مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۹، شماره ۲، سال ۱۳۹۲

# مقاومت نسبی برخی ژنوتیپ های بومی و تجاری گیلاس و آلبالو به *Pseudomonas syringae*

# Relative Resistance of some Local and Commercial Cherry Genotypes to *Pseudomonas syringae*

امیر باباعلی[۱]، منصوره کشاورزی[۲] ، ناصر بوذری[۳]، علی‌محمد شکیب[۴] و سونا حسین‌آوا[۵]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مغان، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دامغان
۲ ، ۳ و ۵- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۴- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۴** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۱**

## چکیده

**باباعلی، ا.، کشاورزی، م.، بوذری، ن.، شکیب، ع. م. و حسین آوا، س. ۱۳۹۲.** مقاومت نسبی برخی ژنوتیپ های بومی و تجاری گیلاس و آلبالو به *Pseudomonas syringae*. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۹: ۳۱۰ - ۲۹۵.**

**در این تحقیق که در سال ۱۳۸۹-۱۳۸۸ در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر انجام شد، مقاومت نسبی شاخه و برگ شانزده ژنوتیپ محلی و هفت رقم تجاری گیلاس و آلبالو به باکتری *Pseudomonas syringae* در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. ارزیابی مقاومت شاخه‌های بریده با مایه‌زنی شاخه‌های زمستانه و ارزیابی مقاومت برگ با سه روش مایه‌زنی مستقیم باکتری، مایه‌زنی در محیط آب-آگار و مایه‌زنی با استفاده از پمپ خلاء انجام شد. به منظور تهیه زادمایه باکتری، از یک جدایه بیماریزای *P. syringae* که از درخت گیلاس آلوده در کرج جداسازی و با آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی شناسایی شده بود، استفاده شد. بر اساس نتایج، تنوع گسترده‌ای در واکنش ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف به این بیماری دیده شد. گروه‌بندی بر اساس طول نکروز در شاخه نشان داد که ۴۳/۵٪ ارقام و ژنوتیپ‌ها مقاوم، ۴۳/۵٪ حدوسط و ۱۳٪ حساس بودند. آلبالوی همدان و گیلاس KB8 به ترتیب به عنوان حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسائی شدند. بررسی روش‌های مختلف مایه‌زنی برگ نشان داد که روش پمپ خلاء بهترین روش برای ارزیابی مقاومت برگ است. بر این اساس، ۶٪ ژنوتیپ‌ها به طور نسبی مقاوم، ۳۵٪ حدوسط و ۵۹٪ حساس گروه‌بندی شدند، گیلاس‌های بلامارکاد و دیررس دانشکده حساس‌ترین و آردی جوبلیوم مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند. با توجه به عدم مشاهده همبستگی بین مقادیر مقاومت شاخه و برگ، حساسیت یا مقاومت برگ نمی‌تواند ملاک مقاومت شاخه به شانکر باکتریایی باشد.**

**واژه‌های کلیدی: گیلاس، آلبالو، شانکر باکتریایی، *Pseudomonas syrinage*، مقاومت.**

نویسنده مسئول: mkeshavarze@spii.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱



Archive of SID
www.SID.ir

**مقدمه**

بیماری شانکر باکتریایی که از آن به عنوان گموز، بلایت شکوفه و بلایت شاخه نیز نام برده می‌شود، از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار در کشورهای مختلف جهان و عامل اصلی کوتاهی عمر (Tree Short Life) درختان میوه هسته‌دار است. میزبان‌های اصلی آن، درختان میوه هسته‌دار به خصوص گیلاس، آلبالو، هلو و زردآلو هستند اما در بادام، گلابی، مرکبات، افرا، توسکا، فندق، ذغال اخته، مگنولیا، یاس بنفش، صنوبر، زیرفون، سوسن، رز و تعدادی از سبزیجات و غلات دانه ریز نیز ایجاد آلودگی می‌کند. خسارت این بیماری در درختان گیلاس، آلبالو، آلو، هلو و زردآلو و گیلاس وحشی دارای اهمیت اقتصادی است (Bultreys and Kaluzna, 2010؛ Lyskanowska and Rejman, 1978) و می‌تواند در باغات جوان ۷۵-۱۰٪ و باغات مسن ۲۵-۱۰٪ و گاهی تا ۸۵٪ خسارت وارد کند (Ogawa *et al.*, 1995؛ Endert and Ritchie, 1984).

نشانه‌های بیماری شانکر باکتریایی به رقم، سن درخت، بافت مورد تهاجم و شرایط محیطی بستگی دارد. مهم‌ترین نشانه آن ایجاد شانکر به همراه تراوشات صمغی در تنه درخت است که می‌تواند موجب کاهش عملکرد یا حتی مرگ درخت در هر سنی شود. علائم در برگ، به صورت لکه‌های آبسوخته که در نهایت قهوه‌ای و خشک می‌شوند و حالت غربالی به برگ می‌دهند و در میوه، به صورت لکه‌های سطحی قهوه‌ای رنگ دیده می‌شود (Ogawa *et al.*, 1995). این علائم توسط گونه‌های *P. syringae* و *P. morspronorium* به طور یکسانی ایجاد می‌شوند اما گونه *P. syringae* مهم‌ترین باکتری عامل این بیماری محسوب می‌شود (Bradbury, 1989؛ Young *et al.*, 1996). عامل اصلی شانکر باکتریایی گیلاس در شمال آمریکا، استرالیا و آفریقای جنوبی گونه *P. syringae* و در اروپا گونه‌های *P. syringae* و *P. morspronorium* هستند (Prunier and Cotta, 1985؛ Scortichini *et al.*, 1995؛ Garrett, 1985). در ایران، بیماری شانکر باکتریایی برای اولین بار توسط بهار و همکاران (Bahar *et al.*, 1981) از درختان زردآلو در اصفهان تشخیص داده شده و عامل آن *P. syringae* گزارش شد. عامل شانکر و سر خشکیدگی درختان گیلاس در دماوند، مازندران و کرج نیز همین گونه گزارش شده است (Banapur *et al.*, 1990؛ Shams Bakhsh and Rahimian, 1989؛ Rahimian *et al.*, 2004). این بیماری در ایران خسارت قابل توجهی به درختان میوه هسته‌دار می‌زند به طوری که از ۴۰۸۸۳ هکتار سطح مبارزه با بیماری‌های گیاهی در سال ۱۳۸۱، ۶۵۰ هکتار مربوط به شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار بوده است (Anonymous, 2002).

