آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۶، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۷

بررسی تنوع فنوتیپی و پروتئینی عامل بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی در استان‌های گلستان و آذربایجان غربی*

Phenotypic and protein profile diversity of tomato bacterial canker in Golestan and West Azarbaijan provinces

فهیمه نظری[۱]، غلامرضا نیکنام[۲]، ابوالقاسم قاسمی[۱]، اسماعیل ترابی[۲] و سید محسن تقوی[۳]**

۱- مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

۲- دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۳- دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۵، تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۶)

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی در ایران، اولین بار در سال ۱۳٦۷ از منطقه ارومیه در استان آذربایجان غربی گزارش گردید. این بیماری موجب زخم (شانکر)، پژمردگی و خشکیدگی یک طرفه در بوته و ایجاد لکه روی برگ و میوه شده و در نهایت به زوال کامل گیاه منجر می‌گردد. در طی این تحقیق، ٦٤ جدایه باکتریایی از بوته‌های آلوده گوجه فرنگی مزارع استان آذربایجان غربی و گلستان جداسازی و بررسی گردید. بر اساس مشخصات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و خصوصیات بیماری‌زایی، تمامی جدایه‌ها تحت عنوان *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* شناسایی شدند. در تمامی مراحل شناسایی از نمونه استاندارد *Cmm* (NCPPB382، از آلمان) به عنوان شاهد در آزمون‌ها استفاده گردید. نتایج،

*قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تبریز.

** Corresponding author: fahimehnazari_2003@yahoo.com

بیانگر وجود تفاوت‌های مشخص در توانایی استفاده از منابع مختلف و نقوش الکتروفورتیکی پروتئین محلول سلولی با استفاده از روش SDS-PAGE بود. دندروگرام داده‌های حاصل از خصوصیات بیوشیمیایی و الکتروفورز پروتئین با استفاده از نرم افزار NTSY`S-pc Version 2/02e، روش UPGMA و ضریب جاکارد رسم گردید. تعداد سه گروه با درصد شباهت معادل ۷۷٪ در دندروگرام حاصل از داده‌های بیوشیمیایی و پنج گروه با درصد شباهت معادل ۸٦٪ در دندروگرام حاصل از داده‌های پروتئینی مشخص گردید. نتایج فوق هتروژنی در بین جدایه‌های ایرانی با نمونه استاندارد، هموژنی بین جدایه‌های گلستان و آذربایجان غربی و وجود جمعیت‌های متفاوت در بین جدایه‌های مناطق مختلف را نشان دادند. این اولین گزارش از وجود بیماری شانکر باکتریایی گوجه فرنگی در استان گلستان است.

واژه‌های کلیدی: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*، شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی، ایران، آذربایجان غربی، گلستان.

مقدمه

گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) میزبان تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی از جمله:

Clavibater michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*)
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (*Xcv*)
Ralstonia solanacearum (*Rs*)
Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (*Ecc*)
Pseudomonas syringae pv. *tomato* (*Pst*)

می‌باشد (Jones *et al*., 1991; Bryan, 1933; Gleason *et al*., 1993). از بین این باکتری‌ها *Cmm*، *Xcv* و *Pst* روی میوه گوجه فرنگی ایجاد علائم می‌نمایند (Bryan, 1933; Gleason *et al*., 1993). شانکر باکتریایی گوجه فرنگی برای اولین بار در سال ۱۹۰۹ میلادی، در گلخانه‌ای واقع در ایالت میشیگان آمریکا مشاهده و در همان سال توسط Erwin F. Smith گزارش و در سال ۱۹۱۰ گزارش نهایی در مورد آن به چاپ رسید (Smith, 1910). وی اولین بار این بیمارگر را *Bacterium michiganensis* نامید، که در نهایت بر اساس بررسی‌های انجام شده روی

ترکیبات دیواره سلولی، الکتروفورز پروتئین و مشخصات بیوشیمیایی تحت نام *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* نامیده شد که امروزه نیز مورد قبول بوده و به کار می‌رود (Davis *et al*., 1984). در ایران نیز ادعا می‌شود اولین نشانه‌های این بیماری در سال ۱۳٦۷ در یک مزرعه گوجه فرنگی در حومه شهرستان ارومیه مشاهده شد. این مشاهدات در سال ۱۳۷۲ توسط مزارعی به ثبت رسید (Mazarei., 1993). در سال ۱۳۷٤ بیماری فوق در مزارع مرند، میانه و اطراف تبریز و عجب شیر مشاهده گردید (Mohammadypour, 1988). در سال ۱۳۸۳ عارضه جدیدی با علائم خشکیدگی یک طرفه بوته گوجه فرنگی، رگه‌های قهوه‌ای رنگ روی ساقه و دمبرگ‌ها (شانکر) در مزارع استان گلستان مشاهده گردید. شدت بیماری در بعضی بوته‌ها به حدی بود که گیاه را کاملاً خشک نموده بود. تحقیق حاضر نتایج بررسی‌هایی است که در زمینه جداسازی، شناسایی و بررسی تنوع فنوتیپی و پروتئینی جدایه‌های عامل بیماری شانکر باکتریایی گوجه فرنگی انجام شده است.

