



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰

doi 10.22055/ppr.2021.17178

بررسی خصوصیات و تنوع ژنتیکی *Xanthomonas translucens* عامل بیماری باکتریایی نواری گندم در استان کرمانشاه

سامان حسینی^۱ و علیرضا معرفت^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲- * نویسنده مسوول: دانشیار، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
(marefat345@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۵

چکیده

بیماری باکتریایی نواری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم است که در صورت مهیا بودن شرایط محیطی خسارت قابل توجهی به میزبان خود در مناطق مختلف دنیا وارد می‌نماید. این بیماری در سال‌های اخیر در استان کرمانشاه شیوع پیدا کرده و موجب خسارت قابل توجه روی گندم شده است. به منظور بررسی خصوصیات عامل بیماری، طی سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ از بذور و برگ‌های دارای علائم بیماری در مناطق عمده گندم‌کاری استان نمونه برداری انجام شد. جداسازی باکتری‌ها از بافت‌های گیاهی آلوده به روش معمول تهیه سوسپانسیون از برگ‌ها و بذور خردشده در آب مقطر سترون و کشت روی محیط کشت آگار غذایی (NA) به صورت خطی انجام شد. پس از رشد، ۱۴۰ پرگنه زرد رنگ شفاف، براق و گرد خالص‌سازی شدند. برای تعیین خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها آزمون‌های باکتری‌شناسی مرسوم انجام شد. برای اثبات بیماری‌زا بودن جدایه‌ها و نیز تعیین پاتووار عامل بیماری، آزمون بیماری‌زایی در گلخانه روی چهار میزبان اصلی شامل گندم، جو، چاودار و تریتیکاله انجام شد. برای شناسایی دقیق‌تر عامل بیماری، ناحیه حفاظت‌شده 16S rRNA در جدایه‌های منتخب، با آزمون PCR و استفاده از آغازگرهای 27F و 1492R تکثیر و تعیین توالی گردید. تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها با استفاده از روش rep-PCR و با آغازگرهای BOX و ERIC بررسی شد. طبق نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی، جدایه‌ها به گونه *X. translucens* تعلق داشتند. بر اساس نتایج آزمون بیماری‌زایی، جدایه‌ها در دو گروه قرار گرفتند. اعضای گروه اول فقط روی گندم بیماری‌زا بودند و علائم خفیفی در برگ‌های تریتیکاله ایجاد کردند اما اعضای گروه دوم در هر چهار میزبان ایجاد بیماری کردند، به این ترتیب اعضای گروه اول به پاتووار *undulosa* و اعضای گروه دوم به پاتووار *cerealis* تعلق داشتند. نتایج تعیین توالی 16S rRNA، شباهت نوکلئوتیدی ۱۰۰٪ جدایه‌های منتخب را با گونه‌ی *X. translucens* (MK356430 - CP043500) موجود در پایگاه ژن بانک نشان داد. بررسی تنوع ژنتیکی نشان داد بین جدایه‌های مناطق مختلف استان تنوع زیادی وجود دارد، اما ارتباطی بین این تنوع و مناطق نمونه‌برداری دیده نشد. ضمن اینکه rep-PCR نتوانست پاتووارهای شناسایی شده را از یکدیگر تفکیک نماید.

کلیدواژه: بیماری‌زایی، پاتووار، سیاهی پوشینه، rep-PCR

دبیر تخصصی: دکتر محمد مهدی فقیهی

Citation: Hosseini, S., & Marefat, A. (2022). Characterization and genetic diversity of *Xanthomonas translucens*, the causal agent of bacterial stripe of wheat in Kermanshah province, Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 89-105. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17178>

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum*)، به عنوان محصولی استراتژیک، نقش مهمی در اقتصاد و سیاست کشور ایفا می کند. لذا توجه به آفات و بیماری های آن حائز اهمیت است. بر اساس آخرین آمار وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶ میزان تولید گندم در ایران ۱۳/۳ میلیون تن در سطحی به اندازه ۵/۴ میلیون هکتار و در استان کرمانشاه ۸۶۵ هزار تن در مساحتی به اندازه ۴۱۴ هزار هکتار بوده است (Ahmadi et al., 2019). نواری باکتریایی (Bacterial Leaf Streak) از بیماری های مهم غلات در دنیا است. این بیماری اولین بار در آمریکا و روی جو گزارش شد (Bamberg, 1936) و در ایران ابتدا در استان کرمان مشاهده و گزارش گردید (Alizadeh & Rahimian, 1989). از مهم ترین علائم این بیماری ایجاد رگه های باریک آب سوخته روی برگ ها است که به تدریج به نوارهایی با حاشیه زردرنگ و مرکز بافت مرده تبدیل می شوند. همچنین با به خوشه رفتن گیاه معمولاً سیاه شدن پوشینه بذرها و خوشه اتفاق می افتد (Duveiller, 1994; F.Beiki et al., 2004). باکتری عامل بیماری *Xanthomonas translucens* می باشد که روی انواع غلات و چمن زارها در کشورهای مختلف گزارش شده است و گندم (*Triticum spp.*)، جو (*Hordeum vulgare*)، چاودار (*Secal cereale*) و تریتیکاله (*Triticum × Secale*) مهم ترین میزبان های آن به شمار می روند (Duveiller et al., 1997). به علاوه، ایجاد بیماری توسط این باکتری روی پسته گزارش شده است (Marefat et al., 2006).

جدایه های *X. translucens* گرم منفی، میله ای، فاقد اسپور، حاوی یک تاژک قطبی، در اندازه ۱-۲/۵ × ۰/۸-۰/۵ میکرومتر هستند و پرگنه های زردرنگ براق و موکوبیدی در محیط کشت آگار غذایی تشکیل می دهند (Sapkota et al., 2020). آزمایش های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی مختلفی از جمله تعیین توالی 16S rRNA برای شناسایی این

باکتری تا سطح گونه به کار رفته اند (Hauben et al., 2009; Singh et al., 1997)، اما شناسایی و افتراق پاتووارهای عامل بیماری فقط با بررسی بیماری زایی و تعیین دامنه میزبانی امکان پذیر است (Duveiller et al., 1997; Thind 2019). تاکنون چهار پاتووار برای *X. translucens* بیماری زا روی غلات در نظر گرفته شده است: پاتووار *cerealis*، بیماری زا روی گندم، جو، چاودار و تریتیکاله؛ پاتووار *translucens* بیماری زا روی جو؛ پاتووار *undulosa* بیماری زا روی گندم و تریتیکاله و پاتووار *secalis* بیماری زا روی چاودار (Duveiller et al., 1997; Vauterin et al., 1995). همچنین، پاتووار *pistaciae* برای جدایه های بیماری زا روی پسته پیشنهاد شده است (Ducray et al., 2009).

بررسی تنوع ژنتیکی به شناخت بهتر ساختار جمعیت های باکتری های بیماری زای گیاهی و متعاقباً دستیابی به طبقه بندی صحیح، روشی مناسب برای ردیابی و در نهایت مدیریت بهتر بیماری کمک می کند. از بین روش های مختلف، repetitive sequence-based (rep-PCR) به دلایل مختلف از جمله سرعت، هزینه و قابل اعتماد بودن از مناسب ترین روش های بررسی تنوع ژنتیکی باکتری های بیماری زای گیاهی است. در این روش با استفاده از آغازگرهای مربوط به ترادف های ERIC، BOX و REP، این ترادف های کوتاه غیر قابل گد شدن و تکرار شونده در سراسر ژنوم باکتری تکثیر می یابند (Versalovic et al., 1994). این روش به ویژه در بررسی تنوع در جمعیت های مربوط به جنس *Xanthomonas* قدرت تفکیک کنندگی زیاد و نتایج قابل اعتمادی داشته (Lema et al., 2012; Singh et al., 2016; Rademaker et al., 2000). و به طور مؤثری گونه ی *X. translucens* را از سایر گونه های *Xanthomonas* متمایز می کند (Rademaker et al., 2006). اخیراً در یک مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۲ جدایه *X. translucens* از سه استان کشور با استفاده از

پراکنش بیماری در سطح استان نبود. لذا این تحقیق باهدف بررسی پراکنش بیماری نواری باکتریایی گندم در استان کرمانشاه، تعیین خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی باکتری عامل بیماری، بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها و تعیین پاتووار(های) آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

