



ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی برخی جدایه‌های باکتری عامل بیماری خوشه صمغی گندم و جو در ایران

سحر نیک اختر^{۱*}، حشمت الله رحیمیان^۲، ولی الله بابایی زاد^۳

^۱ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۲ استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۳ استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۰۳

چکیده

بیماری خوشه صمغی از بیماری‌های گندم در مناطق متعددی از کشت این محصول در ایران می‌باشد. گونه *Rathayibacter iranicus* به عنوان عامل این بیماری بر روی گندم و جو تاکنون فقط از ایران گزارش شده است. به منظور ارزیابی تنوع احتمالی جدایه‌های گونه‌ی *R. iranicus* و نیز مشخص‌تر نمودن موقعیت تاکسونومیک جدایه‌های عامل بیماری در جو نمونه‌هایی از استان‌های آذربایجان شرقی، ایلام، اصفهان، فارس و خوزستان جمع آوری و کشت شد. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی، پانزده جدایه به عنوان نماینده برای بررسی‌های ژنوتیپی انتخاب شدند. برای تعیین میزان تنوع و ارتباط ژنتیکی جدایه‌ها، DNA ژنومی نماینده‌ها با آغازگرهای ریز ماهواره‌ای M13 و 5 (GTG) تکثیر شد. قطعه ژن‌های خانه دار شامل 16S rDNA، *recA* و *gyrB* و همچنین ناحیه ITS تعدادی از جدایه‌ها تکثیر و توالی یابی شد. نتایج تعدادی از آزمون‌های افتراقی فنوتیپی با آنچه در منابع قبلی ذکر شده بود مطابقت نداشت. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی به وسیله‌ی ریز ماهواره‌ها حاکی از وجود تنوع در بین جدایه‌ها بود. مقایسه‌ی ترکیبی نقوش حاصل از این آغازگرها شباهت بالایی را بین جدایه‌ها و جدایه‌ی مرجع *R. iranicus* نشان داد. جدایه‌های جو نیز در شاخه‌ای مجزا ولی نزدیک به گروه جدایه‌ی *R. iranicus* و در فاصله‌ای دور از دو گونه‌ی *R. tritici* و *R. rathayi* قرار گرفتند. مقایسه توالی‌های به دست آمده از ژن‌های ITS، 16SrDNA، *gyrB* و *recA* با توالی‌های موجود در ژن بانک نشانگر بیشترین شباهت جدایه‌های گندم و جو به *R. iranicus* بود. واژه‌های کلیدی: خوشه صمغی، *Rathayibacter* ریز ماهواره، ژن‌های خانه داری.

مقدمه

جمله ITS^۱ (16S-23S rDNA) ، 16S rRNA ، (ژن کد کننده ی DNA RNA ریپوزومی)، *gyrB* (ژن کد کننده ی جیراز زیر واحد β)، *recA* (ژن کد کننده ی رکامیناز) و توالی یابی^۲ این نواحی، عامل این بیماری شناسایی شد. با استفاده از آغازگرهای ریز ماهواره ای M13 و GTG₅ تنوع ژنتیکی جدایه ها بررسی شد. هدف از بررسی حاضر شناسایی دقیق عامل خوشه صمغی در جو و بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی و در نهایت توصیف دقیق تر آنهاست.

مواد و روش ها

نمونه برداری از بوته های گندم دارای علائم خوشه صمغی (جدول ۱) انجام شد. جدایه ها از کشت خطی بذور آلوده روی محیط حاوی آگار غذایی دارای عصاره مخمر و سوکروز (YNAS)^۳ به دست آمدند. جدایه هایی از کلکسیون آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه کشاورزی ساری نیز برای بررسی با انتخاب تک کلونی خالص و تکثیر شدند.

عوامل ایجاد کننده بیماری خوشه صمغی گندم دو گونه ی *Rathayibacter iranicus* و *R. tritici* معرفی شده اند (Zgurskaya, 1993). از علائم شاخص این بیماری تراوش صمغ یا شیرابه ی زرد رنگ روی سنبلچه ها و یا سنبله ی گندم است (Riley & Ophel, 1992). این بیماری در ایران برای اولین بار از مراغه (Scharif, 1961) و سپس از مناطق مختلف کشور گزارش شده است (Amani, 1969; Rahimian, 1993; Babaeizad & Rahimmian, 2002). جدایه هایی از باکتری عامل بیماری برای اولین بار از سنبله جوهای دارای علائم خوشه صمغی از استان ایلام جداسازی و بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی به عنوان گونه ای از جنس *Rathayibacter* شناسایی شدند (Soltani et al., 2010). گونه ی *Rathayibacter iranicus* و نیز باکتری عامل خوشه صمغی جو تا کنون فقط از مزارع آلوده ایران جدا شده اند و ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی و دامنه ی تفاوت ها یا سطوح تنوع ویژگی های آنها هنوز به خوبی مشخص نشده است. در این بررسی جدایه های به دست آمده از گندم و جو آلوده به بیماری خوشه صمغی مناطق مختلف کشور مورد بررسی های فنوتیپی و مقایسه ی الکتروفورزی پروتئین های سلولی (SDS-PAGE) قرار گرفتند. سپس با تکثیر نواحی مختلف ژنی از

¹Internal transcribed spacer

²Sequencing

³ Yeast extract nutrient agar sucrose

جدول ۱- مناطق جمع آوری نمونه‌های سنبله گندم و جو دارای علائم خوشه صمغی و شماره‌های اختصاص یافته به جدایه‌های باکتری.

Table 1- Geographical areas from where samples of gummy spike blight disease on wheat and barley were collected and the numbers assigned to the strains isolated from.

Isolate number شماره جدایه	Host میزبان	Location استان - شهر
1,2	Wheat گندم	Isfahan, Sahrebabak اصفهان، شهر بابک
3,4,5	Wheat گندم	Isfahana, Mobarakeh اصفهان، مبارکه
6,7,8	Wheat گندم	Isfahan, Lenjan اصفهان، لنجان
9,10,11,12	Wheat گندم	آذربایجان شرقی، شبستر East Azarbaijan, Shabestar
13,14	Wheat گندم	Ilam ایلام
15,16,17,18	Barley جو	Ilam ایلام
19,20,21	Wheat گندم	Golestan گلستان
22,23	Wheat گندم	خوزستان، ایران شهر Khuzestan, Iranshahr
28,29,30,31,32,Z ₁	Wheat گندم	Fars, Zarghan فارس، زرگان
33,34,35,36,37	Wheat گندم	Fars, Ramjerd فارس، رامجرد
38	Wheat گندم	Fars, Firouzabad فارس، فیروز آباد
K	Wheat گندم	Kerman کرمان

برای انجام کارهای مقایسه‌ای از کلکسیون‌های کشت نیوزلند^۱ و برزیل^۲ تهیه شدند.

