

## بررسی تنوع فنوتیپی و ژنتیکی پاتووارهای *Xanthomonas translucens*، عامل بیماری باکتریایی نواری گندم و جو در بخش‌هایی از ایران

مهشید حبیبیان<sup>۱</sup>، علی علیزاده علی‌آبادی<sup>۲\*</sup>، جمشید حیاتی<sup>۳</sup> و حشمت‌الله رحیمیان<sup>۴</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۲- \* نویسنده مسوول: دانشیار، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران (aalizadeh1340@yahoo.com)
- ۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۴- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۹

### چکیده

تعداد ۱۲ جدایه از میان ۶۷ جدایه عامل بیماری باکتریایی نواری غلات، از گندم، جو، فالاریس و چچم از مناطق مختلف استان‌های کرمان، کرمانشاه و فارس تهیه و خصوصیات باکتری‌شناسی، دامنه میزبانی، ویژگی‌های مولکولی و ژنتیکی آنها مورد بررسی قرار گرفت. کلیه جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز و اوره‌آز منفی و کاتالاز مثبت، دارای رنگ‌دانه زانتومونادین و قادر به تولید هیدروژن سولفور از سیستمین و پیتون بودند. همه جدایه‌ها از قندهای سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، دی‌مانوز، آرایینوز، زایلوز، ترهالوز، آراییتول و نمک‌های استات، سترات و لاکتات استفاده نمودند، اما از سالیسین، مانیتول، ملی‌بیوز، رامنوز، دی‌تارتارات، اینولین، آدونیتول، دلستول، سوریتول و مزواینوزیتول استفاده نکردند. تنها جدایه‌های جو قادر به استفاده از مالتوز و هیدرولیز لستین و نشاسته بودند. جدایه‌ها، از نظر مقایسه پروتئین محلول، دارای الگوی بانندی مشابهی بودند. انگشت نگاری ژنومی جدایه‌ها به روش rep-PCR با استفاده از دو آغازگر ERIC و Box انجام و داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc.2.2 و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA آنالیز شدند. نتایج حاصل نشان داد همه جدایه‌های گندم، فالاریس، چچم و یک جدایه از جو، به همراه جدایه استاندارد UPB922 در یک گروه و سه زیرگروه و بقیه جدایه‌های جو، که تنها روی جو بیماری‌زا بودند، به همراه جدایه استاندارد UPB922 با ضریب تشابه ۸۴ درصد از گروه اول جدا و گروه دوم (با سه زیرگروه) را تشکیل دادند. براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، بیماری‌زایی (دامنه میزبانی)، و تنوع ژنتیکی، جدایه‌های گروه اول به عنوان پاتووار *X. translucens* pv. *undulosa* و جدایه‌های گروه دوم به عنوان پاتووار *X. translucens* pv. *translucens* شناسایی شدند.

کلیدواژه‌ها: بیماری باکتریایی نواری غلات، گندم، جو، *X. translucens*، *X. translucens* pv. *undulosa*، *translucens* pv. *translucens*، آزمون rep-PCR

## مقدمه

بیماری باکتریایی نواری غلات، برای نخستین بار در اوایل قرن بیستم از گندم، جو، چاودار و تریتیکاله گزارش شد. این بیماری تاکنون از کشورهای متعددی در همه قاره‌های دنیا گزارش شده است (Osdaghi, 2020). خسارت ناشی از این بیماری تا بیش از ۴۰ درصد محصول برآورد شده است و میانگین خسارت مزرعه‌ای در حدود ۱۰ درصد محصول است (Adhikari et al., 2011). عامل این بیماری در سال ۱۳۶۶ از مزارع گندم و جو در استان کرمان، سپس از سایر نقاط کشور گزارش و پاتووارهای آن مشخص شد، که عبارت‌اند از *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (ex *X. t.* pv. Jones et al. 1917) Vauterin et al. 1995 *translucens* (ex Jones et al. 1917) Vauterin et al. 1995. دامنه میزبانی *X. t.* pv. *translucens* محدود به جو و *X. t.* pv. *undulosa* شامل گندم، جو، چاودار، چچم، بروموس و آگروپیرون است، اما قادر به ایجاد آلودگی در میزبان یولاف نیست. این بیماری، در سال ۱۹۹۵ از مناطق مختلف گندم کاری بسیاری از استان‌های ایران، گزارش شد (Alizadeh et al., 1995a). جدا به‌های مختلف جمع‌آوری شده از این دو پاتووار در ایران، از نظر بیماری‌زایی متنوع بوده و واکنش ارقام رایج گندم در ایران و برخی از ارقام ایرانی و خارجی جو در برابر این بیماری متفاوت گزارش شده است (Alizadeh et al., 1994a, b, c). مهم‌ترین پاتووارهایی که در حال حاضر به‌عنوان عامل این معرفی شده‌اند، عبارت‌اند از پاتووارهای *translucens undulosa* و *cerealis*. مطالعات زیادی برای بررسی شباهت ژنتیکی و تنوع این پاتووارها با استفاده از مارکرهای DNA، پروفایل بیوشیمیایی، تست‌های بیماری‌زایی و تجزیه و تحلیل و تایپینگ توالی چند کانونی (MLSA/MLST) انجام شده است (Wichmann et al., 2013; Gardiner et al., 2014; Peng et al., 2016; Langosis et al. 2017;

Curland et al., 2018). داده‌های توالی ژنومی حاکی از آن است که پاتووار *cerealis* از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با دو پاتووار دیگر دارد (Peng et al., 2016; Langlois et al., 2017; Hersemann et al., 2017). تفاوت‌هایی از نظر بیماری‌زایی نیز در بین سویه‌های موجود در هر یک از این پاتووارها مشاهده شده است (Adhikari et al., 2011; Sapkota et al., 2018). این گونه علاوه بر غلات و گرامینه‌های علوفه‌ای، گیاهان مارچوبه و پسته را نیز آلوده می‌کند (Rademaker et al., 2006; Marefat et al., 2006a; Marefat et al., 2006b). از لحاظ خصوصیات ژنتیکی، نقش ژن افکتور شبه فعال کننده رونویسی (Tal) و سیستم ترشحی نوع سه (T3SS) این باکتری در بیماری‌زایی، واکنش فوق حساسیت و ترشح افکتورها نیز تعیین شده است (Wichmann et al., 2013; Gardiner et al., 2014; Peng et al., 2016; Pesce et al., 2017). دو سویه از پاتووار *undulosa* یک سویه از پاتووار *translucens* و یک سویه از پاتووار *cerealis* تعیین توالی شده‌اند (Pesce et al. 2014; Jaenicke et al., 2016; Peng et al., 2016; Charkhabi et al., 2017).

شدت این بیماری در ایران از زمان گزارش وقوع آن تا سال ۱۳۸۵ روی گندم و جو بسیار کم بود. متأسفانه از آن سال، به‌ویژه از سال ۱۳۹۰ به بعد، خسارت این بیماری در مزارع گندم آبی برخی از مناطق کشور افزایش یافته است. علائم بیماری باکتریایی نواری غلات، روی برگ‌ها، ابتدا به صورت نقاط، لکه یا خطوط نواری کوچک به رنگ سبز تیره و آب‌سوخته، که به راحتی در برابر نور به حالت شفاف دیده می‌شوند، ظاهر و پس از مدتی به رنگ زرد یا قهوه‌ای شفاف درمی‌آیند. این لکه‌ها می‌توانند روی غلاف‌ها گسترش یابند و از این طریق، آلودگی به ساقه منتقل شود. علائم بیماری روی ساقه، ابتدا آب‌سوخته و سپس زرد و قهوه‌ای روشن تا تیره و نهایتاً قهوه‌ای متمایل به سیاه ظاهر می‌شوند. باکتری عامل نواری غلات می‌تواند سنبله را نیز

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری نمونه و جداسازی عامل بیماری

در سال ۱۳۸۸ از مزارع گندم و جو استان‌های کرمان، کرمانشاه و فارس برگ‌هایی با علائم لکه نواری و آب‌سوخته جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شستشو، قطعات یک تا دو سانتی‌متری از محل لکه‌ها در داخل پتری و آب مقطر استریل قطعه قطعه و پس از گذشت ۲۰ دقیقه یک قطره از هر سوسپانسیون روی محیط کشت آگار غذایی<sup>۱</sup> (NA) به صورت مخطط، کشت داده شدند. پتری‌ها به داخل انکوباتور ۲۷ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند و پس از چهار روز تک کلنی‌های زرد رنگ رشد یافته، به پتری‌های حاوی محیط کشت NA منتقل شدند. از بین ۶۷ جدایه به دست آمده، ۱۲ جدایه (چهار جدایه از گندم، شش جدایه از جو، یک جدایه از فالاریس و یک جدایه از لولیوم)، به عنوان نمایندگان نمونه‌های آلوده، به تفکیک منطقه و میزبان، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت.

