Archive of SID

شماره ۷۰، بهار ۱۳۸۵

در زراعت و باغبانی

بررسی خصوصیات جدایه‌های باکتری عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان

• **مهدی آزادوار**، عضو هیأت علمی مرکزتحقیقات کشاورزی جیرفت و کهنوج، جیرفت

• **حشمت‌اله رحیمیان**، استاد گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران، ساری

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۴

E mail: azadvar1351@yahoo.com

چکیده

آزمون‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی، تغذیه ای و بیماریزایی روی ۴۸ جدایه عامل پژمردگی سیب زمینی جمع‌آوری شده از شهرستان‌های جیرفت، کهنوج، بم، بافت و بردسیر نشان داد که عامل این بیماری در نواحی جنوب استان کرمان ، باکتری *Ralstonia solanacearum* می باشد. این جدایه‌ها از همگونی نسبتاً بالایی برخوردار بودند و تنها در ۲۴ خصوصیت فنوتیپی و تغذیه ای واکنش‌های متفاوت نشان دادند. براساس توانایی جدایه‌ها در استفاده از منابع کربنی لاکتوز، مالتوز و سلوبیوز، عدم توانایی استفاده از مانیتول، سوربیتول، دولسیتول، ترهالوز و رایبوز، تولید رنگدانه شبه ملانین، عدم تولید گاز از نیترات، لهانیدن سیب زمینی، بیماریزایی نسبی روی سیب زمینی، گوجه فرنگی و بادمجان و عدم بیماریزائی روی فلفل، توتون و بادام زمینی، تمامی جدایه‌ها به بیوتیپ A – ۲ (فنوتیپ B بیووار ۲) و نژاد ۳ این باکتری تعلق دارند. نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های مورد بررسی، از تشابه بالایی برخوردار بوده و تفاوت قابل ملاحظه ای نداشتند. آزمون سرولوژیکی نشت دو طرفه در آگار با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال، منجر به تفکیک جدایه‌ها به سروار(Serovar) نشد و تمام جدایه‌ها به دلیل شباهت زیاد، در یک گروه قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: سیب زمینی، پژمردگی باکتریایی، پوسیدگی قهوه‌ای، استان کرمان

Pajouhesh & Sazandegi No 70 pp: 94-102

Studies on bacteriological characteristics of casual agent of bacterial wilt of potato in Southern Kerman

By: M. Azadvar, Dept. of Plant Protection, Agricultural Research Center of Jiroft and Kahnooj, Jiroft, Iran
and H. Rahimian, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Mazandaran University, Sari, Iran

Bacterial wilt is the most important disease of potato in Southern Kerman. The results of phenotypical, biochemical, nutritional and pathogenicity tests on 48 strains isolated from wilted potato in Southern Kerman(Jiroft, Kahnouj,

www.SID.ir

Archive of SID

Bam, Baft and Bardsir cities) showed that *Ralstonia solanacearum* is the causal agent of the disease in these areas. All strains of *R. solanacearum* examined were very similar in all but 25 phenotypic feafures and belonged to race 3, phenotype B of biovar 2 (biotype 2-A). Strains appeared very similar to almost identical in whole-cell protein patterns in SDS-PAGE and also in agar-gel diffusion tests, when a polyclonal antiserum prepared in rabbit against a representative strain was used.

Key words: Potato, Bacterial wilt, Brown rot, Kerman

مقدمه

بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *Ralstonia solanacearum* (Smith)Yabuuchi ۹۹۵ و همکاران یکی از مهمترین و گسترده ترین بیماری‌های سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در دنیاست. نتایج حاصل از مطالعات پنجاه سال اخیر نشان داده است که این پاتوژن بسیار پیچیده و ناهمگون بوده و از مجموعه ای از گروه‌ها، نژادها، زیرنژادها، بیووارها و استرین‌های با خصوصیات بسیار متفاوت، خصوصا از نظر بیولوژی و دامنه میزبانی تشکیل شده است(۶، ۷، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۲۸). گروه بندی استرین‌های این باکتری در سطح زیر گونه به روش‌های متعددی انجام گرفته است که رایج ترین آن، سیستم بیوتیپ و نژاد می باشد. در این سیستم، جدایه‌های مختلف براساس توانایی یا عدم توانایی در استفاده از سه قند دی ساکاریدی لاکتوز، مالتوز و سلوبیوز و سه الکل شش کربنه مانیتول، دولسیتول و سوربیتول ابتدا به چهار و سپس به پنج بیووار[1] گروه بندی شدند(۱۳، ۱۴، ۱۶). همچنین براساس خصوصیات بیماریزایی، دامنه میزبانی، واکنش فوق حساسیت در توتون، مورفولوژی کلنی روی محیط کشت افتراقی تری فنیل تترازولیوم کلراید آگار[2] (۱۷،۱۴،۷) و تولید رنگدانه شبه ملانین در محیط کشت حاوی تیروزین(۱۴،۷)، ابتدا به سه و سپس به پنج نژاد۳ گروه بندی شدند. استرین‌های بیووار[3] این باکتری که قادر به استفاده از قندهای دی ساکارید می باشند ولی از الکل‌های شش کربنه استفاده نمی کنند، براساس توانایی یا عدم توانایی در استفاده از ترهالوز، رایبوز و تارترات و آزمون‌های فعالیت تایروزیناز، لهانیدن سیب زمینی و بیماریزایی نسبی روی گوجه فرنگی، بادمجان، توتون، تاتوره، تاجریزی سیاه و *Cyphomandara betacea* به دو گروه، بیوتیپ A – ۲ (فنوتیپ B بیووار ۲) و بیوتیپ T – ۲ (فنوتیپ A بیووار ۲) تقسیم بندی شده اند (۱۵، ۲۱). بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی اغلب و به خصوص در مناطق مرتفع و سردسیری توسط بیوتیپ A - ۲ / نژاد ۳ و عمدتاً در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جنوب آمریکا توسط بیوتیپ T - ۲ (N ۲) و به میزان کمتر توسط نژاد ۱ / بیووارهای ۱، ۳ و ۴ باکتری مذکور ایجاد می گردد(۹).

