بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۲/ سال ۱۴۰۲: ۱۵۴-۱۳۸ DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021782.438

CC BY

مقاله پژوهشی

اولین گزارش باکتری *Clavibacter zhangzhiyongii* عامل بیماری زوال و زردی جو در برخی نواحی ایران

اسما رحمن زاده کرمانی[1] و سید محسن تقوی[2]**

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۸ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۷)

چکیده

تا کنون بیماری‌های باکتریایی متعددی از جمله لکه نواری گندم با عامل *Xanthomonas translucens* و موزاییک خفیف باکتریایی با عامل *Clavibacter tessellarius* از گیاهان خانواده گندمیان گزارش شده است. در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر حضور باکتری *Clavibacter zhangzhiyongii* در برخی کشورها نظیر استرالیا و چین از گیاه جو منتشر شده است. این پژوهش با هدف ردیابی و شناسایی باکتری مذکور با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و همچنین تعیین دامنه میزبانی آن اجرا شد. برای این منظور طی سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ از گیاهان گندم، جو و علف‌های هرز گرامینه دارای علائم لکه‌های قهوه‌ای، موزاییک خفیف، زوال و زردی برگ در استان‌های گلستان، بوشهر، قزوین، زنجان و فارس نمونه‌برداری انجام شد. جداسازی باکتری مطابق روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام گرفت. شناسایی جدایه‌ها با انجام آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی و همچنین ژن‌های خانه‌داری *atp*D، *gyr*B، *pp*K و *rec*A و آزمون بیماری‌زایی به دو روش پاشش و تزریق به ساقه انجام گرفت. براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی ۱۵ جدایه از جنس *Clavibacter* شناسایی شد که از بین جدایه‌های مورد بررسی، سه جدایه به عنوان گونه *C. zhangzhiyongii* شناسایی شدند.

واژگان کلیدی: ، جو، گندم، گرم مثبت

---

* بخشی از یک ازساله دکتری تخصصی ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز با راهنمایی آقای دکتر سید محسن تقوی

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

۱- دانشجو دکتری بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران

۲- استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران

Iran. J. Plant Path., Vol. 59, No .2, 2023: 138-154

DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021782.438

Research Article
The first report of the bacterium *Clavibacter zhangzhiyongii*, the cause of barley decay and yellowness in some areas

Asma Rahmanzadeh[1] and Seyed Mohsen Taghavi[2]**

(Received: 07.02.2024; Accepted: 07.07.2024)

Abstract

So far, several bacterial diseases, including wheat stripe spots caused by *Xanthomonas translucens* and mild bacterial mosaics caused by*Clavibacter tessellarius* , have been reported in Poaceae family plants. In recent years, reports have been published on the presence of *Clavibacter zhangzhiyongii* bacteria in barley plants in some countries, such as Australia and China. This research was conducted to track and identify the mentioned bacteria using biochemical and molecular methods and determining its host range. For this purpose, in the years 2021 and 2022, wheat, barley, and weeds with symptoms of brown spots, mild mosaic, decay, and yellowing of leaves were sampled in the provinces of Golestan, Bushehr, Qazvin, Zanjan, and Fars. Bacterial isolation was performed according to standard bacteriological methods. Phenotypic and biochemical tests identified isolates and housekeeping genes *atp*D, *gyr*B, *pp*K, and *rec*A. Pathogenicity tests were performed by spraying and stem injection. Based on biochemical and molecular tests, 15 isolates of the genus Clavibacter were identified, and among the studied isolates, three isolates were identified as *C. zhangzhiyongii*.

Keywords: Clavibacter, Barley, Wheat, Gram-positive

*A Part of a specialized PhD submitted to the School of Agriculture, Shiraz University under the guidance of Mr. Dr. Seyed Mohsen Taghavi

**Corresponding author's E-mail address: mtaghavi@shirazu.ac.ir
1- PhD. student, Department of Plant protection, School of Agriculture, Shiraz University, Iran
2- Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

مقدمه

تیره گندمیان یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی است که حدود ۷۰۰ جنس و ۱۰۰۰۰ گونه گیاهی را در خود دارد (Renvoize and Clayton, 1992). محصول‌های زراعی مهمی نظیر: برنج (*Oryza sativa*)، ذرت (*Zea mays*)، سورگوم(*Sorghum bicolor*)، جو(*Hordeum vulgare*) و گندم (*Triticum aestivum*) در این تیره قرار دارد(Davidson *et al*. 2012). طبق آمار سازمان غذا و دارو (FDA) و سازمان غذا و کشاورزی (FAO) در سال ۲۰۲۲ میزان برداشت گندم در دنیا ۷۸۳/۹ میلیون تن بوده است، فائو از رشد ۲۸ درصدی تولید گندم ایران در سال ۲۰۲۲ نیز خبر داده است و ایران را با تولید ۱۳ میلیون تن گندم سیزدهمین تولیدکننده بزرگ گندم جهان در این سال معرفی کرده است (FAO 2023).

یکی از تیره‌های باکتریایی مهم که دارای گونه‌های مختلف بیماری‌زا در خانواده گندمیان می‌باشد تیره Microbacteriaceae است که اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط پارک و همکاران و در سال ۱۹۹۷ توسط ستاکبرانت و همکاران شناسایی و نام‌گذاری شد(Stackebrandt *et al*.1997; Park *etl*.1999) و در سال‌های بعد توسط ژی (Zhi *et al*. 2009) اصلاح شد. این خانواده یک خانواده باکتریایی منوفیلتیک است و درخت فیلوژنی آن مبنی بر توالی ژن‌های 16SrRNA و همچنین ژن‌های خانه‌داری است (Richert *et al*. 2007). دو جنس شناخته‌شده در این تیره *Clavibacter* و *Rathayibacter* می‌باشند که جنس *Clavibacter* تا قبل از دهه ۸۰ میلادی *Corynebacterium* نام داشته است (Zgurskaya *et al*. 1993; Davis *et al*.1984). جنس *Clavibacter* در دهه ۸۰ میلادی دارای یک گونه به نام *Clavibacter michiganensis* و زیرگونه‌های متعددی بوده است (Davis *et al*.1984). از سال ۲۰۱۱ با استفاده از تجزیه‌وتحلیل چندشکلی و بررسی میانگین شباهت نوکلئوتیدی(Average Nucleotide Identity (ANI)) و هیبریداسیون دیجیتال دی‌ان‌ای-دی‌ان‌ای (Digital DNA-DNA hybridization (DDH)) هر یک از زیرگونه‌های این جنس، خود به گونه‌های مستقل تبدیل شدند، بطوریکه امروزه این جنس دارای ۱۰ گونه مستقل شامل *C. michiganensis*، *C. sepedonicus*، *C. insidiosus*، *C. phaseoli*، *C. californiensis*، *C. capsici*، *C. nebraskensis*، *C. tessellarius*، *C. zhangzhiyongii* و *C. lycopersici* است (Waleron *et al*. 2011; Li *et al*. 2018; Richter *et al*. 2016; Yoon *et al*. 2017; Rodriguez *et al*. 2016; Chun *et al*. 2018; Kim *et al*. 2014; Osdaghi *et al*. 2023).

