نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص. ۲۸۳-۲۷۷

Journal of Plant Protection
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 277-283

ارزیابی آزمون LAMP با خصوصیت رنگ‌سنجی جهت ردیابی چشمی *Ralstonia solanacearum* در محموله‌های سیب‌زمینی ایستگاههای قرنطینه‌ای ایران

امه هانی نبوی چاشمی[۱] - ساره بقائی راوری[۲*] - ماهرخ فلاحتی رستگار[۳] - کبری مسلم خانی[۴] - وحید جهانبخش مشهدی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۶

چکیده

نژاد ۳، بیووار ۲ از کمپلکس گونه‌ای *Ralstonia solanacearum* خسارات اقتصادی قابل‌توجهی را به سیب‌زمینی در سراسر دنیا وارد می‌سازد. بنابراین دستیابی به روش ردیابی حساس و اختصاصی به‌منظور حذف مواد گیاهی آلوده در مراکز تحقیقات و ایستگاههای بازرسی قرنطینه گیاهی ضروری می‌باشد. در مطالعه حاضر پس از جداسازی کلنی‌های شبیه *R. solanacearum* از غده‌های آلوده سیب‌زمینی در محیط تترازولیوم کلراید، تاییدمولکولی گونه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. براساس آزمون استفاده از منابع‌کربنی و واکنش‌زنجیره‌ای‌پلیمراز اختصاصی نیز، جدایه‌های بدست‌آمده متعلق به بیووار ۲ و فیلوتایپ II می‌باشند. آزمون بیماریزایی بر روی گیاهچه‌های سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی برای جدایه‌ها انجام و بیماریزایی جدایه‌ها بررسی گردید. ارزیابی غده‌های آلوده و یا مشکوک به آلودگی با اعمال PCR سنتی و واکنش LAMP بر روی ژن *fliC* بااستفاده از DNAی استخراج‌شده و عصاره آلوده سیب‌زمینی انجام‌گرفت. الگوی نردبانی محصولات LAMP و ردیابی چشمی رسوب پیروفسفات و یا تغییررنگ ایجادشده در نمونه‌های آلوده به واسط کاربرد کالسئین، دلالت‌بر ردیابی موفق *R. solanacearum* توسط واکنش LAMP دارد. اگرچه حساسیت آزمون LAMP (10^4 CFU/ml) مساوی و یا کمتر از PCR سنتی است، اما دقت واکنش مزبور جهت تایید قابل اطمینان وجود *R. solanacearum* در غده‌های سیب‌زمینی کافی می‌باشد. درمجموع، آزمون LAMP به همراه مرحله آشکارسازی کارایی چون استفاده از کالسئین، اطلاعات اولیه مناسبی را جهت غربالگری غده‌های آلوده قبل از انبارداری و در حین حمل‌ونقل استانی مهیا می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی پنهان، پوسیدگی قهوه‌ای، ردیابی چشمی، *fliC*، LAMP

مقدمه

باکتری *Ralstonia solanacearum* مولد پژمردگی در بسیاری از گیاهان می‌باشد و به لحاظ تنوع در دامنه میزبانی، متابولیسم و سایر ویژگی‌های بیولوژیکی به‌عنوان کمپلکس گونه‌ای موردوجه است (۸). گیاهان مربوط به ۵۴ خانواده و ۴۵۰ گونه گیاهی توسط این باکتری آلوده می‌شوند (۲۵). نژاد ۳ و بیووار ۲ این باکتری موجب سوختگی باکتریایی گیاهان سولاناسه به‌ویژه سیب‌زمینی در مناطق گرمسیری و معتدل گردیده (۵) که منجر به خسارات اقتصادی هنگفتی درسراسر دنیا می‌شود.

کنترل بیماری از طریق اعمال روشهای قرنطینه‌ای و یا سوزاندن مواد آلوده گیاهی انجام می‌شود. بااین‌حال استفاده از غده‌های بذری سالم، موثرترین راه جهت اجتناب از پراکنش این باکتری بیمارگر مهاجم به مناطق عاری از آلودگی است. از آغازگرهای متفاوتی جهت ردیابی آلودگی آشکار و پنهان *R. solanacearum* استفاده شده است (۱، ۱۵، ۱۶ و ۲۱).

بااین‌وجود بکارگیری روش سریع، آسان، حساس باصرف کمترین هزینه و امکانات جهت ردیابی بیمارگر در الویت است. بررسی‌ها نشان داده است که سطح پایین تفکیک در تجزیه و تحلیل‌ها بر اساس ناحیه 16S rDNA، منجر به اشتباه در نتایج نهایی در مورد شناسایی *R. solanacearum* با گونه‌های مرتبط و نزدیک می‌گردد (۸ و۲۰). بنابراین تکثیر ژنهای عملکردی دیگر مثل اندوگلوکونار و *hrp*B (۱۸) و *fliC* (۲۰) می‌تواند به عنوان جایگزین برای شناسایی دقیق این کمپلکس گونه‌ای استفاده شود. توانایی زیرواحد پروتئینی فلاژلین تاژک (*fliC*) باکتری در راستای بررسی‌های ناکسونومیکی در باکتری‌های گرم منفی و مثبت زیادی مشخص شده است (۱۰،۱۲ و ۲۲).

به‌منظور تسهیل در ردیابی *R. solanacearum* در غده‌های بذری وارداتی و انبارهای سیب‌زمینی با جمعیت اندک اینا‌کلوم، واکنش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه Loop Mediated

---

۱، ۲، ۳ و ۵- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد و مربی آموزشی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران. ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email:s.baghaee@ferdowsi.um.ac.ir
DOI: 10.22067/jpp.v0i0.57217

Archive of SID
www.SID.ir

Isothermal Amplification (LAMP) مورد بررسی قرار گرفته است. این روش اولین‌بار توسط نوتومی و همکارانش در سال ۲۰۰۰ ارائه گردید (۱۳). در این روش DNA درشرایط هم‌دما با استفاده از آنزیم *Bst* large fragment DNA polymerase که دارای خاصیت جابه‌جایی رشته می‌باشد، تکثیر می‌یابد. واکنش با چهار آغازگر اختصاصی طراحی‌شده که شش ناحیه مشخص از DNAی هدف را شناسایی می‌نمایند، انجام می‌شود (۴ و۱۳). روش LAMP برای ردیابی و شناسایی بیمارگرهای گیاهی ازجمله *Xylella fastidiosa* (۲۴)، *Erwinia amylovora* (۱۱)،*Ralstonia solanacearum* (۸) و *Pectobacterium carotovorum* (۲۶) انجام وحساس‌تر و قابل اطمینان‌تر نسبت به PCR معمولی برآورد شده است. هدف از بررسی حاضر ارزیابی آلودگی آشکار و پنهان غده‌های سیب‌زمینی آلوده به *R. solanacearum* به‌وسیله واکنش *fliC*-LAMP با خصوصیت رنگ سنجی و امکان ارائه آن در پست‌های قرنطینه‌ای کنترل محموله‌های وارداتی سیب‌زمینی می‌باشد. روش حاضر از جنبه‌های مختلف با PCR معمول سنتی در حال اجرا در بیشتر ایستگاه‌های قرنطینه‌ای مقایسه می‌شود.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری و آزمون بیماریزایی

دربررسی حاضر نمونه‌های سیب‌زمینی دارا یا فاقد علائم ارسالی از همدان و سمنان ارزیابی شدند. جداسازی باکتری روی محیط کشت تترازولیوم کلراید (TZC) در۲۸ درجه سانتی‌گراد برای ۴۸ ساعت بر طبق منابع انجام گرفت (۱۹).

آزمون بیماریزایی بر روی گیاهچه‌های سیب‌زمینی رقم اگریا و گوجه‌فرنگی رقم موبیل تحت شرایط کنترل‌شده گلخانه انجام پذیرفت. میزان ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون 10^8 CFU/ml باکتری به زاویه سومین برگ از بالا در گیاهچه‌ها تزریق گردید (۱۴). توسعه علائم به‌طور روزانه تا ۴ هفته ثبت گردید. جدایه استاندارد *R. solanacearum* ICMP5712 و آب مقطر استریل به‌ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی مورداستفاده قرار گرفتند. برای هر جدایه پنج تکرار درنظر گرفته شد.

