مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هجدهم، شماره چهارم، ۱۳۹۰
http://jopp.gau.ac.ir

بررسی عوامل مولد و همراه شانکر و لکه برگی باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در استان گلستان

***هادی محمودی[۱]، کامران رهنما[۲]، حشمت ا... رحیمیان[۳]، سعید نصرا... نژاد[۴] و میثم تقی نصب[۵]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، [۳]استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی ساری، [۴]استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، [۵]مربی آموزشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۹

چکیده

شانکر و لکه برگی باکتریایی مهمترین بیماری‌های درختان میوه هسته دار در جهان و شمال ایران به شمار می‌آیند. طی بررسی دو ساله (۱۳۸۶-۱۳۸۷) از سطح باغ‌های درختان میوه هسته‌دار استان گلستان از بافت‌های دارای علایم شانکر و لکه برگی نمونه‌برداری و پس از اثبات بیماری‌زایی روی شاخه‌ها و برگ‌های هلو، جدایه‌های بیماری‌زا شناسایی گردیدند. بر اساس انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی، الگوی پروتئین کل سلولی و انجام واکنش زنجیری پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی D21 و D22 باکتری‌های *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* ،*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به‌عنوان عوامل ایجاد کننده شانکر باکتریایی هسته‌داران در این استان شناخته شدند. عامل غالب بیماری در نمونه‌های مورد بررسی مناطق شرق استان باکتری *Pss.* شناسایی گردید. اما در مناطق غرب استان مانند کردکوی جمعیت غالب جداسازی شده باکتری *Xap* بود. همچنین باکتری *P.viridiflava* به‌عنوان عامل همراه بیماری از باغ‌های گرگان جداسازی شد. در این تحقیق برای اولین بار *P.viridiflava* به‌عنوان عامل همراه شانکر باکتریایی هسته‌داران از شمال ایران و *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* به‌عنوان عامل بیماری از استان گلستان معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: شانکر و لکه برگی باکتریایی، درختان میوه هسته‌دار، جدایه، بیماری‌زایی

*مسئول مکاتبه: hd_mahmoudi@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

شانکر باکتریایی که به‌وسیله پاتوارهای *Pseudomonas syringae* (Van Hall 1901) ایجاد می‌شود، از معضلات اصلی تولید هسته‌داران در سراسر جهان به‌شمار می‌رود (ویسنت و همکاران، ۲۰۰٤). خسارت دقیق این بیماری را نمی‌توان برآورد کرد اما معمولاً در باغ‌های جوان موجب نابودی درختان به میزان ۱۰ تا ۷۵ درصد می‌شود (اگریوس، ۱۹۹۷). باکتری عامل بیماری شانکر اولین بار توسط برژینسکی در سال ۱۹۸٦ از روی یاس جداسازی و در سال ۱۹۰۲ توسط وان هال به این نام نامگذاری شد (هیرانو و آپر، ۲۰۰۷). در ایران اولین بار بیماری شانکر باکتریایی روی درختان زردآلو در اصفهان گزارش و میزان خسارت ناشی از آن را ۵۰-۲۲ درصد ذکر گردید (بهار و همکاران، ۱۹۸۵). عامل این بیماری روی درختان گیلاس در اطراف تهران پاتووار *P. s.*pv. *syringae* تشخیص داده شد (بناپور و همکاران، ۱۹۹۰). شمس بخش و رحیمیان (۱۹۹۷)، نشان دادند جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر در استان مازندران با مشخصات پاتووار *Pss* مطابقت دارد. الهی‌نیا و رحیمیان (۱۹۹۲)، باکتری *Pss* را به‌عنوان عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته‌دار در منطقه کلاردشت و حومه شناسایی و معرفی نمودند. وجود مخلوطی از پاتوارها و یا فرم‌های حدواسط تشخیص عامل بیماری را مشکل می سازد (ویسنت و روبرتز، ۲۰۰۷). گونه *P. viridiflava* برای اولین بار را به‌عنوان عامل بیمارگر و همراه شانکر روی هلو گزارش شد (اسکورتیچینی و مورون، ۱۹۹۷). سولیکوسکا و سوبیزوسکی (۲۰۰۸) نیز با جداسازی ۲۸۰ ایزوله از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر گونه *P.viridiflava* را به‌عنوان عامل همراه این بیماری گزارش کردند. در ایران این باکتری به عنوان عامل مولد هسته یخ روی درختان میوه هسته‌دار در منطقه فارس گزارش شده است (صحراگرد و همکاران، ۱۹۹۷). لکه برگی باکتریایی نیز امروزه از تمامی کشورهای جهان گزارش شده و در مناطق گرم و مرطوب خسارات آن می‌تواند چشمگیر باشد (گوئل و همکاران ۲۰۰۱). باکتری عامل بیماری *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* تمام گونه‌ها و هیبریدهای جنس *Prunus* را مورد حمله قرار می‌دهد و خسارت اقتصادی این بیماری به‌طور مستقیم با کاهش بازارپسندی میوه‌ها همراه است (استار و همکاران، ۱۹۹۷). در ایران جامی و همکاران (۲۰۰٤)، باکتری *Xap* را از درختان میوه هسته‌دار در استان گیلان جداسازی و گزارش نمودند. تقی‌نسب و همکاران (۲۰۰۵)، نیز با جداسازی چندین جدایه جنس *Xamthomonas* از درختان آلوده به شانکر در استان گلستان پیشنهاد کردند که بیش از یک پاتوژن در شدت بیماری شانکر در هسته‌داران شمال ایران موثر است.

