

ارزیابی مقاومت ارقام سیب‌زمینی در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum* در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه

Evaluation of Potato Cultivars for Resistance to *Ralstonia solanacearum* under *In vitro* and Greenhouse Conditions

کبری مسلم‌خانی^۱، جواد مظفری^۲، عزیزالله علیزاده^۱، مسعود شمس‌بخش^۱ و
ابراهیم محمدی گل‌تپه^۱

- ۱- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، استاد و دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۳

چکیده

مسلم‌خانی، ک.، مظفری، ج.، علیزاده، ع.، و شمس‌بخش، م. ۱۳۸۹. ارزیابی مقاومت ارقام سیب‌زمینی در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum* در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۶: ۵۱۵-۵۰۱.

در این تحقیق واکنش سیزده رقم تجاری سیب‌زمینی با دو روش گلخانه‌ای و درون شیشه‌ای (*in vitro*) ارزیابی و کارایی این دو روش مقایسه شد. ارقام پیکاسو، راجا، سانتانا، آگریا، هر تا، مارفونا، دیامانت، سانتا، میلوا و فیانا در هر دو روش ارزیابی درجه‌های مختلف بیماری را نشان دادند. در شرایط درون شیشه‌ای در ارقام کاسموس، الس و بولستا خسارت بیماری مشاهده نشد یا علائم ظاهر شده خفیف بود ولی باکتری در بافت‌های این ارقام ردیابی شد. در ارزیابی گلخانه‌ای نیز علائم بیماری روی رقم کاسموس ظاهر نشد و یا بسیار خفیف بود ولی باکتری در آن شناسایی شد. دو رقم الس و بولستا در شرایط گلخانه‌ای کاملاً مقاوم بودند و بیمارگر نیز در آن‌ها ردیابی نشد. نتایج این بررسی نشان داد که ارزیابی مقاومت در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند، بنابراین روش درون شیشه‌ای استفاده شده در این بررسی، می‌تواند روش مطمئن، کم هزینه و سریعی برای ارزیابی مقاومت ارقام سیب‌زمینی به باکتری *R. solanacearum* باشد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، پژمردگی باکتریایی، ارزیابی درون شیشه‌ای، مقاومت، *Ralstonia solanacearum*

مقدمه

سیب‌زمینی یکی از محصولات مهم غذایی و اقتصادی است که در ۷۹ درصد از کشورهای جهان کشت می‌شود و از نظر میزان مصرف پس از گندم، ذرت و برنج در جایگاه چهارم جهان قرار دارد^۱ (FAO, 2000). سیب‌زمینی معمولاً به طریقه غیرجنسی با کاشت قطعات غده یا غده کامل تکثیر می‌شود، این روش تکثیر اغلب باعث انتقال عوامل بیماری‌زا از سالی به سال دیگر و از یک نقطه به نقطه دیگر می‌شود (Kelman, 1981).

بیماری پژمردگی باکتریایی یا پوسیدگی قهوه‌ای از بیماری‌های باکتریایی مهم سیب‌زمینی است که به راحتی از طریق غده‌های آلوده به ظاهر سالم منتقل شده و خسارت فراوانی را در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر ایجاد می‌کند (Kelman, 1981). اولین بار وجود این بیماری در ایران توسط بهار و دانش (Bahar and Danesh, 1991) از مزارع استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری گزارش شد و عامل بیماری با انجام آزمایش‌های فیزیولوژیکی، ییو شیمیایی و بیماری‌زایی نژاد ۲ و ییوار ۳ باکتری *R. solanacearum* تشخیص داده شد. مبارزه با این باکتری به دلیل دامنه میزبانی گسترده و نیز پراکندگی وسیع آن در خاک‌های مناطق مختلف و انتقال آن از طریق آبیاری و غده‌هایی که آلودگی پنهان دارند بسیار مشکل است.

عواملی از قبیل شرایط آب و هوایی سرد و آلودگی‌های دیر هنگام موجب می‌شوند که علیرغم تکثیر عامل بیماری در بافت، علائم بیماری ظاهر نشود. استفاده از غده‌های بذری به ظاهر سالم، موجب انتشار باکتری *R. solanacearum* به نقاط مختلف و آلودگی خاک‌های زراعی می‌شود.

در حال حاضر علاوه بر کاشت غده‌های بذری سالم و رعایت بهداشت خاک مزارع، برای کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی در سیب‌زمینی استفاده از ارقام مقاوم راهکار مناسب دیگری به شمار می‌آید. در کشور ما به دلیل نبودن یک برنامه کامل به‌نژادی سیب‌زمینی، تهیه و تولید ارقام مقاوم تاکنون عملی نبوده و به دلیل مشکلات اقتصادی موجود دسترسی به این ارقام برای زارعین نیز امکان‌پذیر نیست. به ویژه این که تاکنون رقمی با مقاومت بالا و پایدار در تمام شرایط آب و هوایی نسبت به بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی معرفی نشده است (Tung et al., 1990). با وجود این، مقاومت نسبی ارقام می‌تواند تا حد زیادی از شدت بیماری بکاهد و باعث کنترل بیماری در بسیاری از مناطق نیمه‌گرمسیر و مناطق اجرای طرح استمرار تولید سیب‌زمینی در ایران شود. در سال ۱۳۷۸، ارزیابی مقاومت چند رقم سیب‌زمینی به بیماری پژمردگی باکتریایی در ایران نشان داد که بر اساس ارزیابی علائم بیماری، تحمل بعضی از ارقام تجاری مورد

1. Available on: www.fao.org

گونه *S. phureja* به گونه *S. tuberosum* و مشخص شده است که میزان مقاومت متغیری در نتاج بروز می کند که بستگی زیادی به سازگاری و ترکیب پذیری والدین داشته است (Thurston and Lozano, 1968)؛ (Bowman and Sequeira, 1982).

