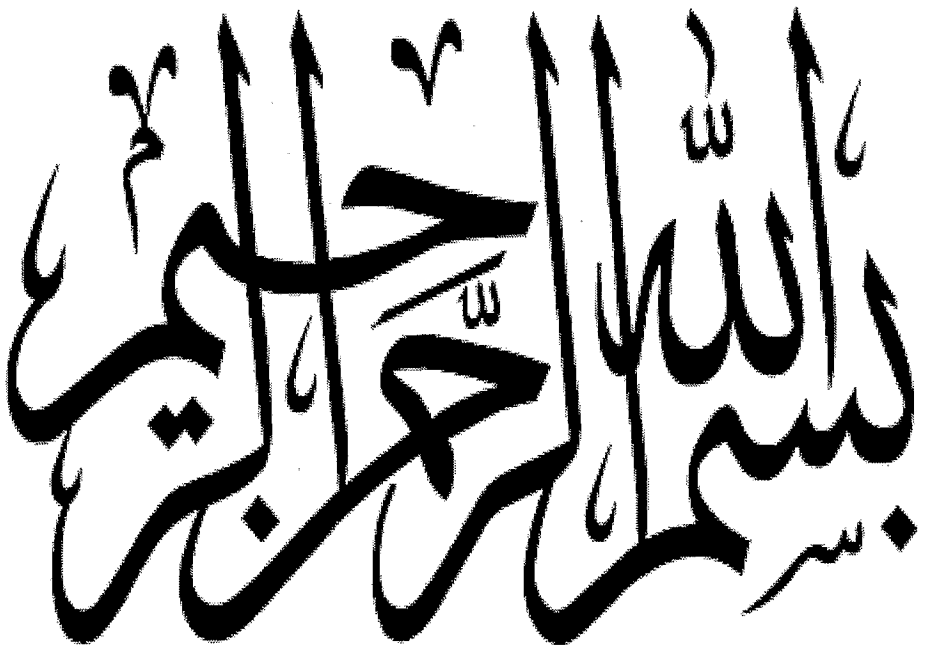

١١٩٤.

۸۷/۱/۱۰ ۸۱۰۴
۸۸-۱۲۲

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم در استان فارس

توسط:

رسول رضائی

۱۳۸۸ /۱/ ۲۱

استاد راهنما:

دکتر سید محسن تقوی

شهریور ماه ۱۳۸۷

۱۱۱۹۳۰

به نام خدا

بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم در استان فارس

به وسیله‌ی:

رسول رضائی

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از
فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

بیماری شناسی گیاهی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

دکتر سید محسن تقوی، دانشیار بخش گیاه پزشکی (رئیس کمیته).....

دکتر ضیاءالدین بنی هاشمی استاد بخش گیاه پزشکی.....

دکتر علی نیازی استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.....

دکترسید علی اکبر بهجت نیا استادیار بخش گیاه پزشکی.....

شهریور ماه ۱۳۸۷

سپاسگزاری

خدا را شاکر و سپاسگزارم که به من توفیق داد تا سرافراز و خشنود این تحقیق را به اتمام برسانم. قبل از هرچیز برخود لازم می‌دانم که مراتب سپاس و امتان بی‌نهایت خود را از جناب آقای دکتر سیدمحسن تقوی که راهنمایی بنده را قبول فرمودند و در طول انجام این تحقیق در نهایت تواضع، فروتنی و بردباری همواره پاسخگوی مسائل و مشکلات بنده بودند، ابراز دارم. از اساتید مشاور و گرامیم آقایان دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی، دکتر علی‌نیازی و دکتر سید علی اکبر بهجت‌نیا که در کمال گشاده‌رویی از هیچ کمک و راهنمایی نسبت به اینجانب دریغ نفرمودند، نهایت تشکر را دارم. ممنون و سپاسگزار محبت‌ها و همدلی‌های دوستان خودم آقایان و خانم‌ها، صیام‌پور، رومی، قادری، خوانچه‌زر، الماسی، حاج ابراهیمی، فرجود، سیفی، زندیه و حسنی هستم. از کلیه کارکنان محترم بخش گیاهپزشکی به ویژه آقایان جوکار، سعادتی، حق‌وردی، قاضی‌شریف و خانم بذرافشان که در طی انجام پایان‌نامه همکاری‌های لازم را نسبت به بنده مبذول داشتند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز هم که بخشی از هزینه انجام پایان نامه را به عهده گرفتند تشکر می کنم. در نهایت موفقیت خود را مرهون و مدیون زحمات بی‌شائبه پدر و مادر خوبم که همواره در تمام طول زندگی‌ام در کنارم بودند و مرا حمایت و پشتیبانی کردند، می‌دانم.

چکیده

بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم در استان فارس

بوسیله‌ی:

رسول رضائی

طی سال های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶، ۴۲ سویه باکتری از غده های آلوده سیب زمینی، ریشه های آلوده شلغم، چغندرقند، هویج و برگ های آلوده کاهو و کلم که علائم پوسیدگی نرم را نشان می دادند از مناطق مختلف استان فارس جداسازی شد. به منظور بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی، آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمیائی و rep-PCR با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC و REP انجام گردید. سویه های مورد بررسی، میله ای شکل، متحرک با تاژک های محیطی، گرم منفی، بی هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، قادر به لهانیدن ورقه های سیب زمینی و از نظر واکنش فوق حساسیت منفی بودند. سویه ها قادر به احیاء نیترات، تولید H_2S از سیستئین و تولید استوئین بودند. از این رو تمامی سویه ها به عنوان باکتری های عامل پوسیدگی نرم تشخیص داده شدند. بر پایه آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی، سویه ها در چهار گروه قرار داده شدند. سویه های گروه اول از نظر خصوصیات فنوتیپی مانند رشد در دمای C ۳۷°، عدم تولید مواد احیاء کننده از سوکروز، عدم فعالیت فسفاتاز، عدم حساسیت به اریترومایسین، عدم تولید ایندول، عدم استفاده از سوربیتول، آرابیتول و استفاده از ملی بیوز، سیترات و رافی نوز به *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* شباهت دارند. سویه های گروه دوم از نظر خصوصیات فنوتیپی مانند رشد در C ۳۷°، تولید مواد احیاء کننده از سوکروز، تولید اسید از پالاتینوز، آرابیتول، سوربیتول و مصرف سیترات به *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* شباهت داشتند. سویه های گروه سوم از نظر خصوصیات فنوتیپی مانند، عدم فعالیت فسفاتاز، عدم حساسیت به اریترومایسین، عدم تولید ایندول، عدم تولید اسید از سوربیتول، ملی بیوز، سیترات، آرابیتول و استفاده از لاکتوز، اینولین و کتو متیل گلوکوزید به *P. betavasculorum* شباهت داشتند. سویه های گروه چهارم بر اساس خصوصیات فنوتیپی مانند هیدرولیز ژلاتین، حساسیت به اریترومایسین، تولید فسفاتاز، تولید گاز از گلوکز، رشد در C ۳۹°، تولید استوئین، تولید اسید از آرابینوز، ملی بیوز، رافینوز، عدم مصرف تری هالوز و تولید ایندول به *Dickeya chrysanthemi* شباهت داشتند. سویه ها بر اساس rep-PCR با استفاده از آغازگرهای مذکور در چهار گروه قرار گرفتند. محصول PCR با استفاده از آغازگرهای مذکور، بیانگر تنوع و تفاوت قابل ملاحظه های در بین سویه ها بود. سویه های گروه اول تحت عنوان *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ، سویه های گروه دوم تحت عنوان *P. betavasculorum*، سویه های گروه سوم تحت عنوان *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* و سویه های گروه چهارم تحت عنوان *Dickeya chrysanthemi* شناسایی شدند. گروه بندی سویه ها بر اساس rep-PCR، گروه بندی بر اساس خصوصیات فنوتیپی را تائید کرد.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول- مقدمه	۱
فصل دوم –مروری بر پژوهش های پیشین	۳
۲-۱- تاریخچه بیماری	۳
۲-۲- علائم	۳
۲-۲-۱- علائم پوسیدگی نرم روی غده سیب‌زمینی	۳
۲-۲-۲- علائم ساقه سیاه	۴
۲-۲-۳- علائم پوسیدگی نرم روی ریشه هویج، برگ های کاهو و کلم	۵
۲-۳- موقعیت تاکسونومیکی جنس *Erwinia*	۵
۲-۴- خصوصیات باکتری‌شناسی جنس *Pectobacterium*	۷
۲-۵- خصوصیات گونه‌های *Pectobacterium*	۷
۲-۶- خصوصیات گونه *Dicheya chrysanthemi*	۸
۲-۷- تاریخچه بیماری در ایران	۹
۲-۸- بیماری‌زایی	۱۰
۲-۹- سازوکار بیماری‌زایی	۱۱
۲-۱۰- آلودگی محصول و چرخه بیماری	۱۲
۲-۱۱- بقای باکتری در خاک و مواد گیاهی	۱۳
۲-۱۲- انتقال باکتری	۱۴
۲-۱۳- تنوع فنوتیپی، سرولوژیکی و ژنوتیپی	۱۵
۲-۱۴- rep-PCR	۱۷
فصل سوم – مواد و روشهای تحقیق	۲۳
۳-۱- نمونه‌برداری و جداسازی	۲۳
۳-۲- نگهداری سویه ها	۲۳

۳-۲- ۱- زیر پارافین مایع سترون ۲۳
۳-۲- ۲- در آب مقطر سترون ۲۴

۳-۳- بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها ۲۴
۳-۳-۱- بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی جدایه‌ها ۲۴
۳-۳-۲- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها ۲۸
۳-۴- بررسی خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌ها ۲۹
۳-۴-۱- استخراج DNA ۲۹
۳-۴-۲- ردیابی بیمارگر با آغازگرهای اختصاصی ۳۰
۳-۴-۳- rep-PCR ۳۲
۳-۴-۳-۱- تهیه ژل آگارز ۳۴
۳-۴-۳-۲- آنالیز داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی ۳۵

فصل چهارم- نتایج ۳۶

۴-۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه ها ۳۶
۴-۲- خصوصیات تغذیه‌ای سویه ها ۳۶
۴-۳- آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی ۳۷
۴-۴- خصوصیات ژنوتیپی ۳۷
۴-۴-۱- ردیابی پکتوباکتریوم‌های عامل پوسیدگی نرم با آغازگرهای اختصاصی ۳۷
۴-۴-۲- rep-PCR ۳۷

فصل پنجم- بحث و نتیجه گیری ۶۵

فهرست منابع ۷۲

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

۲-۱- مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شش گونه جنس *Pectobacterium* ۱۹
۲-۲- مشخصات فیزیولوژیکی زیر گروه‌های گونه *Dicheya chrysanthemi* ۲۱
۲-۳- روش های ملکولی در تعیین سطوح فیلوژنتیکی پروکاریوت ها ۲۲
۳-۱- مواد لازم برای انجام واکنش PCR تشخیصی ۳۱
۳-۲- چرخه‌ی دمایی استفاده شده در واکنش PCR برای آغازگرهایEXPCCR/EXCCF ۳۱
۳-۳- چرخه‌ی دمایی استفاده شده در واکنش PCR برای آغازگرهای ADE1/ADE2 ۳۲
۳-۴- ترادف آغازگرهای مورد استفاده در rep-PCR ۳۳
۳-۵- چرخه‌ی دمایی استفاده شده در واکنشrep-PCR ۳۳
۳-۶- مواد استفاده شده در واکنش rep-PCR ۳۴
۴-۱- مشخصات سویه های پکتوباکتریوم جدا شده از میزبان های مختلف در استان فارس ۳۹
۴-۲- خصوصیات فنوتیپی سویه های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم جدا شده از استان فارس ۴۰
۴-۳- مشخصات تغذیه‌ای سویه های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم جدا شده از استان فارس ۴۱
۴-۴- گروه‌بندی سویه های پکتوباکتریوم جدا شده از استان فارس بر اساس آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی ۴۲
۴-۵- خصوصیات افتراقی فنوتیپی و تغذیه‌ای گروه‌های پکتوباکتریوم جدا شده از استان فارس ۴۳
۴-۶- گروه‌بندی سویه های پکتوباکتریوم جدا شده از استان فارس بر اساس آنالیز عددی rep-PCR با آغازگرهای ERIC، BOX و REP ۴۴

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

۴-۱- علائم پوسیدگی نرم روی غده سیب زمینی ۴۵
۴-۲- علائم پوسیدگی نرم روی غده سیب زمینی ۴۶
۴-۳- علائم پوسیدگی نرم روی پیاز ۴۷
۴-۴- پرگنه های پکتوباکتریوم روی محیط گشت NA ۴۸
۴-۵- پرگنه های سبز متالیک پکتوباکتریوم روی محیط کشت EMB ۴۹
۴-۶- دندروگرام سویه های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم بر اساس خصوصیات فنوتیپی ۵۰
۴-۷- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *Pectobacterium c* *carotovorum* subsp. *carotovorum* تکثیر شده با آغازگرهای EXPCCR و EXPCCF ۵۱
۴-۸- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *Pectobacterium* *carotovorum* subsp. *carotovorum* در واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC ۵۲
۴-۹- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *Pectobacterium* *carotovorum* subsp. *carotovorum* در واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر REP ۵۳
۴-۱۰- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *Pectobacterium* *carotovorum* subsp. *carotovorum* در واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX ۵۴
۴-۱۱- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *D. chrysanthemi* در واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC ۵۵
۴-۱۲- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *D. chrysanthemi* در واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX ۵۶
۴-۱۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* در واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC ۵۷
۴-۱۴- نقوش الکتروفورزی محصول PCR سویه های *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* در واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر ۵۸
۴-۱۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR گونه و زیرگونه های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم بر اساس rep-PCR و با استفاده از آغازگر ERIC ۵۹
۴-۱۶- دندروگرام سویه های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم بر اساس آغازگرهای Eric، Box و Rep ۶۰
۴-۱۷- دندروگرام سویه های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم بر اساس Box-PCR ۶۱

۴-۱۸- دندروگرام سویه های پکتوباکتریوم عامل پوسیدگی نرم بر اساس Eric-PCR ۶۲
۴-۱۹- دندروگرام سویه های *P. carotovorum* subsp.*carotovorum* بر اساس rep-PCR ۶۳
۴-۲۰- بیماری زایی پکتوباکتریوم های عامل پوسیدگی نرم روی ورقه سیب زمینی ۶۴

فصل اول

مقدمه

پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم روی طیف وسیعی از گیاهان به ویژه گیاهانی که دارای اندام‌های ذخیره‌ای آبدار و گوشتی ، از گیاهان زینتی از قبیل سیکلامن (*Cyclamen persicum*)، کوکب (*Dahlia hybrid*)، داوودی (*Chrysanthemum* spp.)، میخک (*Caryophyllus* spp.)، گیاهان زراعی شامل ذرت (*Zeae mays*)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*)، چغندرقند (*Beta vulgaris*)، نیشکر (*Saccharum officinarum*)، سبزیجات مانند کاهو (*Lactuca sativa*)، هویج (*Daucus carota var. sativus*)، کرفس (*Apium grareolens*) و آناناس (*Ananas comosus*) به عنوان بیماری‌زا گزارش شده‌اند. (Dickey, 1979; Gudmestad *et al.*, 1988; Iope *etal.*, 1986; Segall and Dow, 1973; Whitney, 1987 ; Wick and Shrier, 1990)

پوسیدگی نرم باکتریایی ، تعداد زیادی از محصولات را در مزرعه یا انبار آلوده می‌کند. وسعت و دامنه خسارت این باکتری‌ها از کشوری به کشور دیگر متفاوت است و تحت تاثیر شرایط آب و هوایی، شرایط رشد و انبارداری، این خسارت نوسان دارد (Perombelon and Salmond, 1995).

از خصوصیات پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم، تولید مقدار زیادی آنزیم‌های حل کننده دیواره سلولی بخصوص آنزیم های پکتولیتیک است که منجر به لهیدگی بافت پارانشیمی می‌شود و خاص میزبان مشخصی نیستند (Barras *et al.*, 1994; Collmer and Keen, 1986; Perombelon and Salmond, 1995).

چندین عامل در بیماری‌زایی پکتوباکتریوم‌های عامل پوسیدگی نرم دخالت دارند که عبارتند از: آنزیم‌های برون یاخته‌ای بیمارگر که دیواره گیاه را تخریب می‌کنند و شامل پکتینازها، سلولازها و پروتئینازها می‌باشند و ساختارهای موجود در سطح یاخته باکتری مثل پیلی‌ها، تاژک‌ها، لیپوپلی ساکاریدها، لایه های مخاطی اگزو پلی‌ساکاریدی و پروتئین‌های غشا خارجی که نقش‌هایی را در بقای باکتری‌ها درون گیاه میزبان ایفا می‌کنند (Perombelon and Salmond,1995; Salmond, 1994). حداقل چهار گونه *Pectobacterium* قادر به ایجاد بیماری تحت شرایط طبیعی هستند که عبارتند از:

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* (Van Hal 1902),
Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (Jones 1901),
Erwinia carotovora subsp. *wasabiae* (Goto and Motsumoto 1987),
Erwinia carotovora subsp. *odorifera* (Gallois 1992),
Erwinia carotovora subsp. *betavascalarum* (Thomson and Schroth 1981),
Erwinia chrysanthemi (Burkholder 1953),
Erwinia cypripedii (Hori 1911),
Erwinia rhapontici (Millard 1924).

سال ۱۹۹۸ اروینیاهای عامل پوسیدگی نرم به جنس جدید *Pectobacterium*

(Hauben *et al.*, 1998) و در سال ۲۰۰۳ زیرگونه های *P. carotovora* subsp. *atroseptica* ، *P. carotovora* subsp. *wasabiae* و *P. carotovora* subsp. *betavasculorum* به سطح گونه ارتقاء و به *Pectobacterium atrosepticum* ، *P. wasabiae* و *P. betavasculorum* تغییر نام یافتند (Garden *et al.*, 2003). در سال ۲۰۰۴ *P. chrysanthemi* به جنس جدید *Dickeya chrysanthemi* منتقل شد (Samson et al., 2004). در بین پکتوباکتریوم های عامل پوسیدگی نرم *D. chrysanthemi* و *P. carotovorum* دارای اهمیت اقتصادی بیشتری هستند (Anna *et al.*, 2002). گونه های مختلف پکتوباکتریوم هم از نظر فنوتیپی و هم از نظر ژنوتیپی متنوع هستند. *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* (*Pcc*) متنوع ترین زیر گونه *P. carotovorum* می باشد در حالیکه سایر زیر گونه ها تنوع ژنتیکی کمتری دارند (Anna *et al.*, 2002). تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی بین جدایه های *D. chrysanthemi* و *Pcc* بسیار مشهود است و این احتمالا به خاطر پخش جغرافیای وسیع و میزبانهای گسترده می باشد (Anna *et al.*, 2002). مطالعه‌ای که براساس ژن 16S rRNA صورت گرفته است نا همگن بودن جنس *Pectobacterium* را تایید می‌کند (Hauben *et al.*, 1998). شناخت تنوع بین گروه‌های بیمارگر یک پیش‌نیاز مهم برای طبقه‌بندی، تشخیص درست، ردیابی بیمارگر و مطالعات اپیدمیولوژیکی است که این موضوع زمانی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند که تعداد از زیرگونه‌های نزدیک به هم روی یک میزبان بیماری‌زا هستند. مثلاً *D. chrysanthemi* ، *Pcc* ، *P. atrosepticum* (*Pa*) و *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* (*Pcw*) همگی روی سیب‌زمینی بیماری‌زا هستند (Toth *et al.*, 2001). وردونک و همکاران در آنالیز عددی خواص فنوتیپی جنس اروینیا، گونه و زیرگونه‌های پوسیدگی نرم را از یکدیگر متمایز نموده و نشان داده‌اند گونه‌ها ناهمگن (heterogeneous) می‌باشند (Verdonck *et al.*, 1987). خصوصیات سویه‌های بررسی شده *Pcc* تطابق کافی یا کامل با جداول افتراقی این زیرگونه نداشته و به نظر می‌رسد سویه‌های این زیر گونه تنوع زیادی داشته باشند در صورتیکه سویه های *Pa* تنوع کمی دارند (Holt *et al.*, 1994; schaad *et al.*, 2001). با توجه به تحقیقات انجام شده در ایران (ظهورپرالک و همکاران، ۱۳۷۷: سلطانی نژاد و همکاران، ۱۳۸۴ : جعفری و تقوی، ۱۳۸۶)، پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم تنوع زیادی در خصوصیات فنوتیپ و الکتروفورز پروتئین داشته اند بنابراین با توجه به اهمیت پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم، تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی این بیمارگرها که از میزبان های مختلف جدا شده اند انجام پذیرفته است.

فصل دوم

مروری بر تحقیقات پیشین

۲-۱- تاریخچه بیماری

پوسیدگی نرم باکتریایی (bacterial soft rot disease) اولین بار روی هویج تحت نام پوسیدگی نرم هویج در سال ۱۹۰۱ از آمریکا گزارش شد (Graham, 1964). وی ادعا نمود که عامل بیماری به وسیله یک باسیل (*Bacillus*) دارای تاژک‌های محیطی به نام *Bacillus carotovorus* ایجاد می‌شود. یکسال بعد و تقریباً بطور همزمان Van Hal از هلند و Apple از آلمان بطور مستقل بیماری ساق سیاه را از روی سیب‌زمینی گزارش کردند. عامل بیماری را به ترتیب *Bacillus atrosepticus* و *Bacillus phytophthorus* نامگذاری کردند (Dye, 1968; Goto and Matsumoto, 1987).

پوسیدگی نرم ایجاد شده به وسیله *E. chrysanthemi* اولین بار در سال ۱۹۵۳ به عنوان بلایت باکتریایی داوودی از ایالات متحده آمریکا و در سال ۱۹۵۷ از ژاپن گزار گردید (Goto, 1992). پوسیدگی غده سیب‌زمینی در هر جایی که این محصول کشت شود یافت می‌گردد (Dickey, 1979). پوسیدگی نرم روی سایر محصولات مثل ذرت، چغندرقند، کاهو، سیب‌زمینی شیرین، برنج، میخک، بنفشهٔ آفریقایی، آناناس، موز، فیلودندرون، دیفن باخیا، ارکیده، سیکلامن، گوجه‌فرنگی، بگونیا، کوکب و سیب‌زمینی در کشورهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (Goto, 1992; Seo *et al.*, 2003). برای اولین بار پوسیدگی نرم غده‌های گیاهان زنبق، در جنوب آفریقا مشاهده گردید و عامل آن، *E. carotovora* subsp. *carotovora* گزارش شد (Mansvelt and Carstens, 1999). در مورد پوسیدگی نرم هویج اطلاعات کمی در دسترس است. در سال ۱۹۷۶، *E. carotovora* subsp. *carotovora* و *E. chrysanthemi* باعث پوسیدگی مغز هویج در تگزاس شد (Towner and Beraha, 1976). برای اولین بار در سال ۱۹۹۸، پوسیدگی نرم هویج در کالیفرنیا گزارش شد و عامل آن *E. chrysanthemi* معرفی گردید (Farrar *et al.*, 2000).

۲-۲- علائم

۲-۲-۱- علائم پوسیدگی نرم روی غده سیب‌زمینی

غده‌های بذری بعد از کاشت و غده‌های تولید شده قبل از برداشت در خاک و در انبار ممکن است توسط عوامل مولد پوسیدگی نرم آلوده شوند. در ابتدا، روی بافت آلوده، لکه کوچک آبکی به وجود می‌آید که به تدریج بزرگ‌تر و عمیق‌تر شده و بافت نرم می‌گردد، به طوری که با اندک فشاری از بافت سالم جدا می‌شود. بافت‌های پوسیده، برنزه تا کرم رنگ و لزج هستند. اگر پوسیدگی در هوای خشک اتفاق افتد، بافت‌های آلوده به دلیل از دست دادن سریع آب، خشک

می‌شوند. آلودگی به طور عمده از طریق عدسک‌ها، زخم‌ها و انتهای استولون گیاه مادری صورت می‌گیرد. در انبار پوسیدگی غده‌ها، ابتدا در جعبه‌های کوچک شروع می‌شود. اغلب سرعت در نتیجهٔ فساد توده‌ای غده‌ها گسترش می‌یابد (Hooker, 1981; Perombelon and Kelman, 1980).

۲-۲-۲- علائم ساقه سیاه

علائمی که به صورت پوسیدگی سیاهرنگ روی ساقه دیده می‌شود معمولاً از قطعات بذری شروع و ممکن است در چند میلی‌متری بالای ساقه و یا تمام طول آن، توسعه یابد. این علائم در هر مرحله از رشد گیاه ممکن است به وقوع به پیوندد. گیاهان آلوده مخصوصاً در اوایل فصل رشد به صورت راست رشد می‌کنند و اغلب ساقه‌ها از رشد باز می‌مانند. در قسمت بالای ناحیه سیاه شده بافت‌های آوندی ساقه اغلب بی‌رنگ و مغز ساقه پوسیده می‌شود. شاخ و برگ سبزرد شده و حاشیه برگچه‌ها به طرف بالا پیچیده می‌شوند. بتدریج برگچه‌ها و نهایتاً تمام گیاه ممکن است پژمرده شده و به تدریج دچار زوال شده و خشکیده شود. در آب و هوای مرطوب پوسیدگی نرم ساقه، لعابدار بوده و ممکن است گسترش بیشتری یابد. ولی تحت شرایط خشک، بافت آلوده، خشک و چروکیده شده و اغلب به قسمتی از ساقه که در زیرزمین قرار دارد، محدود می‌شود و غده‌های حاصل از گیاه آلوده به ساق سیاه نیز از طریق آوندهای موجود در استولون آلوده شده و می‌پوسند. در غده‌هایی که به این صورت آلوده می‌شوند، پوسیدگی نرم عمدتاً در قسمت‌های مرکزی و داخلی غده مشاهده می‌گردد (Costa *et al.*, 2006; Yahiaoui *et al.*, 2003).

مدت‌ها، میکروارگانیسم عامل ساق سیاه، تنها به باکتری *E. carotovora* subsp. *atroseptica* نسبت داده می‌شد و براین اساس بروز علائم ساق سیاه به عنوان وجه تمایز *E. carotovora* subsp. *atroseptica* و *E. carotovora* subsp. *carotovora* در نظر گرفته می‌شد (Molina and Harrison, 1980) ولی مطالعات سال‌های اخیر نشان داده است که علائم ایجاد شده توسط *E. carotovora* subsp. *carotovora* ،*E. carotovora* subsp. *atroseptica* و *E. chrysanthemi* تحت شرایط مناسب مزرعه، قابل تفکیک و تشخیص نیست (Costa *et al.*, 2006). در آریزونا، *E. carotovora* subsp. *carotovora* به عنوان متداول‌ترین ارگانیسم عامل ساق سیاه در ساقه سیب‌زمینی گزارش شد و در کلرادو *E. carotovora* subsp. *carotovora* را از ساقه‌های آلوده‌ی سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از برخی نواحی آن ایالت، جداسازی گردید (Molina and Harrison, 1980; Stanghellini and Meneley, 1975).

باکتری *E. chrysanthemi* جدا شده از چغندرقند، در شرایط گلخانه‌ای باعث وقوع ساق سیاه روی سیب‌زمینی شد (Duarte *et al.*, 2004). تحقیقات نشان داده که دمای خاک روی فعالیت *E. carotovora* subsp. *atroseptica* و *E. carotovora* subsp. *carotovora* نقش عمده‌ای را ایفا می‌کند. (De Boer and Kelman, 2001).

۲-۲-۳- علائم پوسیدگی نرم روی ریشه هویج، برگ های کاهو و کلم

پوسیدگی نرم باکتریایی باعث نرمی، رنگ پریدگی و لزجی ریشه اصلی هویج می‌شود. فساد، به سرعت قسمت اصلی هویج را از بین می‌برد و اغلب اپیدرم را دست نخورده و سالم رها می‌کند. ممکن است که بوی نامطبوعی در اثر پوسیدگی نرم ایجاد شود. علائم در قسمت‌های هوایی به صورت پژمردگی و زردی برگ‌ها ظاهر می‌شود (Towner and Beraha, 1976). اولین علائم این بیماری روی کاهو ، پوسیدگی لبه‌های برگ‌های پایینی، پژمردگی و تغییر رنگ انتهای ساقه از قهوه‌ای روشن تا قرمز می‌باشد، در نهایت نوک برگ‌های داخلی در اثر پوسیدگی لزج مانندی از بین می‌رود. باکتری‌های عامل بیماری از طریق زخم‌های مکانیکی، حشرات، یخبندان و ریزش باران به روی برگ‌ها پاشیده شده، وارد گیاه می‌شوند. پوسیدگی نرم، در مزرعه، به طور معمول، در زمان بلوغ یا نزدیک به بلوغ، مشاهده می‌شود (Segall and Dow, 1973). در بافت‌های آلوده، گیاهی، در ابتدا نقاط آب سوخته روی بافت گیاه ایجاد می‌شود که به سرعت قطر آن‌ها، گسترش می‌یابد. ناحیه آلوده ، نرم و لزج شده و معمولاً در مراحل پیشرفته بیماری تیره رنگ می‌شود. کلم‌های آلوده به پوسیدگی نرم، همیشه بوی نامطبوعی از خود متصاعد می‌کنند که شاید در نتیجه حمله میکروارگانیسم‌های ثانویه باشد
(Arsenijevic and Obradovic, 1996).

۲-۳- موقعیت تاکسونومیکی جنس *Erwinia*

جنس *Erwinia* اولین بار در سال ۱۹۱۸ توسط Winslow معرفی و برای آن ۶۰ گونه مختلف معرفی گردید (Lelliott and Dickey, 1984). جنس *Erwinia* حداقل دو نوع متفاوت از میکروارگانیسم‌ها را که از نظر ریخت‌شناسی به هم شبیه، اما در بیماری‌زایی و خصوصیات تغذیه‌ای و بیوشیمیای با هم متفاوتند، شامل می‌شود. یک گروه باعث پژمردگی و بافت مردگی خشک می‌شود که گونه *Erwinia amylovora* عامل آتشک گلابی را در برمی‌گیرد و اعضاء گروه دوم باعث پوسیدگی نرم می‌شوند و آنزیم‌های پکتولیتیک ترشح می‌کنند (Avrova *et al.*, 2002). در سال ۱۹۴۵، Waldee پیشنهاد کرد که این دو گروه باید به دو جنس مجزا، شامل *Pectobacterium* برای عامل پوسیدگی نرم و *Erwinia* برای گروه غیر پکتولیتیک منتقل شوند (Graham,1964). در سال ۱۹۷۵، Dowson به طور رسمی با تقسیم‌بندی Waldee به صورت *Erwinia-Pectobacterium* موافقت کرد. با این حال، کاربرد جنس *Pectobacterium* به طور گسترده، پذیرفته نشد و Dye پیشنهاد نمود که تمام گونه‌های موجود در یک جنس تحت نام *Erwinia* باقی بماند و این پیشنهاد توسط Dickey و Lelliott نیز پذیرفته شد

(Graham,1964; Lelliott and Dickey, 1984). گونه‌های جنس *Erwinia* براساس توالی کامل 16S rDNA به سه گروه فیلوژنی، تقسیم شدند. گروه I، اروینیاهای حقیقی را تشکیل

می‌دهد و شامل *E. rhapontici*، *E. psidii*، *E. persicinus*، *E. mallotivora*، *E. amylovora* و *E. tracheiphila* می‌باشد. گروه II شامل *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*، *E. carotovora* subsp. *atroseptica*، *E. carotovora* subsp. *carotovora*، *E. carotovora* subsp. *odorifera*، *E. carotovora* subsp. *wasabiae*، *E. chrysanthemi*، *E. cacticida* و *E. cypripedii* می باشد (Hauben *et al.*, 1998) که به جنس *Pectobacterium* به شرح ذیل انتقال داده شد. (Hauben *et al.*, 1998).

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum*
Pectobacterium carotovorum subsp. *betavasculorum*
Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum*
Pectobacterium carotovorum subsp. *odoriferum*
Pectobacterium carotovorum subsp. *wasabiae*
Pectobacterium cacticidum
Pectobacterium chrysanthemi
Pectobacterium cypripedii

گاردن و همکاران در سال ۲۰۰۳، برپایه‌ی هیبریداسیون DNA-DNA، تاکسونومی عددی ۱۲۰ خصوصیت فنوتیپی، سرولوژی و آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌هایی ژن 16S rRNA که قبلاً گزارش شده بود، زیر گونه‌های *Pectobacterium carotovorum* را به چهار گونه ژنومی تقسیم کردند: گونه ژنومی ۱، زیر گونهٔ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* ، گونه ژنومی ۲، زیر گونه *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum* ، گونه ژنومی ۳، زیر گونه *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* را و گونه ژنومی ۴، زیر گونه *P. carotovorum* subsp. *wasabiae* و زیر گونه *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* را شامل می شود. به طوری که به پیشنهاد ایشان، زیر گونه‌های

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum*.
Pectobacterium carotovorum subsp. *betavasculorum*
Pectobacterium carotovorum subsp. *wasabiae*

به سطح گونه، و به نامهای

Pectobacterium atrosepticum
Pectobacterium betavasculorum
Pectobacterium wasabiae

ارتقاء داده شدند (Garden *et al.*, 2003).

گروه III، شامل گونه‌های *E. paradisiaca*، *E. quercina*، *E. rubrifaciens*، *E. alni*، *E. nigrifluens* و *E. salicis* است که به جنس جدید بنام *Brenneria*. منتقل شدند (Hauben *et al.*, 1998). در سال ۲۰۰۴ ، *Pectobacterium chrysanthemi* نیز به نام جدید *Dickeya chrysanthemi* تغییر نام یافت (Samson *et al.*, 2004).

۲-۴- خصوصیات باکتری‌شناسی جنس *Pectobacterium*

. خصوصیات این جنس به شرح زیر می‌باشد (Lelliott and Dickey, 1984).
یاخته‌های باکتری به صورت میله‌ای راست به اندازه ۳-۱ µm × ۱-۰/۵ معمولاً به صورت تک و در مواردی به صورت زنجیره‌های کوتاه، گرم منفی، غالباً متحرک و عمدتاً دارای تاژک محیطی و بی‌هوازی اختیاری هستند. بهینه دمای رشد آن‌ها °C ۳۰-۲۷ و بیشینه °C ۴۰-۳۲ است. اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت هستند. غالباً از فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، متیل گلوکوزید، سوکرز، مانیتول، مانوز، رایبوز و سوربیتول اسید تولید می‌کنند ولی به ندرت از آدونیتول، دکسترین، دولسیتول و ملی‌بیوز، اسید تولید می‌کنند. استات، فومارات، گلوکونات، مالات و سوکسینات را به عنوان منبع کربن و انرژی مصرف می‌نمایند ولی از بنزوات، اگزالات و پروپیونات، استفاده نمی‌کنند. آنزیم‌های اوره‌آز و لیپاز را به ندرت تولید می‌کنند. آنزیم پکتیناز به وسیله جدایه‌هایی از *D. chrysanthemi*، *P. atrosepticum* و *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* تولید می‌شود
(Duarte *et al.*, 2004). برخی جدایه‌های *P. carotovorum* دارای پلاسمید هستند).
Cronin *et al.*, 1996) آنزیم‌های اوره‌آز و لیپاز را ندرتاً تولید می‌کنند. آنزیم پکتیناز به وسیله سویه هایی از *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*، *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* و *D. chrysanthemi* تولید شده است. سلولاز نیز بوسیله سویه هایی از *P. carotovorum* و *D. chrysanthemi* در حضور کربوکسی متیل سلولز تولید می‌شود. محصول انتهایی تخمیر گلوکز، گاز کربونیک می‌باشد. نشاسته را بیشتر از دکسترین نمی‌تواند هیدرولیز نمایند (Helias *et al.*, 2000; Fessehaie *et al.*, 2002).

۲-۵- خصوصیات گونه‌های *Pectobacterium*

گونه *P. carotovorum* باعث پوسیدگی نرم، به ویژه در بافت‌های ذخیره‌ای طیف وسیعی از گیاهان و نیز باعث بیماری ساق سیاه در سیب‌زمینی می‌گردد. میزان C+G در DNA آن ۵۳/۱٪- ۵۰/۵ می‌باشد (Fiori *et al.*, 2005). مشخصات فنوتیپی این گونه در جدول۲-۱ خلاصه شده است. این گونه، خود به دو زیر گونه تقسیم می‌شود. زیر گونه *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* باعث پوسیدگی نرم، در بافت‌های ذخیره‌ای بسیاری از گیاهان می‌شود. زیر گونه *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*، جدیدترین زیر گونه معرفی شده می‌باشد که باعث پوسیدگی نوعی کاسنی (chicory) می‌شود. این باکتری باعث پوسیدگی برگ‌های در حال رشد گیاه می‌شود که به آن پوسیدگی شیرابه‌ای (slimy rot) می‌گویند. در سال ۱۹۸۰، Samson و همکاران عامل بیماری را یک جدایه غیرعادی *E. carotovora* subsp.

atroseptica (atypical) معرفی کردند. هیبریداسیون DNA-DNA و آزمون‌های بیوشیمیایی، نشان داد که این باکتری متعلق به این گونه است ولی باید در زیر گونه جدیدی قرار داده شود (Gallois *et al.*, 1992). زیر گونه *P. atrosepticum* ، علاوه بر آنزیم پکتیناز، آنزیم سلولاز را نیز داراست و باعث ساق سیاه سیب‌زمینی و پوسیدگی بافت‌های ذخیره‌ای آن می‌شود. میزان C+G آن ۵۳/۱٪+۵۱/۳ می‌باشد. گونه *P. betavasculorum*، از نظر برخی خصوصیات فنوتیپی با دیگر گونه‌های *Pectobacterium* متفاوت است. این گونه باعث پوسیدگی نرم و بافت مردگی آوندی چغندرقند می‌شود و برخی از جدایه‌های آن در دمای ۱۸ و ۲۶ °C ، قادر به ایجاد ساق سیاه روی سیب‌زمینی هستند. در حالی که جدایه‌های سیب‌زمینی، قادر به ایجاد بافت مردگی آوندی در چغندرقند نیستند. میزان C+G در DNA این گونه، ۵۴/۷٪- ۵۴/۴ می‌باشد(Lelliott and Dickey, 1984; Thomson *et al.*, 1981).

گونه *P. wasabiae*، روی Horseradish (*Euterma wasabia*) ایجاد بیماری می‌کند و باعث پوسیدگی نرم در ریزوم‌های Horseradish، قطعات سیب‌زمینی، هویج، تربچه، رگبرگ‌های اصلی کلم چینی و گیاهان گوجه‌فرنگی و تنباکو، می‌شود. ولی روی برنج، ذرت و داوودی، بیماری ایجاد نمی‌کند. تفاوت‌های مهم این گونه با دیگر گونه‌های *Pectobacterium*، عبارت ازعدم ایجاد لخته در شیر لیتموس، رشد در حضور سیانور پتاسیم ۷۵٪ و کلرور سدیم ۵٪، رشد در ۳۲ °C، عدم تخمیر لاکتوز، رافینوز و ملی‌بیوز، میزان C+G در DNA آن ۵۱/۷٪-۵۱/۴ می‌باشد (Goto and Matsumoto, 1987).

۲-۶- خصوصیات گونه *D. chrysanthemi*

اسم این گونه از نام عمومی گل داوودی (*Chrysanthemum*) مشتق شده است. این گونه باعث بیماری پژمردگی آوندی یا مردگی بافت پارانشیمی طیف وسیعی از گیاهان می‌شود. پنج پاتوار برای این گونه تشخیص داده شده است که عبارتند از:

D. chrysanthemi pv. *dieffenbachiae* (*D. chrysanthemi* (I))
D. chrysanthemi pv. *parthenii* (*D. chrysanthemi* (II))
D. chrysanthemi pv. *chrysanthemi* (*D. chrysanthemi* (III))
D. chrysanthemi pv. *dianthicola* (*D. chrysanthemi* (V))

زیر گروه I جدایه‌هایی را در برمی‌گیرد که از میزبان‌های نسبتاً نزدیک به هم جدا شده‌اند. زیر گروه II، جدایه‌هایی که از یک میزبان خاص جدا شده‌اند و زیر گروه IV، جدایه‌هایی که از گروه مختلفی از گیاهان میزبان جدا شده‌اند (جدول ۲-۲). براساس سه خصوصیت فنوتیپی (تولید فسفاتاز، تولید گاز از گلوکز و عدم تولید اسید از تری‌هالوز) این گونه از دیگر گونه‌های جنس *Pectobacterium* تفکیک می‌شود (Dickey, 1979).

۲-۷- تاریخچه بیماری در ایران

اولین بار در سال ۱۳۴۶ حجاورد، یک باکتری را از پیازهای پوسیده غده سیکلامن جدا ، آن را به عنوان *Erwinia* معرفی نمود. سپس امانی با انجام برخی آزمون‌های فنوتیپی، گونه باکتری را *E. corotovora* تشخیص ولی اشاره‌ای به زیر گونه آن نکرد (امانی، ۱۳۴۶ و حجارود، ۱۳۴۶). بهار و دانش در سال ۱۳۶۵ بیماری ساق سیاه سیب‌زمینی را از اصفهان گزارش کردند و عامل آن را *E. carotovora* subsp. *atroseptica* معرفی نمودند (بهار و دانش، ۱۳۶۵). عرب و رحیمیان در سال ۱۳۶۸، پوسیدگی ساقه و دمبرگ دیفن باخیا را در بعضی از گلخانه‌های آمل مشاهده نموده، عامل آن را *E. carotovora* subsp. *carotovora* معرفی نمودند (عرب و رحیمیان، ۱۳۶۸). یک باکتری عامل پوسیدگی نرم، از نمونه‌های پاجوش و طوقه موز منطقه چهابهار، جداسازی شد و بر اساس آزمون های بیوشیمیایی ، فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی، به عنوان زیر گونه‌ی از *E. carotovora* تشخیص و معرفی گردید (حسن زاده، ۱۳۶۹). در زمینه پراکندگی اروینیاهای پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در ایران، بررسی‌هایی انجام شد و *E. carotovora* subsp. *atroseptica* و *E. carotovora* subsp. *carotovora* به عنوان عوامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در مناطق مختلف ایران، معرفی شده است (فریدونی و همکاران، ۱۳۷۷). ظهور پرالک و همکاران ، عوامل مولد پوسیدگی نرم و ساق سیاه سیب‌زمینی را در استان فارس جدا کرده و به عنوان *E. carotovora* subsp. *carotovora* و *E. carotovora* subsp. *atroseptica* معرفی نمودند (ظهور پرالک و همکاران، ۱۳۷۷). عامل لهیدگی ساقه ذرت در استان مازندران نیز *E. chrysanthemi* معرفی گردید (احمدوند و رحیمیان، ۱۳۷۹). سلطانی نژاد و همکاران بر پایه آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی جدایه های پکتوباکتریوم را در چهار گروه قرار دادند. جدایه های گروه اول، دوم و چهارم بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی فیزیولوژیکی افتراقی به *D. chrysanthemi* و جدایه های گروه سوم به *Pcc* شباهت داشتند. نقوش الکتروفورزی جدایه ها بیانگر تنوع و تفاوت قابل ملاحظه ای در بین آنها بود. (سلطانی نژاد و همکاران، ۱۳۸۴). باکتری های جدا شده از گیاه لاله واژگون بر اساس آزمون های بیماری زایی، بیوشیمیایی و استفاده از آغازگرهای اختصاصی تحت عنوان Pcc شناسایی شدند (Mahmoudi et al., 2007). پکتوباکتریوم های جدا شده از چغندرقند بر اساس خصوصیات فنوتیپی و آنالیز پروتئینی تنوع قابل توجهی را نشان دادند (Fassihani and Nedaeinia, 2008). عامل پوسیدگی جوانه مرکزی نخل در استان فارس باکتری های *D. chrysanthemi* و *Pcc* معرفی شدند (جعفری و تقوی، ۱۳۸۶). جدایه ها از نظر خصوصیات فنوتیپی، بیماری زایی، نقوش الکتروفورز پروتئین ها و اندازه قطعات تکثیر شده در حضور آغازگرهای اختصاصی در واکنش PCR مورد مقایسه قرار گرفتند. ویژگی های فنوتیپی و ملکولی باکتری عامل پوسیدگی طوقه و ساقه برنج در مازندران مورد بررسی قرار گرفته است. به رغم شباهت

فنوتیپی زیاد با *Dickeya* جدایه ها در مصرف سوربیتول و تری هالوز با گونه های این باکتری تفاوت داشتند. (خادملو و همکاران، ۱۳۸۷).

۲-۸- بیماری‌زایی

چندین عامل در بیماری‌زایی پکتوباکتریوم‌های عامل پوسیدگی نرم، دخالت دارند که عبارتند از: آنزیم‌های برون یاخته‌ای بیمارگر که دیواره گیاه را تخریب می‌کنند و شامل پکتینازها، سلولازها و پروتئازها می‌باشند و ساختارهای موجود در سطح یاخته باکتری مثل پیلی‌ها، تاژک‌ها، لیپوپلی‌ساکاریدها، لایه‌های مخاطی اگزوپلی‌ساکاریدی و پروتئین‌های غشاء خارجی که نقش بقاء باکتری درون گیاه میزبان را ایفا می‌کنند (Perombelon and Salmond, 1995; Salmond, 1994).

پکتین لیازها (pectin lyase) فرم متیله شدهٔ اسید پلی‌گالاکتورونیک را مورد حمله قرار می‌دهند. پکتین ترانس المیناز (Pnl) ترجیحاً پکتین را می‌شکند و شامل دو فرم exo و endo می باشد. بافت‌های گیاهی دارای موادی هستند که Pnl را القاء می‌کنند. Pnl در چندین سویه بیماری‌زای *D. chrysanthemi* و *Pcc* قابل القاء نیست. پکتین متیل لیاز (Pme) گروه‌های متیلی را از گروه‌های کربوکسیل مواد پکتینی از طریق هیدرولیز کردن حذف می‌نماید. بنابراین نقشی در شکستن ترکیبات پکتینی ندارد. ولی نقش آماده‌سازی یا آسان‌سازی در شکستن آن‌ها را به وسیله سایر آنزیم‌های پکتیناز بعهده دارد. Pme برای بیماری‌زایی روی بنفشه آفریقایی لازم بوده و موتاسیون شدت بیماری‌زایی آن را کاهش می‌دهد (Barras *et al.*, 1994; Goto, 1992;Salmond and Permobelon, 1995).

پکتات لیازها (Pl) پلی‌گالاکتورونیک اسید ترانس المینازها (PATE) هستند که اسید پکتیک را ترجیحاً می‌شکنند و شامل دو فرم endo pl و یا exo pl می‌باشند. محصول نهایی فعالیتشان گالاکتورونیک اسید اشباع یا غیراشباع یا اولیگوگالاکتورونیک اسید است (Goto, 1992). ایزوزیم‌های pl زیادی در یک گونه یا سویه ساخته می‌شود، اکثر سویه های *D. chrysanthemi* در حضور پلی‌کالاکتورونیک اسید پنج pl شامل A، B، C، D و E را ترشح می‌نمایند (Chatterjee, 1980; Collmer and Keen, 1986). در *Pca* و *Pcc* سه تا چهار pl (A, B, C, D)ساخته می‌شود. گرچه در بعضی سویه ها فقط PLهای D, C ترشح شده‌اند (Permobelon and Salmond, 1995).

پلی‌گالاکتورونازها (polygalacturonase) عمدتاً اسید پکتیک را می‌شکنند و آن را بر پکتین ترجیح می‌دهند. نوع endo آن بطور اتفاقی و از هر نقطه‌ای واحدهای گالاکتورونیک را از هم جدا می‌کند و اسید اولیگوگالاکتورنیک تولید می‌کند. نوع exo آن واحدهای تک اسید گالاکتورونیک را از زنجیره جدا می‌کند و باعث افزایش شدید قدرت احیاءکنندگی محصول