بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

سبب شناسی پوسیدگی غده‌های سیب زمینی در منطقه دامنه اصفهان

پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

طاهره شکیبافرد

اساتید راهنما:
دکتر مسعود بهار
دکتر مجید اولیاء

۱۳۹۰

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی خانم طاهره شکیبافرد

تحت عنوان:

سبب شناسی پوسیدگی غده‌های سیب زمینی در منطقه دامنه اصفهان

در تاریخ ۱۳۹۰/۲/۱۹ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱ - استاد راهنمای پایان نامه	دکتر مسعود بهار
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر مجید اولیاء
۳- استاد مشاور پایان نامه	مهندس هادی کریمی پور فرد
۴- استاد داور	دکتر بهرام شریف نبی
۵- استاد داور	دکتر جمشید رزمجو
۶- سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر احمد ریاسی

منت خدای راعزوجل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت

خالصانه ترین سپاس ها نثار دو خورشید همیشه فروزان زندگی ام : پدر و مادرم که با یاری بی دریغ و زحمات بسیارشان مرا در این مهم یاری نمودند.

و از خواهرها، برادر و خواهرزاده های عزیزم، به خاطر دلگرمی هایشان در تمامی مراحل زندگی.

همچنین با قدردانی از استاد گرانقدر خود جناب آقای دکتر مسعود بهار به پاس تمامی زحمات بی شائبه و پی گیری های بی دریغشان در تمامی مراحل پایان نامه.

و با تشکر از استاد محترم جناب آقای دکتر مجید اولیاء به پاس تمامی زحمات و راهنمایی های ایشان در زمینه مباحث ناتودشناسی.

از استاد مشاور پایان نامه ام جناب آقای مهندس هادی کریمی پور فرد به پاس زحمات، همکاری و توجه ایشان سپاسگذارم.

از اساتید ارجمند آقای دکتر بهرام شریف نبی و آقای دکتر جمشید رزمجو که زحمت بازخوانی و داوری پایان نامه ام را تقبل نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.

با تشکر ویژه از خانم مهندس هما عسکریان و آقای مهندس علیرضا اخوان به پاس تمامی زحمات فراوان و راهنمایی های خالصانه سپاسگزارم.

در آخر از تمامی دوستان عزیزم که لحظات خوبی را در کنارشان گذراندم :

طیبه موسوی، هدیه اسلام پناهی، الهام منوچهری، غزاله خاکسار، فروغ اعتصام، آیدا دادرس، فاطمه احمدی، فاطمه امیری، سارا دهقانی، آزاده سرافراز، فهیمه نیک سرشت، ملیحه حسنی، الهه شهواری، زهرا قهرمان، منصوره معادی، مهتاب درخشان و شیرین کامه سپاسگذارم.

طاهره شکیبافرد

اردیبهشت ماه ۱۳۹۰

كليه حقوق مادي مترتب بر نتايج
مطالعات، ابتكارات و نوآوري هاي
ناشي از تحقيق موضوع اين
پايان‌نامه متعلق به دانشگاه صنعتي
اصفهان است.

تقدیم به :

مادر عزیزم خانم منیژه کشتکاران که همیشه چون معلم و راهنمایی دلسوز مشوق من در زمینه ادامه تحصیل بودند.

پدر عزیزم که همیشه پشتیبان و راهنمای من در تمامی مراحل زندگی‌ام بوده اند.

برادر و خواهر های عزیزم

خواهرزاده های عزیزم :

عرفان و مسگات

و استاد مهربانم که با صبر و حوصله بسیار من را در به اتمام رساندن پایان نامه صمیمانه همراهی نمودند:

دکتر مسعود بهار

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فهرست مطالب..... هشت
چکیده..... ۱
فصل اول: مقدمه و بررسی منابع
۱-۱- بیماری‌های مهم سیب زمینی..... ۳
۱-۱-۱- بیماری‌های باکتریایی..... ۵
۱-۱-۲- بیماری‌های نماتودی..... ۵
۱-۱-۳- رابطه متقابل نماتود - باکتری..... ۵
۱-۲- باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه در سیب زمینی..... ۶
۱-۳- تاریخچه بیماری پوسیدگی نرم سیب زمینی..... ۶
۱-۴- موقعیت تاکسونومی باکتری‌های مولد ساق سیاه و پوسیدگی نرم جنس *Pectobacterium*..... ۷
۱-۵- علایم ساق سیاه و پوسیدگی‌های نرم باکتریایی روی سیب زمینی..... ۷
۱-۵-۱- علایم ساق سیاه..... ۷
۱-۵-۲- علایم پوسیدگی نرم سیب زمینی..... ۸
۱-۶- دامنه میزبانی و پراکنش باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم..... ۸
۱-۷- نحوه ورود باکتری به میزبان..... ۸
۱-۸- شرایط محیطی لازم برای بروز و شیوع بیماری..... ۹
۱-۹- منابع اصلی زمستان گذران و مایه تلقیح اولیه..... ۱۰
۱-۱۰- کنترل بیماری ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب زمینی..... ۱۱
۱-۱۱- موقعیت بیماری ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب زمینی در ایران..... ۱۱
۱-۱۲- روش‌های شناسایی پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم..... ۱۲
۱-۱۲-۱- شناسایی پکتوباکتریوم ها بر اساس مشخصات مورفولوژیکی..... ۱۲
۱-۱۲-۲- شناسایی بر اساس روش‌های مولکولی..... ۱۴
۱-۱۳- نماتود مولد پوسیدگی غده سیب زمینی(Potato rat nematode)..... ۱۵
۱-۱۴- تاریخچه نماتود پوسیدگی غده سیب زمینی..... ۱۵
۱-۱۵- خصوصیات تاکسونومی و مورفولوژیکی جنس *Ditylenchus*..... ۱۶
۱-۱۶- گونه‌های جنس *Ditylenchus*..... ۱۷
۱-۱۷- خصوصیات مورفولوژیکی گونه *D. destructor*..... ۱۸

