مقایسه اروینیاهای پکتولیتک سیب‌زمینی در استان فارس

A comparative study on pectolytic erwinias isolated from potato in the Fars province

اسفندیار ظهور پرالک*، حشمت‌اله رحیمیان، و ضیاءالدین بنی‌هاشمی

بخش گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه مازندران، ساری، بخش گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

دریافت ۸۲/۱۱/۱۱ پذیرش ۸۶/۸/۲۸

چکیده

نمونه‌های ساقه و غده‌های سیب‌زمینی با علائم ساق سیاه و پوسیدگی نرم در سال‌های ۱۳۷٤ و ۱۳۷۵ از مزارع سیب‌زمینی مناطق مختلف استان فارس جمع‌آوری و *Erwinia*های مولد پوسیدگی نرم از آنها جدا سازی شد. براساس یکصد آزمون فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شده، استرین‌های جدا شده در چهار گروه مختلف قرار گرفتند. دو گروه از آنها که به عنوان *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum(Pcc)* و *Pectobacterium atrosepticum(Pa)* شناسایی شدند در اکثر مناطق نمونه‌برداری شده وجود داشتند. ولی دو گروه دیگر که از نظر برخی خصوصیات فنوتیپی با مشخصات ذکر شده برای گونه و زیر گونه‌های اروینیاهای پوسیدگی نرم مطابقت نداشتند از نمونه‌های آلوده پاره‌ای مناطق جدا گردید. جدایه‌های دو گروه فوق از نظر تعدادی از خصوصیات کلیدی گونه و زیر گونه‌های شناخته شده متمایز بودند و بینابین آنها قرار می‌گیرند. براساس آنالیز عددی و ترسیم دندروگرام ارتباط جدایه‌ها و گروهها مشخص گردید. جدایه‌های گروه سوم بیشترین شباهت (۸٤ درصد) را به *Pcc* و جدایه‌های گروه ٤ بالاترین شباهت (۷٤ درصد) را به *Pa* داشتند.

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

نقوش متفاوت الکتروفورزی پروتئین‌های جدایه‌ها در گروههای چهار گانه نیز بیانگر تنوع و تفاوت قابل ملاحظه آنها بود. این نقوش از نقوش جدایه‌های شناخته شده *Pcc* و *Dickeya chrysanthemi(Dc)* (استرین ذرت) نیز متمایز بود.

واژه‌های کلیدی: Dickeya، Pectobacterium، پوسیدگی نرم

مقدمه

پوسیدگی نرم باکتریائی اولین بار از ریشه هویج به وسیله جونز (رجوع شود به Graham 1964) از آمریکا گزارش شد. سپس Van Hall از هلند و Apple از آلمان بطور مستقل بیماری ساق سیاه سیب‌زمینی (potato black leg) را گزارش کردند (نقل از Graham 1964). از ویژگی‌های اصلی باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم (soft rot bacteria) تولید و ترشح آنزیم‌های منهدم کننده دیواره سلولی، به ویژه آنزیم های پکتیناز یا پکتولیتیک (pectolytic enzymes) است که موجب لهانیده شدن بافت‌های گیاهی می‌گردند (Barras *et al.*1994). باکتری‌های مولد پوسیدگی‌های نرم در خانواده‌های *Enterobacteriaceae* و *Pseudomonadaceae* قرار داشته و شامل گونه‌های *Pectobacterium* (قبلا *Erwinia*) (Gardan *et al.* 2003, Hauben *et al.* 1998) و *Pseudomonas* هستند (Fahy & Persley 1983, Schaad *et al.* 2001).

پکتو باکتریوم‌ها یا اروینیاهای پوسیدگی نرم روی طیف وسیعی از گیاهان به ویژه گونه‌های دارای اندام‌های ذخیره‌ای یا آبدار و گوشتی بیماریزا بوده و محدودیت یا ویژگی میزبانی (host specificity) چندانی ندارند. این باکتری‌ها می توانند مستقلا و یا به کمک سایر انگل‌ها اندام‌های مختلف گیاهی را آلوده نمایند (Barras *et al.*. 1994). گونه‌های پکتوباکتریوم به عنوان عامل ایجاد پوسیدگی نرم، پژمردگی و لکه برگی از گیاهان مختلف اعم از گیاهان زینتی مانند داوودی (*Chrysanthemum* spp.)، بنفشه آفریقائی (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl)، و دیفن باخیا (*Dieffenbachia* spp.) گیاهان زراعی از جمله ذرت (*Zea mays* L.)، سیب‌زمینی (*Solamum tuberosum* L.)، کلم چینی (*Brassica chinensis*)، آناناس(*Ananas comosus* L)و گوجه‌فرنگی (*Lycopersica esculentum* Mill) جدا شده‌اند (Dickey 1979).

به دلیل وجود تفاوت قابل توجه بین پکتوباکتریوم‌ها و اروینیاهای واقعی (true erwinias)

Archive of SID

www.SID.ir

یا گروه *amylovora* (*amylovora* group) دای این دسته از اروینیاها را در گروه جداگانه‌ای به نام اروینیاهای پوسیدگی نرم قرار داد (Dye 1968,1969).

برنر و همکاران (Brenner *et al.* 1973) با انجام DNA hybridization روی اروینیاها و نیز تعدادی از گونه‌های متعلق به جنس‌های مختلف خانواده *Enterobacteriaceae* نشان دادند که جدایه‌های دو گونه *Erwinia carotovora* و *Erwinia chrysanthemi* از نظر شباهت یا همولوژی DNA (DNA homology)، از یکدیگر واز بقیه گونه‌های این خانواده متمایز هستند؛ و با وجود پیشنهاد غیر رسمی والدی (Waldee 1945) د رنامیدن اعضاء این گروه به عنوان *Pectobacterium* از تغییر نام جنس اجتناب نمودند. در تعیین ارتباط فیلوژنتیکی گونه‌های *Erwinia* براساس توالی ژن RNA ریبوزومی 16S، *E.chrysanthemi* و ۳ زیر گونه *E. caratovora* (*wasabiae , carotovora, betavascalorum*) با هم ولی جدا از گونه‌های دیگر جنس گروه بندی شدند (Kwon *et al.* 1997). *هابن* و همکاران (Hauben *et al.*. 1998) نیز با مقایسه توالی‌های ژن 16S rRNA و آنالیز چربی‌های سلولی گونه‌ها و زیر گونه‌های *Erwinia* ، *Pantoea* و سایر جنس‌های خانواده *Enterobacteriaceae* گونه‌های *Erwinia* را در ۳ گروه مختلف و متمایز از گروه *Pantoea* قرار دادند. گونه‌ها و همچنین زیر گونه‌های پکتولیتیک را در جنس *Pectobacterium* و بقیه گونه‌ها را در جنس‌های *Erwinia* و *Brenneria* طبقه بندی نمودند. گونه‌ها و زیر گونه‌های *Pectobacterium* به اسامی :

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum(Pcc)*
Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum(Pca)*
Pectobacterium carotovorum subsp. *betavasculorum(Pcb)*
Pectobacterium carotovorum subsp. *odoriferum(Pco)*
Pectobacterium carotovorum subsp. *wasabiae(Pcw)*
P. chrysanthemi(Pch)
P. cypripedii(Pcy)
P. cacticidum(Pct)

نامگذاری شدند (Hauben *et al.* 1998).

