

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

حجت ایراندوست<sup>۱</sup>، غلامرضا نیکنام<sup>۱</sup>، ابوالقاسم قاسمی<sup>۲</sup>، سید محسن تقوی<sup>۳\*</sup>، اسماعیل ترابی<sup>۱</sup>

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

### چکیده

طی تابستان سال ۱۳۸۳ نمونه‌هایی از غده و ساقه سیب‌زمینی دارای علائم پوسیدگی و پژمردگی از مزارع مختلف استان‌های آذربایجان شرقی، فارس و کرج جمع‌آوری شدند. تعداد ۳۹ جدایه باکتریایی جداسازی گردید و بر اساس مشخصات مورفولوژیکی، 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 *R. solanacearum* N2 در ایران است.

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

### مقدمه

جدایه‌های مختلف آن از نظر مبدأ، دامنه میزبانی، پراکندگی جغرافیایی، بقا در خاک و گیاه، شدت بیماری‌زایی، قدرت تهاجم، مورفولوژی، 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

سیب‌زمینی در استان‌های آذربایجان شرقی، 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

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

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 تیروزیناز و تولید گاز از نیترات ۶ بیووار برای باکتری *R. solanacearum* معرفی شده است (۱۳، ۱۶، ۱۷، ۱۹ و ۳۴). جدایه‌های مختلف این باکتری بر اساس مقایسه توالی بازهای ژن 16S rRNA به دو گروه تقسیم شده‌اند، طوری که 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/ بیووار ۲ 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 آمریکای جنوبی 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). در حال حاضر این بیماری در اکثر نواحی ایران روی سیب‌زمینی وجود دارد و یکی از عوامل محدود کننده کشت سیب‌زمینی در آذربایجان شرقی 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 نژاد ۳ / 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 آذربایجان شرقی، 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

آذربایجان شرقی بازدید به عمل 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٪، ۳، ۵-تری‌فنیل‌تترازولیوم (۲۱) و محیط‌های کشت SPA (ساکارز+پیتون+آگار)، NA، CPG، YDC، 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 آذربایجان شرقی، 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 بین‌المللی سیب زمینی CIP) 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 گوجه‌فرنگی رقم Peto-Early L-293 انجام شد و از گیاهانی که علائم 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<sub>2</sub>S، هیدرولیز اسکولین، آربوتین، ژلاتین و کازئین، اثر روی شیرلیتموس به روش شاد و همکاران (۳۵)، فعالیت اکسیداز به روش کواکس (۲۲)، آزمون آرچی‌نین‌دهیدرولایز به روش تورنلی (۳۹)، آزمون احیای نیترات به نیتريت و لسیتیناز

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* مورد مطالعه

| محل جمع آوری                      | میزبان    | بیووار | شماره جدایه                       |
|-----------------------------------|-----------|--------|-----------------------------------|
| آذر شهر (استان آذربایجان شرقی)    | سیب‌زمینی | 2A     | Az1, Az2, Az3, Az4, Az5, Az6, Az7 |
| باسمنج (استان آذربایجان شرقی)     | سیب‌زمینی | 2A     | Ba1, Ba2, Ba3, Ba4, Ba5, Ba6, Ba7 |
| بستان آباد (استان آذربایجان شرقی) | سیب‌زمینی | 2A     | Bo1, Bo2, Bo3, Bo4, Bo5, Bo6, Bo7 |
| سراب (استان آذربایجان شرقی)       | سیب‌زمینی | 2A     | Sa1, Sa2, Sa3, Sa4, Sa5, Sa6, Sa7 |
| شبستر (استان آذربایجان شرقی)      | سیب‌زمینی | 2A     | Sh1, Sh2, Sh3, Sh4, Sh5, Sh6, Sh7 |
| بازار (کرج)                       | سیب‌زمینی | 2A     | K1                                |
| داراب (استان فارس)                | سیب‌زمینی | N2     | Da1                               |
| اقلید (استان فارس)                | سیب‌زمینی | N2     | Eg1                               |
| مهارلو (استان فارس)               | سیب‌زمینی | N2     | Ma1                               |
| کاستاریکا (Costa Rica)            | سیب‌زمینی | 2A     | CIP88                             |

کوماسی بلو جی (۲۵۰) روی شیکر به مدت ۴-۵ ساعت انجام گرفت. جهت رنگبری، ژل در محلول مشابه محلول رنگ‌آمیزی ولی بدون کوماسی بلو تا زمان وضوح باندها قرار داده شد. ژل سپس در محلول اسید استیک ۷ درصد نگاه‌داری 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 اتیدیوم بروماید به غلظت ۱mg/L انجام شد. ماده رنگی پیشرو ۶x (حاوی گلیسرول ۶۰ درصد، EDTA ۶۰ میلی‌مولار، بروموفنول بلو ۰/۰۹ درصد و زایلن سیانول FF 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.

