مقاله تحقیقی

ناهمگونی شدت بیماری‌زایی استرین‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان

نگین طاهری[۱]، غلام خداکرمیان[۲]

۱، ۲– دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

مسئول مکاتبات: غلام خداکرمیان، ایمیل: khodakaramian@basu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۲ ۱۴۸–۱۳۵(۱)۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

چکیده

بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی ناشی از *Ralstonia solanacearum* یکی از بیماری‌های زیانبار در استان همدان است. تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی مهمترین عامل بیماریزایی این باکتری است. برای بررسی ناهمگونی شدت بیماریزایی استرین‌های بیماریز، نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی از مناطق سیب‌زمینی کاری گردآوری شد. در آزمایشگاه از نمونه‌های آلوده استرین‌های باکتری روی محیط کشت نوترینت آگار(NA) دارای تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) جداسازی شد. غربالگری باکتری‌های جدا شده بر پایه ظاهر کلنی، واکنش فوق حساسیت روی توتون و فعالیت تیروزینازی انجام شد و تعداد ۶۳ استرین باکتریایی برگزیده و ویژگی‌های فنوتیپی مهم آن‌ها بررسی شد. برای برگزیدن نماینده‌های استرین‌های باکتریایی در پژوهش گلخانه‌ای، واکنش فوق حساسیت روی توتون و بیماری زایی روی سیب زمینی و شمعدانی برای همه استرین‌ها بررسی شد. سپس الگوی پروتئین‌های محلول سلولی الکتروفورز شده استرین‌ها در ژل پلی اکریل آمید بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشتر استرین‌ها روی توتون واکنش فوق حساسیت نشان داده و روی سیب‌زمینی و شمعدانی بیماری زا بودند و الگوی پروتئینی نسبتا یکسانی داشتند. در آزمایشی جداگانه استرین‌های باکتریایی بر پایه شدت بیماری زایی روی برگ شمعدانی گروه بندی و داده های به دست آمده با نرم افزار SAS آنالیز شد. سرانجام بر پایه ویژگی‌های ظاهری و فنوتیپی، الگوی پروتئین های محلول سلولی الکتروفورز شده، بیماری زایی در شمعدانی و واکنش فوق حساسیت روی توتون، تعداد ۱۰ استرین نماینده برای بررسی ناهمگونی شدت بیماریزایی روی سیب زمینی و گوجه فرنگی در گلخانه برگزیده شدند. در شرایط گلخانه بیماریزایی استرین‌های برگزیده روی سیب زمینی و گوجه فرنگی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بررسی شد. نتایج نشان داد که استرین های به کار گرفته شده از نظر شدت بیماری زایی در هر دو گیاه سیب زمینی و گوجه فرنگی ناهمگون بوده و تفاوت معنی‌دار داشتند. استرین‌های آزمایش شده بر پایه تاثیر روی ویژگی‌های رشد مانند اپی‌ناستی، وزن بوته، وزن تر و خشک اندام بالایی و ریشه در مواردی تا پنج گروه آماری بودند. این یافته مهم می‌تواند دیدگاه ما را در مورد مدیریت کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی این دو محصول بسیار مهم بر پایه استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل و کنترل تلفیقی روشن تر نموده و دریچه نوینی را به روی ما بگشاید و در کنترل کارآمد بیماری به ما کمک کند.

واژه‌های کلیدی: اپی ناستی، *R. solanacearum*، پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی، پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی، شمعدانی

مقدمه

پژمردگی باکتریایی نخستین باردر پایان قرن نوزدهم در مناطق نیمه‌گرمسیری درگیاهان گوجه‌فرنگی، سیب زمینی و تنباکو دیده شد (Janse,2012). عامل بیماری نخستین بار توسط دانشمندآمریکایی اروین اف اسمیت (Smith,1896) تحت عنوان *Bacillus solanacearum* شناسایی و گزارش گردید. نامگذاری پاتوژن از زمانی به زمان دیگر تغییر کرد و امروزه تحت عنوان *Ralstonia solanacearum* شناخته می‌شود (Yabuuchi *et al.*,1995). این بیماری دومین بیماری مهم سیب‌زمینی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پس از بلایت دیررس است (Muthoni *et al.*,2014). این باکتری می‌تواند در بیش از ۲۵۰گونه از ۵۰ خانواده گیاهی و درگیاهان تک‌لپه، دولپه،گیاهان یکساله و همچنین در درختان بیماری ایجاد کند (Hayward,1994). در ایران نخستین بار توسط بهار و دانش با علائم سبزخشکی و پژمردگی از مزارع استان‌های اصفهان و چهار محال و بختیاری گزارش شد و با جداسازی باکتری از گیاهان دارای علائم با انجام آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی عامل بیماری بیووار دو و نژاد سه تشخیص داده شد (Bahar & Danesh.,1368). اکنون این بیماری در بیشتر سیب‌زمینی کاری‌های ایران وجود دارد و یکی از عوامل محدودکننده کشت این محصول است. هنگامی که *R. solanacearum* ریشه‌های میزبان‌های طبیعی را توسط ترشحات گیاهی حس می‌کند از طریق ناحیه رشد ریشه، زخم‌های ریشه و یا نقاط ظهور ریشه‌های ثانویه به میزبان نفوذ می‌کند و به فضای بین سلولی بافت کورتکس ریشه (آپوپلاست) و پارانشیم آوندی راه می‌یابد. سپس باکتری در آوند چوبی تکثیر یافته و به سرعت در سیستم آوندی گیاه پخش می‌شود، سرعت حرکت باکتری بستگی به بخشی از گیاه دارد که توسط باکتری کلنیزه می‌شود (Kiba *et al.*,2007). در نهایت باکتری به اندام‌های هوایی گیاه می‌رسد و باعث علائم پژمردگی، توقف رشد و در نهایت مرگ گیاه می‌شود.