اخیرا *گاردان* و همکاران(Gardan *et at.* 2003) با بررسی‌های سرولوژیکی، همولوژی DNA و ویژگی‌های فنوتیپی و نیز مقایسه توالی‌های ژن 16S rRNA زیر گونه‌های گونه" *P. carotovorum* پیشنهاد کردنده‌اند که زیر گونه‌های *Pcw, Pcb, Pca* به گونه ارتقاء یافته و به

Archive of SID

www.SID.ir

ترتیب *P. atrosepticum* ، *P. betavasculorum* و *P.wasabiae* نامیده شوند و فقط *Pcc* و *Pco* در سطح زیر گونه باقی بمانند.

متعاقباً سمسون و همکاران (Samson *et al.*. 2005) تعدادی از گونه‌ها و نیز پاتووارهای شناخته شده را از جنس *Pectobacterium* به جنس جدید *Dickeya* منتقل نمودند. مهم‌ترین گونه‌های توصیف شده جنس اخیر (*Dc*)*D.chrysanthemi* ،(*Dd*) *D.dieffenbachiae* ، (*Dz*) *D.zeae* و (*Ddi*)*D.dianthicola* هستند گونه‌های *P. atrosepticum* (عامل ساق سیاه سیب‌زمینی) *P.betavassculorum* (عامل نکروز چغندر قند) *Dc* (عامل پوسیدگی ساقه ذرت و طیفی از گیاهان دیگر و نیز عامل لکه برگی در محصولات باغی و زینتی)، زیر گونه *Pcc* (عامل پوسیدگی نرم و لکه برگی در طیف گسترده‌ای از محصولات زراعی، باغی و زینتی)، انتشار وسیعی در کشورهای مختلف دارند (Bradbury 1986, Fahy & Persley 1983). در مقابل *P. wasabiae* (عامل پوسیدگی ریزوم‌های *Eutrema wasabi* در ژاپن) (Goto & Matsomoto 1987)، *Pco* (عامل پوسیدگی نرم ریواس، *Cichorium intybus L.* در اروپا) (Gallois *et al.* 1992)، *Pcy* (عامل پوسیدگی قهوه ای ارکیدها) (Bradbury 1986) و *Pct* (عامل پوسیدگی ساقه کاکتوس در آمریکا) (Alkorn *et al.* 1991) در دنیا گسترش محدودی دارند.

در ایران اولین بار *حجاورد* (Hedjarood 1967) پوسیدگی نرم غده سیکلامن را بررسی و عامل بیماری را گونه‌ای از *Pectobacterium* معرفی کرد. متعاقب آن *امانی* (Amani 1967) نیز از غده‌های آلوده سیکلامن باکتری عامل بیماری را جدا کرده و براساس ویژگی‌های مرفولوژیکی و بیوشیمیایی *E. carotovorum (P. carotovora)* تشخیص داد. بررسی‌هائی روی پوسیدگی نرم غده و ساق سیاه سیب‌زمینی توسط *بهار و دانش* (Bahar & Danesh 1986) در اصفهان و *فریدونی* (Ferydoni 1994) روی غده‌های جمع‌آوری شده از مناطق مهم سیب‌زمینی کاری کشور انجام شده است و زیرگونه‌های *Pca* و *Pcc* به عنوان عامل بیماری معرفی گردیده اند. عرب و رحیمیان (Arab & Rahimian 1982) عامل لکه برگی و پوسیدگی ساقه دیفن باخیا و رحیمیان و طالعی (Rahimian & Talei 1995) عامل لکه برگی زنبق (*Iris* spp.) را در مازندران *Pcc* معرفی نمودند. گونه *Dc* نیز به عنوان باکتری عامل پوسیدگی ساقه ذرت از فارس و مازندران گزارش گردیده است (Banapoor & Amani 1986, Masumi & Izadpanah 1988).

Archive of SID

www.SID.ir

در برخی از بررسی‌های انجام شده روی جدایه‌های *Pcc* در ایران، جدایه‌ها ویژگی‌های خاص و متمایزی از *Pcc* و دیگر زیر گونه‌های *Pc* استاندارد داشته‌اند (Ferydoni 1994 و رحیمیان منتشر نشده). در استان خوزستان نیز جدایه‌های *Pcc* و *Dc* توسط *سلطانی‌نژاد* وهمکاران مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Soltani-Nejed *et al.* 2005). هدف این تحقیق بررسی دامنه تغییرات و تنوع جدایه‌های عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در مناطق مهم زیر کشت این محصول در استان فارس بوده است.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی

از مزارع مختلف سیب‌زمینی مناطقی از فارس شامل حاشیه دریاچه مهارلو، آباده، ده بید، اقلید، داریون و خرامه و جلگه رخ خراسان در طول فصول زراعی ۷۵-۷٤ بازدید شد در هر منطقه از چندین مزرعه و از هر مزرعه از تعدادی بوته با علائم بیماری پوسیدگی غده و ساق سیاه نمونه‌برداری به عمل آمد. همچنین غده آلوده سیب‌زمینی و هویج از بازار شیراز و ریشه‌های چغندر قند از مزارع جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت جداسازی عامل بیماری، اندامهای آلوده یک بار توسط آب معمولی و دوبار با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس قطعاتی از قسمت های آلوده جدا و در تشک پتری استریل حاوی چند میلی لیتر آب مقطر استریل خرد شد. بعد از ۱۰تا ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، یک لوپ از سوسپانسیون حاصل روی محیط EMB (ائوزین متیلن بلوآگار) کشت گردید و تشتک‌ها در دمای ۲۷ تا۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۲تا ۳ روز کلنی‌های ریز و نسبتا برجسته با سایه سبز متالیک جدا و روی محیط یاده شده تکثیر گردیدند. جهت اطمینان از خلوص، دوباره باکتری روی محیط EMB یا آگار غذایی (nutrient agar). مخطط شد. با مایه زنی روی برش های سیب‌زمینی، جدایه‌های ایجاد کننده لهیدگی از باکتری های دیگر متمایز و انتخاب گردیدند. برای نگهداری کوتاه مدت، جدایه‌ها روی محیط آگار غذایی به مدت ۲٤ ساعت کشت و پس از افزودن پارافین در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. یک نمونه از هر جدایه نیز لیوفی لایز(lyophilize) گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

از جدایه‌های شناخته شده *Pcc* (جدایه‌های ۱۰۳و۱۱۱ زنبق)، *Dc* (جدایه‌های ۴۲۱ ذرت) و*Pa* (جدایه ۱۱ سیب‌زمینی) موجود در مجموعه کشت‌های آزمایشگاهی باکتری‌شناسی دانشکده کشاورزی ساری به عنوان استاندارد در اکثر آزمون‌ها استفاده شد.

آزمونهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

شکل پرگنه روی محیط EMB بررسی گردید. واکنش گرم (Gram reaction) جدایه‌ها با روش‌های حلالیت در محلول پتاس ۳٪ (Suslow *et al.* 1982) و رنگ‌آمیزی تاژک با روش نیترات نقره (Rhodes 1958) تعیین شد. آزمون هوازی و بی هوازی به روش هیو و لایف سن (Hugh & Leifson 1953) و لهاندن ورقه های سیب‌زمینی به روش *شاد* (Schaad 2001) انجام گردید.