جدایه‌های مرجع *Rathayibacter toxicus*
R. iranicus IBSBF 636 ICMP 9525
R.tritici IBSBF 632 و *R.rathayi* IBSBF 635

¹ International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP)

² Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria (IBSBF)

از آغازگرهای M13 (5'-
 3'-GAGGGTGGCGGTTCT) و (GTG)₅ انجام
 شد. واکنش‌ها به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵
 میکرولیتر 10X PCR buffer، ۰/۵ میلی مولار
 MgCl₂، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط dNTP، ۲
 میکرولیتر آغازگر، ۲ میکرولیتر DNA (۹۰ نانوگرم)
 و ۰/۳ واحد آنزیم تک پلیمرز (شرکت سیناژن)
 انجام شد. تکثیر با برنامه دمایی ۱۰ دقیقه در ۹۵°C
 سپس ۳۵ چرخه ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه دمای
 اتصال ۴۸°C به مدت ۱ دقیقه و دمای گسترش
 ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه انجام شد. طولیل شدن نهایی
 رشته‌های DNA به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C صورت
 گرفت. الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام
 گرفت.

گروه بندی جدایه‌ها با مقایسه نقوش قطعات
 DNA در ژل و نمره دهی بر پایه وجود یا عدم
 وجود قطعات همسان و تعیین ضریب تشابه جاکارد
 صورت گرفت. درخت فیلوژنی با روش مقایسه
 جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی وزن (UPGMA)
 و با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.02 ترسیم
 شد.

تکثیر تعدادی از نواحی ژنی (ژن‌های خانه
 دار)^۲ با استفاده از جفت آغازگرهای ITS (Gurtler)
 16S، (Richert et al., 2004) *gyrB*، (et al., 1996
 F (5'- GCTCGTAGGCGGTTTGTC) rDNA

واکنش گرم به روش (Suslow et al., 1982)،
 تولید گاز سولفید هیدروژن از سیستئین، پپتون و
 تیوسولفات سدیم، تحمل نمک طعام، هیدرولیز
 اسکولین و آربوتین و رشد روی محیط CNS به
 روش (Schaad et al., 2001)، آزمون تولید متیل رد
 و استوئین به روش دای (Dye, 1986) و
 آزمون‌های هیدرولیز توئین ۶۰ و ۸۰ به روش
 میثاقی و گروگان (Misaghi & Grogan, 1969)
 انجام شد. آزمون استفاده از کربوهیدرات‌ها به
 عنوان تنها منبع کربن بر اساس روش (Schaad et
 al., 2001) و با استفاده از محیط کشت پایه
 (Ayer et al., 1919) ولی با افزودن عصاره‌ی مخمر به
 میزان ۰/۵ گرم در لیتر انجام شد.

پس از استخراج پروتئین (Babaeizad &
 Rahimian, 2002) الکتروفورز در جریان ۲۰ میلی
 آمپر و با رسیدن رنگ برم فنول بلو (Bromphenol
 blue) به انتهای ژل پایان پذیرفت (Ausubel et
 al., 1992; Ahmadvand & Rahimian, 2005). بر
 اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و نقوش
 الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی، پانزده جدایه به
 عنوان نماینده برای بررسی‌های ژنوتیپی انتخاب
 شدند.

پس از استخراج DNA به روش توصیف
 شده (Babaeizad & Rahimian, 2002) انگشت
 نگاری DNA ژنومی با روش rep-PCR^۱ با استفاده

² House keeping

¹ Repetitive extragenic palindromic, rep

درخت فیلوژنی به دو روش الحاق به نزدیک‌ترین همسایه^۲ و حداکثر صرفه جویی^۳ با به کارگیری نرم افزار MEGA 5.05 با درجه اعتبارسنجی^۴ ۱۰۰۰ رسم شد.

نتایج

جداسازی و تعیین ویژگی‌های فنوتیپی

تک کلونی‌های حاصل از کشت خطی، بعد از ۸-۴ روز کرم رنگ تا زرد رنگ و به صورت برجسته تا محدب بودند. میزبان، استان مورد نمونه برداری و شماره جدایه‌های به دست آمده در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از بررسی خصوصیات فنوتیپی (جدول ۲) نشان داد که ممکن است همه یا اکثر جدایه‌های به دست آمده از گندم متعلق به گونه‌ی *R. iranicus* باشند. جدایه‌های به دست آمده از جو از نظر بیشتر خصوصیات به *R. iranicus* شباهت داشتند و فقط از نظر چند خصوصیت، مقداری از آن متمایز بودند. همچنین برخی از خصوصیات تعیین شده برای گونه‌ی *R. iranicus* با آنچه در توصیف‌های قبلی گونه منعکس شده بود مطابقت نداشت.

3' - (5'- GGTATCGCAGCCCTTTGT - 3')
 R و *RecA* (5'-
 F (5'-
 R (5'- GTCTTGGCAGCGACGAAC-3')
 CGGACGGAGGCGTAGAA-3')
 با PCR انجام شد. این واکنش‌ها به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۰/۴ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط dNTP، ۲/۵ میکروگرم DNA الگو، ۰/۳ واحد آنزیم تک پلیمرز و ۰/۵ میکرولیتر از جفت آغازگرها انجام شد. برنامه زمانی و دمایی شامل مرحله‌ی واسرشت سازی اولیه $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی $94^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال $50^{\circ}C$ (برای آغازگرهای ITS و 16S rDNA) و $58^{\circ}C$ (برای آغازگرهای *RecA* و *gyrB*) و دمای گسترش $72^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه انجام شد. مرحله گسترش نهایی رشته‌ها در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۳ دقیقه به کار برده شد. پس از تکثیر قطعه مورد نظر، قطعه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی فرستاده شدند. توالی‌ها با استفاده از نرم افزار BioEdit ver. 7.0.9.0 اصلاح شده و با استفاده از نرم افزار بلاست (Blast)^۱ موجود در بانک ژن NCBI همسانی توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد و سپس در این پایگاه ثبت شدند (جدول ۳). با استفاده از توالی‌های به دست آمده و توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI

² Neighbor-Joining

³ Maximum parsimony

⁴ Bootstrap

¹ Basic local alignment search tool

جدول ۲- خصوصیات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای گونه‌های *Rathayibacter*

Table 2- Morphological, biochemical and physiological characteristics of the *Rathayibacter* species.