روش بررسی

الف- جداسازی، نگهداری استرین‌ها و بررسی خصوصیات فنوتیپی: قطعاتی از برگ، ساقه و میوه‌ها با علائم بیماری شانکر گوجه فرنگی در زیر جریان ملایم آب شستشو داده شد. نمونه‌ها به مدت دو دقیقه در آب مقطر سترون شستشه شده و به هاون چینی سترون حاوی دو تا سه میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل گشته و به خوبی با دسته هاون له و یکنواخت گردیدند. بعد از گذشت پنج تا ده دقیقه یک لوپ از سوسپانسیون حاصل روی تشتک پتری حاوی NA (Nutrient Agar)، NBY (Nutrient Broth Yeast extract) و SCM (Semiselective medium for *C. michiganensis*) مخطط گردید. تشتک‌های حاصل در دمای ۲٦°C نگهداری و پس از پنج تا هفت روز از بین کلنی‌های ظاهر شده، کلنی‌های زرد مایل به نارنجی و به شکل تخم مرغ نیمرو شده از روی محیط NA و NBY و کلنی‌های کرم رنگ مایل به خاکستری از روی محیط SCM انتخاب و روی محیط NA تکثیر شدند (Keleman, 1954; Fatmi & Schaad, 1988; Shirakawa & Sasaki, 1988). به منظور استفاده‌های بعدی، از هر استرین، یک نمونه به آب مقطر سترون انتقال و نمونه‌هایی نیز لیوفیلیز (lyophilize) گردیدند. آزمایش‌های فیزیولوژیکی،

بیوشیمیایی و تغذیه ای باکتری‌های جدا شده بر اساس روش‌های معمول باکتریولوژیکی (Schaad *et al*, 2001) انجام گرفت.

ب- بیماری‌زایی: ابتدا بذور گوجه فرنگی (Early urban) در داخل گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوط سترون رس، ماسه و خاک برگ به نسبت‌های مساوی کاشته شدند. جدایه‌های باکتریایی بر اساس روش Van Steeklenburg (1985) روی محیط NA تکثیر و در دمای ۲٦°C نگهداری گردیدند. بعد از گذشت ۲٤ ساعت، سوسپانسیونی ازجدایه‌های باکتریایی تهیه شد. سپس کدورت سوسپانسیون‌ها (OD) در طول موج ٦۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر در حد ۰/۲-۰/۱ تنظیم شد. این سوسپانسیون حاوی حدود $۱۰^{۹}$ سلول زنده در میلی‌لیتر (cfu/ml) بود. با اسکالپل آغشته به سوسپانسیون فوق دمبرگ اولین برگ‌های حقیقی گیاهان چهار هفته‌ای گوجه فرنگی از نزدیکی ساقه برش داده شد. سپس بوته‌های آلوده گوجه فرنگی در اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۸۰ درصد، حرارت ۲۵°C و تحت شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Van Steekelenburg, 1985) و پس از دو تا پنج هفته میزان و شدت بیماری‌زایی بر اساس مقیاس اندازه‌گیری صفر تا پنج Frosheiser and Barnes (صفر= عدم وجود علائم، ۱= پلاسیده شدن برگ‌ها، ۲= قهوه‌ای رنگ شدن حاشیه برگ‌ها، پیدایش زخم‌های قهوه‌ای مایل به سیاه روی ساقه (شانکر)، ٤= خشکیدگی یک طرفه برگ‌ها، ٥= مرگ گیاه) مورد بررسی قرار گرفت (Frosheiser & Barnes, 1978). بعد از ظهور علائم بیماری، باکتری دوباره از برگ و بوته‌ها جداسازی و چند آزمون اساسی و افتراقی روی آن‌ها انجام شد.

ج- آزمون فوق حساسیت: این آزمون در گیاه لاله عباسی[1] (Four-O'clock) به روش Gitaitis (1990) و در گیاه توتون و شمعدانی به روش Klement *et al*. (1963) و Klement *et al*. (1990) انجام گردید.

د- الکتروفورز پروتئین: جدایه‌ها پس از چهار تا پنج روز رشد روی محیط NA در دمای ۲۸°C-۲۷، در یک میلی‌لیتر بافر NaPBS-EDTA (NaPBS-EDTA: pH=۷/۳، ٤۰/٥ میلی‌لیتر $Na_2HPO4.2H_2O$ ۰/۲ مولار، ۹/٥ میلی‌لیتر $NaH_2PO_4.2H2O$ ۰/۲ مولار، ۸ گرم NaCl، ۱۸/٦ گرم

۱- *Mirrabilis jalapa*

EDTA و ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شده) سوسپانسیون و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند این کار سه بار به منظور کاهش پلی ساکاریدهای خارج سلولی (EPS) باکتریایی تکرار شد. رسوب باکتریایی حاصل از هر نمونه در یک میلی‌لیتر بافر نمونه حل و مقدار ۱۳۵ میکرولیتر از محلول لایزوزایم (محلول ٤ درصد لایزوزایم (وزن به حجم) حل شده در Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷) به آن‌ها افزوده شد. پس از چند ثانیه ورتکس، نمونه‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شدند. به هر کدام از نمونه‌ها، سدیم دو دسیل سولفات (SDS; sodium dodecyl sulfate) با غلظت نهایی ۲۰ درصد اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۹۵°C قرار داده شدند و سپس به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردیدند. الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل ۱۲ درصد پلی آکریلامید (polyacrylamid gel) در سیستم ناپیوسته (discontinuous) به روش Laemmli (1970) انجام گرفت.

ژل در محلول یک در هزار کوماسی بلو (Coomassie blue) در متانول، آب و اسید استیک به نسبت ۱:۵:۵ به مدت دو تا سه ساعت رنگ آمیزی و در همان حلال بدون رنگ به مدت یک تا دو ساعت رنگبری و در محلول اسید استیک ۱۰ درصد نگهداری شد. باندهای پروتئینی رنگ آمیزی شده جدایه‌ها با یکدیگر و نیز با جدایه استاندارد *Cmm* (NCPPB382) اهدائی پروفسور رودولف ایشین لب (آلمان) مقایسه گردیدند (Ausubel *et al*., 1987).

