

مطالعه چند بیماری باکتریایی در ایران

The study of a few bacterial diseases in Iran

نادر حسن‌زاده

موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

چکیده:

در بررسیهای معمول نمونه های گیاهی در آزمایشگاه باکتری شناسی، از دو نمونه برگ گردو مبتلا به شانکر تنه، باکتری *Erwinia nigrifluens*، از نمونه های برگ چمن مبتلا به لکه برگ، باکتری *Xanthomonas campestris*، از غده های پوسیده سیب زمینی و ریشه هویج، باکتری *E. carotovora subsp. atroseptica* و از نمونه ساقه ماش مبتلا به لکه ساقه ای توام با صمغ، باکتری *Pseudomonas sp.* جدا گردید. وجود بیماریهای باکتریایی چمن و هویج برای اولین بار از ایران گزارش می گردد و معرفی باکتری *Pseudomonas sp.* از نمونه ماش از بعد بیماری شناسی باکتریایی حائز اهمیت میباشد.

مقدمه:

در حالیکه روزبه روز بر دامنه شناسائی عوامل بیماری زای گیاهی از جمله باکتریها افزوده میشود آلودگی های باکتریایی همچنان تحت شرایط خاص، اثرات مخرب خود را روی تولید کیفی و کمی محصولات کشاورزی باقی میگذارند. از بیماریهای باکتریایی شناخته شده در ایران که در سالهای اخیر در نقاط جدید ایجاد آلودگی نموده است میتوان از بروز شانکر تنه درختان گردو (رحیمیان، ۱۳۶۸) در لواسان و از بیماری ساق سیاه زمینی (بهار و دانش، ۱۳۶۴) روی سیب زمینی در استان زنجان و ریشه های هویج بعنوان میزبان جدید باکتری پاتوژن نام برد. علاوه بر آن پیدایش دوبیماری جدید باکتریایی یعنی لکه برگ چمن با عامل *X. campestris* و بیماری لکه صمغی ماش با عوامل *Pseudomonas sp.* از دو بعد بیماری و عامل بیماری حائز اهمیت میباشند.

در این مقاله ضمن معرفی بیماریهای باکتریایی فوق و مشخصات بیماریزائی آنها در مواردی خاص به صفات متمایز استرین های مورد بررسی نیز اشاره میگردد.

روش بررسی:

۱- جداسازی باکتری از نمونه‌های آلوده گیاهی

چند قطعه کوچک از هر یک از اندامهای آلوده گیاهی پس از شستشوی سطحی و ضدعفونی، به داخل لوله حاوی آب مقطر استریل ریخته شد و یک لوپ از هر سوسپانسیون روی محیط کشتهای (NA) Nutrient agar و King's B medium (KB) کشت گردید. با ظهور تک کلنی‌های باکتریایی، کلنی غالب هر یک از کشت‌ها به منظور شناسائی، خالص سازی شده و همزمان یک کشت به عنوان کلکسیون در یخچال نگهداری شد.

رنگ آمیزی کپسول و تاژک (Schaad, 1980) و تحرک سلولی مورد بررسیهای لازم قرار

گرفت.

۲- آزمایشات فیزیولوژیک و بیوشیمیائی

آزمونهای استاندارد باکتری شناسی برای تعیین مشخصات مورفولوژیک و بیوشیمیائی استرینها مورد استفاده قرار گرفت. آنگاه نتایج آزمونها به کمک کلیدهای معتبر باکتری شناسائی (Krieg & Kolt, 1984; Fahy and Persley, 1983) و تطبیق صفات و نوع میزبان با صفات و انواع میزبانهای معرفی شده برای هر یک از باکتریها در کتاب راهنمای باکتریهای بیماریزای گیاهی (Bradbury, 1986) به منظور تعیین جنس و گونه باکتریهای جداسازی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. و به استثناء یک مورد، در سایر موارد باکتریهای مورد بررسی در حد جنس و گونه و احیاناً زیرگونه مورد شناسائی قرار گرفتند.

