مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۱۹ شماره ۱، صفحه ۴۳-۳۱ (۱۴۰۰)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfrpr.2021.353277.1463
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350859.1400.19.1.3.0

شناسایی عامل شانکر باکتریایی صنوبر در استان‌های زنجان و مرکزی

علی علیزاده علی‌آبادی[1*]، فهیمه جامی[2] و محمدرضا عارفی‌پور[3]

۱*- دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
پست الکترونیک: aalizadeh1340@yahoo.com
۲- استادیار گروه میکروبیولوژی و بیماری‌های گیاهی، موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی و جنگل، دانشگاه پرتوریا، پرتوریا، آفریقای جنوبی
۳- کارشناس ارشد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۳

چکیده

از کلن‌های مختلف صنوبر در استان‌های گیلان، زنجان، مرکزی، آذربایجان‌غربی، کرمانشاه و همدان بازدید و از شانکرهای روی شاخه‌های یک تا چندساله و تنه دارای علائم زخم نمونه‌برداری شد. نمونه‌های استان‌های زنجان (هشت جدایه) و مرکزی (چهار جدایه) از باکتری‌های زردرنگ و لعاب‌دار جداسازی شد. بیماری‌زایی جدایه‌ها روی سرشاخه‌های جوان صنوبر و واکنش فوق حساسیت در توتون اثبات شد. کلیه جدایه‌ها در واکنش‌های گرم، اکسیداز، آرژینین‌دهیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، لسیتیناز و اوره‌آز منفی و در آزمون کاتالاز مثبت و قادر به هیدرولیز اسکولین، توئین ۸۰، تولید لوان و تولید H2S ازسیستئین و پپتون بودند. تمامی استرین‌ها از قندهای سوکروز، فروکتوز، اینوزیتول، ترهالوز، گالاکتوز و نمک‌های فومارات و سوکسینات‌سدیم به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده کردند، ولی از ال‌آرابینوز، لاکتوز، دی‌سوربیتول، ال‌رامنوز، رافینوز، مالتوز، دی‌ریبوز، ملی‌بیوز، سیترات و استات‌سدیم استفاده نکردند. براساس ویژگی‌های باکتری‌شناسی و بیماری‌زایی، کلیه جدایه‌ها به‌عنوان *Xanthomonas populi* شناسایی شدند. درصد آلودگی تنه درختان صنوبر در ایستگاه خسبیجان (اراک) بین صفر تا ۱۳/۳ درصد تعیین شد. کلن‌های *P. b* 56.21، *P. a* 49.39 و *P. b* 72.13 کمترین آلودگی و کلن‌های *P. n* 56.21، *P. n* 72.14 و *P. n* 56.52 بیشترین آلودگی را داشتند. این باکتری، از کلن *P. a* 72.7 در ایستگاه خسبیجان، همچنین از کلن‌های مختلف در ارومیه، کرمانشاه، آذربایجان‌غربی و همدان جداسازی نشد.

واژه‌های کلیدی: شانکر، باکتری، صنوبر، *Xanthomonas populi*.

مقدمه

ایران، در منابع جنگلی ازجمله کشورهای فقیر محسوب می شود. بنابراین ضرورت دارد با مراقبت از عرصه‌های جنگلی موجود و اعمال مدیریت صحیح، حفاظت و حمایت از آنها برای توسعه جنگل، به‌ویژه گونه‌های سریع‌الرشد مانند صنوبر تلاش کرد. چوب صنوبر کاربردهای متنوعی دارد، گونه‌ها و کلن‌های سازگار با اقلیم‌های گوناگون از این درخت در کشور وجود دارد، همچنین به‌دلیل زودبازده بودن، سهولت تکثیر غیرجنسی و وجود عرصه‌های وسیع، توسعه کشت آن با هدف توسعه جنگل‌کاری در کشور در محل‌هایی مانند حاشیه رودخانه‌ها و آبراه‌ها، از اولویت دوچندانی برخوردار است.

اهمیت درختان صنوبر

کاهش سطح جنگل‌های کشور از ۱۸ میلیون هکتار در

سال ۱۳۲۷ به ۱۲/۴ میلیون هکتار کنونی و نیاز روزافزون کشور به چوب و فراورده‌های آن، کاشت درختان سریع‌الرشد و توسعه جنگل با گونه‌های سریع‌الرشد صنوبر را در اقلیم‌ها و عرصه‌های مناسب کشت و کار آنها ایجاب می‌کند.

به دلایل زیر صنوبر در بین گونه‌های زودرشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است:

از نظر اکولوژیکی بسیار کم نیازند و می‌توان آنها را در اغلب اقلیم‌ها کاشت؛

در شرایط مساعد و مساوی رشد، نسبت به سایر درختان بسیار زودرشدترند؛

برخلاف گونه‌های اکالیپتوس در برابر سرما مقاوم‌ترند؛

اغلب درختان اجتماعی هستند و کاشت انبوه آنها در کنار هم امکان‌پذیر است؛

چوب صنوبر برای بسیاری از صنایع چوب، مانند نئوپان، کبریت، روکش و کاغذسازی مناسب است؛

چوب آنها سبک، نرم، همگن، خوش‌کار و دارای قابلیت خوب چسب، میخ و پیچ‌خوری است؛

صنوبر در بسیاری از نقاط خارج از جنگل کاشته می‌شود و مردم با این درخت آشنایی کافی دارند؛

ازدیاد و کاشت آنها به‌وسیله کاشت قلمه به‌راحتی میسر است و به مراقبت زیادی نیاز ندارند؛

چوب صنوبر می‌تواند برای تهیه تیرهای مختلف ساختمانی، تلفن، تلگراف و برق استفاده شود؛

امکان دورگ‌گیری و ترکیب خواص ممتاز صنوبر زیاد است؛

در هر نوع خاکی می‌توان گروهی از صنوبرها را با توجه به نیاز اکولوژیکی آنها کاشت.

