

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی فراوانی برخی بیماری‌گرهای همراه با بیماری سرارغوانی سیب‌زمینی

عزیز باقری^{۱*} - قباد بابایی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۲

چکیده

در برخی مزارع سیب‌زمینی نشانه‌های پژمردگی همراه با سرارغوانی، ریزبرگی، زردی و لوله‌ای شدن برگ، تورم جوانه‌های جانبی و غده‌های هوایی مشاهده می‌شود. بررسی ۴۶۰ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان‌های چهارمحال و بختیاری، همدان و فارس طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۵ با آزمون الیزا با آنتی‌سرم اختصاصی *Potato leaf roll virus (PLRV)*، کشت نمونه‌های ریشه دارای علائم پوسیدگی و شانکر، روی محیط PDA و بررسی نمونه‌ها با PCR با استفاده از پرایمرهای P1/P7 و R16F2n/ R16R2، وجود سه عامل فیتوپلازما، قارچ ریزوکتونیا و ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی را به ترتیب با فراوانی ۱۳۲، ۲۴۵ و ۶۱ نمونه در بین نمونه‌های بررسی شده را نشان داد. نتایج این بررسی نشان داد ۲۸/۷، ۵۳/۲۵ و ۱۳/۲ درصد از علائم سرارغوانی و تشکیل غده هوایی به ترتیب توسط عوامل فیتوپلاسمایی، قارچی و ویروس برگ قاشقی سیب زمینی ایجاد می‌شود. علائم تشکیل غده هوایی و ارغوانی شدن برگ‌های انتهایی بوته سیب‌زمینی در ارقام مختلف به نسبت‌های متفاوت دیده‌شد. برش آنزیمی محصول PCR تکثیر شده توسط پرایمرهای R16F2n/ R16R2 مربوط به نمونه‌های سیب‌زمینی و یونجه دارای علائم جاروک، گوجه فرنگی دارای علائم فیلودی و پیچیدگی برگ و علف‌های هرز همراه با علائم فیلودی، زردی و ریزبرگی حاشیه مزارع، با آنزیم‌های محدود کننده *HhaI*، *MseI*، *HaeIII*، *AluI* (*Aster yellows*) 16SrI-B و *HpaII* و *KpnI*، *RsaI* در آزمون RFLP نشان دهنده وجود دو گروه فیتوپلاسمایی در نمونه‌های سیب‌زمینی شامل 16SrXII-A و 16SrXII-A (Stolbur) است. نمونه‌های فیتوپلاسمایی یونجه و گوجه‌فرنگی همگی متعلق به گروه 16SrXII-A و نمونه‌های سنگ (*Tragopogon graminifolius*) و گوش فیل (*Conringia orientalis*) به ترتیب متعلق به گروه‌های 16SrI-C (-*Aster yellows group*) و 16SrVI-A (*Clover phyllody*) (Clover proliferation group-Clover proliferation) بودند.

واژه‌های کلیدی: آرفال‌پی، پی‌ال‌آروی، پی‌سی‌آر، سرارغوانی، فیتوپلازما

مقدمه

سرارغوانی همراه با تشکیل غده‌های هوایی، ریزبرگی، زردی و لوله‌ای شدن برگ‌ها در مزارع سیب‌زمینی قابل مشاهده است که عوامل بیماری‌زای متعددی به عنوان عامل این بیماری گزارش شده است. ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی، فیتوپلاسمای پژمردگی سرارغوانی و قارچ *Rhizoctonia solani* از مهمترین این عوامل هستند (۲). نشانه مشخصه آلودگی فیتوپلاسمایی شامل پژمردگی و سرارغوانی شدن بوته و تورم جوانه‌های واقع در قاعده دم‌برگ‌ها، رشد زیگزاگ ساقه و جوانه‌های میانی و ظهور غده‌های هوایی است. گیاهان در پاسخ به حمله پاتوژن طیف گسترده‌ای از نشانه‌های بیماری را نشان می‌دهند. معمولاً نشانه‌های بنفش یا ارغوانی شدن برگ‌های گیاهان آلوده، نشان دهنده آلودگی میزبان به عوامل فیتوپلاسمایی است. تجمع و بیوسنتز آنتوسیانین در بافت‌های آلوده، رنگ ارغوانی را ایجاد می‌کند که با کاهش مرگ سلول‌های برگ ناشی از آلودگی فیتوپلازما همراه است. علاوه بر این، آلودگی فیتوپلاسمایی منجر به فعال شدن مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین و تجمع چشمگیر ساکارز در حدود ۱۰۰۰ برابر

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از محصولات مهم غذایی دنیا است که در بیشتر از ۱۴۰ کشور جهان تولید می‌شود. سیب‌زمینی ارزش غذایی بالایی داشته و علاوه بر مصارف غذایی مستقیم در تهیه نشاسته و سایر مواد صنعتی و حتی علوفه استفاده می‌شود. عوامل بیماری‌زای متعددی از جمله عوامل قارچی، ویروسی و پروکاریوتی قادر به ایجاد بیماری در سیب‌زمینی هستند. عارضه

۱- مربی پژوهشی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران

*- نویسنده مسئول: (Email: bagherisa78@gmail.com)

۲- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چهارمحال و بختیاری، ایران

می‌شود که می‌تواند مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین را فعال کند. این اولین مطالعه برای نشان دادن نقش و مکانیسم نشانه‌های ارغوانی بنفش در تعامل گیاه-فیتوپلازما است (۹).

شانکر رایزوکتونیا هم روی ساقه زیرزمینی توسط قارچ رایزوکتونیا ایجاد می‌شود و می‌تواند زردی و ارغوانی شدن برگ‌ها و غده هوایی ایجاد کند اما نشانه مشخصه آن ظهور زخم‌های قهوه‌ای رنگ روی ساقه زیرزمینی است. PLRV هم می‌تواند منجر به زردی و ارغوانی شدن برگ‌های انتهایی شود که نشانه نکرور شبکه‌ای غده ایجاد می‌کند ولی این نشانه‌ها توسط قارچ *Verticillium* و استرس‌های محیطی مثل گرما هم می‌تواند ایجاد شود. برخی عوامل مثل توکسین‌های حاصل از تغذیه حشرات نظیر پسیل سیب‌زمینی هم نشانه‌های سرارغوانی در سیب‌زمینی ایجاد می‌کند (۱۵). پژمردگی سرارغوانی سیب‌زمینی تاکنون از کشورهای متعددی از جمله روسیه، هند، مکزیک و کوبا، استرالیا، اسرائیل، ترکیه، فرانسه، ایتالیا، آمریکا، ژاپن و کره گزارش شده‌است و در برخی کشورها از جمله مکزیک خسارت بالایی ایجاد می‌کند (۵). به طور کلی فیتوپلازماهای سیب‌زمینی به دو گروه عمده *witches broom* و *aster yellows* طبقه‌بندی می‌شوند (۳). تشخیص عوامل فیتوپلازمایی با روش‌های مختلف از جمله سرولوژی، هیبریداسون DNA، PCR و Nested PCR و real-time PCR انجام می‌شود. برش آنزیمی محصول PCR قطعات تکثیر شده از 16SrDNA با آنزیم‌های محدود کننده می‌تواند گروه‌های فیتوپلازماها را از هم تفکیک کند. برخی از گروه‌های توصیف شده بر این اساس عبارتند از *Potato witches broom* و *phytoplasma* که نشانه جاروک در بوته ایجاد می‌کنند که با غده و زنجرفک *Scleroracis spp.* منتقل می‌شود. برخلاف فیتوپلازماهای گروه زردی مینا، این گروه فیتوپلازما اغلب با غده منتقل می‌شوند. گروه ۲ و ۳ *Potato marginal flavescence* و *Potato purple top roll phytoplasma* می‌باشند، این دو فیتوپلازما از هند گزارش شده‌اند. *Purple top roll* در هند عامل ایجاد سرارغوانی گزارش شده است که توسط زنجرفک *Orosius albicinctus* منتقل می‌شود و زنجرفک ناقل بیشتر روی علف‌های هرز *Trifolium sp.*، *Lolium* و *Crotalaria* تکثیر می‌شود و *T. repens* به عنوان منبع پایداری این فیتوپلازما گزارش شده است که در این میزبان هم قرمز و ارغوانی شدن برگ‌ها و کوتولگی دیده می‌شود (۱۲). بررسی دامنه میزبانی فیتوپلازما عامل زردی، جاروک و سرارغوانی در هند نشان داد این فیتوپلازما قادر به آلوده کردن ۸۸ گونه متعلق به ۲۰ جنس و ۸ خانواده است که شدت بیماریزایی فیتوپلازما عامل سرارغوانی سیب‌زمینی بیشتر از تیپ جاروک و زردی است (۱۷). گروه *Potato phyllody phytoplasma* از برخی جنبه‌ها شبیه دو فیتوپلازما گزارش شده از هند است ولی با داشتن تفاوت‌هایی از آنها متمایز است. گروه *Potato stolbur phytoplasma*، که از کشورهای

