فصلنامه تحقیقات بیماری های گیاهی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹۲
صص ۸-۱

بررسی باکتری‌های رو رست علف‌های هرز در باغ‌های میوه دانه‌دار در استان خراسان رضوی

اسفندیار ظهور پرالک [۱]

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۲٤

چکیده

علف‌های هرز همواره موجب بروز مشکل جدی و آلودگی در باغ‌های میوه دانه‌دار شده و میزبان اولیه، ثانویه و رورستی (اپی‌فیتی) برخی از باکتری‌های مهم گیاهی هستند که در صورت انتقال به محصول اصلی باعث صدمه و یا ایجاد بیماری می‌شوند. علف‌های هرز شایع و مهم در باغ‌های میوه شامل علف‌های هرز یک ساله و چند ساله می‌باشند. در این پژوهش طی دو سال بررسی میزبان‌های ثانویه، مهم‌ترین علف‌های هرز بهاره و دائمی باغ‌های میوه چناران، گلمکان، قوچان، نیشابور، فریمان و حومه مشهد جمع‌آوری شد. گیاهان فوق شناسائی و جهت تعیین باکتری‌ها، به روش‌های فنوتیپی معمول باکتری-شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس باکتری‌های مهم تعیین و قابلیت ایجاد بیماری و وضعیت رورستی آن‌ها مطالعه شد. نتایج نشان داد باکتری‌هائی از جنس .*Xanthomonas* sp، .*Pseudomonas* sp و .*Pantoea* sp بصورت رورستی بر روی یولاف وحشی، قیاق، پنجه مرغی، فرز، جو خودرو و پوآ وجود دارند. باکتری‌های فوق در فصل بهار از روی این گونه‌ها قابل جدا سازی بودند. باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از برخی علف‌های هرز تیره گرامینه Poaceae جداسازی و گزارش گردیده است. باکتری *Erwinia amylovora* عامل آتشک گلابی از علف هرز پنجه مرغی و فرز در باغ بسیار آلوده به این باکتری جداسازی گردید.

واژه‌های کلیدی: باکتری، رورست، علف هرز

[۱]- مربی پژوهش و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
* نویسنده مسئول مقاله: zohourpp@yahoo.co.in

مقدمه

حضور علف‌های هرز در زیر درختان میوه و در رقابت با آنها در استفاده از منابع غذایی سبب کاهش رشد و عملکرد محصول می‌گردد. هم‌چنین این عوامل ناخواسته پناهگاهی برای جوندگان، حشرات و عوامل بیماری‌زا در این اکوسیستم‌ها می‌باشند. علف‌های هرز چند ساله را در مرحله پیش کاشت در مقایسه با مراحل بعدی بسیار آسان‌تر می‌توان مهار کرد (Ghadiri, 2002). علف‌های هرز دارای مناسب‌ترین روش‌های بقا می‌باشند به‌گونه‌ای که بذور آنها به‌وسیله دام‌ها، پرندگان حیوانات وحشی و باد پراکنده می‌شوند (Rashed Mohaseel and Mousavi, 2007). در حال حاضر، خسارت علف‌های هرز در کشورهای در حال توسعه با اعمال روش‌های گوناگون کنترل، کاهش عملکردی در حدود ۱۰٪ را موجب شده است (Kropff and Vanlour, 1993). باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی برای مدت‌های طولانی در شرایط نامساعد دوام آورده از مکان‌های ذخیره، آزاد شده و گیاهان را آلوده کرده و بدین وسیله تشکیل کانون‌های آلودگی را می‌دهند. این دوره، چرخه اولیه یا آلودگی اولیه نامیده می‌شود. جمعیت بیماری‌زا در کانون‌های اولیه از جمله علف‌های هرز یک‌ساله و چند ساله افزایش یافته و سپس به راه‌های گوناگون به سایر نقاط باغ انتشار می‌یابد و منجر به آلودگی‌های ثانوی می‌شوند. سپس در شرایط محیطی مساعد موجب همه‌گیری و یا فاز اپی‌فیتی می‌شوند (Mohammadi, 1999). بین عوامل باکتریایی، باکتری‌هایی از جنس و گونه‌های (*Pseudomonas* spp. (*P.* spp.)، *Xanthomonas* spp. (*X.* spp.) و *Erwinia* ssp. (*Er* spp.)) بر روی گیاهان هرز یک‌ساله و چند ساله یا درختان میوه بصورت اپی‌فیت یا بیماری‌زا وجود دارند (Samuel, 2007) که از نظر اقتصادی دارای خسارت قابل توجهی هستند. لذا در این پژوهش وضعیت باکتری‌های فوق بر روی علف‌های هرز به عنوان میزبان‌های ثانوی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