آزمون اوره از به روش کریستنسن (Christensen 1946) صورت گرفت. تحمل نمک طعام به روش *شاد* (Schaad 2001) و تولید اندول، داکسی ریبونوکلناز و فنیل آلانین د آمیناز به روش *گراهام و هاجکیس* (Graham & Hodgkiss 1967) انجام شد. سایر آزمونهای بیوشیمیایی و تغذیه‌ای به روش‌های یاد شده قبلی (Rahimian 1994) صورت گرفت.

توانایی جدایه‌ها در استفاده از مواد آلی مختلف به عنوان منبع کربن با استفاده از محیط *آیرو* و همکاران (Ayer *et al.*. 1919) و با افزودن آگار به غلظت ۱/۲ درصد و عصار مخمر به غلظت ۰/۱درصد تعیین شد. منابع کربن با روش تندال (Tyndallization) یا عبور از فیلترهای میلی‌پور (millipore) استریل گردید و به غلظت نهایی ۰/۵تا۰/۱ درصد به محیط پایه اضافه شد. برای بررسی قابلیت جدایه‌ها در استفاده از آمینواسیدها و دیگر ترکیبات ازته به عنوان منبع ازت، از محیط پایه آیر و همکاران با تغییراتی استفاده شد. فسفات پتاسیم به جای فسفات آمونیوم به کار برده شده و گلوکز به غلظت نهایی یک درصد به آن اضافه گردید. نمونه‌های کشت شده در دمای ۲۷ ºC تا ٤ هفته نگهداری و نتایج به طور هفتگی ارزیابی شد.

به منظور گروه بندی جدایه‌های به دست آمده و ترسیم دندرو گرام (Dendrogram) از روش (Principal component analysis) استفاده شد (Farshadfar 1991). جهت دسته بندی (Clustering) از روش Ward استفاده شد و دندروگرام براساس متغیرهای (آزمونهای)مورد بررسی (در محیط SPSS) ترسیم شد.

بیماریزائی

Archive of SID

www.SID.ir

بیماریزائی جدایه‌ها براساس قابلیت تولید پوسیدگی نرم و ساق سیاه روی غده و ساقه سیب‌زمینی و ریشه چغندرقند و ایجاد آب سوختگی و نکروز در برگ گیاه دیفن باخیا ارزیابی شد. بدین منظور بوته ها و غده‌های سیب‌زمینی در گلدان‌های دارای خاک استریل (مخلوط مساوی خاک باغچه و ماسه) در شرایط گلخانه کاشته و نگهداری گردیدند.

سوسپانسیون جدایه (با دانسیته نوری ۰/۱در ٦۰۰ نانومتر) به کمک سرنگ به زیر پوست سیب‌زمینی و ریشه چغندرقند و حاشیه برگ دیفن با خیا تزریق شد و یا به وسیله لوله های (Haematocrit) در ساقه‌های سیب‌زمینی مایه‌زنی شدند. گلدانها در شرایط گلخانه نگهداری و تا دو ماه پس از مایه زنی ارزیابی شدند.

الکتروفورز پروتئینهای سلولی

استرین‌ها روی محیط آگار غذایی کشت و به مدت ٤٨-٢٤ ساعت در دمای اتاق، نگهداری گردیدند. کلنی‌ها در آب مقطر سوسپانسیون شده و دانسیته نوری(OD) آنها در ٦۰۰ نانومتر به ۱-۰/۸ واحد تنظیم گردید. پروتئینهای سلولهای باکتری با افزودن بافر نمونه حاویSDS (سدیم دودسیل سولفات) و مرکاپتواتانول (Mercaptoethanol) به ترتیب با غلظت ۱ و۲ درصد استخراج گردید و پس از جوشاندن به مدت دو دقیقه آماده الکتروفورز شدند. الکتروفورز در ژل ۱۰ درصد پلی آکریل آمید(polyacrylamide) و در حضور SDS براساس سیستم ناپیوسته *لملی* (Laemmli 1970) صورت گرفت. سایر شرایط الکتروفورز و نحوه رنگ آمیزی ژل با کومازوی بلو(Comassie blue) قبلا شرح داده شده است (Rahimian 1994).

نتیجه

از کشت بافت‌های سیب‌زمینی، چغندرقند، هویج و غده‌های سیکلامن کلنی‌های ریز برجسته با حاشیه منظم، گاهی نامنظم و با سایه سبز متالیک جدا و خالص‌سازی شد.

سلولهای باکتری‌های جداسازی شده میله‌ای، گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، متحرک، دارای چندین تاژک محیطی و قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند. دمای مناسب رشد آنها ۳۰-۲۷ درجه سانتیگراد بود.

تمامی جدایه‌ها اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و اوره آز منفی و قادر به تولید گاز H_2S از

Archive of SID

www.SID.ir

سیستئین و تیوسولفات سدیم بودند.همچنین نمک طعام ٤و٥ درصد را تحمل نموده ولی توئین ۸۰ را هیدرولیز نکردند. هیچ یک از جدایه‌ها روی محیط King B رنگدانه فلورسنت تولید نکردند. در تولید گاز از گلوکز، هیدرولیز نشاسته، ژلاتین، اسکولین، تولید اندول و حساسیت به اریترومایسین واثر روی شیر لیتموس واکنش‌های یکسانی نشان ندادند. تمامی جدایه‌ها از قندهای ساکارز، D گلوکز، سالیسین، تری هالوز، آرابینوز، L رامنوز، D زایلوز، D فروکتوز و لاکتوز استفاده و اسید تولید نمودند. از ملی بیوز و D رافینوزبه ترتیب ۹٤ و ۹۲ درصد از جدایه‌ها استفاده و اسید تولید نمودند از قندهای گالاکتوز ۹۸٪، سوربیتول ۹۰٪، آمیگدالین ۸۸٪ و دکسترین ۸۲٪، مالتوز ۷٤٪، اینولین ٦٦٪، آلفا میتل دی گلوکوزید ٥۰٪، پالاتینوز ٤۰٪ و اینوزیتول ۳۸٪ از جدایه‌ها استفاده و تولید اسید نمودند. کلیه آنها قادربه استفاده از نمک لاکتات بودند از نمک‌های سیترات ۹٦٪، استات ۹٤٪، گالاکتورانات ٤۲٪ و مالونات ۷۲٪ جدایه‌ها بعنوان منبع کربن استفاده نمودند فقط ۱۲٪ از جدایه‌ها قادر به استفاده از تارتارات بودند (جدول۲)، میزبان و محل جمع‌آوری نمونه‌های آلوده پوسیدگی نرم و ساق سیاه بر حسب گروه‌های بدست‌آمده از طریق Principal component analysis (Farshadfar 1991) در جدول ۱ خلاصه شده‌اند.