طی سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ از برگ‌ها و بذور گندم دارای علائم بیماری نواری باکتریایی شامل نوارهای بافت مرده شفاف با هاله زرد رنگ روی برگ‌ها و خطوط و نوارهای باریک قهوه‌ای تا سیاه روی خوشه همراه با چروکیدگی بذور، در مناطق عمده گندم کاری استان کرمانشاه (جدول ۱) نمونه‌هایی جمع‌آوری و با ثبت مشخصات مکان و زمان نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جداسازی باکتری، ابتدا برگ‌های آلوده دارای علائم و بذور با آب شستشو داده و سپس در شرایط سترون، قطعاتی از فاصله بین بافت سالم و آلوده برگ و همچنین بذور خرد شدند و داخل تشتک‌های پتری حاوی آب مقطر سترون غوطه‌ور و سوسپانسیون تهیه گردید. پس از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، یک تا دو لوپ از سوسپانسیون‌های به دست آمده روی محیط کشت آگار غذایی^۲ به روش خطی کشت شد. تشتک‌های به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. پس از رشد، پرگنه‌های گرد منظم، لعاب دار، براق و به رنگ زرد شفاف انتخاب و روی محیط کشت آگار غذایی خالص سازی شدند. به منظور نگهداری جدایه‌ها، سوسپانسیونی از باکتری در آب مقطر سترون درون لوله‌های یک و نیم میلی لیتری تهیه و در دمای ۴°C نگهداری شد. همچنین جهت نگهداری بلندمدت جدایه‌ها، سوسپانسیون باکتری‌ها در محیط آبگوشته غذایی حاوی ۵۰ درصد گلیسرول تهیه و در ۲۰°C - نگهداری شد (Schaad et al., 2001).

آغازگرهای ERIC و BOX بررسی گردید که در نتیجه آن این ۱۲ جدایه به دو گروه اصلی و سه زیر گروه تقسیم شدند (Habibian et al., 2021). باید تأکید نمود شناسایی پاتووارهای عامل بیماری فقط با بررسی بیماری زایی و تعیین دامنه میزبانی امکان پذیر است و نه تنها آنالیز اسیدهای چرب، مطالعات پروتئین‌های سلولی، سرولوژی با آنتی‌بادی‌های پلی و مونوکلونال بلکه روش‌های مبتنی بر DNA از جمله هیبریداسیون-DNA AFLP, RFLP, DNA rep-PCR و هم قدرت افتراق قطعی آن‌ها را نداشته‌اند (Duveiller et al., 1997; Rademaker et al., 2006; Adhikari et al., 2012). همچنین، بررسی‌های فیلوژنی با استفاده از توالی‌های ژن‌های خانه‌داری نیز نتوانسته به‌طور قابل‌اعتمادی پاتووارهای *X. translucens* را از هم تفکیک کند (Parkinson et al., 2009; Langlois et al., 2018; Curland et al., 2017). در همین زمینه چهار ژن خانه‌داری *gyrB*, *fyua*, *dnak* و *rpoD* در ۶۵ جدایه *X. translucens* از هشت استان ایران با استفاده از روش آنالیز و تعیین توالی در چند ناحیه ژنی^۱ بررسی و با داده‌های مشابه موجود در ژن‌بانک مقایسه شدند. نتایج این تحقیق ضمن شناسایی جدایه‌های ایرانی به عنوان دو پاتووار *undulosa* و *translucens* بیانگر تنوع ژنتیکی زیاد در بین آنها و حتی بیشتر از تنوع بین جدایه‌های آمریکای شمالی بود (Khojasteh et al., 2019).

طی چند سال اخیر به دلایل مختلف از جمله تغییرات آب‌وهوایی و افزایش بارندگی‌های ابتدای سال و احتمالاً ورود بذور آلوده، بیماری نواری باکتریایی گندم در مناطق مختلف استان کرمانشاه گسترش یافته و بعضاً خسارت چشمگیری به همراه داشته است. هرچند در برخی مطالعات انجام شده در سایر مناطق کشور به تعداد کمی جدایه *X. translucens* از منطقه کرمانشاه اشاره شده است (Khojasteh et al., 2019; Habibian et al., 2021)، اما تا قبل از این تحقیق گزارش کاملی از وضعیت

2- nutrient agar = NA

1- multi-locus sequence analysis and typing

آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

به منظور شناسایی جدایه‌ها، آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل گرم، واکنش فوق حساسیت روی شمع‌دانی و توتون، خصوصیات پرگنه روی محیط^۱ YDC، کاتالاز، اکسیداز، تولید لوان، رشد هوازی/بی‌هوازی، تولید لسیتریناز، لپانیدن سیب‌زمینی، توانایی تحمل نمک طعام در غلظت‌های مختلف، هیدرولیز نشاسته و توین ۸۰، ذوب ژلاتین، توانایی رشد در دمای ۴۰°C، واکنش در شیر لیموس‌دار، فعالیت هسته یخ و توانایی تولید اسید از آرابینوز، مانوز، سلوبیوز، سوربیتول، اینوزیتول و گالاکتوز طبق روش‌های مرسوم باکتری‌شناسی انجام شد (Borkar, Schaad et al., 2001; 2018).

آزمون بیماری‌زایی

برای آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها، بذرها، میزبان‌های اصلی - افتراقی شامل گندم، جو، چاودار و تربیتکاله از گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی دانشگاه رازی تهیه گردید. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوط خاک و ماسه سترون کشت شدند و آزمایش در گلخانه با طول روز و شب طبیعی و دمای حدود ۲۵°C انجام شد. برای هر جدایه چهار تکرار در نظر گرفته شد. مایه‌زنی حدوداً ۲۰-۱۴ روز پس از کشت بذور در مرحله رشدی دو تا سه برگی گیاهان به دو روش تزریق با سرنگ در زیر اپیدرم برگ و اسپری سوسپانسیون باکتری روی برگ انجام شد. برای این منظور، ابتدا از کشت تازه هر جدایه روی محیط آگار غذایی سوسپانسیون در آب مقطر سترون تهیه شد. در روش تزریق با سرنگ با استفاده از اسپکتروفتومتر غلظت سوسپانسیون در طول موج ۶۲۰ نانومتر روی OD^۲ برابر با ۰/۱ تنظیم شد که قبلاً با روش تهیه سری رقت از سوسپانسیون باکتری و کشت رقت‌های مختلف، این OD معادل ۱۰^۶-۱۰^۷ (cfu/ml) محاسبه شده بود. برای روش اسپری روی برگ‌ها، سوسپانسیون باکتری با غلظتی اندکی بیشتر، (OD برابر

با ۰/۱) مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان شاهد با آب مقطر سترون به هر دو روش مایه‌زنی شدند. جهت حفظ رطوبت، گیاهان مایه‌زنی شده با پلاستیک شفاف به مدت ۲۴ ساعت پوشانده شدند و بررسی علائم و ثبت نتایج روزانه انجام شد. دوهفته پس از مایه‌زنی، جداسازی مجدد باکتری از برگ‌های دارای علائم بیماری به روش ذکر شده در بالا انجام و پرگنه‌های جدا شده براساس خصوصیات ظاهری و آزمون‌های اکسیداز، رشد هوازی/بی‌هوازی و هیدرولیز نشاسته با باکتری مایه‌زنی شده مقایسه شدند.

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از روش rep-PCR

چهارده جدایه از مناطق مختلف استان کرمانشاه برای این بررسی انتخاب شدند. آماده‌سازی DNA جدایه‌ها به روش Rademaker & Bruijn (1997) با کمی اصلاحات انجام شد. بدین ترتیب که از کشت تازه هر جدایه روی آگار غذایی در ریزلوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر سترون، سوسپانسیون رقیقی تهیه شد. برای شستشوی باکتری‌ها، سوسپانسیون در دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از حذف روئشین و اضافه کردن آب به رسوب این مرحله تکرار گردید. به رسوب ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱ مولار پتاسیم هیدروکسید اضافه گردید و ریزلوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. پس از شفاف شدن، سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و روئشین حاوی DNA، به ریزلوله‌های سترون جدید منتقل و در دمای ۲۰°C - نگهداری شد.

انگشت‌نگاری DNA به روش BOX-PCR با استفاده از تک آغازگر (5'- BOXAIR (3'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) و نیز به روش ERIC-PCR با استفاده از آغازگرهای ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') و ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') انجام شد (Rademaker & De Bruijn, 1997).

کلکسیون گروه گیاه پزشکی دانشگاه رازی برای مقایسه به عنوان باکتری خارج از گروه در هر دو آزمون به کار رفت.

