فصلنامه گیاه‌پزشکی
دانشگاه آزاد اسلامی شیراز
۱۳۹۷ - ۹ (۳) : ۱۸۵-۱۹۶

شناسایی و جداسازی بیماری پوسیدگی نرم سیب زمینی با روش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی از دامنه اصفهان

طاهره شکیبافرد[۱*]، مسعود بهار[۱]، مجید اولیا[۲]، هادی کریمی‌پور فرد[۳]

(۱) (*) گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. tahereshakiba@gmail.com

(۲) گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

(۳ بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کهگیلویه و بویراحمد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۹ **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۸/۰۳/۰۵

چکیده

بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی یکی از بیماری‌های مهم روی سیب‌زمینی می‌باشد. به این منظور طی نمونه‌برداری‌های انجام شده از ۱۵ غده پوسیده دارای علائم لهیدگی، یک نوع باکتری گرم منفی دارای کلنی سبز متالیک بر روی محیط کشت EMB به دست آمد که بر اساس آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فعالیت پکتولیتیکی متعلق به جنس *Pectobacterium* تشخیص داده شد. تمامی این باکتری‌ها توانایی هضم نشاسته را نداشته، نسبت به اریترومایسین حساس نبودند؛ فسفاتاز منفی و توانایی رشد در ۳۷°C را داشتند. آنها قادر به استفاده از قندهای زایلوز، تری‌هالوز، آلفا متیل- D گلوکوزید و مالونات نبوده و از قندهای اینوزیتول، رامنوز و آرابیتول استفاده می‌کردند. با توجه به این خصوصیات این باکتری به‌عنوان *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* ایجاد نمودند که تحت تأثیر آنزیم برشی *RsaI* به قطعاتی حدود ۳۵۵bp، ۲۸۰ bp و ۱۸۰ bp تقسیم شدند. نتایج به دست آمده از روش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی یکسان بودن جدایه‌های باکتریایی به دست آمده از غده‌های سیب‌زمینی منطقه دامنه و تعلق آنها به *P. carotovorum* subsp. *caratovorum* را مورد تأیید قرار داد.

واژه‌های کلیدی: بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی، باکتری، *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

مقدمه

سیب‌زمینی(*Solanum tuberosum* L.) ، محصول بومی آمریکای جنوبی می‌باشد. دانشمندان آمریکایی دریافتند که سرمنشأ انواع سیب‌زمینی‌های امروزی را می‌توان به یک گیاه مشترک که بیش از هفت هزار سال قبل در پرو کشت شده است، نسبت داد. سیب‌زمینی نخستین بار در ایران توسط سرجان ملکم، در اواسط پادشاهی فتحعلی شاه قاجار، به ایران آورده شد که در ابتدا به آن

آلوی ملکم می‌گفتند. این سیب‌زمینی‌ها ابتدا در روستای پشند تهران کاشته شدند، سپس به فریدن اصفهان و پس از آن به سایر نقاط کشور برده و کشت شدند (Jafar Pour, 1991; Vazin Afzal & Aezami Sarduie, 2012).

بروز بیماری های مختلف در سیب‌زمینی به لحاظ اقتصادی مهم می‌با شد و تلاش برای شنا سایی و کنترل این بیماری ها در تولید مناسب ضروری است. بیماری های باکتریایی گیاهان در هر نقطه‌ای که به قدر کافی مرطوب باشد، رخ می دهند (Mehavaran, 1997). گیاه سیب زمینی در دمای ۵ تا ۲۵ درجه سلسیوس بهترین رشد را دارد. دماهای بالا و بارندگی های نامنظم و طولانی، خطر ابتلاء این گیاه به بیماری های باکتریایی را افزایش می دهد. پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم جزء باکتری هایی هستند که وابسته به تغییرات آب و هوا می باشند و ممکن است از یک گونه به گونه ای دیگر بر اساس شرایط محیطی تغییر یابند و منجر به گسترش گونه سازگارتر شوند (Bhat et al., 2018; Jafar Pour, 1991).

