علوم و تحقیقات بذر ایران
سال هفتم/ شماره اول/ ۱۳۹۹ (۷۷ - ۶۹)

DOI: 10.22124/jms.2020.4318

ردیابی *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* و استفاده از روش بهینه‌شده در پایش سلامت توده‌های بذری لوبیا

کبری مسلم‌خانی[1*]، لیلا زارع[2]، نیما خالدی[3]، لیلا فراهانی[2]، شهلا هاشمی فشارکی[2]، فرشید حسنی[1]، بابک درویشی[1]

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۹

چکیده

بیماری سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا با عامل *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* از بیماری‌های مهم بذرزاد لوبیا در اکثر مناطق کشت دنیا محسوب می‌شود. استفاده از بـــذر سالم و گواهی‌شده از راهکارهای اصلی مقابله با گسترش این بیماری به شمار می‌رود، لذا ارزیابی سلامت بذور در بسیاری از کشورها به‌صورت روتین در برنامه‌های گواهی انجام می‌شود. در تحقیق حاضر آزمون‌های تشخیصی کشت روی محیط انتخابی، PCR و بیماری‌زایی بر روی رقم حساس خمین برای ردیابی باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* بهینه‌سازی شد. این روش‌های بهینه‌شده برای بررسی سلامت پارت‌های بذری لوبیا استفاده شدند. نتایج نشان داد که استفاده از روش کشت روی محیط انتخابی پیش از آزمون PCR، به‌میزان زیادی خطای تمایز کلنی‌های مشابه غیر هدف از کلنی‌های بیماری‌زای باکتری را کاهش می‌دهد. همچنین انجام آزمون PCR روی کلنی‌های مشکوک جداشده از محیط‌های انتخابی در مقایسه با PCR بر روی عصاره بذر به‌دلیل حذف ممانعت‌کننده‌های گیاهی به‌میزان بسیار زیادی، امکان واکنش کاذب دروغین را کاهش می‌دهد. روش‌های مذکور برای بررسی سلامت نمونه‌های بذری منتخب از مزارع بذری استاندارد با موفقیت استفاده شد و نتایج حاکی از احراز سلامت بذور و عدم آلودگی به باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در توده‌های بذری منتخب گواهی‌شده کشور است.

واژه‌های کلیدی: باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*، سلامت بذر، لوبیا

۱- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- محقق، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳- دکترای بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان رضوی، مشهد، ایران
*نویسنده مسئول: moslemkhany@yahoo.com

مقدمه

باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* یک باکتری بذرزاد است که باعث ایجاد بیماری بلایت معمولی لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) می‌شود. این بیماری از مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت در تولید تجاری لوبیا در جهان به‌ویژه در مناطق گرمسیر به شمار می‌رود (Koike *et al*., 2007; Coyne *et al*., 2003). بیماری مذکور باعث کاهش کمی و کیفی محصول لوبیا بین ۱۰ تا ۴۰ درصد بسته به حساسیت رقم و شرایط محیطی می‌گردد (Saettler, 1989). در حال حاضر این بیماری در ایران نیز از اهمیت بالایی در مناطق تولید لوبیا برخوردار است و بیماری از استان‌های مرکزی، لرستان، اصفهان و چهارمحال بختیاری گزارش شده است (Lak *et al*., 2002; Osdaghi *et al*., 2010). برای محدودنمودن توسعه بیماری‌های مختلف از جمله بلایت معمولی لوبیا، تولید بذر در مناطق خاص با ویژگی‌های مشخص با توجه به استانداردهای ملی کشور و تحت نظارت مستقیم بازرسین فنی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام می‌شود. از طرفی آلودگی‌های سطحی بذر، مهم‌ترین منبع اینوکلوم اولیه بیماری است. تقریباً یک بذر آلوده در ۱۰ هزار عدد می تواند باعث ظهور بیماری در مزرعه شود و وجود ۱۰۰۰ سلول باکتری در بذر، حداقل جمعیت مورد نیاز باکتری برای ایجاد بیماری در گیاه به‌شمار می‌رود (Weller and Saettler, 1980). لذا استفاده از بذر سالم یکی از مهم‌ترین راه‌های پیشگیری از توسعه بیماری است. استفاده از آزمون‌های تشخیصی مناسب برای پایش سلامت نمونه‌های بذری جزو راهکارهای کنترلی با اهمیت این بیماری هستند. استفاده از روش محیط کشت نیمه انتخابی یکی از روش‌های پرکاربرد در ردیابی این بیماری معرفی شده است (Remeeus and Sheppard, 2006). البته دقت این روش به‌میزان بسیار زیادی به مهارت اشخاص در تشخیص صحیح ایزوله‌های بیماری‌زای باکتری بر می‌گردد و به‌دلیل تشابه برخی گونه‌های باکتری احتمال تصمیم‌گیری اشتباه دور از تصور نمی‌باشد. از طرفی به کارگیری آزمون بیماری‌زایی می‌تواند راهگشای مناسبی برای حصول اطمینان از تشخیص صحیح ایزوله‌ها باشد اما با توجه به زمان‌بر بودن آن (به‌مدت ۲ هفته) نمی‌تواند در تعداد زیاد در سیستم کنترل و گواهی سلامت به‌کار گرفته شود. استفاده از روش PCR برای ردیابی این باکتری به‌عنوان یک روش سریع و تخصصی در دنیا مورد توجه قرار دارد (Audy *et al*., 1994; Audy *et al*., 1996; Molouba *et al*., 2001). با وجود فواید قابل تامل این روش، دو اشکال اصلی استفاده مستقیم آن را برای پایش سلامت نمونه‌های بذری با مشکل مواجه می‌سازد. یکی عدم ارائه نتایج کمی است، (این نوع نتایج در تعیین سطح آلودگی نمونه بذری و تصمیم‌گیری برای رد یا قبول آن نمونه حائز اهمیت است) و ایراد دیگری که برای استفاده مستقیم این آزمون وارد است احتمال وجود واکنش منفی دروغین به‌دلیل ممانعت‌کننده‌ها و آلودگی‌های نمونه بذری است (Van Der Wolf and Schoen, 2004; Tebaldi *et al*., 2010). در تحقیق حاضر تلفیقی از سه روش ذکرشده برای ردیابی آلودگی باکتری در غلظت‌های مختلف و در بذر بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ایزوله باکتری

