

شناسایی ژنوتیپی و بررسی تنوع درون گونه‌ای جدایه‌های بیماری‌زای زانتوموناس از
میزبان‌های لوبیا و یونجه در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی
**Genotypic identification and investigation of intra-species diversity of
Xanthomonas pathogenic isolates from bean and alfalfa hosts in East and West
Azerbaijan provinces**

فردین نصرت‌نژاد^۱، سویل نعمت‌اللهی^{۲*} و کیومرث روح‌رضی^۲

دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۷

چکیده

طی سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ به منظور جداسازی باکتری‌های بیماری‌زا از میزبان‌های لوبیا و یونجه دارای علائم بیماری لکه‌برگی، پژمردگی و بلایت که از برخی مزارع و باغات استان‌های آذربایجان شرقی و غربی نمونه‌برداری شده بودند، در مجموع ۱۴۰ جدایه باکتریایی روی محیط کشت نوترینت آگار به صورت جدایه‌های اولیه، کشت و خالص‌سازی گردیدند. بر اساس رنگ و شکل ظاهری کلنی‌ها، جدایه‌هایی که به باکتری زانتوموناس مورد نظر نزدیک بودند، انتخاب شده و پس از کشت دوباره و خالص‌سازی در مجموع ۶۲ جدایه بدست آمد. برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها، هر یک از آنها به صورت جداگانه به میزبان خود تلقیح شده و در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به مدت دو هفته نگهداری شدند؛ ۳۳ استرین توانستند روی میزبان بیماری‌زایی ایجاد کنند. در این استرین‌ها، قطعه ۲۳۹ جفت بازی ژن اختصاصی زانتوموناس به عنوان بخشی از ژن *ITS* تکثیر شد. بنابراین این استرین‌ها به عنوان باکتری جنس زانتوموناس در نظر گرفته شدند. بر اساس انگشت‌نگاری ژنتیکی به روش rep-PCR استرین‌های جدا شده از لوبیا و یونجه نشان داد که استرین‌های لوبیا به چهار خوشه و استرین‌های یونجه به سه گروه تقسیم‌بندی شدند که نتایج، حاکی از تنوع ژنتیکی بین استرین‌ها بود. بر اساس توالی‌یابی ژن‌های *16S rRNA*، *gyrB* و *rpoD* استرین یونجه *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfa* و استرین جدا شده از لوبیا به عنوان گونه *X. phaseoli* pv. *phaseoli* شناسایی شدند. با بررسی منابع موجود، تحقیق حاضر اولین گزارش از جداسازی، شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی این استرین‌ها از میزبان‌های لوبیا و یونجه در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی می‌باشد.

واژگان کلیدی: آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، لوبیا، یونجه، زانتوموناس

مقدمه

بیماری‌های گیاهی باعث کاهش بهره‌وری در منابع تولید، کاهش درآمد تولیدکنندگان، افزایش قیمت مواد غذایی و محدودیت در تولید محصولات کشاورزی می‌شوند. یکی از عوامل ایجادکننده بیماری در گیاهان، باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشند که سالانه خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند. یکی از مهمترین جنس‌های باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی جنس زانتوموناس است (Schaad *et al.*, 2001). گونه‌های زانتوموناس دامنه میزبانی وسیعی دارند و انواع گیاهان زراعی، باغی و زینتی را مورد حمله قرار می‌دهند (Agrios, 2005). بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا اولین بار توسط Beach (1992) از نیویورک و سپس از اغلب مناطق کشت لوبیا در دنیا به استثنای مناطق خشک نواحی گرمسیری گزارش شد (به نقل از: Gilbertson and Maxwell, 1992). این بیماری از بیماری‌های مخرب لوبیا در اکثر مناطق جهان و به‌ویژه مناطق گرمسیری است که میزان خسارت آن در مناطق مختلف از ۱۰ تا ۴۰٪ تخمین زده

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: Nematollahi2001@yahoo.com

شده است (Taran et al., 2001). در ایران، برای اولین بار این بیماری توسط لک و همکاران (۱۳۷۲) از مزارع لوبیا استان مرکزی گزارش شد. در حال حاضر، این بیماری به یکی از بیماری‌های مهم لوبیا در کشور تبدیل شده و از استان‌های مرکزی، لرستان، اصفهان، چهارمحال و بختیاری و زنجان گزارش شده است (لک و همکاران، ۱۳۹۷). علائم اولیه بیماری روی برگ به صورت لکه‌های آب‌سوخته‌ای است که بعد از گذشت چند روز این لکه‌ها تبدیل به لکه‌های کوچک کلروزه می‌شوند. با گذشت زمان و گسترش لکه‌های کلروزه، لکه‌های نکروزه‌ای به رنگ قهوه‌ای در وسط لکه‌های کلروزه پدیدار می‌شود و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی گسترش می‌یابد (لک و همکاران، ۱۳۹۷).

در مورد بیماری‌های باکتریایی یونجه، سوابق مستند در کشور مربوط به پژمردگی و کوتاه قدی باکتریایی با عامل *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* است (Heidari and Khodakaramian, 2011). علاوه بر پژمردگی باکتریایی، بیماری لکه‌برگی باکتریایی ناشی از *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfa* (Schaad et al., 2007) در گذشته *X. campestris* pv. *alfalfae* (Young et al., 1978) مسئول اپیدمی‌های پراکنده یونجه در سراسر جهان بوده است. طی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۴، یک نظرسنجی گسترده در سراسر کشور به منظور تهیه نقشه توزیع موجود و جدید انجام شد. برای این منظور، بیماری‌های باکتریایی محصولات زراعی اعم از سبزیجات و محصولات صنعتی (Osdaghi et al., 2015؛ Mafakheri et al., 2017) و همچنین لوبیا و یونجه نیز بررسی شد؛ مزارع یونجه با علائم مشکوک بیماری باکتریایی در استان فارس مشاهده گردید. بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، جدایه‌ها به‌عنوان *Xanthomonas* sp. تشخیص داده شدند و تشخیص نهایی آن‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جنس زانتوموناس (Xc-lip-F2 و X-ITS-R2) و تکثیر قطعه ۷۷۷ جفت بازی تأیید شد. مطالعه فیلوژنتیک جدایه‌ها با استفاده از تعیین توالی ژن‌های *lepA* و *lacF*، *gltA*، *gapA*، *fusA*، *hrpB2* و نشان داد که این جدایه‌ها به *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* تعلق داشتند (باری پور و همکاران، ۱۳۹۷).

