# بررسی تنوع فنوتیپی و پروتئینی جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* در ایران

حجت ایراندوست[۱] غلامرضا نیکنام[۱]، ابوالقاسم قاسمی[۲]، سید محسن تقوی[۳*]، اسماعیل ترابی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۲/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۵/۹)

## چکیده

**طی تابستان سال ۱۳۸۳ نمونه‌هایی از غده و ساقه سیب‌زمینی دارای علایم پوسیدگی و پژمردگی از مزارع مختلف استان‌های آذربایجان‌شرقی، فارس و کرج جمع‌آوری شدند. تعداد ۳۹ جدایه باکتریایی جداسازی گردید و بر اساس مشخصات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و خصوصیات بیماری‌زایی به دو گروه مشخص تقسیم شدند. تمام جدایه‌های استان آذربایجان شرقی و کرج به عنوان نژاد ۳ / بیووار 2A باکتری *Ralstonia solanacearum* معرفی شدند و جدایه‌های فارس در نژاد ۳ / بیووار N2 گروه‌بندی گردید. تفاوت‌های مشخصی بین جدایه‌های دو بیووار نسبت به توانایی در استفاده از کربن (دی-ترهالوز، دی-رایبوز و تارترات)، فعالیت تیروزیناز و نقوش پروتئینی در SDS-PAGE مشاهده گردید. تعداد هشت جدایه 2A بر اساس آزمون‌های فنوتیپی انتخاب و پلاسمید آنها پس از استخراج در ژل آگارز ۰/۷ درصد الکتروفورز گردید. تمام جدایه‌ها دارای تنها یک پلاسمید با اندازه یکسان بوده و هیچ اختلافی بین آنها وجود ندارد. بر اساس منابع موجود این اولین گزارش از وجود بیووار N2 *R. solanacearum* در ایران است.**

**واژه‌های کلیدی: *Ralstonia solanacearum*، بیووار 2A، بیووار N2، سیب زمینی**

## مقدمه

سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان‌شرقی، کرج و فارس به عنوان یک محصول مهم، در سطح وسیعی کشت می‌شود.

بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al* 1995 یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی سیب زمینی در نواحی گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدل دنیا می‌باشد. بیش از ۲۰۰ گونه متعلق به ۵۰ خانواده گیاهی به عنوان میزبان این باکتری گزارش شده است (۱۵). این باکتری بسیار ناهمگن بوده و جدایه‌های مختلف آن از نظر مبدأ، دامنه میزبانی، پراکندگی جغرافیایی، بقا در خاک و گیاه، شدت بیماری‌زایی، قدرت تهاجم، مرفولوژی، روش انتقال، واکنش فوق حساسیت در توتون، اپید میولوژی، الگوی RFLP و AFLP، پروفیل پروتئین‌های سلولی، آنالیز اسیدهای چرب، توالی بازهای ژن 16S rRNA، ژن *hrp* و اندوگلوکاناز و بسیاری از خصوصیات فنوتیپی متفاوت می‌باشند و گروه‌بندی جدایه‌های این باکتری به روش‌های متفاوت انجام شده است (۱۰، ۱۱، ۱۶، ۳۱، ۳۲ و ۳۳). جدایه‌های مختلف بر اساس خصوصیات بیماری‌زایی و دامنه میزبانی (۶) واکنش فوق

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و مربی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲. پژوهشگر مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران
۳. دانشیار گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtaghavi@shirazu.ac.ir



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]

حساسیت در توتون (۲۵)، مورفولوژی کلنی روی محیط TZCA و تولید شبه ملانین در محیط کشت حاوی تیروزین (۹) به ۵ نژاد گروه‌بندی شدند و بر اساس توانایی استفاده از قندهای مالتوز، لاکتوز، سلوبیوز و قندهای الکلی مانیتول، دولسیتول، سوربیتول، ترهالوز، دی-رایبوز، تارترات، فعالیت تایروزیناز و تولید گاز از نیترات ۶ بیووار برای باکتری *R. solanacearum* معرفی شده است (۱۳، ۱۶، ۱۷، ۱۹ و۳۴). جدایه‌های مختلف این باکتری بر اساس مقایسه توالی بازهای ژن 16S rRNA به دو گروه تقسیم شده‌اند، طوری‌که بیووارهای ۱ و ۲ در یک گروه و بیووارهای ۳ و ۴ و ۵ نیز در گروه دیگر قرار می‌گیرند (۳۶ و ۳۸). نژاد ۳/ بیووار۲ عامل پژمردگی باکتریایی، یک بیماری جدی روی سیب‌زمینی محسوب می‌شود (۱۴). هوریتا و همکاران (۱۹) با مطالعه روی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های بیووار N2 در آسیا، تفاوت بین جدایه‌های بیووار N2 آسیا و آمریکای‌جنوبی و بین جدایه‌های بیووار N2 و ۲ آسیایی را بر اساس خصوصیات فنوتیپی گزارش نمودند. در ایران بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی اولین بار توسط بهار و دانش روی سیب‌زمینی و از منطقه اصفهان گزارش شده است (۴). درحال حاضر این بیماری در اکثر نواحی ایران روی سیب‌زمینی وجود دارد و یکی از عوامل محدود کننده کشت سیب‌زمینی در آذربایجان‌شرقی نیز به شمار می‌رود (۲). تا امروز تمامی جدایه‌های ایران به عنوان بیووار ۲ معرفی شده‌اند (۳). در جنوب استان کرمان این بیماری توسط جدایه‌های نژاد۳ / بیووار ۲A ایجاد می‌شود (۱). هدف از انجام این تحقیق جداسازی، تشخیص و بررسی تنوع فنوتیپی و پروتئینی عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در مناطق مختلف ایران شامل استان‌های آذربایجان‌شرقی، کرج و فارس و مقایسه آنها با یکدیگر از لحاظ فنوتیپی و پروتئینی است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

در طول تابستان ۱۳۸۳ از مزارع سیب‌زمینی واقع در آذربایجان‌شرقی بازدید به‌عمل آمد و بوته‌های پژمرده همراه با غده جمع‌آوری شد. جداسازی باکتری عامل بیماری مطابق روش‌های معمول باکتری‌شناسی(۸)، با خرد کردن قطعات بافت آلوده در آب مقطر سترون و کشت سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت افتراقی TZCA حاوی ۰/۵٪، ۲،۳،۵-تری‌فنیل‌تترازولیوم (۲۱) و محیط‌های کشت SPA (ساکارز+پپتون+آگار)، NA، CPG، YDC و King B انجام گرفت (۱۳). پس از دو تا سه روز نگه‌داری در دمای ۲۸°C تک کلنی‌هایی انتخاب و جهت اطمینان از خلوص مجدداً در محیط‌های قبلی مخطط و با کشت نقطه‌ای روی محیط کشت در داخل یخچال نگه‌داری شدند. مطالعات روی ۳۹ جدایه انتخابی انجام شد که ۳۵ جدایه از آنها متعلق به آذربایجان‌شرقی، یک جدایه متعلق به بازارکرج، ۳ جدایه از استان فارس، بود. دو جدایه سوسپانسیون جوشانده بیووار 2A از منطقه کاستاریکا (اهدایی پرفسور پریو از مرکز بین المللی سیب زمینیCIP) نیز به عنوان جدایه استاندارد در الکتروفورز پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

### آزمون اثبات بیماری‌زایی و فوق حساسیت

آزمون اثبات بیماری‌زایی بر اساس روش وینستد و کلمن(۴۳) روی گوجه فرنگی رقم Peto-Early L-293 انجام شد و از گیاهانی که علایم بیماری را نشان دادند، مجدداً جداسازی انجام گرفت. واکنش فوق حساسیت در توتون طبق روش لوزانو و سکویرا (۲۵) انجام گرفت.

### بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، تغذیه‌ای و آنتی‌بیوگرام

توانایی تجزیه بی‌هوازی گلوکز به روش هیو و لایف سن (۲۰)، آزمون فعالیت کاتالاز، اوره‌آز، تولید لوان، تولید گاز $H_2S$، هیدرولیز اسکولین، آربوتین، ژلاتین و کازئین، اثر روی شیرلیتموس به روش شاد و همکاران (۳۵)، فعالیت اکسیداز به روش کواکس (۲۲)، آزمون آرجی‌نین‌دهیدرولایز به روش تورنلی (۳۹)، آزمون احیای نیترات به نیتریت و لسیتیناز



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* مورد مطالعه

| شماره جدایه | بیووار | میزبان | محل جمع آوری |
|---|---|---|---|
| Az1, Az2, Az3, Az4, Az5, Az6, Az7 | 2A | سیب‌زمینی | آذر شهر(استان آذربایجان شرقی) |
| Ba1, B a2, Ba3, Ba4, Ba5, Ba6, Ba7 | 2A | سیب‌زمینی | باسمنج(استان آذربایجان شرقی) |
| Bo1, Bo2, Bo3, Bo4, Bo5, Bo6, Bo7 | 2A | سیب‌زمینی | بستان آباد(استان آذربایجان شرقی) |
| Sa1, Sa2, Sa3, Sa4, Sa5, Sa6, Sa7 | 2A | سیب‌زمینی | سراب(استان آذربایجان شرقی) |
| Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, Sh5, Sh6, Sh7 | 2A | سیب‌زمینی | شبستر(استان آذربایجان شرقی) |
| K1 | 2A | سیب‌زمینی | بازار (کرج) |
| Da1 | N2 | سیب‌زمینی | داراب (استان فارس) |
| Eg1 | N2 | سیب‌زمینی | اقلید (استان فارس) |
| Ma1 | N2 | سیب‌زمینی | مهارلو (استان فارس) |
| CIP88 | 2A | سیب‌زمینی | کاستاریکا (Costa Rica) |

به‌روش لیلیوت و همکاران (۲۴)، آزمون فسفاتاز، هیدرولیز توئین ۸۰، نشاسته، فنیل‌آلانین، آزمون داکسی ریبونوکلناز (DNase) به روش فهی و هیوارد (۸) و فعالیت تیروزیناز به روش هیوارد (۱۳) انجام گرفت. بررسی توانایی جدایه‌ها در استفاده از منابع کربن بر اساس روش شاد و همکاران (۳۵) صورت گرفت. در آزمون آنتی‌بیوگرام پس از کشت مخطط باکتری روی محیط SPA، از دیسک‌های آغشته به ۱۶ آنتی‌بیوتیک مختلف (با تکرار هر آنتی‌بیوتیک ۲ دیسک) در سطح یک پتری قرار داده شد، پس از دو روز نگه‌داری در دما ۲۸°C نتایج بر اساس قطرهاله بازدارنده ارزیابی شد.