در ایران، بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی ناشی از بیووار ۲ باکتری *R. solanacearum* اولین بار در سال ۱۳۶۷ از مزارع سیب زمینی استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری گزارش شد(۳). باقری خیرآبادی و رحیمیان(۲) عامل این بیماری در نواحی مرکزی و غرب ایران را متعلق به بیووار ۲ و نژاد ۳ این باکتری گزارش نمودند. تاکنون تحقیقی در زمینه بررسی خصوصیات و تعیین بیووار و نژاد باکتری عامل این بیماری در استان کرمان، که یکی از مناطق مهم کشت سیب زمینی در ایران به شمار می رود و از نظر اقلیمی با نواحی مرکزی و غرب ایران تفاوت قابل ملاحظه ای دارد، انجام نگرفته است. مطالعه حاضر به منظور تعیین خصوصیات فنوتیپی، تغذیه‌ای، الگوی الکتروفورز پروتئین‌های سلولی، ویژگی‌ها سرولوژیکی و شناسایی بیووار و نژاد جدایه‌های باکتری عامل این بیماری در مزارع سیب زمینی جنوب استان کرمان انجام گرفت. خلاصه بخشی از نتایج این بررسی قبلاً ارائه شده است(۱).

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی

با بازدید از مزارع سیب زمینی نواحی گرمسیری(شهرستان‌های جیرفت، کهنوج و بم) و سردسیری(شهرستان‌های بافت و بردسیر) جنوب استان کرمان، نمونه‌های غده از بوته‌های دارای علائم پژمردگی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. غده‌ها پس از شست و شوی سطحی با آب معمولی، با الکل ۷۰٪ ضدعفونی و به مدت سه تا پنج ثانیه روی شعله نگهداشته شدند. برای جداسازی باکتری عامل بیماری، قطعاتی از حلقه آوندی هر غده در آب مقطر سترون خرد شد. پس از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، یک قطره[۴] از سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت افتراقی TZCA (۱۷) مخطط شد. تک کلنی‌های منتخب بعد از کشت مجدد و اطمینان از خلوص آن‌ها، تکثیر و علاوه بر کشت نقطه ای، در آب مقطر سترون سوسپانسیون و در یخچال نگهداری شدند.

آزمون بیماریزایی

از کشت جوان هر جدایه، سوسپانسیونی با چگالی نوری یک واحد در طول موج ۶۰۰ نانومتر ($OD_{۶۰۰}$=۱) در آب مقطر سترون تهیه و به عنوان مایه تلقیح استفاده شد. آزمون بیماریزایی مطابق روش Winstead و Kelman (۲۷) با تلقیح به ریشه و ساقه سیب زمینی روی ارقام اگریا، آئولا، دراگا و دیامونت انجام شد. دو هفته پس از تلقیح، نتایج براساس ظهور علائم پژمردگی و امکان جداسازی مجدد عامل بیماری، مورد ارزیابی قرارگرفت.

بررسی خصوصیات فنوتیپی

آزمون‌های بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی روی ۴۸ جدایه نماینده، مطابق روش‌های معمول و استاندارد باکتری شناسی(۸، ۲۶) انجام گرفت. توانایی جدایه‌ها در استفاده از منابع کربن و انرژی شامل کربوهیدرات‌ها، پلی الکل‌ها، نمک‌های آلی، اسیدهای امینه و ترکیبات نیتروژنی با استفاده از محیط پایه هیوارد(۱۳) محتوی ۱٪ آگارز و ۰/۰۱ گرم در لیتر معرف برم تیمول بلو انجام گرفت. منابع کربن مورد استفاده به روش تندال[۵]، سترون شده و به غلظت نهایی ۰/۵ —۰/۱ درصد به محیط پایه افزوده شدند. نتایج تا یک ماه پس از کشت، به طور روزانه مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی بیوتیپ

بررسی توانایی جدایه‌ها در استفاده از منابع کربن و انرژی شامل سه قند الکلی مانیتول، دولسیتول، سوربیتول و سه قند دی ساکاریدی مالتوز، لاکتوز و سلوبیوز و نیز توانایی آن‌ها در استفاده از قندهای رایبوز و ترهالوز و نمک آلی تارترات با استفاده از محیط پایه هیوارد(۱۳) محتوی ۰/۰۱ گرم در لیتر معرف برم تیمول بلو و ۱٪ آگارز انجام گرفت. هرکدام از منابع کربن به غلظت نهایی ۰/۵-۰/۱ درصد تهیه و پس از تندالیزه کردن، به محیط پایه سترون افزوده و در پتری‌های استریل شسته شده با اسید، پخش گردیدند. قند دولسیتول که حلالیت کمی در آب دارد مستقیماً به محیط پایه افزوده و سپس اتوکلاو شد. پس از کشت جدایه‌ها به صورت نقطه ای، نتایج به طور روزانه تا یکماه پس از تلقیح، بر اساس رشد یا عدم رشد و تولید اسید یا قلیا مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون فعالیت تایروزیناز(تولید رنگدانه شبه ملانین) براساس روش هیوارد(۱۳) با کشت باکتری روی محیط کازئین پپتون گلوکوز آگار[۶] حاوی ۱ / ۰درصد ال- تیروزین انجام گرفت و نتایج براساس سرعت و شدت تولید رنگ قهوه‌ای در اطراف کلنی ارزیابی شد. آزمون احیاء نیترات یا تولید گاز از نیترات براساس روش Lelliot و همکاران(۱۹) انجام گرفت و نتایج با افزودن ۰/ ۵ میلی لیتر محلول اسید سولفانیلیک و ۰/ ۵ میلی لیتر محلول دی متیل آلفانفتیل آمین و یا براساس ایجاد حباب در انتهای لوله دورهام[۷] ارزیابی شد.