۳- آزمون بیماری زائی

علاوه بر آزمون فوق حساسیت (HS) روی برگهای توتون که با تزریق سوسپانسیون باکتریها با غلظت تقریبی ۱۰ سلول در هر میلی لیتر به پارانثیم زیرین برگها انجام گرفت، در جهت اثبات بیماری زائی پاتوژنها روی میزبانهای اصلی، هر یک از باکتریها به تناسب نوع بیماری زائی در دو تکرار و با استفاده از آب بعنوان شاهد تیمارها و در شرایط گلخانه‌ای مورد آزمایش قرار گرفتند.

- با قرار دادن شاخه بریده گردو در سوسپانسیون مکدر باکتری پاتوژن گردو (استرین NJ)

- با پاشیدن سوسپانسیون مکدر باکتری پاتوژن چمن (استرین NM) به قطعه آماده چمن.

- با قرار دادن اینوکولوم باکتری روی برشهای سیب‌زمینی در پتری و نیز با مایه زنی گیاه سیب‌زمینی و ریشه هویج با سوسپانسیون هر دو استرین.

- با تزریق سوسپانسیون باکتری به پارانثیم زیرین برگ و محل اتصال دم‌برگ به ساقه گیاهچه‌های ۱۸ روزه گیاه ماش.

نتیجه و بحث:

لیست باکتریهای شناسائی شده و مشخصات مربوط به محل و مآخذ استرین‌ها در جدول شماره ۱ و مشخصات بیوشیمیائی استرینها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. نام علمی

جدول ۱- منشاء و ماخذ باکتریهای شناسائی شده

Table 1. Bacterial strains, their origin and sources

Entry No.	نام باکتری Bacterial species	میزبان/علائم Host origin/symptom	محل بروز بیماری Location
1	<i>Erwinia nigrifluens</i> (NJ)	Walnut canker (<i>Juglans nigra</i> L.)	لواسان (Lavasan)
2	<i>Xanthomonas campestris</i> (NM)	Lawn leaf spot (<i>Lolium perenne</i> L.)	تهران (Tehran)
3	<i>E. carotovora</i> subsp. atroseptica (Nc1&NC2)	Potato tuber and carrot root rot (<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Daucus carota</i>)	زنجان (Zanjan) Tehran vegetable market
4	<i>Pseudomonas</i> sp. (NX)	Vetch stem blight (<i>Vicia sativa</i> L.)	کرج (Karaj)

جدول ۲- مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتریهای بررسی شده

Table 2. Morphological & biochemical tests of characterized strains

Characteristics	1	2	3	4
Gram reaction	-	-	-	-
Fluorescent pigment	-	-	-	-
Flagella	peritrichous	single/polar	peritrichous	single/polar
O/F test	F	O	F	O
Potato soft rot	-	-	+	-
Tobacco hypersensitivity	-	+	+	-
Oxidase	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	-	-	-
Hydrolysis of:				
Gelatin	-	+	d	-
Starch	-	+	-	-
Tween 80	+	-	+	+
Aesculin	+	+	+	NT
Nitrate reduction	-	-	+	-
Urease	+	+	-	+

Table 2. (Continued)

Characteristics	1	2	3	4
Indole production	-	-	-	-
H ₂ S from cystein	+	+	+	+
Phosphatase	+	-	-	-
Acetoin from glucose	NT	NT	+	-
Levan	-	-	-	+
Reducing substances from sucrose	+	+	+	+
Methyl red	+	-	-	-
Litmus milk	+	+	+	NT
Growth in:				
3-4% NaCl	+	+	+	+
5% NaCl	+	-	+	+
Sensitivity to erythromycin	+	+	-	+
Tolerance to TTC	+	-	+	+
Utilization of:				
2-ketogluconate	+	-	-	+
trehalose	+	-	+	+
citrate	+	+	+	-
salicin	+	+	-	-
xylose	+	+	+	+
melzitose	-	-	-	-
mannose	+	+	+	+
sorbose	+	-	-	+
lactose	+	+	+	+
mannitol	+	NT	-	+
sorbitol	+	+	-	+
cellobiose	+	+	+	+
formate	+	+	NT	+
dulcitol	+	-	-	-