گونه و زیرگونه های عوامل بیماری پوسیدگی نرم سیب زمینی متعلق به سلسله Prokaryotae راسته Enterobactriales ، خانواده Enterobacteriaceae و جنس Pectobacterium می با شند. در تحقیقات صورت گرفته با بررسی غده های آلوده سیب زمینی به پوسیدگی نرم مشخص شده است که دماهای حدود ۲۵ درجه سلسیوس برای رشد *P. carotovora* و دمای بالاتر از آن برای رشد *D. chrysanthemi* و درجه حرارت پایین تر از آن برای رشد *P. atroseptica* مناسب می باشد (Haverkort &Verhagen, 2008; Idrissi et al., 2017). از جمله مهم ترین عوامل باکتریایی بیماریزا روی سیب زمینی می توان به عامل ساق سیاه سیب زمینی Pectobacterium atrosepticum و پوسیدگی نرم سیب زمینی Pectobacterium carotovorum pv. carotovorum اشاره نمود (Bhat et al., 2018; Jafar Pour, 1991).

بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی اولین بار با نام پوسیدگی نرم هویج از آمریکا گزارش شد (Dye, 1969). پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم سیب زمینی از نقاط مختلف ایران از جمله اصفهان، خوزستان، فارس، مناطق شمال، کردستان و اردبیل گزارش شده است (Baghaee Ravari et al., 2010; Firuz, 2004; Khodaygan et al., 2015; Rezae, 2008; Salati & Ghasemi, 2004; Zamani et al., 2010; Zohour et al., 1998).

غده های بذری سیب زمینی پس از کاشت، یا غده های تولید شده قبل از برداشت و یا غده های انباری ممکن است به پوسیدگی نرم آلوده شوند. آلودگی به طور عمده در مزرعه از طریق عدسک ها، زخم ها و انتهای ساقه های رونده زیرزمینی گیاه مادری اتفاق می افتد. علائمی که مربوط به عدسک ها می شوند، مناطقی گرد با کمی فرورفتگی آبکی متمایل به قهوه ای 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. شکل خسارات ایجاد شده بوسیله باکتری ممکن است به صورت فرورفتگی نامنظم باشند و معمولاً قهوه ای تیره هستند (Hooker, 1981; Mehravaran, 1997) در انبارها معمولاً زمانی که غده ها آسیب مکانیکی دیده باشند، یا در حضور دیگر بیماری ها، یا زمانی که از قارچ کش ها به طور وسیع استفاده شود و غده ها خیس بمانند و یا ضایعات آب در انبارها زمینه را برای انتقال از یک غده به غده دیگر فراهم آورد، آلودگی بیشتر می شود (AL-Mughrabi, 2010; Onkendi & Moleleki, 2014).

زمستان گذرانی پکتوباکتریوم ها در خاک و غده های آلوده می باشد. غده های آلوده در انبار و بقایای گیاهی در خاک، منابع اصلی آلودگی محسوب می شوند که به عنوان مایه تلقیحی ممکن است در داخل و یا سطح غده مادری باشند. در طول فصل رشد، این

غده ها پوسیده شده و مقادیر زیادی باکتری را وارد خاک می کنند؛ از این رو آلودگی پنهان غده مادری، مسئله مهمی است. مقدار آلودگی غده های مادری از فصلی به فصل دیگر بر اساس شرایط محیطی متفاوت است. باکتری ها ممکن است از طریق عدسک ها، شکاف های رشدی یا زخم های ایجاد شده در اثر عملیات زراعی حین برداشت یا لارو برخی حشرات که روی بقایای گیاهی آلوده در مزرعه به باکتری آلوده شده اند، وارد بافت شده و در زمان انبارداری در غده ها باقی بمانند (Abu-Obeid et al., 2018; Etebarian, 2002; Hooker, 1981). با ورود باکتری های مولد پوسیدگی به زخم ها، باکتری ها از سلول های متلاشی شده سطح زخم تغذیه کرده و تکثیر می یابند. این باکتری ها آنزیم های پکتین تیغه های میانی و دیواره سلولی را تجزیه کرده و باعث خرد شدن بافت ها می شوند. آنزیم های سلولاز با تجزیه نسبی و نرم کردن دیواره سلولی باعث تراوش آب داخل پرتوپلاست به داخل فضای بین سلولی شده در نتیجه سلول ها پلاسمولیز شده و می میرند. باکتری ها به پیشرفت خود به داخل فضاهای بین سلولی ادامه داده و تکثیر می شوند و در همین حال آنزیم های آن ها پیشاپیش حرکت کرده و بافت ها را برای ورودشان آماده می کنند. هیدرولیز مواد پکتیکی و تراوش آب از پروتوپلاست ها به داخل فضای بین سلولی به نرم شدن بافتهای مورد حمله و تبدیل شد نشان به توده ای از لعاب منجر می گردد که حاوی تعداد بیشماری باکتری است. این باکتری ها از طریق شکاف های اپیدرمی خارج شده و وارد خاک می شوند و از طریق ذرات خاک یا در تماس با دیگر اندام های نرم موجب آلودگی های بعدی می گردند و به این ترتیب مجدداً سیکل زندگی روی گیاه دیگر ادامه می یابد (Mehravaran, 1997).

میزان رشد و باروری گیاهان به عوامل محیطی چون آب و خاک، نور و حرارت، و در نهایت ایمنی آن ها در مقابل عوامل نا مساعد بستگی دارد. هر عاملی که سلامت گیاهان را به مخاطره اندازد، در میزان رشد و باروری آن ها تأثیر منفی گذاشته و از ارزش آن ها می کاهد. بنابراین مطالعه بیماری های گیاهی بعلت خسارات وارد شده به گیاهان و فرآورده های آن ها و نیز محدود ساختن کاشت یک گیاه در یک منطقه یا کشور، اهمیت زیادی دارد (Mehravaran, 1997).

بروز بیماری های مختلف در سیب زمینی از لحاظ اقتصادی نیز مهم می باشد و تلاش برای کنترل این بیماری ها برای تولید مناسب محصول ضروری است. با توجه به اهمیت بیماری در منطقه دامنه اصفهان، بررسی گونه باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب زمینی حائز اهمیت می باشد. شناسایی پکتوباکتریوم های مولد پوسیدگی نرم سیب- زمینی به علت علائم مشابهی که روی گیاه سیب زمینی ایجاد می کنند دشوار است، به همین علت با مشاهده علائم ظاهری تنها می توان بیماری را تشخیص داد اما این مسئله که بیماری توسط کدامیک از گونه ها و زیر گونه های *Pectobacterium* ایجاد شده است، با آزمون های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و روش های مولکولی امکان پذیر است.

مواد و روش‌ها

* جداسازی عامل بیماری باکتریایی از غده‌ها

طی بازدید مزارع مختلف منطقه دامنه اصفهان، در هر مزرعه چندین غده سیب زمینی که علائم پوسیدگی نرم را نشان می‌دادند، انتخاب شدند. سیب زمینی‌های آلوده با آب معمولی کاملاً شسته شده و پس از مشاهده لهیدگی روی سطح غده‌ها، مقداری از بافت سطحی با اسکالپل استریل برش داده شد. در زیر قسمت‌های برش داده شده، بافت‌های لهیده‌ای با حاشیه قهوه‌ای تیره وجود داشت که با کمک لوپ استریل در حضور شعله، مقدار جزئی از این بافت‌ها برداشته و به صورت خطی روی محیط Eosin Methylen-blue (EMB) کشت داده شد. محیط‌های کشت در انکوباتور $۲۸^{°C}$ نگهداری شدند و پس از ٤٨ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

* شناسایی پکتوباکتریوم‌ها بر اساس مشخصات مورفولوژیکی

جهت انجام آزمون لهیدگی ورقه‌های سیب زمینی (Potato rot test) ، ابتدا سیب زمینی سالم شسته و استریل شده و به کمک اسکالپل، به قطعات کوچک تقسیم گردیده و در پتری‌های استریل چهار قسمتی قرار داده شدند. از پتری‌های محتوی باکتری‌های رشد یافته روی محیط EMB، یک لوپ برداشته و در مرکز قطعات قرار گرفت. در هر پتری یک نمونه به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. در مرکز پتری‌ها مقداری پنبه استریل جهت حفظ رطوبت قرار داده و سپس پتری‌ها در $۲۸^{°C}$ انکوبه شدند. در صورت لهیده شدن بافت سیب زمینی پس از ۲۴ ساعت، یک لوپ از قسمت لهیده روی محیط‌های EMB و Nutrient Agar (NA) به صورت خطی کشیده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور $۲۸^{°C}$ قرار داده شدند (Etebarian, 2002; Rezae, 2008).

* آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تفکیک پکتوباکتریوم‌ها

جهت تفکیک پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم در غده‌های سیب زمینی از آزمون‌های بیوشیمیایی مانند توانایی رشد در $۳۷^{°C}$، واکنش فسفاتاز، حساسیت به اریترومایسین، استفاده از قندهای اینوزیتول، رامنوز، زایلوز، تری‌هالوز، آلفا متیل- D گلوکوزید ، آرابیتول، مالونات و توانایی هضم نشاسته استفاده شد (Darassae *et al*., 1994; Mehravaran, 1997; Schaad *et al*., 2001).

* روشهای مولکولی جهت تفکیک پکتوباکتریوم‌ها

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روشی دقیق، سریع و کم هزینه نسبت به روش‌های بیوشیمیایی، برای شناسایی پکتوباکتریوم‌های آلوده کننده سیب زمینی است (Abu-Obeid *et al*., 2018; Darassae *et al*., 1994; De Bore & Ward, 1995; Kang *et al*., 2003; Nassar *et al*., 1996).

* استخراج DNA از باکتری‌ها به روش جوشانیدن و فریز

از باکتری‌های جدا شده از بافتهای آلوده با کشت روی محیط NA، جمعیتی خالص از باکتری‌ها جهت استخراج DNA به دست آمد. از حاشیه پرگنه جدایه‌های باکتریایی روی محیط NA یک لوپ برداشته شد و به لوله‌های محتوی ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. لوپ به آرامی درون لوله حرکت داده شد تا باکتری از لوپ به آب مقطر استریل منتقل شود. پس از ورتکس، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش در حمام بن ماری و سپس ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. در این مرحله دیواره سلولی باکتری‌ها متلاشی شده و محتویات آن بیرون می‌ریزد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ سانترفیوژ شدند. در این مرحله با رسوب ناخالصی‌ها، DNA باکتری‌ها در مایع شفاف رویی قرار می‌گیرند. این مایع به لوله‌های استریل منتقل و در فریزر ۲۰- جهت انجام PCR نگهداری شدند (Erinle, 1975).

* شناسایی گونه و زیرگونه‌های پکتوباکتریوم بر اساس PCR

در روش مولکولی از آغازگر G1/L1 بر اساس ناحیه۱۶S-23S rRNA Intergenic Transcribed Spacer (ITS) استفاده شد. با استفاده از این آغازگر با انجام یک واکنش PCR و بر اساس الگوی باندی ایجاد شده باکتری‌های *Pa*، *Dch* و *Pcc* از یکدیگر و از سایر عوامل پوسیدگی نرم تشخیص داده می‌شوند. به لحاظ سرعت عمل و کاهش هزینه آزمایشات، استفاده از این آغازگر اهمیت زیادی دارد (Jensen *et al*., 1993).

* انجام برش آنزیمی RFLP

آنالیز RFLP روشی است که بیشتر برای تأیید شناسایی زیرگونه‌ها بوسیله آنزیم برشی *RsaI* استفاده می‌گردد. پس از انجام PCR و سپس برش آنزیمی روی محصول PCR با آنزیم‌های محدودگر، گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس پکتوباکتریوم شناسایی گردیدند (Waleron *et al*., 2002).

از محصولات PCR که باندهای قوی بر روی ژل الکتروفورز ایجاد نموده بودند و با توجه به غلظت محصول تولید شده، شش تا نه میکرولیتر جهت انجام RFLP استفاده شده است. الکتروفورز محصول PCR-RFLP با آنزیم برشی *RsaI*، در واکنش ۱۵ میکرولیتری به مدت سه ساعت با ولتاژ ۸۰ روی ژل آگارز ۲% الکتروفورز شد. برای سنجش سایز باند در کنار نمونه‌ها از Ladder استفاده شد.

نتایج و بحث

در بررسی‌های پیشین بر روی نمونه‌های غده سیب زمینی از مزارع متفاوت منطقه دامنه، معلوم گردید که بیماری پوسیدگی نرم غده‌های سیب زمینی در این منطقه وجود دارد.

* شناسایی عامل باکتری با استفاده از روشهای مورفولوژیکی

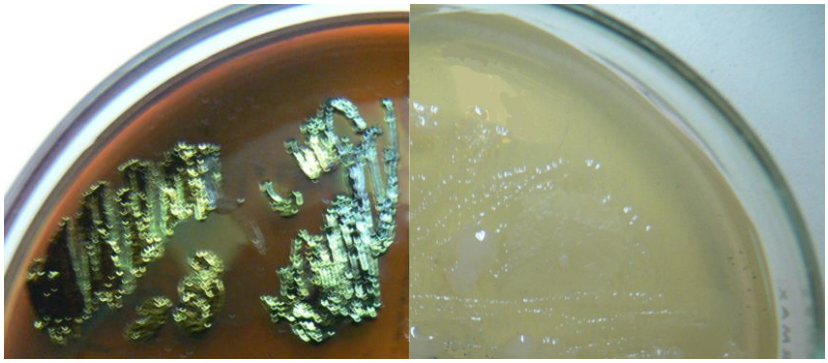
کشت ناحیه‌ای از بافت‌های آلوده دارای علائم باکتری با حاشیه‌های سیاه و قهوه‌ای (شکل ۱و۲) روی محیط EMB، تعداد زیادی پرگنه به رنگ سبز متالیک بدست آمد که روی محیط NA رنگ کلنی‌ها شیری رنگ با حاشیه نامنظم بود (شکل۳). بر اساس رنگ سبز متالیک درخشان ایجاد شده بر روی محیط EMB جنس باکتری‌های بدست آمده *Pectobacterium* sp. تشخیص داده شدند.

شکل ۱ - لهیدگی بافت سیب زمینی با حاشیه سیاه

Figure 1. Potato Soft rot with black margin

شکل ۲- لهیدگی بافت سیب زمینی با حاشیه قهوه‌ای

Figure 2. Potato Soft rot with brown margin



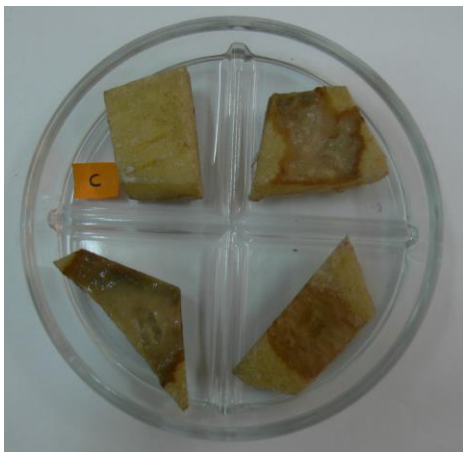
(B) (A)

شکل ۳- تشکیل پرگنه جدایه‌های باکتریایی بدست آمده از غده‌های لهیده. (A) پرگنه‌های شیری رنگ روی محیط NA (B) پرگنه‌های سبز متالیک روی محیط EMB

Figure 3. Bacteria of rot tubers. (A) Milky Bacteria on NA (B) Metallic Green Bacteria on EMB

باکتری‌های کشت داده شده از غده‌های مبتلا به پوسیدگی سیب زمینی، پس از ۲۴ ساعت آزمون لهیدگی ورقه‌های سیب زمینی، وجود پوسیدگی نرم همراه با حاشیه قهوه‌ای در اطراف لهیدگی در ورقه‌های سیب زمینی (شکل۴) تأییدی بر تشخیص جنس *Pectobacterium* sp. است.

جدایه‌های مورد بررسی به همراه رقم، علائم و محل جمع‌آوری نمونه‌ها در (جدول ۱) آورده شده است.



شکل ٤ - آزمون لهیدگی ورقه‌های سیب زمینی در کنار نمونه شاهد

Figure 4. Potato Rot Test with control sample

جدول ۱ - جدایه‌های پکتوباکتریوم جداسازی شده از غده‌های سیب زمینی منطقه دامنه

Table 1. Isolates of *Pectobacterium* from infected tubers of Damaneh Region

Isolate	Symptom	Cultivar	Place of collection
Pcc 9	Black and shrunk on tuber surface	Agria	Komeitak
Pcc 10	Black and shrunk on tuber surface	Agria	komeitak
Pcc 11	Black and shrunk on tuber surface	Komeitak	Agria
Pcc 12	Black and rot on tuber surface	Santana	Ghahiz
Pcc 13	Black and rot on tuber surface	Santana	Ghahiz
Pcc 14	Black and rot on tuber surface	Santana	Ghahiz
Pcc 15	Rot on tuber surface	Marfona	Tiran
Pcc 16	Rot on tuber surface	Marfona	Tiran
Pcc 17	Rot on tuber surface	Maradona	Ghahiz
Pcc 18	Brown rot with dark margin on tuber surface	Marfona	Ghahiz
Pcc 19	Rot on tuber surface	Marfona	Ghahiz
Pcc 20	Rot with black margin on tuber surface	Marfona	Ghahiz
Pcc 21	Rot on tuber surface	Marfona	Ghahiz
Pcc 1B	Rot on tuber surface	unknown	Ghahiz
Pcc 2A	Rot on tuber surface	unknown	Ghahiz
Pcc-SCR	Rot on tuber surface	unknown	England
Pa-SCRI	Rot on tuber surface	unknown	England
Dch 13	Rot on tuber surface	unknown	Isfahan

* شناسایی پکتوباکتریوم‌ها بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی

جدایه‌های به دست آمده، سلول‌های میله‌ای و متحرک داشته، گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و اکسیداز منفی ارزیابی شدند. در آزمون هضم نشاسته، با افزودن ید و یدوره روی محیط محتوی نشاسته، اطراف کلونی‌های باکتری هیچ هاله‌ای تشکیل نشد که نشانه عدم هضم نشاسته بود. تمامی این جدایه‌ها همچنین توانایی رشد در $37^{\circ}C$ را داشته، واکنش فسفاتاز منفی داشتند و نسبت به اریترومایسین حساس نبودند. آنها قادر به استفاده از قندهای اینوزیتول، رامنوز و آرابیتول بوده و از قندهای زایلوز، تری‌هالوز، آلفا متیل- D گلوکوزید و مالونات استفاده نمی‌کردند. نتایج حاصل از این آزمون‌ها در (جدول ۲) آورده شده است. این نتایج در تمام جدایه‌ها مشترک بود. با انجام آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، مشخص شد که تمامی پکتوباکتریوم‌های استخراجی از مزارع دامنه متعلق به سویه *Pcc* می‌باشند.

جدول ۲- آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص سویه *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Table 2. Biochemical Tests for Identification of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

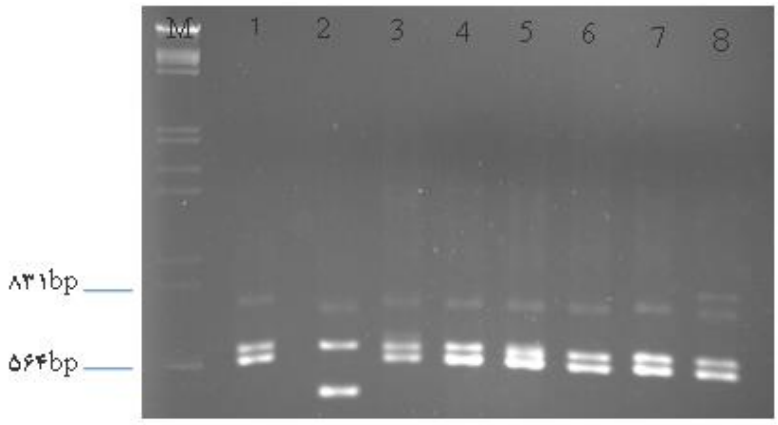
Isolate Test	*Pcc21*	*Pcc29*	*Pcc* 16	*Pcc14*	*Pcc2A*
Gram	-	-	-	-	-
Oxidase	–	–	–	–	–
Growth 37˚C	+	+	+	+	+
Sensitivity to Erythromycin	-	-	-	-	-
Digestion of Starch	-	-	-	-	-
Potato rot	+	+	+	+	+
Phosphatase	-	-	-	-	-
Arabitole	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+
Trehalose	-	-	-	-	-
α-methyl D-glycoside	-	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-

* شناسایی پکتوباکتریوم‌ها بر اساس روش‌های مولکولی

پس از اینکه جدایه‌ها بر ا ساس روش بیو شیمیایی به عنوان *Pcc* شنا سایی شدند، جهت تأیید تشخیص باکتری‌های مورد برر سی، واکنش PCR، با استفاده از آغازگر G1/L1، انجام گرفت. با استفاده از این آغازگر در جدایه *Pcc*، دو نوع الگوی باندی ایجاد شد. در کنار نمونه‌ها، سویه *Dch*13 (Firouz, 2004) و SCR – *Pcc* (انگلستان)، به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت الکتروفورز شدند (شکل۵).

به این ترتیب، بر ا ساس آزمون‌های بیو شیمیایی و روش‌های مولکولی، باکتری عامل پو سیدگی نرم غده‌های سیب- زمینی در منطقه دامنه *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*، تشخیص داده شد. به نظر می‌رسد که *Pcc* باکتری غالب پوسیدگی نرم غده سیب زمینی دراین منطقه می‌باشد. همچنان که در تحقیقات گذشته بر اساس نتایج بیوشیمیایی و مولکولی به دست آمده روی سیب زمینی، *Dch* و *Pcc* به ترتیب به عنوان بیمارگرهای غالب ایجاد کننده ساق سیاه و پوسیدگی نرم سیب زمینی در اصفهان معرفی گردیدند (Firouz, 2004).

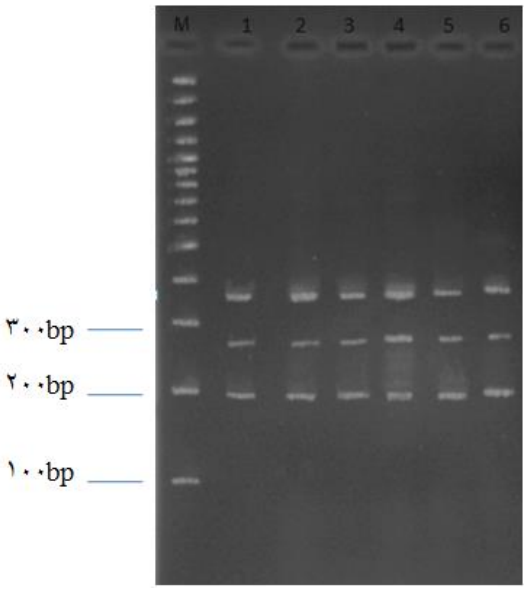
برش آنزیمی *Rsa*I محصول PCR، الگوی سه باند با اندازه‌های ۳۵۵ bp و ۲۸۰ bp و ۱۸۰ bp را ایجاد نمود (شکل۶). نتایج مولکولی به دست آمده از این بررسی با مطالعات قبلی مطابقت دارد و این تأییدی بر شناسایی سویه *Pcc* می‌باشد (Firouz, 2004).



شکل ۵- ایجاد دو نوع الگوی باندی توسط آغازگر G1/L1 در آزمون PCR.

M: مارکر،۱: *Pcc* - SCR (انگلستان)، ۲: *Dch* (Firouz, 2004) ، ۳: *Pcc*1B، ۴: *Pcc*2A، ۵: *Pcc*14، ۶: *Pcc*16، ۷: *Pcc*20، ۸: *Pcc*21.

Figure 5. Formation of two band pattern following PCR amplification with G1/L1 primers.
M: Marker,1:(England) *Pcc*-SCR, 2: *Dch* (Firouz, 2004), 3: *Pcc*1B, 4: *Pcc*2A, 5: *Pcc*14, 6: *Pcc*16, 7: *Pcc*20, 8: *Pcc*21.



شکل ۶- الگوی برش آنزیمی محصول PCR جدایه‌های پکتوباکتریوم منطقه دامنه تحت برش آنزیمی *Rsa*I که به عنوان *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* مشخص شده است.

M مارکر، ۱: *Pcc*2A، ۲: *Pcc*1B، ۳: *Pcc*14، ۴: *Pcc*16، ۵: *Pcc*20، ۶: *Pcc*21

Figure 7. Digestion of PCR product with *Rsa*I restriction enzyme resulted in identical bands formation as described for *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*
M: Marker,1: *Pcc*2A, 2: *Pcc*1B, 3: *Pcc*14, 4: *Pcc*16, 5: *Pcc*20, 6: *Pcc*21

سپاس گزاری

بدین وسیله نویسندگان از بخش گیاهپزشکی دانشگاه صنعتی اصفهان که وسایل و تسهیلات مورد نیاز جهت انجام این پروژه را در اختیار اینجانب قرار دادند، صمیمانه تشکر می نمایند.

منابع

Abu-Obeid, I., Khlaif, H., Salem, N. 2018. Detection and Identification of Potato Soft Rot *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by PCR Analysis of 16S rDNA in Jordan. *Agricultural Sciences*, 9: 546-556.

AL-Mughrabi, K. 2010. *Bacterial soft rot of potatoes*. New Nouveau Press, Brunswick, Canada.

Baghaee Ravari, S., Rahimian, H. & Shams Bakhsh, M. 2010. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical & molecular methods. *Europian Journal of Plant Pathology*, 13: 413-425.

Bhat, K. A.,Viswanath, H.S., Bhat, N.A. & Wani, T.A. 2018. Bioactivity of various ethanolic plant extracts against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot of potato tuber. *Journal of Indian Phytopathology*, 70 (4): 463-47.

Darassae, A., Priou, S., Kotoujansky, A. & Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of *Pel* gene as a tool to identity *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1437-1443.

De Bore, S.H. & Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85:854-858.

Dye, D.W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia* II The carotovora groups. *New Zealand Journal of Science*, 12: 81-97.

Erinle, I.D. 1975. Blackleg of potatoes: Induction through tuber inoculation. *Plant Pathology*, 24: 172-175.

Etebarian, A. 2002. *Vegetables diseases and Methods of controls*. Tehran University Press, Tehran, Iran.

Firouz, R. 2004. *Etyology of potato soft rot and black leg in Isfahan province*, M.Sc. Thesis, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Haverkort, A.G. & Verhagen, A. 2008. Climate Change and Its Repercussions for the Potato Supply Chain. *Potato Research*, 51: 223-237.

Hooker, W.J. 1981. *Compendium of potato diseases*. American Phytopathological society Press, American, USA.

Idrissi, N.S., Abdessamad, A., Senhaji, M.A., Quarzane, A., Chaker, A. & Elantri, S. 2017. Prevalence of the Pectolytic Enterobacterial Diseases in the Major Potato Producing Regions in Morocco. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 10: 42-49.

Jafar Pour, A. 1991. *Potato diseases*, Jahad daneshgahi Press, Mashhad, Iran.

Jensen, M.A., Webster, J.A. & Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on basis of Polymerase Chain Reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 945-952.

Kang, H.W., Kwon, S.W. & Go, S.J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant pathology*, 52: 127-133.

Khodaygan, P., Hatani Giglu, R. & Baghaee Ravari, S. 2015. Identification of Potato soft & black leg on potato in Ardebil province. *Journal of Plant Protection*, 29: 273-282.

Mehravaran, H. 1997. *Plant Pathology*. Urmia University Press, Urmia, Iran.

Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin C., Vedel, R. & Bertheau, Y. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozym polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified of *pel genes*. *Applied Environmental Microbiology*, 19: 2228-2235.

Onkendi, E. & Moleleki, M. 2014. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and brasiliense from diseased potatoes in Keny. *European Journal of Plant Pathology*, 10: 23-31.

Rezae, R. 2008. *Investigation of Phenotypic and Genotypic of soft rot Pectobacterium in Fars province*. M.Sc. Thesis, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Salati, M. & Ghasemi, A. 2004. Investigation and Identification of Potato Bacteria in Khuzestan province. *Proceeding of the 16th Plant Pathology Congress*, Tabriz, Iran, p. 216.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. *Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathology Society of Minnesota Press, American, USA.

Vazin Afzal, M. & Aezami Sarduie, Z. 2012. Potato import to Iran is a fundamental change in traditional agriculture Qajar period. *Journal of the Iranian Society of History*, 12: 131-155.

Waleron, M., Waleron K., Podhajska, A.J. & Kojkowska E. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former Erwinia genus by PCR-RFLP analysis of *rec*A gene fragment. *Microbiology*, 148: 583-595.

Zamani, S., Maerefat, A., Harighi, B. & Ramezan Zadeh, R. 2010. Identification and Study of the Genetic Diversity of Enterobacteriaceae bacteria cause Soft rot in Kurdistan province. *Proceeding of the 19th Plant Pathology Congress*, Kurdestan, Iran, p. 428.

Zohour, A., Rahimian, H. & Bani Hashemi, Z. 1998. Identification of soft rot Erwinia in Iran. *Proceeding of the 13h Plant Pathology Congress*, Karaj, Iran, p. 171.

Plant Protection Journal
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
2018 – **9** (**3**) : 185-197

Identification and Separation of Potato soft rot with Morphological, Biochemical and Molecular Methods from Isfahan Province

Tahereh Shakibafard[1*], Masoud Bahar[1], Majid Olia[2], Hadi KarimipourFard[3]

(1)* Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran., tahereshakiba@gmail.com
(2) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

(3) Plant Protection Research Department, Kohgiluyeh and Boyerahmad Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yasouj, Iran.

Abstract

Potato soft rot is a common and important disease on potatoes. Fifteen pectolytic bacteria with green metallic colonies on EMB medium were isolated from the tubers showing surface cracking and soft rot symptoms, simultaneously. All the isolates grew at 37 ˚C, no starch digestion, they were not sensitive to erythromycin and negative for phosphatase. They could not use sugars of Xylose, Trehalose, α-methyl D-glycoside and Malonate, while they were able to use Inositol, Rhamnose and Arabitol sugars. Based on These characteristics the isolates recognized as *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. The isolates were further identified by PCR amplification with primer G1/L1 which produces two bands similar to those produced in *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, but not from *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* and *Dickeya chrysanthemi*. Digestion of the amplified PCR product with restriction enzyme *Rsa* I resulted in identical 385 bp, 280bp and 180 bp bands formation as described for *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. The results of physiological, pathogenicity, biochemical and molecular tests, confirmed that all bacterial isolates induced soft rot symptoms in potato tubers are *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Keywords: Potato soft rot, Bacteria, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum.*