۱-۱۷-۱- دامنه میزبانی و پراکنش نماتود پوسیدگی سیب زمینی ۱۸
۱-۱۸- خصوصیات مورفولوژیکی گونه *D. dipsaci* و مقایسه آن با گونه *D. destructor* ۱۹
۱-۱۸-۱- دامنه میزبانی و پراکنش *D. dipsaci* ۱۹
۱-۱۹- دامنه میزبانی و پراکنش *D. myceliophagus* ۱۹
۱-۲۰- علایم بیماری نماتود پوسیدگی سیب زمینی ۲۰
۱-۲۱- چرخه زندگی و زیست شناسی نماتود پوسیدگی غده سیب زمینی ۲۰
۱-۲۲- کنترل نماتود پوسیدگی سیب زمینی ۲۲
۱-۲۳- موقعیت بیماری پوسیدگی سیب زمینی در ایران ۲۲
۱-۲۴- روش‌های شناسایی نماتود مولد سیب زمینی ۲۳
۱-۲۴-۱- روش‌های مورفولوژیکی ۲۳
۱-۲۴-۱-۱- روش‌های جداسازی از خاک و بافت گیاه ۲۳
۱-۲۴-۱-۲- مطالعات میکروسکوپی و آرشیوی ۲۳
۱-۲۴-۲- روش‌های مولکولی ۲۴
۱-۲۵- تأثیر متقابل نماتود و باکتری ۲۷
۱-۲۶- نماتودها به عنوان عامل ورودی باکتری‌های پاتوژن ۲۷
۱-۲۷- نماتودها به عنوان ناقلین باکتری‌ها ۲۸
۱-۲۸- افزایش مطالعات در زمینه مطالعه اثرات متقابل ۲۹
۱-۲۸-۱- اجزاء یک سیستم برهمکنش ۲۹
۱-۲۹- بررسی اثرات متقابل نماتود و باکتری روی گیاه سیب زمینی ۳۱
۱-۲۹-۱- نماتودها به عنوان (deterrent) بیماری‌های گیاهی ۳۱
۱-۲۹-۲- نماتودها به عنوان ایجاد کننده زخم‌های مکانیکی روی سیب زمینی ۳۲
۱-۲۹-۳- نماتودها به عنوان تغییردهندگان بافت سیب زمینی ۳۲
۱-۲۹-۴- نماتودها به عنوان ناقل روی گیاه سیب زمینی ۳۲

فصل دوم مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی عامل بیماری باکتریایی از غده‌ها ۳۴
۲-۲- نگهداری پکتوباکتریوم‌ها ۳۵
۲-۳- آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تفکیکی پکتوباکتریوم‌ها ۳۵
۲-۴- استخراج DNA از باکتری‌ها ۳۶
۲-۴-۱- استخراج DNA از باکتری‌ها به روش جوشانیدن ۳۶
۲-۵-شناسایی گونه و زیر گونه‌های پکتو باکتریوم بر اساس PCR ۳۶
۲-۶- تنظیم شرایط واکنش PCR ۳۷

۲-۷- الکتروفورز محصول PCR ۳۷
۲-۸- انجام برش آنزیمی RFLP ۳۹
۲-۹- الکتروفورز محصول PCR-RFLP ۳۹
۲-۱۰- بررسی آلودگی‌های نماتودی غده‌های سیب زمینی دارای علایم نماتودی ۳۹
۲-۱۱- بررسی احتمال آلودگی نماتودی در خاک های قبل از کاشت ۴۰
۲-۱۲- کشتن، تثبیت و انتقال نماتودها به گلیسیرین خالص ۴۱
۲-۱۲-۱- روش کند ۴۱
۲-۱۲-۲- روش تند ۴۱
۲-۱۳- تهیه اسلاید دایم ۴۲
۲-۱۴- اندازه گیری و رسم تصاویر ۴۳
۲-۱۵- بررسی غده‌های آلوده مزارع به نماتود، باکتری و توأم حین برداشت ۴۳
۲-۱۵-۱- جداسازی نماتود از غده سیب زمینی ۴۳
۲-۱۶- بررسی تکثیر نماتود *D. destructor* روی محیط کشت‌های قارچی ۴۴
۲-۱۷- استخراج DNA از تک نماتود ۴۵
۲-۱۸- انجام واکنش PCR-RAPD از DNA استخراجی از نماتودها ۴۵
۲-۱۹- تشخیص نماتود مولد پوسیدگی با استفاده از آغازگرهای rDNA1/rDNA2 ..... ۴۵
۲-۲۰- انجام واکنش PCR ۴۶
۲-۲۱- PCR-RFLP ۴۶
۲-۲۲- تهیه ژل آکریل آمید ۴۸
۲-۲۳- تعیین توالی نوکلئوتیدی ۴۹
۲-۲۴- انجام آزمایش‌های گلخانه ای جهت بررسی آلودگی نماتود در خاک های قبل از کاشت و تعیین اثرات متقابل نماتود و باکتری ۴۹
۲-۲۴-۱- شکستن خواب غده‌های سیب زمینی ۴۹
۲-۲۵- کاشت غده‌های سیب زمیتی در خاک‌های آورده شده از مزارع در گلخانه ۴۹
۲-۲۶- تعیین اثرات متقابل نماتود و باکتری ۵۰

فصل سوم: نتیجه گیری و بحث
۳-۱- شناسایی عامل باکتری با استفاده از محیط‌های کشت ۵۲
۳-۲- شناسایی پکتوباکتریوم‌ها بر اساس آزمون‌های بیو شیمیایی ۵۴
۳-۳- شناسایی پکتوباکتریوم‌ها بر اساس روش‌های مولکولی ۵۶
۳-۴- نتایج حاصل از بررسی نماتودها در خاک های قبل از کاشت ۵۷
۳-۵- روش‌های مورفولوژیکی جهت شناسایی گونه نماتود ۵۹

