بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی گونه های *Pectobacterium* عامل پوسیدگی نرم، جدا شده از میزبان های مختلف در برخی مناطق ایران

۱- الهام توسلی(نویسنده مسئول) etavasoli@gmail.com **۲- علیرضا معرفت ۳- نادر حسن زاده**

۱-گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ۲- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

چکیده

پکتوباکتریوم ها گروه مهمی از باکتری های بیماری زای گیاهی هستند که دارای گسترش جهانی می باشند. این باکتری ها محدودیت میزبانی نداشته و اکثر گیاهان آبدار و گوشتی را آلوده می کنند. طی سال های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ تعداد ۳۸ جدایه پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم از میزبان های مختلف منجمله سیب زمینی، پیاز، کلم و هویج در مناطقی از استان های همدان، سمنان، هرمزگان، کرمان، آذربایجان شرقی، خوزستان، زنجان، تهران و اصفهان جداسازی شد. پس از جداسازی باکتری ها، شناسایی آن ها با آزمون های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی لازم صورت گرفت. تنوع ژنتیکی جمعیت پاتوژن نیز با تکنیک BOX-PCR و آغازگر BOX A1R تعیین گردید. طبق نتایج، کلیه جدایه ها متعلق به گروه "Carotovora" و به *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*، *P. atrosepticum* و *Dickeya chrysanthemi* شبیه بودند. در برخی موارد نیز عدم تطابق کامل آن ها با جدایه های شناخته شده در دنیا دیده شد. نتایج آزمون های فنوتیپی و ژنتیکی انجام شده، تنوع بالایی را میان جدایه ها نشان داد و میان اثر انگشت ژنتیکی جدایه ها با منطقه نمونه برداری آن ها ارتباط خاصی دیده نشد.

واژه های کلیدی: پوسیدگی نرم، *Pectobacterium*، BOX-PCR، BOX A1R

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی

واحد گرمسار،۱۳۸۸، دوره۴، شماره۴، ۷۸-۶۹

Phenotype and genotype diversity of soft rot pectobacteria isolated from different plant hosts in several regions of Iran

E. Tavasoli[1] ,A. R. Marefat[2], N. Hasanzadeh[1]

1-Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2-Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

Abstract

Pectobacterium is one of the major destructive causal agents in most crop plants throughout the world. During the years 2007-2008, 38 isolate of soft rot pectobacteria were isolated from different hosts including: potato, onion, cabbage and carrot in Hamedan, Semnan, Hormozgan, Kerman, East Azarbaijan, Khuzestan, Zanjan, Tehran and Isfahan provinces. Phenotypic identification of the strains were performed using recommended biochemical and physiological tests. Also genetic diversity determined by BOX-PCR using BOX A1R primer. According to results, all strains identified as "Carotovora" group as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* and *Dickeya chrysanthemi*. Also some characteristics of the pathogen differ from those described for this bacterium isolated in some countries. The combined results of performed tests showed a high variability among pectolytic bacteria in Iran and there was no clear relationship between the resulting DNA fingerprints and geographical origins of isolates.

Key words: *Pectobacterium*, Soft rot, BOX-PCR, BOX A1R

مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی

واحد گرمسار،۱۳۸۸، دوره۴، شماره۴، ۷۸-۶۹

مقدمه

پکتوباکتریوم ها یا اروینیاهای عامل پوسیدگی نرم، متعلق به خانواده *Enterobacteriaceae* می باشند. از ویژگی های اصلی این باکتری ها، تولید و ترشح آنزیم های منهدم کننده دیواره سلولی، به ویژه آنزیم های پکتیناز یا پکتولیتیک است که موجب لهانیده شدن بافت های گیاهی می گردند (Barras *et al*., 1994). پوسیدگی های نرم باکتریایی بیشتر روی گیاهانی که بافت های ذخیره ای یا برگ و ساقه های نرم و آبدار دارند رخ می دهد و علائم بیماری در تمامی میزبان ها بسیار مشابه است. بافت های

www.SID.ir

آلوده، نرم، آبکی و پوسیده اند. زمانی که گیاهان در مزرعه آلوده می شوند، علائم ممکن است در قسمت های پایینی ساقه هم ظاهر شده و آبکی، سیاه و پلاسیده شوند. این امر موجب کوتولگی، پژمردگی و مرگ قسمت های هوایی گیاه می گردد (Agrios, 1988). اکثر اروینیاهای عامل پوسیدگی نرم، تخصص میزبانی ندارند، به همین دلیل ممکن است از یک گیاه بیمار بیش از یک گونه یا زیر گونه جدا شده و یا یک گونه از چند گونه گیاهی جدا گردد. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*، *P. atrosepticum* و *Dickeya chrysanthemi* از این دسته بیمارگرها می باشند که در تعداد زیادی از گیاهان ایجاد بیماری می کنند (Perombelon and Kelman, 1980). *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* و *D. chrysanthemi* دارای دامنه میزبانی وسیع می باشند و محصولات مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری را آلوده می کنند، در حالی که *P. atrosepticum* تقریباً محدود به سیب زمینی در نواحی معتدله می باشد و باعث پوسیدگی نرم غده ها و ساق سیاه می شود (Perombelon, 1992).

بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی ابتدا در سال ۱۹۰۱ توسط جونز در آمریکا از ریشه هویج گزارش گردید. یک سال بعد Van Hall از هلند و Appel از آلمان بطور مستقل، بیماری ساق سیاه سیب زمینی را شناسایی کردند (نقل از Graham, 1964). در ایران اولین بار باکتری *Erwinia* از پیازهای پوسیده سیکلامن جدا شد (حجارود ۱۳۴۶). امانی با آزمایشات بیشتر گونه باکتری را *Erwinia carotovora* معرفی نمود (امانی ۱۳۴۶). از آن زمان تاکنون، مطالعات متعددی جهت شناسایی این باکتری ها در مناطق مختلف کشور و بیشتر روی سیب زمینی صورت گرفته است. در اکثر این بررسی ها که بر اساس آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و حداکثر مقایسه نقوش الکتروفورز پروتئین انجام شده اند به شناسایی نشدن بعضی از باکتری های جدا شده و یا قرار گرفتن بعضی از آن ها در گروهی متفاوت با باکتری های شناخته شده اشاره شده است (بهار و دانش ۱۳۶۵؛ ظهورپرالک و همکاران ۱۳۷۷؛ احمدوند و رحیمیان ۱۳۸۱؛ سهیلی مقدم و حسن زاده ۱۳۸۳).

بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت عوامل بیماریزا از اهمیت زیادی برای تاکسونومی، اپیدمیولوژی و مدیریت آن ها برخوردار است (Milgroom and Fry, 1997). تاکنون روش های مختلفی جهت بررسی تنوع ژنتیکی پکتوباکتریوم ها بکار رفته است که شامل RFLP (Nassar *et al.*, 1996)، RAPD (Maki-Valkama and Karjalainen, 1994)، AFLP (Avora *et al.*, 2002) و ERIC (Toth *et al.*, 1999) می باشد. در سال های اخیر مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از PCR و بر اساس توالی های تکرار شونده در ژنوم باکتری ها (rep-PCR) (Rademaker and de Bruijn, 1997) از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و برای بررسی پکتوباکتریوم های عامل پوسیدگی در مطالعات مختلف استفاده شده است (Xiu *et al.*, 2006).

هدف از این تحقیق، شناسایی باکتری های متعلق به خانواده *Enterobacteriaceae* عامل پوسیدگی نرم محصولاتی چون سیب زمینی، پیاز، هویج، کلم، چغندرقند و گوجه فرنگی در برخی از مناطق ایران بر اساس خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی بود. بعلاوه تنوع ژنتیکی این باکتری ها نیز بررسی گردید.

مواد و روش ها

۱- نمونه برداری

طی ماه های مرداد و شهریور ۱۳۸۶، نمونه هایی با علائم مشخص بیماری از مزارع سیب زمینی در مناطقی از استان های همدان (یکن آباد، بهار، وینسار)، سمنان (فولاد محله)، هرمزگان (حاجی آباد)، مزارع پیاز از استان کرمان (بافت و جیرفت)، آذربایجان شرقی (قره تپه) و همچنین مزارع کشت هویج در استان خوزستان (دزفول) و آذربایجان شرقی (قره تپه) تهیه گردید. اردیبهشت ۱۳۸۷ نیز از یک مزرعه کلم با علائم شدید پوسیدگی نرم در شهرستان زنجان، چند انبار نگه داری بذور سیب زمینی

Archive of SID

www.SID.ir

در استان تهران (آبسرد دماوند) بازدید و نمونه برداری بعمل آمد. بعلاوه از یک محموله بذری تهیه شده از استان اصفهان برای یکی از مراکز کشت سیب زمینی در استان زنجان نمونه هایی با علائم بیماری تهیه شد (شکل ۱).

دو جدایه اروینیای پکتولیتیک مربوط به چغندر قند (اهدایی مهندس زید آبادی، دانشگاه آزاد واحد دامغان)، یک جدایه اروینیای پکتولیتیک از گوجه فرنگی (اهدایی مهندس عصاری، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران)و دو جدایه *Pectobacterium atrospecticum* SCRI1043 و *Dickeya dadantii* 3937 اهدایی Dr.Toth از موسسه تحقیقات زراعی اسکاتلند (Scottish Crop Research Institute)، جهت مقایسه با جدایه های این تحقیق استفاده شد. همچنین جدایه استاندارد *Erwinia carotovora* 5702 نیز از کلکسیون بین المللی میکروارگانیسم های جدا شده از گیاهان [International Collection of Micro-organisms from Plants (ICMP)]، تهیه گردید (مشخصات کلیه جدایه ها در جدول ۱ آمده است).

