نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۸۲-۲۷۳

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 2, Summer 2015, P. 273-282

شناسایی عامل بیماری پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه سیب‌زمینی در استان اردبیل

رقیه حاتمی گیگلو[۱]-پژمان خدایگان[۲*]-ساره بقایی راوری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۴

چکیده

به منظور شناسایی عامل بیماری پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه سیب‌زمینی، در سال ۱۳۹۱ از انبارها و مزارع سیب‌زمینی استان اردبیل، نمونه‌های گیاهی با علایم ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم، جمع‌آوری و ۵۳ جدایه باکتری پکتولیتیک جداسازی شد. پس از اثبات بیماری‌زایی، جدایه‌ها از نظر ویژگی‌های فنوتیپی، مورد بررسی قرار گرفته و با جدایه‌های استاندارد مقایسه گردیدند. شدت لهاندگی جدایه‌های مورد بررسی تعیین گردید و درصد آلودگی هر منطقه برآورد شد. نتایج آزمون‌های فنوتیپی افتراقی ویژه انتروباکترهای پکتولیتیک،تنوع بالایی را میان جدایه‌ها نشان داد. براساس این نتایج جدایه‌ها در شش گروه مختلف طبقه‌بندی شدند. جدایه‌های گروه اول براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و افتراقی به گونه *Pectobacteriumcarotovorum* subsp. *carotovorum*، گروه دوم به‌گونه*Pectobacteriumwasabiae*، گروه سوم به گونه*Pectobacteriumatrosepticum* و جدایه‌های گروه چهارم به‌گونه*Dickeyachrysantemi* شبیه بودند. نتایج شناسایی فنوتیپی با کاربرد آغازگرهای اختصاصی برای سه گونه، مورد تایید قرار گرفت. گروه پنجم شامل دو جدایه بوده و ویژگی‌های این جدایه‌ها، حدواسط گونه‌های *Pectobacteriumcarotovorum* subsp. *carotovorum* و*Dickeyachrysantemi* بود. گروه ششم که فقط دربرگیرنده یک جدایه بود، براساس ویژگی‌های فنوتیپی به هر دو گونه *Pectobacteriumcarotovorum* subsp. *carotovorum* و *Pectobacteriumwasabiae* شبیه بوده و بینابین این دو گونه قرار گرفت. در بررسی درصد آلودگی، منطقه کلخوران با ۱۸/۷۵، بیش‌ترین میزان آلودگی را به باکتری‌های پکتولیتیک، در بین مناطق نمونه‌برداری شده داشت.

واژه‌های کلیدی: اردبیل، پکتوباکتریوم، پوسیدگی نرم، دیکیا، سیب‌زمینی، شناسایی

مقدمه

سیب‌زمینی، گیاهی یک‌ساله، با نام‌علمی *Solanumtuberosum* و متعلق به تیرهٔ Solanaceae می‌باشد. جنس سولانوم[۴] دارای گونه‌های زیادی بوده که تعداد محدودی از آن‌ها از جمله گونه‌ی*S.tuberosum*تولید غده می‌نمایند (۴). تولید سیب‌زمینی بیش‌تر از ۳۲۵ میلیون تن بوده و کشت آن به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه به‌سرعت در حال افزایش است. کشور ایران دارای مقام چهاردهم در تولید می‌باشد. استان‌اردبیل با دارا بودن آب و هوای مناسب و سازگار برای کشت این محصول ۱۴/۸ درصد از تولید سیب زمینی کشور را به خود اختصاص داده و با سطح زیرکشتی برابر ۲۴۱۳۲ هکتار و تولید سالانه ۸۲۷ هزار تن از جایگاه ویژه ای در تولید سیب‌زمینی در کشور برخوردار می‌باشد (۳). آفات و بیماری‌های مهمی گیاه سیب‌زمینی را تهدید نموده و بر کیفیت و کمیت این محصول تأثیرگذار می‌باشند. از میان بیمارگرهای گیاهی، باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا هستند (۳۹). بعضی از جنس‌های متعلق به خانواده‌ی اینتروباکتریاسه از بیمارگرهای مهم باکتریایی محسوب می‌شوند که در تعداد زیادی از گیاهان از جمله سیب‌زمینی پوسیدگی نرم ایجاد می‌کنند. زیرگونه‌های *Pectobacterium P.c.* subsp. *carotovorum* subsp. *carotovorum*(*Pcc*)، *brasiliensis*، گونه‌های *P. atrosepticum*(*Pa*),*P. wasabiae*(*Pw*) و*Dickeya* spp. به‌عنوان عوامل ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی گزارش گردیده‌اند (۲۰،۱۷، ۳۱ و ۳۵). باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم پراکنش جهانی داشته و قادر به ایجاد آلودگی در بسیاری از گونه‌های گیاهی، در طول فصل رشد و پس از برداشت می‌باشند. ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی از عمده‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های ناشی از این باکتری‌ها در ایران و کشورهای دیگر است. زیرگونهٔ*Pcc* معمولاً در نواحی نیمه‌گرمسیری و معتدله انتشار وسیعی داشته و احتمالاً وسیع‌ترین دامنه میزبانی را در

۱و۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری شناسی گیاهی،گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر رفسنجان
(*-نویسنده مسئول: Email: Pkhodaygan@vru.ac.ir)
۳- استادیار گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