در بین این ۱۰ گونه در جنس *Clavibacter* سه گونه *C. nebraskensis*، *C. tessellarius* و *C. zhangzhiyongii* به ترتیب بر روی ذرت، گندم و جو بیماری‌زا می‌باشند. گونه *C. zhangzhiyongii* عامل لکه قهوه‌ای برگ و زوال (leaf brown spot and decline)در جو اولین بار در سال ۲۰۱۷ از استرالیا و چین گزارش شد و میزبان اصلی آن گیاه جو بود. محققین در بررسی‌های انجام گرفته و تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک بر اساس ژن *dnaA* دریافتند که این گونه در یک خوشه جداگانه از سایر گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس *Clavibacter* قرار دارد، در سایر ویژگی‌ها ازجمله رنگ پرگنه، استفاده از منبع کربن و فعالیت‌های آنزیمی نیز به‌طور قاطع از سایر گونه‌های جنس *Clavibacter* مجزا است (Tian *et al*. 2021). طی سالیان اخیر هیچ گونه بررسی جامع و دقیقی در زمینه پراکنش این بیماری باکتریایی در ایران صورت نگرفته است و تنها مطالعه صورت گرفته در سالیان گذشته مربوط به بررسی بیماری باکتریایی موزاییک خفیف گندم (Bacterial mosaic of wheat) (*C. tessellarius*) در جنوب ایران می‌باشد (Nasiri *et al*. 2024). از آنجاکه فرضیه‌ی بذرزاد بودن گونه *C. zhangzhiyongii* یکبار

مطرح شده است با توجه به هم‌جواری کشت گندم و جو در مزارع کشاورزی کشور در صورت ورود این عامل بیمارگر احتمال آلودگی غلاتی نظیر گندم و جو و برخی علف‌های هرز گرامینه وجود خواهد داشت.

طی بررسی‌های صورت گرفته احتمال ورود گونه *C. zhangzhiyongii* در ایران وجود دارد. هدف از این پژوهش ردیابی این عامل بیمارگر در نقاطی از ایران و بررسی دامنه میزبانی آن در جهت مدیریت این بیماری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع گندم، جو و همچنین علف‌های هرز تیره گندمیان از اواخر زمستان ۱۳۹۹ تا اواخر بهار ۱۴۰۰ در مرحله اول و در مرحله دوم از اواخر زمستان ۱۴۰۰ تا اواسط بهار ۱۴۰۱ (بر اساس شرایط آب و هوایی هر منطقه) از برخی استان‌های ایران شامل آذربایجان شرقی، البرز، خراسان رضوی، زنجان، فارس، قزوین و گلستان انجام گرفت. گیاهان دارای علائم بیماری‌های باکتریایی نظیر لکه برگی، موزاییک ، لکه‌قهوه‌ای و زردی برگ، ساقه و سنبله‌ها جمع‌آوری و به آزمایشگاه باکتری شناسی، بخش گیاهپزشکی دانشگاه شیراز منتقل شدند. هر یک از نمونه‌های گیاهی با استفاده از چاقوی جراحی سترون در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در درون یک تشتک سترون خرد شد. دو لوپ از سوسپانسیون حاصل بر روی محیط کشت YPGA حاوی پپتون، گلوکز، مخمر و آگار (Park *et al*. 1986) کشت داده شد. تشتک‌ها در دمای۲۷- ۲۵ درجه سیلسیوس به مدت ۴۸-۷۲ ساعت نگه‌داری شدند (Tegli *et al*. 2002). پس از طی زمان مقرر، پرگنه‌های مشکوک به باکتری (با توجه ویژه به پرگنه‌هایی با اندازه کوچک، لعابی و با رنگ‌دانه هلویی رنگ) انتخاب و بر روی محیط کشت YPGA (Parl *et al*.1986) مجدد کشت داده شدند. جدایه‌های خالص در تیوب‌های سترون آزمایشگاهی حاوی آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون و در دمای یخچال، برای مطالعه‌های بعدی نگهداری شدند. برای نگه‌داری طولانی مدت، جدایه‌ها در آب مقطر سترون حاوی ۳۰ ٪ گلیسرول، در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل واکنش گرم با استفاده از KOH (هیدروکسید پتاسیم) سه درصد، کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، بررسی تولید ایندول، رشد بر روی محیط کشت تری فنیل تترازولیوم کلراید (Trihenyl-2H-tetrazolium chloride-2,3,5) (TTC)، و تولید اسید از قندهایی نظیر سوربیتول، مانیتول، اریزیتول، مالتوز، اینوزیتول و هیدرولیز ژلاتین و کازئین برای تمامی جدایه‌های هلویی رنگ در دو تکرار انجام گرفت (Schaad *et al*. 2000; EPPO. 2011).

بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگر اختصاصی

استخراج DNA تمامی جدایه‌های هلویی رنگ به دست آمده از این پژوهش با استفاده از روش جوشاندن و روش CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide) انجام شد. در مرحله بعد از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی جنس *Clavibacter* به نام CMR16F1 و CMR16R1 برای شناسایی اولیه جدایه‌ها استفاده شد (Lee *et al*. 1997; Guimaraes *et al*. 2001; Tegli *et al*. 2002). برای PCR از کیت عمومی PCR پلیمر DNA آمپلیکون، *Taq* DNA Polymerase، مسترمیکس(Ampliqon A/S, Odense, Denmark)، مطابق با توصیه‌های شرکت سازنده استفاده شد. برای هر جدایه، از یک واکنش PCR ۲۵ میکرولیتری حاوی ۵۰

نانوگرم DNA و یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰pmol / µl) استفاده شد. برنامه PCR شامل واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای۶۲ درجه سیلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه بود. گسترش نهایی در ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول‌های تکثیرشده این واکنش از طریق دستگاه الکتروفورز و با استفاده از ژل آگاروز (۱٪) در ۸۰V / cm بافر تریس برات EDTA (TBE) رنگ‌آمیزی شده با محلول یک درصد اتیدیوم بروماید مشاهده شدند.

تحلیل توالی چند جایگاهی (MLSA)

به منظور تعیین موقعیت فیلوژنتیکی برخی جدایه‌های *Clavibacter* به دست آمده در این پژوهش، از چهار ژن خانه‌داری شامل *gyr*B، *atp*D، *pp*K و *rec*A که ژن‌های اصلی خانه‌داری در خانواده Microbacteriacea است جهت تجزیه‌وتحلیل توالی‌های چند جایگاهی استفاده شد (Richert *et al*. 2005; Jacques *et al*. 2012).

شرایط دمایی ترموسایکلر در بالا ذکر شد، دما اتصال با توجه به نوع آغازگر مورد استفاده در واکنش PCR متفاوت بود (جدول ۱)، محصول‌های PCR در ژل آگارز ۱٪ مشاهده و بخشی از آن به طور مستقیم برای تعیین توالی به شرکت کدون ژنتیک تهران ارسال شد. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL W هم‌تراز و بررسی شدند(Larkin *et al*. 2007)، تمامی توالی‌ها در بانک ژن با شماره دسترسی اختصاص ثبت شدند. تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک با روش حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) و با استفاده از مدل جوکس-کانتور (Jukes-Cantor) انجام شد(Jukes and Cantor 1969) . درخت‌های فیلوژنتیک نیز با بوت استرپینگ (۱۰۰۰ تکرار) با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام گرفت (Tamura *et al*. 2013).

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش.

Table1. primers used in this research.