۲- جداسازی و خالص سازی

اندام های آلوده پس از شستشو با آب، خشک و از بین بافت آلوده و سالم قطعه کوچکی جدا شد. این قطعه در چند قطره آب مقطر استریل درون یک پتری دیش استریل خرد گردید. ۲۰ دقیقه پس از نگه داری نمونه در دمای اتاق، یک یا دو لوپ از هر سوسپانسیون، روی محیط کشت nutrient agar (NA) و eosin methylen blue (EMB)، مخطط (Streak) گردید. پتری های کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵°C درون انکوباتور قرار داده شدند. سپس از پتری دیش های حاوی محیط کشت NA، کلنی هایی با رنگ های خاکستری، خاکستری روشن تا سفید شیری و از پتری دیش های حاوی محیط کشت EMB کلنی هایی با درخشندگی سبز متالیک جدا و جهت اطمینان از خلوص کلنی ها، مجدداً روی محیط NA مخطط و پس از رشد، از هر پتری یک کلنی برداشته و روی محیط ذکر شده بصورت نقطه ای کشت شدند.

۳- آزمون های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک

بمنظور شناسایی و جدا نمودن باکتری های متعلق به گروه "Carotovora" از دیگر باکتری ها، آزمون های لازم شامل گرم، لهانیدن ورقه های سیب زمینی و هویج، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین، تولید گاز از گلوکز، تولید مواد احیا کننده از سوکروز، رشد روی محیط کشت حاوی ۵ و ۶ درصد نمک طعام، رشد در دمای ۳۷°C و تولید فسفاتاز به روش Schaad *et al.*, 2001، آزمون رشد هوازی/بی هوازی به روش Hugh and Leifson, 1953، آزمون لسیتیناز به روش Fahy and Hayward, 1983، آزمون تولید ایندول به روش Dye, 1968 و آزمون حساسیت به اریترومایسین به روش Psallidas, 1993 انجام شد.

۴- تنوع ژنتیکی با تکنیک rep-PCR

تنوع ژنتیکی جدایه ها بر اساس توالی BOX Martin *et al.* (1992) به روش Rademaker and de Bruijn, 1997 با کمی تغییرات بررسی شد. بدین منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها روی محیط کشت NA، سوسپانسیون رقیقی (با غلظت تقریبی CFU/ml 10^{7}-10^{3}) در آب مقطر استریل تهیه و به ۱۰µl از آن، ۱۰۰µl هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵°C قرار داده شد. سپس به مدت ۲ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به عنوان منبع DNA ژنومی به تیوب های سانتریفیوژ ۱/۵ ml استریل منتقل شد و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد.

BOX-PCR با استفاده از آغازگر BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') انجام شد. این آغازگر از شرکت سیناژن-تهران تهیه گردید. ترکیب مخلوط واکنش در حجم نهائی ۲۵µl عبارت بود از 1µl از DNA، 0.1 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase، 2.5µl از 10X PCR Buffer، 1µl از (50mM) $MgCl_2$، 0.5µl از dNTPs (25mM)، 1.1µl از هر آغازگر (10pmol) و واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر مدل

Archive of SID

www.SID.ir

corbett و طبق برنامه یک واسرشت اولیه در ۹۴°C بمدت ۴ دقیقه، ۳۴ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴°C، ۴۰ ثانیه در ۵۰°C، ۱ دقیقه در ۷۲°C و یک بسط نهایی در ۷۲°C بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول واکنش تا زمان الکتروفورز در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید. برای بررسی نتیجه PCR، شش میکرولیتر از نتیجه هر واکنش با دو میکرولیتر بافر لودینگ (Loading Buffer)، مخلوط و در ژل آگارز ۱/۵ درصد و در بافر TBE الکتروفورز شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت و به مدت ۲ ساعت انجام گردید. نشانگر مولکولی 1kb (Fermentas, Germany) جهت بررسی وزن مولکولی باندها استفاده شد. پس از الکتروفورز، ژل با اتیدیوم برماید (۰/۶ میکروگرم در لیتر) رنگ آمیزی و پس از رنگ بری در آب مقطر، در دستگاه UV Transilluminator مشاهده و عکسبرداری لازم صورت گرفت. rep-PCR برای جدایه ها ۳ مرتبه تکرار شد.

جهت تجزیه و تحلیل نتایج، عکس های بدست آمده از ژل های آگارز در برنامه Gel-Pro® Analyzer (Media Cybernetics, MD, USA) آنالیز گردید و وجود یا عدم وجود باندها به اعداد یک و صفر تبدیل شد. ماتریس تشابه در برنامه NTSYS-pc (version 2.02K, Applied Biostatistics, Inc., NY, USA) با استفاده از ضریب جاکارد (Jaccard coefficient)، بدست آمد. برای تعیین رابطه جدایه ها، گروه بندی با UPGMA (unweighted pair-group method, using arithmetic averages) در برنامه SAHN از نرم افزار NTSYS-pc انجام شد و دندروگرام برای نتایج تنوع ژنتیکی ترسیم گردید (Rademaker, 2000).