4-Solanum

میان گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس پکتوباکتریوم دارا می‌باشد. دامنهٔ میزبانی گونهٔ *Pa* معمولاً در مناطق معتدله و سردسیری، به سیب‌زمینی محدود شده و علامتی که بیشتر مشاهده می‌گردد، ساق سیاه است. گونهٔ *Dickeyachrysanthemi*(*Dch*) عموماً در نواحی گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدله، روی طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی (زینتی، زراعی و باغی) بیماری‌زا بوده و بیماری‌هایی چون پوسیدگی نرم و پژمردگی را، در آن‌ها ایجاد می‌کند. در سیب زمینی، آلودگی به‌طور معمول از غده‌های بذری نشأت می‌گیرد و عوامل محیطی چون درجه حرارت، میزان اکسیژن و رطوبت نقش اساسی در تظاهر و توسعه علایم بیماری دارند (۳۸). اهمیت خسارت پکتوباکتریوم‌ها در ایجاد بیماری‌های سیب‌زمینی باعث شده است، در بعضی کشورها شرایط قرنطینه‌ای برای ورود غده‌های آلوده به این بیمارگرها در نظر گرفته شود. لذا تولیدکنندگان این نوع سیب‌زمینی‌ها همواره درصدد آن هستند که از بروز و شیوع این بیماری در مزارع خود جلوگیری نمایند تا بتوانند از محدودیت قرنطینه صادرات کشورهای خریدار بذر سیب‌زمینی، عبور نمایند. اطلاعات آماری مشخصی از میزان خسارت باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم در کشور منتشر نشده است، اما با توجه به گزارش‌های متعدد از استان‌های مختلف کشور، خسارت این گروه از باکتری‌ها در سیب‌زمینی، ذرت و گیاهان زینتی قابل توجه می‌باشد (۱، ۲ و ۶). در استان اردبیل افت کمیت و کیفیت سیب زمینی تأثیر زیادی در کاهش درآمد کشاورزان و هم‌چنین افزایش قیمت آن در بازار دارد. به‌دلیل کشت وسیع این محصول، وجود مایه آلوده کننده و هم‌چنین عدم کشت غده‌های بذری سالم و گواهی شده، بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه شیوع فراوانی داشته و در بسیاری از موارد، به‌خصوص در سال‌های پر باران، خسارت قابل توجهی وارد نموده است. تشخیص دقیق و مطمئن عامل بیماری برای اعمال روش‌های کنترل ضروری می‌باشد. در این پژوهش سعی شده است تا با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی، عوامل دخیل در بیماری ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان اردبیل شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

در ماه‌های خرداد، تیر، مرداد و آبان سال ۱۳۹۱، مزارع سیب‌زمینی واقع در نواحی مختلف استان اردبیل (سامیان، کلخوران، نیار، آراللو، شام اسبی، پیراقوم، بابلان و مزرعه تحقیقات کشاورزی اردبیل) و انبارهای سیب‌زمینی بازدید گردیده و ساقه‌های سیب‌زمینی دارای علایم ساق‌سیاه و پژمردگیدر برگ‌ها و هم‌چنین غده‌های پوسیده مظنون به آلودگی، جمع‌آوری شده و در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل گردیدند.جهت جداسازی باکتری، پس از شستشوی بخش‌های آلوده با آب معمولی،به کمک تیغ سترون، قطعات کوچکی از نمونه‌ها از مرز بین بافت سالم و آلوده جدا و در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی گردید. این قطعات دوبار با آب مقطر شسته شده و در داخل لوله‌های حاوی آب مقطر سترون خرد گردیده و بعد از ۳۰-۲۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، یک یا دو قطره توسط لوپ پلاتینی برداشته و روی محیط ائوزین متیلن بلو(EMB[1]) به صورت خطی کشت شد. پس از نگهداری پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ تا ۳ روز، پرگنه‌هایی با رنگ درخشنده سبز متالیک و یا بنفش تیره انتخاب و به‌منظور خالص‌سازی روی محیط کشت آگار غذایی(NA[2]) مخطط گردیدند. تک‌کلون‌ها با رنگ سفید مایل به خاکستری یا شیری به‌عنوان یک جدایه جهت انجام آزمون‌ها و ادامه‌ی تحقیق انتخاب شدند. برای نگهداری طولانی مدت، کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط نوترینت براث[3] به همراه ۴۰ درصد گلیسرول دردمای۸۰- درجهسلسیوسقرار داده شد(۳۶). جدایه‌های استاندارد از کلکسیون کشت میکروارگانیسم‌های برزیل و اسکاتلند تهیه (جدول۱) و به‌عنوان شاهد مثبت در تمامی بررسی‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند.

آزمون بیماری‌زایی

به‌منظور ارزیابی قابلیت جدایه‌ها در ایجاد لهیدگی روی غده‌های سیب‌زمینی رقم مارفونا، صد میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌ها با غلظت 10^7 سلول باکتری در هر میلی لیتر(OD_{600}=0.1) به غده‌های ضدعفونی شده با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، تزریق شد. در آزمونی دیگر، غده‌های سیب‌زمینی رقم مارفونا که حساستی بالا نسبت به این بیماری دارد انتخاب گردید. غده‌های رقم مذکور که گواهی شده و عاری از بیماری بود از مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان تهیه و در گلدان‌هایی با ارتفاع تقریباً ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۵۰ سانتی‌مترحاوی خاک سترون شده (مخلوط خاک باغچه، ماسه و کود حیوانی پوسیده) کاشته شدند. سوسپانسیون باکتری در بافر فسفات نمکی تهیه و به‌وسیله سرنگ با غلظت ذکر شده به بوته‌های سیب‌زمینیکه اندازه‌ای در حدود ۲۰-۱۵ سانتی‌متری داشتند تزریق شد.

محل تزریق، زیر پوست ساقه سیب‌زمینی در حدود ۵ سانتی‌متری بالای خاک بود. گیاهچه‌ها در دمای ۳۰-۲۰ درجه سلسیوس با چرخه نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شرایط بخارزنی آب قرار گرفتند. از ساقه‌های مایه‌زنی شده با بافر فسفات نمکی به عنوان شاهد منفی استفاده شد. جهت بررسی واکنش گیاهان پس از مایه‌زنی،

1-Eosin Methylene Blue
2-Nutrient Agar
3-Nutrient Broth

بوته‌ها به‌طور روزانه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱- جدایه‌های استاندارد مورد استفاده در این تحقیق

کد جدایه	نام جدایه	مرکز نگهداری
863	*Pectobacteriumcarotovorum*subsp. *carotovorum*	IBSBF برزیل
1819	*Pectobacteriumatrosepticum*	IBSBF برزیل
488	*Pectobacteriumwasabiae*	SCRI اسکاتلند
231	*Dickeyachrysanthemi*bv. *chrysanthem*	IBSBF برزیل

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی

آزمون‌های بیوشیمیائی و فیزیولوژیک طبق روش‌های متداول (۱۸، ۲۳ و ۳۶) انجام شد. بررسی حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین، به روش کلمنت (۲۲) انجام شد.