کارهای انجام شده شامل دو قسمت جمع‌آوری و شناسائی علف‌های هرز و تعیین باکتری‌های بدست آمده است.

۱- جمع‌آوری علف‌های هرز: برای این منظور در دو سال اجرای طرح از علف‌های هرز باغ‌های مورد بررسی ازشهرستان‌های چناران، گلمکان، قوچان، نیشابور، فریمان و حومه مشهد در ماه‌های فروردین، اردیبهشت و خرداد (فصل بهار) و در ادامه در فصول تابستان و پائیز ۲۰۸ نمونه علف هرز از باغ‌های سیب (*Malus communis* Lamk.)، گلابی (*Pyrus communis* L.) و به (*Cydonia oblonga* Mill.) جمع‌آوری شد. در هر بازدید نمونه‌ها برای شناسائی به بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مشهد منتقل گردید. در جمع‌آوری نمونه‌ها از کادر یک در یک استفاده شد که به ازای هر هکتار باغ ۵ مرتبه به‌گونه تصادفی در طول قطر زمین انداخته شد.

۲- تعیین باکتری‌های بدست آمده: اندام‌های علف‌هرز به قطعات کوچک تقسیم و از هر نمونه حدود ۱۰گرم بافت در فلاسک‌های ۲۵۰میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و به مدت یک ساعت روی دستگاه تکان دهنده (Shaker) با ۱۰۰ حرکت در دقیقه شستشو شدند. آب شسته بدست آمده از پارچه ململ عبور داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. رسوب بدست آمده در سه میلی‌لیتر آب مقطر بصورت سوسپانسیون در لوله در آمد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (Gross and Cody, 1983). پس از کشت سوسپانسیون بدست آمده مرفولوژی کلنی‌ها روی محیط NAS و KB بررسی شد. در برخی موارد سوسپانسیون از مرز بافت سالم و آلوده تهیه و بر روی محیط کشت بصورت مخطط کشیده شد.

سایر آزمایش‌های، بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و تغذیه‌ای باکتری‌های جدا شده به روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی انجام گردید (Schaad, 2001; Fahy and Pesley, 1983).

از جدایه‌های شناخته شده *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall ارسالی به‌وسیله دکترکالوزنا، بخش بیماری‌های گیاهی نهاد تحقیقات میوه‌های دانه‌دار و گیاهان زینتی لهستان (Research Institute of Pomology and Floriculture, Department of Plant Pathology, Poland) جهت مقایسه در آزمون‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

