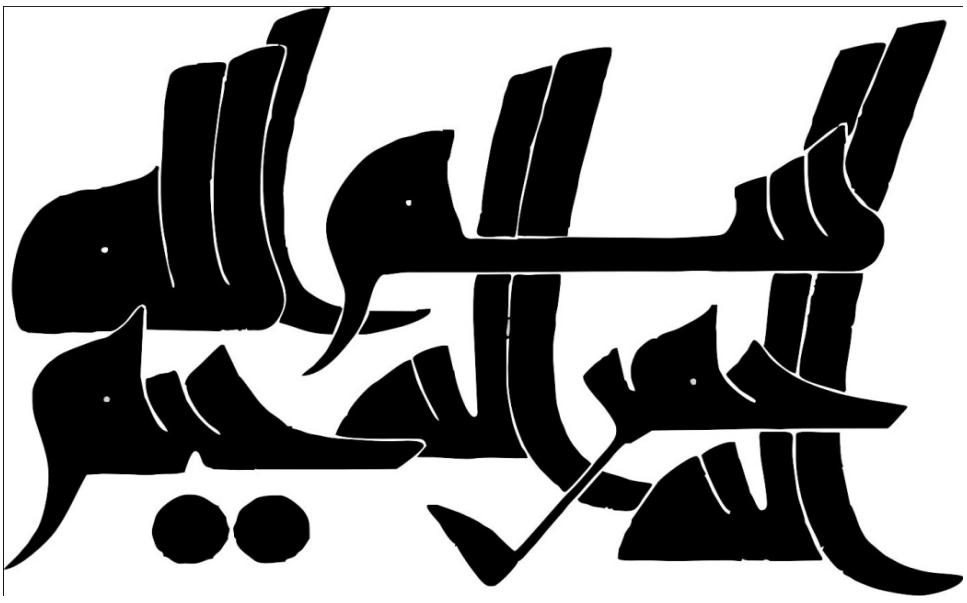

دانشکده تولید گیاهی
گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته
بیماری شناسی گیاهی

بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی گونه‌های *Pectobacterium* مولد ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان گلستان

پژوهش و نگارش:
معصومه ممشلی

اساتید راهنما:
دکتر سعید نصراله‌نژاد
دکتر حشمت‌اله رحیمیان

استاد مشاور:
مهندس میثم تقی‌نسب

مهر ۱۳۹۱

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **معصومه ممشلی** دانشجوی رشته **بیماری شناسی گیاهی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به بی بدیل ترین گنجینه های هستی

پدرم

به پاس زلال باطنش، بلندای نگاهش، که هر چه دارم همه از سخاوت اوست

مادرم

الهه مهرم، مظهر عشقم، او که دعاهایش بزرگترین سرمایه ام در زندگی است

و همسرم

بزرگترین افتخار زیستنم، او که تمام موفقیت هایم را مدیون او، هستم

تقدیر و تشکر

سپاس بی‌کران یگانه خالقم که مرا به رفیع‌ترین روشنایی‌ها هدایت کرد و راهم را به نور همیشه فروزان دانش، روشن ساخت. پس از در بندگی خاضعانه ستایشش می‌کنم و در ادامه این راه، معرفت نفس خویش را از او طلب می نمایم.

سپاس ویژه خود را تقدیم می‌کنم به خانواده ارجمندم به ویژه پدر و مادرم که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند، و همسر مهربانی که گرفتاریهای تحصیلی‌ام را صبورانه تحمل نمود و همیشه همراه و پشتیبانم بود. از خداوند مهربان سلامتی و سربلندی شان را طلب می‌کنم.

در مسیری که برگزیدم همسفرانی را همبرم بودند که حضورشان همچون ستارگانی پر نور، فروزنده راهم بود و از این رو بر خود واجب می دانم مراتب بی پایان سپاس و تقدیرم را نثارشان کنم. از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر سعید نصرالله نژاد که از رهنمودهای خردمندانه‌شان در طول تحصیل بهره برده و در مراحل انجام و تدوین پایان نامه نظارت خاصی مبذول داشته‌اند، کمال تشکر و امتنان را دارم. بیش از همه استاد ارجمندم جناب آقای دکتر حشمت اله رحیمیان که هدایت ها و رهنمودهای ارزنده‌شان چراغی شد فرا رویم که تا پایان راه روشنگر لحظه‌هایم خواهد بود و اگر نبود این هدایت ها و رهنمودها، بی شک طی این راه، بس مشکل و چه بسا ناممکن می گردید. صبر، سعه صدر و نیک اندیشی ایشان درس هایی است که هرگز از یاد نخواهم برد. از استاد مشاور گرانقدر جناب آقای مهندس میثم تقی نسب که در نهایت لطف و سعه صدر در تمام مراحل اجرای پایان نامه اینجانب را ارشاد نموده‌اند، کمال تشکر را دارم.