کشت صنوبر در کشورمان از زمان‌های خیلی قدیم رایج بوده و در بیشتر نقاط ایران از شمال تا جنوب و از شرق تا غرب، گونه‌های مختلف بومی یا بومی‌شده به‌صورت خودرو یا دست‌کاشت در کنار نهرها، رودخانه‌ها و دریاچه‌ها یا به‌صورت قلمستان‌های انبوه، یا بادشکن به چشم می‌خورد. در شمال کشور گونه *Populus caspica* Bornm. (سفیدپلت) و در جنوب یا غرب گونه *Populus euphratica* Olivier (پده) و در بیشتر نقاط ایران گونه‌های *Populus alba* L. (سپیدار) و *Populus nigra* L. (تبریزی) با نام‌های مختلف پراکنده‌اند.

صنوبر میزبان چندین عامل بیماری است: بیماری زنگ صنوبر (*Melampsora larici-populina* Kleb.) و (*Melampsora allii-populina* Kleb.) اولین بار در ایران توسط اسفندیاری در سال ۱۳۲۷ گزارش شده است (Ershad, 1995) و میزبان‌های آن، پده و شالک (صنوبر) هستند و در بیشتر صنوبرکاری‌های کشور انتشار دارد (Behdad, 1987). بیماری لکه قهوه‌ای برگ صنوبر (لکه‌برگی مارسونینایی) (قارچ *Marssonina castagnei* (Desm. & Mont.) و فرم جنسی آن: *Drepanopeziza populi-albae* (Kleb.) Nannf.) ابتدا در سال ۱۳۲۷ توسط اسفندیاری از روی سپیدارهای اطراف تهران گزارش شده است (Behdad, 1987). بیماری لکه‌برگی سپتوریایی (*Septoria populi* Desm.) ابتدا در سال ۱۳۲۰ از برگ‌های سپیدار از دامغان گزارش شده است. درختان میزبان آن شامل پده و دو نوع صنوبر به نام‌های سپیدار و شالک است (Behdad, 1987). بیماری شانکر سیتوسپوریایی (فتیله نارنجی صنوبر *Cytospora chrysosperma* (Pers.: Fr.) Fr. و فرم جنسی آن، *Valsa sordida* Nit. ابتدا در سال ۱۳۲۰ توسط پتراک و اسفندیاری از روی شالک گزارش شده است. درختان میزبان این بیماری در ایران شالک، سپیدار و کبوده است (Behdad, 1987). سایر قارچ‌های مولد شانکر در درختان صنوبر عبارتند از:

Cryptodiaporthe poplea (Sacc.) Butin.

Mycosphaerella populorum G.E. Thompson. (*Dothichiza populea* Sacc. & Briard.)

Fusarium solani (Mart.) Sacc.

Phomopsis sp.

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon & Maubl.

Hypoxylon sp.

قارچ *Taphrina populina* (Fries) Fries به انواع صنوبر به‌ویژه به هیبریدهای *P. deltoides* و *P. nigra* حمله می‌کند. در اثر این قارچ، روی برگ‌های صنوبر جوش‌هایی ایجاد می شود که در سطح زیرین به رنگ زرد براق است و درنهایت

منجر به بیماری بلایت جوانه و برگ صنوبر *Venturia populina* (Vuill.) Fabric. با فرم غیرجنسی *Pollaccia elegans* Servazzi. می‌شود که در بهار پژمردگی، سیاهی و پیچیدگی شاخه‌های جوان و برگ‌های تازه انتهایی را در پی خواهد داشت و باعث خواهد شد شاخه‌های مرده عصایی‌شکل شوند.

دو بیماری مهم باکتریایی هم از صنوبر گزارش شده است که عبارتند از: شانکر باکتریایی باکتری *Xanthomonas populi* Ridé & Ridé 1992 (ex Ridé 1958) و بلایت باکتریایی صنوبر *Pseudomonas syringae* pv. van Hall *syringe*. شانکر باکتریایی که موضوع این مقاله است و در جای خود معرفی خواهد شد. در اینجا به معرفی مختصر بلایت باکتریایی صنوبر می‌پردازیم.

بلایت باکتریایی صنوبر (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) یکی از عوامل محدودکننده تولید نهال است. علائم بیماری به‌صورت لکه‌برگی و سرخشکیدگی شاخه‌ها و شانکرهایی با شکاف‌های طولی روی تنه و شاخه است و ممکن است در پای شاخه‌های خسارت‌دیده تراوش‌هایی نیز مشاهده شود. پوست نزدیک شانکر، کاغذی و شیشه‌ای می شود. بافت کامبیوم خارج از شانکر، رنگ‌پریده شده، اما به ریشه‌ها گسترش نمی‌یابد. علائم این بیماری در دماهای متغیر شدت می‌یابد. دو خصوصیت ژنتیکی باکتریایی که بیماری‌زایی باکتری را افزایش می‌دهد، عبارتند از: توانایی تولید توکسین سیرینگومایسین (Syringomycin) که به بافت‌های گیاهی آسیب می‌رساند، همچنین این باکتری به‌عنوان «هسته یخ مثبت» باعث تسریع در سرمازدگی درخت آلوده می‌شود. این بیماری از کشورهای آمریکایی گزارش شده است و تاکنون در ایران روی صنوبر مشاهده نشده است (De Kam, 1982).

