جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

# ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های مولد بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در استان‌های فارس و همدان

جواد رزمی[۱]، نادر حسن‌زاده[۲]، ابوالقاسم قاسمی[۳] و اصغر حیدری[۳]

## چکیده

در این تحقیق به‌منظور بررسی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های مولد بیماری پژمردگی باکتریایی، مزارع سیب‌زمینی استان‌های فارس و همدان مورد بازدید قرار گرفت و گیاهان دارای علایم پژمردگی جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. خالص‌سازی باکتری با تهیه سوسپانسیون عصاره غده‌های آلوده و کشت روی محیط‌کشت TTC انجام پذیرفت. نتایج آزمون‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی حکایت از وجود باکتری *Ralstonia solanacearum* به‌عنوان عامل جداسازی شده بود. جدایه‌ها بر اساس روش طبقه‌بندی هیوارد و بادن-هاگن در بیوار ۲ و نژاد ۳ قرار گرفتند. همگی جدایه‌ها ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از تلقیح باعث ایجاد واکنش فوق‌حساسیت در برگ‌های توتون شدند. در آزمون اثبات بیماری‌زایی، جدایه‌ها توانستند بر روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و سیب-زمینی تلقیح شده با سوسپانسیون باکتری علایم پژمردگی را نمایان سازند. تمامی جدایه‌های مورد مطالعه از قندهای لاکتوز، مالتوز و سلوبیوز استفاده کرده ولی قادر به‌مصرف مانیتول، سوربیتول و دولسیتول نبودند. استفاده از گلوکز، سوکروز و ترهالوز برای جدایه‌ها مثبت و در مورد رامنوز، رافینوز، آرابینوز، فوکوز و تارتارات منفی بود. در میان نمک اسیدهای آلی هم‌چون مالونات، گلوکانات و سدیم سیترات، تنها مورد اخیر توسط جدایه‌ها مصرف گردید. تولید گاز $H_2S$ از سیستئین، آزمون‌های اوره‌آز، اکسیداز و کاتالاز برای جدایه‌ها مثبت بود، در حالی که جدایه‌ها به آزمون‌های تولید ایندول، متیل‌رد، آرژنین‌دی‌هیدرولیز، هیدرولیز ژلاتین و نشاسته پاسخ منفی دادند. در آنالیز نقوش الکتروفورتیکی پروتئین‌های محلول سلولی، تفاوت چندانی بین جدایه‌های داخلی کشور با یکدیگر و نیز با جدایه‌های استاندارد CIP10 از پرو و ACH0158 از استرالیا مشاهده نگردید و تنها نقوش الکتروفورتیکی جدایه RsR79 تفاوت اندکی با سایر جدایه‌های مورد ارزیابی نشان داد.

***واژه‌های کلیدی:*** پژمردگی باکتریایی، سیب‌زمینی، جدایه، فارس، همدان

---

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۲۸

۱- دانشجوی دکتری گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد علوم و تحقیقات، j_razmi@yahoo.com
۲- عضو هیأت علمی گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات
۳- اعضای هیأت علمی بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



## مقدمه و بررسی منابع

سیب‌زمینی پس از گندم، ذرت و برنج چهارمین محصول عمده‌ی دنیا به حساب می‌آید (۹). باکتری *Ralstonia solanacearum* در سیب‌زمینی ایجاد بیماری پژمردگی یا پوسیدگی قهوه‌ای می‌نماید. این بیماری به نام‌های دیگری هم‌چون پژمردگی گرانویل و پژمردگی باکتریایی جنوبی نیز شناخته می‌شود (۱۹).

بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی[1]، اولین بار توسط بوریل (۱۸۹۰) گزارش گردید. به عقیده کلمن[2] و همکاران (۱۹۹٤) کشاورزان ژاپنی این بیماری را ۲۰۰ سال قبل از آن‌که توسط اروین اسمیت[3] توصیف گردد، می‌شناختند (۱۸). یابوچی[4] و همکاران (۱۹۹۲) عامل آن را از جنس *Pseudomonas* به *Burkholderia* و نهایتاً در سال ۱۹۹۵ به جنس *Ralstonia* انتقال دادند (۲۵ و۲٦). این بیماری از لحاظ اهمیت دومین عامل محدودکننده کشت و تولید سیب‌زمینی در مناطق گرم‌سیری و نیمه گرم‌سیری دنیا به حساب آمده (۲۲) و باعث کاهش محصول از ۱۵ تا ۹۵ درصد می‌شود (۱۷). باکتری *R. solanacearum* دارای دامنه میزبانی گسترده بوده و گسترش جهانی دارد (۲۲).

بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در بیشتر کشورهای تولیدکننده سیب‌زمینی توسط اندام‌های گیاهی با آلودگی پنهان گسترش یافته است (۱۲و۲۲). پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی اساساً توسط استرین سازگار با اقلیم خنک که موسوم به استرین سیب‌زمینی (بیوار۲/ نژاد۳) است، ایجاد می‌شود (۱۰).

*R. solanacearum* یک باکتری ناهمگن بوده و تنوع درون گونه‌ای زیادی دارد. به‌طور معمول جهت طبقه‌بندی درون‌گونه‌ای *R. solanacearum* از سیستم بیوار و نژاد استفاده می‌شود. این طبقه‌بندی یک نوع گروه بندی غیررسمی بوده و از سیستم کد نام‌گذاری باکتری‌ها تبعیت نمی‌کند (۱۵). در سیستم بیوار، توانایی جدایه‌های باکتری در استفاده از سه دی‌ساکارید لاکتوز، مالتوز و سلوبیوز و سه هگزوزالکل مانیتول، دولسیتول و سوربیتول مورد بررسی قرار می‌گیرد. بر طبق این سیستم *R. solanacearum* دارای ۵ بیوار می‌باشد (۲۲).

دامنه میزبانی، اساس سیستم طبقه‌بندی نژاد است که بر این مبنا، پنج نژاد را می‌توان برای باکتری مذکور متصور شد (۱۱و۱۵). نژاد ۳، اساساً روی سیب‌زمینی و گاه روی گوجه‌فرنگی و دیگر گیاهان خانواده‌ی بادمجانیان و علف‌های هرز این خانواده فعال است. این نژاد در مناطق مرتفع و سرد و یا در عرض‌های جغرافیایی بالاتر دیده می‌شود (۱۹).

از آن‌جا که اغلب استرین‌های پاتوژن به دمای پایین حساس هستند، گسترش باکتری محدود به مناطق عمده تولید سیب‌زمینی جهان شده و به هر حال گسترش وسیع‌تر استرین‌هایی که تحمل نسبی به دمای پایین دارند، تهدید جدی برای تولید سیب‌زمینی در آینده به‌شمار می‌آیند (۱۹).

این بیماری در ایران نخستین بار در سال ۱۳٦۷ از استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری (۲) و در سال ۱۳۷۷ از مناطق سیب‌زمینی‌کاری استان‌های اردبیل، مرکزی، مازندران، خراسان و تهران گزارش و بیووار۲، نژاد ۳ باکتری *R. solanacearum* تعیین

---

1- Brown rot or Bacterial wilt
2- Kelman
3- Erwin F. Smith
4- Yabuuchi

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



گردید (۱). در حال حاضر این بیماری در استان‌های همدان، فارس، کرمان و زنجان نیز وجود دارد (۱و۲).

در حال حاضر پوسیدگی قهوه‌ای به‌عنوان مسأله‌ای حاد در بسیاری از کشورهای در حال توسعه در آمده است (٤)، اما هنوز جنبه‌های زیادی از ایجاد این بیماری ناشناخته باقی‌مانده و نیاز به تحقیقات زیادی دارد. قطعاً تعیین ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری مذکور می‌تواند نقش مهمی در شناسایی بهتر عامل بیماری‌زا و در نتیجه کنترل هر چه بهتر و مناسب‌تر بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در کشور ایفا کند.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

در بازدیدهای به‌عمل آمده در طی سال‌های زراعی ۷۹ تا ۸۱، نمونه‌هایی از غـدد آلـوده سـیب‌زمینـی بـا علایم مشخص بیماری از مزارع استان‌هـای فـارس و همدان جمع‌آوری و هر نمونه در پاکت کاغذی قـرار داده شـد و پـس از درج مشخـصات لازم، جهـت جداسازی عامـل بیمـاری بـه آزمایـشگاه انتقـال داده شدند.

### جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

جداسازی از نمونه‌های مـشکوک بـین ۲ تـا ٤ روز پس از تاریخ نمونه‌برداری انجـام گرفـت. غـده‌هـای سیب‌زمینی در جریان آب شهری و سپس با آب مقطر کاملاً شستشو شدند. بـا اسـتفاده از چـاقوی اسـتریل قسمتی از پوست غده‌ها برداشته شد و توسط چاقوی استریل دیگری از محل حلقه آوندی، برشـی در غـده ایجاد و قطعات مذکور به هـاون اسـتریل انتقـال داده شدند. پس از اضافه کردن آب مقطـر اسـتریل بـه آن، خرد کردن و له کردن بافت انجام گرفـت. بعـد از ده دقیقه، بـا اسـتفاده از لـوپ اسـتریل از سوسپانـسیون مذکور روی محیط کشت TTC[1] به‌صـورت مخطـط کشت داده شد. پس از ٤٨ تا ۷۲ ساعت نگهـداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌هـای سـفید شـیری، گرد نامنظم و سیال با مرکز صورتی و هاله سفید رنگ در محیط کشت مـذکور انتخـاب و بـرای اطمینـان از خلوص آن، مجدداً این کلنـی‌هـا روی محـیط کـشت TTC مخطط گردیدند.

از جدایه‌های خالص باکتری در آب مقطر اسـتریل سوسپانسیون غلیظ ساخته شد و در میکروتیوب‌هـای پلاستیکی یک‌ونیم سی‌سی در دمـای اتـاق نگهـداری گردیـد. هـم‌چنـین جدایـه‌هـای خـالص بـاکتری در لوله‌های مک‌کارتی حاوی محیط کشت SPA[2] کشت و پس از ٤٨ تا ۷۲ ساعت نگهداری لوله‌ها به‌صـورت وارونـه در انکوبـاتور ۲۸ $^{o}C$، پـارافین مـایع دوبـار استریل به داخل هر لوله تا یـک سـانتی‌متـر بـالاتر از انتهای فوقانی محیط‌کشت اضافه گردید و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

### آزمون فوق حساسیت در توتون

سوسپانـسیون ایزولـه‌هـای مختلـف بـا غلظـت $10^{8} - 10^{9}$ CFU/ml در آب مقطر اسـتریل تهیـه و توسط سرنگ استریل بـه اپیـدرم تحتـانی بـرگ‌هـای توتون رقم بارلی تزریق گردید. گیاهان شـاهد نیـز بـا آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند.

### اثبات بیماری‌زایی

غده‌های سـیب‌زمینـی رقـم آگریـا در گلـدان‌هـای استریل حاوی خاک برگ، شن و رس (۲:۱:۱) کاشـته و در دمـای ۲۸ – ۳۲$^{o}C$ و رطوبـت نـسبی ۹۰ – ۷۵ درصد در گلخانه نگهداری شدند. بذر گوجـه‌فرنگـی

1- Kelman's TZC agar
2- Sucrose Peptone Agar medium

نیز درظرف‌های مخصوص کاشت حاوی خاک استریل شامل خاک برگ و رس (۲:۱) کاشته شد. گیاهچه‌های دو تا سه برگی انتخاب و به گلدان‌های جداگانه انتقال و در گلخانه نگهداری شدند.

مایه آلودگی لازم جهت انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی و تعیین مشخصات بیوشیمیایی، از کشت جدایه‌های مورد نظر روی محیط کشت TTC فاقد ماده تترازولیوم کلراید[1] در دمای ۲۸ سانتی‌گراد به‌دست آمد. سپس مایه آلودگی با تهیه سوسپانسیون باکتری و تعیین غلظت $1 \times 10^8$ CFU/ml با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۰/۱ =$A_{600}$ تهیه گردید. ده میکرولیتر از مایه آلودگی مذکور توسط سرنگ انسولین استریل در زاویه سومین برگ از نوک ساقه مایه‌زنی شد. گیاهچه‌های شاهد نیز با آب مقطر استریل مایه‌زنی گردیدند. از گیاهانی که علایم بیماری را نشان دادند، مجدداً جداسازی انجام گرفت و چندین آزمون افتراقی روی آن‌ها انجام شد.

