Archive of SID

# تعیین ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری عامل بیماری خوشه صمغی گندم در جنوب استان کرمان

میثم آزادی مقدم[۱]، ذبیح‌اله اعظمی ساردوئی[۲]، مهدی آزادوار[۳*] و خدیجه سالاری[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۵)

## چکیده

**بیست‌ویک جدایه باکتری از توده‌های گندم محلی جنوب استان کرمان دارای نشانه‌های بیماری خوشه‌صمغی، جداسازی شد. ویژگی‌های فنوتیپی و افتراقی جدایه‌ها مطابق روش‌های متداول باکتری‌شناسی انجام شد. شناسایی مولکولی و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با تکثیر و تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعه‌هایی از ژن‌های *16S rRNA*، *gyrB* و *recA* بررسی شد. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطعه‌هایی به‌طول ۷۰۰ و ۵۵۸ جفت‌باز به‌ترتیب مربوط به ژن‌های *16S rRNA* و *gyrB* از تمام جدایه‌ها تکثیر شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *recA*، هیچ قطعه‌ای در نمونه‌های مورد بررسی و جدایه شاهد *Rathayibacter tritici* تکثیر نشد، در حالی‌که در جدایه شاهد *R. iranicus* قطعه‌ای به‌طول ۶۰۰ جفت‌باز تکثیر گردید. توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنی تکثیر شده با یکدیگر، با جدایه *R. tritici* و با استرین‌های این باکتری موجود در بانک ژن یکسان بود. نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بررسی داده‌های حاصل از تکثیر و تعیین توالی جایگاه‌های ژنی یاد شده نشان داد که باکتری *R. tritici* عامل بیماری خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان است. این اولین گزارش از وجود این گونه باکتری در استان کرمان است.**

**کلیدواژه:** خوشه‌صمغی، ژن‌های خانه‌داری، گندم، *Rathayibacter*.

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehdiazadvar@gmail.com

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری شناسی‌گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

۲. استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

۳. استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت، ایران.

۴. مربی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

# Phenotypic and genotypic characterization of wheat spike blight bacterium in southern Kerman province

**M. Azadi Moghadam[1], Z. Azami Sardooei[2], M. Azadvar[3*], and K. Salari[4]**

(Received: 18.9.2018; Accepted: 14.4.2019)

## Abstract

Twenty-one bacterial strains were isolated from wheat showing spike blight disease symptoms in southern Kerman province. Differential phenotypic features of the strains were studied using common bacteriological methods. Molecular identification of the isolates was studied by amplification and partial sequence analyses of *16S rRNA*, *gyrB* and *recA* genes. PCR assays using specific primer sets amplified 700 and 558 bp amplicons of *16S rRNA* and *gyrB* genes from all strains, respectively. PCR assay with specific primer set for *recA* gene amplified a 600 bp fragment from *Rathayibacter iranicus*, but not from *R. tritici* strain and the isolated strains from wheat in southern Kerman province, as well. Sequences of the amplicons obtained from each gene locus were identical to those sequences for *R. tritici* reference strains as well as the *R. tritici* strains available in GenBank. Results obtained from phenotypic tests and analyses of the data from amplification and sequencing of the studied gene loci indicated that *R. tritici* is the causal agent of wheat spike blight disease in southern Kerman province. To the best of our knowledge, this is the first report of *R. tritici* on wheat in Kerman province.

**Keywords:** Gummy spike, Housekeeping genes, *Rathayibacter*, wheat.

*Corresponding author's E-mail: mehdiazadvar@gmail.com

1. M.Sc. student of Plant Pathology, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.
2. Assistant Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.
3. Research Assistant Professor, Plant Protection Department, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran.
4. Lecturer, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.


www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

گندم(*Triticum aestivum* L.) به‌خاطر نقش مهمی که در عرصه سیاسی و اقتصادی کشورها ایفا می‌کند از اهمیت ویژه‌ای در بین محصولات کشاورزی برخودار است. در سال زراعی ۱۳۹۵، سطح زیرکشت گندم در ایران ۵۹۲۸۷۲۸ میلیون هکتار با تولید ۱۴۵۹۲۰۰۳ میلیون تن بوده است (Ebadzadeh *et al.* 2017). بیماری خوشه‌صمغی (Spike blight) از جمله بیماری‌های باکتریایی غلات در دنیاست که به نام‌های دیگری مانند عسلک، پوسیدگی خوشه زرد، پوسیدگی لزج زرد، یا بیماری Tundu نیز شناخته می‌شود (Paruthi & Gupta 1987). این بیماری ابتدا از هندوستان و سپس از مصر، چین، پاکستان، استرالیا، ترکیه، افغانستان، قبرس، اتیوپی و زامبیا روی گندم، جو و برخی علف‌های هرز خانواده غلات گزارش شد (Hutchinson 1917, Carne 1926, Gupta & Swarup 1968, Collins & Bradbury 1986, Akhtar 1987, Swarup *et al.* 1993). در ایران این بیماری اولین بار در ۱۳۴۰ از مراغه در استان آذربایجان‌شرقی گزارش و عامل آن باکتری Carlson & Vidaver 1982 *Corynebacterium iranicum* نام‌گذاری شد (Scharif 1961). در سال‌های بعد این بیماری از استان‌های خوزستان، فارس، گلستان، سیستان‌وبلوچستان، اصفهان و کرمان نیز گزارش شد (Amani 1969, Babaeizad & Rahimmian, 2002). بارزترین نشانه بیماری خوشه‌صمغی، ترشح صمغ زردرنگ در سنبله است. گلوم، گلومل و سنبلک‌ها رشد کافی ندارند و به صمغ آغشته‌اند. سنبله و گردن سنبله به هنگام خروج از غلاف برگ‌انتهایی به‌خاطر چسبنده بودن، خمیده یا چین‌خورده می‌شود. عامل بیماری خوشه‌صمغی خاکزاد است و انتشار آن به مناطق دوردست توسط بذر آلوده صورت می‌گیرد.