### آزمون اثبات بیماری‌زایی

بذور گندم رقم نیک‌نژاد و بذور جو رقم کارون در گلدان‌هایی به قطر ۱۳ سانتی‌متر کاشته و در داخل گل‌خانه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از دوبرگه شدن بوته‌های گندم و جو، آزمون اثبات بیماری‌زایی با دوروش زیر انجام گرفت:

الف. آزمون اثبات بیماری‌زایی با روش پاششی: سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در آب مقطر استریل حاوی نمک طعام ۰/۹ درصد با غلظت  $10^8$  -  $10^9$  باکتری در میلی‌لیتر<sup>۲</sup> تهیه و روی بوته‌های دوبرگی گیاهان پاشیده شد. برای حفظ رطوبت نزدیک به صد درصد، با استفاده از پوشش‌های طلقی روی گلدان‌ها پوشانده شد. گلدان‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بررسی علائم بیماری یک هفته پس از آلوده سازی شروع و تا دوهفته ادامه یافت (Mitkowski et al., 2005).

مورد حمله قرار دهد، علائم بیماری روی سنبله گندم معمولاً به صورت لکه‌های قهوه‌ای روشن، تیره تا سیاه، روی پوشینه‌های سنبله گندم ظاهر می‌شود. به همین دلیل نام دیگر این بیماری پوشینه سیاه است (Sapkota et al., 2020).

باکتری عامل بیماری نواری غلات، محدود به شرایط آب و هوایی مرطوب و معتدل است. مناسب‌ترین درجه حرارت برای توسعه و گسترش این بیماری ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد است. این بیماری می‌تواند در کاه و کلش آلوده، روی علف‌های هرز یک یا چندساله گندمیان، و دامنه وسیعی از گیاهان غیرمیزبان زمستان‌گذرانی کند. این باکتری از طریق بذور آلوده، آب، باد، باران و حشراتی چون تریپس‌ها و شته‌ها و نیز ادوات کشاورزی منتشر می‌شود (Sapkota et al., 2020).

تکنیک‌های متداول باکتری‌شناسی از جمله توالی‌های تکرار شونده ژنومی (rep-PCR) توانسته است به شناسایی و طبقه‌بندی پاتوارهای *X. translucens* کمک کند (Rademaker et al., 2005; Rademaker et al., 2006; Sherafati et al., 2014; Langlois et al., 2017; Mousavipour and Najafipour, 2018; Khojasteh et al., 2019).

باتوجه به گسترش غیرمترقبه این بیماری در کشور و آلوده شدن گسترده مزارع گندم، برای اولین بار در سال‌های اخیر، لازم است یک بار دیگر جدایه‌هایی از باکتری عامل این بیماری مورد شناسایی و با جدایه‌های قبلی مقایسه شود تا احتمال بروز تغییرات ژنتیکی در آن مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق تنوع تعدادی از جدایه‌های این باکتری از گندم، جو و برخی علف‌های گرمینه، به همراه سه جدایه استاندارد که از نمونه‌های قبلی ایرانی (نگهداری شده در کلکسیون بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه لوون لائف بلژیک) هستند (Alizadeh et al., 1995)، با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، ژنتیکی، مولکولی و دامنه میزبانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

گیاهی دانشگاه لوون لائف بلژیک، استفاده شد. جهت کاهش خطای آزمایش، کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید.

### الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی جدایه‌ها در ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE)

در این آزمایش ۱۲ جدایه ایرانی (چهار جدایه از گندم، شش جدایه از جو، یک جدایه از فالاریس و یک جدایه از لولیوم) و سه جدایه استاندارد با یکدیگر مقایسه شدند (Laemmler, 1970; Alizadeh et al., 1996). یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون غلیظ هر جدایه در آب مقطر، تهیه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین (یک میلی‌لیتر بافر ژل بالا، ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول، سدیم دودسیل سولفات ۲٪، ۴۰-۲۰ میکرولیتر برم فنل بلو، ۱۰۰ میکرولیتر مرکاپتواتانل، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به آن اضافه و ۵ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد تا پروتئین‌های محلول باکتری‌ها آزاد شوند. پس از تهیه ژل ده درصد پلی‌اکریل آمید (Laemmler, 1970)، نمونه‌های پروتئینی با سرنگ هاملتون در چاهک‌ها قرار گرفت و در شدت جریان حدود ۲۰ میلی‌آمپر و ولتاژ ۱۰۰، به مدت ۲/۵ تا ۳ ساعت قرار گرفت. آن‌گاه ژل در داخل محلول متانول، آب و اسیداستیک (به نسبت ۵:۵:۱)، حاوی ۰/۱ درصد کومازی بلو به مدت ۱۲ ساعت رنگ‌آمیزی شد. سپس با محلول متانول، آب و اسیداستیک (به نسبت ۵:۵:۱)، شست‌شو و برای تثبیت در اسیداستیک ۷ درصد قرار گرفت. پس از تهیه عکس از ژل‌ها، الگوی باندهای جدایه‌ها با یکدیگر مقایسه شد.

### آزمون rep-PCR

برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها از واکنش rep-PCR استفاده شد. برای این منظور از آغازگرهای 5'-BOXA1R: 5'-ERIC1R: CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' ERIC2: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3' استفاده شد (Versalovic et al., 1994; Versalovic et al., 1991).

ب. تلقیح باکتری به‌روش تزریق: سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در آب مقطر استریل با غلظت باکتری ۱۰<sup>۵</sup>-۱۰<sup>۴</sup> باکتری در میلی‌لیتر تهیه، و با استفاده از سرنگ انسولین استریل، به اپیدرم برگ گیاهان تزریق شد. سپس گلدان‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گل‌خانه به مدت دو هفته نگهداری شدند (Azad and Schaad, 1988). بررسی علائم بیماری سه روز پس از آلوده سازی شروع و تا یک هفته ادامه یافت.

### آزمون‌های بیوشیمیایی

کلیه جدایه‌ها برای آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی زیر مورد بررسی قرار گرفتند: آزمون واکنش گرم با استفاده از پتاس سه درصد (وزن به حجم) (Suslow et al., 1982)، تولید لوان (Lelliot and Stead, 1987)، آزمون واکنش فوق حساسیت در توتون و فلفل (Klement et al., 1990)، تولید گاز از گلوکز، احیای نترات، اوره‌آز (Schaad et al., 2001)، آزمون تولید مواد احیاء کننده از ساکاروز، آزمون‌های کاتالاز، پکتیناز (لهانیدن ورقه‌های سبب زمینی)، هیدرولیز اسکولین، تولید ایندول، هیدرولیز توئین ۸۰ (Lelliot and Stead, 1987)، آزمون‌های آرژینین دهیدرولاز و تولید گاز سولفید هیدروژن از آب پیتونه و سیستین (Schaad et al., 2001)، انجام گردید. آزمون توانایی استفاده از منابع کربوهیدراتی (قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، نمک‌ها و اسیدهای آلی) به‌عنوان تنها منبع کربن با استفاده از محیط پایه آیر [یک گرم فسفات آمونیوم، ۰/۲ گرم کلروپتاسیم، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم، یک میلی‌لیتر از محلول برم تیمول بلو ۱/۶ درصد (وزن به حجم)، ۱۲ گرم آگار خالص و یک لیتر آب مقطر (pH=۷/۲)] انجام گرفت و نتایج روزانه، تا ۱۰ روز، ارزیابی شد (Fahy and Hyward, 1983). همه منابع کربنی با روش تندیازسیون (۱۵ دقیقه جوشاندن در سه روز متوالی) سترون و به غلظت نهایی ۰/۵ درصد به محیط پایه اضافه گردید (Schaad et al., 2001). جهت ارزیابی نتایج آزمون‌ها از سه جدایه ایرانی استاندارد تهیه شده از کلکسیون باکتری‌های بخش بیماری‌شناسی

مایه کوبی، به صورت نقاط ریز آب سوخته در سطح برگ ظاهر شدند. بروز این نقاط، از نوک برگ‌ها آغاز و به تدریج به سمت قاعده برگ‌ها پیش روی کرد، این لکه‌ها پس از چند روز به هم پیوسته و به صورت لکه‌ها و یا نوارهای زرد رنگ آب سوخته گسترش یافتند (شکل ۱). در روش تزریق، علائم بیماری پس از دو روز در محل تزریق به صورت آب سوختگی ظاهر شد. این لکه‌ها به تدریج به بافت اطراف محل تزریق گسترش پیدا کرد. نتایج آزمون نشان داد که تمامی جدایه‌های جو در هر دو حالت پاششی و تزریق، تنها باعث بروز علائم بیماری روی بوته‌های جو (جو کارون) شدند و تنها یکی از جدایه‌های جو (BKR5) توانست گندم نیک‌نژاد را نیز آلوده کند (جدول ۲). علائم روی جو کارون (شکل ۱-ب) مشابه علائم روی بوته‌های گندم (شکل ۱-ا) بود، تنها کشیدگی لکه‌ها روی جو بیشتر از گندم بود. در این مورد نیز ظهور علائم با مایه کوبی به روش تزریق، سریع‌تر از ظهور علائم با مایه کوبی به روش پاششی بود.