تعیین شدت لهانندگی جدایه‌ها

غده‌های سیب‌زمینی رقم مارفونا تقریباً هم‌اندازه و عاری از آلودگی (تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان) مورد آزمایش قرار گرفتند. وزن غده‌ها اندازه‌گیری شده و یادداشت گردید. غده‌ها پس از شستشو با آب معمولی و ضدعفونی با هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد به مدت نیم ساعت، در سینی‌های پلاستیکی سترون قرار داده شدند، برای هر جدایه، چهار غده با تزریق صد میکرولیتر سوسپانسیون باکتری (10^7 سلول در هر میلی‌لیتر) و یک غده به‌عنوان شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی شد. تمامی جدایه‌ها در این آزمون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۳ روز و در شرایط ذکر شده در بخش قبل، قرار داده شدند. پس از پایان آزمایش، بافت آلوده با جریان ملایم آب شسته شده و وزن غده‌های آلوده اندازه‌گیری و با وزن غده قبل از مایه‌زنی، مقایسه گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین صفت مورد مطالعه یعنی شدت لهانندگی جدایه‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تکرار انجام گرفت (۳۰).

استخراج اسیدنوکلئیک

سوسپانسیون کدری از باکتری‌های ۲ روزه در محیط آگار غذایی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و غلظت آن‌ها به۰/۲–۰/۱ واحد OD[1]، تنظیم گردید. به هرنمونه ۰/۱ حجم هیدروکسیدپتاسیم یک نرمال اضافه شد. پس از جوشاندن، اسید نوکلئیک با استفاده از روش معمول فنل و کلروفرم، استخراج گردید. برای تعیین خلوص و غلظت، دو میکرولیتر از اسیدنوکلئیک استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید. بررسی غلظت اسیدنوکلئیک کل استخراج شده با مقایسه شدت نوار حاصله در مقایسه با مقدار مشخصی از اسیدنوکلئیک فاژ لامبدا صورت گرفت (۹).

ردیابی جدایه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از آغازگرهایExpccf/Expccr، که اختصاصی گونه *Pcc*بوده،ADE1/ADE2که اختصاصی گونه *Dch*بوده و Eca1f/Eca2rکه اختصاصی گونه *Pa* است، انجام گرفت (۱۶، ۲۱ و ۲۷). الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش، در ژل آگاروز یک درصد به همراه یک نشانگر وزنی (۱ Kb، ساخت شرکتفرمنتاز[2]) و دربافر تریس–بوریک اسید، EDTA[3] (، ۸۹ میلی‌مولار تریس، ۸۹ میلی‌مولار اسید بوریک، دو میلی‌مولار EDTA، ۸/۲ ~ pH) انجام شد. نمونه‌ها (پنج میکرولیتر) پس از اختلاط با یک میکرولیتر رنگ آماده[4] در چاهک‌های ژل ریخته شده و الکتروفورز در اختلاف پتانسیل ۱۰۰ ولت، تا رسیدن برم‌فنل‌بلو به انتهای ژل انجام شد. ژل با رنگ مخصوص فلورسان[5](محلول ۵ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و از آن عکس‌برداری شد (۹).

نتایج

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها

پانصد و یازده نمونه بوته آلوده سیب‌زمینی با علایم سیاه شدن ساقه و شکستگی، پژمردگی برگ‌ها و کوتولگی بوته، از مزارع اردبیل و اطراف انبارهای سیب‌زمینی و هم‌چنین بیش از ۲۰۰ غده پوسیده که علایم مشابه با علایم بیماری ایجاد شده توسط باکتری‌های پکتولیتیکرا داشتند (شکل۱)، از داخل انبارهای استان مذکور جمع‌آوری گردید. بر اساس قابلیت تولید رنگ سبز متالیک یا بنفش تیره در روی محیط کشت اختصاصی EMB و نیز قابلیت لهانیدن غده سیب‌زمینی، جمعاً ۵۳ جدایه به دست آمد. جدایه‌های پکتولیتیک

1-Optical Density

2-Fermentas
3-Ethylene diaminetetraacetic acid
4-6X loading dye
5-Red safe

در محیط نوترینت براث حاوی ۴۰ درصد گلیسرول در ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده، نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی

تمامی ۵۳ جدایه مورد بررسی، گرم منفی، اکسیداز منفی و بی‌هوازی اختیاری بودند. پرگنه جدایه‌ها روی محیط NAS[1] گرد، تخت یا اندکی برآمده و به رنگ شیری و یا سفید مایل به خاکستری بود. حدود ۵۹ درصد از جدایه‌ها (۳۱ جدایه) روی گیاه توتون و تمامی جدایه‌ها روی گیاه شمعدانی، واکنش فوق‌حساسیت را القاء نمودند. این جدایه‌ها نیترات را احیاء و از سیستئین تولید H_2S و از سیترات تولید قلیا نمودند. جدایه‌ها توانایی تولید رنگ فلورسنت در محیط کشت کینگز ب[2]، و رنگ‌دانه آبی یا صورتی درمحیط YDC[3]را، نداشتند. نتایج بررسی‌های فنوتیپی در جدول ۲ نشان داده شده است. جدایه‌های مورد بررسی بر اساس آزمون‌های افتراقی انتروباکترهای پکتولیتیک در جنس‌های *Pectobacterium*و *Dickeya* و بینابین این دو جنس، و در ۶ گروه متفاوت، قرار گرفتند. مبنای تقسیم‌بندی جدایه‌ها، اختلاف در برخی آزمون‌های بیوشیمیایی و توانایی استفاده از برخی کربوهیدرات‌ها بود. جدایه‌های گروه اول شامل۲۳ جدایه بوده و براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و افتراقی به گونه‌ی*Pcc* شباهت داشتند. گروه دوم شامل پنج جدایه وشبیه به گونه *Pw* بودند. گروه سوم متشکل از ۱۱ جدایه بوده و به گونه *Pa* شباهت داشتند. اعضای گروه چهارم که تعداد آن‌ها نیز ۱۱ جدایه بود، به گونه *Dch* شبیه بودند. گروه پنجم شامل دو جدایه بوده و ویژگی‌های آن‌ها، حدواسط گونه‌های *Pcc*و *Dch* بود. گروه ششم که تنها دربرگیرنده یک جدایه بود، براساس ویژگی‌های فنوتیپی به هر دو گونه *Pcc* و *Pw* شبیه بوده و بینابین این آن‌ها قرار گرفت.

آزمون بیماری‌زایی روی ساقه سیب‌زمینی

در مایه‌زنی ساقه‌ها، علایم با ظهور رنگ تیره و سیاه شدگی در محل تزریق باکتری روی ساقه و ۴-۳ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد. این نشانه‌ها در جدایه استاندارد *Pcc* نیز مثبت ارزیابی گردید (شکل ۲). علایم به‌مرور زمان پیشرفت کرده و به‌طرف پایین ساقه گسترش یافت. علایم فرعی مثل پژمردگی برگ‌ها، کلروز و هم‌چنین خالی شدن ساقه و در نهایت خشک شدن کل گیاه هم با پیشرفت آلودگی مشاهده شد. تعدادی از جدایه‌ها، با گذشت سه هفته پس از مایه‌زنی، علایم را نشان دادند. در ساقه‌هایی که فقط بافر فسفات نمکی به‌عنوان کنترل منفی تزریق شده بود، هیچ گونه علایمی مشاهده نگردید.

آزمون بیماری‌زایی روی غده و بررسی شدت لهاننده‌گی جدایه‌ها

در این آزمون بیماری‌زایی، علائم لهیدگی ۲ روز پس از مایه‌زنی در غده‌ها مشاهده گردید. پس از روز دوم گسترش لهیدگی با سرعت بیشتری اتفاق افتاد. در محل مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد، هیچ گونه علایم پوسیدگی مشاهده نگردید. شدت آلایندگی برخی از جدایه‌ها، از باکتری‌های استاندارد بیشتر بود.در آزمون بررسی شدت لهیدگی غده سیب‌زمینی، مقدار بافت پوسیده شده در جدایه‌های مورد بررسی و در مقایسه باشاهد متغیر بود (شکل ۳).

بررسی درصد آلودگی

درصد آلودگی هر منطقه با توجه به تعداد نمونه‌های بدست آمده و برای تمامی نمونه‌های هر منطقه، محاسبه گردید. نتایج نشان دهنده بالاتر بودن درصد آلودگی منطقه کلخوران در مقایسه با سایر مناطق بود.تنوع باکتری‌های جداسازی شده از منطقه کلخواران نیز بالاتر از سایر مناطق ارزیابی گردید. بیشترین تعداد جدایه‌ها مربوط به گونه *Pcc* بود (شکل ۳ و ۴). نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های ساقه و غده سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف اردبیل حاکی از گسترش ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در تمام مناطق مورد مطالعه بود.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای اطمینان از صحت شناسایی به روش فنوتیپی، جفت آغازگرهای اختصاصی برخی از گونه‌های شناخته شده این خانواده، مورد استفاده قرار گرفت. در جدایه‌هایی که در آزمون‌های فنوتیپی به عنوان گونه‌های *Dch*، *Pcc* و *Pa* شناسایی شده بودند به ترتیب نوارهای۴۲۰، ۵۵۰ و ۶۹۰ جفت بازی تکثیر گردید. این قطعات در سایر جدایه‌های مورد بررسی تکثیر نشد (شکل ۵). به ترتیب بیان شده، تعلق جدایه‌های گروه چهار، یک و سه به گونه‌های مذکور تایید گردید.

بحث

شرایط مناسب آب وهوایی مانند خاکسازگار با زراعت و ارتفاع مناسب از سطح دریا (۱۳۵۰ متر)، باعث گردیده است تا، کشت محصول سیب‌زمینی در اردبیل از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار

1-Nutrient Agar containing 0.5 percentage of sucrose
2-Kings B
3-Yeast Dextrose Chalk

بوده و سطح زیر کشت زیادی را به خود اختصاص دهد. از آن‌جا که این منطقه رطوبت زیادی دارد، بیماری‌های باکتریایی، به‌خصوص بیماری پوسیدگی نرم و ساق‌سیاه این محصول را به شدت تهدید می‌کند. لذا شناسایی عوامل ایجاد بیماری و اعمال روش کنترل ضروری به نظر می‌رسد.

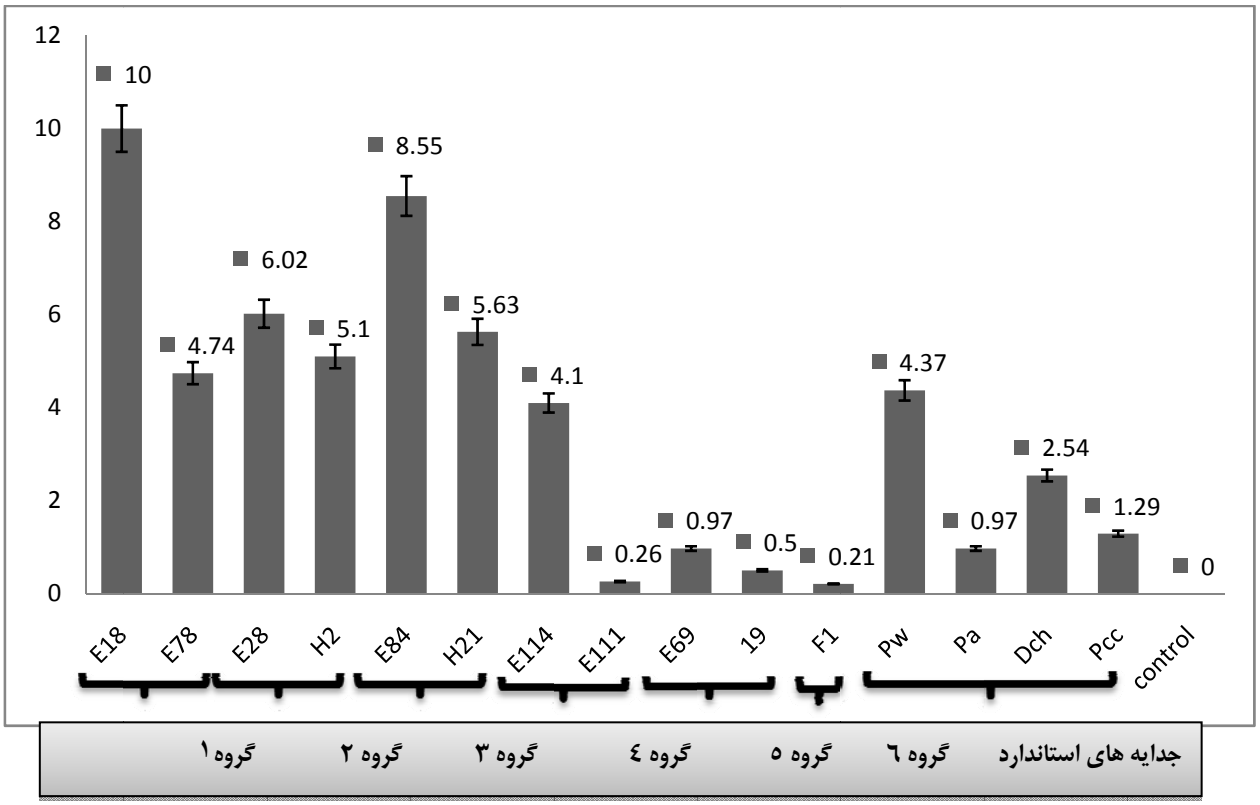
جدول۲- ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق در مقایسه با جدایه‌های استاندارد

ویژگی	درصد جدایه‌ها با واکنش مثبت									
	گروه اول	گروه دوم	گروه سوم	گروه چهارم	گروه پنجم	گروه ششم	*Pcc*	*Pa*	*Pw*	*Dch*
فعالیت پکتولیتیکی روی غده	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
فعالیت پکتولیتیکی روی ساقه	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
واکنش منفی در آزمون گرم	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
واکنش منفی در آزمون اکسیداز	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
القا واکنش فوق‌حساسیت روی گیاه توتون	۶۱	۴۰	۳۶	۵۰	۵۰	۵۰	v	v	v	v[1]
القا واکنش فوق‌حساسیت روی گیاه شمعدانی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
رشد بی‌هوازی	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
احیای نیترات	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
تولید H_2S از سیستئین	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
تولید قلیا از سیترات	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
هیدرولیز ژلاتین	۸۷	۶۰	۲۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	v	۱۰۰	۱۰۰
هیدرولیز توئین ۸۰	۵	۰	۰	۷۳	۰	۰	۰	۰	۰	v
رشد در دمای۳۷ درجه سلسیوس	۸۷	۲۰	۳۶	۶۴	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۱۰۰
تولید مواد احیاء کننده از ساکارز	۱۳	۰	۱۰۰	۴۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
حساسیت به اریترومایسین	۵	۰	۱۸	۷۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰
لسیتیناز	۹	۰	۹	۷۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰
پروتئاز	۱۸	۰	۹	۹۱	۱۰۰	۰	nd	nd	nd	nd[2]
تولید اسید از: سوربوز	۵۷	۶۰	۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سوربیتول	۵۳	۶۰	۵۴	۲۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰
رامنوز	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
زایلوز	۵۳	۲۰	۹	۱۸	۵۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
آرابینوز	۵	۲۰	۰	۹	۰	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
لاکتوز	۵۷	۰	۹	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۱۰۰
ترهالوز	۱۸	۲۰	۰	۲۷	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰
پالاتینوز	۰	۰	۷۳	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰
مالتوز	۰	۰	۶۴	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰
تولید قلیا از دی تارتارات	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

1- Variable
2- Not determined

شکل ۱- نمونه گیاه مشکوک به ساق‌سیاه سیب‌زمینی (راست)، غده مشکوک به پوسیدگی نرم سیب‌زمینی (چپ)

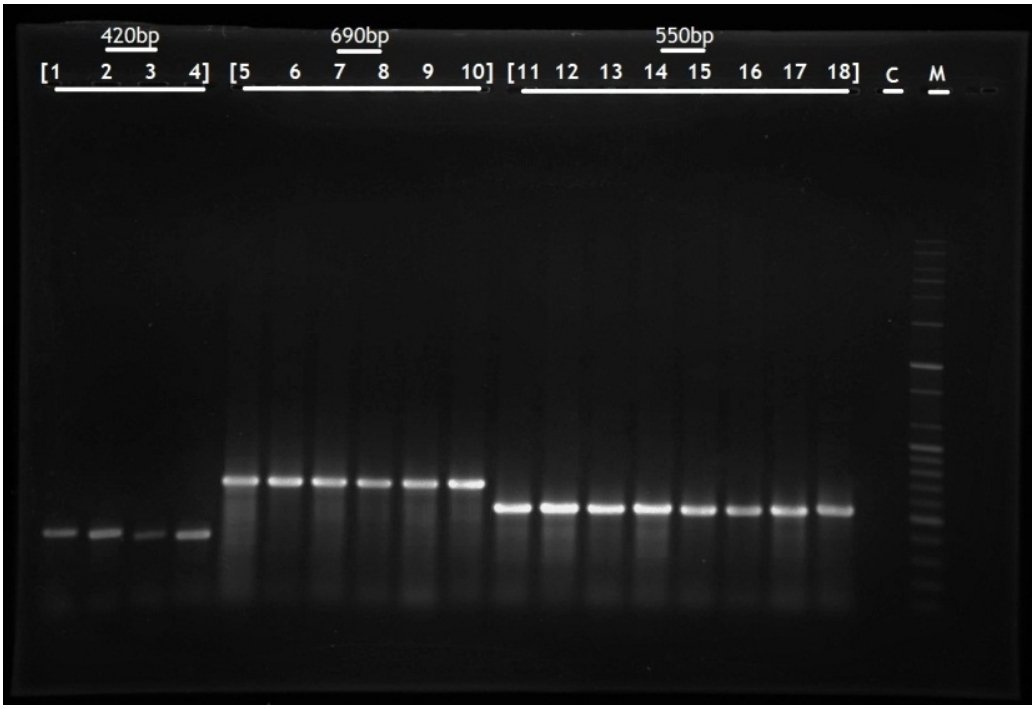
شکل ۲- علایم ساق سیاه و پوک‌شدن ساقه ۷ روز پس از مایه‌زنی با جدایه *Pcc* استاندارد (راست) و جدایهE18از گروه 1، (چپ)



شکل ۳- مقایسه شدت لهاندگی نمایندگانی از جدایه‌ها در آزمون لهانیدن غده‌های سیب‌زمینی. محاسبات آماری در سطح احتمال ۵ درصد انجام شده است. شدت بیماری‌زایی هر جدایه، بر اساس درصد بافت آلوده در بالای نمودار نمایش داده شده است.

شکل ٤-تعداد نمونه‌های گیاهی،باکتری‌های پکتولیتیک جداسازی شده و گروه‌بندی جدایه‌ها

منطقه نمونه‌برداری	تعداد نمونه‌ها	تعداد جدایه‌های پکتولیتیک	گروه جدایه‌ها	بیشترین جدایه	کمترین جدایه
سامیان	۱۰۱	۱۵	۱، ۲، ۳، ۴	گروه ۱	گروه ۲ و ۴
کلخواران	۹۶	۱۸	۱، ۲، ۳، ۴، ۵	گروه ۱	گروه ۵
نیار	۲۸	۲	۱، ۶	برابر	برابر
آراللو	۵۵	۲	۱، ۴	برابر	برابر
پیراقوم	۴۶	۲	۳، ۴	برابر	برابر
شام‌اسبی	۵۱	۲	۴	–	–
بابلان	۴۲	۷	۱، ۳	گروه ۳	گروه ۱
مزرعه تحقیقات کشاورزی اردبیل	۲۴	۱	۴	–	–
اطراف انبارهای شهرستان اردبیل	۶۸	۴	۱، ۵ ، ۲	گروه ۱	برابر
تعداد کل	۵۱۱	۵۳	–	گروه ۱	گروه ۶



شکل ٥- قطعات ٥٥٠، ٦٩٠ و ٤٢٠ جفت‌بازی تکثیر شده در نمایندگانی از جدایه‌ها. این قطعات با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌های*Pcc*، *Pa* و*Dch*، در واکنش‌های جداگانه تکثیر و در یک ژل آگاروزی ۱/٥ درصد بارگذاری شده‌اند. ستون‌ها به ترتیب: شماره‌های ۱ تا ٤: جدایه‌های E34، D9، E111 و IBSBF231 *Dch*، شماره‌های ٥ تا ۱۰: جدایه‌های H21، C12، E27، E84، H6 و*Pa* IBSBF1819، شماره‌های ۱۱ تا ۱۸: جدایه‌های E18، C67، E6، D16، C14، E78، H20 و*Pcc* IBSBF863. ستون C کنترل منفی و ستون M نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی است.

برای این منظور تعدادی از روستاهای شهرستان اردبیل بازدید شده و از نمونه‌های آلوده به بیماری که مشکوک به ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم بودند، نمونه‌برداری شد. تعیین موقعیت تاکسونومیکی این باکتری‌ها به میزان زیادی مبتنی بر روش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بوده است (۴۱). به دلیل وجود هتروژنی قابل توجه در هر دو سطح فنوتیپی و ژنوتیپی در این باکتری‌ها، روش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی گاها، قادر به تفکیک درست نبودهو تشخیص دقیق و سریع این گروه از باکتری‌ها را محدود نموده است (۱۴). با بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای جدایه‌های مورد مطالعه، مشخص گردید که این جدایه‌ها تنوع بالایی نشان داده و با ویژگی‌ها و مشخصات گونه‌ها و زیرگونه‌های شناخته شده در دنیا و جداول افتراقی آن‌ها مطابقت کاملی ندارند. این حالت بینابینی

