

وقوع و پراکنش بیماری موزاییک باکتریایی گندم در جنوب ایران

مصطفی نصیری^۱، حشمت الله رحیمیان^۲، محمدمهدی فقیهی^{۳*} و ولی الله بابایی زاد^۴

- ۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
- ۲- استاد گروه گیاه پزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
- ۳- *نویسنده مسوول: استادیار بخش گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، زرکان، ایران (mm.faghihi@yahoo.com)
- ۴- دانشیار گروه گیاه پزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۸

چکیده

بیماری موزاییک باکتریایی گندم ناشی از *Clavibacter tessellarius*، یکی از بیماری های بذرزاد گندم است که علائمی نظیر موزاییک و لکه های کلروز در سطح برگ ایجاد می کند. به منظور بررسی وقوع و تعیین پراکنش این بیماری در سال های زراعی ۹۹-۱۳۹۸ از مزارع گندم چهار استان جنوبی کشور شامل فارس، خوزستان، کرمان و بوشهر بازدید و تعداد ۱۹۲ نمونه گیاهی با علائم شبیه به این بیماری جمع آوری و جداسازی باکتری از آنها انجام شد. در مجموع، ۴۰۰ جدایه باکتریایی جداسازی شد که براساس نتایج مثبت PCR با آغازگرهای اختصاصی جنس کلویباکتر (*CMR16F1/CMR16R1*)، آزمون بیماری زایی روی گندم و ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی، ۶۱ جدایه به عنوان *C. tessellarius* تشخیص داده شدند. ده جدایه نماینده انتخاب و با آغازگرهای 2F/4R در آزمون PCR قسمتی از ژن *gyrB* در آنها تکثیر شد. تعیین توالی قطعات تکثیر شده در PCR و جستجوی بلاست با استفاده از توالی های ژن *gyrB* در ژن بانک تأیید کرد که هر ده جدایه بیشترین شباهت (۹۸/۸ تا ۹۹/۵ درصد) را در توالی های این ژن با جدایه های *C. tessellarius* داشتند و در درخت تبارزایی نیز در یک گروه مجزا از سایر گونه های *Clavibacter* قرار گرفتند. در مجموع، از ۱۹۲ مزرعه ای نمونه برداری شده، از ۵۳ مزرعه (۲۷/۶۰ درصد) باکتری *C. tessellarius* جداسازی شد. وقوع بیماری، براساس درصد مزارع آلوده، در استان های فارس، خوزستان، کرمان و بوشهر به ترتیب ۳۰/۵۵، ۲۲/۷ و ۷/۱ درصد بود. این بیماری برای اولین بار از استان های خوزستان، کرمان و بوشهر گزارش می شود و وقوع آن در سایر استان های کشور دور از انتظار نیست.

کلیدواژه ها: ایران، ژن *gyrB* کلویباکتر تسلا ریوس، گندم

مقدمه

گندم به عنوان یکی از مهم ترین محصولات کشاورزی نقش مهمی در تأمین نیاز غذایی جوامع بشری دارد. ایران با تولید سالیانه ۱۳ میلیون تن رتبه سیزدهم جهانی تولید این محصول را به خود اختصاص داده است (FAO, 2020). استان های فارس، خوزستان، خراسان رضوی، گلستان، کرمانشاه، همدان، آذربایجان غربی، اردبیل و کردستان بالاترین میزان تولید این محصول را در کشور دارند (Ahmadi et al., 2020). مجموعه ای از آفات و بیماری های گیاهی باعث کاهش عملکرد این محصول می شوند. یکی از بیماری های گندم که کم تر به آن توجه شده است و علائم شبیه به آن در بسیاری از مناطق کشت گندم از جمله در استان های جنوبی کشور مشاهده می شود، بیماری موزاییک باکتریایی گندم است. موزاییک باکتریایی گندم بیماری بذرزادی است که توسط *Clavibacter tessellarius* ایجاد می شود و پریکارپ، اندوسپرم و جنین بذر را آلوده می کند (Carlson, 1982; McBeath and Adelman, 1988; McBeath et al., 1986). این بیماری اولین بار در سال ۱۹۷۶ در نبراسکا^۱ از آمریکا گزارش شد و سپس توسط Carlson and Vidaver (1982) و Davis و همکاران در سال ۱۹۸۴ توصیف گردید (Carlson and Vidaver, 1982; Davis et al., 1984). در بررسی های انجام شده در سال ۱۹۹۰ در ایلینوی^۲ آمریکا، این بیماری از این منطقه گزارش شد و نمونه برداری ها نشان دادند که بیماری در این منطقه شیوع و گسترش دارد (Chang et al., 1991).

در ایران، در سال های گذشته، وقوع این بیماری در چند استان کشور گزارش شده است. Sahandpour and Azad (2000) در سال ۱۹۹۸ علائم مشکوک به موزاییک باکتریایی گندم (نقاط کلروتیک در سطح برگ) را در باجگاه (استان فارس) مشاهده کردند و جدایه هایی از

باکتری را با رنگ پرگنه ی نارنجی رنگ جداسازی کردند و پس از مایه زنی سوسپانسیون آن ها به گندم و ذرت، دوباره از آن ها جداسازی کردند. (Arabi et al., 2004). مشکوک به موزاییک باکتریایی گندم را در ساری (استان مازندران) و فیروزکوه (استان تهران) مشاهده و یک باکتری صورتی رنگ را از نمونه های برگ گندم از فیروزکوه جداسازی و به عنوان عامل بیماری معرفی کردند، ولی از ساری موفق به جداسازی آن نشدند. (Razi et al., 2010). علائم مشکوک به موزاییک باکتریایی گندم را در شرق گنبد در رقم ان-۸۰-۱۹ مشاهده و وقوع باکتری را در استان گلستان گزارش کردند. علائم مشخص بیماری شامل لکه های زرد کوچک با حاشیه های نامشخص با الگوی موزاییک (شبیه به بیماری های ویروسی) و توزیع کم و بیش یکنواخت روی برگ است و بیش تر در برگ های میانی و بالایی گیاه مشاهده می شود. علائم بیماری معمولاً در برگ پرچم نیز هنگام پرشدن دانه ها مشاهده و در آلودگی شدید موجب از بین رفتن برگ پرچم و احتمالاً خسارت معنی دار می شود. ردیابی علائم به دلیل شباهت به برخی از بیماری های برگ یا کمبود مواد مغذی، مشکل است. برخلاف برخی از بیمارگرهای باکتریایی، مانند عامل لکه نواری گندم، ترشح اووز باکتریایی در این باکتری مشاهده نمی شود (MacBeath, 1993; Schutt, 2019).

عامل بیماری موزاییک باکتریایی گندم (Ct) *C. tessellarius* است. یک باکتری گرم مثبت است که در محیط کشت های نیمه اختصاصی مانند BCT و محیط کشت های دیگر مانند YDC پرگنه های نارنجی رنگی تولید می کند. تا چندی پیش این بیمارگر به عنوان یک زیرگونه از گونه ی *Clavibacter michiganensis* و تحت عنوان *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* شناخته می شد، اما پس از آنالیز کامل ژنوم این زیرگونه و چندین زیرگونه دیگر، این زیرگونه ها به گونه تبدیل شدند و این بیمارگر نیز به عنوان *C. tessellarius* معرفی شد (Li et al., 2018).

1- Nebraska
2- Illinois

لکه‌های کوچک سبز کم‌رنگ و با حاشیه‌ی نامشخص، نوارهای زرد و قهوه‌ای کلروزه و پراکنده جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند (جدول ۱). ابتدا برگ‌ها و ساقه‌ها با سدیم هیپوکلریت یک درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضد عفونی سطحی و دو بار با آب مقطر سترون شسته و سپس با اسکالپل سترون به اندازه‌های ریز بریده و در آب مقطر سترون درون هاون سترون له شدند. پس از حدود دو ساعت، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله با سمپلر سترون برداشته و روی محیط کشت‌های مختلف شامل yeast extract bacterial peptone glucose agar (YPGA) (Li et al., 2001; Schaad et al., 2018). با لوپ نیز قطره‌هایی از این سوسپانسیون برداشته و روی محیط‌های کشت مذکور به صورت خطی (مخطط) کشت شد. نمونه‌های کشت شده در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه‌ی سلسیوس به مدت سه تا هفت روز قرار گرفتند. برگه‌های رشد یافته روی محیط کشت خالص-ساز و برای انجام آزمون‌های فوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی آماده شدند. نگهداری کوتاه مدت جدایه‌ها در آب مقطر سترون در دمای ۴ درجه و نگهداری بلندمدت در گلسیرین ۳۰ درصد در دمای منفی هشتاد درجه‌ی سلسیوس انجام شد.

