مجلهٔ پژوهشی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ٦ شمارهٔ ١، صفحهٔ ٧٨-٧٤، (١٣٨٧)

مقاله کوتاه

شناسایی عامل شانکر باکتریایی درختان فندق در استان گیلان

بیتا علی[1*]، مصطفی نیک نژاد کاظم پور[1] و سید علی الهی نیا[1]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت.
پست الکترونیک: bita.ali77@gmail.com
۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت.
۳- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت.

تاکنون دو گونه از باکتریهای جنس *Pseudomonas*، شامل *P. avellanae* و *P. syringae* pv. *syringae* به عنوان مولد بیماری شانکر باکتریایی و عامل زوال و خشکیدگی درختان فندق (*Corylus avellana*) شناسایی شده‌اند. علائم عمده بیماری ایجاد شده توسط *P. avellanae* شامل پژمردگی سریع جوانه‌ها، سرشاخه‌ها و شاخه‌های درختان طی بهار و تابستان می‌باشد. برگها پژمرده و خشکیده شده و تا مدتها پس از خشکیده شدن متصل به ساقه باقی می‌مانند (Scortichini & Mehlenbacher, 2001). پوست و کامبیوم درختان بیمار تغییر رنگ داده، ریشه‌های اولیه نکروز شده و در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شود (Scortichini & Tropiano, 1994). گیاهانی که مورد حمله *P. avellanae* قرار گرفته‌اند در فاصله چند هفته کاملا پژمرده، به سرعت خشکیده شده و می‌میرند. به همین دلیل بیماری ناشی از این باکتری را مرگ[1] درختان فندق نامیده اند (Scortichini, 1999). علائم ایجاد شده بوسیله *P. syringae* pv. *syringae* خفیف‌تر بوده و حالت پژمردگی سریع و مرگ درختان فندق در اثر این باکتری مشاهده نشده است (Scortichini, 2002). در ایران مطالعات مختصری در زمینه شناسایی و بررسی باکتریهای بیماری‌زای فندق انجام شده است و تنها گزارش مرتبط با باکتریهای *Psudomonas* بیماریزای فندق، جداسازی باکتری *P.syringae* از درختان فندق منطقه دوهزار تنکابن است که حسن زاده و مهدویان از درختان فندق این منطقه که علائم زردی، پژمردگی و تغییر رنگ آوندی را از خود نشان می‌دادند، باکتری *P.syringae* را جداسازی و شناسایی نمودند (حسن زاده و مهدویان،۱۳۷۷). با توجه به خسارت‌زا بودن باکتریهای *Pseudomonas* روی درختان فندق و عدم انجام مطالعه روی این باکتریهای بیماری‌زا در گیلان، طی سال ۱۳۸۳ درختان فندق مناطق مختلف استان گیلان بازدید شده و از درختان دارای علائم مشکوک نمونه‌برداری گردید. پس از کشت عصاره بافت‌های آلوده روی محیط‌کشت‌های NA و King's B کلنی‌هایی کرم‌رنگ و دارای حالت فلورسانت جداسازی شدند. جدایه‌ها گرم منفی، لوان مثبت، اکسیداز و پکتیناز منفی، کاتالاز مثبت و هوازی اجباری بوده، روی برگ توتون واکنش فوق حساسیت ایجاد کرده و قادر به هیدرولیز ژلاتین نبودند. بر اساس این خصوصیات، جدایه‌ها به عنوان جنس *Pseudomonas* شناسایی شدند. برای انجام آزمون تولید سیرینگومایسین از قارچ *Geotrichum candidum* استفاده شد (Young *et al.*, 1992). جدایه‌ها دارای قابلیت ایجاد هسته یخ و تولید سیرینگومایسین بودند ولی قادر به تولید ایندول، احیاء نیترات، تولید H_2S، تحمل نمک طعام ۷٪ و هیدرولیز نشاسته نبوده و توین ۸۰ و کازئین را هیدرولیز نمودند. همچنین جدایه‌ها قادر به استفاده از تارتارات، ال- سیستئین، لیزین، لاکتوز، رامنوز، مالتوز، ال-آرابینوز، ریبوز، گلیسین، تریپتوفان و دکسترین نبودند، ولی از دی- سوربیتول،

1- Moria

رافینوز، تره‌هالوز و سوکروز استفاده کردند. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها روی برگ‌ها، میوه‌ها (Yessad *et al*., 1992) و جوانه‌های سرشاخه فندق (Jones, 1971) نیز مثبت ارزیابی گردید. بر اساس مجموع خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (جدول ١) جدایه‌ها به عنوان *P. syringae* pv. *syringae* شناسایی شدند (Schaad, 2001). الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) با استفاده از روش Laemmli با اندکی تغییرات انجام گرفت (Laemmli, 1970). کلیه جدایه‌ها در الکتروفورز پروتئینی تام سلولی به روش یک‌بعدی در ژل پلی‌اکریل‌آمید ١٢٪ نوارهایی تولید نمودند و پروفیل پروتئینی جدایه‌ها با جدایه مرجع این پاتوار دریافت شده از کلکسیون باکتریهای بیماری‌زای فرانسه (CFBP)[1] نیز درصد بالایی از تشابه را میان آنها نشان داد. در این بررسی برای اولین بار بیماری‌زایی این پاتوار روی درختان فندق در استان گیلان گزارش شد. باکتری *P. avellanae* از هیچ یک از نمونه‌های مشکوک مشاهده شده، جداسازی نشد و وجود آن روی درختان فندق استان به اثبات نرسید.

واژه های کلیدی: فندق، باکتری بیماری‌زا، *Pseudomonas*، شانکر باکتریایی، گیلان.

جدول ١- خصوصیات فنوتیپی *Pseudomonas syrigae* pv. *syringae*

خصوصیت	واکنش جدایه های بدست آمده از درختان فندق گیلان	واکنش جدایه مرجع
واکنش گرم	−	−
رشد هوازی/ بی هوازی	هوازی	هوازی
تولید لوان	+	+
اکسیداز	−	−
لهانیدن ورقه های سیب زمینی	−	−
آرژنین دهیدرولاز	−	−
فوق حساسیت در توتون	+	+
فوق حساسیت در فلفل	+(ضعیف)	+(ضعیف)
تولید رنگدانه فلورسنت	+	+
تولید هسته یخ	+	+
تولید سیرینگومایسین	+	+
کاتالاز	+	+
هیدرولیز نشاسته	−	−
هیدرولیز ژلاتین	±	±
هیدرولیز اسکولین	±	±
هیدرولیز توین ٨٠	+	+
تولید H_2S از پپتون	−	−

1. Collection Française de la Bacteries Pathogèn

ادامه جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی *Pseudomonas syrigae* pv. *syringae*

خصوصیت	واکنش جدایه های بدست آمده از درختان فندق گیلان	واکنش جدایه مرجع
تولید H_2S از سیستئین	−	−
هیدرولیز کازئین	+	+
اوره آز	±	±
تولید ایندول	−	−
احیاء نیترات	−	−
تحمل نمک طعام ۵٪	+	+
تحمل نمک طعام ۷٪	−	−
رشد در ٤ درجه سانتی‌گراد	−	−
رشد در ٤١ درجه سانتی‌گراد	−	−
DNase	±	±
استفاده از:		
سدیم تارتارات	−	−
ال- سیستئین	−	−
سیترات	±	±
ال- لیزین	−	−
تولید اسید از:		
ال-آرابینوز	−	−
لاکتوز	−	−
دی- سوربیتول	+	+
ال- رامنوز	−	−
رافینوز	+	+
تره هالوز	+	+
گالاکتوز	±	±
میو اینوسیتول	±	±
مالتوز	−	−
ریبوز	−	−
گلیسین	−	−
تریپتوفان	−	−
سوکروز	+	+
دکسترین	−	−

منابع مورد استفاده

- حسن زاده، ن. و مهدویان، س. ا. ١٣٧٧. جداسازی باکتری *Pseudomonas syringae* از فندق. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ٢٤٢.
- Janse, J.D., Rossi, P., Angelucci, L., Scortichini, M., Derks, J.H.J., Akkermans, A.D.L., de Vrijer, R. and Psallidas, P.G. 1996. Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 4: 589-595.
- 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.
- Psallidas, P.G. and Panagopoulos, C.G. 1979. A bacterial canker of hazelnut in Greece. *Phytopathol. Z.* 94: 103-111.
- 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 pp.
- Scortichini, M. 1999. Hazelnut tree decline. *Rivista di Fruticoltura e di Ortofloricoltua*, 61,11: 40-42.
- Scortichini, M. 2002. Bacterial canker and decline of European Hazelnut. *Plant disease*, 86, 7: 704-709.
- Scortichini, M. and Mehlenbacher, S.A. 2001. The problem caused by *Pseudomonas avellanae* on hazelnut in Italy. Proceedings of the Fifth International Congress on Hazelnut: *Acta Horticulturae*, 556: 503-508.
- Scortichini, M. and Tropiano, F.G. 1994. Severe outbreak of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* on hazelnut in Italy. *Journal of Phytopathology*, 140,1: 65-70.
- Yessad, S., Manceau, C. and Luisetti, J. 1992. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* on Pear. *Plant disease*, 76,4: 370-373.
- Young, J.M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902. *Ann. Appl. Biol*., 118: 283-298.

Short Report

Identification of the causal agent of bacterial canker on hazelnut trees in Guilan province

Bita Ali*[1], Mostafa Niknejad Kazempour[1] & Seyed Ali Elahinia[1]

1*- Corresponding author, Former MS Student of Plant Protection Division, Agricultural Sciences Faculty of Guilan University, Rasht. E-mail: bita.ali77@gmail.com

2. Associate professor of Plant Protection Division, Agricultural Sciences Faculty of Guilan University, Rasht.

3. Professor of Plant Protection Division, Agricultural Sciences Faculty of Guilan University, Rasht.

Abstract

Two species of *Pseudomonas* bacteria including *P. avellanae* and *P. syringae* pv. *syringae* have been identified till now as pathogenic agents on hazelnut trees. During the year 2004, hazelnut trees of Guilan province were visited and samples were taken from trees showing suspicious symptoms. After culturing extracts of the infected tissues on NA and King's B media, dark white, fluorescent colonies were isolated. The isolates were gram negative, oxidase and pectinase negative, Levan and catalase positive and obligate oxidative. They caused hypersensitive reaction on tobacco leaves and could not hydrolyze gelatin. Based on these characteristics, isolates were identified as the genus Pseudomonas. The isolates had the ability to produce ice nucleation and syringomycin toxon, but they could not produce indole, reduce nitrate, produce H_2S, tolerate NaCl 7% and hydrolyze starch, but they hydrolyzed Tween 80 and casein. The isolates also could use tartarate, L-cystein, lysin, lactose, rhamnose, maltose, L-arabinose, ribose, glycin, triptophan and dextrin, but they used D-sorbitol, rafinose, trehalose and sucrose. Pathogenicity test of isolates on leaves, fruit and buds of hazelnut branches was also positive. Based on all physiological and biochemical characteristics, the isolates were identified as *P. syringae* pv. *syringae*. Comparison of protein profile of isolates with reference strain of this pathovar also showed a high similarity percentage. Pathogenicity of this pathovar on hazelnut trees in Guilan province was proved for the first time as a result of the current research. *P. avellanae* was not observed and isolated from any of the suspected samples and existence of it was not proved in this province.

Key words: Hazelnut, pathogenic bacteria, *Pseudomonas*, bacterial canker, Guilan