### الکتروفورز پروتئین

این آزمون بر اساس روش لملی (۲۳) و استنلی (۳۷) انجام شد. الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید (Polyacrylamide gel) عمودی دارای ژل جداکننده (Separating gel) ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده(Stacking gel) ۵ درصد انجام گردید. الکتروفوروز با جریان ثابت ۱۵ میلی‌آمپر تا رسیدن رنگ پیشرو به انتهای ژل انجام گرفت، رنگ‌آمیزی ژل با محلول (آب، متانول، اسید استیک به نسبت ۱۰:۵۰:۵۰ در محلول ۰/۱ درصد کوماسی‌بلو جی-۲۵۰) روی شیکر به مدت ۵-۴ ساعت انجام گرفت. جهت رنگبری، ژل در محلول مشابه محلول رنگ‌آمیزی ولی بدون کوماسی‌بلو تا زمان وضوح باندها قرارداده شد. ژل سپس در محلول اسید استیک ۷ درصد نگه‌داری شد.

### استخراج DNA پلاسمیدی

خالص‌سازی پلاسمید از طریق لیز قلیایی به روش السن (۳۰) انجام گرفت. DNA پلاسمیدی استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۷ درصد با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت دو ساعت، الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی DNA با محلول اتیدیوم‌بروماید به غلظت ۱mg/L انجام شد. ماده رنگی پیشرو ۶x (حاوی گلیسرول ۶۰ درصد، ۶۰EDTA میلی‌مولار، بروموفنول‌بلو ۰/۰۹ درصد و زایلن‌سیانولFF ۰/۰۹ درصد) به نسبت ۱ به ۶ با DNA استخراجی مخلوط گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل در روی نور UV مشاهده و عکس‌برداری شد.

### ترسیم دندروگرام

با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc Version 2.02e، دندروگرامی برای نشان دادن شباهت‌های فنوتیپی جدایه‌ها ترسیم گردید.



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]

**جدول ۲. خصوصیات مرفولوژیک، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* در استان‌های آذربایجان شرقی، کرج و فارس**

| خصوصیت | واکنش | خصوصیت | واکنش |
|---|---|---|---|
| گرم | − | فعالیت اوره آز | + |
| تولید پیگمان زرد | - | سیترات | + |
| اکسیداز | + | رشد در ۴۱ درجه | - |
| کاتالاز | + | آرجی نین دهیدرولایز | - |
| تخمیر بی هوازی گلوکز | - | فنیل آلانین د آمیناز | - |
| تولید فلورسنت روی محیط KB | - | تولید نیتریت از نیترات | + |
| تولید H2S از سیستئین | + | تولید استوئین | - |
| هیدرولیز ژلاتین | - | تولید فسفاتاز | + |
| داکسی ریبونوکلئاز | - | تولید کتولاکتاز | - |
| لهانیدن غده سیب زمینی | - | تولید H2S از پپتون | - |
| مواد احیاکننده از ساکارز | - | تولید اندول | - |
| هیدرولیز نشاسته | - | متیل رد | - |
| ذخیره PHB | + | هیدرولیز کازئین | + |
| لستیناز | + | | |

## نتایج و بحث

تفاوت ریخت شناسی بین پرگنه‌ها از نظر اندازه، شکل، الگوی رنگدانه فورمازان(Furmazan) و اسلایم مشاهده شد. تمام جدایه‌های *R. solanacearum* آذربایجان‌شرقی خصوصیات کشتی مشابه داشتند، طوری که روی محیط CPG دارای پرگنه‌های صاف، مات و بسیار آبکی رونده بودند و یک رنگ خرمایی یا قهوه‌ای (رنگدانه ملانین) روی محیط‌های CPG و TZC و گاهی NA، بعد از چند روز رشد بروز می‌دادند. این خصوصیات در جدایه بازار کرج نیز وجود داشت اما جدایه‌های فارس فاقد رنگدانه ملانین بودند. از کشت این نمونه‌ها روی محیط افتراقی TZCA پرگنه‌های گرد نامنظم، آبکی، نسبتاً درشت، سفیدشیری و معمولاً با مرکز صورتی‌رنگ (تیپ بیماریزا) و گاهی نیز پرگنه‌های گرد، کوچک، محدب، قرمز پررنگ (تیپ غیر بیماری‌زا) و روی محیط SPA پرگنه‌های دوکی شکل نامنظم و آبکی رونده به دست آمد. در محیط حاوی تیروزین جدایه‌های آذربایجان‌شرقی و جدایه بازار کرج تضاریسی از هاله قهوه‌ای رنگ تولید نمودند، اما جدایه‌های فارس فاقد این خصوصیت بودند. تمام جدایه‌ها روی محیط YDC پرگنه‌های کرمی‌رنگ تولید کردند. مرفولوژی پرگنه‌ها روی محیط TZCA با توصیف کلمن (۲۱) مطابقت داشت. تمام جدایه‌های آذربایجان، کرج و فارس باعث پژمردگی سریع گوجه‌فرنگی رقم Peto-Early L-293 بعد از۷–۵ روز شدند. هم‌چنین اکثر جدایه‌ها پس از ۷۲–۴۸ ساعت باعث بروز واکنش فوق حساسیت روی برگ‌های توتون رقم *Nicotiana tabacum* گردیدند. همه جدایه‌ها میله‌ای شکل، گرم منفی، فاقد اسپور، دارای یک یا به ندرت دو تاژک قطبی بودند. سایر خصوصیات بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌ها در جدول ۲ و ۳ و ۴ آمده است.