تاکنون برای بررسی تنوع ژنتیکی در جدایه‌های زانتوموناس چندین روش بکار رفته است که یکی از روش‌های مفید در این زمینه rep-PCR می‌باشد (Giovanardi et al., 2016؛ Ivanovic et al., 2015). در rep-PCR، از پرایمرهای مکمل توالی‌های DNA استفاده می‌شود که به صورت طبیعی تکرار شده و بسیار حفاظت شده می‌باشند و در ژنوم اکثر باکتری‌های گرم منفی و چندین باکتری گرم مثبت نیز وجود دارند (Versalovic et al., 1991). این توالی‌ها شامل سه خانواده از توالی‌های DNA تکراری، یعنی توالی پالیندرومیک برون‌ژنیک تکراری (REP) با ۳۵-۴۰ جفت باز، توالی بین‌ژنی تکراری انتروباکتریایی ۱۲۴-۱۲۷ جفت باز (ERIC) و عنصر BOX با ۱۵۴ جفت باز هستند. استفاده از این پرایمرها در PCR منجر به تکثیر انتخابی نواحی ژنومی متمایز بین عناصر REP، ERIC یا BOX می‌شود (Versalovic et al., 1994). تاران و همکاران جدایه‌های مختلف زانتوموناس به دست آمده از میزبان‌های مختلف را روی غلاف لوبیا تلقیح کردند. نتایج آزمون بیماری‌زایی روی غلاف لوبیا نشان داد که تنها جدایه‌های بدست آمده از لوبیا یا گیاهان نزدیک به لوبیا واکنش بیماری‌زایی مثبت روی غلاف لوبیا نشان دادند؛ در حالی که جدایه‌های متعلق به سایر میزبان‌ها قادر به ایجاد بیماری روی غلاف لوبیا نبودند (Taran et al., 2001).

از آنجائی که شناسایی دقیق و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی عامل بیمارگر نقش مهمی در مدیریت بیماری‌های گیاهی و تعیین راهکار مدیریتی دارد، بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی تاکسونومی و تعیین جایگاه فیلوژنی باکتری‌های عامل بیماری‌های باکتریایی در میزبان‌های لوبیا و یونجه در استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی و شناسایی آنها بر اساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی و توالی‌یابی ژن‌های *16S rRNA*، *gyrB* و *ropD* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

در طول فصل زراعی سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ از گیاه میزبان لوبیا با علائم لکه روی برگ و غلاف میوه و همچنین یونجه با علائم لکه‌برگی در استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها پس از

یادداشت‌برداری داخل پاکت‌های کاغذی قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان جداسازی داخل یخچال نگهداری شد.

به منظور نمونه‌برداری از علائم بیماری از میزبان یونجه ۱۰ نمونه از میاندوآب، ۵ نمونه از مراغه و ۸ نمونه از ارومیه بدست آمد. از میزبان لوبیا نیز ۶ نمونه از شهرستان عجب‌شیر، ۳ نمونه از بناب و ۱۰ نمونه نیز از شهرستان‌های مراغه، میاندوآب و آذرشهر نمونه‌برداری شد.

نمونه‌ها پس از شستشو با آب معمولی و سپس ضد عفونی با الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و شستشوی چندباره با آب مقطر استریل، داخل چند قطره آب مقطر استریل خرد شدند و پس از حدود ۱۵ دقیقه چند قطره از سوسپانسیون حاصل با لوپ برداشته و روی محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar= NA) به صورت مخطط کشت گردیدند. پتری‌دیش‌ها به منظور رشد هر چه بهتر کلنی‌های باکتریایی به داخل انکوباتور در دمای ۲۵-۲۶ درجه سلسیوس منتقل و به مدت ۳ الی ۵ روز نگهداری شدند. به منظور تک‌کلنی کردن، باکتری‌ها مجدداً از تک‌کلنی‌های رشد کرده برداشته شد و روی چند محیط متفاوت به منظور خالص‌سازی بهتر از جمله محیط کشت نوترینت آگار کشت شدند. برای تفکیک جدایه‌های زانتوموناس، کلنی‌ها در محیط کشت عصاره مخمر-دکستروز-کربنات کلسیم (YDC) و همچنین محیط کشت سوکروز-پپتون-آگار (SPA) کشت و تک‌کلنی‌ها خالص‌سازی شدند (Parraguire-Lezama *et al.*, 2021).

آزمون بیماری‌زایی

برای انجام آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های لوبیا، مقدار یک سی‌سی از سوسپانسیون باکتری با مقدار (10^8 CFU/ml) به غلاف میوه تزریق شده و نتیجه پس از دو هفته در گلخانه بررسی شد. در مورد میزبان یونجه نیز مقدار یک سی‌سی از سوسپانسیون باکتری با مقدار (10^8 CFU/ml) روی برگ یونجه تزریق شده و نتیجه پس از دو الی سه هفته در گلخانه بررسی شد. در همه آزمون‌ها از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. آزمون‌های بیماری‌زایی در گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز با شرایط دمایی ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ درصد انجام شد.

تکثیر ژن اختصاصی

جداسازی DNA از سلول‌های باکتریایی به روش لایز قلبیایی انجام شد (Rouhrazi and Rahimian, 2012). به منظور تشخیص باکتری‌های جنس زانتوموناس از باکتری‌های دیگر، از جفت پرایمر اختصاصی Fw3c /X-fyuA استفاده شد (Adriko *et al.*, 2014).

انگشت‌نگاری ژنومی با روش ERIC-PCR، BOX-PCR و rep-PCR

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و انگشت‌نگاری ژنومی، DNA استرین‌ها با آغازگرهای ERIC، BOX و rep-PCR (جدول ۱) با چرخه‌های زمانی و دمایی ذکر شده (Versalovic *et al.*, 1994) در دستگاه PCR مدل Persian (EM9232) تکثیر شد.

آنالیز داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی

بعد از انگشت‌نگاری ژنومی با روش ERIC-PCR، BOX-PCR و rep-PCR، گروه‌بندی جدایه‌ها با مقایسه نقوش قطعات DNA در ژل و نمره‌دهی بر پایه وجود یا عدم وجود قطعات همسان و تعیین ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت. دندروگرام با روش مقایسه جفت‌ها از طریق میانگین‌های بی‌وزن (UPGMA) و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02 ترسیم گردید (Rohlf, 1993). در این تحقیق ژن‌های *gyrB* و *rpoD*، *16S rRNA* نماینده استرین‌ها با استفاده از آغازگرهای جدول ۱ و با شرایط دمایی و زمانی ذکر شده تکثیر (Yamamoto *et al.*, 2000) و پس از الکتروفورز و حصول اطمینان از وجود باند مورد نظر برای هر یک از ژن‌ها، به منظور بررسی روابط فیلوژنی، محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند.

جدول ۱- نام، توالی و اندازه قطعه قابل تکثیر آغازگرهای به کار رفته جهت شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های جدا شده
 Tabel 1. Name, sequence and the size of the amplified fragments of primers used to identify and investigate the genetic diversity of isolated bacteria

آغازگر Primer	توالی Sequence	اندازه قطعه (bp) The fragment size (bp)	منبع Source
BOXA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	100-300	(Versalovic <i>et al.</i> , 1991)
ERIC-1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	100-3000	(Versalovic <i>et al.</i> , 1994)
ERIC-2	5'-AAGTAAGT GACTGGGGTGAGCG-3'		
REP1	5'-IIICGICGICATCIGGC-3'	100-3500	(Versalovic <i>et al.</i> , 1994)
REP2	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'		
X-fyuA	5'-GCCGGTGGACTACGATTGGAATTA-3'	239	(Adriko <i>et al.</i> , 2014)
Fw3c	5'-GCCGGTGGACTACGACTGGAATTA-3'		
<i>16S rRNA</i>			
fD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1500	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
rD1	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'		
<i>gyrB</i>			
UP-1E	5'-CAGGAAACAGCTATGACCAGGGGAAT-3'	890	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2000)
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'		
<i>rpoD</i> ژن			
70F	5'ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATG-3'	850	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2000)
70Fs	5'-ACGACTGACCCGGTACGCATGTA-3'		

پردازش داده‌ها و رسم درخت فیلوژنی

توالی‌های نوکلوتیدی بدست آمده از ژن‌های *16S rRNA*، *gyrB* و *rpoD*، پس از هم‌ردیف‌سازی چندگانه با برنامه Clustal W با سایر توالی‌ها در گونه‌های مختلف باکتری‌های موجود در GenBank مقایسه شدند. درخت فیلوژنی استرین‌ها، هم به صورت تکی و هم به صورت ترکیبی (چند ژنی)، با روش اتصال همسایه‌ای (Saitou and Nei, 1987) و با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و با bootstrap ۱۰۰۰ تکرار ترسیم گردید (Tamura *et al.*, 2013).

نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌ها

به منظور جداسازی باکتری از میزبان‌های لوبیا و یونجه دارای علائم بیماری (شکل ۱) که از برخی مزارع و باغات استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی نمونه‌برداری شده بودند، از بین نمونه‌های مشکوک به بیماری (۲۳ نمونه یونجه و ۱۹ نمونه از میزبان لوبیا) در مجموع ۱۴۰ استرین روی محیط کشت NA به صورت استرین‌های اولیه، کشت و خالص‌سازی گردیدند. بر اساس رنگ و شکل ظاهری کلنی‌ها استرین‌هایی که به باکتری زانتوموناس مورد نظر نزدیک بودند، انتخاب شده و پس از کشت دوباره و خالص‌سازی در مجموع ۶۲ استرین بدست آمد.

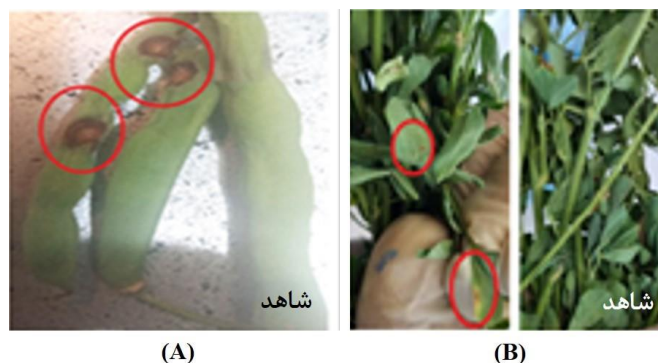


شکل ۱- علائم گیاهان دارای بیماری، نمونه‌برداری شده از مناطق مختلف استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در تحقیق حاضر. A: لکه‌برگی یونجه، B: سوختگی معمولی لوبیا

Fig. 1. Symptoms of diseased plants, sampled from different regions of East and West Azerbaijan provinces in this research. A: alfalfa leaf spot, B: common bean blight

اثبات بیماری زایی

برای اثبات بیماری زایی استرین‌های جدا شده، هر یک از آنها به صورت جداگانه به میزبان خود تلقیح شده و در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به مدت دو الی سه هفته نگهداری شدند؛ ۳۷ استرین توانستند روی میزبان خود بیماری زایی ایجاد کنند (شکل ۲) و بقیه استرین‌های غیربیماری‌زا از ادامه آزمون‌های شناسایی حذف شدند. اسامی استرین‌ها، میزبان جداسازی شده و مناطق جمع‌آوری آنها در جدول ۲ ذکر شده است.



شکل ۲- آزمون بیماری زایی باکتری‌های جدا شده در تحقیق حاضر روی میزبان‌های A: لوبیا، B: یونجه و ظهور علائم پس از دو الی سه هفته در مقایسه با میزبان شاهد

Fig. 2. Pathogenicity test of the bacteria isolated in the present research on hosts A: beans, B: alfalfa and the appearance of symptoms after two to three weeks compared to the control host.

جنس زانتوموناس حدود ۱۲۴ گونه گیاهی تک‌لپه و ۲۶۸ گونه از دولپه‌ای‌ها را آلوده می‌کند (Leyns *et al.*, 1984). تاکنون تحقیقی در ارتباط با جداسازی و شناسایی عامل بیماری لکه‌باکتریایی یونجه در شمال غرب کشور صورت نگرفته است و تحقیق حاضر اولین گزارش از بیماری مذکور در این مناطق می‌باشد. این بیماری با علائمی از جمله وجود لکه‌های آب‌سوخته روی برگ در استان‌های یاد شده ظهور کرده که نهایتاً محل لکه‌ها زرد و قهوه‌ای شده و با پیوستن به هم، سبب ریزش برگ‌ها می‌شد که این علائم با علائمی که قبلاً برای این بیماری گزارش شده بود، مطابقت دارد (Almeida *et al.*, 2010؛ Parkinson *et al.*, 2007).

جدول ۲- استرین‌های مورد مطالعه، میزبان و مناطق جداسازی شده در بررسی حاضر

استرین‌ها Strains	میزبان Host	محل جمع‌آوری Sampling point	سال جداسازی Sampling year
M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7		میاندوآب Miandoab	2022
M8, M9, M10	یونجه	مراغه Maragheh	2021
M11, M12, M13, M14, M15	Alfalfa	ارومیه Uromia	2022
D21, D22		عجب‌شیر Ajabshir	2021
D10, D11, D12, D13, D14		بناب Bonab	2021
D15, D16, D17, D18	لوبیا	مراغه Maragheh	2022
D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9	Bean	میاندوآب Miandoab	2022
D19, D20		آذرشهر Azarshahr	2021

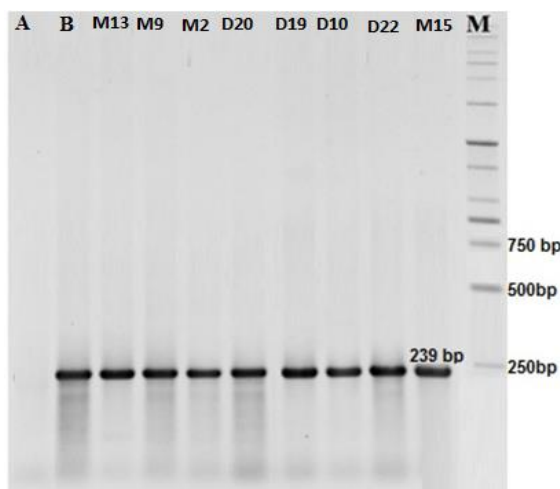
در تحقیق حاضر مشاهده گردید، در مزارعی که از آبیاری بارانی استفاده می‌شود، شیوع و گسترش لکه‌باکتریایی نیز به مراتب بیشتر از دیگر مزارع می‌باشد؛ لذا می‌توان توصیه کرد که در صورت مشاهده این بیماری در هر منطقه، حتی‌الامکان از آبیاری بارانی استفاده نشود. بنابر نتایج تحقیقات پیشین، قارچ‌های *Pseudopeziza medicaginis* و *Pseudoplea hriosiana* نیز علائم مشابهی با بیماری لکه‌باکتریایی ایجاد می‌کنند (Bradbury, 1981). لذا در تحقیق

حاضر برای اطمینان اولیه از باکتریایی بودن عامل بیماری از روش اوزینگ (خروج باکتری از علائم برگ‌گی زیر میکروسکوپ) استفاده شد که وجود اوزینگ از علائم بیماری مذکور قابل مشاهده بود. با توجه به مشاهده بیماری سوختگی معمولی لوبیا چندین سال متوالی در برخی مزارع استان‌های آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی، در تحقیق حاضر به منظور جداسازی و شناسایی عامل بیماری از علائم مشکوک به بیماری نمونه‌برداری گردید. علائم قابل مشاهده بیماری در مزارع عبارت بودند از لکه‌های آسوخته روی برگ و ساقه که بعداً این لکه‌ها به هم پیوسته و سطح وسیعی از برگ را احاطه کرده و در نتیجه سبب ریزش آنها می‌شد. همچنین روی غلاف میوه نیز لکه‌های آسوخته متمایل به قهوه‌ای قابل مشاهده بود. لک و همکاران (۱۳۹۷) نیز علائمی مشابه با تحقیق حاضر، از استان‌های دیگر از جمله زنجان و چهارمحال و بختیاری گزارش کرده بودند.

