فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ..... **Error! Bookmark not defined.**

مقدمه ۷

۱-۱- کلیات طرح ۷

۱-۲- هدف از اجرای طرح ۸

فصل دوم ۹

بررسی منابع ۹

۲-۱- سیب‌زمینی ۹

۲-۲- عامل بیماری ۱۰

۲-۳- خصوصیات باکتری‌شناسی ۱۳

۲-۳-۱- خصوصیات باکتری‌شناسی جنس *Pectobacterium* ۱۳

۲-۳-۲- خصوصیات باکتری‌شناسی گونه *Pectobacterium carotovorum* ۱۳

۲-۳-۳- خصوصیات باکتری‌شناسی زیرگونه‌های *Pectobacterium carotovorum* ۱۴

۲-۳-۳-۱- خصوصیات زیرگونه *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* ۱۴

۲-۳-۳-۲- خصوصیات زیرگونه *Pectobacterium carotovorum* subsp *atrosepticum* ۱۴

۲-۳-۴- خصوصیات باکتری‌شناسی گونه *Pectobacterium chrysanthemi* ۱۴

۲-۳-۵- خصوصیات باکتری‌شناسی جنس *Dickeya* ۱۶

۲-۴- پراکنش جغرافیایی بیماری پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه: ۱۶

۲-۵- دامنه میزبانی: ۱۶

۲-۶- اپیدمولوژی ۱۶

۲-۷- بیماری‌زایی ۱۷

۲-۷-۱- بیماری‌زایی و نحوه ورود ۱۷

۲-۷-۲- ظهور و توسعه علائم ۱۸

۲-۷-۳- علائم بیماری ۱۸

۲-۸- آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی ۱۹

۲-۹- مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۲۰

۲-۹-۱- پیشینه بیماری و روش‌های شناسایی پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم در دنیا ۲۰

عنوان **صفحه**

۲-۹-۲- پیشینه بیماری در ایران ۲۵
فصل سوم ۲۷
مواد و روش‌ها ۲۷
۳-۱- نمونه‌برداری ۲۷
۳-۲- جداسازی عامل بیماری و نگهداری جدایه‌ها ۳۰
۳-۲-۱- جداسازی عامل بیماری ۳۰
۳-۳- نگهداری جدایه‌ها ۳۰
۳-۴- بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیماری‌زایی جدایه‌ها ۳۱
۳-۴-۱- آزمایشات فنوتیپی ۳۱
- آزمون رنگ‌آمیزی گرم ۳۱
- بررسی شکل ظاهری و رنگ کلنی ۳۱
- رنگ‌آمیزی تاژک ۳۱
_آزمون اکسیداسیون و تخمیر (O/F) ۳۱
- آزمون لهانیدن سیب‌زمینی (پکتیناز) ۳۱
- آزمون کاتالاز ۳۱
- اکسیداز ۳۲
- هیدرولیز ژلاتین ۳۲
- آزمون متیل‌رد ۳۲
- فسفاتاز ۳۲
- رشد در دمای ۳۷ ^{o}C ۳۲
- تحمل نمک طعام ۵٪ ۳۲
- حساسیت به اریترومایسین ۳۲
- آزمون مصرف کربوهیدرات‌ها ۳۲
- بررسی توان تجزیه پکتات و تشکیل حفره (pit) روی محیط حاوی پکتات (CVP) ۳۳
- استفاده از آلفا متیل دی‌گلوکوزاید ۳۳
۳-۴-۲- آزمایش‌های بیماری‌زایی و واکنش فوق حساسیت ۳۳
۳-۴-۲-۱- آزمون واکنش فوق حساسیت روی توتون ۳۳

عنوان **صفحه**

۳-۴-۲-۲- آزمایش بیماری‌زایی روی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی ۳۳
۳-۴-۲-۳- آزمایش مقایسه بیماری‌زایی باکتری روی گیاهان مختلف ۳۴
۳-۵- بررسی‌های مولکولی جدایه‌های باکتری ۳۴
۳-۵-۱- استفاده از توالی اختصاصی ژنوم برای شناسایی جدایه‌ها ۳۴
۳-۵-۲- استخراج DNA ژنومی و کمیت‌سنجی آن ۳۴
۳-۵-۳- مراحل انجام واکنش PCR ۳۵
۳-۵-۳-۱- مواد مورد نیاز برای تهیه ۲۵µl مخلوط واکنش ۳۵
- بافر PCR ۳۵
- کلرید منیزیم ($MgCl_2$) ۳۵
- دزوکسی‌ریبونوکلئوتید تری فسفات ($dNTP_s$) ۳۵
- آنزیم *Taq* DNA polymerase ۳۵
- DNA ژنومی ۳۵
- آغازگر(Primer) ۳۵
۳-۵-۳-۲- انجام PCR ۳۶
۳-۵-۴- الکتروفورز ۳۷
۳-۵-۴-۱- بافرها و محلول‌های مورد نیاز جهت انجام الکتروفورز ۳۷
- بافر بارگذاری ۳۷
- بافر TBE ۳۸
- محلول اتیدیوم بروماید ۳۸
- نشانگر اندازه ۳۸
- ژل آگارز ۳۸
۳-۵-۴-۲- انجام الکتروفورز محصول PCR (PCR Product) و رنگ‌آمیزی ژل ۳۸
۳-۶- بررسی تنوع ژنتیکی گونه و زیرگونه‌های *Pectobacterium carotovorum* با استفاده از PCR-RFLP ۳۹
۳-۶-۱- برش محصول PCR (PCR Product) با استفاده از آنزیم‌های برشی ۳۹
۳-۶-۲- الکتروفورز و مشاهده الگوی باندها ۳۹
۳-۷- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۳۹

عنوان **صفحه**

۳-۷-۱- رتبه‌بندی داده‌های حاصل از الکتروفورز(Scoring) ۳۹
۳-۷-۲- تجزیه خوشه‌ای (Cluster Analysis) ۳۹
فصل چهارم ۴۰
بحث و نتایج ۴۱
۴-۱- بررسی تنوع فنوتیپی *P. carotovorum* با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی: ۴۱
۴-۱-۱- نتایج و بحث آزمایشات بیوشیمیایی ۴۳
۴-۱-۲- دسته‌بندی جدایه‌های متعلق به جنس *Pectobacterium* ۴۹
۴-۲- نتایج حاصل از آزمایشات بیماری‌زایی ۵۱
۴-۲-۱- واکنش فوق حساسیت ۵۱
۴-۲-۲- بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف روی ساقه سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی ۵۱
۴-۲-۳- مقایسه حساسیت سینگونیوم و فیلودندرون به جدایه تیپیک باکتری ۵۲
۴-۳- بررسی مولکولی جدایه‌ها ۵۴
۴-۳-۱- تشخیص جدایه‌ها به کمک توالی‌های اختصاصی ۵۴
۴-۳-۲- تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. carotovorum* با استفاده از PCR-RFLP ۵۶
۴-۴- انتشار عامل پوسیدگی نرم (*P. carotovurum*) در مزارع استان: ۶۱
۴-۵- نتیجه‌گیری کلی: ۶۳
۴-۶- پیشنهادات: ۶۴
منابع: ۷۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- برآورد سطح، تولید و میزان عملکرد در هکتار دو محصول مهم زراعی استان چهارمحال و بختیاری در سال زراعی ۱۳۸۵- ۱۳۸۴ (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۷) ۱۰

جدول ۲-۲- خصوصیات بیوشیمیایی زیرگونه‌های *Pectobacterium* ۱۵

جدول ۳-۱- مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده از غده‌های با علائم پوسیدگی نرم و ساقه‌هایی با علائم ساق‌سیاه در مزارع و انبارهای استان چهارمحال و بختیاری..... ۲۹