تجزیه خوشه‌ای (کلاستر): تجریه خوشه‌ای یکی از روش‌های آماری چند متغیره است که با استفاده از آن می‌توان یک جامعه ناهمگن را به گروه‌هایی تقسیم نمود، بطوریکه افراد داخل هر گروه از لحاظ مجموعه‌ای از صفات به هم شباهت بیشتری داشته و با افراد سایر گروه‌ها متفاوت باشند. لذا این روش برای تجزیه داده‌هایی که در بین متغیرهای مربوط تا حدودی همبستگی وجود دارد روشی سودمند و بالقوه می‌باشد (Joanna & Eaton 1983). علاوه بر آن تجزیه کلاستر می‌تواند در پیدا کردن گروه‌های واقعی و بررسی آسان‌تر تفاوت‌های بین داده‌ها مفید باشد (Moghadam *et al*., 1984).

به منظور محاسبه فاصله یا تشابه دو خوشه روش‌های متعددی وجود دارد. که کارائی هر کدام از روش‌ها بستگی به نوع مطالعات و زمینه‌های کاربردی دارد. در تحقیقات کشاورزی

معمول‌ترین روش، UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) است که تشابه یا اختلاف ژنتیکی بین ژنوتیپ و گروه، متوسط تشابه یا تفاوت آن ژنوتیپ با سایر ژنوتیپ‌های موجود در گروه می‌باشد (Gerami, 1984).

نتیجه و بحث

همچنین نمونه‌هایی با علائم مشخصه‌ی بیماری از مزارع آذربایجان غربی جمع آوری و به همراه نمونه‌های گلستان تحت بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). سه تا چهار روز پس از کشت سوسپانسیون تهیه شده از قسمت‌های مبتلا، کلنی‌های گرد نامنظم، نسبتاً درشت، محدب، نیمرویی شکل، زرد، شیری و نارنجی رنگ روی محیط NBY و ۷-۶ روز پس از کشت، کلنی‌هایی به قطر ۲-۱ میلی‌متر به رنگ کرم مایل به خاکستری، گرد و آبکی رونده روی محیط SCM ظاهر شدند. تمامی‌جدایه‌ها تحت آزمون بیماری زایی روی گوجه فرنگی‌های چهار هفته‌ای رقم Early urban و واکنش فوق حساسیت روی گیاهان توتون، لاله عباسی و شمعدانی قرار گرفتند که اکثر جدایه‌ها واکنش مثبت نشان دادند.

خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی از قبیل گرم مثبت بودن، هوازی اجباری، تولید اسید در محیط Dye-c از گلوکز، آرابینوز، فروکتوز و سوکروز ولی عدم تولید اسید از آدونیتول، بتا- دی گلوکوزید، دولسیتول، سوربیتول، دکسترین، نشاسته یا گلیکوژن، رافینوز و رایبوز، توانایی استفاده از سیترات و عدم استفاده از فرمات، گالاکترونات، مالونات، اگزالات و تارتارات، عدم احیاء نیترات به نیتریت در شناسایی جنس *Clavibacter* (Fatmi & Schaad, 1988) به کار رفت. رشد مطلوب بر روی آگار مغذی حاوی پنج درصد سوکروز، تولید اسید از فروکتوز و سوکروز ولی نه از دولسیتول، سوربیتول، اینولین یا آلفا- متیل- دی گلوکوزید، استفاده از سیترات و مالات به عنوان تنها منابع کربن و عدم هیدرولیز توئین ۸۰ در تشخیص گونه *C. michiganensis* (Davis *et al*., 1984; Bradbury, 1986; Davis, 1986; Fatmi & Schaad, 1988; Gitaitis, 1990; Van DenBulk *et al*., 1991) استفاده شد.

شکل ۱- علائم بیماری شانکر باکتریایی گوجه فرنگی مشاهده شده در استان‌های گلستان و آذربایجان غربی

Fig. 1- Symptoms of tomato bacterial canker observed in Golestan and west Azarbaijan provinces

منفی بودن واکنش متیل رد، تایروزیناز، لوان و ۳- کتولاکتوز و مثبت بودن واکنش‌های فسفاتاز و لستیناز، توانایی تولید گاز H_2S از پپتون، هیدرولیز ضعیف ژلاتین و توانایی استفاده از نمک‌های استات و سوکسینات به عنوان منابع کربن و عدم استفاده از پروپیونات، تولید اسید از قندهای دی سلوبیوز و دی مانوز و عدم تولید اسید از الکل شش کربنه مانیتول، رشد روی محیط کشت‌های TTC، CNS و آگار غذایی حاوی ٤، ٥ و ٦ درصد کلرور سدیم و تحمل غلظت ۷ درصد نمک طعام در معین کردن زیر گونه *michiganensis* (*C. m.* subsp. *michiganensis*) (Schaad *et al*., 2001; Bradbury, 1986) مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای، جدایه‌ها در سه گروه کلی از هم متمایز شدند که ۷۷ درصد با همدیگر مشابهت داشتند (جدول ۱).

تجزیه خوشه‌ای: گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از برنامه NTSY`S-pc Version 2/02e و با استفاده از روش UPGMA و ضریب Jaccard انجام شد. پس از تعیین میزان شباهت بر اساس ۵۵ خصوصیت فنوتیپی از جمله خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، بدون در نظر گرفتن وزن (Un weighted Pair-Group Method Analysis)، چهار گروه عمده به شرح زیر تشخیص

داده شدند (شکل ۲):

گروه I : این گروه جدایه‌هایی از *Cmm* بودند که از آذربایجان غربی جمع آوری شده بودند و در بین خود نیز تفاوت‌هایی داشتند.

گروه **II**: این گروه شامل جدایه‌هایی بودند که از مناطق مختلف استان‌های آذربایجان غربی و گلستان جمع‌آوری شده بودند و به لحاظ تفاوت در برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی از گروه **I** متمایز بودند و در بین خود نیز در برخی از صفات تفاوت‌هایی نشان می‌دادند. جدایه استاندارد (NCPPB382) نیز در این گروه قرار گرفت.