اروپایی گزارش شده‌است، در فلفل و بادنجان باعث ریزبرگی می‌شوند. میزان شیوع این بیماری در ترکیه تا ۸۶٪ گزارش شده‌است. گروه دیگر فیتوپلازماها *Potato purple top wilt phytoplasma* از آمریکای شمالی به عنوان عامل پژمردگی انتهایی در سیب‌زمینی گزارش شده‌اند. فیتوپلازما پژمردگی سرارغوانی سیب‌زمینی (*potato purple top wilt phytoplasma*) متعلق به گروه *Aster yellows phytoplasma* می‌باشد. این بیماری با نام‌های برگ قاشقی انتهایی، پژمردگی انتهایی، کوتولگی سرارغوانی، زردی انتهایی و کپه‌ای شدن انتهایی هم نام برده شده است. عموماً این فیتوپلازماها با غده قابلیت انتقال ندارند و عمده‌ترین زنجرفک‌های ناقل آنها نیز *Macrosetes sp.* و *Hyalesthes spp.* می‌باشد. ناقل پس از اخذ عامل بیماری در همه عمر خود قادر به انتقال بیماری است. بنابراین بروز اپیدمی فیتوپلازما در مزارع سیب‌زمینی به وجود منبع آلودگی در نزدیکی مزارع سیب‌زمینی و فعالیت و جمعیت زنجرفک ناقل دارد. کاربرد یک حشره‌کش در زمان مناسب مهاجرت جمعیت زنجرفک می‌تواند به سهولت منجر به کنترل بیماری شود (۱۲). جدایه‌ای از فیتوپلازما در آمریکا مشاهده شده که تحت عنوان *Beet leaf hopper transmitted virescence agent (BLTVA)* شناخته می‌شود و نشانه‌های سرارغوانی، لوله برگی و کوتولگی و تشکیل غده هوایی در سیب‌زمینی ایجاد می‌کند. بررسی بوته‌های آلوده به این فیتوپلازما نشان داده‌است ۶۸٪ بوته‌های آلوده تولید غده‌های آلوده می‌کنند. آلودگی به گونه‌ای است که در برخی بوته‌ها غده‌های سالم و آلوده به صورت توأم تولید می‌شوند. ۳۵٪ غده‌های آلوده ایجاد بوته‌های آلوده کرده است. بدین معنا که در این فیتوپلازما انتقال با غده وجود دارد (۱۶). اغلب جدایه‌های فیتوپلازمایی در مناطق مختلف نشان داد که متعلق به گروه *16SrVI-A* و *16SrVI* (group subgroup A Clover proliferation) هستند که این زیر گروه مشتمل بر گروه‌های *Clover proliferation*، *potato witches broom* و *vinca virescence* است (۱۲). بلالی و همکاران بیماری سرارغوانی را از استان چهارمحال و بختیاری و اصفهان گزارش، و خسارت بیماری را تا ۱۵ درصد برآورد کردند و قابلیت انتقال آن با پیوند را نشان دادند (۱). تاکنون از ایران گروه‌های فیتوپلازمایی *Phytoplasma solani*، *Phytoplasma asteries* و *Phytoplasma trifolii* بعنوان عامل بیماری سرارغوانی سیب‌زمینی گزارش شده است (۱۰).

از دیگر عوامل ایجادکننده زردی و ریزبرگی در سیب‌زمینی ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی (PLRV) است که خسارت آن تا ۹۰٪ کل محصول می‌تواند باشد. شدت نشانه‌های ایجاد شده توسط PLRV بسته به رقم و شرایط محیطی دارد. در شرایط مزرعه لوله‌ای شدن برگ و ارغوانی شدن توسط عوامل متعدد دیگری هم به غیر از این ویروس ایجاد می‌شود چرا که این نشانه‌ها نتیجه اختلال در انتقال

ضد عفونی سطحی شدند و پس از دوبار شستشو در آب مقطر، قطعاتی به اندازه ۲-۱ میلی‌متر از حد فاصل بافت‌های سالم و آلوده شانکرهای موجود روی ساقه‌های زیرزمینی و پوسیدگی‌های ریشه روی محیط کشت سیبزمینی، دکسترز و آگار کشت، و پس از چهار روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، قارچ‌های رشد کرده به روش نوک ریشه خالص سازی و به محیط کشت جدید منتقل شدند. جدایه‌های مختلف قارچی بر اساس شکل و رنگ کلونی دسته‌بندی و سپس مورد شناسایی قرار گرفتند.

اثبات بیماری زایی جدایه‌های مختلف قارچی: برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچی جدا شده از نمونه‌های ریشه سیبزمینی با نشانه‌های سرارغوانی که دارای نشانه‌های شانکر ساقه زیرزمینی و پوسیدگی ریشه هم بودند، از بذر گندم استفاده شد. برای این منظور ۲۰۰-۱۰۰ گرم بذر گندم در ارلن اتوکلاو شده و ۴-۳ قطعه به قطر ۵ میلی‌متر از هر جدایه روی بذر درون هر ارلن قرار داده شد. مایه‌زنی روی ارقام سیبزمینی مارفونا و آگریا در شرایط گلخانه انجام شد. کنار هر بوته سیبزمینی رشد کرده در گلخانه ۴-۵ بذر گندم آلوده شده به قارچ قرار داده شد. بوته‌های مایه‌زنی شده در شرایط معمولی نگهداری و ۴-۳ هفته پس از مایه‌زنی، ظهور نشانه‌ها بررسی شدند. از هر جدایه قارچ، سه گلدان هر یک حاوی ۳-۲ ساقه سیبزمینی مایه‌زنی شدند. نمونه‌هایی از گیاهان دارای نشانه بیماری در گلخانه دوباره کشت داده شد و وجود قارچ مایه‌زنی شده مورد بررسی قرار گرفت.

ردیابی ویروس برگ قاشقی سیبزمینی (PLRV) در گیاهان دارای نشانه‌های سرارغوانی: همه نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای نشانه‌های سرارغوانی همراه با نشانه‌های دیگر از جمله برگ قاشقی، ریز برگی و زردی با آزمون الیزا و با استفاده از آنتی‌سرم چند همسانه‌ای اختصاصی PLRV خریداری شده از منابع خارجی (شرکت DMSZ آلمان) مورد بررسی قرار گرفتند. از هر نمونه یک گرم بافت انتخاب و با استفاده از بافر معمولی (PBST+PVP) عصاره‌گیری شدند. الیزا به روش مستقیم (DAS-ELISA) با تغییراتی انجام شد (۲ و ۴).

ردیابی عوامل فیتوپلاسمایی در گیاهان سیبزمینی و علف‌های هرز

انتقال با پیوند: نمونه‌هایی از گیاهان با نشانه‌های سرارغوانی زردی و لوله برگی شدن انتهایی بوته و تشکیل غده هوایی به طور تصادفی از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده انتخاب و در شرایط گلخانه روی گوجه‌فرنگی حاصل از بذر پیوند زده شدند. دو نمونه از گوجه فرنگی‌های دارای نشانه‌های تورم جوانه و فیلودی، پیچیدگی برگ و کوتولگی بوته نیز به گوجه‌فرنگی سالم در شرایط گلخانه پیوند زده

مواد در آوندهای آبکش است. ریزبرگی، زردی حاشیه برگ و بین رگبرگ‌ها، نکروز شبکه‌ای غده و لوله‌ای شدن برگ از نشانه‌های PLRV است (۱۲).