جدول ۳-۲- توالی و طول قطعه تکثیری مورد انتظار آغازگرهای مورد استفاده ۳۶

جدول ۳-۳- ترکیبات و مقادیر مواد مورد نیار برای تهیه ۲۵µl مخلوط واکنش PCR..... ۳۶

جدول ۳-۴- برنامه حرارتی برای انجام PCR با آغازگرهای Y1 و Y2 ..... ۳۷

جدول ۳-۵- برنامه حرارتی برای انجام PCR با آغازگرهای ECA1f و ECA2r..... ۳۷

جدول ۴-۱- خصوصیات فنوتیپی *Pectobacterium* و *Dickeya* عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان چهارمحال و بختیاری..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۴-۲- تجزیه واریانس کلی تعیین حساسیت دو نوع گیاه زینتی نسبت به باکتری *Pectobacterium carotovorum*..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۴-۳- مقایسه میانگین تعیین تفاوت حساسیت دو گیاه زینتی و روش‌های مختلف تلقیح به باکتری *Pectobacterium carotovorum*..... ۵۲

جدول۴-۴- پراکنش *P. carotovorum* در سطح استان و درصد نمونه‌های آلوده در هر منطقه**Error! Bookmark not defined.**

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- نمونه‌ای از علایم ایجاد شده توسط *Pectobacterium* در کالانکو (الف)، کوکب (ب) و سیب‌زمینی (ج و د) ۱۹

شکل ۳-۱- مناطق نمونه‌برداری در سطح استان با × مشخص شده است ۲۸

شکل ۳-۲- نمونه‌های بیمار جمع‌آوری شده : (الف) علائم پوسیدگی نرم روی غده، (ب) علائم ساق‌سیاه روی ساقه ۲۸

شکل ۴-۱- کلنی‌های جدایه‌های مورد بررسی روی محیط NA (الف) و EMB (ب)..... ۴۲

شکل ۴-۲- آزمایش OF و استفاده از گلوکز توسط باکتری..... ۴۲

شکل ۴-۳- تشکیل حفره روی محیط CVP ۴۳

شکل ۴-۴- تاژک محیطی جدایه‌ها بعد از رنگ‌آمیزی تاژک..... ۴۳

شکل ۴-۵- له شدن سیب‌زمینی در اثر تلقیح با باکتری ۴۴

شکل ۴-۶- عکس‌العمل مثبت جدایه SR10 به آزمایش متیل‌رد..... ۴۵

شکل ۴-۷- مقایسه حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (الف) حساس، (ب) غیرحساس ۴۵

شکل ۴-۸- واکنش مثبت (د-ه-و) و منفی (الف-ب-ج) جدایه‌های مختلف در استفاده از کربوهیدرات‌ها ۴۶

شکل ۴-۹- تولید اسید از آلفا متیل دی‌گلوکوزاید: (الف) واکنش منفی، (ب) واکنش مثبت ۴۷

شکل ۴-۱۰-گروه‌های مختلف درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز آزمون‌های فنوتیپی ۴۹

شکل ۴-۱۱- علائم ساق‌سیاه در ساقه سیب‌زمینی (الف) و گوجه‌فرنگی (ب) تلقیح شده با باکتری ۵۱

شکل ۴-۱۲- تفاوت حساسیت دو گیاه زینتی و روش‌های مختلف تلقیح به باکتری *Pectobacterium carotovorum*..... ۵۳

شکل ۴-۱۳- علائم ساق‌سیاه روی ساقه فیلودندرون (الف) و سینگونیوم (ب) ناشی از مایه‌زنی با یک جدایه تیپیک عامل پوسیدگی نرم ۵۳

شکل ۴-۱۴- الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های مختلف با استفاده از آغازگرهای Y1 و Y2 ..... ۵۵

شکل ۴-۱۵- الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های مشکوک به زیرگونه *P. carotovorum* subsp *atrosepticum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Eca1f، Eca2r ۵۶

شکل ۴-۱۶- الگوی برشی به دست آمده از هضم با ۴ آنزیم *Alu*I، *Hae*II، *Hpa*II، *Sau*3AI توسط داراسه و همکاران ۵۶

شکل ۴-۱۷- الگوی نواری حاصل هضم آنزیمی جدایه‌ها با آنزیم برشی *Hae*II..... ۵۷

شکل ۴-۱۸- الگوی هضم آنزیمی جدایه‌های مختلف با آنزیم برشی *Hpa*II ۵۷

شکل ۴-۱۹- هضم آنزیمی باکتری‌ها با آنزیم برشی *Alu*I ۵۸

شکل ۴-۲۰- هضم آنزیمی باکتری‌ها با آنزیم برشی *Sau*3AI ۵۸

شکل ۴-۲۱- الگوی هضم آنزیمی جدایه‌ها با آنزیم برشی *Hha*I..... ۵۹

شکل ۴-۲۲- درخت فیلوژنتیکی مربوط به RFLP روی ۲۱ نماینده از ۵ گروه فنوتیپی ۶۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱-کلیات طرح

سیب‌زمینی از محصولات مهم زراعی غده‌ای و یکی از مهمترین منابع تغذیه مردم جهان می‌باشد. کشت سیب‌زمینی به دلیل ارزش غذایی بالای آن و اهمیت اقتصادی فراوانی که در عرصه کشاورزی دارد، در بسیاری از نقاط دنیا معمول و متداول است. علاوه بر آن سازگاری این گیاه زراعی به اقلیم‌های مختلف و متنوع در سراسر جهان باعث شده که کشت آن در اغلب کشورهای در حال توسعه از جمله ایران گسترش یابد. ایران با ۲۱۰ هزار هکتار سطح زیر کشت و میانگین تولید ۲۵ تن در هکتار حدود ۵۲۴۰۰۰۰ تن محصول تولید می‌کند که بعد از چین و هند سومین کشور تولیدکننده سیب‌زمینی در آسیا و اقیانوسیه به شمار می‌رود (فائو، ۲۰۰۸).

عوامل نامساعد محیطی، تغذیه نامناسب، ژنتیک نامطلوب و عوامل بیماری‌زای گیاهی (قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، ویروئیدها، مایکوپلاسماها و نماتدها) از مهمترین عواملی هستند که باعث کاهش راندمان تولید و افت کیفیت سیب‌زمینی می‌شوند. سیب‌زمینی به وسیله عوامل بیماری‌زای زیادی مورد حمله قرار می‌گیرد و بیماری‌های گزارش شده روی این محصول در مقایسه با محصولات دیگر بیشتر می‌باشد. جرب پودری، پوسیدگی صورتی، سفیدک دروغی، لکه‌موجی آلترناریایی، شانکر رایزوکتونیایی، پوسیدگی خشک فوزاریومی، پژمردگی ورتیسلیومی و ویروس‌های X، Y، M و S از جمله بیماری‌های مهم این محصول به شمار می‌روند. ماهیت غده‌ای محصول سیب‌زمینی و شرایط محیطی مناسب برای کشت و کار سیب‌زمینی با شرایط مناسب برای توسعه بیماری‌های باکتریایی تطابق دارد. به همین دلیل پوسیدگی قهوه‌ای (*Ralstonia solanacearum*)، پوسیدگی حلقوی (*Clavibacter michiganense* subsp *sepedonicum*)، چشم صورتی (*Pseudomonas fluorescens*)، جرب معمولی (*Stereptomyses scabis*) و پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه

(*Pectobacterium* spp.) سیب‌زمینی از بیماری‌های باکتریایی شایع در بیشتر نقاط کشت این محصول به شمار می‌روند (کاور و میوکجی، ۲۰۰۴؛ دبلیو جی،۱۳۷۹؛ استد، ۱۹۹۹).