### آزمون‌های بیوشیمیایی

تمامی جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت، دارای رنگ‌دانه زانتومونادین، قادر به رشد هوازی، بودند. براساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی (جدول ۳ و شکل ۲) تمامی جدایه‌ها به گونه *X. translucens* نسبت داده شدند. تفاوت‌هایی نیز بین جدایه‌های جو و بقیه جدایه‌ها وجود داشت (جدول‌های ۳ و ۴). تنها جدایه‌های جو قادر به استفاده از لاکتوز و هیدرولیز لستین و نشاسته بودند. هیدرولیز توئین ۸۰ و تولید لعاب در جدایه‌های جو شدیدتر از سایر جدایه‌ها مشاهده شد (جدول‌های ۳ و ۴ و شکل ۲).

### الکتروفورز پروتئین‌های محلول جدایه‌ها

جدایه‌ها از نظر پروتئین محلول دارای الگوی باندهای مشابهی بودند و با جدایه‌های استاندارد نیز تمایزی نداشتند (شکل ۳).

پس از سنجش کمیت دی‌ان‌ای<sup>۱</sup> استخراج شده، واکنش پی‌سی‌آر، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم دی‌ان‌ای پلی‌مراز تک‌آ، ۲ میکرولیتر دی‌ان‌ای و ۱۶/۳ میکرولیتر آب مقطر دوبار سترون)، برای هر نمونه، انجام شد (Louws et al., 1994).

ژل آگارز یک و نیم درصد تهیه و محصول پی‌سی‌آر به همراه مارکر سه کیلو جفت بازی (تهیه شده از شرکت Fermentas) در چاهک‌ها بارگذاری و به مدت دو ساعت در ولتاژ ۷۵ الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز با استفاده از دستگاه Gel documentation از ژل عکس‌برداری شد. ماتریس تشابه ژنتیکی جدایه‌ها براساس وجود یا عدم وجود باند تعیین، و با نرم‌افزار NTSYSpc. version 2.2 و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد<sup>۳</sup> محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از بررسی "میانگین حساسی جفت گروه‌های غیرهم‌وزن" (UPGMA) انجام شد.

## نتایج

### جداسازی عامل بیماری

پس از ۷۲ ساعت کلنی‌هایی به رنگ زرد و به قطر یک تا دو میلی‌متر در پتری حاوی محیط آگار غذایی مشاهده شدند. تک کلنی‌هایی با ویژگی‌های فنوتیپی جنس زانتوموناس (مانند زرد، گرد، گنبدی و لعابی بودن)، جدا و خالص‌سازی شد (جدول ۱).

### آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها

تلقیح باکتری به دو روش تزریق و پاششی نشان داد که جدایه‌های گندم، لولیم و فالاریس توانایی آلوده سازی گندم (رقم نیک‌نژاد) و جو (رقم کارون) را دارند. علائم در روش پاششی پس از گذشت چهار تا هفت روز از زمان

3- coefficient Jaccard's

1- DNA

2- Taq DNA Polymerase

## آزمون Rep-PCR

آغازگرهای BOX و ERIC به ترتیب قادر به تکثیر ۱۵ و ۱۷ باند قابل مشاهده در اندازه‌های تقریبی بین ۲۰۰ تا ۵۰۰۰ جفت‌باز بودند. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای باندهای تولیدشده از محصول پی‌سی‌آر ژنوم کلیه جدایه‌ها، برای هر یک از آغازگرها، به‌طور جداگانه، جدایه‌ها را، به‌شرح زیر، در گروه‌های مختلف قرار داد:

### الف. آغازگر ERIC

بر اساس مقایسه باندهای حاصل از این آغازگر، کلیه جدایه‌ها در سطح تشابه ۸۴ درصد به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل تمامی جدایه‌های گندم، فالاریس، لولیوم و یک جدایه جو است. بقیه جدایه‌های جو در گروه دوم جای گرفتند. البته دو جدایه استاندارد UPB922 و UPB923 در

گروه یک و جدایه استاندارد UPB906 در گروه دوم قرار گرفت. این دو گروه در سطح تشابه ۹۴ درصد به پنج و در سطح تشابه ۹۹ درصد به شش زیر گروه تقسیم شدند. سه زیر گروه متعلق به گروه اول، شامل جدایه‌هایی به‌شرح زیر است: زیر گروه ۱: شامل جدایه‌های: WKEO10 (جدایه گندم کرمان - ارزوئیه)، LKEO8 (جدایه چچم کرمان - ارزوئیه) و FKEO9 (جدایه فالاریس کرمان - ارزوئیه) است. زیر گروه ۲: شامل جدایه‌های: WFB2 (جدایه گندم فارس - بیضاء)، WKA3 (جدایه گندم کرمانشاه - الهیاری)، WFD1 (جدایه گندم فارس - دردوزن) و BKR5 (جدایه جو کرمانشاه - رستم‌آباد) به همراه UPB922 (جدایه کرمان - جدایه استاندارد *X. t. pv. undulosa*).

جدول ۱- جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Bacterial isolates used in this study

Reference	Host	Isolation location	Strain name <sup>a</sup>
This study	Wheat	(Fars - Droodzan)	WFD1
This study	Wheat	Fars - Beiza	WFB2
This study	Barley	Fars - Beiza	BFB2
This study	Wheat	Kermanshah - Allahyari	WKA3
This study	Barley	Kermanshah - Allahyari	BKA4
This study	Barley	Kermanshah - Rostamabad	BKR5
This study	Barley	Kerman-Arzoohieh	BKEO6
This study	Barley	Kerman-Arzoohieh	BKEO7
This study	<i>Lolium</i>	Kerman-Arzoohieh	LKEO8
This study	<i>Phalaris</i>	Kerman-Arzoohieh	FKEO9
This study	Wheat	Kerman-Arzoohieh	WKEO10
This study	Barley	Kerman-Jiroft	BKEJ11
Alizadeh et al., 1995 and 1997	Barley	Standard strain	UPB906
Alizadeh et al., 1995 and 1997	Wheat	Standard strain	UPB922
Alizadeh et al., 1995 and 1997	Wheat	Standard strain	UPB923

a: The isolates of Wheat, Barley, *Phalaris* and *Lolium* begin with W, B, F and L., respectively. The rest of the letters are related to the place of collection: Fars (F), Kermanshah (K), Kerman (KE) provinces, and the locations: Beiza (B), Doroodzan (D), Allahyari (A), Rostamabad (R) Arzoohieh (O) and Jiroft (J). WFD1 (Fars - Droodzan wheat strain), WFB2 (Fars - Beiza wheat strain), BFB2 (Fars - Beiza barley strain), WKA3 (Kermanshah - Allahyari wheat strain), BKA4 (Kermanshah - Allahyari barley strain), BKR5 (Kermanshah - Rostamabad barley strain), BKEO6 (Kerman-Arzoohieh barley strain), BKEO7 (Kerman-Arzoohieh barley strain), LKEO8 (Kerman-Arzoohieh *Lolium* strain), FKEO9 (Kerman-Arzoohieh *Phalaris* strain), WKEO10 (Kerman-Arzoohieh wheat strain), BKEJ11 (Kerman-Jiroft barley strain), UPB: "Unité de Phytopathologie" Bacterial Collection, UCL, Louvain-la-Neuve, Belgium; UPB923 (*X. t. pv. undulosa* standard strain from Kerman), UPB922 (*X. t. pv. undulosa* standard strain from Kerman) and UPB906 (*X. t. pv. translucens* standard strain from Kerman).



شکل ۱- شروع بروز علائم با ظهور لکه‌های کوچک به رنگ سبز تیره و آب‌سوخته در برگ گندم (a) و شروع آلودگی از نوک برگ و لکه‌های آب‌سوخته در برگ جو (b)، به هم پیوستن نقاط و ایجاد لکه‌های آب‌سوخته در برگ گندم (c)  
 Figure 1. Symptoms begin with the appearance of small dark green spots on the wheat leaf (a) and the beginning of infection from the leaf tip and water-soaked spots on the barley leaf (b). Joining these spots and creating water-soaked spots in wheat leaf (c)

جدول ۲- واکنش بوته‌های گندم و جو به جدایه‌های مختلف باکتری *X. translucens*

Table 2. Wheat and barley seedlings reaction to different *X. translucens* isolates

Infection of barley	Infection of wheat	Strain name*
+	+	WFD1
+	+	WFB2
+	+	WKA3
+	+	LKEO8
+	+	FKEO9
+	+	WKEO10
+	-	BFB2
+	-	BKA4
+	+	BKR5
+	-	BKEO6
+	-	BKEO7
+	-	BKEJ11

\* See the footnote of Table 1 for the names of the isolates.