می‌تواند ناشی از تغییرپذیری وراثتی فاکتورهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باشد (۱۹). هم‌چنین مشاهده شد که بخش اعظمی از جدایه‌ها، بیش‌ترین شباهت را به گونه *Pcc* (حدود ۴۴ درصد جدایه‌ها)دارند. بسیاری از محققان دیگر نیز، گونه *Pcc* را، در مناطق مختلف ایران، به عنوان عامل غالب بیماری ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم معرفی نموده‌اند (۵، ۷، ۱۱ و ۱۲). گونه‌های *Pcc* و *Dch* دارای دامنه میزبانی وسیع بوده و از هر دو دمای معتدل و گرمسیر گزارش شده‌اند، در حالی‌که گونه *Pa* بیش‌تر محدود به مناطق سردسیر کشت سیب‌زمینی، می‌باشد (۱۴ و ۳۷). بنابراین تفاوت در این جدایه‌ها را می‌توان به پراکنش جغرافیایی آن‌ها نیز، نسبت داد. به‌عنوان مثال گونه‌ها و زیرگونه‌هایی که دامنه میزبانی محدودتری دارند و از توزیع گسترده اقلیمی برخوردار نیستند، از لحاظ ژنتیکی هموژن می‌باشند. بر عکس، زیرگونه *Pcc* که از لحاظ فنوتیپی و ژنتیکی متنوع‌تر از گونه *Pa* می‌باشد، پراکنش جغرافیایی و دامنه میزبانی وسیع‌تری دارد (۱۰).از آن‌جایی‌که بیماری ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم از طریق غده‌های بذری سیب‌زمینی منتقل می‌شود، در مقیاس وسیع قابل توزیع بوده و در نتیجه تفاوت ژنتیکی زیادی در جدایه‌های متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف وجود خواهد داشت (۸). بیست و یک درصد عوامل جداسازی شده در این تحقیق به‌عنوان گونه *Pa* گزارش شد که با توجه به آب و هوای مرطوب و سرد اردبیل، وجود این گونه خالی از انتظار نبود و حتی انتظار می‌رفت گونه غالب در این منطقه باشد. گونه *Pa* از عوامل مهم ساق‌سیاه در مناطق معتدل مثل نواحی کانادا، ایالات متحده‌ی آمریکا و غرب اروپا می‌باشد. گونه دیگری که در این پژوهش مورد شناسایی قرار گرفت، گونه *Dch* بود. عمده خسارت این گونه در مناطق گرم و خشک مشاهده می‌شود. محققین دیگری نیز در مطالعات خود، به حضور این گونه در ایران اشاره داشته و باکتری مذکور را از محصولات مختلف جداسازی نموده‌اند (۱، ۲، ۱۲، ۱۳ و ۳۴). احتمالاً وارد شدن این گونه به ایران از طریق تبادل غده‌های سیب‌زمینی بوده است. با توجه به این که منبع اولیه تأمین بذر سیب‌زمینی جهت چرخه تولید بذر در ایران کشورهای اروپایی می‌باشند (۴۰)، احتمال گسترش این گونه در مناطق مختلف سیب‌زمینی کاری ایران وجود دارد و قبلاً هم توسط محققین گزارش گردیده است. برخلاف جنس پکتوباکتریوم، ساختار کلی جنس *Dickeya* و دامنه میزبانی این جنس هنوز به‌طور کامل مشخص نگردیده است (۳۵). ابهامات فراوانی در شناسایی دقیق این جنس وجود دارد که به دلیل عدم توانایی روش‌های ژنوتیپی و فنوتیپی استفاده شده در شناسایی ماهیت مختلف این باکتری‌ها و در نتیجه عدم توانایی شناسایی گونه‌های جدید و غیرمعمول می‌باشد (۳۳). وقوع بیماری ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی با عامل *Pw* به مرور زمان در حال افزایش بوده و در خیلی از کشورها گزارش گردیده است. در سال ۲۰۰۱ هم این بیمارگر از روی سیب‌زمینی در ایالات متحده‌ی آمریکا جدا شده است (۲۴) و بعداً از کشورهای نیوزلند (۳۲)، ایران (۱۲)، سوریه (۲۶)، آفریقای جنوبی و زیمباوه (۲۵ و ۲۸)، کانادا (۱۵) و قاره اروپا (۲۹) گزارش گردیده است. سی وشش درصد جدایه‌های شناسایی شده متعلق به گونه *Pw* بودند. این جدایه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد کرده و هم‌چنین در مورد استفاده از قندها هیچ یک از جدایه‌ها تطابق کاملی با جدول تطابقی انتروباکترها نداشتند. این نتایج با نتایج به‌دست آمده در تحقیقات دیگر، مشابه بود (۲، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). فعالیت پکتولیتیکی گونه *Pw* توسط محققین بررسی شده و مشخص شده که گونه *Pw* فعالیت پکتولیتیکی بیش‌تری در گیاه سیب‌زمینی نسبت به گیاه ترپچه ژاپنی دارد و هم‌چنین فعالیت پکتولیتیکی این گونه در سیب‌زمینی نسبت به *Pcc* بیشتر است (۲۵ و ۳۳). فعالیت پکتولیتیکی جدایه‌های به‌دست آمده از سیب‌زمینی روی غده توسط بقایی و همکاران (۱۳) در سال ۲۰۱۳ مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شد که مقدار بافت پوسیده به‌وسیله‌ی جدایه‌های کاشمر بیش‌تر از جدایه‌های استاندارد و هم‌چنین جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق دیگر می‌باشد. در مورد فراوانی و درصد آلودگی باکتری‌های پکتولیتیک در مناطق نمونه‌برداری، براساس تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده و تعداد جدایه‌ی پکتولیتیک به‌دست آمده از مناطق مختلف، مشخص شد که منطقه کلخوران با ۱۸/۷۵ درصد آلودگی، بیش‌ترین میزان آلودگی را به باکتری‌های پکتولیتیک دارد. درصد آلودگی این منطقه نسبت به کل مناطق نمونه‌برداری ۷۶درصد بود. با توجه به آبیاری زیادی که در این منطقه انجام می‌شود، این برآورد دور از انتظار نمی‌باشد. با توجه به گسترش این بیمارگرها و میزان خسارت ایجاد شده توسط آن‌ها، استفاده از روش‌های مدیریتی برای کنترل بیماری ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۱- احمدوند ر.، و رحیمیان ح. ۱۳۸۱. بررسی تنوع *Erwinia* های پکتولیتیک بیماری‌زا روی سیب زمینی در استان همدان. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه رازی کرمانشاه، صفحه۱۸۷.

۲- بقایی‌راوری س.، شمس‌بخش م.، رحیمیان ح.،و صفایی ن. ۱۳۸۹. بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی اروینیاهای پکتولیتیک جدا شده از میزبان‌های زینتی در بخش‌هایی از شمال ایران. بیماری‌های گیاهی،۴۶: ۲۳۳-۲۱۷.

۳- بی‌نام، آمارنامه کشاورزی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی. جلد اول. سال زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹.
۴- پیوست، غ. ۱۳۸۴. سبزی‌کاری (چاپ چهارم)، انتشارات دانش‌پذیر رشت. ۴۸۷ صفحه.
۵- سلطانی‌نژاد س.، تقوی م.، حیاتی ج.،و مستوفی‌زاده قلم‌فرسا ر. ۱۳۸۴. مطالعه خصوصیات فنوتیپی و بیماری‌زایی پکتوباکتریوم‌های مولد پوسیدگی نرم در استان خوزستان. بیماری‌های گیاهی، ۴۱: ۶۱۰-۵۸۵.
۶- عرب م.، و رحیمیان ح. ۱۳۶۸. پوسیدگی ساقه دیفن‌باخیا در شمال ایران. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد ، صفحه ۱۵۱.
۷- معرفت ع.، و قاسمی ا. ۱۳۷۹، شناسایی*Erwinia*های مولد ساق‌سیاه و پوسیدگی نرم در سیب‌زمینی‌های وارداتی، خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، اصفهان، صفحه ۳۱۷.
8- Ali H.F., Junaid M., Ahmad M., Bibi A., Ali A., Hussaun S., Alam S. and Shan J.A. 2013. Molecular and pathogenic diversity identified amaong isolates of *Erwiniacarotovora* subspecies *atroseptica* associated with potato blackleg and soft rot. Pakistan Journal of Botany, 45: 1073-1078.
9- Ausubel F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Morr,D.D.,Seideman, J.G.,Smith, J.A.and Struhl, K.1992. Current Protocols in Molecular Biology.Green publishing Associates and Wiley Interscience, New York.4120 p.
10- Avrova A.O., Hyman L.J., Toth R.L. and Toth I. K. 2002.Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwiniacarotovora* and *Erwiniachrysanthemi*. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1499-1508.
11- AzadmaneshS., MarefatA. and Azadmanesh K. 2013. Detection of Pectobacteria Causal Agents of Potato Soft Rot in North Western Provinces of Iran. Journal of Plant Pathology & Microbiology,4: 154.
12- Baghaee-Ravari S.,Rahimian, H., Shams-Bakhsh M., Lopez-Solanilla E.,Antúnez-Lamas M. and Rodríguez-Palenzuela P. 2011. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. European Journal of Plant Pathology, 129: 413-425.
13- Baghaee-Ravari S.,Moslemkhani K. and Khodaygan P. 2013. Assessment of genetic variability of prevalent pectinolytic bacteria causing potato tuber soft rot in eastern Iran. Journal of Plant Pathology, 95: 107-113.
14- Czajkowski R.,Pérombelon M., C., van Veen J, A. and van der Wolf J. M. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. Plant Pathology, 60: 999-1013.
15- De Boer S., H. and Ward L. J. 2012.*Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. Phytopathology, 102: 937-947.
16- De Boer S.H. and Ward L.J. 1995. PCR detection of *Erwiniacarotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. Phytopathology, 85:854-858. 1995.
17- Duarte V., De Boer S., Ward L. and Oliveira A. 2004. Characterization of atypical *Erwiniacarotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. Journal of Applied Microbiology, 96: 535-545.
18- Fahy P. C., and Persley G. J. 1983.Plant bacterial diseases.A diagnostic guide.Academic Press Australia. 393p.
19- Gallelli A., Galli M., De Simone D., Zaccardelli M. and Loreti S. 2009. Phenotypic and genetic variability of *Pectobacteriumcarotovorum* isolated from artichoke in the Sele valley. Journal of Plant Pathology, 91: 757-761.
20- Gardan L., Gouy C., Christen R. and Samson R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacteriumcarotovorum* to species level: *Pectobacteriumatrosepticum*sp. nov., *Pectobacteriumbetavasculorum* sp. nov.and*Pectobacteriumwasabiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 381-391.
21- Kang H. W., Kwon S. W. and Go S. J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacteriumcarotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. Plant Pathology, 52:127–133.
22- Klement Z., Rudolph K. and Sands D.C. 1990. Methods in Phytobacteriology.Academiaie, Kiado, Budapest, 568p.
23- Lelliot R. and Stead D. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease. Blackwell Scientific publication. 216 p.
24- Ma B., Hibbing M. E., Kim H.-S., Reedy R. M., Yedidia I., Breuer J., Breuer J., Glasner J. D., Perna N. T. and Kelman A. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium*and *Dickeya*. Phytopathology, 97: 1150-1163.
25- Moleleki L. N., Onkendi E. M., Mongae A. and Kubheka G. C. 2013. Characterisation of *Pectobacteriumwasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. European Journal of Plant Pathology, 135: 279-288.
26- Nabhan S., Boer S., Maiss E. and Wydra K. 2012. Taxonomic relatedness between Pectobacteriumcarotovorum subsp. carotovorum, *Pectobacteriumcarotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacteriumcarotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. Journal of Applied Microbiology, 113: 904-913.
27- Nassar A., Darrasse A.,Leemattre M.,Kotoujansky A.,Dervin C.,Vedel R. and Bertheau Y. 1996. Characterization of *Erwiniachrysanthemi* by pectolyticisozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified fragments of *pel* genes. Applied and Environmental Microbiology, 65: 2228-2235.

28- Ngadze E., Brady C. L., Coutinho T. A. and Van der Waals J. E. 2012. Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. European Journal of Plant Pathology, 134: 533-549.
29- Nykyri J., Niemi O., Koskinen P., Nokso-Koivisto J., Pasanen M., Broberg M., Plyusnin I., Törönen P., Holm L. and Pirhonen M. 2012. Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen*Pectobacteriumwasabiae* SCC3193. PLoS Pathogens, 8: e1003013.
30- Palacio-Bielsa A., Mosquera M. E. R., Álvarez M. A. C., Rodríguez I. M. B., López-Solanilla E. and Rodríguez-Palenzuela P. 2010. Phenotypic diversity, host range and molecular phylogeny of Dickeya isolates from Spain. European Journal of Plant Pathology, 127: 311-324.
31- Pérombelon M. 2002. Potato diseases caused by soft rot Erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathology, 51: 1-12.
32- Pitman A. R., Harrow S. A. and Visnovsky S. B. 2010. Genetic characterization of *Pectobacteriumwasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. European Journal of Plant Pathology, 126: 423-435.
33- Pitman A. R., Wright P. J., Galbraith M. D. and Harrow S. A. 2008. Biochemical and genetic diversity of pectolyticenterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. Australasian Plant Pathology, 37: 559-568.
34- Rahmanifar B., Hasanzadeh N., Razmi J. and GhasemiA. 2012**.** Genetic diversity of Iranian potato soft rot bacteria based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. African Journal of Biotechnology, 11 (6): 1314-1320.
35- Samson R., Legendre J., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W. and Gardan L. 2005. Transfer of *Pectobacteriumchrysanthemi* and *Brenneriaparadisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov as *Dickeyachrysanthemi* comb. nov and *Dickeyaparadisiaca* comb. nov and delineation of four novel species, Dickeyadadantii sp. nov., *Dickeyadianthicola* sp. nov., *Dickeyadieffenbachiae* sp. nov and *Dickeyazeae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 1415-1427.
36- Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.Aps Press Minnesota.373p.
37- Toth I., Van Der Wolf J., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., and Elphinstone J. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology, 60: 385-399.
38- Toth I. K., Bell K. S., HolevaM. C. and Birch P. R. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology, 4: 17-30.
39- Van der Wolf J., and De Boer S. 2007. Bacterial pathogens of potato. Potato Biology and Biotechnology, Advances and Perspectives. Oxford, UK: Elsevier, 595-619.
40- Xu G. and Gross D. 1986. Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads, *Erwiniacarotovora*, and potato yields. Phytopathology, 76: 423-430.
41- Yahiaoui-Zaidi R., Jouan B. and Andrivon D. 2003. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. Plant Pathology, 52: 28-40.