نمونه‌های بذری گواهی‌شده، ارقام یاقوت (لوبیا قرمز)، حیدری (لوبیا چیتی) و درسا (لوبیا قرمز) از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال جهت ارزیابی سلامت از نظر بیماری بلایت باکتریایی معمولی لوبیا تهیه شدند. همچنین از دو ایزوله باکتری شناسایی‌شده از استان مرکزی (دریافت‌شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی) و فارس (دریافت‌شده از دانشگاه شیراز) جهت بهینه‌سازی روش تشخیص و همچنین به‌عنوان کنترل مثبت در تمام مراحل آزمایشات استفاده شد.

کشت در محیط انتخابی

در تحقیق حاضر از دو محیط کشت نیمه انتخابی MT (Goszczynska and Serfontein, 1998)، XCP1 (McGuire et al., 1986) و نیز YDC به‌عنوان محیط کنترل غیر انتخابی استفاده شد. از معیارهای مهم در تعیین کارایی محیط کشت توجه به توان تفکیک کلنی‌های باکتری بیمارگر از کلنی‌های غیر بیماری‌زا بر اساس مورفولوژی و رنگ کلنی بود. همچنین قابلیت رشد سریع بیمارگر و اجتناب از آلودگی‌های قارچی و باکتریایی که به‌طور معمول در گیاه و بذور لوبیا وجود دارند نیز در تعیین کارآمدی محیط کشت مد نظر قرار گرفت. برای این منظور آزمایشات در چهار تکرار بر روی سه سری رقت از

سوسپانسیون عصاره بذر و سوسپانسیون باکتری انجام شد. از هر نمونه، ۴۰۰۰ عدد بذر برای کشت در چهار تکرار استفاده شد. ابتدا چهار نمونه با حدود ۲۵۰ گرم بذر (وزن تقریبی هزار دانه) تفکیک و هر زیر نمونه با دو و نیم تا سه برابر حجم خود معادل ۷۵۰ میلی‌لیتر بافر نمکی حاوی توئین ترکیب و زیرنمونه‌ها به‌مدت یک شب در دمای یخچال نگهداری شدند. همچنین از کشت ۲۴ ساعته ایزوله‌های استاندارد باکتری به‌عنوان نمونه‌های کنترل برای بهینه‌سازی آزمون استفاده شد. سری رقت‌های یک به ده از عصاره اولیه بذر و باکتری (۱۰۲ cfu/ml تا ۱۰۴) به‌صورت مجزا در بافر استریل نمکی حاوی توئین ۲۰ تهیه شد و روی محیط‌های مذکور به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت کشت گردید. کشت‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸±۲ درجه سلسیوس نگهداری و ظهور، شکل، رنگ و سرعت رشد کلنی‌ها به‌مدت ۱۰ روز به‌صورت دوره‌ای ارزیابی شدند. کلنی‌های مشکوک با مورفولوژی، اندازه و رنگ مشابه ایزوله‌های استاندارد خالص‌سازی شدند و سپس جهت انجام آزمون PCR و تست بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون PCR