تکثیر ناحیه 16S rRNA

بر اساس نتایج آزمون بیماریزایی، دو جدایه Ke و Un، به عنوان نماینده از دو پاتووار شناخته شده جدایه‌های X. *translucens* در استان کرمانشاه، برای تعیین توالی 16S rRNA انتخاب شدند. تکثیر و تعیین توالی 16S rRNA طبق روش Jiang et al., 2006 با استفاده از آغازگرهای 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

(تهیه شده از شرکت سیناژن) انجام شد. حجم نهایی مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر از master mix (۲×) (شرکت آمپلیکون)، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیش رو و معکوس، ۲ میکرولیتر از نمونه DNA و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر سترون بود. چرخه‌های دمایی PCR عبارت بود از: واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر (T-Personal, Analytik Jena, Germany) انجام شد. به منظور بررسی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر محصول در ژل آگارز ۱٪ و بافر TAE حاوی رنگ DNA Green viewer (شرکت پارس‌توس) به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد و قطعه تکثیر شده در دستگاه عکس برداری از ژل مشاهده گردید. پس از اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت پیشگام بیوتکنولوژی تهران ارسال گردید. توالی‌های دریافت شده، با استفاده از نرم‌افزار Bioedit ver.7.0 ویرایش و با استفاده از نرم‌افزار آنالین^۱ BLAST تشابه آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی^۲ NCBI بررسی شد. به منظور

1997). مخلوط واکنش حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از master mix (2×) (شرکت آمپلیکون)، ۲ میکرولیتر نمونه DNA، ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیش رو و معکوس در ERIC-PCR و ۳ میکرولیتر از تک آغازگر BOXA1R در BOX-PCR بود که حجم نهایی آن با آب مقطر سترون به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. کلیه آغازگرها از شرکت متابیون آلمان تهیه گردید. چرخه‌های دمایی ERIC-PCR شامل: واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۷ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴°C به مدت ۱۰ ثانیه، واسرشت در دمای ۹۲°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۰°C به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۸ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۶ دقیقه بود. چرخه‌های دمایی BOX-PCR شامل: واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۷ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲°C به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۸ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۶ دقیقه بود که در ترموسایکلر مدل (T-Personal, Analytik Jena, Germany) اجرا شد. محصول PCR در ژل آگارز یک و نیم درصد و بافر TAE در ولتاژ ۹۵ به مدت ۵ ساعت الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با DNA Green viewer با ژل داک عکس برداری انجام شد. تصاویر گرفته شده با استفاده از نرم‌افزار Gel pro analyzer (media cybernetics-USA) بررسی و باندها علامت گذاری شدند. وجود یا عدم وجود باندها به ترتیب به ۱ و ۰ تبدیل و پس از تعیین ماتریس تشابه با استفاده از ضریب جا کارد (J) در نرم‌افزار NTSYS-pc، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA انجام شد (Rohlf., 2009). برای به دست آوردن نتیجه بهتر، نتایج حاصل از BOX-PCR و ERIC-PCR با هم تلفیق گردید. یک جدایه *Pseudomonas syringae* از

از سوربیتول و اینوزیتول استفاده کنند. همچنین همه جدایه‌ها در دمای °C ۴- فعالیت هسته یخ داشتند. هیچ یک از جدایه‌ها قادر به لهانیدن تکه‌های سیب‌زمینی نبودند اما همگی در برگ‌های شمعدانی و توتون پس از ۴۸ ساعت از زمان مایه‌زنی، واکنش فوق حساسیت (HR)^۴ ایجاد کردند (جدول ۲).

آزمون بیماری‌زایی

بیماری‌زایی جدایه‌ها در چهار گیاه میزبان اصلی شامل گندم، جو، چاودار و تربیتی‌کاله به دو روش تزریق در برگ و اسپری روی برگ بررسی شد. علائم بیماری پس از ۷ تا ۱۰ روز در گیاهان مایه‌زنی شده ظاهر شد. در حالی که گیاهان شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند علائمی بروز ندادند. در روش تزریق با سرنگ، علائم ابتدا در محل تزریق به صورت آب‌سوخته ظاهر و به تدریج آب‌سوخستگی و سپس بافت‌مردگی در اطراف محل تزریق اتفاق افتاد؛ به طوری که پس از چند روز علائم در طول برگ به شکل نوارهای قهوه‌ای شفاف با هاله زرد رنگ امتداد پیدا کرد. در روش اسپری ابتدا از نوک برگ علائم بافت‌مردگی شروع و در طول برگ به سمت پایین امتداد پیدا کرد (شکل ۱). در این آزمون دو گروه جدایه با بیماری‌زایی متفاوت مشاهده شد. گروه اول شامل جدایه‌هایی بود که قادر بودند در برگ‌های گندم و به طور خفیف‌تر در برگ‌های تربیتی‌کاله آب‌سوخستگی و به تدریج بافت‌مردگی همراه با هاله زرد رنگ ایجاد کنند اما توانایی بیماری‌زایی در جو و چاودار را نداشتند و طبق گروه‌بندی ارائه شده، به عنوان پاتووار *undulosa* شناخته شدند و گروه دوم شامل جدایه‌هایی بود که قادر بودند در برگ‌های هر چهار گیاه گندم، جو، چاودار و تربیتی‌کاله آب‌سوخستگی سپس بافت‌مردگی و به تدریج نوارهای قهوه‌ای شفاف با هاله زرد رنگ ایجاد کنند و به عنوان پاتووار *cerealis* تشخیص داده شدند. به طور کلی علائم ایجاد شده توسط

بررسی جایگاه توالی‌های به‌دست‌آمده در بین گونه‌های مشابه، با استفاده از نرم‌افزار MEGA X (Kumar et al., 2018) و براساس توالی‌های اخذ شده از بانک ژن ابتدا به روش 'MUSCLE توالی‌ها هم‌تراز شدند و سپس دندروگرام فیلوژنتیکی به روش پیوست همسایه‌ها^۲ ترسیم شد. توالی‌های ویرایش شده برای ناحیه 16S rRNA از دو جدایه Un و Ke، در NCBI ثبت شدند.

نتایج

نمونه‌برداری و جداسازی

از نمونه‌های برگ و بذر جمع‌آوری شده از گندم در ۱۲ منطقه مختلف استان کرمانشاه که علائم نواری باکتریایی را داشتند، در مجموع ۱۴۰ جدایه مشکوک به *X. translucens* به دست آمد. جدایه‌ها براساس زمان و مناطق نمونه‌برداری و با در نظر گرفتن ویژگی‌های فنوتیپی پرگنه‌ها، گروه‌بندی و ۳۲ جدایه به‌عنوان نماینده برای ادامه کار انتخاب شدند (جدول ۱).

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

جدایه‌های مورد بررسی روی محیط کشت آگار غذایی (NA) به شکل پرگنه‌های زرد، براق، برآمده و لزج بودند. این جدایه‌ها روی محیط کشت (YDC^۳) پرگنه-های زرد رنگ لعاب‌داری تولید کردند. جدایه‌ها هوازی اجباری، گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بوده، قادر به هیدرولیز نشاسته، ژلاتین و تولید لستیناز بودند اما نتوانستند توپین ۸۰ را هیدرولیز کنند. همه جدایه‌ها توانایی تولید لوان روی محیط آگار غذایی حاوی سوکروز (NAS) را داشتند و توانستند نمک طعام ۲٪ را تحمل کنند اما، در حضور نمک طعام ۳٪ رشد نکردند. همچنین، جدایه‌ها در دمای °C ۴۰ قادر به رشد نبودند. از نظر واکنش در شیر لیتموس دار توانایی تولید اسید، پیتونیزه کردن و احیای لیتموس را داشتند. به‌علاوه، قادر به استفاده از آرابینوز، مانوز، سلوبیوز و گالاکتوز بودند اما نتوانستند

3- yeast dextrose carbonate agar

4- Hypersensitive reaction

1- Multiple Sequence Comparison by Long-Expectation

2- Neighbor Joining

جدایه‌های گروه دوم در برگ‌های مایه‌زنی شده شدیدتر از علائم بوجود آمده از جدایه‌های گروه اول بود. ضمناً از برگ‌های آلوده پرگنه‌های مشابه با باکتری مایه‌زنی شده جداسازی گردید که همه زرد، براق، برآمده و لزج، هوازی اجباری و اکسیداز منفی بودند و نشاسته را هیدرولیز کردند.

جدول ۱- استرین‌های *Xanthomonas translucens* جداسازی شده از گندم در استان کرمانشاه.

Table 1. *Xanthomonas translucens* strains isolated from wheat in Kermanshah province.