گروه **III**: این گروه شامل جدایه‌هایی هستند که از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بودند و به لحاظ تفاوت در برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی از دو گروه **I** و **II** دیگر متمایز بودند ولی در بین خود نیز در برخی از صفات فوق دارای تفاوت‌هایی بودند.

جدایه‌های گروه **I** و گروه **II** به ترتیب ۷٦/٦ و ۸۱ درصد و جدایه‌های گروه **III** حدود ۸۰/۵ درصد با جدایه استاندارد تشابه داشتند. جدایه‌های مورد بررسی در این سه گروه از خود حدود ۸۱ درصد شباهت نشان دادند.

همچنین یک جدایه از باکتری *Xanthamonas malvacearum* pv. *axenopodis*، به عنوان out group در این مقایسه به کار رفت که در گروه مستقلی قرار گرفت (**IV**)، (شکل ۲).

الگوی پروتئین جدایه‌ها: از بین ٦۵ جدایه مورد نظر، ۱۵ جدایه بر اساس بیشترین بیماری‌زایی در هر منطقه، انتخاب و نقوش الکتروفورتیکی پروتئین محلول سلولی آن‌ها بررسی شد. به منظور تفکیک باندهای همسان و چند شکلی در الگوهای به دست آمده از معیار حرکت نسبی (Relative factor) یا Rf استفاده شد. به طوری که از ابتدا تا انتهای باند از شماره ۱ تا شماره ۱۰ تقسیم بندی گردیدند، سپس باندها با دقت یک میلی‌متر از هم متمایز شدند. هر باند پروتئینی نماینده وجود حداقل یک ژن می‌باشد، بنابراین اطلاعات SDS-PAGE برای شناخت روابط نسب زایی در بین گونه‌ها مفید واقع می‌شود (Singh *et al*., 1991).

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* جدا شده از گوجه فرنگی مناطق مختلف استان‌های آذربایجان غربی و گلستان

Table 1- Phenotypic characteristics of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates obtained from different tomato growing areas of west Azarbaijan and Golestan provinces

واکنش (Reaction)	Characteristics	خصوصیات
+	Gram reaction	واکنش گرم
−	Motility	تحرک
Y/V	Pigment	رنگ کلنی
−	Oxidase	اکسیداز
O	Oxidative / Fermentative	رشد هوازی / بی هوازی
−	Levan production	تولید لوان
+	Hypersensitive reaction	واکنش فوق حساسیت
+	Catalase	کاتالاز
+	Phosphatase	فسفاتاز
+	Aesculin hydrolysis	هیدرولیز اسکولین
−	Casein hydrolysis	هیدرولیز کازئین
−	Tween 80 hydrolysis	هیدرولیز توئین ۸۰
w	Gelatin hydrolysis	هیدرولیز ژلاتین
+	5%NaCl tolerance	تحمل نمک طعام ۵ درصد
+	6%NaCl tolerance	تحمل نمک طعام ٦ درصد
+	7%NaCl tolerance	تحمل نمک طعام ۷ درصد
−	Nitrate reduction	احیاء نیترات
−	Urease	اوره آز
+	Lecithinase	لستیناز
−	Tyrosinase	تیروزیناز
+	Growth at 35°C	رشد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد
+	Growth on TTC	رشد روی TTC
+	Growth on CNS	رشد روی CNS
+	H_2S formation	تولید H2S از پپتون
−	Indole formation	تولید اندول
−	3-Ketolactose	تولید ۳- کتولاکتوز
−	Methyl red	تولید متیل رد

ادامه‌ی جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* جدا شده از گوجه فرنگی مناطق مختلف استان‌های آذربایجان غربی و گلستان

Table 1 continued- Phenotypic characteristics of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates obtained from different tomato growing areas of west Azarbaijan and Golestan provinces

اثر روی شیر لیتموس‌دار : Action on Litmus milk		
قلیایی	Alkaline	+ (42%)
اسیدی	Acidic	+ (58%)
احیاء لیتموس	Reduction	-
منابع کربنی مورد استفاده	**Carbon Source**	**درصد واکنش Percentage of reaction(+)**
دی گلوکز	D-Glucose	87.4
سوکروز	Sucrose	70
رافینوز	Raffinose	47
دی سلوبیوز	D- Cellobiose	100
ترهالوز	Trehalose	34
دی فروکتوز	D-Fructose	80
دی رایبوز	D-Ribose	10
ملی بیوز	Melibiose	35
دی مانوز	D-Mannose	66
دی آرابینوز	D-Arabinose	58.4
لاکتوز	Lactose	0
دی ملزیتوز	D-Melezitose	64.6
رامنوز	Ramnose	90
مالتوز	Maltose	28
آدنیتول	Adonitol	0
دولسیتول	Dolcitol	0

ادامه‌ی جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* جدا شده از گوجه فرنگی مناطق مختلف استان‌های آذربایجان غربی و گلستان

Table 1 continued- Phenotypic characteristics of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates obtained from different tomato growing areas of west Azarbaijan and Golestan provinces

درصد واکنش Percentage of reaction(+)	Carbon Source	منابع کربنی مورد استفاده
25	Mannitol	مانیتول
0	D-Sorbitol	دی سوربیتول
14	Dextrin	دکسترین
4	Inolin	اینولین
100	Citrate	سیترات
0	Fumarate	فرمات
0	Gluconate	گلوکونات
0	Benzoate	بنزوات
0	Malonate	مالونات
0	Oxalate	اگزالات
0	Galactronate	گالاکترونات
0	Tartarate	تارتارات
90	Acetate	استات
0	Propionate	پروپیونات
100	Succinate	سوکسینات
87.7	Lactate	لاکتات
7	α-methyl D- glucoside	آلفا- متیل دی گلوکوزید

w: ۹۰ تا ۱۰۰٪ جدایه‌ها واکنش مثبت ضعیف نشان داده‌اند.