یکی دیگر از عوامل ایجاد زردی و تشکیل غده‌های هوایی در سیبزمینی قارچ *Rhizoctonia solani* می‌باشد که سبب بیماری شانکر ریزوکتونیایی در سیبزمینی می‌شود. این قارچ اسکروت‌هایی روی سطح غده و شانکرهای قهوه‌ای رنگی روی ساقه زیرزمینی سیبزمینی ایجاد می‌کند که می‌تواند منجر به مرگ بوته شود. دمای خنک و رطوبت خاک در زمان کاشت موجب خسارت بیشتر این قارچ می‌شود (۱۸). غده‌های هوایی ایجاد شده توسط ریزوکتونیا اغلب در قاعده ساقه سیبزمینی تشکیل می‌شوند که وجه تمایز آن با سایر عوامل ایجاد کننده غده‌های هوایی است. علاوه بر این روی ساقه زیرزمینی آلوده به ریزوکتونیا شانکرهای قهوه‌ای رنگ تشکیل می‌شود. شانکرها روی ساقه سیبزمینی ابتدا قرمز مایل به قهوه‌ای هستند که به تدریج بزرگ شده به رنگ قهوه‌ای درمی‌آیند و در صورت به هم پیوستن، جریان آب و کربوهیدرات در گیاه را قطع می‌کنند. ممانعت از انتقال نشاسته در صورت رشد شانکرها و به هم پیوستن آنها در اواخر فصل رشد روی می‌دهد که موجب پدید آوردن غده‌های سبز و کوچک در محل انشعاب دمبرگ‌ها، که اصطلاحاً غده هوایی گفته می‌شوند که معمولاً نزدیک سطح خاک تشکیل می‌شوند (۱۸). در این تحقیق پراکنش بیمارگرهای همراه با سرارغوانی سیب زمینی در استان‌های چهارمحال و بختیاری، فارس و همدان بررسی و نقش عوامل مختلف بیماری‌زا در مناطق مختلف و درجه اهمیت بسته به رقم سیبزمینی و منطقه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: بوته‌های سیبزمینی با نشانه‌های سرارغوانی، زردی و ریزبرگی و لوله‌ای شدن برگ‌های بالای بوته، پژمردگی و غده‌های هوایی از استان‌های همدان، چهارمحال و بختیاری و فارس (۱۳۸۵-۱۳۸۹) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌هایی از علف‌های هرز حاشیه مزارع دارای نشانه‌های فیلودی، زردی و کپه‌ای و گیاهان یونجه دارای نشانه‌های جاروک نیز جمع‌آوری گردید. بوته‌های مختلف سیبزمینی در آزمایشگاه بر حسب منطقه نمونه‌برداری، رقم، نوع نشانه‌ها، وجود شانکر روی ساقه زیرزمینی و وجود پوسیدگی در ریشه تفکیک، و نمونه‌های ریشه برای بررسی عامل شانکر یا پوسیدگی و نمونه‌های برگ برای بررسی وجود نشانه‌های فیتوپلاسمایی و PLRV جداگانه نگهداری شدند.

بررسی نشانه‌های ریشه و جداسازی قارچ‌های عامل شانکر و پوسیدگی: نمونه‌های ریشه پس از شستشو با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم تجاری (وایتکس) ۵٪ به مدت پنج دقیقه

شد. شاخه‌های کوتاه جانبی برای پیوند مورد استفاده قرار گرفت و محل پیوندک با پارافیلیم بسته شده و گیاه پیوند شده به مدت یک هفته زیر پوشش پلاستیک قرار گرفت. گیاهان پیوند زده شده به مدت ۱ تا ۲ ماه نگهداری شده و پس از آن ظهور نشانه‌ها در آنها مورد بررسی قرار گرفتند.

انتقال با سس: بذرهای سس روی کاغذ صافی مرطوب درون تشتک قرار داده شدند و پس از جوانه‌زنی، روی بادنجان آلوده قرار گرفتند. پس از استقرار سس روی گیاهان آلوده بادنجان، شاخه‌هایی از سس روی گیاه سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی عاری از آلودگی پیوند شدند. پس از یک ماه، ارتباط بین گیاه سالم و آلوده قطع شده و گلدان‌های سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه به منظور بررسی ظهور نشانه‌ها نگهداری شدند.

بررسی وجود عامل فیتوپلاسمایی به روش PCR: همه نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع مختلف در آزمون PCR به منظور بررسی وجود عامل فیتوپلاسمایی در آنها مورد بررسی قرار گرفتند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، ۰/۳ گرم از بافت برگ و ریشه گیاهان دارای نشانه بیماری انتخاب و پس از شستشوی سطحی با مایع ظرفشویی رقیق شده و دوباره آبکشی با آب مقطر و خشک کردن نمونه‌ها انجام شد. بافت با استفاده از ازت مایع پودر شده و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA به روش Hot CTAB با تغییراتی انجام شد (۶). پودر حاصل از خرد کردن بافت در ازت مایع به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB شامل (20 mM EDTA, 0.2 % و ۱.۴ mM NaCl و 2ME , 1% PVP, 100 mM Tris, pH 8 آن اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه Dry (Hot) Block قرار داده و در حین نگهداری چند بار به هم زده شدند. به نمونه‌ها ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم-ایزوپانل الکل با نسبت ۲۴:۱ اضافه و به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری و در این فاصله چند بار به هم زده شدند. نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و روشن‌ترین به دقت، جدا شده و به لوله‌های جدیدی منتقل و به اندازه هم حجم محلول کشیده شده به آنها ایزوپروپانول کاملاً سرد (نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد) اضافه شد. پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ، به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی دور ریخته شده و رسوب با اتانول ۸۰٪ شسته شده و پس از خشک شدن الکل در معرض هوا، به رسوب حاصل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شده و رسوب یک شب در یخچال نگهداری شد تا DNA حل شود. آماده نهایی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و برای استفاده در مراحل بعد نگهداری شد. آماده حاصل به عنوان Template در PCR مورد استفاده قرار گرفت. PCR به روش Nested-PCR با استفاده از آغازگرهای P1/P7 و سپس

PCR R16F2n/ R16R2 انجام شد (۴، ۵، ۶، ۸ و ۹). واکنش PCR حجم کلی ۲۰ میکرولیتر (0.6 μl , 0.5 μl 10mM dNTP mix , 1μlTaq polymerase , 2μl 10 X buffer 50mM MgCl₂ , 25 pmol each primer , 1μl template DNA سترون تا رسیدن به حجم ۲۰ میکرولیتر) انجام شد. واکنش در دستگاه PCR مدل AutoQ Life Cyclor در ۳۵ سیکل (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه در اولین سیکل) ۶۰ ثانیه در ۵۸ درجه (۵۵ درجه سانتی‌گراد در دور دوم PCR) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۱۰ دقیقه در آخرین سیکل) انجام شد. محصول دور اول PCR به نسبت ۸۰:۲۰ رقیق شده و ۲/۵ میکرولیتر آن به عنوان Template در دور دوم استفاده شد. یک نمونه از گوجه‌فرنگی سالم رشد کرده در شرایط گلخانه به عنوان نمونه منفی و نمونه پروانش آلوده شده در گلخانه (تهیه شده از دکتر صالحی- مرکز تحقیقات کشاورزی فارس) به عنوان نمونه مثبت استفاده شد. محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز (در بافر TBE و ولتاژ ۸۰) شد و با محلول اتیدیوم بروماید (غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر درون آب مقطر) رنگ‌آمیزی شد و در دستگاه ژل داگومنتیشن ظهور باند مورد بررسی قرار گرفت (۶).