نام آغازگر	توالی۳-۵َ	دما واسرشت سازی (به درجه)	اندازه قطعه تکثیر شده	ژن هدف	منبع
CMR16F1	GTGATGTCAGAGCTTCCTCTGGCGGATA	۶۲	۱۴۲۴	16S rDNA	Lee *et al*. 1997
CMR16R1	GTACGGCTACCTTGTTACGACTTAGT				
atpD2F	GACATCGAGTTCCCGCAC	۵۵	۱۱۰۴	*atp*D	Jacques *et al*. 2012
atpD2R	CGATGATCTCCTGGAGCTCCTTGT				
2F	ACCGTCGAGTTCGACTACGA	۵۷	۹۷۷	*gyr*B	Richert *et al*. 2005
6R	AGSACGATCTTGTGGTA				
ppkF	GAGAACCTCATCCAGGCCCT	۶۰	۶۰۴	*Ppk*	Jacques *et al*. 2012
ppkR	CGAGCTTGCAGTGGGTCTTGAG				
recAF	GACCGCGCTCGCACAGATCGACCG	۶۳	۷۲۴	*recA*	Jacques *et al*. 2012
recAR	GCCATCTTGTTCTTGGACGACCTTG				

آزمون بیماری‌زایی

تمامی جدایه‌های شناسایی شده در این پژوهش از نظر بیماری‌زایی بر روی گندم (رقم آزادی)، جو (رقم ریحان) و همچنین یولاف بررسی شدند. بذور سالم در گلدان‌های با دهانه ۱۲ سانتی متر و ارتفاع۱۰سانتی‌متر همراه با خاک سترون کاشته شدند بیماری‌زایی جدایه‌ها در مرحله دو برگی و به دو روش زیر صورت گرفت. اولین روش

مایه‌زنی باکتری با استفاده از سرنگ سترون در داخل ساقه گیاه بود. در این روش در ابتدا سوسپانسیونی از باکتری با غلظت CFU/ml $۱۰^{۷}$ × ۱ تهیه شد و سپس با استفاده از سرنگ سترون به داخل ساقه گیاه تزریق، سپس محل تزریق با پارافیلم پوشانده شد. روش دوم پاشش باکتری بر روی برگ گیاهان بود. در این روش در ابتدا برای ورود راحت‌تر باکتری به فضا میان‌برگی خراش‌های کوچک سطحی با استفاده از سوزن سترون بر روی سطح برگ ایجاد شد و سپس سوسپانسیون باکتری با غلظت CFU/ml$۱۰^{۷}$× ۱ به روش پاشش باکتری بر روی سطح برگ‌ها انجام شد (Duveiller 1997). گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه‌ای با رطوبت نسبی ۸۵ تا ۹۰ درصد نگه‌داری شدند و تا ۱۴ الی ۲۰ روز پس از مایه‌زنی به طور منظم از نظر بروز علائم بیماری تحت نظارت قرار گرفتند. همچنین به‌دلیل عدم وجود جدایه استاندارد از گونه *C. zhangzhiyongii* از جدایه‌های استاندارد *C. tssellarius* (CFBP 3496) و *C. michiganensis* (ICMP2550) به عنوان نماینده‌هایی از جنس *Clavibacter* استفاده شد. جداسازی باکتری از گیاهان مایه‌زنی شده به روشی که در بالا ذکر شد انجام شد. آزمون بیماری‌زایی به طور مستقل با سه تکرار انجام گرفت، اصول کخ نیز ۱۰ روز پس از ظهور علائم با نمونه‌برداری از گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه و جداسازی مجدد باکتری از آن‌ها انجام شد (Ansari *et al.* 2019; Nasiri *et al.* 2024).

دامنه میزبانی

بررسی دامنه میزبانی جدایه‌ها با مایه‌زنی برروی ذرت (Zea mays)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) ، چاودار (*Secale cereale*)، سوروف(*Cockspur grass*) و جودره (*Hordeum spontaneum*) انجام گرفت. در این آزمایش، بذور هر یک از گیاهان در گلدان‌های با دهانه ۱۲ سانتی‌متر و ارتفاع۱۰سانتی متر همراه با خاک سترون کاشته شد. آزمون بیماری‌زایی گیاهان در مرحله ۲ برگی و با تزریق۱۵۰ میکرولیتر سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته هر یک از جدایه‌ها با غلظتCFU/ml $۱۰^{۷}$ × ۱ به ساقه هر یک از گیاهان انجام شد. همچنین به‌دلیل عدم وجود جدایه استاندارد از گونه *C. zhangzhiyongii* از جدایه‌های استاندارد *C. tssellarius* (CFBP 3496) و *C. michiganensis* (ICMP2550) به عنوان نماینده‌هایی از جنس *Clavibacter* استفاده شد. تمامی جدایه‌ها با سه تکرار مستقل مایه‌زنی شدند و نتایج به طور مستقل مشاهده و یادداشت شد. پس از گذشت ۱۰ روز، از برگ‌های دارای علائم نمونه‌برداری و جداسازی باکتری از آن‌ها انجام گرفت.

بررسی بذرزاد بودن بیمارگر

بذور سالم گندم، جو و یولاف به مدت دو ساعت در سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های منتخب با غلظت CFU/ml$۱۰^{۷}$ × ۱ قرار گرفتند. رطوبت بذور با استفاده از دستمال کاغذی سترون گرفته و درون گلدان‌هایی با دهانه ۱۲ سانتی متر و ارتفاع۱۰سانتی متر همراه با خاک سترون کاشته شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با رطوبت ۸۵ تا ۹۰ درصد و دمای مناسب نگه‌داری شدند. شرایط رشدی و تغییرات هر گیاه بصورت روزانه و به مدت ۱۴ الی ۲۰ روز ثبت و بررسی شد. در این آزمون برای هر جدایه در هر تکرار ۳ بذر سالم آغشته به سوسپانسیون در نظر گرفته شد و هر یک در گلدان‌های مستقل قرار گرفتند، این آزمون در دو تکرار مستقل صورت گرفت (Tian *et al.* 2021). به دلیل عدم دسترسی به جدایه استاندارد از گونه *C. zhangzhiyongii* در ایران از جدایه‌های استاندارد *C. tssellarius* (CFBP 3496) و *C. michiganensis* (ICMP2550) به عنوان نماینده‌هایی از جنس *Clavibacter* استفاده شد.

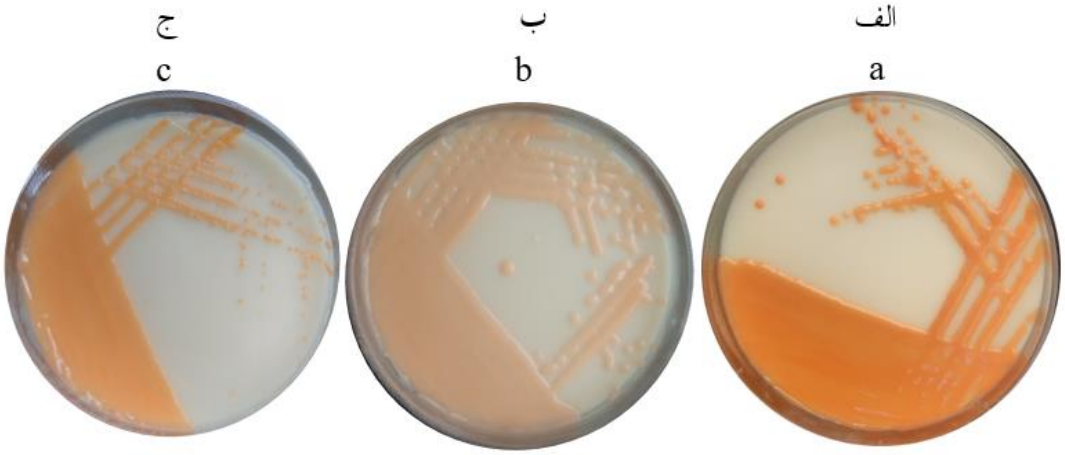
نتایج

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها

در غربال‌گری اولیه پس از تشخیص پرگنه‌های باکتری تمامی پرگنه‌های مشکوک برداشته و مجدد کشت داده شدند. در این مرحله پرگنه‌های با رنگ زرد، سفید، شیری، هلویی و نارنجی جدا شدند، اما توجه بیشتر به پرگنه‌های هلویی رنگ بود.

آزمون‌های بیوشیمیایی

از بین جدایه‌های به دست آمده، ۷۰ جدایه گرم مثبت بودند که از این بین ۲۵ جدایه دارای پرگنه هلویی رنگ بودند(شکل ۱). از میان این جدایه‌ها ۱۶ جدایه اکسیداز منفی بودند. ۱۵جدایه در واکنش‌های اوره‌آز، رشد بی‌هوازی رشد در محیط O/F، هیدرولیز توئین ۸۰، ژلاتین و کازئین منفی بودند. تمامی جدایه‌ها در آزمون‌های هیدرولیز کاتالاز، نشاسته و رشد در محیطTTC مثبت بودند. جدایه‌های مورد آزمایش قادر به رشد در غلظت‌های یک و سه درصد NaCl بودند، اما در غلظت پنج درصد NaCl توانایی رشد نداشتند (جدول۲) ، نتایج آزمون‌های فنوتیپی نشان داد تمام جدایه‌های بدست آمده در گروه *Corynebacterium* قرار می‌گیرند (Schaad *et al*. 2000).



شکل۱.جدایه های گرم مثبت با رنگ پرگنه هلویی بر روی محیط کشت YDC ; الف: جدایه Sh3003، ب: جدایه Sh2141 : ج: جدایه Sh3053

Fig1.Gram positive strains with peach colony in YDC medium; a: Strain 3003,b: Strain 2141,C:Strain Sh3053

بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگر اختصاصی

تمامی ۲۵ جدایه گرم مثبت هلویی رنگ به دست آمده از این پژوهش جهت شناسایی اولیه با استفاده از آغازگر اختصاصی CMR16F1/CMR16R1 مربوط به جنس *Clavibacter* مورد ارزیابی قرار گرفتند (Lee *et al*. 1997) که طی آن هر ۲۵ جدایه قطعه‌ای با اندازه ۱۴۲۵ bp را تکثیر کردند و تمامی این جدایه‌ها برای انجام توالی‌یابی با ژن‌های خانه‌داری آماده شدند (شکل۲).

شکل ۲. تکثیر و تشکیل باند در ناحیه ۱۴۲۵bp توسط برخی نمونه‌های منتخب با استفاده از جفت آغازگر تشخیصی CMR16F1/CMR16R1، سه باند اول مربوط به جدایه‌های گونه *C. zhangzhiyongii*، باند چهارم جدایه Sh2141 *Clavibacter* sp. دو باند آخر مربوط به جدایه های استاندارد *C. michiganensis* و *C. tessellarius*.

Fig 2. Amplification and band formation in region 1425 bP some selected samples using diagnostic primer pairs CMR16F1/CMR16R1. The three bands are related to *C. zhangzhiyongii* strains, the fourth band is Sh2141 *Clavibacter* sp. The last two bands correspond to the standard strains of *C. michiganensis* and *C. tessellarius.*

تحلیل توالی چند جایگاهی (MLSA)

برای بررسی فیلوژنی هر یک از جدایه‌ها ابتدا از آغازگر 2F و 6R که مربوط به ژن *gyr*B است استفاده شد، پس از انجام PCR با این آغازگر نمونه‌هایی که قادر به تکثیر این قطعه ژنی بودند جهت تعیین توالی ارسال شدند. پس از انجام توالی‌یابی با استفاده از این آغازگر و انجام بلاست با کمک پایگاه داده NCBI مشخص شد تنها ۱۵جدایه از ۲۵ جدایه مورد بررسی با درصد شباهت بیش از ۹۸ درصد در جنس *Clavibacter* قرارمی‌گیرند. به‌طوریکه ۶ جدایه با درصد شباهت۹۹/۲٪ تا ۱۰۰٪ و E value صفر مشابه گونه*Clavibacter tessellarius* (*Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* strain NCPPB366) بودند ، ۳ جدایه‌ی Sh2358، Sh2130 و Sh3003 به ترتیب با درصد شباهت ۹۹/۵۷٪، ۹۵/۶٪ و ۹۸/۵۸٪ و E-value صفر مشابه با جدایه *Clavibacter zhangzhiyongii* strain DM1 موجود در پایگاه داده NCBI بودند و از نظر میزان شباهت این جدایه‌ها با یکدیگر جدایه Sh2358 با جدایه Sh2130 ۱۰۰٪ شباهت و با جدایهSh3003 ۹۸/۶۹ ٪ شباهت داشت و جدایه Sh3003 و Sh2130 نیز ۱۰۰٪ شباهت به یکدیگر داشتند ، ۷ جدایه دیگر نیز با درصد شباهت بالا ۹۵٪ در سایر گونه‌های جنس *Clavibacter* قرار گرفتند. در مرحله بعد به منظور شناسایی دقیق‌تر جایگاه فیلوژنی جدایه‌های موجود در این مطالعه و مقایسه آن‌ها با گونه‌های *Clavibacter* موجود در پایگاه داده NCBI، تمام ۱۵ جدایه شناسایی شده به‌عنوان *Clavibacter* با استفاده آغازگز*atp*D2F و *atp*D2R مرتبط با ژن خانه‌داری *atp*D نیز بررسی و نمونه‌هایی که توانایی تکثیر قطعه‌ای با طول ۱۱۰۴ bp را دارا بودند تعیین توالی شدند. پس از انجام تعیین توالی با استفاده از نتایج توالی‌های این ژن خانه‌داری