کنترل موفق شانکر باکتریایی به دلیل فقدان سموم یا عوامل بیوکنترل مناسب و

Archive of SID



www.SID.ir

خصوصیت اندوفیتی باکتری *P. syringae* در برخی مراحل زندگی، قابل حصول نیست (Gilbert *et al*., 2010). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی چون استرپتومایسین مقرون به صرفه نبوده و موجب بروز مقاومت در جمعیت‌های باکتری می‌شود (Lacobellis *et al*., 2005). ترکیبات مسی نیز تاثیر اندکی داشته، ایجاد گیاه سوزی می‌کنند و به دلیل پایداری بالا وارد چرخه‌های اکولوژیک می‌شوند. مصرف این ترکیبات باعث تجمع مس در خاک و منابع آبی شده و اثر مخربی بر میکروارگانیسم‌های خاک داشته و بدین ترتیب از فرایند تجزیه مواد آلی در خاک جلوگیری می‌کنند (Pietrzak and Phail, 2004). با توجه به مشکلات به کارگیری روش‌های کنترل شیمیایی، کاربرد ارقام مقاوم می‌تواند راهکاری کم هزینه، پایدار و غیر شیمیایی در مدیریت این بیماری باشد (Ogawa *et al*., 1995). از وجود تفاوت در سطوح مقاومت نسبی ارقام مختلف آلبالو و گیلاس به این بیماری گزارش‌هائی منتشر شده است (Vries, 1965؛ Garrett, 1986؛ Bedford *et al*., 2003). کلون‌ها، ارقام و ژرم‌پلاسم گیلاس نگهداری شده در ایالات متحده، فرانسه، آلمان، لهستان و ایتالیا نیز واکنش‌های متنوعی به این باکتری نشان داده‌اند (Allen and Dirks, 1978؛ Schortichini *et al*., 1995؛ Santi *et al*., 2004؛ Spotts *et al*., 2010؛ Fischer and Hohlfield, 1998). چنین تنوعی در واکنش برخی ارقام و ژنوتیپ‌های داخلی نیز مشاهده شده است (Bouzari, 2006؛ Hamzenejad *et al*., 2004). با توجه به وجود چنین تنوعی در مقاومت ارقام مختلف، هدف از این تحقیق تعیین مقاومت نسبی اندام‌های شاخه و برگ در ۲۵ ژنوتیپ و ارقام برتر ایرانی و تجاری آلبالو و گیلاس به باکتری *P. syringae* بود.

## مواد و روش‌ها

در اواسط بهار سال ۱۳۸۸، از لکه‌های برگی و شانکرهای صمغ زده در سرشاخه‌های درختان گیلاس و آلبالوی موجود در کلکسیون درختان میوه موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر واقع در کمال‌شهر کرج نمونه‌برداری شد. قطعات کوچکی از حاشیه شانکرهای ضدعفونی شده و حاشیه لکه‌های برگی را بریده و در هاون چینی حاوی چند میلی‌لیتر آب مقطر استریل له کرده و پس از نیم ساعت نگهداری در شرایط آزمایشگاه، چند لوپ از سوسپانسیون حاصله روی محیط Kings' B مخطط شد. تشتک‌های پتری به انکوباتور $25\ ^{\circ}C$ منتقل و تولید مواد فلوروسنت پس از ۳-۲ روز بررسی شد. کلنی های فلوروسنت خالص‌سازی شدند و با استفده از آزمون‌های گرم، بیماریزایی و LOPAT (تولید لوان، اکسیداز، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، تولید ارجینین دی هیدرولاز و واکنش فوق حساسیت) شناسایی شدند. برای آزمون اثبات بیماری‌زایی، نوک شاخه

Archive of SID



www.SID.ir

بریده‌های یک ساله را قطع کرده و ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی (جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در محل برش قرار داده شد. سپس نواحی مایه‌زنی شده با پارافیلم بسته شدند و شاخه‌ها درون ظروف مرطوب (ظروف پلاستیکی شفاف درداری که مشی در کف آن‌ها وجود داشته و زیر آن تا نیم سانتی‌متر آب ریخته شده بود) چیده و به گلخانه ۱۵°C با تناوب نوری طبیعی منتقل و یک هفته بعد، پارافیلم‌ها برداشته شدند. شاخه‌های شاهد با مقطر استریل مایه‌زنی شدند. ظهور لکه‌های نکروزه در زیر پوست شاخه‌ها پس از یک ماه به منزله بیماری‌زا بودن جدایه‌ها بود (Santi *et al.*, 2004). سایر آزمون‌های فنوتیپی شامل توانایی رشد هوازی/ بی‌هوازی، تولید کاتالاز، اوره از، مواد احیا کننده از سوکروز و گاز هیدروژن سولفور، هیدولیز ژلاتین، اسکولین و چربی، اثر بر شیر لیتموس، احیای نیترات، MR/VP و شکست کازئین بر اساس روش‌های استاندارد (Lelliott and Stead, 1987؛ Schaad *et al.*, 2001) و تائید نهایی توسط آزمون PCR انجام شد. مخلوط PCR در حجم نهایی ۲۰ µl شامل کیت آماده (Bioner) (حاوی آنزیم تگ DNA پلیمراز، دی ان تی پی، کلرید منیزیم و بافر PCR) و ۱۲۰ پیکومول از هر آغازگر اختصاصی بود (Sorensen *et al.*, 1998). تک کلونی ۴۸ ساعته باکتری به عنوان DNAی الگو به آن افزوده شد. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۹۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ °C به مدت ۹۰ ثانیه و اتساع در ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه بود که با یک مرحله اتساع نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. باکتری *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (اهدایی پروفسور منسفیلد، دانشگاه لندن)، یک سویه محلی از باکتری *Erwinia amylovora* و آب مقطر استریل به عنوان شاهد به کار برده شدند. محصولات PCR به همراه مارکر (100 bp Plus DNA Ladder) به مدت ۳۰ دقیقه در آگارز ۱٪ در ۸۰-۷۰ ولت الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیم بromید، از باندهای حاصله توسط ژل داک (Uvitec)عکسبرداری شد.

به منظور تهیه مایه باکتری، یکی از سویه‌های بیماریزا انتخاب و پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط Luria Berthoni (LB)، کدورت سوسپانسیون باکتریایی در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۵ تنظیم و برای مایه‌زنی به کار برده شد.