www.SID.ir

وجود شرایط مساعد برای هر دو باکتری عامل شانکر و لکه برگی و شباهت برخی علایم آن‌ها با یکدیگر تفکیک بر اساس مشاهدات باغی در یک منطقه را دشوار نموده و در نتیجه درک درستی از عامل بیماری به ما نمی‌دهد از این‌رو در این پژوهش تلاش گردید با نمونه‌برداری طی دو سال زراعی ۱۳۸٦ و ۱۳۸۷ از مناطق عمده کشت هسته‌داران استان گلستان عوامل مولد و همراه این بیماری‌ها شناسایی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی: از اسفند ۱۳۸۵ تا خرداد ۱۳۸۷ از نمونه‌های مشکوک به لکه برگی و شانکر باکتریایی درختان هسته‌دار هلو، آلو، شلیل و زردآلوی استان گلستان (شهرستان‌های کردکوی، گرگان، علی‌آباد، رامیان و آزادشهر) نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از ضدعفونی بافت‌ها با اتانول ۷۰ درصد، قطعاتی از حد فاصل قسمت آلوده و سالم جدا و داخل پتری‌های استریل حاوی چند قطره آب مقطر استریل خرد شده و بعد از نیم ساعت یک قطره از سوسپانسیون فوق روی محیط آگار مغذی[1] به صورت مخطط گردید (رحیمیان، ۱۹۹٤).

بررسی خصوصیات فنوتیپی و تغذیه‌ای جدایه‌ها: آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی طبق روش‌های متعارف و تولید توکسین با استفاده از قارچ *Geotrichum candidum* به‌عنوان یک ارگانیسم شاخص ردیابی شد(شاد و هکاران، ۲۰۰۱). بررسی طیف منابع کربنی قابل استفاده جدایه‌ها براساس روش متداول (شاد و هکاران، ۲۰۰۱) انجام شد. استخراج رنگدانه زانتومونادین[2] به روش چون (۲۰۰۲) انجام گردید.

اثبات بیماری‌زایی روی برگ و سرشاخه‌های هلو: سرشاخه‌های جوان و سالم هلو و آلو به طول ۵۰ سانتی متر جدا شده و به‌وسیله سرنگ سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری ۰/۰۱ واحد در ٦۰۰ نانومتر به زیر پوست تزریق شد. شاخه‌ها داخل آب در محفظه پلاستیکی (به‌منظور حفظ رطوبت) نگهداری شدند. سرشاخه‌های دارای برگ‌های سالم جدا و سوسپانسیون باکتری با کدورت ۰/۰۱ در ٦۰۰ نانومتر به‌وسیله سرنگ‌های بدون نوک به پشت برگ در هشت محل تزریق شد. آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد (رحیمیان و همکاران ۱۹۹٤ و محمدی و همکاران، ۲۰۰۱).

1- Nutrient Agar
2- Xanthomonadin pigment

www.SID.ir

استخراج پروتئین از نمونه‌ها: سوسپانسیونی از کشت ٢٤ ساعت باکتری در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. سپس جذب نوری آن در دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ٦۰۰ نانومتر برابر یک تنظیم شد. به‌منظور لیز شدن سلول‌ها ۵۰ میکرولیتر SDS (۰/۱ حجم سوسپانسون) اضافه شد و به‌مدت ٤-۵ دقیقه در بن ماری (دمای جوش) قرار گرفت. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ ثانیه با دستگاه اولترا سونیک کاملاً هم‌گن و در ادامه به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpmسانتریفیوژ شدند. لایه رویی به آرامی برداشته و به‌عنوان پروتئین در چاهک‌های ژل پلی اکریلامید ریخته شد. الکتروفورز در جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام و با رسیدن رنگ برمو فنل بلو به انتهای ژل، پایان پذیرفت (رحیمیان، ١٩٩٤).

