بررسی ویژگی‌های مرتبط با بیماریزایی و فنوتیپی استرین‌های عامل بیماری پژمردگی آوندی سیب‌زمینی در استان همدان

سمیه اسفندیاری[1] و غلام خداکرمیان[2]*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

۲*- **نویسنده مسؤول:** دانشیار بیماری شناسی گیاهی ، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

(khodakaramian@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۳ تاریخ پذیرش ۹۲/۶/۱۳

چکیده

بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از باکتری *Ralstonia solanacearum* از اهمیت نسبی روی سیب زمینی در استان همدان برخوردار هستند. در این تحقیق تنوع بیماری‌زایی و ویژگیهای فنوتیپی این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در بهار و تابستان سال ۱۳۸۹ نمونه‌های غده و بوته مشکوک به بیماری از مزارع استان همدان گردآوری شدند. از نمونه‌های گردآوری شده مجموعا ۷۸ استرین باکتری *R. solanacearum* پس از کشت روی محیط NA حاوی تری فنیل تترازولیوم کلراید TTC جداسازی شد، جدایه‌ها از نظر االگوی لعاب و شکل کلونی دارای تنوع بودند. پس از انجام آزمون بیماری‌زایی و بررسی ویژگی‌های فنوتیپی ٦٥ استرین به عنوان باکتری *R. solanacearum* نژاد ۳ بیوار ۲ تشخیص داده شدند. تنوع بیماری‌زایی استرین‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٦٦ تیمار و سه تکرار صورت گرفت و علائم ایجاد شده برای سه صفت، زردی، اپی‌ناستی و پژمردگی ارزیابی شد و نتایج حاصل مورد تجزیه آماری قرار گرفته و مشخص شد که بین بیماری‌زایی جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

کلید واژه‌ها : تنوع بیماری زایی، استان همدان ، Ralstonia solanacearum

مقدمه

سیب‌زمینی ازخانواده Solanaceae و جنس *Solanum* و نام علمی آن *S. tubersom* است. جنس *Solanum* شامل ۲۰۰۰ گونه وحشی و زراعی است که در سراسر جهان به ویژه در نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر پراکنده است و حدود ۱۵۰ گونه آن غده تولید می‌کند. استان های اردبیل، اصفهان، همدان، آذربایجان‌شرقی، خراسان، گلستان، سمنان و تهران به ترتیب مهم‌ترین تولیدکنندگان سیب‌زمینی آبی در کشور به شمار می‌روند (خواجه‌پور، ۱۳۸۶). استان همدان با دارا بودن آب و هوای مناسب و سازگار برای کشت این محصول درصد عمده‌ای از تولید سیب‌زمینی کشور را به خود اختصاص داده و با سطح زیر کشتی برابر ۲۷۰۰۰ هکتار و تولید سالانه ۲۹۲ هزار تن جایگاه ویژه‌ای در تولید سیب‌زمینی کشور دارد.

باکتری *Ralstonia solanacearum* (smith) Yabuuchi *et al* 1995 یکی از عوامل مهم کاهش دهنده محصول سیب‌زمینی در مناطق گرمسیر ، نیمه گرمسیر و معتدل دنیا به شمار می رود (هیوارد[1]،۲۰۰۰). بیش از ۲۷۰ گونه متعلق به ۵۰ خانواده گیاهی به عنوان میزبان این باکتری گزارش شده است (هیوارد، ۱۹۹۴ ؛ هیوارد، ۱۹۹۱). به دلیل تنوع قابل ملاحظه موجود در این باکتری، *R. solanacearum* به عنوان یک گروه گونه ای تلقی می شود (فگان و پرویر[2]، ۲۰۰۵). این باکتری

