مجلهٔ پژوهشی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۵ شمارهٔ ۲ ، صفحهٔ ۱۹۸-۱۹۳، (۱۳۸٦)

## مقاله کوتاه

# شناسایی عامل شانکر باکتریایی درختان گوجه سبز و آلوی وحشی در جنگلهای استان گیلان

**فهیمه جامی[۱]، مصطفی نیک نژاد کاظم پور[۱] و سید علی الهی نیا[۱]**

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت. پست الکترونیک مکاتبه کننده: jami@rifr-ac.ir

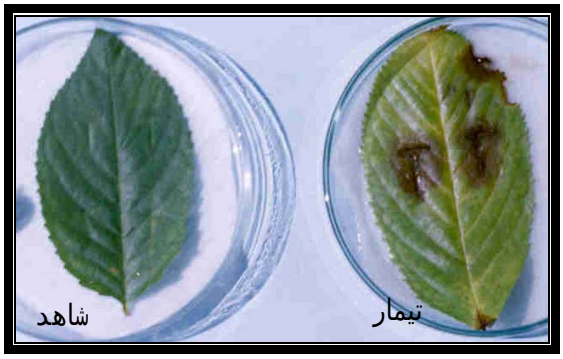
**تاریخ دریافت: ۸٦/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۸٦/۱۰/٤**

از اسفند ماه ۱۳۸۱ تا مهر ماه ۱۳۸۲ از درختان گوجه‌سبز و آلوی وحشی مشکوک به بیماری شانکر باکتریایی واقع در استان گیلان (تالش، هشتپر، لیسار، لاهیجان و آستانه) نمونه‌برداری بعمل آمد. مشخص‌ترین علائم بیماری، تشکیل شانکر به همراه تراوشهای صمغی است. نواحی آلوده اندکی فرورفته و به رنگ قهوه‌ای تیره‌تری نسبت به پوست سالم مجاور بودند؛ رنگ بافتهای پوست ناحیه شانکر بین نارنجی روشن تا قهوه‌ای متغیر می‌باشد. در برخی نواحی، تعداد زیادی از جوانه‌ها از بین می‌روند. تحت شرایط جوی مناسب، آلودگی گلها نیز صورت می‌گیرد و می‌تواند بسیار شدید باشد. ممکن است آلودگی از گلها به شاخه منتشر شده و تولید بلایت شاخه نماید و یا به داخل مهمیز نفوذ کرده و باعث تولید شانکر شود. هنگامی که میوه آلوده شود، لکه‌های روی آن صاف، سطحی و به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آید. لکه‌ها ۲-۳ میلیمتر عمق داشته و فرورفته‌اند. نمونه‌برداری از سرشاخه‌های آلوده و شانکرهای تنه صورت گرفت و عامل بیماری‌زا با کشت روی محیط‌کشتهای باکتریایی مانند King's B و NA (آگار مغذی) جداسازی گردید. در این پژوهش تعداد ۱۲۳ جدایه باکتری از درختان مشکوک به آلودگی جداسازی شد که ۲۸ جدایه در توتون و شمعدانی فوق حساسیت ایجاد نمودند. تمامی آزمونهای شناسایی بر روی این ۲۸ جدایه انجام پذیرفت. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، تغذیه‌ای، مورفولوژیک (جدول ۱) و نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی، باکتری عامل شانکر درختان هسته‌دار تحت عنوان *Pseudomonas syringae* pv *syringae* شناسایی گردید (Schaad, 2001). اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها روی برگ گوجه سبز (Yessad *et al.*, 1992) و سرشاخه‌های جوان جدا شده (Jones, 1971) انجام شد. کلیه جدایه‌ها پس از ۵ روز لکه‌های آبسوخته و نقاط نکروز در ناحیه زخمها ایجاد نمودند (شکل ۲). پس از تزریق هر یک از جدایه‌ها روی سرشاخه‌های آلو و گوجه‌سبز، ابتدا نقاط نکروز در محل تزریق مشاهده و پس از یک ماه اندام تلقیح شده کاملا نکروزه و خشک گردید (شکل ۳). در هر دو روش مایه‌زنی (برگ و سرشاخه‌ها) نمونه شاهد با آب مقطر سترون تیمار شد که هیچ‌گونه علائمی مشاهده نشد. آزمون تولید سیرینگومایسین نیز روی جدایه‌ها با استفاده از قارچ *Geotrichum candidum* صورت گرفت (Young *et al.*, 1991). تولید سیرینگومایسین بوضوح در تمامی جدایه‌ها ردیابی گردید. ٤۰ درصد از جدایه‌ها در هر دو تکرار تولید سیرینگومایسین داشته و از رشد قارچ جلوگیری نمودند. میزان حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از روش Psallidas (Psallidas, 1993) انجام شد که نتایج حاصل در جدول ۲ آمده است. الکتروفورز پروتئین (SDS–PAGE) با استفاده از روش Laemmli با تغییرات اندکی انجام گرفت (Laemmli, 1970) و جدایه‌های مربوطه به همراه جدایه‌های استاندارد دریافتی

