فصلنامه گیاه‌پزشکی
۲۹۶-۲۸۹ : (۴) ۲-۱۳۸۹

شیوع بیماری بلاست سیب و گلابی در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

اسفندیار ظهور پرالک*

مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران

چکیده

طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷ علائم شانکر و سوختگی گل‌ها در درختان گلابی (*Pyrus communis*) و سیب (*Malus communis*) در چندین باغ در استان‌های خراسان رضوی و شمالی دیده شد. علائم بیماری تا اندازه‌ای مشابه علائم آتشک گلابی ناشی از *Erwinia amylovora* بوده ولی ترشح شیرابه از بافت‌های آلوده مشهود نبود. از بافت‌های آلوده باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل و هوازی اجباری جدا گردید. باکتری‌ها روی محیط‌های غنی از سوکروز قادر به تولید لوان بوده و در محیط King's B (KB) تولید رنگدانه فلورسنت نمودند. کلیه جدایه ها کاتالاز مثبت، اکسیداز، آرجی نین دی هیدرولاز منفی بوده و قادر به هیدرولیز نشاسته، اسکولین، تولید اندول، استوئین، H_2S و لهانیدن برش‌های سیب زمینی نبودند. برخی جدایه های مورد بررسی تولید سرینگومایسین (Syringomycin) و در برگ‌های توتون و شمعدانی واکنش فوق حساسیت ایجاد نمودند. فروکتوز، گلوکز، گالاکتوز، سوکروز، مانوز، مانیتول، گلیسیرین، سیترات، فومارات، ساکسی نایت و لاکتات از جمله منابع کربن قابل استفاده به وسیله جدایه‌ها بود. هیچ یک از جدایه‌ها توانائی استفاده از مالتوز، اینولین، نشاسته، دکسترین، اگزالات، فرمات و بنزوات را نداشتند. براساس ویژگی‌های یاد شده و سایر خصوصیات باکتری شناسی، جدایه‌ها به عنوان *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* شناسایی شدند. علائم شانکر و سوختگی جوانه‌ها روی سرشاخه ها و نهال‌های بذری مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه ایجاد گردید و باکتری‌های مایه زنی شده دوباره از شاخه‌ها جدا گردید. این اولین گزارش وقوع بلاست سیب در ایران است.

واژه‌های کلیدی : بلاست، سیب، گلابی، شیوع، خراسان

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : zohourpp@yahoo.co.in

تاریخ دریافت : ۹۰/۴/۱۷، تاریخ پذیرش : ۹۱/۴/۲۰

مقدمه

ایران با داشتن اقلیم‌های مختلف و موقعیت جغرافیایی مناسب، از مساعدترین مناطق دنیا برای کشت و پرورش انواع درختان میوه محسوب می‌گردد. سطح زیر کشت محصولات باغی کشور اعم از نهال و بارور در سال ۱۳۸۷، حدود ۲/۶ میلیون هکتار برآورد شده که ۸۵/۶ در صد آن آبی و ۱۴/۴درصد دیم بوده است. سطح بارور باغ‌های کشور حدود ۲ میلیون هکتار برآورد گردیده که ۷۹/۵ درصد از سطح باغات کشور می‌باشد. سطح زیر کشت سیب و گلابی در استان خراسان رضوی و شمالی در سال ۱۳۸۷ به ترتیب برابر ۲۱۸۰۹ و ۴۶۳۰ هکتار می‌باشد (Annonymous, 2007). بیماری‌های ناشی از پاتوارهای *Pseudomonas syringae* یکی از مشکلات جدی و محدود کننده تاسیس و حفاظت از باغ‌های دانه دار و هسته‌دار می‌باشند (Thomidis *et al*.,2005). این باکتری توانایی ایجاد بیماری در بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی در چندین جنس غیر وابسته را دارد (Little *et al*., 1998). از این میان می‌توان به خانواده‌های Fabaceae، Poacae، Rosaceae، Oleaceae و Rutaceae اشاره نمود و این در حالی است که حساسیت میزبان‌های یاد شده به باکتری مذکور یکسان نیست (Hirano & Upper, 1990). پاتوارهای *Pseudomonas syringae* در اکثر مناطق عمده کشت درختان میوه وجود دارند و به نام‌های بلاست جوانه، بلاست شکوفه، سر خشکیدگی، بلایت مهمیز و سرشاخه نیز شناخته می‌شوند (Ogawa *et al*., 1995). خسارت این بیماری می‌تواند در نتیجه سرمازدگی شکوفه‌ها یا مرگ جوانه و گل‌ها، زوال درخت و یا در نتیجه توسعه شانکر و مرگ شاخه‌ها و تنه اصلی باشد. این باکتری تا کنون از میزبان‌های مختلفی مانند سیب، گلابی، مرکبات، توتون، گندم، ذرت، نیشکر، لوبیا، سورگوم، چغندرقند، کیوی، کدوئیان، گل‌ها و شمار دیگری از گیاهان زراعی و علف هرز جدا شده است (Hwang *et al*., 2005 ; Samule, 2007). در ایران اولین گزارش از بیماری بلاست گلابی از باغ‌های گلابی اطراف مشهد می‌باشد (Zohour *et al*., 2002). سه پاتوار از *Pseudomonas syringae* می‌تواند در درختان میوه مختلف عامل ایجاد بیماری باشد. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall که ممکن است عامل بیماری در هر نوع درخت و میوه‌ای باشد که به صورت تجاری کشت می‌شود. *P. syringae* pv. *morosprunorum* (Wormald) Young *et al.* بیشتر به درختان گیلاس، آلبالو و آلو حمله نموده و رفتار این دو بیمارگر داخل بافت میزبان خیلی شبیه به هم است.

