

الگوی rep-PCR استرین‌های *Pectobacterium* جدا شده از سیب‌زمینی دارای علائم بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه در استان همدان

فاطمه کاظمی^۱، غلام خداکرمیان^{۲*}، عزیز باقری^۳ و ابوالقاسم قاسمی^۴

چکیده

استرین‌های وابسته به باکتری جنس *Pectobacterium* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی به‌ویژه سیب‌زمینی هستند. در استان همدان همه ساله گونه‌های مختلف این باکتری زیان‌های فراوانی را به بار می‌آورند. از مناطق مختلف کشت سیب‌زمینی در استان همدان نمونه‌های مشکوک و دارای علائم بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه گردآوری و استرین‌های باکتریایی مشابه *Pectobacterium* روی محیط کشت EMB جدا و خالص‌سازی شدند. پس از اثبات بیماری‌زایی استرین‌های باکتری روی سیب‌زمینی، تعداد ۲۷ استرین برای بررسی ویژگی‌های فنوتیپی به‌منظور شناسایی، انتخاب شدند. استرین‌های باکتریایی مورد بررسی بر اساس ویژگی‌های بیماری‌زایی و فنوتیپی از هم‌دیگر متمایز بودند. بر مبنای ویژگی‌های فنوتیپی بیشتر استرین‌های عامل بیماری سیب‌زمینی به‌عنوان *Pectobacterium carotovorum* و تعدادی نیز *Pectobacterium atrosepticum* شناسایی شدند. انگشت‌نگاری ژنومی استرین‌های انتخاب شده به‌روش rep-PCR با استفاده از دو آغازگر ERIC و Box انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار NTSYS V 2.2 و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA آنالیز شد. نتایج حاصل نشان داد که استرین‌های مورد آزمایش *P. carotovorum* و تعدادی نیز *P. atrosepticum* هستند. بررسی الگوی rep-PCR روشی سریع برای تشخیص و ردیابی استرین‌های *Pectobacterium* بیماری‌زای سیب‌زمینی است.

واژه‌های کلیدی: *Pectobacterium atrosepticum*, ERIC, *Pectobacterium carotovorum*, Box

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد دامغان
۲. دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳. مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان همدان
۴. بخش بیماری‌های گیاهی موسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی وزارت جهاد کشاورزی

*: نویسنده مسوول

دیده می‌شوند. اغلب دارای تاژک‌های متحرک و محیطی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و بی‌هوازی اختیاری هستند. میزان C+G در DNAی اعضاء این جنس ۵۶/۱-۵۰/۵ درصد است، شاد و همکاران (Schaad et al. 2001).

انگشت نگاری ژنومی rep-PCR امکان استفاده از آغاز-گرها برای ردیابی توالی تکرار شونده DNA و حضور در ژنوم باکتری‌های گرم منفی و تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت را فراهم می‌کند، لوپسکی و وینستوک (Lupsiki & Weinstock 1993). در میان تعدد تکنیک‌های موجود برای تعیین ژنوتیپ، روش بررسی عناصر متقارن خارج-ژنی تکراری مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (rep-PCR) امکان رده‌بندی با دقت بالا را فراهم کرده است و به‌عنوان یک آشکارساز سریع برای ارزیابی تنوع ژنتیکی عمل می‌کنند، لوئیس و همکاران (Louws et al. 2003). تعداد سه خانواده از توالی تکراری که توسط لوپسکی و وینستوک (۱۹۹۳) شناسایی شده است، توالی متقارن. (Palindromic) خارج ژنی تکراری (REP) به طول ۳۵ تا ۴۰ جفت نوکلئوتید، توالی عمومی بین ژنی تکراری درون باکتریایی (ERIC) به طول ۱۲۴ تا ۱۲۷ جفت نوکلئوتید و عناصر Box به طول ۱۵۴ جفت نوکلئوتید هستند. به نظر می‌رسد که این توالی‌ها در یک موقعیت ویژه در فاصله‌ای از ژن‌های خاص قرار گرفته‌اند. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز از هم جدا می‌شوند و یک الگوی بانندی ویژه برای گونه و یا استرین به دست می‌آید، محمد و همکاران (Mohammed & et al. 2009). هیمن و همکاران (Hyman et al. 2000) روش بر پایه PCR را برای ردیابی و تشخیص *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* دارای توانایی بالا دانسته است. ترتا و همکاران (Terta et al. 2010) با استفاده از روش PCR استرین‌های مختلف باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب زمینی در مراکش را از همدیگر تفکیک نمودند. با توجه به این‌که تشخیص و ردیابی سریع باکتری‌های بیماری‌زای در مزرعه و همچنین در توده‌های بذری بسیار اهمیت دارد و از طرف دیگر روش‌های مبتنی بر تعیین ویژگی‌های فنوتیپی وقت‌گیر و پرهزینه است، روش بررسی الگوی rep-PCR می‌تواند برای تشخیص و ردیابی سریع مورد استفاده قرار گیرد. در این راستا این روش در مقایسه با روش تعیین ویژگی‌های فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت تا در تشخیص و ردیابی سریع باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه سیب‌زمینی در استان همدان استفاده شود.

یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای سیب‌زمینی باکتری‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* هستند. این گروه از باکتری‌ها جزء مهم‌ترین پاتوژن‌های گیاهی بوده که نقش عمده‌ای در پایین آوردن کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی داشته و دارای گسترش جهانی هستند. یکی از ویژگی‌های مهم این گروه از باکتری‌ها، تولید مقدار زیادی از آنزیم‌های پکتولیتیک است که قدرت لهانیدن و تخریب فراوان بافت‌های نرم و پر آب را دارد. به‌علاوه استرین‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* دارای دامنه میزبانی گسترده بوده و اکثر گیاهان آب‌دار و گوشتی، میزبان یک یا تعداد بیشتری از گونه‌ها و یا زیرگونه‌های این جنس هستند. بیماری ساق سیاه ناشی از *P. atrosepticum* در فصول مرطوب و در مزارعی که به‌صورت غرقابی آبیاری می‌شوند، یک بیماری جدی است. بیماری‌های ساق سیاه، پوسیدگی نرم و پژمردگی سیب‌زمینی عموماً توسط گونه‌ها و زیرگونه‌های *P. carotovorum*، *P. atrosepticum* و *P. chrysanthemi* ایجاد می‌شوند که انتشار وسیعی در دنیا دارند. باکتری‌های گروه *Carotovora* از جنس *Pectobacterium* عمدتاً باعث ایجاد بیماری لهیدگی در بافت پاراننشیمی گیاه میزبان می‌شوند که علائم اولیه در گیاهان در حال رشد متفاوت است. علائم این بیماری روی غده‌های سیب‌زمینی به صورت لهیدگی و پوسیدگی نرم غده (Tuber soft rot) و در ساقه به‌صورت ساق سیاه (Black leg) بروز می‌کند هوکر (Hooker 1981). در استان همدان به‌دلیل کشت وسیع سیب‌زمینی، وجود مایه تلقیح و هم‌چنین عدم کشت غده‌های بذری سالم و گواهی شده، بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه شیوع یافته و در بسیاری از موارد خسارت‌های فراوانی به این محصول وارد نموده و کشت این محصول را به‌شدت تهدید می‌کنند. هم‌چنین به‌دلیل این‌که سیب‌زمینی در این استان در سطح وسیع کشت می‌شود و سهم نسبتاً عمده‌ای در تأمین نیاز غذایی کشور دارد، لذا کاهش کمیت و کیفیت این محصول تأثیر زیادی در کاهش درآمد کشاورزان و هم‌چنین افزایش قیمت آن در بازار خواهد داشت

(Bagheri & Taghavi 1993). استرین‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* که سبب بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه می‌شوند باکتری‌هایی گرم منفی، میله‌ای شکل با دو انتهای گرد به ابعاد ۱-۳×۰/۵ میکرومتر هستند. سلول‌ها اغلب به‌صورت تک یا جفت و گاهی به‌صورت زنجیره‌های کوتاه