**بررسی خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی جدایه‌ها**

رنگ‌آمیزی گرم طبق روش شاد[2] و همکاران (۲۰۰۱) و نیز بر اساس حلالیت در KOH سه درصد به روش ساسلو[3] و همکاران (۱۹۸۲) انجام گرفت (۲۲، ۲۳). رنگ‌آمیزی تاژک، تولید یا عدم تولید رنگ فلوروسنت در محیط کشت King's B توسط جدایه‌ها، آزمون توانایی رشد در دماهای ۳۷ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد، آزمون کاتالاز، آزمون توانایی استفاده از منابع مختلف کربنی (قندها، الکل‌ها، اسیدهای آلی و آمینه)، آزمون هیدرولیز آسکولین، آزمون هیدرولیز توئین ۸۰، آزمون اثر روی شیر لیتموس، آزمون تحمل نمک‌طعام، آزمون لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، آزمون احیای نیترات به نیتریت و آزمون آوره‌آز بر طبق روش شاد انجام گرفت (۲۲). آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی O/F با روش هاگ و لیفسون[1] (۱۹۵۳) انجام شد (۱۵). آزمون اکسیداز طبق روش کواکس[2] (۱۹۵۶)، آزمون رنگ‌آمیزی دانه‌های PHB طبق روش هیوارد[3] (۱۹۶۴) و آزمون فسفاتاز و واکنش متیل‌رد بر طبق روش کوان و استیل[4] (۱۹۶۵) انجام پذیرفت (۱۹،۵، ۱۳). آزمون آرژنین دی هایدروژناز بر طبق روش تورنلی[5](۱۹۶۰) (۲۴)، آزمون تولید اندول طبق روش فهی و هیوارد[6] (۱۹۸۳) و آزمون فنیل‌آلانین‌دی‌آمیناز، آزمون داکسی-ریبونوکلئاز و آزمون هیدرولیز نشاسته بر طبق روش گراهام[7] (۱۹۷۷) انجام شد (۷ و۱۲). آزمون تولید گاز $H_2S$ از سیستئین و آزمون هیدرولیز کازئین بر طبق روش دای[8] (۱۹۶۹)، آزمون تولید لوان، آزمون لستیناز، آزمون هیدرولیز ژلاتین و آزمون تولید استوئین با استفاده از روش فهی و پرسلی[9] (۱۹۸۳) انجام شد (۶ و ۸).

**تعیین بیووار و نژاد**

جهت تعیین بیوار جدایه‌ها، از روش هیوارد (۱۳) و برای تعیین نژاد جدایه‌ها، از روش بودن‌هاگن[10] (۱۹۶۲) استفاده گردید (۳).

**الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی**

ده جدایه متعلق به مناطق مختلف سیب‌زمینی‌کاری

1- 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride
2- Schaad
3- Suslow

1- Huge & leifson
2- Kovacs
3- Hayward
4- Cowan & Steel
5- Thornley
6- Fahy & Hayward
7- Graham & Hodgkiss
8- Dye
9- Fahy & Persley
10- Buddenhagen

استان‌های فارس و همدان به‌همراه دو جدایه ACH0158 از استرالیا و CIP10 از پرو جهت مقایسه نقوش الکتروفورتیکی پروتئین‌های محلول سلولی انتخاب شدند. هر جدایه در محیط‌کشت آگار غذایی[1] کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج و الکتروفورز پروتئین بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری ژل طبق روش لاملی[2] (۱۹۷۰) انجام شد (۲۰).

## نتایج و بحث

### جداسازی و خالص‌سازی

علایم بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی شامل قهوه‌ای شدن دستجات آوندی غده و نیز خروج شیرابه شیری‌رنگ غلیظ از محل این دستجات در صورت اعمال کمی فشار پیرامونی به غده، در غده‌های جمع‌آوری شده از مزارع استان‌های فارس و همدان مشاهده گردید. با بریدن قطعاتی از حلقه آوندی غده‌های آلوده به طول ۳-۲ سانتی‌متر و قرار دادن آن‌ها در یک ظرف شیشه‌ای حاوی آب، تراوشات شیری‌رنگ دود سیگار مانند پس از چند دقیقه مشاهده گردید.