P. syringae pv. *persicae* موجب لکه برگی، شانکر و انگومک میوه هلو در فرانسه و زوال باکتریایی شلیل، هلو و آلوی ژاپنی در نیوزلند می‌شود (Bultreys & Kaluzna, 2010). این پاتوار از ایران گزارش نشده است (Ogawa *et al*., 1995). هدف از مطالعه اخیر، شناسایی عوامل مولد بلاست دانه داران در استان‌های خراسان رضوی و شمالی، با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری شناسی است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۷ از درختان سیب و گلابی در مناطق مورد بررسی از نمونه‌های مشکوک به بیماری بلاست نمونه برداری و برای جدا سازی و شناسایی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند.

جدا سازی از برگ، شاخه و گل

سر شاخه‌های دارای سوختگی با هیپو کلرهت سدیم ۵٪ ضد عفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو و قطعاتی از حد فاصل بافت سالم و بیمار و به روش متداول کشت گردید. اندام‌های گل به آرامی با آب مقطر معمولی شستشو و سپس قطعاتی از آن در آب مقطر استریل خرد و به صورت سوسپانسیون درآمده و روی محیط آگار مغذی کشت گردید. برگ‌های دارای علائم نکروز، ابتدا زیر جریان آب و سپس دوبار با آب مقطر استریل شسته شدند. قطعاتی از حد فاصل قسمت آلوده و سالم برگ با تیغ استریل برش و در داخل پتری استریل قرار گرفتند. قطعات فوق در داخل پتری خرد و بعد از مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از یک لوپ از سوسپانسیون فوق روی محیط آگار مغذی به صورت خطی کشت داده شد. پتری‌ها در دمای ۲۶ تا ۲۸ درجه سلسیوس به مدت دو تا سه روز نگهداری شدند. بعد از ظهور باکتری‌ها، تک کلنی‌هایی که از نظر رنگ و تحدب و سرعت رشد متفاوت بودند به محیط آگار مغذی جدید منتقل شدند (Fahy & Persley, 1983; Schaad *et al*., 2001).

آزمون‌های فیزیولوژیکی وبیوشیمیایی

جدایه‌های به دست آمده از لحاظ خصوصیات موفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون گرم با حلالیت در پتاس سه درصد به روش ساسلو (Suslow *et al*.,1982)، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش هیوولیف سن (Hugh & Leifson, 1953) و تولید رنگدانه فلورسنت در محیط کشت King's B به روش Schaad *et a*l. (2001) انجام شد. آزمون‌های گروه لوپات (LOPAT) و سایر آزمون‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری شناسی گیاهی انجام گرفت (Schaad *et a*l., 2001).

اثبات بیماری‌زایی روی سرشاخه و برگ هلو

سر شاخه‌های دارای برگ‌های سالم از نهال هلو انتخاب و سطح برگ‌ها با پنبه آغشته به الکل ۳ درصد ضدعفونی شد. سوسپانسیون باکتری به غلظت 10^{7} cfu به وسیله سرنگ‌های بدون نوک به سطح زیرین برگ در چند محل تزریق شد. آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. نهال داخل محفظه پلاستیکی (به منظور حفظ رطوبت) نگهداری و برای هر

جدایه ۳ تکرار اعمال شد. ظهور لکه‌های آبسوخته و نکروز بعد از ۴ تا ۶ روز نشانه مثبت بودن آزمون بیمارزایی می‌باشد (Roos & Hattingh, 1987; Thomidis *et al*., 2005).