<i>R. rathayi</i> *	<i>R. tritici</i> *	<i>R. iranicus</i> *	جدایه‌های به دست آمده از		ویژگی Characteristic
			Isolate from		
			جو Barley	گندم Wheat	
زرد Yellow	زرد Yellow	زرد Yellow	کرم Crem	کرم - زرد Crem-Yellow	رنگ کلونی (Color)
+	+	+	+	+	واکنش گرم (Gram reaction)
2	4	2	<2	2-4	درصد تحمل نمک طعام (NaCL tolerance)
-	-	-	-	-	رشد روی محیط TTC (Growth on TTC medium)
-	-	-	-	-	واکنش متیل رد Methyl red (MR) reaction
-	-	-	-	-	تولید استونین (Production of acetoin)
-	-	-	-	40	تولید H ₂ S از تیوسولفات سدیم (H ₂ S from sodium thiosulfate)
-	-	-	-	30	تولید H ₂ S از سیستئین (H ₂ S from cysteine)
+	+	-	-	45	تولید H ₂ S از پپتون (H ₂ S from peptone)
-	+	+	-	60	هیدرولیز Tween 80 (Hydrolysis of Tween 80)
+	+	+	+	+	هیدرولیز Tween 60 (Hydrolysis of Tween 60)
+	+	+	+	+	هیدرولیز آربوتین (Hydrolysis of arbutin)
					تولید اسید از Acid production from
+	+	+	+	+	د- گلوکز (D-Glucose)
+	+	+	+	+	سلوبیوز (Cellobiose)
+	+	+	+	85	د- لاکتوز (D- lactose)
-	-	+	+	90	سوکروز (Sucrose)

<i>R.rathayi</i> *	<i>R.tritici</i> *	<i>R.iranicus</i> *	جدایه‌های به دست آمده از		ویژگی Characteristic
			Isolate from		
			جو Barley	گندم Wheat	
+	+	+	+	+	مالتوز (Maltose)
-	-	-	-	-	رافینوز (Raffinose)
+	-	+	-	+	فروکتوز (Fructose)
-	-	+	+	+	د-ریبوز (D-Ribose)
+	-	-	+	25	ملزیتوز (Melezitose)
استفاده از (Utilization of)					
+	+	+	+	+	استات سدیم (Sodium acetate)
-	-	-	-	-	پکتات (Pectate)
+	-	+	-	+	سبامیک اسید (Sebacic acid)
-	-	-	-	-	آمیگدالین (Amygdalin)
+	+	+	+	60	اینولین (Inulin)
+	+	+	+	+	ال - آسپاراژین (L-Asparagine)
-	-	-	-	-	ال - اورنیتین (L-Ornithine)
-	-	-	-	-	پروپیونات (Propionate)
-	-	-	-	-	د - تارتارات (D-Tartrate)
-	-	-	-	-	ال - گلوتامیک اسید (L-Glutamic acid)

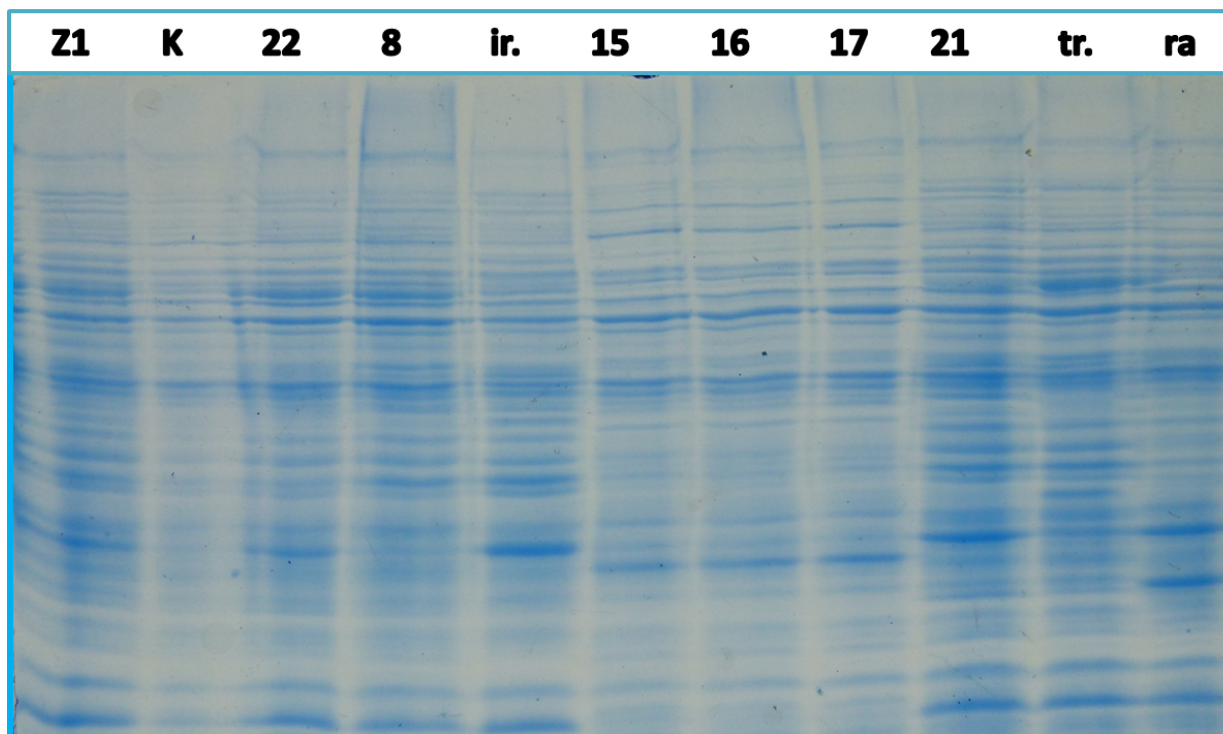
*: جدایه‌های مرجع، +: همه جدایه‌ها دارای واکنش مثبت یا توانایی مصرف داشته‌اند، -: همه جدایه‌ها واکنش منفی و یا عدم توانایی مصرف داشته‌اند. اعداد نشان دهنده درصد واکنش مثبت میان جدایه‌ها هستند.

