مقاله کوتاه

اولین گزارش از بیماری لکه برگی باکتریایی ذرت در ایران*

FIRST REPORT OF BACTERIAL LEAF SPOT OF MAIZE IN IRAN

حسین میرزایی نجفقلی[۱]، سید محسن تقوی[۲]** و محمد رضا عالی منش[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۷)

چکیده

طی بازدیدهای انجام شده در پاییز ۱۳۹۰ از مزارع ذرت در منطقه باجگاه، علائم لکه برگی (لکه‌های آجری) در گیاهان ذرت مشاهده گردید. به منظور بررسی و شناسایی عامل بیماری، برگ‌های گیاهان آلوده به آزمایشگاه منتقل شد و پس از لـه کـردن در آب مقطـر سـترون، روی محیط کشت ائوزین متیلن‌بلو (EMB) کشت گردید. پس از ۷۲ ساعت یک باکتری گرم منفی، زرد رنگ، اکسیداز منفی و بی‌هوازی اختیاری از ۱۵ نمونه جدا گانه گیاه ذرت دارای علائم جداسازی گردید. نتایج آزمون‌های لوان، رشد در دمای ۳۷ درجه سـانتیگراد، تولیـد رنگدانـه زرد روی محیط YDC، تحمل نمک طعام دو درصد، تولید اندول، استوئین و سیترات مثبت بودند. اما نتایج آزمـون‌هـای لسـتیناز، رشـد در دمای ۴۱ درجه سانتیگراد، تولید رنگ فلورسنت روی محیط KB، ذوب ژلاتین، هیـدرولیز آرژنـین، آسـکولین و تـوئین ۸۰ منفـی بودنـد. همچنین این باکتری شیر لیتموس را اسیدی نمود و روی توتون واکنش فوق حساسیت ایجاد کرد. جدایه‌ها قـادر بـه اسـتفاده از سالیسـین، آربوتین، رافینوز، ملوبیوز، سلوبیوز، سوکروز و آرابینوز بودند، اما توانایی استفاده از مالونیـک اسـید را نداشـتند. همچنـین آزمـون اثبـات بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های ذرت انجام گردید. سپس یکی از جدایه‌ها مورد بررسی تکمیلی قرار گرفت و بخشی از ناحیـه 16S rRNA آن تکثیر و توالی‌یابی شد. با توجه به علائم بیماری، خصوصیات فنوتیپی، آزمون بیماری‌زایی و توالی‌یابی ناحیه 16S rRNA، باکتری مذکور بـه عنوان *Pantoea stewartii* subsp. *Indologenes* تشخیص داده شد. این نخستین گزارش از وجود این بیماری در ایران می‌باشد.

کلیدواژه: لکه برگی، ذرت، ژن 16S rRNA، ایران، *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes*

---

* مربوط به تحقیقات بر روی بیماری های ذرت در شهرستان شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtaghavi@shirazu.ac.ir

۱- دانشجوی دوره دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۲- استاد، بخش گیاهپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز

مقدمه

جنس *Pantoea* یکی از مهمترین بیمارگرهای باکتریایی گیاه ذرت (*Zea mays* L.) و دارای گونه‌های *Pantoea agglomerans*، *P. dispersa*، *P. citrea*، *P.punctata*، *P. terrea*، *P. ananatis* و *P. stewartii* می‌باشد. این گونه‌ها روی گیاهان چغندر، گچ دوست، اکالیپتوس، برنج، ذرت، ارزن، آناناس و صمغ گوار بیماری زا هستند (Brady *et al.* 2008; Burr *et al.* 1991; Cother *et al.* 2004; Coutinho *et al.* 2002; Emam 2005; Goszczynska *et al.* 2007). گونه *P. stewartii* دارای دو زیر گونه *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* و *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* است که زیر گونه *stewartii* سبب پژمردگی استوارتی ذرت می‌شود و زیرگونه *indologenes* سبب لکه برگی ارزن دم روباهی (*Setaria italica*)، ذرت و ارزن مروارید (*Pennisetum americanum*)، پوسیدگی آناناس (*Ananas comosus*) و صمغ گوار (*Cyamopsis tetragonolobus*) می‌شود. آزمون اندول مهمترین آزمونی است، که برای تفکیک این دو زیرگونه به کار می رود (Wensing *et al.* 2010). با توجه به مشاهده علائم لکه‌های آجری رنگ و آب سوخته روی برگ‌های ذرت در استان فارس، هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی و ژنوتیپی عامل بیماری می‌باشد.