اثبات بیماریزایی روی میوه

میوه‌های نارس و همچنین شاخه‌های بریده گلابی در شرایط آزمایشگاهی با سوسپانسیون تازه باکتری (رشد ۴۸ساعته) با غلظت تقریبی 10^8 سلول در میلی لیتر مایه زنی گردیده و در شرایط مرطوب نگهداری شدند (Bultreys and Kaluzna, 2010 ; Schaad *et al*.,2001). همچنین نهال‌های سیب و گلابی به عنوان میزبان حساس در شرایط گلخانه از طریق سر شاخه‌ها مایه زنی گردیدند (Lelliot & Stead,1978) آزمون فوق حساسیت (HR) روی برگ شمعدانی و توتون رقم بارلی در شرایط گلخانه انجام گرفت.

تولید توکسین

تولید توکسین با استفاده از قارچ *Geotichum candidum* ردیابی شد. باکتری به صورت لکه‌ای روی محیط Potato Dextrose Agar (PDA) کشت داده و بعد از مدت پنج روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس پتری ها با سوسپانسیون اسپور قاچ اسپری شدند. درصورت تولید سرینگومایسین، مناطق بازدانده رشد قارچ در اطراف باکتری بعد از مدت پنج روز مشاهده می‌شود(Fahy & Persley, 1983) .

نتایج و بحث

نمونه برداری و جدا سازی

در این تحقیق پس از مشاهده علائم بیماری ۳۰ جدایه از نمونه‌های مشکوک شاخه و برگ درختان سیب و گلابی مناطق مختلف خراسان شمالی و رضوی جداسازی گردید.

آزمون بیماری زایی

دو تا سه روز پس از تزریق به پشت برگ در نهال‌های هلو، روی برگ‌ها لکه‌های آبسوخته مشاهده گردید که این لکه‌ها به تدریج از قسمت مرکزی نکروز شدند. از کشت مجدد لکه‌ها باکتری اولیه جداسازی شد. علائم شانکر و سوختگی جوانه‌ها روی سرشاخه‌ها و نهال‌های بذری مایه زنی شده با دو جدایه در شرایط گلخانه ایجاد گردید و باکتری‌های مایه زنی شده دوباره از شاخه‌ها جدا گردید. جدایه ها قادر به ایجاد لکه‌های نکروز روی میوه نارس گلابی بودند. دو الی سه روز پس از تزریق سوسپانسیون باکتری در برگ‌های شمعدانی علائم آبسوختگی، کلروز، و نکروز ایجاد شد.

خصوصیات فنوتیپی جدایه ها

جدایه‌ها روی محیط آگار مغذی مدور، کرم روشن، لزج و برآمده (شکل۲) و روی محیط کشت Yeast Extract Dextrose (YDC) کرم رنگ و غیر لزج بود. حاشیه کلونی در بعضی از جدایه‌ها صاف و در مواردی موج‌دار بود. جدایه‌ها روی محیط KB به صورت کرم روشن با حاشیه صاف تا کمی مضرس بود که پس از ۴۸ ساعت رنگدانه فلورسنت تولید شد. واکنش گرم در کلیه جدایه‌ها منفی بود. تمام جدایه‌ها هوازی اجباری بودند. آزمون کاتالاز و تولید لوان در همه جدایه‌ها مثبت بود. واکنش اکسیداز، هیدرولیز آرژنین، اوره آز، احیای نیترات، تولید ایندول و لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی در همه جدایه ها منفی ارزیابی شد. آن‌ها قادر به هیدرولیز نشاسته و اسکولین، تولید اندول، استوئین و H_2S نبودند. واکنش هسته یخ و تولید توکسین برای اکثر جدایه ها مثبت بود ولی میزان هاله بازدارنده قارچ *Geotricum candidumn* در بین جدایه ها. متغیر بود. رشد روی محیط پنج درصد نمک در جدایه‌ها مثبت بود ولی هیچ یک از جدایه‌ها قادر به رشد در محیط هفت درصد نمک نبودند. فروکتوز، گلوکز، گالاکتوز، سوکروز، مانوز، مانیتول، گلیسیرین، سیترات، فومارات، ساکسی نایت و لاکتات از جمله منابع کربن قابل استفاده به وسیله جدایه‌ها بود. هیچ یک از جدایه ها توانائی استفاده از مالتوز، اینولین، نشاسته، دکسترین، اگزالات، فرمات و بنزوات را نداشتند. سایر نتایج در جدول یک ثبت شده است. براساس مشخصات ذکر شده جدایه‌ها به عنوان *Pseudomonas syringae* pv .*syringae* شناسایی شدند (جدول یک) (Bultreys & Kaluzna, 2010; Zohour *et al*., 2002).