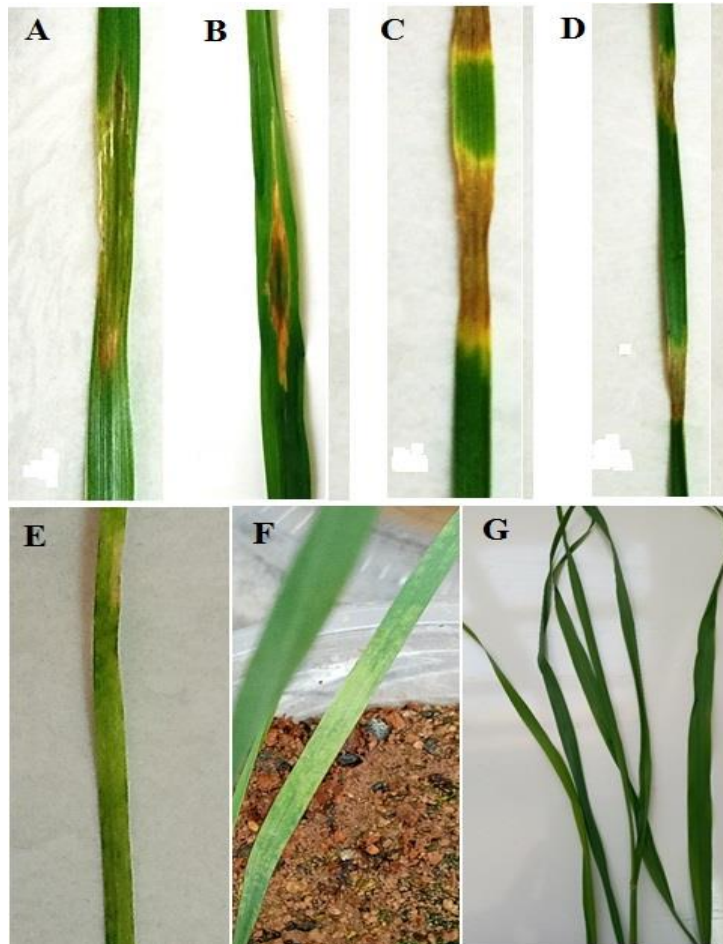
Strain	Isolation date	Location	Source
So	2019	Sonqhor	Seed
Sa1	2019	Sahneh	Seed
Ja1-8, Ja1-1	2019	Javanroud	Seed
Is1	2019	Eslamabad-e-gharb	Seed
Gi1, Gi2-1, Gi2-2, Gi2-3	2019	Gilan-e-gharb	Seed
Da2-5, Da2-4, Da2-3	2019	Dalahu	Seed
R2	2019	Ravansar	Seed
Ke	2019	Kermanshah	Seed
Ss2-5, Ss2-4, Ss2-2	2019	Salas	Seed
Ka3-1, Ka3-2, Ka3-3	2020	Kangavar	Seed
Ha1, Ha2, Ha3	2020	Harsin	Seed
Ma1, Ma2, Ma3	2020	Mahidasht	Leaf
Un1, Un2, Un3	2020	Kermanshah	Leaf
Ka4, Ka4-2, Ka4-3	2020	Kangavar	Leaf

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی استرین‌های *Xanthomonas translucens* جداسازی شده از گندم در استان کرمانشاه

Table 2. Phenotypic and biochemical characteristics of *Xanthomonas translucens* strains isolated from wheat in Kermanshah province

Test	Reaction	Test	Reaction
Gram reaction	-	Ice nucleation activity	+
Oxidative/Fermentative	O*	Growth at 40 °c	-
Oxidase	-	Growth in presence of 2% NaCl	+
Catalase	+	Growth in presence of 3% NaCl	***
Yellow pigment on YDC	+	Growth in presence of 5% NaCl	-
Litmus milk	AC, P**		
Levan production	+	Acid production from:	
Potato soft rot	-	Arabinose	+
Hypersensitive reaction	+	Mannose	+
Starch hydrolysis	+	Cellobiose	+
Tween-80 hydrolysis	-	Sorbitol	-
Lecithinase	+	Inositol	-
Gelatin liquefaction	+	Galactose	+

*O = Oxidative, **AC=Acid, P=Peptonization *** ≥90% negative



شکل ۱- علائم ایجاد شده توسط دو پاتووار از *Xanthomonas translucens* جداسازی شده از گندم در استان کرمانشاه. آب سوختگی و نوارهای بافت مرده همراه با هاله زرد رنگ ایجاد شده توسط پاتووار *cerealis* در برگ (A) گندم، (B) جو، (C) چاودار و (D) تریتیکاله. آب سوختگی و نواحی زرد ایجاد شده توسط پاتووار *undulosa* در برگ (E) گندم و (F) تریتیکاله. (G) شاهد (مایه زنی شده با آب مقطر سترون). علائم ناشی از پاتووار *cerealis* شدیدتر از علائم ناشی از پاتووار *undulosa* بود.

Figure 1. Symptoms caused by *Xanthomonas translucens* pathovars isolated from wheat in Kermanshah province: water-soaked areas and necrotic stripes surrounded by yellow halo caused by pv. *cerealis* in A) wheat, B) Barley, C) Rye and D) Triticale. Water-soaked and yellow areas caused by pv. *undulosa* in E) wheat and F) Triticale. G) Control (inoculated by sterile distilled water). Symptoms caused by pv. *cerealis* were more severe than those caused by pv. *undulosa*.

۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. همچنین در روش BOX-PCR تعداد باندهای بیشتری نسبت به ERIC-PCR تکثیر گردید. براساس خوشه بندی نتایج حاصل از ERIC-PCR جدایه های *X. translucens* در گروهی کاملا مجزا از باکتری *P. syringae* قرار گرفتند و خود به دو زیرگروه تقسیم شدند. زیرگروه اول شامل

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از rep-PCR

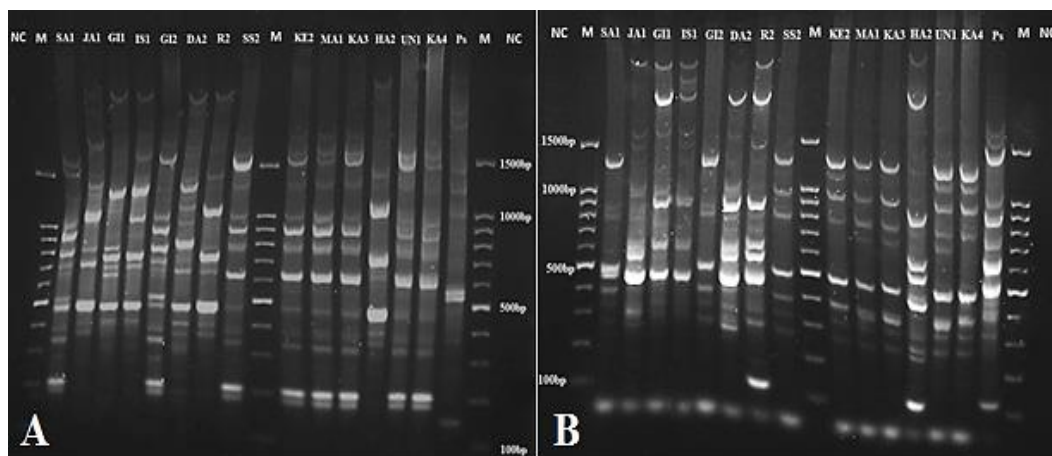
در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های منتخب از مناطق مختلف استان با استفاده از آغازگرهای ERIC و BOX باندها با وزن مولکولی متفاوت از ژنوم جدایه ها تکثیر شدند (شکل ۲). وزن مولکولی باندها در BOX-PCR بین ۲۰۰ تا ۲۸۰۰ جفت باز و در ERIC-PCR از حدود

translucens در استان کرمانشاه، تعیین توالی شد. پس از ویرایش توالی های دریافت شده در نهایت برای دو جدایه Ke و Un به ترتیب توالی هایی به اندازه ۱۴۲۵ جفت باز و ۱۰۱۴ جفت باز به دست آمد. مقایسه توالی ها با توالی های موجود در پایگاه ژن بانک با استفاده از BLAST، نشان دهنده شباهت صد درصدی آنها با گونه *X. translucens* با شماره دسترسی های CP043500 و MK356430 بود. توالی نوکلئوتیدی این دو جدایه با شماره دسترسی MW193070 و MW173461 در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شدند. به منظور ترسیم دندروگرام فیلوژنتیکی، تعدادی از توالی های ناحیه 16S rRNA مربوط به جدایه های جنس *Xanthomonas* از بانک اطلاعاتی NCBI اخذ شد و با استفاده از نرم افزار MEGA X دندروگرام به روش پیوست همسایه ها ترسیم گردید (Kumar et al., 2018). نتایج بیانگر شباهت جدایه های این پژوهش (Un, Ke) با جدایه های گونه ی *X. translucens* بود. در این بررسی باکتری *Agrobacterium rhizogenes* به عنوان گروه خارجی انتخاب گردید (شکل ۵).