مقایسه جدایه‌های فیتوپلاسمای سیب‌زمینی و علف‌های هرز

حاشیه مزارع با روش RFLP

آزمون RFLP با برش محصول PCR دور دوم تکثیر شده با پرایمرهای R16F2n/R16R2 با ۷ آنزیم محدود کننده انجام شد. در این مرحله ۱۵ نمونه سیب‌زمینی (سه نمونه از استان همدان و ۱۲ نمونه از استان چهارمحال و بختیاری) متعلق به ارقام مختلف مناطق مختلف و دارای نشانه‌های مختلف انتخاب و مورد مقایسه قرار گرفتند. چهار نمونه یونجه دارای نشانه‌های جاروک، یک نمونه سنگ دارای نشانه‌های فیلودی، یک نمونه گوجه‌فرنگی دارای نشانه‌های فیلودی و تورم جوانه، یک نمونه گوجه‌فرنگی دارای پیچیدگی شدید برگ و کوتوله یک نمونه تاجریزی دارای نشانه‌های زردی و ریزبری مورد مقایسه قرار گرفتند. برش آنزیمی با استفاده از ۷ آنزیم محدود کننده شامل *KpnI* و *AluI* *MseI* *HhaI* *HaeIII* *HpaII* *RsaI* انجام شد. برای انجام برش آنزیمی، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱-۲ میکرولیتر آنزیم (۱۰ یونیت)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X و ۱۸ میکرولیتر آب مقطر سترون مخلوط و پس از به هم زدن نمونه به مدت ۲۴ ساعت (۳۸ ساعت برای *AluI*) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه Dry Block نگهداری شد. محصول برش یافته در ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد درون بافر TBE و در ولتاژ ۸۰-۹۰ الکتروفورز شد و الگوی برش یافته جدایه‌های مختلف سیب‌زمینی و علف‌های هرز با یکدیگر و با الگوهای توصیف شده (۶ و ۱۰) مقایسه

پوسیدگی قارچی در قسمت ریشه همراه بودند که قارچ رایزوکتونیا بیشترین فراوانی را داشت. بوته‌های دارای پوسیدگی در قسمت ریشه و ساقه زیر زمینی به طور کلی دارای نشانه‌های غده هوایی در قسمت قاعده و ساقه هوایی بودند. در بررسی نمونه‌های دارای نشانه‌های ریشه از جمله شانکر ساقه زیرزمینی و پوسیدگی ریشه قارچ‌های *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani*، *Colletotrichum sp.* و *oxysporom* جدا شدند. مایه‌زنی قارچ‌های فوق در شرایط گلخانه به سیب‌زمینی منجر به مرگ و خشکیدگی بوته شده و بروز نشانه‌های سرارغوانی با تشکیل غده هوایی دیده نشد. مایه‌زنی بوته‌هایی که دو ماه از سبز شدن آنها در شرایط گلخانه گذشته بود نیز منجر به مرگ بوته شد و نشانه‌های سرارغوانی یا سایر نشانه‌ها مشاهده شده در شرایط مزرعه ایجاد نشد. به نظر می‌رسد بروز چنان نشانه‌هایی تنها در شرایط مزرعه امکان‌پذیر باشد (شکل‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵).

وقوع آلودگی PLRV نیز در برخی بوته‌های دارای نشانه‌های سرارغوانی و ریزبرگی و لوله‌برگی شدن انتهای دیده می‌شد که نشانه‌های آلودگی به این ویروس در ارقام مختلف تنوع نشان می‌دهد. در برخی بوته‌ها آلودگی همراه با زردی و زوال بوده و در برخی لوله‌برگی شدن و سرارغوانی مشاهده شد. در هیچ موردی نشانه‌های تشکیل غده هوایی در بوته‌های دارای آلودگی به این ویروس مشاهده نشد. نمونه‌های همراه با شانکر ساقه و پوسیدگی ریشه در انتقال با سس و پیوند در شرایط گلخانه به گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی هیچ‌گونه نشانه‌هایی در گیاهان سالم ایجاد نکرد. ولی نمونه‌های دارای آلودگی به PLRV قابلیت انتقال به سیب‌زمینی را داشت و نشانه‌های زردی و لوله‌برگی خفیف در گلخانه در گیاهان پیوند شده ایجاد کرد. واکنش گیاهان پیوند شده در آزمون الیزا هم مثبت بود. آن دسته از نمونه‌های دارای نشانه‌های سرارغوانی و غده هوایی در گیاه که فاقد هر گونه نشانه‌های شانکر ساقه زیرزمینی و پوسیدگی ریشه بودند و در آزمون الیزا هم با PLRV واکنش مثبت نداشتند، با سس و پیوند در شرایط گلخانه به گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی منتقل شدند. این گیاهان در سیب‌زمینی پیوند شده نشانه‌های مشخص زردی، ریزبرگی و لوله‌برگی و سرارغوانی در شرایط گلخانه ایجاد کردند ولی تشکیل غده هوایی در شرایط گلخانه مشاهده نشد. بررسی غده‌های حاصل از بوته‌های دارای نشانه‌های سرارغوانی، پس از سپری شدن دوره خواب نشان داد تنها تعداد محدودی از این غده‌ها نشانه‌های موئی شدن جوانه را نشان می‌دهد. این وضعیت می‌تواند به دلیل بروز این نشانه‌ها تنها در برخی از غده‌های حاصل از یک بوته آلوده باشد ولی انتخاب بوته‌ها بر حسب نشانه‌ها و عدم اطمینان از آلودگی به فیتوپلازما هم می‌تواند دلیل آن باشد.

بررسی نمونه‌های دارای نشانه‌های سرارغوانی با آزمون PCR به منظور ردیابی وجود عوامل فیتوپلازمایی با دو جفت پرایمر P1/P7 و

و گروه فیتوپلازما شناسایی گردید. از محصول برش یافته ۵ میکرولیتر با ۳ میکرولیتر Loading buffer و ۴ میکرولیتر آب مقطر مخلوط و درون هر چاهک ریخته شد. DNA ladder، ۱۰۰ bp به- عنوان مارکر استفاده شد. پس از الکتروفورز ژل در محلول ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با دستگاه ژل داگمنتیشن عکسبرداری شد. باند فیتوپلازمایی پس از تکثیر نمونه های دارای نشانه‌های سرارغوانی مربوط به استان فارس با پرایمرهای R16F2n/R16R2 خالص سازی شد و برای تعیین ترادف به شرکت سرویس دهنده (ماکروژن) ارسال شد. توالی مربوطه در پایگاه اطلاعاتی NCBI با سایر نمونه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نمونه‌های سیب‌زمینی با نشانه‌های پژمردگی همراه با ریزبرگی، زرد یا ارغوانی برگچه‌های انتهایی، لوله‌ای شدن برگ‌ها و ظهور غده های هوایی در قسمت قاعده بوته نزدیک سطح خاک یا در جوانه‌های جانبی قاعده دمبرگ‌ها از مناطق مختلف استان‌های چهارمحال و بختیاری همدان و فارس جمع‌آوری و بررسی شدند. نشانه‌ها در رقم مارفونا بیشتر شامل ظهور غده‌های هوایی و زردی بوده و در اغلب بوته‌ها شانکر ساقه زیرزمینی هم دیده می‌شد اما کمتر نشانه‌های سرارغوانی قابل مشاهده بود. نشانه‌های بیماری در ارقامی نظیر اگریا، دیامونت، مارادونا، سانت، راجا، نایتا و کوزیما سرارغوانی همراه با ظهور غده‌های هوایی کوچک در برخی بوته‌ها، ریزبرگی و رزت برگ های انتهایی و زوال و پژمردگی بوته بود. برخی ارقام نشانه‌های جاروک بوته، کپه‌ایی، انبوه و موئی شدن ریشه داشتند. نشانه‌های متنوعی از جمله جاروک، فیلودی و ریزبرگی و کپه‌ایی در علف‌های هرز حاشیه مزارع سیب‌زمینی از جمله قاصدک، شنگ، تاجریزی، ترب وحشی و گوش فیل جاروک و ریزبرگی در یونجه دیده‌شد. میزان شیوع نشانه‌های بیماری در مناطق مختلف متفاوت بود. نشانه‌های زردی و تشکیل غده‌های هوایی در رقم نایتا در اواخر فصل رشد زیاد دیده شد. وجود آلودگی به قارچ رایزوکتونیا، سایر قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه (در نمونه‌های دارای نشانه‌های پوسیدگی ریشه)، PLRV و عوامل فیتوپلازمایی در نمونه‌های مختلف به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده وقوع هر سه عامل در نمونه‌های دارای نشانه‌های سرارغوانی بود. برخی نمونه‌ها دارای نشانه‌های آلودگی توام به عوامل بیمارگر بودند. تعداد ۳۵ نمونه آلودگی توام به فیتوپلازما و قارچ، ۶ نمونه آلودگی توام به فیتوپلازما و ویروس و ۱۵ نمونه دارای آلودگی توام به ویروس و قارچ های مختلف بودند. پنج درصد نمونه‌ها با وجود نشانه‌های سرارغوانی و غده هوایی فاقد آلودگی به هر سه عامل بیمارگر بودند. بیشترین تعداد نمونه‌های دارای نشانه‌های سرارغوانی و تشکیل غده هوایی با

برگ‌ها و تشکیل غده‌های هوایی از لحاظ عامل در سه گروه آلوده به ویروس برگ قاشقی سیب‌زمینی، پوسیدگی ریشه (در بیشتر موارد قارچ رایزوکتونیا) و فیتوپلازما قرار می‌گرفتند که در برخی نمونه‌ها آلودگی توام به عوامل فوق هم دیده می‌شد. آلودگی به عوامل فیتوپلازمایی قبلاً نیز از استان‌های چهارمحال و بختیاری، اصفهان و همدان گزارش شده و میزان آلودگی تا ۱۵٪ بر اساس انتقال با پیوند برآورد شده است (۱).

به روش nested-PCR با R16F2n/R16R2 صورت گرفت. در برخی نمونه‌ها یک باند ۱/۸ kb در دور اول PCR با پرایمرهای P1/P7 تکثیر شد ولی در برخی نمونه‌ها تنها در دور دوم (nested) یک باند به اندازه ۱/۲ kb تکثیر شده بود (شکل ۶). آلودگی PLRV در برخی بوته‌های جمع‌آوری شده دارای نشانه‌های لوله برگ‌گی و سرارغوانی شدن با آزمون الیزا ردیابی شد که در بیشتر این بوته‌ها نشانه‌های پژمردگی و غده هوایی دیده‌نمی‌شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای نشانه‌های سرارغوانی با وجود داشتن نشانه‌های سرارغوانی شدن



شکل ۱- نشانه‌های همراه با نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزرعه A: سرارغوانی، ریزبرگی و پژمردگی بوته B: پژمردگی بوته در اثر قارچ‌های مولد پوسیدگی ریشه C: زردی و ریز برگ‌گی همراه با ظهور غده‌های هوایی D: غده‌های هوایی E: رشد زیکزاک ساقه و تورم جوانه‌ها در قاعده دم‌برگ‌ها F: ریزبرگی، ارغوانی شدن برگ‌ها و زوال بوته

Figure 1- Symptoms with samples collected from the field, A: Purple, stubborn and wilting of the plant, B: Plant wilting due to root rot fungi, C: Yellowing and stubborn with the appearance of aerial tubers, D: Aerial tubers, E: Stem curly top growth and bud swelling at the base of the petioles, F: Stubborn, purple leaves and plant decay



شکل ۲- A: شانکر روی ساقه زیرزمینی B: نشانه‌های پوسیدگی ریشه همراه با ظهور غده‌های هوایی در قاعده بوته C: پژمردگی، زردی و خشکیدگی برگ‌ها که عمدتاً در اثر عوامل قارچی مولد پوسیدگی ایجاد می‌شود

Figure 2- A: Canker on the underground stem, B: Symptoms of root rot associated with the appearance of aerial glands at the base of the plant, C: Wilting, yellowing and necrotic of leaves, which is mainly caused by fungal agents that cause rot



شکل ۳- نشانه‌های ایجاد شده توسط عوامل فیتوپلاسمایی. A: ریز برگی، پیچیدگی بوته، ارغوانی شدن برگ‌ها و ظهور غده‌های هوایی در قسمت‌های بالایی گیاه، B: غده‌های هوایی، C: رشد جوانه‌های قاعده دم‌برگ و ارغوانی شدن آنها، D: رشد غده‌های هوایی توام با پوسیدگی ریشه، E: چین‌دار شدن برگ و ارغوانی شدن آن، F: ریز برگی، تورم جوانه و فیلودی

Figure 3- Symptoms caused by phytoplasma agents, A: Stubby, plant curly top, purple leaves and the appearance of aerial tubers in the upper parts of the plant, B: Aerial tubers, C: The buds at the base of the petiole grow and turn purple, D: Aerial tubers growth associated with root rot, E: Wrinkles and purple leaves, F: Stubby, bud swelling and phyllody



شکل ۴- A: موی شدن و انبوهی ریشه در بوته سیب‌زمینی رقم راجا آلوده به فیتوپلازما، B: کوتولگی بوته (سمت راست) در مقایسه با گیاه سالم (سمت چپ)

Figure 4- A: Hair growth and root mass in potato plant of Raja cultivar infected with phytoplasma, B: dwarf (right) compared to healthy plant (left)

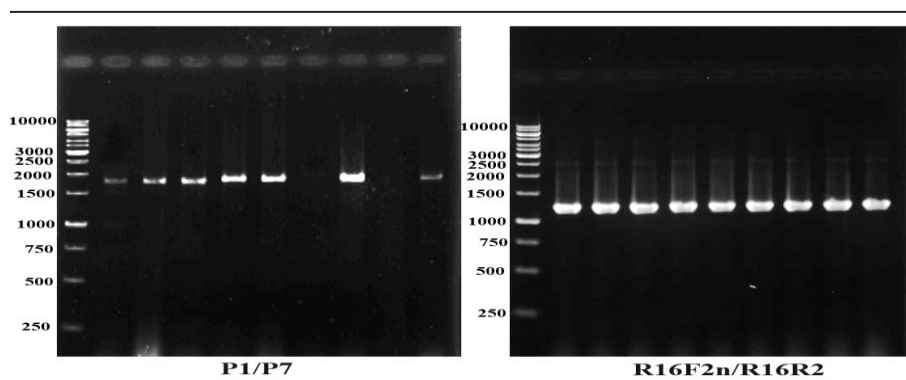


شکل ۵- نشانه‌های آلودگی به فیتوپلازما در برخی علف‌های هرز حاشیه مزارع سیب‌زمینی A: فیلودی و ریزبرگی در شنگ (*Tragopogon graminifolius*) B: فیلودی و بد شکلی برگ‌ها و کوتولگی در علف هرز گوش فیل (*Conringia orientalis*)

Figure 5 - Symptoms of phytoplasma infection in some weeds on the margins of potato fields, A: Stubby and phyllody in Sheng (*Tragopogon graminifolius*), B: phyllody and deformed leaves and dwarfism in elephant ear weeds (*Conringia orientalis*)

فیلودی و یک نمونه گوش فیل با نشانه‌های فیلودی وریزبرگی انجام شد. مقایسه الگوهای برشی نشان داد حداقل دو گروه فیتوپلاسمایی در نمونه‌های سیب‌زمینی وجود داشت (شکل ۷). مقایسه این الگوها با الگوهای توصیف شده لی و همکاران (۱۹۹۸) نشان می‌دهد نمونه‌های سیب‌زمینی متعلق به گروه‌های (Aster yellows) 16SrII-B (group) و 16SrXII-A (Stolbur group) می‌باشند (۱۲) و (۱۳). نمونه‌های یونجه همگی دارای الگوی مشابه و متعلق به گروه 16SrXII-A (Stolbur group)، نمونه شنگ متعلق به گروه 16SrI-C (Aster yellows group-clover phyllody) و گوش فیل متعلق به گروه 16SrVI-A (Clover proliferation group) بودند (شکل ۸). نتایج این مقایسه و تشابه گروه آلوده‌کننده سیب‌زمینی با نمونه‌های فیتوپلاسمای یونجه نشان می‌دهد حداقل این گیاه می‌تواند منبع پایداری برای این بیماری محسوب شود. تعیین ترادف جدایه‌های فارس نیز همه جدایه‌های فیتوپلاسمای را در گروه 16SrII-A قرار داد. نمونه‌های استان همدان نیز همگی در گروه 16SrXII-A قرار گرفتند.