از داوران گرامی جناب آقای دکتر رهنما و جناب آقای دکتر یزدانیان و نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر قربانی که مطالعه این پایان نامه را قبل از ارائه تقبل نمودند و بار، رهنمودهای ارزشمندشان مرا در ارائه بهتر مطالب یاری کردند سپاسگزارم.

همچنین مراتب تشکر و قدردانی خود را از جناب آقای مهندس محمدرضا زاهدی کارشناس محترم گروه گیاهپزشکی که با ارائه خالصانه تجربیات خویش، در این مسیر مرا تنها نگذاشته‌اند ابراز می نمایم. از همکلاسی‌های خوبم و دوستان عزیزم خصوصا سرکار خانم حمیده احسنی که در همه مراحل انجام این تحقیق همراه و همدلم بودند، و کلیه کسانی که در این تحقیق یاری‌ام نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

معصومه منشی

مهرماه ۱۳۹۱

چکیده

سیب‌زمینی یک محصول مهم جهانی است و در ایران نیز در دهه گذشته وسعت کشت آن افزایش یافته است. پکتوباکتریوم‌ها یا اروینیاهای عامل پوسیدگی نرم گروه مهمی از باکتری‌های بیماریزای گیاهی هستند که شدیداً سبب خسارت و محدود نمودن تولید این محصول می‌شوند. شناخت دقیق جدایه‌ها و گونه‌های بیماریزای سیب‌زمینی در هر منطقه در مدیریت کنترل بیماری امری مهم است. بدین منظور طی سال زراعی ۱۳۹۱-۱۳۹۰ از مزارع سیب‌زمینی واقع در نواحی اصلی تولید استان گلستان شامل شهرهای جلین، علی‌آباد، سرخنکلاته، گالیکش، گنبد و آزادشهر بازدید صورت گرفت و بافت‌های دارای علایم پوسیدگی نرم و ساق سیاه جمع‌آوری شدند. سوسپانسیون‌های بافت‌های آلوده در آب مقطر استریل تهیه و سپس بوسیله لوپ روی محیط EMB مخطط گردیدند. کلنی‌های نمایانگر سایه سبز متالیک جداسازی شدند و به منظور خالص سازی مجدداً روی پلیت‌های حاوی EMB کشت گردیدند. جدایه‌های بیمارگر بر اساس توانایی ایجاد پوسیدگی در قطعات سیب‌زمینی، انتخاب شدند. براساس نتایج آزمون‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک، باکتری عامل ایجاد کننده ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم احتمالاً زیرگونه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* می‌باشد. تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با روش‌های rep-PCR و IS50-PCR ارزیابی گردید. سطح تشابه اثر انگشت ژنتیکی جدایه‌ها پس از الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، تعیین شد. ماتریکس تشابه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد ایجاد شد و دندروگرام با استفاده از روش UPGMA ترسیم گردید. جدایه‌ها، ۷ گروه را در سطح تشابه ٦٧ درصد در BOX-PCR، ٦ گروه را در سطح تشابه ٤٨ درصد در ERIC1-PCR، ۷ گروه را در سطح تشابه ٤٤ درصد با ERIC2-PCR و ۷ شاخه را در سطح تشابه ٦٣ درصد در IS50-PCR تشکیل دادند. نتایج فوق نشانگر وجود تنوع ژنتیکی قابل توجهی میان جمعیت‌های *Pcc* روی سیب‌زمینی در استان گلستان می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ، تنوع، پوسیدگی باکتریایی، rep-PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- اهمیت غذایی و صنعتی سیب‌زمینی ۲

۱-۲- گیاه‌شناسی سیب‌زمینی ۲

۱-۳- تاریخچه و سطح زیر کشت سیب‌زمینی ٤

۱-٤- بیماری‌های مهم سیب‌زمینی ٥

۱-٤-۱- ساق سیاه و پوسیدگی نرم ٦

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- تاریخچه شناسایی و طبقه‌بندی عوامل ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی ۱۰

۲-۱-۱- رده‌بندی جنس *Pectobacterium* ۱۳

۲-۱-۲- رده‌بندی جنس *Dickeya* ۱٤

۲-۲- روش‌های شناسایی *Pectobacterium* و *Dickeya* ۱۷

۲-۲-۱- آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ۱۷

۲-۲-۱-۱- توصیف جنس *Dickeya* ۱۸

۲-۲-۱-۲- توصیف گونه *chrysanthem Dickeya* ۱۹

۲-۲-۱-۳- توصیف *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901) Hauben *et al.* 1999 ..... ۲۰