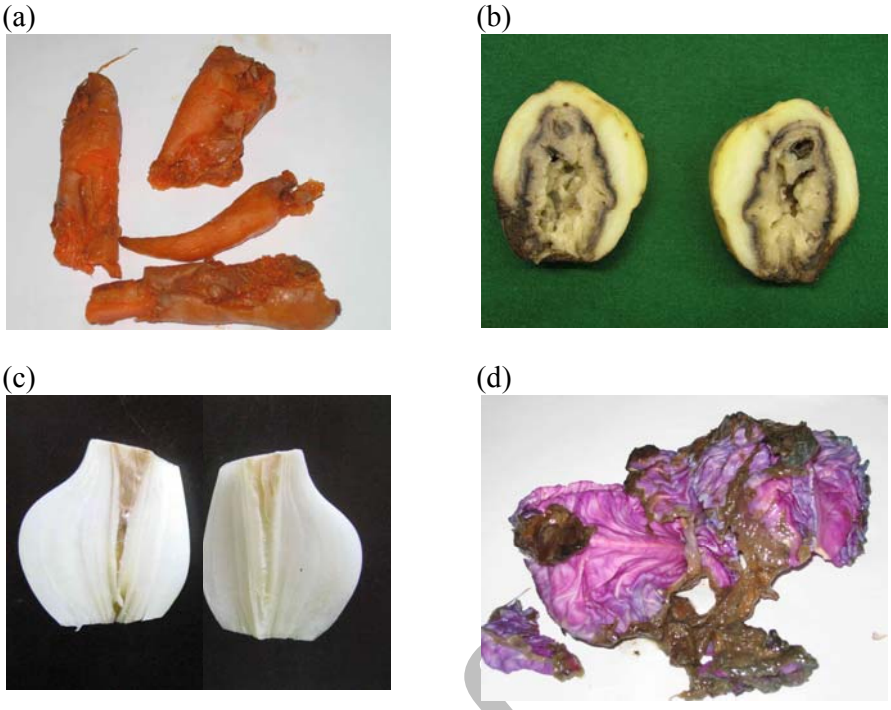
نتیجه

۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه ها

تمامی جدایه ها گرم منفی، بی هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و قادر به لهانیدن ورقه های سیب زمینی بودند. هیچیک از آن ها روی محیط King's B، رنگ فلورسانت تولید نکردند. ۸۸/۶٪ جدایه ها قادر به لهانیدن ورقه های هویج بودند و ۸۴٪ آن ها توانستند در دمای ۳۷°C رشد کنند. در آزمون تحمل ۵٪ نمک طعام تنها جدایه 94B و در تحمل ۶٪ نمک طعام، ۲۹/۵٪ جدایه ها نتوانستند رشد کنند. ۴۷/۷٪ جدایه ها توانایی تولید گاز از گلوکز را داشته و تنها جدایه Dd قادر به تولید لسیتیناز بود. در آزمون تولید ایندول و تولید مواد احیا کننده از سوکروز تنها ۱۵/۹٪ جدایه ها واکنش مثبت داشتند. ۳۶/۴٪ به آنتی بیوتیک اریترومایسین حساس و بقیه به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. در آزمون فسفاتاز به جز ۴۰/۹٪ ، بقیه واکنش مثبت نشان دادند و به استثنای ۴۴/۷٪ بقیه قادر به هیدرولیز ژلاتین بودند (جدول ۲). طبق نتایج حاصل، تنوع زیادی در خصوصیات بیوشیمیایی جدایه ها بدست آمد. بطوریکه خصوصیات بیشتر این جدایه ها بیشترین شباهت را با خصوصیات ذکر شده برای *P. carotovorum* و تعدادی همچون جدایه های 240B، 240C، 248، 261، 364A، 364B بیشترین شباهت را با *D. chrysanthemi* نشان دادند و جدایه های AD4، AD6، AD10، AD22 بیشتر به *P. atrosepticum* شباهت داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- علائم بیماری روی محصولات مورد بررسی

Figure 1. symptoms of disease on infected samples used in this experiment

جدول ۱- مشخصات جدایه های مورد بررسی

Table 1. Bacterial strains used in this experiment

Year isolated	Location of origion	host	Strain
2007	Hamedan (yoknabad)	potato	4B, 28, 29B, 51
2007	Hamedan (bahar)	potato	107
2007	Hamedan (veynesar)	potato	134, 136, 142B
2007	Semnan (fuladmahaleh)	potato	186B
2007	Hormozgan (hajiabad)	potato	299, 300
2008	Tehran (absard damavand)	potato	AD4, AD6, AD10, AD22
2008	Isfahan	potato	C4, C16, C20, C27
2007	Kerman (baft)	onion	240B, 240C, 248
2007	Kerman (jiroft)	onion	261
2007	Azarbaijan sharghi (gharehtapeh)	onion	364A, 364B
2007	Khuzestan (dezful)	carrot	64, 67A, 80, 88, 94B
2007	Azarbaijan sharghi (gharehtapeh)	carrot	374
2008	Zanjan	cabbage	CA2, CA3, CA4, CA5, CA6, CA7, CA9
2008	Kerman (bardsir)	sugar beet	C3
2008	Kerman (bardsir)	sugar beet	D2
2008	Sistan va baluchestan	tomato	T_2
-	-	-	Pa^1
-	-	-	Dd^2
-	-	-	TT^3