جدایه های SA1, GI2, SS2, KE2, MA1, KA3, JA1, UN1 و زیرگروه دوم شامل جدایه های DA2, GI1, IS1, R2, HA2 حدود ۳۲ درصد از یکدیگر جدا شدند. براساس تجزیه خوشه ای حاصل از روش BOX-PCR نیز جدایه های *X. translucens* از باکتری *P. syringae* در سطح تشابه حدود ۱۷ درصد تفکیک شده و در دو گروه قرار گرفتند. قرارگیری جدایه ها در دو گروه همانند نتیجه حاصل از روش ERIC-PCR بود؛ اما بر اساس ضریب تشابه بین گروه ها و زیرگروه ها دو روش ERIC-PCR و BOX-PCR باهم تفاوت داشتند (شکل ۳). علاوه بر رسم دندروگرام براساس نتایج ERIC-PCR و BOX-PCR به صورت جداگانه، دندروگرام حاصل از ادغام داده های دو روش نیز ترسیم شد که نتیجه آن شبیه به نتیجه ERIC-PCR بود هر چند از نظر ضریب تشابه متفاوت بودند (شکل ۴).

تعیین توالی ناحیه 16S rRNA

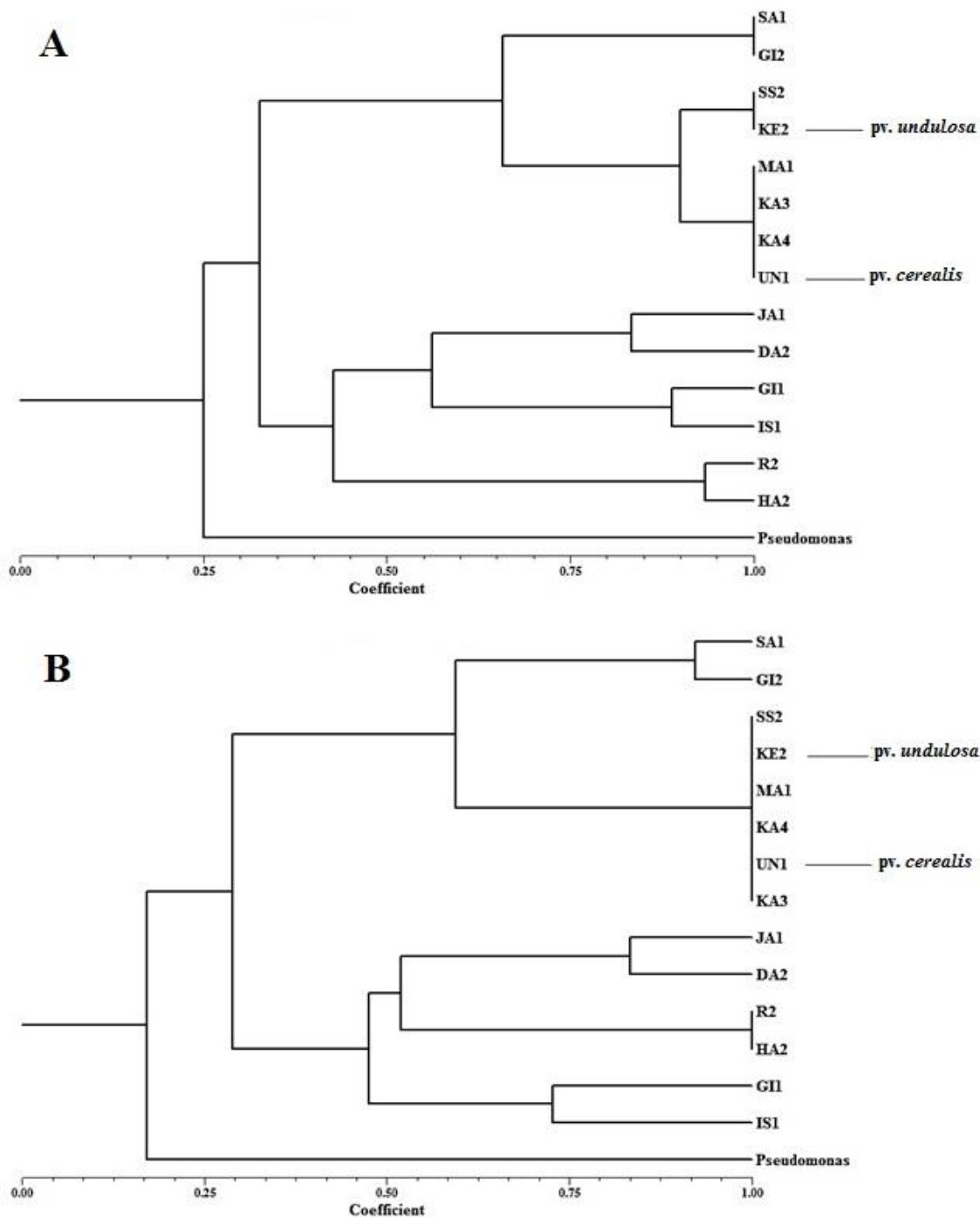
ناحیه 16S rRNA دو جدایه Un و Ke، به عنوان نماینده از دو پاتووار شناخته شده جدایه های *X.*



شکل ۲- انگشت نگاری ژنومی استرین های *Xanthomonas translucens* جدا شده از گندم در مناطق مختلف استان کرمانشاه با استفاده از (A) BOX-PCR و (B) ERIC-PCR. NC) شاهد منفی (آب مقطر سترون)، (M) نشانگر مولکولی (100bp) و (Ps)

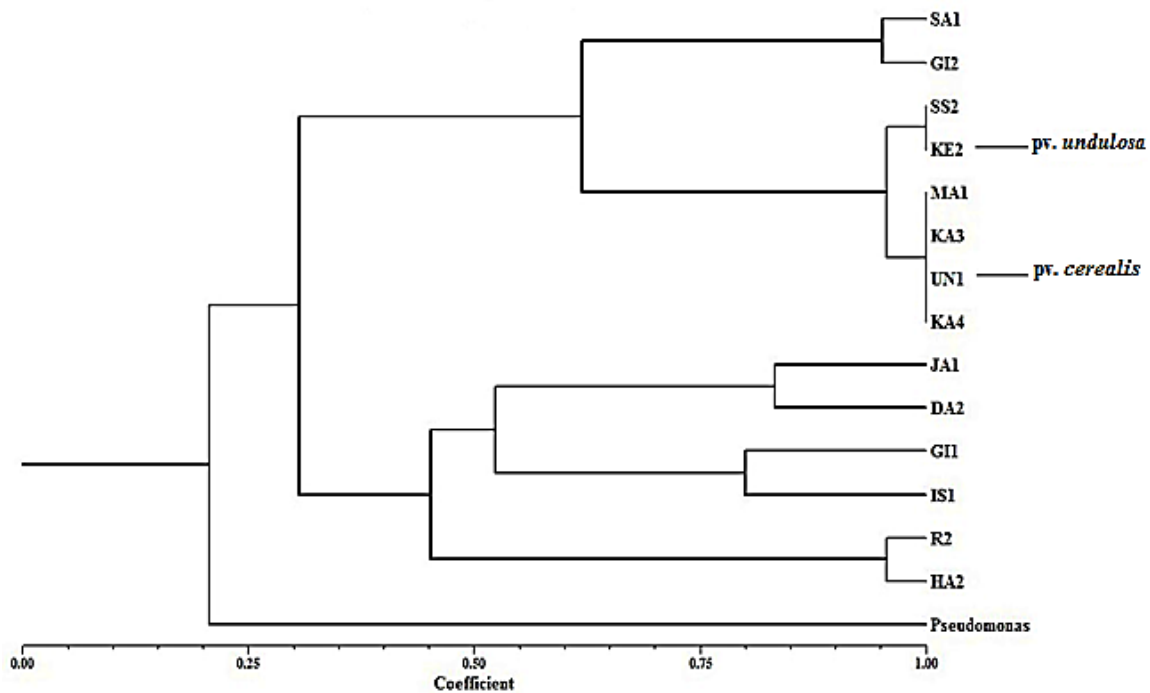
Pseudomonas syringae

Figure 2. Genomic fingerprinting of *Xanthomonas translucens* strains, isolated from wheat in Kermanshah province using: A) BOX-PCR and B) ERIC-PCR. NC) Negative control (sterile distilled water), M) Molecular marker (100bp) and Ps) *Pseudomonas syringae*.



شکل ۳- دندروگرام به دست آمده از انگشت نگاری DNA استرین‌های *Xanthomonas translucens* جدا شده از گندم در مناطق مختلف استان کرمانشاه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA در نرم افزار NTSYS-pc. A) ERIC-PCR، B) BOX-PCR.