جدول ۳- خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های مختلف *X. translucens* از جو، گندم، فالاریس و لولیوم  
**Table 3. Biochemical and physiological characteristics of different isolates of *X. translucens* from barley, wheat, *Phalaris* and *Lolium***

Barley strains	Wheat strains	Test	Barley strains	Wheat strains	Test <sup>a</sup>
-	-	Indole	Negative	Negative	Gram reaction
-	-	Salicin	Aerobic	Aerobic	Aerobic growth
+	+	Cellobiose	-	-	Fluorescent pigment
+	+	Fructose	+	+	Xanthomonadin
+	-	Lactose	-	-	Oxidase
+	(+)	Galactose	+	+	Gelatin hydrolysis
+	+	Trehalose	-+	-	Starch hydrolysis
+	+	Maltose	+	+	Protease
-	-	Mannitol	+	+	Mucoid growth on GYCA
-	-	Melibiose	+	+	Catalase
+	+	Arabinose	-	-	Pectinase
+	+	Di-Mannose	+	+	Slime
-	-	Rhamnose	+	+	Aesculin hydrolysis
+	+	Xylose	-	-	Arginine dihydrolase
+	+	Arabitol	+	(+)	Hydrolysis of Tween 80
-	-	Tartrate	+	+	Hydrogen sulfide production from cysteine
+	+	Acetate	Alkaline	Alkaline	Litmus milk
+	+	Citrate	+	-	Lecithinase
+	+	Lactate	-	-	Urease
-	-	Inulin	-	-	DNase
-	-	Adonitol	-	-	Nitrate reduction
-	-	Dulcitol	+	+	Casein hydrolysis
-	-	Meso-Inositol	-	-	Asparagine
-	-	Sorbitol	-	-	MR-VP

a - Presence (+) or absence (-) of substance in all isolates, also use (+) or non-use (-) of the substance by all isolates, starch hydrolysis by 50% of isolates (- +), weak hydrolysis or poor use of the substance (+ in parentheses)

است. جدایه استاندارد UPB922 نیز در زیر گروه دوم این گروه واقع شده است. در صورتی که ایزوله استاندارد UPB922 با فاصله‌ای بیش تر (با ضریب تشابه حدود ۹۳ درصد) به صورت جداگانه در گروه اول قرار گرفته است. گروه دو نیز در سطح تشابه ۹۹ درصد به سه زیر گروه به شرح زیر تقسیم

زیر گروه ۳: شامل جدایه استاندارد UPB923 (جدایه کرمان - جدایه استاندارد *X. t. pv. undulosa*). همان طور که مشاهده می شود، تنها یک ایزوله جو BKR5 (جدایه جو کرمانشاه - رستم آباد)، که قادر به آلوده سازی گندم و جو بود، نیز در زیر گروه دوم این گروه قرار گرفته



فارس\_ در دوزن) و BKR5 (جدایه جو کرمانشاه - رستم - آباد) به همراه UPB922 (جدایه کرمان - جدایه استاندارد X. t. pv. undulosa) بود. تنها ایزوله استاندارد UPB923 (جدایه کرمان - جدایه استاندارد X. t. pv. undulosa) در خوشه‌ای جداگانه قرار گرفته است. بقیه جدایه‌های جو شامل: BKEO7 (جدایه جو کرمان - ارزوئیه)، BKEJ11 (جدایه جو کرمان - جیرفت)، BKA4 (جدایه جو کرمانشاه - الهیاری) و BFB2 (جدایه جو فارس - بیضاء)، در گروه دوم قرار گرفتند و نحوه قرارگیری آن‌ها در زیرگروه‌های مختلف تقریباً مشابه گروه‌بندی آغازگر ERIC است (شکل ۴ - پائین).

### بحث

در این بررسی دوازده جدایه به‌نماینده‌گی از ۶۸ جدایه، انتخاب و آزمون‌های مختلف شناسایی، بیماری‌زایی و مولکولی روی آن‌ها صورت گرفت. در آزمون بیماری‌زایی مشخص شد که جدایه‌ها در دو گروه مجزا از لحاظ دامنه میزبانی قرار می‌گیرند. گروهی قادر به آلوده سازی بوته‌های گندم و جو بودند و گروهی دیگر تنها بوته‌های جو را آلوده کردند. براساس دامنه میزبانی، جدایه‌های با دامنه میزبانی وسیع متعلق

شده است: زیرگروه اصلی گروه دوم شامل جدایه‌های BKEO7 (جدایه جو کرمان - ارزوئیه)، BKEJ11 (جدایه جو کرمان - جیرفت) و BKA4 (جدایه جو کرمانشاه - الهیاری) است. جدایه BKEO6 (جدایه جو کرمان - ارزوئیه) با شباهتی کم‌تر نسبت به بقیه (در سطح تشابه ۹۱ درصد) از آن‌ها فاصله گرفته است. ایزوله استاندارد UPB906 نیز با کمی فاصله (در سطح تشابه ۹۴ درصد) نزدیک این گروه قرار گرفته است (شکل ۴ - بالا).

### ب. آغازگر BOX:

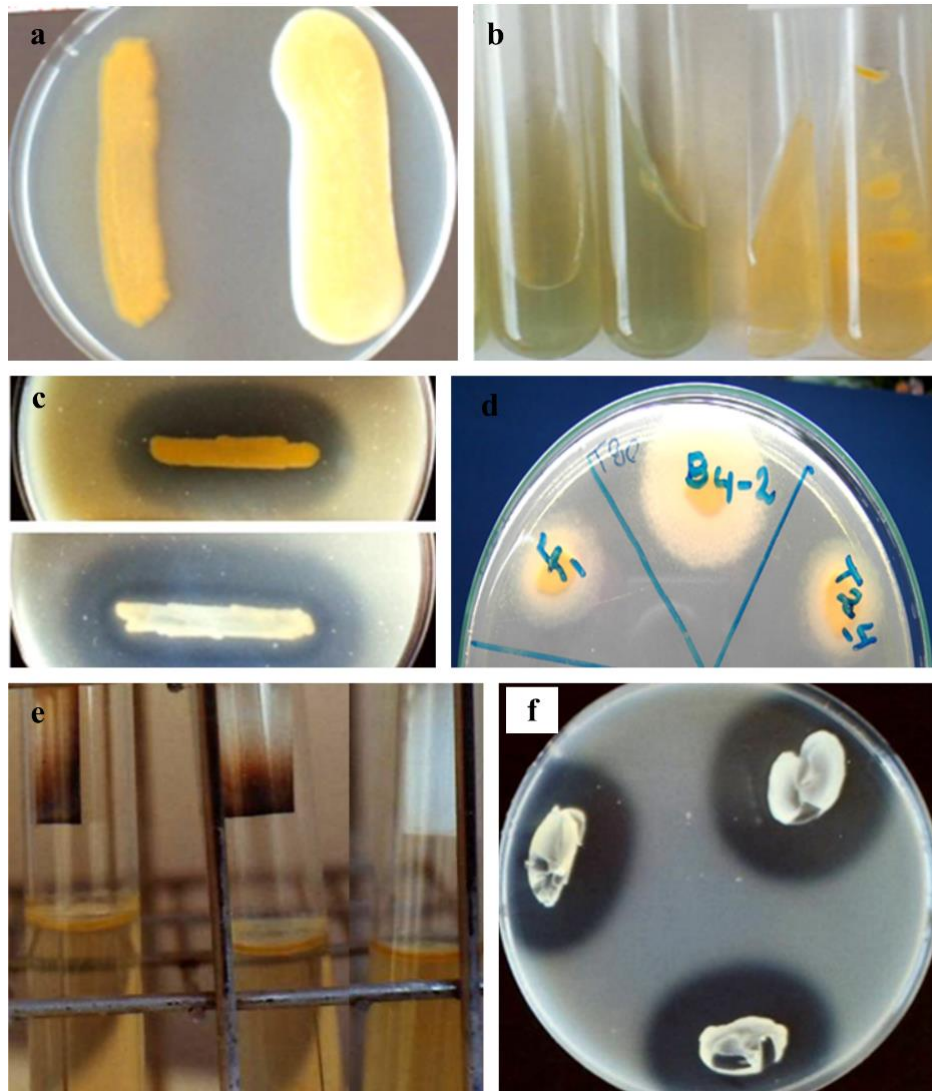
این آغازگر توانست جدایه‌ها را همگن‌تر و عمدتاً در دو گروه با ضریب تشابه ۸۴ درصد و پنج گروه در سطح تشابه ۹۹ درصد تقسیم کند. با این آغازگر کلیه جدایه‌های گندم، فالاریس و لولیوم و جدایه استاندارد ۹۲۲ به همراه BKR5، جدایه جو کرمانشاه (رستم آباد)، در یک زیرگروه قرار گرفته‌اند. این گروه شامل جدایه‌های: WFB2 (جدایه گندم فارس - بیضاء)، WKA3 (جدایه گندم کرمانشاه - الهیاری)، WKEO10 (جدایه گندم کرمان - ارزوئیه)، LKEO8 (جدایه چچم کرمان - ارزوئیه)، FKEO9 (جدایه فالاریس کرمان - ارزوئیه)، WFD1 (جدایه گندم

جدول ۴- آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متمایزکننده پاتووارهای *X. translucens* pv. *translucens* و *X. translucens* pv. *undulosa*

Table 4. Biochemical and physiological tests differentiate *X. translucens* pv. *translucens* from *X. translucens* pv. *undulosa* pathovars.