از کشور فرانسه کلکسیون باکتریهای بیماری‌زای فرانسه (CFBP)[1] مورد مقایسه قرار گرفتند. کلیه جدایه‌ها در الکتروفورز پروتئینی تام سلولی به روش PAGE-SDS یک‌بعدی در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ تولید نوارهایی نمودند. مقایسه نقوش پروتئینی جدایه‌ها وجود سطح بسیار بالایی از تشابه را در بین آنها و ایزوله استاندارد نشان می‌داد و اختلافات جزئی در نوارهای ایجاد شده توسط جدایه‌های فوق که بیشتر به صورت قوی و ضعیف بودن و وجود یا عدم وجود یک یا چند باند بسیار ضعیف بود، دیده شد. با صرف نظر از این اختلافات بسیار جزئی، می‌توان اظهار نمود نقوش پروتئینی مربوط به جدایه‌ها با جدایه استاندارد تفاوتی با هم ندارند و دارای سطح بالایی از تشابه هستند (شکل٤). این اولین گزارش باکتری *Pseudomons syringea* pv *syringea* از درختان هسته دار جنگلی از استان گیلان می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی**: شانکر باکتریایی، *Pseudomonas syringae* pv *syringae*، گوجه سبز وحشی، آلوی وحشی، گیلان.

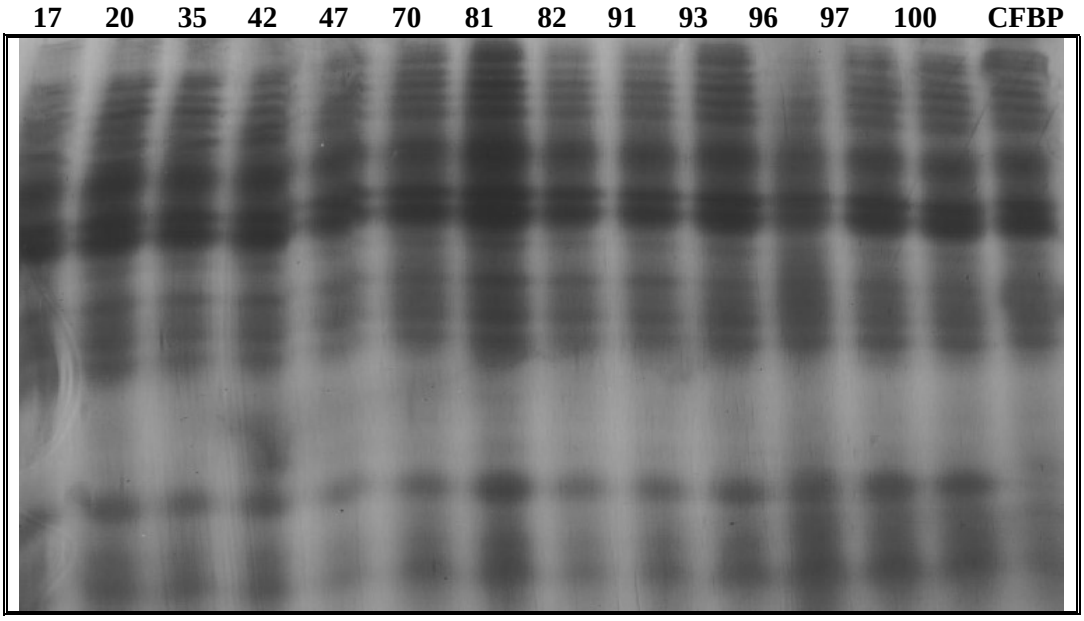
**شکل ۱- نشانه‌های شانکر باکتریایی روی شاخه‌های گوجه‌سبز**