Figure 3. Dendrogram generated from DNA fingerprinting of *Xanthomonas translucens* strains, isolated from wheat in Kermanshah province with Jaccard's similarity coefficient and UPGMA clustering method in NTSYS-pc. A) ERIC-PCR, B) BOX-PCR.



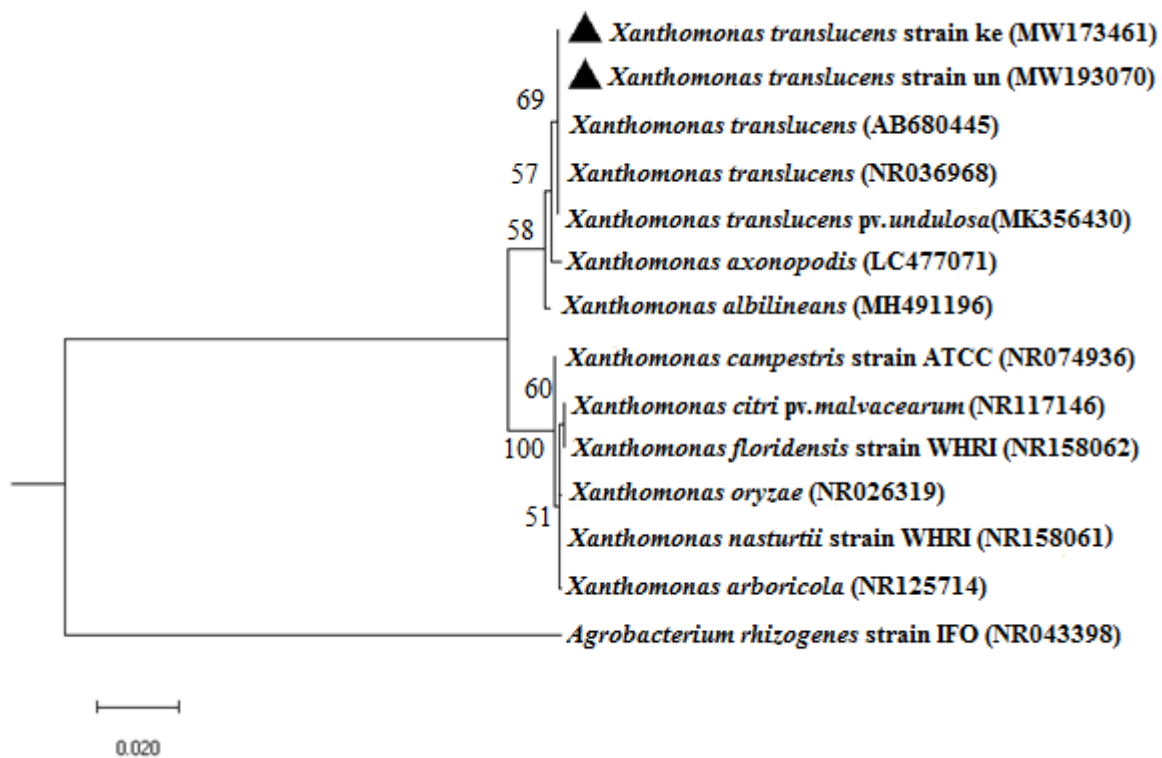
شکل ۴- دندروگرام به دست آمده از انگشت نگاری DNA استرین های *Xanthomonas translucens* جداسازی شده از گندم در مناطق مختلف استان کرمانشاه براساس ادغام داده های حاصل از ERIC-PCR و BOX-PCR با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA در نرم افزار NTSYS-pc.

Figure 4. Dendrogram generated from DNA fingerprinting of *Xanthomonas translucens* strains, isolated from wheat in Kermanshah province based on combined data from ERIC- and BOX-PCR with Jaccard's similarity coefficient and UPGMA clustering method in NTSYS-pc.

بارندگی های ابتدای سال و احتمالاً ورود و جابجایی بذور آلوده در مناطق مختلف استان گسترش یافته و در پاره ای اوقات خسارت چشمگیری به همراه داشته است. این مسأله انجام بررسی کاملتری را ایجاب می نمود. براساس نتایج، خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه ها، جز در برخی موارد، با خصوصیات ذکر شده برای گونه *X. translucens* مطابقت داشت (Schaad et al., 2001). جدایه ها قادر بودند از کربوهیدرات های آرابینوز، مانوز، سلوبیوز و گالاکتوز استفاده کنند اما قادر به استفاده از کربوهیدرات های سوربیتول و اینوزیتول نبودند که با نتایج Alizadeh & Rahimian (1989) مطابقت داشت. در این بررسی جدایه ها قادر به هیدرولیز توپین ۸۰ نبودند که با نتایج ذکر شده توسط Duveiller (1994) و

بحث

این تحقیق با هدف بررسی پراکنش بیماری نواری باکتریایی گندم در استان کرمانشاه، تعیین خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی باکتری عامل بیماری، مشخص نمودن پاتووار آن و بررسی تنوع ژنتیکی بین جدایه های مناطق مختلف استان انجام شد. این بیماری قبلاً در استان مشاهده و تعداد معدودی شامل حدود ۳-۵ جدایه از باکتری عامل بیماری از این ناحیه در سایر مناطق کشور مورد بررسی قرار گرفته بودند (Khojasteh et al., 2019; Habibian et al., 2021). بنابراین تا قبل از این تحقیق گزارش کاملی از وضعیت پراکنش بیماری در سطح استان نبود. این بیماری طی چند سال اخیر به دلایل مختلف از جمله تغییرات آب و هوایی و افزایش



شکل ۵- دندروگرام فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA جدایه Un از *Xanthomonas translucens* و جدایه Ke از *X. translucens* pv. *undulosa* در استان کرمانشاه و برخی از جدایه‌های ژن بانک با روش پیوست همسایه‌ها در نرم‌افزار MEGA X. *Agrobacterium rhizogenes* به عنوان گروه خارجی انتخاب گردید.

Figure 5. Phylogenetic tree generated from 16S rRNA gene sequences of *X. translucens* pv. *cerealis* strain Un and *X. translucens* pv. *undulosa* strain Ke isolated from wheat in Kermanshah province and some strains from the GenBank with Neighbor-Joining method in MEGA X software. *Agrobacterium rhizogenes* was included as an out group.

سوسپانسیون باکتری با سرنگ در نسج برگ و اسپری سوسپانسیون باکتری روی برگ، از نظر زمان و شدت بروز علائم بیماری تفاوت دیده شد، به طوریکه علائم در روش تزریق با سرنگ ۳-۴ روز پس از مایه‌زنی به صورت آب‌سوخستگی در محل تزریق و پس از ۷ روز به صورت بافت مرده همراه با هاله زرد قابل مشاهده بود. اما در روش اسپری، آب‌سوخستگی در نوک و حاشیه برگ‌ها ۴-۵ روز پس از مایه‌زنی به وجود آمد و سایر علائم پس از ۱۰ روز قابل مشاهده بود. نتایج آزمون بیماری‌زایی بیانگر پراکندگی دو پاتووار *cerealis* و *undulosa* از باکتری *X. translucens* در سطح استان کرمانشاه بود. از بین

Hagborg (1946) مطابقت نداشت اما منفی بودن نتیجه این آزمون برای جدایه‌های گندم در ایران قبلاً هم گزارش شده است (Habibian et al., 2021). جدایه‌ها همان‌طور که به عنوان یک ویژگی برای *X. translucens* ذکر شده است، فعالیت هسته یخ داشتند، توانایی عمل کردن به عنوان هسته یخ باعث افزایش خسارت به بافت گیاهی و تشدید ورود و تکثیر باکتری عامل بیماری می‌شود (Kim et al., 1987). این موضوع با توجه به کشت پاییزه گندم در مناطق مختلف استان می‌تواند از عوامل تشدید بیماری باشد. در آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها با استفاده از دو روش تزریق

