مدیریت بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی با سلامت‌سنجی غده‌های بذری

کبری مسلم‌خانی✉ و جواد مظفری

استادیار و استاد مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۰۸

مسلم‌خانی ک. و مظفری ج. ۱۳۹۴. مدیریت بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی با سلامت‌سنجی غده‌های بـذری. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۵(۱): ۷۵-۶۲.

چکیده

باکتری *Ralstonia solanacearum* یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی است که باعث کاهش کمـی و کیفی محصول سیب‌زمینی می‌شود. مبارزه با این باکتری به دلیـل دامنـه میزبـانی گسـترده و نیـز انتشـار وسـیع آن در خاک‌های مناطق مختلف و انتقال آن از طریق آب آبیاری و غده‌هایی که آلودگی پنهان دارند، بسیار مشـکل اسـت. در حال حاضر این باکتری در اکثر نقاط ایران پراکنده شده است و با ایجاد پژمردگی و پوسیدگی قهوه‌ای به عنوان خطری بالقوه، محصول سیب‌زمینی کشور را تهدید می‌کند. تهیه و کاشت غده‌های بذری سالم و گواهی شده موثرترین روش مدیریت بیماری است. مدیریت موفق بیماری، مستلزم داشتن دانش کافی در مورد نحوه‌ی پـراکنش و شـیوع بیمـاری است. در این مقاله ضمن شرح یافته‌های نـوین علمـی در مـورد بیمـاری، روش‌هـای جدیـد ردیـابی بـاکتری بـرای سلامت‌سنجی غده‌های بذری سیب‌زمینی معرفی شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی، سیب‌زمینی، غده، گواهی، *Ralstonia*

مقدمه

سیب‌زمینی یکی از محصولات مهم غذایی و اقتصادی است که در ۷۹ درصد کشورهای جهان کشت می‌شـود و طبق آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO) از نظر تولید پس از گندم، ذرت و برنج در جایگاه چهارم قـرار دارد. کشت و کار سیب‌زمینی در مناطق مختلف به دلیل قابلیت تطابق وسیع با شرایط محیطی امکان‌پذیر بوده و به دلیل دارا بودن مواد غذایی فراوان از جمله پروتیین‌ها، ویتامین‌ها و مـواد معـدنی، مصـرف بسـیار بـالایی در جهـان دارد. طبـق گزارش FAO در سال ۲۰۰۷ سطح زیر کشت سیب‌زمینی در دنیا ۱۹۳۲۷۷۳۱ هکتار بوده و از این سطح ۳۲۵۳۰۲۴۴۵

✉مسئول مکاتبه، پست الکترونیک: Moslemkhani@yahoo.com

تن محصول برداشت شده است. بر اساس آمارنامه کشاورزی کشور سال ۱۳۹۰ سطح کشت سیب‌زمینی کشور حدود ۱۸۶ هزار هکتار و میزان تولید آن حدود ۵.۶ میلیون تن و عملکرد متوسط آن ۳۰ تن در هکتار بوده است. سیب‌زمینی معمولاً به طریقه غیرجنسی با کاشت قطعات غده یا غده کامل تکثیر می‌یابد، این روش تکثیر باعث انتقال بیمارگرهای گیاهی ازسالی به سال دیگر و از یک نقطه به نقطه دیگر می‌شود و زمستان‌گذرانی عوامل بیماریزا را درون غده‌هایی که جهت تکثیر بکار می‌روند، ممکن می‌سازد. از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی که خسارت زیادی ایجاد می‌کند، پژمردگی باکتریایی یا پوسیدگی قهوه‌ای با عامل *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* است که در اکثر مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر شیوع دارد (Elphinstone 2005). خسارت این بیماری در ۸۰ کشور جهان بالغ بر ۹۵۰ میلیون دلار در سال گزارش شده است (Floyd 2007). این بیماری در مواردی باعث کاهش ۵۰ تا ۱۰۰ درصدی محصول شده است. بر اساس وجود رابطه خطی بین وقوع بیماری و میزان کاهش محصول، در حال حاضر از آن به عنوان تهدیدی جدی برای تولید غده بذری سیب‌زمینی در کشورهای تولید کننده یاد می‌شود (Priou *et al*. 1998) . مبارزه با باکتری بسیار مشکل است و عواملی از قبیل شرایط آب و هوایی سرد و آلودگی های دیر هنگام موجب می‌شوند که علیرغم تکثیر بیمارگر در بافت، نشانه‌های بیماری ظاهر نشود. استفاده از اینگونه غده‌های بذری آلوده ولی به ظاهر سالم، موجب انتشار این باکتری به نقاط مختلف و آلودگی خاک‌های زراعی می‌شود، بنابراین داشتن یک سیستم تولید، گواهی و توزیع غده بذری سالم سیب‌زمینی برای کاهش پراکنش و خسارت بیماری و افزایش تولید محصول با کیفیت و مقرون به صرفه امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر می‌باشد.