ارزیابی مقاومت نسبی بر روی شانزده ژنوتیپ بومی و هفت رقم تجاری آلبالو و گیلاس (شانزده گیلاس و هفت آلبالو) متعلق به کلکسیون درختان میوه موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر واقع در کمال‌شهر کرج انجام شد. مواد گیاهی بومی بر اساس نتایج پروژه مصوب

Archive of SID

www.SID.ir

موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر در سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۸۱ انتخاب شده و دارای خصوصیات ممتازی همچون درشتی میوه، بالابودن نسبت گوشت به هسته، پرباری و دیررسی هستند.

ارزیابی بر روی شاخه‌های دو ساله و برگ در شرایط آزمایشگاهی در موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر در کرج انجام شد. ارزیابی مقاومت نسبی شاخه ۲۳ رقم و ژنوتیپ با استفاده از شاخه‌های بریده دو ساله و بر اساس پروتکل موسسه تحقیقات باغبانی انگلستان (Horticultural Research Institute, HRI)و موسسه ملی تحقیقات کشاورزی فرانسه (National Institute for Agricultural Research: INRA) انجام شد (Santi *et al*., 2004). بدین منظور، در بهمن ماه شاخه‌های خواب به طول ۲۵-۲۰ سانتی‌متر بریده و به آزمایشگاه (بخش تحقیقات باغبانی، موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر) منتقل شدند. شاخه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول ۵٪ هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و پس از شستشو در جریان آب، سه مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه در تشت آب کاملاً شسته شدند. پس از خشک شدن، سر و ته آن‌ها را بریده و بسته به قطر، ۵۰-۲۵ میکرولیتر مایه باکتری روی سرشاخه قرار داده و با پارافیلم بسته شد. سپس شاخه ها داخل شیشه‌های مربایی که تا ۲ سانتی‌متری آن‌ها آب بود چیده شده و به اتاقک رشد (دمای ۲۵ °C و رطوبت بالای ۹۰٪) منتقل شدند. یک هفته بعد پارافیلم‌ها باز شده و نمونه‌ها برای مدت یک هفته در سردخانه (۱۰°C-) نگهداری شدند. سپس در ظروف مرطوب چیده شدند و به گلخانه بیماری‌شناسی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (دمای ۱۵°C و تناوب طبیعی نور) منتقل شدند و پس از یک ماه، میزان پیشرفت بیماری با اندازه‌گیری طول (سانتی متر) ناحیه نکروز شده پس از کندن پوست سطحی شاخه اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقاومت نسبی برگ بر روی هفده رقم و ژنوتیپ انجام شد. بدین منظور در اوایل فصل بهار، برگ‌های جوان و تازه با سه روش شامل مایه‌زنی رگبرگ میانی (Bedford *et al*., 2003)، نگهداری برگ‌های مایه‌زنی شده در آب-آگار (Yessed *et al*., 1992) و مایه‌زنی با استفاده از پمپ خلاء (به کار برده شده در این تحقیق)، در شرایط آزمایشگاه مایه‌زنی شدند. در روش مایه‌زنی رگبرگ میانی، پس از ضدعفونی سطحی برگ‌ها، برش عمودی کوچکی در رگبرگ میانی ایجاد و یک قطره مایه باکتری روی آن قرار داده شد. سپس برگ‌ها داخل ظروف مرطوب چیده شده و به گلخانه (۱۵°C و تناوب طبیعی نور) منتقل شدند و ده روز بعد، میزان نکروز بررسی شد. روش آب-آگار مشابه روش رگبرگ میانی بود اما پس از مایه‌زنی، برگ‌ها در تشتک‌های پتری حاوی آب- آگار ۱۰٪ استریل قرار داده شدند. در روش پمپ خلاء، ابتدا برگ‌های هر رقم از

Archive of SID

www.SID.ir

نوک هم سطح و دسته‌بندی شدند و درون بشر حاوی ۳۰ میلی‌لیتر مایه باکتری (به نحوی که ۱/۵ سانتی‌متر از نوک برگ‌ها در مایه باکتری غوطه‌ور باشد) قرار داده شدند. بشرها به دسیکاتور متصل به پمپ خلاء منتقل شدند و پس از مشاهده خروج حباب از برگ‌ها، پمپ خاموش و شیر ورودی هوا باز شد که باعث نفوذ مایه باکتری به فضای بین سلولی برگ‌ها شد. سپس، حد نفوذ مایه باکتری در تک تک برگ‌ها به وسیله مارکر علامت‌گذاری و سطح برگ‌ها با دستمال کاغذی خشک شد و پس از چیدن درون ظروف مرطوب، به گلخانه منتقل شدند. ده روز بعد، ایجاد یا عدم ایجاد نکروز در برگ و بیشترین طول ناحیه نکروزه در پهنک تک تک برگ‌ها اندازه‌گیری شد. در کلیه آزمون‌های برگ و شاخه، نمونه‌های شاهد با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند. کلیه آزمون‌های برگ و شاخه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۰ تکرار انجام و دو بار تکرار شدند. جزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن توسط نرم‌افزار SAS انجام شد و دندروگرام گروه‌بندی ارقام با استفاده نرم‌افزار SPSS ترسیم شد.

## نتایج و بحث

نام ژنوتیپ‌های گیلاس و آلبالوی مورد استفاده در این تحقیق و منشاء آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- ژنوتیپ‌ها و ارقام گیلاس و آلبالو و منشا اولیه آن‌ها

Table 1. Genotypes and cultivars of sweet and soure cherry and their origin

| Germplasm | ژرم پلاسم | Origin | منشا | Germplasm | ژرم پلاسم | Origin | منشا |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cherry | گیلاس | | | Meshkin shahr | مشکین شهر | Ardebil | اردبیل |
| No 28 | شماره ۲۸ | Tehran | تهران | Mahali Karaj | محلی کرج | Karaj | کرج |
| Surati Lavasan | صورتی لواسان | Lavasan | لواسان | Bing | بینگ | USA | آمریکا |
| Darun gazna | درون گزنا | Tabriz | تبریز | KB8 | | Tehran | تهران |
| Shamlu | شاملو | Karaj | کرج | Sour cherry | آلبالو | | |
| Gium | گیوم | - | - | Hamedan | همدان | Tehran | تهران |
| Protiva | پروتیوا | - | - | RD Jubileum | آر-دی جوبلیوم | Hungry | مجارستان |
| Siah-e-zudras | سیاه زودرس | Karaj | کرج | No 119 | شماره ۱۱۹ | Tehran | تهران |
| No 46 | شماره ۴۶ | Tehran | تهران | KB20 | | Tehran | تهران |
| Blamarka | بلامارکا | Italy | ایتالیا | Montmorency | مونت مورنسی | France | فرانسه |
| Frasida | فراسیدا | France | فرانسه | Meygun | میگون | Tehran | تهران |
| Sefid 90 | سفید ۹۰ | Urmie | ارومیه | KB21 | | Tehran | تهران |
| Dirras-e-daneshkade | دیررس دانشکده | Karaj | کرج | | | | |