به‌منظور استخراج DNA باکتری، سوسپانسیون ایزوله‌های جداشده به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس جوشانده شدند، سپس برای ردیابی *X. axonopodis* pv. *phaseoli* از پرایمرهای اختصاصی p7X4c با توالی 5’ggcaacacccgatccctaaacagg 3’ و p7X4e با توالی 5’ cgccggaagcacgatcctcgaag 3’ استفاده شد (Audy *et al*., 1994). آزمون PCR در واکنش ۲۵ میکرولیتری انجام شد. ۱۲/۵ میکرولیتر بافر (Ampliqon, Denmark Taq 2x Master Mix Red)، ۰/۴ میکرومولار از هر کدام از جفت پرایمرهای p7X4c و p7X4e (یک میکرولیتر از استوک ۱۰ میکرومولار)، چهار میکرولیتر DNA و ۶/۵ میکرولیتر آب در هر واکنش مورد استفاده قرار گرفت.

سیکل دمایی به‌صورت یک سیکل در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت سه دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دو مرحله (یک دقیقه در ۹۴ درجه و دو دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس) و نهایتاً یک سیکل در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته و ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک و نیم درصد حاوی ژل رد الکتروفورز شد. در هر آزمون PCR نمونه‌های کنترل مثبت (ایزوله استاندارد باکتری) و منفی (آب و ایزوله گونه دیگری از *Xanthomonas*) مورد استفاده قرار گرفت.

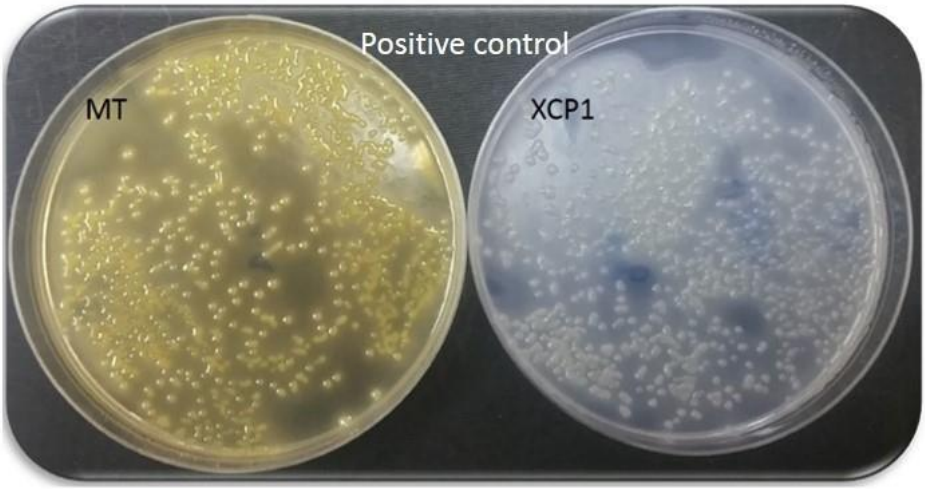
تست بیماری‌زایی

برای تست بیماریزایی از رقم حساس خمین استفاده شد. بذور لوبیا در گلدان‌های کوچک حاوی پیت، پرلیت و خاک در شرایط کنترل‌شده گلخانه کشت شدند. گیاهان در اولین مرحله برگی (تقریباً دو هفته پس از کشت) برای تست بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. سوسپانسیون ایزوله‌های باکتری با غلظت ۱۰۷ cfu/ml (OD $_{600nm}$=0.05) در آب مقطر استریل از کشت ۴۸-۲۴ ساعته باکتری (روی محیط YDC) که در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد یافته، تهیه شد.

برگ‌های اولیه به‌مدت ۳۰ ثانیه در سوسپانسیون باکتری با غلظت یادشده غوطه ور شدند (Darsonval *et al*., 2009). گیاهان تیمارشده در شرایط رطوبت بالای ۹۵ درصد در ۲۸ درجه سلسیوس با ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری و علائم ۵ تا ۱۱ روز پس از آلوده‌سازی (بسته به زمان شروع ظهور علائم) یادداشت برداری شدند.