۱-باکتری عامل بیماری

بیماری پژمردگی باکتریایی اولین بار در قرن نوزدهم از سیب زمینی، توتون، گوجه فرنگی و بادام زمینی از آسیا و آمریکای جنوبی جدا شد (OEPP/EPPO 2004) .از نظر آرایه‌بندی این باکتری متعلق به سلسله‌ی *Proteobacteria*، رده‌ی *Neisseriae*، راسته‌ی *Burkholderiales* و تیره‌ی *Ralstoniaceae* می‌باشد (Pastrik *et al*. 2002). باکتری دارای صدها سویه بیماریزا است که از نظر دامنه میزبانی، پراکنش جغرافیایی، خصوصیات بیوشیمیایی و ژنتیکی متفاوت هستند. از بین نژادهای مختلف آن نژاد سه که تقریباً معادل بیوار دو می‌باشد غالباً در نواحی گرمسیر، نیمه گرمسیر و حتی معتدل به سیب‌زمینی، گوجه فرنگی، بادمجان، فلفل و برخی از

علف‌های هرز تیره‌ی *Solanaceae* مانند تاج ریزی و گیاه تلخ و شیرین حمله می‌کند و باعث ایجاد بیماری می‌شود که اغلب بیماری آن‌ها به‌صورت پنهان باقی می‌ماند. این نژاد بالاترین قدرت بیماریزایی در سیب‌زمینی و بیشترین توانایی انتشار در مناطق مختلف جغرافیایی را دارد (Pradhanang *et al.* 2000). در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۲ بیماری در مزارع استان‌های اصفهان و چهار محال و بختیاری مشاهده شد. سپس با انجام آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماریزایی عامل بیماری بیوار ۲ ، نژاد ۳ باکتری *R. Solanacearum* گزارش شده است (بهار و دانش ۱۳۶۷). در سال‌های اخیر بیماری از استان‌های خراسان، کرمان، گلستان، البرز، خوزستان، همدان، آذربایجان‌شرقی و فارس نیز گزارش شده است (ایراندوست و همکاران ۱۳۸۷، باقری و تقوی ۱۳۷۹، مسلم‌خانی و همکاران ۱۳۸۴، معقولی و همکاران ۱۳۸۳).

۲- زیست‌شناسی و همه‌گیرشناسی

باکتری *R. solanacearum* یک بیمارگر خاکزاد است که در لایه‌های عمیق خاک (بیش از ۷۵ سانتی متر) مستقر می‌شود و قادر است مدت نسبتاً طولانی در خاک بقا یابد. آلودگی گیاه از طریق زخم صورت می‌گیرد، صدمهٔ وارده به ریشه به وسیله نماتدها و وسایل کشاورزی به نفوذ باکتری در غده و در نتیجه بروز آلودگی کمک می‌نماید. زادمایه داخل غده، تکثیر می‌یابد و بعد از کاشته شدن این غده‌ها، باکتری وارد خاک می‌شود. باکتری ممکن است در طول فصل رشد در فراریشه گیاه میزبان و یا بعضی از علف‌های هرز، تکثیر یافته و بقای خود را حفظ کند. دلیل بقای طولانی باکتری در خاک، توانایی ورود به مرحله خواب، بیان شده است (Hansen *et al.* 2003). دلیل اصلی پراکنش *R. solanacearum* حمل و نقل غده‌های آلوده می‌باشد. غده‌های آلوده در نواحی حاره و نیمه‌حاره‌ای باعث گسترش بیماری در سطح جهان شده است. بدون شک پراکنش منطقه‌ای و جهانی این بیماری ناشی از آلودگی پنهان غده‌های سیب‌زمینی است (Denny 2006، مسلم‌خانی و همکاران ۱۳۸۴). در برخی ارقام سیب‌زمینی با وجود جمعیت گسترش یافته باکتری در بافت‌های آوندی، نشانه‌ای از ظهور بیماری مشاهده نمی‌شود، این گونه ارقام به عنوان ارقام متحمل معرفی می‌شوند و می‌توانند از طریق انتقال آلودگی، نقش به سزایی در گسترش جهانی بیماری داشته باشند (مسلم‌خانی و همکاران ۱۳۸۹). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که *R. solanacearum* در سطح غده، عدسک‌ها و در بافت آوندی گیاهان با آلودگی پنهان وجود دارد و بقای باکتری در این قسمت‌ها به درجه حرارت

محیط بستگی دارد. به طور کلی افزایش دما بین ۳۵-۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد باعث افـزایش شـدت بیمـاری مـی‌شـود و گیاهانی که در شرایط معتدل، مقاوم هستند با افزایش دما ممکن است، حساسیت نشان دهند. در واقع مقاومت به دما و قدرت بیماریزایی بیمارگر وابسته است (مسلم‌خانی و همکاران ۱۳۸۹). خاک آلوده، بقایای گیـاهی، غـده‌هـای آلـوده (پنهان و آشکار)، لایه‌های عمیق خاک، فراریشه گیاهان میزبان، آب‌های سطحی وعلف‌های هرز به‌عنوان پناهگاه‌هـای مناسب برای حفظ و بقای *R. solanacearum* معرفی شده‌اند (Denny 2006).

۳- مدیریت بیماری به روش تولید و استفاده از غده‌های بذری سالم

استفاده از غده‌های بذری گواهی شده عاری از بیماری بهترین روش مدیریت بیماری است. خصوصاً با توجه به تکثیر رویشی سیب‌زمینی، نه تنها بیماری‌های آوندی از گیاه والد به نتاج منتقل می‌شوند بلکه بیماری‌هـای سـطحی مانند جرب باکتریایی نیز به غده‌های جدید منتقل می‌شوند. لذا با توجه به انتقال قطعی بیماری از والد به نتاج، ارزیابی سلامت غده‌های بذری از اهمیت به سزایی برخوردار است (مسلم‌خـانی ۱۳۹۳). مهـم‌تـرین عامـل پـراکنش جهـانی بیماری، توانایی بیمارگر در استقرار در بافت آوندی غده‌های بذری سیب‌زمینی بدون نشانه می‌باشد. از جمله عـواملی که باعث ایجاد بیماری به‌صورت پنهان می‌شود عبارتند از: ۱- در شـرایط آب و هـوایی سـرد گیـاه مـی‌توانـد بـدون نشانه‌ای از بیماری حامل بیمارگر باشد. غده‌های تولید شدهٔ این گیاهان نقش مهمی در انتقال بیمارگر به نقاط عاری از بیماری ایفا می‌کنند. ۲- ارقام متحمل به بیماری به‌دلیل عدم بروز نشانه بیماری یکی از عوامل مؤثر در انتشار بیمـاری می‌باشند. ۳- آلودگی‌های دیر هنگام میزبان‌های حساس به‌عنوان یکی دیگر از عوامل اصـلی بـروز آلـودگی پنهـان در غده‌ها هستند. غده‌هایی با آلودگی‌های پنهان هنگامی‌که در شرایط آب و هوایی مسـاعد بـرای رشـد بیمـارگر کشـت می‌شوند، نشانه بیماری را نمایان می‌کنند و علاوه بر انتقال آلودگی به نسل بعد باعث انتقال بیمارگر به خاک‌های عاری از آلودگی نیز می‌شوند. در مجموع استفاده مداوم از روش‌های پیشگیرانه خصوصاً استفاده از غده بذری سالم به عنوان یکی از موثرترین راه‌های کاهش وقوع بیماری است. استفاده از غده‌های بذری عاری از بیماری با به‌کارگیری سیسـتم گواهی بذر، به عنوان مهم‌ترین راهکار مدیریتی این بیماری برای جلـوگیری از ورود و انتشـار آن مـی‌باشـد. بررسـی آلودگی *R. solanacearum* به عنوان بیمارگر مهم غده‌های بذری سیب‌زمینی از اولویت‌های مراحل صدور گواهی سلامت است. در کشور ما موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال این مسئولیت را به عهده دارد. بر اساس قانون