از غده‌های مذکور در روی محیط کشت TTC یک باکتری گرم منفی جداسازی شد. محیط‌کشت مذکور کارایی مناسبی را جهت جداسازی عامل بیماری از غده آلوده و نیز تفکیک کلنی‌های بیماری‌زا (تیپ وحشی[3]) از کلنی‌های غیربیماری‌زا (موتانت[4]) از خود نشان داد. در محیط‌کشت مذکور، کلنی‌های بیماری‌زای *R. solanacearum* به شکل گرد نامنظم، با مرکز قرمز کم‌رنگ و لعاب‌دار دیده می‌شود، این در حالی است که کلنی‌های غیربیماری‌زا در این محیط کشت، گرد منظم و قرمز تیره‌رنگ و عموماً فاقد لعاب‌اند. جمعاً ۹۳ جدایه از مزارع سیب-زمینی استان‌های فارس و همدان جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفت.

### آزمون فوق‌حساسیت در توتون

جدایه‌ها توانستند پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در برگ‌های توتون رقم بارلی که با سوسپانسیون باکتری با غلظت $10^{8}$ – $10^{9}$ CFU/ml مورد تلقیح قرار گرفته بودند، نکروز ایجاد کنند. در برگ گیاهان شاهد نیز که با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند، هیچ علایمی مشاهده نشد.

### آزمون اثبات بیماری‌زایی

پس از سپری شدن هفت تا هشت روز از مایه‌زنی گیاهچه‌ها با سوسپانسیون باکتری عامل بیماری، علایم پژمردگی در آن‌ها پدیدار شد. برای اطمینان از علت پیدایش این علایم از گیاهچه‌های مذکور مجدداً عمل جداسازی انجام گرفت و انجام برخی از آزمون‌های باکتری‌شناسی موید حضور *R. solanacearum* به‌عنوان عامل ایجادکننده پژمردگی بود.

### آزمون‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای

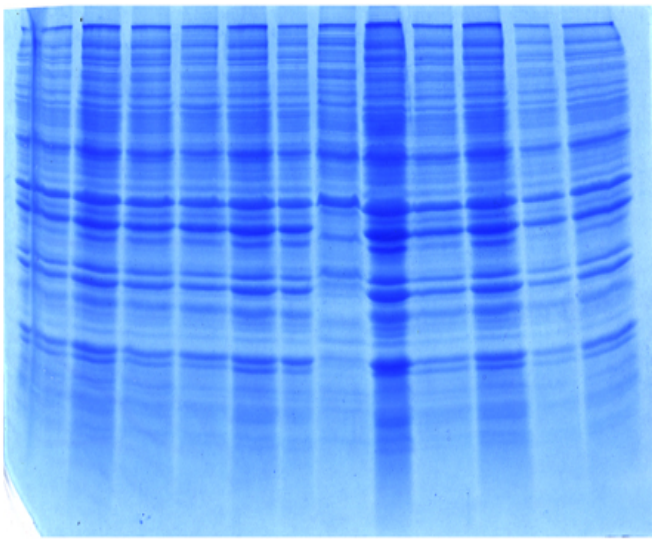
تمامی جدایه‌ها گرم منفی، هوازی اجباری و دارای یک تاژک قطبی بودند و توانستند پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در برگ توتون لکه‌های زرد رنگی ایجاد نمایند. هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی نبودند. واکنش جدایه‌ها به آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز مثبت بود. هم‌چنین جدایه‌ها واکنش