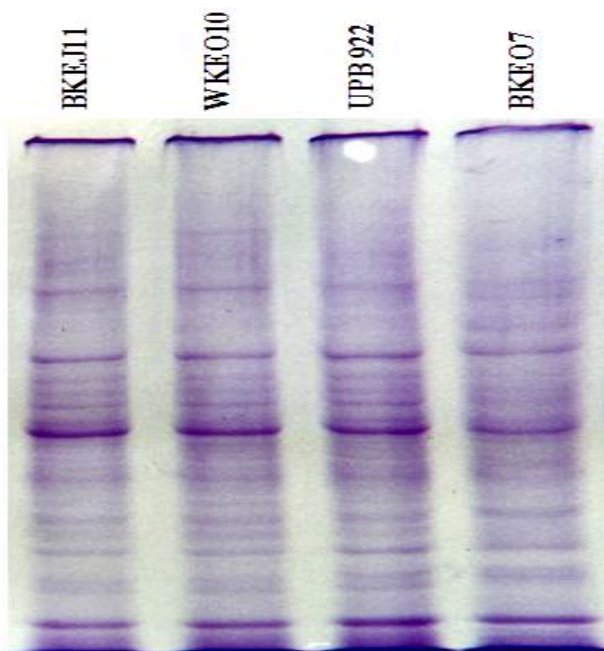
Pathogenic on:	Pathovar name	Original Host	NaCl %	Starch hydrolysis	Hydrolysis of Tween 80 <sup>b</sup>	Slime production <sup>a</sup>	Lactose	Lecithinase
-	<i>hordei</i>	Barley	3-3.5	+	++	+	+	+
+	<i>undulosa</i>	Wheat	2-2.5	-	+	++	-	-

a= Low (+) and high (++) amount slime production. b=Weak T80 (+) hydrolysis [production of a narrow (ca. 1.5 mm wide) zone of precipitate around the colonies], strong (++) T80 hydrolysis [production of a large (2 - 3.5 mm wide) zone of small white crystals of precipitate around the colonies].



شکل ۲- واکنش جدایه‌های نماینده پاتووارهای *X. translucens* pv. *translucens* و *X. t. pv. undulosa* به برخی از آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی: (a) تولید لعاب در جدایه جو (راست)، نسبت به جدایه گندم (چپ)، (b) استفاده از قند لاکتوز در جدایه‌های جو (راست) و عدم استفاده در جدایه‌های گندم (چپ)، (c) هیدرولیز لسیتین توسط جدایه جو و تولید رسوب در اطراف کلنی (پایین) و عدم هیدرولیز لسیتین توسط جدایه گندم (بالا)، (d) هیدرولیز توئین ۸۰ توسط جدایه جو (وسط) در مقایسه با جدایه‌های گندم (دو طرف)، (e) هیدرولیز اسکولین توسط جدایه‌های گندم (چپ)، جو (وسط) و شاهد (راست)، (f) هیدرولیز نشاسته توسط سه جدایه جو پس از سه هفته

Figure 2. *X. translucens* pv. *translucens* and *X. t. pv. undulosa* pathovars reaction to some biochemical and physiological tests: a) Slime production in barley isolates (right), compared to wheat isolates (left), b) Lactose utilization in barley (right) and negative reaction in wheat isolates (left), c) Lecithin hydrolysis by barley isolate and sediment production around the bacterial colony (bottom) and lack of lecithinase in wheat isolate (top), d) Tween 80 hydrolysis in barley (middle) compared to wheat isolates (bilateral), e) Esculin hydrolysis by wheat (left) and barley (middle) isolates and control (right), f) Starch hydrolysis by three barley isolates after three weeks

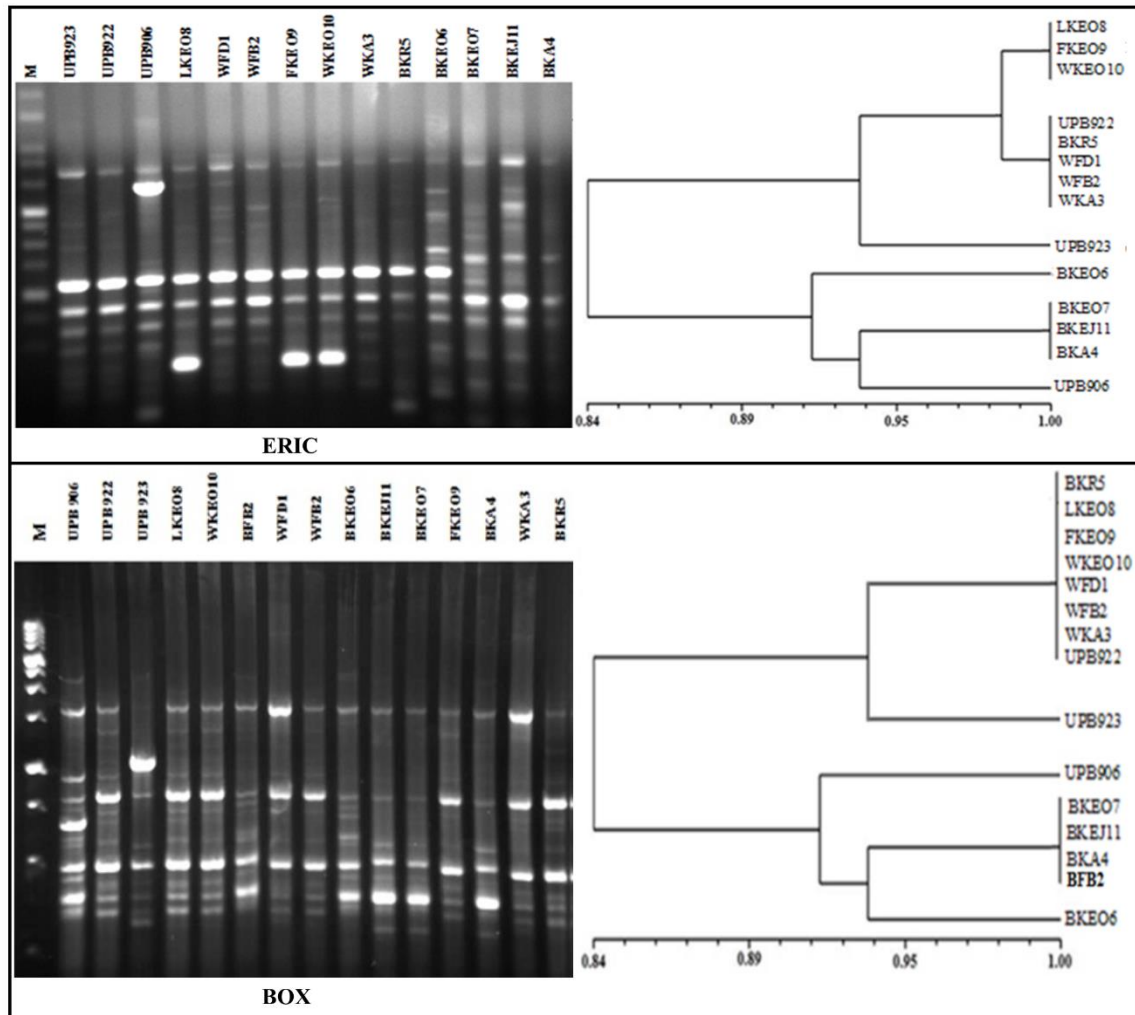


شکل ۳- الگوی باندهای پروتئینی برخی از جدایه‌های گندم و جو و یک جدایه استاندارد: BKEO7 (جدایه جو کرمان - ارزوئیه)، WKEO10 (جدایه گندم کرمان - ارزوئیه)، BKEJ11 (جدایه جو کرمان - جیروفت)، UPB922 (جدایه استاندارد *X. t. pv. undulosa*)

