گزارش کوتاه علمی

شناسایی عامل لکه برگی پامچال در استان مازندران با استفاده از توالی ژن‌های *rpoD* و *dnak*

IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF LEAF SPOT OF PRIMULA BY *DNAK* AND *RPOD* GENE SEQUENCES IN MAZANDARAN

معصومه آقاسی‌نژاد[۱]، حشمت‌اله رحیمیان[۱] و مسعود توحیدفر[۲]

۱. گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

بیماری لکه برگی ناشی از گونه‌ای زانتوموناس در پامچال وحشی (*Primula vulgaris*) در چند منطقه جنگلی استان مازندران گزارش شده است (Rahimian. 1995. 12th Iran. Plant Protec. Cong.,278). براساس یک بررسی ژنومی از تعیین توالی ناحیه ITS و ژن 16s rRNA گزارش گردید که برخی از جدایه‌های عامل لکه برگی پامچال نزدیک به گونه *X.campestris* می‌باشند (Rahimian *et al*. 2008. 18th Iran. Plant Protec. Cong.,420)، ولی اطلاع دقیقی از موقعیت تاکسونومیکی این جدایه‌ها در دسترس نیست. بررسی حاضر به منظور ارزیابی موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های به‌دست آمده از چند منطقه جنگلی استان مازندران انجام گرفت. ازکشت نمونه‌های پامچال دارای علایم لکه برگی، جدایه‌هایی با کلنی‌های محدب زرد رنگ و لعابدار روی محیط NAS به‌دست‌آمد. واکنش فوق حساسیت پس از تزریق سوسپانسیون باکتری به برگ‌های شمعدانی بعد از ۲۴ ساعت و بیماری‌زایی روی برگ‌های پامچال پس از ۷ تا ۱۴ روز به اثبات رسید. نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی اختلاف چندانی میان جدایه‌ها نشان نداد. از نظر ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها بسیار شبیه هم بوده و فقط در مصرف اسید سیتریک به عنوان منبع کربن اختلاف نشان دادند. DNA ژنومی جدایه‌ها استخراج و با به‌کارگیری آغازگرهای *dnak* و *rpoD* قطعاتی از این دو ژن با PCR در شرایط توصیه شده پارکینسون و همکاران (Parkinson *et al*. 2007. Int. J. Syst. Evol. MicrobioI. 57:2881-2887) ولی با کاهش دمای مرحله اتصال (Annealing) تکثیر شد. محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و ژل در محلول ژل رد (gel red) رنگ‌آمیزی شد. به‌ترتیب دو قطعه ۹۶۵ و۷۳۶ bp از ژن‌های *dnak* و *rpoD* تکثیر گردید. به منظور امکان تفکیک محصول PCR جدایه‌ها از یکدیگر هضم محصول حاصل از تکثیر ژن‌های *dnak* و *rpoD* با آنزیم BamHI صورت گرفت. از ضریب تشابه جاکارد برای تعیین تشابه جدایه‌ها و از روش UPGAMA و نرم‌افزار NTSYS برای آنالیز خوشه‌ای استفاده شد. نمونه‌های انتخاب شده براساس نتایج RFLP، توالی‌یابی شد. توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده، پس از همردیف‌سازی چندگانه (Multiple sequence alignment) با برنامه MEGA4 با سایر توالی‌های مربوط به این ناحیه در گونه‌های مختلف *Xanthomonas* موجود در ژن بانک (NCBI) مقایسه شدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد جدایه‌ها در سطح تشابه ۹۸٪ با گونه *Xanthomonas hortorum* شباهت داشته و احتمالاً به پاتوار گزارش نشده‌ای از این گونه تعلق دارند. این اولین گزارش از جدایه‌هایی از گونه *X.hortorum* به عنوان عامل بیماری لکه برگی در پامچال است.