1- Hayward
2- Fegan & Prior

بر اساس دامنه میزبانی به ۵ نژاد و بر اساس استفاده از چند کربوهیدرات مختلف، به ۶ بیووار تقسیم شده است (دنی[1]، ۲۰۰۶). استرین های مختلف این باکتری بر اساس مقایسه توالی بازهای ژن 16S rRNA به دو گروه تقسیم شده اند، به طوری که بیوارهای یک و دو در یک گروه و بیوارهای سه و چهار و پنج نیز در یک گروه دیگر قرار می گیرند (سیل[2] و همکاران، ۱۹۹۷، تقوی[3] و همکاران، ۱۹۹۶). نژاد سه بیوار دو عامل پژمردگی باکتریایی یک بیماری جدی روی سیب-زمینی محسوب می شود (هوریتا[4] و همکاران، ۲۰۰۵). آنالیزهای RFLP یک طبقه بندی جدید را نشان داده که در آن گونه ها بر اساس منشاء جغرافیایی به ۴۶ گروه تقسیم شده اند. این ۴۶ گروه به عنوان زیر گروههای ۲ گروه عمده آسیایی و امریکایی مطرح هستند(پوزیر[5] و همکاران، ۱۹۹۹). در ایران بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی اولین بار توسط بهار و دانش روی سیب زمینی و از منطقه اصفهان گزارش شده است (بهار و دانش، ۱۳۶۷). در حال حاضر این بیماری در اکثر نواحی ایران روی سیب زمینی وجود دارد و یکی از عوامل محدود کننده کشت سیب زمینی به شمار می رود (باقری و تقوی، ۱۳۷۹). دو بیوار:۲A و ۲T از این باکتری معرفی شده است . در جنوب استان کرمان این بیماری توسط جدایه های نژاد ۳ بیوار ۲A ایجاد میشود(آزاداور و رحیمیان، ۱۳۷۹) و بیوار ۲T در ایران اولین بار از استان فارس و از سیب زمینی گزارش شده است (ایران دوست و همکاران ،۱۳۸۷). ازآنجا که استان همدان یکی از نقاط مهم سیب زمینی کاری غرب کشور محسوب می شود و باکتری *R. solanacearum* از عوامل بیماری زای مهم این گیاه در این منطقه هستند، انجام تحقیقی پیرامون آن ضروری به نظر رسید، هدف از انجام این تحقیق جداسازی، تشخیص و بررسی تنوع فنوتیپی، بیماری زایی و پروتئینی این باکتری در مناطق مختلف استان همدان است.

مواد و روش ها

در بهارو تابستان سال ۱۳۸۹ از مزارع سیب زمینی استان همدان بازدید به عمل آمد، واقدام به جمع آوری نمونه های گیاهی مشکوک به آلودگی پژمردگی باکتریایی به صورت تصادفی گردید. به منظور جمع آوری گیاهان آلوده به باکتری، بوته های دارای علائم پژمردگی، زردی و کاهش رشد انتخاب شدند.همچنین غده های دارای حلقه آوندی قهوه ای رنگ نیز از مزارع جمع آوری گردید. جداسازی باکتری بیماری مطابق روش های معمول باکتری شناسی (فهی و هیوارد، ۱۹۸۳) با خرد کردن قطعات بافت آلوده در آب مقطر سترون و بعد از ۱۰-۱۵ دقیقه کشت سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت افتراقی حاوی TTC (تری فنیل تترازولیوم) به صورت مخطط صورت گرفت. غده های آلوده به طور کامل با الکل ۷۰ ٪ سترون شد سپس از محل حلقه های قهوه ای روی غده (آوندها) با لوپ از مایع لزج (عفونت) برداشته و روی محیط به صورت مخطط کشت داده شد، سپس پتری ها به مدت ۲-۳ روز در انکوباتور در دمای ۳۰ -۲۸ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. پس از آن کلونی های باکتری بیماری زا به صورت نا منظم به رنگ سفید با مرکز صورتی لعاب دار مشاهده شدند. مطالعات روی ۷۸ استرین جدا شده از مناطق مختلف استان همدان انجام شد. مشخصات استرین ها در جدول ۱ آمده است.

1- Denny
2- Sail *et al.*
3- Taghavi *et al.*
4- Horita
5- Poussier

جدول۱- محل جمع آوری استرین های *R. solanacearum* استفاده شده در این مطالعه

شماره استرین	محل جمع‌آوری
ES1-ES10	رزن
ES11-ES17	علی آباد
ES18-ES24	اسدآباد
ES25-ES42	بهار
ES43-ES47	ده پیاز
ES 48-ES55	لالجین
ES56-ES65	کبودرآهنگ
ES66-ES72	فامنین
ES73-ES78	ینگجه

آزمون فوق حساسیت و بررسی بیماری زایی:

اثبات بیماری زایی جدایه ها بر اساس روش وینستد و کلمن روی گوجه فرنگی انجام شد و از گیاهانی که علائم بیماری را نشان دادند، مجدداً جداسازی انجام گرفت. برای هر استرین سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از گذشت یک تا دو هفته بوته ها از لحاظ وجود علائم اپی ناستی، زردی و پژمردگی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. واکنش فوق حساسیت در توتون و شمعدانی طبق روش لوزانو و سکویرا[1] (۱۹۷۰) انجام گرفت.