Figure 3. Pattern of protein electrophoresis bands of some wheat and barley isolates and a standard strain: BKEO7 (Kerman-Arzooh barley strain), WKEO10 (Kerman-Arzooh wheat strain), BKEJ11 (Kerman-Jiroft barley strain), UPB922 (*X. t. pv. undulosa* standard strain)

زیادی میان جدایه‌ها مشاهده نشد، اما برخی از آزمون‌ها تا اندازه‌ای قادر به متمایز ساختن این دو پاتووار از یکدیگر بودند. مانند آزمون‌هایی که در جدول ۴ ذکر شده‌اند. استفاده از قند لاکتوز، فعالیت آنزیم‌های لسیتیناز و لیپاز (هیدرولیز توئین ۸۰)، قدرت تحمل نمک طعام و میزان تولید لعاب روی محیط کشت آگار غذایی دارای گلوکز یا ساکارز، مواردی هستند که تا اندازه‌ای در ایجاد تمایز، بین جدایه‌های این دو پاتووار، کمک می‌کنند. البته نتایج آزمون‌های فنوتیپی به‌تهدایی برای تفکیک پاتووارهای یاد شده کافی نیستند. این تفاوت‌های بیوشیمیایی قبلا نیز در تفکیک این دو پاتووار مشاهده شده بود (Alizadeh and Rahimian, 1989; Alizadeh et al., 1995b).

به *X. t. pv. undulosa* و جدایه‌های گروه دیگر، که فقط جو را آلوده کردند، متعلق به *X. t. pv. translucens* هستند. به نظر می‌رسد یکی از جدایه‌های جو (BKR5)، که توانست بوته‌های گندم را نیز آلوده کند، از مزارع گندم آلوده اطراف، به مزرعه جو منتقل شده است و از آنجا که دارای دامنه میزبانی وسیع‌تری است، توانسته است گیاهان جو را نیز آلوده کند. این فرضیه با نتایج حاصل از سایر آزمون‌های انجام شده، که آنرا در پاتووار *undulosa* قرار می‌داد، به اثبات رسید. با انجام مایه‌کوبی گیاهان، با دوروش تزریق (برای از بین بردن موانع فیزیکی مانند کوتیکول و اپیدرم) و پاشش (برای حفظ موانع فیزیکی یاد شده)، اطمینان کافی از صحت نتایج، حاصل شد. اگرچه در آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تفاوت



شکل ۴- نقوش الکتروفورز محصول rep-PCR دی ان ای جدایه‌های نماینده پاتووارهای *X. translucens* pv. *translucens* و *X. t. pv. undulosa* از نقاط مختلف ایران توسط آغازگر ERIC (چپ بالا) و BOX (چپ پایین) دندروگرام گروه‌بندی جدایه‌های نماینده پاتووارهای *X. translucens* pv. *translucens* و *X. t. pv. undulosa* با استفاده از نقوش الکتروفورز محصول rep-PCR توسط آغازگر ERIC (چپ بالا) و BOX (چپ پایین) و روش UPGMA. برای نام جدایه‌ها به زیرنویس جدول ۱ مراجعه شود.

Figure 4. Rep-PCR fingerprinting patterns of genomic DNA of *X. translucens* strains from different geographic regions of Iran generated by, ERIC (Top left) and BOX (bottom left) primers. Dendrograms illustrating the grouping of *X. translucens* Pvs. *translucens* and *undulosa* representative isolates using Rep-PCR fingerprinting patterns of genomic DNA by UPGMA using ERIC (Top left) and BOX (bottom left). See the footnote of Table 1 for the names of the isolates.

الکتروفورز پروتئین‌های محلول جدایه‌های مختلف و حتی پروتئین‌های غشایی سلولی آنها معین شده بود (Alizadeh et al., 1996). این احتمال وجود دارد غلظت ژل مورد استفاده در این

پروفایل باندهای مربوط به الکتروفورز پروتئین‌های محلول جدایه‌ها، در این تحقیق، نتوانست تمایزی روشن و واضح بین آنها ایجاد کند. اگرچه در گذشته تمایزاتی بین باندهای ژل

پاتووار آن‌ها صورت گرفته است. در برخی از گروه‌ها، که هر کدام نماینده یک پاتووار معین هستند، زیر گروه‌هایی با سطح شباهت بیش‌تر نیز ظاهر شد، که نشان دهنده تفاوت و تنوع ژنتیکی، هر چند ناچیز، در بین هر گروه (یا هر پاتووار) است. تغییر و تنوع در گروه‌ها و جمعیت‌های یک بیمارگر می‌تواند به علت تغییرات ژنوتیپی (شامل جهش، نوترکیبی در محتوای ژنومی، در پاسخ به تغییر شرایط محیطی یا کشاورزی) و یا مهاجرت از منطقه‌ای به منطقه دیگر باشد (Ochiai et al., 2000). به نظر می‌رسد تنوع آب و هوایی کشور، تنوع و گوناگونی میزبان‌های متعدد از خانواده گندمیان در ایران، قدمت طولانی حیات و سابقه کهن زندگی گونه‌های مختلف گرامینه، اعم از وحشی و اهلی آن، مانند ارقام مختلف گندم و جو در نقاط مختلف کشور و تعامل دیرباز عوامل بیماری باکتریایی نواری غلات با میزبانان، فرصت مناسبی را برای انواع جهش‌ها و تغییرات ژنتیکی در این بیمارگر ایجاد کرده است تا بتواند خود را با انواع میزبان‌ها، شرایط آب و هوایی و محیط‌های مختلف وفق دهد.

تنوع ژنتیکی پاتووارهای عامل بیماری نواری گندم و جو در ایران، در گذشته نیز مورد بررسی دقیق قرار گرفته است. به طوری که در مطالعه‌ای گسترده، با استفاده از تکنیک RFLP، تعداد زیادی جدایه گندم و جو از نقاط مختلف کشور، به شش زیرگروه در سه گروه مجزا تقسیم شدند. این تقسیم‌بندی نیز در چارچوب دامنه میزبانی و براساس پاتووارهای مختلف صورت گرفته است (Alizadeh et al., 1997). این گروه‌بندی کامل‌تر از گروه‌بندی‌هایی است که قبل از آن با استفاده از الکتروفورز پروتئین محلول و پروتئین‌غشای سلولی جدایه‌ها، به دست آمده بود (Alizadeh and Rahimian, 1989; Alizadeh et al., 1995b; Alizadeh et al., 1996). نتایج تحقیق حاضر موید گروه‌بندی‌های قبلی انجام شده روی جدایه‌های ایرانی این باکتری است.

استفاده از آغازگرهای ERIC و BOX برای بررسی و ردیابی استرین‌های متعدد جنس *Xanthomonas* به عنوان یکی

مطالعه (که ده درصد بود)، باعث عدم آشکارسازی باندهای تفکیک کننده بین پاتووارها شده باشد، که در گذشته با ژل پلی‌آکریل‌امید ۱۲ درصد نمایان شده بودند (Alizadeh and Rahimian, 1989; Alizadeh et al., 1996).

از آن‌جا که ترادف‌های تکراری در ژنوم تمام میکروارگانیسم‌ها وجود دارد و تعدادی از قطعات این ترادف‌های تکراری در ژنوم بسیاری از باکتری‌ها پیدا شده است؛ از این رو یکی از بهترین شاخص‌های مقایسه و تعیین جایگاه ژنتیکی هریک از آن‌ها، ترادف‌های تکراری هستند (Rademaker et al., 2006). هر چند عملکرد دقیق این ترادف‌های تکراری در ژنوم پروکاریوت‌ها مشخص نیست، اما این ترادف‌ها می‌توانند در مطالعات مختلف ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها به کار گرفته شوند. سه خانواده از این ترادف‌های تکراری عبارت‌اند از ترادف‌های REP (Repetitive extragenic palindromic)، شامل ۳۵ تا ۴۰ جفت‌باز، ترادف‌های ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) شامل ۱۲۴ تا ۱۲۷ جفت‌باز و ترادف BOX شامل ۱۵۴ جفت‌باز. از آن‌جا که توالی این ترادف‌های تکرارشونده در بین گروه‌های ژنتیکی مشابه، یکسان است؛ لذا هر چه تشابه ترادف‌های تکرار شونده بین دو میکروارگانیسم کم‌تر باشد، آن دو از لحاظ ژنتیکی و تکاملی به هم نزدیک‌تر هستند (Rademaker et al., 2006). بنابراین می‌توان با مقایسه این ترادف‌های تکرارشونده در باکتری‌های یک گونه معین، میزان تشابه (نزدیکی یا دوری) آن‌ها را مشخص نمود. پرایمرهای ERIC و BOX برای تکثیر این نواحی طراحی شده‌اند. براساس نتایج به دست آمده، آزمون‌های rep-PCR توانست تفاوت‌ها و تنوع‌های داخل هر پاتووار را تا اندازه‌ای نمایان کند. هر چند گروه‌بندی‌های صورت گرفته با این آزمون‌ها با دامنه میزبانی پاتووارها رابطه و همبستگی بالایی را نشان داد. استفاده از هر دو آغازگر ERIC و BOX نشان داد که تنوع ژنتیکی جدایه‌ها به شدت با نوع پاتووار و دامنه میزبانی آن‌ها در ارتباط است و گروه‌بندی‌های اولیه برحسب دامنه میزبانی و