جدول ۱- میزبان و محل جمع‌آوری نمونه‌های آلوده به پوسیدگی نرم در گروههای مختلف براساس ویژگی‌های فنوتیپی

Table 1. Source and location of samples infected with bacterial isolates of different phenotypic groups

شماره جدایه Isolates No.	گیاه Plants	محل جمع‌آوری Location	تعداد نمونه‌ها No of samples
		گروه اول (Phenon 1)	
1	سیب‌زمینی (Potato)	ده بید Deh Beed	2
2	سیب‌زمینی (Potato)	ده بید Deh Beed	3
3	سیب‌زمینی (Potato)	اقلید Eqlid	1
4	سیب‌زمینی (Potato)	اقلید Eqlid	2
5	سیب‌زمینی (Potato)	اقلید Eqlid	2
6	سیب‌زمینی (Potato)	مشهد Mashad	3

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- (ادامه) Table 1. (continued)

3	مشهد Mashad	سیب‌زمینی (Potato)	7
4	مشهد Mashad	سیب‌زمینی (Potato)	8
2	مشهد Mashad	سیب‌زمینی (Potato)	9
2	مشهد Mashad	سیب‌زمینی (Potato)	10
3	ده بیدهDeh Beed	سیب‌زمینی (Potato)	11
3	ده بید Deh Beed	سیب‌زمینی (Potato)	12
	گروه دوم (Phenon 2)		
3	آباده Abadeh	سیب‌زمینی (Potato)	13
1	باجگاه Badjgah	سیب‌زمینی (Potato)	14
1	باجگاه Badjgah	سیب‌زمینی (Potato)	15
4	انبار شیراز Shiraz stores	هویج (Carrot)	16
3	انبارشیراز Shiraz stores	شلغم (Turnip)	17
3	فسا Fasa	چغندرقند (Sugar beet)	18
1	ده بید Deh Beed	سیب‌زمینی (Potato)	19
2	ده بید Deh Beed	سیب‌زمینی (Potato)	20
1	ده بید Deh Beed	سیب‌زمینی (Potato)	21
	گروه سوم (Phenon 3)		
2	آباده Abadeh	سیب‌زمینی (Potato)	22
3	آباده Abadeh	سیب‌زمینی (Potato)	23
3	آباده Abadeh	سیب‌زمینی (Potato)	24
3	آباده Abadeh	سیب‌زمینی (Potato)	25
2	کلبه سعدی Kolbeh saadi	سیب‌زمینی (Potato)	26
2	کلبه سعدی Kolbeh saadi	سیب‌زمینی (Potato)	27
3	کلبه سعدی Kolbeh saadi	سیب‌زمینی (Potato)	28

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- (ادامه) Table 1. (continued)

2	شیراز Shiraz	سیب‌زمینی (Potato)	29
2	اقلید Eqlid	سیب‌زمینی (Potato)	30
3	مهارلو Maharlo	سیب‌زمینی (Potato)	31
3	مهارلو Maharlo	سیب‌زمینی (Potato)	32
2	مهارلو Maharlo	سیب‌زمینی (Potato)	33
1	باجگاه Badjgah	سیب‌زمینی (Potato)	34
2	فسا Fasa	چغندر قند (Sugar beet)	35
	گروه چهارم (Phenon 4)		
2	آباده Abadeh	سیب‌زمینی (Potato)	36
3	آباده Abadeh	سیب‌زمینی (Potato)	37
2	شیراز Shiraz	سیب‌زمینی (Potato)	38
3	شیراز Shiraz	سیب‌زمینی (Potato)	39
3	ده بید Deh Beed	سیب‌زمینی (Potato)	40
3	مهارلو Maharlo	سیب‌زمینی (Potato)	41
3	مهارلو Maharlo	سیب‌زمینی (Potato)	42
2	مهارلو Maharlo	سیب‌زمینی (Potato)	43
3	باجگاه Badjgah	سیب‌زمینی (Potato)	44
1	باجگاه Badjgah	سیب‌زمینی (Potato)	45
1	باجگاه Badjgah	سیب‌زمینی (Potato)	46
3	باجگاه Badjgah	سیب‌زمینی (Potato)	47
3	جنگل ساری Sari forest	سیکلامن وحشی (Cyclamen)	48
2	کلبه سعدی Kolbeh saadi	سیب‌زمینی (Potato)	49
3	کلبه سعدی Kolbeh saadi	سیب‌زمینی (Potato)	50
3	کلبه سعدی Kolbeh saadi	سیب‌زمینی (Potato)	51

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ۵۱ جدایه حاصل از۱۲۵ نمونه سیب‌زمینی، چغندرقند، هویج، سیکلامن و شلغم در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدایه‌ها براساس آنالیز عددی و با توجه به خصوصیات مهم فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در چهار گروه قرار گرفتند (جدول ۲ و شکل ۱).

جدایه‌ها براساس شکل کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، تحرک، لهاندن ورقه‌های سیب‌زمینی، احیاء نیترات، عدم تولید آنزیم اوره آز و لسیتیناز و استفاده از گلوکز در شرایط بیهوازی و استفاده از قندهای ساکارز، فروکتوز، گلوکز، ریبوز، اینوزیتول و پالاتینوز در گونه *Pectobacterium carotovorum* قرار گرفتند.

پراکندگی اروینیاهای مولد پوسیدگی نرم در گروههای بدست امده به علت اختلاف در برخی آزمونها و نیز اختلاف در تولید اسید واستفاده از قندهای مختلف می باشد، خصوصیات افتراقی گروه ها در جدول ۳ منعکس شده است.

کلیه جدایه‌ها نسبت به وانکومایسین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، تتراسیکلین و استرپتومایسین مقاوم بودند. سایر آنها در برابر اریترومایسین، کاربنی سیلین، توبرامایسین، جنتامایسین و سفالکسین واکنشهای مقاوم، حساس و نسبتا حساس را نشان دادند.

آزمون بیماریزائی

تمامی جدایه‌ها در دمای ۲۵ تا۳۰ درجه سانتیگراد در غده‌های سیب‌زمینی پوسیدگی ایجاد نمودند. فقط ٪ ۱۲ آنها قادر به ایجاد آب سوختگی، نکروز و لهیدگی در برگ دیفن باخیا شدند. جدایه‌هایی که به ساقه سیب‌زمینی مایه‌زنی شده بودند، ساق سیاه ایجاد نکردند. چند جدایه در ریشه چغندرقند پوسیدگی نرم ایجاد نمودند. در غده، ساقه و برگ‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل (شاهد) هیچ گونه علائمی مشاهده نشد.

الکتروفورز پروتئینهای سلولی

نفوش الکتروفورزی جدایه‌ها با یکدیگر و همچنین با جدایه شناخته شده *Pcc* (جدایه زنبق ۱۱ و ۱۰۸ *Pcc*) *Dc* (جدایه ذرت ۵۲ و ذرت ٤١٩)و *Pa* (فریدن ٥٤) مقایسه شد. نقوش الکتروفورزی تعدادی از جدایه‌های هر گروه کاملا یکسان و در برخی جدایه‌ها از نظر محل قرار گرفتن نوارهای اصلی و فرعی تفاوت داشتند (شکل ۲). شباهت بعضی از جدایه‌های گروه اول به جدایه‌های گروه سوم بیشتر بود. جدایه‌های ٤٧ و ۱۹ از گروه دوم دارای شباهت

Archive of SID

www.SID.ir

بالا بوده و احتمالاً دو جدایه مختلف یک زیر گونه هستند. شباهت دو جدایه از گروه سوم (۲۳و۲٤) به هم ۸٤ درصد بود و شباهت جدایه‌های ٤۷ ،٤٦ ،۳۹ و۳۷ از گروه چهارم با هم زیاد و درصد شباهت آنها با استفاده از فرمول ضریب تشابه ساده (Simple matching coefficent) و (Colwel & Austin 1981) (S_{sm})به یکدیگر ۹۲٪ محاسبه گردید(شکل ۲). شباهت چهار جدایه فوق با *Dc* (جدایه ذرت ٤۲۱) ۵۵ درصد بود . دو جدایه از زیرگونه *Pcc* (زنبق ۱۰۳ و زنبق ۱۱) کاملا یکسان ولی با تمام جدایه‌های موجود در گروهها از نظر تعداد نوارهای اصلی و فرعی تفاوت محسوس داشتند (شکل ۲) ضریب تشابه آنها با برخی از جدایه‌ها در گروههای یک تا چهار به ترتیب ۲٤درصد، ۵ درصد، ۲۹درصد و ۱۲ الی ۲۱درصد بود .