بیماری شانکر باکتریایی صنوبر توسط باکتری *Xanthomonas populi* ایجاد می‌شود (Ride & Ride, 1978). علائم این بیماری ابتدا به‌صورت ظهور زخم روی شاخه‌های جوان (و نیز مسن) به‌همراه ترشحات صمغی و چسبنده در سطح آنها دیده می‌شود (Koning, 1937). علائم بیماری برحسب کلن، شرایط اکولوژیکی و وضعیت فیزیولوژیکی درخت بیمار متفاوت است. جوانه‌های آلوده روی شاخه‌های جوان یک و دوساله در بهار باز نمی‌شود و معمولاً به‌صورت شکاف‌های سطحی با ترشح شیرابه باکتریایی غلیظ و خاکستری‌رنگ قابل مشاهده است. گسترش بیماری روی تنه یا شاخه‌ها در بهار با ایجاد شکاف‌ها و خراش‌های متورم، دارای ترشح شیرابه غلیظ خاکستری رنگی از باکتری همراه است. ترشح شیرابه به‌صورت قطره‌هایی در درون عدسک‌ها یا شکاف‌ها و میان‌گره‌های شاخه‌های یکساله و اطراف لبه شانکرها نیز دیده می‌شود.

ترشحات باکتریایی تولیدشده در بهار و شیرابه‌های مترشحه از شانکرهای تازه، به‌طور مؤثری با قطره‌های باران انتشار می‌یابد. باکتری از طریق زخم‌های تازه یا خراش‌هایی که طی سال وجود دارد، به بافت‌های جدید وارد شده و آلودگی در شاخه‌های جوان از طریق بافت‌های پوست گسترش می‌یابد (De Kam, 1984). Ebrahim-nesbat و همکاران (۱۹۹۰) پس از آلوده‌سازی مصنوعی محل اتصال دمبرگ به ساقه نهال‌های یکساله صنوبر با یک قطره از سوسپانسیون باکتری، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی به مطالعه بافت‌شناسی نحوه استقرار و توسعه عامل بیماری در داخل گیاه پرداخته‌اند. ۵۰ روز پس از مایه‌کوبی، ایجاد تورم های گال‌مانند، روی ساقه گیاه آلوده و زندگی بین‌سلولی باکتری در بافت گیاه، از مهمترین یافته‌های این مطالعات بوده است. البته علائم تورم و زخم در طبیعت معمولاً روی درختان ۸ تا ۱۰ ساله (با توجه به میزان حساسیت آنها) دیده می‌شود. این گال‌ها، هم روی ساقه و هم در محل انشعاب ساقه‌ها دیده می‌شوند (Kechel, 1984).

این بیماری از کشورهای اروپایی (De Kam, 1981, 1984)، شمال آمریکا و نیوزیلند (Haworth & Spiers, 1988) گزارش شده است. مطالعات در ایران نیز نشان داده است که این باکتری در منطقه زنجان وجود دارد.

جداسازی و شناسایی این باکتری به اوایل دهه ۱۹۶۰ برمی‌گردد. محققان سعی در جداسازی و شناسایی دقیق عامل این بیماری داشتند، ولی به موفقیت چندانی دست نیافتند (Sabet & Dowson, 1952; Van Den, 1957).

درنهایت Ride (۱۹۵۸) موفق به جداسازی و شناسایی دقیق عامل این بیماری شد و نام آن را *Aplanobacterium populi* گذاشت. سپس در سال ۱۹۶۱ نام این بیماری به *Aplanobacter populi* تغییر یافت (De Lange & Kerling, 1962). در سال ۱۹۷۸ براساس خصوصیات باکتریولوژیکی، نام علمی عامل بیماری شانکر باکتریایی صنوبر به *Xanthomonas populi* تغییر یافت. همزمان De Kam (۱۹۷۸) باکتری مشابهی از بید جداسازی و آن را *Xanthomonas populi* sub sp. *salicis* نام‌گذاری کرد. Christie و همکاران (۱۹۸۲) وجود رنگ‌دانه زانتومونادین را در این باکتری با ذکر مشخصات کامل آن به اثبات رساندند. از ویژگی باکتری‌های جنس *Xanthomonas* تولید لعاب است (Star, 1981). این لعاب در ترشحات باکتریایی در محل زخم‌های ناشی از این بیماری نیز مشاهده شده است (Ride & Ride, 1978; Ride, 1980). De Kam (۱۹۸۱) دو زیرگونه *Xanthomonas populi* sub sp. *populi* و *X. p.* sub sp. *salicis* را به‌ترتیب برای صنوبر و سپیدار گزارش کرد.

در سال‌های اخیر به‌منظور توسعه سریع ابزار و روش‌های شناسایی اختصاصی و دقیق این باکتری، مطالعات سرولوژیکی برای تولید پادتن تک‌دودمانه و نیز مطالعات مولکولی برای تعیین تنوع ژنتیکی عامل باکتریایی شانکر صنوبر انجام و میزان تشابه گروه‌های داخلی این باکتری را با یکدیگر و نیز با سایر زانتوموناس‌ها نشان داده‌اند (Mc. Donald & Wong, 2001).

هدف از این تحقیق، ردیابی و تعیین پراکندگی عامل بیماری شانکر باکتریایی صنوبر (*X. populi*) در برخی از استان‌های کشور بود. با توجه به مشاهده علائم شانکر روی تنه و شاخه های صنوبر در مناطق مختلف صنوبرکاری و عدم تعیین عامل آن در بسیاری از نقاط کشور، بررسی و شناسایی عامل شانکر صنوبر در مناطق مختلف کشور ضروری به نظر رسید. بنابراین در تحقیق پیش‌رو، عامل این بیماری در صنوبرکاری‌های استان های گیلان، زنجان، همدان، کرمانشاه، مرکزی و آذربایجان‌غربی ردیابی و شناسایی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از درختان مشکوک به بیماری‌های باکتریایی صنوبر در استان‌های زنجان (منطقه زنجان‌چوب و روستای قره‌چریان)، همدان، آذربایجان‌غربی، کرمانشاه، مرکزی و گیلان نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها از شاخه‌های آلوده و شانکرهای تنه، جمع‌آوری و برای بررسی و جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی، خالص‌سازی و نگه‌داری باکتری‌های عامل شانکر

برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های عامل شانکر، ابتدا شاخه‌های دارای شانکر با هیپوکلریت‌سدیم پنج درصد ضدعفونی و بعد با آب‌مقطر سترون شسته شدند. از حاشیه شانکر و قسمت‌های مجاور آن در شرایط سترون، قطعات کوچک پنج میلی‌متری بریده، در تشتک محتوی پنج میلی‌لیتری آب پپتونه یک‌درصد با تیغ سترون خرد گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در شرایط آزمایشگاه نگه‌داری و با لوپ فلزی سترون از هریک از نمونه‌ها یک قطره روی محیط کشت آگار غذایی، به‌صورت مخطط کشت داده شدند. تشتک‌ها به مدت پنج روز در دمای ۲۰°C نگه‌داری و بعد هشت جدایه از نمونه‌های زنجان و چهار جدایه از نمونه‌های استان مرکزی برای خالص‌سازی، به تشتک‌های دارای محیط کشت آگار غذایی منتقل شدند. برای نگه‌داری باکتری‌ها، یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری به لوله‌های اپندرف حاوی یک میلی لیتر آب‌مقطر سترون انتقال داده شد. درب لوله‌ها مسدود و به یخچال با دمای ۴°C منتقل گردید (Schaad *et al.*, 2001).

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های باکتری

بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی ابتدا روی سرشاخه‌های جوان یک تا دوساله صنوبر با ایجاد شکاف T شکل و تلقیح ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری حاصل از کشت ۲۴ ساعته با غلظت 10^8 سلول در میلی‌لیتر بررسی شد. نمونه شاهد با آب‌مقطر سترون، تیمار و به‌منظور جلوگیری از تبخیر، محل زخم‌ها با پارافیلم پوشانده شد.

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی روی گونه‌های مختلف صنوبر

بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی روی ۴ گونه *P. alba*، *P. euramerican*، *P. deltoids* و *Populus nigra* طبق روش های یادشده ارزیابی شد.

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های باکتریایی

کلیه جدایه‌ها برای آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی زیر مطالعه شدند: آزمون واکنش گرم با استفاده از پتاس سه درصد (وزن به حجم) (Suslow *et al*., 1982)، تولید لوان (Lelliot *et al*., 1987)، آزمون تحریک واکنش فوق‌حساسیت در توتون و فلفل (Klement *et al*., 1990)، تولید گاز از گلوکز، احیای نیترات و اوره‌آز (Schaad *et al*., 2001)، آزمون تولید مواد احیاکننده از سوکروز، آزمون‌های کاتالاز، پکتیناز (لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی)، هیدرولیز اسکولین، تولید ایندول، هیدرولیز توین ۸۰ (Lelliot *et al*., 1987) و آزمون‌های آرژینین‌دهیدرولاز و تولید گاز سولفیدهیدروژن از آب‌پپتون (سیستئین) (Schaad *et al*., 2001)، آزمون توانایی استفاده از منابع کربوهیدراتی (قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه، نمک‌های اسیدهای آلی) به‌عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن با استفاده از محیط پایه آیر (یک گرم فسفات آمونیوم، ۰/۲ گرم کلرورپتاسیم، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم، یک میلی‌لیتر از محلول برم‌تیمول‌بلو ۱/۶ درصد، وزن به حجم، ۱۲ گرم آگار خالص و یک لیتر آب‌مقطر با اسیدیته ۷/۲ انجام و نتایج روزانه تا ۱۰ روز یادداشت‌برداری شد (Fahy & Hyward, 1983). همه منابع کربنی با روش تندالیزاسیون (۱۵ دقیقه جوشاندن در سه روز متوالی) سترون و به غلظت نهایی ۰/۵ درصد به محیط پایه اضافه شدند.

بررسی واکنش گونه‌های مختلف صنوبر به عامل شانکر باکتریایی

سوسپانسیونی با غلظت 10^8 باکتری در میلی‌لیتر آب‌مقطر سترون از پنج ایزوله از باکتری‌های جداسازی شده تهیه و روی سه شاخه جوان یک تا دوساله چهار گونه *P. alba*، *P. euramerican*، *P. deltoids* و *Populus nigra* طبق روش یادشده در بالا مایه‌کوبی شد.

تعیین میزان آلودگی طبیعی کلن‌های مختلف صنوبر به شانکر باکتریایی در استان مرکزی

به‌منظور تعیین میزان آلودگی کلن‌های مختلف صنوبر به شانکر باکتریایی، تعداد شانکرهای موجود در هر تنه برای ۲۰ کلن صنوبر از گونه‌های *P. nigra* (63.135, 56.72, 56.75, 72.9, 49.5)، *P. betulifolia* (56.53, 47.40, 72.11, 56.52, 56.21, 72.5, 72.19, 72.18, 72.13, 72.14) و *P. alba* (44.9, 72.7, 72.4, 17.60, 49.39) در قالب بلوک کامل تصادفی و دارای ۲۰ تیمار در سه بلوک و هر کرت آزمایشی شامل ۲۰ درخت که به‌صورت مربع و به‌فاصله ۳×۳ کاشته شده‌اند؛ به‌طوری‌که به‌صورت مشاهده‌ای شمارش، اندازه‌گیری و ثبت شد، سپس درصد آلودگی برای هر کلن براساس تعداد و اندازه تقریبی زخم‌ها محاسبه گردید.

نتایج

جداسازی، خالص‌سازی و نگه‌داری باکتری‌های عامل شانکر

پرگنه‌های ریز و زرد روشن باکتری پس از پنج روز در سطح محیط کشت ظاهر و برای خالص‌سازی به تشتک‌های دارای محیط کشت NA منتقل شدند. این باکتری از شانکرهای کلن‌های مختلف صنوبر استان‌های زنجان و مرکزی جداسازی شدند. این باکتری، از شانکرهای کلن‌های مختلف صنوبر در آذربایجان‌غربی، کرمانشاه و همدان جداسازی نشد و هیچ‌گونه علامت شانکری روی صنوبرهای بازدیدشده در استان گیلان مشاهده نگردید.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی

دو هفته پس از مایه‌زنی باکتری، در محل تلقیح و روی شاخه‌های جوان یک تا دوساله صنوبر گونه *P. nigra* علائم زخم و نکروز مشاهده شد، به‌نحوی‌که دوباره باکتری *X. populi* از آنها جدا شد (شکل ۱).

شکل ۱- علائم زخم و نکروز در محل تلقیح روی شاخه‌های جوان یک تا دو ساله صنوبر گونه ***P. nigra*** (راست) و تیمار شاهد (چپ) دو هفته پس از مایه‌زنی باکتری

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی روی گونه‌های مختلف صنوبر

علائم زخم و نکروز روی سه گونه *P. nigra*، *P. euramerican* و *P. deltoides* مشاهده شد، به‌طوری که دوباره باکتری *X. populi* از آنها جداسازی شد. البته روی شاخه‌های *P. alba* هیچ‌گونه علامتی مشاهده نشد (شکل ۲).

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های باکتریایی

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های باکتریایی در جدول ۱ آمده است.

شکل ۲- علائم شانکر در محل تلقیح باکتری روی گونه ***Populus deltoides*** (راست) و عدم بروز علائم در محل تلقیح در گونه ***Populus alba*** (چپ) دو هفته پس از مایه‌کوبی

جدول ۱- خصوصیات باکتری‌شناسی استرین‌های جداشده از زخم‌های درختان صنوبر در استان‌های زنجان و مرکزی

خصوصیت	Charcteristic	واکنش
واکنش گرم	Gram reaction	–
رنگ کلنی روی محیط آگار غذایی	Yellow colonies on NA medium	زرد رنگ
رشد لعابی روی محیط آگار غذایی	Mucoid colonies on NA medium	+
تولید لوان	Levan formation	+
فوق حساسیت در فلفل	Pepper HR	+
فوق حساسیت در توتون	Tobacco HR	+
کاتالاز	Catalase	+
اکسیداز	Oxidase	–
آرژینین دهیدرولاز	Arginine dihydrolase	–
هیدرولیز اسکولین	Hydrolysis of esculin	+
هیدرولیز ژلاتین	Gelatin hydrolysis	–
هیدرولیز توین ۸۰	Tween 80 hydrolysis	+
هیدرولیز نشاسته	Starch hydrolysis	متنوع
لسیتیناز	Lecithinase	–
اوره‌آز	Urease	–
دی‌ان‌آز	DNase	+
تولید هیدروژن‌سولفوره از پپتون	H2S from peptone	+
تولید هیدروژن‌سولفوره ازسیستئین	H2S from cysteine	+
احیای نیترات	Nitrate reduction	متنوع
تحمل نمک ۵ درصد	5% NaCl tolerance	–
رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد	Growth at 4°C	–
رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد	Growth at 41°C	–
استفاده از:	Utilization of:	
ال آرابینوز	L-Arabinose	-
لاکتوز	Lactose	متنوع
دی سوربیتول	D-Sorbitol	-
ال رامنوز	L-Rhamnose	متنوع
ترهالوز	Trehalose	+
اینوزیتول	Inositol	+

خصوصیت	Charcteristic	واکنش
سوکروز	Sucrose	+
فروکتوز	Fructose	+
گالاکتوز	Galactose	+
رافینوز	Raffinose	–
مالتوز	Maltose	–
دی ریبوز	D-Ribose	–
ملی بیوز	Melibiose	–
سیترات سدیم	Sodium citrate	–
استات سدیم	Sodium acetate	–
فومارات سدیم	Sodium fumarate	+
سوکسینات سدیم	Sodium succinate	+

جدول ۲– درصد آلودگی طبیعی کلن‌های مختلف صنوبر به شانکر باکتریایی (براساس تعداد و اندازه شانکرهای موجود در هر کلن) برای ۲۰ کلن صنوبر از گونه‌های *P. nigra*، *P. betulifolia* و *P. alba* (از هر کلن ۲۰ درخت در قالب بلوک کامل تصادفی در استان مرکزی).

کلن‌ها	میانگین آلودگی سه بلوک (٪)	کلن‌ها	میانگین آلودگی سه بلوک (٪)	کلن‌ها	میانگین آلودگی سه بلوک (٪)
P. a 72.7	۰	*P. b* 72.14	۲/۷	*P. a* 17.6	۳/۷
P. b 56.21	۰/۷	*P. b* 56.52	۳	*P. n* 72.13	۸/۷
P. a 49.39	۱/۳	*P .b* 72.5	۳	*P. n* 56.63	۸/۷
P. b 72.13	۱/۳	*P. b* 72.18	۳	*P. n* 56.52	۱۲
P. b 47.40	۲	*P. a* 44.9	۳/۳	*P. n* 72.14	۱۲/۷
P. b 56.53	۲/۳	*P. b* 72.11	۳/۳	*P. n* 56.21	۱۳/۳
P. b 72.19	۲/۷				

براساس خصوصیات فنوتیپی، تغذیه‌ای و مرفولوژیکی (جدول ۱)، باکتری عامل شانکر درختان صنوبر گونه *Xanthomonas populi* شناسایی شد (Schaad *et al*., 2001).

تعیین میزان آلودگی کلن‌های مختلف صنوبر به شانکر باکتریایی در استان مرکزی

براساس بررسی‌های مشاهده‌ای شانکرهای روی تنه درختان در صنوبرکاری ایستگاه خسبیجان (اراک) مشخص شد که کلن های *P. b* 56.21، *P. a* 49.39 و *P. b* 72.13 دارای کمترین آلودگی و کلن‌های *P. n* 56.21، *P. n* 72.14 و *P. n* 56.52 دارای بیشترین آلودگی هستند. هیچ‌گونه شانکری در درختان کلن *P. a* 72.7 مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۳- آنالیز واریانس درصد آلودگی طبیعی کلن‌های مختلف صنوبر به شانکر باکتریایی (براساس تعداد و اندازه شانکرهای موجود در هر کلن)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F
تکرار	۲	۳/۵۲۶۳۱۵۸	۵/۳۵**
تیمار	۱۸	۵۳/۶۲۳۷۸۱۷	۸۱/۷۵**
خطا	۳۶	۲۳/۶۱۴۰۳۵۱	
ضریب تغییرات (درصد)		۱۷/۳۰۹۵۵	

**: معنی‌داری در سطح ۱ در هزار

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد آلودگی طبیعی کلن‌های مختلف صنوبر به شانکر باکتریایی و گروه‌بندی کلن‌های صنوبر برحسب میزان آلودگی طبیعی به روش دانکن

گروه‌بندی دانکن	میانگین آلودگی سه بلوک (٪)	کلن‌ها
a	۱۳/۳	*P. n* 56.21
a	۱۲/۷	*P. n* 72.14
a	۱۲	*P. n* 56.52
b	۸/۷	*P. n* 56.63
b	۸/۷	*P. n* 72.13
C	۳/۷	*P. a* 44.9
C	۳/۳	*P. a* 17.6
cd	۳/۳	*P. b* 72.11
cd	۳	*P. b* 72.5
cd	۳	*P. b* 72.18
cde	۳	*P. b* 72.19
cde	۲/۷	*P. b* 72.14
cde	۲/۷	*P. b* 56.53
def	۲/۳	*P. b* 47.40
def	۲	*P. b* 56.52
efg	۱/۳	*P. b* 72.13
efg	۱/۳	*P. a* 49.39
fg	۰/۷	*P. b* 56.21
g	۰	*P. a* 72.7

بحث

از نتایج آنالیز داده‌ها، جدول تجزیه واریانس و جدول گروه‌بندی کلن‌ها (جدول‌های ۲، ۳ و ۴) چنین استنباط می شود که آلودگی طبیعی کلن‌های مختلف صنوبر به شانکر باکتریایی که براساس تعداد و اندازه شانکرهای موجود برای ۲۰ کلن صنوبر از گونه‌های *P. nigra*، *P. betulifolia* و *P. alba* محاسبه شده است، در کلن‌های مختلف و تکرارهای سه‌گانه معنی‌دار بوده است. البته تفاوت در کلن‌ها ممکن است جنبه ژنتیکی داشته باشد و تفاوت‌هایی که در میان تکرارها مشاهده شده است، مربوط به آلودگی طبیعی و تصادفی آنهاست و طبیعی به نظر می‌رسد. بنابراین اگرچه این داده‌ها تصویری کلی را از واکنش طبیعی کلن‌های مختلف به این بیماری نشان می‌دهند، اما برای کسب اطمینان بیشتر و اطلاعات دقیق‌تر، انجام آزمون‌های بیماری‌زایی به‌صورت مایه‌کوبی مصنوعی کلن‌ها در شرایط کنترل‌شده و یکسان از لحاظ آماری ضروری به نظر می‌رسد.

Faiz Sayadian و Maarefat (۲۰۱۶) در بهار سال ۹۳ و ۹۴ از قسمت‌های پوست، شاخه و بخش‌هایی از تنه درختان صنوبر دارای علائم بیماری شانکر باکتریایی در برخی مناطق شمال‌غرب و غرب (زنجان، تبریز و کرمانشاه) نمونه‌برداری کرده‌اند. جداسازی باکتری‌ها به روش معمول خیس کردن قطعات خردشده هر نمونه در آب‌مقطر و کشت روی محیط کشت آگار غذایی انجام و برای شناسایی باکتری‌های جداشده از آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف و آزمون بیماری‌زایی استفاده کردند. بیماری‌زایی جدایه‌ها را در نهال‌های صنوبر گونه *Populus nigra* در شرایط گلخانه‌ای بررسی کردند. آنان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق باکتری را داخل آوندهای برگ، جوانه و پوست مایه‌کوبی کردند و علائم لکه‌برگی با حاشیه آب‌سوخته را پس از هفت تا ۱۰ روز و علائم نکروز شاخه‌ها را در محل تزریق و اطراف آن پس از سه تا چهار هفته مشاهده نمودند. براساس نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شده، آنها عامل این شانکر را به دو باکتری *Microbacterium* sp. و گونه‌ای از *Xanthomonas* (که با *X. populi* تفاوت‌هایی داشته است) نسبت دادند (Faiz Sayadian & Maarefat, 2016).

واکنش ارقام و کلن‌های مختلف صنوبر، در دنیا به این بیماری متفاوت است. برخی از آنها مقاومت نسبی و برخی دیگر حساسیت بالایی را در مقابل این بیماری دارند. Jobling و Young (۱۹۶۵) در انگلستان، مقاومت طبیعی ارقام و واریته‌های مختلف صنوبر به آلودگی طبیعی به این باکتری را بررسی و ارزیابی کردند. آنان نشان دادند که برخی از کلن‌ها حساس هستند و برخی دیگر تحمل بیشتری دارند. Whitbread (۱۹۶۷) در انگلستان با استفاده از ترشحات صمغی و چسبنده جمع‌آوری شده از روی زخم های طبیعی، روی صنوبر آلودگی ایجاد کرد. وی میزان آلودگی با اسلایم‌های طبیعی را بسیار متغیر ارزیابی کرد. Burdekin (۱۹۷۲) ضمن تلقیح کلن‌های مختلف صنوبر با سوسپانسیون باکتری خالص‌سازی شده و نیز با ترشحات صمغ‌مانند موجود در حاشیه زخم‌های باکتریایی، توانست بیماری را به درختان سالم منتقل کند. وی نشان داد که آلودگی مصنوعی صنوبر با ترشحات طبیعی باکتری در تعیین حساسیت و مقاومت ارقام مختلف می‌تواند در کنار استفاده از کشت باکتریایی خالص مورد توجه قرار گیرد و تعیین کننده باشد.

Gremmen و DE Kam (۱۹۷۴) با انجام چندین آزمون، نقش جوانه، گوشوارک‌ها (برگچه‌های محل انشعاب دمبرگ) و برگ را در آلوده‌سازی صنوبر به این باکتری بررسی کردند. نتایج این بررسی‌ها نقش هر سه اندام یادشده را در ایجاد آلودگی مصنوعی به‌خوبی نشان می‌دهد. مایه کوبی از طریق جوانه‌ها و گوشوارک‌ها به آلودگی طبیعی نزدیک‌تر است. برای تعیین میزان حساسیت صنوبر به عامل شانکر باکتریایی، De Kam و Heisterkamp (۱۹۸۷) با دو روش آلوده‌سازی، گوشوارک‌ها (برگچه‌های محل انشعاب دمبرگ) (stipule scare) و برگ‌های (leaf scare) کلن‌های مدنظرشان را به‌صورت مصنوعی آلوده کردند. مقایسه این دو روش نشان داد، اگرچه هر دو روش برای آلوده‌سازی موفق گیاه مناسب هستند، ولی آلوده‌سازی از طریق گوشوارک‌ها

نسبت به آلوده‌سازی برگ‌ها به آلودگی طبیعی بسیار نزدیک تر است. Lonsdale و Rose (۱۹۹۸) حساسیت و مقاومت ۴۹ کلن جدید صنوبر (که در بلژیک اصلاح شده بودند) را از طریق آلوده‌سازی به روش آلوده‌سازی گوشوارک‌ها به *Xanthomonas populi* بررسی و تعدادی از این کلن‌ها را که مقاومت قابل قبولی داشتند، معرفی کردند.

منابع مورد استفاده

-Behdad, A., 1987. Pests and diseases of trees, forest shrubs and ornamental plants in Iran, Neshat Press, Esfahan, 820p (In Persian).

-Burdekin, D.A., 1972. Bacterial canker of poplar. Annals of Applied Biology, 72: 295-299.

-Christie, L., Jenkins, C.L. and Mortimer Starr, P., 1982. The Pigment of *Xanthomonas populi* is a Nonbrominated Aryl-Heptaene Belonging to Xanthomonadin Pigment Group 11. Current Microbiology, 7: 195-198.

-De Kam, M. and Heisterkamp, S.H., 1987. Comparison of two methods to measure the susceptibility of poplar clones to *Xanthomonas populi*. European Journal of Forest Pathology, 17: 33-46.

-De Kam, M., 1978. *Xanthomonas populi* subsp. *salicis*, cause of bacterial canker in *Salix dasyclada*. European Journal of Forest Pathology, 8: 334-337.

-De Kam, M., 1981. The identification of the two subspecies of *Xanthomonas populi* in vitro. European Journal of Forest Pathology, 11: 25-29.

-De Kam, M., 1984. *Xanthomonas campestris* pv. *populi*, the causal agent of bark necrosis in poplar. Netherlands Journal of Plant Pathology, 90: 13-22.

-De Kam, M., 1982. Damage to poplar caused by *Pseudomonas syringae* in combination with frost and fluctuating temperatures. European Journal of Forest Pathology, 12: 203-209.

-De Lange, A. and Kerling, L.C.P., 1962. *Aplanobacterium populi*, the cause of bacterial canker of poplar. Tijdschrift Over Plantenziekten, 68: 289-291.

-Ebrahim-nesbat, F., Von Tiedemann, S., Albrecht, S., Heiteeuss, R. and Huttermann, A., 1990. Electron microscopical studies of poplar clones inoculated with *Xanthomonas populi* subsp. *populi*. European Journal of Forest Pathology, 20: 367-375.

-Ershad, D. 1995. Fungi of Iran, 2nd edn. Tehran, Iran: Agricultural Research, Education and Extension Organization, Publication, 10: 1–874.

-Fahy, P.C., and Hyward, A.C., 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: Fahy, P.C., Persley, (Eds.). Plant bacterial disase, A diognostic. Guide. Academic press, Australia. pp: 337-378.

-Faiz Sayadian, N. and Maarefat, A., 2016. Identification of bacteria related to canker of poplar trees in some areas of western and northwestern Iran. 22nd Iranian Plant Protection Congress. Volume 22, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, 99p (In Persian).