1: *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043
2: *Dickeya dadantii* 3937
3: *Erwinia carotovora* 5702

Archive of
www.SID.ir

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی اروینیاهای پکتولیتیک محصولات مناطق مختلف در مقایسه با جدایه استاندارد

Table 2. Phenotypic characteristics of the strains of *Pectobacterium* isolated from plants in comparing to standard isolate

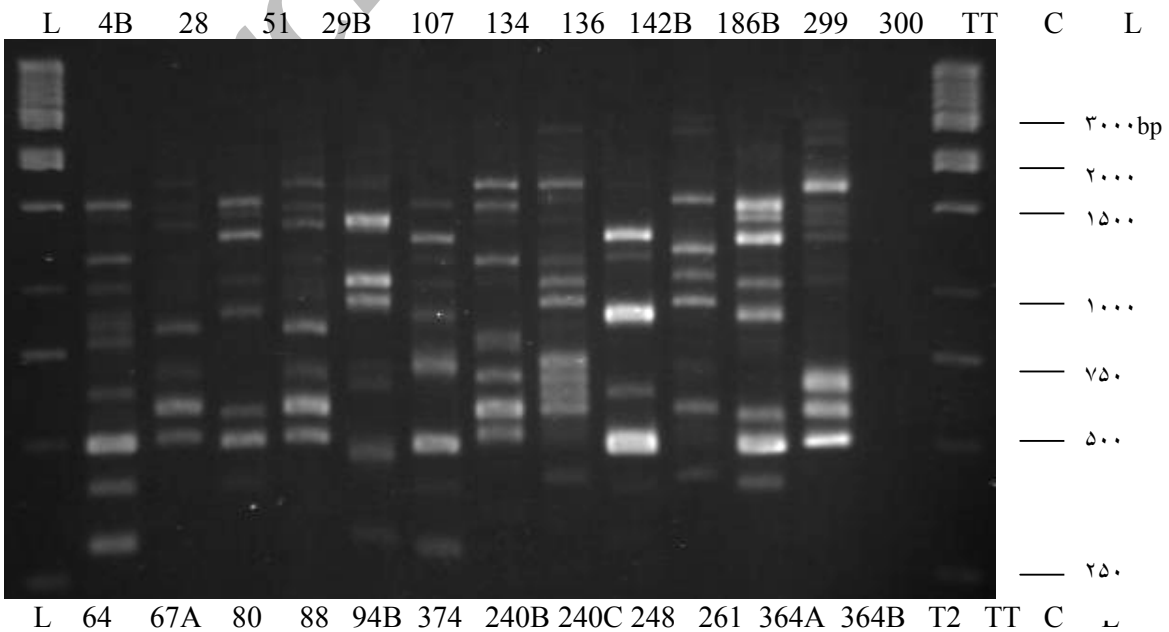
	Results		
Test	Number of strains positive or negative/number of strains tested	% strains positive	*E. carotovora* 5702
Fermentative growth	+(44/44)	100	+
Gram reaction	-(44/44)	0	-
Potato soft rot	+(44/44)	100	+
Carrot soft rot	+(39/44)	88.6	+
Oxidase	-(44/44)	0	-
Catalase	+(44/44)	100	+
Lecithinase	-(43/44)	2.3	-
Gelatin hydrolysis	+(23/44)	52.3	+
Gas from glucose	-(23/44)	47.7	-
Reducing substances from sucrose	-(37/44)	15.9	-
Growth in 5% NaCl	+(43/44)	97.7	+
Growth in 6% NaCl	+(31/44)	70.4	+
Growth at 37 ºC	+(37/44)	84.1	+
Production of Indole	-(38/44)	13.6	-
Sensivity to erythromycin	-(28/44)	36.4	+
Phosphatase	+(24/44)	54.5	+

