

## شناسایی، پراکنش و تعیین برخی ویژگی های عوامل باکتریایی بیماری زای همراه با تغییر رنگ و سوختگی خوشه برنج در استان مازندران

مهدی رستمی<sup>۱\*</sup>، ابوالقاسم قاسمی<sup>۲</sup>، حشمت اله رحیمیان<sup>۳</sup> و وحید خسروی<sup>۴</sup>

\*- نویسنده مسؤل: عضو هیات علمی بخش گیاهپزشکی موسسه تحقیقات برنج کشور- معاونت مازندران (M. rostami@areo.ir)

۲- عضو هیات علمی بخش تحقیقات بیماری های گیاهی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی

۳- استاد گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- عضو هیات علمی بخش گیاهپزشکی موسسه تحقیقات برنج کشور- معاونت مازندران

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

### چکیده

بیماری تغییر رنگ و سوختگی خوشه در چند سال اخیر با توسعه کشت ارقام پرمحصول برنج شیوع بیشتری در مزارع داشته است. علائم این بیماری به صورت قهوه ای شدن خوشه بوده که معمولاً با عقیمی و پوکی شلتوک ها همراه می باشد. این بیماری یک بیماری چند عاملی (Complex) بوده و قارچها و باکتری ها از عوامل اصلی ایجاد کننده آن می باشند. بیماری تغییر رنگ و سوختگی خوشه روی همه ارقام محلی و پرمحصول با درجات مختلفی از وقوع و شدت آلودگی مشاهده می شود. آلودگی ارقام پرمحصول مانند ندا، فجر و شیروودی در مقایسه با رقم طارم محلی بیشتر بود. طی مدت دو سال نمونه برداری از مزارع شالی کاری مناطق مختلف استان مازندران، باکتری های بیماری زای همراه با بیماری روی محیط های آگار غذایی و *Pseudomonas agar F* جداسازی و بر اساس آزمون های بیماری زایی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شناسایی شدند. در جداسازی از نمونه های جمع آوری شده همراهی یک، دو یا سه گونه از باکتری های بیماری زا محرز شد. گونه های *Pantoea ananas*، به عنوان گونه غالب، گونه *Pseudomonas syringae* و گونه ای شبیه به *Pseudomonas fuscovaginae* و *Acidovorax avenae subsp. avenae* از اکثر نمونه ها جداسازی شدند. در آزمون بیماری زایی روی ارقام مختلف برنج، ارقام پرمحصول حساسیت بیشتری به عوامل بیماری زای باکتریایی نشان داده و میزان آلودگی بالاتری داشتند. در این خصوص جدایه های *Pseudomonas fuscovaginae* و *Pseudomonas syringae* باعث آلودگی بیشتر تعداد خوشه و شلتوک روی خوشه شدند. در مقابل گونه *Pantoea ananas* آلودگی کمتری را روی خوشه های برنج ایجاد نمود. گونه *Acidovorax avenae subsp. avenae* نیز ضمن ایجاد تغییر رنگ جزئی خوشه باعث پوسیدگی محور های اصلی و فرعی گل آذین شد. این اولین گزارش از بیماری زایی گونه *P. ananas* و *Acidovorax avenae subsp. avenae* روی خوشه برنج به عنوان عوامل تغییر رنگ خوشه در استان مازندران و ایران می باشد.

کلید واژه ها: برنج، باکتری های بیماری زای همراه، تغییر رنگ دانه، سوختگی خوشه *Acidovorax Pantoea* و *Pseudomonas*

### مقدمه

دارند (کوتین و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۶؛ زیگلر و همکاران<sup>۲</sup>،

۱۹۸۷). تا کنون در دنیا چند گونه از باکتری ها را بعنوان

عوامل اصلی ایجادکننده تغییر رنگ و پوکی

شلتوک روی خوشه، قارچ ها و باکتری ها معرفی شده

اند، که بصورت توأم در ایجاد بیماری نقش

1- Cottyn et al.

2- Zeigler et al.

*Pseudomonas fuscovaginae* باعث پوسیدگی شدید غلاف، تغییر رنگ و سوختگی خوشه شده و درصد بذرزادی آن بیش از ۳۰ درصد گزارش شده است (زیگلر و همکاران، ۱۹۸۷). در ایران جدایه‌هایی شبیه و تا حدودی متفاوت با خصوصیات عامل این بیماری از شمال ایران جداسازی گردیده است (رستمی و همکاران، ۱۳۸۸).

بیماری پوسیدگی باکتریایی غلاف برنج (Bacterial sheath rot)، ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* که به فراوانی از بذر جداسازی شده، پتانسیل ایجاد خسارت پایینی دارد (میو و میسرا، ۱۹۹۴). پاتوارهای *striafaciens* و *atrofaciens* از گونه *Pseudomonas syringae* در ایران باعث ایجاد پوسیدگی غلاف برگ پرچم می‌شود (رستمی و همکاران، ۱۳۸۸؛ صابری و همکاران، ۱۳۸۸). در استان گیلان نیز پاتوار *syringae* از گونه *P. syringae* از خوشه‌های برنج جداسازی و شناسایی شده‌اند (آسمانی نژاد و همکاران، ۱۳۸۷). در گزارش دیگری *P. syringae* pv. *oryzicola* عامل پوسیدگی شدید غلاف و تغییر رنگ خوشه (Glum blotch) شناسایی شد (میو و میسرا، ۱۹۹۴؛ زیگلر و همکاران، ۱۹۸۷).

کلیه گزارش‌های موجود حاکی از آن است که بیماری‌های مذکور که سبب پوسیدگی غلاف پرچم می‌شوند، قادرند بیماری تغییر رنگ و سوختگی خوشه را نیز ایجاد نمایند.

در سال‌های اخیر علائم بیماری سوختگی، تغییر رنگ و پوکی خوشه روی ارقام محلی و پرمحصول برنج مثل ندا، فجر، شیرودی و هیبرید در بسیاری از مناطق استان مازندران مشاهده شده است. با توجه به سطح زیر کشت ارقام پرمحصول در استان شرایط خاص آب و هوایی منطقه (به لحاظ مساعد بودن شرایط رطوبتی و حرارتی برای باکتری‌های بیماریزا)، در این تحقیق،

عوامل اصلی بیماری زای خوشه و تغییر رنگ آن معرفی کرده‌اند.

بیماری قهوه‌ای شدن خوشه برنج (Paleabrowning) با عامل *Pantoea agglomerans* که در گذشته *Erwinia herbicola* نامگذاری شده بود (آزگامی و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۸۳). سبب تغییر رنگ و قهوه‌ای شدن خوشه‌های برنج می‌شود. میزان آلودگی خوشه‌ها به این باکتری بین ۲/۱ الی ۱۲/۶ درصد گزارش شده است (گوانلین<sup>۲</sup>، ۲۰۰۱). این بیماری در اکثر کشورهای برنج خیز دنیا وجود دارد. کوتر و همکاران<sup>۳</sup> (۲۰۰۴) در استرالیا عامل این بیماری را *Pantoea ananas* گزارش نمودند. علائم توصیف شده در مطالعه مذکور به صورت پوسیدگی محور اصلی خوشه و تغییر رنگ خوشه‌ها گزارش شده است. تعدادی از گونه‌های *Xanthomonas* spp. از جمله *X. oryzae* pv. *oryzae* نیز باعث تغییر رنگ خوشه‌ها می‌شود (آسمانی نژاد و همکاران، ۱۳۸۷؛ کوتر و همکاران، ۲۰۰۴؛ وبستر و گونل<sup>۴</sup>، ۱۹۹۲).

بیماری سوختگی خوشه (bacterial panicle blight) که سه گونه *Burkholderia glumae*، *B. multivorans* و *B. gladioli* به عنوان عوامل آن بیماری ذکر شده‌اند، باعث پوسیدگی غلاف پرچم، تغییر رنگ و سوختگی و پوکی کامل خوشه و بذر می‌شود. در این بیماری خوشه‌های آلوده به صورت مستقیم (Straight) ایستاده و از دور نمایان می‌شوند (میو و میسرا<sup>۵</sup>، ۱۹۹۴؛ وبستر و گونل، ۱۹۹۲؛ تروننگ و همکاران<sup>۶</sup>، ۱۹۹۳؛ یوان<sup>۷</sup>، ۲۰۰۴).

بیماری پوسیدگی قهوه‌ای باکتریایی غلاف برنج (Bacterial sheath brown rot) با عامل

- 1- Azegami et al
- 2- Guanlin
- 3- Cother et al.
- 4- Webster & Gunnell
- 5- Mew & Misra
- 6- Trung et al.
- 7- Yuan

گردید (رحیمیان، ۱۹۸۶). بذر جوانه دار شده نیز به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون باکتری قرار گرفت و پس از قرار دادن روی سه لایه کاغذ صافی سترون مرطوب به انکوباتور با دمای ۲۸ الی ۳۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ درصد منتقل شدند (شاکیا و همکاران<sup>۲</sup>، ۱۹۸۶). پس از سه الی چهار هفته از گیاهچه های دارای علائم سوختگی، سرعصابی و یا نوار قهوه ای باکتری عامل بیماری مجدداً جداسازی شد.

در ذرت و سورگوم، سوسپانسیونی از کشت ۴۸ ساعته جدایه های گروه *Pantoea* sp. با غلظت  $10^8$  cfu/ml و  $OD=0.2$  در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و در مرحله گیاهچه ای روی ذرت و سورگوم مایه زنی شدند. مایه زنی به روش تزریق سوسپانسیون جدایه ها همراه با خراش دادن برگ ها صورت گرفت. برای دو میزبان مذکور یک گلدان شاهد در نظر گرفته شد که با آب مقطر سترون مایه زنی شد. قبل از مایه زنی گلدان ها در محیط مرطوب با رطوبت ۸۰ تا ۹۰ درصد قرار گرفتند. بعد از مایه زنی، گلدان ها در زیر پلاستیک مرطوب به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و برای مشاهده علائم هر روز مورد بازدید قرار گرفتند.

### بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه ها

شناسایی باکتری های بیماری زا بر اساس آزمون های شاد و همکاران<sup>۳</sup> (۲۰۰۱) صورت گرفت.

### آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی

خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ۷۹ جدایه باکتریایی با استفاده از برنامه Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-Pc) Version 2.0 به صورت ماتریکسی با کد صفر برای خصوصیات منفی و یک برای خصوصیات مثبت محاسبه گردید و برای ترسیم دندروگرام مربوط به گروه بندی جدایه ها از روش

عوامل باکتریایی ایجاد کننده این بیماری روی ارقام مختلف برنج بررسی شد.

## مواد و روش ها

### نمونه برداری و جداسازی:

در سال های زراعی ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ مناطق برنجکاری شهرستان های آمل، بابل، محمودآباد، فریدونکنار، بابلسر، قائم شهر، ساری، چالوس، تنکابن و رامسر در مرحله خوشه دهی مورد بازدید قرار گرفت و ۲۰۰ نمونه دارای علائم بیماری از ارقام محلی و پرمحصول از مزارع جمع آوری شدند. جداسازی باکتری ها از شلتوک تغییر رنگ یافته و سوخته و همچنین از محور تغییر رنگ یافته خوشه که قهوه ای و سوخته بودند، به دو روش خرد کردن در بافر (Phosphate buffer saline) PBS و شستشو در بافر PBS (Liquid assay) (میو و میسرا، ۱۹۹۴؛ شاکیا و چونگ<sup>۱</sup>، ۱۹۸۳) صورت گرفت و عصاره حاصله روی محیط *Pseudomonas F* و *Nutrient agar* کشت شد. تشک های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و تک کلنی هایی که جمعیت غالبی داشتند، مجدداً خالص سازی شدند. از جدایه هایی که توانایی ایجاد واکنش فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی را داشتند، برای اثبات بیماری زایی روی برنج، ذرت و سورگوم استفاده شد.

مایه زنی باکتری ها با پاشش سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته جدایه ها با غلظت  $10^8$  cfu/ml و  $OD=0.2$  روی خوشه های سه رقم طارم محلی، هیبرید و فجر در مرحله گلدهی انجام گرفت. سپس گلدان ها در رطوبت نسبی ۸۰ درصد در محدوده دمایی ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و برای مشاهده علائم روزانه بازدید شدند. در مرحله گیاهچه ای سوسپانسیون باکتری مانند روش مذکور تهیه و در مرحله سه یا چهار برگی به روش تزریق (Injection infiltration) در غلاف مایه زنی

2- Shakya et al.  
3- Schaad et al.

1-Shakya & Chung

*Pantoea ananas* قادر به ایجاد علائم گیاهچه ای نبود و گیاهچه ها، رشد طبیعی داشتند. در مایه زنی خوشه در مرحله گلدهی بیماری زایی همه گونه ها با شدت و ضعف متفاوتی روی خوشه مشاهده شد. جدایه های *P. fuscovaginae* و *P. syringae* بیشترین میزان آلودگی را روی خوشه به صورت تغییر رنگ کلی و سوختگی شدید شلتوک نشان دادند، در صورتی که جدایه های *Pantoea ananas*، آلودگی متوسط و کمتری را روی خوشه به صورت تغییر رنگ و قهوه ای شدن شلتوک نشان دادند (شکل ۱). آلودگی خوشه در مزرعه به *A. avenae* subsp. *avenae* نیز به اثبات رسید. با این تفاوت که این گونه باعث تغییر رنگ جزئی شلتوک و پوسیدگی محورهای اصلی و فرعی خوشه شده در صورتی که گونه های دیگر قادر به ایجاد بیماری روی محورهای خوشه نبودند.

نتایج تعیین دامنه میزبانی گونه *Pantoea ananas* نشان داد، گونه مذکور علاوه بر بیماری زایی روی خوشه برنج در مرحله گلدهی، توانست روی گیاهچه های ذرت نیز باعث ایجاد بیماری شود. علائم بیماری روی گیاهچه های ذرت، ابتدا به صورت لکه های آبرسوخته پس از سه الی ۴ روز مشاهده که بتدریج دچار سوختگی و در نهایت سبب سوختگی قسمتی از برگ گردید.

### خصوصیات فنوتیپی جدایه ها

#### خصوصیات گونه *Pantoea ananas*

جدایه های قرار گرفته در این گروه (۳۰ جدایه)، دارای پرگنه زرد روی محیط آگار غذایی، گرم منفی، اکسیداز منفی و بی هوازی اختیاری (Fermentative) بودند. واکنش فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی متغیر بوده به طوریکه اکثر جدایه ها واکنش فوق حساسیت مثبت و تعدادی نیز واکنش فوق حساسیت روی شمعدانی نشان ندادند.

UPMGA بر اساس ضریب تشابه ( Simple matching) استفاده شد (رولف<sup>۱</sup>، ۱۹۹۷).

### نتایج

در مجموع از ۲۰۰ نمونه دارای علائم بیماری تغییر رنگ و سوختگی خوشه، جمع آوری شده از مناطق دشت، میان بند و کوهستانی ۱۸۷ جدایه باکتری به صورت اپیفیت<sup>۲</sup> و اندوفیت<sup>۳</sup> جداسازی گردید که ۵۲/۴۵ درصد از مزارع زیر کشت ارقام محلی (طارم محلی ۴۹/۹ درصد و طارم هاشمی ۵۵ درصد) و ۷۲/۴۲ درصد از مزارع زیر کشت ارقام پرمحصول (فجر ۸۳/۶۶ درصد، شیرودی ۷۳/۳۰ درصد، ندا ۷۸/۵۷ درصد، نعمت ۶۶/۶۰ درصد و شفق ۶۰ درصد) به باکتری های بیماری زا آلوده بودند. که از این تعداد ۹۴ جدایه متعلق به گونه *Pantoea ananas* (۵۰/۲۶ درصد از جدایه ها)، ۱۰ جدایه متعلق به گونه *A. avenae* subsp. *avenae* (۵/۳۴ درصد از جدایه ها)، ۴۲ جدایه متعلق به گونه شبیه به *Pseudomonas fuscovaginae* (۲۲/۴۵ درصد از جدایه ها) و ۱۹ جدایه متعلق به گونه *syringae* *Pseudomonas* (۱۰/۱۶ درصد از جدایه ها) شناسایی شد. در اکثر موارد حداقل دو و حداکثر ۳ گونه از باکتری های بیمارگر با خوشه و شلتوک دارای علائم همراه بودند.

### بیماری زایی

#### روی برنج:

در روش اثبات بیماری زایی از طریق مایه زنی بذری قرار گرفتن آن روی کاغذ صافی علائم بیماری به خوبی در گیاهچه ها مشاهده شد. علائم سوختگی، سرعصایی و خمیدگی در گیاهچه های مایه زنی شده با گونه های *A. avenae* subsp. *avenae* *P. syringae* و *P. fuscovaginae* مشاهده شد. در صورتی که گونه

1- Rolf  
2- Endophyte  
3- Epifyt  
4- Endophyte

*Pseudomonas syringae* و *fuscovaginae* و *Acidovorax avenae subsp. avenae* به ترتیب به لحاظ تنوع گونه بیشترین فراوانی را داشتند. از لحاظ فراوانی، گونه *Pantoea ananas* و *Acidovorax avenae subsp. avenae* از نقاط ساحلی، دشت و میان بند و در نقاط بالادست و کوهستانی اکثراً گونه های *Pseudomonas syringae* و *fuscovaginae* جداسازی شدند.

در بررسی پراکنش جدایه های باکتریایی بیماری زای همراه با تغییر رنگ خوشه های برنج در مناطق مختلف استان مازندران نتایج نشان داد که گونه *Pantoea ananas* در اکثر مناطق مورد نمونه برداری شامل شهرستانهای های آمل، بابل، قائم شهر، ساری، محمودآباد، فریدونکنار، چالوس، تنکابن و رامسر شیوع داشته ولی گونه شبه *Pseudomonas fuscovaginae* در شهرستانهای آمل، قائم شهر (سوادکوه و دوآب)، ساری (دشت ناز)، فریدونکنار، تنکابن (دوهزار) و رامسر و *Pseudomonas syringae* در شهرستانهای آمل، قائم شهر (سوادکوه و دوآب)، ساری (کیاسر و دشت ناز)، فریدونکنار، تنکابن (دوهزار) و رامسر و *Pseudomonas syringae* در شهرستانهای آمل، قائم شهر (سوادکوه و دوآب) و ساری (کیاسر و دشت ناز) در حالیکه *Acidovorax avenae subsp. avenae* از گسترش کمتری برخوردار بوده و تنها در برخی از مناطق و شهرستان آمل مشاهده شد و در بیشتر مناطق جداسازی نگردید. این که آیا منطقه جغرافیایی در خصوص تنوع گونه جداسازی شده نقش داشته است، مشخص نیست و در جداسازی از نمونه های آلوده صرفاً فراوانی و تنوع گونه ای در منطقه به اثبات رسید.

#### آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی

پس از تعیین میزان شباهت بر اساس ۳۳ خصوصیت فنوتیپی از جمله خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گونه *P. ananas* در ۷ گروه قرار گرفت که میزان شباهت گروه های یک (شامل جدایه های شماره ۱۰، ۲۰، ۲۷،

#### خصوصیات گونه *Pseudomonas spp.*

گونه های *Pseudomonas spp.* جدا شده از خوشه و شلتوک دارای علائم، گرم منفی، کاتالاز مثبت، هوازی اجباری و قادر به تولید رنگیزه فلورسنت روی محیط King's B بودند. اکثر جدایه ها بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت واکنش فوق حساسیت قوی روی توتون و شمعدانی ایجاد نمودند. جدایه ها براساس آزمون های اکسیداز و آرژنین دهیدرولاز به دو گروه تقسیم بندی شدند.

#### ۱- گروه اکسیداز و آرژنین مثبت

این گروه خصوصیتی شبیه به *Pseudomonas fuscovaginae* داشته و ۲۰ جدایه در این گروه قرار گرفتند.

#### ۲- گروه اکسیداز و آرژنین منفی

این گروه به یک یا چند پاتوار از *Pseudomonas syringae* مانند *syringae*، *atropfacience* و یا *Striafacience* شباهت داشته و ۱۹ جدایه در این گروه قرار گرفتند.

#### خصوصیات گونه *Acidovorax avenae subsp. avenae*

جدایه های قرار گرفته در این گونه (۱۰ جدایه)، پرگنه کرم و بژ روی محیط آگار غذایی داشته و واکنش فوق حساسیت قوی روی توتون و شمعدانی ایجاد نمودند.

ویژگی های جدایه های مختلف با ویژگی های فنوتیپی (فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی) استرین های تیپ و استاندارد مورد مقایسه و تطابق قرار گرفت که گونه های مذکور شباهت زیادی با استرین های تیپ و استاندارد متعلق به همان گونه داشتند. سایر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه ها در جدول ۱ آمده است.

در جداسازی از نمونه های بیمار همراهی چند گونه از باکتری های بیماری زا به اثبات رسید. گونه غالب *Pantoea ananas* و گونه های *Pseudomonas*

رستمی و همکاران: شناسایی، پراکنش و تعیین برخی ویژگی‌های ...

جدول ۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کلیدی و متمایز کننده جنس‌ها و گونه‌های باکتریایی جدا سازی شده از خوشه‌های دارای علائم تغییر رنگ و سوختگی خوشه و شلتوک برنج از مناطق مختلف استان مازندران

آزمون	گونه			
	<i>Pantoea ananas</i>	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>A. avenae</i> subsp. <i>Avenae</i>
	تعداد استرین مورد مطالعه (۳۰)	تعداد استرین مورد مطالعه (۲۰)	تعداد استرین مورد مطالعه (۱۹)	تعداد استرین مورد مطالعه (۱۰)
واکنش گرم	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+
تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB	-	+	+	-
واکنش فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی	+	+	+	+
اکسیداز	-	+	-	+
آرژنین د هیدرولاز	ND	+	-	-
لوان	-	-	V	-
له نمودن سبب زمینی	-	-	-	-
هوازی	+	+	+	+
بی هوازی	+	-	-	-
احیاء نیترات	V	V	-	+
تولید ۲- کتوگلوکونات	+	-	V	-
ذوب ژلاتین	V	+	V	+
هیدرولیز نشاسته	V	-	V	V
هیدرولیز اوره	-	+	+	+
هیدرولیز توئین ۸۰	-	+	+	+
هیدرولیز اسکولین	V	-	+	-
هیدرولیز آربوتین	-	-	V	-
هیدرولیز کازئین	-	-	+	+
هیدرولیز لسیتین	-	-	ND	V
تولید مواد احیا کننده از سوکروز	V	V	V	-
فسفاتاز	V	+	+	+
تولید اندول	V	-	-	-

+ در صورتی که ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش مثبت داشتند. - : ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش منفی داشتند. بین ۲۱ تا ۷۹٪ از

استرین‌ها واکنش مثبت داشتند. V: ، هوازی اجباری O: ، واکنش ضعیف W:

## ادامه جدول ۱-

آزمون	گونه			
	<i>Pantoea ananas</i>	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>A. avenae</i> subsp. <i>Avenae</i>
تولید متیل رد	-	-	-	-
تولید استوئین	+	-	-	-
رشد روی نمک طعام ۳ درصد	+	+	+	+
رشد روی نمک طعام ۴ درصد	+	+	+	+
رشد روی نمک طعام ۵ درصد	V	V	-	-
رشد در ۳۹ درجه سانتیگراد	+	-	-	+
از سیستین H <sub>2</sub> S تولید گاز استفاده از کربوهیدراتها:	V	V	V	+
گلوکز	+	+	+	+
سوکروز	V	V	+	-
ترهالوز	V	V	-	-
سوربیتول	V	V	+	+
مانیتول	+	+	+	+
اریتریتول	ND	ND	-	+
اینوزیتول	+	+	+	-
دلسیتول	-	-	-	-
آدونیتول	-	-	-	-
رافینوز	V	V	-	+
مانوز	+	+	+	+
ال-رامنوز	+	-	V	V
مالتوز	+	-	V	-
سلوبیوز	+	-	-	-
ملی بیوز	+	+	+	+
اینولین	ND	-	-	-
سالیسین	V	-	-	+
دکستروز	V	-	-	+
دی تارتارات	-	-	-	+
ال تارتارات	ND	-	-	-
پروپیونات	ND	ND	ND	V

+ : در صورتی که ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین ها واکنش مثبت داشتند. - : ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ از استرین ها واکنش منفی داشتند. بین ۲۱ تا ۷۹٪ از

استرین ها واکنش مثبت داشتند. V : هوای اجباری O : واکنش ضعیف W :



شکل ۱- علائم بیماری قهوه ای شدن خوشه های برنج در رقم فجر (۱) و طارم محلی (۲) در اثر گونه های *Pseudomonas Pantoea ananas* و *fuscovaginae*

*P. avenae* subsp. *avenae* (مورد شناسایی قرار گرفت).

در جداسازی از خوشه و شلتوک دارای علائم، گونه های خانواده *Entrobacteriaceae* فراوانی بیشتری داشتند که در این خصوص دو گونه از جنس *Pantoea* شناسایی شد. گونه *P. ananas* که قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی شمعدانی و بیماری زایی روی گیاهچه ذرت و خوشه برنج بودند ولی گونه *P. agglomerance* قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی شمعدانی نبوده و نتوانست روی گیاهچه های ذرت و همچنین روی برنج در مرحله گلدهی و خوشه دهی بیماری ایجاد نمایند. لذا گونه *P. ananas* به عنوان گونه غالب و بیماری زا قلمداد شود. نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعات گوانلین<sup>۱</sup> (۲۰۰۱) مطابقت داشت. البته در آن مطالعه *Erwinia herbicola* و *Pantoea agglomerans* به عنوان عامل قهوه ای شدن پالنا گزارش شده است. در منابع صرفاً یک گزارش از شناسایی و بیماری زایی گونه *Pantoea ananas*

شامل جدایه های ۱، ۲، ۲۶، ۲۸، ۳۸، ۴۳ و ۴۸) و دو (شامل جدایه های ۱، ۲، ۲۶، ۳۴، ۳۷ و ۴۱)، ۸۶٪ و میزان شباهت گروه سه (شامل جدایه های ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۲۵، ۲۹، ۳۲، ۴۰، ۴۴ و ۴۵) با گروه های یک و دو، ۸۴/۵٪ تعیین گردید. جدایه های شماره ۴، ۱۳ و ۱۸ در گروه چهار قرار گرفت که با گروه های یک، دو و سه ۸۲/۵٪ شباهت داشت. جدایه های ۳۵، ۴۲ و ۳۳ هر کدام به تنهایی در گروه های پنج، شش و هفت قرار گرفتند.

### بحث

نتایج دو سال نمونه برداری از مزارع برنج استان مازندران و بررسی بیماری تغییر رنگ و سوختگی خوشه، آلودگی ارقام پرمحصول در مناطق دشت و ارقام محلی در مناطق کوهستانی را به باکتری های عامل بیماری تغییر رنگ خوشه محرز و آلودگی نمونه های دارای علائم به باکتری های بیماری زا از چند جنس و گونه به اثبات رسید.

ویژگی های فنوتیپی جدایه های مختلف با ویژگی های فنوتیپی (فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی) استرین های تپ و استاندارد همان گونه مطابقت و شباهت زیادی داشت و چهار گونه شامل گونه های *Pantoea Pseudomonas fuscovaginae ananas* ، پاتوارهای *P. Syringae* (شامل *Syringae atrofaciense* و *Striafaciense*) و *A. avenae*



علاوه بر گونه های اشاره شده گونه *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* نیز به تعداد کمتری از نمونه های شلتوک تغییر رنگ یافته جداسازی شد که در آزمون بیماری زایی روی خوشه ها علائم بیماری را نشان داد. گونه *A. avenae* subsp. *avenae* باعث تغییر رنگ خوشه و پوسیدگی محور گل آذین خوشه شد که علائم مشاهده شده با علائم ایجاد شده توسط این باکتری در سایر نقاط دنیا مشابهت دارد. لازم به ذکر است گونه مذکور گونه گرمادوستی بوده و علائم واضح و مشخصی را در مزرعه روی خوشه ایجاد نمی نماید و تنها وجه مشخصه آن پوسیدگی محور گل آذین می باشد که گاهی در مزرعه مشاهده می شود. در این تحقیق نیز علائم واضح و مشخصی از علائم بیماری در مزرعه روی خوشه ها مشاهده شد که با علائم مشاهده شده در تحقیقات کادوتا (۱۹۹۶) مطابقت داشت (کادوتا<sup>۴</sup>، ۱۹۹۶؛ گوانلین و همکاران، ۲۰۰۲).

در تعیین فراوانی و غالبیت گونه ها، گونه های *Pantoea ananas* و شبه *Pseudomonas fuscovaginae* از جمله گونه هایی بودند که از اکثر نمونه های دارای علائم جداسازی و شناسایی شدند. در این میان *Pantoea ananas* فراوانی و غالبیت بیشتری داشته است. پس از جداسازی و شناسایی گونه ها مشخص شد، زمانی که مرحله آبستنی و خروج خوشه های اولیه گیاه مصادف با بارندگی و هوای خنک باشد، بیماری تغییر رنگ خوشه ابتدا با عامل شبیه به *Pseudomonas fuscovaginae* و سپس گونه *P. syringae* غالبیت داشته ولی به تدریج با گرم شدن هوا در اواخر فصل و همزمان با برداشت برنج گونه *Pantoea ananas* بیشتر قابل جداسازی خواهد بود. لذا از آنجائیکه وقوع و شدت بیماری های باکتریایی تحت تأثیر شرایط آب و هوایی بوده و آب و هوای خنک توام با بارندگی برای توسعه و ایجاد علائم برای گونه های *Pseudomonas* مساعد تر می باشد،

روی برنج توسط کوثر و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۴) از استرالیا وجود دارد. نتایج حاصل از دامنه میزبانی و بیماری زایی جدایه های *P. ananas* بر روی گیاهچه های ذرت با نتایج آزاد و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۰۰) که این گونه را از روی سورگوم جداسازی و شناسایی نمودند، همخوانی داشت. البته نتایج حاصل از آزمون های فنوتیپی یک غیر همگونی را در بین جدایه ها نشان می دهد و احتمال می رود که مخلوطی از دو گونه مذکور وجود داشته باشند که نیاز به مطالعات وسیعتر، از جمله مطالعات ژنتیکی دارد.

گونه های شناسایی شده دیگر شامل گونه *P. syringae* (که به پاتوارهای *atrofaciense* و *striafaciense* شباهت داشته) و گونه ای شبیه به *Pseudomonas fuscovaginae* از گروه *Pseudomonas* های فلورسنت بودند که درجات مختلفی از بیماری زایی را از قوی تا ضعیف روی خوشه ایجاد نمودند. لذا مجموعه ای از *Pseudomonas* های بیماری زا، با بیماری زایی قوی تا ضعیف از خوشه جداسازی شدند. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات کوتین و همکاران<sup>۳</sup> (۱۹۹۶ و ۲۰۰۱) مطابقت دارد. با این وجود در مطالعات آنها گونه های بیماری زای *Pseudomonas fuscovaginae*، *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* و *X. oryzae* pv *oryzicola* نیز از نمونه های دارای علائم جداسازی و شناسایی شد. در مطالعه دیگری که گوانلین و همکاران (۲۰۰۲) در استان زجیانگ چین در سال های ۱۹۹۷ الی ۲۰۰۰ انجام داده بودند، گونه های *Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola*، *Acidovorax* و *Pseudomonas fuscovaginae* *avenae* subsp. *avenae* گزارش شد.

1- Cother et al.

2- Azad et al.

3- Cottyn et al.

خوشه ۲/۱ الی ۱۲/۶ درصد گزارش شد. در آزمون بیماری زایی روی ارقام فجر و طارم محلی نیز مشخص شد، باکتری های جنس *Pseudomonas* در مقایسه با گونه *Pantoea* علائم شدیدتر و میزان آلودگی بیشتری از خوشه ها را روی ارقام پرمحصول ایجاد می نمایند.

شلتوک هایی که در آزمون بیماری زایی علائم تغییر رنگ را نشان دادند روی سه لایه کاغذ صافی مرطوب در تشتک های پتری قرار گرفته و درون دستگاه جوانه زنی بذر (ژرمیناتور) قرار داده شدند. گیاهچه های حاصله از جوانه زنی بذور بیمار علائم متنوعی را نشان دادند. عدم جوانه زنی مطلوب بذر، ایجاد گیاهچه های ناقص و کج و معوج همراه با لکه های قهوه ای، رشد ضعیف گیاهچه که در نهایت منجر به خشکیدگی گیاهچه شد. این نتایج نشان داد که باکتری عامل بیماری می تواند با بذر منتقل و باعث آلودگی گیاهچه شود.

### سپاس گذاری

از کمیته علمی و پژوهشی موسسه تحقیقات برنج و دفتر بررسی و همانگی طرح های تحقیقاتی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی جهت تصویب و تامین بودجه پروژه مربوطه به شماره مصوب ۸۷۰۰۳-۰۴-۰۴ و همچنین از همکاری کارشناسان بخش گیاهپزشکی معاونت موسسه تحقیقات برنج کشور تقدیر و تشکر به عمل می آید.

لذا در ابتدای فصل دو گونه مذکور با فراوانی بالاتری قابل جداسازی خواهد بود. ولی از آنجائیکه پتانسیل ایجاد اپیدمی برای گونه شبیه به *P. fuscovaginae* بالاتر از گونه *P. syringae* می باشد، لذا گونه *P. fuscovaginae* با فراوانی بیشتری قابل جداسازی خواهد بود (میو و میسرا، ۱۹۹۴). البته حساسیت و مقاومت ارقام کشت شده به باکتری عامل بیماری، مدیریت زراعی و مقادیر مختلف کودی، مخصوصاً استفاده بیش از اندازه کود ازته یا عدم استفاده صحیح از کودهای شیمیایی در شدت بیماری های باکتریایی نقش به سزایی خواهند داشت (بوتا و احمد، ۱۹۹۴).

در مجموع از بیشتر نمونه های دارای علائم، گونه بیماری زای *Pantoea ananas* جداسازی و شناسایی شد. که واکنش فوق حساسیت آن روی شمعدانی مثبت ارزیابی گردید. گونه دیگری از همین جنس از نمونه های دارای علائم جداسازی و *Pantoea agglomerans* شناسایی شد که فوق حساسیت آن روی شمعدانی منفی و قادر به ایجاد بیماری روی برنج در مرحله خوشه دهی و ذرت در مرحله گیاهچه ای نبود. نتایج حاصل از آزمون بیماری زایی گونه های مذکور روی خوشه در ارقام فجر و طارم محلی نشان داد گونه *Pantoea ananas* در مقایسه با گونه *Pseudomonas fuscovaginae* و *P. syringae* بیماری زایی ضعیف تری داشته و درصد کمتری از شلتوک ها آلوده و میزان پوکی شلتوک ها روی خوشه کمتر مشاهده شد به طوری که ۷ تا ۲۵ درصد از شلتوک ها روی خوشه علائم تغییر رنگ را نشان دادند. از لحاظ بیماری زایی، باکتری های جنس *Pseudomonas* در مقایسه با جنس *Pantoea* پتانسیل بیشتری برای بیماری زایی نشان دادند. نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعات گوانلین (۲۰۰۱) از چین تا حدودی مطابقت داشت. در این گزارش میزان تغییر رنگ شلتوک ها روی