* Standard isolates, +: Positive reaction or growth, -: negative reaction or no growth. Numbers are positive percent.

مقایسه الگوی پروتئین‌های سلولی

در بررسی نقوش حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های سلولی (شکل ۱)، شباهت زیادی میان جدایه‌های گندم و جدایه *R.iranicus* استاندارد مشاهده شد اما جدایه‌های جو در موقعیت و مقدار

نسبی چندین باند بالایی و میانی با سایر جدایه‌های گندم متفاوت بودند. باندهای حاصل از دو جدایه استاندارد *R.rathayi* و *R.tritici* در دو الی سه باند با یکدیگر و با جدایه‌های گندم متفاوت بودند.



شکل ۱- الگوی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های *Rathayibacter* به دست آمده از گندم و جو آلوده به بیماری خوشه صمغی و جدایه‌های مرجع در ژل پلی‌اکریل آمید. نام و محل جداسازی جدایه‌ها در جدول ۱ آورده شده است. *ra.* و *tr.* *ir.* به ترتیب جدایه‌های مرجع *R.iranicus* و *R.rathayi* می‌باشند.

Figure 1- Comparison of electrophoretic pattern of cell proteins of the isolates of *Rathayibacter* species from wheat and barley spikes with symptoms of gummy spike blight in several provinces of Iran and reference strains of *Rathayibacter* spp., codes of the isolates have been given in Table 1.

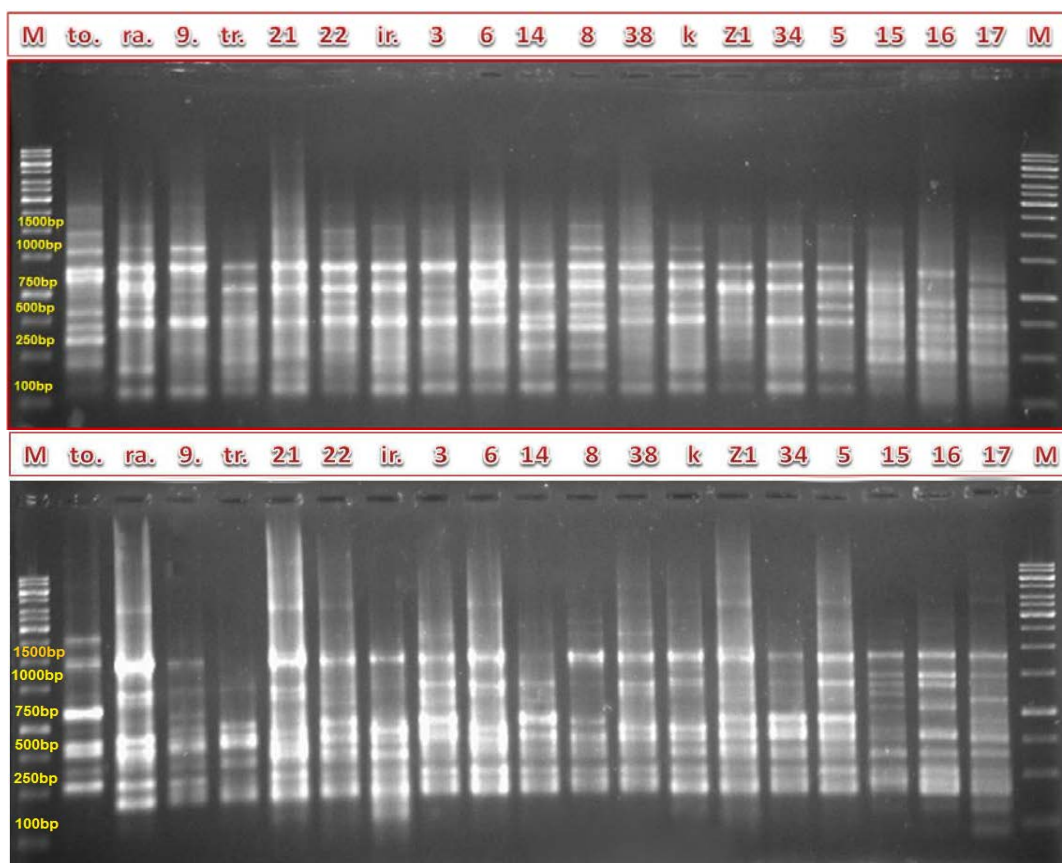
انگشت نگاری با آغازگرهای ریزماهوره‌ای

در الگوی نقوش به دست آمده با آغازگر 5(GTG) طول قطعات تکثیر شده ۱۰۰ تا ۱۶۰۰ جفت باز بودند (شکل ۲). درخت فیلوژنی حاصل جدایه‌های نماینده را در سطح تشابه ۶۷ درصد به ۷ گروه تقسیم کرد. در این سطح تشابه جدایه های ۵، ۶، ۸ (گندم اصفهان) و ۱۴ (گندم ایلام) با جدایه مرجع *R. iranicus* در یک گروه قرار گرفتند. جدایه مرجع *R. toxicus* در گروه کاملاً جداگانه‌ای قرار گرفت. طبق درخت فیلوژنی ترسیمی اساس اثر انگشت نگاره ژنی حاصل از تکثیر با آغازگر M₁₃ جدایه‌ها در سطح تشابه ۶۷ درصد به ۱۲ گروه تقسیم شدند. در این سطح تشابه جدایه‌های ۲۱ (گندم گلستان)، ۶ (لنجان اصفهان) و ۳۸ (فیروزآباد) با جدایه مرجع *R. iranicus* در یک گروه قرار گرفتند. جدایه مرجع *R. toxicus* نیز در گروه کاملاً جدایی قرار گرفت. طول قطعات تکثیر شده در این روش ۱۰۰ تا ۱۸۰۰ جفت باز بود. در نقوش به دست آمده با تجمیع دو آغازگر، جدایه‌ها

در سطح تشابه ۶۷ درصد به ۱۱ گروه تقسیم شدند (شکل ۳).