شناسایی نژاد

توانایی جدایه‌ها در بیماریزایی یا عدم بیماریزایی روی گوجه فرنگی(*Lycopersicon esculentum* L.)، فلفل(*Capsicum annum* L.)، بادام زمینی(*Arachis hypogaea* L.)، بادنجان(*Solanum melongena* L.) و سیب زمینی(*S. tuberosum* L.) مطابق روش Winstead و Kelman (۲۷) و با تزریق ۴۰-۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه با چگالی نوری یک واحد ($OD_{۶۰۰}$=۱) در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=۷) به ساقه گیاهان مذکور انجام گرفت. در گیاهان شاهد به جای سوسپانسیون باکتری، از آب مقطر سترون استفاده شد. ارزیابی نتایج براساس ظهور یا عدم ظهور علایم بیماری و نیز امکان جداسازی مجدد باکتری از ۵ سانتیمتری بالای محل تلقیح انجام گرفت. توانایی جدایه‌ها در ایجاد واکنش فوق حساسیت، مطابق روش Lozano و Sequeira (۲۰) با تزریق سوسپانسیونی از هر جدایه با ۰/۲=$OD_{۶۰۰}$ در برگ‌های کاملاً توسعه یافته توتون رقم زانتی (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) انجام و نتایج پس از ۷۲-۲۴ ساعت بر اساس ایجاد کلروز یا نکروز ارزیابی شد.

الکتروفورز پروتئین‌های سلولی

از کشت جوان جدایه‌ها روی محیط کشت CPGA (۱۳) سوسپانسیون‌هایی با چگالی نوری یک واحد($OD_{۶۰۰}$=۱) تهیه و استخراج پروتئین‌های سلولی با استفاده از بافر نمونه تریس(تریس ۰/۷۵مولار، گلیسرین ۳۶ درصد، اس-دی-اس ۱۰ درصد، ۲-مرکاپتواتانول ۱۲ درصد، بروموفنل بلو ۰/۰۲ درصد، pH ۶/۸) انجام گرفت. الکتروفورز در ژل واسرشت شده پلی اکریل آمید ۱۰٪ در حضور اس-دی-اس (SDS-PAGE) بر مبنای روش اصلاح شده سیستم ناپیوسته Laemmli (۱۸) صورت گرفت.

بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

پس از کشت چمنی باکتری در محیط کشت سوکروز پپتون آگار[۸]، در هر تشتک پتری پنج دیسک کاغذی آغشته به آنتی بیوتیک‌های مختلف (تهیه شده از شرکت داروپخش)، به فواصل مساوی روی سطح محیط قرارداده شد. تشتک‌های پتری به مدت دو روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نتایج براساس محاسبه قطرهاله باز دارنده ارزیابی و جدایه‌ها در سه گروه مقاوم، نسبتاً حساس و حساس قرار داده شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه ایمیونوژن

تهیه ایمیونوژن از سلول سالم باکتری[۹]، براساس روش Hampton و همکاران (۱۰) در آب نمک استریل۰/۸۵ درصد انجام گرفت. سوسپانسیون حاصل تا زمان استفاده در ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه آنتی سرم

تهیه آنتی سرم براساس روش Ball و همکاران(۴) با تغییراتی، با تزریق ایمیونوژن به خرگوش جوان و سالم به صورت وریدی، ماهیچه‌ای و زیرپوستی(دو بار)، جمعاً ۴ بار و به فواصل ۷ روز از یکدیگر انجام شد. قبل از اولین تزریق، خونگیری جهت تهیه سرم نرمال انجام گرفت. یک هفته پس ازآخرین تزریق، خونگیری از رگ کناری[۱۰] گوش به عمل آمد. خون حاصل به مدت یک ساعت در دمای اطاق و سپس به مدت یک شب در یخچال(در دمای چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سرم حاوی آنتی‌بادی از لخته جداشد و به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در ۵۰۰۰ g سانتریفوژ شد. آنتی سرم حاصل به حجم‌های یک میلی‌لیتری تقسیم و تا زمان استفاده در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

نشت دوطرفه در آگار

نشت دو طرفه در آگار براساس روش Bouzer و Moore (۵) و Nillson (۲۲) با تغییراتی انجام گرفت. لایه ای از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (دی اتیل باربیتوریک اسید ۲/۵ میلی مولار، تریس ۷۳ میلی مولار ، EDTA ۵ میلی مولار در pH=۶/۸)حاوی ۰/۲٪ سدیم آزاید، به ضخامت دو میلی متر درتشتک‌های پتری پلاستیکی پخش

جدول-۱ خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های باکتری *R. solanacearum* عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان

خصوصیت (characteristic)	واکنش (reaction)	خصوصیت (characteristic)	واکنش (reaction)
Gram reaction	-	Methyl red reaction	-
Hypersensitive reaction in tobacco	+	Nitrite from nitrate	-
Glucose fermentation	-	Gas from nitrate	+
Glucose oxidation	+	Gas from glucose	-
Catalase	+	۳-Ketolactose production	-
Oxidase	+	Starch hydrolysis	+W
Phenylalanin deaminase	-	Gelatin hydrolysis	+W
Arginine dehydrolase	-	Casein hydrolysis	-
DNase	-	Esculin hydrolysis	-
Urease	+	Arbutin hydrolysis	-
Lecithinase	-	Tween ۸۰ hydrolysis	d(۸۳)
Tyrosinase	+	Alkalin reaction in lithmus milk	+
Phosphatase	d(۶۵)	Reducing substances from sucrose	-
PHB accumulation	+	Potato rot	d(۶۹)
Fluorescent pigment	-	Growth in ۱٪(w/v) NaCl	+
Levan formation	-	Growth in ۱,۴٪(w/v) NaCl	d(۶۲)
H۲S from pepton	-	Growth in ۱,۷٪(w/v) NaCl	d(۴۱)
H۲S from cysteine	+	Growth in ۲٪(w/v) NaCl	-
H۲S from thiosulfate	+	Acetoin production	-
Indol production	-	Polar flagella	۱

+: واکنش مثبت

-: واکنش منفی

d: واکنش متفاوت(درصد جدایه‌های مثبت)

W+: واکنش مثبت ضعیف

+: Positive reaction

-: Negative reaction

d: Different reaction(persent of positive)

+ W:Weakly positive

www.SID.ir

Archive of SID

جدول- خصوصیات بیوشیمیایی و تغذیه ای جدایه‌های باکتری ***Ralstonia solanacearum*** عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان

خصوصیت (characteristic)	واکنش (reaction)	خصوصیت (characteristic)	واکنش (reaction)	خصوصیت (characteristic)	واکنش (reaction)
استفاده از منابع کربن: Utilization as carbon sources		استفاده از منابع کربن: Utilization as carbon sources		استفاده از منابع کربن: Utilization as carbon sources	
Amygdalin	-	A-methyl glucoside	d(۶۲)	Meso-erythritol	-
Arabinose	d(۵۱)	Melibiose	d(۷۸)	Adonitol	-
Cellubiose	+	myo-inositol	+	Inulin	-
D(-)fructose	+	p- arbutin	d(۳۴)	Fumarate	+
D(+) fucose	-	Palatinose	+	Glutamate	+
D(+) glucose	+	Ribose	-	Glycolate	d(۶۷)
Melezitose	-	Salicin	-	Itaconate	-
D- sorbitol	-	Trehalose	-	Lactate	-
D(+) sucrose	+	Starch	d(۷۱)	Laevulinate	d(۱۴)
D(+)raffinose	-	Xylitol	-	Nicotinate	-
Dulcitol	-	Adipate	d(۴۱)	Oxalate	-
D(+) xylose	-	Acetate	+	Pectate	+
Galactose	d(۵۶)	Alginate	-	L-hystidine	+
Glycerol	+	Ascorbate	-	Propionate	+
Inositol	-	Aspartate	+	Pyruvate	+
L- arabitol	-	Barbiturate	-	Sebacate	d(۳۳)
L(+) rhamnose	-	Caprate	-	Sorbate	-
L- sorbose	-	Citraconate	-	Succinate	+
L- tyrosin	+	Citrate	+	Tannate	-
Maltose	+	Deoxycholate	-	Tarucholate	-
Mannitol	-	D(-) tartrate	d(۲۱)	B-alanin	-
Mannose	d(۸۱)	D(+) tartrate	d(۱۷)	Betaine	-
Digitonin	-	Formate	+	D-asparagine	+
L-phenylalanine	-	Guanosine	d(۱۳)	L- leucine	D(۲۰)
D-L ornithine	+	DL phenylalanin	-	Polygalactronate	+
L-cysteine	-	L asparagine	+	L-isolucine	
L- lysine	-	L-glutamine	+	L-ornithine	+
L- methionine	d(۱۵)	L- proline	+	L-tryptophane	-
L- valine	d(۱۵)	L- serine	+	L- tyrosine	+
L(+) tartrate	d(۲۳)	Thymidine	-	Uracil	d(۲۹)
D-L alanine	+				

+: واکنش مثبت یا استفاده

-: واکنش منفی یا عدم استفاده

d: واکنش متفاوت(درصد جدایه‌های مثبت)

+: Positive reaction or utilization

-: Negative reaction or no growth

d: Different reaction(persentof positive)

www.SID.ir

Archive of SID

شـد. در هر تشـتک، چاهک‌هایی به قطر چهار میلی‌متر و با فاصله شش میلی‌متر از یکدیگر حول یک چاهک مرکزی ایجاد شـد. سوسپانسـیونی از کشـت جوان هر جدایه با OD_{600}=۱/۵ تهیه و به مقدار ۴۰ میکرولیتر در چاهک‌های کناری ریخته شـد. در چاهک وسـطی نیز ۴۰ میکرولیتر از آنتی سـرم ریخته وتشتک‌ها در دیسـیکاتور مرطوب، در دمای اطاق نگهداری شـدند. ارزیابی نتایج ۲۴-۴۸ سـاعت بعد براسـاس تشـکیل باندهای رسوبی انجام گرفت.

نتایج و بحث

دو تا سـه روز پس از کشت غده‌های گیاهان بیمار روی محیط کشت TZCA ، عمدتـاً کلنی‌های گرد نامنظم، نسـبتاً درشـت، سـفید شـیری و بـا مرکز صورتی کمرنگ(تیپ وحشـی) و ندرتـاً کلنی‌های گرد کوچک، محدب، قرمز تیره و با حاشیه سفید باریک(تیپ جهش یافته) مشاهده شد که با گزارش کلمن(۱۷) مطابقت دارد. روی محیط کشت SPA کلنی‌های تیپ وحشـی بی رنگ تا سفیدشیری و بسیار آبکی بودند. جمعاً ۴۸ جدایه از باکتری‌های جداسازی شده انتخاب و در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایـج آزمون‌هـای فنوتیپی و بیوشـیمیایی انجـام گرفته روی این جدایه‌هـا ازجمله: واکنش منفی در آزمون رنگ آمیزی گرم، متابولیسـم گلوکوز در شـرایط هـوازی، تجمع دانه‌های PHB ، عـدم تولید رنگدانه فلورسـنت، تولید کاتالاز و اکسیداز، استفاده از سـیترات، واکنش منفی در آزمون‌های هیدرولیز اسـکولین، تولید لوان، آرژنین دهیدرولاز، عدم رشـد در حضـور نمک طعـام دو درصد و عـدم توانایی در اسـتفاده از مانیتول، مانوز و سـوربیتول به عنوان منبع کربن و انرژی، با خصوصیات ذکر شـده برای گونه *Ralstonia solanacearum* مطابقت داشـت(۱۳، ۱۶، ۲۳، ۲۴، ۲۸). نتایـج بررسـی خصوصیـات فنوتیپـی، تغذیـه‌ای و بیوشـیمیایی جدایه‌هـای نماینده، در جداول ۱و۲ ارائه شـده اسـت. برایـن اسـاس جدایه‌ها از همگونی نسـبتاً بالایی برخـوردار بودند و در ۲۵ خصوصیت فنوتیپی شـامل آزمون‌های فسفاتاز، هیدرولیز توئین ۸۰ ، قدرت و سـرعت لهانیدن سـیب زمینی، رشـد در حضـور نمک طعام ۱/۴ و ۱/۷ درصـد و نیـز توانایی اسـتفاده از آرابینـوز، گالاکتوز، مانوز، ملـی بیوز، آلفا متیـل گلوکوزید، پی-آربوتین، سالیسـین، آدیپات، دی و ال-تارتـرات، گلیکولات،لوولینـات، سـباکات، گوانوزین، ال-لوسـین، ال-ایزولوسـین، ال-متیونین، ال-والین و اوراسـیل به عنوان منبع کربن متفاوت بودند.

جدایه‌های مورد بررسـی در تحقیق حاضر، نسبت به جدایه‌های ایرانی بررسـی شـده توسـط باقری خیرآبادی و رحیمیان(۲) که از اسـتان‌های آذربایجان شـرقی، اصفهان، چهار و محال و بختیاری، خراسـان، مرکزی و مازندران جدا شده بودند، از همگونی بیشتر و قدرت متابولیکی ضعیف تری برخوردارند.

جدایه‌هـای مـورد بررسـی از قندهای لاکتـوز، مالتوز و سـلوبیوز تولیـد اسـید نمودند ولی قـادر به اسـتفاده از الکل‌های شـش کربنه مانیتـول، دولسـیتول و سـوربیتول نبودند ولذا براسـاس گـروه بندی Hayward(۱۳، ۱۴) به عنوان بیووار ۲ تشـخیص داده شـدند. به علاوه اگرچه جدایه‌ها در توانائی اسـتفاده از نمـک تارترات و همچنین قدرت و سـرعت لهانیدن سـیب زمینی تفاوت نشـان دادند ولی هیچیک قادر به تولید اسـید از قندهای رایبوز و ترهالوز نبودنـد. کلیه جدایه‌ها قادر بـه احیاء نیترات بوده ولـی هیچ گاه تا مرحله تولیـد گاز پیش نرفتند. لذا براین اسـاس تمامی جدایه‌های مورد مطالعه به فنوتیپ B بیووار ۲ (بیوتیپ A –۲) متعلق بودند که با گزارشـات سـایر محققین(۱۳، ۱۵ ،۲۱) مطابقت دارد.

کلیه جدایه‌ها روی سـیب زمینی، تاتوره و تاجریزی سـیاه بیماریزا بودنـد و ۷ تـا ۱۰ روز پـس از مایه‌زنی، علایم ظاهری بیماری را نشـان دادنـد. این جدایه‌ها روی گوجـه فرنگی و بادمجان نیـز بیماریزا بودند ولی علایم خفیف تری نشـان دادند. نتیجه آزمـون بیماریزایی جدایه‌ها روی فلفل، بادام زمینـی و توتون منفی بود. همه جدایه‌ها قادر به تولید رنگدانـه شـبه ملانیـن بودنـد و همچنین پس از ۴۸-۲۴ سـاعت روی برگ‌هـای توتون رقـم زانتی لکه‌های آبسـوخته و نهایتاً نکـروزه تولید کردند. بنابراین تمامی جدایه‌ها به عنوان نژاد ۳ تشخیص داده شدند که با گزارشـات Hayward (۱۴) و Buddenhagen و Kelman (۷) مطابقت دارد.