بعضی از محققین گزارش کرده اند که مقاومت به پژمردگی باکتریایی سیب زمینی (*R. solanacearum*) تحت تاثیر دمای محیط و واکنش به گرمای ارقام قرار داشته و در درجه حرارت های بالا امکان شکسته شدن مقاومت وجود دارد (Tung et al., 1990). انتخاب سویه مناسب *R. solanacearum* و به کارگیری روش آلوده سازی و ارزیابی کارآمد یکی از عوامل موثر برای موفقیت در گزینش مقاومت پایدار به شمار می آید (Tung et al., 1992). مقاومت به پژمردگی باکتریایی در سیب زمینی بیشتر از نوع پلی ژنیک بوده ولی در عین حال از پایداری کمتری برخوردار است.

به علت نهفته بودن علائم بیماری پژمردگی باکتریایی و تاثیر شدید شرایط محیطی بر ایجاد و توسعه آن، ارزیابی مقاومت در گلخانه و مزرعه با در نظر گرفتن فنوتیپ و خسارت ظاهری باکتری کارائی لازم را نداشته و از دقت کافی برخوردار نیست، به همین دلیل ارقامی که در یک بررسی مقاوم تشخیص داده می شوند ممکن است در یک بررسی دیگر آلودگی نشان

کشت در ایران مانند مورن، فاموسا و آنولا در مقابل نژاد ۳ باکتری *R. solanacearum* بیش از ارقام کوزیما، مارفونا و اطلس بوده است (سماواتیان، گزارش منتشر نشده). در ارقام متحمل علیرغم آلودگی غده، خسارتی مشاهده نمی شود و به همین علت در صورت استفاده به عنوان غده های بذری، باعث انتقال و انتشار آلودگی می شوند. در مطالعه دیگری مقاومت دوازده رقم تجاری سیب زمینی به بیماری پژمردگی باکتریایی در شرایط گلخانه ای بررسی شد که همه ارقام حساس و نسبتاً حساس تشخیص داده شدند و رقم متحمل یا مقاوم در بین آنها یافت نشد (Ahmadvand et al., 2008). مقاومت مشاهده شده در ارقام مختلف بستگی زیادی به قدرت بیماری زایی و ساختار ژنتیکی جدایه ها یا سویه های باکتری دارد که پس از مدتی در برابر سویه جدید شکسته می شود. دستیابی به ژنوتیپ های مقاوم برای بهره برداری از آنها به منظور ایجاد ارقام تجاری پر محصول و مقاوم یکی از اهداف مهم برنامه های به نژادی سیب زمینی به شمار می رود. در گونه های خویشاوند وحشی سیب زمینی مانند گونه *S. phureja* منابع مقاومت خوبی در برابر عامل بیماری مشاهده شده که مقاومت خود را به صورت پایدار ایجاد و حفظ می کنند (Bowman and Sequeira, 1982). تلاش هایی نیز برای انتقال مقاومت موجود در

گلدان‌هایی با قطر ۲۰ سانتی‌متر کاشته شدند. شش هفته پس از کاشت، گیاهان با باکتری *R. solanacearum* مایه‌زنی شده و برای ارزیابی مقاومت مورد استفاده قرار گرفتند.

هشت جدایه خالص شده باکتری *R. solanacearum* از گروه بیماری‌شناسی دانشکده‌های کشاورزی شیراز و ساری دریافت شد که شامل جدایه‌های جمع‌آوری شده از اراک، گرگان، شیروان، اقلید و مناطق اطراف شیراز بودند. جدایه‌های دریافتی روی محیط TZC (Tetra Zolium Chloride) کشت شده و کلنی‌های این باکتری به صورت گرد، قرمز رنگ با حاشیه سفید و نامنظم همراه با مواد لزج فراوان رشد کردند (Kelman, 1954). قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها با انجام آزمون بیماری‌زایی روی رقم حساس مارفونا (Moslemkhani, 2001) انجام شد و در مراحل بعدی آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون الیزا بر روی غشاء نیترو سلولزی

عصاره گیاهان آلوده شده و شاهد (بدون آلودگی) به منظور افزایش تعداد سلول باکتری در عصاره، در محیط SMSA (Selective Medium Southern Africa) مایع ۴۸ ساعت کشت داده شد. مقدار ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله روی غشاء نیترو سلولزی لکه‌گذاری شد. سپس با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلنال مرکز تحقیقات بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) آزمون الیزا بر روی غشاء نیتروسلولزی (NCM-ELISA) مطابق روش پرو