ثبت ارقام گیاهی و کنترل و گواهی بذر و نهال مصوب ۸۲/۲/۳۰ مجلس شورای اسلامی، این موسسه مسئولیت کنترل و گواهی (سلامت و کیفیت) بذرهای تولیدی کشور را عهده‌دار است. امروزه افزایش عملکرد سیب‌زمینی با استفاده از بذر گواهی شده برای کشاورزان شناخته شده است. تولید و تکثیر غده‌های بذری سیب‌زمینی عاری از بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و فیتوپلاسمایی از اهداف کنترل و گواهی بذر است که از عوامل مؤثر در افزایش میانگین عملکرد در واحد سطح می‌باشد. در کشور ما به منظور ارزیابی سلامت بذرهای تولید شده در چرخه تولید بذر سالم و قابل گواهی سه مرحله بازرسی صورت می‌گیرد که شامل دو مرحله بازرسی مزرعه‌ای و یک مرحله بررسی سلامت غده‌ها در آزمایشگاه است. بر اساس نوع بیماری، استانداردهایی وجود دارد که اگر میزان آلودگی از این حدود تجاوز نماید، غده‌های حاصله به‌عنوان بذر تأیید نمی‌شوند (حسنی و همکاران ۱۳۹۳). سیب‌زمینی بذری به طبقات مختلف شامل هسته‌های اولیه سیب‌زمینی بذری (Pre basic seed)، سیب‌زمینی بذری مادری (Basic seed) و گواهی شده (Certified seed) تقسیم می‌شوند. هسته‌های اولیه، غده‌های بذری هستند که در کشور ما عمدتاً از طریق کشت بافت تولید می‌شوند و تحت عنوان کلاس S معرفی می‌گردند. غده‌های بذری مادری که حاصل کشت هسته‌های اولیه است شامل دو کلاس بذری SE و E می‌باشد. همچنین به غده‌های حاصل از کشت سیب‌زمینی بذری مادری، غده‌های بذری گواهی شده اطلاق می‌شود که در سه کلاس بذری A، B و C قرار می‌گیرند. گواهی بذر و معرفی طبقات بذری، بر اساس بازدیدهای مزرعه‌ای و درصد آلودگی‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی گزارش شده از مزرعه و آزمایشگاه صورت می‌گیرد. یکی از عوامل مهم و مورد توجه در بررسی‌های مزرعه‌ای و آزمایشگاهی، وجود بیماری پژمردگی باکتریایی است. استانداردهای میزان آلودگی قابل تحمل به باکتری *R. solanacearum* در شرایط مزرعه‌ای و آزمایشگاهی ایران در طبقات مختلف بذری در جدول ۱ آمده است.

۴- روش‌های تشخیص آلودگی *R. solanacearum* در سیستم گواهی غده بذری سیب زمینی

در حال حاضر سیستم گواهی بذر سیب‌زمینی در ایران به منظور کاهش هزینه‌های صدور گواهی سلامت، صرفاً به مشاهدات چشمی غده‌ها بسنده می‌کند در حالی‌که احتمال بروز آلودگی پنهان خصوصاً تحت شرایط آب و هوایی خنک و سرد وجود دارد (Hayward 1991). در بسیاری از کشورهای تولید کننده بذر سیب‌زمینی به منظور بهینه سازی مؤثر روش‌های حفاظتی و تشخیص بذرهای آلوده، ابزارهای قوی برای شناسایی و ردیابی باکتری در اندام‌های

جدول ۱- استانداردهای حداکثر درصد آلودگی قابل تحمل به باکتری *Ralstonia solanacearum* در طبقات مختلف بذری در شرایط مزرعه‌ای و آزمایشگاهی ایران*

کلاس بذری	بازدید مزرعه‌ای		بررسی آزمایشگاهی	
	اولیه	نهایی	چشمی	آزمون
S (nuclear stock)[1]	۰	۰	۰	–
SE (Super Elite)[2]	۰	۰	۰	–
E (Elite)[2]	۰	۰	۰	–
A[3]	۰/۵	۰	۰	–
B[3]	۰/۵	۰	۰	–
C[3]	۱	۰/۵	۰	–

* اعداد ذکر شده در جدول به مقیاس درصد می‌باشند.

رویشی تکثیر شونده، آب و خاک استفاده می‌گردد. تکنیک‌های بکار برده شده از دقت، سرعت، اختصاصیت بالایی برخوردار هستند و قادرند کمترین جمعیت باکتری را ردیابی نمایند. علاوه بر این با استفاده از این روش‌ها جنبه‌های ناشناختهٔ دامنهٔ میزبانی، علف‌های هرز میزبان و آلودگی پنهان شناخته می‌شوند. چندین نکته در خصوص روش‌های تشخیصی وجود دارد اول اینکه روش مورد استفاده باید قابل اعتماد باشد و آلودگیهای واقعی را نشان دهد. دوم، نمی‌توان از یک روش خاص برای ردیابی باکتری از هر نوع نمونه‌ای (مثلاً آب، خاک، غده و بافت گیاهی) استفاده نمود. سوم، میزان مواد (نمونه) مورد استفاده می‌تواند حساسیت یک روش تشخیصی را تغییر دهد، چهارم، میزان و نحوه نمونه برداری می‌تواند در نتایج تأثیر به‌سزایی داشته باشد و پنجمین نکته اینکه در آزمایشگاه‌هایی که تعداد زیادی نمونه مورد ارزیابی قرار می‌گیرند هزینه روش تشخیصی اهمیت زیادی پیدا می‌کند. به طور معمول در هر گرم بافت گیاه آلوده و پژمرده، بیش از $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلنی (Colony Forming Unit= CFU) باکتری وجود دارد، لذا غالباً به دلیل این غلظت بالای باکتری، از سطح بریده شده ساقه این گیاهان اوز شیری رنگی خارج می‌شود و همین خصوصیت منجر به شناسایی بسیار ساده این بیماری می‌گردد (Allen *et al*. 2001)، اما ردیابی جمعیت‌های پایین این باکتری در خاک و آب و نیز آلودگیهای پنهان در غده‌ها کار دشواری است، زیرا به‌صورت معمول جمعیت این باکتری در خاک یا آب آلوده کمتر از $۱۰^{۴}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر گرم است و این در حالی است که جمعیت باکتری‌های پوده‌رست به همین میزان یا بیشتر از این است. در مورد این نوع نمونه‌ها بهتر