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها نشان داد که همگی متعلق به گونه *Ralstonia solanacearum* می‌باشند (۱۲، ۴۰، ۴۴ و ۴۵).



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]

**جدول ۳. بعضی اختلافات در بین جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات مرفولوژیک، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای**

| خصوصیت | واکنش | خصوصیت | واکنش |
|---|---|---|---|
| واکنش فوق حساسیت | V(2/36) | هیدرولیز توئین ۸۰ | V(2/36) |
| هیدرولیز اسکولین | V(36/2) | تولیدلوان | V(35/3) |
| واکنش قلیایی شیر لیتموش | V(1/37) | رشد در حضور نمک ٪۱/۵ | V(36/2) |

V: اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده تعداد جدایه‌های (مثبت/منفی)V است.

**جدول ۴ : خصوصیات تعیین کننده بیووار جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب زمینی**

| خصوصیت | بیووار ۲A | بیووارN2 |
|---|---|---|
| منشا جغرافیایی | آذربایجان شرقی و کرج | فارس |
| تولید رنگدانه شبه ملانین از تیروزین | + | − |
| استفاده از : | | |
| دولسیتول | − | - |
| سلوبیوز | + | + |
| سوربیتول | − | − |
| گلوکوز | + | + |
| لاکتوز | + | + |
| مالتوز | + | + |
| مانیتول | − | − |
| اینوزیتول | + | + |
| تارترات | − | + |
| دی − رایبوز | − | + |
| دی−ترهالوز | − | + |

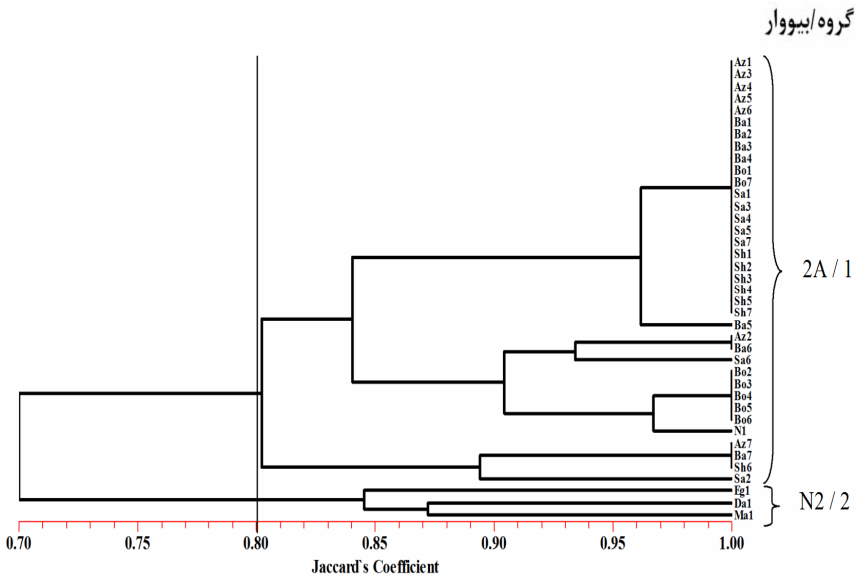
هیچ یک از جدایه‌ها قادر به تحمل نمک طعام ۲٪ نبودند. این خصوصیت یکی از خصوصیات ثابت گونه است که با نتایج کار سایر محققین مطابقت دارد (۴۰، ۴۴ و ۴۵). جدایه‌ها قادر به احیای نیترات بودند که این یافته نیز با توصیف بیووار ۲ توسط هیوارد همخوانی دارد (۱۴). جدایه‌های آذربایجان‌شرقی و کرج از لحاظ خصوصیات کشتی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شبیه به یکدیگر بودند. بعضی اختلاف‌ها در بین جدایه‌ها (هیدرولیز توئین۸۰، هیدرولیز اسکولین و تولید لوان) وجود دارد (جدول۳) اما این اختلاف‌ها در تاکسونومی *R. solanacearum* اهمیت زیادی ندارد (۲۶). بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده جدایه‌های آذربایجان شرقی و کرج به عنوان بیووار 2A و جدایه‌های فارس یه عنوان بیووار N2 معرفی می‌گردند(جدول ۴). این خصوصیات با نتایج کار سایر محققین درباره تعیین بیووار(بیووار) و تفکیک بیووار 2A از بیووار N2 مشابه است (۱۶، ۱۹ و ۲۶).

این جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، نالیدیکسیک، اکسی‌تتراسایکلین و دوکسی‌سایکلین کاملاً حساس و به آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین، باکتریاسین، سفالوتین، آمپی‌سیلین، فورازولیدون و کلوکساسیلین کاملاً مقاوم بودند. جدایه‌ها در مقاومت به نئومایسین و کلرامفنیکل اختلاف نشان دادند. نتایج حاصل از آزمون آنتی‌بیوگرام جدایه‌های آذربایجان و فارس تا حد زیادی با کارهای مورالز و سکویرا (۲۹) همخوانی دارد.