بیماری فقط با بررسی بیماری‌زایی و تعیین دامنه میزبانی امکان‌پذیر است. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از ERIC-PCR و BOX-PCR تنوع نسبتاً زیادی بین جدایه‌های مناطق مختلف آشکار نمود. این تنوع می‌تواند حاصل از ورود عامل بیماری از منابع متفاوت و در زمان‌های متعدد به مناطق مختلف استان و نیز اثر عوامل محیطی باتوجه به اقلیم‌های متفاوت موجود در استان باشد. در این بررسی جدایه‌های مربوط به مناطق مشابه و نزدیک در یک گروه قرار گرفتند، مثلاً جدایه‌های Un، Ke و MA1 از کرمانشاه و Ka3 و Ka4 از کنگاور در یک گروه، جدایه‌های JA1 و Da2 از جوانرود و دالاهو در گروهی دیگر و نیز جدایه‌های GI2 و IS1 از اسلام آبادغرب و گیلان غرب در یک گروه قرار گرفتند که می‌تواند به علت انتقال عامل بیماری از طریق بذر و نیز اقلیم مشابه این مناطق باشد. نکته قابل توجه آنکه هرچند rep-PCR تنوع زیادی را بین جدایه‌ها نشان داد اما نتوانست تفاوت قابل اعتمادی بین دو پاتووار آشکار نماید و فقط در ترکیب نتایج دو روش ERIC-PCR و BOX-PCR دو پاتووار با ضریب تشابه بالا از هم جدا شدند. این موضوع قبلاً نیز در مطالعات متعدد مورد تأکید قرار گرفته است که با روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی مثل rep-PCR نمی‌توان به‌طور قابل اطمینانی پاتووارهای *X. translucens* را از هم تفکیک نمود و هنوز اساس مولکولی سازگاری پاتووارهای *X. translucens* مرتبط با غلات و علف‌ها مشخص نیست (Rademaker et al., 2005; Hersemann et al., 2017; Langlois et al., 2017). تعیین و نامگذاری پاتووارهای *X. translucens* همواره با چالش همراه بوده است چون گاهی نامگذاری براساس گیاه میزبانی که باکتری از آن جدا شده است و بعضاً براساس بیماریزی روی گیاهان میزبان افتراقی صورت گرفته است به‌علاوه، روش‌های مختلف برای آزمون بیماریزی به کار رفته‌اند

پاتووارهای عامل بیماری، پاتووار *cerealis* که علاوه بر گندم، سایر غلات مثل جو، چاودار و تریتیکاله را نیز آلوده می‌کند (Vauterin et al., 1995)، بیشترین فراوانی و پراکندگی را در ایران دارد (Alizadeh & Rahimian, 1989). حضور این پاتووار در استان بیانگر این است که می‌تواند علاوه بر گندم به محصولات مهمی همچون جو نیز خسارت وارد سازد. پراکنش وسیع این دو پاتووار در سطح استان می‌تواند به علت انتقال با بذر آلوده باشد. در تحقیق انجام شده توسط (Khojasteh et al., 2019)، چهار ژن خانه‌داری *rpoD* و *gyrB* *fyua* *dnak* در ۶۵ جدایه *X. translucens* از هشت استان ایران از جمله پنج جدایه از گندم در استان کرمانشاه با استفاده از روش آنالیز و تعیین توالی در چند ناحیه ژنی مورد بررسی قرار گرفتند و جدایه‌های گندم شامل پنج جدایه استان کرمانشاه به عنوان پاتووار *undulosa* شناسایی شدند که تأییدکننده نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. همچنین Habibian et al., (2021) در بررسی روی ۱۲ جدایه *X. translucens* از میزبان‌های مختلف در سه استان، یک جدایه از گندم و دو جدایه از جو در استان کرمانشاه را به ترتیب پاتووارهای *undulosa* و *translucens* شناسایی نمودند. لازم به ذکر است پاتووار *translucens* شامل جدایه‌های جو می‌باشد که فقط در این گیاه بیماریزا هستند (Duveiller et al., 1997). در تحقیق حاضر فقط از مزارع گندم آلوده به بیماری در استان نمونه‌برداری گردید و شناسایی عامل بیماری در سایر غلات از جمله جو ادامه دارد. تعیین توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های متعلق به دو پاتووار *undulosa* و *cerealis* شباهت ۱۰۰٪ آنها را با گونه *X. translucens* نشان داد و هیچ‌گونه تفاوتی در توالی این ژن بین دو پاتووار دیده نشد. این موضوع در راستای پژوهش‌های قبلی است (Vauterin et al., 1995; Duveiller et al., 1997; Hauben et al., 1997; Thind 2019) که شناسایی و افتراق پاتووارهای عامل

دقیق پاتووارهای *X. translucens* نقش مؤثری داشته باشد، موضوعی که این محققین تحقق آن را نیازمند تحقیقات وسیع تر روی تعداد بیشتری از استرین‌ها از میزبان‌ها و مناطق متنوع دانسته‌اند. افکتورهای شبه فعال کننده رونویسی که توسط سیستم ترشچی نوع سوم به گیاه میزبان منتقل می‌شوند و با اتصال به DNA میزبان بیان ژن‌های هدف را افزایش می‌دهند از فاکتورهای مهم و اصلی برای بیماریزایی جنس زانتوموناس به‌شمار می‌روند (Shams-bakhsh et al. 2018).

در این بررسی ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی باکتری عامل نواری گندم در استان کرمانشاه و نیز وضعیت پراکنش بیماری در مناطق مختلف استان تعیین گردید. به‌علاوه مشخص شد استرین‌های *X. translucens* عامل نواری گندم در استان کرمانشاه به دو پاتووار *cerealis* و *undulosa* تعلق دارند. این یافته‌ها به همراه نتایج بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های عامل بیماری در مناطق مختلف، می‌تواند در دستیابی به مدیریت بیماری نقش به‌سزایی داشته باشد. همچنین در ادامه این تحقیق، بررسی بیماری روی سایر غلات و گیاهان هم‌خانواده آن‌ها در استان می‌تواند انجام شود.

سپاس‌گزاری

از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه برای حمایت از این تحقیق کمال تشکر را داریم.

(Bragard et al., 1997; Duveiller et al., 1997). همچنین ذکر شده است که اعضای این گونه ممکن است در سطح استرین، دامنه میزبانی متنوعی داشته باشند یا استرین‌هایی با نام متفاوت، یکسان باشند چون دامنه میزبانی آنها بعد از جداسازی از میزبان اولیه به‌طور دقیق تعیین نشده است (Duveiller et al., 1997). اخیراً Fallahi Charkhabi et al., (2017) به منظور بررسی بیشتر و بهتر تنوع ژنتیکی در *X. translucens*، ژنوم استرین ایرانی ICMP11055 از پاتووار *undulosa* را به‌طور کامل تعیین توالی نمودند که مقایسه آن با سایر توالی‌های موجود نشان داد این استرین همراه با سایر استرین‌های این پاتووار در یک تک‌شاخه (کلاد) و با تفاوت جزئی در یک شاخه مجزا از سایر استرین‌های این پاتووار قرار می‌گیرد. آنان همچنین با بررسی افکتورهای شبه فعال کننده رونویسی (TALEs¹) نتیجه گرفتند که استرین ICMP11055 همراه با سایر استرین‌های پاتووار *undulosa* در یک گروه مجزا از گروه دوم شامل استرین‌های پاتووار *translucens* گروه سوم شامل استرین‌های پاتووار *cerealis* و گروه چهارم شامل استرین‌های سایر پاتووارها از جمله *graminis* و *arrhenatheri* قرار می‌گیرند. نتیجه این بررسی که برای اولین بار در مورد نقش TALEs در بیماری نواری باکتریایی گندم انجام گرفت می‌تواند در تعیین و تفکیک

REFERENCES

- Adhikari, T. B., Gurung, S., Hansen, J. M., & Bonman, J. M. (2012). Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. *Phytopathology*, 102(4), 390-402. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0201>
- Ahmadi, K., Ebadzadeh, H., Hatami, F., Abedshah, H. & Kazemian, A. (2019). *Agricultural Iran statistics 1396-1397*: Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran (In Farsi).
- Alizadeh, A. & Rahimian, H. (1989). Bacterial leaf streak of Gramineae in Iran. *EPPO Bulletin*, 19(1), 113-117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1989.tb00136.x>