است که عصاره مورد آزمایش روی محیط نیمه انتخابی مانند SMSA (Semi-selective medium, South Africa) کشت شود (Elphinstone *et al.* 1996) این محیط از رشد سایر پوده‌رست‌ها ممانعت می‌نماید به نحوی که۵۰۰-۱۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی از جمعیت باکتری در هر گرم آب یا خاک توانایی رشد در این محیط را پیدا می‌کنند (Poussier *et al.* 2002).

روش‌های سرولوژیکی برای غربال اولیه نمونه‌ها به‌دلیل سرعت و دقت بسیار مناسب هستند. این روش‌ها غالباً جمعیت‌هایی در حد $۱۰^{۳}$- $۱۰^{۴}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر نمونه را ردیابی می‌نمایند. هر روش سرولوژیکی یکسری مزایا دارد اما در رابطه با اختصاصیت یا حساسیت تشخیص، مشکلاتی نیز دارند. برای مثال آنتی بادی‌های پلی کلنال توانایی بالاتری در ردیابی باکتری *R. solanacearum* دارند در حالیکه آنتی بادی‌های مونوکلنال اختصاصیت بیشتری در تشخیص جدایه‌ها دارد. یکی از مشکلات روش‌های سرولوژیکی عدم تمایز سلول‌های زنده از مرده است (Priou *et al.* 1998). روش ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) به‌دلیل هزینه کم، آسان و سریع بودن و همچنین قابلیت استفاده آن برای انواع نمونه‌ها، بیشترین کاربرد را در بسیاری از آزمایشگاه‌ها دارد. امروزه روش ELISA مستقیم و غیر مستقیم و DAS- (Double Antibody Sandwich) ELISA توسعه یافته و بکار می‌رود. همچنین روش NCM-ELISA (NitroCellolose membrane) در بسیاری از کشورها برای ردیابی بیمارگر در مناطق مختلف بکار می‌رود. دقت ردیابی انواع روش‌های ELISA در حد $۱۰^{۴}$ سلول باکتری در هرمیلی‌لیتر عصاره گیاه یا خاک است که می‌توان این دقت را تا حد زیادی با استفاده از پیش غنی سازی با محیط نیمه انتخابی SMSA به مدت ۴۸ ساعت افزایش داد. تحقیقات نشان داده با استفاده از پیش غنی سازی دقت ردیابی باکتری در عصاره غده تا یک میلیون برابر و در خاک تا ده هزار برابر افزایش می‌یابد (مسلم‌خانی و همکاران ۱۳۸۶). از روش‌های سرولوژیکی دیگر که در ردیابی این باکتری بکار گرفته شده است می‌توان به روش IFAS (Immunoflurescence-Antibody Staining) و IFCS (Immunoflurescence Colony Staining) اشاره نمود. این روش‌ها همان قابلیت‌ها و مشکلات روش ELISA را دارد با این تفاوت که میکروسکوپ‌های خاصی نیاز است که ممکن است در برخی آزمایشگاه‌ها وجود نداشته باشد. این دو روش در حد $۱۰^{۴}$-$۱۰^{۲}$ سلول باکتری را در هر گرم خاک یا عصاره بافت گیاهی ردیابی می‌کنند (Van der Wolf *et al.* 2000).

روش سرولوژیکی (LFIC) Immunochromatography Lateral flow به عنوان یک روش تشخیصی سریع و کم هزینه معرفی شده که با پیش غنی‌سازی، دقتی به اندازه‌ی آزمون‌های مولکولی به همراه دشته است و قادر به ردیابی آلودگی‌های پنهان باکتریایی می‌باشد (مسلم خانی و همکاران ۱۳۹۳) این روش برای تشخیص باکتری *Ralstonia solanacearum* نیز توسعه یافته است و امروزه تعدادی از شرکت‌های تجاری، کیت‌های LFIC را برای تشخیص برخی از ویروس‌ها و باکتری‌های بیمارگر گیاهی به فروش می‌رسانند.

روش‌های ردیابی باکتری *R. solanacearum* بر پایه تشخیص اسید نوکلئیک با طراحی پروب (در هیبریداسیون) و پرایمر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) بر اساس توالی هدف در باکتری بیمارگر صورت می‌پذیرد. انواع روش‌های مبتنی بر PCR مانند روش Direct PCR، Nested PCR، Co-operational PCR، Real time PCR و Multiplex PCR برای ردیابی باکتری *R. solanacearum* توسعه یافته است (Caruso *et al*. 2003, Umesha & Avinash 2014, Chen *et al*. 2010). اگر شرایط واکنش PCR ایده‌آل باشد این روش حتی تا یک سلول باکتری را نیز ردیابی می‌کند. انتخاب توالی هدف که می‌بایست در واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون تکثیر شود از اهمیت خاصی برخوردار است. توالی مورد نظر می‌بایست از قسمت حفاظت شده که متعلق به آن گونه یا زیر گونه خاص است و در سایر باکتری‌ها وجود ندارد در نظر گرفته شود. در واقع انتخاب صحیح قطعه هدف در اختصاصیت تشخیص این روش حائز اهمیت است. پرایمر طراحی شده می‌بایست تا حد ممکن روی سویه‌های زیادی از بیمارگر ارزیابی شود تا اطمینان کامل از توانایی روش در ردیابی باکتری حاصل گردد. از نظر نظری روش PCR از حساسیت و اختصاصیت بالاتری نسبت به روش‌های سرولوژیکی برخوردار است. اگرچه مانند روش سرولوژیکی، روش PCR نیز تمایزی بین سلول‌های زنده و مرده باکتری قائل نیست. همچنین برخلاف روش‌های سرولوژیکی عناصر ممانعت کننده می‌توانند به‌طور نسبی یا کامل باعث اختلال در واکنش PCR شوند و منجر به ایجاد واکنش منفی دروغی شوند. برای مثال در عصاره غده سیب‌زمینی مواد ممانعت کننده قوی است که در فرایند تکثیر اختلال ایجاد می‌نمایند. در عصاره‌های گیاهی، بذر، خاک و آب نیز معمولاً ممانعت کننده‌های متفاوت و ناشناخته ای وجود دارد. روش‌های مختلفی برای حذف یا کاهش ممانعت کننده‌های PCR معرفی شده است برای مثال رقیق نمودن نمونه‌ها منجر به کاهش مواد مزاحم می‌گردد و تکثیر صورت می‌گیرد.

(Weller *et al*. 2000) راه حل دیگر افزودن موادی مانند پلی وینیل پیرولیدون (PPV) در بافر استخراج و به وین سرم آلبومین و ترهالوز در بافر PCR می‌توانند ممانعت کننده‌ها را غیر فعال نمایند (Denny 2006) موثرترین راه برای حذف این عوامل استفاده از یک روش مناسب استخراج DNA است. برای این منظور روش‌های مختلف استخراج مقایسه شده‌اند. از جمله روش‌های دستی و کیت‌های تجاری مختلف که نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داد که کیت‌های تجاری علاوه بر ساده نمودن مراحل استخراج قابلیت حذف ممانعت کننده‌ها را نیز دارند (Pastrik & Maiss 2000, Poussier *et al*. 2002). استراتژی مناسب دیگر استفاده از پیش غنی سازی به منظور افزایش جمعیت باکتری‌ها و رقیق شدن عصاره مورد ارزیابی و به تبع آن کاهش غلظت ممانعت کننده‌ها است. استفاده از پیش غنی سازی نه تنها از فعالیت مواد ممانعت کننده جلوگیری می‌کند بلکه باعث افزایش دقت روش به میزان چندین برابر روش معمول می‌گردد. حسن دیگر پیش غنی سازی این است که قابلیت ردیابی سلول‌های زنده در عصاره خاک غده و گیاه فراهم می‌گردد (مسلم‌خانی و همکاران ۱۳۸۴). از سایر روش‌های PCR که دقت و حساسیت تشخیص را افزایش می‌دهد nested PCR است که روش بسیار دقیقی است (Pradhanang *et al*. 2000). روش Real time PCR قادر به ردیابی ۳۰-۱۰ واحد تشکیل کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر عصاره پیش غنی سازی شده از غده سیب‌زمینی است (Ozakman & Schaad 2003). روش PCR نیز به همراه پیش غنی سازی قادر به ردیابی ۱۰ واحد تشکیل کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر عصاره غده و خاک است (مسلم‌خانی و همکاران ۱۳۸۴).