۳-۶- بررسی تکثیر نماتود *D. destructor* روی محیط‌های کشت قارچی ۶۲
۳-۷- شناسایی نماتود *D. destructor* دامنه اصفهان بر اساس روش‌های مولکولی ۶۴
۳-۸- مقایسه توالی *D.destructor* استخراجی با توالی های اروپایی (جمهوری چک) ۷۰
۳-۹- نتایج حاصل از کاشت سیب زمینی در خاک‌های قبل از کاشت ۷۳
۳-۱۰- نتایج حاصل از آزمایش گلخانه ای اثرات متقابل نماتود و باکتری روی سیب زمینی ۷۳
۳-۱۰-۱- محاسبه شدت بیماریزایی پوسیدگی غده های سیب زمینی ۷۴
فصل چهارم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادها
۴-۱- نتیجه گیری کلی ۷۸
۴-۲- پیشنهادها ۸۰
منابع ۸۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱ – شکاف‌های نامنظم سطح غده‌های در سیب زمینی مبتلا به بیماری پوسیدگی سیب زمینی..... ۵۳
شکل ۳-۲- حفره‌های سفید نماتودی در بافت زیر پوست سیب زمینی..... ۵۳
شکل ۳-۳- مشاهده لهیدگی باکتریایی در کنار حفره‌های نماتودی ۵۳
شکل ۳-۴- لهیدگی بافت داخلی سیب زمینی با حاشیه قهوه‌ای تیره ۵۳
شکل ۳-۵- لهیدگی بافت داخلی سیب زمینی با حاشیه سیاه ۵۳
شکل ۳-۶- تشکیل پرگنه جدایه‌های باکتریایی بدست آمده از غده‌های لهیده ۵۴
شکل ۳-۷- آزمون لهیدگی ورقه‌های سیب زمینی در کنار نمونه شاهد..... ۵۴
شکل۳-۸- ایجاد دو نوع الگوی باندی ایجاد شده توسط آغازگر G1/L1..... ۵۶
شکل ۳-۹- الگوی برش آنزیمی محصول PCR جدایه‌های پکتوباکتریوم منطقه دامنه تحت برش آنزیمی *Rsa*I ۵۷
شکل ۳-۱۰- قسمت‌های مختلف بدن نماتود *D. destructor* استخراج شده از غده سیب زمینی (روستای دره بید) ۶۰
شکل ۳-۱۱- اندازه گیری قسمت‌های مختلف بدن نماتود با استفاده از پیستوله ماری..... ۶۱
شکل ۳-۱۲- انجام واکنش PCR-RAPD با آغازگر OPA04 با DNA استخراج شده از تعدادی نماتود *D. destructor* از منطقه دامنه اصفهان ۶۴
شکل ۳-۱۳- تکثیر قطعه حدود ۱۰۰۰ bp DNA از نماتود *D. destructor* در واکنش PCR با جفت آغازگر عمومی rDNA1/rDNA2..... ۶۵
شکل ۳-۱۴- انجام PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برشی *Taq*I در نمونه‌های *D. destructor* منطقه دامنه ۶۶
شکل ۳-۱۵- مقایسه نماتود استخراجی با دیگر نماتودهای موجود در سایت NCBI..... ۶۸
شکل ۳-۱۶- قسمتی از کریپتوگرام (A) و توالی نوکلئوتیدی (B) مربوط به *D. destructor* جدا شده از غده مبتلا به پوسیدگی سیب زمینی در دامنه ۶۹
شکل ۳- ۱۷-درخت فیلوژنتیکی..... ۷۱
شکل ۳-۱۸- همردیف سازی توالی استخراجی نماتود *D. destructor* منطقه دامنه با توالی‌های جمهوری چک..... ۷۲
شکل ۳-۱۹- مشاهده عدم آلودگی غده‌های سیب زمینی به بیماری پوسیدگی غده سیب زمینی در خاک‌های قبل از کاشت مزارع..... ۷۶
شکل ۳-۲۰- علایم مشاهده شده بیماری پوسیدگی سیب زمینی بر روی سطح غده‌ها در آزمایش گلخانه‌ای ۷۶
شکل ۳-۲۱- مشاهده بیماری در داخل بافت ۷۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- شرایط PCR مربوط به جفت آغازگر G1/L1 ..... ۳۸

جدول۲-۲- برنامه PCR مربوط به جفت آغازگر G1/L1 ..... ۳۸

جدول ۲-۳- مواد و مقادیر لازم برای واکنش برش آنزیمی..... ۳۹

جدول۲-۴- خاک‌های قبل از کاشت تیرماه ۸۸..... ۴۰

جدول ۲-۵- خاک‌های قبل از کاشت اواخر اردیبهشت ماه ۸۹..... ۴۰

جدول ۲-۶- شاخص‌های مورد نیاز جهت تشخیص نماتود پوسیدگی..... ۴۴

جدول ۲-۷- شرایط PCR-RAPD ۴۶

جدول ۲-۸- برنامه PCR مربوط به PCR-RAPD ۴۶

جدول ۲-۹- شرایط PCR با استفاده از آغازگر rDNA1/rDNA2..... ۴۷

جدول ۲- ۱۰- برنامه PCR مربوط به آغازگر rDNA1/rDNA2 ..... ۴۷

جدول ۳-۱- جدایه‌های پکتوباکتریوم جداسازی شده از غده های سیب زمینی و مورد بررسی در این تحقیق..... ۵۷

جدول ۳-۲- نماتودهای شناسایی شده در خاک‌های قبل از کاشت تیرماه ۸۸..... ۵۸

جدول ۳-۳- نماتودهای شناسایی شده در خاک‌های قبل از کاشت اواخر اردیبهشت ماه ۸۹..... ۵۸

جدول ۳-۴- بررسی مزارع حین برداشت دامنه مهر و آبان ۸۸ و۸۹ و تعداد نماتود *D. destructor* در یک گرم خاک و غده این مزارع ۵۹