در مجموع، چهار جدایه فلوروسنت که درمحیط اگار غذایی-سوکروز کلنی‌های سفید رنگ مدور، برآمده و لعاب‌دار با قطر ۳-۴ میلی‌متر تولید کردند، جداسازی شد. بر

Archive of SID

www.SID.ir

اساس نتایج آزمون اثبات بیماریزایی، انتهای مایه‌زنی شده شاخه‌ها نکروز شدند که مبین بیماری‌زا بودن سویه‌ها در گیلاس و آلبالو بود. همچنین، واکنش جدایه‌ها به آزمون‌های LOPAT (+– – – +) نیز مبین بیماریزا بودن (غیر ساپروفیت بودن) جدایه‌ها بود. در نتایج آزمون پی سی آر، قطعه ۷۵۲ جفت بازی مربوط به بخشی از ژن *syrB* در جدایه‌های *P. syringae* تکثیر شد اما چنین باندی در محصولات PCR نمونه‌های شاهد (جنس‌های زانتاموناس، اروینیا و آب دو بار تقطیر) مشاهده نشد (شکل ۱). ژن *syrB* مسئول سنتز توکسین سیرینگومایسین در گونه‌های *P. syringae* است (Sorensen, 1998؛ Quigley and Gross, 1994). این توکسین با ایجاد کانال‌های یونی در غشاء سلولی، بافت‌های گیاهی را لیز می‌کند. در مجموع، بر اساس نتایج آزمون‌های فنوتیپی (جدول ۲)، بیماریزایی و ملکولی، جدایه‌های جمع‌آوری شده *P. syringae* تشخیص داده شدند.

جدول ۲- ویژگی‌های فنوتیپی سویه *P. syringae* جدا شده از درخت آلوده گیلاس

Table 2. Phenotypical characteristics of *P. syringae* strain isolated from infected trees of sweet cherry

| Test | Reaction | Test | Reaction |
|---|---|---|---|
| HR reaction | + | Reducing compounds from sucrose | - |
| Gram reaction | - | $H_2S$ production | - |
| Arginine dihydrolase | - | Casein degradation | + |
| Oxidative/fermentative (O/F) | +/- | Gelatin hydrolysis | + |
| Potato rot | - | Aesculin hydrolysis | + |
| Tween hydrolysis | + | Starch hydrolysis | - |
| Oxidase | - | Catalase | + |
| Levan formation | + | Urease | - |
| Flourescent pigments | + | Nitrate reduction | - |
| Litmus milk: | | Methyl Red | - |
| Alkaline | - | Voges Proskuer (VP) | - |
| Acidic | + | | |

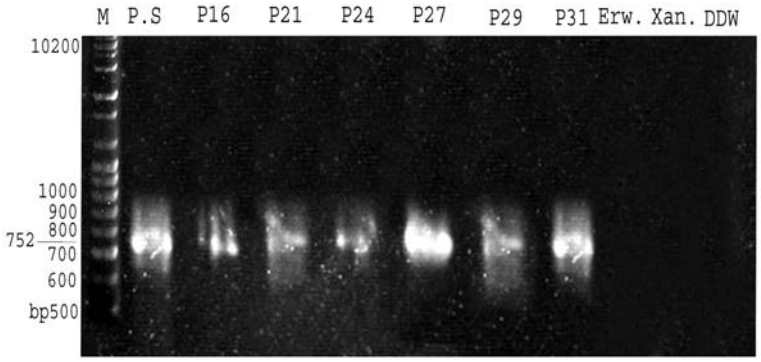
+: Positive reaction -: Negative reaction

آلوده‌سازی شاخه‌های بریده بر اساس روش سانتی و همکاران (Santi *et al*., 2004) انجام شد. در این روش، از شاخه‌های زمستانه استفاده می‌شود که پس از مایه‌زنی، برای دوره ای در دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. به نظر می‌رسد این مرحله برودتی موجب تحریک ایجاد هسته‌های یخ شده و در ایجاد و توسعه شانکر موثر است. به همین دلیل است شانکرهای وسیع و کشنده عموماً پس از زمستان‌های سرد ایجاد می‌شوند (Prunier and Bordjiba, 1991؛ Klement, 1988؛ Klement *et al*., 1983).

بررسی نواحی مایه‌زنی شده شاخه‌ها پس از کندن پوست نشان داد که بافت چوب نکروزه و

Archive of SID

www.SID.ir




شکل ۱- قطعه ۷۵۲ جفت بازی تکثیر شده از DNA جدایه‌های *P. syringae* (ستون‌های ۷-۲)

Fig. 1. A 752 bp band proliferated from *P. syrinagae* DNA samples (lanes 2-7)

Erw: *E. amylovora*, Xan: *Xanthomonas campestris*, DDW: double distilled water, M: molecular marker, 100 bp plus

قهوه‌ای تیره شده و نکروز به سمت انتهای شاخه گسترش یافته و بخشی یا کل طول شاخه را در بر گرفته است. نواحی نکروزه عموماً پیوسته و ممتد بودند اما در مواردی به صورت جزایر مجزا و غیر ممتدی دیده شدند. وجود نواحی نکروزه ناپیوسته در شاخه‌های بریده ارقام گیلاس در واکنش به این بیماری توسط سانتی و همکاران (Santi *et al*., 2004) نیز گزارش شده است. در شاخه‌های شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل به جز چند میلی‌متر نکروز در محل‌های ایجاد زخم، نشانه دیگری مشاهده نشد.