بهار و دانـش(۳) و باقری خیر آبادی و رحیمیان(۲) جدایه‌های این باکتری بدسـت آمده از سـیب زمینی از سـایر نقاط ایران را به عنوان بیوتیـپ ۲ / نـژاد۳ گزارش نموده اند کـه نتایج حاصـل از این تحقیق نیـز مؤید نتایـج مطالعـات قبلی می باشـد. اگرچـه در مطالعات قبلی تعلـق جدایه‌های این باکتری از سـایر نقاط ایران بـه بیوتیپA -۲ یا T -۲ مشـخص نشده اسـت، اما از آنجا که بیماری پژمردگی باکتریایی سـیب زمینـی، غده زاد بـوده و همچنین بخش عمـده ای از غده‌های سـیب زمینی بذری مورد استفاده در جنوب استان کرمان از استان‌های اصفهان، آذربایجان شـرقی، اردبیل و همدان تامین می گردد، به احتمال قوی سایر جدایه‌های ایرانی این باکتری که از سیب زمینی جدا شده اند نیز متعلق به بیوتیپ A -۲ می‌باشند.

جدایه‌هـای نماینده، بـه آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسـین، ریفامپین، پنیسـیلین، کانامایسین، استرپتومایسین و جنتامایسین کاملاً حساس و به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسـی سیلین، سفازولین، سفالکسـین، آمپی‌سیلین، وانکوماسـین و لینکومایسـین کامـلاً مقاوم بودنـد. واکنـش جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در جدول ۳ آمده است.

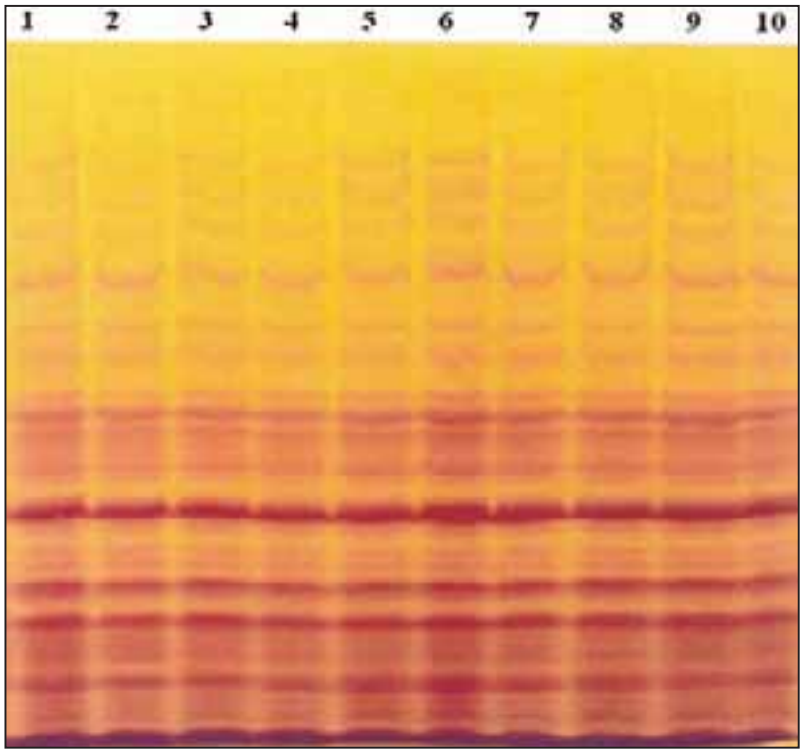
در بررسـی الگـوی الکتروفـورزی پروتئین‌هـای سـلولی جدایه‌های منتخب، کلیه جدایه‌ها دارای یک باند پروتئینی قوی در یک سـوم انتهایی ژل بودنـد. اگرچـه تعدادی از جدایه‌ها(جداشـده از مناطق سردسـیری) واجد یک باند پروتئینی فرعی اضافی بودند اما تشـابه نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سـلولی جدایه‌های مورد مطالعه بسـیار بالا بود و همگی در یک گروه قرار گرفتند.

در آزمون نشـت دو طرفه در آگار، در شرایط این تحقیق مشخص شد که اسـتفاده از دترجنت‌های بریج (Brig-۳۵) به میزان ۰/۲ درصد وتریتون (Triton x-۱۰۰) بـه میـزان ۰/۵ درصد در سوسپانسـیون باکتری، باعث پخش و مبهم شدن باندهای رسوبی و کاهش وضوح آن‌ها می شود. لذا در آزمون نشـت دوطرفه در آگار از سوسپانسیون باکتری بدون هرگونه تیمار استفاده شد.

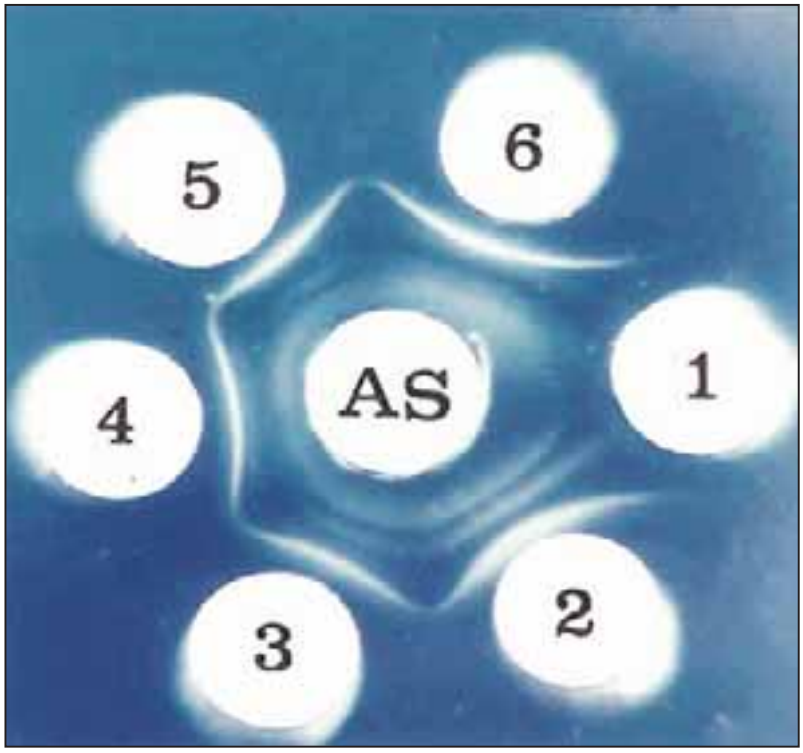
وجود یک خط رسـوبی ۱۱ اصلـی در تمام جدایه‌ها نشـان دهنده

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱ـ نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی تعدادی از جدایه‌های باکتری *R. solanacearum* عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان در ژل پلی اکریل آمید ۱۰% (شماره‌های ۱-۱۰ به ترتیب جدایه‌های: GR۲،Bb۳،GS۶،KS۶، GB۲، KF۳،GH۱،BD۱،SD۱ و GL۱)



شکل ۲- واکنش سرولوژیکی تعدادی از جدایه‌های باکتری *R. solanacearum* عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان در آزمون نشت دو طرفه در آگار (As: آنتی سرم تهیه شده برعلیه جدایه منتخب، ۱: سرم نرمال، ۲-۶: جدایه‌های نماینده).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳ : حساسیت جدایه‌های باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب زمینی در جنوب استان کرمان به آنتی‌بیوتیک‌ها

آنتی بیوتیک (µg/disc)Antibiotic		درصد استرین‌های مقاوم(R)	درصد استرین‌های نیمه حساس (RS)	درصد استرین‌های حساس (S)
Erythromycin(۱۵)	اریترومایسین	۰	۰	۱۰۰
Rifampicin	ریفامپیسین	۰	۰	۱۰۰
Penicillin(۱۰)	پنی سیلین	۰	۰	۱۰۰
Nalidixic acid(۳۰)	نالیدیکسیک اسید	۰	۲۰	۸۰
Amoxicillin(۲۵)	آموکسی سیلین	۱۰۰	۰	۰
Cefazolin(۳۰)	سفازولین	۱۰۰	۰	۰
Chloramphenicol(۳۰)	کلرامفنیکل	۳۰	۷۰	۰
Kanamycin(۳۰)	کانامایسین	۰	۰	۱۰۰
Cefalexin(۳۰)	سفالکسین	۱۰۰	۰	۰
Tobramycin(۱۰)	توبرامایسین	۰	۳۰	۷۰
Streptomycin(۱۰)	استرپتومایسین	۰	۰	۱۰۰
Neomycin(۳۰)	نئومایسین	۰	۶۰	۴۰
Ampicillin(۱۰)	آمپی سیلین	۱۰۰	۰	۰
Oxacillin(۱)	اگزاسیلین	۷۰	۳۰	۰
Amikacin(۳۰)	آمیکاسین	۰	۲۰	۸۰
Sulfamethoxazol	سولفامتوکسازول	۷۰	۳۰	۰
Gentamycin(۱۰)	جنتامایسین	۰	۰	۱۰۰
Vancomycin(۳۰)	وانکومایسین	۱۰۰	۰	۰
Lincomycin(۳۰)	لینکومایسین	۱۰۰	۰	۰

R: (استرین‌های مقاوم): فاقدهاله بازدارندگی

RS: (استرین‌های نسبتاً حساس): قطرهاله بازدارندگی کمتر از ۱۰ میلی‌متر

S : (استرین‌های حساس): قطرهاله بازدارندگی بیش از ۱۰ میلی‌متر

µg/disc: میکرگرم آنتی‌بیوتیک در هر دیسک(عدد داخل پرانتز)

شباهت کامل[۱۲] جدایه‌ها بود. از طرفی وجود ۳-۱ خط رسوبی فرعی در بین جدایه‌ها، نشان می‌دهد که جدایه‌های مختلف از نظر محل‌های آنتی‌ژنیکی[۱۳]، کاملا یکسان نیستند. تنها در جدایه‌های KF۱ و SD۱ یک باند رسوبی فرعی ضعیف نزدیک چاهک آنتی‌ژن تشکیل شد که به نظر می‌رسد خطوط رسوبی اختصاصی استرین[۱۴] بوده وکمان رسوبی قوی و مشترک بین همه جدایه‌ها، باند رسوبی اختصاصی گونه[۱۵] باشد(۲۵).

در شرایط این آزمایش، آزمون‌های الکتروفورز پروتئین‌های سلولی و نشت دوطرفه در آگار با استفاده از آنتی سرم پلی کلونال، قادر به گروه بندی جدایه‌ها، در حد نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نبودند. وجود و موقعیت خطوط رسوبی فرعی در نشست دوطرفه نشانگر وجود گروه‌های متمایز از نظر سرولوژیکی بود که این گروه‌ها خود متشکل از چند زیرگروه فنوتیپی بودند. در بررسی‌های باقری و رحیمیان نیز گروه‌های سرولوژیکی براساس نقوش کمانهای رسوبی در نشت دو طرفه در آگار و ایمینو الکترو فورز در جمعیت‌های ایرانی *R. solanacearum* وجود داشته ولی در داخل هرگروه اعضا (جدایه‌ها)یی با چند

www.SID.ir

Archive of SID

خصوصیت فنوتیپی متفاوت وجود داشته‌اند (۲) این نتایج منعکس کننده تنوع جدایه های هر منطقه از کشور است. پیشنهاد می‌شود تحقیقات تکمیلی برای گروه بندی دقیق این جدایه‌ها و مقایسه آن‌ها با سایر جدایه‌های ایرانی باکتری مذکور، با کمک روش‌های پیشرفته سرولوژیکی و مولکولی انجام گیرد.

پاورقی‌ها

1- Biovar
2- Triphenyl Tetrazolium Chloride Agar(TZCA)
3- Race
4- Loopful
5- Tyndallization
6- Casein Pepton Glucose Agar(CPGA)
7- Durham tube
8- Sucrose Pepton Agar(SPA)
9- Whole cell
10- Marginal vein
11- Precipitation line
12- Complete identity
13- Antigenic determinants
14- Strain specific
15- Species specific

منابع مورد استفاده

۱ - آزادوار، م. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۹؛ خصوصیات جدایه‌های ***Ralstonia solanacearum*** عامل پژمردگی سیب زمینی در جنوب استان کرمان. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. اصفهان. صفحه ۳۱۵.

۲ - باقری خیرآبادی، م. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۷. تشخیص بیووارهای ***Ralstonia solanacearum*** عامل پژمردگی سیب زمینی در مناطق عمده سیب زمینی کاری در ایران. سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. کرج. صفحه ۱۸۸.

۳ - بهار، م. و دانش، د. ۱۳۶۷؛ سبب شناسی پژمردگی سیب زمینی در ایران. مجله بیماریهای گیاهی ایران. جلد ۲۴. شماره ۴-۱، صفحات ۱۱-۱.

4- Ball, E.M., Hampton, R.O., De Boer, S.H. and Schaad, N.W. 1990; Polyclonal antibodies. In: Hampton, R.O., Ball, E.M. and De Boer, S.H. (eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, a Laboratory Manual. pp. 35-54. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA.

5- Bouzer, H. and Moore, L.W.1990; Ouchterlony double diffusion plates, bacteria. In: Hampton, R.O., Ball, E.M. and De Boer, S.H. (eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, a Laboratory Manual. pp. 35-54. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA.

6- Bradbury, J. F. 1986; Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International, Slough, U.K.

7- Buddenhagen, I. W. and Kelman, A. 1964; Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2 : 203-230.

8- Fahy, P. C. & Hayward, A. C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: Fahy, P. C. and Persley, G. J. (eds.). Plant Bacterial Disease, A Diagnostic Guide, pp. 337-378. Academic Press, Sydeny, Australia.

9- French, E.R. 1994; Strategies for integrated control of bacterial wilt of potato. In: Hayward, A. C. and Hartman, G. L. (eds). Bacterial wilt, the disease and its causative agents, *Pseudomonas solanasearum*. pp. 199-207. CAB International, Walingford, UK.

10- Hampton, R.O., Ball, E.M. and De Boer, S.H. (eds.). 1990; Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens, a laboratory manual. pp. 35-54. APS Press, St. Paul, Minnesota. USA.

11- Haris, D. C. 1972; Intra specific variation in *Pseudomonas solanacearum* in: Moes Geesteranus, H. P. (ed.). Proceedings of 3rd. International Conference of Plant Pathogenic Bacteria. pp. 289-292. 14-21. Apr. Wageningen, Netherlands.

12- Hartman, G. L. & Hayward, A. C. 1993; Bacterial Wilt. Proceedings of an International symposium, Kaohsiung, Taiwan, 28-31 Oct., 1992; ACIAR Proceedings 45, ACIAR, Canberra.

13- Hayward, A.C. 1964; Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology, 27: 265-277.

14- Hayward, A. C. 1991; Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 65-87.

15- Hayward, A. C., EL-Nashaar, H. M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990; Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. J. of Appl. Bacteriol. 69: 269-280.

16- He, L. Y., Sequeira, L. and Kelman, A. 1983; Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disase 67: 1357-1361.

17- Kelman, A. 1959; The relationship of pathogenecity in Pseudomonas solanasearum to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693-695.

18- Laemmli, U. K. 1970; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lond.) 227: 680-685.

www.SID.ir

Archive of SID

19- Lelliot, R. A., Billing, E., & Hayward, A. C. 1966; A determinative scheme for the flourescent plant pathogenic Pseudomonas. J. of Appl. Bacteriol. 29: 470-489.

20- Lozano, J. C. and Sequeira, L. 1970; Differentiation of races of *Pseudomonas solanasearum* by a leaf infilteration technique. Phytopathology 60: 833-838.

21- Marin, J. E. and EL-Nashaar, H. M. 1993; Pathogenecity of the new phenotypes of *Pseudomonas solanasearum* from Peru in: Hartman, G. L. and Hayward, A. C. (eds). Bacterial wilt. Proc. Int. Conf., Kaoshing, Taiwan. 28-31 October, 1992. pp. 78-84. ACIAR proceeding.

22- Nillson, L. A.1983; Double diffusion in gel. Scand. J. Immunol., 17: 57-68.

23- Palleroni, N. J. 1984; Genus I. *Pseudomonas migula* 1894. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G. (eds.). Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. pp. 141-199. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

24- Palleroni, N. J., and Doudorof, M. 1971; Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies among some Pseudomonas species. J. of Bacteriol. 110: 1-11.

25- Seal, S.E. and Elphinstone, J.G.1994; Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A.C. and Hartman, G.L. (eds.). Bacterial Wilt the Disease and Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. pp. 35-58. CAB International, Walingford, UK.

26- Schaad, N. W. 1988; Laboratory guide for Identification of plant pathogenic bacteria. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.

27- Winstead, N. N. and Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanasearum*. Phytopathology 42: 3946-3951.

28- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y. 1995; Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov. : Proposal of R. pickettii (Ralston, Palleroni and Doudroff 1973). comb. nov., *R. solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and R. eutropha (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. and Immunol. 39: 897-904.

www.SID.ir