بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۳/ سال ۱۴۰۲: ۲۶۴-۲۵۲ DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021787.443

CC BY

مقاله پژوهشی

اولین گزارش باکتری *Pantoea dispersa* در ایران

حسنا الوندی[۱] و سید محسن تقوی[۲*]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۳۱)

چکیده

ذرت با نام علمی ***Zea mays*** از دسته‌ی غلات و خانواده‌ی بزرگ گندمیان، سومین محصول زراعی از نظر سطح زیر کشت بعد از گندم و برنج در دنیا است. این پژوهش با هدف بررسی ردیابی و شناسایی باکتری بیمارگر ***Pantoea dispersa*** در ایران با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و همچنین بررسی دامنه میزبانی این باکتری در کشور انجام گرفت. به این منظور در دو سال متوالی نمونه‌برداری از مزارع ذرت استان‌های مختلف ایران که دارای علائمی نظیر لکه‌برگی و پژمردگی بودند، صورت گرفت. جداسازی باکتری‌های همراه با علائم ذکر شده، به روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی و شناسایی جدایه ها با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی و آغازگرهای مربوط به ژن‌های خانه‌داری انجام گرفت. در بررسی بیماری‌زایی و دامنه میزبانی ۲۰ جدایه باکتری بدست آمده، شش جدایه به عنوان ***P. dispersa*** شناسایی شد. ارزن و سورگوم به عنوان میزبان‌های جدید این گونه در ایران معرفی می‌شوند.

واژگان کلیدی: پژمردگی، بذر زاد، ذرت، قرنطینه، ژن‌های خانه‌داری

---

* بخشی از رساله دکتری نویسنده اول، 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

DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021787.443

Research Article
First report of Pantoea dispersa in Iran

H. Alvandi[1] and S. M. Taghavi[*1]

(Received: 02.03.2024; Accepted: 21.08.2024)

Abstract

Corn (*Zea mays*) is from the cereal category and the large wheat family; it is the third crop after wheat and rice cultivated areas worldwide. This research aims to investigate the detection and identification of the pathogenic bacterium *Pantoea dispersa* in Iran using biochemical and molecular identification methods and the host range of this bacterial species. For this purpose, in two consecutive years, sampling was done from the corn fields of different provinces of Iran, which have symptoms such as leaf spots and wilting. Standard plant bacteriology methods were used to isolate bacteria with the mentioned symptoms, and isolates were identified using biochemical characteristics and primers related to housekeeping genes. In the investigation of pathogenicity and host range of 20 bacterial isolates obtained from different corn fields, six isolates were identified as *P. dispersa*. This is the first report of the presence of the bacterium in Iran. In examining the host range of the mentioned isolates millet and sourghum are introduced as new hosts of this species in Iran.

Key words: Wilting, Seed born, Corn, Quarantine, Housekeeping genes

[*] A part of Ph.D. thesis of the first author, 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

ذرت (*Zea mays*) از دسته‌ی غلات و خانواده‌ی بزرگ گندمیان، سومین محصول زراعی مورد کشت بعد از گندم و برنج است. طبق آمار سازمان خواربار و کشاورزی (FAO) در سال ۲۰۲۰ میزان تولید ذرت در دنیا ۱۱۶۲ میلیون تن بوده است، که سهم ایران از آن حدود ۱/۴ میلیون تن است (FAOSTAT, 2022). طیف وسیعی از آفات و بیمارگرهای مختلف اعم از باکتری، قارچ و ویروس ذرت را مورد حمله قرار می‌دهند (Sulong *et al*., 2019). در فهرست آفات و بیمارهای قرنطینه خارجی منتشر شده از طرف سازمان حفظ نباتات کشور در سال،۱۳۹۷ ثبت گزارشی از حضورباکتری *Pantoea dispersa* به عنوان عامل پژمردگی و لکه‌برگی ذرت در ایران وجود ندارد(PPO, 2018). با این وجود در سال‌های اخیر نمونه‌هایی از مزارع ذرت استان‌های مختلف ایران جمع‌آوری و بررسی گردیده است که نتایج این بررسی‌ها حضور زیرگونه *P. stewartii* subsp. *indologene* (Psi) را در ایران نشان می‌دهد (میرزائی نجفقلی و همکاران، ۱۳۹۳). باکتری *P. dispersa* متعلق به خانواده *Erwiniaceae* و راسته *Enterobacteriales* می‌باشد که اعضای آن یک گروه بزرگ و متنوع از باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور می‌باشند که در رده گاماپروتئوباکتریا قرار دارند. اعضای این راسته توانایی زیست در محیط‌های مختلف آب، خاک و همراه با موجودات زنده از جمله انسان، جانوران، حشرات و گیاهان را دارند (Adeolu *et al*., 2016). در سال‌های اخیر گزارش‌هایی از این بیمارگر در مالزی و در هند به‌عنوان عامل لکه برگی روی برنج منتشر شد(Jena *et al*., 2023; Toh *et al*., 2019). همچنین در چین این باکتری به عنوان عامل لکه قهوه‌ای قارچ آبشاری به نام *Flammulina filiformis* و در تایوان نیز به عنوان عامل پوسیدگی غده پیاز معرفی شد(Chang *et al*., 2018; Hu *et al*., 2022). در تحقیقی که سال ۲۰۱۹ در هند در مزارع پنبه انجام شد، مشخص گردید عامل اصلی پوسیدگی داخلی غوزه پنبه در هند نیز باکتری *P. dispersa* می‌باشد (Nagrale *et al*., 2020). این باکتری همچنین به عنوان عامل پوسیدگی نرم جوانه گیاه *Agave angustifolia* که بومی آمریکای مرکزی و مکزیک است گزارش شده است(Palemón-Alberto *et al*., 2021). تحقیقات انجام شده بر روی بیماری سوختگی گیاهچه برنج ناشی از باکتری *Burkholderia glumae* نشان داد که باکتری *P. dispersa* توانایی سرکوب بیمارگر و کاهش علائم این بیماری را دارد (Kouzai & Akimoto-Tomiyama, 2024). از طرفی *P. dispersa* توانایی سم‌زدایی آلبسیدین تولید شده توسط باکتری *Xanthomonas albilineans* عامل سوختگی برگ نیشکر و همچنین اسیدی کردن محیط برای ایجاد رقابت بین خود و باکتری*X. albilineans* دارد (Zhang & Birch, 1997). همچنین از این باکتری به صورت تجاری برای کنترل بیماری قارچی پژمردگی فوزاریومی نخود استفاده شده است (Yang *et al*., 2022). بنابراین از این باکتری می‌توان در کنترل زیستی بعضی از بیمارگرها استفاده کرد