باکتری جنس *Rathayibacter*، عامل بیماری خوشه صمغی گیاهان خانواده‌های Poaceae, Cyperaceae, Asteraceae و Primulaceae دارای ۸ گونه مختلف است (Skerman *et al.* 1980, Zgurskaya *et al.* 1993, Sasaki *et al.* 1998, Dorofeeva *et al.* 2002, Riley *et al.* 2004, Vasilenko *et al.* 2016, Dorofeeva *et al.* 2018). گونه‌های *R. tritici* و *R. iranicus* عوامل بیماری خوشه‌صمغی در گندم هستند (Amani 1969, Zgurskaya *et al.* 1993). گونه *R. iranicus* تاکنون فقط از ایران و ترکیه گزارش شده‌است (Scharif 1961, Postnikova *et al.* 2009) و ایران تنها کشوری است که دو گونه *R. tritici* و *R. iranicus* به‌عنوان عوامل بیماری خوشه‌صمغی گندم از آن گزارش شده‌است. بررسی‌های قبلی در ایران نشان داد که این بیماری در استان‌های آذربایجان شرقی (مراغه و شبستر)، فارس (ظفرآباد)، کرمان (شهربابک)، ایلام (ایلام) و کهگیلویه‌وبویراحمد (یاسوج) ناشی از گونه *R. iranicus* و در استان‌های خوزستان (اهواز و دزفول)، گلستان (کلاله و گنبدکاووس) و سیستان‌وبلوچستان (ایرانشهر) ناشی از گونه *R. tritici* است (Amani 1969, Nikakhtar *et al.* 2016, Babaeizad & Rahimmian 2002, Soltani *et al.* 2011). در استان اصفهان عامل بیماری خوشه‌صمغی گندم در شهرستان‌های مبارکه و لنجان گونه *R. iranicus* و در شهرستان شهرضا گونه *R. tritici* گزارش شده‌است (Babaeizad & Rahimmian 2002). در سال‌های اخیر بیماری خوشه‌صمغی در مزارع گندم جنوب استان کرمان مشاهده شد (Azadvar *et al.* 2017)، اما شناسایی گونه، تعیین ویژگی‌های باکتری عامل بیماری و مقایسه مولکولی آن با سایر جدایه‌های ایرانی و دنیا بررسی نشده است. تکنیک‌های مبتنی بر PCR از جمله توالی‌یابی ژن *16S rRNA* و برخی ژن‌های خانه‌دار به


www.SID.ir

Archive of SID

عنوان روش‌های قابل اعتماد نسبت به آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی، در شناسایی دقیق و بررسی تنوع درون گونه‌ای باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Singh *et al.* 2009). در این تحقیق، باکتری‌های جدا شده از مزارع گندم مبتلا به بیماری خوشه‌صمغی در جنوب استان کرمان براساس خصوصیت‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی و همچنین روش‌های مولکولی مبتنی بر تکثیر و تعیین توالی ژن‌های *16S rRNA*، *gyrB* و *recA* مورد بررسی قرارگرفتند.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی باکتری عامل بیماری

طی سال‌های زراعی ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از مزارع گندم جنوب استان کرمان شامل شهرستان‌های قلعه‌گنج، رودبارجنوب، جیرفت، کهنوج، فاریاب و عنبرآباد بازدید به‌عمل آمد. بوته‌های گندم دارای نشانه‌های بیماری خوشه‌صمغی به‌طور تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعاتی از خوشه‌های دارای نشانه‌های بیماری خوشه‌صمغی، زیر جریان ملایم آب شسته و پس از ضدعفونی با محلول ۰/۵٪ هیپوکلریت‌سدیم و شستشو با آب‌مقطر، در آب‌مقطر سترون خرد شدند. پس از ۲۰ دقیقه، یک لوپ از سوسپانسیون به‌دست آمده روی محیط آگار غذایی حاوی ۰/۵ درصد سوکروز (NAS) مخطط شد. تشتک‌های پتری به‌مدت حداقل ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌سلسیوس نگهداری شدند. تک پرگنه‌های زرد لعاب‌دار غالب از هر تشتک پتری انتخاب شدند. سپس سوسپانسیونی از هر کدام از پرگنه‌ها به صورت جداگانه تهیه و روی محیط NAS مخطط و خالص‌سازی شدند (Schaad *et al.* 2001).

### آزمون‌های فنوتیپی افتراقی

تعدادی آزمون فنوتیپی کلیدی به منظور شناسایی مقدماتی جنس باکتری عامل بیماری و چند آزمون افتراقی به منظور تمایز گونه جدایه‌های منتخب انجام گرفت (Nikakhtar *et al.* 2016). از جدایه‌های شناخته شده *R. tritici* (RT) و *R. iranicus* (RI) (Nikakhtar *et al.* 2016) به عنوان شاهد مثبت در آزمون‌های فنوتیپی و بررسی‌های مولکولی استفاده شد. آزمون‌های اکسیداز براساس روش کواکس، (Kovacs 1956)، هیدرولیز توئین ۲۰ و ۸۰ به روش میثاقی و گروگان (Misaghi & Grogan 1969)، توانایی ایجاد فوق‌حساسیت در توتون به روش کلمنت و همکاران (Klement *et al.* 1964) و آزمون‌های حلالیت در KOH سه درصد، کاتالاز، رشد در نمک‌طعام ۲٪، ۳٪، ۴٪ و ۵٪، تولید لوان و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی براساس روش شاد و همکاران Schaad *et al.* (2001) انجام شد.

### استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA از ۲۱ جدایه باکتری منتخب و استرین‌های شاهد مثبت *R. tritici* و *R.iranicus* براساس روش ویلسون (Wilson 1997) انجام شد. رسوب حاصل (DNA) در ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر سترون حل گردید و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. قبل از انجام PCR، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermo Scientific Nanodrop One C, USA) تعیین و در غلظت مناسب تنظیم شد.

### واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

تمام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۵۰


www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۱ .نام و توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق**

**Table 1. Description of the used primers in this study**

| Primer name<br>نام آغازگر | Sequence (5′ to 3′)<br>توالی نوکلئوتیدی | Target gene<br>ژن هدف | Amplicon size (bp)<br>اندازه قطعه تکثیرشده (جفت باز) | Reference<br>منبع |
|---|---|---|---|---|
| MAF16 | GCTCGTAGGCGGTTTGTC | *16S rRNA* | 700 | Nikakhtar *et al.* 2016 |
| MAR16 | GGTATCGCAGCCCTTTGT | | | |
| 2F | ACCGTCGAGTTCGACTACGA | *gyrB* | 558 | Richert *et al.* 2005 |
| 4R | CCTCGGTGTTGCCSARCTT | | | |
| recAF | GTCTTGGCAGCGACGAAC | *recA* | 600 | Nikakhtar *et al.* 2016 |
| recAR | CGGACGGAGGCGTAGAA | | | |

میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر 10x PCR buffer (سیناکلون، ایران)، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۲ میلی‌مولار از مخلوط dNTP، ۰/۲ میکرومولار از هریک از آغازگرها ( Bioneer, south Korea)، ۰/۵ واحد آنزیم پلیمراز *Taq* (سیناکلون، ایران) و ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو انجام شد.

شناسایی مولکولی و تایید جنس جدایه‌های منتخب، با با تکثیر و تعیین توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن *16S rRNA* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی MAF16/MAR16 (Nikakhtar *et al.* 2016) انجام گرفت (جدول ۱). چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه بود ( Nikakhtar *et al.* 2016, Richert *et al.* 2005).

شناسایی گونه جدایه‌های بدست آمده با تکثیر و تعیین توالی نوکلئوتیدی بخش‌هایی از ژن‌های خانه‌دار *gyrB* و *recA* به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای 2F/4R و recAF/recAR ( Richert *et al.* 2005, Nikakhtar *et al.* 2016) انجام شد (جدول ۱).

برنامه ترموسایکلر برای تکثیر بخشی از ژن *gyrB* بصورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه و سپس ۳۸ چرخه شامل واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه و دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. مرحله گسترش نهایی رشته‌ها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه به کار برده شد ( Richert *et al.* 2005).

برنامه زمانی و دمایی برای تکثیر بخشی از ژن *recA* شامل واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۴۶ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه بود. مرحله گسترش نهایی رشته‌ها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت هفت دقیقه انجام شد (Nikakhtar *et al.* 2016).

برای بررسی نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تعیین اندازه قطعات تکثیر شده، بخشی از محصول هر واکنش در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. از نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی DNA (سیناکلون، ایران) برای تعیین وزن


www.SID.ir

Archive of SID

مولکولی قطعه‌های تکثیری استفاده شد. مشاهده نتایج و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه مستندساز ژل (KIAGEN, Iran) انجام شد.

### تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل داده‌ها

قطعه‌های تکثیر شده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز متعلق به ژن‌های مختلف ۷ جدایه باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان و جدایه‌های شاهد برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره‌ی جنوبی ارسال شدند. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (Hall 1999) ویرایش و با استفاده از نرم‌افزار BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) همسانی آنها با توالی‌های موجود در بانک ژن جهانی NCBI مقایسه و درصد تشابه آن‌ها با گونه‌های مختلف *Rathayibacter* بررسی شد. ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) و بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده و توالی‌های منتخب از بانک ژن، به روش Neighbor joining و با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ انجام گرفت.

## نتایج و بحث

### جداسازی عامل بیماری ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها

در بازدید از مزارع گندم جنوب استان کرمان، نشانه‌های بیماری خوشه صمغی فقط در توده‌های گندم بومی مشاهده شد. در بوته‌های بیمار، خوشه‌های آلوده پیچ‌خورده بودند و صمغ زردرنگ روی خوشه، برگ‌های نزدیک به خوشه و قسمتی از ساقه مشاهده شد. بذرها به طور کامل تشکیل نشده و خوشه‌ها ناقص بودند. از کشت مخطط این نمونه‌ها روی محیط‌کشت NAS پس از ۷۲ ساعت پرگنه‌های لعاب‌دار کمی برجسته و به رنگ زرد تیره به دست آمد. از ۲۵ نمونه گندم جمع آوری شده از شهرستان‌های جیرفت، عنبرآباد، کهنوج، فاریاب، رودبار جنوب و قلعه‌گنج در جنوب استان کرمان، ۲۱ جدایه باکتری خالص‌سازی و در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