جدول۳-۵ - اندازه‌گیری خصوصیات مورفومتریک نماتود ماده جنس *D. destructor*..... ۶۳

جدول ۳-۶- اندازه‌گیری خصوصیات مورفومتریک نماتود نر جنس *D. destructor*..... ۶۳

جدول۳-۷- مقایسه میانگین اندازه‌گیری‌های نماتودهای نر و ماده منطقه دامنه با کلیدهای شناسایی معتبر..... ۶۴

جدول۳-۸- مقایسه میزان شباهت قطعه توالی‌یابی شده با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI)..... ۶۷

جدول۳-۹- مقایسه تشابه و فاصله همولوژی نمونه استخراجی با ۲۲ نمونه از توالی‌های موجود در NCBI..... ۷۰

جدول ۳-۱۰- محاسبه جمعیت فعال نماتودهای استخراجی جهت تلقیح به گیاه..... ۷۵

جدول ۳-۱۱- نتایج تجزیه واریانس ۷۵

جدول۳-۱۲- نتایج حاصل از مقایسه میانگین ۷۵

چکیده

بیماری پوسیدگی غده یکی از مهم‌ترین بیماری‌های سیب زمینی در جهان می‌باشد که در سالهای اخیر این بیماری در مزارع سیب زمینی منطقه دامنه استان اصفهان گسترش یافته و خسارت قابل توجهی وارد می‌کند. غده‌های مبتلا شکافهای سطحی داشته و در آنها پوسیدگی تیره رنگ همراه با حفرات حاوی نماتود مشاهده می‌شود. در بعضی از این غده‌ها علایم لهیدگی بافت، مشابه پوسیدگی نرم پکتو باکتریومی، با حاشیه قهوه‌ای رنگی وجود داشت. جهت تعیین عوامل بیمارگر دخیل در بروز این بیماری، در سالهای ۸۹-۱۳۸۸ نمونه‌های زیادی از غده‌های پوسیده از مزارع سیب زمینی منطقه دامنه جمع‌آوری شد تا مورد بررسی قرار گیرند. در محل حفرات زیر پوست تمام غده‌ها جمعیتی از یک نوع نماتود پارازیت حضور داشت که با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مورفومتریکی *Ditylenchus destructor* تشخیص داده شد. با استفاده از جفت آغازگر عمومی rDNA1/rDNA2 در آزمون PCR، قطعه‌ای DNA به طول ۹۵۰bp از ناحیه ITS نمونه‌های متفاوت جمع‌آوری شده این نماتود تکثیر شد. بررسی الگوی برش قطعه DNA مزبور با آنزیم *Taq* I مشخص نمود که DNA درتمامی نماتودهای جمع‌آوری شده از مزارع مختلف از یکنواختی ژنتیکی برخوردار است. با توالی‌یابی این قطعه از یکی از نمونه‌ها و همردیف‌سازی آن با توالی‌های ثبت شده از *D. destructor* در بانک ژن جهانی (NCBI) مشخص شد که توالی ITS نماتود عامل بیماری پوسیدگی غده‌های سیب زمینی در دامنه اصفهان با توالی‌های گزارش شده از این نماتود از کشورهای مختلف شباهت بسیار زیادی (۹۹-۹۷٪) دارد. از ۱۵ غده پوسیده دارای علایم لهیدگی همزمان، یک نوع باکتری گرم منفی دارای کلنی سبز متالیک در روی محیط کشت EMB بدست آمد که بر اساس آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فعالیت پکتولیتیکی متعلق به جنس *Pectobacterium* تشخیص داده شد. با توجه به توانایی رشد این باکتری در ۳۶ درجه سلسیوس، احیاء ساکارز، تولید ایندول و هضم نشاسته، استفاده از قندهای اینوزیتول، رامنوز و آرابیتول و عدم توانایی آن در تولید گاز از گلوکز، واکنش فسفاتاز منفی، عدم حساسیت به اریترومایسین و عدم هضم قندهای زایلوز، تری‌هالوز، آلفا متیل D گلوکوزید، پالاتینوز و مالونات در مقایسه با جدایه‌های استاندارد، این باکتری به عنوان *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* شناسایی شد. تمامی جدایه‌های این باکتری در آزمون PCR با جفت آغازگر G1/L1 الگوی دو باندی مشابه با *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* و متفاوت از *P. carotovoum* subsp. *atrosepticum* و *Dickeya chrysanthemi* تکثیر نمودند که تحت تأثیر آنزیم برشی *Rsa*I به قطعاتی حدود bp ۳۵۵، ۲۸۰bp و bp ۱۸۰ تقسیم شدند. نتایج به دست آمده از آزمونهای فیزیولوژیکی، بیماریزایی، بیوشیمیایی و مولکولی یکسان بودن جدایه‌های باکتریایی بدست آمده از غده‌های سیب زمینی منطقه دامنه و تعلق آنها به *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* را مورد تأیید قرار داد. برای تعیین نقش هر کدام از عوامل بیمارگر *D. destructor* و *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* در بروز عارضه پوسیدگی غده سیب زمینی، آزمایش‌های تلقیح باکتری و نماتود به تنهایی و توأم در بوته‌های سیب زمینی صورت گرفت و معلوم گردید که نماتود *D. destructor* به تنهایی عامل اصلی ایجاد بیماری پوسیدگی غده‌های سیب زمینی در دامنه می‌باشد و باکتری با نفوذ از طریق زخمهای نماتودی باعث لهیدگی بعدی غده‌ها می‌شود. با توجه به خسارت شدید نماتود *D. destructor* در غده‌های سیب زمینی منطقه دامنه، تعیین میزبانهای زراعی و علف‌های هرز آن در منطقه و تأثیر آیش و تناوب با گیاهان غیر میزبان این نماتود جهت کاهش خسارت بیماری، برای برنامه‌ریزی در مدیریت کنترل این نماتود پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: پوسیدگی غده سیب زمینی، *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*، *Ditylenchus destructor*

فصل اول
مقدمه و بررسی منابع

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) متعلق به خانواده *Solanaceae*، گیاهی دو لپه، یکساله و علفی است که به علت تکثیر از طریق غده، ظرفیت بالقوه چند ساله بودن را دارد. گل در سیب زمینی پنج قسمتی به رنگ‌های مختلف، با خامه و کلاله ساده و تخمدان دو خانه‌ای است. برگها مرکب و برگچه‌ها روی رگبرگ مرکزی به صورت متقابل قرار گرفته‌اند [۱۷]. سیب زمینی محصول آب و هوای خنک می‌باشد و بهترین رشد را در دمای ۲۱ درجه سلسیوس دارد. دمای بهینه برای رشد غده‌ها ۱۸-۱۵ درجه سلسیوس می‌باشد. در اوایل رشد، روزهای بلند، دمای خنک، نیتروژن زیاد و رطوبت یکنواخت خاک برای افزایش تولید غده مورد نیاز است [۱۵، ۶۳].

