لکه برگی باکتریائی آهار در مازندران

حشمت اله رحیمیان*

یک بیماری با علائم لکه های نکروزه قهوه ای رنگ در چند منطقه شرق مازندران مشاهده شد . باکتری عامل بیماری Xanthomonas campestris pv. zinniae تشخیص داده شد . استرینهای باکتری در چند خصوصیت فنوتیپی باهم تفاوت داشتند ولی نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی اکثر استرینها مشابه بود . تفاوتهای کمی در پروفیل پروتئینی معدودی از استرینها وجود داشت .

مقدمه :

در تابستان ۱۳۷۰ یک بیماری لکه برگی با لکه هائی برنگ قهوه ای بقطر یک تا چهار میلیمتر، که در وسط نکروزه و در حاشیه دارای آبسوختگی خفیف بودند روی بوته های آهار (*Zinnia elegans*) در چند منطقه ساری و نکاء مشاهده گردید . اکثر لکه ها دارای یک هاله کلرتیک سبز مایل به زرد بودند (شکل ۱) . کثرت لکه ها در برگهای جوان و پیوستن آنها بیکدیگر باعث نکروزه شدن سطح زیادی از برگ و منجر به بد شکل شدن برگهای جوان شده بود . در بررسی میکروسکپی لکه ها ، اندامهای قارچی دیده نشد ولی تراوش شدید باکتری از لبه لکه ها مشاهده گردید .

باکتری های متعدد از جمله :

Pseudomonas viridiflava (Burkholder) Dowson , (Year)

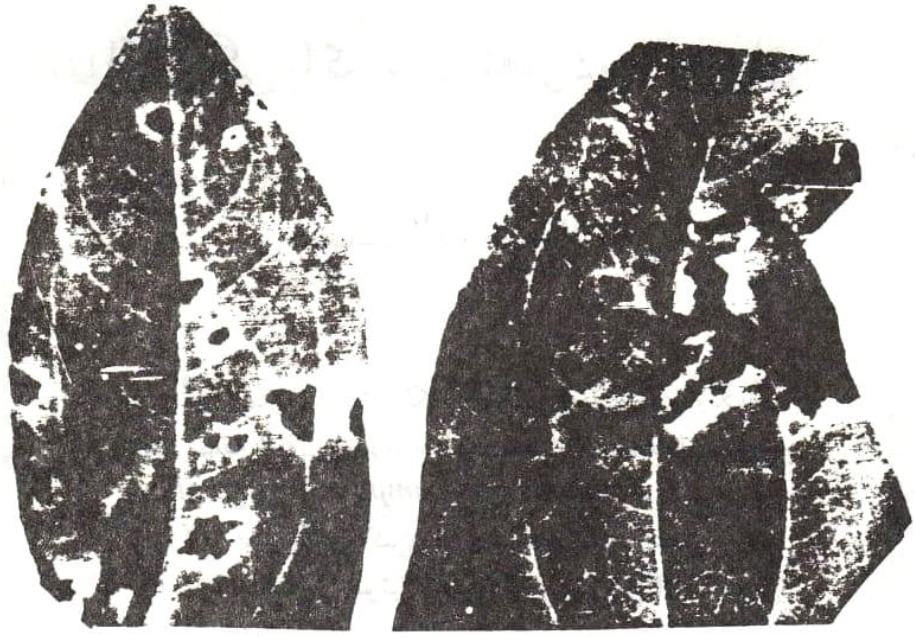
Pseudomonas syringae pv. *tagetis* (Hellmers) Young etal , (Year)

Xanthomonas campestris pv. *zinniae* (Hopkins & Dowson) Dye (Year)

---

* - دانشیار گروه گیاهپزشکی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه مازندران

تاریخ دریافت : ۷۲/۲/۲۶ تاریخ پذیرش : ۷۳/۴/۱۴



شکل ۱ - علائم بیماری باکتریائی لکه برگی روی برگ های گل آهار

در آهار میتوانند لکه برگی ایجاد نمایند (۳ ، ۴ ، ۱۳) . از بین این عوامل باکتریائی ، *Xanthomonas campestris* pv *zinniae* بیشترین گسترش جغرافیائی را روی آهار داشته و معمول ترین باکتری روی این گیاه است (۴ ، ۱۴) . علائم بیماری مشاهده شده در ساری و نکاء مشابه علائم ذکر شده برای بیماری ناشی از این باکتری در سایر نقاط دنیا است (۳ ، ۱۲ ، ۱۳) . هدف این بررسی تشخیص عامل بیماری و تعیین خصوصیات آن است .