تحقیق حاضر و نیز بررسی‌هایی که پس از آن انجام شده است و هنوز نتایج آن منتشر نشده است، همین تنوع را در جدایه‌های ایرانی نمایان ساخته است، لذا به نظر می‌رسد تغییر زیادی از نظر ژنتیکی در عامل این بیماری در کشورمان در طول سال‌های اخیر، صورت نگرفته است و پاتووار و یا نژاد جدیدی نیز از این بیماری وارد کشور نشده است. شیوع گسترده بیماری باکتریایی نواری غلات در سال‌های اخیر، می‌تواند عمدتاً به خاطر شرایط محیطی و واکنش ارقام متداول و تحت کشت گندم و جو در کشور، باشد. البته انجام مطالعات گسترده‌تر با جدایه‌های متنوع-تر از نظر جغرافیایی و میزبان، با استفاده از روش‌های جدید و پیشرفته تر مولکولی، می‌تواند ابعاد و جنبه‌های بیش‌تری از این موضوع را روشن و نمایان سازد و تنوع ژنتیکی پاتووارهای عامل این بیماری را در کشور بهتر و کامل‌تر از قبل تعیین کند.

### سپاس‌گزاری

از بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور به خاطر فراهم نمودن امکانات مالی و تجهیزاتی لازم و همچنین از آقای مهندس ابوالقاسم قاسمی به جهت ارائه راهنمایی‌های علمی، تشکر و قدردانی می‌شود.

از روش‌های مناسب معرفی شده است ( Louws, et al., 1994). براساس نتایج حاصل از آزمون‌های BOX-PCR پاتووارهای گونه *X. translucens* در بیش از چهار گروه ژنومی پراکنده می‌شوند، که سه گروه آن مربوط به عوامل بیماری "پژمردگی باکتریایی گرامینه‌ها" است. گروه اول شامل پاتووار *graminis*، گروه دوم شامل دو استرین از پاتووار *cerealis* و پاتووار *arrhenatheri* و گروه سوم شامل پاتووارهای *phlei*، *phleipratensis* و *phoeae* است. در این مطالعه کلیه پاتووارهای مهم عامل بیماری باکتریایی نواری غلات در گروه چهارم قرار گرفته‌اند، که شامل پاتووارهای *translucens* و *secalis undulosa* هستند (Rademaker et al., 2005). بنابراین، در این مطالعه، امکان تفکیک و تمایز بین پاتووارهای عامل این بیماری حاصل نشده است. در صورتی که در مطالعه حاضر نه تنها این پاتووارها از یکدیگر تفکیک شده‌اند، بلکه تمایزات و تفاوت‌هایی در داخل هر پاتووار نیز نمایان شده است.

از آنجا که مطالعات قبلی ( Alizadeh and Rahimian, 1989; Alizadeh et al., 1995a; Alizadeh et al., 1995b; Alizadeh et al., 1996; Alizadeh et al., 1997)،

### REFERENCES

- Adhikari, T.B., Hansen, J.M., Gurung, S., and Bonman, J.M. 2011. Identification of new sources of resistance in winter wheat to multiple strains of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Plant Disease, 95: 582-588.
- Alizadeh, A., and Rahimian, H. 1989. Bacterial Leaf Streak of Graminea in Iran. EPPO Bulletin, 19: 113-117.
- Alizadeh, A., Arlat, M., Boucher, C.A., Barrault, G., and Sarrafi, A. 1997. RFLP Analysis of Iranian strains of *Xanthomonas campestris* from Cereals and Grasses. Plant Disease, 81: 31-35.
- Alizadeh, A., Barrault, G., Sarrafi, A., Rahimian, H., and Albertini, L. 1995a. Identification of bacterial leaf streak of cereals by their phenotypic characteristics and host range in Iran. European Journal of Plant Pathology, 101: 225-229.

Alizadeh, A., Benetti, V., Sarrafi, A., Barrault, G., and Albertini, L. 1994a. Genetic analysis for partial resistance to an Iranian strain of bacterial leaf streak (*X. campestris* pv. *hordei*) in barley. *Plant Breeding*, 113: 323-326.

Alizadeh, A., Benetti, V., Sarrafi, A., Barrault, G., and Albertini, L. 1995b. Genetic analysis for partial resistance to an Iranian strain of bacterial leaf streak (*X. campestris* pv. *hordei*) in barley. *Plant Breeding*, 113: 323-326.

Alizadeh, A., Dechamp-Guillaume, G., Sarrafi, A., Rahimian, H., and Barrault, G. 1996. Electrophoretic analysis of total and membrane protein of *Xanthomonas campestris* pathovars causing leaf streak of cereals and grasses in Iran. *Journal of Phytopathology*, 144: 97-101.

Alizadeh, A., Sarrafi, A., and Barrault, G. 1994b. Genetic variability for partial resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *hordei* and pathogenicity variation of 13 pathovar's strains in barley. (Proceedings d'ANPP - 4. Conférence internationale sur les maladies des plantes (1994/12/06-08; Palais des congrès, Bordeaux, FRA), Tome I: 193-200.

Alizadeh, A., Sarrafi, A., and Barrault, G. 1995c. Genetic variability for partial resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *cerealis* and pathogenicity variation of 13 pathovar's strains in wheat. *Journal of Genetic and Breeding*, 49: 309-312.

Azad, H., and Schaad, N.W. 1988. The relationship of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* to frost and the effect of frost on black chaff development in wheat. *Phytopathology*, 78: 95-100.

Charkhabi, N.F., Booher, N.J., Peng, Z., Wang, L., Rahimian, H., and ShamsBakhsh, M. 2017. Complete genome sequencing and targeted mutagenesis reveal virulence contributions of Tal2 and Tal4b of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* ICMP11055 in bacterial leaf streak of wheat. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1488.

Curland, R.D., Gao, L., Bull, C.T., Vinatzer, B.A., Dill-Macky, R., Van Eck, L., and Ishimaru, C.A. 2018. Genetic diversity and virulence of wheat and barley strains of *Xanthomonas translucens* from the Upper Midwestern United States. *Phytopathology*, 108: 443-453.

Fahy, P.C., and Hyward, A.C. 1983. Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests. In: Fahy, P.C. Persley (eds). *Plant bacterial diseases: a diagnostic guide*. Academic press, Sydney, Australia, 1983. Pp: 337-378.

Gardiner, D.M., Upadhyaya, N.M., Stiller, J., Ellis, J.G., Dodds, P.N., and Kazan, K. 2014. Genomic analysis of *Xanthomonas translucens* pathogenic on wheat and barley reveals cross-kingdom gene transfer events and diverse protein delivery systems. *PLOS ONE*, 9: e84995.

Hersemann, L., Wibberg, D., Blom, J., Goesmann, A., Widmer, F., and Vorholter, F.J. 2017. Comparative genomics of host adaptive traits in *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *BMC Genomics*, 18: 35.

Jaenicke, S., Bunk, B., Wibberg, D., Spröer, C., Hersemann, L., and Blom, J. 2016. Complete genome sequence of the barley pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* DSM 1874T (ATCC 19319T). *Genome Announcements*, 4: e01334-e1416.

Khojasteh, M., Shah, S.M.A., Haq, F., Xu, X., Taghavi, S.M., Osdaghi, E., and Chen, G. 2020. Transcription activator-like effectors diversity in Iranian strains of *Xanthomonas translucens*. *Phytopathology*, 110: 758-767.

Khojasteh, M., Taghavi, S.M., Khodaygan, P., Hamzehzarghani, H., Chen, G., Bragard, C., Koebnik, R., and Osdaghi, E. 2019. Molecular typing reveals high genetic diversity of *Xanthomonas translucens* strains infecting small-grain cereals in Iran. *Applied and Environmental Microbiology*, 85: e01518-19.