استخراج DNA

جداسازی و خالص‌سازی DNAی کل جدایه‌های باکتریایی به روش چن و کاا (۱۹۹۳) انجام گرفت (۲). همچنین به‌منظور انجام PCR سنتی و LAMP بدون نیاز به DNAی خالص شده، به میزان ۰/۱ گرم از بافت آوندی غده‌های سیب زمینی دارای آلودگی و یا فاقد آلودگی برداشته و در کیسه‌های پلاستیکی حامل یک میلی لیتر بافر PBS 1X لهانیده شد (۱۷). عصاره مایع فیلترشده برای ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد جوشانده و ۲ میکرولیتر از مایع‌رویی آن به‌طور مستقیم در آزمایشات مولکولی مورداستفاده قرار گرفت. در صورت کاربرد عصاره سیب‌زمینی، تیمار آلبومین سرم گاو (۵ µg) برای ممانعت از اثرات بادارندگی ترکیبات عصاره در واکنش PCR درنظر گرفته شد.

شناسایی مولکولی وتعیین بیوار باکتری

برای ردیابی و شناسایی اختصاصی *R. solanacearum* در سطح گونه از جفت آغازگرهای ۷۵۹ GTCGTCGCC GTC AAC (5´TCA CTTTCC3´) و ۷۶۰ (5´ GTC GCC GTC AGC AAT GCGG AAT CG3´) (۱۵) بر اساس ژن *lpx*C کد کننده UDP-3-0-acylnacetyl glucosamine deacetylase در *R. solanacearum* برای واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده گردید. تایید فیلوتایپ باکتریایی نیز بر اساس روش فگان و پریور(۲۰۰۵) صورت پذیرفت (۳). محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد بارگذاری شده و بعد از الکتروفورز، زیر نور UV مشاهده گردیدند.

جهت ارزیابی بیوار ، استفاده از منابع کربنی سلوبیوز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، دولیسیتول، سوربیتول، اینوزیتول، ترهالوز و دی‌ریبوز بر اساس هیووارد (۱۹۹۴) انجام گرفت (۶).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سنتی و تکثیر هم‌دمای وابسته‌به حلقه(LAMP)

واکنش PCR سنتی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ µl بافر PCR 1X، ۳ mM کلرید منیزیم، ۲۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۰/۲ mM dNTPs، دو واحد آنزیم دی‌ان‌ای تک‌پلیمراز (Genet bio,Korea) و ۲ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی DNAی الگو انجام شد (۲۰).

برای انجام واکنش LAMP براساس ژن *fliC*، پنج آغازگر شامل آغازگرهای بیرونی (F3: 5′-TTCAAGTTGCAGGTCACGT-3′ and B3:5′-AGGTTGTTTTCAACCTGGCC-3′)، آغازگرهای درونی (FIP:5′-GAGATGTTGGTATTGAGGCTGAGCAAGCATTCACTCGGGCA-3′,BIP:5′-GCCTGACCACGACCCTGAACAGGTACGAGTTCGCACCGT-3′) و آغازگر لوپ (5′-CGCAAACGCAAGGTATCCAGA) براساس پروتوکل کوباتا و همکاران (۸) استفاده گردید. واکنش LAMP در ۶۴ درجه‌سانتی‌گراد برای ۵۵ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفت. برای مقایسه، جدایه *R. solanacearum* ICMP5712 در آزمایشات مولکولی بکار گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی محصولات واکنش LAMP

به‌منظور تایید انجام واکنش و مشاهده الگوی نردبانی، محصول LAMP در ژل آگاروز ۲٪ حاوی DNA (Genet Bio,Korea) Green viwer و بااستفاده از بافر TBE 1X الکتروفورز گردید. همچنین ارزیابی چشمی محصولات LAMPبه دو صورت انجام گرفت. در روش اول با اضافه کردن 1.5µM سولفات منیزیوم به نمونه‌ها قبل از واکنش، کدورت حاصل از رسوب سفید رنگ منیزیوم پیروفسفات بررسی گردید. در آزمونی دیگر، ۲/۵ میکرولیتر کالسئین (25µmol/L) کالسئین همراه با 0.5m mol/L کلرید منگنز) (۲۳) به هر میکروتیوپ قبل از شروع واکنش اضافه و بعدازانجام واکنش، تغییر رنگ زیر نور معمولی و نور UV مشاهده گردید. جهت کاهش خطا، تمام واکنش‌ها سه بار تکرار گردید.

بررسی حساسیت واکنش LAMP درمقایسه با PCR

ابتدا سوسپانسیون باکتری با غلظت10^8 CFU/ml توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ($OD_{600}=0.45=10^8$CFU/ml) از کشت ۲۴ ساعته‌ی جدایه‌ی نماینده Rs8 در آب مقطر استریل و یا عصاره گیاه سیب زمینی فراهم شد. به‌منظور دستیابی به حدسنجش حساسیت LAMP ، غلظت‌های ۱۰ × ۲ تا 10^7 × ۲ سلول باکتری درهر میلی‌لیتر تهیه و ۲µl از هر رقت DNA در واکنش LAMP در مقایسه با PCR سنتی مورداستفاده قرار گرفت.

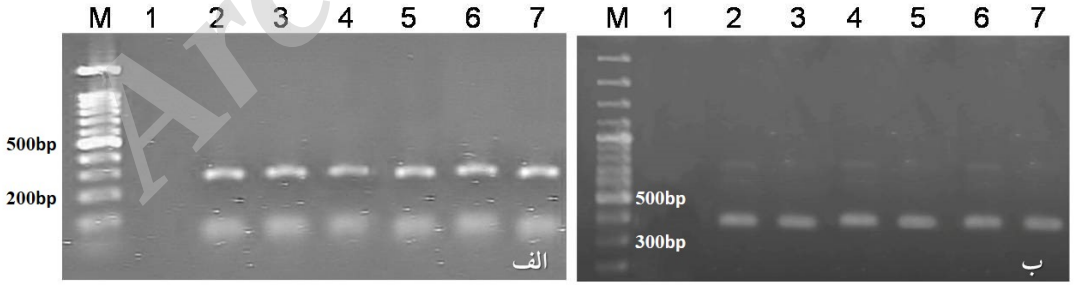
نتایج و بحث

ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌ها و آزمون بیماریزایی

از بین جدایه‌های رشدیافته برروی محیط TZC، تعداد ۶ جدایه با ظاهر لعاب‌دار و مات به‌صورت کلنی‌های گرد با مرکز صورتی‌رنگ و حاشیه سفید و نامنظم بعد از سه روز انکوباسیون در ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای آزمون بیماریزایی انتخاب شدند. علاوه‌برآن تعداد سه جدایه *R. solanacearum* از موسسه ثبت و گواهی بذر و نهال تهران دریافت گردید. در آزمون بیماریزایی، ده روز بعد از مایه‌زنی، نکروز حاشیه برگهای گیاهچه های سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی به همراه پژمردگی مشاهده و بیماریزایی ۵ جدایه تایید گردید. جداسازی مجدد باکتری بیماری‌زا از بافت پژمرده توسط کشت و آزمون مولکولی اختصاصی نیز تایید گردید.

ردیابی و شناسایی مولکولی

قطعه موردنظر ۲۸۱ جفت بازی مربوط به ناحیه حفاظت‌شده ژن *lpxC*، بااستفاده از آغازگرهای 759/760 اختصاصی گونه برای تمام جدایه ها موردبررسی تکثیر گردید (شکل ۱–الف). تعلق جدایه‌های موردآزمایش به فیلوتایپ II، به‌صورت تکثیر باند ۳۷۲ جفت‌بازی با استفاده از آغازگرهای مربوطه نیز تایید گردید (شکل ۱–ب). همچنین با انجام واکنش زنجیره‌ی پلیمراز سنتی با آغازگرهای *fliC* یک قطعه ۴۰۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۲) و با دو بار توالی‌یابی صحت تکثیر آن تایید گردید. در حالیکه کاربرد عصاره سیب‌زمینی آلوده به جای سوسپانسیون باکتری، منجر به تکثیر باندهای کاذب یا عدم تکثیر باند می‌گردید. برای حل این مشکل تهیه سری رقت و تیمار آلبومین سرم گاو (BSA) (۱۶) در PCR تا حد زیادی این مشکل را برطرف ساخت.

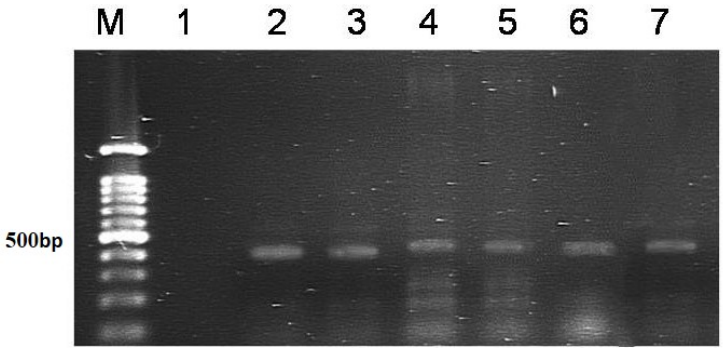


شکل ۱- تکثیر قطعه ۲۸۱ جفت بازی اختصاصی گونه های *R. Solanacearum* بااستفاده از آغازگرهای 759/760 (الف) و باند ۳۷۲ جفت‌بازی اختصاصی فیلوتایپ ۲ در جدایه‌های موردبررسی بااستفاده از آغازگرهای Nmult21:2F and Nmult22: RR(ب) M: سایز مارکر 100bp ۱: آب مقطر استریل- ۲تا٦: جدایه‌های ایرانی- ۷: جدایه استاندارد ICMP5712

Fig1- The amplified 281 bp fragment specific to *R. Solanacearum* species using 759/760 primers (a) and, 372 bp band specific to phylotype 2 in studied strians using Nmult21:2F and Nmult22: RR primers (b). M: 100 bp size marker; 1: Sterile distilled water; 2 to 6: Iranian strains; 7: Rs ICMP5712 reference strain

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- ردیابی قطعه ٤٠٠ جفت‌بازی مربوطبه ژن *fliC* در جدایه‌های *R. solanacearum* بااستفاده آغازگرهای Ral-*fliC*/ Rsol-*fliC*: M: سایز مارکر 100bp ۱: آب مقطر استریل- ۲تا٦: جدایه‌های ایرانی- ۷: جدایه استاندارد ICMP5712

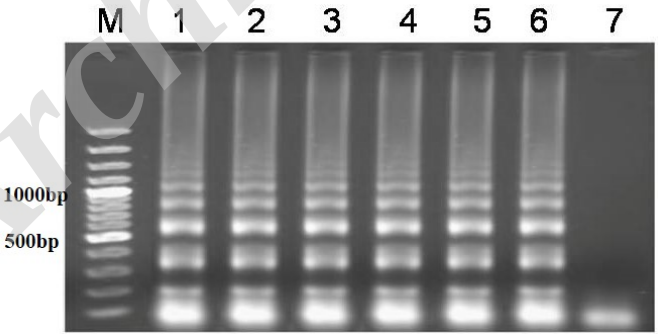
Fig 2- Detection of 400 bp fragment associated to *fliC* gene in *R. solanacearum* strains using Ral-*fliC*/ Rsol-*fliC* primers. M: 100 bp size marker; 1: Sterile distilled water; 2 to 6: Iranian strains; 7: Rs ICMP5712 reference strain.

تعیین بیووار جدایه‌های مورد بررسی

جدایه‌های *R. solanacearum* پس از بررسی آزمونهای قندی، توانایی استفاده از قندهای مالتوز، لاکتوز و سلوبیوز را داشته ولی قادر به‌استفاده از سه قند دیگر نبودند لذا براساس منابع موجود (۱۸)، جدایه‌ها به‌عنوان بیوار ۲ تشخیص داده شدند.

ردیابی و تایید محصولات LAMP

بقای بیمارگر *R. solanacearum* در خاک بوده و توسط آب به نقاط مختلف منتقل می‌شود، بنابراین ریشه‌کنی بیمارگر غیرممکن می باشد. ارزیابی غده‌های وارداتی یا داخلی در آزمایشگاه، پست‌های قرنطینه‌ای و یا سیستم‌های تولید و صدور گواهی سلامت بذر با استفاده از یک روش سریع و حساس بایستی مدنظر قرار گیرد. بدین‌منظور واکنش LAMP یا تکثیر هم‌دمای وابسته‌به‌حلقه به‌عنوان یک روش سریع و اقتصادی انجام پذیرفت. این واکنش برپایه ژن *fliC* مربوط به *R. solanacearum* توانایی بالایی در ردیابی بیمارگر در آب و خاک نشان داده است (۸). در مطالعه حاضر کارایی روش مذکور جهت ردیابی باکتری در سیب‌زمینی‌های انباری دارا یا فاقد علائم بررسی شده است. الگوی نردبانی محصولات تکثیری حاصل از واکنش LAMP برای جدایه‌های *R. solanacearum* در شکل (۳) قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۳- الگوی نردبانی حاصل از واکنش LAMP برای ژن *fliC* در جدایه‌های *R. solanacearum*: M: سایز مارکر 100bp، ۱تا٥: جدایه‌های ایرانی- ٦: جدایه استاندارد ICMP5712-۷: آب مقطر استریل

Fig 3- Ladder pattern of LAMP products for *fliC* gene in *R. solanacearum* strains. M: 100 bp size marker; 1 to 5: Iranian strains; 6: Rs ICMP5712 reference strain; 7: Sterile distilled water

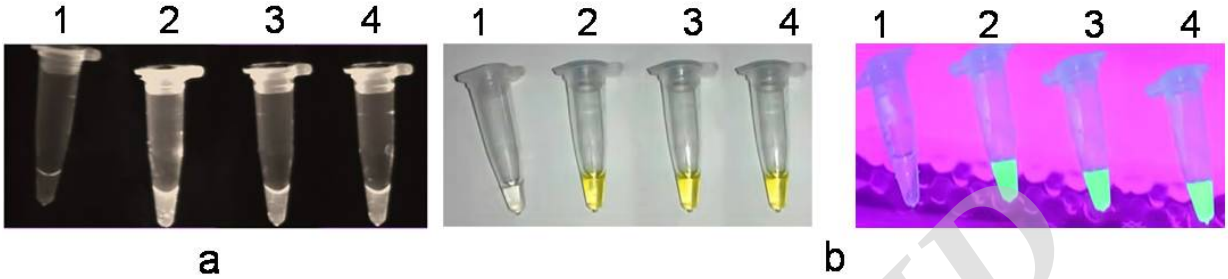
علاوه‌برآن، موفقیت واکنش LAMP نیز به‌صورت چشمی بررسی گردید. کدورت ایجادشده در جدایه‌های موردبررسی بعدازگذشت ۵۵ دقیقه از شروع واکنش در ته تیوب مطابق شکل ۴ قابل‌رویت می‌باشد. در ارزیابی واکنش مثبت LAMP، مشاهده کدورت منیزیوم پیروفسفات در بازه کوتاهی پایدار است. بنابراین گاهی اوقات امکان حذف رسوب و اشکال در صحت نتایج پیش‌خواهد آمد. برای مرتفع‌کردن این مشکل می‌توان از سایر شاخص‌های رنگی همچون کالسئین استفاده نمود. در بررسی شاخص رنگی دیگر، با اضافه کردن ماده فلورسنت کالسئین قبل از شروع واکنش به تیوب‌ها، نمونه‌های مثبت زیر نور UV به رنگ سبز مشاهده شده و در نور معمولی زرد

Archive of SID

www.SID.ir

پررنگ می‌شود (شکل ۴).

در این واکنش از غده‌های به‌ظاهر سالم مشکوک به آلودگی نیز استفاده گردید. عصاره گیاه پس از جوشاندن، مورداستفاده مستقیم قرار گرفت. از ۱۲ غده موردبررسی، فقط در یک‌مورد آلودگی در LAMP ردیابی گردید. علی‌رغم حساسیت PCR به بازدارنده‌های موجود در بافت و خاک، سنجش LAMP در مقابل این بازدارنده‌ها حساسیت کمتری دارد که با نتایج سایرین مطابقت دارد (۷ و ۹).

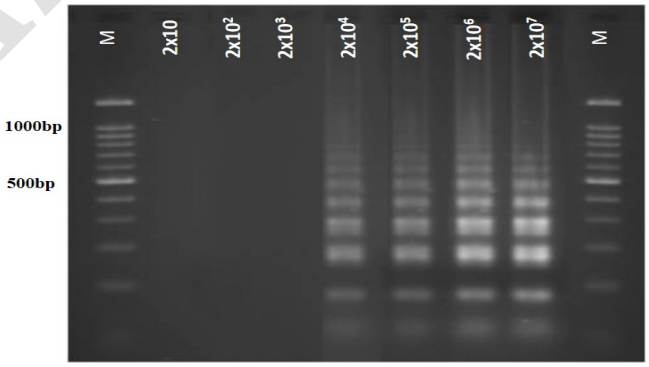


شکل ٤- مشاهده چشمی واکنش مثبت LAMP (a) کدورت سفید حاصل از منیزیوم پیروفسفات نامحلول (b):کاربرد رنگ کالسئین که در واکنش مثبت در نور معمولی زرد و در نور ماوراء بنفش سبز می باشد ۱: کنترل منفی- ۲: ICMP5712- ۳و٤: جدایه های ایرانی*R.solanacearum*

Fig 4- Visual detection of positive LAMP reactions (a) magnesium pyrophosphate-based method which production of insoluble pyrophosphate ions causing white turbidity.(b) Calcein indicator that produce yellow color for positive tubes visually and green color after UV treatment.1: Negative control; 2: ICMP5712; 3 and 4: Iranian strains of *R. solanacearum.*

شکل ٥- حساسیت واکنش PCR: M: سایز مارکر 100bp؛ ۱تا۷: جدایهPs8 به‌ترتیب با غلظت‌های ۱۰ × ۲ تا ۲×۱۰^۷ (CFU/ml)

Fig 5- Sensitivity of conventional PCR for detecting *R. solanacearum* in infected potato extracts. M: 100-bp DNA ladder; 1 to 7: serial dilution of 2×10 to 2×10^7 CFU/ml of Ps8 bacterial suspension.



شکل ٦- حساسیت واکنش LAMP: M: سایز مارکر 100bp؛ ۱تا۷: جدایهPs8 به ترتیب با غلظت‌های ۱۰ × ۲ تا ۲×۱۰^۷ (CFU/ml)

Fig 6- Sensitivity of LAMP assay for detecting *R. solanacearum* in infected potato extracts. M: 100-bp DNA ladder; 1 to 7: of 2×10 to 2×10^7 CFU/ml of Ps8 bacterial suspension.

Archive of SID

www.SID.ir

حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سنتی و LAMP

سری رقت تهیه‌شده از باکتری و عصاره سیب‌زمینی آلوده برای هر دو روش استفاده گردید. واکنش PCR-*fliC* قادر به شناسایی باکتری تا حد 10^3-10^4 cfu/ml می باشد (شکل ۵) در حالیکه کمترین غلظت باکتری برای ردیابی توسط LAMP، 10^4 cfu/ml (شکل۶) برای هر دو تیمار به دست آمد. به منظور تایید صحت انجام نتایج، آزمایشات آستانه حساسیت سه بار تکرار گردید و نتایج با هم همخوانی داشتند.

اگرچه حساسیت LAMP برابر یا کمتر از PCR سنتی ارزیابی شده است اما دقت LAMP برای تعیین دقیق حضور *R. solanacearum* در نمونه‌های سیب‌زمینی دارا یا بدون علائم، کافی می‌باشد. دستورالعمل سنجش LAMP زمان کمتری می‌برد، به تجهیزات خاصی نیاز ندارد و امکان تشخیص چشمی را مهیا می‌سازد. بنابراین براساس داده‌های این بررسی واکنش LAMP با استفاده از ژن *fliC* به همراه مرحله آشکارسازی کارایی چون استفاده از کالسئین، اطلاعات اولیه مناسبی را جهت غربالگری غده‌های آلوده قبل از انبارداری و در حین حمل و نقل استانی مهیا می‌سازد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه فردوسی مشهد به‌خاطر حمایت‌مالی این پروژه با کد ۲۷۰۷۳ قدردانی می‌نمایند.

منابع

1-Boudazin G., Le Roux A.C., Josi K., Labarre P., and Jouan B. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology. 105:373–380.

2-Chen W.P., and Kuo T.T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Research. 21: 2260.

3-Fegan M., and Prior P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex. St. Paul, MN, U.S.A.: American Phytopathological Society Press, 449-461.

4-Fu S., Qu G,, Guo S,, Ma L,, Zhang N. 2011. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. Applied Biochemistry and Biotechnology, 163: 845–850.

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

6-Hayward A.C. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent*, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 123–35.

7-Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., and Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. Journal of Biochemistry and Biophysical Methods, 70: 499-501.

8-Kubota R., Vine B.G., Alvarez A.M., and Jenkins D.M. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. Phytopathology, 98:1045–1051.

9-Lenaric R,, Morisset D,, Pirc M,, Llop P,, Ravnikar M., and Dreo T. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. PLoS ONE, 9: e96027

10-Machado J., Grimont F., and Grimont P.A.D. 2000. Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fli*C gene. Research Microbiology, 151: 535–546.

11-Moradi A., Nasiri J., Abdollahi H., Almasi A. 2012. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* base on chromosomal DNA. European Journal of plant pathology, 133: 609. Doi: 10.1007/s10658-012-9939-y

12-Morgan J.A.W., Bellingham N.F., Winstanley C., Ousley M.A., Hart C.A., and Saunders J.R., 1999. Comparison of flagellin genes from clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Applied and Environmental Microbiology, 65:1175–1179.

13-Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., and Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28: E63.

14-Nouri S., Bahar M., and Fegan M. 2008. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strain outside South America. Plant Pathology, 58: 243– 249.

15-Opina N., Tavner F., Holloway G., Wang J.F., Li T.H., Maghirang R., Fegan, M., Hayward A.C., Krishnapillai V., Hong W.F., Holloway B.W., and Timmis J.N. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 5:19-30.

Archive of SID

www.SID.ir

16-Pastrik K.H., and Maiss E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology, 148: 619–626.
17-Pastrik K.H., Elphinstone J.G., and Pukall R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology, 108:831-842.
18-Poussier S., Prior P., Luisetti J., Hayward C., and Fegan M. 2000. Partial sequencing of the *hrp*B and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. Systematic and Applied Microbiology, 23:479-486.
19-Schaad N.W., Jones J.B., and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society St. Paul, MN, USA, 378 pp.
20-Schonfeld J., Gelsomino A., van Overbeek L.S., Gorissen A., Smalla K., and van Elsas J.D. 2003. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. FEMS Microbiology and Ecology. 43:63–74.
21-Seal S.E., Jackson L.A., Young J.P., and Daniels M.J. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii*, and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. Journal of General Microbiology, 139: 1587–1594.
22-Tasteyre A., Karjalainen T., Avesani V., Delmee M., Collignon A., Bour-lioux P., and Barc M.C. 2000. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (*fli*C) among *Clostridium difficile* isolates from different sero-groups. Journal of Clinical Microbiology, 38: 3179-3186.
23- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nature Protocols, 3, 877–882.
24-Ward L., Harper S., Clover G. 2010. Development of a LAMP assay for *Xylella fastidiosa*. MAF Biosecurity New Zealand Technical Paper No: 2010/14.
25-Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Fegan M. 2007. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French WestIndies) Exhibiting a New Pathogenic Potential. Applied and Environmental Microbiology. 71: 6790–6801.
26-Yasuhara-Bell J., Marrero G., De Silva A., Alvarz A.M. 2016. Specific detection of *Pectobacterium carotovorum* by loop-mediated isothermal amplification. Molecular Plant Pathology, DOI: 10.1111/mpp.12378.

Archive of SID

www.SID.ir