در مجموع ۱۳ خصوصیت فنوتیپی افتراقی ۲۱ جدایه باکتری عامل بیماری خوشه صمغی بدست‌آمده از جنوب استان کرمان و استرین‌های *R. tritici* و *R. iranicus* به عنوان شاهد مثبت بررسی شد. واکنش تمامی جدایه‌ها در آزمون‌های حلالیت در KOH سه درصد، کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز توین۲۰، تحمل نمک طعام ۲٪ و ۳٪، واکنش فوق‌حساسیت در برگ توتون و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، یکسان و با خصوصیت‌های جدایه‌های شاهد RT و RI کاملا مشابه بود (جدول ۲). این نتایج، تعلق جدایه‌های مذکور به *Rathayibacter* sp. را تایید می‌کند (Nikakhtar *et al.* 2016, Zgurskaya *et al.* 1993, Dorofeeva *et al.* 2002 and 2018, Babaeizad & Rahimian 2002). جدایه‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان توانایی هیدرولیز توین۸۰ را نداشتند اما قادر به تولید پلی‌ساکارید لوان در محیط‌کشت آگارغذایی حاوی ۵ درصد سوکروز بودند. اکثر جدایه‌ها قادر به رشد در حضور نمک‌طعام ۴٪ بودند. این ویژگی‌ها با خصوصیت‌های فنوتیپی جدایه شاهد RT و در بیشتر موارد با خصوصیت‌های فنوتیپی ذکرشده برای این گونه در بررسی‌های قبلی (Nikakhtar *et al.* 2016, Babaeizad & Rahimian 2002, Zgurskaya *et al.* 1993)، یکسان ولی با خصوصیت‌های فنوتیپی جدایه شاهد RI متفاوت بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که جدایه‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان بجز از نظر


www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۲ . خصوصیت‌های فنوتیپی باکتری‌های جداشده از نمونه‌های گندم مبتلا به خوشه‌صمغی در جنوب استان کرمان.**

**Table 2. Phenotypic features of the bacteria isolated from wheat spike blight samples in southern Kerman province.**

| Characteristic<br>خصوصیت | Isolated *Rathayibacter tritici* strains<br>استرین‌های *R. tritici* جداسازی شده | Reference strains<br>جدایه‌های شاهد | |
|---|---|---|---|
| | | *R. tritici* | *R. iranicus* |
| KOH 3% (w/v) solubility | + | + | + |
| HR on tobacco | + | + | + |
| Catalase | + | + | + |
| Oxidase | - | - | - |
| Levan formation | + | + | - |
| Tween 20 hydrolysis | + | + | + |
| Tween 80 hydrolysis | - | - | + |
| Potato rot | - | - | - |
| Growth in 2% (W/V) NaCl | + | + | + |
| Growth in 3% (W/V) NaCl | + | + | + |
| Growth in 4% (W/V) NaCl | V(77.2) | + | - |
| Growth in 5% (W/V) Nacl | - | - | - |
| Colony color | Dark yellow | Light yellow | Dark yellow |

+: واکنش مثبت، -: واکنش منفی، V: واکنش متغیر (عدد داخل پرانتز درصد جدایه‌های با واکنش مثبت).

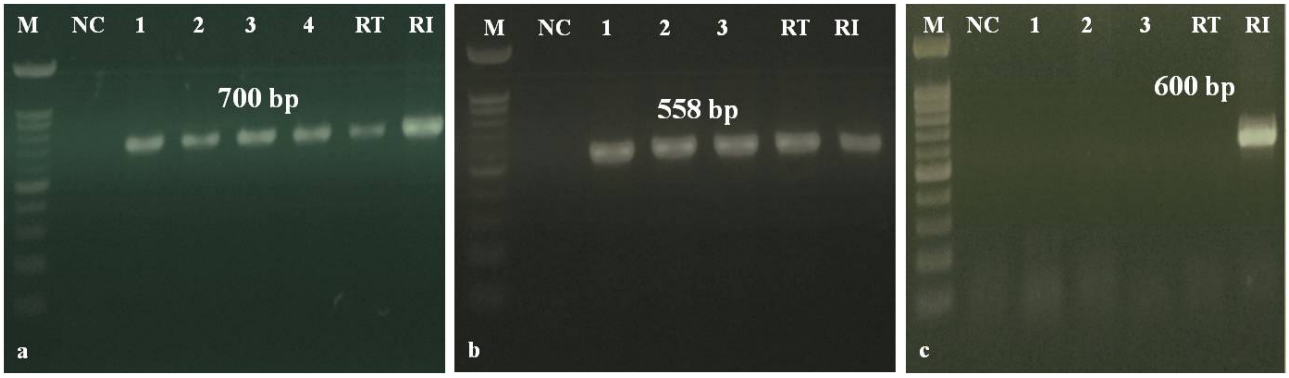
+: positive reaction, -: negative reaction, V: variable reaction (percentage of positives in parenthesis

رنگ پرگنه و توانایی رشد در حضور نمک طعام ۴٪، در سایر خصوصیات فنوتیپی مورد بررسی، شباهت بسیار بالایی به جدایه شاهد *R. tritici* دارند و به احتمال زیاد متعلق به این گونه می‌باشند.

بررسی حاضر نشان داد که ۷۷/۲ درصد از جدایه‌های *R. tritici* بدست آمده از جنوب استان کرمان قادر به تحمل نمک‌طعام چهار درصد بودند و ۲۲/۸ درصد جدایه‌ها و همچنین جدایه شاهد *R. iranicus* قادر به تحمل این میزان نمک نبودند . نیک‌اختر و همکاران (Nikakhtar *et al.* 2016) بیان نمودند که جدایه‌های *R. iranicus* بدست آمده از گندم در استان‌های مختلف کشور، قادر به تحمل نمک‌طعام ۴٪ هستند درحالی‌که جدایه‌های *R. iranicus* جداشده از جو حتی قادر به تحمل نمک‌طعام ۲٪ نبودند. تحمل نمک‌طعام ۵٪ در برخی جدایه‌های *R.tritici* در بررسی‌های قبلی گزارش شده است ( Zgurskaya *et al.* 1993, Dorofeeva *et al.* 2018). در مطالعه بابائی‌زاد و رحیمیان Babaeizad & (Rahimian 2002) جدایه‌های ایرانی باکتری *R. tritici* توانایی ایجاد فوق‌حساسیت در شمعدانی را نداشته ولی قادر به هیدرولیز توین۸۰ بودند که با نتایج این تحقیق متفاوت است. پرگنه‌های جدایه‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان در محیط‌کشت آگار غذایی سوکروز به رنگ زرد تیره و از این نظر به پرگنه‌های جدایه شاهد RI شبیه بودند. تناقض در برخی خصوصیت‌های فنوتیپی ذکر شده برای جدایه‌های ایرانی باکتری عامل خوشه صمغی ممکن است به دلیل تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها ناشی از تفاوت در میزبان و یا مکان جغرافیایی نمونه‌برداری باشد. با توجه به قدمت بیماری خوشه‌صمغی در ایران، وجود دو گونه *R. tritici* و *R. iranicus* در این کشور و بومی بودن گونه *R. iranicus*، لازم است بررسی جامعی درخصوص پراکنش، تعیین ویژگی‌های فنوتیپی و مولکولی و تنوع ژنتیکی عوامل