تکثیر ژن اختصاصی باکتری زانتوموناس

در بین کل استرین‌های مورد مطالعه، در ۳۳ استرین، قطعه ۲۳۹ جفت بازی ژن اختصاصی زانتوموناس که بخشی از ژن *ITS* است، تکثیر شد. بنابراین این استرین‌ها به‌عنوان باکتری جنس زانتوموناس در نظر گرفته شدند (شکل ۳). در نهایت ۱۵ استرین از یونجه و ۱۸ استرین نیز از میزبان لوبیا انتخاب و برای شناسایی گونه و همچنین تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به کثرت تعداد استرین‌های جداسازی شده به منظور شناسایی دقیق، از پرایمر اختصاصی جنس زانتوموناس استفاده شد. این جفت پرایمر قبلاً در تحقیقات (Timilsina et al., 2020) نیز مورد استفاده قرار گرفته بود.

آزمون بیماری‌زایی نیز تأییدکننده بیماری‌زا بودن استرین‌های جدا شده از علائم بیماری سوختگی معمولی بود؛ وجود لکه‌های آسوخته روی غلاف میوه اولین و مهمترین راه تشخیصی بیماری بلایت معمولی لوبیا ذکر شده است (Mhedbi-Hajri et al., 2013).



شکل ۳- تکثیر قطعه ۲۳۹ جفت بازی توسط استرین‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر به‌عنوان بخشی از ژن اختصاصی باکتری زانتوموناس. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، A: شاهد منفی (باکتری سودوموناس)، B: شاهد مثبت (استرین استاندارد (*Xanthomonas arboricola* NCPPB416)

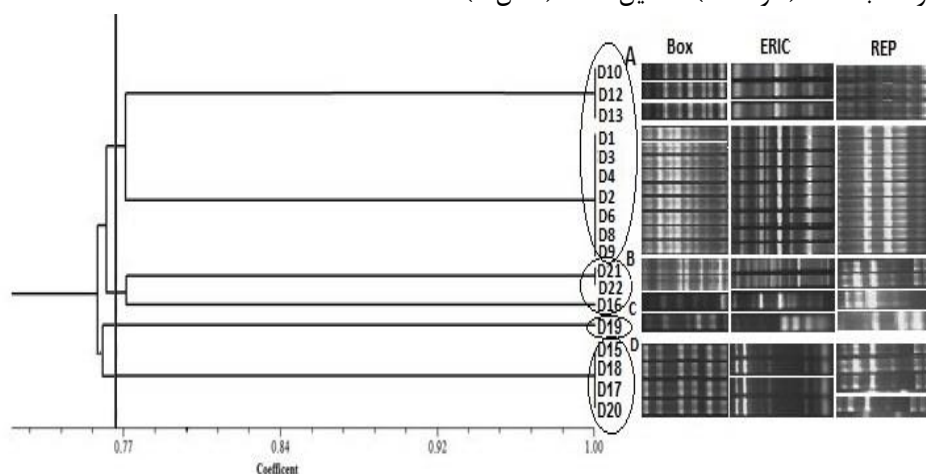
Fig. 3. Amplification of the 239 bp fragment by the strains studied in the current research as part of the specific gene of *Xanthomonas* bacteria. M: 100 bp molecular marker, A: negative control (*Pseudomonas* bacteria), B: positive control (*Xanthomonas arboricola* standard strain NCPPB416)

بررسی خصوصیات استرین‌ها

باکتری‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر همگی گرم منفی بودند و روی محیط NA کلنی زرد و لعاب‌دار تشکیل دادند. از نظر واکنش به آزمون کاتالاز همه استرین‌ها مثبت بودند. بر اساس انگشت‌نگاری ژنتیکی استرین‌های لوبیا، تعداد قطعات تولید شده از BOX-PCR روی ژل آگارز ۱۰ باند و اندازه آنها بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ جفت باز بود (شکل ۳). در روش

ERIC-PCR تعداد قطعات ۹ باند و اندازه قطعات بین ۱۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز و در روش rep-PCR تعداد قطعات ۱۱ باند و اندازه آنها بین ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز بودند (شکل ۳).

بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های جدا شده از لوبیا نشان داد که این استرین‌ها در سطح تشابه ۷۷ درصد به چهار خوشه تقسیم‌بندی شدند؛ به طوری که استرین‌های گروه A شامل ۱۲ استرین حاصل از مناطق بناب و میاندوآب بود. استرین‌های جدا شده از منطقه بناب همگی با سه روش BOX، ERIC و rep-PCR الگوی کاملاً مشابهی را ایجاد کردند و با استرین‌های جدا شده از منطقه میاندوآب در سطح تشابه ۷۸ درصد گروه جداگانه‌ای تشکیل دادند. الگوی ژنتیکی نه استرین جدا شده از منطقه میاندوآب نیز با سه روش ذکر شده یکسان بود که نشان‌دهنده عدم تنوع ژنتیکی استرین‌ها در این منطقه می‌باشد. خوشه B شامل سه استرین جدا شده از مناطق عجب‌شیر و مراغه بود. استرین D19 حاصل از منطقه آذرشهر به تنهایی در خوشه C قرار گرفت و استرین‌های D15، D18، D17 و D20 حاصل از مناطق مراغه و آذرشهر نیز خوشه جداگانه (خوشه D) تشکیل دادند (شکل ۴).

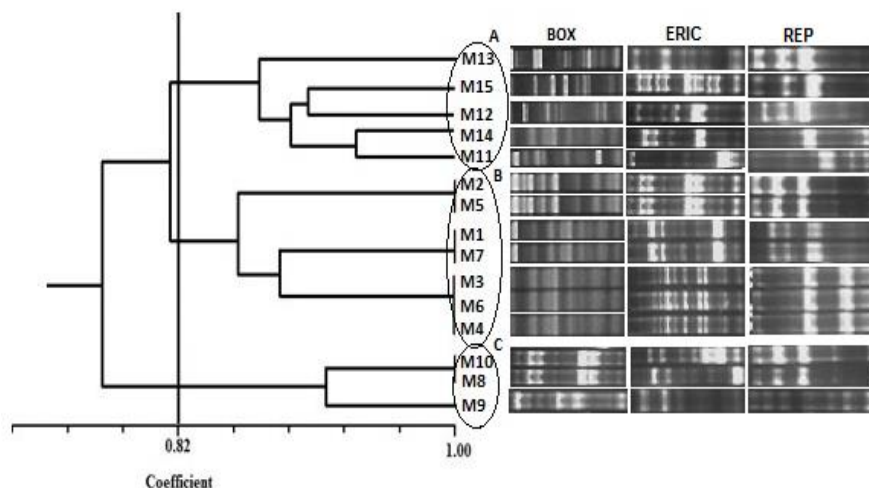


شکل ۴- الگوی نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA ژنومی استرین‌های جدا شده از لوبیا به سه روش rep-PCR، ERIC و BOX و دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی حاصل از تلفیق سه روش، رسم شده با نرم افزار Ntsys.