سیب زمینی محصول بومی آمریکای جنوبی می‌باشد. دانشمندان آمریکایی دریافتند که سر منشأ انواع سیب زمینی‌های امروزی را می توان به یک گیاه مشترک که بیش از هفت هزار سال قبل در پرو کشت شده است، نسبت داد. سیب زمینی در حدود سال ۱۵۷۰ میلادی توسط فاتحان اسپانیایی از آمریکای جنوبی به اسپانیا منتقل شد و سپس به ایتالیا و سایر نقاط اروپای مرکزی انتقال یافت و به تدریج تبدیل به یک محصول غذایی اصلی در اروپا مخصوصاً آلمان، روسیه و ایرلند گردید و کشت آن در سراسر اروپا رواج یافت. سیب‌زمینی مجدداً توسط مستعمره نشین‌های بریتانیایی به آمریکای شمالی وارد شد. سیب زمینی نخستین بار در ایران توسط سرجان ملکم، در اواسط پادشاهی فتحعلی‌شاه قاجار، به ایران آورده شد که در ابتدا به آن

آلوی ملکم میگفتند. این سیب زمینی‌ها ابتدا در روستای پشند تهران کاشته شدند، سپس به فریدن اصفهان و پس از آن به سایر نقاط کشور برده و کشت شدند [۷، ۱۱].

غم انگیزترین رویداد تاریخی که توسط یک بیماری گیاهی حادث شد، قحطی ایرلند بر اثر بیماری بادزدگی سیب زمینی در سال ۱۸۴۵ بود. این بیماری باعث شد در اواسط قرن نوردهم تمام محصول سیب-زمینی این کشور از بین رود و حدود یک میلیون نفر در ایرلند جان خود را از دست داده و یک میلیون و نیم به ایالات متحده آمریکا و سایر کشورها مهاجرت نمایند [۱۱].

سیب زمینی مهمترین گیاه دو لپه در تغذیه انسان می‌باشد. این محصول از نظر اهمیت غذایی در جهان مقام پنجم را بعد از گندم، برنج، ذرت و جو به خود اختصاص داده است [۱۷]. از نظر آمار جهانی آمریکای شمالی با تولید بیش از ۴۰ تن در هکتار پیشرو در تولید سیب زمینی می‌باشد و تولید کشورهای آمریکای لاتین، اروپا، آسیا، اقیانوسیه و آفریقا به ترتیب ۴۱/۲، ۱۶/۳، ۱۷/۴، ۱۵/۷ و ۱۰/۸ تن در هکتار می‌باشد [۳۸].

استان همدان با اختصاص ۲۰/۸۳ درصد از تولید سیب زمینی کشور در مقام نخست قرار دارد. استان-های اردبیل، اصفهان، کردستان و آذربایجان شرقی به ترتیب با ۱۲/۰۳،۱۶/۰۵، ۶/۹۸ و ۵/۳۹ درصد مقام‌های دوم تا پنجم را به خود اختصاص داده‌اند. پنج استان مزبور جمعاً ۶۱/۲۸ درصد از اراضی کل کشور را دارا هستند و ۳۸/۷۲ درصد باقیمانده در سایر استان‌ها کشت می‌شوند [۸]. مناطق عمده کشت سیب زمینی در استان اصفهان به ترتیب میزان سطح زیر کشت، شامل شهرستان‌های فریدن، فریدون شهر، چادگان، سمیرم، تیران و کرون، گلپایگان و خوانسار می‌باشند [۶].

میزان رشد و باروری گیاهان به عوامل محیطی چون آب و خاک، نور و حرارت، و در نهایت ایمنی آن‌ها در مقابل عوامل نامساعد بستگی دارد. هر عاملی که سلامت گیاهان را به مخاطره اندازد، در میزان رشد و باروری آن‌ها تأثیر منفی گذاشته و از ارزش آن‌ها می‌کاهد. بنابراین مطالعه بیماری‌های گیاهی بعلت خساراتی که در نتیجه بیماری به گیاهان و فرآورده‌های آن‌ها وارد ساخته و عامل محدودکننده کاشت یک گیاه در یک منطقه یا یک کشور می‌شوند، اهمیت زیادی دارد [۳۵]. بروز بیماری‌های مختلف در سیب-زمینی نیز به لحاظ اقتصادی مهم می‌باشد که تلاش برای کنترل این بیماری‌ها در تولید مناسب ضروری است.

