بررسی خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه های *Ralstonia solanacearum* عامل بیماری پژمردگی باکتریائی سیب زمینی جداشده از استان کردستان*

سحر پیره[۱] و بهروز حریقی[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۲۰)

چکیده

ویژگی های فنوتیپی و تنوع ژنتیکی ۲٤ جدایه باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل بیماری پژمردگی باکتریائی سیب زمینی جدا شده از مناطق مختلف استان کردستان مورد بررسی قرار گرفت. براساس خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیائی، ۱۹جدایه *R. solanacearum* بعنوان بیووار ۲ تشخیص داده شدند. پنج جدایه، خصوصیات فنوتیپی بیووار ۳ را دارا بودند. صحت تشخیص تمامی جدایه ها در سطح گونه توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای 759/760 اختصاصی گونه مورد تایید قرار گرفت. در مطالعه جدایه ها با استفاده از روش Multiplex PCR (Pmx)، تمامی جدایه های تشخیص داده شده تحت عنوان بیووار ۲ با تکثیر باندهائی با اندازه تقریبی ۲۸۲ و ۳۷۲ جفت باز در فیلوتیپ II قرار گرفتند. پنج جدایه با خصوصیات فنوتیپی شبیه به بیووار۳، در واکنش Pmx باند اختصاصی گونه به اندازه تقریبی ۲۸۲ جفت باز به اضافه باند با اندازه تقریبی ۱۹۱ جفت باز تکثیر نمودند که اختصاصی هیچکدام از گروه های فیلوتیپی نمی باشد. نوع ژنتیکی جدایه ها به روش rep-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی REP، ERIC و BOX مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ترکیبی داده با استفاده از هرسه آغازگر به روش UPGMA و براساس ضریب تشابه دایس نشان داد که جدایه ها در سطح تشابه ٤۳٪ به ۵ گروه قابل تفکیک هستند. ارتباط مشخصی بین گروه بندی بدست آمده و منطقه جغرافیائی جدایه ها مشاهده نشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشاندهنده تنوع ژنتیکی در جدایه های *R. solanacearum* جداسازی شده از استان مورد مطالعه می باشد.

کلیدواژه: پژمردگی باکتریائی سیب زمینی، تنوع ژنتیکی، فیلوتیپ، *R. solanacearum*

---

* بخشی از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: BHarighi@uok.ac.ir

۱. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

Phenotypic and genetic properties of *Ralstonia solanacearum* strains, the causal agent of bacterial wilt of potato isolated from Kurdistan province*

S. Pireh[1] and B. Harighi[1]**

(Received: 6.2.2016; Accepted: 9.4.2017)

Abstract

Phenotypic properties and genetic diversity of 24 strains of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of potato plants isolated from various locations in Kurdistan province was investigated. According to physiological and biochemical properties, 19 and 5 of isolates were identified as *R. solanacearum* biovar 2 and 3, respectively. Identification of isolates was further confirmed by PCR using 759/760 primers specific to *R. Solanasearum*. Based on multiplex PCR, all strains identified as biovar 2 were belonging to phylotype II. In multiplex PCR, strains identified as biovar 3 produced *R. solanacearum* species-specific fragment but failed to produce expected phylotype-specific amplicon. Genetic diversity of selected strains was investigated by rep-PCR fingerprinting using REP, ERIC and BOX primers. UPGMA analysis of combined data obtained from rep-PCR fingerprint pattern using Dice's coefficient revealed the strains could be separated into 5 groups at a similarity level of approximately 43%. There was no direct relationship between geographic locations of strains and grouping. Obtained results demonstrated the existence of a genetic diversity among *R. solanacearum* strains causing bacterial wilt disease of potato in Kurdistan province.

Keywords: Bacterial wilt of potato, Genetic diversity, Phylotype, *R. solanacearum*, rep-PCR