باکتری برای پیشرفت در بافت‌های گیاهی از مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زایی استفاده می‌کند عامل اصلی بیماری‌زایی در بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی دیگر سیستم ترشحی نوع سه (T3SS) است (kao *et al.*, 1991). یکی از عوامل کلیدی تعیین‌کننده بیماری‌زایی *R. solanacearum* پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS) هستند که منجر به گرفتگی آوند چوبی می‌شوند و همچنین می‌توانند به آوند چوبی متصل شوند و از باکتری در برابر دفاع گیاه محافظت کنند، این پلی ساکاریدهای خارج سلولی به صورت یک کپسول یا لعاب اطراف سلول باکتری را گرفته و از راه مسدود کردن بافت‌های آوندی در انتقال آب و املاح در گیاه دخالت می‌کنند (Kao *et al.*, 1991). پلی ساکارید خارج سلولی به صورت لعاب اطراف سلول باکتری را احاطه کرده است و این پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا موجب ایجاد علائم اولیه یعنی پژمردگی در برگ های انتهایی گیاه می‌شود. با پیشرفت بیماری ممکن است تغییر رنگ قهوه ای در ساقه تا دو و نیم سانتی‌متر یا بیشتر از سطح خاک ایجاد شده و برگ‌ها نیز به رنگ برنزه تغییر یافته و سبز خشک می‌شود. علاوه بر این اپی–ناستی دمبرگ نیز ممکن است رخ بدهد (April *et al.*, 2019). علاوه بر این سیستم ترشحی عمومی نوع دو فاکتورهای بیماری‌زای مهمی از جمله آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی را به آپوپلاست ترشح می‌کند. این آنزیم‌ها که بتا یک وچهار اندوگلوکوناز، اگزو پلیگالاکتوناز، بتا یک و چهار سلوبیوهیدرولاز و پکتین متیل استراز هستند، برای کلونیزاسیون گیاه توسط *R. solanacearum* مهم هستند (Huang *et al.*, 1997). باکتری *R. solanacearum* توانایی ترشح هورمون‌های گیاهی مانند سیتوکینین، اتیلن و اکسین را دارد (Hosseinzadeh *et al.*, 2013). این باکتری غلظت IAA را در گیاه بیمار تا صد برابر افزایش می‌دهد و سرانجام با تأثیر بر مواد گیاهی باعث تُرد شدن آن و در نهایت باعث شتاب عملکرد مواد تجزیه‌کننده دیواره سلولی می‌شود (Agrios .,2005).

همچنین این باکتری با بالابردن سطح اکسیژن تنفس بافتی را افزایش می‌دهد. به دلیل اهمیت اقتصادی سیب زمینی و زیان بالای بیماری، پژوهش‌هایی برای بررسی ناهمگونی شدت بیماری زایی استرین های *R. solanacearum* صورت گرفته است. هونگ و همکاران (Hong *et al.*, 2012) آزمون

بیماری‌زایی باکتری *R. solanacearum* را روی گیاه گوجه فرنگی انجام دادند. با توجه به اینکه تمامی شرایط اعم از میزان غلظت تزریق شده، شرایط نگه‌داری گیاه، سن گیاه و مقدار مواد غذایی در دسترس گیاه یکسان بود اما تمامی بوته‌ها با اختلاف زمانی علائم پژمردگی را بروز دادند و نتایج این آزمون بیانگر این بود که عواملی از قبیل پلی ساکارید های خارج سلولی به دلیل متفاوت بودن آن ها در استرین ها سبب تغییر در شدت بیماری زایی می شود. هوریتا و همکاران (Horita *et al*., 2000) صفت پژمردگی را برای استرین‌های *R. solanacearum* جدا شده از ژاپن را روی گیاهان گوجه فرنگی، بادمجان و سیب زمینی بررسی کردند و بر پایه شدت بروز علائم استرین های باکتریایی را در چهار گروه قرار دادند. لی و همکاران (Li *et al*.,2016) به بررسی پژمردگی باکتریایی ناشی از *R. solanacearum* که مهمترین بیماری توتون و تنباکو (Nicotiana tabacum) در چین است پرداختند. در این پژوهش، ۸۹ استرین از چهار منطقه تولید تنباکو در چین جمع آوری شد. استرین ها به عنوان فیلوتیپ I شناسایی شدند و بر پایه پلی مورفیسم در ژن اندوگلوکاناز (egl) به هفت گروه تقسیم شدند. بیماری زایی ۲۷ استرین نماینده با تلقیح روی سه رقم توتون با حساسیت های مختلف بررسی شد که به پاتوتیپ‌های مختلف بر پایه شدت بیماریزایی طبقه بندی شدند. خیری و همکاران (Khairy *et al*.,2021) به منظور شناسایی بیمارگرهای باکتریایی و انتخاب ارقام مقاوم و جلوگیری از کاهش ارزش صادرات سیب زمینی مصر به بررسی غده‌های سیب زمینی صادراتی پرداختند. بر پایه این پژوهش پنج استرین از باکتری *R.solanacearum* شناسایی شد و به این نتیجه رسیدند که استرین RS5 کمترین درصد کاهش بروز بیماری را در سه رقم سیب زمینی آزمایش شده نشان می‌دهد. لیلیام گوتارا و همکاران (Gutarra *et al*., 2017)، در طی پژوهشی در پرو ۲۵ استرین از باکتری *R. solanacearum* که نماینده گروه‌های مختلف بودند را بررسی کردند و به آزمایش‌های بیماری‌زایی با استفاده از گیاهان مختلف سولاناسه پرداختند. بیشتر این استرین‌ها از سیب زمینی منشاء می‌گرفتند، زیرا ۵۰ تا ۱۰۰ درصد گیاهان سیب‌زمینی علائم پژمردگی نشان دادند. تقریباً همه استرین‌ها به صورت نهفته در گوجه‌فرنگی و بادمجان وجود داشتند. تنباکو کمترین تأثیر را از استرین‌ها داشت. تنها دو استرین متعلق به فیلوتیپ IIA (CIP–426) و (CIP–130) باعث پژمردگی در همه میزبان‌های آزمایشی شدند. به نظر می‌رسید فیلوتیپ IIA برای آلوده کردن تنباکو سازگارتر از استرین‌های فیلوتیپ IIB بوده زیرا تقریباً تمام استرین‌های IIA ناشی از این گیاه هستند. استرین‌های IIB–1 و IIB–2 روی سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و بادمجان بسیار تهاجمی بودند. نصرت احمد و همکاران (Ahmed *et al*., 2013) در یک پژوهش به بررسی برخی از مناطق کشت سیب‌زمینی در بنگلادش برای اطلاع از پژمردگی باکتریایی سیب زمینی ناشی از *R. solanacearum* از نظر بروز و شدت بیماری ناشی از آن پرداختند و ۴۴ استرین باکتری ازگیاهان سیب‌زمینی پژمرده بدست آوردند که سه گروه بودند. در این پژوهش تولید رنگ صورتی یا قرمز روشن با حاشیه مایل به سفید در محیط کشت داری تترازولویم کلراید (TZC) توسط استرین‌های باکتریایی نشان داد که تمامی گروه‌ها بیماریزای قوی بودند و نتایج آزمون بیماری زایی بیانگر این بود که تمامی گروه‌ها قادر به ایجاد علائم پژمردگی در گیاه و علائم پوسیدگی در غده سیب زمینی بودند. امروزه باکتری *R. solanacearum* یکی از عوامل محدود کنندهٔ کشت سیب زمینی به شمار می‌رود و همچنین بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی از مشکلات اصلی سیب زمینی‌کاری های استان همدان است که در بیشتر سیب‌زمینی کاری‌های این استان به صورت آشکار و نهان گسترش یافته است. هدف از انجام این پژوهش بررسی وجود ناهمگونی در شدت بیماریزایی استرین‌های *R. solanacearum* بیماری‌زای سیب‌زمینی در استان همدان است تا چشم‌اندازی روشنتر برای بهبود مدیریت کنترل بیماری با کاربرد روش‌های کنترل پیش پای کشاورزان قرار دهد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و نگهداری استرین های باکتریایی