www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ۱. نقوش الکتروفورزی قطعات تکثیر شده از DNA گونه‌های باکتری *Rathayibacter* عامل خوشه صمغی گندم در ژل آگارز مربوط به بخشی از جایگاه‌های ژنی *16S rRNA* (a)، *gyrB* (b) و *recA* (c) به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای MAF16/MAR16، 2F/4R و recAF/recAR. M) نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران)، NC) کنترل منفی (بدون DNA)، ٤-١ ) استرین‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم جداشده از جنوب استان کرمان، RT) شاهد مثبت *Rathayibacter tritici*، RI) شاهد مثبت *Rathayibacter iranicus*.**

**Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplicons from DNA of *Rathayibacter* species causing wheat spike blight. Partial amplification of *16S rRNA* (a), *gyrB* (b) and *recA* (c) loci using MAF16/MAR16, 2F/4R and recAF/recAR primer pairs, respectively. Lane 1 to 4, wheat spike blight strains collected from southern Kerman province; M) 100 bp DNA ladder (Sinaclon, Iran); NC) negative control (no DNA); RT (*R. tritici*) and RI (*R. iranicus*) as positive controls.**

بیماری خوشه صمغی گندم و جو در نقاط مختلف ایران انجام گیرد.

درحالی‌که بابایی‌زاد و رحیمیان (Babaeizad & Rahimian 2002) هر دو گونه باکتری *R. tritici* و *R. iranicus* را در ایجاد بیماری خوشه صمغی گندم در ایران دخیل دانسته‌اند، نیک اختر و همکاران (Nikakhtar *et al.* 2016) در بررسی خود نتیجه‌گیری نمودند که تمام یا اکثر جدایه‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم از استان‌های مختلف کشور متعلق به گونه *R. iranicus* می‌باشند. در تحقیق حاضر برای شناسایی دقیق و تایید گونه باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان از نشانگر مولکولی مبتنی بر تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن‌های *16S rRNA*، *gyrB* و *recA* استفاده شد (Nikakhtar *et al.* 2016).

## آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگرهای MAF16 /MAR16 و 2F/4R، مطابق انتظار (Nikakhtar *et al.* 2016, Richert *et al.* 2005) به‌ترتیب منجر به تکثیر قطعه‌هایی به اندازه ۷۰۰ و ۵۵۸ جفت‌باز در تمام جدایه‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان و هم‌چنین جدایه‌های شاهد RT و RI شد (شکل ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر recAF/recAR اگرچه منجر به تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت بازی در جدایه شاهد RI شد، اما هیچ نوار دی ان آ در جدایه‌های باکتری عامل خوشه صمغی گندم جنوب استان کرمان و جدایه شاهد RT تولید نکرد (شکل ۱). از این ویژگی می‌توان برای توسعه نشانگرهای مولکولی قابل اطمینان، از جمله تکنیک duplex PCR، برای شناسایی و تمایز سریع دو گونه *R. tritici* و *R. iranicus* استفاده نمود.

## تعیین توالی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

توالی‌های به‌دست آمده از ژن‌های *16S rRNA*، *gyrB* و


www.SID.ir

Archive of SID

*recA* جدایه‌های باکتری در این تحقیق و جدایه‌های شاهد RT و RI، پس از ویرایش با نرم‌افزار BioEdit، به‌طور جداگانه با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. نتایج نشان داد توالی‌های نوکلئوتیدی هریک از نواحی ژنی، در تمام جدایه‌های منتخب باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان با یکدیگر یکسان است و تنوعی در آن‌ها مشاهده نشد. براین اساس باکتری عامل خوشه صمغی گندم در جنوب استان کرمان از همگونی بسیار بالایی برخوردار است.

توالی نوکلئوتیدی قطعه‌های تکثیری جدایه‌های منتخب A13، A16 و A20 حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر MAF16 /MAR16 با رس‌شمارهای MH793592 تا MH793594 در بانک ژن ثبت شدند. جستجو در بانک ژن نشان داد که این توالی‌ها ۹۹٪ تا ۱۰۰٪ با توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* گونه‌های مختلف باکتری *Rathayibacter* ازجمله *R. tritici* (KX758080)، *R. rathayi* (NR026159)، *Rathayibacter* sp. (MG860349)، *R. festucae* (KX758068)، *R. caricis* (KX527664)، *R. tanaceti* (KU891049)، و *R. iranicus* (NR118543) شباهت دارند. این نتایج تایید می‌کند که باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان متعلق به یکی از گونه‌های جنس *Rathayibacter* است. برای شناسایی گونه این جدایه‌ها، تکثیر و توالی نوکلئوتیدی دو ژن خانه‌دار *gyrB* و *recA* بررسی شد.

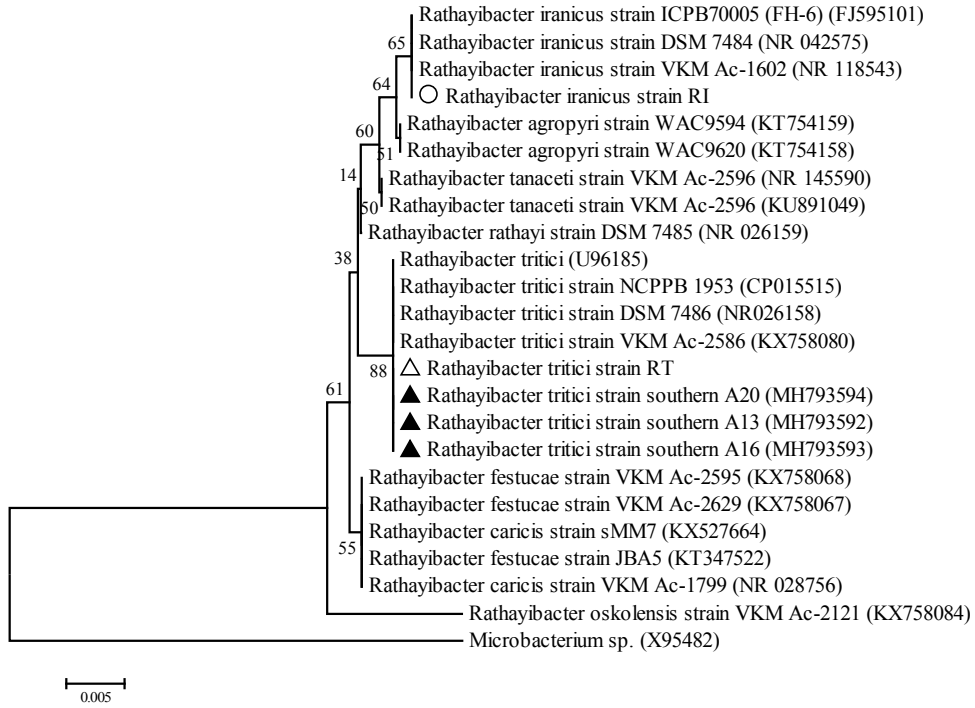
توالی نوکلئوتیدی قطعه‌های تکثیری حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر 2F/4R جدایه‌های منتخب باکتری عامل خوشه‌صمغی بدست آمده از جنوب استان کرمان با کدهای A13، A16 و A20 (که به‌ترتیب با رس‌شمارهای MH823903، MH823904 و MH823905 در بانک ژن ثبت شدند) یکسان بود. این توالی‌ها ۱۰۰٪ با توالی نوکلئوتیدی ژن *gyrB* استرین‌های VKM-Ac-1603 (KX758033) و LMG3726 (FR727975) و ۹۹٪ با توالی نوکلئوتیدی استرین‌های VKM-Ac-2589 (KX758038) و NCPPB1953 (CP015515) همگی متعلق به گونه *R. tritici* و به میزان ۹۴٪ و یا کمتر با توالی نوکلئوتیدی همین ژن در سایر گونه‌های *Rathayibacter* مشابهت دارند. براین اساس جدایه‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان متعلق به گونه‌ی *R. tritici* هستند. این نتیجه موید نتایج حاصل از آزمون‌های فنوتیپی (جدول ۲) است.

قطعه ۶۰۰ جفت بازی تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای recAF/recAR در جدایه شاهد RI، به میزان ۱۰۰ درصد با توالی نوکلئوتیدی استرین‌های CFBP807 (JX890262)، Z1 (KF922384)، 22 (KP768444) و DSM 7484 (AM410812) باکتری *R. iranicus* و کمتر از ۸۰٪ با توالی سایر گونه‌های *Rathayibacter* موجود در بانک ژن تشابه داشت. این نتیجه موید نتایج قبلی و بیانگر تعلق جدایه‌های باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان به گونه *R. tritici* و تمایز آن‌ها از گونه *R. iranicus* است. نیک اختر و همکاران (Nikakhtar *et al.* 2016) نیز در بررسی خود از این جفت آغازگر برای تکثیر بخشی از ژن رکامبیناز در جدایه‌های مختلف گونه *R. iranicus* استفاده نمودند.

نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنتیکی براساس توالی بخشی از ژنوم *16S rRNA* نشان داد که جدایه‌های منتخب باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان (A20, A16, A13) و جدایه شاهد RT، به همراه استرین‌های مختلف باکتری *R. tritici* در یک گروه قرار می‌گیرند. اگرچه درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس


www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس ترادف‌های نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* جدایه‌های A13، A16 و A20 باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان(▲)، جدایه‌های شاهد *Rathayibacter tritici* (Δ) و *Rathayibacter iranicus* (○) و نمایندگان سایر گونه‌های *Rathayibacter* موجود در بانک ژن با استفاده از روش Neighbor-joining و درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰. از *Microbacterrium* sp. به عنوان خارج از گروه استفاده شد.**

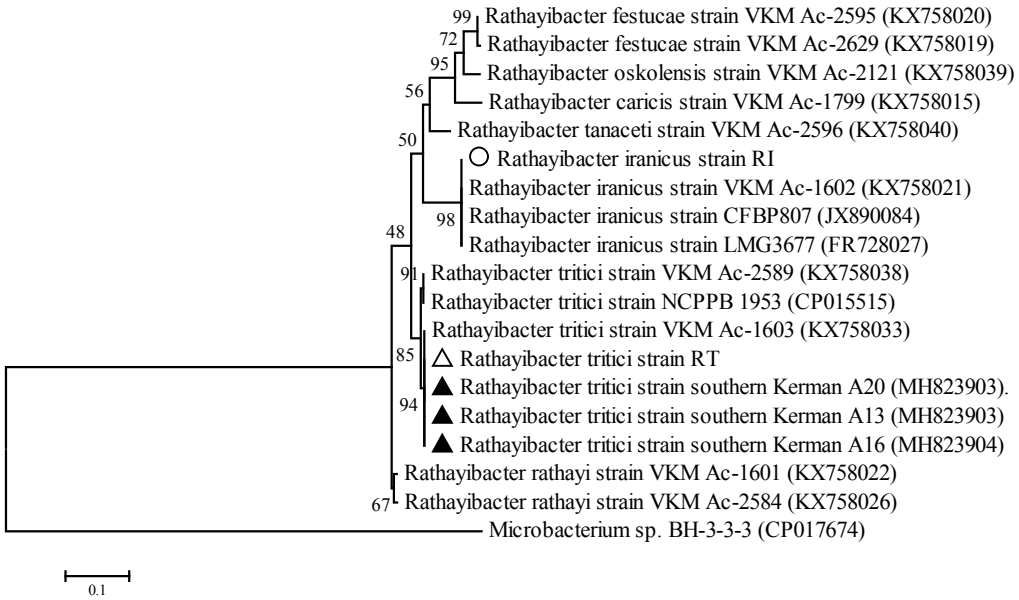
**Figure 2. Phylogenetic tree constructed using *16S rRNA* gene partial sequences of A13, A16 and A20 *Rathyibacter tritici* strains collected from southern Kerman province (▲), *R. tritici* (Δ) and *R. iranicus* (○) reference strains and other *Rathayibacter* species representatives available in GenBank, by Neighbor-joining method with 1000 bootstrap. *Microbacterium* sp. was used as out -group.**

توالی نوکلئوتیدی ژن بسیار محافظت شده *16S rRNA* قادر به تمایز گونه‌های *R. festucae* و *R. caricis* از یکدیگر نبود اما سایر گونه‌های این باکتری به‌خوبی از یکدیگر تفکیک شده و در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. براین اساس جدایه‌های منتخب باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان بسیار همگون بوده و متعلق به گونه *R. tritici* می‌باشند (شکل ۲).

نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنتیکی براساس توالی ناحیه ژنی *gyr*B نشان داد که جدایه‌های عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان (A13 ، A16 و A20) و جدایه شاهد (RT) *R. tritici* بیشترین قرابت را با استرین VKM Ac-1603 باکتری *R. tritici* (KX758033) داشته و به عنوان یک زیرگروه، به همراه زیرگروه دیگری مشتمل بر استرین‌های VKM AC-2589 (KX758038) و NCPPB 1935 (CP015515) در یک شاخه اصلی قرار می‌گیرند. براین اساس این نشانگر ضمن اینکه گونه‌های مختلف باکتری *Rathayibacter* را از یکدیگر متمایز می‌سازد قادر به تفکیک استرین‌های باکتری *R. tritici* به دو گروه مجزا نیز می‌باشد. توپولوژی درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی نوکلئوتیدی ژن *gyrB* (شکل ۳) موید نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* می‌باشد.


www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس ترادف نوکلئوتیدی ژن *gyrB* جدایه‌های A13 ، A16 و A20 باکتری عامل خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان(▲)، جدایه‌های شاهد *Rathayibacter tritici* (Δ) و *Rathayibacter iranicus* (○) و نمایندگان سایر گونه‌های *Rathayibacter* موجود در بانک ژن با استفاده از روش Neighbor-joining و درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰. از *Microbacterrium* sp. به عنوان خارج از گروه استفاده شد.**

**Figure 3. Phylogenetic tree constructed using *gyrB* gene sequences of A13, A16 and A20 *Rathyibacter tritici* strains collected from southern Kerman province (▲), *R. tritici* (Δ) and *R. iranicus* (○) reference strains and other *Rathayibacter* species representatives available in GenBank, by Neighbor-joining method with 1000 bootstrap. *Microbacterium* sp. was used as out -group**

براساس تشابه بالای خصوصیت‌های فنوتیپی جدایه‌های باکتری عامل خوشه صمغی گندم در جنوب استان کرمان با باکتری *R. tritici* و توپولوژی درخت‌های فیلوژنیکی مبتنی بر توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنی *16S rRNA* و *gyrB* مشخص می‌شود که عامل بیماری خوشه‌صمغی گندم در جنوب استان کرمان گونه *R. tritici* است. با توجه به اینکه این باکتری در جنوب استان کرمان فقط از توده‌های گندم بومی جداسازی شده است به احتمال زیاد باکتری *R. tritici* از قبل در این منطقه وجود داشته و یک بیمارگر وارداتی نیست. قبلا گونه *R. iranicus* به عنوان عامل بیماری خوشه‌صمغی از مزارع گندم شمال استان کرمان گزارش شده است (Babaeizad & Rahimmian 2002, Nikakhtar et al. 2016). براساس اطلاعات موجود این اولین گزارش از وجود باکتری *R. tritici* همراه با بیماری خوشه‌صمغی گندم در استان کرمان می‌باشد. براساس اطلاعات قبلی درخصوص پراکنش بیماری خوشه‌صمغی گندم در ایران و نتایج حاصل از این تحقیق، اصفهان و کرمان تنها استان‌هایی هستند که تاکنون هر دو گونه باکتری *R. tritici* و *R. iranicus* به عنوان عوامل خوشه‌صمغی از آن‌ها گزارش شده است.

## سپاسگزاری

از آقای دکتر پژمان خدایگان بخاطر در اختیار قرار دادن استرین‌های باکتری دو گونه *R. tritici* و *R. iranicus* تشکر می‌شود.


www.SID.ir

Archive of SID

## منابع


Akhtar A. 1987. Bacterial gumming disease of wheat. FAO Plant Protection Bulletin 35:102.