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی استرین‌های باکتریایی

در سال‌های ۱۳۷۸ تا ۱۳۸۸ طی بازدیدهای به عمل آمده از مزارع و انبارهای مختلف سیب‌زمینی استان همدان شامل بهار، لاله‌جین، دینارآباد، حسام‌باد، گنج‌تپه، کرفس، کبودرآهنگ، اسدآباد به صورت تصادفی از غده‌های آلوده در انبار و بوته‌های دارای علائم بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه باکتریایی و مشکوک به آلودگی در مزرعه به‌طور تصادفی نمونه برداری شد. جهت جداسازی استرین‌های باکتریایی عامل بیماری، اندام‌های آلوده با آب معمولی شسته و سپس خشک شدند. از نمونه‌ها قطعات کوچکی از مرز بین بافت سالم و آلوده به کمک تیغ سترون جدا و در محلول حاوی ۱٪ هیپوکلریت-سدیم به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شد. سپس این قطعات دو بار با آب مقطر شسته شدند و در داخل لوله‌های حاوی آب مقطر سترون خرد گردیده و بعد از ۲۰-۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، یک تا دو قطره توسط لوپ پلاتینی برداشته و روی محیط کشت آئوزین متیلن بلو (EMB) مخطط گردیدند.

پس از دو روز نگهداری در دمای 28°C ۲۸ کلونی‌هایی با رنگ سبز متالیک ظاهر شدند. جهت خالص سازی، دو تا سه کلونی سبز متالیک از هر تشتک پتری جدا و مجدداً روی محیط EMB به صورت خطی کشت شد. سپس از هر تشتک پتری یک تک کلون انتخاب گردیده و به‌عنوان یک استرین جهت انجام آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی روی محیط‌های کشت سوکروز پپتون آگار (SPA) و آگار غذایی (NA) به صورت خطی یا نقطه‌ای نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتری

آزمون‌هایی فنوتیپی برای شناسایی گونه‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* شامل آزمون گرم، حلالیت در پتاس سه درصد، رشد هوازی و بی‌هوازی، اکسیداز، کاتالاز، لپانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، لسیتیناز، فسفاتاز، رشد در دمای ۳۹ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، تولید سولفید هیدروژن از سیستمین، احیاء نیترات، هیدرولیز نشاسته، اسکولین و توئین ۸۰، آرژنین دی‌هیدرولاز و فوق حساسیت در شمعدانی به روش‌های استاندارد باکتری شناسی بود شاد و همکاران (۲۰۰۱).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

برای استخراج DNA، باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی محیط آگار غذایی کشت داده شدند. پس از رشد باکتری-ها سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^7 از هر باکتری در آب تهیه گردید. از روش لیز قلیایی (alkaline lysis) برای آزاد-

سازی DNA استفاده شد. به این منظور ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسید پتاسیم ۰/۵ مولار مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس سوسپانسیون به مدت دو دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی به تیوب‌های تمیز منتقل و جهت استفاده در انجام واکنش‌های PCR در دمای ۲۰- نگهداری گردید رادماکر و همکاران (Rademaker et al. 1997). تنوع استرین-های باکتریایی جدا شده با آغازگرهای ERIC و BOX بررسی شد و رسالویک و همکاران (Versalovic et al. 1997). توالی پرایمرهای ERIC شامل ERIC 1Rever و ERIC 2Forward 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC- 3' و 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG- 3' و هم‌چنین AReverse BOX 3'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 5' بود. برای واکنش PCR واسرشت سازی ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه در ۳۵ چرخه و گسترش نهایی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه انجام گرفت. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۹۰ الکتروفورز و در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و برای عکس-برداری از دستگاه Gel document استفاده شد. دندروگرام الگوی rep-PCR بر اساس وجود یا عدم وجود باند، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS V.2.2 و بر اساس روش داده‌های جفت شده غیر وزنی (UPGMA) و ضریب ژاکارد (Jacard) ترسیم شد.

نتایج و بحث

همه استرین‌های مورد بررسی گرم منفی و واکنش‌های اکسیداز، فسفاتاز، لسیتیناز، آرژنین دی‌هیدرولاز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری بودند. این استرین‌ها قادر به احیاء نیترات به نیتريت، تولید گاز سولفید هیدروژن از سیستمین و لپانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند. تمامی استرین‌ها از ال-رامنوز، ترهالوز، ملی‌بیوز و رافینوز اسید تولید نموده و اسکولین را هیدرولیز کرده ولی قادر به هیدرولیز نشاسته نبودند. استرین‌های مورد بررسی قادر به رشد روی سیترات و فوق حساسیت در شمعدانی بودند ولی توانایی مصرف ال-آلانین و هیدرولیز توئین ۸۰ نداشتند. بر مبنای ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بررسی و آزمون بیماری‌زایی، بیشتر استرین‌های عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی به‌عنوان *P. carotovorum* و تعداد کمی به‌عنوان

الگوی rep-PCR استرین‌های *Pectobacterium* جدا شده از سیب زمینی ...

پس از بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های جدا شده، ۱۱ استرین به‌عنوان نماینده انتخاب شدند. DNA ژنومی این استرین‌ها به همراه استرین‌های استاندارد به روش انگشت‌نگاری ژنومی rep-PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل-های ۱ و ۲) و دندروگرام آن‌ها رسم شد (شکل ۳).

P. atrosepticum تشخیص داده شدند. این نتایج با یافته‌های جانز و راسن (Jans & Ruissen 1988) و شاد و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد. ویژگی‌های بررسی شده استرین‌های باکتریایی در جدول شماره یک آورده شده است.

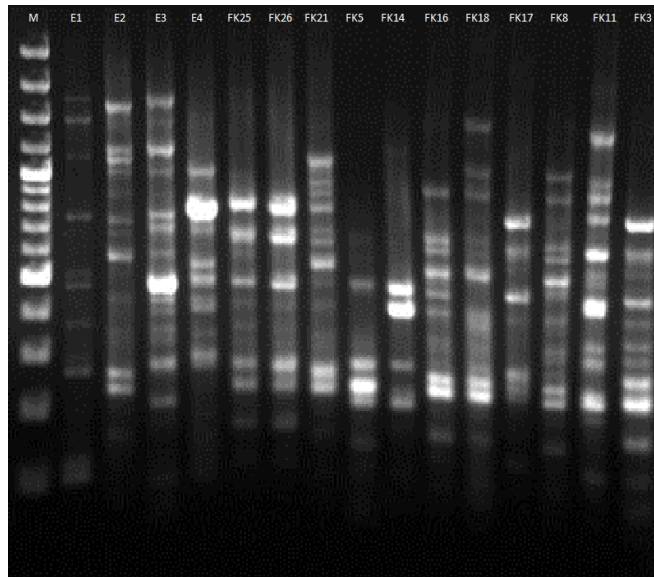
جدول ۱: ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتری عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان

Table 1: Phenotypic features of the strains of bacterial strains causing potato soft rot in Hamedan province.

واکنش	ویژگی	واکنش	ویژگی
+	احیای نیترات Nitrate reduction	-	گرم Gram
+	تولید SH ₂ از سیستئین SH ₂ from cystein	-	تولید رنگ فلورسنت روی محیط KB Flourescent pigment on KB medium.
	شیر لیتموس Litmus milk alkaline	-	اکسیداز Oxidase
v	رشد در ۳۶ سانتی‌گراد Growth at 36°C	+	کاتالاز Catalase
-	رشد در ۳۹ سانتی‌گراد Growth at 39°C	F	رشد هوازی بی هوازی Oxidative/Fermantative
-	فسفاتاز Phosphatase	-v	تولید پیگمان آبی روی محیط YDC Blue pigment on YDC medium
+	فوق حساسیت در شمعدانی Hypersensitivity on geranium	+	لهاندن ورقه‌های سیب‌زمینی Potato rot
+	سیترات Citrate	-	لسیتیناز Lecitinase
+	تولید اسید از ترهالوز Acid from trehalose	v	تولید اندول Indol
-	استفاده از دی-تارتارات D - tratarate	-	مصرف آرژنین Arginine
v	تولید اسید از آرابیتول Acid from arabitol	v	تشکیل لوان از سوکروز Levan from sucrose
+	تولید اسید از رافینوز Acid from raffinose	V	رشد در کلرید سدیم ۰.۵٪ Growth in % NaCl
-	استفاده از مالونات Malonate	v	هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis
+	تولید اسید از ال-رامنوز Acid from l- rhamnose	v	تولید مواد احیا کننده از سوکروز Reducing substances from sucrose
-	استفاده از ال-لاکتات L - lactate	V	هیدرولیز کازئین Casein hydrolysis
-	استفاده از ال-الانین L - alanine	-	هیدرولیز توئین ۸۰ Tween 80 hydrolysis
+	تولید اسید از ملی‌بیوز Acid from melibiose	+	هیدرولیز اسکولین Aesculin hydrolysis
+	استفاده از ال-گلوتامات L - glutamate	-	هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis

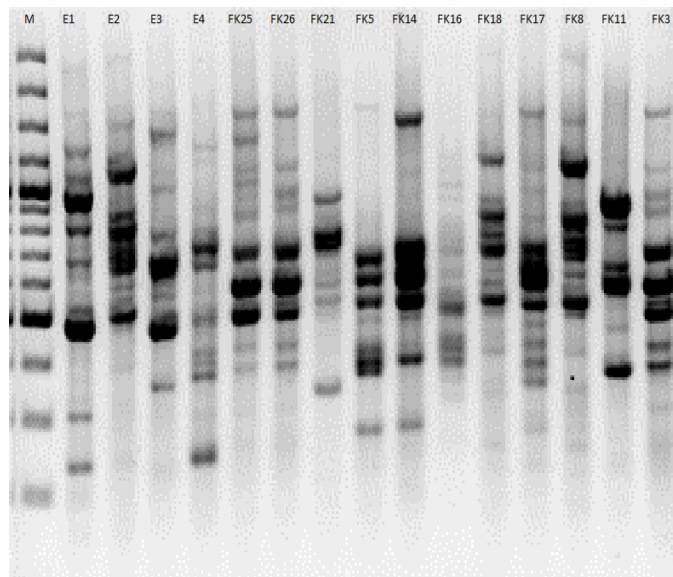
+: ۸۰٪ یا بیشتر استرین‌ها واکنش مثبت، -: ۲۰٪ یا کمتر استرین‌ها واکنش منفی، V: ۲۱-۷۹٪ استرین‌ها واکنش مثبت

+80% or more strains positive; V, between 21-79% of strains positive; -,80% or more strains negative



شکل ۱: الگوی rep-PCR استرین‌های باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان و *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) و *P. chrysanthemi* (E4) با استفاده از آغازگر ERIC

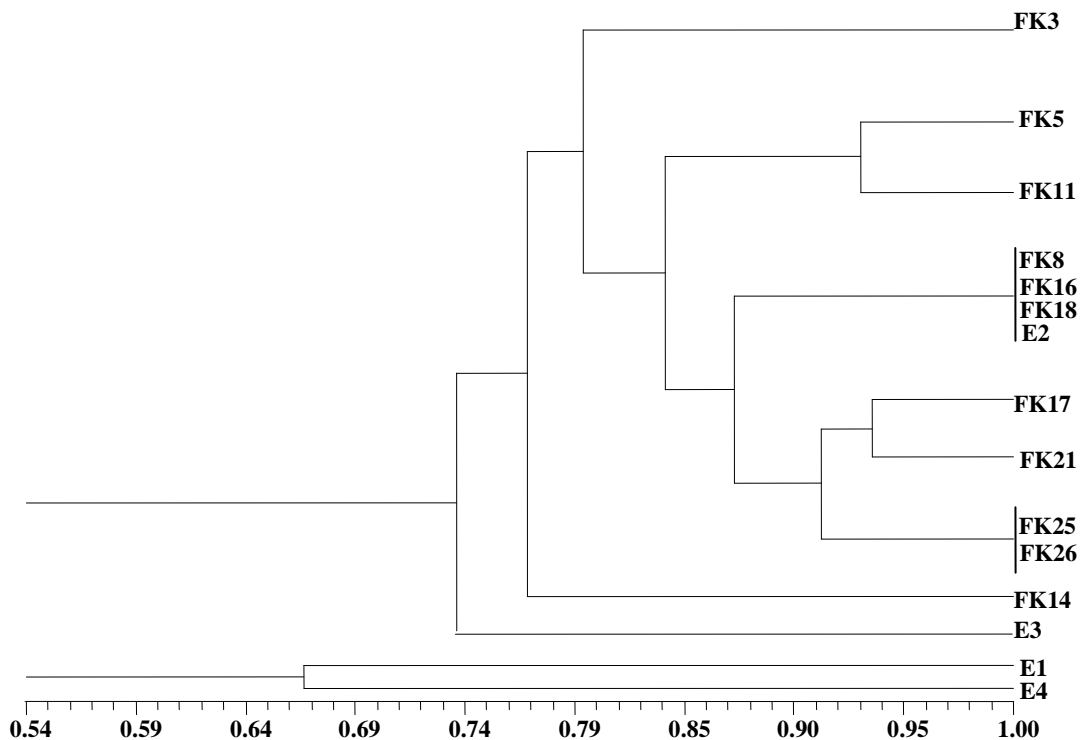
Figure 1: rep-PCR pattern among the bacterial strains causing potato soft rot and *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) and *P. carotovorum* using ERIC primers



شکل ۲: الگوی rep-PCR استرین‌های باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان و *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) و *P. chrysanthemi* (E4) با استفاده از آغازگر BOX

Figure 2: rep-PCR pattern among the bacterial strains causing potato soft rot and *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) and *P. carotovorum* using BOX

primers



شکل ۳: دندروگرام الگوی rep-PCR استرین‌های باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در استان همدان و

P. chrysanthemi (E4) و *P. atrosepticum* (E3)، *Pectobacterium carotovorum* (E2)، *Dickeya dianthicola* (E1)

Figure 3: Rep-PCR pattern dendrogram among the bacterial strains causing potato soft rot and *Dickeya dianthicola* (E1), *Pectobacterium carotovorum* (E2), *P. carotovorum* (E3) and *P. carotovorum*

بودند و تعداد باندهای تشکیل شده ۶ تا ۱۲ باند بود که پس از رسم دندروگرام قابل تفکیک بودند و در خوشه‌های جداگانه قرار گرفتند. رادماکر و همکاران (۱۹۹۷)، پس از مقایسه روش‌های مختلف برای تعیین تنوع ژنتیکی بین استرین‌های *Pectobacterium* عامل ساق سیب‌زمینی نتیجه گرفتند که روش rep-PCR برای آنالیز ژنوم این استرین‌ها بسیار مناسب و تفکیک کننده است و به دیگر تکنیک‌های انگشت‌نگاری ژنومی برای این هدف برتری دارد. هیمن و همکاران (۲۰۰۰) روش بر پایه PCR را برای ردیابی *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* موثر دانستند که با استفاده از روش PCR استرین‌های مختلف باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم را از هم‌دیگر تفکیک نمودند.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۱-۱۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

نتایج بررسی الگوی rep-PCR و رسم دندروگرام آن نشان داد که استرین‌های FK8، FK16 و FK18 جدا شده از بهار و E2 (*P. carotovorum*) در یک گروه، استرین FK3 جدا شده از اسدآباد در یک گروه، استرین FK14 جدا شده از کبودرآهنگ در یک گروه و استرین‌های FK25 و FK26 جدا شده از لالچین در گروهی جدا قرار گرفتند. این نتایج نشان داد که استرین‌های باکتری عامل پوسیدگی نرم و ساق سیب‌زمینی از نظر منطقه جغرافیایی تفکیک پذیر هستند و تفاوت در بیماری‌زایی می‌تواند تنوع موجود در استرین‌های مختلف را توجیه کند. نتایج بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی نشان داد که نتایج این دو روش با هم هم‌خوانی داشته و استرین‌های مورد آزمایش را از هم‌دیگر تفکیک نمودند و با نتایج ورسا/ووویک و همکاران (۱۹۹۷) سازگاری دارد. این پژوهش‌گران، تنوع ژنتیکی استرین‌های *P. carotovorum* را با استفاده از انگشت‌نگاری ژنومی rep-PCR مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که استرین‌های مورد بررسی دارای باندهای ۱۵۰ تا ۵۰۹۰ pb

rep-PCR Pattern of the Strains of *Pectobacterium* Isolated From Potato Soft Rot and Black Leg Diseases in Hamedan Province

kazemi¹, F., khodakaramian^{2*}, Gh., Bagheri³, A. and ghasemi⁴, A.

Abstract

Bacteria belong to *Pectobacterium* genus cause important diseases on some plants especially potato. They are agents for economically crop losses in Hamedan province annually. From the main potato growing area in Hamedan province diseased potato samples showing soft rot and black leg disease symptoms were collected and bacterial strains were isolated on EMB medium. Pathogenicity of the isolated strains verified on potato seedlings and 27 strains for characterization of phenotypic features as representatives which were determined based on the standard bacteriological methods. Results indicated that tested strains were differentiable based on their phenotypic features which mainly identified as *Pectobacterium carotovorum* and few as *Pectobacterium atrosepticum*. Genomic fingerprinting of the representatives by rep-PCR using ERIC and Box primers were determined. Obtained DATA were analyzed by NTSYS V.2.2 software and UPGMA cluster analysis using Jacard coefficient. Results showed that most of the tested strains are *P. carotovorum* and a few as *P. atrosepticum*. Rep-PCR pattern analysis is a quick technique for detection and identification of *Pectobacterium* strains pathogenic on potato.

Keywords: *Pectobacterium carotovoru*, *Pectobacterium atrosepticum*, ERIC, BOX

References

- Bagheri, A. and Taghavi, S. M. 1998. Characteristics of the bacterial strains causing potato and tomato wilt. Iranian Journal of Plant Diseases, Vol. 36; No. 3-4
- Hooker, W. J. 1981. Compendium of Potato Disease. American Phytopathology Society State Paul Minnesota, USA. 125 pp.
- Hyman, L. J., Birch, P. R., Dellagi, A., Avrova, A. O., Toth, I. K. 2000. A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. Lettr in Applied Microbiology; 30 (4): 330-5.
- Jans, J. D., Ruissen, M. A. 1988. Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands. Phytopathology. 78: 800-808.
- Louws, F. J., Schneider, M., deBruijn, F. J. 2003. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR), in: G. A. Toranzos (Ed.), Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples, Technomic Publishing Co. pp 63–94.
- Lupsiki, J. R. and Weinstock, G. M. 1993. Short interspersed repetitive DNA sequence in prokaryotic genomes. Journal of Bacteriology 174: 4525–4529.
- Mohammed, M., Abd El-Aziz, H., Omran, N., Anwar, S., Awad, S. and El-Soda, M. 2009. Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. International Journal of Food Microbiology 128: 417–423
- Rademaker, J. L. W., and Debruijn, F. J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis in G. Caetano-Anollés and P.M. Gresshoff (ed.), DNA markers: Protocols, Applications and Overviews Jhon Wiley and Sons, Inc., USA, Chapter 10, p. 151-171.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press St. Paul., Minnesota, USA 373 pp.
- Terta, M., El Karkouri, A., Ait M'hand, R., Achbani, E., Barakate, M., Amdan, M., Annajar, B., El Hassouni, M., Val, F., Bouteau, F. and Ennaji, M. M. 2010. Occurrence of *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco. Cell Molecular Biology (Noisy-le-grand), Suppl:OL1324-33.
- Versalovic, J., de Bruijn, F.J. and Lupski, J. R. 1997. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes, in: F.J. de Bruijn, J. R. Lupski, G. M. Weinstock (eds.) Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis, Chapman and Hall, pp. 437–453.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 47-53= ۴۷-۵۳).

1. MSc student of Damghan Azad University

2. Associate Professor of Plant Protection Department, Faculty of Ag , Bu Ali Sina University, Hamedan

3. Research center of Jihad –e- Agriculture in Hamedan

4. Province and Plant Disease Department of Pest and Diseases Research Center for Ministry of Jihad –e- Agriculture

*: Corresponding author