روش بررسی

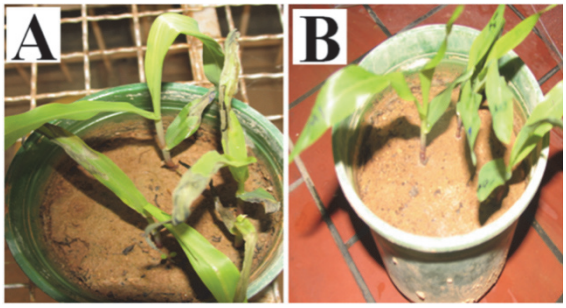
تعداد ۱۵ جدایه باکتریایی از گیاهان ذرت دارای علائم لکه برگی و آب سوخته در منطقه باجگاه، ۱۵ کیلومتری شمال شهر شیراز جداسازی گردید. شناسایی جدایه‌های مذکور توسط تعدادی از آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک براساس روش کواکس، فهی و پرسلی، و شاد و همکاران (Fahy and Parsley 1988; Schaad *et al.* 2001; Kovacs 1955) انجام گردید. همچنین آزمون فوق حساسیت روی گیاهچه‌های توتون و آزمون اثبات بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ در مرحله چهار برگی به روش شاد و همکاران انجام گردید (Schaad *et al*. 2001; Klement *et al*. 1964).

به منظور صحت تشخیص جدایه‌ها توسط آزمون‌های انجام شده، یک جدایه به عنوان نماینده انتخاب شد و با استفاده از آغازگرهای عمومی Proteobacteria با ترادف‌های (5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA -3') 16s-F و (5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3') 16s-R به روش گوش و همکاران، قطعه‌ای از ناحیه S ۱۶rRNA تکثیر گردید (Ghosh *et al.* 2010). دی ان ای الگو به روش جوشاندن باکتری تهیه و به میزان ۳ میکرولیتر در هر واکنش مورد استفاده واقع شد.

پس از تکثیر و توالی‌یابی ناحیه ۱۶S rRNA توسط شرکت ماکروژن کره‌جنوبی، توالی‌های حاصل در برنامه BLASTn موجود در پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفت. همچنین درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-Joining با آزمون Bootstrap با ۵۰۰ تکرار ترسیم شد (Hauben *et al.* 1998).

نتایج و بحث

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژی و فوق حساسیت روی توتون نشان داد که جدایه‌ها گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری بوده و روی محیط‌کشت عصاره مخمر دکستروز کربنات کلسیم آگار (YDC) تولید رنگدانه زرد می نمایند. نتایج آزمون‌های تولید اندول، استوئین، لوان، کاتالاز، فوق حساسیت روی توتون، رشد در ۳۷ درجه



شکل ۱.A- علائم ایجاد شده توسط جدایه *Pantoeastewartii* subsp. *Indologenes* بر روی گیاهچه ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ ده روز پس از مایه زنی. B- گیاهچه ذرت شاهد مایه زنی شده با آب مقطر سترون.

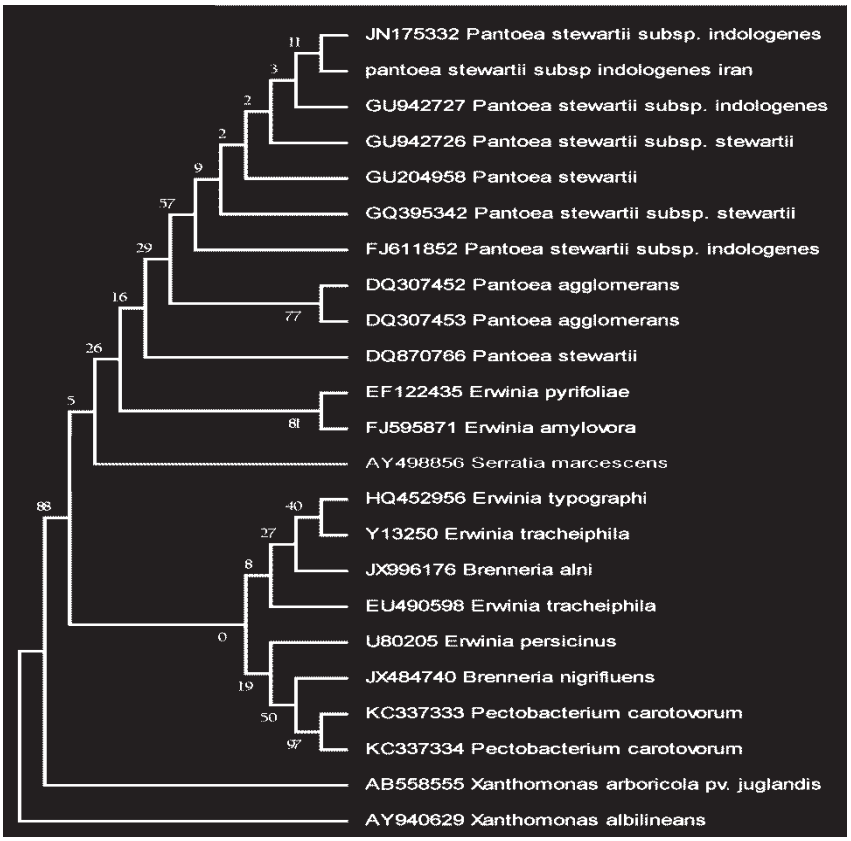
Fig. 1. A: Symptoms caused by *Pantoeastewartii* subsp. *indologenes* on a corn single cross 704 seedling, 10 days after inoculation. B: Control corn seedling mock inoculated with water.

سانتیگراد و تحمل نمک طعام دو درصد مثبت اما نتایج آزمون‌های لستیناز، هیدرولیز آسکولین، توئین ۸۰ و آرژنین، رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد و اکسیداز منفی بودند. همچنین همه جدایه‌ها قادر به استفاده از سالیسین، آربوتین، رافینوز، ملوبیوز، سلوبیوز، سوکروز و آرابینوز بودند، اما از مالونیک اسید استفاده نکردند. در آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های ذرت علائم ابتدا به صورت لکه‌های آبسوخته و در مواردی سوختگی شدید روی برگ‌های ذرت نمایان شد، در حالی که در برگ‌های شاهد این علائم ظاهر نگردید. همچنین در بعضی از گیاهچه‌ها میزان سوختگی برگ‌ها پیشرفت بیشتری داشت به طوری که سبب مرگ تعدادی از گیاهچه ها گردید (شکل-۱).

در یکی از جدایه ها ترادف ۹۴۰ جفت بازی از ناحیه 16s rRNA با استفاده از آغازگرهای 16s-F و 16s-R تکثیر شد. پس از تکثیر، توالی‌یابی و بلاست کردن ناحیه تکثیر شده در پایگاه داده‌ای NCBI، جدایه موجود بیشترین شباهت را به باکتری *P. stewartii* subsp. *indologenes* داشت. همچنین درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA 5، با استفاده از روش Neighbor-Joining ترسیم و درخت ترسیم شده با آزمون Bootstrap با ۵۰۰ تکرار آزمایش شد (شکل- ۲).

یکی از روش‌های دقیق در شناسایی مولکولی، توالی یابی ناحیه 16S rRNA باکتریایی می‌باشد که در این تحقیق نیز از توالی‌یابی این ناحیه استفاده شد. این قسمت از ژنوم دارای نواحی حفاظت شده و متغیری می‌باشد که تفاوت باکتری های نزدیک از نظر فیلوژنی، حاصل تفاوت در نواحی متغیر است (Krawczyk *et al*. 2010). در آنالیز فیلوژنتیکی ترادف ناحیه 16S rRNA (شکل- ۲) موقعیت فیلوژنتیکی جدایه ایرانی *P. stewartii* subsp. *indologenes* بیشترین شباهت را با جدایه‌های FJ611852، JN175332، GU942726 و GU942727 زیرگونه *P. stewartii* subsp. *indologenes* داشت.

با استفاده از خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی ذکر شده در پژوهش‌های سایر محققین مانند تولید اندول، هیدرولیز آسکولین، استفاده از سیترات، تولید اسید از سالیسین، آربوتین و سلوبیوز زیرگونه *P. stewartii* subsp. *indologenes* از *P. stewartii* subsp. *stewartii* تفکیک می‌شود، که این آزمون‌ها با جدایه‌های مورد نظر مطابقت داشت. نتایج آزمون‌های انجام شده برای زیرگونه *P. stewartii* subsp. *indologenes* مثبت اما برای زیرگونه *P. stewartii* subsp. *stewartii* منفی است (Mergaert *et al*. 1993; Wensing *et al*. 2010). همچنین براساس کارهای مرگارت و همکاران، به منظور تفکیک زیرگونه *P. stewartii* subsp. *indologenes* از گونه *P. annanatis* از آزمون‌های تفکیکی هیدرولیز توئین ۸۰ و رشد در ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده گردید، که زیرگونه *P. stewartii* subsp. *indologenes* قادر به رشد در دمای ۳۷ درجه



شکل ۲ . دندروگرام قرابت ترادف قطعه ای از ژن 16S rRNA جدایه ایرانی *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* با برخی از جدایه‌های خانواده Enterobacteriaceae موجود در بانک اطلاعات NCBI.

Fig. 3.Dendrogram depicting the estimated phylogenetic relatedness of the Iranian isolate of *Pantoea stewartii* subsp. *Indologenes* among selected species in Enterobacteriaceae isolates, based on pairwise comparisons of partial 16S rRNA sequences.

سانتیگراد بود، اما قادر به هیدرولیز توئین ۸۰ نبود (Mergaert *et al.* 1993). با توجه به خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی، آزمون اثبات بیماری‌زایی و توالی‌یابی ناحیه ۱۶S rRNA، باکتری مذکور به عنوان *P. stewartii* subsp.*indologenes* تشخیص داده شد. این نخستین گزارش از وقوع این بیماری و عامل آن در ایران است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحهٔ ۱۸۸ متن انگلیسی مراجعه شود.