دهند. در راستای حل این مشکل در این تحقیق به منظور دستیابی به یک روش ساده و مطمئن برای ارزیابی مقاومت به *R. solanacearum* در ارقام سیب‌زمینی، امکان استفاده از ارزیابی مقاومت در شرایط درون شیشه‌ای در برابر این بیماری مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی از دو روش مختلف آلوده‌سازی در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. همچنین آزمون NCM-ELISA همراه با غنی‌سازی برای اندازه‌گیری میزان تکثیر عامل بیماری در بافت‌های مختلف گیاهی و امکان استفاده از آن به جای روش معمول ارزیابی ظاهری علائم بیماری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

غده‌های بذری طبقه سوپرالیست ارقام سیب‌زمینی سانتانا (Santana)، مارفونا (Marfona)، دیامانت (Diamont)، بولستا (Bolesta)، میلوا (Milova)، الس (Els)، راجا (Raja)، کاسموس (Casmus)، آگریا (Agria)، هرتا (Herta)، فیانا (Phiana)، پیکاسو (Picaso) و سانتا (Sante) از بخش تحقیقات سیب‌زمینی و پیاز مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

برای انجام آزمایش‌های ارزیابی مقاومت، غده‌های هر رقم برای تولید جوانه‌های نوری، به مدت چند روز در مقابل نور قرار داده شدند. غده‌هایی پیش‌جوانه‌دار شده ارقام در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار در گلخانه در

ارزیابی درون شیشه‌ای

در این ارزیابی از نمونه‌های کشت بافتی ارقام از کلکسیون سیب‌زمینی بانک ژن گیاهی ملی ایران استفاده شد. هر یک از نمونه‌ها ابتدا بر روی محیط کشت MS (Murashing and Skoog, 1962) از طریق کشت تک جوانه تکثیر شدند. تکثیر درون شیشه‌ای در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری مناسب که شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود انجام شد. پس از گذشت یک ماه گیاهچه‌های کاملاً رشد کرده برای ارزیابی درون شیشه‌ای به کار برده شدند. به منظور انتخاب مناسب‌ترین روش آلوده‌سازی در شرایط درون شیشه‌ای دو روش مورد مقایسه قرار گرفت. برای این منظور از دو رقم مارفونا و الس (*Solanum tuberosum*) استفاده شد. در روش اول جوانه انتهایی گیاهچه‌های رشد کرده و سالم قطع شده و سپس در محل بریدگی، مقداری از کلنی ۲۴ ساعته باکتری با نوک سوزن منتقل شد و گیاهچه‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد بر روی محیط کشت MS نگهداری شدند. در روش دوم نوک ریشه‌های گیاهچه‌های رشد کرده در محیط MS بوسیله قیچی کاملاً استریل بریده شده و در سوسپانسیون غلیظ باکتری به مدت نیم ساعت غوطه‌ور و سپس در محیط MS مایع قرار داده شدند و علائم پس از ده روز بررسی شد. این مطالعه در قالب یک آزمایش فاکتوریل با دو روش آلوده‌سازی و دو رقم در چهار

و همکاران (Priou *et al.*, 1998) انجام شد. در گیاهچه‌هایی که شدت بیماری بسیار زیاد بود به علت از بین رفتن سریع گیاهان، بافت مورد نیاز برای عصاره‌گیری و انجام آزمون NCM-ELISA فراهم نشد.

ارزیابی گلخانه‌ای

گیاهان در مرحله شش برگی با غلظت 10^8 CFU/ml سوسپانسیون باکتری با استفاده از روش تزریق به ساقه آلوده شدند. بدین منظور سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری تهیه شد سپس قطره‌هایی از سوسپانسیون باکتری در زاویه بین برگ سوم و ساقه قرار داده شد و سوزن چند بار از بین قطره به داخل ساقه فرو برده شد تا زخم لازم برای ورود باکتری به فضای بین سلولی ایجاد شود. سه روز قبل از آلوده‌سازی به گیاهان آب داده نشد تا آوندها سوسپانسیون باکتری را بهتر جذب کنند. گیاهان آلوده شده در محیطی با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بالا قرار داده شدند. مایه‌زنی گیاهان شاهد با آب مقطر استریل انجام شد. پس از گذشت بیست روز علائم بیماری بر اساس درجه بندی زیر یادداشت‌برداری شد:

۰: بدون علائم؛ ۱: یک برگ پژمرده؛
 ۲: دو تا سه برگ پژمرده؛ ۳: به جز سه برگ
 آخر بقیه پژمرده؛ ۴: تمام برگ‌ها پژمرده؛
 ۵: مرگ گیاه (Winstead and Kelman, 1952). در نهایت با استفاده از آزمون NCM-ELISA آلودگی در بافت‌های گیاهی ردیابی شد.

تکرار برای هر رقم انجام شد. در هر رقم یک تکرار در آب استریل قرار گرفت و سپس به محیط MS مایع منتقل و به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد.

با توجه به نتایج یکسان به دست آمده و سهولت روش اول، از این روش جهت ارزیابی مقاومت در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. بدین صورت که سیزده رقم مورد بررسی پس از رشد کامل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار با استفاده از روش اول آلوده شدند و در هر رقم یک تکرار نیز به عنوان گیاه شاهد در نظر گرفته شد. ده روز بعد از آلوده‌سازی علائم بر اساس درجه بندی زیر یادداشت‌برداری شدند:

۰: بدون علائم؛ ۱: یک پنجم گیاهچه خشک؛
۲: دو پنجم گیاهچه خشک؛ ۳: سه پنجم گیاهچه خشک؛ ۴: چهار پنجم گیاهچه خشک؛ ۵: گیاهچه کاملاً خشک.

در نهایت گیاهچه‌هایی که در اثر بیماری از بین نرفته بودند برای ارزیابی آلودگی به باکتری با استفاده از آزمون NCM-ELISA بررسی شدند.

نتایج و بحث

به منظور بررسی امکان استفاده از سیستم درون شیشه‌ای برای ارزیابی مقاومت به باکتری *R. solanacearum*، مقاومت سیزده رقم تجاری سیب‌زمینی در دو شرایط کنترل شده گلخانه و شرایط درون شیشه‌ای مورد ارزیابی

قرار گرفت. در واکنش ارقام مورد بررسی بر اساس علائم ظاهری خسارت بیماری، در هر دو روش ارزیابی تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲). بر مبنای به کارگیری درجه آلودگی به همراه آزمون NCM-ELISA مقایسه و ارزیابی مقاومت ارقام در برابر این باکتری با استفاده از هر دو روش امکان‌پذیر بود.

ارزیابی مقاومت در شرایط گلخانه

تجزیه واریانس ارزیابی مقاومت ارقام مختلف سیب‌زمینی در برابر باکتری *R. solanacearum* در شرایط گلخانه که بین ارقام اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۱). ارقام پیکاسو، راجا، مارفونا، سانتانا، آگریا، هرتا، دیامانت، سانتا و میلوا علائم پژمردگی ناشی از بیماری پژمردگی باکتریایی را به درجات مختلف نشان دادند و به عنوان ارقام حساس ارزیابی شدند (جدول ۲). در ارقام فیانا و کاسموس تنها بعضی از گیاهان علائم مختصری از بیماری را نشان دادند و نسبتاً مقاوم بودند در حالی که دو رقم الس و بولستا علائمی از بیماری نشان ندادند. در واقع این دو رقم با توجه به علائم ظاهری بیماری به عنوان ارقام مقاوم تلقی شدند (شکل ۱ و جدول ۲). برای اطمینان از مقاومت واقعی و عدم آلودگی پنهان علاوه بر شدت علائم بیماری، تکثیر بیمارگر در بافت گیاه نیز با استفاده از روش تشخیصی دقیق و سریع Post-enrichment NCM-ELISA ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان داد که در تمامی ارقام

حساس که علائم بیماری مشهود بود باکتری
وجود داشت. در ارقام نیمه مقاوم فیانا و



شکل ۱- واکنش برخی از ارقام سیب زمینی به *Ralstonia solanacearum* در گلخانه. به ترتیب از چپ به راست: گیاه آلوده نشده رقم حساس مارفونا (شاهد سالم تزریق شده با آب) و گیاهان آلوده شده رقم حساس مارفونا، رقم نیمه حساس سائته و رقم مقاوم الس.

Fig. 1. Response of some potato cultivars to *Ralstonia solanacearum* in greenhouse. From left to right: mock inoculated (water), and inoculated plants of susceptible cultivar Marfona, moderate susceptible cultivar Sante and resistant cultivar Els.

جدول ۱- تجزیه واریانس مرکب درجه آلودگی ارقام سیب‌زمینی به باکتری *Ralstonia solanacearum* در شرایط گلخانه و درون شیشه‌ای

Table 1. Combined analysis of variance for potato cultivars tested under greenhouse and *in vitro* conditions for resistance to *Ralstonia solanacearum*

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS
Cultivar	رقم	12	17.226**
Evaluation technique	روش ارزیابی	1	2.167 ^{ns}
Cultivar × Evaluation technique	رقم × روش ارزیابی	12	1.611 ^{ns}
Error	خطا	52	0.692
Total	کل	77	

ns و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد.
ns and **: Not significant and significant at 1% probability level, respectively.

به عنوان ارقام متحمل یا نسبتاً مقاوم طبقه‌بندی شدند.

این نتایج نشان داد که برای ارزیابی مقاومت ارقام سیب‌زمینی در برابر بیماری پژمردگی باکتریایی باید علاوه بر علائم ظاهری بیماری به

کاسموس که علائم بیماری آن چنانی از خود نشان نمی‌دادند و سالم به نظر می‌رسیدند جمعیت نسبتاً گسترش یافته‌ای از بیمارگر درون بافت‌های آوندی و غده ردیابی شد (جدول ۳)، با توجه به این مشاهدات ارقام کاسموس و فیانا



شکل ۲- واکنش دو رقم سیب‌زمینی الس و مارفونا هفت روز بعد از مایه‌زنی در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum* در ارزیابی درون شیشه‌ای با مقایسه دو روش آلوده‌سازی: (A) آلوده‌سازی به روش قرار دادن کلونی در قسمت فوقانی گیاه؛ (B) آلوده‌سازی از طریق غوطه‌ور کردن ریشه زخمی گیاهچه‌های کامل در سوسپانسیون باکتری.