مواد و روش آزمایش :

جدا سازی عامل بیماری . برگهای دارای علائم بیماری در بشر حاوی آب مقطر قرار داده شده و بمدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی شیگر ، با دور متوسط ، تکان داده شدند . قسمتی از برگ که دارای یک لکه مجزا بود بریده ، درون چند قطره آب مقطر استریل در یک پتری دیش قرار داده شده و با تیغ استریل خرد گردید . نمونه بمدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در حرارت اطاق نگهداری و - پس یک قطره آن به کمک لوپ استریل روی محیط آگار غذائی[1] حاوی یک درصد گلوکز مخطط[2] گردید . پتری های کشت شده در حرارت ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند . پس از ۴ تا ۵ روز

۱- Nutrient agar (Difco) ۲- Streak

شد ، کلنی های باکتری جدا و روی محیط آگار غذائی مجدداً مخطط شدند تا کشت خالصی از باکتری بدست آید . باکتری خالص شده در محیط آگار غذائی کشت و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و نمونه ای از آنها انجماد خشک[۱] گردید . یک نمونه از هریک نیز به آب مقطر استریل منتقل و در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد . مرفولوژی کلنی روی محیط آگار غذائی حاوی گلوکز بررسی گردید .
رنگ آمیزی تاژک با روش نیترات نقره صورت گرفت (۱۱) .

تعیین خصائص فنوتیپی [۲]

آزمونهای مرفولوژیکی ، بیوشیمیائی و تغذیه ای بر اساس روشهای قبلی صورت گرفت (۱ و ۹) . قابلیت باکتری در ایجاد فوق حساسیت[۳] در شمعدانی[۴] بررسی شد . شمعدانی گیاه مناسبتری از توتون برای آزمایش این خصوصیت در زانتوموناسها[۵] و سودوموناسها[۶] تشخیص داده شده است (رحیمیان ، منتشر نشده) . بعلاوه از جنبه های دیگر منجمله فراوانی ، آسانتر بودن پرورش و سهولت تکثیر و تزریق بر توتون برتری دارد .
آزمونهای فسفاتاز[۷] و تایروزیناز[۸] بترتیب با استفاده از روشهای شاد (۱۱) ولی لیوت و همکاران (۸) صورت گرفت .

الکتروفورز پروتئین [۹]

استرینهای جدا شده از آهار و یک استرین *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (ارسالی مسعود بهار ، دانشگاه صنعتی اصفهان) در روی محیط آگار غذائی بمدت ۳ روز در دمای ۲۸ - ۲۵ درجه سانتیگراد کشت شد . کلنی های باکتری از سطح محیط کشت جدا و در آب مقطر سوسپانسیون شد . سوسپانسیون سلولها در g × ۳۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب در آب مقطر حل گردید . غلظت سلولها به کمک اسپکتروفتومتر به دانسیته نوری[۱۰] برابر ۱/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر[۱۱] تنظیم شد . حل نمودن باکتری و الکتروفورز پروتئینها در ژل ۱۰٪ پلی اکریل امید[۱۲] بروش قبلی انجام شد (۱ و ۲) .

۱- Lyophilized
۲- phenotypic Features
۳- Hypersensitive reaction
۴- Pelargonium hortorum
۵- Xanthomonads
۶- Pseudomonads
۷- Phosphatase
۸- Tyrosinase
۹- Protein electrophoresis
۱۰- Optical density
۱۱- Nanometer
۱۲- Polyacrylamide gel

آزمون بیماریزائی :

بذور آهار ، گل جعفری[۱] ، رعنا[۲] و همیشه بهار[۳] در مخلوطی از خاک باغچه ، ماسه و تراشه پوست درخت[۴] (به نسبتهای مساوی) که اتوکلاو شده بود ، در گلدان های پلاستیکی کاشته شدند . گلدانها در گلخانه در دمای بین ۲۲ تا ۳۱ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند . گیاهان در مرحله ۶ تا ۸ برگی با سوسپانسیون باکتری مایه زنی شدند . باکتری روی محیط آگار غذائی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بمدت ۲ روز رشد داده شده و سلولها در آب مقطر استریل سوسپانسیون شدند . دانسیته نوری سوسپانسیون به ۲٪ در ۶۰۰ نانومتر تنظیم گردید .
سوسپانسیونها بوسیله محلول پاش دستی روی گیاه مورد آزمایش پاشیده شد و گیاهان زیر پوشش پلاستیکی قرار داده شدند . پس از دو روز گیاهان از زیر پلاستیک خارج و در گلخانه نگهداری گردیدند . حداقل ۱۰ بوته از هر گیاه مایه زنی شده و برای ثبت علائم بیماری مورد بازدید روزانه قرار گرفتند . به برگهای سه بوته دیگر از هر گیاه نیز سوسپانسیون رقیق باکتری (دانسیته نوری ۰/۰۴) تزریق گردید . گیاهان گروه اخیر بدون قرار گرفتن زیر پوشش پلاستیکی ، در شرایط گلخانه نگهداری شدند . برای هر گروه ۳ بوته شاهد در نظر گرفته شد که بجای باکتری با آب مقطر محلول پاشی یا تزریق شده و در شرایط مشابه نگهداری شدند .