نتایج تجزیه واریانس طول نکروز در شاخه (جدول ۳) نشان داد که ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف گیلاس و آلبالو طول نکروز متفاوت و در نتیجه سطوح مقاومت نسبی متفاوتی ($P\leq0.01$) به این بیماری داشتند. گارت (Garrett, 1986) و بدفورد و همکاران (Bedford *et al*., 2003) نیز تنوع چشمگیری در واکنش ارقام مختلف گیلاس به شانکر باکتریایی مشاهده کردند. چنین تنوع گسترده‌ای در واکنش کلون ها، ارقام و ژرم‌پلاسم گیلاس در فرانسه، ایالات متحده، آلمان، لهستان و ایتالیا نیز مشاهده شده است (Allen and Dirks, 1978؛ Fischer and Hohlfield, 1998؛ Spotts *et al*., 2010؛ Santi *et al*., 2004؛ Schortichini *et al*., 1995). نتایج تعدادی از ارزیابی های انجام شده در ایران نیز دلالت بر تنوع سطوح مقاومت نسبی ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف گیلاس به این بیماری دارد (Hamzenejad *et al*., 2004؛ Bouzari, 2006).

بر اساس مقادیر طول نکروز در شاخه، آلبالوی همدان و گیلاس KB8 به طور نسبی حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها (به ترتیب)

Archive of SID



www.SID.ir

جدول ۳- تجزیه واریانس طول نکروز در شاخه و برگ ژنوتیپ ها و ارقام مختلف آلبالو و گیلاس

**Table 3.** Analysis of variance of length of necrosis in shoot and leaf organs of different sweet cherry and sour cherry cultivars and genotypes

| | | MS | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | طول نکروز در شاخه | | طول نکروز در برگ | |
| | | Length of necrosis in shoot | | Leght of necrosis in leaf | |
| Source of variance | منابع تغییرات | درجه آزادی df. | میانگین مربعات Mean squares | درجه آزادی df. | میانگین مربعات Mean squares |
| Cultivar/genotype | رقم/ژنوتیپ | 22 | 165.22** | 16 | 60.46*** |
| Error | خطا | 232 | 5.91 | 239 | 0.58 |
| Total | کل | 254 | | 255 | |
| C.V.% | ضریب تغییرات (٪) | 58.72 | | 13.47 | |

** و ***: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ در صد و ۱ در هزار.

**and ***: Significant at 1% and 0.1% probability levels, respectively.

جدول ۴- میانگین طول نکروز در شاخه و برگ ژنوتیپ ها و ارقام مختلف آلبالو و گیلاس

Table 3. Mean values of necrosis length in shoot and leaf organs of different sweet cherry and sour cherry cultivars and genotypes

| | Length of necrosis (cm) طول نکروز | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| رقم/ژنوتیپ Cultivar/genotype | شاخه Shoot | برگ leaf | رقم/ژنوتیپ Cultivar/genotype | شاخه Shoot | برگ leaf |
| Hamedan | 11.51a | 7.27c | No 119 | 3.47efg | nd |
| No 28 | 9.23b | 3.81fg | KB20 | 2.65efg | nd |
| Surati Lavasan | 8.05b | 7.21c | Sefid 90 | 2.37efg | 4.09fg |
| Darun gazna | 6.46c | 7.00c | Diras-e-daneshkade | 2.06fgh | 8.23b |
| Shamlu | 5.92c | 4.32f | Meshkin shahr | 1.83fgh | 7.09c |
| Gium | 5.51dc | 3.53g | Montmorenci | 1.49gh | nd |
| Protiva | 5.39cd | 5.20e | Mahali Karaj | 1.42gh | 5.23e |
| Siah-e-zudras | 5.38cd | 6.22d | Meygun | 1.36gh | nd |
| No 46 | 3.93de | nd | Bing | 1.01gh | 4.24f |
| Blamarkad | 3.85de | 9.65a | KB21 | 0.95gh | nd |
| RD Jobelium | 3.57ef | 1.27h | KB8 | 0.49h | 5.71de |
| Frasida | 3.51ef | 6.11d | | | |

در هر ستون، میانگین‌ها با حروف مشابه در سطح احتمال ۱٪ فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

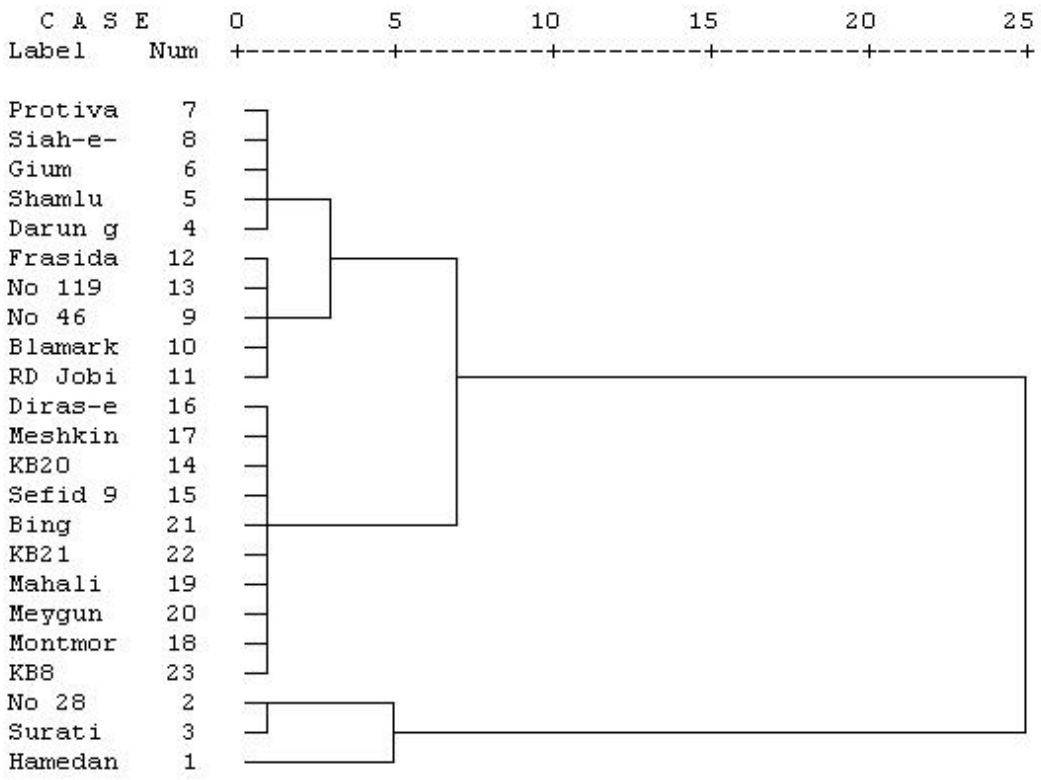
Means followed by the same letters in each column are not significantly different at 1% probability level.