+: واکنش مثبت؛ -: واکنش منفی

+:Positive reaction; -: negative reaction

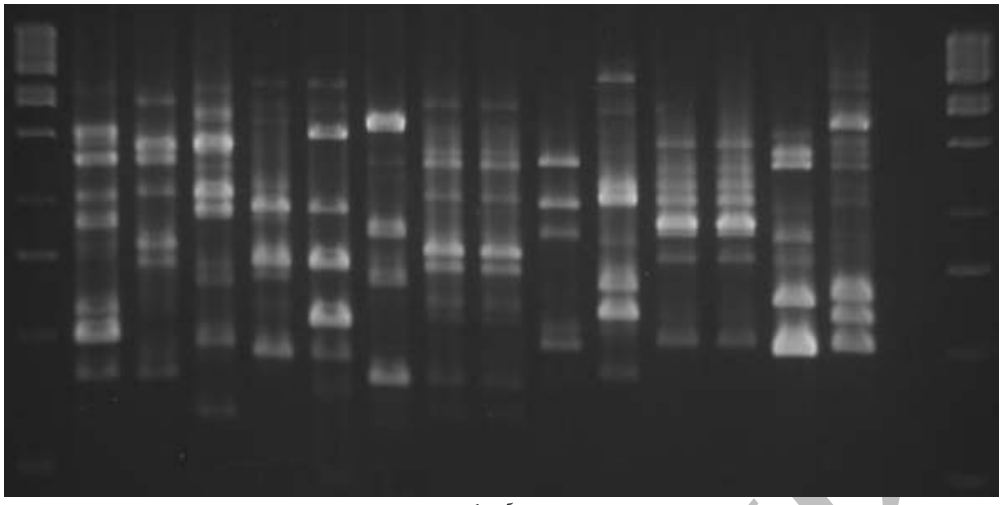
۲- الگوی DNA حاصل از rep-PCR

در این بررسی، همه جدایه های حاصل از میزبان ها و مناطق مختلف کشور همراه با جدایه استاندارد، مورد مقایسه قرا گرفتند. نتیجه انگشت نگاری DNA با آغازگر BOX A1R به صورت ۲۱ باند مشخص شد که حدوداً بین ۲۵۰-۳۰۰۰bp واقع شده بودند. این روش دو گروه ژنوتیپی اصلی که ضریب تشابه آن ها بر پایه UPGMA، ۴۹٪ بود، در جمعیت پاتوژن نشان داد. گروه اول با ۶۹٪ شباهت دارای زیرگونه های فرعی بود که در آن ها ۳ ژنوتیپ بروز داده شد. گروه دوم که بیشترین جمعیت پاتوژن در آن جای گرفته بودند نیز با ۵۱/۵٪ شباهت به دو زیرگروه تقسیم و هر یک از این گروه های فرعی خود دارای تقسیماتی بودند. در نهایت از مجموع ۴۴ جدایه مورد بررسی، ۳۷ ژنوتیپ در میان آن ها بروز پیدا کرد (اشکال ۲ و ۳).



Archive of SID

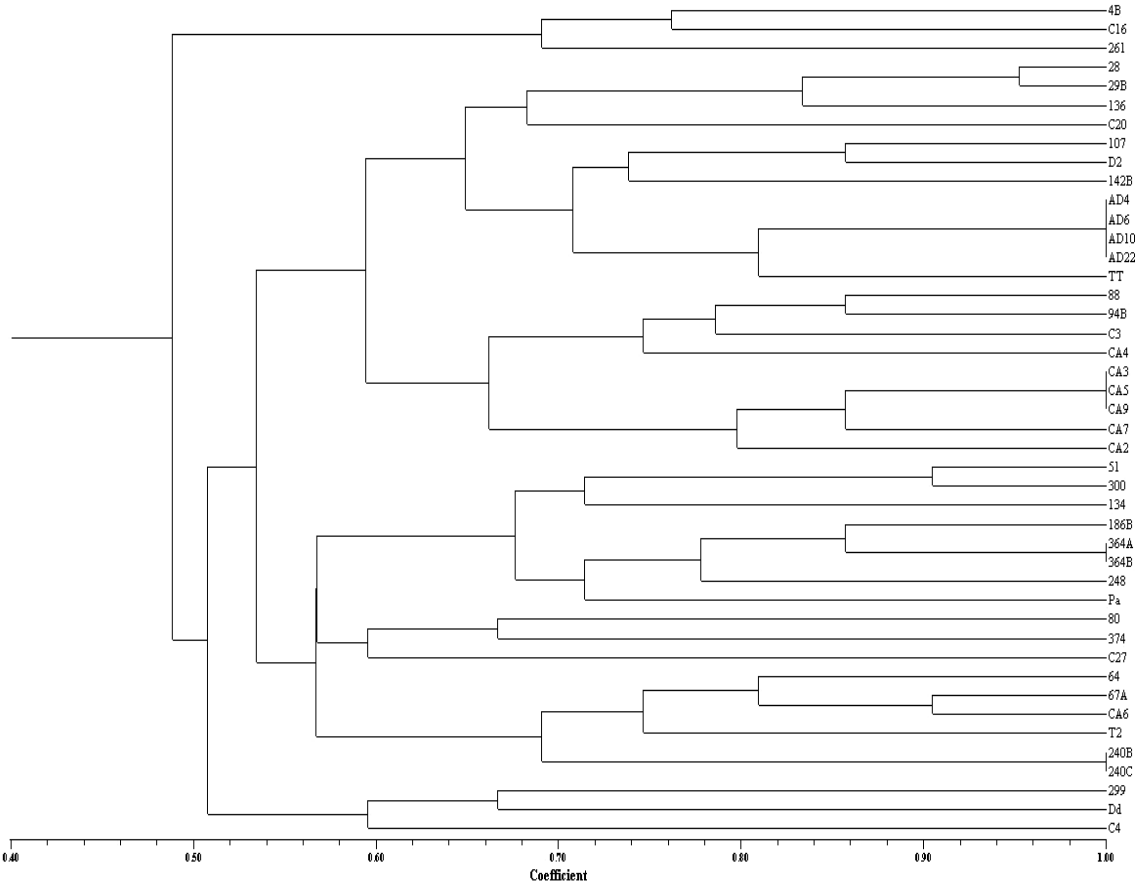
www.SID.ir



شکل ۲- الگوی باندی تکثیر شده از DNA ژنومی حاصل از BOX-PCR با آغازگر BOX A1R در جدایه ها