نتایج و بحث

ایزوله‌های شاهد باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در سری رقت‌های ۱۰۲ تا ۱۰۷ cfu/ml در هر دو محیط کشت نیمه انتخابی MT، XCP1 و محیط کشت غیر انتخابی YDC با جمعیت و سرعت مشابه به‌خوبی رشد نمودند. مورفولوژی تیپیک کلنی‌ها روی محیط کشت MT به رنگ زرد با دو ناحیه هیدرولیز که یک ناحیه شفاف بزرگ مربوط به هیدرولیز کازئین است و ناحیه کوچک شیری مربوط به هیدرولیز توئین ۸۰ مشاهده شد و کلنی‌ها روی محیط XCP1 به رنگ زرد کمرنگ درخشان است که با یک ناحیه هیدرولیزشده نشاسته متمایز شدند (شکل ۱). کلنی‌ها در محیط کشت YDC به رنگ زرد و بدون وجه تمایز خاصی نمایان شد. نتایج در خصوص کشت عصاره بذر و سری رقت‌های آن، قدرت تفکیک بالای محیط‌های نیمه انتخابی به‌ویژه محیط کشت XCP1 نسبت به محیط کشت عمومی YDC را نشان داد.



شکل ۱- مورفولوژی کلنی‌های *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (ایزوله استان مرکزی) در دو محیط XCP1 و MT

Figure 1. Morphology of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* colonies (Markazi isolate) on MT and XCP1 plates

در محیط YDC به‌دلیل عدم وجود آنتی‌بیوتیک یا سایر ممانعت‌کننده‌ها و نیز آلودگی بذور لوبیا به عوامل قارچی و باکتریایی دیگر، جمعیت زیادی از کلنی‌های غیر بیماری‌زا ظاهر می‌شوند که برخی مواقع با سرعت رشد زیاد مانع از رشد مناسب باکتری بیماری‌زا در محیط کشت می‌شوند. در اکثر ارزیابی‌ها خصوصاً در رقت‌های غلیظ‌تر، جمعیت زیاد و متنوع باکتری‌های غیر هدف امکان شمارش تعداد کلنی باکتری هدف را غیر ممکن می‌نمایند. از طرفی نتایج آزمون PCR نشان داد به‌دلیل مورفولوژی غیر تیپ باکتری بیماری‌زای هدف در این محیط، تفکیک آن از ایزوله‌های غیر هدف معمولاً با خطای زیادی همراه است. در خصوص محیط‌های کشت نیمه انتخابی قدرت تفکیک با دقت نسبتاً بالایی صورت گرفت (جدول ۱). تمام کلنی‌های مشکوک و همچنین نماینده‌ای از تمام کلنی-های غیر هدف بر اساس آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج PCR در تمام کلنی‌های متفاوت از نظر ویژگی‌های موروفولوژیک با کلنی‌های هدف منفی شد. اگرچه کشت‌های مختلف نمونه‌های بذری نشان داده که اندازه و رنگ کلنی‌ها ممکن است حتی در یک نمونه متفاوت باشد لذا ارزیابی‌های دقیق کلنی‌های مشکوک در نمونه‌های بذری با استفاده از آزمون‌های تکمیلی ضروری است (Sheppard *et al*., 2007).

جدول ۱- میزان کلنی های مشابه و کلنی‌های غیر هدف ردیابی‌شده از ده نمونه بذری لوبیا در محیط‌های نیمه انتخابی XCP1، MT و محیط غیر انتخابی YDC

Table 1- number of suspect and non-target detected colonies from 10 bean seed samples on sem-selective media XCP1, MT and non-selective media YDC

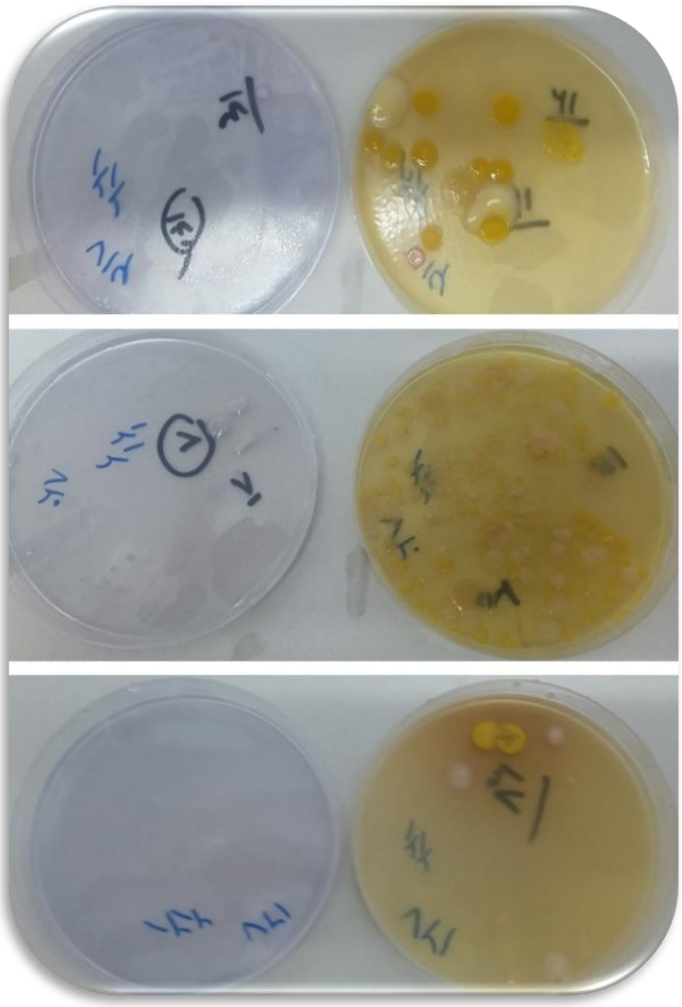
اد کلنی (cfu) حاصل از کشت ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بذر (از ده نمونه بذر و در رقت اول در چهار تکرار) Number of colony forming units in 100 µl of seed extract (from 10 seed samples in first dilution with four replicates)	محیط YDC YDC medium	محیط MT MT medium	محیط XCP1 XCP1 medium
مشابه باکتری هدف suspect colonies	>100	31	5
سایر باکتری‌های غیر هدف non target bacterial colonies	many	147	70