Fig. 2. Responses of potato cultivars Els and Marfona ,seven days after inoculation in *in vitro* screening against *Ralstonia solanacearum* using two inoculation techniques: A) inoculation by placing bacterial colonies on the upper end of the stem cutting ; B) by immersing wounded roots of the plantlets in the bacterial suspension.

ارزیابی مقاومت در شرایط درون شیشه ای

در این تحقیق ارزیابی درون شیشه‌ای با موفقیت برای سیزده رقم سیب زمینی در برابر باکتری *R. solanacearum* بکار گرفته شد. در راستای دستیابی به یک روش آلوده‌سازی مناسب، دو روش مختلف آلوده‌سازی درون شیشه‌ای گیاهان سیب‌زمینی مقایسه شد که نتایج حاصل از هر دو روش قرار دادن کلونی باکتری

وجود بیمارگر در بافت‌های جدید گیاه توجه کرد در غیر این صورت احتمال این که یک رقم متحمل به عنوان مقاوم معرفی شود بسیار زیاد خواهد بود. ارقام الس و بولستا در ارزیابی گلخانه‌ای مقاوم بودند یعنی هم فاقد علائم ظاهری بوده و هم آزمون NCM-ELISA نتوانست باکتری را در بافت‌های این دو رقم ردیابی کند (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۲- مقایسه میانگین درجه‌های آلودگی ارقام سیب‌زمینی به باکتری *Ralstonia solanacearum* در شرایط ارزیابی درون شیشه ای و گلخانه ای

Table 2. Comparison of disease scores in potato cultivars inoculated with *Ralstonia solanacearum* and evaluated under *in vitro* and greenhouse conditions

Cultivars	ارقام	Score* درجه آلودگی		Response	واکنش
		گلخانه	درون شیشه ای		
		Greenhouse	<i>In vitro</i>		
		حداقل - حداکثر	حداقل - حداکثر		
		Max.. - Min.	Max.. - Min.		
Picasso	پیکاسو	5-3	5-4	S	حساس
Raja	راجا	4-3	5-4	S	حساس
Marfona	مارفونا	5-4	4-3	S	حساس
Santana	سانتانا	4-3	5-4	S	حساس
Agria	آگریا	3-2	5-4	S	حساس
Herta	هرتا	3-2	5-4	S	حساس
Diamont	دیامونت	4-3	4-3	S	حساس
Sante	سانته	4-3	4-3	S	حساس
Milova	میلوا	4-3	2-1	S	حساس
Phiana	فیانا	1-1	1-1	MR	نسبتاً مقاوم
Casmus	کاسموس	1-0	0-0	MR	نسبتاً مقاوم
Els	الس	0-0	0-0	R	مقاوم
Bolesta	بولستا	0-0	0-0	R	مقاوم

* Winstead and Kelman (1952)

هرتا، دیامانت، سانته و میلوا با درجه‌های مختلف آلودگی نسبت به بیماری حساسیت نشان دادند (جدول ۲) گیاهچه‌های تعدادی از ارقام در اثر شدت بیماری از بین رفته بودند به طوری که تامین عصاره مورد نیاز برای انجام آزمون NCM-ELISA میسر نشد. اما ارقام الس (شکل ۲) و بولستا علائمی از بیماری نشان ندادند. در این دو رقم با وجود ظاهری سالم و عاری از علائم بیماری، بیمارگر درون بافت گیاهی آن‌ها ردیابی شد (جدول ۳). براساس این

در محل قطع جوانه انتهایی ساقه و غوطه‌ور کردن ریشه‌های زخمی در سوسپانسیون باکتری کاملاً مشابه یکدیگر بود (شکل ۲)، بنابراین با توجه به سهولت و کوتاه بودن زمان آلوده‌سازی از روش اول یعنی قرار دادن کلنی در محل قطع جوانه انتهایی گیاهچه‌ها استفاده شد. در این روش همچنین شدت تکثیر باکتری در بافت گیاهی با میزان ترشح آن در محیط کشت قابل مشاهده بود.

ارقام پیکاسو، راجا، مارفونا، سانتانا، آگریا،

مؤثرترین روش‌های کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی است. بر اساس نتایج تحقیقاتی انجام شده تاکنون در ارقام زراعی سیب‌زمینی *Solanum tuberosum*، مقاومت پایداری در برابر باکتری *R. solanacearum* عامل بیماری پژمردگی باکتریایی گزارش نشده است. مقاومت نسبی مشاهده شده در بعضی از ارقام در شرایط مختلف محیطی (خصوصاً تحت تاثیر دما) تغییر می‌کند (Thurston and Lozano, 1968؛ French and Lindo, 1982; Tung et al., 1990). بون سو بساکول و همکاران (Boonsuebsakul et al., 1996) بیماری‌زایی سه جدایه باکتری *R. solanacearum* را روی چهارده رقم سیب زمینی در شرایط گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار دادند که تنها دو رقم نسبت به بیماری پژمردگی باکتریایی مقاومت نشان دادند البته مقاومت این ارقام در شرایط مختلف محیطی و در برابر جدایه‌های دیگر بررسی نشده است و امکان دارد که این مقاومت پایدار نباشد. در تحقیقات انجام شده توسط گانتر (Gunther, 1996) در شرایط مزرعه‌ای هیچ‌گونه مقاومتی در ارقام سیب‌زمینی به بیماری پژمردگی باکتریایی مشاهده نشد. در تحقیق حاضر مقاومت سیزده رقم در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد که از بین آنها تنها سه رقم الس، بولستا و کاسموس مقاومت کامل داشتند و علائمی از بیماری نشان ندادند. باید توجه داشت علائم ظاهری به تنهایی نمی‌تواند نشان‌دهنده