نتیجه و بحث

جدا سازی و تعیین خصوصیات فنوتیپی :

باکشت برگهای آلوده روی محیط آگار غذائی حاوی گلوکز یک باکتری باکلنی های زرد جدا گردید . کلنی های باکتری مدور ، برجسته[۵] و لعاب دار[۶] بوده و پس از ۴ روز بقطر ۱ تا ۲- میلیمتر می رسند . در روی محیط عصاره مخمر - دکستروز - کربنات کلسیم[۷] ، زنگ کلنی ها زرد کاهی و لعاب زیادی تولید کردند . جمعاً ۴ استرین از نکاء و ۶ استرین از ساری جداگردیده و مورد برسیهای فنوتیپی قرار گرفتند . سلولهای باکتری میله ای شکل ، اغلب منفرد ، گاهی بصورتهای

۱- *Tagetis erecta*
۲- Gaillardia pulchella
۳- *Calendula officinalis*
۴- Bark shavings
۵- Convex
۶- Mucoid
۷- Yeast dextrose calcium carbonate (YDC)

و لعاب زیادی تولید کردند . جمعاً ۴ استرین از نکاء و ۶ استرین از ساری جداگردیده و مورد برسیهای فنوتیپی قرار گرفتند . سلولهای باکتری میله ای شکل ، اغلب منفرد ، گاهی بصورتهای دوتائی یا زنجیرهای کوتاه و دارای یک تاژک قطبی بودند . نتایج آزمونهای بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی استرینهای بررسی شده در جدول ۱ خلاصه شده است .

الکتروفورژ پروتئین استرینها:

پروفیل پروتئین[1] اکثر استرینهای جدا شده از آهار مشابه هم بوده ولی تفاوت های کمی بین بعضی از استرینها وجود داشت . پروفیل پروتئین های استرینهای آهار کاملاً از پروفیل *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* متمایز بود (شکل ۲) .

شکل ۲ – نقوش الکتروفورزی استرین های باکتری عامل لکه برگی آهار (۱ ، ۲ و ۳) و یک استرین *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*(۴) در ژل پلی اکریل امید.

۱– Protein profile

جدول (۱) خواص فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی استرینهای باکتری
عامل لکه برگی گل آهار

آزمون	واکنش	آزمون	واکنش
رنگ کرم	–	رشد لعاب دار	+
هیدرولیز نشاسته	+	لهانیدن سیب زمینی	+
هیدرولیز ژلاتین	+	رشد روی منابع کربن :	
		گلوکز	+
هیدرولیز اسکولین		فروکتوز	+
هیدرولیز توئین ۸۰	+	سلوبیوز	+
هیدرولیز لسیتین	+	گالاکتوز	+
هیدرولیز کارئین	+	لاکتوز	±
داکسی ریبو نوکلئاز	+	سوکروز	+
فسفاتاز	+	ملی بیوز	+
اوره از	–	مانوز	+
ارجی نین دی هیدرولاز	–	مالتوز	+
تایروزیناز	–	مانیتول	+
تولید کتولاکتوز	–	ترهالوز	+
تولید رنگ فلور سانت	–	زایلوز	±
رشد بی هوازی	–	دکسترین	+
واکنش شیر لیتموس	قلیائی	سوربیتول	–
احیاء نیترات	–	ادونیتول	–
تولید هیدررژن سولفوره	+	دلسی‌تول	–
تحمل ۴٪ نمک طعام	–	اینوزیتول	–
تحمل ۳٪ نمک طعام	±	رافی‌نوز	–
کاتالاز	+	رامنوز	–
اکسیداز	–	گلیسرین	–
واکنش متیل رد	–	اینولین	–
تولید استوئین	–	سالیسین	–
تولید اندول	–	ارابینوز	–
تولید مواد احیاء کننده از سوکروز	+	ریبوز	+

ادامه جدول ۱ از صفحه قبل

آزمون	واکنش	آزمون	واکنش
استات	±		
سیترات	+		
لاکتات			
مالونات	+		
ساکسیی نات	+		
فومارات	+		
اگزالات	–		
L – تارتارات	–		
D – تارتارات	–		
فرمات	–		
مالئات	–		
پروپیونات	–		

واکنشهای : = وجود خاصیت یا قابلیت استفاده

– = عدم وجود خاصیت یا عدم توانائی در استفاده

± = تفاوت بین استرینها در توانائی استفاده

جمعاً ۹ استرین بررسی شده اند .

