

تنوع ژنتیکی و صفات فیزیولوژیکی استرین‌های *Ralstonia solanacearum* مزارع سیب‌زمینی استان همدان

Diversity and Physiological Characteristics of *Ralstonia solanacearum* From Potato Fields in Hamedan Province

سمیه اسفندیاری^۱ و غلام خداکریمیان^{۲*}

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۳/۷

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۲/۲

چکیده

بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *Ralstonia solanacearum* از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی در استان همدان است. برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solanacearum* نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی در بهار و تابستان سال ۱۳۸۹ از مناطق مختلف این استان جمع‌آوری گردید. کشت اندام‌های آلوده گیاهی (غده و ساقه) روی محیط نوترینت آگار (NA) حاوی تری فنیل تترازولیوم کلراید و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، منجر به شناسایی ۵۲ استرین *R. solanacearum* بیوار 2A گردید. برای تشخیص دقیق‌تر جدایه‌ها واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای ps96H و ps96I انجام شد. نتایج PCR نشان داد که نمونه‌ها همراه با نمونه استاندارد یک باند مشابه ۱۴۸ جفت بازی تولید نمودند. تنوع ژنتیکی ۲۶ جدایه انتخابی با آغازگرهای BOX و ERIC مورد بررسی قرار گرفت. طول قطعات تکثیری با استفاده از آغازگر BOX A1R در محدوده ۱۰۰ تا ۱۵۰۰bp و آغازگر ERIC از ۲۰۰ تا ۱۲۰۰bp متغیر بود. گروه‌بندی جدایه‌های به‌دست آمده با روش UPGMA و براساس ضریب جاکارد با استفاده از داده‌های هر دو آغازگر، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۷۴ درصد به ۵ گروه اصلی منتسب کرد. نتایج حاصل نشان‌دهنده آن است که استرین‌های *R. solanacearum* جمع‌آوری شده خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی متفاوتی داشتند، هرچند ارتباط مشخصی بین منطقه جغرافیایی و خصوصیات استرین‌ها به‌دست نیامد. این بررسی کارآیی روش PCR با آغازگرهای BOX و ERIC را برای نشان دادن چندشکلی ژنتیکی در جمعیت‌های *R. solanacearum* نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی سیب‌زمینی، BOX، ERIC، بیوار 2A، استان همدان

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

Email: khodakaramian@yahoo.com

*: نویسنده مسوول

مقدمه

پژمردگی باکتریایی ناشی از *R. solanacearum* برای نخستین بار در سال ۱۸۶۴ در اندونزی و در توتون مورد توجه قرار گرفت و در سال ۱۸۹۶ توسط اسمیت (Smith, 1896) با نام *Pseudomonas solanacearum* توصیف شد خاکور و همکاران (Khakvar et al., 2008). در سال ۱۹۵۳ گزارش جامعی در مورد این بیماری توسط کلن منتشر شد و نژاد سه و بیووار دو عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی شناخته شد. هاپوارد (Hayward, 1991). این باکتری یکی از عوامل مهم کاهش‌دهنده محصول سیب‌زمینی در مناطق گرمسیر، نیمه‌گرمسیر و معتدل دنیا به شمار می‌رود. بودنهاگن و کلمن؛ کلمن و همکاران؛ هاپوارد و همکاران (Buddenhagen and Kelman, 1964; Kelman et al., 1994; Hayward et al., 1994) و از اقلیم‌های نسبتاً خنک نیز گزارش شده است. بیش از ۲۷۰ گونه متعلق به ۵۰ خانواده گیاهی به‌عنوان میزبان این باکتری گزارش شده است هاپوارد (Hayward, 1991; Hayward, 1995). در بین دو لپه‌ای‌ها، بیشترین تعداد میزبان‌ها به‌ترتیب متعلق به خانواده‌های *Solanaceae*، *Asteraceae* و *Leguminoseae* هستند. در ایران بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی اولین بار توسط بهار و دانش روی سیب‌زمینی از منطقه اصفهان گزارش شده است (بهار و دانش، ۱۳۶۷). در حال حاضر این بیماری در اکثر نواحی ایران روی سیب‌زمینی وجود دارد و یکی از عوامل محدودکننده کشت سیب‌زمینی است. به‌دلیل اهمیت اقتصادی سیب‌زمینی و زیان بالای بیماری، مطالعات زیادی برای شناسایی و تشخیص سریع عامل بیماری به روش مولکولی صورت گرفته است. باکتری *R. solanacearum* به‌دنبال جداسازی از گیاهان بدون علامت یا دارای علامت و همچنین آب یا خاک، توسط چندین روش مولکولی و میکروبیولوژیکی قابل شناسایی است. پریو و همکاران؛ شاد و همکاران (Priou et al., 2006; Schaad et al., 2001). ترکیب حداقل دو روش تکمیل‌کننده متفاوت برای شناسایی بدون ابهام گونه‌ها و بیووارها ضروری است. بهار و همکاران (۱۳۸۳) روش‌های مختلف ردیابی باکتری را برای تعیین حضور آن در خاک‌هایی که به‌طور مصنوعی آلوده به این بیمارگر شده بودند، مورد مقایسه قرار داده و گزارش کرده‌اند که روش PCR با آغازگر اختصاصی در ردیابی بیمارگر حساسیت بالایی نشان می‌دهد. نوری و همکاران (۱۳۸۳) از روش PCR-RFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی نژاد شماره سه باکتری *R. solanacearum* در مناطق سیب‌زمینی‌کاری ایران استفاده کردند. در این تحقیق برای تعیین اختلاف جدایه‌ها، تولیدات PCR آن‌ها به‌وسیله آنزیم‌های برشی هضم شدند. نتایج