ردیابی ارقام الس و بولستا را می‌توان به عنوان رقم مقاوم یا نسبتاً مقاوم تلقی کرد زیرا باکتری عامل بیماری توانایی تکثیر و زنده ماندن در بافت آن‌ها را دارد اما علائم پژمردگی ایجاد نمی‌کند.

مقایسه ارزیابی مقاومت در شرایط درون

شیشه‌ای و گلخانه

مقایسه واکنش سیزده رقم سیب‌زمینی در برابر باکتری *R. solanacearum* در دو شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای و تجزیه واریانس مرکب اثر رقم و شرایط ارزیابی (محیط) بر مقاومت ارقام نشان داد که مقاومت ارزیابی شده در این دو شرایط تفاوت معنی‌داری نداشته (جدول ۱) و می‌توان به جای ارزیابی مقاومت در گلخانه از روش ارزیابی درون شیشه‌ای استفاده کرد. در ارزیابی درون شیشه‌ای نیز همانند ارزیابی گلخانه‌ای ارقام پیکاسو، مارفونا، راجا، سانتانا، دیامانت، سانتا، میلوا، آگریا، هرتا، فیانا و کاسموس درجه‌های مختلفی از حساسیت را نشان دادند (جدول ۲). دو رقم الس و بولستا در این شرایط با وجود ظاهری سالم و بدون علائم بیماری دارای جمعیت نسبتاً گسترش یافته بیمارگر در بافت خود بودند (جدول ۳)، این در حالی بود که در ارزیابی گلخانه‌ای این دو رقم نه تنها فاقد علائم و خسارت بیماری بودند بلکه عامل بیماری نیز در بافت آنها قابل ردیابی نبود و بنابراین به عنوان ارقام مقاوم ارزیابی شده بودند (جدول ۲).

استفاده از ارقام مقاوم به عنوان یکی از

جدول ۳- نتایج آزمون NCM-ELISA در ردیابی باکتری *Ralstonia solanacearum* از عصاره بافت گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه و شرایط درون شیشه‌ای

Table 3. Results of NCM-ELISA tests for detection of *Ralstonia solanacearum* in extracts of plants grown and inoculated under greenhouse or *in vitro* conditions

Cultivars	رقم	Greenhouse گلخانه		In vitro
		Tuber غده	Stem ساقه	
Picasso	پیکاسو	+	+	ND
Raja	راجا	+	+	ND
Marfona	مارفونا	+	+	ND
Santana	سانتانا	+	+	ND
Agria	آگریا	+	+	ND
Herta	هرتا	+	+	ND
Diamont	دیامونت	+	+	ND
Sante	سانته	+	+	ND
Milova	میلوا	+	+	ND
Phiana	فیانا	+	+	+
Casmus	کاسموس	+	+	+
Els	الس	-	-	+
Bolesta	بولستا	-	-	+

ND: به علت شدت آلودگی و سرعت ظهور علائم نیازی به انجام آزمون NCM-ELISA نبود.

ND: No need for NCM-ELISA due to clear and severe symptoms.

سیب‌زمینی است که به صورت ناقل عمل می‌کند. در دمای پایین، با وجود حساس بودن رقم هیچ‌گونه علائمی موقوع برداشت ظاهر نمی‌شود اما پس از برداشت محصول و کشت در شرایط مساعد، بیماری ظاهر می‌شود و باعث انتقال آلودگی به خاک‌های عاری از باکتری عامل بیماری می‌شود (Thurston and Lozano, 1968؛ French and Lindo, 1982؛ Tung *et al.*, 1990). در این تحقیق برای رفع این نقصان، پس از بررسی و یادداشت‌برداری علائم ظاهری گیاه آلوده شده، قسمت‌هایی از ساقه و غده جهت

مقاومت کامل به بیماری پژمردگی باکتریایی در شرایط مزرعه یا گلخانه باشد، زیرا این باکتری می‌تواند به صورت پنهان و بدون بروز علائم بیماری، درون بافت‌های گیاه ظاهراً مقاوم رشد و تکثیر کند. گیاهان به ظاهر سالم به عنوان منابع مهم انتشار آلودگی در مناطق مختلف جغرافیایی به شمار می‌روند. در ارقام متحمل و نیز در دمای پایین باکتری به صورت پنهان رشد کرده ولی خسارت و علائم بیماری بروز نمی‌کند، شاید همین عامل باعث گسترش وسیع بیماری در سطح دنیا شده است. بر اساس تحقیقات انجام شده رقم کروزا ۱۴۸ به عنوان نمونه‌ای از ارقام