در بین بیمارگرهای باکتریایی عوامل پوسیدگی نرم از جمله بیمارگرهای مخربی هستند که علاوه بر خسارت سنگین در مزرعه، در انبار نیز به محصولات ذخیره شده و بذور نگهداری شده برای سال بعد نیز آسیب فراوان وارد می‌سازند باکتری‌های مذکور در صورت مساعد بودن شرایط محیطی با تولید آنزیم‌های پکتولیتیک و سلولیتیک و هجوم به بافت‌های گوشتی و آبدار میوه‌ها، سبزیجات، گیاهان زینتی و برخی از محصولات زراعی و باغی از جمله سیب‌زمینی، با تجزیه تیغه میانی و دیواره سلولی ساختمان بافتی را متلاشی کرده و باعث پوسیدگی نرم در ساقه، طوقه و غده می‌شود (آیسان و همکاران، ۲۰۰۳؛ کالمر و کین، ۱۹۸۶؛ آورا و همکاران، ۲۰۰۲). هر چند بسیاری از باکتری‌ها قادر به تولید آنزیم‌های حل‌کننده دیواره سلولی هستند ولی تعداد معدودی (بعضی از اعضای جنس‌های *Pectobacterium*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Clostridium* و *Flavobacterium*) باعث پوسیدگی نرم در بافت‌های زنده می‌شوند که از میان آنها اعضای جنس *Pectobacterium* اهمیت بیشتری دارند (پرومبلون و سالموند، ۱۹۹۵).

این بیماری تاکنون در اکثر کشورهای دنیا از روی سبزیجات، محصولات ذخیره‌ای، تعدادی از گیاهان زینتی و زراعی گزارش شده است و در مناطق گرم و مرطوب و تحت شرایط مناسب (آبیاری نامناسب در مزرعه، شرایط بد انبار) به صورت مسئله جدی در می‌آید (جینس، ۲۰۰۶). غده‌های بذری آلوده، خاک و آب آبیاری مهمترین منابع اینوکلوم باکتری به شمار می‌روند (پاولسون، ۱۹۸۴).

بیماری از بسیاری از نواحی جهان گزارش شده است. جدایه‌های مختلف عامل بیماری هر چند از نظر خصوصیات کلی مشابه بوده و مشخصات جنس *Pectobacterium* را نشان می‌دهند، ولی از نظر بعضی از خصوصیات همچون بیماری‌زایی و بعضی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژی با هم تفاوت داشته و به گونه‌ها و زیرگونه‌های مختلف قابل تفکیک هستند. با توجه به اینکه مدیریت هر بیماری در وهله اول مستلزم شناخت دقیق عامل بیماری و تعیین خصوصیات آن می‌باشد، شناسایی و تفکیک جدایه‌های عامل بیماری در هر منطقه ضروری می‌باشد، به همین دلیل محققین در نقاط مختلف سعی در شناسایی و تفکیک جدایه‌های عامل بیماری در آن منطقه دارند (دی‌بویر و همکاران، ۱۹۷۸؛ هلیاس و همکاران، ۱۹۹۸؛ بقائی و همکاران، ۲۰۱۱).

۱-۲- هدف از اجرای طرح

بررسی عوامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی و تنوع موجود در آنها در استان چهارمحال و بختیاری به عنوان یکی از مراکز مهم سیب‌زمینی کاری ایران جهت استفاده در مدیریت بیماری در منطقه ضروری به نظر می‌رسد و نتیجه آن می‌تواند مبنای تحقیقات بعدی جهت کنترل و کاهش خسارت بیماری قرار گیرد. بنابراین شناسایی عوامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در مزارع و انبارهای استان، تعیین خصوصیات جدایه‌های عامل بیماری و تفکیک آنها و نیز به دست آوردن اطلاعات اولیه درباره میزان و نحوه پراکنش بیماری در منطقه، اهداف اصلی این تحقیق را تشکیل می‌دهند.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- سیب‌زمینی

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) گیاهی از تیره بادمجانیان (Solanaceae) و یکی از مهمترین محصولاتی است که بخش عمده‌ای از نیازهای غذایی بشر را تامین می‌کند و ظاهراً از سلسله کوه‌های آند (Ande) در آمریکای جنوبی منشاء گرفته است (به نقل از بارتن، ۱۹۶۶). این محصول از نظر ارزش غذایی بسیار پر اهمیت و هم‌ردیف گندم و برنج بوده و یک منبع غذایی سرشار از انرژی محسوب می‌شود که حاوی ۲٪ پروتئین با کیفیت بالا می‌باشد. میزان تولید جهانی آن در سال ۲۰۰۹ میلادی ۳۲۹۵۵۶۹۱۱ تن بوده است (فائو، ۲۰۰۹). سابقه ورود سیب‌زمینی به ایران به سال‌های ۱۸۰۰ تا ۱۸۱۰ میلادی باز می‌گردد این گیاه اولین بار توسط سرجان ملکم انگلیسی وارد ایران شد و اکنون از نظر میزان تولید، بعد از گندم در جایگاه دوم محصولات مهم ایران قرار می‌گیرد (فائو، ۲۰۰۹).

استان‌های اردبیل، اصفهان، همدان، فارس، آذربایجان شرقی، خراسان و چهارمحال و بختیاری از مهمترین مناطق کشت این محصول در کشور می‌باشند. استان چهارمحال و بختیاری یکی از مناطق مهم تولید سیب‌زمینی در ایران می‌باشد و همه ساله سطح زیرکشت این محصول در آن رو به افزایش است. در سال زراعی ۸۵-۸۴ سطح زیرکشت سیب‌زمینی در این استان ۳۸۹۴ هکتار (آبی) و میزان تولیدکل حدود ۱۳۰ هزار تن بود که بعد از گندم، رتبه دوم تولید را در بین سایر محصولات کشاورزی در این استان به خود اختصاص داده بود (جدول ۲-۱). از نظر عملکرد در هکتار (با میانگین ۳۳۳۸۴ کیلوگرم در هکتار)، پس از استان همدان (۳۶۲۱۹) در رتبه دوم کشور قرار داشته است (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۷).

جدول ۲-۱- برآورد سطح، تولید و میزان عملکرد در هکتار دو محصول مهم زراعی استان چهارمحال و بختیاری در سال زراعی ۱۳۸۵-۱۳۸۴ (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۷)

محصول	سطح (هکتار)	تولید (تن)	عملکرد (کیلوگرم)
گندم	۷۸۲۵۷	۱۹۵۶۴۶	-
سیب‌زمینی	۳۸۹۴	۱۲۹۹۹۸	۳۳۳۸۰

ارقام اگریا ۶۰٪ (با سطح زیرکشت ۲۷۰۰ هکتار)، مارفونا ۲۰٪ (با سطح زیرکشت ۹۰۰ هکتار)، کوزیما ۵٪ (با سطح زیرکشت ۲۲۵ هکتار) و سایر ارقام ۵٪ (با سطح زیرکشت ۶۷۵ هکتار) بیشترین سطوح کشت سیب‌زمینی را در استان به خود اختصاص می‌دهند. انبارداری یکی از مسائل مهم در مراقبت‌های پس از برداشت محصول سیب‌زمینی به‌ویژه سیب‌زمینی بذری محسوب می‌شود. انبارهای استاندارد در کشور و استان بسیار محدود است به‌طوری‌که تعداد انبارهای اختصاصی نگهداری این محصول در استان (۲ انبار سرد با ظرفیت ۵۰۰۰ تن در نافچ و فرادنبه) است در همین تعداد معدود نیز شرایط نگهداری مطابق با استانداردهای لازم برای محصول نیست (آمار سازمان جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری، ۱۳۸۸). استفاده از انبارهای غیراختصاصی و شرایط نامناسب انبارداری موجب تشدید بیماری‌های غده‌های آلوده با منشاء مزرعه‌ای و همچنین گسترش بیماری در انبار می‌گردد.