Table 2. (Continued)

Characteristics	1	2	3	4
maltose	-	+	-	-
palatinose	NT	NT	+	NT
α -methyl glucoside	-	-	-	-
tryosin	NT	-	NT	-
ribose	+	-	+	-
malonate	-	+	-	+
arabinose	+	+	+	NT
phenylalanine deaminase	-	NT	-	NT

F= facultative anaerobic growth

O= aerobic growth

+ = positive reaction

- = negative

NT= Not tested

d= positive for strain NC2

و صفات متمایز و افتراقی هر یک از باکتریهای شناسائی شده به شرح زیر میباشد:

۱- باکتری *E. nigrifluens* (strain NJ)

باکتری مزبور از شاخه های درخت گردو باغ میوه منطقه لواسان که در سطح شاخه ها لکه های قهوه ای به فراوانی قابل رویت بود و بافت برگ در قسمتهائی کاملاً رنگ سبز تیره داشت، جداگردید (شکل ۱).

کلتی های این باکتری سفید، صاف، لعابی و بدون پیگمان بودند. سلولها دارای کپسول، متحرک و آرایش تازکی از نوع Peritrichous بود. آزمون فوق حساسیت روی برگ توتون منفی و برگ شاخه های بریده گردو در سوسپانسیون مکدر باکتری پس از ۲ ساعت از رنگ سبز طبیعی به سبز تیره تغییر رنگ داد. از صفات افتراقی این استرین با استرین های مشابه در منابع، واکنش مثبت به اکسیداسیون گلکونوات و تست مواد احیاکننده از ساکاروز بود. هیدرولیز ضعیف توئین ۸۰ و عدم تولید VP از دیگر موارد قابل ذکر است.

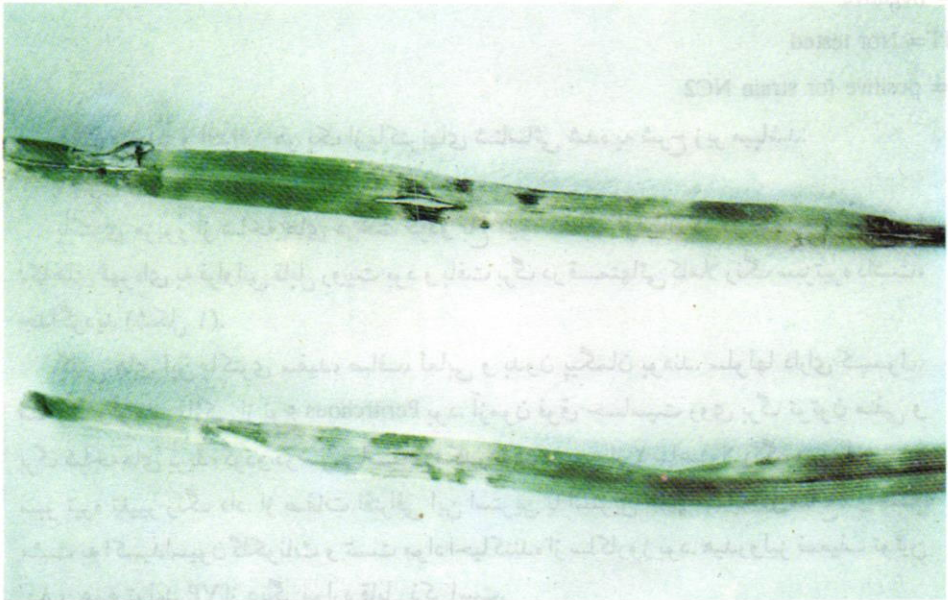
۲- باکتری *X. campestris* (strain NM)

این باکتری از نمونه های چمن که شدیداً به بیماری لکه برگ با حاشیه زرد آب سوخته مبتلا بود جداگردید (شکل ۲). باکتری مزبور در محیط کشت (TTC) Tetrazolium chloride agar با غلظت ۰/۱٪ فاقد رشد و در آزمون اثبات بیماری زائی روی برگ توتون دارای واکنش فوق



شکل ۱- علائم بیماری شانکر باکتریایی با عامل *E. nigrifluens* روی گردو

Fig. 1. Symptoms of walnut bacterial canker disease caused by *E. nigrifluens*



شکل ۲- علائم بیماری لکه برگی چمن با عامل *X. campestris*

Fig. 2. Necrotic leaf spot symptom in inoculated leaces of *Lolium perenne* L. with *X. campestris*

حساسیت مثبت (SH) بود.