انگشت‌نگاری ژنومی: استخراج DNA به‌روش لیز قلیایی انجام شد. از کشت ٢٤ ساعته باکتری روی محیط KB سوسپانسیونی با جذب نوری ۱ در ٦۰۰ نانومتر تهیه شد. سوسپانسیون تهیه شده در شرایط استریل با پتاس ۵ درصد لیز شده و یک دقیقه در آب جوش گذاشته شد. شفاف شدن سوسپانسیون نشانه لیز شدن سلول‌های باکتری تلقی گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و لایه رویی به‌عنوان DNA برداشته و در منفی۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (عربی و همکاران، ۲۰۰٦).

واکنش زنجیری پلیمراز (PCR)[1]: واکنش PCR در حجم ۱۲ میکرولیتری شامل ٦/۲۵ میکرولیتر Mastr kit (خریداری شده از شرکت سیناژن)، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای D21 (5 AGC CGT AGG GGA ACC TGC GG 3) و D22 (5 TGA CTG CCA AGG CAT CCA CC 3)، ٤/۷۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه انجام شد. تکثیر با برنامه زمانی ۷ دقیقه در ۹۵ درجه و ۳۰ چرخه شامل ۲ دقیقه در ۹٤ درجه، ۱ دقیقه در ٦۰ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر Corbet Research مدل CG1-96 انجام شد. سنتز قطعات ناقص با نگهداری نمونه‌ها در ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه تکمیل شد. نمونه‌ها در منفی۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (مانسیو و هوروویز، ۱۹۹۷). الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این بررسی در مجموع ١٦۵ جدایه از نمونه‌های آلوده شاخه و برگ درختان هلو (۸۰ جدایه)، آلو (۲۹ جدایه)، شلیل (۳۸ جدایه) و زردآلو (۱۸ جدایه)، روی محیط آگار مغذی جداسازی شد.

1- Polymerase chain reaction

www.SID.ir

جدایه‌ها بر اساس رنگ روی محیط YDC، در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول پرگنه‌هایی کرم رنگ و لزج، گروه دوم پرگنه‌هایی زرد رنگ و گروه سوم پرگنه‌هایی سفید رنگ داشتند. جدایه‌های گروه اول همگی گرم منفی بوده و ۸۷ درصد آنها (۵۸ جدایه)، روی محیط KB[1] رنگدانه فلورسنت تولید کردند.

نتایج آزمون‌های شناسایی جدایه‌های گروه اول: جدایه‌های این گروه قادر به رشد بی‌هوازی نبودند. واکنش اکسیداز بین جدایه‌ها متغیر بود به‌طوری‌که ۲۷ درصد اکسیداز مثبت و بقیه اکسیداز منفی بودند. ۱۳ درصد جدایه ها (٦ جدایه)، قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بوده که ۷۰ درصد لوان مثبت و واکنش آرژنین دهیدرولاز بین آنها نیز متغیر بود. از بین ۵۸ جدایه فلورسنت ۳۰ جدایه واکنش فوق حساسیت بعد از ٢٤ ساعت روی شمعدانی بروز دادند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های سری لوپات (لوان مثبت، اکسیداز منفی، لهانیدن سیب‌زمینی منفی، آرژنین دهیدرولاز منفی و فوق حساسیت مثبت روی شمعدانی)، ٢٦ جدایه به‌عنوان گونه *P. syringae* تشخیص داده شد و آزمون‌های تکمیلی روی آن‌ها انجام گرفت. واکنش جدایه‌ها به هیدرولیز ژلاتین و اسکولین متغیر بود. هیچ‌کدام از جدایه‌ها قادر به رشد در ۷درصد نمک طعام نبودند اما در محیط کشت حاوی ۵ درصد نمک، تعدادی از جدایه‌ها رشد کردند. همچنین ۱۲ درصد (۳ جدایه)، توانستند از دی تارترات استفاده کنند. سایر نتایج در جدول (۱) آمده است. با توجه به نتایج فوق و مقایسه آن‌ها با جدول‌های استاندارد (شاد و همکاران، ۲۰۰۱)، این جدایه‌ها به‌عنوان گونه *P.syringae* تایید شدند. ذوب ژلاتین و هیدرولیز اسکولین مثبت و مصرف تارترات منفی بود که طبق نتایج ویسنت و همکاران (۲۰۰٤)، از ویژگی‌های پاتووار *Pss* است. در بین ۱۰ جدایه هلو ۸٤ درصد جدایه‌ها، در بین ۵ جدایه‌های آلو ٦۲ درصد و تمامی جدایه‌های شلیل همگی *Pss* تشخیص داده شدند.