nd: not done

تشخیص داده شدند (جدول۴). نتایج بر اساس محصول نشان می‌دهد که در آلبالو، ژنوتیپ همدان به طور نسبی حساس‌ترین و KB21، میگون و مونت مورنسی مقاوم ترین و در گیلاس، ژنوتیپ شماره ۲۸ و صورتی لواسان حساس‌ترین و KB8 مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها بودند (جدول ۴). بر اساس نتایج تجزیه کلاستر مقاومت نسبی شاخه بر اساس طول نکروز، ارقام

Archive of SID

www.SID.ir




شکل ۲- دندروگرام گروه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌های گیلاس و آلبالو بر اساس تجزیه خوشه‌ای طول نکروز در شاخه

Fig. 2. Cluster analysis dendrogram of sweet and sour cherry genotypes based on shoot necrosis length

و ژنوتیپ‌ها در سه گروه اصلی دسته‌بندی شدند (شکل ۲) و ده ژنوتیپ (۴۳/۵٪ ژنوتیپ‌ها) شامل دیررس دانشکده، مشکین شهر، KB20، سفید ۹۰، بینگ، KB21، محلی کرج، میگون، مونت مورنسی و KB8 به طور نسبی مقاوم،ده ژنوتیپ (۴۳/۵٪ ژنوتیپ‌ها) شامل پروتیوا، سیاه زودرس، درون گزنا، شاملو، گیوم، فراسیدا، شماره ۱۱۹، شماره ۴۶، بلامارکاد و آردی جوبلیوم حد وسط و ۳ ژنوتیپ (۱۳٪) آلبالوی همدان و گیلاس های صورتی لواسان و شماره ۲۸ حساس بودند. ویرس (Vries, 1965) نیز در بررسی باغی مقاومت تعدادی از کلون‌های گیلاس به شانکر باکتریایی نشان داد که ۳۳٪ کلون‌ها به طور نسبی مقاوم بودند تا حدودی نزدیک به نتایج مطالعه حاضر است.

در برخی ارقام و ژنوتیپ‌ها، سطوح حساسیت نسبی شاخه با نتایج ارزیابی باغی بوذری (Bouzari, 2006) هماهنگی دارد و هر دو، پروتیوا، سیاه زودرس، درون گزنا و گیوم را دارای مقاومت نسبی متوسط، بینگ، محلی کرج و مشکین شهر را مقاوم و صورتی لواسان و شماره ۲۸ را حساس تشخیص

Archive of SID



www.SID.ir

دادند. دو رقم همدان و بلاماکارد که در این تحقیق و تحقیق حمزه‌نژاد و همکاران (Hamzenejad *et al*., 2004) مشترک بودند، نیز مقاومت نسبی مشابهی نشان دادند. اما سطوح حساسیت همدان، صورتی لواسان، دیررس دانشکده، مونت مورنسی و مشکین شهر در این تحقیق مشابه نتایج ارزیابی باغی بوذری (۲۰۰۶) نبود. رقم بینگ در این تحقیق و در تحقیق بوذری (۲۰۰۶) مقاوم و در نتایج اسپاتس و همکاران (Spotts *et al*., 2010) حساس ارزیابی شد. مشاهده واکنش‌های متفاوت برخی ارقام به این بیماری می‌تواند ناشی فاکتورهای متعدی باشد. به عنوان مثال، شرایط باغ در آن آزمایش‌ها با شرایط گلخانه‌ای انجام این تحقیق متفاوت است که می‌تواند بر شدت بیماری تاثیر بگذارد. شرایط کنترل شده گلخانه‌ای مانع تداخل سایر عوامل بیماری‌زا در این بیماری شده در حالی که شانکرهای چند ساله در باغ به راحتی توسط سایر قارچ‌های فرصت طلب و ساپروفیت اشغال می‌شوند و این عوامل ثانویه نقش به سزایی در گسترش شانکر دارند. فاکتور دیگر احتمال تفاوت در ویرولنس/بیماری‌زایی مایه‌های باکتری در آزمایش‌های مختلف (جدایه مورد استفاده در این آزمایش و مایه طبیعی باکتری در آزمایشات باغی) باشد. همچنین با توجه به این که اکثر گزارش‌های موجود بر روی ژنوتیپ‌های محلی هستند، نتیجه‌گیری بر اساس مقایسه نسبی است که موجب جابه جا شدن جایگاه ارقام در گروه‌بندی‌ها می‌شود.

در ارتباط با مکانیسم مقاومت به شانکر باکتریایی مطالعات چندانی انجام نشده اما تفاوت در محتوای فنلی ارقام مختلف موثر گزارش شده است (Mo *et al*., 1993؛ Geibel *et al*., 1994). همچنین حمزه‌نژاد و همکاران (Hamzenejad *et al*., 2004) فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پولی فنل اکسیداز را در مقاومت ارقام گیلاس موثر گزارش کرده‌اند.

کارایی سه روش مختلف مایه‌زنی برگ در ارزیابی مقاومت متفاوت بود. در مجموع، روش‌های مایه‌زنی رگبرگ میانی و آب-آگار، نتایج تکرارپذیری ایجاد نکرده و تنوع بالایی در واکنش برگ‌های مختلف از یک رقم دیده شد. به نظر می‌رسد این روش‌ها کارایی لازم برای تعیین سطوح مقاومت برگ را نداشته و تنها برای اثبات بیماری‌زایی معتبر باشند. روش اصلی ارزیابی مقاومت برگ روش پمپ خلاء بود که برای اولین بار در این تحقیق به کاربرده شد. در این روش، نفوذ زادمایه باکتری به فضای بین بافتی به راحتی با چشم غیر مسلح قابل رؤیت و موفقیت پروسه آلوده‌سازی قطعی بود. ناحیه نکروز پیوسته و الگوی پیشروی نکروز تابع خطوط مرزی ناحیه نفوذ بود. همچنین این روش تنوع بالایی در واکنش مقاومتی ارقام مختلف نشان داد بدین ترتیب که در برخی ارقام، نکروز کمتر از ناحیه نفوذ زادمایه باکتری بود، در برخی ارقام کل این ناحیه نکروزه می‌شد و در برخی دیگر، ناحیه نکروزه فراتر از ناحیه نفوذ