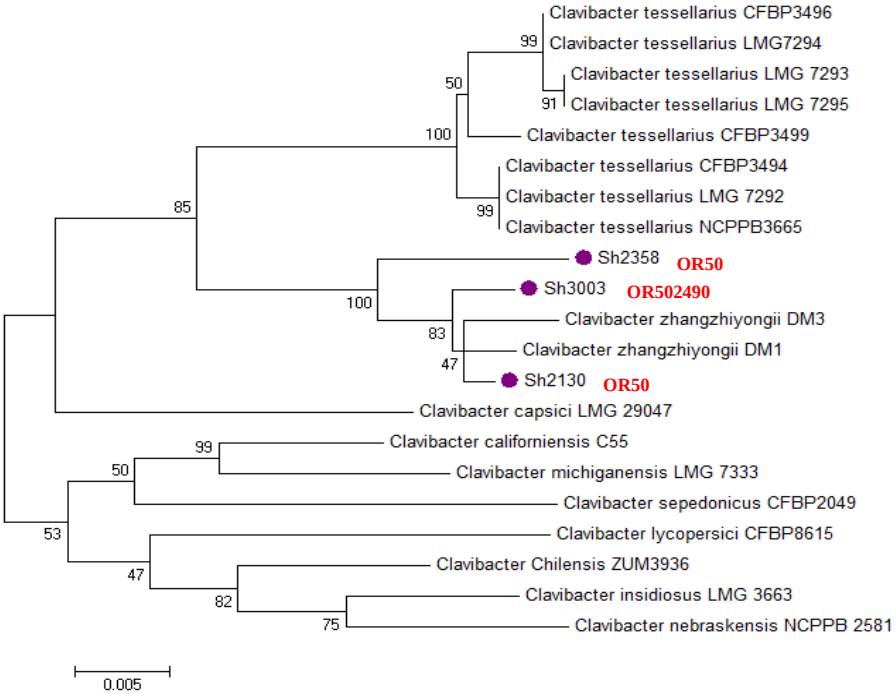
جستجویی که از طریق بلاست در پایگاه‌داده NCBI GenBank نیز انجام گرفت که این نتایج مشابه نتایج حاصل از بلاست ژن *gyr*B بود به‌طوریکه درصد شباهت برای سه جدایه‌ی نام برده شده به ترتیب ۹۹/۳۸٪، ۹۹/۱۸٪ و ۹۹/۱۸٪ با جدایه *Clavibacter zhangzhiyongii* strain DM3 موجود در پایگاه داده NCBI بود، همچنین جدایه Sh2358 با جدایه‌های Sh2130 و Sh3003 ۹۹/۳۸ ٪ شباهت داشت و جدایه Sh3003 و Sh2130 نیز ۹۹/۳۸٪ شباهت با یکدیگر داشتند. نتیجه حاصل تا به‌اینجا نشان از وجود سه جدایه از گونه *C. zhangzhiyongii* با درصد شباهت بیش از ۹۸ درصد به جدایه های موجود از این جنس در پایگاه داده NCBI از بین ۱۵ جدایه تعیین توالی شده داشت، این سه جدایه شامل جدایه های Sh2358 جداسازی شده از یولاف Sh3003، وSh2130 جداسازی شده از جو بودند که به ترتیب از استان‌های آذربایجان شرقی، گلستان و قزوین جداسازی شده بودند. در مرحله بعد جهت اطمینان از وجود این گونه، تعیین توالی با دو آغازگر *pp*KF و *pp*KR مربوط به ژن *pp*K (با طول قطعه ۶۰۴bp) و همچنین آغازگر *rec*AF و*rec*AR مربوط به ژن *rec*A (با طول قطعه ۷۲۴bp) نیز انجام گرفت (شکل۳) که نتیجه بلاست این دو ژن نیز نتایج حاصل از بلاست دو ژن *gyr*B و *atp*D را تایید کرد. به‌طوریکه درصد شباهت قطعه ژنی توالی‌یابی شده مربوط به آغازگر*pp*K با جدایه *Clavibacter zhangzhiyongii* strain DM1 موجود در پایگاه داده NCBI در جدایه‌های Sh2358، Sh2130 و Sh3003 به ترتیب۹۹/۴۲٪، ۹۹/۶۱٪ و ۹۹/۶۱٪ بود و همچنین جدایه Sh2358 دارای ۱۰۰٪ شباهت با جدایه های Sh2130 و Sh3003 و جدایه Sh3003 شباهت ۱۰۰٪ با جدایه Sh2130 داشت، در قطعه ژنی حاصل از توالی‌یابی با آغازگر *rec*A نیز سه جدایه Sh2358، Sh2130 وSh3003 به ترتیب ۹۱٪، ۹۹/۲۰٪ و ۹۹٪ با جدایه *Clavibacter zhangzhiyongii* strain DM1 موجود در پایگاه داده NCBI شباهت داشتند و جدایه Sh2358 با جدایه Sh2130 ۹۵/۹۵٪ شباهت و با جدایه Sh3003 ۹۶/۵۶٪ شباهت داشت ، دو جدایه Sh3003 و Sh2130 نیز ۹۸/۸۰٪ شباهت با یکدیگر داشتند ، در مرحله بعد با استفاده از توالی‌های ۴ ژن خانه‌داری در دسترس از ۳ جدایه مورد نظر و با کمک توالی‌های گونه‌های مختلف جنس *Clavibacter* موجود در پایگاه داده NCBI درخت فیلوژنی رسم شد. رسم درخت با کمک نرم افزارCLUSTAL W با روش حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) و با استفاده از مدل جوکس-کانتور (Jukes-Cantor) انجام شد (Jukes and Cantor 1969). نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنی نشان از قرارگیری هر سه جدایه مورد نظر در یک خوشه کنار یکدیگر و همراه با ۲ جدایه *C. zhangzhiyongii* موجود در پایگاه داده NCBI داشت. در این بررسی دو جدایه Sh3003 و Sh2358 ۱۰۰٪ مشابه یکدیگر و دارای ۸۳ ٪شباهت به جدایه *C. zhangzhiyongii* DM1 موجود در پایگاه داده NCBI بودند اما جدایه Sh2130 با درصد شباهت کمتر (۴۷٪) در کنار جدایه *C. zhangzhiyongii* DM1 درهمان خوشه قرار گرفت و هر سه جدایه به صورت کاملا مستقل از سایر گونه‌های جنس *Clavibacter* قرار گرفتند (شکل۴).

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی برای سه جدایه *C. zhangzhiyongii* مورد مطالعه (Sh2130، Sh2358 و Sh3003) برروی برخی اعضای خانواده گندمیان شامل گندم (*Triticum aestivum*)، جو (*Hordeum vulgare*) و یولاف (*Avena sativa*) انجام گرفت. آزمون بیماری‌زایی به دو روش مختلف انجام شد، روش تزریق به ساقه علائم را شدید و وسیع‌تر از روش پاشش باکتری نشان داد. در روش

شکل۳.تکثیر و تشکیل قطعات مربوط به آغازگرهای ژن‌های خانه‌داری، باندهایی با طول۶۰۴bp مربوط به آغـازگر ***pp*k**، بانـدهایی بـا طـول ۷۲۴bp مربوط به آغازگر ***rec*A**، باندهایی با طول۹۷۷ bp مربوط به آغازگر***gyr*b** و باندهایی با طول ۱۱۰۴bp مربوط به آغازگر***atp*D** است.

Fig3. Amplification and formation of the fragments related to housekeeping gene primers, bands with a length of 604 bp are related to the *pp*k primer, bands with a length of 724 bp are related to the *rec*A primer, bands with a length of 977 bp are related to the *gyr*b primer, and bands with a length of 1104 bp are related to the *atp*D primer.



شکل۴. موقعیت جدایه‌های***C. zhangzhiyongii*** در درخت فیلوژنی با استفاده از از ۴ژن ***atpD***، ***pp*K**، ***rec*A** و ***gyrB*** بر اساس نـرم افزار **Mega6.0** با روش **Maximum Likelihood** و سنجش اعتبار به روش **Bootstrap1000**(راس شمار مربوط به ژن ***gyr*B** بـه رنگ قرمز کنار هر جدایه مشخص شده است)

Fig4. The position of *C. zhangzhiyongii* isolates in the phylogeny tree using *atpD pp*K ,*rec*A and *gyrB* genes base on Mega6.0 software with the Maximum Likelihood method and validity measurement using method Bootstrap 1000 (The accession number corresponding to the *gyr*B gene is marked in red next to each strain)

تزریق به ساقه ایجاد لکه‌های قهوه‌ای در یک سوم بالایی برگ، همچنین زردی و سرخشکیدگی برگ به طور کامل مشاهده شد اما در روش پاشش فقط لکه‌های قهوه‌ای و آبسوخته به صورت محدود در سطح برگ مشاهده شد و زردی نوک برگ در هیچ یک از از گیاهان مشاهده نشد. به طور کلی علائم ایجاد شده توسط سه جدایه‌یSh2130، Sh2358 و Sh3003 بر روی جو ،یولاف و گندم در روش تزریق به ساقه علائمی مشابه با علائم مرتبط با *C. zhangzhiyongii* بود، به‌طوریکه گیاهان مدت کوتاهی پس از مایه‌زنی دچار زردی و زوال شدند و لکه‌های ریز قهوه‌ای رنگ بر روی آن‌ها ایجاد شد. پس از گذشت ۱۰روز از ایجاد علائم، نمونه‌برداری از گیاهان دارای علائم در گلخانه نیز انجام گرفت. پس از انجام جداسازی، پرگنه‌های مشابه با پرگنه‌های جدایه‌های مورد نظر در این پژوهش جداسازی شد و جهت اطمینان شنایی مجدد به روش مولکولی و تزریق مجدد به گیاه انجام گرفت و مشاهده مجدد علائم دال بر بیماری‌زا بودن جدایه‌های مورد نظر بود(شکل۴).