علف‌های هرز شایع و مهم در باغ‌های میوه شامل علف‌های‌هرز یک ساله مانند یولاف وحشی (*Avena fatua* L.)، جوخودرو (*Hordeum vulgare* L.)، تاجریزی (*Solanoum nigrum* L.)، سلمه (*Chenopodium album* L.)، تاتوره (*Datura stramonia* L.) و پوآ (*Poa* sp.) و چند ساله مثل تلخه (*Acroptilon repens* L.)، کنگر وحشی (*Cirsium arvens* (L.) Scop.)، پیچک صحرائی (*convolvulus arvensis* L.)، اویارسلام زرد (*Cyperus esculentus* L.)، اویارسلام قرمز (*Cyperus rotundus* L.)، قیاق (*Sorghum halepense* L.)، پنجه مرغی (*Cynodoun dactylon* L.) و فرز (*Agropyron repense* L.) بود (جدول۱). علف‌های هرز فوق در این باغ‌ها مشکلات فراوانی ایجاد می‌نمایند. به عنوان مثال پیچک با پیچیدن به دور شاخه‌ها مانع رشد مناسب درختان می‌گردد. هم‌چنین گونه‌هائی مانند، قیاق و کنگر وحشی با قدرت رقابت بالا بویژه در جذب آب و مواد غذائی در رشد درختان اختلال ایجاد می‌کند. نتایج نشان داد باکتری‌هائی از جنس *X.* spp. ،*P.* spp. و *Pantoea herbicola* روی یولاف وحشی، قیاق، پنجه مرغی، جو خودرو و پوآ وجود دارند. باکتری‌های فوق در اوایل تا اواخر بهار از روی این علف‌ها قابل جداسازی بودند و با افزایش دما و کاهش رطوبت، کاهش می‌یابند که با نتایج بدست آمده به‌وسیله سایر محققین مطابقت دارد (Lindow *et al*., 1978; Sahragard *et al*., 1977). باکتری‌های گروه *herbicola* شامل اروینیاهائی است که معمولا "نوعی رنگدانه زرد رنگ تولید می‌نمایند. برخی از اعضای این گروه مثل *Pantoea herbicola* اپی‌فیت غیر بیماری‌زای گیاهی هستند و در هر موقعیت زمانی و مکانی وجود دارند و از تمامی علف‌های هرز جمع‌آوری شده قابل جدا سازی بودند (جدول۱).

جدول۱- میزبان، محل جمع‌آوری و باکتری‌های مهم گیاهی جدا شده از علف‌های هرز شایع در باغات میوه دانه‌دار

تعداد نمونه	محل جمع آوری	میزبان	نوع باغ	باکتری‌های جدا شده
۱۶	چناران، قوچان نیشابور و حومه مشهد	یولاف وحشی	سیب و به	*Ph*[1], *X.* spp.[2], *P.* spp.[3], *Pss*[4]
۲۷	چناران، گلمکان، قوچان نیشابور فریمان و حومه مشهد	جو خود رو	سیب،گلابی و به	*Ph*, *X.* spp., *P.* spp., *Pss*
۱۵	گلمکان، نیشابور، فریمان و حومه مشهد	تاج ریزی	سیب،گلابی و به	*Ph*
۲۲	چناران، ، قوچان، نیشابور، فریمان و حومه مشهد	سلمه	سیب،گلابی و به	*Ph*
۱۲	چناران، قوچان، نیشابور، فریمان و حومه مشهد	تاتوره	سیب،گلابی و به	*Ph*
۱۲	قوچان فریمان و حومه مشهد	پوآ	سیب،گلابی و به	*P.* spp., *X.* spp., *Ph*
۱٤	چناران، قوچان نیشابور و حومه مشهد	کنگر وحشی	سیب و گلابی	*Ph*
۲۰	چناران، قوچان، نیشابور فریمان و حومه مشهد	پیچک صحرایی	سیب،گلابی و به	*Ph*
۱۲	قوچان نیشابور فریمان و حومه مشهد	اوریاسلام زرد	سیب،گلابی و به	*Ph*
۱۰	گلمکان، قوچان و نیشابور	اوریا سلام قرمز	سیب،گلابی و به	*Ph*
۸	قوچان، نیشابور وفریمان	قیاق	سیب،گلابی و به	*P.* spp., *X.* spp., *Ph*
۱۸	چناران، قوچان، نیشابور، فریمان و حومه مشهد	پنجه مرغی	سیب،گلابی و به	*Ph, Ea*
۲۲	چناران، گلمکان، نیشابور و حومه مشهد	فرز	گلابی و به	*Ph, Ea*

1- *Pantoea herbicola*, 2-*Xanthomonas* spp., 3-*Pseudomonas* spp., 4-*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 5-*Erwinia amylovora*

بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌هایی از *Pseudomonas syringae* (*Ps*) و *P. herbicola* (*Ph*) تعیین هویت شدند که قبلا به عنوان عوامل مولد هسته یخ (Ice nucleation active bacteria) تشخیص داده شده‌اند (Bultreys and Kaluzna, 2010; Lelliot *et al*., 1966; Schaad, 2001) (جدول۲).