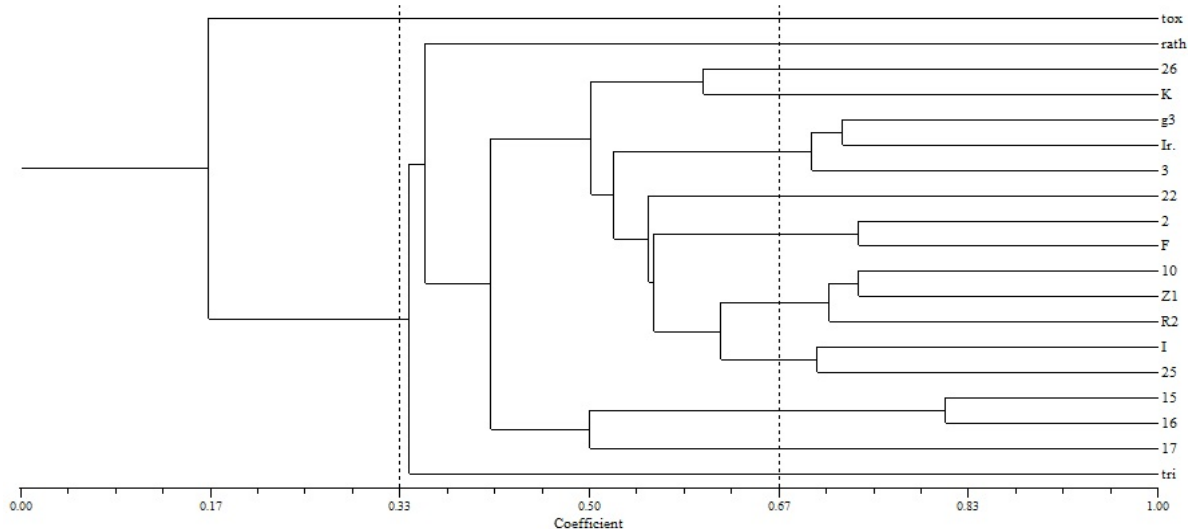
بررسی توالی ژن‌های خانه دار

تکثیر نواحی ITS، 16S rDNA، *gyrB* و *RecA* جدایه‌های ۱۶ (جو)، ۲۲ (گندم خوزستان)، Z₁ (گندم زرقان فارس) و K (گندم کرمان، فقط برای ناحیه‌ی ITS) انجام شد. طول تقریبی قطعات برای این نواحی به ترتیب حدود ۵۰۰، ۷۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ جفت باز تخمین زده شد (شکل ۴). پس از مقایسه توالی‌ها در بانک ژن NCBI همه‌ی جدایه‌ها بیشترین شباهت را به *R. iranicus* داشتند. پس از ثبت توالی‌ها در بانک ژن درخت فیلوژنی توالی جدایه‌ها و برخی از توالی‌های دو جنس *Rathayibacter* و *Clavibacter* موجود در بانک ژن به دو روش الحاق به نزدیک‌ترین همسایه (شکل ۵) و حداکثر احتمال با درجه اعتبار سنجی ۱۰۰۰ رسم شد.



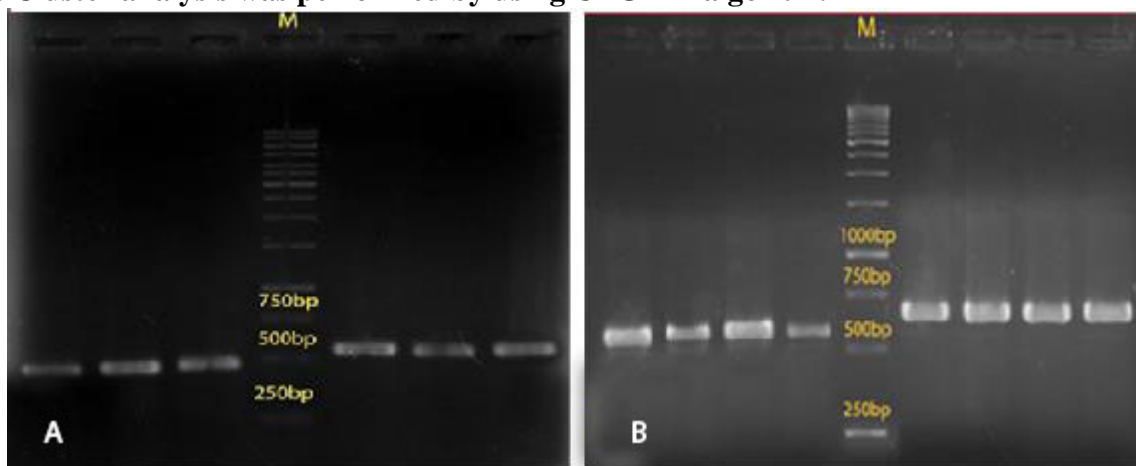
شکل ۲- اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های عامل خوشه صمغی گندم و جو در برخی از استان‌های ایران با استفاده از توالی $(GTG)_5$ (قسمت بالا) و M13 (قسمت پایین) در ژل آگارز ۱/۲ درصد. *tr.*، *ra.*، *to.* و *ir.* به ترتیب جدایه‌های مرجع *Rathayibacter toxicus*، *R.rathayi*، *R.tritici* و *R.iranicus* هستند. مشخصات شماره‌های جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

Figure 2- Electrophoresis gel of PCR fingerprinting with the primer $(GTG)_5$ and M13 for the isolates of *Rathayibacter* species from wheat and barley spikes with symptoms of gummy spike blight in several provinces of Iran and reference strains of *Rathayibacter* spp., codes of the isolates have been given in Table 1.



شکل ۳- درخت فیلوژنی ارتباط ژنتیکی با آنالیز ترکیبی داده‌های حاصل از تکثیر به وسیله‌ی آغازگرهای M13 و (GTG)₅ میان جدایه‌های عامل خوشه صمغی گندم و جو و جدایه‌های مرجع به روش UPGMA.

Figure 3- Dendrogram showing the relationship among *Rathayibacter spp.* isolated from gummy spike infected wheat and barley based on PCR tests employing primers M13 and (GTG)₅. Cluster analysis was performed by using UPGMA algorithm.



شکل ۴- موقعیت قطعات تکثیر شده با PCR، به ترتیب از چپ به راست ژن‌های ITS و gyrB (A) و ژن‌های recA و 16S rDNA (B) جدایه‌های باکتری عامل خوشه صمغی گندم و جو پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد در ۸۰ ولت و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید. ستون M نشانگر DNA با جرم مولکولی ۱ کیلو بازی شرکت فرمنتاس (Fermentas, Lithuania) است.

Figure 4- Fragments from ITS, gyrB, recA and 16S rDNA genes of the gummy spike blight isolates in 1.2% Agarose gel stained with etidium bromide. M: 1 Kb DNA ladder.

بحث

جو در شاخه‌ای مجزا ولی نزدیک به گروه جدایه‌ی مرجع *R. iranicus* و در فاصله‌ی دورتری از دو گونه‌ی *R. tritici* و *R. rathayi* قرار گرفتند. جدایه مرجع *R. toxicus* هم در گروه مجزایی قرار گرفت. جدایه‌های مرجع *R. tritici* و *R. rathayi* در نقوش حاصل از آغازگر 5(GTG) شباهت‌هایی را با جدایه‌های *R. iranicus* (جدایه‌های گندم) نشان دادند. اما در نقوش حاصل از تکثیر در PCR با آغازگر M13 و نیز در درخت فیلوژنی ترکیبی نتایج حاصل از این دو آغازگر، گونه‌ها در گروه‌های جداگانه جای گرفتند.

نتایج بررسی نشانگر مفید بودن این ریز ماهواره‌ها در تفکیک گونه‌ها و جدایه‌های داخل گونه است. نتایج حاصل از تکثیر ناحیه ITS و همچنین قسمتی از نواحی ژنی 16S rDNA، *gyrB* و *recA* شباهت بالای اکثر جدایه‌های عامل خوشه صمغی به دست آمده در سال‌های اخیر از مناطق مختلف ایران را با گونه *R. iranicus* نشان داد. نتایج بررسی حاضر نشانگر کارایی بالای توالی‌یابی این ژن‌ها در تفکیک و شناسایی جدایه‌های *Rathayibacter* در سطح گونه می‌باشد.

درخت فیلوژنی ترسیمی بر اساس توالی قطعاتی از ژن‌های خانه‌داری یاد شده در گونه‌های *Rathayibacter* مورد بررسی و توالی‌های *Rathayibacter* و *Clavibacter* موجود در بانک ژن، نشان داد که این ژن‌ها توانایی تفکیک گونه‌های

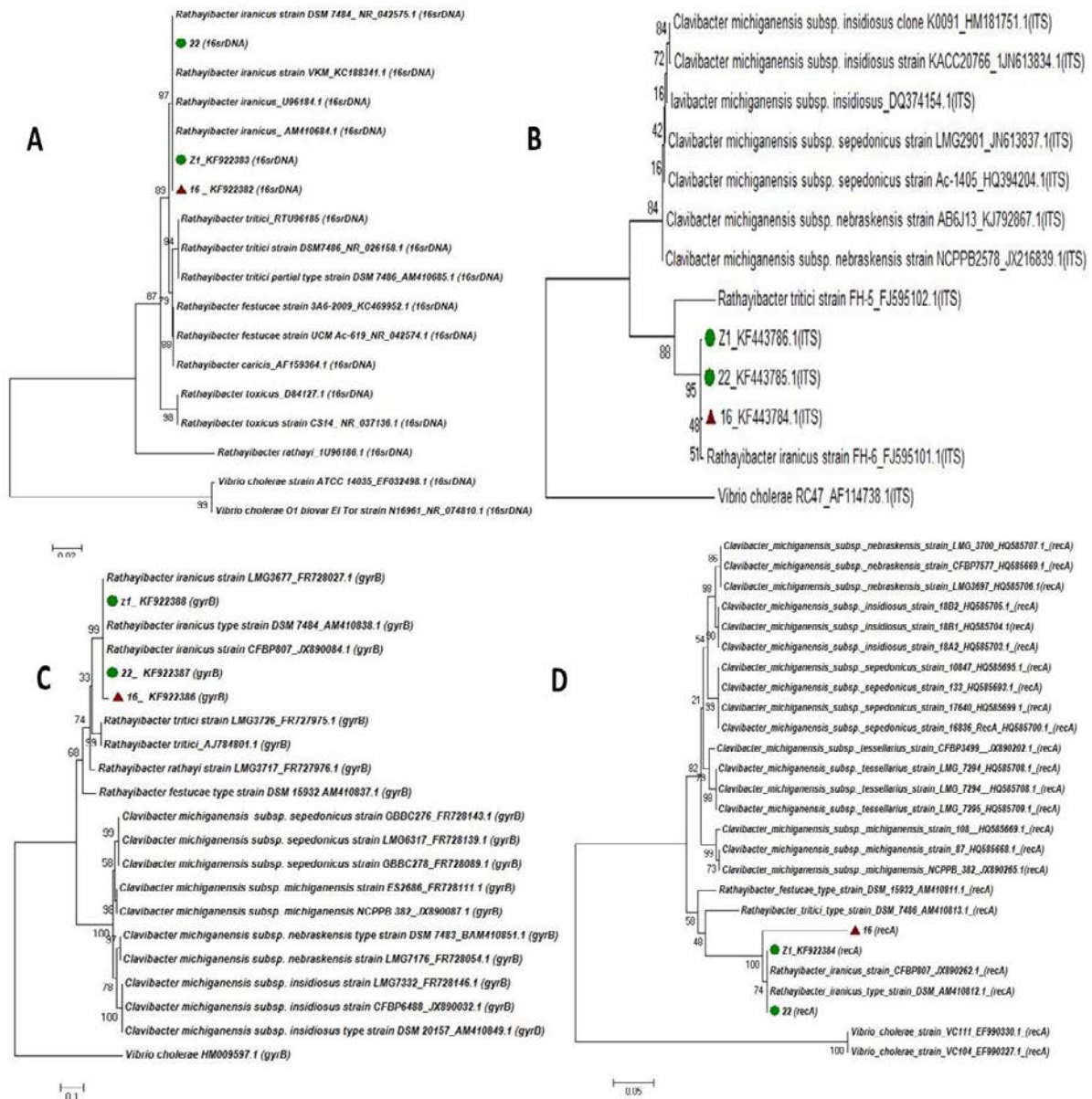
گونه‌ی *R. iranicus* و نیز باکتری عامل خوشه صمغی جو تا کنون فقط از مزارع آلوده ایران جدا شده‌اند و ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و دامنه تفاوت‌ها یا سطوح تنوع ویژگی‌های آن‌ها هنوز به خوبی مشخص نگردیده است. برای تعیین خصوصیات مهم افتراقی گونه‌های *Rathayibacter* و ویژگی‌های دقیق *R. iranicus* آزمون‌های افتراقی روی جدایه‌ها انجام شد. بر پایه‌ی نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی به نظر می‌رسد که همه یا اکثر جدایه‌های به دست آمده از گندم متعلق به گونه‌ی *R. iranicus* باشند.