Archive of SID

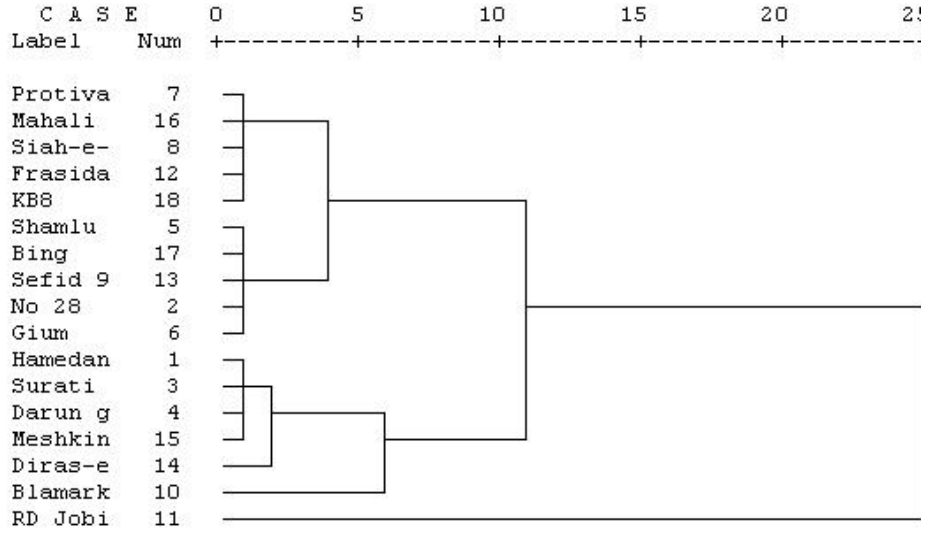
www.SID.ir

بوده و سطح وسیعی از برگ را درگیر کرده بود. با این وجود، به دلیل نامشخص بودن شکل هندسی ناحیه نکروزه، اندازه‌گیری مساخت آن عملاً دشوار و در مواردی غیر ممکن بود و لذا تنها به اندازه‌گیری طول ناحیه نکروزه اکتفا شد که می‌تواند دقت این روش را به کاهد.

نتایج تجزیه واریانس طول نکروز در برگ (بر اساس نتایج روش سوم) نشان داد (جدول ۳) که تنوع وسیعی در سطوح مقاومت نسبی برگ ارقام و ژنوتیپ‌های وجود دارد ($P\leq0.001$).

شدیدترین لکه‌های برگی در گیلاس‌های بلامارکاد و دیررس دانشکده و خفیف‌ترین آن در آردی جوبلیوم مشاهده شد (جدول۴). بر این اساس، ارقام و ژنوتیپ‌ها در سه گروه مقاوم (۶٪)، حدوسط (۳۵٪) و حساس (۵۹٪) گروه‌بندی شدند (شکل ۳).

بررسی همبستگی بین مقادیر طول نکروز در برگ و شاخه نشان داد که رابطه معنی‌داری بین این مقادیر وجود ندارد (ضریب همبستگی ۰/۰۹۷، جدول ۵).




شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌های گیلاس و آلبالو بر اساس طول نکروز در برگ

Fig. 3. Cluster analysis dendrogram of sweet and sour cherry genotypes based on leaf necrosis length

جدول ۵- ضریب همبستگی بین طول نکروز در برگ و شاخه

Table 5. Correlation coefficient of necrosis length in leaf and shoot

| | | Shoot شاخه | Leaf برگ |
|---|---|---|---|
| Shoot | شاخه | 1.00 | |
| Leaf | برگ | 0.097 | 1.00 |

www.SID.ir

برگ درخت گیلاس حاوی نوعی گلیکوزید فنلی است که بر بیوسنتز Syringomycins (فیتوتوکسینی که در ویرولنس *P. syringae* دخالت دارد) تاثیر می‌گذارد (Geibel *et al*., 1994؛ Mo *et al*., 1993)، لذا تفاوت در محتوای فنلی شاخه و برگ ممکن است توجیه کننده یکسان نبودن مقاومت این دو اندام باشد. چنین تفاوتی حتی بین شاخه‌های مختلف نیز دیده شده است و شاخه‌های دو ساله حساس‌تر از یک ساله هستند (Santi *et al*., 2004). واکنش متفاوت اندام‌های مختلف گیاه به باکتری‌های بیماری‌زا در درختان سیب نسبت به بیماری آتشک و گردو به بیماری بلایت باکتریایی نیز مشاهده شده است (Le Lezec *et al*., 1987؛ Silsepur *et al*., 2010 ؛Aleta *et al*., 2001).

در مجموع بر اساس نتایج تحقیق حاضر، سطوح نسبی حساسیت شاخه و برگ ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف آلبالو و گیلاس به بیماری شانکر باکتریایی متفاوت بود اما بین حساسیت شاخه و برگ رابطه مستقیمی مشاهده نشد. لذا با توجه به این که خسارت اصلی این بیماری ناشی از شانکرهای ایجاد شده در چوب درخت است اطلاعات مربوط به حساسیت شاخه می‌تواند در ارقام در دست معرفی و در برنامه‌های به‌نژادی مورد توجه قرار گیرد. در عین حال، از آن جائی که شانکرهای کشنده عمدتاً در تنه درخت ایجاد می‌شوند، پیشنهاد می‌شود سطوح مقاومت این مواد گیاهی با مایه‌زنی تنه در شرایط باغی نیز مطالعه شود.

**References**


**Aleta, N., Ninot, A., Moragrega, C., Liorente, I., and Montesinos, E. 2001.** Blight sensitivity of Spanish selections of *J. regia*. Acta Horticulturae 544: 353-362.

**Allen W. R., and Dirks, V. A. 1978.** Bacterial canker of sweet cherry in the Niagara Peninsula of Ontario, Pseudomonas species involved and cultivar susceptibility. Canadian Journal of Plant Sciences 58: 363-369.

**Anonymous 2002.** Agricultural Data, Crop Products in Year 2000-2001. Ministry Jihad-e-Keshavarzi, Tehran, Iran (in Persian).

**Bahar, M., Mogahedi, H., and Akhyanii, A. 1981.** Apricot bacterial canker in Isfahan. Iranian Journal of Plant Pathology 18: 58-68 (in Persian).