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]




**شکل ۱ . دندروگرام جدایه‌های *Ralstonia solancearum* جدا شده از سیب‌زمینی بر اساس داده‌های فنوتیپی و آنتی‌بیوگرام با الگوریتم Complete Linkage و ضریب Jaccard (مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است).**

شباهت فنوتیپی در بین ۳۹ جدایه مطالعه شده در دندروگرام آمده است (شکل ۱). دندروگرام فنوتیپی جدایه‌های *R. solanacearum* بر اساس خصوصیات مهم بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای تعداد گروه‌ها را در درون گونه‌ها به خوبی مشخص می‌نماید(۱۷). دندروگرام به دست آمده با الگوریتم Complete Linkage و بر اساس ضریب جاکارد در جدایه‌های *R. solanacearum* مبتنی بر خصوصیات مهم بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و آنتی‌بیوگرام این تحقیق می‌باشد که دو گروه عمده را مشخص نمود. هر چند که در روش UPGMA بر اساس ضریب جاکارد، ضریب کوفنتیک r = ۰/۹۱۸۶۷ و بیشتر از ضریب کوفنتیک روش Complete Linkage برابر r = ۰/۹۰۵۵۷ بود ولی به دلیل اثر زنجیره‌ای (chaining effect) در روش UPGMA، روش Complete Linkage در نظر گرفته شد. با توجه به شباهت ۷۰ درصدی جدایه‌ها، تعیین تعداد مطلوب خوشه در دندروگرام‌ها با برش در نقطه‌ای انجام گرفت که بیشترین فاصله بین بیووارها در خوشه‌ها دیده می‌شد. بنابراین بر اساس برش نقطه جدایی جدایه‌های بیووار 2A از جدایه‌های بیووار N2 در نظر گرفته شد. بر اساس نقطه برش، که در دندروگرام نقطه معادل شباهت ۸۰ ٪ بین دو گروه را نشان می‌دهد، جدایه‌های *R. solanacearum* به دو گروه اصلی تقسیم شدند. گروه اول شامل ۳۶ جدایه که متعلق به بیووار 2A می‌شود و گروه دوم جدایه‌های بیووارهای N2(2T) را در بر گرفت. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، جدایه‌های بیووار ۲ در اکثر مناطق سیب‌زمینی‌کاری دنیا تقریباً شبیه یکدیگر هستند و فقط بعضی تفاوت‌های جزئی در آنها دیده می‌شود (۱۴ و۱۷). جدایه‌های بیووار ۲ در مناطق خنک، بیشتر سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی را آلوده می‌کنند و منحصراً متعلق به نژاد ۳ می‌باشند در صورتی که در مناطق گرمسیر جدایه‌های بیووار ۲، دامنه میزبانی وسیع‌تری دارند و منحصراً نژاد ۳ نمی‌باشند. بنابراین به عنوان بیووار جدیدی از بیووار ۲ با نام بیووار N2 یا 2T (tropical) نام‌گذاری می‌شوند. این دو بیووار از لحاظ استفاده از ترهالوز، دی- رایبوز و فعالیت پکتولیتیکی از یکدیگر تفکیک می‌شوند (۱۶ و ۲۶). تاکنون هیچ نژادی به طور قطعی برای بیووار 2T تعیین نگردیده است ولی آن را در نژادهای ۱ و ۳ قرار می‌دهند (۱۸، ۱۹ و۳۳). بیووار مذکور اولین بار در نواحی پست حوزه رود آمازون یافت



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]