با توجه به ماهیت نیمه انتخابی‌بودن دو محیط کشت انتخاب‌شده، امکان حذف تمام باکتری‌های ساپروفیت موجود در مواد گیاهی وجود ندارد، اگرچه به‌دلیل وجود انواع آنتی‌بیوتیک در آن‌ها رشد بسیاری از میکروارگانیسم-ها در حدی کاهش می‌یابد که امکان رشد بیمارگر فراهم گردد، بنابراین به‌طورکلی امکان رشد کلنی‌های مشابه اما غیر هدف در این محیط‌ها وجود دارد و مهارت افراد در تمایز کلنی‌های هدف اهمیت زیادی دارد (Goszczynska and Serfontein, 1998).

نتایج کشت نمونه بذری مشکوک به آلودگی

در نمونه‌های بذری کشت‌شده روی محیط MT در هر چهار تکرار انواع مختلفی از ایزوله‌های مشابه با باکتری

هدف و غیر مشابه شامل باکتری‌های گرم مثبت و نیز باکتری‌هایی از گونه سودوموناس مشاهده شد درحالی‌که در محیط XCP1 کلنی‌ها از نظر تعداد و تنوع بسیار محدود مشاهده شدند یا اصلاً کلنی روی این محیط رشد نکرد (شکل ۲). تحقیقات نشان داده محیط MT کم‌تر انتخابی است اما از حساسیت خوبی برخوردار است و حتی می‌توان از آن برای ردیابی سایر باکتری‌های سودوموناس بیمارگر نیز استفاده نمود (Remeeus and Sheppard, 2006). گزارشات دیگری بر این ادعا هستند که محیط XCP1 کارایی بیش‌تری در کمی‌سازی و ردیابی *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در نمونه‌های بذری دارند (Tebaldi *et al*., 2007). به‌منظور تشخیص قطعی کلنی‌های مشکوک و مشابه در ادامه از آزمون PCR استفاده شد.



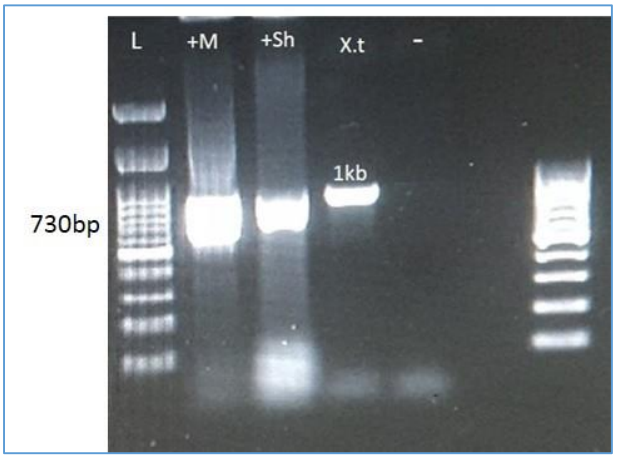
شکل ۲- ظهور انواع کلنی‌های مشابه با کتری هدف و کلنی های غیر هدف در محیط MT (سمت راست) در مقایسه با رشد حداقلی یا عدم رشد کلنی‌ها در محیط XCP1 (سمت چپ)

Figure 2. Appearance of various suspect colonies and non-pathogenic isolates on MT plates (right) in comparison to XCP1 plates with limited growth of colonies (left)