1- Nutrient Agar
2- Laemmli
3- Wild type
4- Mutant

**جدول۱- خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های *R. solanacearum* جدا شده از سیب‌زمینی در استان‌های فارس و همدان**

| خصوصیت | واکنش |
|---|---|
| تولید پیگمان زرد | - |
| واکنش گرم | - |
| تجمع دانه های PHB | + |
| تعداد تاژک | ۱ |
| تخمیر بی هوازی گلوکز | - |
| رشد در ۳۷°C | + |
| رشد در ۴۱°C | - |
| رشد در نمک طعام ۱٪ | + |
| رشد در نمک طعام ۲ ٪ | - |
| رشد در pH4 | - |
| رشد در pH7 | + |
| رشد در pH9 | - |

**L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 L11 L12**



**شکل۱- الگوی الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید؛ L1: جدایهRsR21، L2: جدایه ACH0158، L3: جدایه RsR33، L4: جدایه CIP10، L5: جدایه RsR47، L6: جدایه RsR63، L7: جدایه RsR79، L8: جدایهRsR07، L9: جدایه RsR48، L10: جدایه RsR91، L11: جدایه RsR56، L12: جدایه RsR13.**

**جدول۲- خصوصیات بیوشیمیایی *R. solanacearum* جدا شده از سیب‌زمینی در استان‌های فارس و همدان**

| خصوصیت | واکنش | خصوصیت | واکنش |
|---|---|---|---|
| تولید لوان | **v** | تولید استوئین | – |
| تولید اندول | – | گلوکز | + |
| متیل رد | – | گلیسرول | **+w** |
| کاتالاز | + | بتائین | – |
| اکسیداز | + | سیترات | + |
| تولید $H_2S$ از سیستئین | + | ال – والین | – |
| هیدرولیز نشاسته | – | هپتانوآت | – |
| هیدرولیز ژلاتین | – | بتا آلانین | **v** |
| هیدرولیز آسکولین | – | دی – تارتارات | – |
| هیدرولیز توئین ۸۰ | **v** | مالونات | – |
| تولید نیتریت از نیترات | + | دی آرابینوز | – |
| تولید گاز از نیترات | – | دی- رافینوز | – |
| فعالیت اوره آز | + | سوکروز | + |
| آرژنین دی هایدروژناز | – | ترهالوز | + |
| فنیل آلانین دی آمیناز | – | ۲- کتوگلوکانات | – |
| فسفاتاز | + | ال- آرژنین | – |
| شیر لیتموس | **Alk** | ال – رامنوز | – |
| هیدرولیز کازئین | **v** | دی فوکوز | – |
| لستیناز | **v** | گالاکتوز | + |
| داکسی ریبونوکلئاز | – | مانوز | **v** |

+ : واکنش مثبت جدایه‌ها  – : واکنش منفی جدایه‌ها

w : واکنش ضعیف جدایه‌ها  v : واکنش متغیر جدایه‌ها

Alk: قلیایی

**جدول۳- خصوصیات تعیین کننده بیوار۲ جدایه‌های *R. solanacearum* جدا شده از سیب‌زمینی در استان‌های فارس و همدان**

| استفاده از | واکنش |
|---|---|
| **لاکتوز** | + |
| **مالتوز** | + |
| **سلوبیوز** | + |
| **مانیتول** | – |
| **سوربیتول** | – |
| **دولسیتول** | – |

+ و – : ۸۰ درصد یا بیشتر استرین ها واکنش مثبت یا منفی نشان دادند.

متغیر به آزمون لوان نشان دادند. جدایه‌ها در غلظت نمک‌طعام یک درصد قادر به رشد بوده ولی رشد آن‌ها در حضور نمک‌طعام ۲٪ متوقف شد. هم‌چنین جدایه‌ها در pH هفت رشد، ولی در pH چهار و نه رشد نکردند. نتایج آزمون‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در جدول شماره ۱ آورده شده است.

تمامی جدایه‌ها قندهای لاکتوز، مالتوز، سلوبیوز، دکستروز و گلوکز را مصرف و تولید اسید کرده ولی در استفاده از قندهای مانیتول، سوربیتول، دولسیتول و ترهالوز واکنش جدایه‌ها منفی بود. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای در جدول شماره ۲ آمده است.