در پاییز سال ۱۴۰۰ از غده‌های سیب‌زمینی مشکوک به آلودگی به باکتری *R. solanacearum* استان همدان شامل بخش بهار، لاله جین و قروه روی رقم آگریا نمونه‌برداری شد. پس از ضدعفونی سطحی غده‌ها با الکل ۷۰٪، برش داده شدند و به روش هایوارد و فهی (Hayward & Fahy.,1983) از محل لایه زاینده آوندها با لوپ استریل روی محیط کشت نوترینت آگار دارای تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) کشت داده شدند. تشتک‌های پتری کشت شده به مدت دو تا سه روز در انکوباتور با دمای ۳۰–۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس تیپ کلنی‌های *R. solanacearum* روی همان محیط خالص شدند. نگهداری استرین‌های جدا شده به سه روش کوتاه مدت (روی محیط کشت NA)، میان مدت (در آب مقطر استریل) و بلند مدت (در گلیسرول ۱۰٪ درون فریزر 20^{c} –) صورت گرفت.

غربالگری و بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتریایی

غربالگری نخستین باکتری‌های جدا شده بر پایه ظاهر کلنی روی محیط کشت TTC، واکنش فوق حساسیت روی توتون و فعالیت تیروزینازی انجام شد. بیماریزایی باکتری روی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی با افزودن سوسپانسیون باکتری (چگالی نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در خاک گلدان و کاشتن گیاه اثبات شد. بر پایه غربالگری فنوتیپی و آزمون بیماریزایی، تعداد ۶۳ استرین باکتریایی برگزیده و ویژگی‌های فنوتیپی مهم آن‌ها به روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی (Schaad *et al*., 2001) بررسی شد. سپس الگوی پروتئین‌های محلول سلولی الکتروفورز شده استرین‌ها در ژل پلی اکریل آمید به روش ناپیوسته لملی بررسی شد. هم‌چنین بر پایه اندازه‌گیری میزان آب سوختگی ناشی از تزریق سوسپانسیون استرین‌ها با چگالی نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی برگ شمعدانی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی و آنالیز داده‌ها با نرم افزار SAS گروه‌بندی اولیه استرین‌ها انجام شد.

بررسی ناهمگونی شدت بیماری زایی در میان استرین‌های برگزیده در شرایط گلخانه روی سیب زمینی و گوجه فرنگی

برای آزمایش‌های گلخانه‌ای، مخلوطی از خاک باغچه، ماسه و کود حیوانی پوسیده به نسبت ۱:۲:۲ به کار برده شد. مخلوط خاک بالا به مدت ۴۰ دقیقه در رطوبت و دمای ۷۰ درجه سلسیوس پاستوریزه شد. تعداد ۳۳ گلدان دو کیلویی برای کاشت سیب زمینی و ۳۳ گلدان برای کاشت گوجه‌فرنگی شسته و ضدعفونی شدند و سپس به مقدار مساوی از خاک پر شدند. غده‌های بذری سیب‌زمینی رقم آگریا و بذر گوجه‌فرنگی از مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان همدان تهیه شد. برای شکستن دوره خواب غده‌های سیب‌زمینی تهیه شده غده‌ها حدود دو هفته در مکان تاریک و سرد نگهداری شدند. بذرهای گوجه‌فرنگی در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی حدود ۷۰٪ درون سینی‌های نشاء در گلخانه کاشته شدند و پس از گذشت یک ماه در مرحله پنج تا شش برگی برای آزمایش به کار برده شدند. از کشت ۴۸ ساعته ده استرین باکتری که بر پایه غربالگری اولیه، فنوتیپ، الگوی پروتئینی و شدت بیماریزایی روی‌شمعدانی برگزیده شده بودند، سوسپانسیون با OD= ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. در هر دو گیاه سیب زمینی و گوجه‌فرنگی سوسپانسیون استرین‌های باکتری برگزیده به دو صورت آغشته سازی غده و ریشه و افزودن به خاک صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد و آب مقطر استریل به عنوان تیمار کنترل به کار برده شد. برای ارزیابی تفاوت در شدت بیماری‌زایی استرین‌های باکتریایی، فاکتورهای اپی‌ناستی، شادابی، پژمردگی امتیازدهی (جدول‌های ۱ تا ۳) و وزن بوته اندازه گیری و ثبت شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS آنالیز و گروه‌بندی میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای انجام شد.

جدول۱– شاخص اندازه‌گیری صفت اپی‌ناستی در گیاهان سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Ralstonia solanacearum* جدا شده از استان همدان.

Table 1. Measuring index of epinasty trait in potato and tomato plants infected with Ralstonia solanacearum bacteria isolated from Hamedan province.

Description of symptoms	Scale
No symptoms	1
In the upper leaves	2
In 2–3 leaves	3
In 4 leaves or more	4
dead (completely withered)	5

جدول ۲– شاخص اندازه‌گیری صفت شادابی درگیاهان سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Ralstonia solanacearum* جدا شده از استان همدان.

Table 2. Measurement index of freshness trait in potato and tomato plants infected with Ralstonia solanacearum bacteria isolated from Hamadan province.

Description of symptoms	Scale
weak	1
average	2
good	3
very good	4
great	5

جدول۳– شاخص اندازه‌گیری صفت پژمردگی در گیاهان سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Ralstonia solanacearum* جدا شده از استان همدان.

Table 3. Measurement index of wilting trait in potato and tomato plants infected with Ralstonia solanacearum bacteria isolated from Hamadan province.