۱-۱- بیماری های مهم سیب زمینی

سیب زمینی بوسیله عوامل بیماریزای زیادی مورد حمله قرار می‌گیرد. ریشه، ساقه، برگ و غده‌های سیب-زمینی به بیماری‌های زیادی مبتلا می‌شوند که ناشی از عوامل ژنتیکی، محیطی، عدم تعادل یا کمبود مواد غذایی و عوامل بیمارگر از قبیل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، نماتودها، ویروئیدها و فیتو پلاسماها می‌باشد. ازبیماری-های مربوط به عوامل باکتریایی می‌توان به ساق سیاه (*Pectobacterium atrosepticum*)[۱] و پوسیدگی نرم

۱- Blackleg

سیب زمینی (*P. carotovorum* pv. *carotovorum*)[۱]، پوسیدگی قهوه‌ای (*Ralstonia solanacearum*)[۲]، پوسیدگی حلقوی (*Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*)[۳]، چشم صورتی (*Pseudomonas fluorescens*)[۴] و جرب معمولی (*Stereptomyses scabis*)[۵] اشاره نمود. از ویروس‌ها، ویروس برگ-پیچیدگی سیب زمینی (*Potato leaf roll virus*)، ویروس Y سیب زمینی (*Potato virus Y*)، ویروس X سیب زمینی (*Potato virus X*)، ویروس A سیب زمینی (*Potato virus A*)، ویروس S سیب زمینی (*Potato virus S*)، ویروس جارویی سیب زمینی (*Potato mop top virus*)، ویروس پنهان آندی سیب زمینی (*Andian potato latent virus*) و ویروس کوتولگی زرد سیب زمینی (*Potato yellow dwarf virus*) را می‌توان نام برد. از بیماری‌های قارچی، جرب پودری (*Spongospora subterranea*)[۶]، شانکر جزیره‌ای سیب‌زمینی (*Rizoctonia solani*)[۷]، پوسیدگی صورتی (*Phytophtora erythoseptica*)[۸]، بادزدگی سیب-زمینی (*P. infestans*)[۹]، بیماری لکه موجی سیب زمینی (*Alternaria solani*)[۱۰]، پژمردگی فوزاریومی سیب-زمینی (*Fusarium solani*)[۱۱] و بیماری ورتیسیلیومی سیب‌زمینی (*Verticilium albu-atrum, V. dahliae*)[۱۲] از اهمیت زیادی برخوردارند. نماتودهای مولد سیست سیب‌زمینی (*Globodere rostochiensis, G. pallida*)[۱۳]، پوسیدگی غده سیب زمینی (*Ditylenchus destructor*)[۱۴] مولد زخم سیب زمینی (*Paratylenchus* spp.)[۱۵] و نماتود مولد گره ریشه سیب زمینی (*Meloidogyne* spp.)[۱۶] در سیب زمینی ایجاد خسارت می‌کنند. ویروئید دوکی شدن غده سیب زمینی (*Potato spindle tuber viroid*) و بیماری‌های فیتوپلاسمایی زردی مینا در سیب‌زمینی (*Candidatus* phytoplasma *asteries*) و جارویی شدن سیب زمینی (Potato witches` broom) نیز از جمله بیماری‌های مهم سیب زمینی محسوب می‌شوند [۱۱، ۱۷].

۱- Soft rot
۲- Brown rot
۳- Ring rot
۴- Pink eye
۵- Common scab
۶- Powdery scab
۷- Potato shanker
۸- Pink eye
۹- Late blight
۱۰- Early blight
۱۱- Fusarium wilt
۱۲- Potato early dying
۱۳- Potato cyst nematode
۱۴- Potato rot nematode or potato tuber nematode
۱۵- Lesion nematode
۱۶- Root-knot nematode

۱-۱-۱- بیماری‌های باکتریایی

باکتری‌ها موجودات کوچک و ساده‌ای هستند که از یک سلول پروکاریوت تشکیل یافته‌اند. حدود ۸۰ گونه باکتری یافت شده‌اند که روی گیاهان ایجاد بیماری می‌کنند، بسیاری از این گونه‌ها خود از تعدادی پاتووار (Pathovars) یا نژادهای اختصاصی آلوده کننده یک میزبان مشخص، تشکیل شده‌اند. تقریباً تمام باکتری‌های بیماریزای گیاهی میله‌ای شکل هستند و بیشتر این باکتری‌ها تاژک‌هایی دارند که بوسیله آن در محیط مایع حرکت می‌کنند. بیماری‌های باکتریایی گیاهان در هر نقطه‌ای که به قدر کافی مرطوب باشد، رخ می‌دهند. این باکتری‌ها با ایجاد لکه برگی‌ها و سوختگی برگ، پوسیدگی‌های نرم میوه، ریشه و اندام‌های ذخیره‌ای، پژمردگی‌ها، رشد غیر عادی، جرب (scab)، شانکر و غیره باعث ایجاد بیماری در گیاهان می‌شوند [۳۵]. از مهم‌ترین عوامل باکتریایی بیماریزا روی سیب زمینی می‌توان به عامل ساق سیاه سیب زمینی (*P. atrosepticum*) و پوسیدگی نرم سیب زمینی (*P. carotovorum* pv. *carotovorum*)، جرب معمولی (*Stereptomyses scabis*)، پوسیدگی حلقوی (*C. michiganense* subsp. *sepedonicum*) و پوسیدگی قهوه‌ای (*R. solanacearum*) اشاره نمود [۱۱].

۱-۱-۲- بیماری‌های نماتودی

نماتودها موجودات کرمی شکل و کوچک با بدنی کم و بیش شفاف هستند. تمامی نماتودهای انگل گیاهی دارای استایلت یا سوزن دهانی توخالی هستند که برای نفوذ به داخل سلول‌های گیاهی از آن استفاده می‌کنند. تقریباً تمامی نماتودهای بیماریزای گیاهی بخشی از زندگی خود را در خاک سپری می‌کنند و بطور سطحی روی ریشه‌ها یا ساقه‌های زیرزمینی تغذیه می‌کنند. تعدادی از نماتودها به اندام‌های هوایی گیاهان هم حمله می‌نمایند. نماتودها روی ریشه باعث ایجاد غده، زخم، انشعاب و بالاخره پوسیدگی می‌شوند که این علایم ریشه باعث ایجاد علایم غیر اختصاصی در بخش‌های بالای زمینی گیاه شده و بیماری ظاهر می‌شود [۳۵]. مهم‌ترین پاتوژن‌های بیماریزا روی سیب زمینی نماتود طلایی سیب زمینی (*G. rostochiensis,G. pallid*) و نماتود مولد پوسیدگی سیب زمینی (*D. destructor*) می‌باشند، نماتودهای *Meloidogyne* spp.، *Trichodorus* spp.، *Pratylenchus* spp. و به میزان کمتر نماتودهای *Longidorus* spp.، *Hexatylenchus* spp. و *Neotylenchus* spp. نیز در روی سیب زمینی بیماریزا هستند [۳۸].

۱-۱-۳- رابطه متقابل نماتود - باکتری

بیمارگرهایی که به گیاهان حمله می‌کنند در طول تکامل خود این قابلیت را به دست آورده‌اند تا از مواد ساخته شده بوسیله گیاهان استفاده کرده و زندگی کنند. بیمارگرهای گیاهی به طور کلی موجودات بسیار ریزی هستند که همه به استثنای نماتودها فاقد سیستم ماهیچه‌ای بوده و قادر به ایجاد نیروهای ارادی در سطح گیاه میزبان نمی‌باشند. چنین به نظر می‌رسد که باکتری‌ها و ویروس‌ها به طور کلی قادر به اعمال هیچ گونه

نیروی ارادی به سطح سلول میزبان نمی‌باشند. از طرف دیگر بعضی از قارچ‌ها، گیاهان عالی پارازیتی و نماتودها قادرند به سطح گیاهی که می‌خواهند وارد شوند، فشارآورند که میزان نیروی وارد بر سطح گیاه بر حسب مقدار مواد مترشحه آنزیمی بیمارگر و درجه نرمی سطح گیاه متفاوت خواهد بود. با وجود اینکه نماتودها به تنهایی قادرند در گیاهان ایجاد بیماری کنند، بیشتر آن‌ها با زندگی و فعالیت خود در خاک، مداماً با قارچ‌ها و باکتری‌هایی که خود نیز بیماریزا هستند احاطه می‌شوند. در بسیاری ازموارد رابطه‌ای بین نماتودها و برخی از دیگر بیمارگرها بوجود می‌آید که نماتودها درآن صورت بخشی از مجموعه پیچیده عوامل تولید بیماری می‌شوند و در مجموع ظرفیت بیماریزایی بسیار بیشتری از مجموع ظرفیت بیماریزایی آن‌ها به تنهایی، پیدا می‌کنند [۳۵].

۱-۲- باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه در سیب زمینی

باکتری‌های عامل بیماری ساق سیاه با ایجاد آلودگی ساقه‌های سیب زمینی ممکن است روی غده‌های سیب زمینی پوسیدگی نرم ایجاد کنند [۶۶] که گونه‌هایی از جنس *Pectobacterium* spp. در این اتفاق دخالت دارند و باعث ضررهای وسیع اقتصادی روی این گیاه می‌شوند. با مطالعات تاکسونومیکی گسترده، جنس *Pectobacterium* به چندین گونه و زیرگونه، بر اساس اختلاف در خصوصیات مولکولی، بیوشیمیایی و دامنه میزبانی تقسیم شده است. از جنس *Pectobacterium* گونه *P. atrosepticum* عامل ساق سیاه سیب-زمینی می‌باشد و *P. carotovorum* pv. *carotovorum* نیز پوسیدگی نرم در سیب زمینی ایجاد می‌کند [۳۹]. در کنار این عامل بیماری، باکتری دیگری بنام *Dickeya chrysantemi* بیماری مشابهی روی سیب-زمینی مخصوصاً در نواحی خشک بوجود می‌آورد که قبلاً به جنس *Pectobacterium* sp. تعلق داشت [۹۲].

۱-۳- تاریخچه بیماری پوسیدی نرم سیب زمینی

پوسیدگی نرم باکتریایی اولین بار روی گیاه هویج به نام پوسیدگی نرم هویج در سال ۱۹۰۱ از آمریکا گزارش شد. در آن موقع چنین برداشت می‌شد که عامل بیماری توسط یک باسیل به نام *Bacillus carotovorus* با تاژک‌های محیطی از طریق زخم یا شکاف‌های سطحی وارد میزبان شده و بیماری ایجاد می‌کند [۵۸]. در سال ۱۹۰۲ برای اولین بار این باکتری از روی گیاه سیب زمینی مبتلا به ساق سیاه توسط Van Hall از هلند و Apple از آلمان به طور مستقل گزارش شد که عامل بیماری را به ترتیب *Bacillus atrosepticus* و *Bacillus phytophthorus* نامگذاری نمودند. در سال ۱۹۰۷ نیز Harrision باکتری *B. solaniasprus* را که بیماری مشابه ساق سیاه ایجاد کرده بود، به عنوان عامل این بیماری معرفی نمود [۵۰، ۵۸]. چندین نسل بعد Smith در سال ۱۹۱۸ پیشنهاد کرد تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین *B. phytophtorus* و *B. carotovorus* وجود ندارد [۵۰]. تا این که Winslow عوامل پوسیدگی نرم را در جنس *Erwinia* قرار داد

[۶۵]. در کتاب Bergey به سال ۱۹۲۳، نشان داده شده که *E. carotovora* با *E. atroseptica* از یکدیگر مجزا هستند ولی احتمالاً *E. solaniasprus* با *E. atroseptica* مترادف می‌باشند [۵۰]. تا اینکه در نهایت اروینیاهای مولد پوسیدگی نرم در سال ۱۹۹۸ در جنس دیگری بنام *Pectobacterium* قرار گرفتند [۶۲]. از بین گونه‌های مولد پوسیدگی نرم *P. chrysanthemi* به جنس *Dickeya chrysanthemi* منتقل شد [۹۲].

۱-۴- موقعیت تاکسونومی باکتری‌های مولد ساق سیاه و پوسیدگی نرم جنس *Pectobacterium*

گونه و زیرگونه‌های عوامل بیماری ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی متعلق به سلسله *Prokaryotae* راسته *Enterobactriales*، خانواده *Enterobacteriaceae* و جنس *Pectobacterium* می‌باشند [۳۵]. مهم‌ترین پکتوباکتریوم‌های مولد ساق سیاه و پوسیدگی نرم روی سیب زمینی که باعث خسارت عمده در بسیاری از مناطق دنیا می‌شوند، عبارتند از:

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (*Pcc*) (Jones) Hauben *et al*
Pectobacterium atrosepticum (*pa*) (Van Hall) Garden
Dickeya chrysanthemi (*Dch*) (Burkholder) Brenner *et al*

[۶۶].

دیگرگونه‌هایی که سیب زمینی را آلوده می‌کنند: *P. wasabiae* و *P. brasiliensis* هستند که روی دیگر گیاهان نیز گزارش شده‌اند [۳۹].

۱-۵- علایم ساق سیاه و پوسیدگی‌های نرم باکتریایی روی سیب زمینی

۱-۵-۱- علایم ساق سیاه

علایم ساق سیاه سیب زمینی ممکن است در هر مرحله از رشد گیاه اتفاق بیفتند. ساقه گیاهان آلوده، پوسیدگی جوهر مانندی را ایجاد می‌کنند که معمولاً از قطعات بذر شروع می‌شوند و به صورت نواحی آب-سوخته کوچک چند میلیمتری در قاعده ساقه یا در تمام طول آن توسعه می‌یابند. ساقه در قسمت بالای سیاه-شدگی دچار فساد شده، بافت‌های آوندی در داخل ساقه اغلب بی رنگ می‌شوند و مغز ساقه می‌پوسد. گیاهان آلوده معمولاً کوتاه می‌مانند. کلروز در شاخ و برگ ظاهر گردیده و در حاشیه برگچه‌ها به طرف بالا پیچیده می‌شوند و ممکن است به تدریج برگچه‌ها و نهایتاً گیاه پژمرده و خشک شود. ساقه، برگ‌ها و برگچه‌ها ممکن است از طریق زخم‌هایی مثل شکاف برگچه‌ها، تگرگ و طوفان یا خسارت باد آلوده شوند. آلودگی ممکن است به سمت بالا به برگچه‌ها یا به سمت پایین ساقه پیشروی کرده و بنابراین آلودگی را در قطعات بذری آلوده نشان ندهند. در هوای گرم و مرطوب، آلودگی نرم و لزج می‌شود و ممکن است به گیاهان بیشتری گسترش یابد. در هوای خشک، بافت آلوده شده خشک شده و ترک بر میدارد و اغلب محدود به قسمت‌های زیر زمینی ساقه می‌شود. غده‌های حاصل از گیاه آلوده به ساق سیاه نیز می‌توانند از طریق آوندهای موجود در ساقه‌های رونده زیر زمینی آلوده شده و باعث پوسیدگی نرم تمام غده شوند. غده-

های آلوده که دارای پوسیدگی نرم در قسمت میانی غده هستند، به غده‌های دیگر از طریق ساقه زیر زمینی منتقل می‌شوند [۶۶].

۱-۵-۲- علایم پوسیدگی نرم سیب زمینی

غده‌های بذری سیب زمینی پس از کاشت، یا غده‌های تولید شده قبل از برداشت و یا غده‌های انباری ممکن است به پوسیدگی نرم آلوده شوند. آلودگی به طور عمده در مزرعه از طریق عدسک‌ها، زخم‌ها و انتهای ساقه‌های رونده زیرزمینی گیاه مادری اتفاق می‌افتد. علایمی که مربوط به عدسک‌ها می‌شوند، مناطقی گرد با کمی فرورفتگی آبکی متمایل به قهوه‌ای هستند که تقریباً ۰/۳ - ۰/۶ سانتیمتر قطر دارند. اگر آلودگی در هوای خشک اتفاق افتد، بافت آلوده ممکن است تو خالی، سخت و خشک شود. گاهی اوقات ممکن است به دلایلی چون خشک شدن منطقه آلوده و پر شدن منطقه توخالی با توده سخت و سیاه و مرده بافت گیاه از پیشروی بیماری جلوگیری شود. خسارات ایجاد شده بوسیله باکتری ممکن است در شکل فرورفتگی نامنظم باشند و معمولاً قهوه‌ای تیره هستند [۶۶]. در انبارها معمولاً زمانی که غده‌ها آسیب مکانیکی دیده باشند، یا در حضور دیگر بیماری‌ها، یا زمانی که از قارچ‌کش‌ها به طور وسیع استفاده شود و غده‌ها خیس بمانند و یا ضایعات آب در انبارها زمینه را برای انتقال از یک غده به غده دیگر فراهم آورد، آلودگی بیشتر می‌شود [۳۷].

۱-۶- دامنه میزبانی و پراکنش باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم

پکتوباکتریوم‌های عامل پوسیدگی نرم علاوه بر آلودگی غده‌های سیب زمینی روی تعدادی از میوه‌های نرم، سبزیجات و گیاهان زینتی از جمله: هویج، شلغم، چغندرقند، کلم، کاهو، کرفس، گوجه فرنگی، سیب-زمینی شیرین، برنج، ذرت، پیاز، زنبق، سنبل، میخک، بنفشه آفریقایی،آناناس، موز، فیلودندرون، دیفن باخیا، ارکیده، سیکلامن، بگونیا و کوکب بیماریزا می‌باشند. این بیماری در تمام نقاط دنیا وجود داشته و باعث ایجاد خسارت‌های بسیار زیادی در مزرعه، حمل و نقل و خصوصاً در انبارها شده و از نظر ایجاد خسارت از دیگر باکتری‌ها گسترده‌تر هستند [۴، ۳۵]. ساق سیاه به عنوان یک بیماری خطرناک غده‌ها، قطعات بذری و بوته‌های سیب زمینی در کشورهای آفریقا، آسیا، استرالیا، اروپا، امریکا شایع است و در فصولی که رطوبت خاک زیاد است، گسترش بیشتری دارد [۹۶].

۱-۷- نحوه ورود باکتری به میزبان

باکتری‌های عامل بیماری ساق سیاه از طریق ساقه‌های زیرزمینی رونده و منافذ طبیعی مانند عدسک‌ها و زخم‌های ایجاد شده توسط حشرات، نماتودها یا عملیات مکانیکی وارد میزبان می‌شوند و با ترشح آنزیم‌های