**شکل۲- آزمون اثبات بیماری‌زایی روی برگ گوجه‌سبز**

**شکل۳- آزمون اثبات بیماری‌زایی روی شاخه آلو**

1- Collection Francais de la Bacterie Pathogen




**شکل٤- مقایسه نقوش پروتئینی جدایه‌های *P.synigae* pv. *syringae* (عامل شانکر باکتریایی)**
**جدایه استاندارد: CFBP، ۱۷،۲۰،٤۷،۹٦،۹۷ جدایه‌های گیلاس، ۳۵،٤۲،۹۳،۱۰۰ جدایه‌های آلو،۷۰،۸۱،۸۲،۹۱ جدایه‌های گوجه‌سبز**

**جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه های *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*، جدا شده از گوجه سبز و آلوی وحشی از استان گیلان**

| خصوصیت | Charcteristic | واکنش |
|---|---|---|
| واکنش گرم | Gram reaction | - |
| رشد هوازی/ بی‌هوازی | Oxidative/Fermentative | هوازی/O |
| تولید لوان | Levan formation | + |
| اکسیداز | Oxidase | - |
| لهانیدن ورقه های سیب زمینی | Potato rot | - |
| آرژنین دهیدرولاز | Arginine dihydrolase | - |
| فوق حساسیت در توتون | Tobacco HR | + |
| تولید رنگ فلورسنت | Fluorecent | + |
| کاتالاز | Catalase | + |
| هیدرولیز ژلاتین | Gelatin hydrolysis | ± |
| هیدرولیز آسکولین | Aesculin hydrolysis | ± |
| هیدرولیز توییین۸۰ | Tween 80 hydrolysis | + |
| تولید H2S از پپتون | H2S from peptone | - |
| هیدرولیز کازئین | Casein hydrolysis | + |

**ادامه جدول ۱**

| خصوصیت | Charcteristic | واکنش |
|---|---|---|
| فعالیت هسته یخ | Ice nucleation activity | + |
| اوره آز | Urease | ± |
| تولید ایندول | Indole formation | - |
| اکسیداسیون۲-کتوگلوکونات | 2-Ketogluconate oxidation | - |
| احیا نیترات | Nitrate reduction | - |
| تحمل نمک ۵٪ | 5% NaCl tolerance | ± |
| تحمل نمک۷٪ | 7% NaCl tolerance | - |
| رشد در٤ درجه سانتیگراد | Growth 4$^{°C}$ | - |
| رشد در ٤١ درجه سانتیگراد | Growth 41ºC | - |
| هیدرولیز نشاسته | Starch hydrolysis | - |
| DNase | DNAs activity | ± |
| سدیم تارتارات | Sodium tartrate | - |
| تولید سیرینگومایسین | Syringomycin production | + |
| استفاده از: | Utilization of: | |
| ال آرابینوز | L-Arabinose | + |
| لاکتوز | Lactose | - |
| دی سوربیتول | D-Sorbitol | + |
| ال رامنوز | L-Rhamnse | - |
| رافینوز | Raffinose | + |
| تری هالوز | Trehalose | + |
| گالاکتوز | Galactose | ± |
| اینوسیتول | Inositol | ± |
| مالتوز | Maltose | - |
| رایبوز | Ribose | - |
| گلیسین | Glycine | - |
| تریپتوفان | Trptophane | - |
| سوکروز | Sucrose | + |
| دکسترین | Dextrin | - |
| ال سیستئین | L(-)Cyctine | - |
| سیترات | Cirate | ± |
| ال لیزین | L-Lysine | - |

**جدول ۲- حساسیت جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv *syringae*، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف**

| نام آنتی‌بیوتیک | میزان در هر دیسک (µg/ml) | متوسط هاله بازدارنده (mm) | مقاوم (٪) | نیمه حساس (٪) | حساس (٪) |
|---|---|---|---|---|---|
| الاندومایسین | ۲۵ | ۱۱/۵ | ۸۸ | ٦ | ٦ |
| فسفومایسین | “ | ۰ | ۱۰۰ | ۰ | ۰ |
| اسپکتینومایسین | “ | ٤ | ۷٤ | ۲٦ | ۰ |
| سولفات استرپتومایسین | “ | ٤/۷۵ | ٦۱ | ۳۳ | ٦ |
| داکسی سایکلین | “ | ٤/۱ | ٤۷ | ٤۰ | ۱۳ |
| سفالکسین | “ | ٦/٦ | ٦۰ | ۲۷ | ۱۳ |
| نووبیوسین | “ | ۵/۳ | ٦۰ | ۲۷ | ۱۳ |
| آمپی سیلین | “ | ۰ | ۱۰۰ | ۰ | ۰ |
| ریفامپیسین | “ | ۱۰/۳ | ۰ | ٦٤ | ٤٦ |
| کاناماپسین | “ | ۱۰/٦ | ۳٤ | ٦۰ | ٦ |
| اکسی تتراسایکلین | “ | ٤/۳ | ۰ | ۲۷ | ۷۳ |
| کلرامفنیکل | “ | ٤ | ۰ | ۰ | ۱۰۰ |
| تتراسایکلین | “ | ۳/۸ | ۰ | ۰ | ۱۰۰ |
| میکامایسین | “ | ۳/٤ | ۰ | ۹٤ | ٦ |
| اریترومایسین | “ | ۵/۸ | ۱٤ | ۱۳ | ۷۳ |
| کاسوگومایسین | “ | ٤/۱ | ٤۸ | ٦ | ٤٦ |

## منابع مورد استفاده


- Jones, A. L., 1971. Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. Plant disease, 55: 961-965.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Psallidas, P. G., 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellana*. Plant Pathology, 42: 358-363.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, (Third edition). St. Paul, MN, APS Press. 373 p.
- Yessad. S., Manceau, C. and Luisetti, J., 1992. A detached leaf assay evaluates virulence and pathgenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* on Pear. Plant Disease, 76(4):370.
- Young, L. M., 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902. Ann. Appl. BioI., 118: 283-298.

**Short Article**

# Identification of bacterial canker agent on wild stone fruit trees in Guilan province

**F. Jamie[1], M. Niknejad Kazempour[1] and S. A. Elahinia[1]**

1-Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht. Corresponding author E-mail: jami@rifr-ac.ir

Received: Jul. 2007 Accepted: Dec. 2007

## Abstract

This research has been conducted to identify bacterial pathogen on wild stone fruit trees (wild plum) in Guilan province, during 2002-2003. Samples were collected from various areas in Guilan provine: Talesh, Hashtpar, Astaneh-Ashrafieh and Lahijan. Specific disease symptoms on infected trees include: occurance of necrotic canker on trunks, gum exudations and necrotic lesions on buds and shoots. Infected tissues of bud, leaf, shoot and stem were cultured on NA, LPGA and King' B media (with Actidion antibiotic) and typical bacterial colonies were identified and maintained in pure cultures. Bacterial colonies were light cream with limpid margin and produced fluorescent pigments on King's B medium. The causal agent of disease was identified as *Pseudomonas syringae* pv.*syringae*. Pathogenic isolates were characterized based on phenotypic test (morphological, physiological, biochemical), total cellular protein profiles (SDS-PAGE), plasmid profiles and antibiotic sensitivity test. Total protein pattern of isolates conformed with the standard isolates.

**Key words:** Bacterial canker, wild stone fruits, *Pseudomonas syringae* pv *syringea*