**تعیین بیووار و نژاد**

طبق روش پیشنهاد شده از سوی هیوارد (۱۹٦٤)، با توجه به استفاده جدایه‌ها از قندهای لاکتوز، مالتوز و سلوبیوز و عدم توانایی آن‌ها در استفاده از مانیتول، سوربیتول و دولسیتول، جدایه‌های مورد مطالعه بیوار ۲ شناسایی شدند (جدول۳). هم‌چنین بر اساس طبقه‌بندی بودن‌هاگن (۱۹٦۲) جدایه‌ها به نژاد ۳ تعلق داشتند زیرا تمامی جدایه‌ها توانستند پس از سپری شدن هفت تا هشت روز از مایه‌زنی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی با سوسپانسیون باکتری عامل بیماری، علایم پژمردگی را پدیدار سازند. یافته‌های بهار و همکاران (۱۳٦۷) و باقری و همکاران (۱۳۷۷) نیز حاکی از بیوار ۲ و نژاد ۳ جدایه‌های بیماری‌زای *R. solanacearum* به‌عنوان عامل بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در ایران است (۲و۱).

**الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی**

در آنالیز نقوش الکتروفورتیکی پروتئین کل جدایه‌ها، تفاوت چندانی بین جدایه‌های داخلی کشور با یکدیگر و نیز با جدایه‌های استاندارد CIP10 از مرکز تحقیقات بین المللی سیب‌زمینی واقع در کشور پرو و جدایه ACH0158 از استرالیا مشاهده نگردید. تنها نقوش الکتروفورتیکی جدایه RsR79 تفاوت اندکی با سایر جدایه‌های مورد ارزیابی نشان داد. نتایج الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی در شکل شماره ۱ آمده است.

محیط‌کشت TTC جهت جداسازی جدایه‌های باکتری *R. solanacearum* از غده، محیط‌کشت مناسبی تشخیص داده شد. کلنی استرین‌های وحشی گرد نامنظم، سیال، سفید با مرکز صورتی رنگ و مات و در مقابل اکثر موتانتها معمولاً گرد و شدیداً قرمز با حاشیه نازک مایل به آبی و نیمه شفاف بودند. هم‌چنین گاهی اوقات کلنی موتانت‌ها به‌صورت نقاط قرمز گرد کوچک نیز دیده شدند. مورفولوژی کلنی‌های باکتری جدا شده از نمونه‌های مشکوک با توصیف انجام شده از این کلنی‌ها توسط کلمن (۱۹٥٤) در محیط کشت مذکور یکسان بود (۱۷). شایان ذکر است که تفاوت موجود بین شدت رنگ کلنی‌های تیپ وحشی و موتانت‌ها پس از گذشت۷۲ ساعت کاهش یافت و سطح کلنی در هر دو گروه صاف بود (۱۷). ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مبین باکتری *R. solanacearum* به‌عنوان عامل بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در استان‌های یاد شده بود. هم‌چنین نتایج آزمون‌ها حاکی از عدم تفاوت فنوتیپی در بین جدایه‌ها بود.

## نتیجه‌گیری کلی

مدیریت موفق پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی منوط به ردیابی باکتری در خاک و مواد گیاهی قبل از کاشت محصول می‌باشد، لذا شناسایی *Ralstonia solanacearum* به‌عنوان عامل

بیماری در استان فارس و همدان و نیز تعیین ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌ها می‌تواند کمک شایانی را در ردیابی پاتوژن و در نتیجه کنترل هر چه بهتر و مناسب‌تر بیماری در این دو استان نماید. آزمون‌های انجام گرفته حاکی از عدم تفاوت فنوتیپی در بین جدایه‌های فارس و همدان بود. در نتیجه با توجه به یکنواختی فنوتیپی جدایه‌ها، می‌توان مدیریت مشترکی را برای کنترل این بیماری در دو استان یاد شده اعمال نمود.