روش دیگری که برای ردیابی سلول‌های زنده باکتری معرفی شده است بر اساس تکثیر RNA هدف است زیرا RNA با مرگ ریزجاندار به سرعت تجزیه می‌گردد. این روش تحت عنوان NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) شناخته می‌شود و قسمتی از 16S rRNA باکتری را ردیابی می‌نماید (Bentsink *et al*. 2002). روش مولکولی LAMP (Loop-mediated isothermal PCR) نیز در شناسایی باکتری *R. solanacearum* موفق بوده است. ازمزیت های LAMP نسبت به روش‌های سرولوژی و PCR معمولی، توانایی آن در تکثیر اختصاصی توالی مورد نظر از DNA در دمای ۶۵ درجه و بدون نیاز به چرخه‌های دمایی و تجهیزاتی چون ترموسایکلر می‌باشد. قدرت تشخیص این روش بین $۱۰^{۴}$ تا $۱۰^{۶}$ واحد تشکیل کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر تخمین زده شده است. در این روش از ۴ پرایمر اختصاصی که ۶ ناحیه ژنی را در DNA باکتری در

مدت زمان کوتاهی شناسایی و تکثیر می‌کند، استفاده می‌شود. این روش به عنوان یک روش ساده و سریع در شناسایی بسیاری از میکرو ارگانیسم‌ها عمل کرده است. از مزیت‌های دیگر این روش امکان مشاهده مستقیم محصول واکنش می‌باشد که با رنگ آمیزی مواد حاصل واکنش با چشم غیر مسلح قابل مشاهده است (Kubota *et al*. 2008).

نتیجه‌گیری

بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی ناشی از ***R. solanacearum***، که از بیشتر مناطق کشت این گیاه در ایران گزارش شده، سالانه خسارت قابل توجهی به این محصول در دنیا وارد می‌کند. این بیماری از طریق غده‌های بذری آلوده انتشار می‌یابد و همین موضوع سبب گسترش بیماری در سطح وسیع در کشور شده است. بنابراین می‌توان تهیه و کاشت غده‌های بذری سالم گواهی شده را به عنوان بهترین روش مدیریت بیماری و افزایش کمی و کیفی محصول سیب‌زمینی **پیشنهاد** کرد.

منابع **References**

۱. ایراندوست ح.، نیکنام غ.، قاسمی آ.، تقوی س. م. و ترابی آ. ۱۳۸۷. بررسی تنوع فنوتیپی و پروتئینی جدایه های *Ralstonia solanacearum* در ایران. *علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی* ۱۲: ۱۹۲-۱۸۳

۲. باقری ع. و تقوی س. م. ۱۳۷۹. بررسی خصوصیات جدایه های عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی و گوجه فرنگی در استان فارس و ارزیابی مقاومت تعدادی از ارقام سیب‌زمینی و گوجه فرنگی نسبت به آنها. *بیماری‌های گیاهی* ۳۶: ۲۴۳-۲۳۳.

۳. بهار م. و دانش د. ۱۳۶۷. سبب شناسی پژمردگی سیب‌زمینی در ایران. *بیماری‌های گیاهی* ۱۰: ۲۴-۱.

۴. حسنی ف.، درویشی ب. و علیپور د. ۱۳۹۳. راهنمای فنی کنترل و گواهی بذر سیب زمینی. *فصلنامه ثبت و گواهی بذر و نهال* ۲: ۳۶-۳۰

۵. مسلم‌خانی ک. ۱۳۹۳. گواهی سلامت غده‌های بذری سیب‌زمینی. *فصلنامه علمی تخصصی ثبت و گواهی بذر و نهال* ۲: ۳۰-۲۸

۶. مسلم‌خانی ک.، مظفری ج.، علیزاده ع. و مبصر ص. ۱۳۸۶. افزایش حساسیت تشخیص باکتری *Ralstonia solanacearum* با تلفیق روش‌های غنی سازی عصاره و الایزا بر روی غشاء نیتروسلولزی. *مجله علوم و صنایع کشاورزی، ویژه حفاظت نباتات* ۲۱: ۶۴-۵۷.

۷. مسلم‌خانی ک.، مظفری ج. و علیزاده ع. ۱۳۸۴. تشخیص *Ralstonia solanacearum* در غده‌های بذری سیب‌زمینی و خاک با استفاده از تکنیک PCR . *بیماری‌های گیاهی* ۴۱: ۲۲۸-۲۱۵.

۸. مسلم‌خانی ک.، مظفری ج.، علیزاده ع.، شمس بخشم. و محمدی گل تپه آ. ۱۳۸۹. ارزیابی مقاومت ارقام سیب‌زمینی در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum* در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه. *مجله به نژادی نهال و بذر* ۲۶ :۵۱۶-۵۰۱.

۹. معقولی م.، حیاتی ج.، تقوی س. م. و مستوفی‌زاده قلمفرسا ر. ۱۳۸۳. تعیین خصوصیات بیووارهای *Ralstonia solanacearum* در استان خوزستان. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه تبریز. تبریز، ایران.

10. Allen C., Kelman A. & French E. R. 2001. Brown rot. Pp.11-13. *In:* W. R. Stevenson R. Loria G. D. Franc & D. P. Weingartner (eds.). Compendium of Potato Diseases (2ed). St. Paul: APS Press.

11. Bentsink L., Leone G.,Van Beckhoven J. R. C. M., Van Schijndel H. B., Van Gemen B. & Van der Wolf J. M. 2002. Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato. *Journal of Applied Microbiology* 93:647–655.

12. Caruso P., Bertolini E., Cambra M. & López M. M. 2003. A new and sensitive Co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of Ralstonia solanacearum in water. *Journal of Microbiological Methods* 55:257-272.

13. Chen Y., Zhang W. Z., Liu X., Ma Z. H., Li B., Allen C. & Guo J. H. 2010. A real-time PCR assay for the quantitative detection of Ralstonia solanacearum in the horticultural soil and plant tissues. *Journal of Microbiology* and *Biotechnology* 20:193-201

14. Denny T. P. 2006. Plant pathogenic Ralstonia species. In Plant-associated bacteria pp. 573-644. Springer Netherlands.

15. Elphinstone J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: A global view. Pp. 9-28. *In*:C. Allen P. Prior & A. C. Hayward (eds.). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press,MN,USA.

16. Elphinstone J. G., Hennessy J., Wilson J. K. & Stead D. E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* in potato tuber extracts. *OEPP/EPPO Bulletin* 26:663-678.

17. Floyd J. 2007. New Pest Response Guidelines: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. USDA-APHIS-PPQ, Emergency and Domestic Programs, Riverda le, MD. Online.

18. Hansen C., Shrestha J. N. B., Parker R. Y. & Derr N. J. 2003. Genetic diversity among Canadienne, Brown Swiss, Holestein, and Jersey Cattle of Canada based on 15 bovin microsatellite markers. *Genome* 45:897-904.

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

20. Kubota R., Vine B. G., Alvarez, A. M. & Jenkins D. M. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 98:1045-105

21. OEPP/EPPO. 2004. *Ralstonia solanacearum*. *OEPP/EPPO Bulletin* 34:173 – 178.

22. Ozakman M. & Schaad N. W. 2003. A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25:232-239.

23. Pastrik K. H. & Maiss E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* 148:619-626.

24. Poussier S., Cheron J. J., Couteau A., & Luisetti J. 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of Microbiological Methods* 51:349-359.

25. Pradhanang P. M., Elphinstone J. G. & Fox R. T. V. 2000. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology* 49:403-413.

26. Pradhanang P. M., Elphinstone J. G. & Fox R. T. V. 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology* 49:414-422.

27. Umesha S. & Avinash P. 2014. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas perforans*. *Biotech.* 5:245-252

28. Van der Wolf J. M., Vriend S. G. C., Kastelein P., Nijhuis E. H., van Bekkum P. J. & Van Vuurde J. W. L. 2000. Immunofluorescence colony-staining (IFC) for detection and antification of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* biovar 2 (race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. *European Journal of Plant Pathology* 106:123-133.

Management of Bacterial Wilt Disease of Potato by Health Assay of Seed Tubers

COBRA MOSLEMKHANI✉ & JAVAD MOZAFARI
Assistant Professor & Professor of Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
(✉Corresponding author, E.mail: Moslemkhani@yahoo.com)

Received: 02.02.2015 Accepted: 28.06.2015

Moslemkhani K. & Mozafari J. 2016. Management of bacterial wilt disease of potato by health assay of seed tubers. *Plant Pathology Science* 5(1): 62-75.

Abstract

Ralstonia solanacearum is an important phytopathogen which reduces quantity and quality of potato. Due to its wide distribution and broad host range and in soil of different regions through irrigation water or latent infected tubers. It is generally difficult to control the damage of this bacterium. It has widely distributed in most of potato growing regions of Iran and by causing wilt and brown rot disease of potato, is a serious treat for cultivation of this crop in the country. Providing and sowing the healthy and certificated seed tubers is the most effective method of controlling the disease. For a successful strategy of disease management, a clear understanding of mode of disease distribution and epidemiology of causal agent is necessary. In this paper, recent scientific findings on this disease are described and new methods of bacterium detection and health assay of seed tubers are introduced.

Key words: Wilt, Potato, Tuber, Certification, *Ralstonia*