۲-۲-۱-٤- توصیف *Pectobacterium atrosepticum* ۲۰

۲-۲-۲- آزمایش‌های سرولوژیک ۲۲

۲-۲-۳- آنالیز اسید چرب ۲۲

۲-۲-٤- هیبریداسیون DNA ۲۲

۲-۲-٥- الکتروفورز پروتئین‌های سلولی ۲۳

۲-۲-٦- روش‌های مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳

۲-۲-٦-۱- نشانگر AFLP ۲٤

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۲-٦-۲- نشانگر RAPD ۲۵
۲-۲-٦-۳- URP-PCR ۲۵
۲-۲-٦-٤- نشانگر RFLP ۲٦
۲-۲-٦-۵- عناصر تکرار شونده ۲۷
۲-۳- علایم بیماری ۲۸
۲-٤- چرخه بیماری و اپیدمیولوژی ۲۹
۲-۵- عوامل مؤثر بر شدت بیماری ۳۰
۲-٦- سازوکارهای بیماریزایی ۳۱
۲-٦-۱- آنزیم‌های خارج سلولی ۳۱
۲-٦-۲- سیستم ترشحی ۳۲
۲-٦-۳- توکسین‌های باکتریایی ۳۳
۲-٦-٤- سیستم Quorum Sensing ۳٤
۲-۷- ساختار ژنومی ۳٤
۲-۸- کنترل بیماری ۳۵
۲-۸-۱- روشهای زراعی ۳۵
۲-۸-۲- مقاومت ژنتیکی ۳۷
۲-۸-۳- کنترل بیولوژیک ۳۷

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های باکتریایی ٤۰
۳-۲- خالص سازی جدایه‌ها ٤۰
۳-۳- نگهداری جدایه‌ها در آب مقطر استریل ٤۰
۳-٤- اثبات بیماری‌زایی ٤۱
۳-۵- آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک برای شناسایی جدایه‌ها ٤۱

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۵-۱- رنگ آمیزی گرم ٤١
۳-۵-۲- حلالیت در KOH ٤٢
۳-۵-۳- آزمون هوازی/ بی‌هوازی ٤٢
۳-۵-٤- آزمایش اکسیداز ٤٢
۳-۵-۵- تولید لوان ٤٣
۳-۵-٦- هیدرولیز نشاسته ٤٣
۳-۵-۷- بررسی فعالیت پکتولیتیکی به روش له کردن ورقه‌های سیب‌زمینی ٤٣
۳-۵-۸- هیدرولیز ژلاتین ٤٤
۳-۵-۹- آزمایش آرژینین دی هیدرولاز ٤٤
۳-۵-۱۰- مصرف منابع کربن ٤٤
۳-۵-۱۱- هیدرولیز اسکولین ٤٥
۳-۵-۱۲- احیا نیترات ٤٥
۳-۵-۱۳- آزمایش دما ٤٥
۳-٦- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ٤٦
۳-٦-۱- استخراج DNA ژنومی ٤٦
۳-٦-۲- سنجش مقدار DNA استخراج شده ٤٦
۳-٦-۳- مخلوط واکنش جهت انجام PCR ٤٦
۳-٦-٤- آغازگرها ٤٧
۳-٦-٤-۱- برنامه تکثیر برای آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 ..... ٤٨
۳-٦-٤-۲- برنامه تکثیر برای آغازگر BOXA1R ٤٨
۳-٦-٤-۳- برنامه تکثیر برای آغازگر IS50 ..... ٤٨
۳-٦-۵- dNTPs ٤٩
۳-٦-٦- کلرید منیزیم $MgCl_2$ ٤٩

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-٦-۷- بافر PCR (10X) ٤٩

۳-٦-۸- Taq DNA polymerase ٤٩

۳-٦-۹- الکتروفورز محصولات PCR ٤٩

۳-۷- تجزیه و تحلیل دادها و رسم درخت فیلوژنی بر اساس انگشت‌نگاری ژنومی ۵۰

فصل چهارم: نتایج

٤-۱- جداسازی جدایه‌ها ۵۲

۴-۲- خصوصیات فنوتیپی (مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک) جدایه‌ها ۵۲

٤-۳- نتایج آزمون بیماریزایی ۵۷

٤-٤- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی حاصل از BOX-PCR ۵۸

٤-۵- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی حاصل از ERIC1R-PCR ٦۱

٤-٦- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی حاصل از ERIC2-PCR ٦٤

٤-۷- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی حاصل از IS50-PCR ٦۷

٤-۸- آنالیز داده‌های حاصل از ERIC، BOX و IS50 ..... ۷۰

فصل پنجم: بحث

نتیجه‌گیری کلی ۷۹

پیشنهادات پژوهشی ۸۰

فهرست منابع ۸۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- تولید سیب‌زمینی در جهان ٤

جدول ۱-۲- برآورد سطح، تولید و درهکتار سیب‌زمینی در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷ دراستان گلستان.... ٥

جدول ۲-۱- ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی افتراقی بیوارهای *Erwinia chrysanthemi* (سمسون و همکاران، ۱۹۸۷)..... ۱٥

جدول ۲-۲- توصیف بیووار ۸ و ۹ *Erwinia chrysanthemi* (ان گویرا و سمسون، ۱۹۹۰) ۱٦

جدول ۲-۳- اعضای جنس *Dickeya*، اسامی مشابه و میزبان‌های اصلی (سمسون و همکاران، ۲۰۰٥)..... ۱٦

جدول ۲-٤- خصوصیات افتراقی گونه‌های *Dickeya* spp. (سمسون و همکاران، ۲۰۰٥) ۱۹

جدول ۲-٥- آزمون‌های تعیین کننده گونه‌ها و زیرگونه‌های متداول‌تر *Pectobacterium* (گاردان و همکاران، ۲۰۰۳)..... ۲۱

جدول ۳-۱- مواد لازم و مقدار هریک برای تهیه محلول پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Master Mix) ٤۷

جدول ۳-۲- نام و توالی آغازگرها ٤۷

جدول ٤-۱- مشخصات جدایه‌های به دست آمده از سیب‌زمینی ٥۲

جدول ٤-۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی جدایه‌های به دست آمده از سیب‌زمینی ٥٥

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ٤-١- نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های *Pcc* (تولید گاز H_2S از سیستئین) ٥٤

شکل ٤-٢- نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های *Pcc* (تولید گاز از گلوکز) ٥٤

شکل ٤-٣- علائم ساق سیاه روی سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با جدایه پکتوباکتریوم در شرایط گلخانه..... ٥٧

شکل ٤-٤- نتیجه رشد جدایه‌های *Pcc* روی محیط EMB (پرگنه‌های دارای سایه سبز متالیک)..... ٥٧

شکل ٤-٥- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی جدایه‌های *Pcc* بدست آمده از سیب‌زمینی، حاصل از BOX-PCR با آغازگر BOXAIR ٥٩

شکل ٤-٦- ارتباط ژنتیکی جدایه‌های *Pectobacterium* بدست آمده بر پایه اثر انگشت ژنی حاصل از BOX-PCR با به کارگیری از آغازگر BOXAIR ٦٠

شکل ٤-٧- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی جدایه‌های *Pcc* به دست آمده از سیب‌زمینی، حاصل از ERIC-PCR با آغازگر ERIC1R ٦٢

شکل ٤-٨- ارتباط ژنتیکی جدایه‌های *Pectobacterium* بدست آمده بر پایه اثر انگشت ژنی حاصل از ERIC1R-PCR با به کارگیری از آغازگر ERIC1R ٦٣

شکل ٤-٩- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی جدایه‌های *Pcc* بدست آمده از سیب‌زمینی، حاصل از ERIC-PCR با آغازگر ERIC2 ..... ٦٥

شکل ٤-١٠- ارتباط زنتیکی جدایه‌های *Pectobacterium* بدست آمده بر پایه اثر انگشت ژنی حاصل از ERIC-PCR به به کارگیری از آغازگر ERIC2 ..... ٦٦

شکل ٤-١١- نتایج اثر انگشت ژنی DNA ژنومی جدایه‌های *Pcc* بدست آمده از سیب‌زمینی، حاصل از IS50-PCR با آغازگر IS50 ..... ٦٨

شکل ٤-١٢- ارتباط ژنتیکی جدایه‌های *Pectobacterium* بدست آمده بر پایه اثر انگشت ژنی حاصل از IS50-PCR با به کارگیری از آغازگر IS50 ..... ٦٩

شکل ٤-١٣- ارتباط ژنتیکی جدایه‌های *Pectobacterium* بدست آمده بر پایه اثر انگشت ژنی حاصل از ERIC-PCR، BOX-PCR و IS50-PCR..... ٧١

فصل اول

مقدمه

۱-۱- اهمیت غذایی و صنعتی سیب‌زمینی

گیاه سیب‌زمینی به عنوان یک گیاه صنعتی و پردرآمد بصورت جهانی کشت می‌شود و در کشور ما نیز بخصوص در دهه گذشته هم از لحاظ سطح زیر کشت و هم از لحاظ روش‌های کشت دچار دگرگونی و تحول شگرفی شده است. امروزه سیب‌زمینی غالباً برای مصارف انسانی کشت می‌شود. در طول تنها چهار قرن، سیب‌زمینی بعد از برنج، گندم و ذرت تبدیل به چهارمین محصول غذایی بزرگ در سطح جهان شده است. اطلاعات اخیر نشان می‌دهد که سیب‌زمینی نسبت به گندم و برنج در واحد سطح به ترتیب ۵۴ و ۷۸ درصد پروتئین بیشتری تولید می‌کند (خانیزاد و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۲- گیاه‌شناسی سیب‌زمینی

سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* و *S. tuberosum* subsp. *andigena* گیاه یک ساله علفی دو لپه می‌باشد و در جاهایی که غده‌ها بتوانند در بین فصول زراعی بقا یابند، به صورت چند ساله نیز رشد می‌کند. در برنامه‌های اصلاحی، تکثیر از طریق بذور حقیقی معمول بوده و در برخی از مناطق تولید نیز استفاده از آنها گسترش یافته است. در مقابل، در غالب مناطق تولید تجاری، تکثیر به صورت رویشی و از غده‌ها صورت می‌گیرد. هنگامی که گیاهان سیب‌زمینی از بذور حقیقی رشد می‌کنند، ریشه‌چه[1] از بذور خارج شده و به عنوان ریشه اصلی[2] توسعه می‌یابد که در نهایت منجر به تولید سیستم منشعب ریشه می‌شود. اولین برگ‌ها تخم‌مرغی شکل و کرک‌دار می‌باشند. گیاه جوان فوراً تولید استولن و غده‌های کوچک می‌کند. زمانی که گیاهان از غده‌ها حاصل شوند، جوانه‌های روی غده تولید ساقه‌های جانبی می‌نمایند که در نهایت منجر به تولید ساقه‌های هوایی، سیستم ریشه نابجا، استولن و غده‌ها می‌شود (خانیزاد و همکاران، ۱۳۸۹).

گلها پنج قسمت به رنگ‌های مختلف با خامه وکلاله ساده و تخمدان دو خانه‌ای دارند. میوه‌ها گرد تا تخم مرغی (به قطر ۳-۱ سانتی‌متریا بیشتر) به رنگ سبز، زرد مایل به سبز یا قهوه‌ای، و در موقع رسیدن، قرمز تا بنفش هستند (رجبی، ۱۳۷۹).

1 radicle
2 taproot

ساقه‌های برگی معمولاً سبز هستند اما می‌توانند قرمز تا ارغوانی نیز باشند. ساقه‌ها در برش عرضی زاویه‌دار می‌باشند. در اواخر فصل رشد قسمت‌های پائینی آن ممکن است در قاعده چوبی شود. شاخه‌های ثانویه به طور معمول از جوانه‌های برگی روی محور ساقه حاصل می‌شوند. برگ‌ها با الگوی آرایش مارپیچی در اطراف ساقه قرار می‌گیرند و به صورت مرکب پرمانند هستند هرچند که برگ‌های اولیه گیاهچه‌ها و اولین برگ‌های گیاهان رشد یافته از غده‌ها ممکن است ساده باشند (خانیزاد و همکاران، ۱۳۸۹).

گیاهان حاصل از بذور حقیقی تولید ریشه بالایی بلند و باریک می‌کنند. ریشه‌های جانبی از ناحیه دایره محیطی ریشه و در مریستم ساقه‌های زیرزمینی نزدیک به گره صفحه ایجاد می‌شوند. تقسیم یاخته‌ای در دایره محیطی سر منشاء تشکیل ریشه می‌باشد که از کورتکس[1] خارج می‌شود. منشاء ریشه‌های نابجا ناحیه مشابهی در قسمت‌های زیرزمینی ساقه‌های برخاسته از غده‌ها می‌باشد. محل‌های خروج و ظهور ریشه‌های جانبی ممکن است به عنوان محل ورود بیمارگرها نیز عمل کنند (خانیزاد و همکاران، ۱۳۸۹).

غده‌ها در نوک استولن‌ها تشکیل شده و به عنوان تکثیر جانبی بافت ذخیره‌ای می‌باشد که حاصل تقسیم و بزرگ شدن یاخته‌های آن است. رشد غده‌ها اصولاً به انبساط میانگره‌های جوانه جانبی بستگی دارد. رشد بیشتر منجر به تشکیل غده‌های بیضی یا کروی شکل می‌شود. در ساقه، استولن و غده‌ها، بافت آوندی اصولاً به عنوان دسته‌های دو طرفه با گروهی از یاخته‌های آوندی با دیواره نازک خارج از چوب (آبکش خارجی) و به سمت مرکز و درون چوب (آبکش داخلی) تشکیل می‌شود. همزمان با بزرگ شدن غده‌ها گروه‌های جدیدی از بافت‌های آوندی از جمله لوله‌های غربالی، یاخته‌های همراه و عناصر هدایت کننده پارانشیم تشکیل می‌شوند. کربوهیدرات‌ها به شکل دانه‌های نشاسته در درون یاخته‌های پارانشیم ذخیره‌ای قسمت‌های گوشتی و کورتکس ذخیره می‌شوند. سطح غده با اپیدرم پوشیده شده است و روزنه‌ها در روی اپیدرم پراکنده شده و اجازه تبادل به گازها را می‌دهند. سرانجام پریدرم در زیر اپیدرم و از یاخته‌های کامبیوم مریستمی توسعه می‌یابد و یک لایه محافظت کننده تشکیل می‌دهد. عدسک‌ها در زیر روزنه‌ها تشکیل می‌شوند که می‌توانند به عنوان محل‌های آلودگی برای برخی بیمارگرها عمل نمایند (خانیزاد و همکاران، ۱۳۸۹).

1 cortex

۱-۳- تاریخچه و سطح زیر کشت سیب‌زمینی

سیب‌زمینی یکی از محصولات غذایی مهم دنیاست و ظاهراً از سلسله کوه‌های آند[1] در آمریکای جنوبی منشأ گرفته است. به عقیده اسکات، سرخپوستان "اینکا[2]" اولین بار آن را در ۲۰۰ سال قبل از میلاد مسیح کشت نمودند. در سال ۱۵۳۷ جنگجویان اسپانیایی به کشت آن واقف شدند. این محصول سپس وارد اسپانیا شد و از آنجا به ایتالیا و سایر نقاط اروپای مرکزی انتشار یافت و به تدریج به صورت یک محصول غذایی اصلی در اروپا مخصوصاً آلمان، روسیه و ایرلند درآمد. در سال ۱۷۱۹ از ایرلند وارد ایالت متحده شد، و نخستین بار در ایالت نیوهمشایر[3] کشت گردید (جعفرپور، ۱۳۷۰).

کشورهای تولید کننده‌ی عمده‌ی سیب‌زمینی شامل شوروی سابق، چین و لهستان و پس از آنها کشورهای ایالت متحده‌ی آمریکا، آلمان و هندوستان هستند. هلند، انگلستان، فرانسه، آلمان و آمریکا تولید کنندگانی هستند که بیشترین بازده تولید را دارا می‌باشند (فلاحی، ۱۳۷۴).

جدول ۱-۱- تولید سیب‌زمینی در جهان (فائو، ۲۰۰۷)

	سطح زیر کشت (هکتار)	عملکرد (تن)	بازده (تن/هکتار)
آفریقا	۱۵٤۱٤۹۸	۱٦۷۰٦۵۷۳	۱۰/۸
آسیا/ اقیانوسیه	۸۷۳۲۹٦۱	۱۳۷۳٤۳٦٦٤	۱۵/۷
اروپا	۷٤۷۳٦۲۸	۱۳۰۲۲۳۹٦۰	۱۷/٤
آمریکای لاتین	۹٦۳۷٦٦	۱۵٦۸۲۹٤۳	۱٦/۳
آمریکای شمالی	٦۱۵۸۷۸	۲۵۳٤۵۳۰۵	٤۱/۲
جهان	۱۹۳۲۷۷۳۱	۳۲۵۳۰۲٤٤۵	۱٦/۸

سطح زیرکشت سیب‌زمینی کشور در سال زراعی ۸۸-۱۳۷۸ حدود ۱۵۴ هزار هکتار برآوردشده که ۹۸/۱۷ درصد آن آبی و بقیه دیم است. استان همدان با ۱۶/۶۳ درصد اراضی سیب‌زمینی کشور، از نظر

1 ande
2 Inca
3 New Hampshire

سطح برداشت در مقام نخست قرار دارد. استان‌های اردبیل، اصفهان، کردستان، زنجان و آذربایجان شرقی به ترتیب مقام‌های دوم تا ششم را به خود اختصاص داده‌اند. میزان تولید سیب‌زمینی در کشور حدود ۴/۱۱ میلیون تن برآورد شده که ۹۹/۳۲ درصد آن از اراضی آبی حاصل شده است. عملکرد سیب‌زمینی آبی در کشور ۲۶۹۸۶/۹۵ کیلوگرم و سیب‌زمینی دیم ۹۸۷۲/۳۰ کیلوگرم بوده است. میزان تولید سیب‌زمینی استان گلستان نسبت به کل کشور ٪۳/۴ می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۹).

جدول ۱-۲- سطح کشت و میزان تولید در هکتار سیب‌زمینی در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷ در استان گلستان (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۹)

سطح (هکتار)			تولید (تن)		
آبی	دیم	جمع	آبی	دیم	جمع
٦٣٠٧	۰	٦٣٠٧	١٣٨٦٣٧	۰	١٣٨٦٣٧

۱-٤- بیماری‌های مهم سیب‌زمینی

از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی این محصول می‌توان به پوسیدگی ریشه (*Rhizoctonia solani*)، پوسیدگی خشک سیب‌زمینی (*Fusarium solani* و *F. roseum*)، لکه موجی (*Alternaria solani*)، آنتراکنوز (*Colletotrichum atramentarium*)، پژمردگی بوته (*Fusarium eumarti*) و جرب معمولی (*Streptomyces scabies*) اشاره نمود.

ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی[1]، ویروس Y سیب‌زمینی[2]، ویروس A[3] سیب‌زمینی و ویروس X[4] سیب‌زمینی نیز از ویروس‌های بیمارگر مهم در این محصول به شمار می‌آیند. از جمله بیماری‌های باکتریایی، بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی (*Ralstonia solanacearum*)، ساق سیاه و پوسیدگی نرم را می‌توان ذکر کرد. نماتود طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*)، نماتود مولد زخم

1 Potato leaf roll virus
2 Potato virusY
3 Potato virus A
4 Potato virus X

(*Pratylenchus* spp.)، نماتود مولد غده (*Meloidogyne* spp.) از نماتودهای انگل سیب‌زمینی می‌باشند (الهی‌نیا، ۱۳۸۴).

۱-٤-۱- ساق سیاه[1] و پوسیدگی نرم[2]

پکتوباکتریوم‌ها یا اروینیاهای عامل پوسیدگی نرم، به خانواده *Entrobacteriaceae* تعلق دارند. تولید و ترشح آنزیم‌های پکتولیتیک[3] از ویژگی‌های اصلی این باکتری‌ها است که موجب لهانیده شدن بافت‌های گیاهی می‌گردند (براس و همکاران، ۱۹۹۴). (*Pc*) *Pectobacterium carotovorum*، .*Dickeya* spp، (*Pa*) *Pectobacterium atrosepticum*، و یک استرین غیرمعمول جدید، *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*) عوامل مولد ساق سیاه، پوسیدگی نرم و پوسیدگی ساقه‌های هوایی سیب‌زمینی می‌باشند (وان در مرو، ۲۰۰۶). این استرین‌های پکتولیتیک را پیشتر .*Erwinia* spp می‌نامیدند. با مطالعات و تحقیقات گسترده‌ای که روی این باکتری‌ها انجام شد،آنها را در دو جنس جدا، *Pectobacterium* و *Dickeya* طبقه‌بندی نمودند (گاردان و همکاران، ۲۰۰۳). پوسیدگی‌های نرم باکتریایی بیشتر روی گیاهانی با بافت‌های ذخیره‌ای یا برگ و ساقه‌های نرم و آبدار رخ می‌دهد و علائم بیماری در تمامی میزبان‌ها بسیار مشابه است. بافت‌های آلوده نرم، آبکی و پوسیده‌اند. زمانی که گیاهان در مزرعه آلوده می‌شوند، علائم ممکن است در قسمت‌های پایینی ساقه هم ظاهر شده و بافت‌ها آبکی، سیاه و پلاسیده شوند. این امر موجب کوتولگی، پژمردگی و مرگ قسمت‌های هوایی گیاه می‌گردد (اگریوس، ۲۰۰۵).

اروینیاهای عامل پوسیدگی نرم، طیف وسیعی از گیاهان مثل سیب‌زمینی، هویج، کاهو، کلم پیچ، ذرت، چغندرقند و سیب‌زمینی شیرین را آلوده می‌کنند (ویتنی، ۱۹۸۷). اروینیاهای پوسیدگی نرم انتشار آب و هوایی دارند که تنوع میزبانی و دمای رشد آنها را نشان می‌دهد. *Eca* به طور عمده در آب و هوای معتدل و اغلب روی سیب‌زمینی محدود شده است. *Ech* گونه‌های متنوعی از گیاهان زراعی و گرمسیری شامل سیب‌زمینی، ذرت، برنج و گیاهان زینتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. *Ecc* هم به تعداد زیادی از میوه‌ها و سبزیجات خسارت وارد می‌کند و در هر دو ناحیه معتدل و گرمسیر یافت می‌شود (الفینستون، ۱۹۸۷). *Pcc* به طور گسترده در جهان منتشر شده است و در مقایسه با زیرگونه‌های دیگر دامنه میزبانی وسیع‌تری دارد (دی بور و همکاران، ۱۹۸۷).

1 Blackleg
2 Soft rot
3 Pectolytic enzymes

پدیده بیماریزایی به تولید آنزیم‌های خارج سلولی[1] از بین برنده دیواره سلولی وابسته است. این آنزیم‌ها باعث شکسته شدن پلی‌مرهای اجزای دیواره سلولی گیاه می‌شوند (روبرت بادوی، ۱۹۹۱). در صورت وجود دمای بهینه، کمبود اکسیژن، رطوبت بالا و آب آزاد توسعه بیماری آغاز می‌شود (توس و همکاران، ۲۰۰۳). آبیاری بیش از حد، برداشت مکانیکی و استفاده از تجهیزات ضدعفونی نشده، انتشار بیماری را افزایش می‌دهند (روبرت بادوی، ۱۹۹۱). آلودگی غده‌های بذری در طول فصل رشد به عنوان منبع اصلی ایناکلوم برای آلودگی غده‌های نتاج[2] هستند، که پس از برداشت و در انبار ، هنگامی که شرایط مطلوب شد، پوسیدگی نرم غده‌ها اتفاق می‌افتد (ساحی و همکاران، ۲۰۰۷). توسعه علائم به هجوم باکتری، حساسیت میزبان و همچنین شرایط محیطی مانند دما و رطوبت وابسته است (پرومبلن و کلمن، ۱۹۸۰). جمعیت بالای بیمارگر به انتشار وسیع‌تر ساق سیاه منجر می‌شود (گادمستاد، ۱۹۹۸).

همه باکتری‌های پوسیدگی نرم شناسایی شده شامل *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*، *P. betavasculorum*، *P. wasabiae*، *P. carotovorum* subsp. *oderiferum* و *Dickeya* spp. از نواحی متفاوت کشت سیب‌زمینی در ایران جداسازی شده‌اند (رحمانی‌فر و همکاران، ۲۰۱۲).

در ایالت اورگان آمریکا، در اوایل فصل که آب و هوای سردی وجود دارد *Pa* بیمارگر اصلی ساق سیاه سیب‌زمینی محسوب می‌گردد، ولی در اواخر فصل که دما بالاتر است *Pcc* به صورت بیمارگر غالب در می‌آید (پوالسون، ۱۹۸۰). همچنین *Pcc* در کلرادو (مولینا و هریسون، ۱۹۷۷) و آریزونا به عنوان متداولترین عامل بیماری ساق سیاه سیب‌زمینی گزارش شده است. در اسرائیل *Dch* عامل اصلی ساق سیاه سیب‌زمینی می‌باشد (لامب و همکاران، ۱۹۸۶) و در ایالت ریوگرانده برزیل عوامل ایجاد کننده ساق سیاه سیب‌زمینی شامل *Pa* (۵۵٪)، *Pcc* (۴۵٪) و *Dch* (۱٪) اعلام شده‌اند (دارت و همکاران، ۲۰۰۴). پوسیدگی نرم و پژمردگی سیب‌زمینی در نواحی خشک استرالیا، پوسیدگی گسترده ساقه در نواحی گرمسیر و پست پرو، پوسیدگی محدود ساقه در مناطق سرد- معتدل ژاپن و سوئیس گزارش شده است (پالاکیو- بیلسا و همکاران، ۲۰۰۶). بیماری ساق سیاه (*Pectobacterium atroseptica*) در مناطق معتدل و سرد کانادا، اروپای غربی، هندوستان و پاکستان شایع است (ساحی و همکاران، ۲۰۰۷).

1 Extracellular enzymes
2 Progeny tubers

ساق سیاه به عنوان خطر اصلی تولید سیب‌زمینی در جهان محسوب می‌شود (مولینا و هریسون، ۱۹۷۷). میزان خسارت مستقیم و غیرمستقیم پکتوباکتریوم‌های پوسیدگی نرم برآورد نشده اما آشکار است که هنگفت می‌باشد (دی بور، ۱۹۹۴). پرومبلن و کلمن (۱۹۸۰)، خسارت ایجاد شده توسط *Pectobacterium* spp. را بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلیون سالانه تخمین زده‌اند. درجنوب گرجستان، در سال ۱۹۷۰، پوسیدگی نرم عامل خسارت غده‌های برداشت شده و انبار شده بود (شرف و مکناب، ۱۹۸۶)، در کلرادو خسارت ناشی از ساق سیاه ۵- ٪۱۰ تخمین زده شد (مولینا و هریسون، ۱۹۷۷). *P. chrysanthemi* به عنوان عامل چندین خسارت غده‌های بذری در برخی نواحی کم آب استرالیا شناخته شد (کوتر و پوال، ۱۹۸۳). طی مراحل برداشت، پس از برداشت و ذخیره‌سازی خسارت ممکن است تا ۱۰۰٪ هم برسد. در عملیات بزرگ، طی یک فصل انبارداری، خسارت به میلیون دلار رسیده است. خسارت جهانی احتمالاً به صدها میلیون دلار سالانه می‌رسد (الفینستون، ۱۹۸۷).

ارزش هر محصول زراعی میزان توجیه پذیری اقدامات کنترلی را تعیین می کند. می‌توان گفت که سیب زمینی محصول به نسبت با ارزشی، همراه با مشکلات پیچیده‌ای در تولید، انبارداری و بهره‌برداری است، و بنابراین اقدامات پیشگیرانه نسبتاً زیادی لازمه‌ی آن است. تشخیص و شناسایی صحیح بیماری در شروع به اقدامات مناسب برای پیشگیری و مبارزه، در درجه اول اهمیت قرار دارد. لذا در این تحقیق، با نمونه‌برداری از مزارع سیب‌زمینی استان گلستان عوامل مولد پوسیدگی نرم و ساق سیاه مورد شناسایی قرار گرفتند و از آن جایی که بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت عوامل بیمارگر از اهمیت زیادی در تاکسونومی عوامل و اپیدمیولوژی و مدیریت بیماری‌های ناشی از آنها برخوردار است، تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها بررسی گردید.

فرضیه‌ها:

۱. نظر به علائم عامل بیمارگر روی میزبان و شناسایی آن در منطقه، ایزوله‌های مختلف *Pectobacterium* در زراعت سیب‌زمینی استان فعال می‌باشند.

۲. در میان جدایه‌های پکتوباکتریوم در نواحی مختلف استان، تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی وجود دارد.

اهداف:

۱. تشخیص و تعیین گونه‌های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه از نمونه‌های آلوده شده از مزارع سیب زمینی استان گلستان

۲. ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف استان گلستان