ندادند بلکه باکتری نیز در بافت آن‌ها ردیابی نشد. با وجود مقاومت کامل این دو رقم در برابر جدایه‌های مورد بررسی نباید از نظر دور داشت که این دو رقم نیز ممکن است در شرایط محیطی مختلف و نسبت به ایزوله‌های دیگر باکتری واکنش متفاوتی داشته باشند (Tung et al., 1990؛ Tung et al., 1992). مقاومت به پژمردگی باکتریایی در سیب‌زمینی بیشتر پلی‌ژنیک بوده و دارای دامنه وسیعی است. علاوه بر نوع جدایه باکتری، به کارگیری روش موثر مایه‌زنی و آلوده‌سازی نیز از عوامل مهم در موفقیت برای ارزیابی مقاومت به *R. solanacearum* گزارش شده است. (Tung et al., 1990)

در این تحقیق به منظور دستیابی به یک روش ساده، مطمئن و سریع برای ارزیابی مقاومت به عامل بیماری پژمردگی باکتریایی در ارقام سیب‌زمینی برای اولین بار از تکنیک‌های ارزیابی درون شیشه‌ای استفاده شد. در این روش ارزیابی به دلیل ایجاد شرایط استریل و عدم دخالت عوامل بیولوژیک و سایر عوامل کنترل نشده گلخانه و مزرعه مانند آفات، بیماری‌ها، تغییرات دما و عوامل ممانعت‌کننده خاک، ارزیابی دقیق تر بوده و با حساسیت بیشتری انجام می‌شود (Mozafari and Pazhohandeh, 2001؛ Fock et al., 2000) همچنین به دلیل سهولت و سرعت روش‌های درون شیشه‌ای، ارزیابی همزمان تعداد زیادی از ارقام و گیاهچه‌ها با

ردیابی باکتری عامل بیماری، از گیاه جداسازی و در آزمایشگاه با استفاده از آزمون NCM-ELISA مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از این روش باعث شد تا برخی از ارقام که با استفاده از علائم ظاهری مقاوم شناسایی شده بودند به عنوان رقم متحمل شناخته شوند زیرا با وجود ظاهری کاملاً سالم دارای جمعیت نسبتاً گسترش یافته از باکتری در بافت خود بودند. در دو رقم فیانا و کاسموس که به وسیله آزمون NCM-ELISA حضور بیمارگر در قسمت‌های مختلف بافت گیاهی آن‌ها ردیابی شد، علائم ظاهری بیماری مشاهده نشده بود.

در یک بررسی برای ارزیابی مقاومت ارقام تجاری سیب‌زمینی به بیماری پژمردگی باکتریایی که در سال ۱۳۷۸ در ایران انجام شد، بر اساس علائم ظاهری در گلخانه ارقام مورن، فاموسا و آتولا به عنوان ارقام نسبتاً متحمل و ارقام کوزیما، مارفونا و اطلس به عنوان ارقام حساس معرفی شدند (سماراتیان، گزارش منتشر نشده). در بررسی دیگری هیچ یک از دوازده رقم ارزیابی شده مقاوم نبودند (Ahmadvand et al., 2008). در تحقیق حاضر رقم فیانا و کاسموس به عنوان ارقام متحمل و رقم مارفونا به عنوان یک رقم کاملاً حساس تایید شد. گزارش مقاومت کامل دو رقم الس و بولستا در ارزیابی گلخانه‌ای در برابر جدایه‌های مورد بررسی باکتری *R. solanacearum* در ایران در این بررسی تائید شد چون نه تنها علائمی از بیماری نشان

تامین دقیق‌تر دما، نور و تغذیه مناسب برای رشد و پرورش گیاهچه‌های آلوده، واکنش واقعی ژنوتیپ‌های مورد نظر و پتانسیل ژنتیکی آن‌ها در برابر عامل بیماری بهتر مشخص می‌شود.

اطمینان از آلوده‌سازی در شرایط درون شیشه‌ای نیز همانند ارزیابی گلخانه‌ای حائز اهمیت است. برای دستیابی به یک روش مطمئن آلوده‌سازی، در این بررسی روش قرار دادن زادمایه (کلنی باکتری) در محل قطع جوانه انتهایی ساقه و روش اضافه کردن زادمایه (سوسپانسیون سلولی باکتری) به محیط کشت مایع که گیاهچه‌ها در آن قرار داده شده بودند مقایسه شدند. هر دو روش قادر بودند آلوده‌سازی یکنواخت و کامل ایجاد کنند، لذا به دلیل سهولت و سرعت آلوده‌سازی، روش قرار دادن زادمایه در محل قطع جوانه انتهایی توصیه می‌شود.