در حال حاضر گزارشی از بیماری‌زا بودن باکتری *P. dispersa* روی ذرت وجود ندارد. هدف اصلی این پژوهش بررسی وجود این گونه باکتری در کشور با استفاده از روش‌های شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی و همچنین بررسی دامنه میزبانی این گونه باکتریایی در کشور است.

مواد و روش‌ها

بررسی، نمونه‌برداری و جداسازی باکتری

طی سال‌های ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۱ نمونه‌برداری از مزارع ذرت‌های دارای علائم پژمردگی و برگ‌های دارای نوارهای زرد رنگ در پایان فصل بهار، فصل تابستان و اوایل فصل پاییز از برخی استان‌های ایران نظیر بوشهر، چهار محال و بختیاری، خراسان رضوی، خوزستان، سیستان و بلوچستان، فارس، کرمانشاه، کهگیلویه و

بویراحمد، هرمزگان، همدان، و مرکزی (بر اساس شرایط آب و هوایی هر منطقه) انجام گرفت و گیاهان دارای علائم بیماری‌های باکتریایی روی برگ و ساقه جمع‌آوری شدند و به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه شیراز، بخش گیاهپزشکی منتقل شدند. برگ وساقه بوته‌های ذرت با یک چاقوی جراحی سترون در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون خرد شدند. دو لوپ سوسپانسیون حاصل روی یک محیط کشت شامل پپتون، گلوکز، مخمر و آگار (YPGA) کشت داده شد (EPPO, 2018). تشتک‌ها در دمای۲۷– ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲–۴۸ ساعت نگه‌داری شد. پرگنه‌هایی با اندازه کوچک و با رنگ‌دانه زرد پررنگ و لعابی جداشده و بر روی محیط کشت YPGA دیگری مجدد کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت جدایه‌های باکتریایی خالص، در آب مقطر سترون حل و در ۴ درجه سلسیوس برای مطالعه‌های بیشتر نگه‌داری شد. برای نگه‌داری طولانی مدت، جدایه‌ها در ۵۰ درصد گلیسرول و ۵۰ درصد آب مقطر سترون در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی جدایه‌ها

همه جدایه‌ها برای واکنش گرم، آزمون کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، آزمون اکسیداتیو–تخمیر(O/F) ، هیدرولیز توین ۸۰، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، کشت روی محیط YDC و تولید اسید از قندهایی نظیر فروکتوز، ساکارز، لاکتوز، مالتوزو و مانیتول مورد آزمایش قرار گرفتند(EPPO, 2018). آزمون‌های بیوشیمیایی برای اطمینان دو بار تکرار شد. استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از روش جوشاندن و یا روش CTAB انجام شد(Minas *et al*., 2011; Schaad *et al*., 2001). از یک جفت آغازگر مربوط به ژن خانه‌داری *rpoB* (جدول ۱) برای شناسایی اولیه جدایه‌های باکتریایی موجود استفاده شد. برای واکنش‌های 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 آزمون PCR هر جدایه از یک واکنش 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 سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه است. گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول‌ها تکثیرشده از طریق الکتروفورز و با استفاده از ژل آگاروز یک درصد در ۸۰V / cm بافر تریس برات EDTA (TBE) رنگ‌آمیزی شده با محلول یک درصد اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی براساس اندازه محصول بدست آمده توسط آغازگر اختصاصی و همچنین براساس تعیین توالی قطعه تکثیر شده انجام شد.