جدول ۲- ویژگی‌های فنوتیپی و گروه بندی پکتوباکتریوم های جدا شده ازسیب‌زمینی وسایر گیاهان

Table 2. Phenotypic features and grouping of the strains of *Pectobacterium* isolated from potato and other plants

درصد جدایه‌های مثبت جدایه‌ها در هر گروه (Phenon) % strains positive in each group					
1 (12)	2 (9)	3 (14)	4 (15)a	Characteristic	خصوصیت
0	0	0	0	Gram reaction	واکنش گرم
100	100	100	100	Potato rot	لهاندن ورقه های سیب‌زمینی
100	100	100	100	O/F	رشد بی هوازی
100	100	100	100	Catalase	کاتالاز
0	0	0	0	Oxidase	اکسید از
0	44	0	0	Starch hydrolysis	هیدرولیزنشاسته
42	0	57	54	Gelatin hydrolysis	هیدرولیز ژلاتین
58	78	86	86	Esculin hydrolysis	هیدرولیز اسکولین
0	0	0	0	Tween-80 hydrolysis	هیدرولیز توئین ۸۰

Archive of SID

www.SID.ir

Table 2. (continued) جدول ۲- (ادامه)

0	0	0	0	Lecithin hydrolysis	هیدرولیز لستین
0	0	35	46	Casein hydrolysis	هیدرولیز کازئین
0	0	0	0	Urease	اوره آز
100	100	100	100	Nitrate reduction	احیاء نیترات
				Action on Litmus milk:	اثرروی لیتموس
100	100	100	100	Acid reaction	واکنش اسیدی
25	11	21	94	Reduction of litmus	احیاء لیتموس
84	67	86	100	Acid curd	ایجاد لخته اسیدی
67	89	42	20	Arginine utilization	مصرف آرجی نین
17	0	0	80	Arginine dihydrolase	آرجی نین دی هیدرولاز
100	100	100	100	H_2S from cysteine	تولید H_2S از سیستئین
100	100	100	100	H_2S from thiosulfate	تولید H_2S ازتیوسولفات سدیم
100	67	21	73	Gas form glucose	تولید گاز از گلوکز
58	67	14	20	Indole	تولید اندول
100	89	64	13	Methyl red reaction	متیل رد
0	11	36	87	Acetoin production	تولید استوئین
8	8	14	87	Levan from sucrose	تولید لوان
16	0	7	53	Reducing substances from sucrose	تولید مواد احیاء کننده از ساکارز
0	0	0	0	Ketolactose production	تولید کتولاکتوز
0	0	0	0	Phenylalanine deaminase	فنیل آلانین د آمنیاز
58	11	35	60	Deoxyribonuclease	داکسی ریبونوکلئاز
V	V	V	V	Hypersensitive reaction	فوق حساسیت در توتون

Archive of SID

www.SID.ir

Table 2. (continued) جدول ۲– (ادامه)

50	78	42	66	Phosphatase	فسفاتاز
100	100	86	93	Maximum growth temp (36-37^{0C})	تحمل در 36-37 ^{O}C
50	77	21	33	Maxiumum rowth temp(39-40^{0C})	تحمل در 39-40 ^{O}C
100	100	100	100	Growth on 4% NaCl	تحمل نمک طعام ٤درصد
100	100	100	100	Growth on 5% NaCl	تحمل نمک طعام ٥ درصد
0	0	0	0	King – B Medium	تولید رنگ فلورسنت روی محیط King-B
75	22	42	6	Clearing zone on YDC	هاله شفاف اطراف کلنی روی YDC
75	89	36	87	Utilization of asparagine as sole sucrose of carbon and nitrogen	استفاده از آسپارازین به عنوان تنها منبع
				Acid production from	تولید اسید از
100	100	100	100	Glucose	گلوکز
100	100	100	100	Arabinose	آرابینوز
100	100	100	100	Fructose	فروکتوز
100	100	100	100	D_xylose	زایلوز(D)
100	100	100	100	Rhamnose	رامنوز
100	100	100	100	Salicin	سالیسین
100	89	93	93	Sorbitol	سوربیتول
100	78	86	100	Raffinose	رافینوز
100	100	100	100	Sucrose	ساکارز
100	88	93	100	Melibiose	ملی بیوز
100	100	100	100	Trehalose	تری هالوز
100	100	100	100	Galactose	گالاکتوز

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- (ادامه) Table 2. (continued)

100	100	100	100	Cellobiose	سلوبیوز
100	100	100	100	Lactose	لاکتوز
92	78	57	80	Dexterin	دکسترین
58	33	0	94	α methyl - D - glucoside	آلفامیتل دگلوکوزید
	67	044	54	Palatinose	پالاتینوز
100	89	36	100	Maltose	مالتوز
100	100	100	100	Amygdalin	آمیکدالین
83	21	0	33	Inositol	اینوزیتول
16	88	78	73	Inulin	اینولین
				Utilization of :	استفاده از
0	44	86	0	L-tartrate	تارتارات ـ ال
100	100	100	100	Lactate	د - لاکتات
100	100	21	94	Malonate	مالونات
67	8	64	100	Acetate	استات
83	22	7	46	Galacturonate	گالاکتورانات
100	100	78	94	Citrate	سیترات

a، تعداد جدایه‌های هر گروه در پرانتز

a,No. of strains in parenthesis

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- خصوصیات افتراقی گروههای پکتوباکتریوم جداشده از سیب‌زمینی و سایر گیاهان در استان فارس

Table3. Differential characteristics of the *Pectobacterium* strains isolated from potato and other plants in Fars

درصد جدایه‌های مثبت در هر گروه (Phenon) % strains positive in each group				Characteristic	خصوصیت
1 (12)	2 (9)	3 (14)	4 (15)a		
0	0	35	46	Casein hydrolysis	هیدرولیز کازئین
42	0	57	54	Gelatin hydrolysis	هیدرولیز ژلاتین
17	0	0	80	Arginine dihydrolase	آرجی نین دی هیدرولاز
50	78	42	66	Phosphatase	فسفاتاز
58	67	14	20	Indole	اندول
100	0	21	73	Gas from glucose	گازاز گلوکز
16	0	7	53	Reducing substance from sucrose	تولید مواد احیاءکننده از ساکارز
100	100	86	93	Maximum growth temp(36-37^{0c})	تحمل در ^{o}C ۳۷-۳٦
50	77	21	33	Maximum growth temp(39-40^{0c})	تحمل در ^{o}C ٤٠-۳۹
17	89	0	34	Sensivitiy to erythromycin	حساسیت به اریترمایسین
				Acid production from	تولید اسید از:
100	89	93	94	Sorbitol	سوربیتول
94	86	100	92	Amygdalin	آمیگدالین
100	89	36	100	Maltose	مالتوز
58	33	0	94	α methyl- D – glucoside	آلفامیتل دگلوکوزید
67	44	0	54	Palatinose	پالاتینوز
83	21	0	33	Inositol	اینوزیتول
16	88	78	73	Inulin	اینولین
92	78	57	80	Dextrin	دکسترین