ارزیابی بیماری زایی

برای ارزیابی بیماری و بررسی تنوع آن روی گیاه گوجه‌فرنگی ، سه فاکتور زردی، اپی ناستی و پژمردگی در نظر گرفته شد. شاخص اندازه گیری صفات به صورت زیر بود:گیاه بدون علائم زردی: ۱، زردی در برگ بالای محل تلقیح: ۲، زردی در دو تا سه برگ: ۳، زردی در چهار برگ یا بیشتر: ۴، مرگ گیاه: ۵. :گیاه بدون علائم اپی ناستی: ۱،اپی ناستی در برگ بالای محل تلقیح: ۲، اپی ناستی در دو تا سه برگ: ۳، اپی ناستی در چهار برگ یا بیشتر: ۴، مرگ گیاه: ۵. گیاه بدون علائم پژمردگی: ۱، پژمردگی در برگ بالای محل تلقیح: ۲، پژمردگی در دو تا سه برگ: ۳، پژمردگی در چهار برگ یا بیشتر: ۴، مرگ گیاه: ۵. گیاه شاهد (هوریتا و همکاران، ۲۰۰۱).

طرح آزمایش و آنالیز نتایج حاصل

این آزمایش با ۶۵ تیمار و ۱ شاهد سالم در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه گردید. به دلیل مشاهده ای بودن داده ها برای بررسی معنی دار بودن آنها از آزمون کروسکال والیس با توزیع کای اسکویر در سطح پنج درصد استفاده شد (بهبودیان، ۱۳۸۷).

الکتروفورز پروتئین:

این آزمون بر اساس روش لملی[2] (۱۹۷۰) و استنلی[3] (۱۹۹۰) انجام شد. الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید (polyacrylamide gel) عمودی با ژل جداکننده (Separating gel) ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد انجام گرفت (Stacking gel). الکتروفورز با شدت جریان ثابت ۱۵ میلی آمپر تا رسیدن رنگ پیشرو به انتهای ژل انجام گرفت، رنگ آمیزی ژل با محلول (آب، متانول، اسید استیک به نسبت ۱:۵:۵ در محلول ۰/۱ درصد کوماسی برلیانت بلو جی-۲۵۰) به مدت ۲۴ ساعت انجام

1- Lozano & Sequeira

2- Laemmli
3- Stanley

شد. جهت رنگ بری ، ژل در محلول مشابه محلول رنگ‌آمیزی ولی بدون کوماسی بلو تا زمان وضوح باند ها قرار داده شد.ژل سپس در محلول اسید استیک ۷ در یخچال نگهداری شد .

بررسی ویژگی های بیوشیمیایی، تغذیه ای:

به منظور شناسایی استرین ها از روش های متداول بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی استفاده شد. از محیط کشت حاوی TTC برای بررسی خصوصیات ظاهری کلونی و مقایسه کلونی های بیماری زا و غیربیماری زا استفاده گردید(کلمن و همکاران، ۱۹۹۴). واکنش تعیین گرم به روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) با حلالیت در هیدروکسید پتاسیم سه درصد، آزمون آرژنین دی هیدرولاز به روش تورنلی[1] (۱۹۶۰)، همچنین رشد هوازی و بی هوازی(O/F) در حضور گلوکز و به روش هیو و لایف سن[2] (۱۹۵۳) انجام شد. اکسیداز به روش کواکس[3] (۱۹۵۶) آزمون کاتالاز، اوره آز، تولید لوان، هیدرولیز ژلاتین و کازئین و بررسی توانایی جدایه ها در استفاده از منابع کربن بر اساس روش شاد[4] و همکاران (۲۰۰۱) صورت گرفت. آزمون احیای نیترات به نیتریت به روش لیلیوت[5] و همکاران(۱۹۹۶)، فسفاتاز، هیدرولیز نشاسته و فنیل آلانین به روش فهی[6] و هیوارد (۱۹۸۳) انجام گرفت.