آزمون زیست‌سنجی تولید توکسین: همه جدایه‌های *Pss* هاله بازدارنده رشد روی قارچ *Geotrhicum candidum* ایجاد کردند. قطر هاله بازدارنده بین جدایه‌ها از ۲۰-۲ میلی‌متر متغیر بود. محمدی و همکاران (۲۰۰۱)، نیز با بررسی تولید توکسین در جدایه‌های *Pss* تفاوت میزان توکسین تولید شده بین جدایه‌ها را متغیر گزارش داند که نتایج ما با آن مطابقت دارد.

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *Pss* روی شاخه و برگ: در همه جدایه‌ها بعد از ۵ روز علایم نکروز روی شاخه مشاهده گردید که پس از مدتی به سمت پایین گسترش یافت. طول ناحیه نکروز بین

1- King B

www.SID.ir

جدایه‌ها از ۰/٦ تا ٤/۹ سانتی‌متر متغیر بود (شکل ۱) در برخی نمونه‌ها با گذشت ۱۰ روز از زمان تلقیح در حاشیه محل نکروز صمغ نیز مشاهده گردید. باکتری‌های جداسازی شده از این نواحی با جدایه‌های اولیه کاملا مشابه بودند. در تیمارهای شاهد هیچ‌گونه نکروز مشاهده نشد. لکه‌های آبسوخته پس از ٤ تا ٥ روز روی برگ‌های تلقیح شده مشاهده گردید. لکه‌ها به‌تدریج از قسمت مرکزی نکروز شده و بعد از چند روز از بافت برگ جدا شدند. از کشت لکه‌های نکروز، باکتری اولیه جداسازی شد. شکل (۱).

(ب) (الف)

شکل ۱- اثبات بیماریزایی جدایه‌های *Pss* روی شاخه و برگ هلو. جدایه Ps16 (الف)، جدایه AA4 (ب)

نقوش الکتروفورز پروتئین جدایه‌های *Pss*: تشخیص جدایه‌ها با مقایسه پروفیل پروتئین آن‌ها با جدایه استاندارد انجام گرفت. مقایسه نقوش پروتینی جدایه‌های *Pss* سطح بالایی از تشابه بین جدایه‌ها با جدایه استاندارد نشان داد (شکل ۲). جدایه‌های هلو در مقایسه با جدایه‌های آلو و زردآلو در یک باند مشابه ضخامت بیشتری نشان دادند. طی یک بررسی نشان داده شد نقوش پروتئینی جدایه‌های *Pss* نیشکر با جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار تفاوت دارند (رحیمیان، ۱۹۹٤) اما مقایسه پروفیل پروتئین در این بررسی شباهت زیادی میان جدایه‌های مختلف هلو، آلو، شلیل و زردآلو نشان داد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- خصوصیات مورفولوژیک، بیوشمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های* *P. syringae* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار

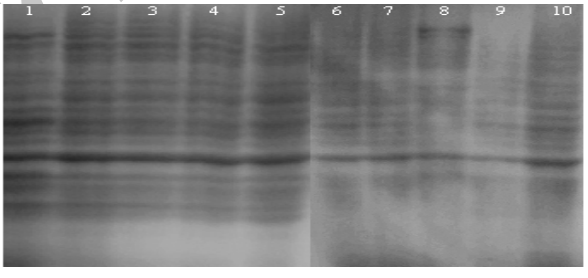
خصوصیت	واکنش	خصوصیات	واکنش	خصوصیت	واکنش
گرم	–	گلوکز	+	کاتالاز	+
رنگ روی YDC	کرم	L-آرابینوز	+	تولید H_2S از پپتون	–
اوره آز	–	مانوز	+	اثر بر شیر لیتموس	قلیایی
رشد هوازی	+	D- تارتارات	–	هیدرولیز نشاسته	–
رشد بی‌هوازی	–	آدونیتول	–	تولید ایندول	–
تولید رنگدانه فلورسنت	+	گالاکتوز	+	احیاء نیترات	–
تولید لوان	+	فروکتوز	+	رشد در نمک طعام ۷ درصد	-
اکسیداز	–	رافینوز	–	رشد در نمک طعام ۵ درصد	v
لهانیدن سیب‌زمینی	–	L- رامنوز	–	رشد در ٤٠ درجه سانتی‌گراد	–
آرژنین دی هیدرولاز	–	تری‌هالوز	–	رشد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد	+
فوق حساسیت روی توتون	+	مالتوز	–	مانیتول	v
هیدرولیز ژلاتین	v	D-سوربیتول	+	سلوبیوز	+
هیدرولیز اسکولین	v	لاکتوز	–	دلیستول	–
سوکروز	+	گلیسرول	+	اتانول	–
اینوزیتول	+	تولید هسته‌یخ	+		

v : واکنش جدایه‌ها متغیر بود

*: ۲٦ جدایه در این آزمون ها بکار گرفته شدند.

+: واکنش مثبت

– : واکنش منفی



شکل ۲- نقوش پروتئینی جدایه‌های *Pss*. نمونه ۱، *Pss* استاندارد، نمونه ۲ و ۳ جدایه‌های Ps17، Ps15 از هلو، نمونه‌های ٤ و ٥ جدایه‌های SS2 و SS3 از شلیل، نمونه‌های ٦ و ۷ جدایه‌های Alshco1، Alshco3 از آلو و نمونه‌های ۸، ۹ و ۱۰ جدایه‌های Zam11، Zam23 و Zgm11 از زردآلو جدا شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص جدایه‌های *Pss* با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: جدایه‌ها بعد از الکترفورز محصول PCR روی ژل یک باند ۵۵۰bp نشان دادند که کاملا با قطعه تکثیر شده در جدایه استاندارد مشابه بود (شکل۳). آغازگرهای D21 و D22 در واکنش PCR ناحیه ITS [1] (ناحیه بین 16SrDNA و 23SrDNA) را تکثیر می‌کنند. از این جفت آغازگرها برای تشخیص پاتووارهای *P. syringae* استفاده می‌شود (مانسائو و هوروایز، ۱۹۹۷؛ شاد و همکاران، ۲۰۰۱).

شکل۳- انگشت نگاری ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های *Pss* حاصل از واکنش PCR با آغازگرهای D21 و D122 . از راست به چپ : استاندارد جرم مولکولی، جدایه‌های Ps14، Ps15، Ps16، Ps17، Ps18 (هلو)، Alshco3 (آلو)، Zgm11 (زردآلو)، *Pss* استاندارد ZAM11 (زردآلو).

شناسایی جدایه‌های گروه دوم: از بین ۲۸ جدایه گروه دوم که همگی روی محیط YDC، پرگنه زرد داشتند، ۲۲ جدایه که واکنش گرم آن‌ها منفی بود انتخاب شدند. ابتدا چند آزمون کلیدی به‌منظور تشخیص در سطح جنس انجام گرفت. ده جدایه قادر به رشد در شرایط بی‌هوازی بودند که احتمالا مربوط به خانواده انتروباکتریاسه[2] می‌باشند. هفت جدایه که آزمون اکسیداز آن‌ها منفی بود به‌منظور شناسایی دقیق‌تر انتخاب و آزمون‌های تکمیلی روی آن‌ها انجام گرفت که نتایج آن به این صورت می‌باشد. از نظر رنگ و شکل کلونی روی محیط YDC این ۷ جدایه با بقیه تفاوت داشته و سرعت رشد آن‌ها در محیط آگار مغذی بسیار کند بود، به طوری که تک کلنی‌های آن‌ها ۷۲ ساعت بعد از کشت ظاهر شدند. کلونی‌ها لزج و رنگ آن‌ها زرد روشن بود. جدایه‌ها بعد از ٢٤ ساعت روی

1- Intergene spacer
2- Enterobactericae

www.SID.ir

شمعدانی فوق حساسیت نشان دادند. جدایه‌ها همگی کاتالاز مثبت، اکسیدار منفی، هوازی اجباری بودند و هیچ‌کدام توانایی تولید آنزیم‌های آرژنین دهیدرلاز، اوره آز و احیا نیترات را نداشته و روی محیط کشت حاوی ۵ و ۷ درصد نمک طعام رشد نکردند. این جدایه‌ها همگی از نظر تولید لوان در محیط حاوی سوکروز رشد در نمک طعام ۲ درصد، رشد در دماهای ۳۵ و ٤٠ درجه سانتی‌گراد، ذوب ژلاتین و تولید H_2S از پپتون مثبت بوده و هیچ‌کدام قادر به هیدرولیز اسکولین نبودند. هیچ‌کدام از جدایه‌ها نتوانستند از گلیسرول، لاکتوز، اتانول، مانیتول، دی–سوربیتول، ال–رامنوز، رافینوز، مالتوز، آدونیتول، ال و دی –زایلوز و تریپتوفان به‌عنوان منبع کربن استفاده کنند. تمامی جدایه‌ها از گلوکز، گالاکتوز، مانوز، سوکروز و آرابینوز استفاده کردند. با توجه به نتایج فوق و مقایسه با جداول استاندارد (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) این جدایه‌ها به‌عنوان *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) تشخیص داده شده و آزمون اختصاصی نظیر آنالیز رنگدانه زانتومونادین و اثبات بیماری‌زایی روی آن‌ها انجام گرفت.

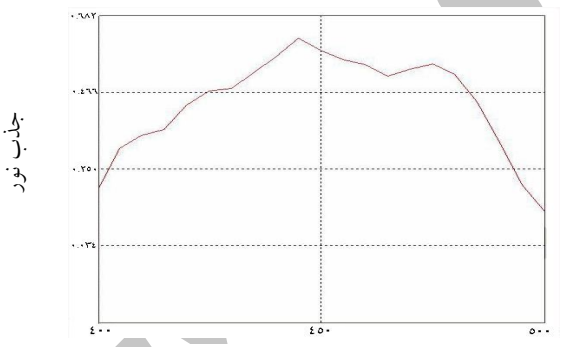
آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *Xap*: تمامی جدایه‌های *Xap* روی شاخه‌های هلو بعد از هفت روز، نکروز ایجاد کردند. اما در مقایسه با جدایه‌های *Pss* طول ناحیه نکروزه در این جدایه‌ها کمتر بود. جدایه‌ها بعد از ٤ الی ٦ روز لکه‌های آبسوخته روی برگ در محل تلقیح ایجاد کردند. این لکه‌ها از قسمت وسط نکروز شده و با گسترش قسمت نکروز بعد از ۷ روز از بافت برگ جدا شدند.

بررسی رنگدانه زنتومونادین: رنگدانه استخراج شده از جدایه‌های *Xap* به‌وسیله روش اسپکتوفتومتری بررسی شد. جدایه‌های مورد بررسی حداکثر جذب را در طول موج ٤٤٥ نانومتر نشان دادند (شکل ٤). استار و همکاران (۱۹۹۷)، با بررسی این رنگدانه در گونه‌های زانتوموناس از جمله *X. arboricola*، گوئل و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی رنگدانه در *X.oryzae* pv. *oryzae* و *X. juglandis* حداکثر جذب را در طول موج ٤٤٥ به‌دست آوردند. زانتومونادین‌ها رنگدانه‌های شبه کارتنوئیدی[1] هستند که منحصرا توسط گونه‌های جنس *Xanthomonas* تولید می‌شوند. یکی از نقش‌های بیولوژیکی این رنگدانه محافظت باکتری از خطرات اشعه UV نور خورشید است (گوئل و همکاران، ۲۰۰۱). تضمین بقاء اپیفیتی و تشدید علایم بیماری از طریق کمک به نفوذ و استقرار باکتری در گیاه از دیگر نقش‌های آن به‌شمار می‌رود. اکثر گونه‌های زانتوموناس در ارتباط با گیاه بوده و به‌صورت‌های مختلف بیمارگر، گندرو و اپیفیت دیده

1- Carotenoid like pigment

www.SID.ir

می‌شوند. دو مشخصه عمده این جنس تولید رنگدانه زانتومونادین و صمغ زانتان است (گوئل و همکاران، ۲۰۰۱). جامی و همکاران (۲۰۰٤)، باکتری *Xap* را از درختان میوه هسته‌دار در استان گیلان جداسازی و گزارش نمودند. طی یک بررسی در استان مازندران دخالت این باکتری در سوختگی شکوفه‌های هلو نشان داده شد (رحیمیان و همکاران، ۲۰۰٤). تقی‌نسب و همکاران (۲۰۰۵)، با جداسازی چندین جدایه جنس *Xamthomonas* از درختان آلوده به شانکر در استان گلستان پیشنهاد کردند که بیش از یک پاتوژن در شدت بیماری شانکر در هسته‌داران شمال ایران موثر باشد که یافته‌های ما آن را تایید نمود. در این پژوهش برای اولین بار *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni* به‌عنوان عامل بیماری از استان گلستان معرفی می‌گردد.



شکل ٤- طیف جذبی رنگدانه استخراج شده از جدایه‌های عامل لکه برگی و شانکر درختان میوه هسته‌دار در استان گلستان. حداکثر (بیشینه)، جذب در طول موج ٤٤٥ نانومتر به‌دست آمد.

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *P.viridiflava*: از بین جدایه‌های فلورسنت گروه یک، ٦ جدایه لوان منفی و قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند. تمامی جدایه‌ها در ۳۷ درجه رشد کردند. ذوب ژلاتین مثبت اما هیدرولیز اسکولین متغیر بود. سایر نتایج آزمون‌های تشخیصی در جدول (۵) آمده است. با توجه به خصوصیات فوق، این جدایه‌ها به‌عنوان گونه Dowson (Burkholder) *P. viridiflava* شناخته شدند. تمامی جدایه‌ها تولید هسته یخ کرده و روی شمعدانی واکنش فوق حساسیت بعد از ٢٤ ساعت نشان دادند، اما واکنش فوق حساسیت آنها متغیر و نسبت به جدایه‌های *Pss* ضعیف‌تر بود. تمامی جدایه‌ها روی برگ‌های هلو ٤ روز بعد از تلقیح لکه برگی دادند اما