بیماریزائی استرینهای آهار:

شش تا هفت روز پس از پاشیدن سوسپانسیون باکتری روی بوته ها ، لکه های زرد رنگی بقطر ۲-۱ میلیمتر در سطح برگهای آهار پدیدار گردید . دو تا سه روز پس از بروز ، مرکز لکه ها نکروزه[1] شده و با گذشت زمان قسمت نکروزه بقطر ۲ تا ۳ میلیمتر رسید . هاله زرد رنگ در اطراف اکثر لکه ها مشهود بود .

در گیاهان گل جعفری ، رعنا و همیشه بهار که با روش پاشیدن سوسپانسیون باکتری مایه زنی

۱- Necrotic

شده بودند علائمی ایجاد نگردید . در روش تزریق سوسپانسیون ، علائمی در همه گیاهان مایه زنی شده بوجود آمد . در آهار ۳ تا ۵ روز پس از تزریق ، لکه های زرد رنگ و غالبا" نکروزه بوجود آمد . هاله زرد رنگ در اطراف لکه های ایجاد شده مشخص بود . در معدودی از برگها لکه های تولید شده ابتداء کلروزه بوده ولی پس از ۲-۱ روز نکروز از وسط لکه شروع و به اطراف گسترش پیدا نمود . در رعنا و همیشه بهار فقط نکروزه ناشی از فوق حساسیت ایجاد گردید . در برگهای تزریق شده گل جعفری لکه های نکروزه قهوه ای رنگ ، پس از ۲ روز پدیدار شد . آبسوختگی مختصری در حاشیه یا قسمتهائی از سطح لکه بوجود آمده و نکروز بطور تدریجی و محدود توسعه یافت . در خارج از سطوح تزریق شده یا در برگهای مایه زنی نشده لکه ای بوجود نیامد . در گیاهان شاهد که با آب مقطر محلول پاشی یا تزریق شده بودند علائمی بروز ننمود .

مشخصات مرفولوژیکی : بیوشیمیائی و بیماریزائی استرینهای جدا شده از آهار در مازندران با خصوصیات *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* مطابقت مینماید (۳،۴،۱۲،۱۳) .

باکتری عامل بیماری لکه برگی آهار اولین بار توسط هاپکینز و داسون در سال ۱۹۴۹ از ردزیا گزارش و *Xanthomonas nigromaculans* f. sp. *zinniae* Hopkins & Dowson نامگذاری شد (۶). بیماری سپس از استرالیا (۳) ، امریکا (۵،۱۲،۱۳) ، هند (۱۰) ، ژاپن و تعدادی از کشورهای دیگر (۴) گزارش شده است . در سال ۱۹۷۸ نام این باکتری به *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* تغییر داده شد (۱۶) .

تفاوتهای کمی بین استرینهای جدا شده از مازندران با استرینهای گزارش شده از امریکا و استرالیا (۳،۴،۱۲،۱۳) وجود دارد . استرینهای مازندران در توانائی رشد روی ۳٪ نمک طعام و استفاده از لاکتوز زایلوز و استات متغییر بوده و قادر به استفاده از ارابینوز نبودند . استرینهای کشورهای یاد شده همگی روی ۳٪ نمک رشد کرده و از لاکتوز توانسته اند استفاده نمایند ولی از نظر استفاده از مانیتول و ارابیتول متغییر یاد شده اند .

استرینهای معدودی در کشورهای فوق تحت بررسی های فنوتیپی قرار گرفته اند و اطلاعات کافی از دامنه تغییرات خصوصیات های آنها موجود نمی باشد . بعلاوه وجود تفاوت های مختصر بین استرینهای مناطق مختلف دور از انتظار نمی باشد . علاوه بر وجود چند خصوصیت مختلف در بین استرینهای جدا شده از مازندران تفاوتهای مختصری نیز بین پروفیل پروتئینی این استرینها وجود داشت . دامنه میزبانی باکتری جدا شده از مازندران محدود و مشابه دامنه میزبانی *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* است (۱،۳،۴) .