**Banapur, A., Zakeri, Z., and Amani, G. 1990.** Cherry bacterial canker in Tehran. Proceedings of the 9th Plant Protection Congress of Iran, Mashhad, Iran. Page 94 (in Persian).


Archive of SID

www.SID.ir

**Bedford, K. E., Sholberg, P. L., and Kappel, F. 2003.** Use of detached leaf bioassay for screening sweet cherry cultivars for bacterial canker resistance. Acta Horticulturae 622: 365-368.

**Bradbury, J. F. 1986.** Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew. Surry, UK.

**Bultreys, A., and Kaluzna, M. 2010.** Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars of syringae and morspronorum race 1 and 2. Journal of Plant Pathology 92: S1.21-S1.33.

**Bouzari, N. 2006.** Evaluation of cherry cultivars for bacterial canker resistance. Proceedings of the 17th Plant Protection Congress of Iran, Karaj. Page 376 (in Persian).

**Endert, E., and Ritchie, D. F. 1984.** Detection of pathogenicity, measurement of virulence and determination of strain variation in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Disease 68: 677-680.

**Fischer, M., and Hohlfed, B. 1998.** Resistance tests in sweet cherries. Acta Horticulturae 468: 87-94.

**Garrett, C. M. E. 1986.** Influence of rootstock on the susceptibility of sweet cherry scions to bacterial canker caused by *P. syringae* and *P. morspronorum*. Plant Pathology 35: 114-119.

**Geibel, M., Gross, D. C., Mo, Y. Y., Bonsal, R. F., and Geiger, H. 1994.** Identification of flavonol glycosides from *Prunus avium* leaves which induce the production of syringomycin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Acta Horticulturae 381: 662-666.

**Gilbert, V., Planchon, V., Legras, F., Maraite, H., and Bultreys, A. 2010.** Pathogenicity and aggressiveness in populations of *P. syringae* from Belgian fruit orchards. European Journal of Plant Pathology 126: 263-277.

**Hamzenezhad, P., Rahimian, H., Ghasemi, A., and Mahmudpur, M. 2004.** Investigation of commercial cherry cultivars to bacterial canker and evaluation of polyphenil oxidase and peroxidase as biochemical markers. Proceedings of the 16th Plant Protection Congress of Iran, Tabriz, Iran. Page 414 (in Persian).

**Klement, Z. 1988.** Bacterial canker and dieback disease of apricots. Acta Horticulturae 209: 151-154.

Archive of SID

www.SID.ir

**Klement, Z., Balo, A., Prileszky, G., and Rozsnyay, Z. 1983.** Decrease of sugar content of bacterially ifected apricot branches in relation to freezing injury. Acta Horticulturae 121: 417-420.

**Lacobellis, N., Locantore, S., Capasso, P., and Senatore, F. 2005.** Antibacterial activity of *Guminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal of Agricultural Food Chemistry 53: 57-61.

**Le Lezec, M., Pauline, J. P., and Lecomte, P. 1987.** Shoot and blossom susceptibility to fireblight of apple cultivars. Acta Horticulturae 217: 311-316.

**Lelliot, R. A., and Stead, D. E. 1987.** Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications, Boston, USA.

**Lyskanowska, K., and Rejman, A. 1978.** Bacterial canker of sweet cherry in Poland. III. Degree of susceptibility of wild cherry seedlings. Plant Disease Reporter 62: 500-503.

**Mo, Y. Y., Geibel, M., Bonsal, R. F., and Gross, D. C. 1995.** Analysis of sweet cherry leaves for plant signal molecules that activate the *syrB* gene required for synthesis of the phytotoxin syringomycin, by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Physiology 107: 603-612.

**Ogawa, T. M., Zehr, E., Bird, G. W., Ritcher, D. F., Uriu, K., and Uyemoto, J. K. 1995.** Compendium of Stone Fruit Tree Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

**Pietrzaku, M. C., and Phail, D. C. 2004.** Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soil of Victoria. Geoderma 122: 151-166.

**Prunier, J. P., and Bordjiba, O. 1991.** Effect of frost on bacterial necrosis of apricot buds. Acta Horticulturae 293: 495-502.

**Prunier, J. P., and Cotta, J. 1985.** Le chancre bacterien du cerisier en France, un risqué serieux. L'arbor. Fruit 372: 39-42.

**Quingley, N. B., and Cross, D. C. 1994.** Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. Molecular Plant-Microbe Interaction 7: 78-90.

**Rahimian, H., Nikravesh, Z., Arab., F., and Rezaian V. 2004.** contribution of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in blossom blight of peach in Mazandaran.

Archive of SID

www.SID.ir

Proceedings of the 16th Plant Protection Congress of Iran, Tabriz, Iran. Page 424 (in Persian).

**Santi, F., Russell, K., Me´nard, M., and Dufour, J. 2004.** Screening wild cherry (*Prunus avium*) for resistance to bacterial canker by laboratory and field tests. Forest Pathology 34: 349–362.

**Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001.** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

**Scortichini, M., Biocca, M., and Rossi, M. P. 1995.** *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on wild cherry for timber production: outbreak and field susceptibility. European Journal of Plant Pathology 25: 343-350.

**Shams Bakhsh, M., and Rahimian, H. 1989.** Characterization of stone fruits bacterial canker in Mazandaran. Proceedings of the 9th Plant Protection Congress of Iran, Mashhad. Page 134 (in Persian).

**Silsepur, L., Keshavarzi, M., Hassani, D., and Hashemi, M. 2010.** Necessity of different walnut organs evaluation for selection of blight resistant cultivars. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 325-329 (in Persian).

**Sorensen, N. K., Kim, K., and Takemoto, J. Y. 1998.** PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Applied and Environmental Microbiology 64: 226-230.

**Spotts, R. A., Wallis, K. M., Serdani, M., and Azarenko, A. N. 2010.** Bacterial canker of sweet cherry in Oregon. Infection of horticultural and natural wounds and resistance of cultivar and rootstock combination. Plant Disease 94: 345-350.

**Vries, D. P. DE. 1965.** Field resistance to bacterial canker in some cherry seedling populations. Euphytica 14: 78-82.

**Yessed, S., Manceau, C., and Luisetti, J. 1992.** A detached leaf bioassay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. Plant Disease 76: 370-373.

**Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., De Boer, S. H., Vauterin, L., Garden, L., Govozdyak, R. I., and Stead, D. E. 1996.** Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. Review of Plant Pathology 75: 721-763.

Archive of SID

www.SID.ir