در بررسی حاضر تعدادی از نتایج آزمون‌های فنوتیپی با نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی (Zgurskaya et al., 1993; Babaeizad & Rahimian, 2002; Soltani et al., 2010) همخوانی نداشت (جدول ۴). در بررسی نقوش حاصل از الکتروفورز پروتئین، شباهت زیادی میان جدایه‌های *R. iranicus* وجود داشت اما جدایه‌های جو از نظر موقعیت یا میزان نسبی چندین باند از سایر جدایه‌ها متمایز بودند. نتایج حاصل از ارزیابی تنوع ژنتیکی در PCR با آغازگرهای 5(GTG) و M13 موید وجود تنوع در بین جدایه‌ها بود. مقایسه‌ی ترکیبی نقوش حاصل از این آغازگرها نشانگر وجود شباهت بالا بین جدایه‌های گندم و جو و جدایه‌ی مرجع *R. iranicus* بود. جدایه‌های

از ویژگی‌ها در جمعیت *R. iranicus* در چند بررسی اخیر مشاهده شده ممکن است توارثی نبوده و تفاوت‌ها ناشی از تفاوت در محل و زمان آزمون‌ها^۱ و خطای آزمایش‌ها باشد چنین تفاوت‌هایی که عمدتاً ناشی از کندی رشد و کندی متابولیسم به ویژه در مصرف بعضی از کربوهیدرات‌ها است در بررسی‌های سایر محققین روی این گروه از باکتری‌ها نیز مشاهده شده است (Davis et al., 1984). این تردید، تکرار بررسی‌های فنوتیپی گسترده‌تر روی تعداد بیشتری از جدایه‌های *R. iranicus* را اجتناب ناپذیر می‌نماید. در حال حاضر می‌توان ویژگی‌های مهم فنوتیپی و افتراقی گونه‌های *Rathayibacter* را به شکلی که در جدول ۴ خلاصه شده است پیشنهاد نمود.

Rathayibacter و نیز *Clavibacter* را دارند. چنین نتیجه‌ای در پژوهش‌های پیشین (Richert et al., 2007; Stackebrandt et al., 2005) نیز مشاهده شده است. در پاره‌ای از ویژگی‌های فنوتیپی، برخی از جدایه‌ها شباهت‌هایی را با جدایه مرجع *R. tritici* نشان داده و دارای ویژگی‌های بینابین این گونه و *R. iranicus* بودند ولی شباهت بالایی را در توالی ژن‌های خانه‌داری با گونه *R. iranicus* نشان دادند؛ لذا تعلق آن‌ها به گونه *R. iranicus* تایید شده و این تفاوت‌ها در ویژگی‌های فنوتیپی می‌تواند منعکس کننده تنوع در جمعیت‌های *R. iranicus* به حساب آید. بررسی‌های محققین در گذشته در زمینه ویژگی‌های فنوتیپی *R. iranicus* محدود به تنها یک جدایه استرین تیپ موجود در کلکسیون‌های نگهداری کشت‌ها مانند (*R. iranicus* type strain DSM 7484=CFB 807=LMG 3677=ICMP 3496) بوده است. با توجه به نتایج دو بررسی فنوتیپی قبلی (Babaeizad & Rahimian, 2002; Soltani et al., 2010) که به شکل نسبتاً گسترده روی تعداد قابل توجهی از جدایه‌های *R. iranicus* از نواحی مختلف ایران صورت گرفته است و بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی حاضر، می‌توان ادعا نمود که ویژگی‌های فنوتیپی گونه *R. iranicus* و به ویژه دامنه تفاوت جمعیت‌ها در این ویژگی‌ها با درجه اطمینان بالایی تعیین گردیده است. البته تفاوت‌هایی که در پاره‌ای

¹ Time and Space



شکل ۵- درخت فیلوژنی حاصل از توالی نوکلئوتیدی ژنهای 16S rDNA (A)، ITS (B)، gyrB (C) و recA (D) جدایه های عامل خوشه صمغی گندم (●) و جو (▲) و توالی جدایه های منتخب ثبت شده در بانک ژن با روش اتصال همسایه ها (Neighbor joining). گونهی *Vibrio cholerae* به عنوان برون گروه در نظر گرفته شده است.

Figure 5- NJ dendrograms of comprising the 16S rDNA (A), ITS (B), gyrB (C) and recA (D) nucleotide sequence data of isolated from gummy spike infected wheat (●) and barley (▲) and some strains available in GenBank with *Vibrio cholerae* as the outgroup.

جدول ۳- شماره دسترسی قطعات توالی یابی و ثبت شده از عوامل ایجاد کننده بیماری خوشه صمغی گندم.

Table 3- GenBank Accession numbers of the sequences of the gummy spike blight agents on wheat and barley.

کد جدایه (Isolate number)		شماره دسترسی (Accession number)		
ITS	16S rDNA	gyrB	recA	ITS
16	KF922382.1	KF922386.1	KP768445.1	KF443784.1
22	KP768446.1	KF922387.1	KP768444.1	KF443785.1
Z ₁	KF922383.1	KF922388.1	KF922384.1	KF443786.1

جدول ۴- ویژگی‌های فنوتیپی پیشنهادی در شناسایی و تفکیک گونه‌های *Rathayibacter* با تاکید بیشتر روی تمایز گونه

R.iranicus

Table 4- Differentiating characters of the *Rathayibacter* species.

Dye & Kemp, 1977	Zgurskaya, 1993	Dorofeeva et al., 2002	Babaeizad & Rahimian, 2002	Soltani et al., 2010	بررسی حاضر (Our study)	ویژگی یا آزمون (Characteristic)								
III	II	III	II	III	II	I								
3-4	2	5	<5	5	<5	3-4	2	3-4	2	2	4	V	<2	درصد تحمل نمک طعام (NaCl tolerance)
-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	-	-	V	-	تولید H ₂ S از تیوسولفات سدیم (H ₂ S from sodium thiosulfate)
d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	هیدرولیز Tween 80 (Hydrolysis of Tween 80)
														تولید اسید از (Acid production from)
		+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	V	+	سوکروز (Sucrose)
														ملزیتوز (Melezitose)
														د-ریبوز (D-Ribose)
														د-لاکتوز (D-lactose)
														استفاده از (Utilization of)
		+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	سباسیک اسید (Sebacic acid)
		+	-	+	+	+	V	-	+	+	+	V	V	اینولین (Inulin)

I: جدایه‌های جو، II: *R.iranicus*، III: *R.tritici*

+ : واکنش جدایه‌ها مثبت، - : واکنش جدایه‌ها منفی V: برخی از جدایه‌ها پاسخ مثبت و برخی پاسخ منفی داده‌اند. d : نتایج مختلف یک جدایه در دو محیط کشت

Table 4. I: Barley strains, II *R.iranicus*, III: *R.tritici*

+: positive reaction, -: Negative reaction, V: Some strains positive, d: Different results either between culture or when repeated

- Ahmadvand R, and Rahimian H (2005). Study on phenotypic and electrophoretic diversity of *Pectobacterium* species infecting maize in Mazandaran. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 271-289.
- Amani B (1969). Gummy spike blight disease. Iranian Journal of Plant Pathology 1:15-24.
- Ayers SH, Rupp P, Johnson WT (1919). A study of the alkali-forming bacteria in milk. US Department of Agriculture Bulletin, Washington (DC): USDA.
- Babaeizad V, Rahimian H (2002). Identity and distribution of *Rathayibacter* species causing gummy spike blight of wheat in some wheat growing areas of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 38:47-55.
- Bradbury JF. (1986). Guide to Plant Pathogenic Bacteria. Common wealth Agricultural Bureaux International Mycological Institute, Kew. UK.
- Davis MJ, Gillaspie AG, Vidaver AK, Harris RW (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.
- Dorofeeva LV, Evtushenko LI, Krausova VI, Karpov AV, Subbotin, SA, Tiedje JM, (2002). *Rathayibacter carisis* sp. nov. and *Rathayibacter festucae* sp. nov. isolated from the phyllosphere of *Carex* sp. and the leaf gall induced by the nematode *Anguina graminis* on *Festuca rubra* L., respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1917-1923.
- Dye DW (1986). A taxonomic study of the genus *Erwinia*, I. The “*Amylovora*” group. New Zealand Journal of Science 12: 590-607.
- Dye DW, Kemp WJ (1977). A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. New Zealand Journal of Agricultural Research 20: 563-582.
- Gurtler V, Stanisich VA (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology 142: 3-16.
- Missaghi L, Grogan RG (1969). Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent *Pseudomonas*. Phytopathology 59: 1436-1450.
- Rahimian H (1993). Characteristics of strains causing gummy spike blight of wheat in Fars province. Proc. of 11th Congress of the Plant Protection. Aug. 25-29, 1993. Guilan, Iran. p. 35.
- Richert K, Brambilla E, Stackebrandt E (2005). Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria order Actinomycetales. Current Microbiology 60: 115-123.
- Riley IT, Ophel KM (1992). *Clavibacter* sp. nov., The bacterium responsible for annual ryegrass toxicity in Australia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 42: 64-68.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society Press, Minnesota. USA.
- Scharif G 1961. *Corynebacterium iranicum* sp. nov. on wheat (*Triticum aestivum*) in Iran and a comparative study of it with *C. tritici* and *C. rathayi*. Entomology and Phytopathology 19:1-4.

- Soltani M, Fuladvand A, Rahimian H, Babaeizad V (2010). Proc. of 19th Congress of the Plant Protection. Aug. 24-27, 2010. Tehran, Iran. P. 429
- Stackebrandt E, Brambilla E, Richert K (2007). Gene sequence phylogenies of the family Microbacteriaceae. Current microbiology 55: 42-46.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72: 917-918.
- Zgurskaya HI, Evtushenko LI, Akimov VN, Kalakoutskii LV (1993). *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 43: 143-149.

Evaluation of the phenotypic and genotypic diversity of the bacterial species causing gummy spike blight of wheat and barley

Nikakhtar S.^{*1}, Rahimian H.², Babaeizad V.³

¹Former MSc student of Plant Pathology, Agricultural sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

²Department of Plant Protection, Agricultural sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

³Department of Plant Protection, Agricultural sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Abstract

Gummy spike blight is a disease of wheat (*Triticum aestivum*) in several cereal growing areas of Iran. *Rathayibacter iranicus*, as the causative agent of the disease of wheat and barley, appears to be confined to Iran. To evaluate possible phenotypic and genotypic diversity of strains infecting wheat and barley, infected spikes were collected from East Azarbaijan, Ilam, Isfahan, Fars and Khuzestan provinces and the associated bacteria were isolated from the spikelets and characterized. Fifteen strains were selected as representatives of groups displaying one or a few differences in phenotypic features or total protein electrophoretic patterns and were used in genotypic comparisons. DNA was extracted from these isolates and from the type strains of *Rathayibacter* spp. To evaluate the genetic diversity of the studied strains, minisatellite marker, with primers M13 and (GTG)₅, was used. Fragments of the genes for 16S rDNA, ITS, gyrase (*gyrB*) and recombinase (*recA*) were amplified and sequenced. Combined PCR fingerprints obtained with the minisatellite primers indicated identity of the strains isolated from wheat with *R. iranicus*. Strains isolated from barley formed a distinct branch closer to that of *R. iranicus* and furthest from those of the other *Rathayibacter* species including *R. tritici* and *R. rathayi*. *R. toxicus* and other *Rathayibacter* species formed a distinctly different branch. Comparison of the sequences of the ITS, 16S rDNA, *gyrB* and *recA* genes with those deposited in GenBank, verified, further, the identity of the strains isolated from wheat and barley as *R. iranicus*.

Key words: *Gummy spike blight, Rathayibacter, minisatellite, housekeeping gene*

* Corresponding Author: Nikakhtar S.

Tel: 09129457984

Email: Shr_nikakhtar@yahoo.com