L: نشانگر 1kb؛ C: کنترل منفی؛ TT: جدایه استاندارد (*E. carotovora* 5702)

Figure 2. DNA fingerprinting of bacterial strains by BOX-PCR using BOX A1R primer
L: DNA ladder (1-kb)**;** C: Negative control (without DNA)**;** TT: Standard isolate (*E. carotovora* 5702)



شکل ۳- دندروگرام ارتباط ژنتیکی حاصل از BOX-PCR میان جدایه ها

Figure 3. dendrogram of the genetic relationships between bacterial strains, based on BOX-PCR fingerprinting

www.SID.ir

بحث

در این تحقیق، خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اروینیاهای پکتولیتیک چند محصول زراعی از مناطق مختلف کشور تعیین و همچنین تنوع ژنتیکی جمعیت این پاتوژن توسط تکنیک rep-PCR بررسی شد.

به لحاظ خصوصیات فنوتیپی، تنوع قابل ملاحظه ای میان جدایه ها مشاهده گردید و در برخی موارد عدم تطابق کامل آن ها با گونه های شناخته شده در دنیا دیده شد. این عدم تطابق در بررسی های قبلی انجام شده توسط محققین، روی اروینیاهای پکتولیتیک سیب زمینی از مناطق مختلف کشور نیز عنوان شده است (ظهورپرالک و همکاران ۱۳۷۶؛ احمدوند و رحیمیان ۱۳۸۱). لذا جهت شناسایی پاتوژن، نیاز به روش های دقیق تر و مطمئن تر همچون روش های متکی بر DNA ضروری بنظر می رسد.

rep-PCR تکنیکی حساس و مطمئن برای تفکیک ایزوله های باکتریایی در سطح زیر گونه است و از دیگر تکنیک های ایجاد اثر انگشت ژنتیکی و بررسی تنوع در درون جمعیت ها روش مناسب تری است (Louws *et al*., 1994). در این بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت بیمارگر با روش BOX-PCR بررسی شد. نتایج بدست آمده از این بررسی، تنوع زیاد میان جدایه ها را نشان داد، به طوری که در بیشتر موارد میان اثر انگشت ژنتیکی جدایه های بدست آمده از یک منطقه خاص نیز این تنوع مشاهده گردید و گاهی جدایه های یک منطقه در دو گروه مجزا از هم قرار گرفتند. از میان ۴۴ جدایه، ۳۷ ژنوتیپ بروز داده شد و جدایه ها دو گروه اصلی را تشکیل دادند که هر گروه دارای زیرگروه هایی بود. هیچیک از آن ها شباهت کامل با جدایه استاندارد را نشان نداد و جدایه استاندارد با ۸۱٪ شباهت در کنار جدایه های سیب زمینی آبسرد دماوند در یکی از گروه های فرعی قرار گرفت. جدایه هایی که جهت مقایسه با جدایه های این تحقیق بکار رفتند به طور پراکنده در میان گروه بندی ها جای گرفتند و ژنوتیپ یکسانی را با هیچیک از جدایه ها نشان ندادند. همچنین میان اثر انگشت ژنتیکی جدایه ها با منطقه نمونه برداری آن ها ارتباط خاصی دیده نشد.

مجموع نتایج بدست آمده نشان می دهد ۷۴٪ جدایه ها به *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*، ۱۶٪ آن ها به *D. chrysanthemi* و ۱۰٪ شبیه به *P. atrosepticum* بودند. در این میان، جدایه های پیاز جمع آوری شده از استان کرمان بیشترین شباهت را به *D. chrysanthemi* نشان دادند. درجه حرارت مناسب برای فعالیت باکتری یاد شده ۲۷، ۳۳/۵ و ۳۷°C می باشد (Agrios, 1988) که با توجه به شرایط آب و هوایی گرم استان کرمان جداسازی این باکتری دور از انتظار نبود. همچنین جدایه های سیب زمینی آبسرد دماوند به *P. atrosepticum* شبیه بودند. گونه یاد شده از زیانبارترین باکتری های پکتولیتیک در آب و هوای سرد به شمار می رود (Perombelon and Kelman, 1980) و اهمیت زیاد این عامل و جداسازی آن از روی سیب زمینی در بررسی های محققین دیگر در مناطق خنک و مرطوب، عنوان شده است (Molina and Harrison, 1977). جدایه های سیب زمینی، هویج و کلم مناطق دیگر نیز بیشترین شباهت را به زیرگونه *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* نشان دادند.

با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین جمعیت پاتوژن در کشور، زیرگونه یاد شده می باشد. در آینده لازم است مطالعات مولکولی گسترده تری روی پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم در حجم وسیع روی میزبانان بیشتر به منظور شناسایی دقیقتر و دستیابی به راه های کنترل بهتر این پاتوژن انجام پذیرد.

منابع و مآخذ:

۱. احمدوند، ر. و ح. رحیمیان، ۱۳۸۱. بررسی تنوع *Erwinia*های پکتولیتیک بیماریزا روی سیب زمینی در استان همدان. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه رازی کرمانشاه. ص ۱۸۷.

۲. امانی، ب. ۱۳۴۶. گندیدگی نباتات زینتی و سبزیجات. مجله بیماری های گیاهی. جلد ۴، ص ۱۳-۱۰.

Archive of SID

www.SID.ir

۳. بهار، م. و د. دانش، ۱۳۶۵. بروز بیماری ساق سیاه سیب زمینی در اصفهان. خلاصه مقالات هشتمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. ص ۱۰۳.

۴. حجارود، ق.ع. ۱۳۴۶. پوسیدگی نرم غده سیکلامن در ایران. مجله بیماری های گیاهی. جلد ۴، ص ۲۳-۱۹.

۵. سهیلی مقدم، ب. و ن. حسن زاده، ۱۳۸۳. شناسایی اروینیاهای مولد بیماری پوسیدگی نرم سیب زمینی در استان اردبیل. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه تبریز. ص ۲۲۷.

۶. ظهورپرالک، ا.، ح. رحیمیان، و ض. بنی هاشمی، ۱۳۷۷. شناسایی *Erwinia* های مولد پوسیدگی نرم سیب زمینی در استان فارس. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشکده کشاورزی کرج. ص ۱۷۱.

7.Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology. 3rd ed. Academic Press, New York. 803 pp.

8.Avrova, A. O., L. J. Hyman, R. J. Toth, and I. K. Toth. 2002. Application of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Applied and Environmental Microbiology 94: 1108-1116.

9.Barras. F., F. Van Gijsegem, and A. K. Chatterjee. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. Annual Review of Phytopathology 32: 201-34.

10. Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The `amylovora' group. New Zealand Journal of Science 11: 590-607.

11. Fahy, P. C., and A. C. Hayward. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic test. In: Fahy, P. C., Persley, G. J. (eds.) Plant Bacterial Disease A Diagnostic Guide. pp. 337-378. Academic Press. Sidney, Austeralia.

12. Graham, D. C. 1964. Taxonomy of the soft rot coliform bacteria. Annual Review of Phytopathology 2: 13-42.

13. Hugh, R., and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. Journal of Bacteriology 66: 24-26.

14. Louws, F. J., D. W. Fulbright, C. T. Stephens, and F. J. de Bruijn. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60: 2286–2295.

15. Maki-Valkama, T. and R. Karjalainen. 1994. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. Annals of Applied Biology 125: 301–309.

16. Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, and R. Hakenbeck. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Research 20: 3479-3483.

17. Milgroom, M. G. and W. E. Fry. 1997. Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. Advances in Botanical Research 24: 1-30.

18. Molina, J. and M. D. Harrison. 1977. The role of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg. I. relationship of *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var *atroseptica* to potato blackleg in Colorado. American Potato Journal 54: 587-597.

19. Nassar, A., A. Darrasse, M. Lemattre, A. Kotoujansky, C. Dervin, R. Vedel, and Y. Bertheau. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. Applied and Environmental Microbiology 62: 2228-2235.

20. Perombelon, M. C. M. and A. Kelman. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology 18: 361-387.

Archive of SID

www.SID.ir

21. Perombelon, M. C. M, 1992. Potato blackleg: epidemiology, host– pathogen interaction and control. Netherlands Journal of Plant Pathology 98(Suppl. 2): 135-46.
22. Psallidas, P. G. 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellanae*. Plant Pathology 42: 358-363.
23. Rademaker, J. L. W. and F. J. de Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: Caetano-Anolles G, Gresshoff PM, eds. DNA Markers: Protocols, Application and Overviews. New York, USA: John Wiley & Sons: 151-171.
24. Rademaker, J. L. W., B. Hoste, F. J. Louws, K. Kersters, J. Swings, L. Vauterin, P. Vauterin, and F. J. de Bruijn. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 665-677.
25. Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Ed, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.
26. Toth, I. K., Y. Bertheau, L. J. Hyman, and 9 other authors. 1999. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Journal of Applied Microbiology 87: 770-781.
27. Xiu, J. H., G. H. Ji, M. Wang, Y. L. Yang, and C. Y. Li. 2006. Molecular identification and genetic diversity in Konnyaku's soft rot bacteria 46(4): 522-525.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir