

آفات و بیماریهای گیاهی  
جلد ۶۰، شماره های ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۱

## معرفی چند باکتری بیماریزای گیاهی در ایران

Taxonomic study on some bacterial plant pathogens in Iran

نادر حسن زاده

موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

### چکیده

در طی بررسیهای بعمل آمده روی تعدادی از نمونه های آلوده گیاهی مشکوک به بیماریهای باکتریائی که از چند استان کشور نمونه برداری و ارسال گردیده بود تعداد ۷ استرین باکتری جداسازی و شناسائی گردید. روشهای شناسائی مبتنی بر نتایج حاصله از انجام آزمایشات مربوط به صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیائی و بیماریزائی هر یک از ایزوله ها بود و طی آن *Erwinia rhapontici* از ریشه پوسیده چغندر، *E. herbicola* از نمونه های درختچه های صنوبر مبتلا به لکه برگ، *Pseudomonas cichorii* از بوته های عشقه آلوده به بیماری لکه برگ، و دو استرین از گونه *Xanthomonas campestris* از نمونه های توسکای بیلاقی با علائم شدید لکه زاویه ای و سرانجام *Clavibacter michiganense* از بوته های گوجه فرنگی با علائم شانکر و پژمردگی جدا گردیدند. از بین استرین های فوق الذکر تنها باکتری *C. michiganense* از نوع گرم مثبت و فاقد تحرک بود.

### مقدمه

نظر به اهمیت بیماریهای باکتریائی گیاهان و خسارت ناشی از آنها خصوصاً روی برخی از محصولات استراتژیک کشاورزی و نیز با توجه به تثبیت موقعیت عوامل باکتریائی بعنوان یکی از اصلی ترین عوامل بیماریزا پس از قارچها و ویروسها در پاتولوژی گیاهی و بالاخره با عنایت به مشکلات ناشی از پراکندگی گزارشات رو به تزاید بروز بیماریهای باکتریائی بر روی گیاهان مختلف از اقصی نقاط کشور، در این بررسی سعی گردیده است چند ایزوله باکتریائی که ندرتاً نسبت به میزبان و غالباً برای کشور جدید میباشد معرفی گردد.

در این خصوص *E. rhapontici* عامل پوسیدگی چغندر قند *E. herbicola* عامل لکه برگ

صنوبر از جمله پاتوژنهای جدید محسوب میگردد که برای اولین بار از روی میزبانهای فوق الذکر گزارش میگردد (Brabdury, 1986; Lelliot & Stead, 1987). بروز بیماری لکه برگگی گیاه زینتی عشقه (*Ps. cichorii*) و بیماری شانکر و پژمردگی گوجه فرنگی (*C. michiganense*) نیز برای اولین بار از ایران گزارش میگردد.

شایان ذکر است باکتریهای *Ps. cichorii* و *X. campestris* عوامل لکه برگگی توسکای بیلاقی و شمعدانی به ترتیب از شرق مازندران و گرمسار قبلاً گزارش گردیده است (رحیمیان ۱۹۸۹ و ۱۹۹۱).

## روش بررسی

۱- جداسازی باکتری از بافت های آلوده گیاهی  
به تناسب نوع بیماری از اندامهای مختلف گیاهی با علائم آب سوختگی یا نکروز نمونه برداریهای مقطعی انجام گرفت و با افزودن قطعات کوچکی از نمونه ها در لوله های حاوی آب مقطر استریل، سوسپانسیون های مجزای باکتریائی تهیه و یک لوپ از هر یک از سوسپانسیونها بر روی محیط کشت آگار غذایی (NA) کشت گردید. پس از چند روز انکوباسیون از تک کلنی های بدست آمده از هر باکتری، برای عمل خالص سازی، تجدید کشت (Subculture) و تهیه کلکسیون استفاده گردید.

۲- مشخصات ظاهری باکتری  
ایزوله های باکتری از نظر مشخصات مرفولوژیکی نظیر رنگ و بافت کلنی، تولید یا عدم تولید پیگمانهای ساطع (diffusible pigments)، رنگ آمیزی های گرم و کپسول و نیز حرکت باکتریها با استفاده از روشهای معمول باکتری شناسی مورد بررسی قرار گرفت. در تعیین نوع پیگمان در محیط، از محیط کشت KB (King et al., 1954) برای مشاهده پیگمان فلورسانت و از محیط کشت های PDA (سیب زمینی دکستروز آگار) و SNA (آگار غذایی +۵٪ ساکروز) برای مشاهده پیگمان صورتی رنگ استرن *E. rhapontici* استفاده گردید.

۳- آزمایشات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی  
برای تعیین صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی ایزوله ها از متدهای استاندارد استفاده گردید (Blazevic & Ederer, 1975; Fahy & Persley, 1983). سپس نتایج حاصله از این آزمونها با کمک کلیدهای باکتری شناسائی مورد ارزیابی قرار گرفت و باکتریهای بیماریزا در سطح جنس یا گونه مورد شناسائی قرار گرفتند (Krieg & Holt, 1974; Buchanan & Gibbons, 1974; Schaad, 1980; 1984).

۴- آزمایش بیماریزائی

آزمون فوق حساسیت (HR) بر روی توتون (*Nicotiana tabacum* L., Burley) با تزریق سوسپانسیون غلیظ باکتریها ( $10^8$  سلول در هر میلی لیتر) به سطح زیرین برگهای توتون انجام گرفت (Klement & Goodman, 1967). علاوه بر آن، آزمون ایجاد لهیدگی با تلقیح استرین‌های عامل پوسیدگی (استرین‌های NC, NCH, NDT) به اندامهای سالم میزبانهای مربوطه و آزمون بیماریزایی به صورت پاشیدن سوسپانسیون استرین NP عامل بیماری لکه برگی به سطح برگهای عشقه و تلقیح استرین NT عامل بیماری شانکر و پژمردگی به سطح میوه‌های گوجه‌فرنگی و تزریق سوسپانسیون این باکتری به گیاهچه‌های سه هفته‌ای گوجه‌فرنگی انجام گرفت.

#### نتیجه و بحث

لیست باکتریهای شناسائی شده و مشخصات مربوط به نوع میزبان، محل بروز بیماری و نام جمع آوری کننده نمونه در جدول ۱ و مشخصات منتخب مورفولوژیکی و بیوشیمیائی ایزوله‌های باکتری در جدول ۲ نشان داده شده است. در این قسمت از بررسی سعی گردیده است که مشخصات عمومی هر یک از ایزوله‌ها به ترتیب شماره ردیف آنها تشریح و تدوین گردد.

- استرین *E. rhapontici* NCH

باکتری بصورت کشت مخلوط از نمونه‌های پوسیده غده چغندر قند منطقه دزفول توسط شهریار دریاقت و پس از خالص سازی مورد شناسائی قرار گرفت. کلنی‌ها در محیط کشت NA، سفید، کمی برجسته با وسط متراکم بود. از طرفی کلنی‌ها روی محیط کشت‌های SNA و KB و PDA بسیار لعابی و همراه با انتشار پیگمان صورتی رنگ در داخل محیط بود. این باکتری میله‌ای شکل، دارای کپسول و متحرک بود آزمایشات مربوط به فسفاتاز، اسکولین، متیل رد، و استفاده از ازرافینوز،  $\alpha$ -methyl glucoside و ملی زیتوز در مورد این باکتری مثبت بود. مضافاً اینکه آزمون فوق حساسیت (HR) روی برگ توتون منفی و آزمون ایجاد لهیدگی روی غده سالم چغندر مثبت بود.

- استرین *E. herbicola* pv. *herbicola* NPP

این پاتوار از نمونه‌های صنوبر (*Populus nigra*) جمع آوری شده توسط میرابوالفتحی از منطقه جوکندان - مازندران که دارای علائم شدید لکه برگی ریز آب سوخته بود جدا گردید (شکل ۱). کلنی‌های این باکتری ابتدا سفید و بتدریج متمایل به زرد گردید. بافت کلنی‌ها بسیار لعابی و همراه لوپ کشیده میشد. آزمون فوق حساسیت چند بار تکرار و در هر بار مثبت بود. همچنین واکنش این باکتری در استفاده از قندهای رافینوز، ملی زیتوز و آلفا-متیل گلوکوسید و رشد در محیط کشت حاوی ۰.۵٪ کلرورسدیم مثبت بود.

جدول ۱- لیست ایزوله های باکتریایی و چگونگی جداسازی آنها از روی میزبانهای مختلف گیاهی

Table 1. List of bacterial isolates and their origin and sources

نام باکتریهای شناسایی شده Bacterial species	میزبان Host	محل بروز بیماری Location	نام جمیع آوری کننده نمونه Sample collector
<i>E. rhaponitici</i> NCH	چغندر (Bate Vulgaris)	باختران (Bakhtararan)	شهریاری
<i>E. herbicola</i> pv. <i>Herbicola</i> NPP	پوپولوس (Populus sp.)	مازندران (Mazandaran)	میرابو الفتیحی
<i>Pseudomonas cichorii</i> NP	عشقه (Hedera helix)	تهران (Tehran)	-
<i>Pseudomonas</i> Soft rotting sp. NC	کاکوس (Cercus sp.)	تهران (Tehran)	عباسی
<i>Xanthomonas campestris</i> NTA	توسکای (Alnus subcordata)	گورگان (Gorgan)	سنبل کار و میرابو الفتیحی
NTA & NTB	بیلابقی		
<i>Clavibacter michiganense</i> NT	(Lycopersicon esculentum)	ارومیه (Orumieh)	ارومچی

گوجه فرنگی

- استرین *Pseudomonas cichorii* NP

این باکتری از نمونه های عشقه آلوده به بیماری لکه برگی اخذ شده از یک متقاضی از منطقه ده روس تهران جدا گردید (شکل ۲). علائم بیماری بصورت لکه های بزرگ نکروز شده با هاله ای از آبسوختگی اطراف لکه ها کاملاً نمایان بود. آزمون فوق حساسیت (HR) مثبت و در تلقیح مصنوعی به میزان جدا شده از آن موجب علائم لکه برگی گردید.

- استرین *Pseudomonas soft rotting species* NC

از چند نمونه کاکتوس کاملاً لهیده که توسط عبائی از تهران جمع آوری گردیده بود یک باکتری فلورسانت جدا گردید. این باکتری دارای کلنی های به رنگ سفید، ناصاف و تخت (Flat) و سلولهای میله ای شکل کشیده و دارای کپسول بود. آزمون فوق حساسیت (HR) مثبت و در تلقیح به کاکتوس سالم پوسیدگی تدریجی و محدود را موجب گردید. این باکتری فاقد قدرت لهیدگی برشهای هویچ، کلم، تربچه، خیار و کاهو ظرف ۴۸ ساعت بود.

- استرین *Xanthomonas campestris* NTA & NTB

دو استرین متعلق به گونه *X. campestris* از نمونه های توسکای بیلاتی با علائم شدید لکه زاویه ای که در دو نوبت توسط سنبل کار و میرابوالفتحی از نهالستان قرق-گرگان جمع آوری گردیده بود جدا گردید (شکل ۳). رشد کلنی های این باکتری در محیط کشت NA ابتدا بسیار کند و نقطه نقطه (Punctiform) و بتدریج به کلنی های رنگ زرد تپیک زانتمونانداها تغییر شکل داد. فرم سلولها میله ای شکل و فاقد کپسول بود. رشد هر دو استرن بر روی محیط کشت یک درصد TTC (2, 3, 5, Triphenyl tetrazolium chloride) کاملاً متوقف گردید. آزمون فوق حساسیت (HR) برای هر دو استرن مثبت بود.

- استرین *Clavibacter michiganense* NT

احتمال وجود باکتری مزبور با مشاهده علائم و جمع آوری نمونه گوجه فرنگی با علائم شانکر و پژمردگی در منطقه ارومیه توسط ارومچی گزارش و جهت جداسازی و شناسائی قطعی عامل بیماری به مرکز ارسال گردید و پس از انجام آزمایشات لازم باکتری مزبور بنام *C. michiganense* (Syn. *Corynebacterium michiganense* (Smith) Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris) مورد شناسائی قرار گرفت.

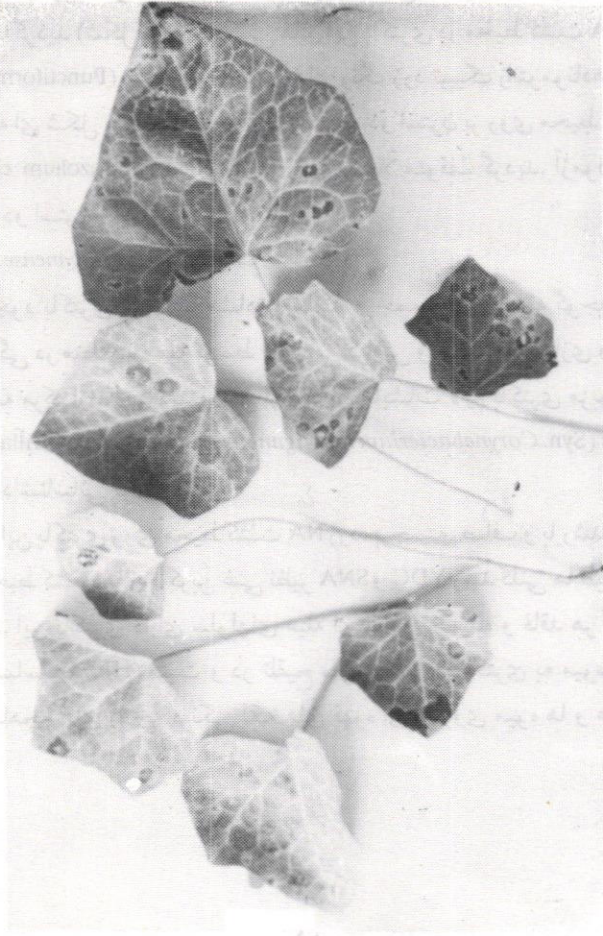
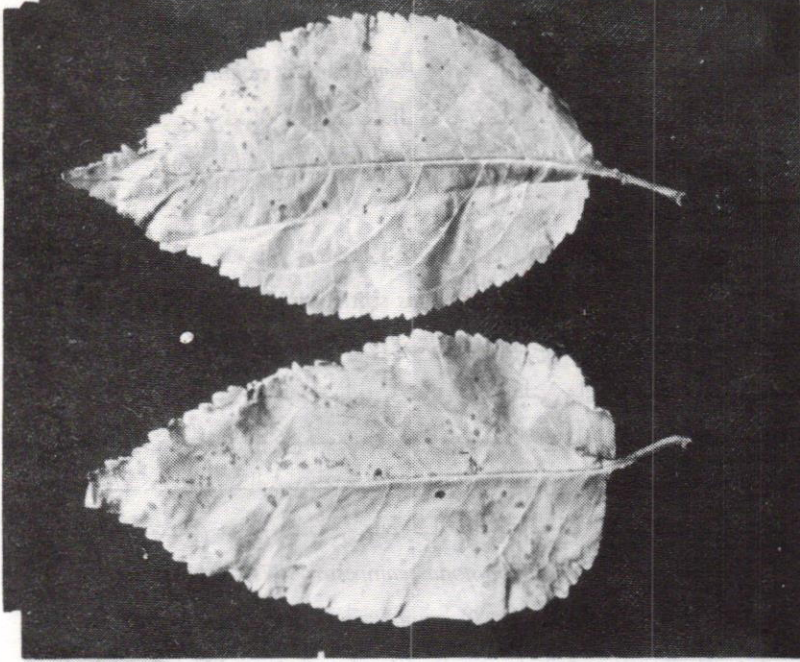
کلنی های این باکتری روی محیط کشت NA زرد، برجسته، صاف و با رشد بسیار کند بود. بر عکس روی محیط کشت های باکترین غنی نظیر SNA و YDC رشد کلنی ها طبیعی و به صورت نیمه سیال بود. این باکتری دارای سلولهای میله ای شکل خمیده و فاقد هر گونه تحرک بود. آزمون فوق حساسیت (HR) مثبت و در تلقیح سوسپانسیون باکتری به میوه گوجه فرنگی و تزریق آن به گیاهچه های گوجه فرنگی لکه های قهوه ای بر روی میوه ها و علائم کوتولگی و

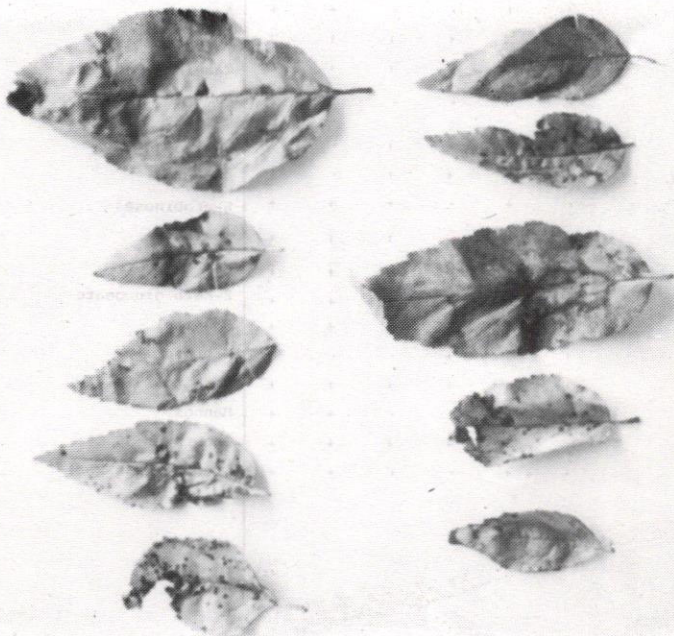
شکل ۲- علائم لکه برگی بر روی برگهای عشقه توسط *Ps. cichorii*

Fig. 2. leaf spots of *Hedera helix* caused by *Ps. cichorii*

شکل ۱- علائم لکه برگی ناشی از باکتری *E. herbicola* روی صنوبر

Fig. 1. Foliar symptoms on *Populus nigra* induced by *E. herbicola*





شکل ۳- علامت لکه زاویه ای برگهای توسکای بیلاقی توسط *X. campestris*  
 Fig. 3. Angular leaf spot of *Alnus subcordata* caused by *X. campestris*



شکل ۴- علامت کزنگی یکطرفه بگلخانه برگهای گوجه فرنگی در نتیجه مصنوع با باکتری *C. michiganense*  
 Fig. 4. Stunting and one-sided wilt of tomato seedling developed after inoculation with a strain of *C. michiganense*

جدول ۲ - مشخصات منتخبات *پیزیزوژنیک*، *ویروس‌شناسی* برخی اریباکتریهایی بهمانه‌ریزای جدا شده از میزبانهای مختلف زیر سم  
 Table 2. Selected morphological, physiological and biochemical characteristics of some phyto-bacteria isolated from different hosts.

گونه‌ها با اکتینومایسیت

Species and strain	Gram reaction	Motility	diffusible pigments	O/F Test	Tobacco hypersensitivity (HR)	Potato soft rot	Oxidase	Arginine dihydrolyase	Gelatinase	amylase	Urease	Lecithinase	Lipase (Tween 80)	Indole	nitrate reductase	H <sub>2</sub> S production	Acetoin	Levan	Casein hydrolysis	Reducing compounds from Sucrose	B-alanine	Sucrose	L-arabinose	lactose	maltose	2-Keto gluconate	Monnitol	Citrate	Sorbitol	Mannos	Growth at 36 C	Growth in 5% NaCl
1 <u>E. Thaponetici</u> NGH	-	+	pink F	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	W	+	M	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2 <u>E. herbarcola</u> PV, <u>herbarcola</u> npp	-	+	F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3 <u>Pseudomonas cichorii</u> NP	-	+	FL	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
4 <u>Pseudomonas</u> soft rotting sp. NC	-	+	FL	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5 <u>Xanthomonas campestris</u> NTA & NTB	-	+	0	+	+	-	W	-	+	+	+	+	+	+	-	W	-	M	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+		
6 <u>Clavibacter michiganense</u> NT	+	-	0	+	-	W	-	SL	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

F=fermentative      W=weak reaction      Fj=Fluorescent  
 O-oxidative      M=mucoid growth      d=positive for strain NTB  
 . =Not Tested  
 +<sup>B</sup>=twitching motility  
 SL:slow degradation

این جدول به منظور مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گونه‌های اریباکتریایی جدا شده از میزبانهای مختلف در این مطالعه تهیه شده است. نتایج حاصل از آزمایش‌ها در این جدول خلاصه شده است.



پژمردگی یکطرفه برگچه‌ها در روی گیاهچه‌ها ایجاد گردید (شکل ۴).  
با توجه به خصوصیات عمومی و اختصاصی ایزوله‌های باکتریائی مورد بررسی و روند  
مراحل شناسائی، به استثنای باکتریهای *X. campestris* و *Ps. cichorii* (رحیمیان ۱۹۸۹، ۱۹۹۱)  
سایر عوامل باکتریائی توصیف شده برای اولین بار از ایران گزارش می‌گردد و برخی از این  
پاتوژنها از قبیل *C. michiganense* و *E. rapontici* بی‌تردید از لحاظ علم رده بندی و نیز از نقطه  
نظر اهمیت اقتصادی و قرنطینه‌ای کشور از اهمیت خاصی برخوردار میباشند.

#### سپاسگزاری

از آقای عامری کاردان بخش که در تهیه عکس‌ها و نیز خانم فرحناز محوی که در تایپ این  
مقاله نگارنده را یاری نمودند صمیمانه تشکر مینماید.

---

#### نشانی نگارنده:

دکتر نادر حسن زاده. بخش تحقیقات بیماریهای گیاهان، موسسه تحقیقات آفات و  
بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵، تهران.