شکل۴. علائم بیماری *C. zhangzhiyongii* بر روی گیاهان جو (رقم ریحان) و گندم (رقم آزادی) پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در گلخانه با دما ۲۷ درجه سیلسیوس ، الف: زردی و زوال برگ جو(جدایهSh3003**)، ب: لکه‌های قهوه‌ای و زردی قسمت‌های بالایی برگ جو (جدایه**Sh2130**)،ج: زردی زودرس برگ گندم (جدایه**Sh2358**)،چ: زردی و زوال قسمت‌های بالایی برگ گندم (جدایه **Sh3003**)،ح: شاهد (جدایه استاندارد گونه ***C. michiganensis***).**

Fig4. The symptoms of *C. zhangzhiyongii* disease on barley and wheat plants after inoculation of isolates in the greenhouse with relative humidity of 90% and temperature of 27°C, a: yellowing and decay of barley leaves (isolate Sh3003), b: brown spots and yellowing of the parts upper part of barley leaf (strain Sh2130), c: premature yellowing of wheat leaf (strain Sh2358),d: yellowing and deterioration of upper parts of wheat leaf (strain Sh3003); e: Negative control (Type strain *C. michiganensis* species).

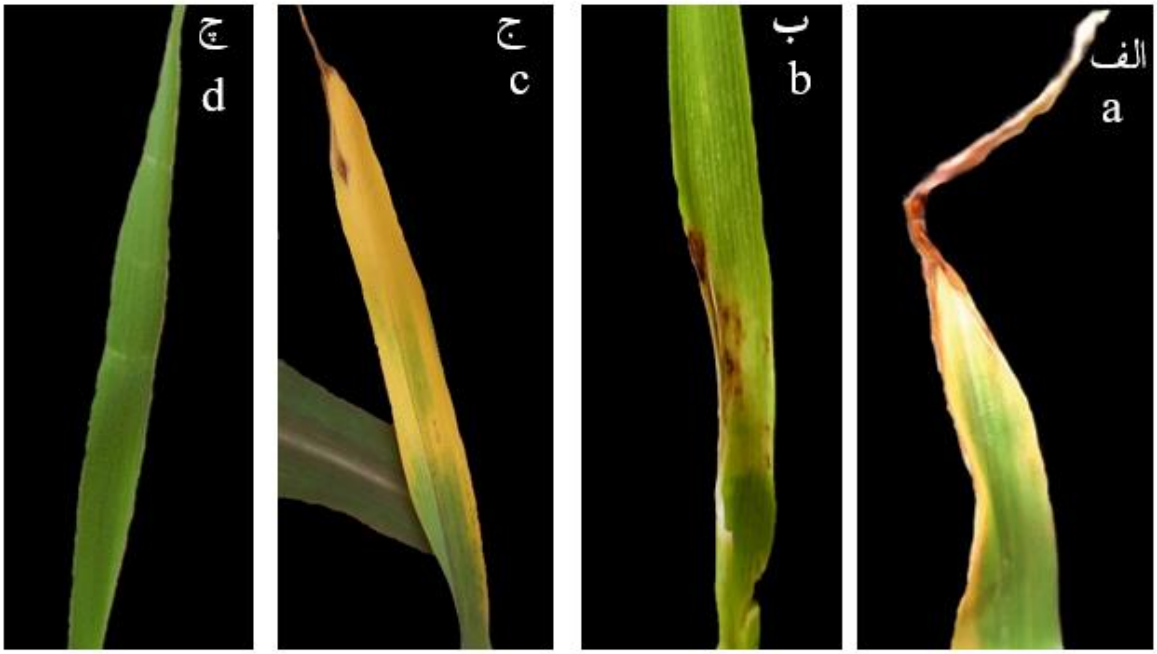
جدول۲. مشخصات و برخی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های گرم مثبت هلویی رنگ در این پژوهش.

Table2. characteristics and some phenotypic characteristics of gram-positive isolates of peach color in this study.

خواستگاه					آزمون‌های فنوتیپی			
نام جدایه	میزبان	استان	شهر	سال	گونه	اکسیداز	کاتالاز	اوره‌آز	رشد در محیط TTC
Sh2113	گندم	زنجان	زنجان	۱۴۰۰	*C. tessellarius*	-	+	+	+
Sh2121	گندم	قزوین	قزوین	۱۴۰۰	*C. tessellarius*	-	+	+	+
Sh2122	گندم	قزوین	قزوین	۱۴۰۰	*C. tessellarius*	-	+	+	+
Sh3031	جو	ایلام	ایوان	۱۴۰۱	*C. tessellarius*	–	+	–	+
Sh3086	گندم	زنجان	زنجان	۱۴۰۱	*C. tessellarius*	+	+	+	+
Sh3075	گندم	فارس	باجگاه	۱۴۰۱	*C. tessellarius*	+	+	+	+
Sh2130	جو	قزوین	کمال آباد	۱۴۰۰	*C. zhangzhiyongii*	+	+	+	+
Sh2358	یولاف	آذربایجان شرقی	مرند	۱۴۰۰	*C. zhangzhiyongii*	+	+	+	+
Sh3003	جو	گلستان	گنبد کاووس	۱۴۰۱	*C. zhangzhiyongii*	+	+	+	+
Sh2141	گندم	البرز	کرج	۱۴۰۰	*Clavibacter* SP.	+	+	–	+
Sh3038	گندم	فارس	باجگاه	۱۴۰۱	*Clavibacter* SP.	+	+	–	+
Sh2088	گندم	آذربایجان شرقی	مرند	۱۴۰۰	*Clavibacter* SP.	+	+	–	+
Sh3027	گندم	فارس	اقلید	۱۴۰۱	*Clavibacter* SP.	–	+	–	+
Sh2036	یولاف	فارس	باجگاه	۱۴۰۰	*Clavibacter* SP.	–	+	+	+
Sh2126	یولاف	زنجان	زنجان	۱۴۰۰	*Clavibacter* SP.	–	+	+	+
Sh3058	گندم	زنجان	زنجان	۱۴۰۱	*Curtobacterium* SP.	–	+	–	+
Sh3068	گندم	قزوین	تاکستان	۱۴۰۱	*Curtobacterium* SP.	+	+	+	+
Sh3078	گندم	قزوین	تاکستان	۱۴۰۱	*Curtobacterium* SP.	–	+	+	+
Sh3082	گندم	قزوین	تاکستان	۱۴۰۱	*Curtobacterium* SP.	–	+	–	+
Sh2108	گندم	قزوین	آبیک	۱۴۰۰	*Curtobacterium* SP.	–	+	–	+
Sh2306	یولاف	بوشهر	عسلویه	۱۴۰۰	*Curtobacterium* SP.	–	+	–	+
Sh2023	گندم	فارس	باجگاه	۱۴۰۰	*Curtobacterium* SP.	–	+	+	+
Sh3053	گندم	گلستان	گنبد کاووس	۱۴۰۱	*Curtobacterium* SP.	–	+	–	+
Sh3066	گندم	فارس	اقلید	۱۴۰۱	*Curtobacterium* SP.	–	+	–	+
Sh3072	گندم	فارس	آباده	۱۴۰۱	*Curtobacterium* SP.	–	+	–	+

دامنه میزبانی

دامنه میزبانی برروی ذرت (*Zea mays*)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) ، چاودار (*Secale cereale*)، سوروف (*Cockspur gras*) و جودره (*Hordeum spontaneum*) به منظور بررسی تعیین دامنه میزبانی انجام گرفت. هیچ یک از جدایه‌ها بر روی سوروف، چاودار و سورگوم علائم اصلی مرتبط با بیمارگر *C. zhangzhiyongii* شامل سرخشکیدگی و زوال به همراه لکه‌های قهوه‌ای را ایجاد نکردند اما بر روی ذرت و جودره علائم خفیفی نظیر زردی و خشکیدگی حاشیه برگ و لکه‌های قهوه‌ای پراکنده ایجاد شد(شکل۵).



شکل۵. علائم بیماری بر روی سایر گیاهان خانواده گندمیان; الف: خشکیدگی حاشیه و نوک برگ توسط جدایه Sh3003(ذرت)، ب: ایجاد لکه قهوه ای در حاشیه برگ توسط جدایه Sh3003(جودره)،ج: زردی حاشیه و نوک برگ توسط جدایه Sh2130 (ذرت)،چ: شاهد جدایه استاندارد گونه *C. michiganensis* (جودره).

Figure 5. Disease symptoms on other host in Poaceae family; a: Dryness and decline of leaf margin and tip by strain Sh3003 (Zea maize),b: Formation of brown spots on leaf margin of strain Sh3003 (Hordeum spontaneum), c: yellowing of leaf margin and tip by strain Sh2130 (Zea maize), d: Negative control *C. michiganensis* species (Hordeum spontaneum).

بررسی بذرزاد بودن بیمارگرها

طبق آزمون صورت گرفته در این پژوهش جهت بررسی بذرزاد بودن جدایه‌های موجود، پس آلوده‌سازی بذور توسط سوسپانسیون باکتریایی هیچ گونه تغییری در روند رشد گیاهان حاصل نشد و گیاهان گندم، جو و یولاف هیچ گونه علائمی در ۱۴ الی ۲۰ روز پس از کاشت نیز از خود نشان ندادند، این امر را می‌توان دال بر عدم توانایی جدایه‌های *Clavibacter* موجود در این پژوهش در آلوده‌سازی بذر دانست که این موضوع با داده‌های حاصل از پژوهش Tian و همکاران در سال ۲۰۲۱ همخوانی نداشت (Tian *et al*. 2021).

دسترسی داده‌ها

توالی‌های نوکلئوتیدی سه جدایه *C. zhangzhiyongii* در پایگاه داده GenBank با راس شمارهای زیر به ترتیب برای جدایه Sh2130 برای هر یک از ژن‌های *atp*D، *pp*K، *gyr*B و *rec*A به ترتیب شامل OR502456، OR502471، OR502487 و OR502502 است، در جدایه Sh2358 برای هر یک از ژن‌های *atp*D، *pp*K، *gyr*B و *rec*A به ترتیب شامل OR502458، OR502473،OR502489 و OR502504 است و برای جدایه Sh3003 برای هر یک از ژن‌های *atp*D، *pp*K، *gyr*B و *rec*A به ترتیب شامل OR502459، OR502474، OR502490 و OR502505

است.

بحث

هدف از انجام این پژوهش در ابتدا بررسی جمعیت باکتری‌های گرم مثبت موجود در خانواده گندمیان بود، پس از نمونه‌برداری‌های متوالی طی سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ از نواحی شمال، غرب، جنوب غربی و جنوب کشور تعداد ۷۰ جدایه گرم مثبت به دست آمد که از این بین ۵۰ جدایه دارای رنگدانه‌های زرد و یا گلبهی بودند، از این تعداد ۲۵ جدایه از نظر رنگ و شکل پرگنه مشابه باکتری‌های گونه *C. tessellarius* بودند که ادامه این پژوهش برروی این ۲۵ جدایه انجام گرفت، پس از جمع‌آوری و نامگذاری جدایه‌های گرم مثبت، شناسایی اولیه آن‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CMR16F1/CMR16R1 انجام شد. جدایه‌هایی که توانایی تکثیر باند اختصاصی را داشته غربال و برای توالی‌یابی با ژن خانه‌داری*gyr*B آماده شدند. نتایج توالی‌یابی یافته‌های جدیدی را مشخص کرد، از ۲۵ جدایه‌ی منتخب تنها ۱۵ جدایه متعلق به جنس *Clavibacter* و مابقی مربوط به جنس *Curtobacterium* بودند که این امر نشان از این داشت که آغازگر اختصاصی CMR16F1/CMR16R1 به طور کامل توانایی تفکیک جنس‌های *Clavibacter* و *Curtobacterium* را از یکدیگر دارا نمی‌باشد. از بین ۱۵ جدایه جنس *Clavibacter* جهت تفکیک کامل گونه‌های این جنس از ۳ ژن خانه‌داری دیگر *atp*D، *pp*K و *rec*A استفاده شد، پس از رسم درخت فیلوژنی مشخص شد ۳ جدایه از جدایه‌های موجود در این پژوهش درون یک خوشه همراه با جدایه استاندارد *C. zhangzhiyongii* قرار گرفتند. نتایج حاصل از انجام بلاست در پایگاه دادهNCBI نیز شباهت بیشتر از ۹۰ درصد بین این جدایه‌ها را تایید کرد. با توجه به دقت بالای روش MLSA در تفکیک گونه‌های جنس *Clavibacter* از یکدیگر می‌توان به طور قطعی از وجود گونه *C. zhangzhiyongii* در بین جدایه‌های موجود در این پژوهش سخن گفت. نکته قابل تامل جداسازی این جدایه‌ها از مزارع مربوط به مناطق جغرافیایی نیمه شمالی کشور (شمال و شمال غرب) است که این امر فرضیه ورود این بیمارگر از شمال کشور را مطرح می‌کند زیرا در این پژوهش هیچ جدایه‌ای از این گونه‌ی باکتریایی در استان‌هایی نظیر فارس که طی مدت این پژوهش نمونه‌برداری به صورت وسیع انجام گرفته بود یافت نشد. توانایی بیماری‌زایی هر سه جدایه‌ی Sh2130، Sh2358 وSh3003 بر روی سه گیاه گندم، جو و یولاف نکته قابل توجهی است، علاوه بر این جداسازی جدایه‌یSh2358 از یولاف به احتمال بسیار قوی به دلیل هم جواری جو و یولاف در یک مزرعه در کنار یکدیگر و انتقال باکتری از میزبان اصلی(جو) به گیاه همراه (یولاف) بوده است که بیمارگر بودن این جدایه روی هر دو میزبان این فرضیه را تا حدود زیادی قطعیت می‌بخشد. همچنین تعداد کم جدایه‌های *C. zhangzhiyongii* به دست آمده در این پژوهش و مشاهدات حاصل از بررسی بذرزاد بودن این بیمارگر که نشان از عدم توانایی این جدایه‌ها در آلوده سازی بذر را داشت، فرضیه بذرزاد بودن این بیمارگر را تا حدود زیادی کاهش می‌دهد زیرا در صورتی‌که این بیمارگر توانایی آلودگی بذر را دارا بود می‌بایست تا کنون به صورت گسترده شاهد حضور این بیمارگر در مناطق گزارش شده در این پژوهش باشیم ،اما به طور کلی با توجه به مغایرت نتایج حاصل از بذرزاد بودن این بیمارگر با مقاله Tian و همکاران (۲۰۲۱) در زمینه توانایی آلوده‌سازی بذر توسط این باکتری تابه امروز نمی‌توان با اطمینان سخن گفت، اما در صورت وجود احتمال بذرزاد بودن این بیمارگر عدم کنترل آلودگی ناشی از آن طی سالیان آینده علاوه بر خطر اپیدمی شدن این بیماری احتمال عقیم شدن سنبله‌ها در شرایط مساعد را افزایش

می‌دهد (Duveiller *et al*. 1997; Khojasteh *et al*. 2019).