نتایج آزمون PCR

با استفاده از آزمون PCR، باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* با موفقیت ردیابی شد. در نمونه‌های کنترل مثبت قطعه‌ای به اندازه ۷۳۰ bp تکثیر شد و در نمونه کنترل منفی این قطعه تکثیر نشد (شکل ۳). روش PCR به‌دلیل تکثیر قابل توجه قسمتی از ژنوم باکتری بیمارگر هدف به‌عنوان ابزار بسیار مفیدی در ردیابی پاتوژن‌های بذری شناخته شده است و به‌عنوان یک تکنیک قوی در صنعت بذر خصوصاً بذر سبزیجات در آزمایشگاه‌های رسمی سلامت بذر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Munkvold, 2009; Popovic *et al*., 2010). اما از عوامل محدودکننده استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR، واکنش‌های منفی اشتباه در اثر ممانعت‌کننده‌های موجود در عصاره‌های بذری و همچنین ردیابی DNA از

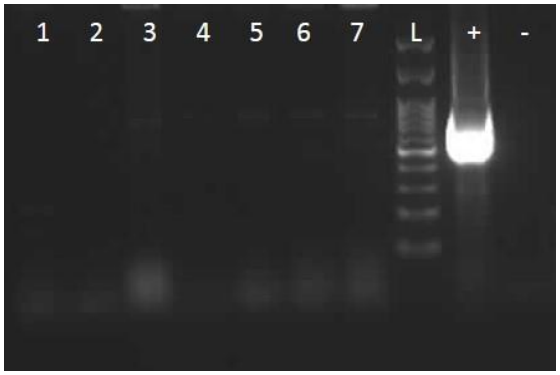
پروپاگول‌های غیر زنده معرفی شده است. استفاده از روش کشت روی محیط انتخابی قبل از انجام روش PCR به‌طور قابل توجهی در رفع مشکلات یادشده مؤثر واقع شده است. در این روش که مشابه آن به نام Bio-PCR شناخته می‌شود، پروپاگول‌های پاتوژن روی محیط کشت تکثیر شده، سپس پاتوژن‌های شسته‌شده از روی محیط کشت بوسیله PCR ارزیابی می‌شوند. این روش به‌صورت موفقیت آمیزی در خصوص ردیابی باکتری پاتوژن بذرزاد *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* نیز در لوبیا مورد استفاده قرار گرفته است (Schaad *et al*., 2007). کشت روی محیط انتخابی به‌همراه PCR ضمن این‌که امکان واکنش منفی دروغین را در این آزمایشات به‌شدت کاهش داد، از تشخیص اشتباه کلنی‌های مشابه باکتری هدف نیز ممانعت به‌عمل آورد.



شکل ۳- محصول PCR تکثیر شده 730bp باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* روی ژل آگاروز. L: نشانگر 100 bp، M+: کنترل مثبت مربوط به ایزوله باکتری جداشده از استان مرکزی، Sh+: کنترل مثبت مربوط به ایزوله باکتری جداشده از استان فارس. X.t: قطعه kb1 تکثیرشده از گونه دیگری از باکتری *Xanthomonas*

Figure 3. PCR product of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* with specific band at 730 bp on agarose gel. L: 100 bp Ladder, M+: positive control belong to Markazi isolate, Sh+: positive control belong to fars isolate. X.t: 1kb band produced with other *Xanthomonas* species

از بین ایزوله‌های مشکوک جداشده از دو محیط کشت MT و XCP1 هیچکدام از ایزوله‌ها در آزمون PCR به‌عنوان باکتری هدف شناسایی نشدند و نتایج حاکی از عدم آلودگی نمونه‌های بذری ارزیابی‌شده به باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* بود (شکل ۴).

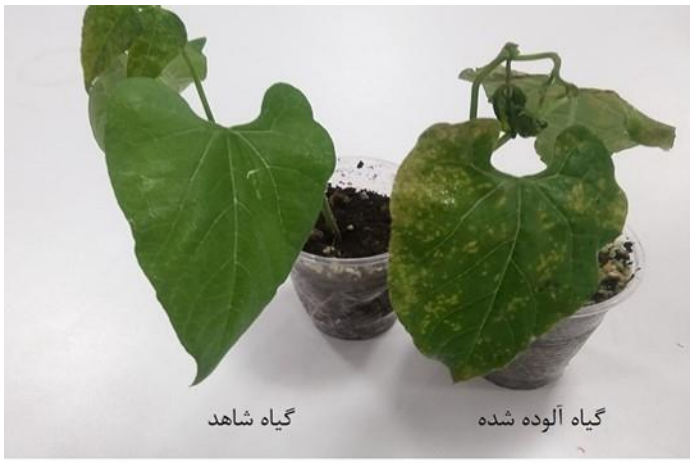


شکل ۴- عدم ردیابی باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* در توده‌های بذری ارزیابی‌شده از ارقام یاقوت، حیدری و درسا (با استفاده دو روش کشت و آزمون PCR برروی ایزوله‌های مشکوک) (شماره‌های ۱ تا ۷). L: نشانگر 100 bp، +: کنترل مثبت ایزوله مرکزی، -: کنترل منفی