آزمون‌های فوتیپی و بیوشیمیایی

به منظور تشخیص اولیه باکتری‌های جداسازی شده آزمون‌های فوتیپی و بیوشیمیایی انجام شد. تعدادی از جدایه‌های خالص‌سازی شده براساس آزمون گرم و رنگ پرگنه‌ها (جدایه‌های گرم مثبت با رنگ پرگنه‌ی نارنجی و نزدیک به آن) انتخاب و تعدادی از آزمون‌های لازم برای تشخیص جنس و تفکیک گونه‌های کلایوباکتر روی آن‌ها انجام شد. این آزمون‌ها شامل رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی (O/F)، اکسیداز، کاتالاز، پکتیناز، رشد روی محیط TTC^۱ حاوی ۰/۱ درصد تری‌فنیل تترازولیم و کلراید و رشد روی محیط CNS^۲، رنگ پرگنه روی

(Mendez et al., 2020). این باکتری لوآن مثبت، غیر فلورسنس و پکتیناز منفی بوده، از سوربیتول و مانیتول اسید تولید کرده و قابلیت استفاده از گلیسرول را داشته ولی از استات نمی‌تواند استفاده کند. *C. tessellarius* در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه‌ی سلسیوس بهترین رشد را دارد و حداکثر دمای رشد آن ۳۵ درجه‌ی سلسیوس است. معمولاً بین سه تا پنج روز در دمای بهینه‌ی رشدی، روی محیط کشت پرگنه‌های نارنجی رنگ تولید می‌کند. باکتری *C. tessellarius* پس از ورود به گیاه گندم، در آوند چوبی قرار می‌گیرد. به دنبال رشد و گسترش این باکتری در آوند چوبی، دیواره‌های سلولی آوند چوبی و سلول‌های پارانشیمی اطراف آن، با ترشح سلولازها و آنزیم‌های خارج سلولی دیگر شامل پلی‌گالاکتوروناز، زایلانازها و سایر اندوگلوکانازها هیدولیز و منجر به ایجاد علایم می‌شود. باکتری میله‌ای شکل و در اندازه‌ی ۰/۵ در ۲ میکرومتر و غیرمتحرک بوده و یک باکتری بذرزاد در گندم است (Li, 2018).

در زمینه‌ی اهمیت این بیماری در دنیا و ایران تحقیقات اندکی انجام شده است و هنوز اطلاعات دقیقی از میزان خسارت کمی و کیفی بیماری در دسترس نیست. همچنین، پراکنش بیماری و میزان خسارت آن در مزارع گندم در مناطق مختلف کشور تعیین نشده است و این احتمالاً به دلیل نزدیکی علایم این بیمارگر با علایم بیماری‌های ویروسی و علایم کمبودهای غذایی و عدم شناخت کافی اغلب کشاورزان و کارشناسان از علایم این بیماری بوده است. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی وقوع و تعیین پراکنش بیماری موزاییک باکتریایی گندم در مزارع گندم جنوب ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها

در سال‌های زراعی ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ از ۱۹۲ مزرعه‌ی گندم در مناطق مختلف استان‌های فارس، خوزستان، کرمان و بوشهر بازدید شد و نمونه‌های برگ گندم مشکوک به داشتن بیماری موزاییک باکتریایی با علایم شبیه به موزاییک، نقاط و

1- Triphenyl tetrazolium chloride medium

2- *Corynebacterium nebraskense* semi-selective medium

براساس واکنش گرم، رنگ پرگنه و آزمون پی‌سی‌آر با آغازگرهای اختصاصی CMR16F1/CMR16R1 مربوط به جنس کلاویاکتر (Lee et al., 1997) مورد شناسایی دوباره قرار گرفتند.

شناسایی بیمارگر با روش مولکولی

جدایه‌های گرم مثبت با پرگنه‌ی نارنجی رنگ، همزمان با انجام آزمون‌های افتراقی فنوتیپی و بیوشیمیایی، با آزمون پی‌سی‌آر نیز با استفاده از آغازگرهای CMR16F1/CMR16R1 اختصاصی جنس کلاویاکتر (*Clavibacter* spp.) (Lee et al., 1997) بررسی شدند. این آغازگرها قطعه‌ی حدود ۱/۴ کیلو جفت‌بازی از ژن 16S rDNA در گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس کلاویاکتر را تکثیر می‌کند (جدول ۲). از بین جدایه‌هایی که با آغازگرهای اختصاصی جنس کلاویاکتر شناسایی شده و در آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی هم به *C. tessellarius* نزدیک‌تر بودند (۶۱ جدایه)، ۱۰ جدایه به‌عنوان نماینده انتخاب و برای تأیید گونه‌ی آن‌ها در آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی (Richert) 2F/4R (et al., 2005) به کار برده شدند. این آغازگرها قطعه‌ی ۵۳۰ جفت‌بازی از ژن خانه‌زادی *gyrB* را تکثیر می‌کند.

استخراج دی‌ان‌ای براساس روش دوپله و دوپله (۱۹۹۰) با تغییراتی در آن انجام شد. بدین ترتیب که پرگنه‌های باکتری‌ها به ۶۰۰ میکرولیتر بافر سی‌تب^۲ دو درصد، با دمای ۶۵ درجه‌ی سلسیوس اضافه و در حمام آب گرم ۶۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. به هر لوله ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم-ایزوامیل الکل (به نسبت حجمی ۲۴ به ۱) اضافه و لوله‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. روشن‌ترین هر لوله لوله جدیدی منتقل شد. پس از اضافه کردن حدود دو سوم حجم نمونه ایزوپروپانول سرد (دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس) به هر لوله و مخلوط کردن آنها، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ

محیط^۱ YDC، تولید لوان، تولید اسید از مانیتول و سوربیتول و استفاده از استات و هیدرولیز نشاسته، ژلاتین و اسکولین بودند (Schaad et al., 2001). در انجام آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی از یک جدایه‌ی شناخته شده‌ی *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* نیز به‌عنوان کنترل در کنار سایر جدایه‌ها استفاده شد.

آزمون بیماری‌زایی

شصت و یک جدایه‌ی تشخیص داده شده با آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی به‌عنوان *Clavibacter tessellarius* همراه با چهار جدایه با رنگ پرگنه‌ی زرد در آزمون بیماری‌زایی روی گندم (ارقام چمران و پیشتاز) استفاده شدند. گیاهان گندم در گلدان‌های با قطر ۱۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر در شرایط گلخانه با دمای ۲۵±۳ درجه‌ی سلسیوس در روز و ۱۰±۳ درجه‌ی سلسیوس در شب و ۱۴ ساعت نور طبیعی کشت شدند. به‌منظور انجام آزمون بیماری‌زایی سوسپانسیونی با OD= 0.5 در طول موج ۶۰۰ نانومتر در آب مقطر سترون (تقریباً معادل ۱۰^۷ CFU/ml) برای هر جدایه تهیه و با سرنگ سترون به زیر اپیدرم برگ گیاهان یک ماهه‌ی گندم (سه برگ برای هر جدایه)، ارقام چمران و پیشتاز مادری، تزریق شد. تیمار شاهد شامل گیاهان سالم با و بدون تزریق آب مقطر سترون بودند. برای حفظ رطوبت، به مدت سه روز گیاهان مایه‌زنی شده و شاهد با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شدند. گیاهان در گلخانه (با شرایط مذکور) نگهداری و مطابق معمول آبیاری شدند. علائم بیماری (به‌صورت لکه‌های رنگ پریده، نوارهای کوتاه و پراکنده و علائم شبیه به موزاییک) تا یک ماه پس از مایه‌زنی ثبت شد و از برگ‌های دارای علائم، نمونه برداری انجام و برای جداسازی و تشخیص دوباره‌ی باکتری روی محیط کشت‌های مذکور استفاده شدند. جدایه‌های به دست آمده از برگ‌های مایه‌زنی شده

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این بررسی. جفت آغازگرهای CMR16F1/CMR16R1 و 2F/4R به ترتیب قطعه‌های حدود ۱۴۰۰ جفت‌باز و ۵۳۰ جفت‌باز از ژن‌های 16S rRNA و *gyrB* را در جدایه‌های مورد مطالعه تکثیر کردند.

Table 1. Characteristics of the primers used in this study. Primer pairs CMR16F1/CMR16R1 and 2F/4R amplified fragments of approximately 1400 bp and 530 bp of 16S rRNA and *gyrB* genes in the studied isolates, respectively.

Primer name	Sequence	Annealing (°C)	Amplicon size (bp)	Target	Reference
CMR16F1	5'-GTGATGTCAGAGCTT GCTCTGGCGGAT-3'	59	~1400	16S rDNA	Lee et al., 1997
CMR16R1	5'-GTACGGCTACCTTGT TACGACTTAGT-3'				
2F	5'-ACCGTCGAGTTCGAC TACGA -3'	59	~530	gyrase subunit B	Richert et al., 2004
4R	5'-CCTCGGTGTTGCCSA RCTT -3'				

وجود یا عدم وجود باند مورد نظر، واکنش‌های مثبت و منفی در هر آزمایش ثبت گردید.

آنالیز تبارزایی

برای تفکیک و تشخیص زیرگونه‌های *Clavibacter michiganensis* تجزیه و تحلیل تبارزایی براساس ژن *gyrB* یک روش مناسب است (Jacques et al. 2012). در این بررسی، ۱۰ جدایه‌ی نماینده‌ی *C. tessellarius* برای ترسیم درخت تبارزایی براساس توالی ژن *gyrB* استفاده شدند. آغازگرهای اختصاصی 2F/4R (Richert et al., 2004) برای تکثیر قطعه‌ی حدود ۵۳۰ جفت‌باز از ژن *gyrB* استفاده شدند. آزمون پی‌سی‌آر مطابق با برنامه و چرخه‌ی دمایی ذکر شده در بخش قبل انجام شد. محصولات پی‌سی‌آر به بخش کاردیوژنتیک مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی (<http://gen.rhc.ac.ir/fa>) ارسال و با فناوری تعیین توالی سنج از هر دو طرف تعیین توالی شدند. قطعات دی‌ان‌ای تعیین توالی شده با استفاده از نرم‌افزار SeqMan^۱ ویرایش شد. سپس، جستجو با برنامه‌ی بلاست (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) در ژن بانک با استفاده از این قطعات، برای بررسی صحت و تأیید این