از نخستین گزارش بیماری پژمردگی باکتریایی در ایران بیست سال می‌گذرد و هم اکنون این بیماری در مزارع استان‌های همدان، زنجان، کردستان، فارس، اصفهان، گلستان، چهارمحال و بختیاری و کرمان خساراتی را به زارعین وارد می‌آورد. با این حال، هنوز جنبه‌های زیادی از توسعه این بیماری ناشناخته باقی مانده و نیاز به تحقیقات زیادی در آینده دارد. مطالعه و بررسی جنبه‌های اکولوژیکی و اپیدمیولوژیکی عامل بیماری و نیز ارایه راهکارهای مناسب در جهت کنترل این بیماری با توجه به شرایط اقلیمی، کشاورزی و اقتصادی کشورمان ضروری به نظر می‌رسد. امید است رهیافت‌های جدید و تلفیق تحقیقات پایه‌ای و عملی با یکدیگر منجر به فهم کافی از پاتوژن و بیماری شده و در نهایت باعث توسعه اقدامات کنترلی پایدار و مناسب گردد.

## منابع


۱. باقری، م. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۷. تشخیص بیوارهای *R. solanacearum* عامل پژمردگی سیب‌زمینی در مناطق عمده سیب‌زمینی کاری ایران. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، صفحه ۱۸۸.

۲. بهار، م. و د. دانش. ۱۳٦۷. سبب‌شناسی پژمردگی سیب‌زمینی در ایران. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۲٤، صفحات ۱۲-۱.

3. Buddenhagen, I. W., L. Sequeira and A. Kelman. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52: 726.
4. Ciampi, L., L. Sequeira and E. R. French. 1980. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. American Potato Journal 57:377-386.
5. Cowan, S. T. and K. J. Steel. 1965. Manual of the identification of medical bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, London.
6. Dye, D. W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia* .II. The *carotovora* groups. New Zealand Journal of Science 12: 81-97.
7. Fahy, P. C. and A. C. Hayward. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: Fahy, P. C. and Persley, G. J. (eds.): Plant bacterial diseases: A diagnostic guide. Pp. 337-378. Academic Press, Sydney, Australia.
8. Fahy, P. C. and G. J. Persley. 1983. Plant bacterial diseases: A diagnostic guide. Academic Press, Sydney, Australia, p. 378.
9. French, E. R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In: Hayward, A. C. and Hartman G. L. (eds.): Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum.* CAB International. Pp.199-207.
10. French, E. R., L. Gutarra, P. Aley and J. Elphinstone. 1995. Culture media for *Pseudomonas solanacearum* isolation, identification and maintenance, Fitopatologia 30: 126- 130.

11. Gillings, M. and P. Fahy. 1993. Genomic finger printing and PCR analysis: rapid, sensitive and inexpensive means of differentiating strains of *Pseudomonas solanacearum.* In: Bacterial Wilt Proceeding of an International Conference held at Kaohsiung, Taiwan, 28-31 Oct. 1992. ACIAR Proceedings 45: 85-92.
12. Graham, D. C. and W. Hodgkiss. 1977. Identify of gram negative, yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. Journal of Applied Bacteriology 30:175-189.
13. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum.* Journal of Applied Bacteriology 27: 256-277.
14. Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.* Annual Review of Phytopathology 29: 65- 87.
15. Hugh, R. and E. Leifson. 1953. The taxonomic significancance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various gram negative bacteria. Journal of Bacteriology 66: 22-26.
16. Javier, E. Q. 1994. Foreward. In: Hayward, A. C. and Hartman G. L. (eds.): Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB Interntional. UK. p. XI.
17. Kelman, A. 1954. The relationship pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44: 693-695.
18. Kelman, A., G. L. Hartman and A. C. Hayward. 1994. Introduction. In: Hayward, A. C. and Hartman G. L. (eds.): Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB Interntional. UK. p. 1-7.
19. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. Nature 178: 703.
20. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
21. Priou, S., P. Aley, E. Chujoy, B. Lemaga and E. French. 1999. Integrated control of bacterial wilt of potato. CIP. Lima, Peru. p. 30.
22. Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chen. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press. p. 373.
23. Suslow, T. V., M. N. Schroth and M. Saka. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic bacteria and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72:917-918.
24. Thorneley, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology 13:37-52.
25. Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaiza, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen.nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with type species *Burkholderia cepacia* comb.nov. Microbiology and Immunology 36:1251-1275.
26. Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta and Y. Nisiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and a *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen.nov. : Proposal of *Ralstonia picketti* comb.nov., *Ralstonia solanacearum* comb.nov. and *Ralstonia eutropha* comb.nov. Microbiology and Immunology 39:897-904.