نتایج و بحث

تفاوت ریخت شناسی بین پرگنه‌ها از نظر اندازه، شکل، الگوی رنگدانه و لعاب در محیط افتراقی حاوی TTC مشاهده شد. پرگنه های گرد و نا منظم، لعاب دار، نسبتاً درشت، سفید شیری و معمولاًبا مرکز صورتی رنگ (تیپ بیماری زا) و گاهی نیز پرگنه های گرد، کوچک، محدب، قرمز پررنگ (تیپ غیر بیماری زا) دیده شد. که این تفاوت در بررسی های کریمی در استان های کردستان و مرکزی نیز دیده شد (کریمی و حریقی، ۱۳۸۹). استرین های مربوط به شهرستان بهار و لاله جین تقریباً کلونی های مشابه از نظر مقدار لعاب و همین طور رنگدانه داشتند. استرین های منطقه رزن دارای لعاب زیاد و رنگدانه کم بودند به طوری که پرگنه بعضی از استرین ها به رنگ شیری مات دیده می شد و بسیار رونده بود. در اطراف پرگنه بعضی از استرین‌های مربوط به شهرستان بهار یک هاله کرم تا زرد رنگ دیده شد. استرین‌های منطقه رزن دارای لعاب زیاد و رنگدانه کم بودند به طوری که پرگنه بعضی از استرین ها به رنگ شیری مات دیده می شد و بسیار رونده بود. بقیه استرین ها تقریباً پر گنه مشابهی داشتند . مورفولوژی پرگنه ها روی محیط حاوی تری فنیل تترا زولیوم با توصیف کلمن (۱۹۹۴) مطابقت داشت. هیچ یک از استرین‌ها قادر به تحمل نمک طعام ۲٪ نبودند. این خصوصیت یکی از خصوصیات ثابت گونه است که با نتایج کار سایر محققین مطابقت دارد (یابوچی، ۱۹۹۵). استرین ها قادر به احیای نیترات بودند که این یافته‌ها نیز با توصیف بیوار دو توسط هیوارد همخوانی دارد (هیوارد، ۱۹۹۴). بعضی اختلافات در بین استرین‌ها (هیدرولیز اسکولین و تولید لوان) دیده شد اما این اختلافات در تاکسونومی *R. solanacearum* اهمیت زیادی ندارد (مارین و ناشار،۱۹۹۳). این اختلافات در بررسی های ایراندوست در استرین های آذربایجان شرقی و کرج نیز دیده شد. (ایراندوست و همکاران، ۱۳۸۷). همه استرین ها میله ای شکل، گرم منفی، فاقد اسپور، دارای یک یا به ندرت دو تاژک قطبی بودند. سایر خصوصیات بیوشیمیایی و تغذیه‌ای در جدول ۲ آمده است. خصوصیات فنوتیپی استرین‌هانشان داد که همگی متعلق به گونه *R. solanacearu* می باشند. (هیوارد، ۱۹۹۱؛ یابوچی، ۱۹۹۵). استفاده از سه قند مالتوز، لاکتوز، سلوبیوز و همین طور عدم مصرف سه قند مانیتول، دولسیتول و سوربیتول نشان داد که ۶۵ استرین از کل استرین‌های جمع‌اوری شده متعلق به بیوار۲ بوده‌اند.

1- Thorneley
2- Hugh & Leifson
3- Kovacs
4- Schaad
5- Lelliott
6- Fahy

این خصوصیات با نتایج کار سایر محققین درباره تعیین بیوار مشابه است (هوریتا و همکاران، ۲۰۰۱؛ هیوارد، ۱۹۹۱؛ مارین و ناشار، ۱۹۹۳). بر اساس خصوصیات فنوتیپی، استرین‌های بیوار دو در اکثر مناطق سیب‌زمینی کاری دنیا تقریباً شبیه یکدیگر هستند و فقط بعضی تفاوت‌های جزئی در آنها دیده می شود.

جدول ۲- ویژگی‌های مرفولوژیک، بیوشیمیایی، و تغذیه‌ای استرین‌های باکتری *Ralstonia solanacearum* جداشده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان

ویژگی	واکنش	ویژگی	واکنش
واکنش گرم	–	استفاده از:	
فوق حساسیت در توتون	+	دولسیتول	–
فوق حساسیت در شمعدانی	+	مالتوز	+
لهانیدن غده سیب‌زمینی	–	سلوبیوز	+
رنگدانه نفوذپذیر	+	دی-ترهالوز	–
کاتالاز	+	گلوکوز	+
اکسیداز	+	دی-آرابینوز	–
آرژینین دی هیدرولاز	–	دی-تارتارات	-
رشد در ۴۱ درجه سلسیوس	–	مانیتول	-
تخمیر بی‌هوازی گلوکز	–	سوربیتول	-
تولیدرنگدانه فلورسنت روی محیط KB	–	دی-فوکوز	–
هیدرولیز ژلاتین	–	لاکتوز	+
هیدرولیز اسکولین	v	تولید لوان	v
هیدرولیز نشاسته	–	مالتوز	+
متیل رد	–	ان-پروپانول	+
فعالیت اوره آز	+	هپتانوات	–
تولید نیتریت ازنیترات	+	بتایین	–
فسفاتاز	–	ال-آرژینین	–
هیدرولیز کازئین	+	دی-رایبوز	–
رشد در حضور نمک ۱/۵ درصد	–	لاکتوز	+

(هیوارد؛ ۱۹۹۴ ; پاستریک و میس[1] ، ۲۰۰۰).

ب- واکنش فوق حساسیت در توتون و شمعدانی

آزمون فوق حساسیت برای استرین های این باکتری روی گیاه توتون و شمعدانی انجام شد. در بین استرین های مورد بررسی استرین های مربوط به مناطق بهار و لاله جین مایه زنی شده به توتون و استرین های ES59, ES41, ES13 تلقیح شده به شمعدانی پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تلقیح واکنش فوق حساسیت شدیدی را نشان داد. استرین ES30 در کمتر از ۲۴ ساعت از زمان تلقیح واکنش نشان داد. بدین ترتیب که برگ توتون را به شدت آب‌سوخته کرد. سایر استرین ها نیز پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت واکنش نشان دادند و ۷ استرین نیز واکنشی نشان ندادند. نتایج به دست آمده با نتایج هوریتا و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی تنوع استرین های جدا شده از ژاپن مشابه است، بیشتر استرین های جدا شده از مزارع سیب زمینی ژاپن بعد از ۴۸ ساعت از زمان تلقیح روی توتون واکنش نشان دادند. و کل استرین ها در واکنش HR به ۳ گروه تقسیم شدند(هوریتا و تسوچیا[2]، ۲۰۰۱).

الکتروفورزپروتئین سلولی:

باند های پروتئینی استرین های مناطق مختلف استان همدان با یکدیگر مقایسه شد. و الگوی الکتروفورتیکی پروتئینهای سلولی همسان بود. در بررسی های ایراندوست در آذربایجان شرقی و فارس نتایج مشابهی به دست آمد (ایراندوست و همکاران، ۱۳۸۷).استرین های بیماری زای *R. solanacearum* که پلی ساکارید خارج سلولی (EPS) تولید می کنند با فرم های غیر بیماری زا (غیر آبکی و رونده) همان استرین ها الگوی پروتئینی مشابه داشتند (دریستینگ[3]، ۱۹۹۰). معقولی و همکاران از مزارع مختلف سیب زمینی و گوجه فرنگی استان خوزستان ۷۳ جدایه جداسازی کردند که همه جدایه ها *R. solanacearum* شناخته شدند، با وجود تفاوت های جزئی در خصویات فنوتیپی، نقوش الکتروفورزی پروتئین های سلولی همه جدایه های بدست آمده از سیب زمینی و گوجه یکسان بودند (معقولی و همکاران، ۱۳۸۳). علت یکنواخت بودن اکثر باندهای پروتئینی در مورد استرین های باکتری می تواند به دلیل یکسان بودن شرایط اقلیمی منطقه، شرایط خاص آب و هوایی ، یکسان بودن کشت و نیز این که استرین ها از یک منطقه محدود گردآوری شدند، باشد. لازم به ذکر است که ارتباط مشخصی بین الگوی پروتئین سلولی و علا ئم بیماری بدست نیامد، پروفیل SDS-PAGE پروتئین های غشا معیار کاربردی مناسبی برای طبقه بندی شناسایی و گروه بندی درون گونه ای باکتری *R. solanacearum* در سطح زیر گونه به شمار می آید (ملو و فرویا[4]، ۱۹۹۸).

تنوع بیماری زایی:

نتایج بررسی بیماری زایی و تنوع آن بر روی گیاه گوجه فرنگی نشان داد که بین تیمارها برای چهار صفت بررسی شده در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی دار وجود دارد. همین طور بین استرین های مناطق مختلف برای صفات ذکر شده تنوع وجود دارد.

استرین های جدا شده از شهرستان لاله جین صفت زردی را بارزتر از بقیه مناطق نشان دادند [5](۳/۲)، استرین های دو منطقه بهار و علی آباد به یک شکل (۲/۸) و مناطق کبودرآهنگ، ده پیاز و رزن نیز تقریباً مشابه بودند.(۵۳ /۴۸،۲/۲و۲/۴). استرین های جدا شده از مزارع سیب-زمینی شهرستان اسدآباد این صفت را کمتر (۱/۵۱) از بقیه مناطق نشان دادند (شکل۱).

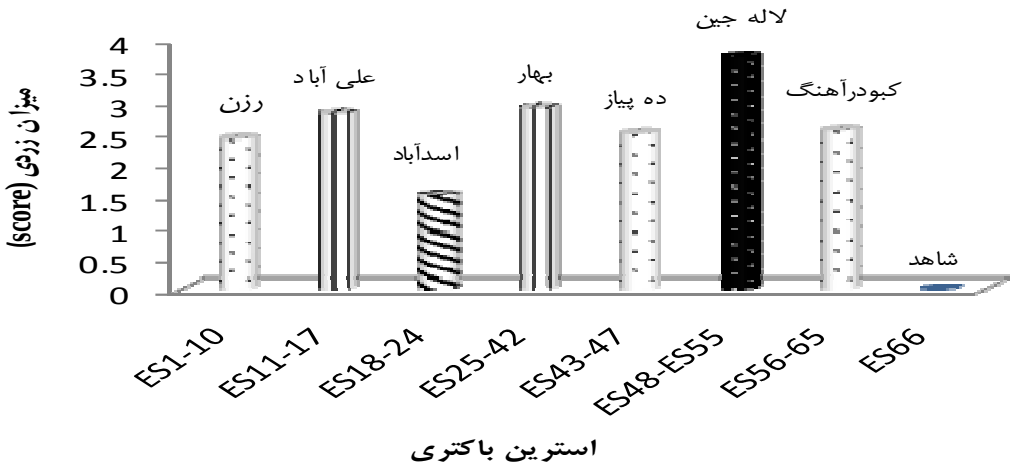
استرین‌های جدا شده از شهرستان اسد آباد صفت پژمردگی را در مقایسه با بقیه مناطق کمتر نشان دادند(۲/۶)، استرین‌های چهار منطقه رزن، علی آباد، ده پیاز و کبودرآهنگ تقریباً به یک شکل (۳/۶۵، /۳/۶۲، ۳/۶۷ و۳/۶۷) مناطق بهار و لاله جین نیز با اندکی تفاوت

1- Pastrik & Maiss
2- Horita & Tsuchiya
3- Dristing
4- Melo & Furuya

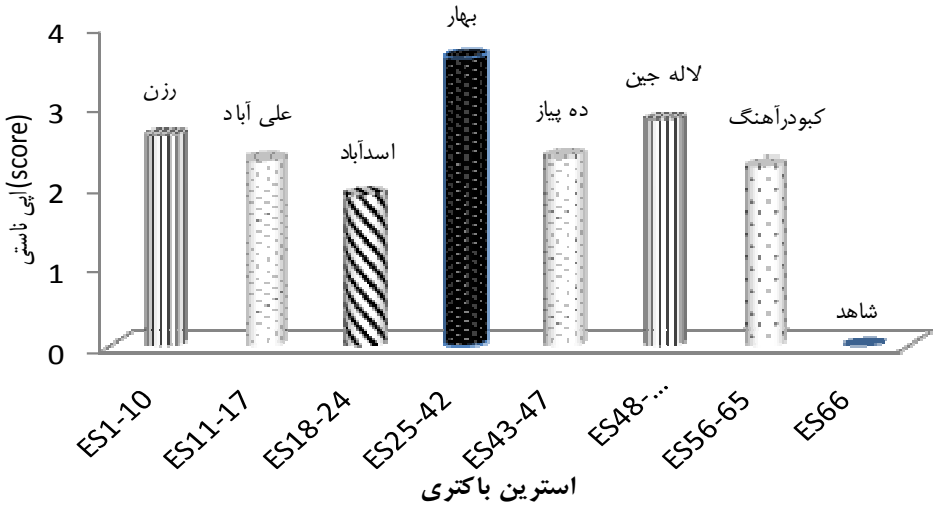
تقریباً مشابه بودند (۳/۹ و ۴/۰۱). گیاه تیمار شده باآب مقطر صفت پژمردگی را نشان ندادند. (شکل۲).

استرین‌های جدا شده از شهرستان بهار صفت اپی-ناستی را بارزتر از بقیه مناطق نشان دادند (۳/۵)، استرین-های سه منطقه ده پیاز، کبودرآهنگ و علی آباد تقریباً به یک شکل (۲/۲، ۲/۱۴ و ۲/۲۴) مناطق رزن و لاله‌جین نیز تقریباً مشابه بودند (۲/۸ و ۲/۴۸). استرین‌های جدا شده از مزارع سیب‌زمینی شهرستان اسد آباد صفت اپی‌ناستی را کمتر (۱/۸۱) از بقیه مناطق نشان دادند (شکل۳).

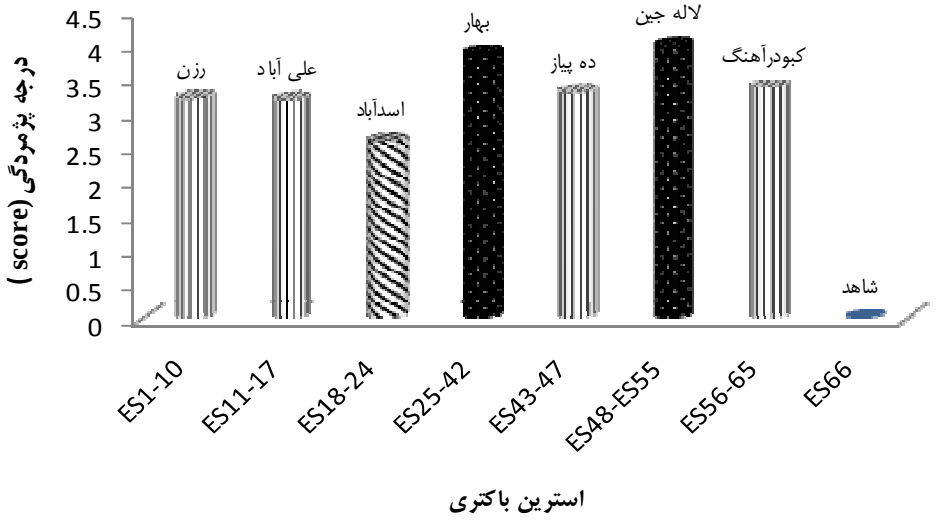
نتایج بدست آمده از این آزمایش مشخص کرد که استرین‌های جدا شده از شهرستان اسدآباد صفات مذکور را کمتر از بقیه مناطق نشان دادند. بنابراین ممکن است استرین‌های جدا شده از این منطقه، استرین‌های جدیدی باشند که در ژن‌های بیماری‌زایی آنها تغییراتی صورت گرفته است. هوریتا و همکاران(۲۰۰۰) صفت پژمردگی را برای استرین‌های *R. solanacearum* جدا شده از ژاپن بر روی گیاه گوجه فرنگی، بادمجان و سیب‌زمینی بررسی کردند بر اساس شدت بروز علائم پژمردگی استرین‌های باکتری را در ۴ گروه قرار دادند، که در تحقیق حاضر نیز گروه بندی به همین صورت انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق مؤید آن است که در بین استرین‌های *R. solanacearum* جمع آوری شده از مناطق مختلف استان همدان از نظر خصوصیات فنوتیپی و بیماری‌زایی و الگوی پروتئین تفاوت‌هایی (در بعضی صفات به صورت جزئی) دیده شد ولی ارتباط مشخصی بین منطقه جغرافیایی و خصوصیات استرین‌ها بدست نیامد، که این نتایج در بررسی‌های کریمی در ۲ استان کردستان و مرکزی نیز دیده شده است. (کریمی و حریقی، ۱۳۸۹).



شکل۱- بررسی اثر باکتری‌های *R. solanacearum* جدا شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان بر روی زردی برگ گیاه گوجه‌فرنگی



شکل ۲- بررسی اثر باکتری‌های *R. solanacearum* جدا شده از مزارع سیب زمینی استان همدان بر روی پژمردگی برگ گیاه گوجه‌فرنگی



شکل۳- بررسی اثر باکتری‌های *R. solanacearum* جدا شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان بر روی اپی‌ناستی برگ گیاه گوجه‌فرنگی

منابع

۱. ایراندوست، ح، نیکنام، غ، قاسمی ، ا، تقوی، م و ترابی، ا. ۱۳۸۷. بررسی تنوع فنوتیپی و پروتئینی جدایه های *R. solanacearum* در ایران. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۴۳ (۱): ۱۸۳– ۱۹۲.

۲. آزادوار، م. ح، رحیمیان. ۱۳۷۹. شناسایی بیوتیپ و نژاد جدایه‌های باکتری *R. solanacearum* عامل پژمردگی سیب-زمینی در جنوب استان کرمان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه اصفهان.

۳. باقری خیرآبادی، م.۱۳۷۲. بررسی بیوارهای باکتری عامل پژمردگی سیب‌زمینی در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

۴. باقری، ع و تقوی، م. ۱۳۷۹. بررسی خصوصیات جدایه‌های عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی در استان فارس و ارزیابی مقاومت تعدادی از ارقام سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی نسبت به آنها. مجله بیماری‌های گیاهی، ۳۶ (۴): ۹-۱۵.

۵. بهار، م و دانش، د. ۱۳۶۷. سبب شناسی پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در ایران. مجله بیماریهای گیاهی، ۲۴: ۱-۱۲

۶. بهبودیان، ج. ۱۳۸۷. آمار ناپارامتری. دانشگاه شیراز، ۲۵۰ -۲۵۷

۷. خواجه پور، م. ۱۳۸۶. گیاهان صنعتی . جهاد دانشگاهی. اصفهان.

۸. کریمی، م و حریقی، ب. ۱۳۸۹. بررسی تنوع فنوتیپی و ژنتیکی باکتری *R. solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در استانهای کردستان و مرکزی. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه تهران

۹. معقولی، م. حیاتی، ج، تقوی، م. و مستوفی زاده، ر. ۱۳۸۳. تعین خصوصیات بیووارهای *R. solanacearum* در استان خوزستان. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه تبریز

10. Buddenhagen, I.W., and Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Pathology, 2: 203-230.

11. Denny, T.P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In Gnanamanickam S.S. (ed.) Plant-associated bacteria. Dordrecht: Springer, pp :573-644.

12. Dristing, M.C.G., and Dianse, J.C. 1990. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovar based on membrane protein patterns. Journal of Phytopathology, 80: 641-646.

13. Fahy, P. C., and Hayward, A. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: Klement, Z., Rudolph, K., Stands, D., C., (eds.). "Methods in Phytobacteriology." Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, p: 327

14. Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In Allen, C. Prior, P. and Hayward, A. C. (eds.). Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. Aps press, Minnesota, pp: 449-461.

15. Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology, 29: 65-87.

16. Hayward, A.C. 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In Hayward, A. C. and Hartman, G. L., (eds.). Bacterial Wilt the Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB. International, Wallingford, UK. pp: 123-135.

17. Hayward, A.C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. Encylopedia of Microbiology. Vol. 4, 2nd edn. Academic Press, London (GB). 29: 67-58.

18. Horita, M., Tsuchiya, K., and Ooshiro, A. 2005. Characteristics of *Ralstonia solanacearum* Biovar N2 strain in Asia. Journal of Phytopathology, 153: 209-213.

19. Horita, M., and Tsuchiya, K. 2001. Genetic diversity of Japanese strain of *Ralstonia solanacearum*. Journal of Phytopathology, 91: 399-407.

20. Hugh, R., and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidadative metabolism of carbohydrate by various Gram negative bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 66: 22-26.

21. Kelman. A., Hartman. G.L., and Hayward, A.C. 1994. Introduction. In Hayward, A.C. and Harman. G.L. (eds.), Bacterial wilt the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*, CAB international, Wallingford, UK. pp: 1-7.

22. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. Nature, 178:703.

23. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. Nature, 227: 680-685.

24. Lelliott, R. A. Billing, E., and Hayward, A.C. 1996. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonas. Journal of Applied Bacteriology, 29: 470-489.

25. Lozano, J.C., and Sequeira, L. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. Journal of Phytopathology, 60: 833-838.

26. Marin, J.E., and E1-Nashaar, H.M. 1993. Pathogenecity of the new phenotypes of *Pseudomonas solanacearum* from Peru. In Hayward, A. C. and G. L. Hartman. (eds.), Bacterial wilt. Proceedings of International Conference of ACIAR, Kaoshing, Taiwan. 28-31 Oct. 1992. pp: 78-84.

27. Melo, M.S., Furuya, N., and Matsuyama, N. 1998. Comparative membrane protein characterization of Brazilian strain of *Ralstonia solanacearum*. Bulletin of the Institute of tropical Agriculture Kyushu University, 22: 34-44.

28. Pastrik, K.H., and Maiss, B. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology, 148: 619-626.

29. Poussier, S., Vandewalle, P., and Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strain of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of the hrp gene region. American Society for Microbiology, 65(5): 2184-2194.

30. Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A., and Denny, T.P., 1997. "Role of extracellular polysaccharide and endogluconase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Journal of Phytopathology, 87:1264-1271.

31. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun W., 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Edn. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

32. Stanley, R.M. 1990. Experimental Techniques. In Bacterial Genetic. Jones and Bartlett Press. US. 180 p.

33. Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L.I., and Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 46: 10-15.

34. 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.

35. Tovar, P., Estrada, R., Schilde, L., Dodds, J. 1985. Introduction and use of invitro potato tuber circular. Plant Tissue Culture & Biotechnology, 13: 1-5

36. Yabuuchi, E., Kosako, I., Yano, Hotta, H., and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of Burkholderia and Alkaligenes to *Ralstonia* Gen. Nov. proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, palleroni and Doudoroff 1973) Comb. November *Ralstonia solanacearum* (Smith 1996) comb. Novemberand *Ralstonia eutropha* (Davis, 1969) comb. Nov. Microbiology and Immunology, 39:897-904.