شدند. روشن‌ترین دور ریخته و به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و پنج دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. این عمل دو بار تکرار و بعد از آن لوله‌ها از باقیمانده‌ی الکل خشک گردیده و رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و به عنوان دی‌ان‌ای قالب در پی‌سی‌آر استفاده شدند (Doyle and Doyle, 1990). آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی (برای هر دو جفت آغازگر) در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس، ۶ میکرولیتر آب مقطر سترون، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ میکرومول) و ۱ تا ۲ میکرولیتر دی‌ان‌ای الگو انجام گردید. چرخه‌ی پی‌سی‌آر شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه‌ی دمایی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۹ درجه ۴۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس ۹۰ ثانیه، همراه با یک مرحله‌ی گسترش نهایی ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. ده میکرولیتر از محصول‌های پی‌سی‌آر معمولی روی ژل آگاروز یک درصد حاوی رنگ ایمن فلوروو (FluoroVue, NS1000) برده شد و با دستگاه عکس‌برداری از ژل از آن عکس گرفته شد. براساس

از مجموع ۴۰۰ جدایه‌ی خالص به‌دست آمده از کشت نمونه‌ها، تعداد ۱۸۵ جدایه گرم مثبت و ۲۱۵ جدایه گرم منفی بودند. جدایه‌های گرم مثبت با آغازگرهای اختصاصی جنس کلایواکتر و آزمون پی‌سی‌آر مورد بررسی قرار گرفتند که ۸۶ جدایه در واکنش پی‌سی‌آر مثبت بودند. از این تعداد، ۷۰ جدایه با پرگنه‌ی نارنجی رنگ (روی محیط‌های BCT، CNS و YDC) (شکل ۲) و ۱۶ جدایه واجد طیف‌های مختلف رنگ زرد بودند. از میان ۷۰ جدایه، در آزمون بیماری‌زایی ۶۱ جدایه علایم شاخص بیماری را در گلخانه ایجاد کردند و ۹ جدایه علایمی را روی گیاهان گندم نشان ندادند. تمامی ۶۱ جدایه گرم مثبت، نارنجی رنگ، هوازی اجباری، لوان مثبت، اکسیداز منفی، پکتیناز منفی، ژلاتیناز منفی، هیدرولیز نشاسته مثبت، استات منفی وقادر به رشد روی محیط حاوی TTC و محیط CNS و تولید اسید از مانیتول و سوربیتول بودند. بدین ترتیب ویژگی‌های آن‌ها به *C. tessellarius* بیش‌ترین شباهت را داشت.

آزمون بیماری‌زایی

از ۷۰ جدایه‌ی گرم مثبت با پرگنه‌ی نارنجی رنگ که مشکوک به *C. tessellarius* بودند، ۶۱ جدایه پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ روز، علایم لکه‌های کوچک رنگ پریده تا زردرنگ را به صورت پراکنده و شبیه به علایم مزرعه‌ای بیماری را روی گیاهان مایه‌زنی شده، ایجاد کردند. ۹ جدایه از ۶۱ جدایه با رنگ پرگنه‌ی نارنجی و هر چهار جدایه‌ی با پرگنه‌ی زرد رنگ نتوانستند علایمی را روی برگ‌های گندم ایجاد کنند. گیاهان شاهد منفی که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند علایمی را نشان ندادند. از لکه‌ها و علایم ایجاد شده روی برگ‌ها در آزمون بیماری‌زایی، مجدداً باکتری‌های مایه‌زنی شده جداسازی و با انجام آزمون‌های فنوتیپی و پی‌سی‌آر با آغازگرهای اختصاصی جنس کلایواکتر (CMR16F1/CMR16R1) به‌عنوان جدایه‌های *C. tessellarius* شناسایی شدند.

توالی‌ها، انجام گردید. توالی‌های ژن *gyr B* از تعدادی از جدایه‌های موجود در ژن بانک اخذ شدند. براساس توالی این ژن در جدایه‌ها، درخت تبارزایی با روش پیوست همسایه‌ها^۱ با استفاده از نرم‌افزار MEGA X (Kumar et al., 2018) (با درجه‌ی اعتبارسنجی^۲ ۱۰۰۰) ترسیم شد. علاوه بر این، جدول ماتریس تشابه و مقایسه‌ی میزان شباهت نوکلئوتیدی بین جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MegAlign به‌دست آمد.

نتایج

علایم و پراکنش بیماری

در مزارع گندم استان‌های فارس، کرمان، خوزستان و بوشهر علایم شبیه به بیماری موزاییک باکتریایی گندم شامل موزاییک به‌صورت نقاط و لکه‌های رنگ پریده و پراکنده با حاشیه‌ی نامشخص در پهنک برگ مشاهده شد (شکل ۱). برخلاف سایر آلودگی‌های باکتریایی (مانند بیماری لکه‌نوری گندم)، در این بیماری لکه‌های آب سوخته یا ترشح صمغ و شیرابه (اوز باکتریایی) مشاهده نشد. پس از جداسازی باکتری‌ها از برگ‌های دارای علایم، باکتری مظنون به عامل بیماری موزاییک باکتریایی گندم، *C. tessellarius*، شناسایی گردید.

در مجموع از ۱۹۲ مزرعه‌ی گندم در استان‌های فارس، کرمان، خوزستان و بوشهر بازدید و با توجه به علایم یادشده ۱۹۲ نمونه‌ی برگ‌ی جمع‌آوری شد. کشت، جداسازی و شناسایی جدایه‌های باکتریایی در نمونه‌ها نشان داد که در ۵۳ مزرعه (۲۷/۶۰ درصد) مورد نمونه‌برداری، باکتری از برگ‌ها جداسازی و نتیجه‌ی آزمون بیماری‌زایی آن‌ها در گلخانه روی گندم مثبت بود. از ۸۴ مزرعه‌ی نمونه‌برداری شده در استان فارس ۳۰ مزرعه (۳۵/۷ درصد) آلوده به این باکتری بودند. درصد آلودگی مزارع در استان‌های خوزستان، کرمان و بوشهر نیز به ترتیب ۳۰/۵۵ درصد (۱۱ مزرعه‌ی آلوده از ۳۶ مزرعه)، ۲۲/۷ درصد (۱۰ مزرعه از ۴۴ مزرعه) و ۷/۱ درصد (۲ مزرعه از ۲۸ مزرعه) بود (جدول ۲).



شکل ۱- علائم بیماری موزاییک باکتریایی روی گندم در مزرعه. الف و ب: نقاط و لکه‌های زرد و رنگ پریده در برگ‌ها که ممکن است به هم پیوسته و به صورت رگه مانند مشاهده شوند. ج: نمونه‌های بدون علائم از گیاهان سالم.

Figure 1. Symptoms of bacterial mosaic disease on wheat in the field. A and B: Leaves with small, yellow lesions that sometimes coalesced into streaks. C: Asymptomatic healthy plants.



شکل ۲- الف و ب: پرگنه‌های نارنجی رنگ دو جدایه خالص از باکتری *Clavibacter tessellarius* روی محیط کشت BCT. ج: پرگنه‌های نارنجی رنگ *C. tessellarius* به همراه پرگنه‌های قرمز مایل به صورتی از یک باکتری دیگر گرم مثبت.

Figure 2. A, B: Orange colonies of two pure isolates of *Clavibacter tessellarius* on BCT medium. C: reddish-pink colonies of an-related Gram-positive bacterium.

قطعات تکثیر شده از ژن *gyrB* پس از تعیین ترادف و ویرایش، با رس‌شمارهای MZ014474-MZ01483 در ژن بانک قرار گرفتند. جستجوی بلاست (BLAST) با استفاده از ترادف‌های ویرایش شده ژن *gyrB* در داده‌های ژن بانک (NCBI) تأیید کرد که هر ده جدایه بیش‌ترین شباهت (۹۸/۸ تا ۹۹/۵ درصد) را در ترادف این ژن با جدایه‌های *C. tessellarius* داشتند. بدین ترتیب درخت تبارزایی نیز تعلق این جدایه‌ها را به گونه‌ی *C. tessellarius* تأیید کرد (شکل ۵).

ده جدایه‌ی باکتری *C. tessellarius* که از استان‌های مختلف جداسازی شدند از نظر ترادف ژن

شناسایی مولکولی جدایه‌ها و آنالیز تبارزایی

جفت‌آغازگر CMR16F1/CMR16R1 در آزمون پی‌سی‌آر قطعه‌ی حدود ۱/۴ کیلوگفت‌باز را در ۸۶ جدایه از باکتری‌های گرم مثبت تکثیر کرد (شکل ۳). از این ۸۶ جدایه، ۶۱ جدایه براساس آزمون‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و بیماری‌زایی *C. tessellarius* تشخیص داده شده بودند. ده جدایه از آنها، به‌عنوان نماینده مناطق مختلف انتخاب و قسمتی از ژن *gyrB* هریک در آزمون پی‌سی‌آر با آغازگرهای 2F/4R تکثیر گردید. قطعه‌ی قابل انتظار حدود ۵۳۰ جفت‌باز در این جدایه به‌دست آمد، ولی در نمونه‌ی شاهد منفی (آب مقطر سترون) این قطعه تکثیر نشد (شکل ۴).