### منابع

۱. آسمانی نژاد حسن کیاده، ا.، نیک نژاد کاظم پور، م.، پاداشت، ف. و رحیمیان، ح. ۱۳۸۷. جداسازی و شناسایی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از خوشه های برنج در مزارع استان گیلان. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه بوعلی سینا همدان، ۳ الی ۶ شهریور ماه، ص ۴۶۲.
۲. آسمانی نژاد حسن کیاده، ا.، نیک نژاد کاظم پور، م.، پدرام فر، ح.، پاداشت، ف.، رحیمیان، ح.، خشکدامن، م. و عبادی، ع. ۱۳۸۷. جداسازی و شناسایی باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* از خوشه های برنج در مزارع استان گیلان. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه بوعلی سینا همدان، ۳ الی ۶ شهریور ماه ص ۴۶۳.
۳. رستمی، م.، قاسمی، ا.، رحیمیان، ح. و خسروی، و. ۱۳۸۸. بیماری پوسیدگی باکتریایی غلاف برنج در استان مازندران. مجله بیماری های گیاهی، ۴۵(۳): ۲۱۳-۲۲۷.
۴. صابری، ا.، صفایی، ن.، رحیمیان، ح. و رستمی، م. ۱۳۸۸. بررسی وضعیت تاکسونومیکی جدایه های اکسیداز مثبت سودوموناس دخیل در پوسیدگی غلاف برنج در استان مازندران با استفاده از 16SrRNA-RFLP. مجله بیماری های گیاهی، ۴۵(۳): ۲۲۹-۲۴۳.
5. Azad, H.R., Holmes, G.J., and Cooksey, D.A. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. *Plant Disease*, 84: 973-979.
6. Azegami, K., Ozaki, K., and Matsuda, A. 1983. Bacterial palea browning, a new disease of rice caused by *Erwinia herbicola*. *Bull. Neta. Inst. Agric. Sci. ser*, 39: 1-12.
7. Bhutta, A.R., and Ahmad, S.I. 1994. Detection of bacterial pathogens in paddy seed lots in Pakistan. *Pakistan journal of Science and Industrial Research*, 37: 382- 384.
8. Cother, E.J., Reinke, R., McKenzie, C., Lanoiselet, V.M., and Noble, D.H. 2004. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33: 495- 503.
9. Cottyn, B., Cerez, M.T., Vanoutryve, M.F., Barroga, J., Swing, J., and Mew, T.W. 1996. Bacterial diseases of rice, I. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. *Plant Disease*, 80: 429-437.
10. Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M., Mew, T.W., and Swings, J. 2001. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*, 91: 282-292.
11. Guanlin, X. 2001. First report of palea browning in China and characterization of the causal organism by phenotypic tests and Biology, *IRRN*, 26: 25-26.

12. Guanlin, X. 2003. First report of sheath brown rot of rice in China and characterization of the causal organism by phenotypic tests and *Biolog. IRRN*, 28: 50-52.
13. Guanlin, X, Guonian, Z., and Xiaoping, R. 2002. Diversity of pathogenic bacteria from rice seed. *Acta Phytopathologica Sinica*, 32: 114- 121.
14. Kadota, I. 1996. Studies on the pathogen of bacterial brown stripe of rice and its cology. *Bulletin of the Hokuriku. Nat. Agric. Exp, Station*, 38: 113- 171.
15. Mew, T.W., and Misra, J.K. 1994. A manual of rice seed health testing. International Rice Research Institute. LosBanos, Laguna, Philippines. 113p.
16. Rahimian, H. 1986. Incidence of bacterial stripe of rice in Iran. *Iran Agricultural Research*, 5: 63- 71.
17. Rott, P., Nottheghem, J.L., and Frossard, P. 1989. Identification and characterization of *Pseudomonas fuscovaginae*, the causal agent of bacterial sheath brown rot of rice, from Madagascar and other countries. *Plant Disease*, 73: 133-137.
18. Rolf, F.J. 1997. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.00. Exeter Software, Setauket, New York, 31p.
19. Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guid for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd. APS press. St. Paul, Minnesota. 373p.
20. Shakya, D.D., and Chung, H.S. 1983. Detection of *Pseudomonas avenae* in rice seed. *Science Technoligy*, 11: 583- 587.
21. Shakya, D.D., Chung, H.S., and Vinther, F. 1986. Transmission of *Pseudomonas avenae* the cause of bacterial stripe of rice. *Journal of Phytopathology*, 116: 92- 96.
22. Trung, H. M., Van, N.V., Vien, N.V., Lam, D.T., and Lien, M. 1993. Occurrence of rice grain rot disease in Vietnam. *International Rice research Notes*, 18:30
23. Webster, R.K., and Gunnell, P.S. 1992. Compendium of Rice Diseases. APS press, USA. 62p.
24. Zeigler, R.S., and Alvarez, E. 1987. Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. *Plant Disease*, 71: 592- 597.
25. Zeigler, R.S., Aricapa, G., and Hoyos, E. 1987. Distribution of fluorescent *Pseudomonas* spp. Causing grain and sheath discoloration of rice in Latin America. *Plant Disease*, 71: 894- 900.