Figure 4. No detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* from seed lots of Yaghoot, Heidari and Dorsa (using two methods, culture and PCR on suspected colonies) . L: 100 bp Ladder, +: positive control of Markazi isolate, -: negative control

برای اطمینان از نتایج، برخی ایزوله‌های مشکوک و ایزوله‌های کنترل مثبت برای تست بیماری‌زایی نیز مورد استفاده قرار گرفتند. در نتایج بیماری‌زایی، باکتری کنترل مثبت علائم مشخصی از بیماری را ایجاد نمود و کنترل

منفی و سایر ایزوله‌های مشکوک قادر به ایجاد علائم تیپیک بیماری نبوده‌اند (شکل ۵).



شکل ۵- آزمون بیماری‌زایی با باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* و ظهور علائم بیماری روی لوبیا رقم حساس خمین

Figure 5. pathogenicity test of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and appearance of disease symptoms on Khomein susceptible cultivar

از آن‌جایی که تحقیقات نشان داده‌اند آلودگی بذور لوبیا به باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* باعث کاهش وزن و قدرت جوانه‌زنی بذور می‌شود (Valarini and Menten, 1992). لذا بوجاری و حذف بذور چروکیده حاصل از مزارع بیمار در کاهش آلودگی بذر به عامل بیماری بلایت باکتریایی معمولی لوبیا بسیار تاثیرگذار است. در مجموع از آن‌جایی که بذور بررسی‌شده از منشاء مزارع بذری لوبیا نمونه‌برداری شده‌اند، به نظر می‌رسد، رعایت کامل اصول بهداشتی، رعایت حداقل تناوب دو ساله، حذف و مبارزه با علف‌های هرز و حذف کامل و مبارزه با بیماری‌های بذرزاد، استفاده از آبیاری قطره‌ای (Koike *et al*., 2007) باعث کاهش چشمگیر وقوع بیماری‌های مهمی نظیر بلایت باکتریایی معمولی لوبیا شده است، لذا اجرای قوانین مندرج در استانداردهای ملی بذر لوبیا در کاهش آلودگی‌های بذرزاد و ارتقاء کیفی و کمی بذور تولیدشده بسیار کارآمد بوده است. روش‌های تشخیصی دقیق و تکرارپذیر بهینه‌شده برای اولین بار در کشور در تعیین سلامت بذور جهت ارائه گواهی سلامت به‌کار گرفته شد. استفاده از بذور گواهی‌شده سالم ضمن این‌که می‌تواند منجر به کنترل مؤثر توسعه بیماری در سطح کشور شود در کاهش خسارات ناشی از بیماری‌های بذرزاد و افزایش محصول با کیفیت نیز حائز اهمیت می‌باشد (Choudhury *et al*., 2017).

تشکر و قدردانی

نگارندگان از مسئولین مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

Audy, P., Braat, C.E., Saindon, G., Huang, H.C. and Laroche, A. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. Phytopathology, 86: 361-366. **(Journal)**

Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H.C. and Gilbertson, R.L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. phaseoli var. fuscans, using the polymerase chain reaction. Phytopathology, 84: 1185-1192. **(Journal)**

Choudhury, R.A., Garrett, K.A., Klosterman, S.J., Subbarao, K.V. and McRoberts, N. 2017. A Framework for Optimizing Phytosanitary Thresholds in Seed Systems. Phytopathology, 107:1219-1228. **(Journal)**

Coyne, D.P., Steadman, J.R., Godoy-Lutz, G., Gilbertson, R., Arnaud-Santana, E., Beaver, J.S. and Myers, J.R. 2003. Contribution of bean/cowpea CRSP to management of bean diseases. Field Crops Research, 82: 155-168. **(Journal)**

Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S. and Jacques, M.A. 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seeds of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. Molecular Plant-Microbes Interactions, 22: 747–757. **(Journal)**

Goszczynska, T. and Serfontein, J.J. 1998. Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Journal of Microbiological Methods, 32: 65-72. **(Journal)**

Koike, S.T., Gladders, P., and Paulus, A.O. 2007. Vegetable diseases: a color handbook. San Diego: Academic Press. Vegetable Diseases: A Color Handbook. Manson Publishing Ltd., London, 448 pp. **(Book)**