Description of symptoms	Scale
no wilting (witness)	1
weak	2
average	3
good	4
dead (completely withered)	5

نتایج و بحث

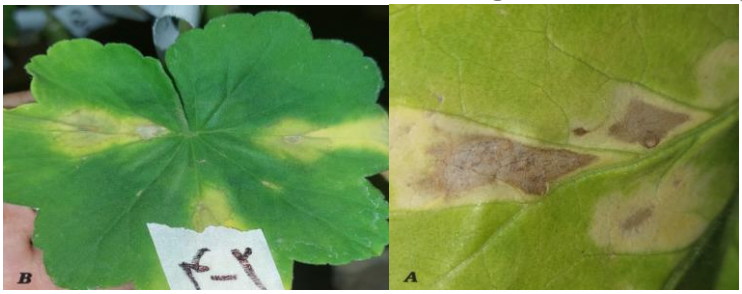
جداسازی و خالص‌سازی

کلنی استرین‌های باکتریایی جداسازی شده روی محیط تری فنیل تترازولیوم کلراید به صورت گرد ،نامنظم و سیال با مرکزیت صورتی و هاله سفید و روی محیط نوترینت آگار کروی شکل و کرم رنگ بودند، کلنی‌های از نظر شکل ظاهری، شدت قرمزی رنگ، سرعت رشد و میزان لعاب دارای تفاوت‌هایی بودند که بر پایه این ویژگی‌ها گروه‌بندی شدند.

آزمون فوق حساسیت (HR) در برگ‌های توتون و بیماری‌زایی در شمعدانی

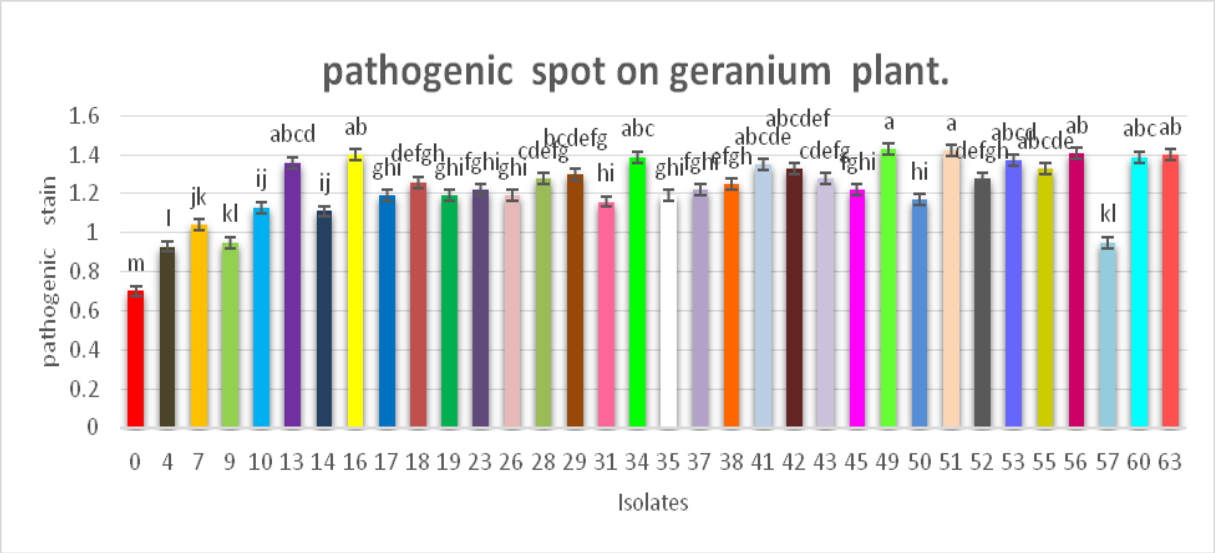
از آنجا که بیشتر باکتری‌های بیماریزای گیاهی روی نامیزبان فوق حساسیت ایجاد می‌کنند (Klement *et al*., 1990)، آزمون فوق حساسیت در برگ‌های توتون و بیماری‌زایی در شمعدانی انجام شد و نتایج پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیشتر باکتری‌های جدا شده از غده‌های سیب زمینی همدان (۴۸ استرین از ۶۳ استرین) قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در گیاه توتون

و بیماری‌زایی روی گیاه شمعدانی بودند (شکل ۱) آنالیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری میانگین لکه‌های آب سوخته ایجاد شده ناشی از تزریق سوسپانسیون استرین‌های باکتریایی روی برگ شمعدانی با نرم افزارSAS و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی نشان داد که تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بودند و در سطح یک درصد به پنج گروه تقسیم شدند (شکل۲).



شکل ۱– آزمون فوق حساسیت در گیاهان توتون (سمت راست) و بیماریزایی روی برگ شمعدانی (سمت چپ) ناشی از تزریق سوسپانسیون استرین‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی در استان همدان.

Fig. 1. Hypersensitivity test in tobacco plants (right side) and pathogenicity on geranium leaves (left side) caused by injection of the suspension of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from Hamadan potato tubers.



شکل۲– میانگین لکه‌های ناشی از تزریق سوسپانسیون استرین‌های *Ralstonia solanacearum* به گیاه شمعدانی.

Fig. 2. The average spots caused by injecting a suspension of *Ralstonia solanacearum* strains into the geranium plant.

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی در ژل پلی اکریل آمید (SDS–PAGE)

الگوی پروتئینی استرین‌های جداشده در سه ژل متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند و از استرین‌هایی که الگوی پروتئینی یکسانی داشتند یک نماینده برگزیده شد که سرانجام بر اساس الگوی پروتئین‌های محلول سلولی الکتروفورز شده استرین‌ها در ژل پلی اکریل آمید به روش ناپیوسته هفت گروه شناسایی شدند.

ویژگی های فنوتیپی استرین‌ها

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های مورد مطالعه بر اساس کلیدهای باکتری‌شناسی برگیس و شاد (Schaad *et al.*, 2001) نشان داد که تمامی استرین‌ها متعلق به گونه

Ralstonia solanacearum هستند (جدول ۴) و در نهایت با توجه به آزمون‌های بیماری‌زایی به عنوان نژاد سه و بیو وار دو تشخیص داده شدند.

جدول ۴– ویژگی های فنوتیپی استرین‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب زمینی همدان.

Table 1. Phenotypic characteristics of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from Hamedan potato tubers.

Test	Number and reaction of strains.									
	NT10	NT15	NT19	NT23	NT50	NT52	NT53	NT57	NT58	NT60
oxidase	- -	+	+	–	+	+	+	+	+	+
KOH	- -	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
starch	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
O/F	aerobics									
Growth at 41 degrees Celsius	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–
salt 2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
salt 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
salt 5%	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–
salt 7%	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	–	+	+	–	+	+	+	+	+	–
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Slobbies	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L–arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

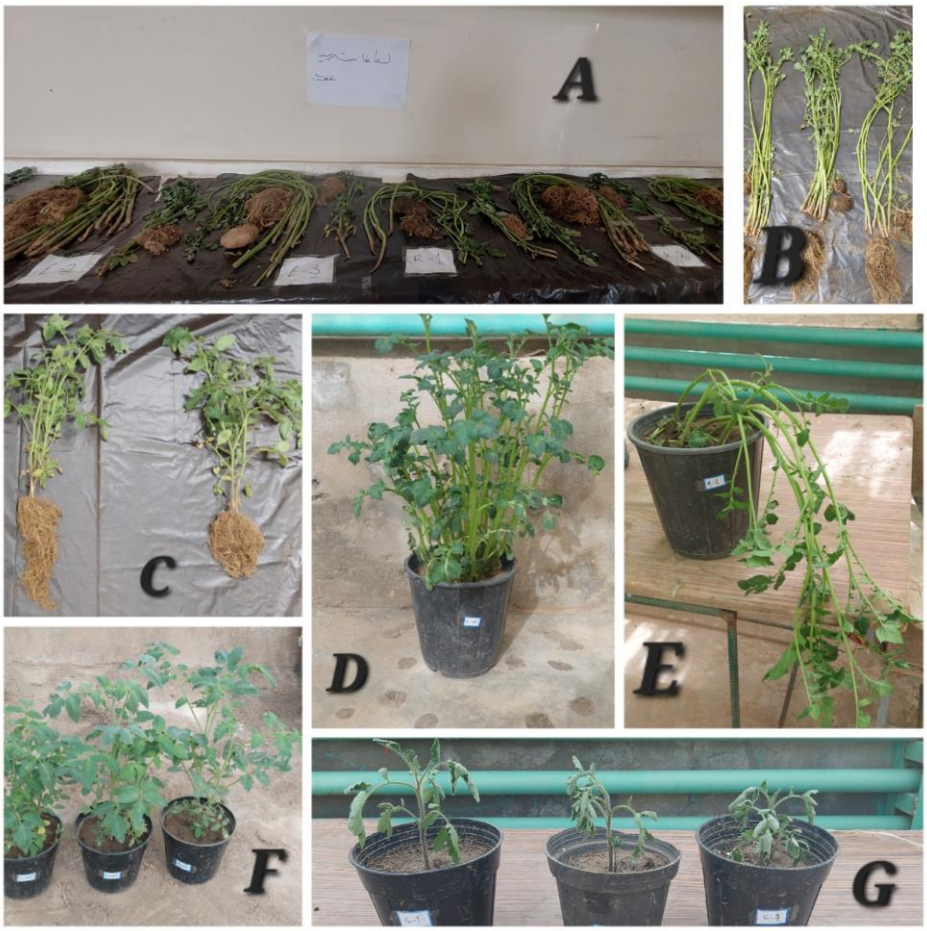
گروه‌بندی نهایی استرین‌ها

در نهایت بر پایه تفاوت ظاهری استرین‌های باکتریایی (شکل، رنگ و سرعت رشد)، نتایج بررسی ویژگی‌های فنوتیپی، نتایج گروه‌بندی استرین‌ها بر پایه الگوی پروتئین‌های محلول سلولی الکتروفورز شده و گروه‌بندی واکنش فوق حساسیت در توتون و بیماری‌زایی در شمعدانی تعداد ۱۰ استرین برای بررسی بیشتر برگزیده شدند.

نتایج ارزیابی تفاوت در بیماری‌زایی و بررسی شدت بیماری

نتایج بررسی تفاوت در بیماری‌زایی استرین‌های برگزیده در شرایط گلخانه پس از گذشت یک هفته از آغشته‌سازی گیاهان سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی به سوسپانسیون استرین‌ها (شکل۳) نشان داد که استرین‌های به کار رفته از نظر شدت بیماریزایی در هر دو گیاه سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی ناهمگون بودند و تفاوت معنی‌دار داشتند. بیشترین بیماری‌زایی روی سیب‌زمینی مربوط به استرین NT50 و کمترین مربوط به استرین NT60 بود. بیشترین بیماری¬زایی روی گوجه‌فرنگی مربوط به استرین NT58 و کمترین مربوط به استرین NT57 بود. استرین‌های آزمایش شده بر پایه تاثیر روی ویژگی‌های رشد مانند اپی ناستی، وزن بوته ، وزن تر و خشک اندام بالایی و ریشه در مواردی تا پنج گروه آماری تقسیم‌بندی شدند (نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات استرین¬ها در جدول¬های ۵ تا ۸ و شکل‌های ۴ تا ۱۲ آورده شده است). آزمون‌های انجام شده حاکی از تفاوت بیماری‌زایی در

استرین‌های جدا شده از استان همدان بود این یافته مهم می‌تواند دیدگاه ما را در مورد مدیریت کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی این دو محصول مهم بر پایه استفاده از ارقام مقاوم یا محتمل و کنترل تلفیقی روشن‌تر نموده و دریچه نوینی را روی ما بگشاید و در کنترل کارآمد بیماری به ما کمک کند. 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.



شکل۳– گیاهان سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی آلوده به *Ralstonia solanacearum* (A) گیاهان سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Ralstonia solanacearum* در حال خشک شدن. B و D و E گیاه سیب‌زمینی. C و F و G گیاه گوجه‌فرنگی.

Fig. 3. Potato and tomato plants infected with *Ralstonia solanacearum*. (A) Potato and tomato plants infected with *R. solanacearum* bacteria while drying. B, D, and E potato plants. C, F, and G tomato plants.

جدول ۵– آنالیز واریانس صفات اندازه‌گیری شده در گیاه سیب‌زمینی آلوده شده به باکتری *Ralstonia solanacearum* در گلخانه.

Table 5. Variance analysis of traits measured on potato plants infected with *Ralstonia solanacearum* bacteria in the greenhouse.

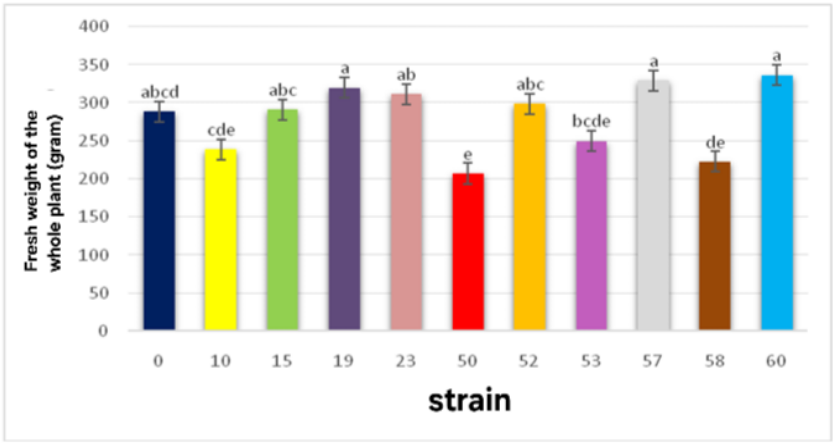
Mean square of different traits																
Stem strength	clawing power	wilting	Freshness	epinasty	Lower body length	Aerial length	Dry weight of the whole plant	Root and tuber dry weight	Stem dry weight	Root dry weight	Fresh weight of the whole plant	Fresh weight of roots and tubers	Stem fresh weight	root fresh weight	Degrees of freedom	Source of change
0/0009^{ns}	0/37^{ns}	0/19^{ns}	0/35^{ns}	0/21^{ns}	1/57^{ns}	56/57^{ns}	114/91^{ns}	0/03^{ns}	0/033^{ns}	0/001^{ns}	3027/76^{ns}	0/03^{ns}	2265/21^{ns}	34/76^{ns}	2	Block
0/21*	0/11^{ns}	0/18^{ns}	0/25^{ns}	0/23*	22/62^{ns}	124/49*	1052/56**	0/08*	0/055**	0/11**	5980/53**	0/044**	2750/16**	808/42**	10	strain
0/07	0/13	0/09	0/14	0/085	10/84	37/61	55/57	0/029	0/011	0/012	1328/82	0/01	659/61	127/82	20	Test error
14/85	20/38	16/61	24/06	15/85	15/33	7/43	17/67	12/28	9/15	10/99	12/96	4/95	13/27	12/82		Coefficient of variation (%)

ns, *and are similarity and dissimilarity respectively at five percent and one percent probability levels**

جدول۶– گروه‌بندی میانگین صفات اندازه‌گیری شده در گیاه سیب‌زمینی آلوده شده به باکتری *Ralstonia solanacearum* در گلخانه.

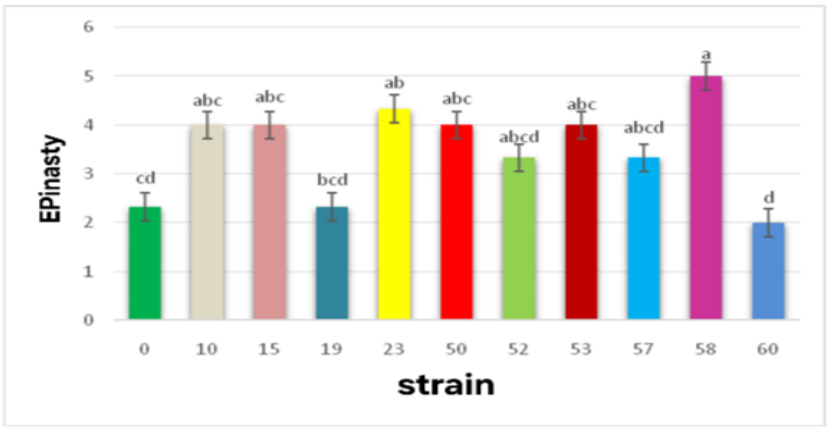
Table 6. Grouping of average traits measured in potato plants infected with *Ralstonia solanacearum* bacteria in greenhouse.

Dry weight of the whole plant	Root and tuber dry weight	Stem dry weight	Root dry weight	Fresh weight of the whole plant	Fresh weight of roots and tubers	Stem fresh weight	root fresh weight	strain
25/33de	20bc	13c	12/67abc	288/67abcd	288/67cd	202/67ab	93ab	0
44c	32/67ab	13/33c	18/67a	238/67cde	152a	224ab	83/67bc	10
38cd	25/33bc	12cd	4/67d	291/33abc	291/33ab	187/33bc	112/33a	15
34/67cd	26/67bc	14/67bc	14ab	320a	72d	193/33ab	105/33ab	19
34/67cd	30/33abc	16/67abc	8bc	311/33ab	121/33abc	208ab	62d	23
20e	14/67c	8d	4/67d	207/33e	87/67cd	140d	65/33cd	50
34/67cd	26/67abc	10/67cd	10bc	298/67abc	150/33a	174/67bcd	71/33cd	52
81/33a	54/67a	14c	8c	250bcde	96bcd	146cd	96/97ab	53
27/33de	15/33c	12cd	12/67abc	329/33a	134/67abc	238/67a	100/67ab	57
60/67b	22/67bc	22/67ab	11bc	222/67de	94bcd	203/33ab	84/67bc	58
63/33b	38ab	24/33a	12bc	336/67a	159/33a	210/67ab	94/67ab	60



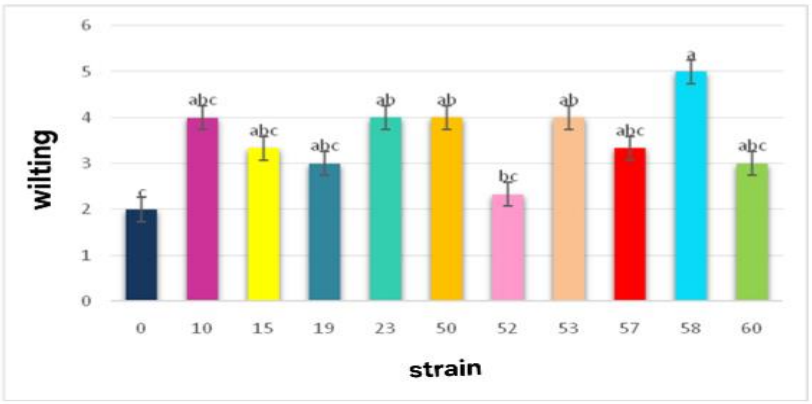
شکل ۴– اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی وزن تر کل بوته گیاه سیب‌زمینی.

Fig. 4. The effect of *Ralstonia solanacearum* bacteria isolated from potato tubers in Hamadan on the fresh weight potato plant.



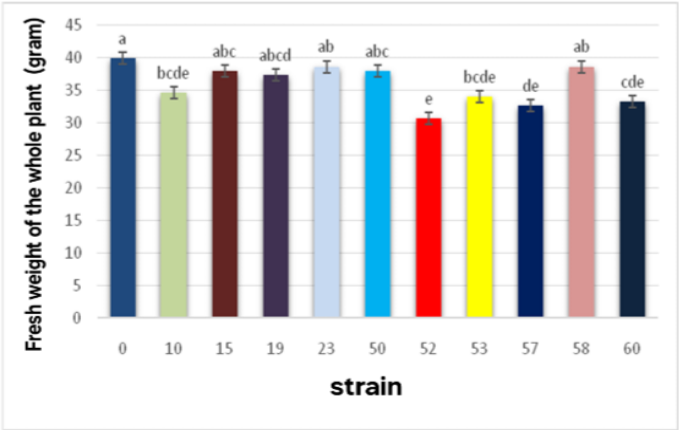
شکل۵–اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی اپی ناستی گیاه سیب‌زمینی.

Fig. 5. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* from potato tubers in Hamedan on potato plant epinasty.



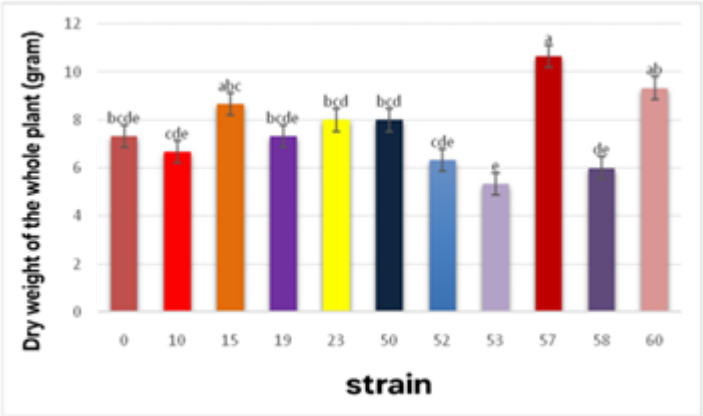
شکل ۶–اثر استرین‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی پژمردگی گیاه سیب‌زمینی.

Fig. 6. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* from potato tubers in Hamedan on potato wilting



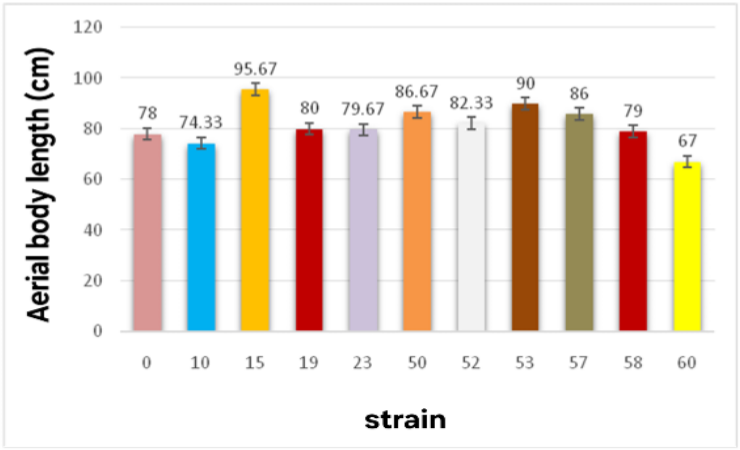
شکل۷– اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی وزن تر گوجه‌فرنگی.

Fig. 7. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* from potato tubers in Hamedan on the fresh weight of tomato plants.



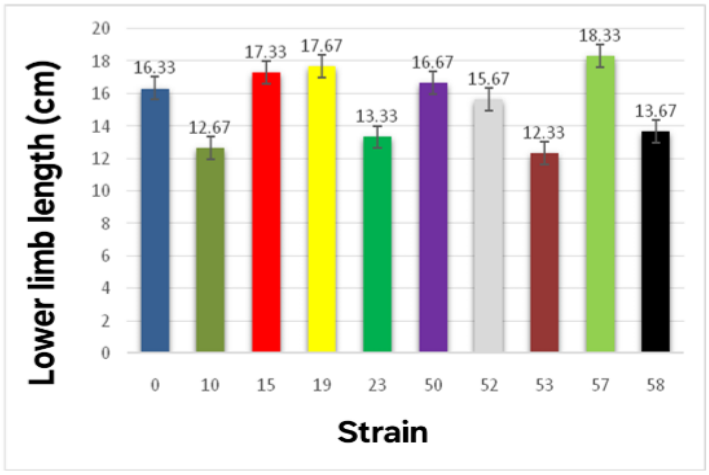
شکل۸– اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی وزن خشک کل بوته گیاه گوجه‌فرنگی.

Fig. 8. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* from potato tubers in Hamedan on the dry weight of tomato plants.



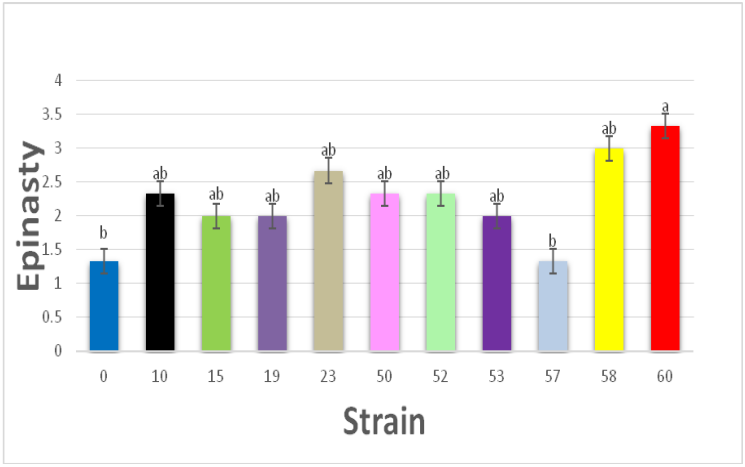
شکل۹– اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی طول ساقه گوجه‌فرنگی.

Fig. 9. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* from potato tubers in Hamedan on stem length of tomato plants.



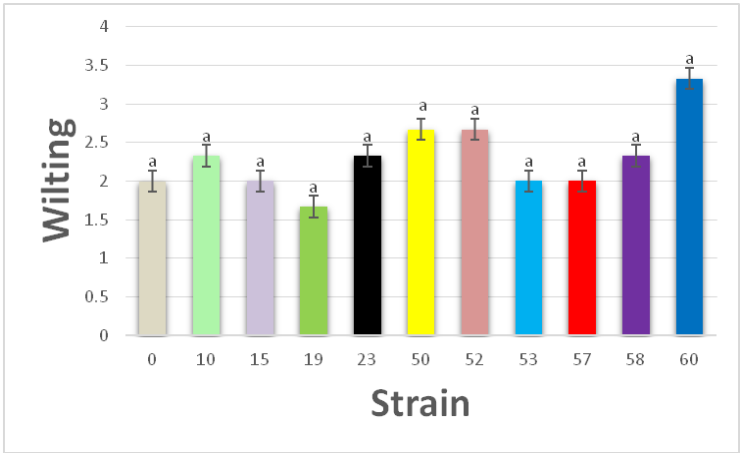
شکل ۱۰– اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی طول ریشه گوجه‌فرنگی.

Fig. 10. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* potato tubers in Hamedan on the root length of of tomato plants.



شکل ۱۱– اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی اپی ناستی گیاه گوجه‌فرنگی.

Fig. 11. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* from potato tubers in Hamedan on tomato plant epinasty.



شکل ۱۲– اثر باکتری‌های *Ralstonia solanacearum* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی همدان روی پژمردگی گیاه گوجه‌فرنگی.

Fig. 12. The effect of isolated *Ralstonia solanacearum* from potato tubers in Hamedan on the wilting of tomato plants.

References

Agrios, G.N. 2005. “Plant Phathology”. Elsevier Academic Prss, PP.922.

Ahmed, N.N., Islam, M.R., Hossain, M.A., Meah, M.B. & Hossain, M.M. 2013. Determination of races and biovars of Ralstonia solanacearum causing bacterial wilt disease of potato. Journal of Agricultural Science, 5(6): 86.

Bahar, M. & Danesh, D. 2017. "Etiology of potato bacterial wilt in Iran". Plant Diseases, 24: 1–12.

Fahy, P.C. & Hayward, A.C. 1983. Media & methods for isolation & diagnostic tests. In Klement, Z., Rudolph, K., Stands, D., C. (eds)."Methods in Phytobacteriology." Akademiai Kiado, Budapest, P. 20–28. Microbiology, 2: 131–141.

Gutarra, L., Herrera, J., Fernandez, E., Kreuze, J. & Lindqvist–Kreuze, H. 2017. Diversity, pathogenicity and current occurrence of bacterial wilt bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. Frontiers in Plant Science, 8: 1221.

Hayward, A.C. & Hartman, G.L. 1991. Bacterial wilt the disease and its causative agent *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International in Association with AVRDC.

Hong, J.C., Norman, D.J., Reed, D.L., Momol, M.T. & Jones, J.B. 2012. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. Phytopathology, 102: 924–936.

Horita, M. & Tsuchiya, K. 2000. “Genetic Diversity of Japanese Strains of *Ralstonia solanacearum*”. The American Phytopathological Society, 91(4): 399–407.

Hosseinzadeh, S., Falahi Charkhabi, N., Rastgo, M. & Hosseinzadeh, A. 2014. "Plant Bacteriology" in Agricultural Education & Extension. Page 346.

Huang, Q. & Allen, C. 1997. "An exo–poly–a–D–galacturonosidase, PehB, is requred for wild–type virulence of *Ralstonia solanacearum*". Journal of Bacteriology, 179: 7369–7378.

Janse, J.D. 2012. Review on brown rot (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, phylotype IIB) epidemiology and control in the Netherlands since 1995: a success story of integrated pest management. Journal of Plant Pathology, 257–272.

Kao, C.C. & Sequeira, L. 1991. "A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of Pseudomonas solanacearum". Journal of Bacteriology, 173: 7841–7848.

Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, D.C. 1990. Methods in phytobacteriology. Akadémiai Kiadó.

Khairy, A.M., Tohamy, M.R., Zayed, M.A. & Ali, M.A. 2021. Detecting pathogenic bacterial wilt disease of potato using biochemical markers and evaluate resistant in some cultivars. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(9): 5193–5203.

Kiba, A., Maimbo, M., Kanda, A., Tomiyama, H., Ohnishi, K. & Hikichi, Y. 2007. Isolation and expression analysis of candidate genes related to *Ralstonia solanacearum*–tobacco interaction. Plant Biotechnology, 24(4): 409–416.

Li, Y., Feng, J., Liu, H., Wang, L., Hsiang, T., Li, X. & Huang, J. 2016. Genetic diversity & pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* causing tobacco bacterial wilt in China. Plant Disease, 100(7): 1288–1296.

Muthoni, J., Shimelis, H., Melis, R. & Kinyua, Z.M. 2014. Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al*.) in the tropical highlands. American Journal of Potato Research, 91(2): 215–232.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. "Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria". APS Press, St. Pual, Minnesota, 373 pp.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. & Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two Burkholderia & an Alcaligenes species to Ralstonia gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis1969) comb. nov. Microbiology and Immunology, 39(11): 897–904.

Heterogeneity of pathogenicity of Ralstonia solanacearum strains isolated from potato fields in Hamadan province

Negin Taheri[1], Gholam Khodakaramian[2]

1., 2. M. Sc. student, Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu– Ali Sina University, Hamedan, Iran.
Corresponding author: Gholam Khodakaramian, email: khodakaramian@basu.ac.ir
Received: Jun., 11, 2024 11(1) 135–148 Accepted: Oct., 21, 2024

Abstract
One of the most devastating potato diseases in Hamadan province is bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. The production of extracellular polysaccharide is the most important pathogenic factor of this bacterium. To investigate the heterogeneity of pathogenicity among pathogenic strains of bacteria, plant samples suspected of contamination were collected from the potato growing areas of the province. In the laboratory, bacterial strains of *R. solanacearum* were isolated from infected potato samples on Nutrient Agar (NA) containing tri–phenyl tetrazolium chloride (TTC). Screening of isolated bacteria was done based on colony appearance on TTC culture medium, hypersensitivity reaction on tobacco & tyrosinase activity. A total of 63 bacterial strains were selected & their critical phenotype were characterized. To select representatives of bacterial strains for greenhouse experiment, hypersensitivity reaction on tobacco and pathogenicity on potato and geranium were investigated for all strains. The pattern of bacterial cell soluble proteins electrophoresed in polyacrylamide gel was investigated. Results showed that most of the strains showed hypersensitive reaction on tobacco & they were pathogenic on potato & geranium. In a separate experiment, bacterial strains were grouped based on the severity of pathogenicity on geranium leaves & the obtained data were analyzed with SAS software. Finally, based on the appearance & phenotypic characteristics of bacterial strains, the pattern of electrophoresed cell soluble proteins, pathogenicity in geranium & hypersensitivity reaction on tobacco, 10 representative strains were selected to investigate the heterogeneity of pathogenicity on potato and tomato in greenhouse. In greenhouse conditions, the variation of pathogenicity among the selected strains on potato & tomato was investigated in a randomized complete block design with three replicates. Results showed that the tested strains were heterogeneous in terms of pathogenicity in both potato & tomato plants and showed significant differences. In some cases, tested strains were up to five statistical groups based on the effect on plant growth factors such as epinasty, plant total weight, wet and dry weight of upper parts & roots. This important finding can clarify our point of view on the control of bacterial wilt disease of these two very important products based on the use of resistant or tolerant cultivars & integrated control and open a new window for us to efficient control of the disease.
Keywords: Epinasty; R. solanacearum bacterial wilt of tomato; bacterial wilt of potato; Geranium