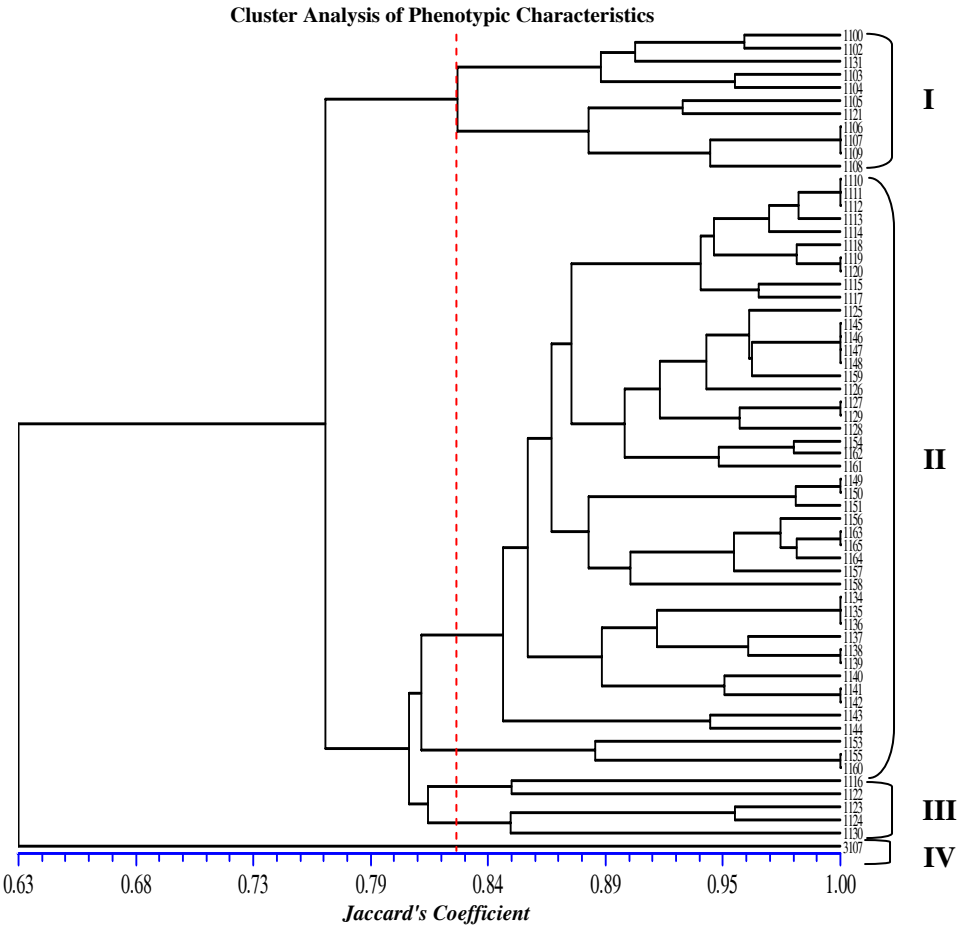
90-100 % of isolates with weak positive reaction.

Y: زرد؛ O: نارنجی؛ V: رنگ‌های متنوع از قبیل: صورتی، قرمز، نارنجی و سفید.

Y: Yellow; O: Orange; V: Various colors such as pink, red, orange and white.

+: ۸۰ تا ۱۰۰٪ جدایه‌ها واکنش مثبت نشان داده‌اند.

80-100 % of isolates with positive reaction.



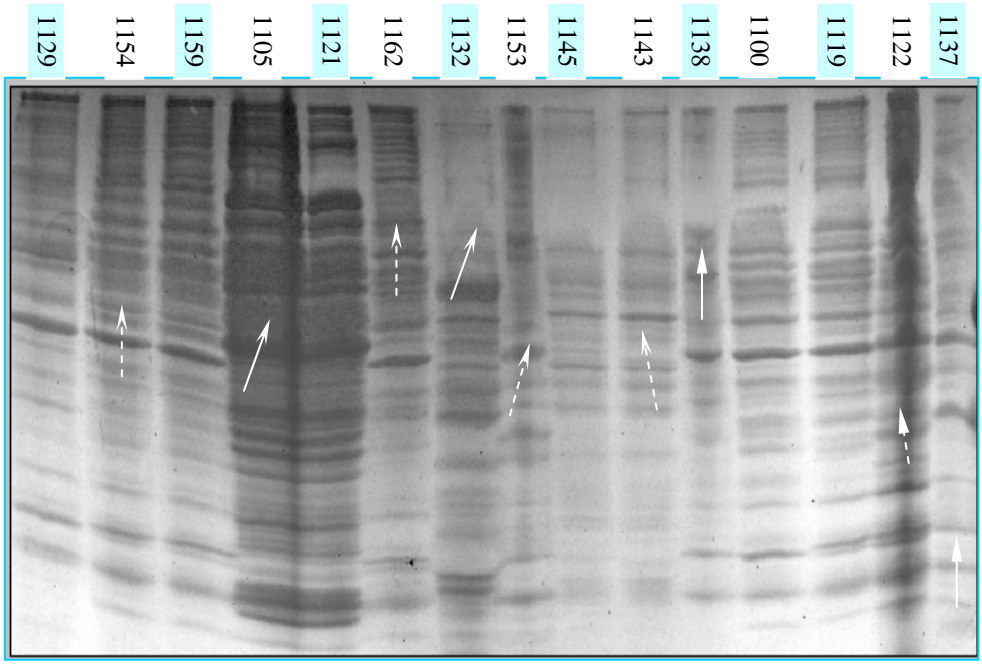
شکل ۲- گروه بندی جدایه‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* عامل شانکر باکتریایی گوجه فرنگی بر اساس مثبت یا منفی بودن واکنش آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی با استفاده از الگوریتم UPGMA (جدایه‌های ۱۱۰۰-۱۱۵۱ از استان آذربایجان غربی، جدایه ۱۱۵۳ از آلمان و جدایه‌های ۱۱۵٤- ۱۱٦٥ از استان گلستان).

Fig. 2- Cluster analysis of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates, causal agent of tomato bacterial canker based on the results of biochemical and physiological test (+ & -) and using UPGMA method. (Isolates 1100-1151 from West Azarbaijan province, isolates 1154-1165 from Golestan province and 1153 from Germany).

جدایه شماره ۱۱۲۹ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸، ۲/۳ و ۵/۵، جدایه‌های ۱۱۵٤ و ۱۱۵۹ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸ و ۵/۵، جدایه‌های ۱۱۰۵ و ۱۱۲۱ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸، ۱/۵ و ۲/۳، جدایه ۱۱٦۲ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸، ۲/۳، ٤/۵ و ۵/۵، جدایه ۱۱۳۲ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸، ۱/۵، ۳، ۳/۲ و ۵/۹، جدایه‌های ۱۱٤۵ و ۱۱٤۳ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸، ۱/۵، ۳ و ۳/۲، جدایه ۱۱۳۸ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸، ۲/۳ و ٤/۵، جدایه‌های ۱۱۰۰و ۱۱۳۷ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸ و ٤/۵ و جدایه‌های ۱۱۱۹ و ۱۱۲۲ در حرکت‌های نسبی معادل ۰/۸، ۲/۳، ٤/۵ و ۵/۵ با جدایه استاندارد NCPPB382 تفاوت نشان دادند (شکل ۳). در بین جدایه‌های گلستان بیشترین تفاوت در حرکت‌های نسبی معادل ۲/۳ و ٤/۵ و جدایه‌های آذربایجان غربی در حرکت‌های نسبی معادل ۱/۵، ٤/۵ و ۵/۵ بود. همچنین جدایه‌های گلستان بیشترین تفاوت را در حرکت نسبی معادل ۱/۵ با جدایه‌های آذربایجان غربی نشان دادند. نتایج الکتروفورز پروتئین سلولی جدایه‌های *Cmm* با استفاده از روش یاد شده تجزیه و به صورت دندروگرام در شکل ٤ نشان داده شد. همان گونه که در شکل دیده می‌شود پنج گروه کلی از نظر نقوش الکتروفورز پروتئین قابل تشخیص می‌باشند.

گروه **I**: جدایه‌های این گروه با یک باند اختلاف، ۹٦ درصد با همدیگر تشابه داشته و دارای ۲ زیر گروه بودند. میزان تشابه این گروه با گروه **III** (جدایه استاندارد NCPPB382) ۹۰ درصد بود.

گروه **II**: جدایه‌های این گروه با یک تا دو باند اختلاف، ۹٤/۸ درصد با همدیگر تشابه داشته و به ۳ زیر گروه تقسیم گردیدند. میزان تشابه این گروه با گروه **III** (جدایه استاندارد) ۹۰ درصد بود.



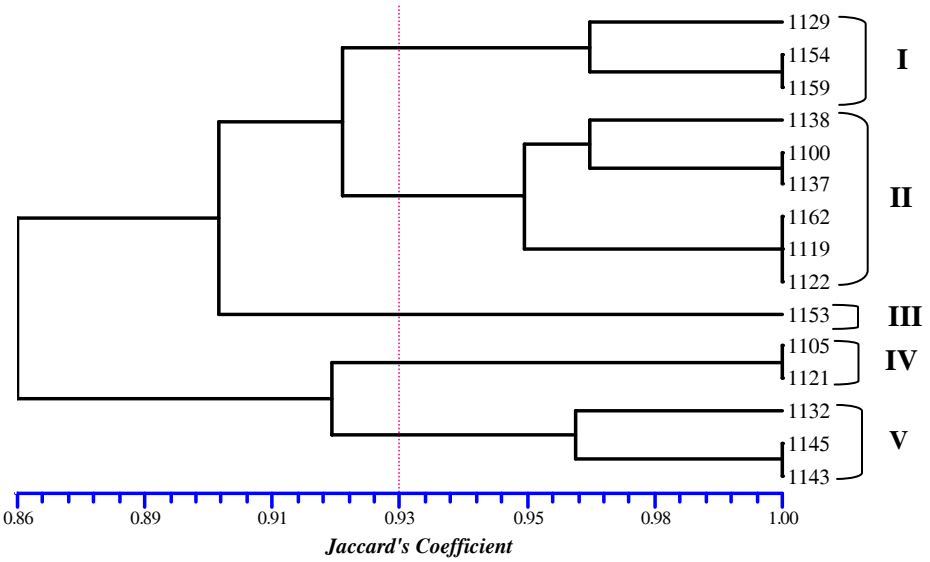
شکل ۳- مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* در ژل پلی اکریلامید (جدایه‌های ۱۱۲۹، ۱۱۰۵، ۱۱۲۱، ۱۱۳۲، ۱۱٤٥، ۱۱٤۳، ۱۱۳۸، ۱۱۰۰، ۱۱۱۹، ۱۱۲۲ و ۱۱۳۷ از استان آذربایجان غربی: ۱۱٥٤، ۱۱٥۹، ۱۱٦۲ از استان گلستان و ۱۱٥۳ (NCPPB382) از آلمان).

Fig. 3- Comparing cell protein electrophoresis of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates on polyacrylamid (Isolates 1129, 1105, 1121, 1142, 1145, 1144, 1148, 1100, 1119, 1122 and 1147 from west Azarbaijan province; 1154, 1159, 1162 from Golestan province and 1153"NCPPB382" from Germany).

گروه **III**: در این گروه جدایه استاندارد از آلمان جای گرفت.

گروه **IV**: جدایه‌های این گروه با ۱۰۰ درصد تشابه در یک گروه مجزا قرار گرفتند. میزان تشابه این گروه با گروه **III** (جدایه استاندارد) ۸٦ درصد بود.

گروه **V**: جدایه‌های این گروه با یک باند اختلاف، با همدیگر ۹٦ درصد تشابه داشته و دارای سه زیر گروه می‌باشند. میزان تشابه این گروه با گروه **III** (جدایه استاندارد) ۸٦ درصد بود.



شکل ٤- گروه بندی جدایه‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* عامل شانکر باکتریایی گوجه فرنگی بر اساس داده‌های نقوش الکتروفورز پروتئینی با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضرایب مختلف فاصله ژنتیکی (۱۱۲۹، ۱۱۰۵، ۱۱۲۱، ۱۱۳۲، ۱۱٤٥، ۱۱٤۳، ۱۱۳۸، ۱۱۰۰، ۱۱۱۹، ۱۱۲۲ و ۱۱۳۷ از استان آذربایجان غربی: ۱۱٥٤، ۱۱٥۹ و ۱۱٦۲ از استان گلستان و ۱۱٥۳ از آلمان).

Fig. 4- Cluster analysis of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates, the causal agent of tomato bacterial canker based on data derived from protein profile, using UPGMA method and different coefficient of genetic distance (Isolates 1129, 1105, 1121, 1132, 1145, 1143, 1138, 1100, 1119, 1122 and 1137 from West Azarbaijan province, 1154, 1159 and 1162 from Golestan province and 1153 from Germany).

بررسی الگوی پروتئین ژنوتیپ‌ها با استفاده از SDS-PAGE نشان داد که الگوی پروتئین ژنوتیپ‌ها در شرایط مختلف یکسان نیست و بیشترین تمایز نمونه‌ها از هم، در باندهای ۰/۸، ۱/۵، ۲/۱، ٤/٥ و ٥/٥ مشاهده شد. الکتروفورز پروتئین با SDS–PAGE در تفکیک زیر گونه‌ها تا حدودی موفق عمل نمود و توانست آن‌ها را در پنج گروه از هم متمایز سازد. بررسی الگوی پروتئین نشان داد که برای برخی از باندها تفاوت در وجود و یا عدم وجود و برای برخی از باندها تفاوت در شدت وجود دارد که این تفاوت در حرکت نسبی معادل ۳/۲ به وضوح قابل تشخیص بود. در واقع رفتار ژنوتیپ‌ها از لحاظ بیان ژن در شرایط و مناطق مختلف ممکن است متفاوت باشد. علاوه بر این، یک سری پروتئین‌های مشابه نیز در همه شرایط وجود داشت. نقوش پروتئینی حاصل، نشانگر تنوع بین جدایه‌ها بود. این تنوع با مقایسه‌های فنوتیپی حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و تغذیه‌ای تا حدودی همخوانی دارد و نتایج حاصل از الکتروفورز pro وجود تنوع در بین جدایه‌ها را تأیید می‌کند. نتایج حاصل از این تحقیق تا حدودی با نتایج محمدی پور مطابقت داشت (Mohammadypour., 1988). در مورد تطابق نتایج حاصل از دندروگرام بیوشیمیایی با دندروگرام پروتئینی تا حد زیادی این انطباق برقرار است به عنوان مثال استرین‌های ۱۱۵۹، ۱۱٥٤ و ۱۱۲۹ در دندروگرام شکل ٤ (پروتئین) در گروه I قرار گرفته‌اند و این استرین‌ها در دندروگرام شکل ۲ (بیوشیمیایی) نیز در یک گروه قرار گرفته‌اند و به صورت پراکنده نیستند (گروه II) که این امر بیانگر انطباق نتایج می‌باشد. همچنین در بین اجزاء گروه IV از دندروگرام پروتئینی با گروه I از دندروگرام بیوشیمیایی این امر دیده می‌شود. در مورد نقش بیماری‌زایی در گروه‌بندی استرین‌ها، لازم به ذکر است که در ترسیم دندروگرام بیوشیمیایی اساساً فاکتور شدت بیماری‌زایی نقشی ندارد زیرا مطابق با سیستم رتبه‌بندی فقط بیماری‌زا بودن یا نبودن یک استرین و نه شدت آن که بصورت صفر و یک بیان می‌گردد قابلیت دخالت در تشکیل دندروگرام را دارد. در مورد دندروگرام پروتئینی نیز سعی شده استرین‌ها با ماکزیمم شدت بیماری‌زایی (نمره ٥ در سیستم رتبه بندی) از هر منطقه جغرافیایی انتخاب شوند. لذا در این دندروگرام نیز تنوع حاصله ارتباطی به تفاوت در شدت بیماری‌زایی ندارد و تمام استرین‌ها دارای شدت بیماری‌زایی حداکثر و یکنواخت هستند. در مورد نقش منطقه جغرافیایی در ایجاد تنوع با توجه به دندروگرام شکل ٤ مشاهده

شد که استرین ۱۱۲۹ که از منطقه خوی در استان آذربایجان غربی جدا شده بود با استرین‌های ۱۱۵۹ و ۱۱٥٤ که از استان گلستان جدا شده‌اند در یک گروه (گروه I) قرار گرفتند و این نشان می‌دهد که احتمالاً آن‌ها منشاء واحد داشته و ممکن است همراه با بذر از یک منطقه به منطقه دیگر رفته باشند. از طرف دیگر استرین‌های دیگر مربوط به آذربایجان غربی در گروه‌های مختلفی از قبیل I، II، IV و V قرار گرفته‌اند که نشان از وجود و ظهور گروه‌های مختلف از استرین‌های باکتری در یک منطقه جغرافیایی است که ممکن است به دلیل موتاسیون در طی سالیان متمادی حاصل شده باشد.

نشانی نگارندگان: مهندس فهیمه نظری و مهندس ابوالقاسم قاسمی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران؛ دکتر غلامرضا نیکنام و مهندس اسماعیل ترابی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ایران؛ دکتر سید محسن تقوی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران.