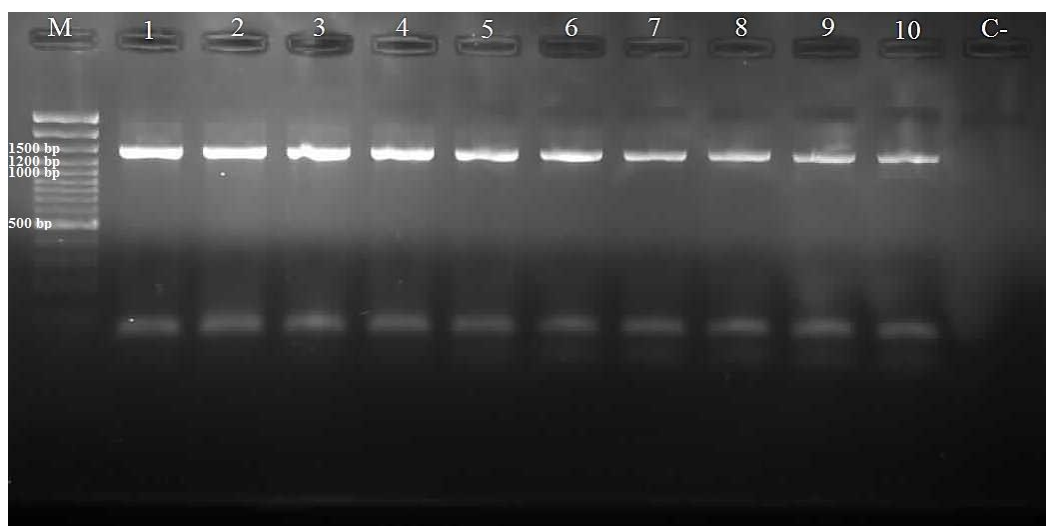
نتایج این پژوهش نشان داد که بیماری موزاییک باکتریایی گندم در مناطق مختلف کشت گندم در هر چهار استان بررسی شده (فارس، خوزستان، کرمان و بوشهر) وجود دارد. در ایران، در سال‌های گذشته بیماری موزاییک باکتریایی گندم از استان‌های فارس (منطقه‌ی باجگاه)، تهران (فیرزوکوه) و گلستان (گنبد) به صورت موردی گزارش شده بود (Sahandpour et al., 2001; Arabi et al., 2004; Razi et al., 2010)، ولی تا پیش از این مطالعه، در رابطه با وضعیت پراکنش این بیماری در هیچ جای کشور تحقیقی انجام نشده بود. این اولین گزارش از وجود بیماری موزاییک باکتریایی گندم در استان‌های خوزستان، کرمان و بوشهر است و در کشور، اولین پژوهش در رابطه با تعیین پراکنش بیماری است.

طی این بررسی، بالاترین میزان وقوع آلودگی مزارع (تعداد مزارع آلوده تقسیم بر تعداد مزارع نمونه‌برداری شده $\times 100$) مربوط به استان‌های فارس (۳۵/۷ درصد) و خوزستان (۳۰/۵۵ درصد) بود. باتوجه به نتایج تحقیق حاضر و وقوع

gyrB بین ۹۹/۳ تا ۱۰۰ درصد با یکدیگر شباهت داشتند. این جدایه‌ها با جدایه‌های *C. tessellarius* در ژن بانک (رس‌شمارهای MT941371، MT941372، JX890022 و MF409306) بین ۹۸/۵ تا ۹۹/۶ درصد در ترادف این قطعه ژن *gyrB* شباهت داشتند (جدول ۳). در میان زیرگونه‌های *C. mishiganensis*، جدایه‌های *C. tessellarius* بیش‌ترین شباهت را در ترادف ژن *gyrB* با زیرگونه‌ی *C. mishiganensis* subsp. *mishiganensis* و گونه‌ی *Clavibacter capsici* (۹۶/۹ تا ۹۷/۴ درصد) و کم‌ترین شباهت را با گونه‌های *Clavibacter insidious*، *Clavibacter nebraskense* و *Clavibacter sepidonicus* (۹۵/۲ تا ۹۶/۳ درصد) داشتند.

بحث

مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی وقوع و تعیین پراکنش بیماری موزاییک باکتریایی گندم ناشی از *C. tessellarius* در مزارع گندم جنوب ایران انجام شد.



شکل ۳- قطعات قابل انتظار حدود ۱/۴ کیلوگفت‌باز از ژن 16S rRNA که در برخی از باکتری‌های گرم مثبت در آزمون PCR با آغازگرهای CMR16F1/CMR16R1 تکثیر شدند. راهک‌های ۱ تا ۱۰: جدایه‌های نماینده به‌دست آمده از بوته‌های گندم دارای علائم موزاییکی؛ C-: کنترل منفی؛ M: مارکر ۱۰۰ جفت‌باز (سیناکلون، ایران).

Figure 3. The expected fragments of about 1.4 kb of 16S rRNA gene that amplified by PCR test using primer pair CMR16F1/CMR16R1 in some isolates of gram-positive bacteria recovered from mosaic-affected wheat plants. Lines 1 to 10: representative isolates; C-: negative control; M: 100 bp DNA ladder (SinaClon, Iran).

جدول ۲- مزارع گندم مورد نمونه برداری به همراه تاریخ و محل نمونه برداری، نام ارقام کشت شده و وضعیت آلودگی

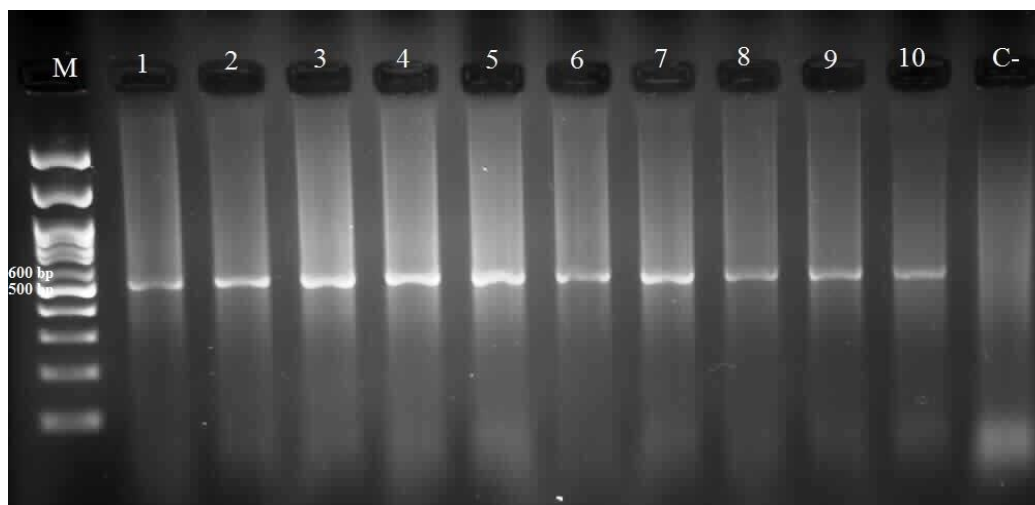
مزارع به موزاییک باکتریایی ناشی از *Clavibacter tessellarius* (CT)

Table 2. Wheat farms sampled in this study along with the date and place of sampling, cultivars name and infection status of the farms with *Clavibacter tessellarius*

No	Isolate	County	Date	Cultivar	C	No.	Isolate	County	Date	Cultivar	CT	No.	Isolate	County	Date	Cultivar	CT
1	Aba1	Abadeh	March2020	Mihan	-	65	Zarg1	Zargan	March2020	Sirvan	+	129	Ram1	Ramhormoz	Jan2020	Chamran2	+
2	Aba2	Abadeh	March2020	Mihan	-	66	Zarg2	Zargan	March2020	Chamran2	+	130	Ram2	Ramhormoz	Jan2020	Mehrgan	-
3	Aba3	Abadeh	March2020	Pishgam	-	67	Zarg3	Zargan	March2020	Chamran	-	131	Ram3	Ramhormoz	Jan2020	Mehrgan	-
4	Aba4	Abadeh	March2020	Pishgam	-	68	Zarg4	Zargan	March2020	Sirvan	-	132	Ram4	Ramhormoz	Jan2020	Mehrgan	+
5	Egh1	Eghlid	March2020	Pishgam	-	69	Nay1	Nayriz	Feb2020	Pishtaz	-	133	Ahv1	Ahvaz	Jan2020	Chamran	+
6	Egh2	Eghlid	March2020	Pishgam	-	70	Nay2	Nayriz	Feb2020	Chamran2	-	134	Ahv2	Ahvaz	Jan2020	Chamran	+
7	Egh3	Eghlid	March2020	Mihan	-	71	Nay3	Nayriz	Feb2020	Chamran2	-	135	Ahv3	Ahvaz	Jan2020	Chamran2	+
8	Egh4	Eghlid	March2020	Mihan	-	72	Nay4	Nayriz	Feb2020	Sirvan	-	136	Ahv4	Ahvaz	Jan2020	Chamran2	-
9	Sep1	Sepidan	Feb2020	Chamran	-	73	Ghir1	Ghir	Jan2020	Chamran2	-	137	Shut1	Shushtar	Jan2020	Mehrgan	-
10	Sep2	Sepidan	Feb2020	Sirvan	-	74	Ghir2	Ghir	Jan2020	Mehrgan	-	138	Shut2	Shushtar	Jan2020	Mehrgan	-
11	Sep3	Sepidan	Feb2020	Sirvan	-	75	Ghir3	Ghir	Jan2020	Chamran2	-	139	Shut3	Shushtar	Jan2020	Chamran2	-
12	Sep4	Sepidan	Feb2020	Sirvan	-	76	Ghir4	Ghir	Jan2020	Chamran2	-	140	Shut4	Shushtar	Jan2020	Chamran2	-
13	Mar1	Marvdasht	March2020	Sirvan	-	77	Jah1	Jahrom	Jan2020	Chamran2	-	141	Shus1	Shush	Jan2020	Chamran	-
14	Mar2	Marvdasht	March2020	Chamran2	-	78	Jah2	Jahrom	Jan2020	Chamran2	-	142	Shus2	Shush	Jan2020	Chamran2	-
15	Mar3	Marvdasht	March2020	Chamran2	-	79	Jah3	Jahrom	Jan2020	Sirvan	+	143	Shus3	Shush	Jan2020	Chamran2	-
16	Mar4	Marvdasht	March2020	Chamran2	-	80	Jah4	Jahrom	Jan2020	Sirvan	+	144	Shus4	Shush	Jan2020	Chamran2	-
17	Mam1	Mamasani	Jan2020	Chamran	-	81	Baj1	Bajgah	March2020	Chamran	+	145	Dez1	Dezful	Jan2020	Mehrgan	+
18	Mam2	Mamasani	Jan2020	Behrang	+	82	Baj2	Bajgah	March2020	Chamran2	+	146	Dez2	Dezful	Jan2020	Mehrgan	+
19	Mam3	Mamasani	Jan2020	Chamran	+	83	Baj3	Bajgah	March2020	Chamran	+	147	Dez3	Dezful	Jan2020	Mehrgan	-
20	Mam4	Mamasani	Jan2020	Behrang	-	84	Baj4	Bajgah	March2020	Chamran2	+	148	Dez4	Dezful	Jan2020	Chamran2	-
21	Shir1	Shiraz	March2020	Sirvan	+	85	Ker1	Kerman	Jan2020	Chamran	+	149	Abn1	Abadan	Jan2020	Chamran2	-
22	Shir2	Shiraz	March2020	Sirvan	+	86	Ker2	Kerman	Jan2020	Chamran	+	150	Abn2	Abadan	Jan2020	Chamran2	-
23	Shir3	Shiraz	March2020	Chamran2	-	87	Ker3	Kerman	Jan2020	Chamran	+	151	Abn3	Abadan	Jan2020	Chamran2	-
24	Shir4	Shiraz	March2020	Pishtaz	+	88	Ker4	Kerman	Jan2020	Chamran2	+	152	Abn4	Abadan	Jan2020	Chamran2	-
25	Kaz1	Kazerun	Feb2020	Chamran	-	89	Sir1	Sirjan	Jan2020	Chamran	+	153	Shad1	Shadgan	Jan2020	Mehrgan	-
26	Kaz2	Kazerun	Feb2020	Mihan	-	90	Sir2	Sirjan	Jan2020	Chamran2	+	154	Shad2	Shadgan	Jan2020	Chamran2	-
27	Kaz3	Kazerun	Feb2020	Mihan	-	91	Sir3	Sirjan	Jan2020	Chamran	-	155	Shad3	Shadgan	Jan2020	Chamran2	-
28	Kaz4	Kazerun	Feb2020	Chamran	-	92	Sir4	Sirjan	Jan2020	Chamran2	+	156	Shad4	Shadgan	Jan2020	Chamran2	-
29	Fir1	Firuzabad	March2020	Sirvan	+	93	Raf1	Rafsnjan	Jan2020	Chamran2	+	157	Khor1	Khormshhr	Jan2020	Mehrgan	-
30	Fir2	Firuzabad	March2020	Chamran2	+	94	Raf2	Rafsnjan	Jan2020	Chamran2	+	158	Khor1	Khormshhr	Jan2020	Chamran2	+
31	Fir3	Firuzabad	March2020	Chamran2	-	95	Raf3	Rafsnjan	Jan2020	Chamran2	+	159	Khor1	Khormshhr	Jan2020	Chamran2	+
32	Fir4	Firuzabad	March2020	Pishtaz	-	96	Raf4	Rafsnjan	Jan2020	Chamran	-	160	Khor1	Khormshhr	Jan2020	Mehrgan	-
33	Far1	Farashband	Feb2020	Chamran	+	97	Baf1	Baft	Jan2020	Sirvan	-	161	Sus1	Susngrd	Jan2020	Chamran2	+
34	Far2	Farashband	Feb2020	Chamran	-	98	Baf2	Baft	Jan2020	Mehrgan	-	162	Sus2	Susngrd	Jan2020	Chamran2	+
35	Far3	Farashband	Feb2020	Sirvan	+	99	Baf3	Baft	Jan2020	Mehrgan	-	163	Sus3	Susngrd	Jan2020	Mehrgan	-
36	Far4	Farashband	Feb2020	Sirvan	-	100	Baf4	Baft	Jan2020	Chamran	-	164	Sus4	Susngrd	Jan2020	Chamran2	-
37	Fas1	Fasa	March2020	Sirvan	+	101	Sha1	Shahrabak	Jan2020	Chamran2	-	165	Bush1	Bushehr	Jan2020	Mehrgan	-
38	Fas2	Fasa	March2020	Tirgan	+	102	Sha2	Shahrabak	Jan2020	Barat	-	166	Bush2	Bushehr	Jan2020	Mehrgan	-
39	Fas3	Fasa	March2020	Tirgan	+	103	Sha3	Shahrabak	Jan2020	Chamran2	-	167	Bush3	Bushehr	Jan2020	Chamran2	-
40	Fas4	Fasa	March2020	Chamran2	+	104	Sha4	Shahrabak	Jan2020	Chamran	-	168	Bush4	Bushehr	Jan2020	Chamran2	-
41	Est1	Estahban	March2020	Sirvan	-	105	Bar1	Bardsir	Jan2020	Chamran	-	169	Gen1	Genaveh	Jan2020	Mehrgan	-
42	Est2	Estahban	March2020	Sirvan	+	106	Bar2	Bardsir	Jan2020	Chamran2	-	170	Gen2	Genaveh	Jan2020	Chamran2	-
43	Est3	Estahban	March2020	Sirvan	-	107	Bar3	Bardsir	Jan2020	Chamran2	-	171	Gen3	Genaveh	Jan2020	Chamran2	-
44	Est4	Estahban	March2020	Sirvan	-	108	Bar4	Bardsir	Jan2020	Chamran2	-	172	Gen4	Genaveh	Jan2020	Mehrgan	-
45	Sarv1	Sarvestan	March2020	Sirvan	+	109	Jir1	Jirft	Jan2020	Sirvan	-	173	Day1	Daylam	Jan2020	Chamran	-
46	Sarv2	Sarvestan	March2020	Sirvan	+	110	Jir2	Jirft	Jan2020	Chamran2	-	174	Day2	Daylam	Jan2020	Mehrgan	-
47	Sarv3	Sarvestan	March2020	Chamran	+	111	Jir3	Jirft	Jan2020	Sirvan	-	175	Day3	Daylam	Jan2020	Chamran2	-
48	Sarv4	Sarvestan	March2020	Chamran	+	112	Jir4	Jirft	Jan2020	Chamran2	-	176	Day4	Daylam	Jan2020	Chamran	-
49	Dar1	Darab	Feb2020	Sirvan	-	113	Bam1	Bam	Jan2020	Mehrgan	-	177	Dar1	Dayer	Jan2020	Chamran	-
50	Dar2	Darab	Feb2020	Sirvan	-	114	Bam2	Bam	Jan2020	Sirvan	-	178	Dar2	Dayer	Jan2020	Chamran	-
51	Dar3	Darab	Feb2020	Sirvan	-	115	Bam3	Bam	Jan2020	Chamran2	-	179	Dar3	Dayer	Jan2020	Chamran	-
52	Dar4	Darab	Feb2020	Chamran2	-	116	Bam4	Bam	Jan2020	Chamran2	-	180	Dar4	Dayer	Jan2020	Chamran2	-
53	Kho1	khonj	Feb2020	Chamran	-	117	Rav1	Raver	Jan2020	Sirvan	-	181	Bor1	Borazjan	Jan2020	Chamran2	+
54	Kho2	khonj	Feb2020	Tirgan	-	118	Rav2	Raver	Jan2020	Sirvan	-	182	Bor2	Borazjan	Jan2020	Chamran2	-

ادامه‌ی جدول ۲:

No.	Isolate	County	Date	Cultivar	C T	No.	Isolat e	County	Date	Cultivar	CT	No.	Isolate	County	Date	Cultivar	CT
55	Kho3	khonj	Feb2020	Sirvan	-	119	Rav3	Raver	Jan2020	Chamran2	-	183	Bor3	Borazjan	Jan2020	Chamran	-
56	Kho4	khonj	Feb2020	Chamran	-	120	Rav4	Raver	Jan2020	Chamran2	-	184	Bor4	Borazjan	Jan2020	Chamran2	+
57	Lar1	Lar	Feb2020	Mehrgan	+	121	Zara1	Zarand	Jan2020	Mehrgan	-	185	Ahr1	Ahram	Jan2020	Mehrgan	-
58	Lar2	Lar	Feb2020	Sirvan	+	122	Zara2	Zarand	Jan2020	Sirvan	-	186	Ahr2	Ahram	Jan2020	Mehrgan	-
59	Lar3	Lar	Feb2020	Mehrgan	+	123	Zara3	Zarand	Jan2020	Sirvan	-	187	Ahr3	Ahram	Jan2020	Chamran	-
60	Lar4	Lar	Feb2020	Sirvan	+	124	Zara4	Zarand	Jan2020	Chamran2	-	188	Ah41	Ahram	Jan2020	Chamran	-
61	Lam1	Lamerd	Feb2020	Sirvan	-	125	Beh1	Behbahan	Jan2020	Chamran2	-	189	Khm1	Khormoj	Jan2020	Chamran	-
62	Lam2	Lamerd	Feb2020	Sirvan	-	126	Beh2	Behbahan	Jan2020	Chamran2	-	190	Khm2	Khormoj	Jan2020	Mehrgan	-
63	Lam3	Lamerd	Feb2020	Chamran	-	127	Beh3	Behbahan	Jan2020	Mehrgan	-	191	Khm3	Khormoj	Jan2020	Chamran2	-
64	Lam4	Lamerd	Feb2020	Chamran	-	128	Beh4	Behbahan	Jan2020	Mehrgan	-	192	Khm4	Khormoj	Jan2020	Chamran	-



شکل ۴- قطعه‌ی قابل انتظار حدود ۵۳۰ جفت‌باز که با آزمون پی‌سی‌آر و آغازگرهای 2F/4R مربوط به ژن *gyrB* در جدایه‌های نماینده به‌دست آمده از بوته‌های گندم دارای علائم موزاییک تکثیر شدند. M: مارکر ۱۰۰ جفت‌باز. نمونه‌های ۱ تا ۱۰: جدایه‌های نماینده؛ C-: کنترل منفی؛ M: مارکر ۱۰۰ جفت‌باز (Smobio, SM2300).