۲-۲- عامل بیماری

عامل بیماری پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه به جنس *Erwinia* خانواده Entrobacteriaceae، راسته Entrobacteriales، کلاس III (Gammaproteobacteria) و شاخه Protobacteria تعلق دارد (جینس، ۲۰۰۶). جنس *Erwinia* به احترام یکی از بنیانگذاران باکتری‌شناسی گیاهی اروین فرینک اسمیت (Erwin frink smit) در سال ۱۹۱۷ توسط وینسلو و همکاران برای انتروباکترهای بیماری‌زای گیاهی پیشنهاد گردید. قبل از آن باکتری‌شناسان عوامل پوسیدگی نرم را در خانواده Bacteriaceae و قبیله جدیدی به نام Erwineae قرار داده بودند (هالت و همکاران، ۱۹۹۴). در سال ۱۹۲۳ در اولین جلد از Bergeys Manual of Determinative Bacteriology این قبیله به دو جنس *Erwinia* و *Phytomona* تقسیم شد. در این طبقه بندی *Erwinia* به عنوان یک میکروارگانیسم دارای تاژک محیطی معرفی شده بود (للیوت و دیکی، ۱۹۸۴). در سال ۱۹۳۷ ران خصوصیات Eubacteriales را بررسی و یک خانواده به نام Enterobacteriaceae که جنس *Enterobacter* را شامل می‌شد را پیشنهاد نمود. بعد از مدتی مشخص شد که جنس *Erwinia* حداقل ۳ گروه متفاوت از میکروارگانیسم‌ها را که از نظر ریخت‌شناسی به هم شبیه، اما از لحاظ بیماری‌زایی، خصوصیات تغذیه‌ای و بیوشیمیایی متفاوتند را شامل می‌شود. گروه اول amylovora باعث پژمردگی و نکروز خشک می شود که از مهمترین آنها گونه *Erwinia amylovora* عامل آتشک سیب و گلابی می‌باشد، اعضای گروه دوم carotovora، آنزیم‌های پکتولیتیک ترشح کرده و پوسیدگی نرم ایجاد می‌کنند. گروه سوم herbicola روی محیط آگار غذایی رنگدانه تولید می‌نماید و اغلب به صورت ساپروفیت هستند (گراهام، ۱۹۶۴). بررسی‌هایی که توسط محققین مختلف روی باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم (گروه carotovora) انجام گرفت نشان داد که بسیاری از گونه‌های گزارش شده مترادف هم می‌باشند به همین دلیل *E.carotovora* به عنوان گونه

شاخص این گروه و گونه‌های *E. atroseptica* و *E. chrysanthemi* به عنوان واریته‌های آن در نظر گرفته شدند (دای، ۱۹۶۹). این نوع تقسیم‌بندی از طریق مطالعه مقایسه‌ای DNA در *E.carotovora* و *E. chrysanthemi* صورت گرفت و نشان داد که درصد C+G در *E. chrysanthemi* ٪۵۶ بوده در حالی که در *E.carotovora* این مقدار ٪۵۲/۱ می‌باشد به این دلیل در نهایت این دو گونه مجزا تشخیص داده شدند (گراهام، ۱۹۶۴).

یانگ و همکاران در سال ۱۹۸۲ پیشنهاد کردند که برای بیمارگرهایی که به عنوان یک گونه مجزا قابل تشخیص نیستند باید اصطلاح پاتووار (Pathovar) به کار برده شود که بر اصطلاحات واریته و زیرگونه ارجحیت دارد ولی چون پاتووار محدودیت دامنه میزبانی دارد عمدتاً در مورد *E. chrysanthemi* صدق می کرد (گراهام و هریسون، ۱۹۷۵). لذا کمیسیون صدور رأی کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی باکتری‌ها اصطلاح زیرگونه (sub species) را به جای پاتووار پذیرفت و پاتووارهای گونه *E.carotovora* را به عنوان زیرگونه، در لیست تصویبی به صورت زیر گنجانید (شاد و همکاران، ۲۰۰۱).

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (Ecc)

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* (Eca)

Erwinia carotovora subsp.*wasabiae* (Ecw)

Erwinia carotovora subsp.*odorifera* (Eco)

Erwinia carotovora subsp.*betavascularum* (Ecb)

این ۵ زیرگونه *E.carotovora* به همراه گونه‌های *Erwinia chrysanthemi* (Ech)، *Erwinia cypripedii* (Ecy) و *Erwinia rhapontici* (Erh) به عنوان اروینیای عامل پوسیدگی نرم در گیاهان مختلف معرفی شدند (گوتو و ماتسوموتو، ۱۹۸۷؛ تامسون و همکاران، ۱۹۷۷ و ۱۹۸۱).

در سال ۱۹۹۸ هیوبن و همکاران بر اساس توالی کامل ۱۶S rDNA نام *Pectobacterium* را برای گونه های فوق‌الذکر پیشنهاد کردند و نامگذاری باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم به‌صورت

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* comb.nov. (Pcc)

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum* comb.nov. (Pca)

Pectobacterium carotovorum subsp. *betavascularum* comb.nov. (Pcb)

Pectobacterium carotovorum subsp. *odoriferum* comb.nov. (Pco)

Pectobacterium carotovorum subsp. *wasabiae* comb.nov. (Pcw)

Pectobacterium cacticidum (Pc)

Pectobacterium chrysanthemi (Pch)

Pectobacterium cypripedii (Pcy)

تغییر یافت (هیوبن و همکاران، ۱۹۹۸). این نام تا سال‌های دهه ۱۹۹۰ به‌صورت متناوب و پراکنده در منابع استفاده شد. در سال‌های اواخر دهه۱۹۹۰ برای بررسی فیلوژنی اروینیا، توالی‌های ژن 16S rRNA مورد استفاده قرار گرفت. گروهی نیز برای احیا جنس *Pectobacterium* از این داده‌ها استفاده کردند (هیوبن و همکاران، ۱۹۹۸؛ کون و همکاران، ۱۹۹۷) در هر دو مورد اطلاعات کافی برای آنالیز فیلوژنیکی فراهم نشد.

در سال ۲۰۰۳، بر پایه هیبریداسیون DNA-DNA، تاکسونومی عددی ۱۲۰ خصوصیت فنوتیپی، سرولوژی و آنالیز فیلوژنتیکی، زیرگونه‌های *P.carotovorum* به ۴ گونه ژنومی تقسیم شدند. بر این اساس گونه ژنومی یک، زیرگونه (Pca) *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* را در بر می‌گیرد. گروه ژنومی دو، زیرگونه *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* (Pcb) را شامل می‌شود، گروه ژنومی سه زیرگونه *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (Pcw) و گروه ژنومی چهار، زیرگونه(Pco) *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* و زیرگونه (Pcc) *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* را در بر می‌گیرد. همچنین پیشنهاد شد که زیرگونه های

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum* comb.nov. (Pca)

Pectobacterium carotovorum subsp. *betavascularum* comb.nov. (Pcb)

Pectobacterium carotovorum subsp. *wasabiae* comb.nov. (Pcw)

به سطح گونه ارتقاء یافته و به صورت

Pectobacterium atrosepticum sp. now.,

Pectobacterium wasabiae sp. now.,

Pectobacterium betavascularum sp. now.

نوشته شوند. در نتیجه تنها دو زیرگونه Pcc و Pco باقی ماند (گاردان و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به تغییرات مختلفی که از نظر تاکسونومیکی برای باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم اعمال شد در نهایت طبقه‌بندی این باکتری‌ها به شرح زیر تصویب شد (گاردان و همکاران، ۲۰۰۳).

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* comb.nov. (Pcc)

Pectobacterium atrosepticum sp. now.,

Pectobacterium betavascularum sp. now.

Pectobacterium wasabiae sp. now.,

Pectobacterium chrysanthemi (Pch)

اما اخیراً *P.chrysanthemi* (Pch) بر اساس خصوصیت فنوتیپی، سرولوژیکی و آنالیز فیلوژنی ۱۶S rDNA به جنس *Dickeya* منتقل شد (سامسون و همکاران، ۲۰۰۴).

تغییر نام مکرر گونه‌ها باعث آشفتگی نامگذاری و انتشار شرح گونه‌هایی که تنها چند سال اعتبار داشته‌اند، شده است. ولی دو گونه در این گروه سابقه بیشتری دارند. گونه *E. chrysanthemi* متنوع‌تر و شناخت خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی آن کامل‌تر از *E. carotovora* است (ناسار، ۱۹۹۶). در بین زیرگونه‌های *E.carotovora* بیشترین تنوع متعلق به زیرگونه *E. carotovora* subsp. *carotovora* می‌باشد. این زیرگونه طیف میزبانی وسیعی داشته و از روی گیاهان متعلق به حداقل ۱۶ خانواده گیاهی گزارش شده است. حتی استرین‌های جدا شده از یک میزبان (سیب‌زمینی) این زیرگونه ساختمان ژنوم، روابط سرولوژیکی و نیمرخ آنزیمی متفاوت دارند (راید و کالمر، ۱۹۸۶؛یاپ و همکاران، ۲۰۰۴).

امروزه روش‌های بسیار زیادی برای طبقه‌بندی و تشخیص جدایه‌های *Pectobacterium* (*Erwinia*) وجود دارد که اکثراً به خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی و مولکولی وابسته هستند (دی‌بویر و همکاران، ۱۹۷۸؛ هلیاس و همکاران، ۱۹۹۸؛ یاهویی-زیایی و همکاران، ۲۰۰۳؛ بقائی و همکاران، ۲۰۱۱). زیرگونه‌های *Pectobacterium* عامل پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه سیب‌زمینی، از نظر خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی متنوع بوده و از نظر بسیاری از خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی، توالی بازهای آلی ژن 16S rRNA و توالی بازهای آلی خانواده ژنی *pelY* قابل تفکیک بوده و تفاوت زیادی در آنالیز قطعات DNA حاصل از تأثیر آنزیم‌های برش دهنده (RFLP) در آنها دیده می‌شود (داراسه و همکاران، ۱۹۹۴). قدرت بیماری‌زایی در جدایه‌های *Pectobacterium* نیز متفاوت می‌باشد و اطلاعات کمی در مورد ساز و کار تنوع در قدرت تهاجم این بیمارگر وجود دارد.

۲-۳- خصوصیات باکتری‌شناسی

۲-۳-۱- خصوصیات باکتری‌شناسی جنس *Pectobacterium*

جنس *Pectobacterium* به همراه *Escherichia*، *Brenneria*، *Dickeya*، *Pantoea*، *Erwinia*، *Salmonella* و *Enterobacter* و چند جنس دیگر در راسته Entrobacteriales و خانواده Entrobacteriaceae قرار گرفته است (جینس، ۲۰۰۶). کلیه اعضای این جنس باکتری‌هایی گرم منفی، میله‌ای راست و به اندازه ۱-۲/۵μm × ۰/۵-۱، دارای تاژک محیطی(Peritrichous)، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت هستند. بهینه درجه حرارت رشد آنها ۲۷-۳۰ $^{\circ}$C و بیشینه آن ۳۲-۴۰ $^{\circ}$C است. این باکتری‌ها به خاطر تولید آنزیم پکتیناز قادر به ایجاد حفره (pit) روی محیط‌های حاوی سدیم پلی‌پکتات هستند. غالباً از فروکتوز، گلوکز، سوکروز، مانیتول، مانوز، رایبوز و سوربیتول اسید تولید می‌کنند ولی به‌ندرت از آدونیتول، دکسترین، دولسیتول و ملی‌بیوز استفاده می‌کنند (شاد و همکاران،۲۰۰۱؛ للیوت و دیکی، ۱۹۸۴) معمولاً به صورت تکی هستند و در برخی موارد به صورت زنجیره‌های کوتاه در می‌آیند.

۲-۳-۲- خصوصیات باکتری‌شناسی گونه *Pectobacterium carotovorum*

کلمه carotovora از دو کلمه carrot (هویج) و vora (بلعیدن و قورت دادن) تشکیل شده است. که مجموعاً به بلعیدن و از بین بردن هویج اشاره دارد. این گونه باعث پوسیدگی نرم به‌ویژه در بافت‌های ذخیره‌ای

طیف وسیعی از گیاهان و نیز ساق‌سیاه در سیب‌زمینی می‌گردد. میزان G+C در DNA آن ٪۵۳/۱- ۵۰/۵ می باشد (للیوت و دیکی، ۱۹۸۴). خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی این گونه در جدول (۲-۲) خلاصه شده است.

۲-۳-۳- خصوصیات باکتری‌شناسی زیرگونه‌های *Pectobacterium carotovorum*

۲-۳-۳-۱- خصوصیات زیرگونه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

همان‌طور که در بالا اشاره شد کلمه carotovora مجموعاً به بلعیدن و از بین بردن هویج اشاره دارد. این زیرگونه باعث پوسیدگی نرم به‌ویژه در بافت‌های ذخیره‌ای می‌شود و بیشتر در آب و هوای گرم شیوع دارد. (جینس، ۲۰۰۶). بافت‌های آلوده ابتدا کرم رنگ بوده، سپس در اثر اکسیداسیون قهوه‌ای رنگ می‌شوند (پاسکو و همکاران، ۲۰۰۶). خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی این زیرگونه در جدول (۲-۲) خلاصه شده است.

۲-۳-۳-۲- خصوصیات زیرگونه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*

کلمه *atroseptica* از دو قسمت ater (سیاه) و spticus (عفونت سیاه‌رنگ) تشکیل شده است. این زیرگونه علاوه بر آنزیم پکتیناز، آنزیم سلولاز نیز ترشح می‌کند و باعث ساق‌سیاه و پوسیدگی بافت‌های ذخیره‌ای می شود. میزان G+C در DNA آن ٪۵۳/۱-۵۱/۳ می‌باشد (سالموند، ۱۹۹۴) علائم ناشی از *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* که عموماً به عنوان عامل ساق‌سیاه شناخته می‌شود ابتدا به صورت زردی و پژمردگی در برگ‌ها است این پژمردگی به‌ویژه در اوقات گرم روز ظاهر می‌شود. پیچیدگی کناره برگ‌ها و گاهی کوتولگی از علائم دیگر این گونه محسوب می‌شوند. ساقه‌های آلوده سرانجام به رنگ سیاه در می‌آیند (جینس، ۲۰۰۶). در شرایط مرطوب پوسیدگی نرم ناشی از آن لعاب‌دار بوده اما در شرایط خشک چروکیده است. این گونه عموماً در آب و هوای سرد شیوع دارد (جینس، ۲۰۰۶). خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی این زیرگونه در جدول (۲-۲) خلاصه شده است.

۲-۳-۴- خصوصیات باکتری‌شناسی گونه *Pectobacterium chrysanthemi*

اسم این گونه از نام عمومی گل داوودی (*Chrysanthemum morifoloum*) مشتق شده است (بورک‌ودر و همکاران، ۱۹۵۳) گونه *P. chrysanthemi* نیز یک پاتوژن آوندی است که ایجاد نکروز آوندی قهوه‌ای رنگ و پژمردگی می‌کند. علائم پوسیدگی نرم ایجاد شده توسط این گونه ممکن است با علائمی که توسط *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ایجاد می‌شود، اشتباه گرفته شود (جینس، ۲۰۰۶). اما نکروز آوندی ایجاد شده توسط این گونه عموماً در بخش‌های بالاتر ساقه دیده می‌شود که از این طریق از نکروز ناشی از *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (در پایین ساقه دیده می‌شود) قابل تفکیک است (جینس، ۲۰۰۶). برای شناسایی سریع این پاتوژن می‌توان از پیگمانت‌های آبی (قابل‌حل در آب) که در کلنی باکتری تولید می‌شود استفاده‌کرد (یانگ و همکاران، ۲۰۰۶). شش پاتووار *chrysanthemi*، *zea*، *deffenbachiae*، *dianthicola*، *paradisiasa* و *Parthenii* برای این گونه تشخیص داده شده است (للیوت ودیکی، ۱۹۸۴). بر

اساس سه خصوصیت فنوتیپی (فسفاتاز، تولید گاز از گلوکز و عدم تولید اسید از تری‌هالوز) این گونه از دیگر گونه‌های جنس *Pectobacterium* قابل تفکیک است. میزان C+G در DNA آن ٪۵۷/۱-۵۵/۱ می‌باشد (للیوت و دیکی، ۱۹۸۴؛ شاد و همکاران، ۲۰۰۱). خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی این گونه در جدول (۲-۲) خلاصه شده است.

جدول۲-۲- خصوصیات بیوشیمیایی زیرگونه‌های *Pectobacterium*

آزمون	pcc	pca	pcb	pco	pcw	pch	pct
گرم	-	-	-	-	-	-	-
تاژک محیطی	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	-	-	-	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+
ژلاتیناز	+	-	-	+	+	+	ND
رشد بی‌هوازی و هوازی	+	+	+	+	+	+	+
رشد در $37^{\circ}c$	+	-	+	+	-	+	+
کاهش سطح سوکروز	-	+	+	+	-	-	-
لهانیدن سیب‌زمینی	+	+	+	+	+	+	+
فوق‌حساسیت روی برگ توتون	-	-	-	-	-	-	-
متیل‌رد	+	+	-	+	+	+	+
فسفاتاز	-	-	-	-	-	+	V
کازئیناز	+	-	-	+	+	+	ND
لسیتیناز	-	-	-	-	-	+	ND
حساسیت به اریترومایسین	-	-	-	ND	-	+	-
تولید اندول	-	-	-	-	-	+	-
استفاده از:							
ملی‌بیوز	+	+	-	+	-	+	-
لاکتوز	+	+	+	+	+	+	-
رافینوز	+	+	-	ND	-	+	-
سیترات	+	+	-	+	+	+	ND
آرابیتول	-	-	-	+	ND	-	ND
سوربیتول	-	-	-	+	ND	-	-
پالاتینوز	-	+	+	-	-	-	-
مالتوز	+	-	+	-	+	-	ND
استفاده از آلفا متیل دی گلوکوزاید	-	+	+	+	-	-	-

+ = ۸۰٪ یا بیش از ۸۰٪ استرین‌ها مثبت، V= بین ۲۱-۷۹٪ استرین‌ها مثبت، - = ۸۰٪ یا بیش از ۸۰٪ استرین‌ها منفی، ND= تعیین نشده است.

۲-۳-۵- خصوصیات باکتری‌شناسی جنس *Dickeya*

جنس *Dickeya* به همراه *Pectobacterium* و چند جنس دیگر در راسته Entrobacteriales و خانواده Entrobacteriaceae قرار گرفته است (جینس، ۲۰۰۶). اعضای این جنس کلنی‌هایی محدب و به رنگ شیری دارند و به‌واسطه تولید مقادیر زیاد آنزیم‌های پکتولیتیک خارج سلولی شناخته شده هستند (پالاسیو- بیلسه و همکاران، ۲۰۱۰). این باکتری‌ها به خاطر واکنش مثبت در آزمون فسفاتاز، حساسیت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین، استفاده از قندهای رافینوز، ملی‌بیوز، آرابیتول و عدم رشد در روی محیط آلفا متیل دی گلوکوزاید و محیط حاوی Nacl 5% از گونه و زیرگونه‌های پکتوباکتریوم قابل تشخیص هستند (لوریلا و همکاران، ۲۰۰۸).

۲-۴- پراکنش جغرافیایی بیماری پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه

با وجود اینکه این بیماری تاکنون از همه‌ی مناطق کشت سیب‌زمینی (آفریقا، آسیا و اقیانوسیه، اروپا، آمریکای شمالی و مرکزی) در دنیا گزارش شده است اما *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب و *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* در شرایط آب و هوای سرد بیشتر شیوع دارد (ایس و همکاران، ۲۰۰۸؛ پرومبلون و کلمان، ۱۹۸۰)

۲-۵- دامنه میزبانی

این باکتری رنج میزبانی وسیعی دارد. عمده میزبان‌های آن گیاهانی مثل سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)، پیاز(*Allium cepa*)، بگونیا (*Begonia* spp.)، کلم (*Brassica* spp.)، چیکوریم (*Cichorium endivia*)، کدوئیان (*Cucurbita* spp.)، هویج (*Daucus carota*)، تربچه (*Raphanus sativus*)، کالالیلی (*Zantedeschia*)، آسپاراگوس (*Asparagus officinalis*)، ریواس (*Rheum rhaponticum*)، گیاه تخم‌مرغی (*S. melongena*) و داوودی (*Chrysanthemum morifoloum*) است. در واقع به اکثر گیاهانی که بافت ذخیره ای دارند حمله می‌کند (دوارت و همکاران، ۲۰۰۳؛ دی‌بویر، ۲۰۰۳؛ دیکی، ۱۹۷۹ و ۱۹۸۱).

۲-۶- اپیدمولوژی

اکثر کارهای اپیدمولوژی انجام شده روی پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم با *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* و *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* و روی سیب‌زمینی انجام شده است. مطالعات اپیدمولوژیکی کمی روی سایر پکتوباکتریوم‌های پوسیدگی نرم مثل *P. chrysanthemi* انجام شده است زیرا اولاً صنعت تولید سیب‌زمینی سالانه با خسارت زیادی از طرف *P. carotovorum* مواجه است و ثانیاً اغلب کارهای اپیدمولوژیکی در شرایط آب و هوایی انجام شده است که برای *P. chrysanthemi* و سایر پکتوباکتریوم‌های پوسیدگی نرم غیر معمول می‌باشد. این باکتری‌ها به آسانی در محیط زیست یافت می‌شوند و از روی تعداد زیادی از میزبان‌های گیاهی، خاک، حشرات، آب‌های سطحی و زیرزمینی قابل کشت هستند (میس‌کارتر و همکاران، ۱۹۸۴ و ۱۹۸۵). آنها می‌توانند مسیرهای طولانی با اندام‌های تکثیری و غده‌های

سیب‌زمینی جابه‌جا شوند همچنین مسیرهای طولانی را به همراه گرد و غبار در اتمسفر سپری کنند. کوئین و همکاران در طول بارندگی تابستان، پاییز و اوایل زمستان، *P. carotovorum* را از سطح هوا جدا کرده‌اند. لیچ و همکاران طی مطالعاتی که در دهه‌های ۱۹۲۰ تا ۱۹۳۰ انجام دادند همراهی *Pectobacterium* با کرم ذرت را پیشنهاد کردند (نقل از گنامانیکام، ۲۰۰۶). پکتوباکتریوم‌های پوسیدگی نرم همچنین همراه با سایر بی مهرگان مانند کرم‌های میوه و حلزون گزارش شده‌اند (هریسون و همکاران، ۱۹۷۷؛ فیلیپس و کلمان؛ ۱۹۸۲). کلاپر و همکاران در سال ۱۹۷۹ با بررسی چند خانواده از Diptera، Hymenoptera، Coleoptera و Homoptera، نقش مهم این حشرات در گسترش باکتری‌های پوسیدگی نرم *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* و *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* در بین میزبان‌های گیاهی را ثابت کردند (کلاپر و همکاران، ۱۹۷۹).

نارس بودن و زخمی شدن غده‌ها، تابش آفتاب، حمله سایر عوامل بیماری‌زا، آب و هوای گرم و مرطوب و کمبود اکسیژن شرایط را برای پوسیدگی نرم غده فراهم می‌کند. غده‌هایی که در شرایط دمایی گرم مثل ۲۰ $^{\circ}C$ ۲۵- برداشت می‌شوند بسیار به پوسیدگی نرم حساس هستند. در دماهای بالا $^{\circ}C$ ۱۰ احتمال پوسیدگی غده شدت می‌یابد (دبلیوجی‌هوکر، ۱۳۷۹).

۲-۷- بیماری‌زایی

۲-۷-۱- بیماری‌زایی و نحوه ورود

هر جا بافت‌های گوشتی یا آبدار گیاه، در مزرعه یا انبار در حال پوسیدن باشند باکتری‌ها همیشه حضور دارند. بوی ناخوشایندی که از این بافت‌ها احساس می‌شود معمولاً نتیجه تولید مواد فراری است که این باکتری‌ها از تجزیه بافت‌های گیاهی آزاد می‌سازند. بافت‌های در حال پوسیدن نرم و آبکی شده و اغلب مواد لزجی متشکل از باکتری‌ها و پسماند سلولی از شکاف‌های ایجاد شده در آنها به خارج تراوش می‌شود. باکتری های مولد پوسیدگی نرم در بافت‌های آلوده، خاک ناحیه ریزوسفر و روی لوازم و دستگاه‌ها زنده می‌مانند بعضی از آنها در حشرات نیز زمستان‌گذرانی می‌کنند. این باکتری‌ها از طریق تماس مستقیم گیاهان با یکدیگر، حشرات، آب، خاک، وسایل، ابزار، بذر و دست افراد پخش می‌شوند و عمدتاً از طریق زخم وارد گیاه یا بافت‌های آن می‌شوند. در داخل گیاه این باکتری‌ها به مقدار فراوان در فضای بین سلولی تکثیر می‌یابند و آنزیم‌های مختلفی تولید می‌کنند که موجب حل شدن تیغه میانی و جدا شدن سلول‌ها از همدیگر و له شدن بافت‌های مورد حمله می‌شوند. سلول‌هایی که به‌واسطه باکتری‌ها و آنزیم‌های تولیدی آنها محاصره شده‌اند، ابتدا آب خود را از دست می‌دهند، چروکیده می‌شوند و سرانجام قسمت‌هایی از دیواره سلولی حل و باکتری‌ها وارد آنها می‌شوند. کنترل پوسیدگی‌های نرم باکتریایی دشوار است و به رعایت اصول بهداشتی، جلوگیری از زخمی‌شدن اندام‌ها، کنترل خوب حشرات، رعایت تناوب زراعی و خشک و خنک نگه‌داشتن اندام‌ها در انبار وابسته است (اگریوس، ۲۰۰۵).

۲-۷-۲- ظهور و توسعه علائم

بیماری ممکن است ابتدا در مزرعه، روی گیاهانی ظاهر شود که از قطعات بذری آلوده تکثیر شده باشند. بعضی از غده‌ها، ریزوم‌ها و پیازها پس از تشکیل شدن، از طریق عدسک‌ها یا زخم‌ها آلوده می‌شوند. حشرات در مایه‌زنی باکتری‌ها به اندام‌های آبدار گیاهان و پخش و گسترش آنها در مزرعه و انبار به میزان زیادی نقش دارند. باکتری‌های پوسیدگی نرم قادرند در بدن حشرات، در مراحل مختلف چرخه رشدی آنها زندگی کنند. به علاوه، لاروهای حشرات موقعی که روی بافت‌های لهیده غده و پیاز حرکت می‌کنند، به باکتری آغشته می شوند. حشرات باکتری را روی گیاه سالم می‌برند و آنها را در محل‌های زخم‌شده قرار می‌دهند و موجب ایجاد بیماری می‌شوند. حتی در مواردی گیاه یا اندام‌های ذخیره‌ای گیاه به پوسیدگی نرم مقاوم باشند و بتوانند پیشرفت پوسیدگی را از طریق ایجاد لایه‌های چوب‌پنبه‌ای در محل آسیب‌دیده و زخم‌ها متوقف کنند، لاروها این لایه‌های چوب‌پنبه‌ای را به همان سرعتی که تولید می‌شوند، از بین می‌برند و پوسیدگی نرم به گسترش خود ادامه می‌دهد. وقتی باکتری‌های پوسیدگی نرم وارد زخم‌ها می‌شوند ابتدا روی مایعات آزادشده از سلول های زخمی زندگی می‌کنند و تکثیر می‌یابند و در آنجا با تولید مقادیر زیادی از آنزیم‌های پکتیناز، مواد پکتینی موجود در تیغه میانی را می‌شکنند و موجب نرم شدن بافت‌ها می‌شوند. به علت بالا بودن فشار اسمزی در بافت‌های آلوده، آب از سلول‌ها به فضای بین‌سلولی ترشح می‌شود. در نتیجه این حوادث، سلول‌ها پلاسمولیز شده و می‌میرند. آنزیم‌های ترشح شده جلوتر از باکتری‌ها حرکت می‌کنند و بافت‌ها را برای حمله باکتری‌ها آماده می‌سازند. بافت مورد حمله نرم و به توده‌ای لزج، شامل تعدادی زیادی باکتری در حال شنا کردن در مواد آبکی، تبدیل می‌شود.

اپیدرم بسیاری از بافت‌ها مورد حمله قرار نمی‌گیرد. با وجود این، ترک‌هایی در آنها پدیدار می‌شود و از راه آن ترک‌ها مواد لزج خارج و به خاک یا کیسه‌ها در انبار وارد می‌شود که با ایجاد تماس با اندام‌های گوشتی و آبدار سالم، آلودگی را به آنها منتقل می‌کند (اگریوس،۲۰۰۵).

۲-۷-۳- علائم بیماری

علایم پوسیدگی نرم ابتدا به صورت زخم‌های کوچک آبسوخته شروع می‌شود که به سرعت بر عمق و قطر آنها افزوده می‌شود. بافت‌هایی که در محل آلودگی قرار دارند کرم رنگ و لزج می‌شوند و به شکل توده‌ای خمیری متشکل از سلول‌های تخریب‌شده و باکتری‌ها در می‌آیند. در حالی که بخش‌های درونی به مایع کدری تبدیل می‌شوند سطح خارجی بافت ممکن است سالم به نظر برسد یا ممکن است ترک‌هایی ایجاد شود و توده لزج به بیرون تراوش کند و با قرار گرفتن در معرض هوا به رنگ زرد، خاکستری یا قهوه‌ای تیره درآید. میوه یا غده، ممکن است طی ۳ تا ۵ روز به توده‌ای نرم و آبکی پوسیده تبدیل شود. میوه یا غده‌های آلوده بسیاری از گیاهان تا زمان فروپاشی بافت‌ها تقریباً بی‌بو هستند. پس از آن، بر اثر رشد باکتری‌های ثانویه در بافت‌های در حال تجزیه شدن، بوی زننده‌ای تولید می‌شود. ولی گیاهان تیره کلم (خاجیان) و پیازها تقریباً همیشه بر اثر آلودگی به باکتری‌های پوسیدگی نرم، بوی زننده‌ای پیدا می‌کنند. وقتی محصولات ریشه‌ای در مزرعه آلوده شوند، قسمت‌های پایینی ساقه‌ها نیز ممکن است آلوده، آبکی، قهوه‌ای رنگ و نهایتاً چروکیده شده و موجب کوتولگی، پژمردگی و مرگ گیاه شود. آلودگی برگ‌ها و ساقه‌های گوشتی در مزرعه به ندرت

ممکن است اهمیت داشته باشد ولی این اندام‌ها اگر در زمان بسته‌بندی و انبار کردن آلوده شوند، به‌ویژه مواقعی که در بسته‌های پلاستیکی نگهداری می‌شوند به سرعت نرم شده و از هم می‌پاشند و طی یک تا دو روز به توده‌های آبکی لزج سبز رنگی تبدیل می‌شوند (شکل۲-۱)(اگریوس، ۲۰۰۵).

شکل۲-۱- نمونه‌ای از علایم ایجاد شده توسط *Pectobacterium* در کالانکو (الف)، کوکب (ب) و سیب‌زمینی (ج و د)

علائم پوسیدگی نرم در غده، سایر ارگانل‌های ذخیره‌ای و میوه‌ها دیده می‌شود. گیاهان آلوده ممکن است علائم پژمردگی را هم نشان دهند. بافت‌ها شروع به نرم شدن می‌کنند و از آنها مایع شیری تراوش می‌شود. ساقه و دمبرگ‌ها توخالی شده و متلاشی می‌شوند. ممکن است پوسیدگی نرم ایجاد شده بوسیله *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* با علائم پوسیدگی نرم که بوسیله *P. chrysanthemi* ایجاد می‌شود اشتباه گرفته شود. در آلودگی‌های ناشی از *P. chrysanthemi* نکروز آوندی قهوه‌ای رنگ در بخش‌های بالاتر ساقه مشاهده می‌شود و در محل آلودگی زخم و جراحاتی هم وجود دارد (دی‌بویر،۲۰۰۳؛ جینس، ۲۰۰۶).

علائم ساق‌سیاه ابتدا به صورت زردی و پژمردگی در برگها است این پژمردگی به ویژه در اوقات گرم روز ظاهر می‌شود. پیچیدگی کناره برگ‌ها و گاهی کوتولگی از علائم دیگر ساق‌سیاه محسوب می‌شوند. ساقه‌های آلوده سرانجام به رنگ سیاه در می‌آیند. در شرایط مرطوب پوسیدگی نرم ناشی از آن لعاب‌دار بوده اما در شرایط خشک چروکیده است (جینس، ۲۰۰۶).

۲-۸- آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی

قدرت تهاجمی پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم به ترشح آنزیم‌های برون سلولی آنها بر می‌گردد. این آنزیم‌ها شامل پکتینازها، سلولازها و پروتئازها هستند که دیواره سلولی گیاه را می‌شکنند و مواد غذایی لازم برای رشد باکتری را فراهم می‌کنند (پرومبلون، ۲۰۰۲؛ باراس و همکاران، ۱۹۹۴).

پکتینازها مهمترین آنزیم‌های خارج سلولی هستند که در ایجاد بیماری نقش دارند. پکتینازها شامل پکتات‌لیاز (Pl یا Pel)، پکتین‌لیاز (Pnl)، پکتین‌متیل‌استراز (Pme) و پلی‌گالاکتروناز (Peh) هستند که در

چندین شکل و به صورت ایزوآنزیم وجود دارند. این آنزیم‌ها توسط ژن‌های مستقلی کد می‌شوند ولی بسیار به هم شبیه هستند (پرومبلون، ۲۰۰۲؛ پرومبلون وسالموند، ۱۹۹۵).

پکتات‌لیاز (Pel) مهمترین پکتیناز در بیماری‌زایی پکتوباکتریوم است. دارای دو فرم exo و endo می‌باشد و اسید پکتولیتیک را ترجیح می‌دهد. این آنزیم‌ها پیوندهای گلی‌کوزیدی را از طریق حذف پیوند ß شکسته و اسید گالاکترونیک اشباع و غیراشباع یا اسید اولیگوگالاکترونیک تولید می‌کنند. *P. chrysanthemi* در حضور پلی‌گالاکترونیک اسید، پنج پکتات‌لیاز مهم A، B، C، D، E و حداقل چهار پکتات‌لیاز ثانویه X، Z، I و L را ترشح می‌کند (کالمر و کن، ۱۹۸۶؛ تاچ و همکاران، ۲۰۰۳). ژن‌های پکتات‌لیاز زیرگونه‌های *P. carotovorum* در پنج خانواده A، B، C، D و E قرار گرفته‌اند که خانواده A، D و E نقش مهم‌تری در بیماری‌زایی دارند (تاچ و همکاران، ۲۰۰۳؛ راید و کالمر، ۱۹۸۶).

سلولازها نشان‌دهنده فعالیت اندونوکلئازها هستند و باعث شکسته شدن سلولز در دیواره سلولی می‌شوند. حداقل دو نوع سلولاز cel y و cel z در *P. chrysanthemi* و دو نوع cel s و cel v در *P. carotovorum* شناخته شده‌اند. تحقیقات اخیر نشان داده است که در بیماری‌زایی *P.carotovorum* روی سیب‌زمینی cel احتمالاً به فعالیت پکتینازها کمک می‌کند (باراس و همکاران، ۱۹۹۴؛ والکر و همکاران، ۱۹۹۴).

گونه‌های پکتوباکتریوم پروتئازهای متنوعی را می‌سازد که نقش آنها در بیماری‌زایی ثابت شده است. اهداف احتمالی این آنزیم‌ها گلیکوپروتئین‌های دیواره سلولی گیاه، کیتینازها و یا پروتئین‌های دفاعی با فعالیت‌های مشابه لیزوزیم‌ها می‌باشد با فعالیت این آنزیم آمینواسیدهای لازم برای بیوسنتز پروتئین‌های بیمارگر فراهم می‌شود (تاچ و همکاران، ۲۰۰۳).

تولید و ترشح آنزیم‌های خارج سلولی منحصر به پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم نمی‌باشد بلکه توسط بسیاری از ساپروفیت‌ها نیز ترشح می‌شود. اما از آن جایی‌که پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم توانایی تولید میزان زیادی از این آنزیم‌های خارج سلولی را دارند آنها به عنوان بیمارگرهای خطرناک معرفی شده‌اند (پرومبلون و سالموند، ۱۹۹۵).

۲-۹- مروری بر پژوهش‌های انجام شده

۲-۹-۱- پیشینه بیماری و روش‌های شناسایی پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم در دنیا

بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی، اولین بار در سال ۱۹۰۱ از آمریکا توسط جونز (Jones) روی هویج و تحت نام پوسیدگی نرم هویج (*Bacillus carotovorum*)، گزارش گردید. در سال ۱۹۰۲، ون‌هال (Ven Hall) در هلند و اپل (Appel) در آلمان به‌طور جداگانه، یک میکروارگانیسم با ریخت‌شناسی مشابه را به عنوان عامل بیماری ساق‌سیاه (blackleg disease) در سیب‌زمینی گزارش کردند. ون‌هال عامل آن را *Bacillus atrosepticus* و اپل، آن را *Bacillus phytophthorus* نامید (نقل از گراهام، ۱۹۶۴). در سال ۱۹۰۷ هریسون باکتری *B.solaniasprus* را که بیماری مشابه ساق‌سیاه روی سیب‌زمینی ایجاد کرده بود را به عنوان عامل