Appl. Ent. Phytopath.
Vol. 76, No. 1, Sep. 2008

Phenotypic and protein profile diversity of tomato bacterial canker in Golestan and West Azarbaijan Provinces

F. NAZARI[1]*, G. R. NIKNAM[2], A. GHASEMI[1], S. TORABI[2] and S. M. TAGHAVI[3]

1- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran

2- Faculty of Agriculture, Tabriz University

3- Faculty of Agriculture, Shiraz University

ABSTRACT

Tomato Bacterial canker disease, firstly reported in Iran from Urmieh in West Azarbaijan province in 1988. The disease causes lesion (canker), wilting and dryness of plants, leaf and fruit spots and whole plant decline. In this study, about 160 samples of infected plants were collected and sixty-four bacterial isolates were obtained from the infected tomato plants in Golestan and West Azarbaijan during 2004-2005. All isolates identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* based on morphological biochemical characters and pathogenecity test. Isolate *Cmm* (NCPPB382, Germany) was used as standard. Isolates showed considerable differences in using different sources of carbon and in their electrophoretic (SDS-PAGE) profiles of soluble cell proteins. Cluster analysis dendrograms obtained based on information derived from biochemical characters and protein electrophoresis, using software NTSYS-pc version 2/o2e, UPGMA method and Jaccard′s coefficient. Three groups (clusters) with %77 similarity based on biochemical data, 5 groups with %86 similarity based on SDS-PAGE results were realized. The results indicated high correlation and complementarirty. Resultes revealed I) heterogenesis between Iranian isolates and standard *Cmm* (NCPPB382), II) homogenesis between Golestan and West Azarbaijan isolates, and III) presence of different populations (strains) among the isolates selected from different areas. This is the first report of tomato bacterial disease in Golestan provice of Iran.

Key words: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; Bacterial canker of tomato;

---

* Corresponding author: fahimehnazari_2003@yahoo.com

West Azarbaijan, Golestan province.

References

AUSUBEL, M. R., R. E. BRENT, D. D. KINGSTON, J. G. MOORE, J. A. SEIDMAN, SMITH and K. STRUHL, 1987. Current protocols in molecular biology. John Weily Publishing Company.

BRADBURY, J. F. 1986. *Clavibacter* In: Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Insititute, Kew Survey England, pp. 46-52.

BRYAN, M. K. 1933. Studies on bacterial canker of tomato. J. Agric. Res. 41:825-851.

DAVIS, M. J., A. G. GILLAWPIE, A. K. VIDAVER and R. W. HARRIS, 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic corynefrom bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermuda grass stunting disease. Intern. J. Syst. Bacteriol. 34: 107-117.

DAVIS. M. J. 1986. Taxonomy of plant-pathogenic corynefrom bacteria. Ann. Rev. Phytopathology. 24: 115-140.

FATMI, M. and N. W. SCHAAD, 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. Phytopathology. 78: 121-126.

FROSHEISER, FI. and DK. BARNES, 1978. Field reaction of artificially inoculated alfalfa populations to the *fusarium* and bacterial wilt pathogens alone and in combination. Phytopathol. 68: 943-946.

GERAMI, A. 1984. Multi Variation Statistic Method. Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University.

GITAITIS, R. D. 1990. Induction of a hypersensitive like reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Dis. 74: 58-60.

GLEASON, M. L., R. D. GITAITIS. and M. D. RICKER, 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. Plant Dis. 77: 1069-1076.

JOANNA, F. and G. W. EATON, 1983. Application of yield component analysis to crop research. Field Crop abstracts. Vol. 36. No. 10.

JONES, J. B., R. E. STALL and T. A. ZITTER, 1991 (eds). Compendium of tomato Disease. APS Press. pp. 73.

KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology. 44: 693-695.

KLEMENT, Z., K. RUDOLPH and D. C. SANDS, (eds), 1990. Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado and Nyomad Vallalat, Budapest, Hungary. pp. 568.

KLEMENT, Z., G. L. FARKAS and L. LOVREKOVICH, 1963. Hypersensitive Reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology. 54: 474-477.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (lond.). 227: 680-685.

MAZAREI, M., S. ORUMCHI and C. LORA, 1993. Investigation of bacterial canker of tomato in West Azarbaijan, Iran. Proceedings of the 11th Plant Protection Congress of Iran, pp 160.

MOGHADAM, M., S. MOHAMMADY and M. AGHAEEI, 1984. Introducing of Multi Variation Statistic Method. (Translation), First Edition.

MOHAMMADYPOUR, M. 1988. Investigation of bacterial canker of tomato in East Azarbaijan, Iran. Part of M.Sc Thesis. Faculty of Agriculture, Tabriz University.

SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (3rd ed). APS Press, St. Pual, Minnesot. 373 pp.

SHIRAKAWA, T. and T. SASAKI, 1988. A selective medium for isolation of *Corynebaterium michiganense* pv. *michiganense*, the pathogen of tomato bacterial canker disease. Annals of the Phytopatological Society of Japan. 54: 540-543.

SINGH, A. K., K. S. SIVARAMA, M. H. MENGESH and C. D. RAMAIAH, 1991. Phylogenetic relation in section Arachis based on seed protein profile. Theor. Appl. Genet. 82: 593-597.

SMITH, E. F. 1910. A new tomato disease of economic importance. Science (New series). 31: 794-796.

VAN DEN BULK, R. W., L. P. T. M. ZEVENHUIZEN, L. H. G. CORDEWENER, and J. J. M. DONS, 1991. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology. 81: 619-623.

VAN STEEKELENBURG, N. A. M. 1985. Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. Euphytica. 34: 245-250.

Address of the authors: Eng. F. NAZARI and Eng. A. GHASEMI, Department of Plant Pathology, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran 19395, Iran; Dr. G. R. NIKNAM and Eng. S. TORABI, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran; Dr. S. M. TAGHAVI, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran.