نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ص ۱۰۴-۱۰۲

Journal of Plant Protection
Vol. 25, No. 1, Spring 2011, P. 102-104

مقاله کوتاه پژوهشی

تعیین جمعیت اپی فیتی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* روی علف های هرز باغات زردآلوی مبتلا به شانکر باکتریایی

میرمعصوم عراقی[1*]- کامران رهنما[2]

تاریخ دریافت:۸۹/۴/۱۲
تاریخ پذیرش:۹۰/۱/۲۹

چکیده

مرحله اپی فیتی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) در شیوع و انتشار آن نقش اساسی دارد. این تحقیق با هدف تعیین جمعیت اپی فیتی باکتری *Pss* روی تعدادی از علف های هرز باغات زردآلوی آلوده به بیماری شانکر باکتریایی در منطقه مرند انجام گرفت. در ماه های مهر و آبان از علف های هرز موجود نظیر پنیرک، تاج خروس، گل قاصد، پیچک، سلمه، قیاق و مرغ نمونه برداری شد. رقت های مختلف تا 10^{-7} از سوسپانسیون تهیه شده از بافت گیاهی، درون ظروف حاوی محیط کشت نیمه انتخابی NAS پخش شد و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری گردید. پس از گذشت ۷۲- ۴۸ ساعت اقدام به شمارش کلونی های *Pss* گردید و با اعمال ضرایب مختلف رقت، تعداد باکتری در هر گرم بافت تازه گیاهی محاسبه گردید. لگاریتم پایه ده اعداد برای انجام تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین ها استفاده شد. علف های هرز مورد بررسی در این آزمون از نظر میزان جمعیت اپی فیتی باکتری *Pss* در سطح احتمال ۱ درصد دارای تفاوت معنی دار آماری بودند. به طوری که علف های هرز قیاق، مرغ و تاج خروس به ترتیب با ۶/۷۸۵، ۶/۱۴۵ و ۵/۲۲ (لگاریتم تعداد سلول باکتری در گرم بافت گیاهی) بیشترین جمعیت اپی فیتی و دو علف هرز پنیرک و پیچک به ترتیب با ۲/۶۰۵ و ۲/۳۵ حامل کمترین جمعیت باکتری *Pss* بودند. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، چنین به نظر می رسد که نقش الگوی رشدی، ویژگی های ساختاری و فیزیولوژیکی علف های هرز مورد بررسی در این تحقیق در میزان جمعیت اپی فیتی باکتری *Pss* محتمل باشد.

واژه های کلیدی: زردآلو، شانکر باکتریایی، مرحله اپی فیتی، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

مقدمه

شهرستان مرند یکی از مهمترین شهرستان های استان آذربایجان شرقی از نظر تولید محصولات زراعی و باغی به ویژه زردآلو به حساب می آید. گزارشات متعدد از باغات منطقه حاکی از خشکیدگی و زوال درختان هسته دار و به ویژه زردآلو، از مهمترین موضوعات مورد بحث در سال های اخیر در این شهرستان بوده است. یکی از مهمترین عوامل بیماری زای سرخشکیدگی، پژمردگی، خشکیدگی و زوال درختان هسته دار بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته دار می‌باشد. در ایران این بیماری با نام *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) توسط بهار و همکاران روی زردآلو در اصفهان گزارش گردید (۲). اخیراً نیز ابراهیم زاده و همکاران باکتری *Pss* را به عنوان مهمترین عامل سرخشکیدگی باکتریایی درختان زردآلو در باغات مرند معرفی کردند (۱). باکتری *Pss* دامنه میزبانی وسیعی دارد و می تواند به صورت اپی فیت روی بسیاری از گونه های گیاهی از جمله درختان هسته دار به زندگی ادامه دهد. تاکنون بقاء و زندگی اپی فیتی *Pss* روی بسیاری از گیاهان میزبان و غیر میزبان اعم از زراعی، باغی و علف های هرز همچون هلو، گیلاس، بادام، زردآلو، اقاقیا، زیتون، بلوط، رز، سرو، آفتابگردان، گوجه فرنگی، توت فرنگی، لوبیا، نیشکر، ماشک، یولاف وحشی، پوآ، پنجه مرغی، ذرت، گندم، جو خودرو، ارزن، چاودار، مرغ، قیاق، تاج خروس، تاجریزی سیاه، چسبک، خونی واش، فرفیون، نی، سلمه و پیچک صحرایی به اثبات رسیده است (۳، ۵، ۶ و ۹). با توجه به اهمیت عامل بیماری در منطقه بر روی درختان هسته دار به ویژه زردآلو و نظر به دامنه میزبانی وسیع اپی فیتی این باکتری در اغلب مزارع و باغات میوه، در

۱و۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: (Email: Iraqi602@yahoo.com

این تحقیق برای نخستین بار سعی شده است تا بـه بررسـی و تعیـین میزان جمعیت اپی فیتی این باکتری روی علف های هـرز موجـود در باغات زردآلوی منطقه مرند پرداخته شود.

مواد و روش ها

نمونه برداری از علف های هرز باغات زردآلو

با در نظر گرفتن بهینه زمان مناسب برای رشـد، انتشـار و شـیوع باکتری *Pss*، نمونه برداری در ماه های مهر و آبـان و از علـف هـای هرز مهم موجود در باغات در زمان نمونه برداری (مهر- آبـان) شـامل پنیـرک (*Malva neglecta*)، گـل قاصـد (*Taraxacum officinale*)، پیچـک (*Convolvulus arvensis*)، سـلمه (*Chenopodium album*)، تـاج خـروس (*Amaranthus retroflexus*)، قیـاق (*Sorghum halepense*) و مـرغ (*Agropyron repense*) نمونه برداری شد (۴).

جداسـازی و تعیـین جمعیـت بـاکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

جداسازی و تعیین جمعیت اپی فیتی باکتری *Pss* بر اساس روش خانی و همکاران صورت گرفت (۳). از هر نمونه علـف هـرز بـه طـور تصادفی ۳ گرم بافت تازه گیاهی تهیه، خرد کرده و در داخل ۶۰ میلی لیتـر بـافر شستشـو حـاوی ۶/۲۵ گـرم KH_2PO_4، ۸/۷۵ گـرم K_2HPO_4، یک گرم باکتوپپتون در یک لیتـر آب اتـوکلاو شـده بـا pH ۷ ریختـه و روی شـیکر بـا ۵۰ دور در دقیقـه تکـان داده شـد. رقت‌های مختلف تا 10^{-7} سوسپانسیون تهیه و بـه میـزان ۰/۵ میلـی لیتر از رقت های مختلف بـه درون ظـروف پتریـدیش حـاوی محـیط کشت نیمـه انتخـابی NAS (۳ و ۱۰) دارای مقـادیر معـین از آنتـی بیوتیک های وانکومایسین، پنیسیلین و سفالکسین انتقـال داده شـد و توسط میله شیشه ای به طور یکنواخت در سطح محیط کشت پخـش گردید. در این آزمون از ۷ سـطح غلظـت 10^{-1}- 10^{-7} اسـتفاده شـد. برای هر رقت ۳ تکرار (نمونه گیاهی از هر علف هرز) در نظـر گرفتـه شد. ظروف پتریـدیش بـه مـدت ۷۲- ۴۸ سـاعت در دمـای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شدند. (برای شناسـایی دقیـق جدایه های باکتریایی بر اساس شاد و همکاران (۱۰) از واکنش هـای گرم، تحرک، رشـد هـوازی/ بـی هـوازی، تولیـد رنگدانـه فلورسـنت، لهیدگی سیب زمینی، اکسیداز، تولید لوان، کاتالاز، تولیـد هسـته یـخ، تولید سرینگومایسین، آرژنین دی هیدرولاز، هیـدرولیز ژلاتـین، تولیـد H_2S از پپتون، احیای نیترات، تولید ایندول، استفاده از ال- تارتـارات، آلانین و سـیترات، تولیـد اسـید از مـانیتول، دی آرابینـوز، سـوربیتول، سوکروز و ال- رامنوز استفاده شد). پس از گذشت این مدت اقدام بـه شمارش کلونی های *Pss* گردید. نهایتاً با اعمال ضرایب مختلف رقت تعداد باکتری در سوسپانسیون اولیه و در نهایت در هر گرم بافت تـازه گیاهی محاسبه و لگاریتم پایه ده آنها بـرای انجـام تجزیـه و تحلیـل آماری و مقایسه میانگین ها به دست آمد. برای تجزیه و تحلیـل داده ها از نرم افزار آماری SAS استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که علف های هرز مورد بررسی در این آزمون از نظر میزان جمعیت اپی فیتی باکتری *Pss* در سطح احتمال ۱ درصد دارای تفاوت معنی دار آماری هستند. به طوری که علف های هرز قیاق، مرغ و تاج خروس به ترتیب بیشترین جمعیت اپی فیتی را داشتند. لگاریتم تعداد سلول زنده باکتریایی در گرم بافت تازه گیاهی برای علف های هرز قیاق، مرغ، تاج خروس، گل قاصد و سلمه به ترتیب ۶/۷۸۵، ۶/۱۴۵، ۵/۲۲، ۳/۴۰ و ۲/۶۳ به دست آمد. دو علف هرز پنیرک و پیچک به ترتیب با ۲/۶۰۵ و ۲/۳۵ حامل کمترین جمعیت باکتری *Pss* بودند (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین جمعیت اپی فیتی *Pss* روی علف های هرز باغات زردآلو منطقه مرند در مهر- آبان

علف هرز	* میانگین جمعیت *Pss* (بر حسب لگاریتم تعداد باکتری در گرم بافت تازه گیاهی)
پنیرک	(۲/۷۶) – ۲/۶۰۵ – (۲/۴۵) [d]
گل قاصد	(۳/۲۲) – ۳/۴۰ – (۳/۵۸) [c]
پیچک	(۲/۴۲) – ۲/۳۵ – (۲/۲۸) [d]
تاج خروس	(۴/۸۱) – ۵/۲۲ – (۵/۶۳) [b]
قیاق	(۷/۱۵) – ۶/۷۸۵ – (۶/۴۲) [a]
مرغ	(۵/۸۱) – ۶/۱۴۵ – (۶/۴۸) [a]
سلمه	(۲/۴۱) – ۲/۶۳ –(۲/۸۵) [d]

ضریب تغییرات: ۱/۷۹۶۰۳۶۴ درصد. * اعداد دارای حروف مشابه دارای اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه ای دانکن نمی باشند

در تحقیقی میزان جمعیت اپی فیتی باکتری *Pss* (عامل نوار قرمز نیشکر) روی علف های هرز مزارع نیشکر شامل قیاق، ذرت، مرغ، خونی واش، تاج خروس، نی، تاجریزی سیاه، پیچک صحرایی، آفتابگردان، سلمک و توت فرنگی به ترتیب ۷/۳۰۰، ۷/۱۷۰، ۷/۰۵۰، ۷/۰۴۰، ۶/۹۲۰، ۵/۱۷۵، ۳/۷۲۵، ۲/۷۸۵، ۱/۱۰۰، ۱/۰۵۰ و ۰/۷۵۵ (لگاریتم تعداد سلول باکتری در گرم بافت تازه گیاهی) محاسبه شد (۳). نتایج تحقیقات مختلف نشان می دهد که میزان جمعیت اپی فیتی باکتری در گیاهان می تواند متأثر از ساختارهای فیزیولوژیکی و الگوی رشدی آنها باشد. اندام های گیاهانی که دارای رشد ایستا و عمودی هستند به یک میزان از تنش های محیطی متأثر نمی شوند و جمعیت باکتری به طور یکسان در تمام اندام های آنها کاهش نمی یابد و این مسئله باعث می شود که میانگین جمعیت قابل ردیابی بیشتر باشد در حالی که در گیاهانی با رشد کپه ای، روزته یا خوابیده به دلیل نزدیکی به سطح خاک، بیشتر با خشکی و شرایط نامساعد محیطی مواجه بوده و در نتیجه جمعیت کمتری از باکتری را در مقایسه با سایر گیاهان دارا هستند (۳). با توجه به اینکه قیاق، مرغ و تاج خروس گیاهانی با رشد عمودی و ایستا بوده و بیشترین جمعیت اپی فیتی باکتری را در خود داشتند و دو گیاه پنیرک با رشد کپه ای و نزدیک سطح خاک و پیچک با رشد خوابیده و خزنده کمترین جمعیت باکتری را دارا بودند، بنابراین نقش الگوی رشدی گیاهان در نگهداری جمعیت های اپی فیتی باکتری *Pss* در این تحقیق نیز به اثبات رسید. از سوی دیگر گیاهی مانند سلمه که دارای رشد ایستاد و عمودی است دارای جمعیت کمتری بود (در مقایسه با مرغ، تاج خروس و قیاق). بنابراین چنین به نظر می رسد که علاوه بر اُلگوی رشدی، عوامل دیگری نیز در نگهداری جمعیت باکتری در گیاهان مختلف نقش داشته باشند. تفاوت در میزان مواد غذایی مترشحه در برگ ها (همچون قندها و