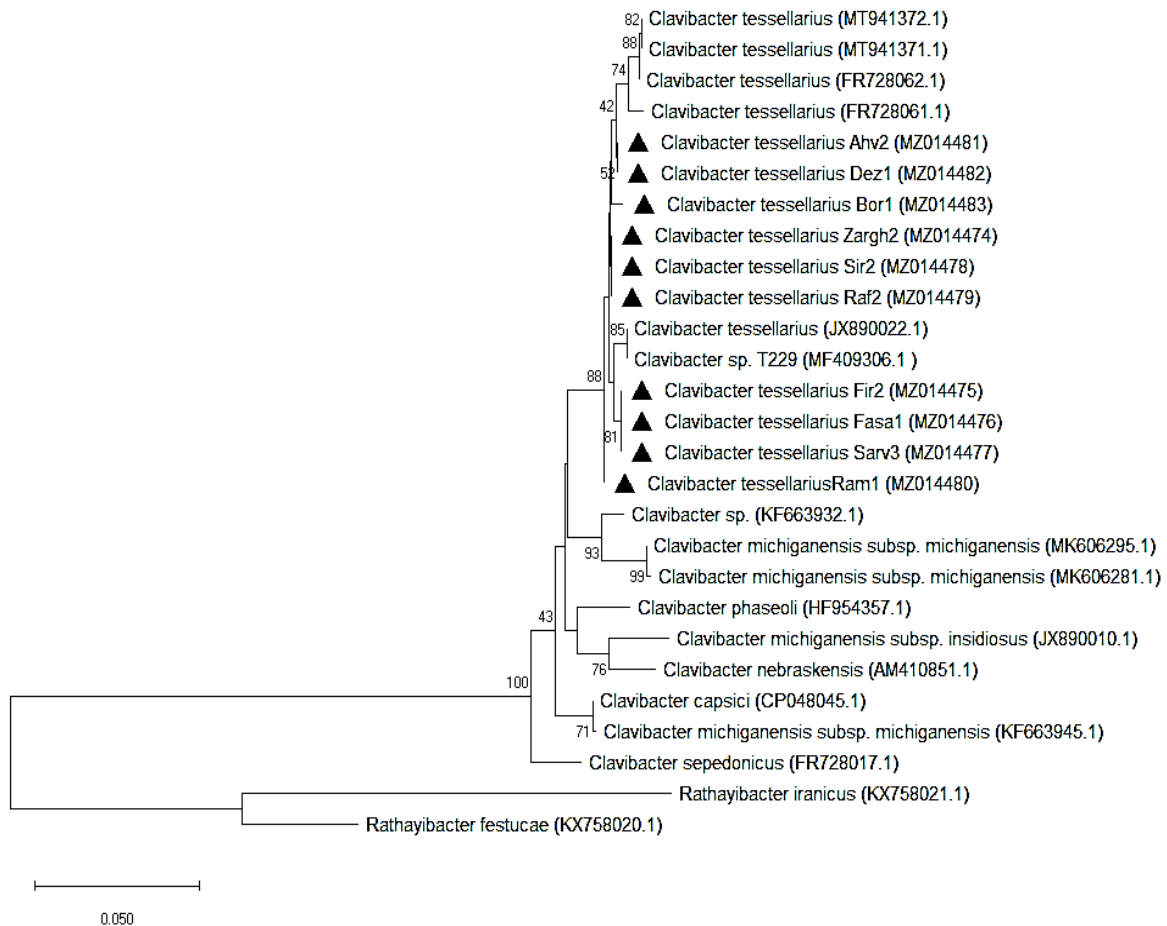
Figure 4. The expected fragments of about 530 bp that amplified by PCR using 2F/4R primers of the *gyrB* gene. Lines 1 to 10: representative isolates of the Gram-positive bacteria recovered from mosaic-affected wheat plants; C-: negative control; M: 100 bp DNA ladder (Smobio, SM2300).

کوتولگی گندم و سایر بیماری‌های ویروسی در مزارع گندم در جنوب کشور زیاد به چشم می‌خورند که به‌خصوص علائم موزاییک رگه‌ای گندم شبیه به موزاییک باکتریایی گندم است و تشخیص ویروس با انجام آزمایش‌های سرولوژیکی و مولکولی انجام می‌گیرد. در کنار این علائم، ممکن است علائم موزاییک ناشی از باکتری *C. tessellarius* نیز وجود داشته باشد که تشخیص آن مشکل‌تر است و درنهایت با کشت عامل بیماری در آزمایشگاه، روش‌های مولکولی، آزمون‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی قابل تشخیص است. علائم شبیه به موزاییک به صورت لکه‌ها و نقاط کوچک زرد و رنگ پریده در زمینه‌ی سبز برگ در

متوسط بیماری به میزان ۲۷/۶۰ درصد در مزارع گندم چهار استان بررسی شده (۵۳ مزرعه‌ی آلوده از ۱۹۲ مزرعه)، به‌نظر می‌رسد این بیماری در اغلب مزارع گندم در نقاط مختلف کشور نیز وجود داشته باشد. باوجود این، به دلیل نزدیکی علائم ناشی از این بیمارگر با علائم بیماری‌های ویروسی و علائم کمبودهای غذایی و عدم شناخت کافی از علائم این بیماری، میزان خسارت اقتصادی آن در مزارع گندم در مناطق مختلف کشور و حتی در دنیا تعیین نشده است. علائم مشخص موزاییک و کوتولگی در بیماری‌های ویروسی مانند ویروس کوتولگی زردجو (BYDV)، موزاییک ایرانی ذرت (IMMV) روی گندم، موزاییک رگه‌ای گندم، ویروس

باکتریایی را ایجاد کند و به احتمال زیاد اغلب ارقام با شدت‌های مختلف به این باکتری آلوده می‌شوند. Sahandpour and Rahimian (2004) واکنش ارقام مختلف گندم را نسبت به عامل موزاییک باکتریایی گندم در گلخانه بررسی و شدیدترین علائم و بیش‌ترین سطح آلودگی را در ارقام استار، فلات، الموت و پیش‌تاز مادری و کم‌ترین شدت علائم را در رقم زرین مشاهده و وجود علائم در برخی از ارقام دیگرمانند چمران، شیراز و دوروم عنوان کرده‌اند (Sahandpour et al., 2004).

اغلب ارقام گندمی که نمونه‌برداری از آن‌ها انجام گرفت، مشاهده شد و جداسازی باکتری *C. tessellarius* نیز از ارقام مختلفی مانند چمران، چمران ۲، سیروان، مهرگان، تیرگان، بهرنگ و پیش‌تاز انجام شد. احتمال وقوع آلودگی و ردیابی آن در ارقامی مانند میهن و پیشگام نیز وجود دارد و عدم گزارش وقوع بیماری روی این ارقام در این تحقیق ممکن است به تعداد کم نمونه‌های آن‌ها مرتبط باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری *C. tessellarius* می‌تواند در ارقام مختلف گندم علائم بیماری موزاییک



شکل ۵- درخت تبارزایی که با نرم‌افزار MEGA X با روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor-joining) براساس ترادف قسمتی از ژن *gyrB* در جدایه‌های *C. tessellarius* به‌دست آمده از گندم‌های آلوده به موزاییک و جدایه‌هایی از بانک ژن با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار رسم شده است. استرین‌های جدا شده در این مطالعه با مثلث سیاه در درخت مشخص و رس‌شمارهای مربوط به آن‌ها در پرانتز نوشته شده‌اند. دو گونه‌ی *R. festucae* و *R. iranicus* به‌عنوان گروه‌های خارجی انتخاب شدند.

Figure 5. Phylogenetic tree constructed with MEGA X software by the Neighbor-joining method based on the sequence of *gyrB* gene in *C. tessellarius* isolates recovered from mosaic-affected wheat plants and the related species and subspecies retrieved from GenBank. The strains isolated in this study are marked with a black triangle. The accession numbers are indicated in parentheses. *Rathayibacter iranicus* and *R. festucae* were used as outgroups.

جدول ۳- جدول ماتریس تشابه براساس توالی قسمتی از ژن *gyrB* که با نرم افزار MegAlign محاسبه و شباهت نوکلئوتیدی ده جدایه‌ی نماینده‌ی *C. tessellarius* را که از گیاهان گندم آلوده به موزاییک در نواحی جنوب ایران جداسازی شدند با ترادف‌های برخی از جدایه‌های موجود در ژن بانک نشان می‌دهد.

Table 3. Similarity matrix based on the partial sequence of *gyrB* gene which obtained with MegAlign software showing the nucleotide similarity between ten *C. tessellarius* representative isolates recovered from mosaic-affected wheat plants in southern Iran and some sequences from GenBank.

		Percent Identity																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Divergence	1	■	99.6	99.6	99.6	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	100.0	98.9	98.9	99.3	99.3	95.4	95.8	96.1	97.2	96.7	97.2	74.6	1	Zargh2_Ct
	2	0.4	■	100.0	100.0	99.6	99.6	99.3	99.3	99.3	99.6	98.5	98.5	99.3	99.3	95.4	95.8	95.8	96.7	96.3	96.7	74.6	2	Fir2_Ct
	3	0.4	0.0	■	100.0	99.6	99.6	99.3	99.3	99.3	99.6	98.5	98.5	99.3	99.3	95.4	95.8	95.8	96.7	96.3	96.7	74.6	3	Fasa1_Ct
	4	0.4	0.0	0.0	■	99.6	99.6	99.3	99.3	99.3	99.6	98.5	98.5	99.3	99.3	95.4	95.8	95.8	96.7	96.3	96.7	74.6	4	Sarv3_Ct
	5	0.0	0.4	0.4	0.4	■	100.0	99.8	99.8	99.8	100.0	98.9	98.9	99.3	99.3	95.4	95.8	96.1	97.2	96.7	97.2	74.6	5	Sir2_Ct
	6	0.0	0.4	0.4	0.4	0.0	■	99.8	99.8	99.8	100.0	98.9	98.9	99.3	99.3	95.4	95.8	96.1	97.2	96.7	97.2	74.6	6	Raf2_Ct
	7	0.2	0.7	0.7	0.7	0.2	0.2	■	99.6	99.6	99.8	98.7	98.7	99.6	99.6	95.6	96.1	96.3	97.4	96.5	97.4	74.6	7	Ram1_Ct
	8	0.2	0.7	0.7	0.7	0.2	0.2	0.4	■	100.0	99.8	99.1	99.1	99.1	99.1	95.2	95.6	95.8	96.9	96.5	96.9	74.6	8	Ahv2_Ct
	9	0.2	0.7	0.7	0.7	0.2	0.2	0.4	0.0	■	99.8	99.1	99.1	99.1	99.1	95.2	95.6	95.8	96.9	96.5	96.9	74.6	9	Dez1_Ct
	10	0.0	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0	0.2	0.2	0.2	■	98.9	98.9	99.3	99.3	95.4	95.8	96.1	97.2	96.7	97.2	74.6	10	Bor1_Ct
	11	1.1	1.6	1.6	1.6	1.1	1.1	1.3	0.9	0.9	1.1	■	100.0	98.7	98.7	94.7	95.2	95.4	96.7	96.1	96.7	74.2	11	MT941372.1Ct
	12	1.1	1.6	1.6	1.6	1.1	1.1	1.3	0.9	0.9	1.1	0.0	■	98.7	98.7	94.7	95.2	95.4	96.7	96.1	96.7	74.2	12	MT941371.1Ct
	13	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.4	0.9	0.9	0.7	1.3	1.3	■	100.0	95.2	95.6	96.1	96.9	96.1	96.9	74.6	13	JX890022.1Ct
	14	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.4	0.9	0.9	0.7	1.3	1.3	0.0	■	95.2	95.6	96.1	96.9	96.1	96.9	74.6	14	MF409306.1Clavibacter_sp.T229
	15	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.5	5.0	5.0	4.8	5.5	5.5	5.0	5.0	■	96.9	94.5	96.5	96.1	96.5	74.2	15	JX890010.1Ct
	16	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3	4.1	4.5	4.5	4.3	5.0	5.0	4.5	4.5	3.1	■	94.1	97.4	95.6	97.4	75.7	16	AM410851.1Cn
	17	3.8	4.1	4.1	4.1	3.8	3.8	3.6	4.1	4.1	3.8	4.5	4.5	3.8	3.8	5.5	5.9	■	95.8	95.6	95.8	75.7	17	FR728017.1Cs
	18	2.9	3.4	3.4	3.4	2.9	2.9	2.7	3.1	3.1	2.9	3.4	3.4	3.1	3.1	3.6	2.7	4.1	■	97.4	100.0	75.9	18	CP048045.1Cc
	19	3.4	3.8	3.8	3.8	3.4	3.4	3.6	3.6	3.6	3.4	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.5	4.3	2.7	■	97.4	75.5	19	HF954357.1Cp
	20	2.9	3.4	3.4	3.4	2.9	2.9	2.7	3.1	3.1	2.9	3.4	3.4	3.1	3.1	3.6	2.7	4.1	0.0	2.7	■	75.9	20	KF663945.1Cmm
	21	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.1	31.7	31.7	31.1	31.1	31.7	29.4	29.1	29.1	29.8	29.1	■	21	KX758021.1Rhi
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			

تهیه‌ی بذر از مناطق آلوده‌ای که شناسایی و تشخیص داده نشده‌اند و عدم استفاده از بذور سالم و عاری از بیمارگر به شیوع بیماری در مناطق دیگر منجر خواهد شد. از سوی دیگر، آلودگی بدون علامت *C. tessellarius* روی برخی از گیاهان خانواده‌ی گرامینه مانند جو، یولاف، ذرت شیرین، سودان گراس و چاودار وحشی نیز گزارش شده است (Carlson and Vidaver, 1982). تناوب کشت گندم با این گیاهان و وجود برخی از گیاهان خانواده‌ی گرامینه به‌عنوان علف هرز در اطراف مزارع گندم می‌تواند منجر به بقای باکتری روی این میزبان‌ها و وقوع و پراکنش بیش‌تر بیماری روی گندم شود.

یکی از مشکلات تعیین پراکنش بیماری موزاییک باکتریایی گندم، علاوه بر تشخیص مشکل علامت آن به دلیل شباهت با سایر علائم تغذیه‌ای و بیمارگرهای ویروسی، عدم وجود یک روش کارا در شناسایی سریع و دقیق عامل بیماری، *C. tessellarius*، در گذشته بود که به دلیل ویژگی‌های نزدیک این باکتری با برخی از گونه‌ها و زیرگونه‌های کلایواکتر بوده است. حتی جفت‌آغازگر اختصاصی CMR16F1/CMR16R1 که از روی

به‌طورکلی، وقوع این بیماری در بیش از ۳۰ درصد از مزارع گندم در استان‌های فارس و خوزستان که قطب تولید گندم در کشور نیز هستند، مشاهده شد. مطالعه‌ای که در ۳۴۱ مزرعه‌ی گندم در ایلینوی آمریکا طی سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۰۹ و ۲۰۲۰-۲۰۱۹ در خصوص وقوع ویروس‌های گندم و باکتری عامل موزاییک باکتریایی گندم انجام شد نشان داد که به‌طور متوسط در این پنج سال، علاوه بر وقوع ۲۲ درصدی ویروس کوتولگی زرد جو و وقوع ۲۲ درصدی ویروس موزاییک رگه‌دوکی گندم (WSSMV)، عامل موزاییک باکتریایی گندم نیز به‌طور میانگین در ۷۷ درصد از مزارع گندم ردیابی شد. این گزارش حاکی از وقوع بالای موزاییک باکتریایی گندم نسبت به سایر بیماری‌های رایج در مزارع گندم این منطقه است (Kleczewski et al., 2020). به دلیل عدم شناخت کافی از علائم این بیماری و تشخیص مشکل آن، در هیچ جای دنیا به‌جز آمریکا روی وقوع و ردیابی این بیماری تحقیقی انجام نشده و گزارش رسمی مشاهده نمی‌شود.

بذرداد بودن عامل بیماری موزاییک باکتریایی گندم در انتشار بیماری در مناطق مختلف تأثیرگذار است و

(Eichenlaub and Gartemann, 2011). در ایران نیز در سال‌های اخیر برخی از گونه‌های کلایوباکتر شیوع پیدا کرده‌اند؛ به‌عنوان مثال شانکر باکتریایی گوجه فرنگی در اکثر مناطق کشت آن شیوع یافته و موجب خسارت‌های زیادی نیز شده است (Osdaghi et al., 2018).

با توجه به اینکه این بیماری نیز مانند بیماری لکه‌نواری گندم بذرزاد است و احتمال انتقال آن از مناطق آلوده به سالم زیاد است، استفاده از بذر گواهی شده و سالم در کنار ژنوتیپ‌های مقاوم در کنترل و کاهش انتشار آن نقش مهمی دارد. کشت وسیع گندم و سایر غلات در استان‌های فارس و خوزستان و احتمالاً حساسیت نسبی اغلب این ارقام می‌تواند دلیلی بر پراکنش بیماری موزاییک باکتریایی در تعداد بیش‌تری از مزارع گندم در این دو استان باشد.

به‌طور کلی، درمورد پراکنش و اهمیت بیماری موزاییک باکتریایی گندم در دنیا و در ایران پژوهش‌های اندکی انجام شده است. در مطالعات آتی لازم است که علایم این بیماری و وقوع آن در استان‌های مختلف کشور و خسارت اقتصادی احتمالی آن در کاهش عملکرد گندم مورد توجه قرار گیرد. همچنین، تنوع ژنتیکی جدایه‌های *C. tessellarius* در کشور به‌منظور فهم از ساختار جمعیت باکتری، برای مدیریت بهتر آن در صورت شیوع بیماری، لازم است بررسی شود. این باکتری ممکن است از سایر گیاهان گرامینه و حتی میزبان‌های گیاهی دیگر نیز جداسازی شود (Carlson and Vidaver, 1982)، بنابراین، ردیابی این باکتری و گونه‌های نزدیک به آن روی علف‌های هرز در اطراف مزارع گندم و بیماری‌زایی آن‌ها می‌تواند در آینده مورد بررسی قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از جناب آقای دکتر ابراهیم اسداغی به پاس راهنمایی‌های ارزنده‌شان کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین، از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس و بخش گیاهپزشکی که امکانات انجام این پژوهش را فراهم کردند سپاس‌گزاری می‌شود.

ترادف ژن 16S rRNA در استرین‌های *mishiganensis* طراحی شده (Lee et al., 1997) و قطعه‌ای در حدود ۱/۴ کیلو جفت‌بازی را تکثیر می‌کند، برای تشخیص زیرگونه‌ها یا گونه‌های نزدیک *mishiganensis* از یکدیگر کافی نیست. از این رو، برای شناسایی مولکولی این گونه‌ها از سایر ژن‌های هدف مانند ژن‌های خانه‌زاد *atpA*، *rpoB* و *gyrB* استفاده می‌شود و در این بین تجزیه و تحلیل توالی ژن جیراز B (*gyrB*) برای تشخیص گونه‌های نزدیک یا زیرگونه‌ها از ارزش زیادی برخوردار است (Zaluga et al., 2011). در این مطالعه نیز استفاده از این ژن و تعیین توالی آن در جدایه‌های نماینده‌ای که از مزارع گندم جداسازی شده بودند، منجر به تایید تشخیص گونه‌ها و تفکیک آن‌ها از سایر گونه‌های کلایوباکتر و زیرگونه‌های *mishiganensis* شد. تشخیص گونه‌های کلایوباکتر و زیرگونه‌های *C. mishiganensis* براساس ویژگی‌های فنوتیپی، آزمون‌های سرولوژیک، پروفیل اسیدهای چرب و پروتئین‌ها و به‌خصوص روش‌های مولکولی به‌عنوان روش‌های دقیق و سریع صورت می‌گیرد و در نهایت آزمون بیماری‌زایی باید انجام شود (Li et al., 2018).

براساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مبنی بر وقوع بیماری موزاییک باکتریایی در تعداد زیادی از مزارع گندم در جنوب ایران، اهمیت گونه‌ی *C. tessellarius* بیش از پیش مشخص می‌شود. اخیراً گونه‌ای جدید از کلایوباکتر به نام *Clavibacter zhangzhiyongii* به‌عنوان عامل لکه قهوه‌ای برگ و زوال جو گزارش شده است که در بسیاری از ویژگی‌های فنوتیپی شبیه به گونه‌ی *C. tessellarius* است ولی، علایم متفاوتی را در جو ایجاد می‌کند که احتمالاً به‌دلیل ساختار ژنتیکی متفاوت این گونه است (Tian et al., 2021). تاکنون گونه‌های کلایوباکتر موجب بیماری و خسارت‌های اقتصادی زیادی روی گیاهان مهم زراعی مانند گوجه‌فرنگی، فلفل، سیب‌زمینی، یونجه، لوبیا و ذرت در بسیاری از مناطق دنیا شده‌اند

REFERENCES

- Ahmadi, K., Ebadzadeh, H., Hatami, H., and Kazemian, A. 2020. Agricultural Statistics of 2018-19 Crop Year. Volume One, Ministry of Agriculture. Page 89.
- Arabi, F., Nicraves, V., and Rahimian, H. 2004. Bacterial mosaic of wheat in Tehran province. Proceedings of the 16th Iranian plant Protection Congress, Tabriz, Iran.
- Carlson, R. R. 1982. Bacterial mosaic, a new corynebacterial disease of wheat. *Plant Disease*, 66: 76.
- Carlson, R. R., and Vidaver, A. K. 1982. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(3): 315-326.
- Chang, R. J., Ries, S. M., Hewings, A. D., and D'Arcy, C. J. 1991. Bacterial mosaic of wheat in Illinois. *Plant Disease*, Cab Abstracts.
- Davis, M. J., Gillaspie, Jr. A. G., Vidaver, A. K., and Harris, R. W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 107-117.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Eichenlaub, R., and Gartemann, K. H. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 49: 445-464.
- FAO. 2020. Crop Prospects and Food Situation - Quarterly Global Report No. 1, March 2020. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca8032en>
- Jacques, M. A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., Quillevere, A., Audusseau, C., Olivier, V., Grimault V., and Mathis, R. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 8388-8402.
- Kleczewski, N., Chapara, V., and Bradley, C. 2020. Occurrence of viruses and *Clavibacter michiganensis* in winter wheat in Illinois, 2009 to 2011 and 2019 to 2020. *Plant Health Progress*, 21(4): 317-320.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Lee, I. M., Bartoszyk, I. M., Gundersen, D. E., Mogen, B., and Davis, R. E. 1997. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2625-2630.

- Li, X., Tambong, J., Yuan, K. X., Chen, W., Xu, H., Lévesque, C. A., and De Boer, S. H. 2018. Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68: 234-240.
- McBeath, J., and Adelman, M. 1986. Detection of *Corynebacterium michiganense* subsp. *tessellarius* in seeds and wheat plants. *Phytopathology*, 76: 1099.
- McBeath, J. H. 1988. Other bacterial diseases. In: Seed-Borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat. S. B. Mathur and B. M. Cunfer, eds. Jordbrugsforlaget.
- Mendez, V., Valenzuela, M., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Besoain, X., Moore, E. R. B., and Seeger, M. 2020. Comparative genomics of pathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile reveals potential virulence features for tomato plants. *Microorganisms*, 8(11): 1679.
- Osdaghi, E., Ansari, M., Taghavi, S. M., Zarei S., Koebnik, Ralf., and Lamichhane J. R. 2018. Pathogenicity and phylogenetic analysis of *Clavibacter michiganensis* strains associated with tomato plants in Iran. *Plant Pathology*, 67(4): 957-970.
- Razi, M., Aghajani, M., and Mirali, M. 2010. Occurrence of bacterial wheat mosaic in Golestan province. *Proceedings of the 19th Iranian plant Protection Congress, Tehran, Iran.*
- 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. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 115-123.
- Richert, K., Brambilla, E., and Stackebrandt, E. 2007. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16SrRNA genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 30: 102-108.
- Sahandpour, A., and Azad, H. 2000. Occurrence of bacterial wheat mosaic in Fars province. *Proceedings of the 14th Iranian plant Protection Congress, Isfahan, Iran.*
- Sahandpour, A., and Rahimian, H. 2004. Investigation of reaction of different wheat cultivars to bacterial mosaic of wheat. *Proceedings of the 16th Iranian plant Protection Congress, Tabriz, Iran.*
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third edition. APS, St. Paul, MN, USA, 379 pp.
- Schutt, L. S. 2019. *Serie Extensión INTA Paraná N*, 84: 35-36.
- Tian, Q., Chuan, J., Sun, X., Zhou, A., Wang, L., Zou, J., Zhao, W., Li, X. 2021. Description of *Clavibacter zhangzhuyongii* sp. nov., a phytopathogenic actinobacterium isolated from barley seeds, causing leaf brown spot and decline. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(5): 004786.

Zaluga, J., Heylen, K., Van Hoorde, K., Hoste, B., Van Vaerenbergh, J., Maes, M., and De Vos, P. 2011. *GyrB* sequence analysis and MALDI-TOF MS as identification tools for plant pathogenic *Clavibacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, 34: 400-407.



© 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/>).

Occurrence and distribution of wheat bacterial mosaic in southern Iran

M. Nasiri¹, H. Rahimian², M.M Faghihi^{3*} and V. Babaeizad

1. Ph.D. student, Department of Plant Protection, Agricultural Faculty, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Agricultural Faculty, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran
3. ***Corresponding Author:** Assistant Professor of Plant Pathology, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), P.O. Box 71555-617 Shiraz, Iran. (mm.faghihi@yahoo.com)
4. Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Agricultural Faculty, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2021.17081

Received: 15 June 2021

Accepted: 19 August 2021

Abstract

Background and Objectives

The bacterial mosaic induced by *Clavibacter tessellarius* is one of the wheat seed-borne diseases that causes mosaic and chlorotic leaf spots on infected plants. The disease has previously been reported in a few regions within Iran. There is still no information on the disease's prevalence and distribution in the major wheat-growing areas of southern Iran. The disease may have gone unnoticed in part due to its mild symptoms and resemblance to those caused by viruses and certain non-infectious wheat diseases. This study aimed to determine the occurrence and distribution of wheat bacterial mosaic in wheat fields in southern Iran.

Materials and Methods

Between 2019 and 2020, surveys in wheat fields in four southern Iranian provinces, including Fars, Khuzestan, Kerman, and Bushehr were conducted, and 192 plant samples with symptoms resembling the bacterial mosaic were collected. Bacteria were isolated and purified using semi-selective media, and Gram-positive isolates were selected using Gram staining and KOH solubility tests. The isolates were identified using a polymerase chain reaction (PCR) with *Clavibacter*-specific primer pair CMR16F1/CMR16R1, as well as their phenotypic and pathogenicity characteristics. Additionally, a fragment of the *gyrB* gene from the representative isolates was amplified by PCR using primer pair 2F/4R. The PCR products were purified and directly sequenced. The obtained sequences were aligned, trimmed, and compared to those of related strains in the GenBank using the BLAST search method. A phylogenetic tree based on the *gyrB* sequences was constructed using the MEGAX software employing the neighbor-joining method.

Results

In total, 400 bacterial isolates were obtained. Based on positive PCR results with specific primers for the genus *Clavibacter* along with the pathogenicity test on wheat, and the phenotypic and biochemical characteristics, 61 isolates were identified as *C. tessellarius*. In ten representative isolates, a ~530 bp fragment of the *gyrB* gene was amplified by PCR. The *gyrB* gene partial sequences were edited and deposited in GenBank under the accession numbers MZ014474–MZ01483. A BLAST search confirmed that all ten isolates shared the highest nucleotide identity (98.8% to 99.5%) with their corresponding sequences in *C. tessellarius* strains in GenBank. In the phylogenetic tree, these isolates

with *C. tessellarius* strains from GenBank were clustered in a clade distinct from *Clavibacter* species and subspecies of *Clavibacter michiganensis*.

Discussion

C. tessellarius was isolated from 53 out of 192 wheat fields (27.60%), exhibiting bacterial mosaic symptoms. The Fars, Khuzestan, Kerman, and Bushehr provinces had disease incidences of 35.7% (30 infected farms out of 84 sampled farms), 30.55%, 22.7%, and 7.1%, respectively, indicating the relatively widespread occurrence of the disease in these provinces. To our knowledge, the wheat bacterial mosaic is reported for the first time in the provinces of Khuzestan, Kerman, and Bushehr, and its occurrence in other parts of the country would not be unexpected.

Keywords: *Iran, Gene gyrB, Clavibacter tessellarius, Wheat*