---

* Part of M.Sc. thesis of first author submitted to University of Kurdistan

**Corresponding author's E-mail: BHarighi@uok.ac.ir

1. Former M.Sc. Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan

مقدمه

پژمردگی باکتریائی ناشی از باکتری *Ralstonia solanacearum* یکی از مهمترین بیماریهای شناخته شده در سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) و سایر گیاهان از قبیل گوجه فرنگی، توتون، موز، بادام زمینی و غیره است. عامل بیماری از مناطق مختلف جغرافیائی از جمله مناطق گرم، معتدل و سردسیر گزارش شده است (Hayward 1994a). باکتری عامل بیماری توانایی ایجاد آلودگی در بیش از ۵۰ خانواده گیاهی شامل گیاهان تک لپه و دولپه را دارد (Elphinstone 2005). باکتری *R. solanacearum* بعنوان یک گونه مرکب شناخته می شود بصورتی که تفاوت های قابل ملاحظه ای بین سویه ها از لحاظ دامنه میزبانی، منشا جغرافیایی، بیماریزایی و خصوصیات فنتیپی مشاهده می گردد (Denny 2006). سویه ها براساس خصوصیات بیوشیمیائی و دامنه میزبانی به ترتیب به هفت بیووار و یا پنج نژاد تقسیم بندی می شود (Hayward 1991; Horita *et al.* 2014). اگرچه ارتباط مشخصی بین این دو سیستم گروه بندی وجود ندارد اما در اکثر موارد نژاد۳ یا نژاد سیب زمینی معادل بیووار۲ است (Hayward 1991; Smith *et al.* 1995). پژمردگی باکتریائی سیب زمینی توسط بیووار۱، ۲ و *T*۲ یا نژاد ۱ و ۳ بوجود می آید. سویه های بیووار۲ دارای فعالیت متابولیکی کمتری نسبت به جدایه های *T*۲ هستند (Hayward 1994b). بیماری همچنین در آسیا و آمریکای جنوبی توسط بیووار۲ و *N*۲ بوجود می آید. تفاوت بیووار۲ و *N*۲ در میزان فعالیت متابولیکی و همچنین وسیع تر بودن دامنه میزبانی بیووار *N*۲ است (Gillings & Fahy 1993). بعلاوه جهت بررسی تنوع ژنتیکی و همچنین وجود ارتباط ژنتیکی بین جدایه های *R. solanacearum* روشهای مبتنی بر DNA از جمله RFLP، تعیین توالی ژن *16S* rDNA، rep-PCR و AFLP مورد استفاده قرار گرفته است (Fegan *et al.* 1998; Nouri *et al.* 2007; Horita & Tsuchiya 2001; Poussier *et al.* 2000). براساس RFLP، جدایه های *R. solanacearum* به دو شاخه اصلی تقسیم می شوند. شاخه آمریکائی شامل بیووار۱، ۲ و *N*۲ و شاخه آسیائی شامل بیووارهای۳، ۴ و ۵ (Cook *et al.* 1989; Cook & Sequeira 1994). این نتایج براساس تحقیقات بعدی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی ناحیه بین ژنی 16S-23S rRNA، ژن اندوگلوکاناز و ژن پلی گالاکتوروناز مورد تایید قرار گرفت (Gillings *et al.* 1993; Fegan *et al.* 1998; Poussier *et al.* 2000). در سالهای اخیر براساس توالی نوکلئوتیدی ژن اندوگلوکاناز، ژن hrpB و ژن mutS یک نوع گروه بندی جدید پیشنهاد شده است. براساس این سیستم طبقه بندی جدایه های *R. solanacearum* به چهار فیلوتیپ و یا هشت گروه (Clade) تقسیم می شوند (Wicker *et al.*, 2012). جدایه های متعلق به فیلوتیپ *I* دارای منشا آسیائی و جدایه های متعلق به فیلوتیپ II ازآمریکا ی جنوبی منشا گرفته اند. همچنین فیلوتیپ III شامل جدایه های آفریقا و جزایر اطراف و فیلوتیپ IV جدایه های گزارش شده از اندونزی، ژاپن، کره و استرالیا را شامل می شود (Fegan & Prior 2005; Jeong *et al.* 2007; Prior & Fegan 2005). همچنین تقسیم بندی گروه ها در ارتباط با میزبان و توانایی جدایه ها برای ایجاد بیماری در شرایط اختصاصی جغرافیایی است. باتوجه به اینکه *R. solanacearum* یک گونه مرکب شناخته می شود براساس مطالعات چندجانبه ای پیشنهاد گردیده است جدایه های متعلق به فیلوتیپ *I* و III به گونه جدید *R. pseudosolanacearum*، جدایه های متعلق به فیلوتیپ *IV* تحت عنوان *R. syzygii* تغییر نام

یافته و فقط جدایه های متعلق به فیلوتیپ II تحت عنوان *R. solanacearum* شناخته شوند (Safni *et al.* 2014). نامگذاری اخیر توسط مطالعات برمبنای داده های پروتئومیکس و ژنومیکس مورد تایید قرار گرفته است (Prior *et al.*, 2016). علاوه بر روشهای ذکر شده rep-PCR نیز روش مفیدی در مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه های *R. solanacearum* است (Horita & Tsuchiya 2001; Horita *et al.* 2005; Nouri *et al.* 2009; Thwaites *et al.* 1999).

در ایران، بیماری پژمردگی باکتریائی سیب زمینی ناشی از جدایه های متعلق به بیووار ۲ اولین بار از استان اصفهان گزارش گردید (Danesh & Bahar 1984). پس از آن بیماری از سایر مناطق سیب زمینی کاری کشور گزارش شده است (Azadvar & Rahimian 2000; Bagheri & Taghavi 2000; Maghooli *et al.* 2004; Irandoust *et al.* 2008). هدف از تحقیق حاضر مطالعه خصوصیات فنوتیپی جدایه های *R. solanacearum* جداشده از مناطق مختلف استان کردستان، شناسائی آنها براساس سیستم طبقه بندی بیووار و تعیین گروه فیلوتیپی غالب در جدایه های مورد مطالعه بود. بعلاوه تنوع ژنتیکی جدایه ها به روش rep-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش های بررسی

جداسازی و تعیین مشخصات جدایه ها

نمونه برداری از بافت های گیاهی آلوده با علایم پژمردگی در اندام های هوایی و پوسیدگی حلقوی در قسمت داخلی غده از مرداد تا مهر ماه ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ و از مزارع سیب زمینی در مناطق مختلف استان کردستان انجام گردید. جهت جداسازی عامل بیماری قطعات کوچکی از ساقه و غده آلوده جدا و پس از شستشو با آب معمولی و ضد عفونی سطحی توسط محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم و شستشوی مجدد توسط آب مقطر سترون در ۳-۲ میلی لیتر آب مقطر سترون خرد گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری سوسپانسیون در درجه حرارت ۲۸- ۲۶ درجه سلسیوس، ۳۰ -۲۰ میکرولیتر از محلول حاصله بر روی محیط تترازولیوم کلرید (TZC) کشت گردید (Kelman 1954). پس از ۷۲-۴۸ ساعت نگهداری در درجه حرارت ۲۸- ۲۶ درجه سلسیوس تک کلنی های شیری رنگ و در وسط کلنی به رنگ صورتی رشد یافته مجدداً بر روی محیط خالص سازی گردید. تعیین مشخصات فنوتیپی جدایه ها براساس روشهای ذکر شده قبلی انجام گردید (Hayward 1964).