اسیدآمینه ها)، سن و فنولوژی گیاه، وجود و عدم وجود کرک و نوع آن در اندام های مختلف گیاه می تواند میزان جمعیت اپی فیتی باکتری را تحت تأثیر قرار دهد (۳، ۷ و ۸). که این مورد اخیر در مورد گیاه سلمه می تواند صحت داشته باشد، چراکه رابطهٔ مثبتی بین میزان جمعیت اپی فیتی باکتری ها و تراکم کرک های گیاهی وجود دارد (۱۱).

منابع

۱- ابراهیم زاده ع.، محمدی گل تپه ا.، و رضایی دانش ی. ۱۳۸۷. بررسی عامل مولد خشکیدگی زردآلو در باغات مرند در ایران. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه بوعلی سینای همدان. صفحه ۴۰۷.

۲- بهار م.، مجتهدی ح.، و اخیانی ا. ۱۳۶۱. شانکر باکتریایی زردآلو در اصفهان. مجله بیماری های گیاهی. جلد ۱۸، شماره ۴، صفحات ۶۸- ۵۸.

۳- خانی م.، رحیمیان ح.، و خداکرمیان غ. ۱۳۸۶. شناسایی میزبان های اپی فیتی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل بیماری نوار قرمز نیشکر در مزارع مازندران. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۴، شماره ۲، صفحات ۱۷۴- ۱۶۵.

۴- راشد محصل م.ح.، و وفابخش ک. ۱۳۷۸. مدیریت علمی علف های هرز. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۷۵ صفحه.

۵- ظهور پرالک ا.، و سروی ر. ۱۳۸۹. بررسی وضعیت اپی فیتی چند باکتری مهم گیاهی و علف های هرز میزبان آن ها. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۴۴۳.

۶- نیک نژاد کاظم پور م. ۱۳۸۱. روند استقرار باکتری *Pseudomonas syringae* روی ارقام حساس و مقاوم گوجه فرنگی در شرایط مزرعه. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۱۷۱- ۱۵۵.

7- Hirano S.S., and Upper C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*, a pathogen ice nucleus and epiphyte. Microbiology Molecular Biology Review 64: 624-653.

8- Mercier J., and Lindow S.E. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. Applied Environmental Microbiology 66: 369-374.

9- Rahimian H. 1995. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. Phytopathology 143: 321-324.

10- Schaad N.W., Jones J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd edition). APS Press, 373 pp.

11- Yadav R.K., Karamanoli K., and Vokou D. 2005. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. Microbe Ecology 50: 185-196.