Klement, Z., Rudolph, K., and Sands, D.C. (eds). 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, 568 pp.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Langlois, P.A., Snelling, J., Hamilton, J.P., Bragard, C., Koebnik, R., Verdier, V., Triplett, L.R., Blom, J., Tisserat, N.A., and Leach, J.E. 2017. Characterization of the *Xanthomonas translucens* complex using draft genomes, comparative genomics, phylogenetic analysis, and diagnostic LAMP assays. *Phytopathology*, 107: 519-527.

Lelliot, R.A., and Stead, D.E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications. U. K. 215 pp.

Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., and de Bruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60: 2286-2295.

Marefat, A., Ophel-Keller, K., Scott, E., and Sedgley, M. 2006a. The use of ARMS PCR in detection and identification of xanthomonads associated with pistachio dieback in Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 57-68.

Marefat, A., Scott, E.S., Ophel-Keller, K., and Sedgley, M. 2006b. Genetic, phenotypic and pathogenic diversity among xanthomonads isolated from pistachio (*Pistacia vera*) in Australia. *Plant Pathology*, 55: 639-649.

Mitkowski, N.A., Browning, M., Basu, C., Jordan, K., and Jackson, N. 2005. Pathogenicity of *Xanthomonas translucens* from annual bluegrass on golf course putting greens. *Plant disease*, 89: 469-473.



Mousavipour, S.H.B., and Najafipour, G. 2018. Genotypic characteristics of *Xanthomonas arbaricola* pv. *juglandis*, causal agent of walnut bacterial blight, based on Rep-PCR in Kohgiluyeh and Buyer- ahmad province. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 41: 73-87 (In Persian with English Abstract).

Ochiai, H., Horino, O., Miyajima, K., and Kaku, H. 2000. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. Phytopathology, 90: 415-421.

Osdaghi, E., 2020. *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (bacterial leaf streak of barley). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56978>.

Peng, Z., Hu, Y., Xie, Z., Potnis, N., Akhunova, A., and Jones, J. 2016. Long read and single molecule DNA sequencing simplifies genome assembly and TAL effector gene analysis of *Xanthomonas translucens*. BMC Genomics, 17: 21.

Pesce, C., Bolot, S., Cunnac, S., Portier, P., Fischer-Le Saux, M., and Jacques, M.A. 2015. High quality draft genome sequence of the *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* pathotype strain CFBP 2541. Genome Announcements, 3: e01574-e1614.

Pesce, C., Jacobs, J.M., Berthelot, E., Perret, M., Vancheva, T., and Bragard, C. 2017. Comparative genomics identifies a novel conserved protein, HpaT, in proteobacterial type III secretion systems that do not possess the putative translocon protein HrpF. Frontiers in Microbiology, 8: 1177.

Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and De Bruijn, F.J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology, 95: 1098-1111.

Rademaker, J.L.W., Norman, D.J., Forster, R.L., Louws, F.J., Schultz, M.H., and De Bruijn, F.J. 2006. Classification and identification of *Xanthomonas translucens* isolates, including those pathogenic to ornamental asparagus. Phytopathology, 96: 876-884.

Sapkota, S., Mergoum, M., and Liu, Z. 2020. The translucens group of *Xanthomonas translucens*: Complicated and important pathogens causing bacterial leaf streak on cereals. Molecular plant pathology, 21(3): 291-302.

Sapkota, S., Zhang, Q., Chittem, K., Mergoum, M., Xu, S.S., and Liu, Z. 2018. Evaluation of triticale accessions for resistance to wheat bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Plant Pathology, 67: 595-602.

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, C. 2001. Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria. (Third edition) St Paul, Minnesota, APS press, 373 pp.

Sherafati, F., Khodaygan, P., Azadvar, M., Sedaghati, E., Saberi Riseh R., and Norolahi, K. 2014. Identification and comparative investigation into causal agent of citrus bacterial canker

in Ilam province. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 36: 11-23 (In Persian with English Abstract).

Suslow, T.V., Schroth, M.N., and Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917-918.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of xanthomonas. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45: 472-489.

Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19: 6823-31.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5: 25-40.

Wichmann, F., Vorholter, F.J., Hersemann, L., Widmer, F., Blom, J., and Niehaus, K. 2013. The noncanonical type III secretion system of *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* is essential for forage grass infection. Molecular Plant Pathology, 14: 576-588.



© 2021 Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International. (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

## Investigation of the phenotypic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pathovars, the causal agents of bacterial leaf streak of wheat and barley in parts of Iran

M. Habibian<sup>1</sup>, A. Alizadeh Aliabadi<sup>2\*</sup>, J. Hayati<sup>3</sup> and H. Rahimian<sup>4</sup>

1. Graduated M.Sc. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. **\*Corresponding Author:** Associate Professor of the Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Tehran, Iran (aalizadeh1340@yahoo.com)

3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4. Professor, Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2021.16931

Received: 18 April 2021

Accepted: 20 July 2021

---

### Abstract

#### Background and Objectives

Bacterial leaf streak of cereal was first reported from wheat and barley in the early twentieth century. This disease was observed in wheat and barley fields of Kerman province in 1987 and then isolated and identified from infected wheat and barley in different provinces of Iran, as *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* and *X. t.* pv. *translucens* respectively. In recent years, this disease became epidemic in Iran. For this reason, it was necessary to re-examine once again the different characteristics of the causal agents of this disease in different regions of Iran to determine if there is any possible genetic modification in these bacteria.

#### Materials and Methods

The phenotypic and genetic diversity of 12 bacterial strains isolated from wheat and barley (four isolates from wheat, six isolates from barley, one isolate from *Phalaris* sp. and one isolate from *Lolium* sp.) originated from Kerman, Kermanshah, and Fars provinces was studied. These isolates (selected from 67 isolates) were compared with three ancient Iranian standard strains (obtained from Unité de Phytopathologie, UCL, Louvain-la-Neuve, Belgium). The strains' pathogenicity test was performed on wheat and barley seedlings by spraying and injection methods. Then, the biochemical and physiological characteristics and SDS-PAGE profiles of the whole cell proteins of isolates were examined. Finally, using rep-PCR by BOX A1R, ERIC 1R, and ERIC 2 primers, the genetic diversity of isolates was performed.

#### Results

All strains were Gram, oxidase, and urease negative, and catalase positive. All strains produced xanthomonadin pigment. The strains could produce hydrogen sulfide from cystine and peptone. Negative results were obtained for arginine dihydrolase, urease, starch hydrolysis, nitrate reduction, acetoin and indole production, and methyl red reaction. All isolates produced acid from cellobiose, fructose, galactose, di-mannose, arabinose, xylose, trehalose, arabitol, but not from salicin, mannitol, melibiose, rhamnose, dulcitol, sorbitol, and

mesoinositol. They utilized acetate, citrate, and lactate but not d-tartrate and inulin. Only barley isolates could utilize lactose and hydrolyze lecithin and starch. There are no discriminating bands among PAGE profiles of wheat, barley, and standard strains. Genomic fingerprinting of isolates was performed, and the data were analyzed using NTSYS V 2.2 software and the UPGMA cluster analysis method. All isolates of wheat, *Phalaris* sp., *Lolium* sp. and one isolate from barley along with UPB922 standard strain were formed one group consists of three subgroups. Isolates of this group could infect wheat and barley plants. The rest of barley isolates, which were pathogenic only on barley, separated from the first group at a similarity coefficient of 84% and formed the second group, including the standard strain UPB922. Furthermore, this group had three subgroups. This grouping was completely related to the host range from the isolates. Based on biochemical, physiological, pathogenicity (host range) characteristics of strains and their genetic diversity compared to the standard strains, the first group, and the second group isolates were identified as *X. t. pv. undulosa* and *X. t. pv. translucens*, respectively.

### **Discussion**

It was found that the isolates are divided into two separate groups based on their host range. One group could contaminate wheat and barley plants, and another group infected only barley plants. Biochemical and physiological tests did not show much difference among the strains, but some tests were able to distinguish two pathovars, such as lactose utilization, the activity of lecithinase and lipase enzymes (hydrolysis of Tween 80), the tolerance of NaCl in the culture medium and the amount of slimes, produced on the nutrient agar medium containing glucose or sucrose. Rep-PCR tests could show the differences and variations within each pathovar. The grouping formed based on these tests showed a high correlation with the strain host range of pathovars. Using both BOX and ERIC primers showed that the genetic diversity of isolates was strongly related to the pathovars type and their host range. Since previous studies showed the same diversity in Iranian isolates, so it seems that there has not been a genetic change in the causal agent of this disease in Iran. The disease widespread occurred in recent years could be mainly due to environmental conditions and wheat and barley cultivars response to this disease.

**Keywords:** *Bacterial leaf streak of cereal, wheat, barley, X. translucens pv. undulosa, X. translucens pv. translucens, rep-PCR test*