- Beiki, F., Alizadeh, A., & Khodakaramian, Gh. (2004). Reaction to *Xanthomonas translucens* pvs. *cerealis* & *translucens* in wheat and barley cultivars. *Iranian Journal of Crop Sciences* (In Farsi with English summary).
- Bamberg, R. (1936). Black chaff disease of wheat. *Journal of Agricultural Research*, 52, 397-417.
- Borkar, S. G. (2018). *Laboratory Techniques in Plant Bacteriology*: CRC Press.
- Bragard, C., Singer, E., Alizadeh A., Vauterin L., Maraite H., & Swings J, (1997). *Xanthomonas translucens* from small grains: diversity and phytopathological relevance. *Phytopathology* 87, 1111-1117. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.11.1111>
- Curland, R. D., Gao, L., Bull, C. T., Vinatzer, B. A., Dill-Macky, R., Van Eck, L., & Ishimaru, C. A. (2018). Genetic diversity and virulence of wheat and barley strains of *Xanthomonas translucens* from the Upper Midwestern United States. *Phytopathology*, 108(4), 443-453. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-17-0271-R>
- Ducray, G., Marefat, A., Gillings, M. R., Parkinson, N. M., Bowman, J. P., Ophel-Keller, K., Taylor, C., Facelli, E. & Scott, E. S. (2009). Proposal of *Xanthomonas translucens* pv. *pistaciae* pv. nov., pathogenic to pistachio (*Pistacia vera*). *Systematic Applied Microbiology Biotechnology Advances*, 32(8), 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.08.001>
- Duveiller, E. (1994). Bacterial leaf streak or black chaff of cereals. *EPPO Bulletin*, 24(1), 135-157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1994.tb01057.x>
- Duveiller, E., Fucikovsky, L. & Rudolph, K. (1997). *The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. Mexico: CIMMYT.
- Falahi Charkhabi, N., Booher, N.J., Peng, Z., Wang, L., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Liu, Z., Liu, S., White, F. F. & Bogdanove, A. J. (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, p.1488. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01488>
- Habibian, M., Alizadeh Aliabadi, A., Hayati, J. & Rahimian, H. (2021). Investigation of the phenotypic and genetic diversity of *Xanthomonas ranslucens* pathovars, the causal agents of bacterial leaf streak of wheat and barley in parts of Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(2), 33-50. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.16931>
- Hagborg, W. A. F. (1946). The diagnosis of bacterial black chaff of wheat. *Scientific Agriculture*, 26(3), 140-146.
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. & Moore, E. (1997). Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 47(2), 328-335. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-328>
- Hersemann, L., Wibberg, D., Blom, J., Goesmann, A., Widmer, F., Vorhölter, F. J., & Kölliker, R. (2017). Comparative genomics of host adaptive traits in *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *BMC genomics*, 18(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3422-7>
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R. & Fields, M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern

China. *Applied Environmental Microbiology*, 72(6), 3832-3845.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02869-05>

Khojasteh, M., Taghavi, S.M., Khodaygan, P., Hamzehzarghani, H., Chen, G., Bragard, C., Koebnik, R. & Osdaghi, E., (2019). Molecular typing reveals high genetic diversity of *Xanthomonas translucens* strains infecting small-grain cereals in Iran. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(20), pp.e01518-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01518-19>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Kim, H., Orser, C., Lindow, S. & Sands, D. (1987). *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. *Plant Disease*, 71(11), 994-997. <https://doi.org/10.1094/PD-71-0994>

Langlois, P. A., Snelling, J., Hamilton, J. P., Bragard, C., Koebnik, R., Verdier, V & Leach, J. E. (2017). Characterization of the *Xanthomonas translucens* complex using draft genomes, comparative genomics, phylogenetic analysis, and diagnostic LAMP assays. *Phytopathology*, 107(5), 519-527. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-16-0286-R>

Lema, M., Cartea, M. E., Sotelo, T., Velasco, P., & Soengas, P. (2012). Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by Brassica spp. genotypes and rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 133(1), 159-169. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9929-5>

Marefat, A., Scott, E., Ophel-Keller, K. & Sedgley, M. (2006). Genetic, phenotypic and pathogenic diversity among xanthomonads isolated from pistachio (*Pistacia vera*) in Australia. *Plant Pathology*, 55(5), 639-649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01437.x>

Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., & Stead, D. (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of gyrB sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2), 264-274. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65825-0>

Rademaker, J. L. & Bruijn, F. J. d. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. *DNA Markers: Protocols, Application and Overviews*, 151-171.

Rademaker, J. L., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L. & Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 665-677. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-665>

Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. & De Bruijn, F. J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95(9), 1098-1111. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1098>

Rademaker, J. L. W., Norman, D. J., Forster, R. L., Louws, F. J., Schultz, M. H., & De Bruijn, F. J. (2006). Classification and identification of *Xanthomonas translucens* isolates,

including those pathogenic to ornamental asparagus. *Phytopathology*, 96(8), 876-884. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0876>

Rohlf, F., (2009). Numerical, taxonomy and multivariate analysis system (NTSYSpc) version 2.2. Exeter Software, Applied Biostatistics. Inc., New York, USA, pp. 43.

Sapkota, S., Mergoum, M. & 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. <https://doi.org/10.1111/mpp.12909>

Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*: American Phytopathological Society (APS Press).

Shams-bakhsh, M., Falahi-Charkhabi, N. & Rahimian, H. (2018). Transcription activator-like effectors (TALEs) role in plant response to *Xanthomonas*. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 10(3) 87-110. <https://doi.org/10.22103/jab.2018.2210>

Singh, S., Goswami, P., Singh, R. & Heller, K. J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT-Food Science Technology*, 42(2), 448-457. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.019>

Singh, D., Rathaur, P. S., & Vicente, J. G. (2016). Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India. *Plant Pathology*, 65(9), 1411-1418. <https://doi.org/10.1111/ppa.12508>

Thind, B. S. (2019). *Phytopathogenic Bacteria and Plant Diseases*. CRC Press.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 45(3), 472-489. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.



© 2022 by the authors. Licensee SCU, 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/>).



Characterization and genetic diversity of *Xanthomonas translucens*, the causal agent of bacterial stripe of wheat in Kermanshah province, Iran

S. Hosseini¹ and A. Marefat^{2*}

1. M.Sc. student, Department of Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran
2. *Corresponding Author: Associate Professor, Department of Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran (marefat345@gmail.com)

Received: 6 September 2021

Accepted: 27 November 2021

Abstract

Background and Objectives

Bacterial stripe caused by *Xanthomonas translucens* is one of the most important diseases of wheat worldwide. The disease was first reported on barley in America in 1917. In Iran, it was reported for the first time on wheat and barley in Kerman province in 1987. Based on the standards for naming pathovars, the currently accepted pathovars as pathogens infecting cereals include pv. *cerealis*, pv. *translucens*, pv. *undulosa*, and pv. *secalis*. Following climate changes, especially heavy rainfalls in recent years, and probably the transmission of infected seeds, the disease has shown significant outbreaks and damages on wheat in Kermanshah province, Iran. The present study was performed to (I) characterize the pathogen in Kermanshah province, (II) determine pathogen distribution, and (III) assess the genetic diversity of the strains.

Materials and Methods

Wheat seeds and leaves showing symptoms of the disease were collected from major wheat-growing areas in Kermanshah province during 2019 and 2020. In the laboratory, samples were rinsed with tap water and were macerated into a few drops of sterile distilled water. Two loops full of the resulting suspension were streaked on the nutrient agar medium. Plates were incubated at 25°C and pale yellowish colonies were purified. Physiological and biochemical tests were performed to identify and characterize 140 isolates. To determine the pathovar(s) of the pathogen, the pathogenicity of the strains was tested on wheat, barley, rye, and triticale in the greenhouse. Nearly complete 16S rRNA sequences were determined for two strains representatives of two pathovars distinguished by pathogenicity test using 27F and 1492R primers. Genetic diversity among the isolates was evaluated in rep-PCR utilizing BOX and ERIC primers.

Results

Based on physiological and biochemical tests, *Xanthomonas* strains from wheat in Kermanshah province were identified as *X. translucens*. Pathogenicity tests revealed two groups among the strains. Members of the first group induced disease symptoms on wheat and triticale exclusively and were identified as pv. *undulosa*, while the strains belonging to the second group infected wheat, barley, rye, and triticale, and were identified as pv. *cerealis*. The rep-PCR using ERIC and BOX primers demonstrated genetic variation

among the strains. However, there was no significant difference between the results obtained by ERIC- and BOX-PCR. Nearly complete 16S rRNA sequences were determined as the representative strains of two pathovars distinguished by pathogenicity test and based on the comparison of sequences with the GenBank database. The two strains matched *X. translucens* with 100% similarity. The nucleotide sequences of the pathogen strains were deposited in the GenBank database under the accession numbers MW173461 and MW193070.

Discussion

According to the findings of this study, *X. translucens* strains collected from wheat in Kermanshah province belonged to pathovars *undulosa* and *cerealis*. Considering the wide host range of these pathovars, the disease could be found on other cereals and grasses belonging to the Poaceae in the province and this subject must be taken into consideration in future studies. Although rep-PCR showed significant diversity among the strains, there was no correlation between the rep-PCR groups and the pathovars identified in the pathogenicity test or the geographic origin of the strains. Biochemical and physiological tests, as well as rep-PCR and 16S rRNA sequencing, could not distinguish the two pathovars. This confirms that pathogenicity tests and host range are still the main methods for determining pathogen pathovar(s).

Keywords: *Black chaff, Pathogenicity, Pathovar, rep-PCR*

Associate editor: M.M. Faghihi (Ph.D.)

Citation: Hosseini, S., & Marefat, A. (2022). Characterization and genetic diversity of *Xanthomonas translucens*, the causal agent of bacterial stripe of wheat in Kermanshah province, Iran. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 89-105. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17178>