شد. این بیووار همانند نژاد ۱ دارای دامنه میزبانی وسیع بوده و جدایه‌های زیادی دارد، با این حال بیووار 2T (N2) دارای قدرت تهاجم کم می‌باشد. بیووار ۲A فعالیت متابولیکی کمتری داشته و اختصاصی سیب‌زمینی است و کمترین دامنه میزبانی را دارد. این بیووار در مناطق سردسیری و مرتفع گسترش دارد و احتمالاً از ارتفاعات آند منشأ گرفته است. بیووار N2 فعالیت متابولیکی بیشتری داشته و به گیاهان بیشتری حمله می‌کند. در مناطق گرمسیری و جلگه‌ای آمریکای جنوبی شیوع داشته و احتمالاً از مناطق حاره‌ای آمریکای جنوبی منشأ گرفته است (۱۶ و ۲۶). به‌علاوه جدایه‌های آسیایی بیووار N2 از جدایه‌های امریکای‌جنوبی بر اساس آنالیزهای ژن RNA ریبوزومی جدا شده‌اند (۳۸). جدایه‌های بیووار N2 از نظر دامنه میزبانی و گروه‌های بیماری‌زایی بسیار متغیر هستند، گروهی از جدایه‌های این بیووار از آنجا که روی توتون، بادمجان و فلفل دلمه‌ای بیماری‌زا نیستند و باعث بیماری‌زایی (با دامنه صفر تا بیماری‌زایی متوسط) روی گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی می‌شوند متعلق به نژاد ۳ هستند و گروهی که روی توتون، بادمجان، فلفل دلمه‌ای، گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی بیماری‌زا بودند، در نژاد ۱ قرار گرفتند (۱۸). در امریکای جنوبی بیووار ۲ و N2 هم در مناطق خنک و هم در مناطق گرمسیر وجود دارد و در هر دو شرایط اقلیمی سازگار شده‌اند (۲۶). در ژاپن بیووار N2 در مناطق نیمه‌گرمسیری و بعضی مناطق گرمسیری گسترش یافته اما در مناطق خنک وجود ندارد. دمای بالا شبیه شرایط مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به جدایه‌های بیووار N2 امکان رشد می‌دهد و سبب بیماری می‌شوند (۱۹). اخیراً جدایه‌های بیووار N2 را که باعث پژمردگی سیب‌زمینی در منطقه آمازون امریکای‌جنوبی، آسیا (ژاپن، اندونزی و فیلیپین) و افریقا (کنیا) می‌شوند از جدایه‌های بیووار ۲ جدا کرده‌اند، چون آنها در گروه‌های مختلف ژنتیکی (Phylotype) قرار داشتند. جدایه‌های بیووار N2 آسیا از نظر نسب شناسی از جدایه‌های افریقایی و امریکایی مجزا می‌باشند، این جدایه‌ها در گروه‌های ژنتیکی(Phylotype) ۱ و ۲ پخش می‌شوند(۴۱). جدایه‌هایی که در گروه ۱ قرار دارند نسبت به گروه ۲ دامنه میزبانی وسیعتری دارند، این نتایج نشان می‌دهد که جدایه‌های بیووار N2 منشا متفاوتی نسبت به بیووار ۲ دارند و دلالت بر این می‌کند که طبقه‌بندی معمول و رایج بیووار/ نژاد برای تفکیک این جدایه‌ها کافی نیست(۴۱). جدایه‌های مختلف *R. solanacearum* بر مبنای آنالیزهای نسب شناختی توالی‌های 16S-23S ( rRNAناحیه ITS)، ژن‌های *hrp*، ژن اندوگلوکاناز و ژن *muts* به چهار گروه ژنتیکی **(phylotype)** تقسیم شده است که بیووار ۲/ نژاد ۳ در گروه‌های ژنتیکی۲ و ۴ و بیووار N2 در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ قرار می‌گیرند (۳۳). در کارهای تکمیلی تر ویلا و همکاران (۴۱) که با جدایه‌های بیشتر بر روی ژن‌های اندونوکلئاز، *hrpB* و 16S rDNA انجام گردید، چهار گروه ژنتیکی(phylotype) را مطرح گردید که نژاد۳ / بیووار۲ در گروه ۳ و بیووار N2 در گروه‌های ۲و۱ قرار گرفتند.

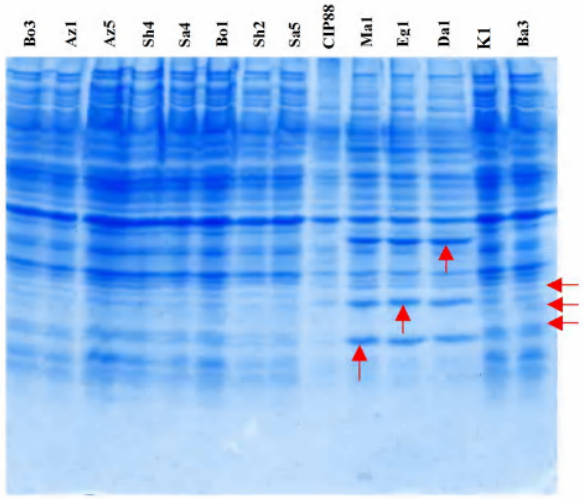
جدایه‌های متعلق به بیووار N2 در روی محیط TZCA به سختی جداسازی می‌شوند. این جدایه‌ها بسیار کند رشد هستند و می‌توانند به راحتی توسط بیووارهای ۲ و ۳ پوشیده شوند و نتوان آنها را جداسازی نمود (۴۲). معقولی و همکاران از مزارع مختلف سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی استان خوزستان، ۷۳ جدایه جداسازی کردند و بر اساس آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی کلیه جدایه‌ها به عنوان بیووار۲ / نژاد۳ باکتری *R. solanacearum* تشخیص داده شدند. با وجود تفاوت‌های جزئی در خصوصیات فنوتیپی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی همه جدایه‌های به‌دست آمده از سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی یکسان بودند(۵). باقری و تقوی خصوصیات جدایه‌های عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی در استان فارس را بررسی کردند و با توجه به آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تمامی جدایه‌ها بیووار ۲ / نژاد ۳ معرفی شدند(۳).

با توجه به نتایج آزمون‌های فنوتیپی، تعیین بیووار و نژاد (جدول ۲و۳و۴) و رسم دندروگرام (شکل۱) و مقایسه نتایج با کارهای سایر محققین، جدایه‌های مطالعه شده در این بررسی

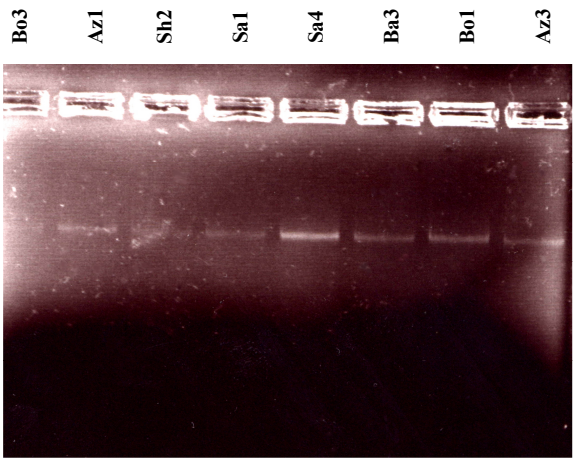


[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]




**شکل۲. نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از سیب‌زمینی در ژل پلی‌اکریلامید۱۲٪**




**شکل۳ . الگوی پلاسمیدی جدایه های مناطق مختلف آذربایجان شرقی**

متعلق به نژاد ۳ می‌باشند که بیووارهای 2A و N2 را شامل می‌شوند. با توجه به مطالعات ویلا و همکاران (۴۱) جدایه‌های استان آذربایجان‌شرقی و جدایه کرج (بیووار 2A/ نژاد۳) در گروه ژنتیکی(Phylotype) ۳ و جدایه‌های استان فارس(بیووار N2/ نژاد۳) در گروه ژنتیکی(Phylotype) ۲ قرار می‌گیرند. طبق منابع موجود این اولین گزارش از وجود بیووار N2/ نژاد ۳ در ایران می‌باشد. از آنجا که استان فارس دارای اقلیم نیمه گرمسیری می‌باشد و بیووار N2 نیز با این آب و هوا سازگار می‌باشد. وجود این بیووار در این استان غیر محتمل نمی‌باشد.

باندهای پروتئینی جدایه‌های آذربایجان‌شرقی و فارس با یکدیگر مقایسه شدند. جدایه‌های بیووار 2A به دلیل تفاوت در ۶ موقعیت باند پروتئینی ازجدایه‌های بیووار N2 تفکیک می‌شوند (شکل۲). در SDS-PAGE هر باند پروتئینی نماینده وجود حداقل یک ژن می‌باشد، بنابراین اطلاعات SDS-PAGE برای شناخت روابط نسب شناختی در بین گونه‌ها مفید واقع می‌شود (۲۸). پروفیل SDS-PAGE پروتئین‌های غشا معیار کاربردی مناسبی برای طبقه‌بندی، شناسایی و گروه‌بندی درون گونه‌ای باکتری *R. solanacearum* در سطح زیرگونه به شمار می‌آید (۲۷). جدایه‌های بیماریزای *R. solanacearum* که EPS تولید می‌کنند با فرم‌های غیربیماری‌زا (غیر آبکی وغیر رونده) همان جدایه‌ها الگوی پروتئینی مشابه داشتند (۷).

از بین جدایه‌های مختلف استان آذربایجان‌شرقی تعداد هشت جدایه از مناطق مختلف بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی انتخاب شد و الگوی پلاسمیدی DNAاستخراج شده آنها با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز مشاهده شد. تمام جدایه‌ها دارای یک پلاسمید با اندازه یکسان بودند و هیچ اختلافی در بین آنها مشاهده نشد(شکل۳).

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری‌های ارزنده کلیه اعضای محترم آزمایشگاه باکتری‌شناسی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی- اوین تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع مورد استفاده

۱. آزادوار، م. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۹. شناسایی بیو تیپ و نژاد جدایه‌های باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه اصفهان.



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]

۲. باقری خیرآبادی، م.۱۳۷۲. بررسی بیووارهای باکتری عامل پژمردگی سیب زمینی در ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

۳. باقری، ع. و م. تقوی. ۱۳۷۹. بررسی خصوصیات جدایه‌های عامل پژمردگی باکتریایی سیب زمینی و گوجه فرنگی در استان فارس و ارزیابی مقاومت تعدادی از ارقام سیب زمینی و گوجه فرنگی نسبت به آنها. بیماری‌های گیاهی. ۳: ۲۳۳-۲۴۳.

۴. بهار، م. و د. دانش، ۱۳۶۷. سبب شناسی پژمردگی باکتریایی سیب زمینی در ایران. بیماری‌های گیاهی۲۴: ۱-۱۲.

۵. معقولی، م.، ج. حیاتی، س.م. تقوی و ر. مستوفی زاده. ۱۳۸۳. تعیین خصوصیات بیووارهای *Ralstonia solanacearum* در استان خوزستان. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱۱-۷ شهریور، دانشگاه تبریز.

6. Buddenhagen, I. W. and A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.* Ann. Rev. Phytopathol. 2: 203-230.
7. Dristing, M. C. G. and J. C. Dianse. 1990. Characterization of *Pseudomons solanacearum* biovars based on membrane protein patterns. Phytopathol. 80: 641-646.
8. Fahy, P. C. and A. C. Hayward. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. PP. 337-378. *In*: Fahy, P. C. and Persley, G. J. (Eds.). Plant Bacterial Disease, A Diagnostic Guide. Academic Press, Pub., Sydeny, Australia.
9. French, E. R. and L. Sequeira. 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from central and south America: A comparative study. Phytopayhol. 60: 506-512.
10. Gillings, M. R. and P. C. Fahy. 1993. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovar2 and N2 assessed using restriction endonucease analysis of total genomic DNA. Plant Pathol. 42: 744-753.
11. Gillings, M. R. and P. C. Fahy. 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. PP. 95-112. *In*: Hayward, A. C. and Hartman, G. L. (Eds.). Bacterial Wilt The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International , Walingford, UK.
12. Gillis, M. V. T., R. Van, M. Bardain, P. Goor, a. Hebber, P. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Kersters, Heulin, and M. P. Fernandes. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *B. vietnamiensis* Sp. Nov. for N2 fixing isolates from rice in Vietnam. International J. Sys. Bacteriol. 45: 274-289.
13. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27: 265-277.
14. Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. Phytopatho. 29: 65-87.
15. Hayward, A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum. In*: Lederberg, J. (Ed.), Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. Pub., San Diego.
16. Haywrad, A. C. 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. PP. 123-135. *In*: Hayward, A. C. and G. L. , Hartman. (Eds.). Bacterial Wilt the Disease and Its Causative Agant, *Pseudomonas solanacearum*. CAB. International, Walingford, UK. .
17. He, L. Y., L. Seqeira and A. Kelman. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67: 1357-1361.
18. Horita, M. and K. Tsuchiya. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum.* Phytopathol. 91: 399-407.
19. Horita, M., K. Tsuchiya and A. Ooshiro. 2005. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* Biovar N2 strains in Asia J. Phytopathol. 153: 209-213.
20. Hugh, R. and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidadative metabolism of carbohydrate by various Gram negative bacteria. J. Appl. Bacterio. 66: 22-26.
21. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenecity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathol. 44: 693-695.
22. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. Nature 178: 703.
23. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. Nature 227: 680-685.
24. Lelliott, R. A. E. Billing and A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. J. Appl. Bacteriol. 29: 470-489.
25. Lozano, J. C. and L. Sequeira. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infilteration techniques. Phytopathol. 60: 833-838.
26. Marin, J. E. and H. M. El-Nashaar. 1993. Pathogenecity of the new phenotypes of *Pseudomonas solanacearum* from



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]

Peru. PP. 78-84. *In*: Hayward, A. C. and G. L. Hartman. (Eds.), Bacterial wilt. Proc. Int. Conf., Kaoshing, Taiwan. 28-31 Oct. 1992. ACIAR Proceedings.

27. Melo, M.S., N. Furuya and N. Matsuyama. 1998. Comperative membrane protein characterization of Brazilian strains of *Ralstonia solanacearum.* Bulletin of the Institute of tropical Agriculture Kyushu University 22: 34-44.
28. Minsavage, G. V. and N. W. Schaad. 1983. Characterization of membrane proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris.* Phytopathol. 73: 747-755.
29. Morales, V. M. and L. Sequeira. 1985. Indigenous plasmids in *Pseudomonas solanacearum.* Phytopathol. 75: 767-771.
30. Olsen, J. E. 1990. An improved method for rapid isolation of plasmid DNA from wild type Gram negative bacteria for plasmid restriction profile analysis. Letters in Appl. Microbiol. 10: 209-212.
31. Poussier, S., D. Trigalet-Demery, P. Vandewalle, B. Goffinet, J. Luisetti and A. Trigalet. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16s rRNA sequence analysis and identification of an African subdivision. Microbiol. 146: 1679-1692.
32. Poussier, S., P. Vandewalle and J. Luisetti. 1999. Genetic Diversity of African and wide world strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the hrp gene region. Appl. and Environ. Microbiol. 65: 2184-2194.
33. Prior, P. and M., Fegan. 2005. How complex is the " *Ralstonia solanacearum* species complex" PP. 449-461. *In*: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. Allen, C., P. Prior, and A. C. Hayward. (Eds.), APS. Press, st. Paul, Minnesota USA.
34. Robertson, A. E., B. A. Fortnum, T. C. Wood and D. A. Klueofel. 2001. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in the Southeastern United States. Beitrage zur Tabakforschung International. 19(7): 323-331.
35. Schaad, N. W., J. B. Jones. and W. Chun. 2001. Laboratory Guide For The Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd the ed., APS Press, St. Pual, Minnesot 373 pp.
36. Seal, S. E., M. Taghavi, N. Fegan, A. C. Hayward and M. Fegan. 1999. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroup by PCR tests. Plant Pathol. 48: 115-120.
37. Stanley, R. M. 1990. Experimental Techniques In Bacterial Genetics. Jones and Bartlett Press. US. pp. 104-110.
38. Taghavi, M., A. C. Hayward, L. Sly. and M. Fegan. 1996. Analysis of the Phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum* and *Pseudomonas syeygii* and blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences, International Journal of Systematic Bacteriol. 46: 10-15.
39. Thorneley, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol. 13: 37-52.
40. Urakami, T., C. Ito-Yoshida, H. Araki, T., Kijima, K. I. Suzuki and K. Komagata. 1994. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *B. vandii* Sp. Nov. Intern. J. Sys. Bacteriol. 44: 235-245.
41. Villa, J. E., K. Tsuchiya, M. Horita, M. Natural, N. Opina and M. Haykumachi. 2005. Phylogenetic relationship of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16s rDNA, endoglucanase and *hrpB* gene sequences. J. Gen. Plant Pathol. 71: 39-46.
42. Villa, J. E., K. Tsuchiya, M. Horita, M. Natural, N. Opina and M. Haykumachi. 2003. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria on 282-bp PCR-amplified fragment. Plant Dis. 87: 1337-1343.
43. Winstead, N. N. and A. Kelman. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathol. 42: 3946-3951.
44. Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta. and Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and *Alkaligenes* to *Ralstonia* Gen. Nov. proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. November, *Ralstonia solanacearum*(Smith 1996) comb.Novemberand *Ralstonia eutropha* (Davis, 1969) Comb. Nov. Microbiol. Immunol. 39: 897-904.
45. Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, Y. Hasimoto, T. Ezaki and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* Gen Nov and transfer of seven species of the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) Comb Nov. Microbiol. Immunol. 36: 1251-1275.

[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2025-07-04 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.16.9 ]