آزمون بیماریزائی

بیماری زائی کلیه جدایه ها بر روی سیب زمینی رقم آگریا، گوجه فرنگی، فلفل و توتون انجام گردید. بذور گیاهان ذکر شده در گلدانهای پلاستیکی حاوی خاک سترون کشت گردید. جدایه ها پس از رشد بر روی محیط TZC به مدت ۴۸ ساعت و در ۲۸ درجه سلسیوس توسط سانتریفوژ نمودن (۷۰۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه) رسوب داده شد. رسوب حاصله مجدداً در آب مقطر سترون حل و غلظت سوسپانسیون به حدود 1×10^{8} CFU/ml تنظیم گردید. گیاهان در مرحله ۴ تا ۵ برگچه ای و با سه تکرار مایه زنی گردید. سوسپانسیون باکتری توسط سرنگ سترون به ناحیه ساقه نزدیک به طوقه تزریق گردید (Winstead & Kelman 1952) و یا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری درون خاک نزدیک به ریشه اضافه گردید (Montanelli *et al.* 1995). در تمامی آزمایشات گلخانه ای مایه زنی گیاهان توسط آب مقطر سترون بعنوان کنترل در نظر گرفته شد. گیاهان مایه زنی شده در گلخانه در درجه حرارت ۳۰- ۲۵ درجه سلسیوس و تحت شرایط طبیعی نگهداری

و نتایج تا ۴۲ روز به فواصل زمانی ۳ روزه بررسی گردید.

تهیه DNA ژنومی جدایه ها

سوسپانسیون جدایه ها در ۵ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات تهیه و پس از سانتریفوژ کردن (۴۵۰۰ دور، ۹۰ ثانیه) رسوب حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در منهای ۲۰ درجه سلسیون نگهداری گردید. رسوب مجدداً در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل و با اضافه نمودن ۸ میکرولیتر لیزوزیم (از محلول پایه ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. سپس سلولها با اضافه نمودن ۴۰ میکرولیتر محلول ۴ مولار پرکلرات سدیم، ۲۴ میکرولیتر محلول SDS ۱۰٪ و ۸ میکرولیتر پروتئیناز K (از محلول پایه ۲۰ میکرگرم بر میلی لیتر) و نگهداری به مدت ۲ ساعت در ۴۵ درجه سلسیوس تخریب گردید. دی ان ای حاصل با افزودن اتانول مطلق به میزان ۲ حجم محلول، نگهداری در منهای ۲۰ درجه سلسیون به مدت ۳۰ دقیقه و سانتریفوژ نمودن (۱۳۰۰۰ دور، ۵ دقیقه، ۴ درجه سلسیوس) رسوب داده شد. رسوب حاصله با اضافه نمودن ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شسته شد و سپس در ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. محلول بدست آمده سپس با حجم مساوی ترکیب فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) مخلوط شده و در درجه حرارت معمولی اطاق بصورت وارونه کردن هم زده شد. سپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید (۱۳۰۰۰ دور، ۴ درجه سلسیوس)، فاز روئی به میکروتیوب تمیز منتقل و مرحله قبل سه بار تکرار گردید. فاز روئی بدست آمده از مرحله قبل یکبار نیز با اضافه نمودن کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) رسوب داده شد، سپس فاز رویی به میکروتیوب تمیز منتقل و دی ان ای با اضافه نمودن ۲ حجم اتانول خالص و ۰/۱ حجم محلول استات سدیم ۳ مولار با اسیدیته ۴/۸ و نگهداری در فریزر به مدت یک شب، رسوب داده شد. ترکیب حاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب بدست آمده توسط اتانول ۷۰٪ شسته شد. رسوب حاصله پس از خشک شدن، در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حاوی ریبونوکلئاز (از محلول پایه ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به غلظت نهائی ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) حل گردید.

تشخیص جدایه ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه

تشخیص جدایه های باکتری عامل بیماری در سطح گونه در واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی گونه ۷۶۰/۷۵۹ مورد بررسی قرار گرفت (Opina *et al.* 1997). واکنش در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر حاوی PCR buffer ×۱، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها (۲۵ پیکومول بر میکرولیتر)، ۰/۸ میلی مولار dNTP، ۲ واحد Taq polymerase و ۱ میکرولیتر (حدود ۲۵ نانوگرم) دی ان ای ژنومی انجام شد. برنامه دمایی شامل یک چرخه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۵۳ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه با برنامه ۱۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و بسط نهائی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

واکنش Multiplex PCR (Pmx) اختصاصی فیلوتیپ

برای تعیین گروه فیلوتیپی جدایه ها، pmx-PCR با استفاده از چهار آغازگر اختصاصی فیلوتیپ و در واکنش با آغازگر معکوس اختصاصی گونه به اضافه آغازگرهای ۷۵۹/۷۶۰ انجام شد (Fegan & Prior 2005). توالی

جدول ۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، اندازه محصول و اختصاصیت آغازگرها

Table 1. List of oligonucleotide primers used in this study, size of PCR products and specificity of primers

Primers	Sequence (5' to 3')	Specificity	Amplicon size when paired with Nmult:22:RR
Nmult21:1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	Phylotype I	144bp
Nmult21:2F	AAGTTATGGACGGTGGAAGTC	Phylotype III	372bp
Nmult23:AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	Phylotype III	91bp
Nmult22:InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	Phylotype IV	213bp
Nmult22:RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA	All phylotype	NA[a]
759F	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	*R. solanacearum*	-
760R	GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG	*R. solanacearum*	-

[a]Not applicable

آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام و حاوی PCR buffer ×۱، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۸ میلی مولار dNTP، ۲ واحد Taq polymerase، ۶ پیکومول از هرکدام از آغازگرهای Nmult:21:1F، Nmult:21:2F، Nmult:22:InF، Nmult:23:AF، ۱۸ پیکومول آغازگر Nmult:22:RR، ۸ پیکومول از آغازگرهای ۷۵۹/۷۶۰ و حدود ۴۰ نانوگرم دی ان ای ژنومی بود. واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۵۹ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و بسط نهائی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود.