به روش 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 نگاه‌داری در دما ۲۸°C نتایج بر اساس قطر هاله 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 متراکم‌کننده (Stacking gel) ۵ درصد انجام گردید. الکتروفورز 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

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

| واکنش | خصوصیت                          | واکنش | خصوصیت                            |
|-------|---------------------------------|-------|-----------------------------------|
| +     | فعالیت اوره آز                  | -     | گرم                               |
| +     | سیترات                          | -     | تولید پیگمان زرد                  |
| -     | رشد در ۴۱ درجه                  | +     | اکسیداز                           |
| -     | آرجی نین دهیدرولایز             | +     | کاتالاز                           |
| -     | فنیل آلانین د آمیناز            | -     | تخمیر بی هوازی گلوکز              |
| +     | تولید نیتريت از نیترات          | -     | تولید فلورسنت روی محیط KB         |
| -     | تولید استوئین                   | +     | تولید H <sub>2</sub> S از سیستئین |
| +     | تولید فسفاتاز                   | -     | هیدرولیز ژلاتین                   |
| -     | تولید کتولاکتاز                 | -     | داکسی ریبونوکلئاز                 |
| -     | تولید H <sub>2</sub> S از پیتون | -     | لهانیدن غده سیب زمینی             |
| -     | تولید اندول                     | -     | مواد احیاکننده از ساکارز          |
| -     | متیل رد                         | -     | هیدرولیز نشاسته                   |
| +     | هیدرولیز کازئین                 | +     | ذخیره PHB                         |
|       |                                 | +     | 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* آذربایجان شرقی 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 آذربایجان شرقی 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 از ۷-۵ 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).

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

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

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

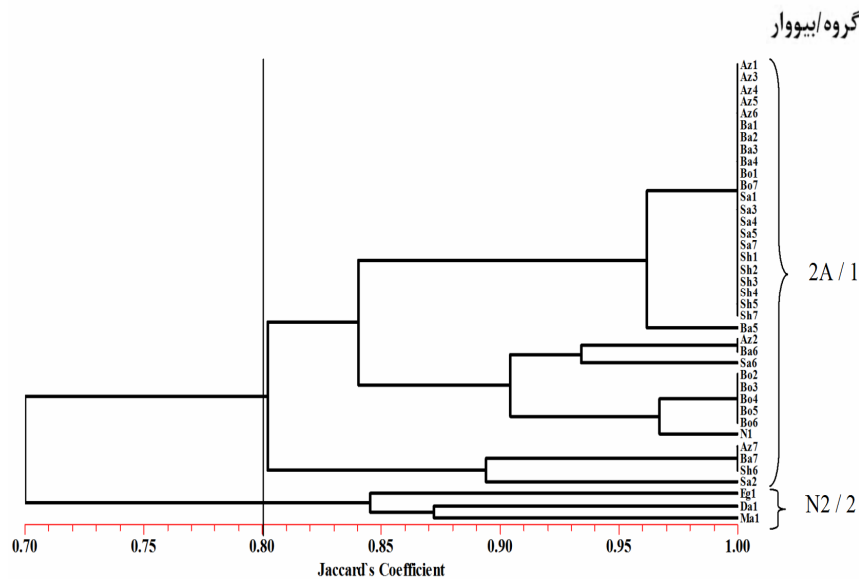
جدول ۴: خصوصیات تعیین کننده بیووار جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب زمینی

| خصوصیت                              | بیووار ۲A            | بیووار N2 |
|-------------------------------------|----------------------|-----------|
| 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                        | -                    | +         |

جدایه‌های فارس به 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 پنی‌سیلین، 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.

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 نترات بودند که این یافته نیز با توصیف بیووار ۲ توسط هیوارد همخوانی دارد (۱۴). جدایه‌های آذربایجان شرقی و کرج از لحاظ خصوصیات کشتی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شبیه به یکدیگر بودند. بعضی اختلاف‌ها در بین جدایه‌ها (هیدرولیز توئین ۸۰، هیدرولیز اسکولین و تولید لوان) وجود دارد (جدول ۳) 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



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

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 سیب‌زمینی کاری دنیا تقریباً شبیه یکدیگر هستند و فقط بعضی تفاوت‌های جزئی در آنها دیده می‌شود (۱۴ و ۱۷). جدایه‌های بیووار ۲ در مناطق خنک، بیشتر سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی را آلوده می‌کنند و منحصرأً متعلق به نژاد ۳ می‌باشند در صورتی که در مناطق گرمسیر جدایه‌های بیووار ۲، دامنه میزبانی وسیع‌تری دارند و منحصرأً 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 و ۳۳). بیووار مذکور اولین بار در نواحی پست حوزه رود آمازون یافت

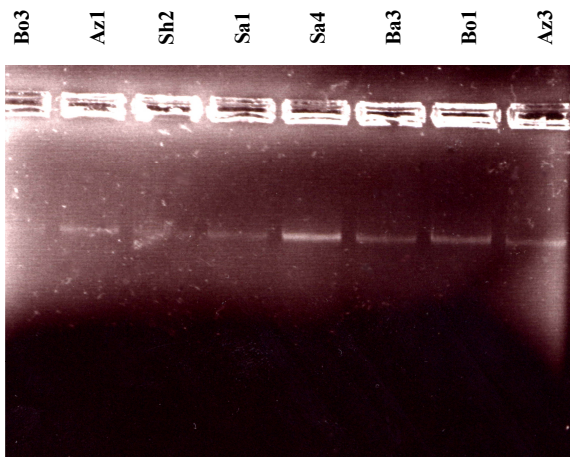
شباهت فنوتیپی در بین ۳۹ جدایه مطالعه شده در دندروگرام آمده است (شکل ۱). دندروگرام فنوتیپی جدایه‌های *R. solanacearum* بر اساس خصوصیات مهم بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای تعداد گروه‌ها را در درون گونه‌ها به خوبی مشخص می‌نماید (۱۷). دندروگرام به دست آمده با الگوریتم Complete Linkage و بر اساس ضریب جاکارد 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 کوفتتیک  $r = 0.91867$  و بیشتر از ضریب کوفتتیک روش Complete Linkage برابر  $r = 0.90557$  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

در گروه ۱ قرار دارند نسبت به گروه ۲ دامنه میزبانی وسیعتری دارند، این نتایج نشان می‌دهد که جدایه‌های بیووار N2 منشأ 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 (RNA ناحیه ITS)، ژن‌های *hrp* ژن اندوگلوکاناز و ژن *mutS* به چهار گروه ژنتیکی (phylo type) تقسیم شده است که بیووار ۲/ نژاد ۳ در گروه‌های ژنتیکی ۲ 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 اندونوکلاز، *hrpB* و 16S rDNA انجام گردید، چهار گروه ژنتیکی (phylo type) را مطرح گردید که نژاد ۳ / بیووار ۲ در گروه ۳ و بیووار N2 در گروه‌های ۲ و ۱ قرار گرفتند.

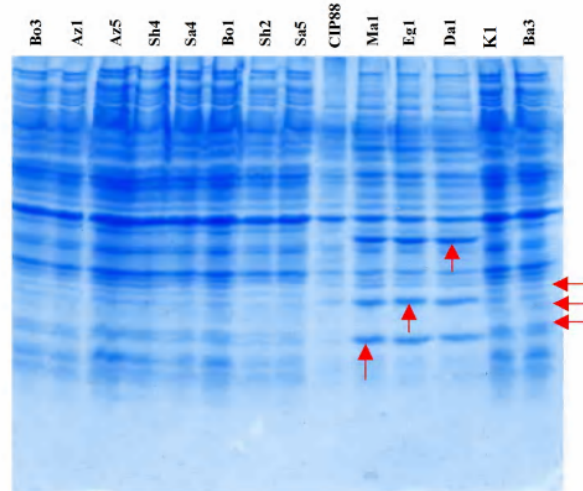
جدایه‌های متعلق به بیووار N2 در روی محیط TZCA به سختی جداسازی می‌شوند. این جدایه‌ها بسیار کند رشد هستند و می‌توانند به راحتی توسط بیووارهای ۲ و ۳ پوشیده شوند و نتوان آنها را جداسازی نمود (۴۲). معقولی و همکاران از مزارع مختلف سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی استان خوزستان، ۷۳ جدایه جداسازی کردند و بر اساس آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی کلیه جدایه‌ها به عنوان بیووار ۲ / نژاد ۳ باکتری *R. solanacearum* تشخیص داده شدند. با وجود تفاوت‌های جزئی در خصوصیات فنوتیپی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی همه جدایه‌های به دست 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 ۲ و ۳ و ۴) و رسم دندروگرام (شکل ۱) و مقایسه نتایج با کارهای سایر محققین، جدایه‌های مطالعه شده در این بررسی

شد. این بیووار همانند نژاد ۱ دارای دامنه میزبانی وسیع بوده و جدایه‌های زیادی دارد، با این حال بیووار (N2) 2T 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). به علاوه جدایه‌های آسیایی بیووار N2 از جدایه‌های آمریکای جنوبی 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 آمریکای 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 آمریکای جنوبی، آسیا (ژاپن، اندونزی و فیلیپین) و افریقا (کنیا) می‌شوند از جدایه‌های بیووار ۲ جدا کرده‌اند، چون آنها در گروه‌های مختلف ژنتیکی (Phylo type) قرار داشتند. جدایه‌های بیووار N2 آسیا از نظر نسب شناسی از جدایه‌های افریقایی و آمریکایی مجزا می‌باشند، این جدایه‌ها در گروه‌های ژنتیکی (Phylo type) ۱ و ۲ پخش می‌شوند (۴۱). جدایه‌هایی که



شکل ۳. الگوی پلاسمیدی جدایه های مناطق مختلف آذربایجان شرقی



شکل ۲. نقوش الکتروفورز پروتئین های سلولی جدایه های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از سیب زمینی در ژل پلی اکریلامید ۱۲٪

کاربردی مناسبی برای طبقه بندی، شناسایی و گروه بندی درون گونه ای باکتری *R. solanacearum* در سطح زیرگونه به شمار می آید (۲۷). جدایه های بیماریزای *R. solanacearum* که EPS تولید می کنند با فرم های غیر بیماریزا (غیر آبکی و غیر رونده) همان جدایه ها الگوی پروتئینی مشابه داشتند (۷).

از بین جدایه های مختلف استان آذربایجان شرقی تعداد هشت جدایه از مناطق مختلف بر اساس آزمون های بیوشیمیایی انتخاب شد و الگوی پلاسمیدی DNA استخراج شده آنها با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز مشاهده شد. تمام جدایه ها دارای یک پلاسمید با اندازه یکسان بودند و هیچ اختلافی در بین آنها مشاهده نشد (شکل ۳).

### سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری های ارزنده کلیه اعضای محترم آزمایشگاه باکتری شناسی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی - اوین تشکر و قدردانی می شود.

متعلق به نژاد ۳ می باشند که بیووارهای 2A و N2 را شامل می شوند. با توجه به مطالعات ویلا و همکاران (۴۱) جدایه های استان آذربایجان شرقی و جدایه کرج (بیووار 2A / نژاد ۳) در گروه ژنتیکی (Phylotype) ۳ و جدایه های استان فارس (بیووار N2 / نژاد ۳) در گروه ژنتیکی (Phylotype) ۲ قرار می گیرند. طبق منابع موجود این اولین گزارش از وجود بیووار N2 / نژاد ۳ در ایران می باشد. از آنجا که استان فارس دارای اقلیم نیمه گرمسیری می باشد و بیووار N2 نیز با این آب و هوا سازگار می باشد. وجود این بیووار در این استان غیر محتمل نمی باشد.

باند های پروتئینی جدایه های آذربایجان شرقی و فارس با یکدیگر مقایسه شدند. جدایه های بیووار 2A به دلیل تفاوت در موقعیت باند پروتئینی از جدایه های بیووار N2 تفکیک می شوند (شکل ۲). در SDS-PAGE هر باند پروتئینی نماینده وجود حداقل یک ژن می باشد، بنابراین اطلاعات SDS-PAGE برای شناخت روابط نسب شناختی در بین گونه ها مفید واقع می شود (۲۸). پروفیل SDS-PAGE پروتئین های غشا معیار

### منابع مورد استفاده

- آزادوار، م. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۹. شناسایی بیو تیپ و نژاد جدایه های باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه اصفهان.



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 گیاهی ۲۴: 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 *Pseudomonas 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., Sydney, Australia.
9. French, E. R. and L. Sequeira. 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from central and south America: A comparative study. Phytopathol. 60: 506-512.
10. Gillings, M. R. and P. C. Fahy. 1993. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovar 2 and N2 assessed using restriction endonuclease 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. Hebbert, 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. Phytopathol. 29: 65-87.
15. Hayward, A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. In: Lederberg, J. (Ed.), Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. Pub., San Diego.
16. Hayward, 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 Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB. International, Walingford, UK. .
17. He, L. Y., L. Sequeira 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 pathogenicity 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 bacteriophage T4. 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 infiltration techniques. Phytopathol. 60: 833-838.
26. Marin, J. E. and H. M. El-Nashaar. 1993. Pathogenicity of the new phenotypes of *Pseudomonas solanacearum* from

- 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. Comparative 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. Kluefel. 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. 3<sup>rd</sup> ed., APS Press, St. Paul, Minnesota 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. November and *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.