علائم بیماری و خصوصیات باکتریولوژیکی و بیماریزائی استرین‌های جدا شده از نمونه‌ها آلوده تائیدی بر وجود بیماری بلاست سیب و گلابی ناشی از *Pesudomonas syringae pv. syringae* است.

نتایج این پژوهش نشان داد که عامل بیماری در استان‌های اجرای این تحقیق شامل خراسان شمالی و رضوی فعال بوده و در اکثر باغ‌های سیب و گلابی که نمونه‌برداری در آن‌ها انجام گرفت جدا سازی شد. بر اساس مطالعات سایر پژوهندگان بیماری بلاست گلابی در برخی نقاط دیگر دنیا از روی دانه‌داران و سایر میزبان‌ها گزارش گردیده است (Bultreys & Kaluzna, 2010 ; Lucienne Mansvelt & Hattingh, 1986). همچنین این بیماری در سال‌های اخیر در اطراف مشهد گزارش شده است (Zohour *et al*., 2002). مطالعات حاضر نیز با نتایج سایرین مطابقت داشته و اولین گزارش از ظهور بلاست درختان سیب ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در استان‌های مورد مطالعه است. در آینده می‌توان با جمع آوری جدایه‌های بیشتر تنوع ژنتیکی این جدایه ها در محصولات مختلف بررسی نمود.

جدول ۱- خصوصیات *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* جدا شده بر اساس آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماریزائی

Table 1. Characteristics of isolated *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on the basis of physiological, biochemical and pathogenicity tests

Test	***P.syringae* pv *syringae***
Gram reaction	-
Oxidase	-
Catalse	+
O/F	Oxdative
Soft rot	-
Nitrate reduction	-
Argirine dihydrolase	-
Gelatin hydrolysis	-
Starch hydrolysis	-
Tween-80 hydrolysis	-
Aesculin hydrolysis	-
H_2S Porduction	-
Levan Porduction	+
Fluorescent pigment	+
Indole Porduction	-
Litmus milk reaction	Alkalin
Tobacco hypersensitivity	+
Necrotic spot	+
Acid Porduction from	
Glucose	+
Fructose	+
Manitole	+
Glycerol	+
Lactose	+
Maltose	-
Galactose	-
Mannose	–
Sucrose	+
Inulin	–
Starch	–
Dextrin	–
Utilization of:	
Citrate	+
Fumarate	+
Sucinate	+
Lactate	+
Oxalate	–
Fumarate	–
Benzoate	–

منابع

Annonymous, 2007. *Random Sampling of Fruits Crops*. Bureau for Statistics and Information Technology, Plannining and Economical Division, Ministry of Jihad-e- Agriculture. Iran. (In Persian).

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

Fahy, P. C., & Persley, C. J. 1983. *Plant Bacterial Disease, A Diagnostic Guide*. Academic Press, Sidney, Australia.

Hirano, S. S & Upper, C. D. 1990. Population biology and epidemiology of *pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathol*, 28:155-177.

Hwang, M. S., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., & Guttman, D. S. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *pseudomonas syringae*. *Applied & Environmental Microbiology*, 71:5182-5191.

Hugh, R. & Leifson, E. 1953. The Taxnomic significance of fermentative versus Oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66: 24-26.

Lelliot, R. A. & Stead, D. D. E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacteriol Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications, UK.

Little, E. L. Bostock, R. M. & Kirkpatrik, B. C.1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Applied & Environmental Microbiology*, 64: 3818-3823.

Lucienne Mansvelt, E. & Hattingh, M. J. 1986. Pear blossom blast in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology*, 35:337- 343.

Ogawa, J. M., Zehr, E. J., Bird, G. W., Ritchie, D. F. & Uyemoto, J. K. 1995. *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, USA.

Roos, I. M. & Httingh, M. J. 1987. Systemic invasion of plum leaves and shoots by *Pseudomonas syringae pv. syringae* introduced into petioles. *Phytopathology*, 77: 1253-1257.

Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for ldentification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathological Society press, USA.

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

Samuel , S. G. 2007. *Plant-Associated Bacteria*. Springer publishing, The Netherlands.

Thomidis, T., Tsipouridis, C., Exadaktylou, E., & Drogoudi, P. 2005. Comparison of three laboratory methods to evaluate the pathogenicity and virulence of ten *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains on apple, pear, cherry and peach trees. *Phytopathology,* 33:137-140.

Zohour, E., Rahimian, H., Arab. F,. & Nikravesh, Z. 2002. Pear blast disease in Khorasan. *Proceeding of the 15th Iranian Plant protection Congrees.Vol. 2, 7-11 Sept. Razi University of Kermanshah*, *Iran*, p. 247.