در آلودگی مصنوعی قطعه چمن پرورش یافته در گلخانه، علائم بیماری پس از ۴۸ ساعت بصورت لکه

برگی و پلاسیدگی شدید برگها در قطعه چمن تیمار شده نمایان گردید. از صفات متمایز عامل بیماری تولید اوره‌آز و عدم استفاده از قند تری هالوز بود.

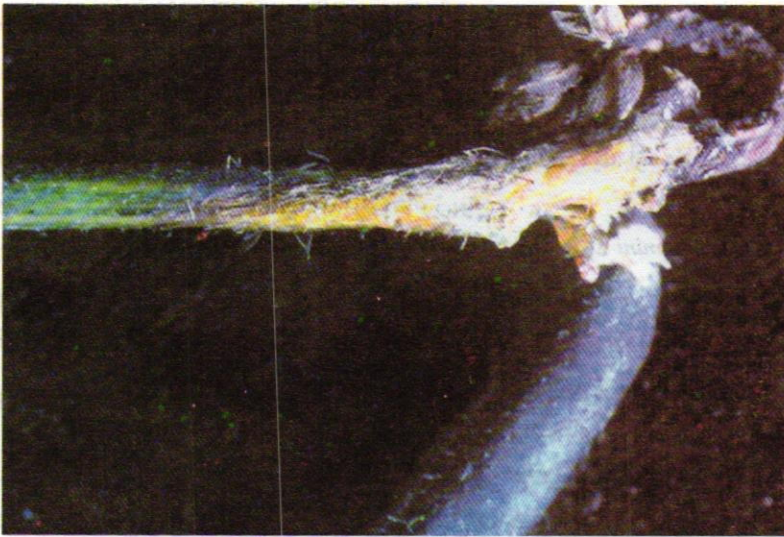
بروز این بیماری قبلا در ایران سابقه نداشته و احتمال آن می‌رود *Pv. gramini* پاتوار این باکتری و بذره‌های چمن وارداتی، منبع اصلی آلودگی باشند.

۳- باکتری *E. carotovora* subsp. *atroseptica*

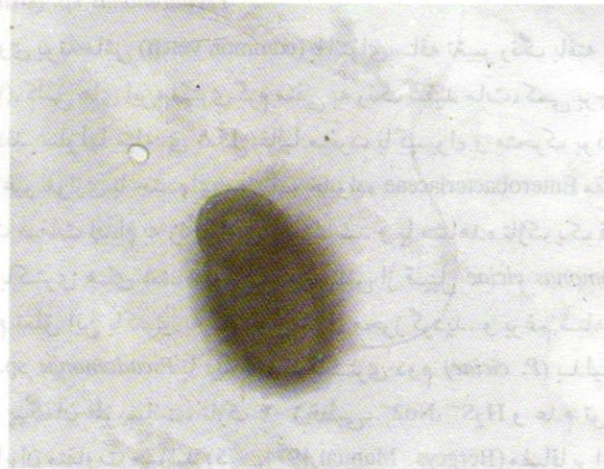
دو استرین NC1 و NC2 به ترتیب از غده‌های لهیده سیب‌زمینی برخی از مزارع سیب‌زمینی کاری استان زنجان که در سال ۷۲ شیوع یافته بود و نیز از ریشه‌های هویج لهیده که سطح آنها پوشیده از تراوشات باکتریائی بود جدا گردید. دو استرین علاوه بر داشتن اشتراک و انطباق صفات با صفات استرین‌های معتبر در منابع، بدلیل ماهیت متغیر و ناپایدار باکتریهای *Erwinia carotovora* (حسن‌زاده، ۱۹۹۰) دارای مشخصات بیوشیمیائی بارزی چون تحمل ۵٪ نمک طعام، عدم هیدرولیز ژلاتین (در مورد NC1) و عدم استفاده از قند α -methyl-D-glucoside بودند. هر دو استرین دارای HS⁺ و با مایه زنی استرین NC1 در قسمت پائین بوته سیب‌زمینی علائم تیپیک بیماری ساق سیاه (black leg) ظاهر گردید.