تشابه نتایج ارزیابی ارقام مورد بررسی سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای و عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار بین دو روش ارزیابی نشان داد که ارزیابی درون شیشه‌ای مقاومت به بیماری نیز می‌تواند همانند ارزیابی گلخانه‌ای معمول نتایج قابل اعتماد داشته باشد. در ارزیابی درون شیشه‌ای نیز علاوه بر ظهور علائم ظاهری قابل اندازه‌گیری، باکتری با نرخ سریع‌تری رشد و در گیاه انتشار پیدا می‌کند و ارزیابی دقیق‌تری را در زمان کمتری میسر می‌سازد. ارقام الس و بولستا در شرایط گلخانه کاملاً مقاوم بودند و باکتری در آن‌ها

رشدی نداشته و ردیابی نشد اگرچه این ارقام در شرایط درون شیشه‌ای نیز فاقد علائم بودند ولی باکتری بیمارگر در بافت آن‌ها رشد و تکثیر کرد و توسط آزمون NCM-ELISA ردیابی شد، بنابراین می‌توان گفت که اولاً این روش ارزیابی از دقت و حساسیت بیشتری نسبت به ارزیابی گلخانه‌ای برخوردار است و ثانياً چه در ارزیابی درون شیشه‌ای و چه در ارزیابی گلخانه‌ای نایستی فقط به علائم ظاهری بیماری برای ارزیابی مقاومت اکتفا کرد. با توجه به حساسیت شدید باکتری *R. solanacearum* به شرایط محیطی مانند دما و رطوبت، انجام ارزیابی در شرایط گلخانه‌ای متغیر و دارای نوسانات قابل توجه ممکن است نتایج متفاوت و غیر قابل تکراری ایجاد کند، در حالی که کنترل موثر این شرایط محیطی در شرایط درون شیشه‌ای کاملاً عملی بوده و با حذف عوامل بیولوژیک در این شرایط، رشد مطلوب باکتری و ایجاد بیماری یکنواخت امکان‌پذیر می‌شود و در نتیجه تکرارپذیری و قابلیت اعتماد نتایج در این سیستم ارزیابی بیشتر است. علاوه بر آن با در نظر گرفتن سرعت انجام کار و فضای کم لازم برای ارزیابی باید گفت که روش ارزیابی درون شیشه‌ای روش مناسب، حساس، دقیق و کارآمدی برای ارزیابی همزمان تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی برای مقاومت به *R. solanacearum* بوده این روش را می‌توان با اطمینان بیشتری مورد استفاده قرار داد.

References

- Ahmadvand, R., Zarbakhsh, A., and Hajianfar, R. 2008.** Evaluating resistance of commercial potato cultivars to bacterial wilt under greenhouse condition. Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran. Page 416 (in Persian).
- Bahar, M., and Danesh, D. 1991.** Etiology of bacterial wilt of potato in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 24: 1-10.
- Boonsuebsakul, W., Yanvaree, S., Boonyawat, N., Tetratran, V., Pavichit, S., and Thongjiem, M. 1996.** Test for virulence of *Pseudomonas solanacearum* on potato varieties. pp. 249-253. In: Rasco, E. T. Jr., Aromin, F.B., Amante, V. D. R., and Lopez, P. J. S. (eds.). Southeast Asian Program for Potato Research and Development.
- Bowman, J. E., and Sequeira, L. 1982.** Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: infectivity titrations in relation to multiplication and spread of the pathogen. American Potato Journal 59: 155-164.
- Fock, I., Collonnier, C., Purwito, A., Luisetti, J., Souvannavong, V., Vedel, F., Servaes, A., Ambroise, A., Kodja, H., Ducreux, G., and Sihachakr, D. 2000.** Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. Plant Science 160 : 165–176.
- French, E. R., and Lindo, L. D. 1982.** Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: strain specificity and temperature sensitivity. Phytopathology 72: 1408-1412.
- Gunther, M. 1996.** Screening of potato varieties for field resistance to bacterial wilt. pp. 69-82. In: Rasco, E. T. Jr., Aromini, F. B., Amante, V. D. R., and Lopes, P. G. S. (eds.) Southeast Asian Program for Potato Research and Development.
- Kelman, A. 1981.** Brown rot. pp. 29-31. In: Hooker, W.J.(ed.) Compendium of Potato Diseases: APS, Press, Minnesota, USA.
- Moslemkhani, K. 2001.** Rapid diagnostic of *Ralstonia solanacearum* and screening potato cultivars for resistance to this bacterium using ELISA and PCR techniques. MSc. Thesis. College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 122 pp. (in Persian).
- Mozafari, J., and Pazhohandeh, M. 2001.** Using biotechnology for developing the first Iranian *in vitro* gene-bank of virus free potato germplasm. Bulletin of Biotechnology Commission 3: 166-173.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio-assay

with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.

Thurston, H. D., and Lozano, J. C. 1968. Resistance to bacterial wilt of potato in Colombian clones of *Solanum phureja*. *American Potato Journal* 45: 51-65.

Tung, P. X., Hermsen, J. G. T. H., Vanderzaag, P., and Schmiediche, P. E. 1992. Effects of heat tolerance on expression of resistance of *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith in potato. *Potato Research* 35: 321-328.

Tung, P. X., Rasco, F. T., Vanderzaag, P., and Schmiediche, P. E. 1990. Resistance of *Pseudomonas solanacearum* in the potato. Effects of sources of resistance and adaptation. *Euphytica* 45: 203-210.

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