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش.

Table1. primers used in this research.

Prime name	5´- 3´ sequence	Size of amplicon bp	Ann. Temp.	Target species/region	Reference
rpoBCM7-F	CCCAGCGAGCGAATCTCTTTCAACAG	1580	58	*rpo*B *Pantoea* spp.	This study
rpoBCM31b-R	AACGGTTACAACTTCGAAGACTCCAT				
PantgyrB-F	ATGTCGAATTCTTATGACTC	1492	57	*gyr*B *Pantoea* spp.	This study
PantgyrB-R	CGGTCATGATGATGATGCTGTG				
PantatpD-F	GATTGTCCAGATTATCGGCG	1383	59	*atp*D *Pantoea* spp.	This study
PantatpD-R	TACAGTTTCTTCGCTTTTTC				

طراحی آغازگرهای ژن‌های خانه داری جنس *Pantoea*

برای طراحی آغازگرهای مربوط به ژن‌های خانه‌داری، جدایه‌های مرجع گونه‌های مختلف جنس *Pantoea* از پایگاه داده NCBI دریافت شد و سپس توالی سه ژن *atp*D، *gyr*B و *rpo*B از توالی‌های آن‌ها استخراج شد. با استفاده از نرم‌افزار Mega6 هم ردیف‌سازی هریک از این سه ژن جداگانه انجام شد. بعد از هم ردیف‌سازی نواحی مشترک بین همه گونه‌ها به‌صورت چشمی انتخاب شدند. نواحی منتخب برای طراحی آغازگرهای به طول ۲۰ تا ۲۶ نوکلئوتید به‌صورت دستی به عنوان رشته پیشرو انتخاب شدند و توالی رشته معکوس هریک به‌وسیله پایگاه اینترنتی Vector Builder دریافت شد (Vector Builder). اعتبارسنجی و اختصاصیت آغازگرها نیز توسط پرایمر بلاست NCBI سنجیده شد و در نهایت برای ساخت آن‌ها، توالی آغازگرها به شرکت پیشگام فرستاده شد.

تحلیل توالی چندژن‌گاهی

شناسایی دقیق و تعیین موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های *P. dispersa*، با واکاوی سه ژن خانه‌داری شامل *atp*D، *gyr*B و *rpo*B انجام شد. شرایط PCR و پارامترهای چرخه مشابه همان مواردی بود که در بالا توضیح داده شده است (جدول ۱). خلوص و بازده محصول‌های PCR برای تعیین توالی با اجرای یک مخلوط واکنش ۵ میکرولیتری بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد و محصول‌ها تائید شده برای تعیین توالی آماده شد. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL W هم‌ردیف‌سازی شد (Larkin *et al*., 2007). تمامی توالی‌ها در بانک ژن ذخیره و به آن‌ها یک شماره دسترسی اختصاص داده شد. واکاوی فیلوژنتیک با استفاده از روش حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) و با استفاده از مدل جوکس-کانتور (Jukes-Cantor) انجام شد (Jukes & Cantor, 1969). درخت‌های فیلوژنتیک با بوت استرپینگ (۱۰۰۰ تکرار) با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 در دسترس در سایت: www.megasoftware.net، انجام گرفت (Tamura *et al*., 2013).

آزمون بیماری‌زایی

آزمون‌های بیماری‌زایی روی ساقه شش رقم ذرت به نام‌های Simon، Maxima، Bc678، 400، Taha و Chavosh در گلخانه انجام شد. گیاهان به منظور انجام آزمون بیماری‌زایی در گلخانه کاشته شدند و پس از رشد در گلخانه، در مرحله دو تا سه برگی با سوسپانسیونی از باکتری‌های شناسایی شده در مرحله قبل، به طور مستقل مایه‌زنی شدند. مایه‌زنی به ساقه ذرت با سرنگ سترون انجام گرفت که برای این کار از کشت خالص تازه (۲۴ یا ۳۶ ساعته) باکتری استفاده شد. برای مایه‌زنی به ساقه، سوسپانسیونی از باکتری در غلظت 10^6 یا 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر (واحدهای تشکیل‌دهنده پرگنه یا Cfu/ml) تهیه و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از آن را به وسیله سرنگ سترون همراه با سوزن به داخل ساقه تزریق شد (Duveiller *et al*., 1997). در هر رقم یک گیاه به عنوان کنترل منفی با آب مقطر سترون نیز مایه‌زنی شد. تمام گیاهان مایه‌زنی‌شده در گلخانه در دمای محیط (۲۸- ۲۵ درجه سلسیوس و ۱۴ ساعت نور طبیعی) نگه‌داری شدند. گیاهان به‌طور دوره‌ای برای ظهور علائم بیماری بررسی شدند و ارزیابی نهایی علائم بیماری ۲۰ روز پس از مایه‌زنی انجام شد. به منظور جداسازی مجدد و شناسایی باکتری انجام اصول کخ نیز با جداسازی جدایه‌های باکتریایی مایه‌زنی شده از گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه انجام شد. آزمون بیماری‌زایی به طور مستقل با سه تکرار انجام شد (Tsukamoto *et al*., 2001).

بررسی دامنه میزبانی روی سایر اعضای خانواده گندمیان

دامنه میزبانی باکتری *P. dispersa* با برخی از اعضای خانواده گندمیان مانند گندم (*Triticum aestivum*) رقم آزادی، جو (*Hordeum vulgare*)، یولاف (*Avena sativa*) رقم یورو، ارزن (*Pennisetum glaucum*) و همچنین سه رقم سورگوم (*Sorghum bicolor*) به نام‌های سپیده، پیام و پژپال با مایه‌زنی سوسپانسیون شش جدایه باکتری با رنگ زرد پررنگ، شفاف و لعابی که به عنوان باکتری *P. dispersa* شناسایی شدند؛ با نام‌های Ha196، Ha210، H360، Ha361، Ha387 و Ha426 به ساقه آن‌ها، در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. این گیاهان بعد از مدت ۱۵ روز از کشت در گلخانه مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی به ساقه، سوسپانسیونی از باکتری را در غلظت 10^6 یا 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر (واحدهای تشکیل‌دهنده پرگنه یا CFU) تهیه و سپس ۲۰ میلی‌لیتر از آن را به وسیله سرنگ سترون همراه با سوزن به داخل ساقه تزریق شد (Duveiller, 1997). به گیاهان کنترل منفی نیز ۲۰ میلی‌لیترآب مقطر سترون تزریق شد. پس از مایه‌زنی، گیاهان به مدت ۲۰ روز در دمای ۳±۲۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۵ درصد در گلخانه نگه‌داری شد و از یک سیستم مرطوب‌کننده برای پاشش آب سترون بر روی گیاهان به مدت یک ساعت در روز استفاده شد. ارتفاع و لکه‌های زرد نواری روی برگ‌های هر گیاه در روزهای صفر، ۵ ، ۱۰ ، ۱۵ و ۲۰ پس از مایه‌زنی (dpi) برآورد شد. پس از گذشت زمان مقرر در صورت بروز علائم مورد نظر، سه نمونه از بخش‌های دارای علائم هر گیاه، مخلوط با یکدیگر برداشت شد. وزن هر نمونه دو گرم تنظیم و بافت‌های گیاهی با استفاده از یک هاون سترون در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون، خرد شد. سپس دو لوپ سوسپانسیون حاصل روی یک محیط کشت شامل پپتون، گلوکز، مخمر و آگار (YPGA) کشت داده شد (EPPO, 2018). تشتک‌ها در دمای۲۷– ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲–۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. پرگنه‌هایی کوچک، زرد رنگ و لعابی مشابه پرگنه‌های متعلق به باکتری *P. dispersa* جداسازی شد. به این صورت اصول کخ نیز انجام شد. آزمایش به جهت اطمینان دو بار تکرار شد.

نتایج

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌ها

نمونه‌برداری به صورت دو سال متوالی از مهر ۱۴۰۰ تا آذر سال ۱۴۰۱ از مناطق مختلف کشت غلات در ۱۵ استان واقع در مناطق جغرافیایی مختلف با اقلیم‌های متنوع در ایران شامل بوشهر، چهار محال و بختیاری، خراسان رضوی، خوزستان، سیستان و بلوچستان، فارس، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، هرمزگان، همدان، و مرکزی؛ وجود عامل باکتریایی لکه برگی و پژمردگی ذرت مورد بررسی قرار گرفت. در غربال‌گری اولیه تعدادی از باکتری‌ها، شامل باکتری‌هایی با پرگنه‌هایی با اندازه کوچک، زرد پررنگ و لعابی جدا شدند که به طور کلی تعداد این پرگنه‌ها محدود بود و طی جداسازی حاصل از چهار سال نمونه‌برداری ۲۰ جدایه با این ویژگی‌های ظاهری به دست آمد و پس از خالص سازی نگه‌داری شدند.

آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌ها

تمامی ۲۰ جدایه زرد رنگ لعابی جداسازی شده نتیجه آزمون گرم، اکسیداز و اوره‌آز آن‌ها منفی بود، درحالی‌که از نظر هیدرولیز کاتالاز، ژلاتین، توئین ۸۰ و همچنین تولید اسید از قندهای فروکتوز، ساکارز، لاکتوز و مانیتول همگی مثبت بودند. هیچ یک از این شش جدایه قادر به هیدرولیز شاسته نبودند. همچنین از نظر آزمون اکسیداتیو–تخمیر (O/F) نیز همه جدایه‌ها بی‌هوازی اختیاری بودند. نتایج این آزمون‌ها این امکان را داد که این جدایه‌های باکتریایی در گروه جدایه‌های باکتریایی شبیه به جنس *Pantoea*

طبقه‌بندی شوند (Schaad *et al*. 2000). تمامی ۲۰ جدایه این پژوهش جهت شناسایی اولیه با استفاده از یک جفت آغازگر مربوط به ژن خانه‌داری به نام *rpo*B (جدول ۱) مربوط به جنس *Pantoea* مورد ارزیابی قرار گرفت، نتیجه این ارزیابی براساس وجود، اندازه قطعه و همچنین توالی نوکلئوتیدی نشان دهنده این بود که شش جدایه متعلق به جنس *Pantoea* می‌باشد که از نقاط مختلف ایران بود (جدول۲).

طراحی آغازگرهای ژن‌های خانه داری جنس *Pantoea*

آغازگرهای طراحی شده برای هرسه ژن *atpD*، *gyr*B و *rpo*B گونه‌های مختلف جنس *Pantoea*، توسط شرکت پیشگام ساخته شد و با ۲۰ جدایه به دست آمده در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. شش جدایه مربوط به گونه *P.dispesa* و دو جدایه مربوط به گونه های *P. agglomerans* و *P. ananatis* همگی قادر به تکثیر قطعا مد نظر هر یک از سه ژن که در جدول شماره یک آورده شده است، بودند.

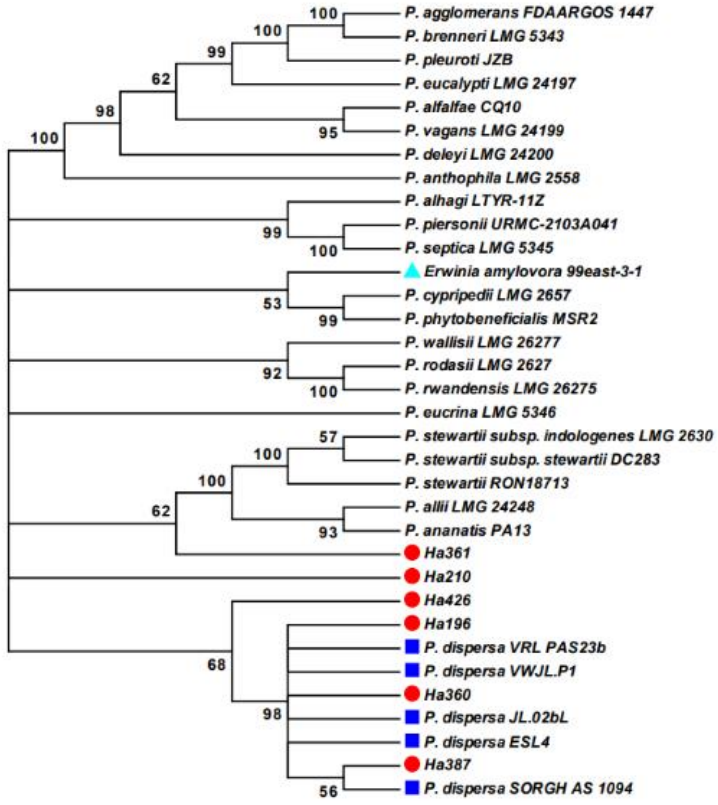
تحلیل توالی چند جایگاهی (MLSA)

به منظور شناسایی دقیق گونه‌ی جدایه‌های موجود در این مطالعه و مقایسه تمامی گونه‌های *Pantoea* گزارش‌شده دردسترس در NCBI، تمام ۲۰ جدایه به‌دست‌آمده در این مطالعه با استفاده از سه ژن خانه‌داری (*atp*D، *gyr*B و *rpo*B) تعیین توالی شدند. نتایج جستجویی که از طریق BLAST در پایگاه‌داده NCBI GenBank با استفاده از توالی‌های هر یک از سه ژن خانه‌داری انجام شد، به این شرح است؛ شباهت ژن *gyr*B در جدایه‌های Ha196، Ha210، H360، Ha361، Ha387 و Ha426 جدا شده از ذرت که به ترتیب از استان‌های همدان، چهار محال و بختیاری، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، اصفهان و فارس جداسازی شده‌اند؛ به ترتیب۹۸/۹۷، ۹۸/۴۳، ۹۹/۱۷، ۹۹/۶۷، ۹۹/۱۸ و۹۸ درصد، شباهت ژن *atp*D در جدایه‌های Ha196، Ha210، H360، Ha361، Ha387 و Ha426 به ترتیب ۹۹/۸۳، ۹۸.۹۷، ۹۹/۵۵، ۹۹/۲۹، ۹۸/۹۴ و ۹۹/۸۰ درصد و شباهت ژن *rpo*B در جدایه‌های Ha196، Ha210، H360، Ha361، Ha387 و Ha426 به ترتیب ۹۹/۴۵، ۱۰۰، ۹۹/۴۹، ۹۹/۸۴، ۱۰۰ و ۹۹/۰۸ درصد به این سه ژن در جدایه BJQ0007 باکتری *P. dispersa* نشان دادند.

جدایه‌های Ha277 و Ha393 متعلق به گونه *P. agglomerans* و جدایه‌های Ha38 و Ha446 نیز متعلق به گونه *P. ananatis* می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه وجود گونه *P. dispersa* در ایران تایید شد.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی برای تمامی شش جدایه‌های *P. dispersa* به دست آمده در این مطالعه برروی شش رقم ذرت به نام‌هایSimon، Maxima، Bc678، 400، Taha و Chavosh انجام شد. علائم ایجاد شده توسط شش جدایه Ha196، Ha210، Ha360، Ha361، Ha387 و Ha426 بر روی شش رقم مختلف ذرت مشابه با علائم مشاهده شده در مزرعه بود، به‌طوریکه دو تا سه روز پس از مایه‌زنی لکه‌های زرد رنگ متعدد روی برگ‌های گیاهان ایجاد شد که با گذشت زمان اندازه لکه‌ها بزرگ‌تر می‌شد و علاوه بر لکه‌برگی، علائم پژمردگی گیاه نیز قابل مشاهده بود (شکل ۱).



شکل۱. موقعیت جدایه‌های ***Pantoea dispersa*** در درخت فیلوژنی با استفاده از سه ژن ***atpD***، ***rpoB*** و ***gyrB*** بر اساس نرم افزار **Mega6.0** با روش **Maximum Likelihood** و سنجش اعتبار به روش **Bootstrap1000**؛ باکتری ***Erwinia amylovora*** به عنوان گونه خارج از گروه انتخاب شده است. مربع‌های آبی تایپ استرین‌های ***P. dispersa*** را نشان می‌دهند.

Fig1. The position of *Pantoea dispersa* isolates in the phylogeny tree using *atpD*, *rpoB* and *gyrB* genes base on Mega6.0 software with the maximum likelihood method and validity measurement using the method Bootstrap 1000. *Erwinia amylovora* has been selected as an out-group species. Blue squares indicate the type strains of *P. dispersa*.

دامنه میزبانی

دامنه میزبانی بر روی گیاهانی از جمله سه رقم مختلف سورگوم (*Sorghum bicolor*) به نام‌های سپیده، پیام و پژپال ، گندم (*Triticum aestivum*) رقم آزادی، جو (*Hordeum vulgare*)، یولاف(*Avena sativa*) رقم یورو و ارزن (*Pennisetum glaucum*) برای تعیین دامنه میزبان انجام گرفت.

همه جدایه‌ها بر روی سه رقم مختلف سورگوم و ارزن علائم لکه‌برگی را ایجاد کردند در حالی که بر روی گندم و جو قادر به ایجاد بیماری نبودند. نتایج آزمون بیماری‌زایی بر روی یولاف متغییر بود؛ به این صورت که جدایه‌های Ha210، Ha360، Ha361،

Ha426 و Ha387 علائـــم لکـــه‌برگی را روی برگ‌هـــای ایـن گیـاه ایجـاد کردنـد در حالیکـه گیـاه مایـه‌زنی شـده با جدایه Ha196 هیچ‌گونه علائمـی را نشـان نـداد (شـکل شماره۲).

جدول۲. ویژگی‌های بیماری‌زایی و برخی از ویژگیهای فنوتیپی جدایه‌های *P. dispersa* در این پژوهش.

Table2. Pathogenicity and phenotypic characteristics of *Pantoea dispersa* isolates in this research.

	Isolates	Ha196	Ha210	Ha360	Ha361	Ha387	Ha426	Ha277	Ha393	Ha38	Ha446
	Host	corn	corn	corn	corn	corn	corn	corn	corn	corn	corn
	Province	Hamedan	chaharmahal and bakhtiari	Fars	Kohgiluyeh –Boyer ahmad	Isfahan	Fars	Markazi	West Azerbaijan	Khuzestan	Fars
	Year	2022	2022	2022	2022	2022	2022	2022	2022	2022	2022
Pathogenicity	Corn(cv. taha)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Corn(cv. Bc678)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Corn(cv. maxima)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Corn(cv. simon)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Corn(cv. 400)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Corn(cv. chavosh)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Surgum(cv. sepideh)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Surgum(cv. payam)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Surgum(cv. pazhpal)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	wheat	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
	Barley	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
	Oat	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_
	Millet	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		P. dispersa	*P. dispersa*	*P. dispersa*	*P. dispersa*	*P. dispersa*	*P. dispersa*	*P. agglomerans*	*P. agglomerans*	*P. ananatis*	*P. ananatis*

شکل۲. علائم بیماری ایجاد شده توسط باکتری *P. dispersa* پس از مایه‌زنی جدایه‌ها در گلخانه با رطوبت نسبی ۹۰ درصد و دما ۲۷ درجه سانتی گراد؛ الف، ب، پ و ت به ترتیب علائم لکه برگی جدایه‌های Ha196، Ha360، Ha.361 و Ha426 بر روی گیاه ذرت رقم Simon، ث؛ علائم لکه برگی جدایه Ha196 بر روی ارزن، ج؛ علائم لکه برگی جدایه Ha196 بر روی سورگوم رقم سپیده، چ؛ علائم خفیف لکه برگی جدایه Ha210 برروی گیاه یولاف و ح؛ ذرت رقم Simon به عنوان گیاه شاهد که با آب مقطر سترون شده مایه‌زنی شده است.

Fig2. The symptoms of diseases caused by *P. dispersa* disease on maize of Simon cultivar after inoculation of isolates in the greenhouse with a relative humidity of 90% and temperature of 27°C; a, b, c and d; according to the leaf spot symptoms of Ha.196, Ha.360, Ha.361 and Ha.426 isolates on maize of Simon cultivar:, e; the leaf spot symptoms of Ha.196 isolate on millete , f; the leaf spot symptoms of Ha.196 isolate on sourghum of Sepideh cultivar ,j; Mild leaf spot symptoms of isolate Ha210 on oat and h; Corn cultivar Simon was inoculated with sterilized distilled water as a positive control.

دسترسی داده‌ها

توالی‌های نوکلئوتیدی سه ژن *atp*D، *gyr*B و *rpo*B گونه *P. dispersa* در پایگاه داده GenBank با راس شمارهای زیر به ترتیب برای نمونه‌های Ha196، Ha210، Ha360، Ha361، Ha387 و Ha426 ذخیره شده‌اند: *atp*D(PP791865، PP791866، PP791867، PP791868، PP791869، PP791870)، *gyr*B (PP791871، PP791872، PP791873، PP791874، PP791875، PP791876) و *rpo*B (PP791877، PP791878، PP791879، PP791880، PP791881، PP791882).

بحث

هدف از این پژوهش بررسی بیماری لکه‌برگی ذرت در

مزارع ذرت استان‌های مختلف کشور بود که طی چهار سال متوالی از نقاط مختلف کشور نمونه‌برداری انجام و منجر به شناسایی باکتری *P. dispersa* به عنوان عامل باکتریایی این بیماری شد. در طی نمونه‌برداری گیاهان با علائم لکه برگی و پژمردگی در طول مدت نمونه‌برداری مشاهده و جمع‌آوری شد. تعداد کل جدایه‌های جداسازی شده از مزارع مختلف ذرت در این پژوهش ۲۰ جدایه است که براساس خصوصیات ظاهری جدایه یعنی رنگ زرد و لعابی بودن آن برگزیده شدند. با استفاده از آغازگر مربوط به ژن *rpoB* که از ژن‌های خانه‌داری جنس *Pantoea* می‌باشد، مشخص گردید تمامی جدایه‌ها به جنس *Pantoea* تعلق دارند. سپس با استفاده از دو ژن خانه‌داری دیگر به نام‌های *atp*D و gyrB به بررسی فیلوژنی و تشخیص دقیق‌تر گونه پرداخته شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی این سه ژن جدایه‌های این تحقیق درکنار توالی همین سه ژن گونه‌های استاندار دیگر گونه‌های *Pantoea* که در پایگاه NCBI موجود است قرار گرفت. نتیجه حاصل نشان داد شش جدایه با نام‌های Ha196، Ha210، Ha360، Ha361، Ha387 و Ha426 از بین ۲۰ جدایه متعلق به گونه *P. dispersa* می‌باشد. باتوجه به اینکه تا کنون گزارشی از حضور این باکتری بر روی گیاه ذرت منتشر نشده است، این تحقیق به عنوان اولین گزارش این باکتری از میزبان ذرت می‌باشد. این شش جدایه توانایی ایجاد بیماری بر روی گیاه ذرت را داشتند و علائم لکه برگی حاصل از این بیمارگر بعد از گذشت دو تا سه روز از مایه‌زنی روی برگ‌های ارقام مختلف ذرت مشاهده شد که در نهایت منجر به پژمردگی بوته‌های ذرت بعد از گذشت ۲۰ روز از مایه‌زنی شد. از آن‌جا که بیماری‌زایی شش جدایه متعلق به گونه *P. dispersa* بدست آمده در این پژوهش، روی میزبان‌های دیگر خانواده گندمیان نظیر ارقام مختلف سورگوم، ارزن و یولاف به اثبات رسید؛ احتمال همه‌گیری گسترده در مزارع گیاهان مختلف خانواده گندمیان وجود دارد که تهدیدی برای صنعت تولید هریک از محصولات این خانواده می‌باشد. با توجه به عدم حضور ناقل برای این بیمارگر، مهم‌ترین راه ورود این بیمارگر به کشور از طریق بذر آلوده (داخل اندوسپور و سطح رویی پوشش بیرونی بذر) بوده است. چنانچه قبل از کشت با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵٪ بذرها ضدعفونی شود تا حد زیادی خطر گسترش و همه‌گیری این بیمارگر کاهش می‌یابد(Block et al., 1998). در صورت عدم کنترل آلودگی ناشی از این بیمارگر امکان کاهش محصولاتی همچون علوفه دامی می‌باشد و کاهش سطح زیر کشت این محصولات را به دنبال دارد. با توجه به موارد گفته شده اهمیت و ضرورت بررسی آلودگی باکتریایی بذر بویژه در خانواده گندمیان مشخص می‌گردد.

نتیجه‌گیری حاصل از این تحقیق نشان دهنده حضور باکتری نوظهور *P. dispersa* در ایران علاوه بر گونه‌های دیگر باکتری نظیر *P. agglomerans* و *P. stewartii* subsp. *indologene* از جنس *Pantoea* است (میرزائی نجفقلی و همکاران، ۱۳۹۳). جدایه‌های به دست آمده از این گونه باکتریایی که از استان‌های اصفهان، چهار محال و بختیاری، فارس، کهگیلویه و بویراحمد و همدان جداسازی شده‌اند، علاوه بر توانایی ایجاد بیماری روی ذرت؛ قادر به بیماری‌زایی روی سورگوم را نیز داشتند. سه جدایه Ha210، Ha360، Ha361 و Ha426 توانایی بیماری‌زایی روی علف هرز یولاف را دارند که نشان دهنده گسترش این عامل باکتریایی بر روی سایر میزبان‌های گیاهی است. از طرفی این امر منجر به 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.

References

منابع

نجفقلی میرزائی، ح.، تقوی، م.، و عالی‌منش.، م. ر. (۱۳۹۳). اولین گزارش از بیماری لکـه برگـی باکتریـایی ذرت در ایـران. بیماری‌های گیاهی، ۵۰(۴)، ۴۰۳-۴۰۶.

Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales'*: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam .nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *66*(12), 5575-5599 .

Block, C., Hill, J., & McGee, D. (1998). Seed transmission of *Pantoea stewartii* in field and sweet corn. *Plant Disease*, *82*(7), 775-780 .

Chang, C.-P., Sung, I.-H., & Huang, C.-J. (2018). *Pantoea dispersa* causing bulb decay of onion in Taiwan. *Australasian Plant Pathology*, *47*, 609-613 .

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

EPPO. (2018). *European and Mediterranean Plant Protection Organization*. https://gd.eppo.int [Accessed April 2018]

FAOSTAT. (2022). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize

Hu, H., Xu, M., Song, H., Zhai, Z., Chen, M., Zhou, J., Hu, D., & Gao, Y. (2022). First report of *Pantoea dispersa* causing brown blotch disease in *Flammulina filiformis* in China. *Plant Disease* ,۱۰۵۶ ,(۳)۱۰۶ ,

Jena, B., Senapati, A., Kumar, S., Panda, A., Boblina, B., & Barik, O. (2023). First report of *Pantoea dispersa* causing leaf, panicle and grain blight in India. *New Disease Reports*, *47*(2), e12190 .

Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules.(Munro HN ed.) Mammalian protein Metabolism, III. *New York Academic Press*, 21-132 .

Kouzai, Y., & Akimoto-Tomiyama, C. (2024). Development of specific PCR primer sets for detecting *Pantoea dispersa*, a potential biocontrol agent against rice seed-borne diseases caused by Burkholderia pathogens. *Journal of General Plant Pathology*, *90*(1), 42-50 .

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A & ,Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*(21), 2947-2948 .

Minas, K., McEwan, N. R., Newbold, C. J., & Scott, K. P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS microbiology letters*, *325*(2), 162-169 .

Nagrale, D. T., Gawande, S. P., Gokte-Narkhedkar, N., & Waghmare, V. N. (2020). Association of phytopathogenic *Pantoea dispersa* inner boll rot of cotton (Gossypium hirsutum L.) in Maharashtra state, India. *European Journal of Plant Pathology*, *158*, 251-260 .

Palemón-Alberto, F., Ortega-Acosta, S. Á., Domínguez-Monge, S., Castañeda-Vildozola, Á., Reyes-García, G., Cruz-Lagunas, B., & Flores-Simon, O. U. (2021). First report of bud soft rot on *Agave angustifolia* caused by *Pantoea dispersa* in México. *Plant Disease*, *105*(10), 3286 .

PPO. (2018). *Plant Protection Organization*. https://www.ppo.ir/

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

Sulong, Y., Mohamed, S., Sajili, M. H., & Ngah, N. (2019). Survey on pest and disease of corn (*Zea mays* Linn) grown at BRIS soil area. *Journal of Agrobiotechnology*, *1۰*(1S), 75-87 .

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, *30*(12), 2725-2729 .

Toh, W., Loh, P., & Wong, H. (2019). First report of leaf blight of rice caused by *Pantoea ananatis* and *Pantoea dispersa* in Malaysia. *Plant Disease*, *103*(7), 1764-1764 .

Tsukamoto, T., Takeuchi, M., Shida, O., Murata, H., & Shirata, A. (2001). Proposal of *Mycetocola* gen. nov.

in the family *Microbacteriaceae* and three new species, *Mycetocola saprophilus* sp. nov., *Mycetocola tolaasinivorans* sp. nov. and *Mycetocola lacteus* sp. nov., isolated from cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *51*(3), 937-944 .

Vector Builder https://en.vectorbuilder.com/

Yang, Y., Hu, H., Zhou, C., Zhang, W., Yu, Y., Liu, Q., Lu, T., & Zhang, Q. (2022). Characteristics and accurate identification of *Pantoea dispersa* with a case of spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma in China: A case report. *Medicine*, *101* .(۲)

Zhang, L., & Birch, R. (1997). Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of applied microbiology*, *82*(4), 448-454 .