Lak, M.R., Shams-Bakhsh, M. and Bahar, M. 2002. Identification of the bacterial agent of bean leaf and pod blight in Markazi province. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resource, 6: 231- 243. **(Journal)**

McGuire, R.G., Jones, J.B. and Sasser, M. 1986. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. Plant Disease, 70: 887-891. **(Journal)**

Molouba, F., Guimier, C., Berthier, C., Guenard, M., Olivier, V., Baril, C. and Horvais, A. 2001. Detection of bean seed-borne pathogens by PCR. Acta Horticulturae, 546: 603-607. **(Journal)**

Munkvold, G.P. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. Annual Review of Phytopathology, 47: 285-311. **(Journal)**

Osdaghi, E., Shams-bakhsh, M., Alizadeh, A. and Lak, M.R. 2010. Study on common bean seed lots for contamination with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by BIO-PCR technique. Journal of Agricultural Technology, 6: 503-513. **(Journal)**

Popovic, T., Balaž, J., Nikolic, Z., Starovic, M., Gavrilovic, V., Aleksic, G., Vasic, M. and Živkovic, S. 2010. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. African Journal of Agricultural Research, 5: 2730-2736. **(Journal)**

Remeeus, P.M. and Sheppard, J.W. 2006. ISTA Method Validation Reports. International Seed Testing Association publication, 3: 1-11. **(Journal)**

Saettler, A.W. 1989. Common bacterial blight. Bean Production Problems in the Tropics, 261-184. **(Journal)**

Schaad, N.W., Berthier-Schaad, Y. and Knorr, D. 2007. A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Plant Pathology, 56: 1-8. **(Journal)**

Sheppard, J., Kurowski, C. and Remeeus, P.M. 2007. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *Fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. International Rules for Seed Testing, 7-21. **(Journal)**

Tebaldi, N.D., De Cássia Panizzi, R. and Sader, R. 2007. Detection, transmission and effect of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the physiological quality of broccoli seeds. Summa Phytopathologica, 33: 290-293. **(Journal)**

Tebaldi, N.D., Peters, J., Souza, R.M., Chitarra, L.G., van der Zouwen, P., Bergervoet, J. and Van Der Wolf, J. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. Tropical Plant Pathology, 35: 213-222. **(Journal)**

Valarini, P.J. and Menten, J.O.M. 1992. Methodology for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seeds. Fitopatologia Brasileira, 17: 373-383. **(Journal)**

Van Der Wolf, J.M. and Schoen, C.D. 2004. Bacterial pathogens: detection and identification methods. Encyclopedia of Plant and Crop Science, 84-88. **(Journal)**

Weller, D.M. and Saettler, A.W. 1980. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. Phytopathology, 70: 148-152. **(Journal)**

Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and use of optimized method in bean seed lots health monitoring

Kobra Moslemkhany[1*], Leila Zare[2], Nima Khaledi[3], Leila Frahani[2], Shahla Hashemi Fesharaki[2], Farshid Hasani[1], Babak Darvishi[1]

Received: August 18, 2018 Accepted: November 20, 2018

Abstract

Common bacterial blight, caused by the seed-borne bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseol*, is important seed borne disease in been culture area in the world. Using healthy and certified seed is the major key to success for control disease distribution so seed health testing is routinely carried out in the certification programs. In this study cultivation diagnostic tests on selective medium, PCR and pathogenicity on susceptible cultivar Khomain for detection of the bacteria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* were optimized. These optimized methods were used for assessing the health of bean seed samples obtained from different seed lots. The results showed that the use of selective-medium in culturing bacteria prior to PCR test, greatly reduces differentiation error of similar non-target colonies from pathogenic ones. Also performing PCR on suspected colonies isolated from selected media compared to PCR of seed extract, due to the removal of plant inhibitors, it reduces the possibility of false feedback. The mentioned methods check the health of selected seed samples from standard seed farms successfully and the results indicated the authentication seed health and non-contaminated seed lots.

Key words: Bean; Bacteria; Seed health; *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*

How to cite this article

Moslemkhany, K., Zare, L., Khaledi, N., Frahani, L., Hashemi Fesharaki, Sh., Hasani, F. and Darvishi, B. 2020. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and use of optimized method in bean seed lots health monitoring. Iranian Journal of Seed Science and Research, 7(1): 69-77. (In Persian)(**Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2020.4318

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Research Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Researcher, Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Ph.D of Plant Diseases, Ferdowsi University of Mashhad, Khorasan Razavi, Mashhad, Iran
*Corresponding author: moslemkhany@yahoo.com