Fig. 4. The patterns of fragments resulting from the amplification of genomic DNA of strains isolated from beans by three methods rep-PCR, ERIC and BOX and the dendrogram related to the genetic diversity resulting from the combination of the three methods, drawn with Ntsys software.

براساس انگشت‌نگاری ژنتیکی استرین‌های یونجه، تعداد قطعات تولید شده از BOX-PCR روی ژل آگارز ۷ باند و اندازه آنها بین ۱۵۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز بود (شکل ۴). در روش ERIC-PCR تعداد قطعات ۸ باند و اندازه قطعات بین ۱۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز و در روش rep-PCR تعداد قطعات ۹ باند و اندازه آنها بین ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بودند (شکل ۴).

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های جدا شده از یونجه پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به روش BOX، ERIC و rep-PCR، الگوی ژنتیکی آنها پس از تفکیک روی ژل آگارز، با استفاده از نرم‌افزارهای GEL-compare و NTYsys مقایسه و گروه‌بندی شد. نتایج نشان داد که استرین‌ها در سطح تشابه ۸۲ درصد به سه خوشه تقسیم شدند. خوشه A عبارت بود از ۵ استرین M11، M12، M13، M14 و M15 که همگی از منطقه ارومیه جداسازی شده بودند. در خوشه B، چهار استرینی که از منطقه میاندوآب جدا شده بودند، قرار گرفت. این استرین‌ها با استرین‌های خوشه A، در حدود ۸۱ درصد مشابهت داشتند. نهایتاً سه استرین M9، M8 و M10 حاصل از منطقه مراغه در خوشه C قرار گرفتند (شکل ۵).



شکل ۵- الگوی نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA ژنومی استرین‌های جدا شده از یونجه به سه روش BOX، ERIC و rep-PCR و دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی حاصل از تلفیق سه روش، رسم شده با نرم‌افزار Ntsys.

Fig. 5. The patterns of fragments resulting from the amplification of genomic DNA of strains isolated from alfalfa by the three methods BOX, ERIC and rep-PCR and the dendrogram related to the genetic diversity resulting from the combination of the three methods, drawn with Ntsys software.

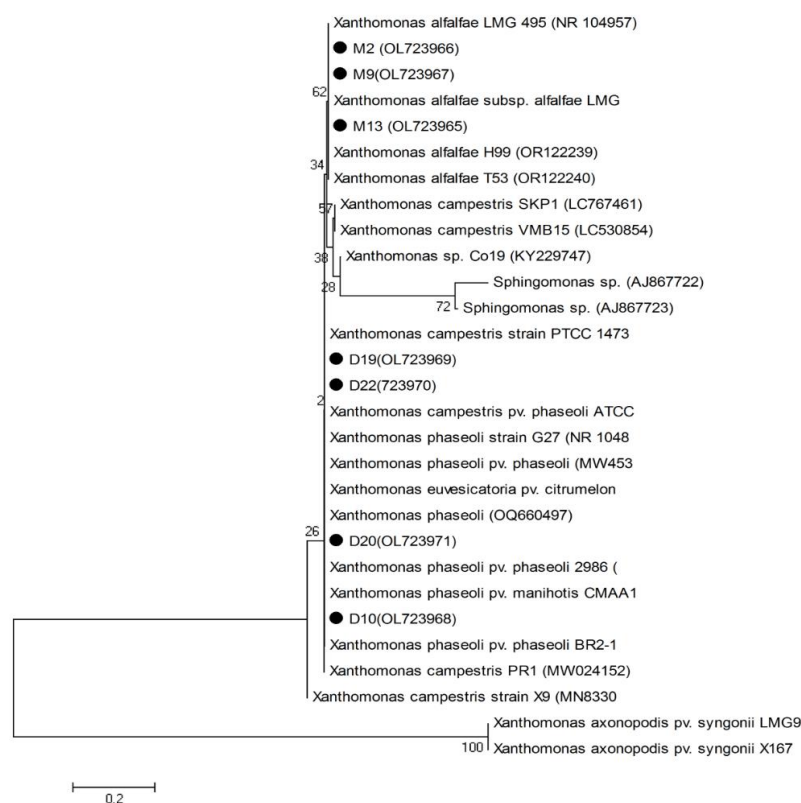
پیشرفت‌های اخیر در زمینه زیست‌شناسی مولکولی، شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها را تسهیل و تسریع کرده است که از جمله این روش‌ها می‌توان به هیبریداسیون DNA-DNA، هیبریداسیون DNA-RNA و توالی‌یابی ژنومی اشاره کرد (Vauterin et al., 1995؛ Martins et al., 2020). همچنین روش‌هایی مبتنی بر انگشت‌نگاری ژنومی و آنالیز داده‌های کامپیوتری، در طبقه‌بندی استرین‌های زانتوموناس موفقیت‌آمیز بوده‌اند (Jiang et al., 2020؛ Timilsina et al., 2020). علاوه بر موارد ذکر شده، روش rep-PCR روشی سریع، قابل تکرار و تا حدودی آسان برای بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های زانتوموناس است (Barionovi and Scortichini, 2006).

بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های جدا شده از لوبیا نشان داد که این استرین‌ها در روش rep-PCR دارای تنوع کمی هستند؛ به طوری که استرین‌های جدا شده از استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند و استرین‌های جدا شده از مناطق نزدیک به هم الگوی ژنتیکی تقریباً یکسانی داشتند که این امر ممکن است به دلیل یکسان بودن اینوکولوم اولیه در آلودگی گیاهان لوبیا مبتلا به بیماری باشد. نتایج این تحقیق با یافته‌های Zamani et al. (2011) مطابقت دارد. این محققین تنوع ژنتیکی استرین‌های عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا را در بخش‌هایی از استان‌های مرکزی، لرستان و اصفهان با روش‌های rep-PCR و PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند که استرین‌های عامل بیماری دارای تنوع کمی هستند (Zamani et al., 2011). در اسپانیا، تنوع ژنتیکی استرین‌های عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا با استفاده از روش‌های RAPD-PCR و rep-PCR مورد بررسی قرار گرفته و تنوع کمی بین استرین‌های مذکور گزارش شد (Lopez et al., 2006). این در حالی است که تنوع ژنتیکی بین استرین‌های لوبیا قبلاً در تحقیقات سایر کشورها گزارش شده است (Alexander et al., 2004). در بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های عامل بیماری لکه‌باکتریایی یونجه، مشاهده گردید که شباهت بالای ژنتیکی بین استرین‌های جدا شده از مناطق ارومیه، میاندوآب و مراغه وجود دارد؛ به طوری که در دندروگرام رسم شده این شباهت بالای ۸۲ درصد بود. لذا می‌توان این‌گونه استنباط کرد که منشأ اولیه بیماری از یک منطقه می‌باشد. و در نتیجه در مدیریت بیماری باید این نکته را مد نظر قرار داد تا از ورود بیماری به منطقه جدید اجتناب گردد. علی‌رغم تنوع پایین استرین‌ها در روش rep-PCR، ملاحظه گردید که از بین سه روش، روش ERIC-PCR در نشان دادن تنوع بین استرین‌ها نسبت به دو نشانگر دیگر (BOX و rep-PCR) از کارایی بیشتری برخوردار است؛ به طوری که درصد چند شکلی محاسبه شده با این نشانگر بیشتر از دو نشانگر دیگر بود (۷۶/۶۹). تحقیقات نشان داده است که

روش rep-PCR در نشان دادن تنوع ژنتیکی بین استرین‌های گونه‌های مختلف زانتوموناس از کارایی خوبی بهره‌مند است (Rademaker *et al.*, 2000; Vancheva *et al.*, 2021).

توالی‌یابی ژن *16S rRNA*

به منظور شناسایی ژنوتیپی استرین‌ها، ژن *16S rRNA* نماینده‌ای از استرین‌ها بر اساس گروه‌بندی rep-PCR تکثیر شد و قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی روی ژل آگار نمایان گردید. توالی‌یابی ژن‌ها توسط شرکت تکاپوزیست انجام شد. نتایج توالی‌یابی ژن *16S rRNA* استرین‌های لوبیا و یونجه و مقایسه آنها با دیگر استرین‌های ثبت شده در بانک ژن NCBI نشان داد که استرین‌های M2، M9 و M13 جداسازی شده از یونجه به ترتیب با ۹۹/۶، ۹۹/۴ و ۹۹/۲ درصد به استرین استاندارد *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* شبیه بودند. این در حالی است که استرین M12، ۹۱ درصد به استرین *X. campestris* و استرین M7، ۹۶ درصد به استرین *Xanthomonas* sp. شبیه بودند. توالی استرین‌های مورد نظر در بانک ژن ثبت شد و شماره دسترسی آنها در شکل ۶ ارائه شده است. همچنین استرین‌های D10، D19، D20 و D22 جدا شده از میزبان لوبیا با درصد تشابه ۹۹/۲-۹۹/۵ به استرین استاندارد *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* شبیه بودند. بر اساس توالی‌یابی ژن *16S rRNA* استرین D21 با ۹۷ درصد تشابه به گونه *Xanthomonas vesicatoria*، استرین D10 به استرین *Xanthomonas* sp. ۹۸ درصد شباهت داشت. استرین‌های D16 و D17 نیز با درصد‌های پایین به جنس‌های *Pseudomonas* و *Curtobacterium* شبیه بودند. درخت فیلوژنتیکی استرین‌های لوبیا و یونجه در مقایسه با دیگر توالی‌های ثبت شده در بانک ژن از کشورهای دیگر در شکل ۶ رسم شده است.

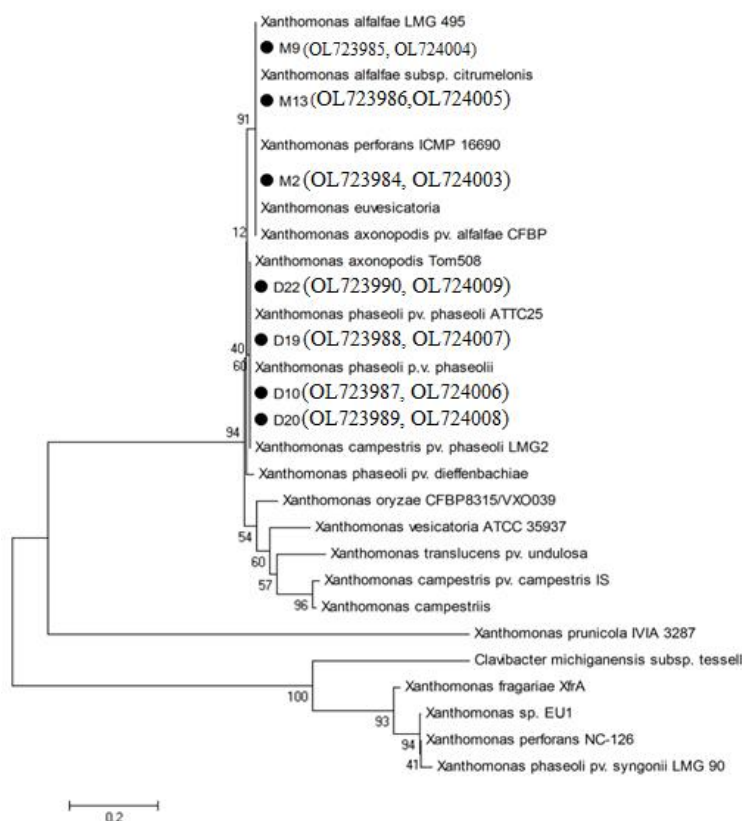


شکل ۶- دندروگرام حاصل از مقایسه توالی ژن *16S rRNA* استرین‌های جدا شده از لوبیا و یونجه با باکتری‌های موجود در بانک ژن، رسم شده با نرم‌افزار MEGA6. جدایه‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر با دوایر سیاه مشخص شده‌اند و شماره دسترسی و ثبت شده آنها در بانک ژن داخل پارانترز ذکر گردیده است.

Fig 6. Dendrogram resulting from the comparison of the *16S rRNA* gene sequence of strains isolated from beans and alfalfa with the bacteria in the gene bank, drawn with MEGA6 software. The isolates used in this research are marked with black circles and their access and registered numbers in the gene bank are mentioned in parentheses.

توالی‌یابی ژن‌های خانه‌داری

نتایج توالی‌یابی ژن‌های *gyrB* و *rpoD* استرین‌های لوبیا و یونجه و درخت فیلوژنتیکی آنها در شکل ۷ نشان داده شده است. استرین‌های جدا شده از یونجه (M9، M13، M2) که به ترتیب از مناطق میاندوآب، مراغه و ارومیه جداسازی شده بودند، در یک کلاستر همراه با چند استرین استاندارد از جمله *A. alfalfae* subsp. *alfalfae* با شماره دسترسی LMG495، ICMP16690 *X. perforans* و *X. alfalfae* subsp. *citromelonis* قرار گرفتند (شکل ۷). همچنین استرین‌های D19، D20، D22، D10 و D10 که از مناطق بناب، آذرشهر و عجب‌شیر جداسازی شده بودند، با استرین استاندارد *X. phaseoli* pv. *Phaseoli* ATTC2563 در یک کلاستر جداگانه قرار گرفتند (شکل ۷).



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی استرین‌های جدا شده از لوبیا و یونجه در مقایسه با دیگر استرین‌های ثبت شده در بانک ژن بر اساس توالی ژن‌های *gyrB* و *rpoD* جدایه‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر با دایر سیاه رنگ مشخص شده‌اند و شماره دسترسی و ثبت شده آنها در بانک ژن داخل پارانتر ذکر گردیده است.

Fig. 7. Phylogenetic tree of strains isolated from beans and alfalfa compared to other strains recorded in the gene bank based on *gyrB* and *rpoD* gene sequences. The isolates used in this research are marked with black circles and their access and registered numbers in the gene bank are mentioned in parentheses.

توالی‌یابی ژن *16S rRNA* نشان داد که استرین‌های جدا شده از لوبیا به استرین *Xanthomonas campestris* PTCC1473 و همچنین استرین‌های *X. phaseoli* PR2 و *X. phaseoli* BR1 که از کشورهای اسپانیا و صربستان جداسازی شده بودند، شبیه بوده و در یک گروه قرار گرفتند. نماینده استرین‌های لوبیا در تحقیق حاضر با استفاده از توالی‌یابی ژن‌های خانه‌داری (*gyrB* و *rpoD*) به استرین *X. phaseoli* pv. *phaseoli* ATTC2563 شباهت داشتند که این امر نشان‌دهنده کارایی توالی‌یابی چندژنی (MLST) در شناسایی و تعیین جایگاه فیلوژنتیکی استرین‌های این گونه دارد. گرچه در منابع، دو گونه *X. citri* pv. *fuscans* و *X. phaseoli* pv. *phaseoli* به‌عنوان عامل بیماری بلایت معمولی لوبیا ذکر شده است (Chen et al., 2021؛ Alavi et al., 2008)، ولی در این تحقیق فقط گونه *X. phaseoli* pv. *phaseoli* به‌عنوان عامل بیماری در استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی جداسازی و شناسایی گردید. اخیراً ضمن بررسی

نه استرین مختلف از گونه‌های مذکور که عامل بیماری بلایت باکتریایی در کشورهای مختلف بوده و با توالی‌یابی ژن‌های خانه‌داری، این دو گونه نزدیک به هم معرفی شده‌اند (Gaudin *et al.*, 2023).

در تحقیق حاضر بررسی توالی ژن *I6S rRNA*، نماینده استرین‌های جدا شده از یونجه بالای ۹۹ درصد به استرین استاندارد *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* LMG495 و همچنین استرین‌های *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* H99 و *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* T53 که از کشور چین جداسازی و شناسایی گردیده بودند، مشابهت داشته و در درخت فیلوژنتیکی رسم شده در یک خوشه قرار گرفتند. در حالی که در توالی‌یابی ژن‌های خانه‌داری، استرین‌های یونجه به گونه‌های *X. alfalfae* subsp. *citromelonis* و *X. perforans* ICMP16690، *A. alfalfae* subsp. *alfalfae* LMG495 شبیه بوده و در یک کلاستر قرار گرفتند. بنابراین می‌توان گفت بر اساس مجموع روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، عامل ایجاد بیماری لکه‌باکتریایی یونجه در استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی گونه *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* می‌باشد که از نظر ژنتیکی نزدیک به باکتری‌های *X. perforans* و *X. alfalfae* subsp. *citromelonis* قرار می‌گیرد. این باکتری از آنجایی اهمیت دارد که قبلاً به‌عنوان عامل بیماری از میزبان‌های دیگر از جمله لوبیا، باقلا و نخودفرنگی جداسازی و شناسایی گردیده است (Jacques *et al.*, 2013؛ Stuteville and Sorensen, 1966). به همین جهت لازم است از شیوع و گسترش این بیماری در مزارع یونجه جلوگیری گردد تا از وارد آمدن به دیگر میزبان‌ها جلوگیری شود. سه گونه *X. alfalfa*، *X. euvesicatoria* و *X. perforans* بر اساس آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی قبلاً به‌عنوان گونه‌های نزدیک به هم معرفی شده‌اند (Parkinson *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر مشاهده گردید که استرین‌های جدا شده از یونجه بر اساس توالی‌یابی ژن‌های *gyrB* و *rpoD* با گونه‌های دیگر قرابت ژنتیکی دارد. این نتایج با یافته‌های (Almeida *et al.*, 2010؛ Parkinson *et al.*, 2007) مطابقت دارد. این محققین بر اساس توالی‌یابی ژن *gyrB*، نشان دادند که سه گونه *X. alfalfa*، *X. euvesicatoria* و *X. perforans* تشابه صددرصدی دارند. بر اساس توالی‌یابی ژن‌های خانه‌داری استرین‌های عامل بیماری لکه‌باکتریایی یونجه در استان‌های جنوبی کشور، گونه *X. alfalfae* معرفی گردید. تحقیقات نشان داده است که استفاده از ترکیبات مسی در کنترل این بیماری نقش مهمی دارد و می‌توان از آن در جهت مدیریت بیماری کمک گرفت (Yaripour *et al.*, 2018). با توجه به چند میزبان بودن باکتری مذکور، و همچنین بر اساس نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه در کشورهای دیگر می‌توان به کشاورزان توصیه کرد تا با رعایت بهداشت مزرعه و استفاده از ترکیبات مسی، بیماری را مدیریت کرده تا از انتشار آن به مزارع و مناطق دیگر و همچنین محصولات دیگر جلوگیری نمایند.

References

منابع

- لک، م. ر.، شمس‌بخش، م. و بهار، م. ۱۳۷۲. وقوع بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا در استان مرکزی. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۹۹۵.
- لک، م. ۱۳۹۷. بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا و روش‌های مدیریت آن. دستورالعمل فنی. مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور. ۱۶ صفحه.
- یاری‌پور، ز.، تقوی، م.، اسداغی، ا. و زارعی، ص. ۱۳۹۷. اولین گزارش از وقوع لکه‌باکتریایی یونجه ناشی از *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* در ایران. بیست و سومین کنگره گیاهپزشکی ایران. شیراز. صفحه ۲۳۸.
- Adriko, J., Mbega, E.R., Mortensen, G., Wulff, E., Tushemereirwe, W., Kubiriba, J. and Lund, O. 2014. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. European Journal of Plant Pathology 138: 293-306.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology, 5th edition. Academic Press, 635 pp.
- Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C. and Poussier, S. 2008. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by