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- (ادامه) Table 3. (continued)

ملی بیوز	Melibiose	100	93	88	100
رافینوز	Raffinose	100	93	78	100
استفاده از:	Utilization of :				
مالونات	Malonate	100	7	100	94
سیترات	Citrate	100	78	100	94
گالاکتورانات	Galacturonate	83	7	22	46
تارتارات – ال	L-tartrate	0	86	44	0

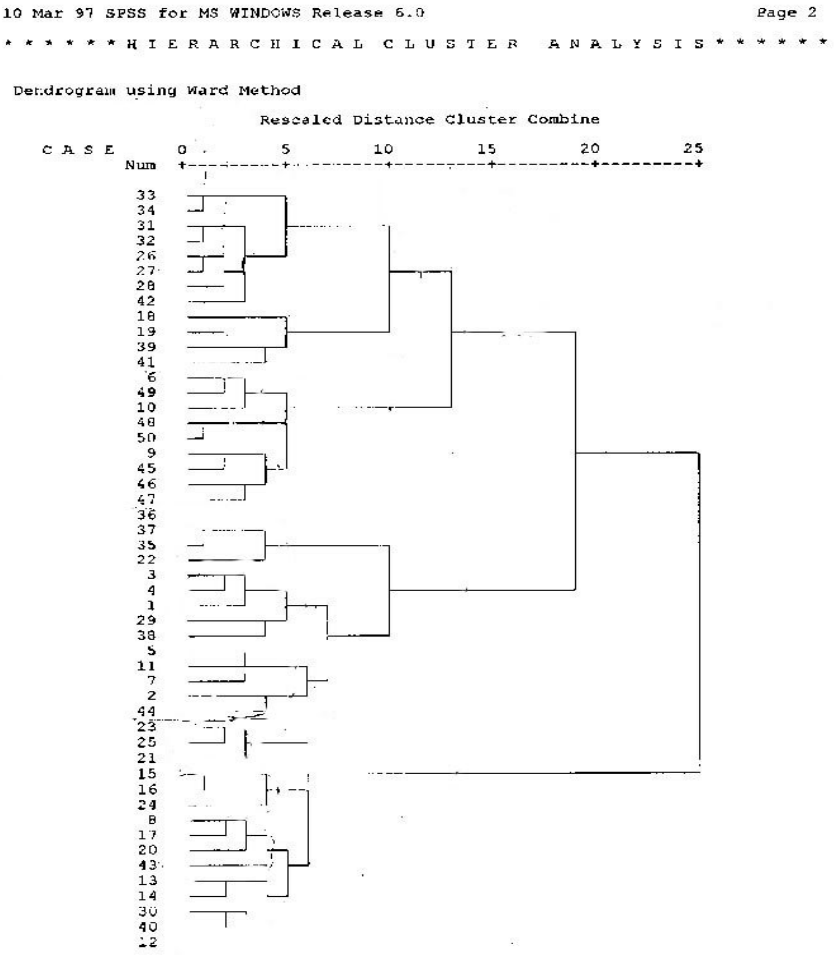
a، تعداد جدایه‌های هر گروه در پرانتز a, No of strains

بحث

باکتریهای جدا شده میله ای شکل ، متحرک و با تاژک های محیطی (Peritrichous) ، گرم منفی و بی هوازی اختیاری بوده و دمای مناسب رشد آنها۳۰-۲۷ درجه سانتیگراد بود. همه قادر به ایجاد پوسیدگی نرم در بافتهای گیاه، احیا کننده نیترات ، مولد H_2S از سیستئین ولی اوره آزمنفی بودند. از قندهای گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز، سوکروز، لاکتوز، رافینوز، آرابینوز، سلوبیوز، گلسیرین، سالیسین و ملی بیوز اسید تولید کردند. بر این اساس بعنوان گونه‌های پکتوباکتریوم شناسائی شدند (Lelliott and Dickey 1984). جدایه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی در ٤ گروه طبقه بندی شدند. پراکندگی استرینهای *Peetobacterium* در گروهای فوق براساس اختلاف در نتایج بعضی آزمونها و نیز اختلاف درمیزان تولید از اسید قندهای متفاوت بود (Margaert *et al.* 1984). جدایه‌های گروه اول بر اساس تولید اسید از آلفامتیل دی گلوکوزید (۵۸ درصد جدایه‌ها). سوربیتول ، آمیگدالین، اینوزتیول (٪۸۳ جدایه‌ها)، دکسترین(٪۹۲ جدایه‌ها)، ملی بیوز ورافینوز ونیز استفاده از مالونات، سیترات و گالاکتورنات(٪۸۳ جدایه‌ها)، حساسیت به اریترومایسین(٪۱۷ جدایه‌ها)، تولید اندول(٪۵۸ جدایه‌ها)و فسفاتاز (٪۵۰ جدایه‌ها)بیشترین شباهت (٪۷۱)را به *Pcc* داشتند. ولی از نظر قابلیت تولید اسید از آلفا متیل دی گلوکوزید، پالاتینوز، مالتوز، فروکتوز، ملی بیوز و رافینوز و تعداد دیگری از خصوصیات

Archive of SID

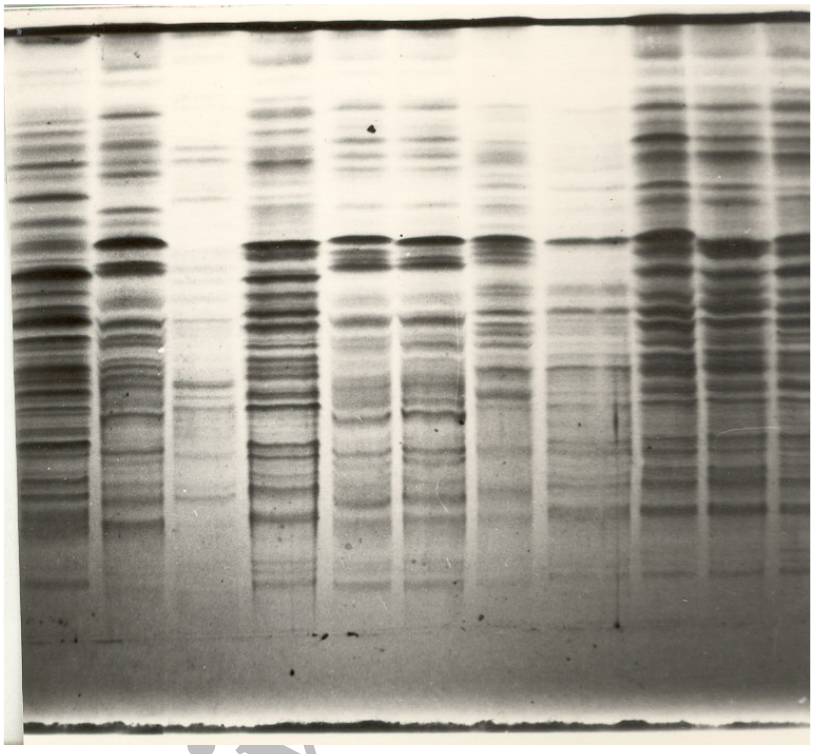
www.SID.ir



شکل ۱- دندروگرام قرابت جدایه‌های پکتوباکتریوم جدا شده از سیب‌زمینی و سایر میزبانان در استان فارس از نظر خصوصیات فنوتیپی.

Fig.1.Phenogram of *Pectobacterium* strains isolated form potato and other plants in Fars Province.

www.SID.ir



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی جدایه‌های پکتوباکتریوم جدا شده از سیب‌زمینی در استان فارس در ژل پلی آکریل آمید ٪۱۰. چاهک ها شامل ۱- جدایه ۳۶(از گروه ۴) ، ۲- جدایه ۳۷(گروه ۴) ، ۳- جدایه ۳۹(گروه ۴) ، ۴- ذرت ۴۲۱ (*Dc* استاندارد)، ۵- جدایه ۴۱(گروه ۴)،۶- جدایه ۱۵(گروه ۲) ، ۷- جدایه ۴۶ (گروه ۴) ، ۸- جدایه ۲۰ (گروه ۲) ، ۹- *Dc* ذرت (استاندارد) ، ۱۰- جدایه ۵- (گروه ۱) و۱۱-زنبق ۱۱۱(جدایه استاندارد *Pcc*) نقوش باند های گروه سه به جز یک یا دو باند شبیه جدایه‌های گروه چهار بوده است.

Fig. 2. Electrophoretic pattern of cell proteins of *Pectobacterium* strains isolated form potato in Fars Province. Lanes: 1,strain 36(phenon 4); 2, strain 37 (phenon 4); 3, strain 39(phenon 4) ; 4, maize strain 421 (reference strain of *Dickeya chrysanthemi*);5, strain 41 (phenon 4) ;6, strain 15 (phenon 2);7, strain 46 (phenon 4); 8, strain 20(phenon 2) ; 9, a reference strain of *D.chrysanthemi*; 10, strain , (phenon 1); 11, Iris strain 111 (*P.carotovorum* subsp . *carotovorum*).

Archive

www.SID.ir

٦٧٪ شباهت با *Pa* دارند. شباهت آنها با ویژگیهای *D.chrysanthemi* ٦٥٪ بوده وجود مشترک کلیدی آنها با این زیر گونه قابلیت تولید اسید از اینوزتیول، ملی بیوز و D رافینوز است (Holt *et al.* 1994, Lelliott & Dikey 1984).

چند جدایه گروه اول شیر لیتموس را لخته نکرده و از این نظر و در پاره ای ویژگیهای دیگر (مصرف تری هالوز، گالاکتوز، لاکتوز، و سیترات، رشد در NaCl ٥ درصد و در ٣٢ °C) به *Pw* شبیه بودند، ولی برخلاف این زیر گونه قادر به پپتونیزه کردن شیر نبودند (Gallios *et al.* 1992, Goto & Mutsumoto 1987). توانایی جدایه‌ها در تولید اسید از آلفا متیل دی گلوزید، پالاتینوز و اینوزیتول تطابق کامل با جداول موجود نداشته و منجر به شباهت این گروه به زیر گونه‌های مختلف (*Pcc*، *Pb*، *Pw*، *Pco*) و گونه*Dc* (در حد فاصل ٥٠ الی ٧١ درصد) شده است. شباهت این گروه با زیرگونه *Pb* در آزمونهای استفاده از ملی‌بیوز و سلوبیوز و تفاوت در قابلیت تولید اسید از رافینوز، تری هالوزدکسترین می‌باشد (Thomson *et al.* 1981). در مجموع جدایه‌های گروه اول شباهت کافی با گونه *Dc* (٦٥٪)و زیرگونه‌های توصیف شده *Pc* را نداشته و به نظر می‌رسد متعلق به گونه یا زیرگونه‌های بینابین *Dc* و *Pc* باشند.

جدایه‌های گروه دوم براساس تولید اسید از سوربیتول، مالتوز و آمیگدالین (٨٩ درصد جدایه‌ها) اینولین و ملی‌بیوز (٨٨٪ جدایه‌ها) دکسترین وD رافینوز (٧٨٪ جدایه‌ها) آلفا متیل دی گلوکوزید (٣٣٪ جدایه‌ها) و نیز استفاده از مالونات، سیترات و گالاکتورنات (٢٢٪ جدایه‌ها) حساسیت به اریترومایسین (٨٩ درصد جوایه‌ها) تولید اندول ٦٧٪جدایه‌ها) و فسفاتاز (٧٨٪ جدایه) بیشترین شباهت (٧٥٪) را به گونه*Dc* دارند. تفاوت آنها با آن گونه در خصوصیات تولید اسید از آمیگدالین(١٠٠٪)،مالتوز(٨٩٪)،دکسترین(٧٨٪) و پالاتیتوز (٤٠٪) می‌باشد (Holt *et al.* 1994, Lelliott & Dickey 1984) .

شباهت این گروه به میزان ٦٧ درصد به *Pa* به علت قابلیت تولید اسید از مالتوز، اینوزیتول ملی بیوز، D رافینوز واستفاده از سیترات است. شباهت گروه فوق به میزان ٦٥ درصد به *Pcc* به علت قابلیت تولید اسید از مالتوز، اینوزیتول، ملی‌بیوز، D رافینوز و استفاده از سیترات است. تشابه و تفاوت استرینها در تولید اسید ازآلفامتیل متیل د گلوکوزید، پالاتیتوز و مالتوز باعث شباهت آن به زیر گونه و گونه‌های *Pco*، *Pb* و *Pw* به ترتیب به میزانهای ٦٥ درصد، ٥٨ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

و ۴۹ درصد شده است و اختلاف جدایه‌های گروه دوم با *Pb* در آزمونهای تولید اسید از سوربیتول، ملی بیوز و تعداد دیگری از خصوصیات است، همچنین فرق آنها با زیرگونه*Pco* در تولید H_2S از تیوسولفات سدیم و سنیستین، تولید اندول، گاز از گلوکز و فسفاتاز می‌باشد (Gallios *et al.* 1992 & Thomson *et al.* 1981) .

با توجه به عدم ایجاد لخته در شیر لیتموس چند جدایه در این گروه به *Pw* شباهت داشتند ولی قادر به پپتونیزه نمودن محیط نبودند و از این لحاظ با زیرگونه فوق متفاوتند (Goto & Matsumoto 1987).

در مجموع جدایه‌های گروه دوم شباهت کافی با گونه *Dc* و زیر گونه‌های توصیف شده *Pc* را نداشته و به نظر می‌رسد متعلق به گونه *Dc* بوده و یا بینابین زیر گونه‌های *Pc* قرار می‌گیرند.

جدایه‌های موجود در گروه اول و دوم از نظر تولید اسید از آلفا متیل دی گلوکوزید، پالاتینوز و اینولین متغیر بوده و در سایر خصوصیات در حد ۸۷ درصد به هم شباهت دارند. تفاوت این دو گروه از نظر قابلیت تولید آنزیم فسفاتاز، حساسیت به ارتیرومایسین و آرجی نین دی هیدرولاز می‌باشد (Holt *et al.* 1994 , Lelliott & Dickey 1984 Gallios *et al.* 1992 & Thomson (*et al.* 1981).

با توجه به وجود استرینهای غیر عادی در گروه *carotovora* و عدم تطابق کامل گروههای اول و دوم با جداول افتراقی گونه‌ها و زیر گونه‌های شناخته شده موجود، به ویژه براساس قابلیت تولید اسید از قندهای آلفا متیل دی گلوکوزید، مالتوز، اینولین و دکسترین، استفاده از مالونات و سیترات و هیدرولیز ژلاتین و حساسیت به اریترماسین با قاطعیت نمی توان در مورد آنها اعلام نظر نمود. به نظر می رسد که این جدایه‌ها خصوصیات بین گونه *Dc* و زیرگونه‌های *Pc* را دارا هستند (Goto & Matsumoto 1987).

برغم درصد شباهت ذکر شده با *Pcw*، براساس قابلیت تولید H_2S در هر دو زیر گروه، احتمال نزدیکی آنها به این زیر گونه کم می‌باشد بنابراین احتمال می‌رود با جمع‌آوری جدایه‌های بیشتر از تمام مناطق وانجام بررسی‌های تکمیلی بتوان زیر گونه‌های جدیدی را معرفی نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

گروه سوم و چهارم از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به هم نزدیکتر بوده و متعلق به یک گونه هستند. جدایه‌های گروه سوم که در دمای ٣٦تا ٣٧ درجه سانتیگراد رشد کرده و توانایی استفاده از آلفامتیل دی گلوکوزید و پالاتینوز را ندارند و همچنین قادر به تولید اسید از ملی بیوز و د رافینوز می‌باشند (٨٤ درصد)به زیر گونه *Pcc* نسبت داده می‌شوند (Holt *et al.* 1994, Lelliott & Dickey 1984) .

درصد شباهت این گروه با توجه به تعداد خصوصیات یکسان نسبت به کل ویژگیهای تعیین شده به *Pcc* ٨٤ درصد بود. استرینهای این گروه در هیدرولیز کازئین، ژلاتین، تولید فسفاتاز، اندول و آزمون DNase و مصرف مالونات، سیترات گالاکتورنات و تارتارات و تولید اسید از دکسترین، مالتوز، اینولین و اینوزیتول متغیر بودند (جدول ٣).

درصد شباهت گروه سوم به چهارم ٧٥ درصد می‌باشد. در گروه یاد شده چهار زیر گروه تعیین شد. که در آنها٩٠ درصد تشابه دیده می‌شود. چندین جدایه در گروه سوم براساس عدم مصرف سیترات و فقدان قابلیت تولید اسید از ملی‌بیوز و د رافینوز به زیر گونه *Pb* شباهت دارند در حالی که سایر خصوصیات آنها مشابه *Pcc* است و از چغندر قند جدا شده‌اند (Thomson *et al.* 1981).

جدایه‌های گروه چهارم که قادر به تولید اسید از مالتوز، آلفا متیل د گلوکوزید، ملی بیوز و D رافینوز بودند، ٧٤ درصد به *Pa* شباهت داشتند. جدایه‌های گروه چهارم در تولید مواد احیاء کننده از ساکارز(٥٣ درصد)، فسفاتاز (٦٦ درصد) حساسیت به اریترومایسین (٣٤ درصد) و تولید اسید از پالاتینوز (٥٤ درصد)، اینوزیتول (٣٣ درصد) و اینولین (٧٣ درصد) و مصرف مالونات (٩٤ درصد) متغیر بودند (جدول ٣).

جدایه‌های گروه چهارم با توجه به قابلیت مصرف مالونات درصد بالای تولید فسفاتاز و تولید گاز از گلوکز به گروه اول و دوم شباهت دارند.

گروه فوق، خود از چهار زیر گروه تشکیل شده است که در بین آنها ٩٤ درصد تشابه دیده شد. اغلب جدایه‌های موجود در هر زیر گروه قادر به استفاده و تولید اسید از سوربیتول می‌باشند. این ویژگی نیز با خصوصیات زیر گونه‌ها در جداول افتراقی موجود تطابق نداشته و فقط برای زیر گونه *Pco* چنین قابلیتی ذکر گردیده است (Gallios *et al.* 1992).

مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها درگروههای مختلف نیز موید

Archive of SID

www.SID.ir

تنوع بالای آنها می باشد. برخی جدایه‌ها با جدایه‌های شناسائی شده شباهتهای کلی نشان دادند ولی کاملا یکسان نبودند.

جدایه ۲۰ از گروه ۲ با جدایه استاندارد زنبق *(Pcc)* از نظر نوارهای پروتئینی اصلی شباهت داشت (شکل ۲). به رغم تشابه فنوتیپی نسبی، نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی جدایه‌های گروه یک با یک جدایه *Dc* شباهت چندانی نداشت (شکل۲). بنابراین با توجه به تنوع مشاهده شده در آزمونهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی خصوصیات جدایه‌های بررسی شده *Pcc* و *Pa* تطابق کافی با جداول افتراقی گونه و زیر گونه‌ها *Pectobacterium* نداشته و این دو باکتری درایران تنوع زیادی دارند. صفات متغیر جدایه‌های ایران در مقایسه با جداول افتراقی تولید اسید از، دکسترین و سوربیتول و مصرف مالونات، تارتارات و گالاکتورانات و تولید آرجی نین دی هیدرولاز می‌باشد (جدول ۳). بعضی جدایه‌ها با جدایه‌های شناسایی شده شباهتهای کلی را نشان دادند ولی کاملا یکسان نبودند. شباهت نقوش الکتروفورزی گروه اول به سوم (در چند جدایه) به میزان ٦٢ الی ٦٧ درصد نشان دهنده نزدیکی این دو گروه می‌باشد. گروهبندی بدست آمده در آنالیز عددی نیز نشان دهنده چنین شباهتی است. تغییرات ضریب تشابه در بین گروهها و ناهمگن بودن نقوش الکتروفورزی نشان دهنده تنوع جدایه‌های بررسی شده است .

کلیه جدایه‌ها برروی غده‌های سیب‌زمینی کشت شده بیماریزا بودند. همچنین ۱۲ درصد آنها برروی برگ دیفن باخیا ایجاد آب سوختگی و نکروز نمودند. جدایه‌های اخیر در گروههای دوم وچهارم قرار داشتند بنابراین تفکیک جدایه‌ها براساس علائم روی میزبان چندان عملی نیست.

در آینده لازم است مطالعات تاکسونومیک وسیع و گسترده تری، به صورت پلی‌فازی (Polyphasic) روی پکتوباکتریومهای مولد پوسیدگی نرم در محصولات متنوع مناطق مختلف کشور انجام پذیرد، تا موقعیت این گروه و احتمالا وجود زیر گونه‌های دیگر (احتمالا جدید) روشن‌تر گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (53-49) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: اسفندیار ظهور پرالک، بخش تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی خراسان مشهد، دکتر حشمت‌اله رحیمیان، بخش گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه مازندران، ساری، ضیاءالدین بنی‌هاشمی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

Archive of SID

www.SID.ir