***rep*-PCR**

انگشت نگاری ژنومی جدایه ها با استفاده از آغازگرهای REP، ERIC و BOX انجام گردید (Louws *et al.* 1994). واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر master mix (بافر PCR reaction ×۱۰، کلرید منیزیوم، dNTPs و Taq DNA polymerase)، ۱ میکرلیتر از هرکدام از آغازگرها (۱۰ پیکومول بر میلی لیتر)، ۱ میکرولیتر از دی ان ای ژنومی و ۵/ ۱۰ میکرولیتر آب مقطر سترون انجام شد. برنامه حرارتی بصورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ چرخه در ۹۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ درجه سلسیوس (REP)، ۵۰ درجه سلسیوس (ERIC) و ۵۰ درجه سلسیوس (BOX) به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه و بسط نهائی در ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه انجام شد. محصولات PCR سپس توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک، توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه واکنش ها دو بار تکرار گردید. تفاوت در پروفیل محصولات PCR بدست آمده بصورت مشاهده ای بررسی و تنها باندهائی که در هردو تکرار وجود داشتند در آنالیز لحاظ شدند. آنالیز خوشه ای داده ها در برنامه NTSYSpc 2.02e براساس ماتریس شباهت به روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه دایس انجام شد (Dice 1945).

نتایج

تعیین بیووار و فیلوتیپ عامل بیماری

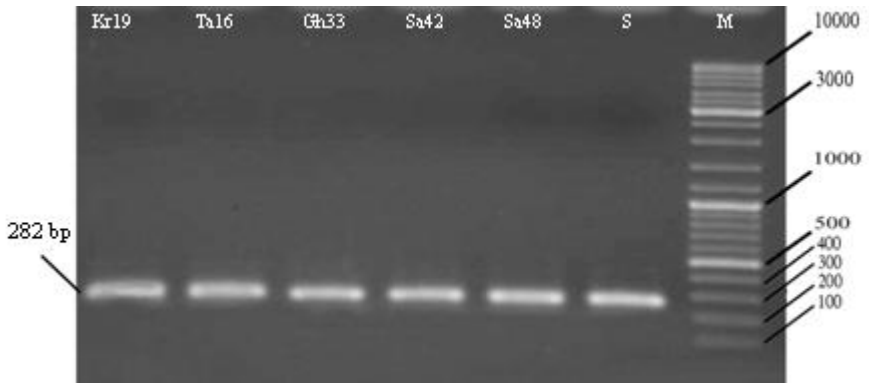
در مجموع ۲۴ جدایه از بوته های سیب زمینی با علایم پژمردگی در مناطق مورد مطالعه جداسازی گردید (جدول ۲). جدایه ها بر روی محیط کشت TZC کلنی های بدون شکل مشخص، لعابدار و شیری رنگ (در وسط کلنی به

جدول ۲- جدایه های ***Ralstonia solanacearum*** استفاده شده در این تحقیق

Table 2. *Ralstonia solanacearum* strains used in this study

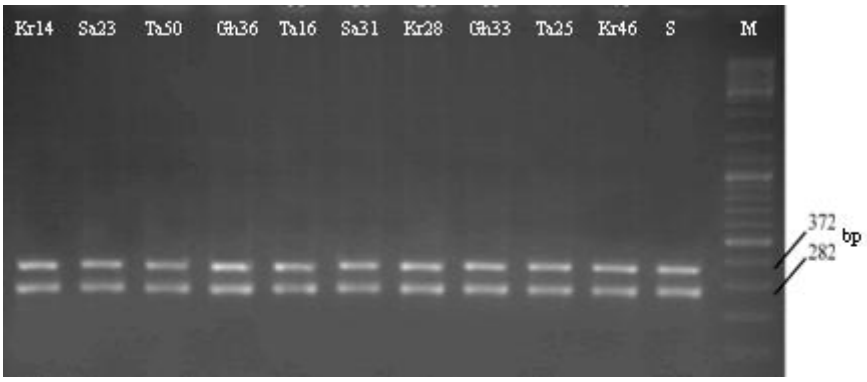
Isolate	Geographic origin
Sa10, Sa18, Sa20, Sa23, Sa31, Sa42, Sa45, Sa48	Sarab
Ta12, Ta16, Ta25, Ta38, Ta50	Tahmasbgholi
Kr14, Kr19, Kr28, Kr43, Kr44, Kr46	Krondan
Gh11, Gh33, Gh36, Gh40, Gh47	Ghorveh
S (*R. solanacearum* ICMP7866)	International collection of microorganisms from plants (ICMP)

رنگ صورتی) تولید نمودند. تمامی جدایه ها گرم منفی و هوازی بودند. نتیجه آزمون اکسیداز، کاتالاز، احیای نیترات به نیتریت، فعالیت تیروزیناز مثبت و توانائی رشد در محیط حاوی ۱٪ نمک طعام را داشتند. رشد در محیط حاوی ۲٪ نمک طعام، آرجینین دی هیدرولاز، لسیتیناز، هیدرولیز اسکولین، توئین ۸۰ و هیدرولیز نشاسته، رشد در ۴ و ۴۱ درجه سلسیوس و لهانیدن ورقه های سیب زمینی منفی بود. اکثر جدایه ها فاقد توانائی تولید لوان بر روی محیط آگار غذائی حاوی ۵٪ ساکارز بودند اما نتیجه هیدرولیز ژلاتین متغیر بود. نوزده جدایه توانائی استفاده از سلوبیوز، لاکتوز، مالتوز و ترهالوز را داشتند اما نتیجه برای استفاده از دی ریبوز، اینوزیتول، مانیتول، سوربیتول و دولسیتول منفی بود. براساس نتایج ذکر شده این نوزده جدایه *R. solanacearum* بیووار۲ تشخیص داده شدند. پنج جدایه (Sa45، Kr44، Sa42، Kr19 و Kr14) قادر به استفاده از تمامی منابع کربوهیدراتی ذکر شده در بالا بودند و براین اساس دارای خصوصیات بیووار۳ تشخیص داده شدند. اکثر جدایه ها توانائی ایجاد واکنش فوق حساسیت در شمعدانی ظرف ۴۸ ساعت را داشتند. در واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از جفت آغازگر ۷۵۹/۷۶۰ اختصاصی گونه تمامی جدایه ها باندی با اندازه تقریبی ۲۸۲ جفت باز تکثیر نمودند (شکل ۱). نتیجه آزمون بیماریزائی جدایه های منتخب به گیاهان سیب زمینی، گوجه فرنگی، توتون و فلفل نشان داد که تمامی جدایه ها قادر به تولید علایم پژمردگی در سیب زمینی و گوجه فرنگی پس از ۱۴ تا ۲۱ روز بودند اما هیچگونه علایمی در فلفل و توتون حتی بعد از نگهداری به مدت ۴۲ روز مشاهده نگردید و براین اساس نژاد ۳ تشخیص داده شدند.



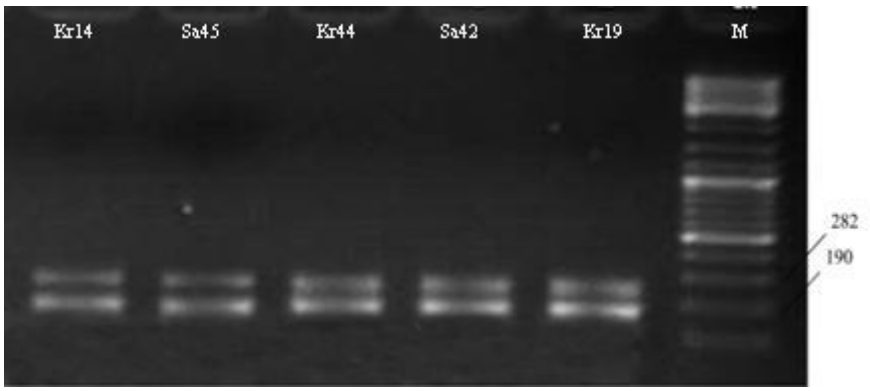
شکل۱) نقوش الکتروفورزی محصول پی سی آر جدایه ها با استفاده از جفت آغازگر ۷۵۹/۷۶۰ اختصاصی گونه *Ralstonia solanacearum*. M) نشانگر مولکولی 1kbp ، S) جدایه استاندارد ICMP7866.

Figure 1. Electrophoresis patterns of PCR product of *Ralstonia solanacearum* strains using species-specific primer pairs 759/760, Lane M) 1kbp DNA ladder, S) *Ralstonia solanacearum* ICMP7866.



شکل ۲) نقوش الکتروفورزی محصولات واکنش Multiplex PCR سویه های *Ralstonia solanacearum* بیووار ۲ M) نشانگر مولکولی 1kbp، S) *Ralstonia solanacearum* ICMP7866.

Figure 2. Electrophoresis Patterns of multiplex PCR products of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains. Lane M) 1 kbp DNA ladder, S) *Ralstonia solanacearum* ICMP7866.



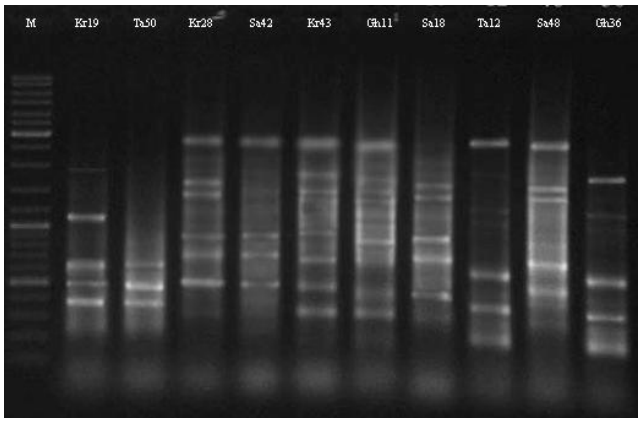
شکل ۳) نقوش الکتروفورزی محصولات واکنش Multiplex PCR سویه های *Ralstonia solanacearum* بـا خصوصـیات بیوشـیمیائی بیووار ۳، M) نشانگر مولکولی 1kbp.

Figure 3. Electrophoresis patterns of multiplex PCR products of *Ralstonia solanacearum* biovar 3 strains. Lane M) 1 Kbp DNA ladder.

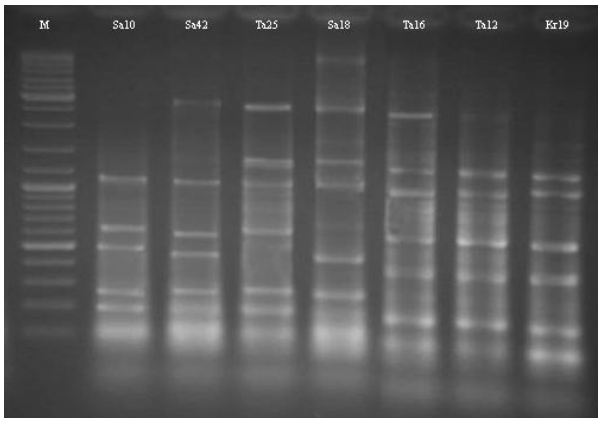
در واکنش *Pmx* تمامی جدایه های شناسائی شده براسـاس خصوصیات فنوتیپی تحت عنوان بیووار۲ قطعاتی به انـدازه تقریبی ۲۸۲ و ۳۷۲ جفت بازی به ترتیب اختصاصی گونـه و فیلوتیپ II، *R. solanacearum* تکثیر نمودند (شکل ۲). پـنج جدایـه تشـخیص داده شـده براسـاس خصوصـیات فنوتیپی تحت عنوان بیـووار۳ قطعـات ۲۸۲ و ۱۹۱ جفـت بازی تکثیر نمودند و براین اسـاس در هیچکـدام از گـروه های فیلوتیپی شناخته شده قرار نگرفتند (شکل ۳).

تنوع ژنتیکی جدایه ها براساس *rep*-PCR

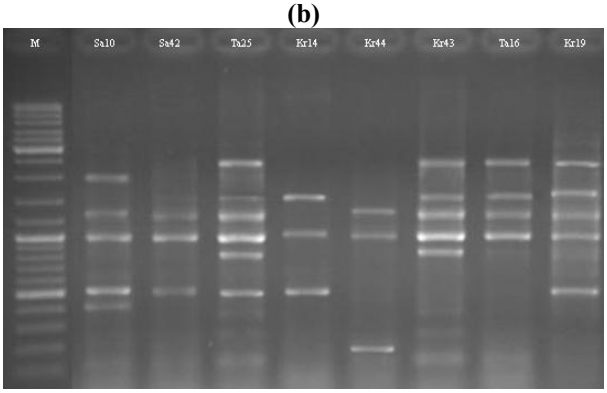
تنوع ژنتیکی تمامی جدایه ها براسـاس rep-PCR و بـا اسـتفاده از آغازگرهـای اختصاصـی ERIC، REP و BOX مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آغازگرها قـادر بـه تکثیـر باندهای مناسب در دامنه به انـدازه تقریبـی ۱۵۰ تـا ۲۵۰۰ جفت باز بودند (شکل۴ الف، ب و پ). جهت آنـالیز داده ها به روش UPGMA، ۱۷، ۱۳ و ۱۶ باند به ترتیـب بـرای ERIC، REP و BOX در نظر گرفته شد. آنالیز خوشـه ای



(a)



(b)



(c)

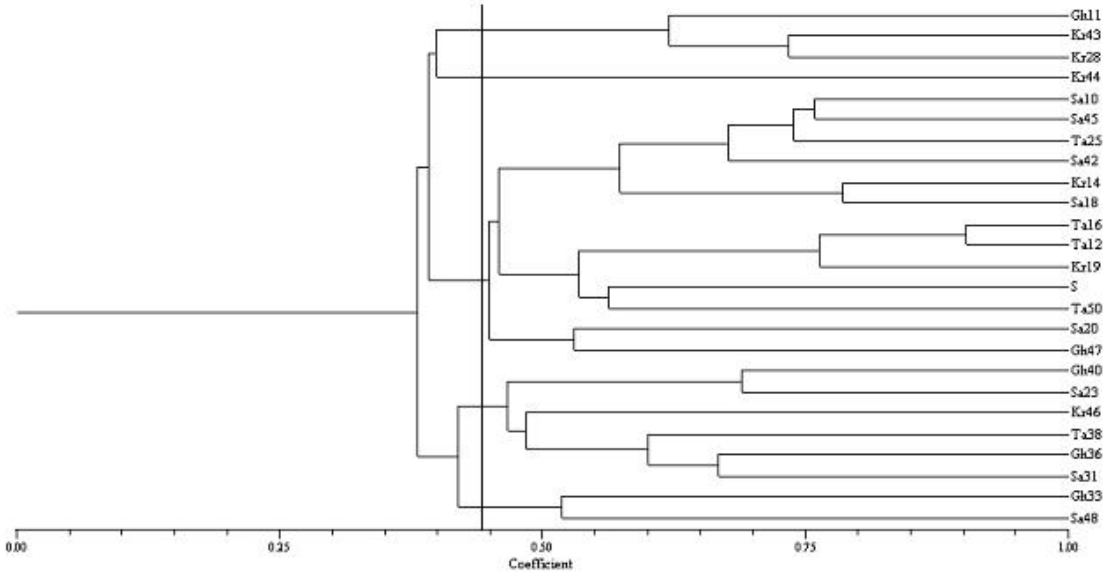
شکل ٤) انگشت نگاری ژنومی جدایه های *Ralstonia solanacearum* با استفاده از آغازگرهای rep-PCR، الف) ERIC، ب) REP و ث) BOX. M) نشانگر مولکولی ۱kbp

Figure 4. Genomic fingerprinting patterns of *Ralstonia solanacearum* genomic strains isolated from infected tissue using A, ERIC, B, REP and C, BOX primer sets. Lane M) 1 Kbp DNA ladder.

داده های ترکیبی هرسه آغازگر نشان داد که جدایه ها در سطح تشابه ۴۳٪ به پنج گروه قابل تفکیک هستند (شکل ۵). تمامی جدایه های تشخیص داده شده تحت عنوان بیووار ۳ بجز سویه Kr44 در یک گروه قرار گرفتند. اگرچه هیچکدام از این جدایه ها به روش rep-PCR قابل تفکیک ازجدایه های متعلق به فیلوتیپ II نبودند. نتایج بدست آمده نشان داد که ارتباط مشخصی بین گروه های بدست آمده و مناطق جغرافیائی یا خصوصیات فنوتیپی جدایه ها وجود ندارد.

بحث

بیماری پژمردگی باکتریایی از عوامل مهم خسارت زا در ارقام مختلف سیب زمینی در استان کردستان است. باتوجه به تنوع ارقام سیب زمینی کشت شده در استان که بعضاً از سایر مناطق وارد استان می شوند بررسی تنوع در خصوصیات باکتری عامل بیماری میتواند از جنبه مدیریت بیماری مورد توجه باشد. برهمین اساس در تحقیق حاضر خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه های *R. solanacearum* عامل بیماری پژمردگی باکتریائی سیب زمینی جدا شده از مناطق عمده کاشت سیب زمینی در استان کردستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دو گروه اصلی عامل ایجاد بیماری در منطقه مورد مطالعه هستند. یک گروه از جدایه ها براساس خصوصیات فنوتیپی بیووار ۳ تشخیص داده شدند. *R. solanacearum* بیووار۳ دارای دامنه میزبانی وسیعی است و از بسیاری گیاهان متعلق به خانواده سولاناسه و سایر خانواده های گیاهی جداسازی شده است. بیووار۳ باکتری بعنوان یک عامل مخرب از آسیا، امریکای لاتین، اروپا، افریقا و استرالیا



شکل ۵) دندروگرام تنوع ژنتیکی سویه های *Ralstonia solanacearum* براساس آنالیز ترکیبی داده هـای حاصـل از rep-PCR. خوشـه بندی براساس ضریب شباهت دایس انجام شده است.

Figure 5. Dendrogram of genetic relatedness of the rep-PCR fingerprint patterns generated by 24 strains of *Ralstonia solanacearum* isolated from infected tissues. Cluster analysis was performed using Dice's coefficients.

گـزارش شـده اسـت (Elphinstone 2005). پـنج جدایـه تشخیص داده شده تحت عنـوان بیـووار۳ بـر روی سـیب زمینی و گوجه فرنگی بیمـاریزا بودنـد امـا توانـائی ایجـاد بیماری در فلفل و تنباکو را نداشتند. بعلاوه تمامی آنهـا در واکنش PCR باند اختصاصـی گونـه را تکثیـر نمودنـد امـا هیچکدام در واکـنش Pmx بانـد مـورد انتظـار اختصاصـی فیلوتیپ ها را تکثیر ننمودند. عدم تکثیـر بانـد اختصاصـی فیلوتیپ هـا در مطالعـات قبلـی نیـز گـزارش شـده اسـت (Fegan & Prior 2005; Ivey *et al.* 2007). وجود جدایـه های با مشخصات ژنتیکی جدید میتواند موید وجود تکامل تدریجی این بیمارگر باشد. بنظر میرسد ایـن جدایـه هـا از نظر فیلوژنتیکی متمایز از سایر جدایه های تاکنون شناسائی شده هستند. اگرچه جهت تعیین جایگاه طبقـه بنـدی ایـن جدایه ها مطالعات بیشتر خصوصاً براسـاس تعیـین تـوالی نوکلئوتیـدی ژن انـدوگلوکاناز یـا سـایر ژنهـای خانـه دار ضروری است. گروه دوم جدایـه هـای *R. solanacearum* بیووار۲ بعنوان عامل عمده تشخیص داده شد. ایـن بیـووار گسترش جهانی داشـته و دارای چنـدین گـروه فنـوتیپی از جمله بیووار۲/ نژاد۳، بیووار N۲ و بیووار ۲T با مشخصات متفاوت میزبانی و اکولوژیکی است. نتیجه تحقیـق حاضـر نشان داد که براساس خصوصیات فنوتیپی و دامنه میزبـانی از جمله عدم توانائی جدایه ها در لهانیدن ورقه های سیب زمینی، عدم توانائی استفاده از قنـد ریبـوز و عـدم توانـائی ایجاد بیمـاری در فلفـل و تنبـاکو، بیـووار۲/ نـژاد۳ عامـل بیماری است. در سایر مناطق ایران نیز عامل بیماری تحـت عنوان بیووار۲/ نـژاد۳ گـزارش شـده اسـت (Azadvar & Rahimian 2006; Danesh & Bahar 1984; Irandost *et al.* 2008; Magholi *et al.* 2004; Nouri *et al.* 2009). جهت تایید جدایه های تشخیص داده شده واکنش زنجیـره ای پلیمـراز بـا اسـتفاده از آغازگرهـای اختصاصـی گونـه، ۷۵۹/۷۶۰ انجام شد و تکثیـر بانـد بـا انـدازه تقریبـی ۲۸۲ جفت باز تاییـد گونـه *R. solanacearum* بـود. مطالعـات

برمبنای گروه های فیلوتیپی نشان می دهد که سویه های متعلق به فیلوتیپ I دارای منشا آسیایی هستند اما نتایج تحقیق حاضر براساس Pmx نشان داد سویه های بیووار ۲ متعلق به فیلوتیپ II هستند که تایید گزارشات قبلی است (Izadiyan & Taghavi 2011; Nouri *et al.* 2009). با توجه به اینکه منشا سویه های متعلق به فیلوتیپ II امریکای جنوبی است بنابراین می توان احتمال داد که همراه با پایه های گیاهی آلوده از جمله بذر به ایران منتقل شده باشند. نتایج برخی مطالعات قبلی در سایر کشورهای آسیایی نیز موید وجود سویه های بیووار ۲ متعلق به فیلوتیپ II بوده که از طریق بذور آلوده منتقل شده اند (Sagar *et al.* 2014). مطالعات متعددی در خصوص استفاده از rep-PCR جهت تفکیک سویه های *R. solanacearum* در سطح بیووار و نژاد انجام شده است. (Horita and Tsuchiya 2001; Horita *et al.* 2005; Jeong *et al.* 2007; Melanie *et al.* 2007; Robertson *et al.* 2001; Thwaites *et al.* 1999). در این تحقیق براساس rep-PCR، جدایه ها در سطح تشابه ۴۳٪ به پنج گروه تقسیم شدند که نشاندهنده تنوع بیشتر جدایه ها در مقایسه با مطالعات قبلی است (Nouri *et al.* 2009). برخی مطالعات نشاندهنده تنوع ژنتیکی بین جدایه های بیووار۲، گروه بندی آنها براساس rep-PCR بوده و ارتباط مشخصی بین گروه ها و مناطق جغرافیائی وجود دارد (Horita *et al.* 2005). در مقایسه تحقیق حاضر نشان داد ارتباط مشخصی بین گروه های بدست آمده با مناطق جغرافیائی جدایه ها و یا خصوصیات فنوتیپی آنها وجود ندارد که می تواند نشان دهنده ورود باکتری به استان همراه با اندامهای آلوده از مناطق متنوع جغرافیایی باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که *R. solanacearum* بیووار۲/ نژاد۳ عامل اصلی ایجاد بیماری پژمردگی باکتریائی سیب زمینی در استان کردستان است و بیووار ۳ نیز با درصد وقوع کمتر بعنوان عامل بیماری گزارش می گردد. بعلاوه نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه های مورد مطالعه بود اگرچه نیاز است مطالعات تکمیلی با تعداد بیشتری جدایه جمع آوری شده از مناطق جغرافیایی وسیع تر انجام شود.

منابع

Azadvar M., Rahimian H. 2006. Studies on bacteriological characteristics of casual agent of bacterial wilt of potato in Southern Kerman. Pajouhesh and Sazandegi, 19:94-102.

Bagheri A. and S.M. Taghavi. 2001. Characteristics of strains of the causal agent of bacterial wilt of potato and tomato in Fars province and reaction of some potato and tomato cultivars to the pathogen. Iranian Journal of Plant Pathology 36:69–72.

Cook D., Barlow E., Sequeira L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant Microbe Interaction 2:113-121.

Cook D., Sequeira L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward AC, Hartman GL, eds, *Bacterial wilt, the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 77-93.

Danesh D., Bahar M. 1984. Occurrence of bacterial wilt of potato in Iran. In: *Proceedings of the ninth triennial conference of the European association for potato research, Interlaken, Switzerland*, 407-408.

Denny T.P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam S.S., ed. Plant associated bacteria.

Dordrecht, The Netherlands: Springer Publishing, 573-644.
Dice L.R. 1945. Measurement of the amount of ecologic association between species. Ecology, 26:297–302.
Elphinstone J.G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pages 9-28 in: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, Prior P., and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
Fegan M., Prior P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? Pages 449-461 in: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
Fegan M., Taghavi M., Sly L., Hayward A.C. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostic of *Ralstonia solanacearum*. Pages 19-33 in: Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological aspects. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. INRA Edition, Paris.
Gillings M., Fahy P. 1993. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovar 2 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. Plant Pathology 42:744-753.
Gillings M., Fahy P., Davies C. 1993. Restriction analysis of an amplified polygalactoronase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. Letters in Applied Microbiology 17:44-48.
Hayward A.C. 1994a. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman, 9-23. Wallingford: CAB International.
Hayward A.C. 1994b. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 123-135.
Hayward A.C. 1964. Characterization of *Pseudomonas solanacearum*. Journal Applied Bacteriology 27:265-277.
Hayward A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
Horita M., Tsuchiya K. 2001. Genetic Diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 91:399-407.
Horita M., Tsuchiya K., Ooshiro A. 2005. Characteristics of *Ralstonia Solanacearum* biovar N2 strains in Asia. Journal of Phytopathology 153:209-213.
Horita M., Tsuchiya K., Suga Y., Yano K., Waki T., Kurose D., Furuya N. 2014. Current classification of *Ralstonia solanacearum* and genetic diversity of the strains in Japan. Journal of General Plant Pathology 80:455-465.
Irandoust H., Niknam G.H., Ghasemi A., Taghavi S.M., Torabi E. (2008). Study on phenotypic and protein diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Iran. Journal Science & Technology of Agriculture and Natural Resources 43:183-192.
Ivey M.L., Gardener B.B., Opina N., Miller S.A. 2007. Diversity of *Ralstonia solanacearum* Infecting Eggplant in the Philippines. Phytopathology 97:1467-75.
Izadiyan M., Taghavi S.M. 2011. Diversity of Iranian isolates of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathologia mediterranea 50:236-244.
Jeong Y., Kim J., Kang Y., Lee S., Hwang I. 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. Plant Disease 91:1277-1287.
Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium chloride medium. Phytopathology 44:693-695.
Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60:2286-2295.
Maghooli M., Hayati J., Taghavi M., Mostafazadeh G.R. 2004. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* in Khuzestan. In: Proceedings of the Sixteenth plant protection congress, Tabriz, Iran, 218.
Melanie L., Lewis I., Brian B., Gardner M., Opina N., Miller S.A. 2007. Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. Phytopathology 97:1467-1475.
Montanelli C.A., Chiari A., Chiari T., Stefanini F., Nascari G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas*

solanacearum in potato under controlled conditions. Euphytica 81:35-43.

Norman D.J., Zapata M., Gabriel D.W., Duan Y.P., Yuen J.M.F., Mangravita-Novo A., Donahoo R.S. 2009. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. Phytopathology 99:1070-1077.

Nouri S., Bahar M., Fegan M. 2009. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. Plant Pathology 58:243-249.

Opina N., Tavner F., Hollway G., Wang J.F., Li T.H., Maghirang R., Fegan M., Hayward A.C., Krishnapillai V., Hong W.F., Holloway B.W., Timmis J. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific Journal Molecular Biology and Biotechnology* 5:19-30.

Prior P., Ailloud F., Dalsing B.L., Remenant B., Sanchez B., Allen C. 2016. Genomic and proteomic evidence support the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. BioMed Central Genomics [http://bmcgenomics.biomedcentral.com] 10.1186/s12864-016-2413-z.

Prior P., Fegan M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Acta Horticaltura 695:127-136.

Poussier S., Prior P., Luisetti J., Hayward C., Fegan M. 2000. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirmed and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. Systematic and Applied Microbiology 23:479-486.

Poussier S., Trigalet-Demery D., Wandewalle P., Goffinet B., Luisetti J., Trigalet A. 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. Microbiology 146:1679-1692.

Robertson A.E., Fortnum B.A., Wood T.C., Kluepfel D.A. 2001. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in the Southeastern United States. Contributions to Tobacco Research 19:323-331.

Safni I., Cleenwerck I., De Vos P., Fegan M., Sly L., Kappler U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebensis* subsp. nov., and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstinia pseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:3087-3103.

Sagar V., Jeevalatha A., Mian S., Chakrabarti S.K., Gurjar M.S., Arora R.K., Sharma S., Bakade R.R., Singh B.P. 2014. Potato bacterial wilt in India caused by strains of phylotype I, II and IVof *Ralstonia solanacearum*. European Journal of Plant Pathology, 138:51–65.

Smith J.J., Offord L.C., Holderness L.C., Holderness M., Saddler G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61:4263-4268.

Thwaites R., Mansfield J., Eden-Green S., Seal S. 1999. RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. Plant Pathology 48:121-128.

Winstead N.N., Kelman A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 42:628-634.