www.SID.ir

هیچ‌کدام از جدایه‌ها روی شاخه‌های هلو و آلو نکروز ایجاد نکردند. این باکتری به‌عنوان یک بیمارگر و اپی فیت در بسیاری از گیاهان گزارش شده است. این باکتری دامنه میزبانی وسیعی داشته و در بسیاری از گیاهان، شانکر، بلایت و لکه برگی ایجاد می‌کند (شمس بخش و رحیمیان،۱۹۹۷). اسکورتچینی و مورون (۱۹۹۷) برای اولین بار ***P.viridiflava*** را به‌عنوان عامل بیمارگر روی هلو گزارش نمودند. سولیکوسکا و سوبیزوسکی (۲۰۰۸) نیز با جداسازی ۲۸۰ ایزوله از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر گونه ***P.viridiflava*** را به‌عنوان عامل همراه این بیماری گزارش کردند. در مجموع این باکتری در درختان میوه هسته‌دار به‌عنوان یک بیمارگر ثانویه و اپیفیت مطرح بوده و قابلیت ایجاد هسته یخ آن نیز اثبات شده است (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) که نتایج بررسی حاضر نیز آن را تایید نمود. صحراگرد و همکاران (۱۹۹۷)، نیز این باکتری را به‌عنوان عامل مولد هسته یخ روی درختان میوه هسته دار در منطقه فارس گزارش کردند. از این رو اهمیت آن در کنترل صدمات ناشی از سرمازدگی این محصولات می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در این تحقیق برای نخستین بار ***P.viridiflava*** به‌عنوان عامل همراه شانکر باکتریایی هسته‌داران از شمال ایران معرفی می‌گردد.

جدول ۵- خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های *P .viridiflava*

خصوصیات	واکنش	خصوصیت	واکنش	خصوصیت	واکنش
واکنش گرم	–	سوربیتول	+	گالاکتوز	+
لهانیدن سیب‌زمینی	+	اتانول	–	مالتوز	–
ذوب ژلاتین	+	لوان	–	دی- تارتارات	–
هیدرولیز اسکولین	–	اینوزیتول	+	دکستروز	+
واکنش شیر لیتموس	قلیایی	دی- مانیتول	+	تری هالوز	–
احیا نیترات	–	اکسیداز	–	رامنوز	–
تولید رنگدانه فلورسنت	+	تحمل ۵ درصدنمک	V	گلوکز	+
آرژنین دهیدرولاز	–	تولید ایندول	–	گلیسرول	+
فوق حساسیت روی شمعدانی	+	اوره از	–	سوکروز	–
رشد در ٤١ درجه	–	لاکتوز	–	آرابینوز	+
رشد در ۳۷ درجه	+	رافینوز	–		
مواد احیا کننده از ساکارز	–	فروکتوز	+		

V: واکنش جدایه‌ها متغییر بود ٦ جدایه در این آزمون‌ها به‌کار گرفته شد. + : واکنش مثبت – :واکنش منفی

www.SID.ir

عوامل غالب مولد شانکر هسته‌داران در مناطق مورد نمونه‌برداری:در مناطق شرق استان از جمله علی‌آباد، آزادشهر و دلند از نمونه‌های آلوده فقط باکتری *P.s.* pv. *syringae* جداسازی شد. در منطقه غرب استان (کردکوی)، مخلوطی از گونه‌های *Xanthomonas*pv. *pruni arboricola* (۸ جدایه)، و *P. s.* pv. *syringae* (۲ جدایه)، شناسایی گردید. ٦ جدایه *P.viridiflava* فقط از باغ‌های گرگان جداسازی شد.

منابع

1.Agrios, G. 1997. Plant pathology. 4th. Academic Press, 663p.

2.Arabi, F., Nikravesh, Z., Babaeezad, V., Rezaeean, V., and Rahimian, H. 2006. Occurrrence of bacterial leaf spot garden beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Iran. Iran. J. plant Pathology. 42: 665-669.(In Persian).

3.Bahar, M., Mojtahedi, H., and Akhyani, A. 1985. Bacterial canker of apricot trees in Esfahan. Iran. J. Plant Pathology. 18: 58-67. (In Persian).

4.Banapoor, A., Zakiee, Z., and Amani, G. 1990. Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on cherry trees in Tehran. Iran. J. Plant Pathology. 26: 67-72. (In Persian).

5.Chun, W.W.C. 2002. Xanthomonadins, unique yellow pigments of the genus *Xanthomonas*. Pla. Heal. Inst J. 4: 102-105.

6.Elahinia, S.A., and Rahimian, H. 1992. Identification agent bacterial canker of stone fruit tree in Summer area Mazandran. Proc. 11th Plant protect. cong. Iran. p: 213.

7.Goel, A., Rajagopal, L., and Sonti, R.V. 2001. Pigment and virulence deficiencies associated with mutations in the aroE Gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Appl. Enviro. Mic. J. 67: 245–250.

8.Hirano, S.S., and Upper, C.D. 2007. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*: a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. Microbiol. Mol. Bio. Rev. J. 64: 624–653.

9.Jami, F., Niknejadkazempoor, M., and Elahini, S.A. 2004. Study of bacterial disease on stone fruit tree in Gilan province. Proc. 16th Plant protect.cong. Iran, p: 431.

10.Manceau, C., and Horvais, A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. Appl. Enviro. Mic. J. 63: 491-505.

11.Mohammadi, M., Ghasemi, A., and Rahimian, H. 2001. Phenotypic characterization of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van

www.SID.ir

Hall, the causal agent of bacterial canker disease of stone fruit trees. Agric. Sci. Technol. J. 3: 51-65.
12. Rahimian, H. 1991. Bacterial leaf spot Plargonium on Mazandaran and Semnan province. Iran. J. plant .Pathology. 27: 1-12.
13. Rahimian, H., Nikravesh, Z., Arabi, F., and Rezaeean, V. 2004. Association of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* with blossom blight of peach in Mazandaran. Proc. 16th Plant protect. Cong. Iran, p: 424.
14. Rahimian, H.(1994. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. J. Phytopathology. 143: 321–324.
15. Sahragard, N., Banihashemi, Z., and Taghavi, S.M. 1997. Identification of ice nucleation activities bacterial on stone fruit tree in Fars province. Iran. J. plant Pathology. 33: 209-215.
16. Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3th, APS Press. 373pp.
17. Scortichini, M., and Morone, C. 1997. Apoplexy of peach tree caused by *Pseudomonas viridiflava*. J. Phytopathology. 145: 367-399.
18. Shamsbakhsh, M., and Rahimian, H. 1997. Comparative study on agent of citrus blast and bacterial canker of stone fruit tree in Mazandaran. Iran. J. Plant Patholo. 33: 143- 132.
19. Starr, M.P., Jenkins, C.L., Bussey, L.B., and Andrewes, A.G. 1997. Chemotaxonomic significance of the Xamthomonadins, novel brominated Aryl-polyen pigments produced by bacteria of genus *Xanthomonas*. Arch. Mic. J. 113: 1-9.
20. Sulikowska, M., and Sobiczewski, P. 2008. *Pseudomonas* spp. Isolated from stone fruit trees in Poland, Zemdirbyste-Agriculture. 95: 166–170.
21. Taghinasab, M., Alimi, M., Motaki, A., and Rahimian, H. 2005. Bacterial strains associated with bacterial canker on Golestan Province. Proc. 18th Plant protect.cong. Iran, p: 414.
22. Vicente, J.G., and Roberts, S.J. 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. Euro. J. Plant. Pathol. 117: 383-392.
23. Vicente, J.G., Alves, J.P., Russel, K., and Roberts, S.J. 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. Euro. J. Plant. Patholo. 110: 337-351.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 18(4), 2012
http://jopp.gau.ac.ir

Investigation on casual and associated agents with bacterial canker stone fruit trees in Golestan Province

***H. Mahmoudi[1], K. Rahnama[2], H. Rahimian[3], S. Nasrolahnejad[4] and M. Taghinasab[5]**

[1]M.Sc. Student of Plant pathology Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]Associate Prof., Dept. of Plant pathology Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [3]Professor Dept. of Plant pathology Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [4]Assistant Prof., Dept. of Plant pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural, Iran, [5]Educational Instructor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Received: 2009-8-1 ; Accepted: 2011-11-10

Abstract

Bacterial canker and leaf spot are typical symptoms and of the most important diseases of stone fruit trees in world and in North your country. Significant management of plant disease is possible by identification and diagnosis plant pathogenic casual and associated agents. Various samples of canker and leaf spot tissues during 2007-2008 collected from different orchards of stone fruit trees of Golestan province and pathogenicity tests was demonstrated on peach young branches and leaf tissues by various bacterial isolates. Based on the morphological, nutritional, biochemical, physiological, total cellular protein pattern and PCR reaction with d21 and d22 primers *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*), and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* identified as casual agents of bacterial canker in this province. *Pss* was the major agent disease on the east regions such as Ali-Abad and Azad shahr but in west regions such as Kordkooy *Xap* was major agent. *P.viridiflava* isolated from gorgan areas only as associated agent with disease. This research is the first report on *Xap*, the casual agent of bacterial canker in stone fruit trees Golestan Province and also first report on *P.viridiflava*, as associated agent with bacterial canker stone fruit trees on the north regions Iran.

Keyword: Bacterial canker and leaf spot; Stone fruit tree; Strain; Pathogenesis.

*Corresponding Author; Email: hd_mahmoudi@yahoo.com

www.SID.ir
Archive of SID