-Gremmen J. and De Kam, M., 1974. Research on poplar canker (*Aplanobacter populi*) in the Netherlands. Part II. European Journal of Forest Pathology, 4: 175-181.

-Haworth, R.H. and Spiers, A.G., 1988. Stem necrosis of *Populus deltoides X P. triehoearpa* in New Zealand caused by *Xanthomonas campestris* pv. *populi*. European Journal of Forest Pathology, 18: 200-206.

-Jobling, J. and Young, C.W.T., 1965. Apparent variations in the resistance of poplar clones to bacterial canker. Report Forest Research, London, 1517p.

-Kechel, H.G., 1984. Untersuchungen über die Resistenz von Pappeln gegenüber dem Erreger des Pappelkrebses, *Xanthomonas populi* subsp. *populi* (Ridé) Ridé und Ridé. Schr Forschungsinst Schnellwachsende Baumarten, Vol 3, Univ Hannover-Münden.

-Klement, Z., Rudolph, K. and Sands D.C., 1990. Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, 568p.

-Koning, H. C., 1937. The bacterial canker of poplars. Meded. Phytopathological Laboratory Willie Commelin Scholten, 14: 3-42.

-Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, U.K., 21p.

-Lonsdale, D. and Rose, J., 1998. Resistance of new Belgian poplar clones to British isolates of the bacterial canker pathogen, *Xanthomonas populi.* European Journal of Forest Pathology, 28: 227-232.

-Mc. Donald, J.G. and Wong, E., 2001. Use of a monoclonal antibody and genomic fingerprinting by repetitive-sequence-based polymerase chain reaction to identify *Xanthomonas populi* pathovars. Canadian Journal of Plant Pathology, 23: 47-51.

-Ride, M., 1958. Sur l'etiologie du chancre suitantdu peuplier. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, France, 246: 2795-2798.

-Ride, M., 1980. International bacterial canker testing programme on poplar. In: Heybroek. H.M., (Eds.). Proceedings III. International Workshop on the Genetics of Host-Parasite Interactions in Forestry, Netherland, pp. 14-21.

-Ride, M. and Ride, S., 1978. *Xanthomonas populi*

Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, (third edition). Saint Paul, MN, APS Press, American Phytopathological Society, 373p.

-Starr, M.P. 1981. The Genus *Xanthomonas*. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (Eds). The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9-62

-Suslow, T.V., Schroth, M.N., and Isaka, M., 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917-918.

-Van Den, E.G., 1957. Het onderzoek over de populierenkanker, veroorzaakt door *Pseudomonas syringae* v. Hall f. sp. populae Sabet. Meded. Landb. Hogeseh. Gent., 22: 527-533.

-Whitbread, R., I967. Bacterial canker of poplar in Britain. The cause of the disease and the role of leaf scars in infection. Annals of Applied Biology, 59: 31-123.

(Ride) comb. nov. (syn. *Aplanobacter populi* Ride), specificite, variabilite et absence de relations avec *Erwinia cancerogena* Ur. European Journal of Forest Pathology, 8: 310-333.

-Ride, M. and Ride, S., 1979. The causal agent of the bacterial canker of poplar *(Aplanobacter populi* Ride): *Xanthomonas populi* or *Xanthomonas campestris* pathovar *populi*. In: Angers, (Eds.). Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Beaucouze: Institut National de la Recherche Agronotnique. pp. 365-370.

-Ride., M. and Ride, S., 1978. Factors affecting inoculation success in woody plants. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, 957-968.

-Sabet, K.A. and Dowson, W.J., 1952. Studies in the bacterial die-back and canker disease of poplar I. The disease and its cause. Annals of Applied Biology, 39: 609-616.

-Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., 2001.

Identification of poplar bacterial canker in Zanjan and Markazi provinces

A. Alizadeh Aliabadi[1*], F. Jami[2] and M.R. Arefipoor[3]

1*-Corresponding author, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Tehran, Iran, E-mail: aalizadeh1340@yahoo.com
2- Department of Microbiology and Plant Pathology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria, South Africa
3- Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 24.01.2021 Accepted: 12.04.2021

Abstract

In order to identify the bacterial canker of poplar, various poplar clones in Gilan, Zanjan, Markazi, Western Azerbaijan, Kermanshah and Hamedan provinces were visited. Branches of one to several years old and trunk with canker symptoms were collected. Samples of Zanjan (eight isolates) and Markazi (four isolates) provinces were isolated from yellow and mucoid bacteria. The pathogenicity of the isolates on young shoots of poplar and hypersensitivity reaction in tobacco was proved. All bacterial isolates were gram-negative, oxidase, arginine dehydrolase, gelatin hydrolysis, lecithinase and urease negative, but in catalase test, they were positive and able to hydrolyze scolin, twin 80, produce levan and produce H2S from cysteine and peptone. All strains used sucrose, fructose, inositol, trehalose, galactose, sodium fumarate and sodium succinate as the only carbon source, but did not use al-arabinose, lactose, disorbitol, alumenose, raffinose, maltose, di-ribose and mellibiose. Based on their bacteriological properties and pathogenicity, all isolates were identified as *Xanthomonas populi*. The percentage of poplar trunk contamination in Khosbijan station (Arak) was determined between 0.0 to 13.3%. Based on our results, the lowest infection was observed in clones of *P. alba* (*P. a* 49.39) and *P. betulifolia* (*P. b* 56.21 and *P. b* 72.13) and the highest infection was observed in clones of *Populus nigra* (*P. n* 56.52, *P. n* 56.21 and *P. n* 72.14). This bacterium was not isolated from *P. a* 72.7 colony in Khasbijan site, nor from different colonies in Urmia, Kermanshah, West Azerbaijan and Hamedan.

Key words: Bacteria, canker, poplar, *Xanthomonas populi*.