استرینهای مازندران بطور معمول فقط در آهار آلودگی ایجاد نمودند . اگر چه گل جعفری پس از آلوده سازی با روش تزریق تولید لکه های نکروزه با گسترش محدودی را نمود . ولی با روش محلول پاشی آلوده نگردید . آلودگی این گیاه با مایه زنی در شرایط گلخانه در نقاط دنیا گزارش شده است (۴،۱۰) .

باکتری عامل لکه برگی آهار با بذر منتقل شده و آلودگی بذر مهمترین وسیله انتشار بیماری می باشد (۴ و ۱۳) . استفاده از بذور سالم ، حذف بوته های آلوده و سمپاشی گیاهان با سموم مسی یا انتی بیوتیکهای مناسب از روشهای مبارزه علیه این بیماری است (۱۳ و ۱۴) . تفاوت در حساسیت نسبی ارقام آهار نسبت به بیماری مشاهده شده است (۷ و ۱۲) . بیماری لکه برگی باکتریائی آهار برای اولین بار از ایران گزارش می شود .

منابع مورد استفاده

۱ - رحیمیان ، حشمت اله ۱۳۷۰ . لکه برگی باکتریائی شمعدانی در استانهای مازندران و سمنان . بیماریهای گیاهی ۲۷ : ۱ تا ۱۲ .

۲ - رحیمیان ، حشمت اله و حبشی . محمد ۱۳۷۱ . مطالعه ریز برگی مرکبات در مازندران بیماریهای گیاهی ۲۸ : ۹۷ تا ۱۰۱

3 - Bertus, A.L. and A.C. Hayward . 1971 . A bacterial leaf sport of Zinnia in New South Wales . Proc. Linn. Soc. N. S. W. 96 : 81-84 .

4 - Bradbury, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria . C.A.B. International . Slough, England , 332p .

5 - Holcomb, G.E., C. Hollier and H.K. Whitam . 1985. First report of bacterial leaf and flower spot of zinnia in Louisiana. Plant Dis . 69 : 360 .

6 - Hopkins, J.C. and W.J. Dowson. 1949 . A bacterial leaf and flower disease of zinnia in Southern Rhodesia . Trans . Brit . Mycol , Soc . 32 : 252-254 .

7 - Jones, J.J. and D.L. Strider. 1979 . Susceptibility of zinnia cultivars to bacterial leaf spot caused by Xantho . monas nigromaculans f. sp. zinniae. Pland Dis . Rep . 63 : 449-453 .

8 - Lelliott, R.A., E. Billing and A.C. Hayward. 1966 . A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads . J. Appl. Bacteriol . 29 : 470-489 .

9 - Rahimkian, H. 1986 . Bacterial stripe of rice in Iran. Iran Agric . Res . 5 : 63-71d .

10 - Rangaswami, G. and S.S. Gowda. 1963 . On some bacteriai diseases of ornamentals and vegetables in Madras . state . Indian Phytopathol. 16 : 74-85 .

11 - Schaad, N.W. 1988 . Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd ed. Amer . Phytopathol . Soc . Press, St. Paul, Minnesota, USA.

12 - Sleesman, J., D.G. Whidte, and W. Ellett. 1973 . Bacterial leaf spot of zinnia : Anew disease in North America . Plant Dis . Rep . 57 : 555-557 .

13 - Strider, D.L. 1973 . Bacterial leaf and flower spot of zinnia in North Carolina . Plant Dis. Rep. 57 : 1020 .

14 - Strider, D.L. 1976 . An epiphytptic of bacterial leaf and flower spot of zinnia . Plant Dis. Rep. 60 : 342-344 .

15 - Tamura, M. 1982 . Bacterial leaf and flower spot of zinnia caused by *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* (Hopking & Dowson 1949) Dye 1978 .Ann. Phytopathol . Soc. Jpn. 48 : 532-533 .

16 - Young, J.M., D.W. Dye, J.F. Bradbury, C.G. Panagopoulos and C.F. Robbs. 1978 . Aproposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria . New Zealand J. Agric . Res. 13 : 315-324 .

BACTERIAL LEAFSPOT OF ZINNIA IN MAZANDARAN

H. Rahimian

College of Agriculture, Mazandaran University, Sari, Iran

SUMMARY

A bacterial leafspot of Zinnia elegans was found in several locations in eastern Mazandaran. The lesions were brown and necrotic in the center and surrounded by a chlorotic halo. The incitant bacterium was identified as *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*. Strains were found to vary slightly in phenotypic features and in their electophoretic profiles of cell proteins.