مکرر آزمایش RFLP نشان داد که وضعیت باندهای برش یافته آنزیمی کاملاً مشابه هم هستند. کریمی و حریقی (۱۳۸۹) تنوع فنوتیپی و ژنتیکی استرین‌های *R. solanacearum* در استان های کردستان و مرکزی را با روش PCR و استفاده از آغازگر - های اختصاصی ژن‌های *hrp* بررسی کردند. ایزدیان و تقوی (۱۳۸۹) به بررسی بیماری‌زایی *R. solanacearum* پرداخته و بیوارهای مختلف باکتری را با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در روش Bio-PCR تفکیک کردند. براساس نتایج به‌دست آمده استرین‌های مورد بررسی براساس بیوار در دو گروه 2A و 2N قرار گرفتند. سیل و همکاران (Seal et al., 1992 and 1993) از روش PCR برای تشخیص باکتری *R. solanacearum* در غده سیب‌زمینی استفاده کردند. آن‌ها دریافتند که ردیابی غلظت- های پایین باکتری در عصاره‌ی غده با استفاده از روش PCR همیشه با موفقیت همراه نیست، زیرا عصاره دارای ممانعت‌کننده‌های بسیاری است که مانع تکثیر DNA هدف می‌شوند. تحقیقات انجام شده نشان داده که علاوه بر ممانعت‌کننده‌های سلولی، گاهی مواد استفاده شده در استخراج DNA نیز به‌عنوان ممانعت‌کننده در تکثیر DNA عمل می‌نمایند. بنابراین برای دستیابی به DNA عاری از ممانعت‌کننده‌ها، استفاده از یک روش استخراج مناسب امری ضروری است. هرتانگ و همکاران (Hartung et al., 1998) از تکنیک PCR برای شناسایی استرین‌های *R. solanacearum* جدا شده از مناطق مختلف جغرافیایی استفاده نمودند و نشان دادند که پرایمرهای PS96I و PS96H بسیار اختصاصی بوده و توانستند تمام استرین‌های مورد بررسی را شناسایی کنند. پاستریک و میس (Patrik and Miss, 2000) ده روش مختلف استخراج DNA از غده آلوده به باکتری *R. solanacearum* را مقایسه نمودند و نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که سه روش استخراج DNA با استفاده از CTAB SDS و کیت استخراج DNA-Easy از کارایی بالایی برخوردارند و قادر به استخراج DNA با کیفیت بسیار خوب از عصاره غده هستند. در باکتری‌های گرم منفی و مثبت، توالی‌های DNA تکراری به‌طور طبیعی در سرتاسر ژنوم وجود دارند که عناصر پالیندرمیک خارج ژنی تکرار شده (REP) یا Repetitive Extragenic Palindromes، توالی‌های بین ژنی تکرار شده در انتروباکترها (ERIC) یا Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus و عناصر BOX می‌باشند. rep-PCR با استفاده از آغازگرهای مشتق شده از این توالی‌های تکراری صورت می‌گیرد. لووز و همکاران؛ دبورجن (Louws et al., 1994; DeBrujin, 1992). کاربرد rep-PCR یک روش بسیار معتبر،

سه گروه تقسیم کردند نشان دادند که بیووارهای آسیا دو گروه هستند. براساس RFLP و دیگر مطالعات انگشت‌نگاری ژنتیکی *هایوارد*، ۱۹۹۵؛ سیل و همکاران؛ تقوی و همکاران (Seal et al., 1996; Taghavi et al., 1993) باکتری به دو شاخه با منشأ جغرافیایی متفاوت تقسیم می‌شود: شاخه I (بیووار سه، چهار و پنج منشأ گرفته از آسیا) و شاخه II (بیووار یک، 2A و 2T منشأ گرفته از آمریکای جنوبی). اخیراً یک سری روش‌های طبقه‌بندی معتبر از لحاظ فیلوژنتیکی بر اساس آنالیز توالی ناحیه ITS ابداع شده است *پریو و فگان*؛ *پوسیر و همکاران* (Prior and Fegan, 2005; Poussier et al., 2000). این سیستم، کمپلکس گونه‌ای را به چهار فیلوتایپ تقسیم می‌کند که به میزان زیادی نشان‌دهنده‌ی روابط ژنتیکی و جغرافیایی این استرین‌ها است. استرین‌های فیلوتایپ I از آسیا، استرین‌های فیلوتایپ II از آمریکا، استرین‌های فیلوتایپ III از آفریقا و استرین‌های فیلوتایپ IV از اندونزی (بیووار یک، دو و 2T) جدا شده‌اند. فیلوتایپ I و II منطبق با شاخه یک و دو توصیف شده توسط *کوک و همکاران* هستند (Cook et al., 1989). براساس توالی ژن اندوگلوکناز، این فیلوتایپ‌ها به چند سکيووار (Sequivar) تقسیم می‌شوند (*پریو و فگان*، ۲۰۰۵). طبقه‌بندی براساس توالی چند جایگاهی و دیگر بررسی‌ها مؤید این مسئله است که این سیستم طبقه‌بندی منعکس‌کننده فیلوژنی این گروه است. بررسی‌هایی که توسط *ویلا و همکاران* (Villa et al., 2005) با جدایه‌های بیشتر روی ژن‌های اندونوکلاز، *hrpB* و 16S rDNA انجام گردید نشان داد که جدایه‌ها چهار گروه ژنتیکی (Phylotype) هستند طوری که نژاد ۳، بیووار ۲ در گروه ۳ و بیووار N2 در گروه‌های ۱ و ۲ قرار گرفتند. در تحقیق حاضر کارایی روش rep-PCR برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solanacearum* در استان همدان از یکدیگر مورد ارزیابی قرار گرفت تا در استراتژی مدیریت بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و نگهداری استرین‌های باکتریایی

در بهار و تابستان سال ۱۳۸۹ از مزارع سیب‌زمینی استان همدان بازدید به‌عمل آمد، بوته‌های دارای علائم پژمردگی، زردی و کاهش رشد انتخاب شدند و در مجموع تعداد ۷۳ نمونه گردآوری شد. همچنین غده‌های دارای حلقه آوندی قهوه‌ای رنگ نیز از مزارع جمع‌آوری گردید. جداسازی باکتری مطابق روش‌های معمول باکتری‌شناسی، *فای و هایوارد* (Fahy and Hayward, 1983) با خردکردن قطعات بافت آلوده در آب مقطر

تکرارپذیر (reproducible)، سریع و دارای قدرت تشخیص و تفکیک بالایی است که با آن می‌توان جدایه‌ها را در سطح گونه، زیرگونه و بیووار شناسایی و تفکیک کرد. *لووز و همکاران* ۱۹۹۴؛ *ربرتسون و همکاران* (Robertson et al., 2001). *اسمیت و همکاران* (Smith et al., 1995) تنوع ژنتیکی نژاد ۳ و *R. solanacearum* در کنیا را با استفاده از RC-PFGE (Rare endonuclease pulsed field gel cutting restriction electrophoresis) و rep-PCR مطالعه کرد. نتایج نشان داد که در روش rep-PCR بین جدایه‌ها ۹۵٪ شباهت وجود دارد. آن‌ها در RC-PFGE چندشکلی بیشتری را نسبت به rep-PCR به‌دست آوردند. *واندرولف و همکاران* (Van Der Wolf et al., 1998) تنوع ژنتیکی نژاد ۳ را در غرب اروپا با rep-PCR و RC-PFGE بررسی کردند. این محققین هر سه روش را برای مطالعات ژنتیکی، مناسب ارزیابی کردند و چندشکلی خوبی از جدایه‌های نژاد ۳ را به‌دست آوردند (*ربرتسون و همکاران*، ۲۰۰۱). تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solanacearum* را در شمال غربی ایالت متحده با استفاده از rep-PCR مورد بررسی قرار دادند و چندشکلی بالایی مشاهده نمودند. آن‌ها بیان داشتند که تنوع بالای این باکتری مشکلات زیادی در تولید ارقام مقاوم تولید شده در این منطقه‌ی جغرافیایی به‌وجود آورده است. *هوریتا و تسوجیا* (Horita and Tsuchiya, 2001). تنوع ژنتیکی جدایه‌های ژاپن را با RFLP و rep-PCR مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها جدایه‌های بیووار N2 را به دو گروه تقسیم کردند، به‌طوری‌که تعدادی در نژاد ۳ و تعدادی دیگر در نژاد ۱ قرار گرفتند. همچنین بیووارهای ۳، ۴ و ۵ در گروه اول و بیووارهای ۱، ۲ و N2 در گروه دوم جای گرفتند و دامنه‌ی شباهت میان جدایه‌های بیووار ۲ از هشت کشور مختلف و بیووار N2 از برزیل بین ۶۵ تا ۹۴ درصد بود. این محققین اعلام کردند که خصوصیات فنوتیپی و الگوهای rep-PCR ممکن است با هم رابطه داشته باشند. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solanacearum* روی سیب‌زمینی و اکالیپتوس در آفریقا به روش PCR-RFLP توسط *فوخ و بیچ و همکاران* (Fouche-Weich et al., 2006) انجام شده و نتایج به‌دست آمده نشان داد که استرین‌های جدا شده بیووار دو و سه بودند. آنالیز AFLP نیز این نتایج را تأیید و آن‌ها را به دو گروه شامل بیووار دو و سه تقسیم کرد. در مطالعات انجام شده توسط *هوریتا و همکاران* (Horita et al., 2005) روی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های بیووار N2 در آسیا، بین جدایه‌های بیووار N2 آسیا و آمریکای جنوبی و بین جدایه‌های بیووار N2 و ۲ آسیایی، براساس خصوصیات فنوتیپی تفاوت وجود داشت. آن‌ها براساس rep-PCR بیووار N2 را به

BOX و 57°C برای آغازگر PS96I و PS96H به مدت ۱ دقیقه (اتصال آغازگر) و 65°C به مدت چهار دقیقه (گسترش آغازگر) و در نهایت یک چرخه دمای 65°C به مدت هشت دقیقه برای آغازگر REP و به مدت ۱۵ دقیقه برای آغازگر BOX و دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه برای آغازگر PS96I و PS96H (گسترش نهایی) بود. برای تفکیک قطعات تکثیری از الکتروفورز ژل آغاز ۱/۵ و ۱/۷ درصد استفاده شد و رنگ‌آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام گردید. برای تعیین اندازه قطعات محصول rep-PCR از نشان‌گر استاندارد DNA فاژ لامبدا (Gene Ruler™ 100bp Ladder Plus) استفاده شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل روی نور UV مشاهده و از آن عکس برداری گردید.

تجزیه داده‌ها

برای تعیین کارایی گروه‌بندی از الگوهای نواری به صورت وجود یا عدم وجود نوار استفاده گردید. امتیازدهی و گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از الگوریتم‌های UPGMA و دورترین همسایه‌ها و ضریب تشابه جاکارد انجام شد. تعداد بهینه خوشه با تشخیص محل برش در دندروگرام تعیین گردید، محمودی و پراسانا (Mohamadi and Prasanna, 2003). تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pcVersion 2.02e صورت گرفت.

نتایج و بحث

مشخصات استرین‌های مورد بررسی شامل محل جداسازی و نوع بیووار تشخیص داده شده در جدول ۱ آمده است. براساس خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ۵۲ استرین باکتری عامل بیماری پژمردگی سیب‌زمینی *R. solanacearum* و نوع بیوار آن 2A تشخیص داده شد. ویژگی‌های مهم استرین‌های جداسازی شده براساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی در جدول ۲ نوشته شده است.

خصوصیات فنوتیپی استرین‌ها نشان داد که همگی جدایه‌ها متعلق به گونه *R. Solanacearum* می‌باشند. هایوارد (1991، یابوچی و همکاران (Yabuuchi et al., 1995). با توجه به نتایج به دست آمده جدایه‌های جمع‌آوری شده از استان همدان بیوار 2A معرفی می‌گردند. این خصوصیات با نتایج کار سایر محققین درباره تعیین بیوار مشابه است (هوریتا و همکاران، 2001؛ هایوارد، 1991).

استرین و بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه کشت سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت PDA و NA حاوی TTC (تری فنیل تترازولیوم) به صورت مخطط صورت گرفت.

بررسی صفات فیزیولوژیکی استرین‌های جداسازی شده:

برای بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی استرین‌های باکتری *R. solanacearum* جدا شده از استان همدان از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی استفاده شد (شاد و همکاران، 2001).

استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آنالیز داده‌ها

جهت بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های باکتریایی

استخراج DNA به روش اوسبل و همکاران (Ausubel et al., 2002) انجام گردید. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری روی محیط جامد NA با غلظت 10^6-10^7 سلول زنده در میلی‌لیتر در آب مقطر سترون تهیه شد. سپس روی باکتری‌های مذکور 1000 میکرولیتر آب مقطر یا بافر TE ریخته و سه بار در حمام آب گرم به مدت ۱/۵ دقیقه جوشانده شده و بلافاصله سرد شدند سپس میکروتیوب‌های حاوی مواد فوق به مدت ۵ دقیقه در 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. از محلول رو نشین شده (فاز رویی) به عنوان DNA الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش PCR در بافر PCR (غلظت نهایی $1\times$) $2/5 \mu\text{l}$ MgCl_2 (غلظت نهایی $2/5 \text{ Mm}$) $2/5 \mu\text{l}$ dNTPS (غلظت نهایی $0/2 \text{ Mm}$) $0/5 \mu\text{l}$ پرایمر (غلظت نهایی 25 pmol) $2/5 \mu\text{l}$ آنزیم Taq DNA polymerase (غلظت نهایی 25 pmol) $0/5 \mu\text{l}$ آب مقطر دیونیزه $15/5 \mu\text{l}$ و DNA استخراج شده $1 \mu\text{l}$ انجام شد. از آغازگرهای

ERIC1R (5'GTGAAGTAAAGACGAGTCA3');
ERIC2 (5'-GTAAGCTCCTGGGGATTCA-3') و
BOXA1R (5'CTACGCAAGGCCGCTGACG-) لویی و همکاران (Lowe et al., 1994). و جفت آغازگرهای PS96H (5'-TCACCGAGCCACGCGTCCATCAC-3');
PS96 I (AAGGTGTGCATCGAACCCGCC-3') (هرتانگ و همکاران، 1998) تهیه شده از شرکت سیناژن استفاده شد. چرخه دمایی شامل پنج دقیقه در دمای 95°C (واشرش اولیه) و سپس ۳۵ چرخه با 94°C به مدت یک دقیقه (واشرش)، 40°C برای آغازگر ERIC و 52°C برای آغازگر

جدول ۱: محل گردآوری استرین‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان و بیوار آن‌ها

Table 1: Places of isolation of *Ralstonia solanacearum* strains from potato field in Hamedan province

محل جمع‌آوری Place of collection	میزبان Host	بیوار Biovar	شماره جدایه Strain
بهار (Bahar)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES1-ES14
لالجین (Lalejin)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES15-ES26
اسدآباد (Asadabad)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES27-ES30
کبودرآهنگ (Kabodarhang)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES31-ES34
ده پیاز (Dehpiaz)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES35-ES37
ینگجه (Yengeje)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES38-ES42
رزن (Razan)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES43-ES47
فامنین (Famenin)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES48-ES50
علی‌آباد (Aliabad)	سیب‌زمینی (<i>Solanum tuberosum</i>)	2A	ES51-ES52

جدول ۲: برخی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های *Ralstonia solanacearum* عامل بیماری پژمردگی مزارع سیب‌زمینی

Table 2: Some phenotypical characteristics of *Ralstonia solanacearum*, causing wilt potato disease in Hamedan province

واکنش Reaction	ویژگی Character	واکنش Reaction	ویژگی Character
-	رشد در نمک ۱/۵٪ Growth on 1.5% NaCl	-	واکنش گرم Gram reaction
-	دولسیتول Dulcitol	+	فوق حساسیت در توتون Tobacco hypersensitivity reaction
±	مالتوز Maltose	+	فوق حساسیت در شمعدانی Geranium hypersensitivity reaction
+	سلوبیوز Celubiose	-	لهانیدن غده سیب‌زمینی Potato rot
-	دی-ترهالوز D-threhalose	+	رنگدانه نفوذپذیر Diffusible pigment
+	گلوکوز Glucose	+	کاتالاز Catalase
-	دی-آرابینوز D-arabinose	+	اکسیداز Oxidase
-	دی-تارتارات D-tartarate	-	آرژنین دی‌هیدرولاز Arginine dihydrolase
-	مانیتول Mannitol	-	رشد در ۴۱ درجه سلسیوس Growth at 41 °C
-	سوربیتول Sorbitol	-	تخمیر گلوکز Glucose fermentation
-	دی-فوکوز D-fucose	-	رنگ فلورسنت روی کینگ ب Fluorescent pigment on King's B medium
+	لاکتوز Lactose	-	هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis

*: +: ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش مثبت نشان دادند، -: ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش منفی نشان دادند و V:

بین ۲۱-۷۹٪ استرین‌ها واکنش مثبت نشان دادند

*: +: 80% or more of tested bacterial strains showed positive reaction; -: 80% or more of tested bacterial strains showed negative reaction and V: between 21-79% of tested bacterial strains showed positive reaction

ادامه جدول ۲: برخی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های *Ralstonia solanacearum* عامل بیماری پژمردگی مزارع سیب‌زمینی
Continued Table 2: Some phenotypical characteristics of *Ralstonia solanacearum*, causing wilt potato disease in
Hamedan province

واکنش Reaction	ویژگی Character	واکنش Reaction	ویژگی Character
V	تولید لوآن Levan formation	V	هیدرولیز اسکولین Aesculine hydrolysis
±	مالتوز Maltose	-	هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis
+	ان-پروپانول N-propanol	-	متیل رد Methyl red
-	هپتانوات Heptanoate	+	اوره‌آز Urease
-	بتاین Btaein	+	احیای نیترات Nitrate reduction
-	ال-آرژینین L-arginine	-	فسفاتاز Phosphatase
-	دی-رایبوز D-ribose	+	هیدرولیز کازئین Casein hydrolysis

*: +: 80% یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش مثبت نشان دادند، -: ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش منفی نشان دادند و V:

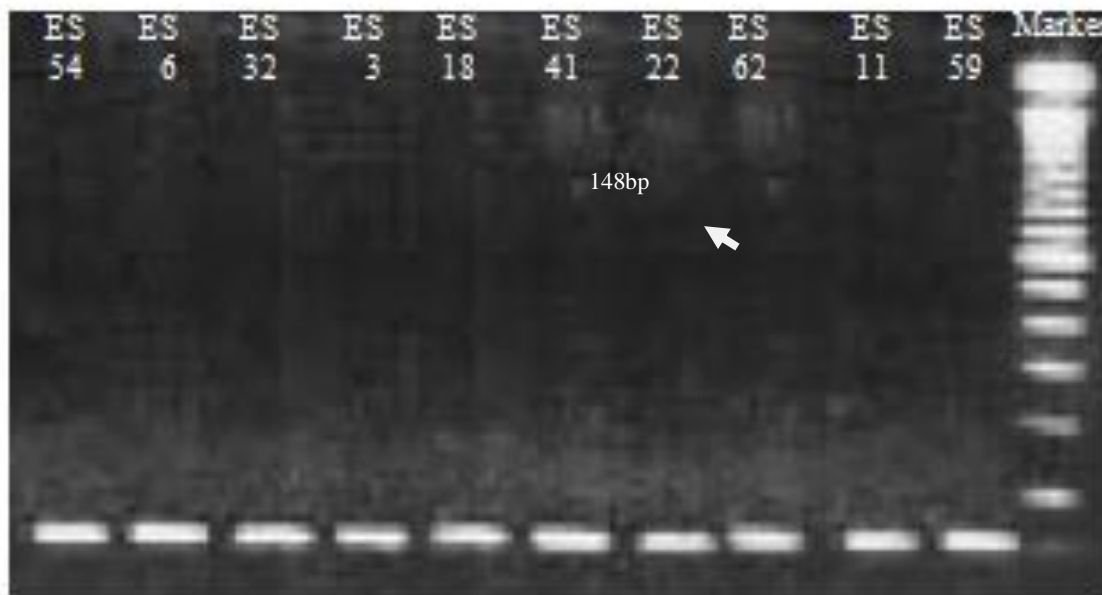
بین ۲۱-۷۹٪ استرین‌ها واکنش مثبت نشان دادند

*: +: 80% or more of tested bacterial strains showed positive reaction; -: 80% or more of tested bacterial strains showed negative reaction and V: between 21-79% of tested bacterial strains showed positive reaction

کردستان، دو آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. این دو آغازگر سطوح مختلف تنوع را نشان دادند که هر کدام اطلاعاتی از یک جدایه را نمایان می‌سازد. با این دو آغازگر در مجموع ۳۳ باند تکثیر شد. آغازگر BOX AIR چند شکلی بیشتری نشان داد. از تعداد کل باندها، ۲۰ باند مربوط به آغازگر BOXIR و ۱۳ باند مربوط به آغازگر ERIC بود. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرها متفاوت بود. قطعات تکثیری با استفاده از آغازگر BOX AIRbp ۱۰۰ تا ۱۵۰۰bp بود و با استفاده از آغازگر ERIC قطعاتی با اندازه ۲۰۰bp تا ۱۲۰۰bp تکثیر شد (شکل ۲).

بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های باکتریایی

پس از انجام آزمون‌های فیزیولوژیکی برای شناسایی مولکولی و دقیق استرین‌های جمع‌آوری شده آغازگرهای PS96I و PS96H به کار رفت. با استفاده از این آغازگر باندی به طول ۱۴۸ جفت باز به دست آمد که با نتایج هارتونگ و همکاران (۱۹۹۸) که از جفت پرایمرهای مذکور برای شناسایی ۲۸ استرین *R. solanacearum* استفاده کردند همخوانی دارد. به منظور ارزیابی چندشکلی‌های حاصل از تکثیر DNA در بین ۲۶ استرین انتخاب شده (با توجه با آزمون‌های فنوتیپی، الگوی پروتئین، تنوع بیماری‌زایی) و دو جدایه از استان



شکل ۱: واکنش PCR با آغازگرهای PS96I و PS96H جهت شناسایی باکتری *Ralstonia solanacearum* جدا شده از مزارع سیبزمینی استان همدان (طول باند ایجاد شده ۱۴۸ جفت باز است)

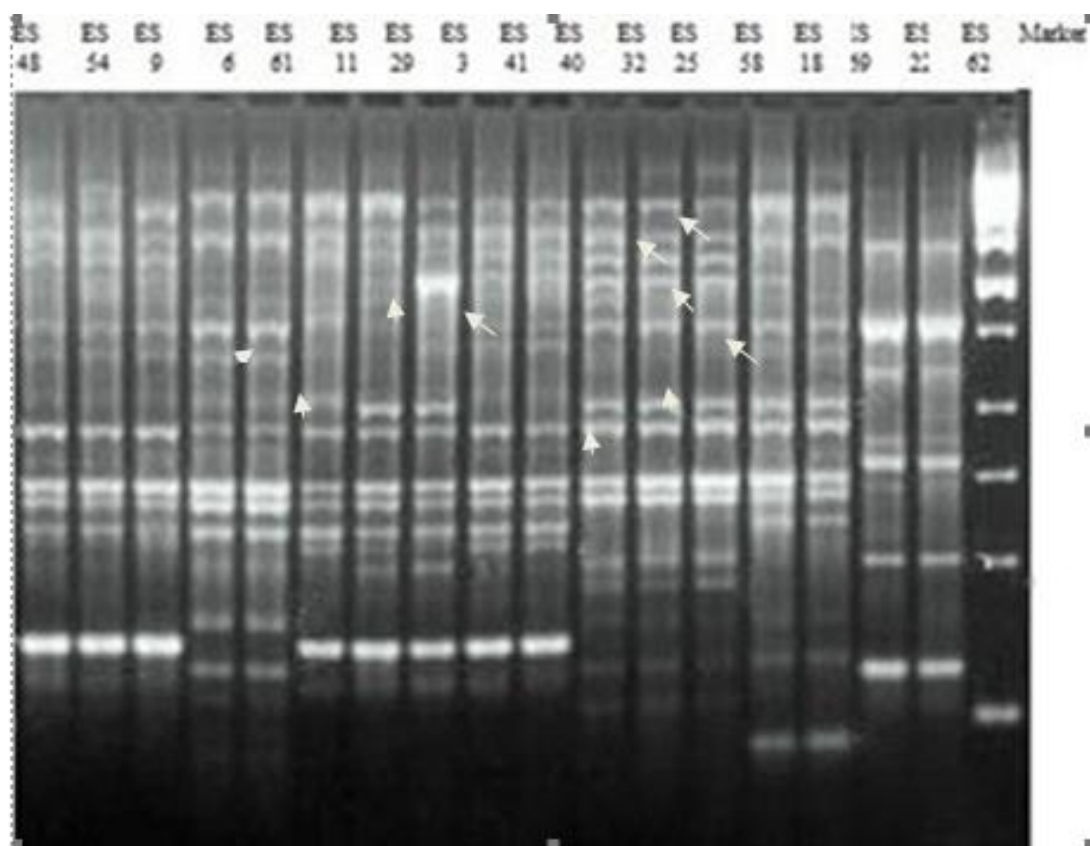
Fig. 1: PCR amplification of targeted DNA using PS96 and PS96H primers, for diagnosis of *Ralstonia solanacearum* from potato field of Hamedan province (Length of band is 148 bp)

استان کردستان با استان همدان همجوار است این احتمال وجود دارد که جدایه‌های در نظر گرفته شده از استان همدان به این استان وارد شده باشند و یا این که در طی تبادلات غده-های سیبزمینی تشابهات ژنتیکی میان آن‌ها اتفاق افتاده است. جدایه‌های مربوط به منطقه اسداباد به تنهایی تشکیل یک گروه را داده و در کنار جدایه‌های هیچ کدام از مناطق قرار نگرفتند. از آنجایی که در این منطقه کشت سیبزمینی به تازگی و طی سال‌های اخیر صورت گرفته ممکن است این جدایه‌ها جدید باشند که از مناطق دیگر وارد شده‌اند و یا این که نتیجه جهش و نوترکیبی در جدایه‌های استان همدان باشند. این گروه‌بندی‌ها نشان داد که جدایه‌های منطقه اسداباد شباهت ژنتیکی کمتری با بقیه جدایه‌ها داشت. جدایه‌های دو منطقه لاله‌جین و بهار شباهت ژنتیکی بیشتری با هم نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند. این نتایج با کارهای محققین دیگر در بررسی روش rep-PCR برای نشان دادن تنوع ژنتیکی جدایه‌های *R. solanacearum* همخوانی دارد. اسمیت و همکاران؛ *جانگ و وانگ؛ هوریتا و تسوچی؛ ملانی و همکاران؛ نورمن و همکاران (Smith et al., 1995; Horita and Tsuchiya, 2001; Jaunet and Wong, 1998; Melanie et al., 2009; Norman et al., 2007)*. ملانی و همکاران (2007) تنوع ژنتیکی ۱۷۹ جدایه‌های باکتری *R. solanacearum* جدا شده از بادمجان را از مناطق مختلف فیلیپین با استفاده از آغازگر ERIC بررسی کردند، جدایه‌های در نظر گرفته شده بیوار سه،

در گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از دو الگوریتم PGMA با توجه به مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک، گروه‌بندی حاصل از الگوریتم UPGMA براساس ضریب جاکارد، برای تفسیر نهایی انتخاب شد. بر مبنای این الگوریتم ضریب مزبور برای آغازگر BOXA1R برابر $r = 0/91$ و در تلفیق دو آغازگر برابر $r = 0/92$ بود که نشان‌دهنده کارایی بالای این روش است. برش در نقطه‌ای انجام شد که بیشترین فاصله بین جدایه‌ها از نظر منطقه جغرافیایی مشاهده شد. قطع دندروگرام در نقطه ۷۴ (سطح شباهت ۷۴٪) جدایه‌ها را به ۵ گروه اصلی تقسیم کرد (شکل ۳). گروه‌ها شامل: دو جدایه انتخابی از منطقه اسداباد که در گروه اول خوشه‌بندی قرار گرفتند. در گروه دوم ۸ جدایه از ۴ منطقه بهار، لاله‌جین، رزن، کبودرآهنگ و یک جدایه از استان کرمان قرار گرفتند. در گروه دوم چهار جدایه از ۳ منطقه استان همدان و یک جدایه از استان کرمان قرار گرفتند. در گروه سوم ۴ جدایه از ۳ منطقه و در گروه چهارم ۸ جدایه از ۳ منطقه استان همدان (بهار، لاله‌جین، کبودرآهنگ) قرار گرفتند. همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، جدایه‌های ۲ منطقه بهار و لاله‌جین در کنار هم در دو گروه قرار گرفتند. براساس مشخصات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و خصوصیات بیماری‌زایی نیز جدایه‌های ۲ منطقه بهار و لاله‌جین تقریباً مشابه بوده و از نظر بیماری‌زایی صفات در نظر گرفته شده را بارزتر از سایر مناطق نشان دادند جدایه مربوط به استان کردستان در کنار جدایه‌های استان همدان در ۲ گروه قرار گرفتند، از آنجایی که

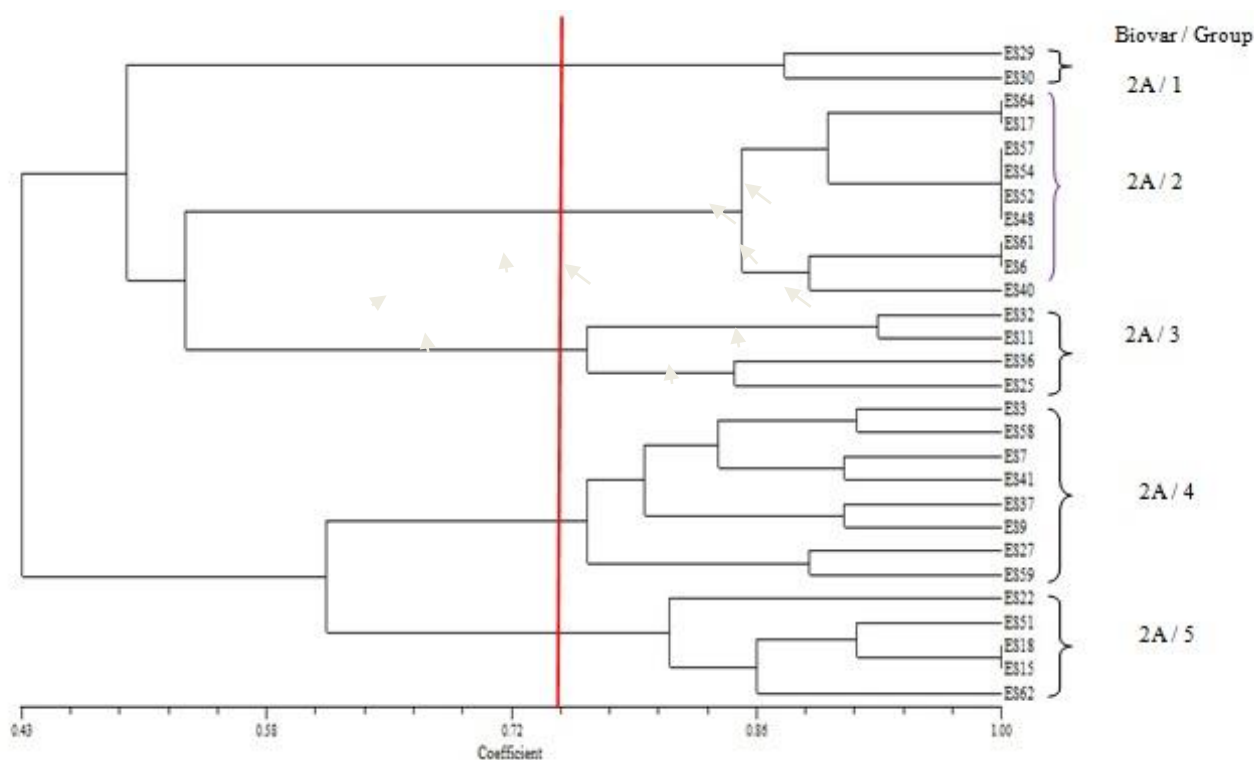
حریقی نشان داد که بین استرین‌های *R. solanacearum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف این دو استان از نظر خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی تفاوت وجود دارد و ارتباط مشخصی بین منطقه جغرافیایی و خصوصیات جدایه‌ها به دست نیامد. ایزدیان و تقوی (۱۳۸۸) تنوع ژنتیکی بیوارهای *R. solanacearum* جدا شده از مناطق عمده سیب‌زمینی‌کاری ایران را با استفاده از آغازگرهای REP، ERIC و BOX (rep-) بررسی کرد که استرین‌ها در سطح تشابه ۵۸٪ در دو گروه شامل استرین‌های بیوار 2A و 2T قرار گرفتند. با توجه به طبقه‌بندی جدید ویلا و همکاران (2005) و براساس تجزیه شجره‌ای، جدایه‌های استان همدان (نژاد ۳/ بیووار 2A) در گروه ژنتیکی (Phylotype) ۳ قرار می‌گیرند.

چهار و یک شناخته شدند. نورمن و همکاران (2009) تنوع ژنتیکی ۱۳۲ استرین باکتری *R. solanacearum* جدا شده از مناطق مختلف آمریکا را برای تعیین بیوار با استفاده از آغازگرهای BOX و ERIC و REP بررسی کردند، ۱۳۲ استرین موردنظر براساس منطقه جغرافیایی از هم تفکیک نشدند که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. ولی روش rep-PCR جدایه‌ها را براساس بیوار از هم تفکیک کرد و جدایه‌های بیوار دو به تنهایی در یک گروه که خود شامل چهار زیر گروه بود قرار گرفتند. کریمی و حریقی (۱۳۸۹) تنوع فنوتیپی و ژنتیکی باکتری *R. solanacearum* را در استان‌های کردستان و مرکزی با استفاده از آغازگرهای REP، ERIC و BOX (rep-PCR) مورد بررسی قرار داد، استرین‌های بررسی شده در سطح تشابه ۵۰ درصد به شش گروه تقسیم شدند، نتایج حاصل از تحقیق کریمی و



شکل ۲: الگوی نواری جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* با استفاده از آغازگر ES18، ES41، ES3، ES17 (بهاره‌ها) و ES18، ES41، ES3، ES17 (بهاره‌ها)؛ ES54، ES27 (لالجین‌ها)؛ ES62، ES61 (علی‌آباد)؛ ES6، ES11 (کبودرآهنگ)؛ ES59، ES25 (رازان)؛ ES32 (فامنین)؛ ES22، ES48 (یئنججه)؛ ES30 (اسدآباد) و ES40 (جدایه‌های کردستان). نوک فلش‌ها در شکل تفاوت باند استرین‌ها را نشان می‌دهد

Fig. 2: Pattern band of *Ralstonia solanacearum* strains with BOX primers: ES18, ES41, ES3, ES17 (Bahar strains); ES54, ES27 (Laljin strains); ES62, ES61 (Ali abad strains); ES6, ES11 (Kabodarahang strains); ES59, ES25 (Razan strains); ES32 (Famenin strains); ES22, ES48 (Yengeje strains); ES30 (Asadabad strains) and ES40 (Kordestan strains)
The arrows shows the differences among the tested strains



شکل ۳: گروه‌بندی جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از سیب‌زمینی براساس داده‌های rep-PCR (آغازگرهای BOX و ERIC) با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب جاکارد. ES3، ES8، ES12، ES1، ES6، ES5، ES14 (جدایه‌های بهار)، ES22، ES17، ES24، ES26 و ES15 (جدایه‌های لاله‌جین)، ES52 و ES51 (جدایه‌های علی‌آباد)، ES34 و ES32 (جدایه‌های کبودرآهنگ)، ES46، ES47 و ES44 (جدایه‌های رزن)، ES4 و ES48 (جدایه‌های فامنین)، ES41 و ES38 (جدایه‌های ینگجه) و ES29 و ES30 (اسدآباد) و K1 و K2 (جدایه‌های کردستان)

Fig. 3: Clustering of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from potato fields in Hamedan province based on the rep-PCR data (BOX and ERIC primers) via UPGMA algorithm and Jaccard coefficient: ES3, ES8, ES12, ES1, ES6, ES5, ES14 (Bahar strains); ES54, ES27 (Laljin strains); ES51, ES52 (Ali abad strains); ES32, ES34 (Kabodarhang strains); ES46, ES47, ES 44 (Razan strains); ES48, ES49 (Famenin strains); ES41, ES38 (Yengeje strains); ES30, ES30 (Asadabad strains) and K1, K2 (Kurdistan strains)

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۶-۸ متن انگلیسی مراجعه شود.