۴- باکتری *Pseudomonas* sp. (strain NX)

این باکتری از روی بوته ماش (common vetch) با انتهای ساقه تغییر رنگ یافته توام با صمغ جدا گردید (شکل ۳). کلنی‌های این باکتری گرم منفی به رنگ سفید مات، کمی برجسته، صاف و بدون پیگمان بودند. سلولها میله ای شکل غالباً منفرده، با کپسول و متحرک بودند. ابتدا این باکتری بدلیل رشد غیر هوازی با جنسهای مختلف خانواده Enterobacteriaceae مقایسه گردید. ولی به دلیل مغایرت صفات اقدام به رنگ آمیزی تاژک شد و با مشاهده تاژک یک قطبی (شکل ۴) و مقایسه آن با باکتری‌های شناخته شده در ماش از قبیل *Pseudomonas viciae* و *P. andropogonis* عدم تعلق این باکتری به گونه‌های فوق محرز گردید. و برغم شباهت در رشد غیرهوازی باکتری *Pseudomonas* sp. با *P. viciae* باکتری دوم (*P. ciciae*) بدلیل دارا بودن صفاتی چون تولید پیگمان فلورسانت، تاژک ۴-۲ قطبی، No_2^- ، H_2S^- و عدم تولید اسید از ساکاروز با استرین ایران متفاوت میباشد (Bergeys Manual 1974, 75) مضافاً بر اینکه باکتری *P. viciae* Uyeda, 1915 که از روی ماش از پاکستان گزارش گردیده است (Akhtar, 1985). بدلیل فقدان Type strain آن در کلکسیون‌های معروف باکتری شناسی دنیا، از لیستهای معتبر باکتری شناسی چون Approved Lists و ISSP حذف گردیده است (Bradbury, 1986). از آنجائیکه باکتری دارای HS⁻ روی برگ توتون و HS⁺ روی برگ ماش بود و آلودگی گیاهچه‌های ماش با باکتری *Pseudomonas* sp. موجب خشکیدگی ساقه‌های جوان گیاه ماش گردید، پاتوژن



شکل ۳- علائم مزرعه‌ای بیماری لکه ساقه‌ای گیاه ماش با عامل *Pseudomonas* sp.
Fig. 3. Typical field-collected common vetch plant infected by *Pseudomonas* sp.



شکل ۴- عکس میکروسکوپ الکترونی تازک یک قطبی باکتری *Pseudomonas* sp.
Fig. 4. Electron micrograph of single, polar flagellum of *Pseudomonas* sp. isolated from common vetch

بودن باکتری مذکور روی گیاه ماش محرز و موقتا به شناسائی آن در حد جنس اکتفا گردید.
در خاتمه بار دیگر یادآوری این نکته مهم ضروریست که هنگامی شناسائی عوامل بیماریزا مفید خواهد بود که در جهت تحدید و کنترل بیماریها از جمله باکتریهای مخرب گیاهی گامهای موثرتری از سوی مراجع ذیربط برداشته شود.

سپاسگزاری

از آقای دکتر شهرآئین جهت تهیه عکس از رنگ آمیزی تاژک، و از آقای عامری در تهیه سایر عکسهای این مقاله و از خانم مهدوی جهت تایپ اولیه متن مقاله کمال تشکر را دارد.

نشانی نگارنده: دکتر نادر حسنزاده، بخش تحقیقات بیماریهای گیاهی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی. صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵، تهران.