نتایج مطالعه اخیر نشان می‌دهد نشانه‌های توصیف شده مربوط به حداقل دو گروه فیتوپلاسمایی، PLRV و قارچ‌های خاکزاد به‌ویژه رایزوکتونیا می‌باشد که قارچ رایزوکتونیا و فیتوپلاسمای اهمیت بیشتری دارند. بیشترین میزان آلودگی به قارچ رایزوکتونیا در رقم مارفونا دیده می‌شد به نظر می‌رسد این رقم بیشترین حساسیت بین ارقام تجاری موجود به این قارچ را داشته‌باشد و عامل اصلی بروز علائم تشکیل غده هوایی در این رقم آلودگی به *Rhizoctonia* است ولی در سایر ارقام عوامل فیتوپلاسمایی و قارچی به نسبت تقریباً مساوی در بروز پژمردگی سرارغوانی نقش دارند. آلودگی به PLRV کمترین میزان فراوانی در بروز نشانه‌های سرارغوانی را دارد. هیچ موردی از همراهی این ویروس با نشانه‌های تشکیل غده هوایی دیده‌نشده. مقایسه الگوهای برشی محصول PCR تکثیر شده با پرایمرهای R16F2n/R16R2 با ۷ آنزیم محدود کننده برای ۱۵ نمونه انتخابی سیب‌زمینی با نشانه‌های مختلف سرارغوانی، زردی، تشکیل غده هوایی و کپه‌ایی، چهار نمونه یونجه با نشانه‌های جاروک از چهار منطقه استان چهارمحال و بختیاری، یک نمونه شنگ با نشانه‌های



شکل ۶- قطعه تکثیر شده به اندازه ۱/۸kb در برخی نمونه‌های سیب‌زمینی با استفاده از آغازگرهای P1/P7 (چپ) و قطعه تکثیر شده ۱/۲ kb در مرحله nested با آغازگرهای R16F2n/R16R2 با استفاده از PCR. لاین ۱، kb DNA Ladder، لاین ۲-۱۰، نمونه‌های سیب‌زمینی دارای نشانه‌های سرارغوانی

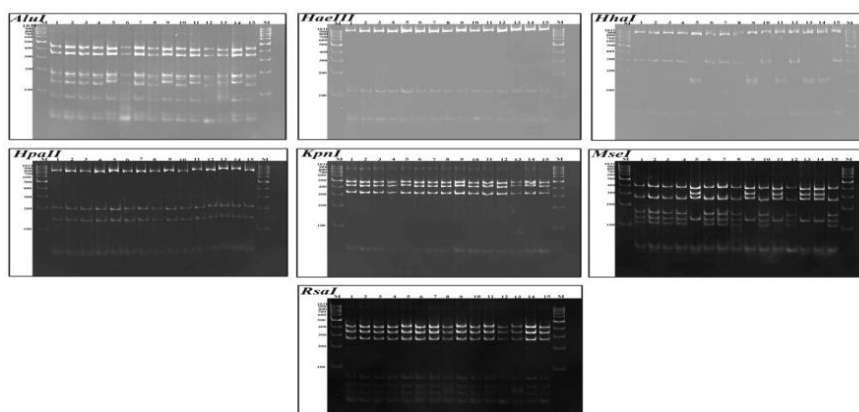
Figure 6- Duplicated piece to size 1.8 kb In some samples of potato using primers P1/P7(left) and duplicated piece 1.2 kb In the nested stage with primers R16F2n/R16R2 usage PCR line1, kb DNA Ladder, line 2-10, Potato samples with purple top symptoms

فیتوپلاسمای نشان می‌دهد علاوه بر فیتوپلاسمای، PLRV و رایزوکتونیا، قارچ‌های دیگر نیز می‌توانند در بوته‌های آلوده نشانه‌های سرارغوانی و غده‌های هوایی ایجاد کنند. تشکیل غده‌های هوایی در قسمت‌های بالا و قاعده دمبرگ‌ها به همراه تورم جوانه و سرارغوانی، بیشتر مربوط به نشانه‌های فیتوپلاسمای و تشکیل غده هوایی در قاعده بوته نزدیک خاک به همراه نشانه‌های پژمردگی بیشتر مربوط به عوامل پوسیدگی ریشه از جمله قارچ *Rhizoctonia* است. آلودگی PLRV همراه با لوله‌ای شدن برگ‌ها و ریز برگ‌های انتهایی و سرارغوانی شدن بدون تشکیل غده هوایی است. چنین نتایجی در

نتایج این بررسی نشان داد که عوامل فیتوپلاسمایی، PLRV و قارچ رایزوکتونیا می‌توانند سبب پژمردگی همراه با سرارغوانی شدن بوته، زردی، ریزبرگی، کپه‌ایی، انبوه شدن ریشه‌ها و ظهور غده‌های هوایی در محل انشعاب دمبرگ‌ها یا در قاعده بوته در ارقام مختلف سیب‌زمینی شوند. اگرچه نتایج مایه‌زنی قارچ‌های جدا شده از ساقه زیرزمینی و ریشه بوته‌های سیب‌زمینی دارای نشانه‌های ذکر شده منجر به پدید آمدن نشانه‌های مزرع‌ای نشد و تنها باعث خشک شدن بوته‌ها گردید ولی همراهی این قارچ‌ها با بوته‌های دارای نشانه‌های بیماری و عدم آلودگی این بوته‌ها به سایر عوامل از جمله

هیچگونه آلودگی به عوامل فیتوپلاسمایی، قارچ رایزوکتونیا و سایر قارچ‌های عامل پوسیدگی و PLRV نشان ندادند که نشان می‌دهد عوامل دیگری از جمله عوامل محیطی یا برخی آفات می‌توانند با اختلال در روند انتقال مواد غذایی به ریشه چنین نشانه‌هایی ایجاد کنند. فراوانی بالای آلودگی توام به فیتوپلاسمای ویروس با عوامل قارچی در نمونه‌های بررسی شده نیز می‌تواند به دلیل ایجاد حساسیت و ضعف در سیستم ریشه پس از آلودگی به عوامل فیتوپلاسمایی و PLRV و افزایش میزان پوسیدگی ریشه در اثر عوامل قارچی باشد.

سایر نقاط دنیا نیز به دست آمده‌است (۱۲ و ۱۷). حساسیت ارقام مختلف به این عوامل متفاوت است اما به نظر می‌رسد دلیل عمده زردی و تشکیل غده‌های هوایی در برخی ارقام نظیر مارفونا قارچ رایزوکتونیا باشد. آلودگی به فیتوپلاسمای در برخی ارقام نظیر ناویتا منجر به ظهور نشانه‌های غنچه درشت (big bud) و کوتولگی بوته و در برخی ارقام نظیر راجا و سانتانا، کپه‌ایی و انبوه شدن ریشه‌هاست. برخی ارقام نظیر ناویتا حساسیت بالایی به فیتوپلاسمای نشان می‌دهند و شدت آلودگی در این رقم در منطقه بروجن زیاد بود. برخی بوته‌ها دارای نشانه‌های شاخص سرارغوانی و غده هوایی مورد بررسی



شکل ۷- الگوی RFLP قطعه ۱/۲ kb تکثیر شده با پرایمرهای R16F2n/R16R2 پس از برش با آنزیم‌های محدودکننده *HaeIII*، *HpaII*، *RsaI*، *KpnI* و *AluI*، *MseI*، *HhaI* نمونه‌های انتخابی سیب‌زمینی. نمونه‌های ۳-۱ متعلق به استان همدان دارای علائم سرارغوانی و غده‌های هوایی (Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A)، نمونه‌های ۵، ۹ و ۱۳ دارای نشانه‌های زردی، ریز برگ و غده هوایی بدون سرارغوانی و نمونه‌های ۱۱ و ۱۴ سیب‌زمینی دارای نشانه‌های کوتولگی و ریز برگ همراه با مویی شدن و انبوهی ریشه متعلق به استان چهارمحال و بختیاری (Aster yellows group, 16SrI-B) و نمونه‌های ۷، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دارای نشانه‌های پژمردگی سرارغوانی همراه با ریز برگ و غده‌های هوایی کوچک در قاعده دمبرگ‌ها (Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A). (M=100bp DNA ladder, Fermentas).

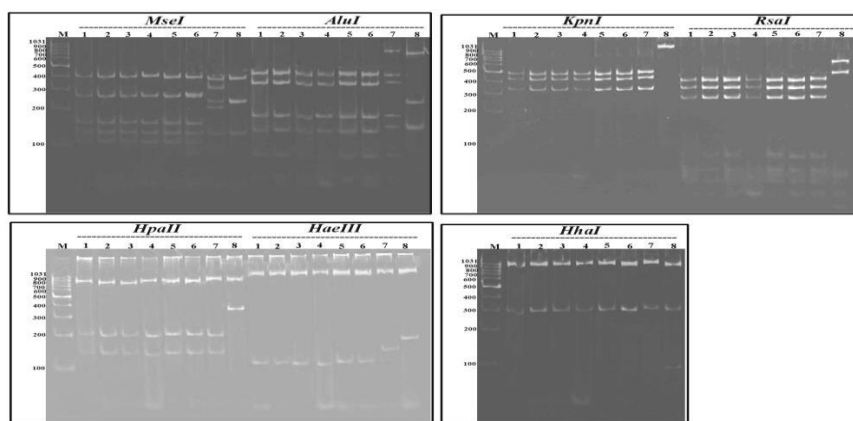
Figure 7- RFLP pattern of kb 1/2 amplified with R16F2n / R16R2 primers after cutting with restriction enzymes *RsaI*، *HpaII*، *HaeIII*، *HhaI*، *MseI*، *AluI* and *KpnI* Sample Selected Potatoes. Sample 1-3 belonging to Hamedan province with symptoms of purple top and airial tuber (Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A). Examples 5, 9, and 13 have symptoms stulborn and airial tuber without purple top symptoms and Samples 11 and 14 of Potato have dwarf symptoms and stulborn along with hairy and rooted belong to Chaharmahal and Bakhtiari province (Aster yellows group, 16SrI-B) and samples 4, 6, 7, 8, 10, 12 and 15 with wilting symptoms of purple top and stulborn at the base of the petioles) Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A. (M=100bp DNA ladder, Fermentas)

گرفتند. وجود تشابه گروه فیتوپلاسمایی نمونه‌های یونجه و سیب-زمینی نشان می‌دهد گیاه یونجه می‌تواند منبع پایداری فیتوپلاسمای سیب‌زمینی محسوب شود. وجود نشانه‌های متنوعی از جمله ریز برگ و زردی در گیاهان علف هرز دائمی احتمال وجود عوامل فیتوپلاسمایی مرتبط با فیتوپلاسمای سیب‌زمینی در این گیاهان را نشان می‌دهد. این گیاهان می‌توانند منبع پایداری برای فیتوپلاسمای سیب‌زمینی محسوب شوند که تحقیقات بیشتری می‌تواند در این زمینه انجام گیرد. اگر چه فیتوپلاسمای سیب‌زمینی

عوامل فیتوپلاسمایی متعددی از سیب‌زمینی با نشانه‌های سرارغوانی، تشکیل غده هوایی، پژمردگی و لوله برگ شدن، متعلق به گروه‌های 16SrI، 16SrII، 16SrVI، 16SrXII از مناطق مختلف دنیا گزارش شده است (۴، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). نتایج این تحقیق هم وجود فیتوپلاسمای متعلق به گروه‌های 16SrI-B، 16SrII-A و 16SrXII-A را در سیب‌زمینی دارای نشانه‌های سرارغوانی نشان می‌دهد که نمونه‌های استان‌های فارس در گروه 16SrII-A و نمونه‌های استان‌های چهارمحال و بختیاری و همدان در دو گروه دیگر قرار

که در شرایط خشکسالی اپیدمی‌های این بیماری در ارقام حساس - سیب‌زمینی مشاهده شود. وقوع آلودگی بالای رقم ناپیتا در منطقه بروجن در استان چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۸۶ نیز می‌تواند به همین دلیل بوده باشد. با توجه به یکسان بودن گروه فیتوپلاسمایی سیب‌زمینی و یونجه به نظر می‌رسد این گیاه می‌تواند منبع پایداری عمده‌ای برای سیب‌زمینی محسوب شود، به همین دلیل بهتر است مزارع سیب‌زمینی به فاصله مناسب از مزارع یونجه کاشته شوند هر چند قدرت مهاجرت و حرکت زنجبرک بالا بوده و تا چند کیلومتر می‌تواند حرکت کنند. علی‌رغم تشابه نشانه‌های سرارغوانی و تشکیل غده‌های هوایی در مزارع سیب‌زمینی، این بیماری توسط عوامل فیتوپلاسمایی، PLRV و قارچ رایزوکتونیا ایجاد می‌شود که در مدیریت آن بایستی عامل بیماری شناسایی گردد.

در اغلب موارد نمی‌توانند توسط غده منتقل شوند ولی در برخی گروه‌های فیتوپلاسمایی چنین انتقالی دیده شده است (۵). وجود انتقال برخی گروه‌های فیتوپلاسمایی با غده لزوم توجه بیشتر به این بیماری در توده‌های بذری سیب‌زمینی را نشان می‌دهد. همچنین وجود عوامل فیتوپلاسمایی متعلق به گروه‌های دیگر در دنیا (با توجه به واردات بذر سیب‌زمینی) لزوم توجه به قرنطینه در این زمینه را ضروری می‌سازد. عوامل فیتوپلاسمایی عمدتاً توسط زنجبرک و در پاره‌ای موارد پسپیل‌ها انتقال می‌یابند (۱۶). انجام تحقیقات بیشتر در زمینه ناقل یا ناقلین عوامل فیتوپلاسمایی و شناسایی منابع پایداری و تکثیر این عوامل در مدیریت بیماری ضروری به نظر می‌رسد. طغیان زنجبرک در شرایط خشکی و مهاجرت آنها به سیب‌زمینی باعث بروز اپیدمی‌های این بیماری در برخی نقاط دنیا شده است (۱۶). با توجه به خشک بودن مناطق تولید سیب‌زمینی در ایران این احتمال وجود دارد



شکل ۸- الگوی RFLP قطعه ۱/۲ kb تکثیر شده با پرایمرهای R16F2n/R16R2 پس از برش با آنزیم‌های محدودکننده *HpaII*، *RsaI*، *HaeIII*، *HhaI*، *MseI*، *AluI* و *KpnI* علف‌های هرز و یونجه حاشیه مزارع سیب‌زمینی. نمونه ۱-۴، یونجه دارای نشانه‌های جاروک و ریزبرگی (Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A)، نمونه ۵ گوجه‌فرنگی دارای نشانه‌های فیلودی و نمونه ۶ گوجه‌فرنگی دارای نشانه‌های پیچیدگی و بد شکلی برگ (Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A)، نمونه ۷ شنگ دارای نشانه‌های جاروک و فیلودی (Aster yellows group- Clover phyllody, 16SrI-C) و نمونه ۸ علف هرز گوش‌فیل دارای نشانه‌های فیلودی و ریزبرگی (Clover proliferation group-Clover proliferation, 16SrVI-A) M=100 bp DNA ladder, Fermentas.

Figure 8- RFLP pattern of kb 1/2 amplified with R16F2n / R16R2 primers after cutting with restriction enzymes *RsaI*, *HpaII*, *HaeIII*, *HhaI*, *MseI*, *AluI* and *KpnI* Sample Selected Weeds and alfalfa on the margins of potato fields. Example 1-4, alfalfa with symptoms of witches broom and stulborn (Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A) sample 5 tomatoes with phyllody symptoms and sample 6 tomatoes with leaf roll (Stolbur group-Celery yellows, 16SrXII-A), Sample 7 Sheng with witches broom and phyllody (Aster yellows group- Clover phyllody, 16SrI-C) and sample 8 Earphone weeds have phyllody and stulborn (Clover proliferation group-Clover proliferation, 16SrVI-A) M=100 bp DNA ladder, Fermentas.

منابع

- Balali Gh., Danesh D., and Phylsuf F. 1986. Wilt of potato purple top in Iran. Summary of Articles of the 8th Iranian Plant Protection Congress. Esfahan, Iran. (In Persian)
- Bienkowski D., Stewart A., Falloon R.E., Braithwaite M., Loguercio L.L., and Hicks E. 2010. A disease assay for *Rhizoctonia solani* on potato (*Solanum tuberosum*). New Zealand Plant Protection 63: 133-137.
- Borges M., and Lourdes V. 1972. Mycoplasma and potato disease. Potato Research 15: 187-199.
- Clark M.F., and Adams A.N. 1977. Characterization of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay

- for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483.
5. Crosslin J. M., Hamlin L. L., Buchman J.L., and Munyaneza J.E. 2011. Transmission of potato purple top phytoplasma to potato tubers and daughter plants. *American Journal of Potato Research* 88: 339–345.
 6. Ember I., Munyaneza J.E., and Crosslin J.M. 2011. Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *European Journal of Plant Pathology* 130(3): 367-377.
 7. Girsova N.V., Bottner K.D., Kastalyeva T.B., Mozhaeva K.A., Owens R.A., and Lee I.M. 2008. Identification of phytoplasma species associated with potato diseases in Russia. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 73(2): 331-333.
 8. Girsova N.V., Bottner-Parker K.D., Meshkov Y.I., Mozhaeva K.A., Kastalyeva T.B., and Lee I.M. 2016. Diverse phytoplasmas associated with potato stolbur and other related potato diseases in Russia. *European Journal of Plant Pathology* 145: 139–153.
 9. Himeno M., Kitazawa Y., Yoshida T., Maejima K., Yamaji Y., Oshima K., and Namba S. 2014. Purple top symptoms are associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Scientific Reports* 4: 4111.
 10. Hosseini P., Bahar M., Madani G., and Zirak L. 2011. Molecular characterization of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Iran. *Journal of Phytopathology* 159: 241–246.
 11. Jung H.Y., Hahm Y.I., Lee J.K, Hibi T., and Namba S. 2003. Characterization of phytoplasma associated with witche's broom disease of potato in Korea. *Journal of General plant Pathology* 69:87-89.
 12. Kumari S., Nagendran K., Rai A. B., Singh B., Rao G.P., and Bertaccini B. 2019. Global Status of Phytoplasma Diseases in Vegetable Crops. *Front. Microbiology*. Available at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01349>.
 13. Lee I.M., Bottner K.D., Secor G., and Rivera-Varas V. 2006. Candidatus *Phytoplasma americanum*, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1593-1597.
 14. Lee I.M., Bottner K.D., and Sun M. 2009. An emerging potato purple top disease caused by a new 16SrIII group phytoplasma in Montana. *Plant Disease* 93: 574-583.
 15. Menzies J.D., and Gidding N.J. 1953. Identity of potato curly top and greened dwarf. *Phytopathology* 43: 684-686.
 16. Munyaneza J.E., and Henne D.C. 2013. Leafhopper and Psyllid Pests of Potato. *Insect Pests of Potato*.
 17. Singh A., Prasad S.S., and Nagaich B.B. 1985. Host range of yellows pathogens of potato. *Indian Phytopathology* 38: 497-501.
 18. Woodhalla J.W., Leesb A.K., Edwardsa S.G., and Jenkinsona P. 2007. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology* 56: 286–295.

Survey of Frequency of some Pathogens Associated with Potato Purple Top Disease

A. Bagheri^{1*}- Gh. Babaei²

Received: 13-02-2020

Accepted: 12-07-2020

Introduction: Several pathogens, including fungal, viral, and prokaryotic agents, can cause disease in potatoes. Purple top disease associates with the formation of air glands, stubborn, leaf rolling, in potato fields is visible and several pathogens has reported reported to be the cause of this disease. Potato leaf roll virus, purple top wilt Phytoplasma and *Rhizoctonia solani* fungi are the most important agents. Plants in response to pathogen infection, show a wide range of symptoms. Symptoms of purple or purple leaves usually indicate contamination of the host plant with phytoplasmic agents.

Materials and Methods: Symptoms of purple top wilt, stubborn, yellowing and leaf rolling, witches broom, big bud and formation of aerial tubers were observed in potato fields of Chaharmal Va Bakhtiari, Hamedan and Fars provinces during 2006-2011. Some samples also showed symptoms of root rot and stem canker, Wilting accompanied by stubborn, color change of the yellow leaves or purple, leaf rolling and formation of aerial tubers at the base of the plant near the surface of the soil or in the lateral buds of the base of the petioles and of course, it was different in different cultivars. Symptoms of disease in the Marfona variety, mostly include the formation of aerial tubers and yellow leaves, and in the most of plants stolon canker was also seen. In Agria, Diamont, Maradona, Sante, Raja, Navita, and Kozima varieties, symptoms of purple top accompanied formation of aerial tubers in some plants were stubborn the witches broom and wilt. In some other cultivars, symptoms of witches broom, rosette and hairy of the roots were observed. Symptoms of disease also weeds in the margins of potato fields. Symptoms of witches broom, phyllody, stubborn and rosette in Dandelion (*Taraxacum officinalis*), Salsify (*Tragopogon graminifolius*), Black night shade (*Solanum nigrum*), Wild raddish (*Raphanus raphanistrum*), hare's ear mustard (*Conringia orientalis*) and witches broom and stubborn in alfalfa were observed. Scales of symptoms varied in different regions depending on the region and sampling time. Symptoms of purple top and formation of aerial tubers at the end of the season. Yellowing symptoms and the formation of aerial tubers in the Navita cultivar in the late growing season has reached to 40% in some areas.

Results and Discussion: 460 samples tested by ELISA against PLRV, PCR (using P1/P7 followed R16F2n/R16R2 universal primers) for presence of phytoplasma and cultured on PDA for isolation of fungi caused root rot and canker. Investigation showed presence of phytoplasmas, fungi and PLRV with abundance of 136, 245 and 61(28.7, 53.25 and 13.2 %) respectively. Most of the symptoms caused by phytoplasmas and *Rhizoctonia* have a symptom of purple top and aerial tubers. Association of PLRV in some cases produced symptoms of leaf roll and purpling. Aerial tuber formation and purple top symptoms in different potato cultivars were seen in various ratio, while fungal and phytoplasmas agent were main casual agents in Marfona and Navita cultivars, respectively. From the samples of potato with roots and stems of rot and canker symptoms, fungi *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *F.oxysporom* and *Colletotrichum sp.* isolated that 32.9% of the infection was related to *Rhizoctonia* and 20.3% was related to other fungi. Inoculation of these fungi in greenhouse conditions caused potato plants to cause plant death and drying out, and no symptoms of purple top or aerial tuber formation were observed. It seems that occurrence of such symptoms is possible only in farm conditions. Plants that showed purple top, stubborn, and rolling of the end leaves were infected with PLRV, the symptoms of the virus are varied in many varieties. In some plants, disease is accompanied by yellowing and degeneration and in some leaf roll and purple top were observed. In no case, the symptoms of the aerial tuber formation in plants that were infected with the virus were not observed. In transfer with dodder and grafting to tomatoes and potatoes, samples with stem canker and root rot did not cause any symptoms in healthy plants. But those examples were no symptoms of purple top and aerial tuber in the plant that did not show any symptoms of stolon and rooting of root canker and in the ELISA test, they did not respond positively to PLRV, tomatoes and potatoes were transplanted in greenhouse conditions with dodder and grafting. Potato plants have shown graft symptoms of yellow, stubborn, leaf roll and purple top in greenhouse conditions, but the formation of the aerial

1- Assistant, Plant Protection Research Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran

(*- Corresponding Author Email: bagherisa78@gmail.com)

2- Assistant of Professor, Plant Protection Research Department, Chahar Mahal Bakhtiari Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Chahar Mahal Bakhtiari, Iran

tuber was not observed in greenhouse conditions. After dormancy the tubers from plants with symptoms of purple top showed only a small number of these tuber showing symptoms of hairy sprouting. This condition can only be infected in some tubers from an infected plant due to the occurrence of these symptoms but the selection of plants in terms of symptoms and the uncertainty of infection with phytoplasma can be a reason. These two pathogen group caused purple top and aerial tuber formation in other potato cultivars in different region with various ratio. The PCR products of R16F2n/R16R2 from phytoplasma detected in potato, alfalfa and weeds samples were used in restriction fragment length polymorphism, RFLP, by digestion with *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *RsaI*, *KpnI*, *MseI* and *Hae III* restriction enzymes. Results indicated presences of two distinct phytoplasma group in potato samples (16SrI-B and 16SrXII-A) and 16SrXII-A phytoplasma from Alfalfa samples, 16SrI-C from salsify (*Tragopogon graminifolius*) and 16SrVI-A from here's ear cabbage (*Conringia orientalis*). Contamination of different agents were seen also in some samples. This is the first report of presence of phytoplasma group 16SrI-B and 16SrXII-A in potato in Iran.

Conclusions: Despite the similarities between the symptoms of purple top and the formation of air glands in potato fields, the disease is caused by phytoplasmic agents, PLRV, and rhizoctonia fungi, in its management, the cause of the disease should be identified.

Keywords: PCR, Phytoplasma, PLRV, Purple top, RFLP