- multiple suppression subtractive hybridizations. *Applied and Environmental Microbiology* 74(10): 3295–3301.
- Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C.R., Morris, C.E., Schaad, N.W., Schuenzel, E.L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J.B., Castillo, J.A., Bull, C.T., Leman, S., Guttman, D.S., Setubal, J.C. and Vinatzer, B.A. 2010.** PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* 100: 208–215.
- Alexander, B.C., Mkandawire, R.B., Mabagala, P.G., Gepts, P. and Robert, L. 2004.** Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Bacteriology* 19: 27-35.
- Bradbury, J.F. 1981.** *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae*. IMI Description of Fungi and Bacteria. CAB International. <https://doi.org/10.1079/DFB/20056400698>.
- Barionovi, D. and Scortichini, M. 2008.** Integron variability in *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains. *FEMS Microbiology Letters* 288: 19–24.
- Chen, N.W.G., Ruh, M., Darrasse, A., Foucher, J., Briand, M., Costa, J., Studholme, D.J. and Jacques, M.A. 2021.** Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence. *Molecular Plant Pathology* 22: 1464–1480.
- Gaudin, C., Gihaut, C., Briand, M., Marques, S.A., Marisa, A.S.V. and Chen, W.G. 2023.** Whole genome sequences of nine *Xanthomonas* strains responsible for common bacterial blight of bean. *Microbiology Resource Announcements* 12(3): e01259-22.
- Gilbertson, R.L. and Maxwell, D.P. 1992.** Common bacterial blight of bean. Pp: 18-39. In: Chaub, H.C., Singh, U.S. and Mukhopadhyay, A.N. (eds.). *Plant Diseases of International Importance, Vol. II. Diseases of Vegetables and Oil Seed Crops*. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Giovanardi, D., Dallai, D. and Stefani, E. 2017.** Population features of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* from *Prunus* spp. orchards in northern Italy. *European Journal of Plant Pathology* 147: 761-771.
- Heidari, A. and Khodakaramian, G. 2011.** Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* inducing alfalfa wilt disease using specific PCR and physiological methods in Iran. *Research Journal of Chemistry and Environment* 15: 486–491.
- Ivanović, Z., Popović, T., Janse, J., Kojić, M., Stanković, S., Gavrilović, V. and Fira, D. 2015.** Molecular assessment of genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains from Serbia by various DNA fingerprinting techniques. *European Journal of Plant Pathology* 141: 133–145.
- Jacques, M.A., Bolot, S., Charbit, E., Darrasse, A., Briand, M., Arlat, M., Gagnevin, L., Koebnik, R., Noël, L.D., Portier, P., Carrère, S. and Boureau, T. 2013.** High-quality draft genome sequence of *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* strain CFBP 3836. *Genome Announcements* 1(6): e01035–13.
- Jiang, S., Balan, B., Assis, R.A.B., Sagawa, C.H.D. and Wan, X. 2020.** Genome-wide profiling and phylogenetic analysis of the SWEET sugar transporter gene family in walnut and their lack of responsiveness to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* infection. *International Journal of Molecular Science* 21(4): 1251.
- Leyns, F.M.D., Cleene, J. and Swings, J.D. 1984.** The host range of the genus *Xanthomonas*. *Botany Review* 50(3): 308-353.
- López, R., Asensio, C. and Robert, L. 2006.** Phenotypic and genetic diversity in strains of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseolivar. fuscans*) in a secondary center of diversity of the common bean host suggests multiple introduction events. *Bacteriology* 4: 23-35.
- Mafakheri, H., Taghavi, S.M., Banihashemi, Z., Osdaghi, E. and Lamichhane, J.R. 2017.** Pathogenicity, host range and phylogenetic position of *Agrobacterium* species associated with sugar beet crown gall outbreaks in Southern Iran. *European Journal of Plant Pathology* 147: 721–730.
- Martins, L., Fernandes, C., Blom, J., Dia, N.C., Pothier, J.F. and Tavares, F. 2020.** *Xanthomonas euroxanthea* sp. nov., a new xanthomonad species including pathogenic and non-pathogenic strains of walnut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 6024–6031.
- Mhedbi-Hajri, N., Hajri, A., Boureau, T., Darrasse, A., Durand, K., Brin, C., Fischer-Le Saux, M., Manceau, C., Poussier, S., Pruvost, O., Lemaire, C. and Jacques, M.A. 2013.** Evolutionary history of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas axonopodis*. *PLoS ONE* 8(3): e58474.
- Osdaghi, E., Taghavi, S.M., Fazliarab, A., Elahifard, E. and Lamichhane, J.R. 2015.** Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: An emerging bacterial pathogen in Iran. *Crop Protection* 78: 185–192.
- Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. and Stead, D. 2007.** Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2881–2887.

- Parraguirre-Lezama, C., Arenas O.R., Valencia de Ita, M.A., Rivera, A., Villa-Ruano, N. and Gutiérrez, A.M. 2021.** First report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as the causal agent of necrotic leaf spot in *Phaseolus vulgaris* at Puebla, Mexico. *Plant Disease* 105: 12-15.
- Rademaker, J.L., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. and de Bruijn, F.J. 2000.** Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2): 665-677.
- Rohlf, F.J. 1993.** Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System NTSys-PC Version 1.80 Exeter Software. New York.
- Rouhrazi, K. and Rahimian, H. 2012.** Characterization of Iranian grapevine isolates of *Rhizobium (Agrobacterium)* spp. *Journal of Plant Pathology* 94: 555-560.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001.** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathology Society Minnesota, 373 pp.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacey, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K. and Vidaver, A.K. 2007.** List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 893-897.
- Stuteville, D.L. and Sorensen, E.L. 1966.** Distribution of leaf spot and damping-off (*Xanthomonas alfalfae*) of alfalfa in Kansas, and new hosts. *Plant Disease Reporter* 50: 731-734.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular and Biology Evolution* 30: 2725-2729.
- Taran, B., Michaels, T.E. and Pauls, K.P. 2001.** Mapping genetic factors affecting the reaction to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* L. under field conditions. *Genome* 44: 1046-1056.
- Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A., Liyanpathirange, P., Bocardo, F.I., White, F.F., Goss, E.M., and Jones, J.B. 2020.** *Xanthomonas* diversity, virulence and plant-pathogen interactions. *Natural Review Microbiology* 18: 415-427.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lanem, D.J. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Vancheva, T., Bogatzevska, N., Moncheva, P., Mitrev, S., Vernière, C. and Koebnik, R. 2021.** Molecular epidemiology of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from the Balkan Peninsula revealed by a new multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis scheme. *Microorganisms* 9(3): 536.
- Vauterin, L., Hoste, B., and Korsters, S.L. 1995.** Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472-489.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J.R. 1991.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Research* 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994.** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology* 5: 25-40.
- Zamani, Z., Morid, B., Jacques, M., Lak, M. and Akhavan, A. 2011.** Genetic diversity of the common bacterial blight pathogen of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, in Iran revealed by rep-PCR and PCR-RFLP analyses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2371-2378.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S. 2000.** Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology (Reading)* 146(10): 2385-2394.
- Yaripour, Z., Taghavi, M., Osdaghi, E. and Lamichhane, J. 2018.** Host range and phylogenetic analysis of *Xanthomonas alfalfae* causing bacterial leaf spot of alfalfa in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 150: 267-274.
- Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G. and Robbs, C.F. 1978.** A Proposed Nomenclature and Classification for Plant Pathogenic Bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21: 153-177.

Genotypic identification and investigation of intra-species diversity of *Xanthomonas* pathogenic isolates from bean and alfalfa hosts in East and West Azerbaijan provinces

F. Nosratnejhad¹, S. Nematollahi^{2*} and K. Rouhrazi²

Received: 9 Jun, 2023

Accepted: 18 Aug., 2023

ABSTRACT

In order to isolate pathogenic bacteria from the hosts of bean and alfalfa, 140 bacterial isolates were cultured and purified on NA medium in East and West Azerbaijan provinces. Based on the color and appearance of the colonies, the isolates that were close to the desired *Xanthomonas* bacteria were selected. After re-cultivation and purification, a total of 62 isolates were obtained. To perform the pathogenicity test of the isolates, each of them was inoculated individually to its host and kept in greenhouse conditions for two weeks. 33 strains were able to cause pathogenicity on the host. The strains were able to amplify the 239 bp fragment of *Xanthomonas* specific gene, which is part of the *ITS* gene. Therefore, these strains were considered as *Xanthomonas* bacteria. Based on genetic fingerprinting by rep-PCR method, the strains isolated from bean and alfalfa was divided into four and three groups, respectively, which results indicated genetic diversity between the strains. Based on the sequencing of *16S rRNA*, *gyrB* and *rpoD* genes, the strains isolated from alfalfa were identified as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* and bean strains were identified as *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. By reviewing the available sources, the present research is the first report of the isolation, identification and genetic diversity of these strains from bean and alfalfa hosts in East and West Azerbaijan provinces.

Key words: East Azerbaijan, West Azerbaijan, bean, alfalfa, genetic diversity, *Xanthomonas*

1. Ph.D. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Corresponding author: Nematollahi2001@yahoo.com