نتیجه‌گیری حاصل از این تحقیق نشان دهنده ظهور باکتری *C. zhangzhiyongii* در برخی نقاط نیمه شمالی کشور است، جدایه‌های به دست آمده از این پژوهش توانایی آلوده‌سازی برخی اعضای خانواده گندمیان نظیر گندم ، جو و همچنین علف هرز یولاف را دارا می‌باشند که این یافته نشان دهنده توانایی این عامل باکتریایی در بیماری‌زایی بر روی سایر میزبان‌های نزدیک به میزبان اصلی خود است. همچنین این امر موجب درک گسترده‌تری در زمینه بررسی بیماری‌زایی و تنوع جمعیت این بیمارگر بر روی سایر میزبان‌های گیاهی از جمله گیاهان همراه با خانواده گندمیان شده است.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام میدارند که در رابطه با تهیه و انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده و منافع تجاری در این راستا وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) با شماره طرح: ۴۰۲۱۳۷۳ به دلیل حمایت مالی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

References

Ansari, M., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., Valenzuela, M., Siri, M. I., & Osdaghi, E. 2019. Multiple introductions of tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Iran as revealed by a global-scale phylogeographic analysis. Applied and Environmental Microbiology 85:e02098-19. doi.10.1128/AEM.02098-19.

Chang, R. J., Ries, S. M., Hewings, A. D., & D'Arcy, C. J. 1990. Bacterial mosaic of wheat in Illinois. Plant Disease 74. Doi.10.1094/PD-74-1037E.

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, DR., et al .2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 68:461–466. Doi. 10.1099/ijsem.0.002516.

Davis, M. J., Gillaspie Jr, A. G., Vidaver, A. K., & 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 and evolutionary microbiology 34:107-117. doi. 10.1099/00207713-34-2-107.

Davidson, R. M., Gowda, M., Moghe, G., Lin, H., Vaillancourt, B., Shiu, S. H., ... & Robin Buell, C. 2012. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. The Plant Journal 71: 492-502. Doi. 10.1111/j.1365-313X.2012.05005.x.

Duveiller, E. 1997. The bacterial diseases of wheat*:* concepts and methods of disease management. CIMMYT.

EPPO.2011. 2nd Meeting of the Panel on Diagnostics and Quality Assurance .https://www.eppo.int/MEETINGS/2011_meetings/p_quality_assurance.

Evtushenko, L. I., & Takeuchi, M. 2006. The family *microbacteriaceae*. The prokaryotes 3: 1020-1098. Doi. 10.1007/0-387-30743-5_43.

FAOSTAT.2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database, available at http://faostat.fao.org/.

Guimaraes, P. M., Palmano, S., Smith, J. J., Grossi de Sá, M. F., Grossi de Sá, & Saddler, G. S. 2001. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.

flaccumfaciens. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology 80:1-10. Doi. 10.1023/A:1012077425747.

Jacques, M. A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., ... & 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. Doi.10.1128/AEM.02158-12.

Jukes, T. H., & Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (Ed.), Mammalian protein metabolism (pp. 21-132). New York: Academic Press.

Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., & Stackebrandt, E. R. K. O. 2006. Introduction to the *Proteobacteria*. *The prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, Springer 3-37.

Khojasteh, M., Taghavi, S. M., Khodaygan, P., Hamzehzarghani, H., Chen, G., Bragard, C., ... & Osdaghi, E. 2019. Molecular typing reveals high genetic diversity of *Xanthomonas translucens* strains infecting small-grain cereals in Iran. Applied and Environmental Microbiology 85:01518-19. Doi.10.1128/AEM.01518-19.

Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. nternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:346–351. Doi.10.1099/ijs.0.059774-0.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., … Higgins, D. G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 23: 2947-2948. Doi.10.1093/bioinformatics/btm404.

Lee, I. M., Bartoszyk, I. M., Gundersen, D. E., Mogen, B., & Davis, R. E. 1997. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Applied and Environmental Microbiology 6: 2625-2630. Doi.10.1128/aem.63.7.2625-2630.1997.

Nasiri, M., Faghihi, M. M., Rahimian, H., & Osdaghi, E.2024. *Clavibacter tessellarius* causing bacterial mosaic of wheat establishes in the Old World. Plant Pathology. doi. 10.1111/ppa.13893.

Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Hamidizade, M., Fazliarab, A., Hajian Maleki, H., Li, X., ... & Portier, P. 2023. *Clavibacter lycopersici* sp. nov.: a peach-colored actinobacterium isolated from symptomless tomato plant. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 7:006022. doi.org/10.1099/ijsem.0.006022.

Park, S. K., & Kyung, K. H. 1986. Pigment-forming bacteria in the presence of L-typrosine and their possible role in the browning of fermented soybean products. Korean Journal of Food Science and Technology 18: 376-381.

Park, Y. H., Yoon, J. H., Shin, Y. K., Suzuki, K. I., Kudo, T., Seino, A., ... & Lee, S. T. 1999. Classification of 'Nocardioides fulvus' IFO 14399 and Nocardioides sp. ATCC 39419 in Kribbella gen. nov., as Kribbella flavida sp. nov. and Kribbella sandramycini sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 49:743-752. doi. 10.1099/00207713-49-2-743.

Renvoize, S. A., & Clayton, W. D. 1992. Classification and evolution of the grasses. Grass evolution and domestication 3-37.

Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., Peplies .2016. a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. Bioinformatics 32:929–931. Doi:10.1093/bioinformatics/btv681.

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. Journal of microbiological methods, 60:115-123. Doi:10.1016/j.mimet.2004.09.004.

Richert, K., Brambilla, E., & 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. doi.10.1016/j.syapm.2006.04.001.

Rodríguez-Rubio, L., Gutiérrez, D., Donovan, D. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. 2016. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. Critical reviews in biotechnology 363: 542-552. Doi. 10.3109/07388551.2014.993587.

Schaad . N. W., Jones . J. B., Chun. W. 2000. A boratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3th ed.,USA. 373 p. Doi.10.1093/bioinformatics/btv681.

Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int J Syst Bacteriol 47 : 479–491. Doi . 10.1099/00207713-47-2-479.

Tegli, S., Sereni, A., & Surico, G. 2002. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. Letters in Applied Microbiology 35 : 331-337. Doi.10.1046/j.1472-765X.2002.01187.x.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6. 0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729. Doi.10.1093/molbev/mst197.

Tian, Q., Chuan, J., Sun, X., Zhou, A., Wang, L., Zou, J., ... & Li, X. 2021. Description of *Clavibacter zhangzhiyongii* sp. nov., a phytopathogenic actinobacterium isolated from barley seeds, causing leaf brown spot and decline. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71. Doi: 10.1099/ijsem.0.004786.

Vasilenko, O. V., Starodumova, I. P., Dorofeeva, L. V., Tarlachkov, S. V., Prisyazhnaya, N. V., Chizhov, V. N., Nedler.S. N., Evtushenko, L. I. 2018. Draft genome sequences of new isolates and the known species of the family *Microbacteriaceae* associated with plants. Microbiology Resource Announcements 7: e01051-18. Doi.10.1128/mra.01051-18.

Li, X., Tambong, J., Yuan, K., Chen, W., Xu, H., Lévesque, C. A., & 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. Doi. 10.1099/ijsem.0.002492.