Amani B. 1969. Gummy spike blight disease. Iranian Journal of Plant Pathology 1:15-24. (in Persian with English Summary)

Azadvar M., Sharifi M., Rooshan K. A., Amiri M., Azadi Moghaddam M. and Azami Sardooei Z. 2017. First report of gummy spike blight disease of wheat in southern Kerman. First International and Second National Conference of Agriculture, Environment and Food Security, University of Jiroft. Jiroft. Iran. (in Persian with English Summary)

Babaeizad V. and Rahimian H. 2002. Identity and distribution of *Rathayibacter* species causing gummy spike blight of wheat in some wheat growing areas of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 38:47-55. (in Persian with English Summary)

Carne W. M. 1926. Earcockle (*Tylenchus tritici*) and bacterial disease (*Pseudomonas tritici*) of wheat. Journal of Agriculture Western Australia 3:508-512.

Collins M. D. and Bradbury J. F. 1986. Plant pathogenic species of *Corynebacterium*, pp. 1276-1284. in: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Vol. 2. Baltimore, MD: The Williams & Wilkins Co.

Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I., Krausova V. I., Karpov A. V., Subbotin S. A. and Tiedje J. M. 2002. *Rathayibacter caricis* sp. nov. and *Rathayibacter festucae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Carex* sp. and the leaf gall induced by the nematode *Anguina graminis* on *Festuca rubra* L., respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52:1917–1923.

Dorofeeva L. V., Starodumova I. P., Krauzova V. I., Prisyazhnaya N. V., Vinokurova N. G., Lysanskaya V. Y., Tarlachkov S. V. and Evtushenko L. I. 2018. *Rathayibacter oskolensis* sp. nov., a novel actinobacterium from Androsace kosopoljanskii Ovcz. (Primulaceae) endemic to the central Russian Upland. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 68:1442-1447.

Ebadzadeh H. R., Ahmadi K., Mohammadnia Afroozi S., Abbas Taghani R., Abbasi M. and Yari S. 2017. Agricultural statistics 1395. (Vol. 1) Ministry of Jihad -e- Agriculture. Tehran, Iran.

Gupta P. and Swarup G. 1968. On the ear cockle and yellow ear rot diseases of wheat. 1. Symptoms and histopathology. Indian Phytopathology 21:318-323.

Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium series 41:95-98.

Hutchinson O. M. 1917. A bacterial disease of wheat in the Punjab. Memoirs of the Department of Agriculture in India. Bacteriological Series 17:75-169.

Klement Z., Farkas G. L. and Lovrekovich L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. Phytopathology 54:474.

Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. Nature 178:703.

Misaghi I. and Grogan R. G. 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent *pseudomonas*. Phytopathology 59:1436-1450.

Nikakhtar S., Rahimian H. and Babaeizad V. 2016. Evaluation of the phenotypic and genotypic diversity of the bacterial species causing gummy spike blight of wheat and barley. Journal of Agricultural Biotechnology 8:139 -156. (in Persian with English Summary)

Paruthi I. J. and Gupta D. C. 1987. Incidence of 'tundu' in barley and kanki in wheat field infested with *Anguina tritici*. Haryana Agricultural University Journal of Research 17:78–79.

Postnikova E., Agarkova I., Altundag S., Eskandari F., Sechler A., Karahan A., Vidaver A. K., Schneider W., Ozakman M. and Schaad N. W. 2009. *Rathayibacter iranicus* isolated from symptomless wheat seeds in Turkey. Plant Pathology 58:796.

Richert K., Brambilla E. and Stackebrandt E. 2005. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria order Actinomycetales. Current Microbiology 60:115–123.

Riley I. T., Swart A., Postnikova E., Agarkova I., Vidaver A. and Schaad N. 2004. New association of a toxigenic *Rathayibacter* sp. and *Anguina woodi* in *Ehrharta villosa* var.*villosa* in South Africa. Phytopathology 94:S88.



www.SID.ir

Archive of SID

Sasaki J., Chijimatsu M. and Suzuki K. 1998. Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48:403–410.

Schaad N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed., APS Press., St. paul, Minnesota, USA. 373 p.

Scharif G. 1961. *Corynebacterium iranicum* sp. nov. on wheat (*Triticum vulgare* L.) in Iran, and a comparative study of it with *C. tritici* and *C. rathayi*. Entomologie et Phytopathologie Appliques 19:1–24.

Singh S., Goswami P., Singh R. and Heller K. J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. LWT-Food Science and Technology 42:448–457.

Skerman V. B. D., McGowan V. and Sneath P. H. A. 1980. Approved lists of bacterial names. International Journal of Systematic Bacteriology 30:225-420.

Soltani M., Rahimian H. and Babaeizad V. 2011. The assessment of genetic diversity of strains of *Rathayibacter iranicus* (the causal agent of gummy spike blight in wheat) in Isphahan and Fars using REP-PCR. 7th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran. Niroo Research Institute, Tehran, Iran. 5 pages.

Swarup G., Sethi C. L. and Goten N. 1993. Ear cockle (nematode gall) and yellow slime, pp. 153-161. In: S. B. Mathur and B. M. Cunfer (Eds). Seed borne diseases and seed health testing of wheat. Jordbrug Forlaget, Frederiksberg, Denmark.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.

Vasilenko O. V., Starodumova I. P., Tarlachkov S. V., Dorofeeva L. V., Avtukh A. N. and Evtushenko L. I. 2016. Draft genome sequence of *Rathayibacter tanaceti* strain VKM Ac-2596 isolated from *Tanacetum vulgare* infested by a foliar nematode. Genome Announcements 4:e00512-16. doi:10.1128/genomeA.00512-16.

Wilson K. 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria, 2.4.1-2.4.5. In: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (Eds). Current Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons, New York.

Zgurskaya H. I., Evtushenko L. I., Akimov V. N. and Kalakoutskii L. V. 1993. *Rathayibacter* gen, nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb, nov., *Rathayibacter tritici* comb, nov., *Rathayibacter iranicus* comb, nov. and six strains from annual grasses. International Journal of Systematic Bacteriology 43:143-149.


www.SID.ir