هم‌چنین جدایه‌هایی *Pss* از چند علف‌های هرز تیره گرامینه (Poaceae) جداسازی گردید. این جدایه‌ها گرم منفی، میله‌ای شکل و هوازی بودند. پرگنه آنها بر روی محیط غنی از سوکروز دارای لوان بوده و رنگدانه فلورسنت بر روی محیط King's B تولید نمودند. توانایی استفاده از فروکتوز، گلوکز و سوکروز را داشته، هم‌چنین کاتالاز مثبت، اکسیداز و آرجی نین دی هیدرولاز منفی بوده و قادر به لهانیدن برش‌های سیب زمینی نبودند. آنها در برگ‌های توتون و شمعدانی فوق حساسیت ایجاد کردند. بر روی میوه گلابی بعد از دو روز لکه‌های نکروز تولید نمودند (شکل۱) و بر اساس ویژگی‌های یاد شده و خصوصیات دیگر شباهت بسیار بالایی به *P. s.* pv. *syringae* دارند (Kaluzna *et al*., 2010; Mohammadi *et al*., 2001; Schaad, 2001) (جدول۱) که قبلاً به عنوان بیماری بلاست از درختان گلابی برای اولین بار از ایران گزارش گردیده است (Zohour Paralak *et al*., 2002).

شکل ۱- لکه‌های نکروز روی میوه گلابی بعد از مایه زنی با *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

جدول۲- خصوصیات باکتری‌های جدا شده از علف‌های هرز بر اساس آزمون‌های فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

آزمون	*P. syringae* pv. *syringae*	*P. herbicola*	*Xanthomonas* spp.
واکنش گرم	-	-	-
اکسیداز	-	-	-
کاتالاز	+	+	+
رشد هوازی	+	+	+
رشد بی‌هوازی	+	+	-
لهانیدن ورقه های سیب زمینی	-	-	-
اوره آز	-	-	-
احیا نیترات	-	-	-
آرجی نین دی هیدرولاز	-	+	-
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	-	-	+
هیدرولیز توئین ۸۰	-	-	+
تولید هسته یخ	+	+	-
تولید H_2S از پپتون	-	+	v
تولید لوان	+	-	-
تولید هاله فلورسنت	+	-	-
رشد روی نمک طعام ۵٪	+	+	-
فوق حساسیت در شمعدانی	+	-	d
فوق حساسیت روی توتون	+	-	d
لکه سیاه روی میوه گلابی	+	-	-
تولید اسید از :			
گلوکز	+	+	+
فروکتوز	+	+	+
مانیتول	+	+	-
گلیسرول	+	+	+
لاکتوز	-	+	+
مالتوز	-	+	+
گالاکتوز	+	+	+
مانوز	–	d	+
سوکروز	+	+	+
اینولین	–	*	-
نشاسته	–	*	+
دکسترین	–	*	+
استفاده از :			
سیترات	+	*	-
فومارات	+	*	+
ساکسینات	+	*	+
لاکتات	+	*	+
اگزالات	–	*	-
فرمات	–	*	+
بنزوات	–	*	-

– : واکنش منفی، عدم وجود فعالیت یا عدم استفاده از ترکیبات + : واکنش مثبت، وجود فعالیت یا استفاده از ترکیبات

v : واکنش متغیر (مثبت یا منفی) d : بعد از چند روز واکنش مثبت شد *: آزمون انجام نشد

باکتری *P. herbicola* از تمامی نمونه‌ها و میزبان‌ها بدست آمد، هجده جدایه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از یولاف وحشی و یازده جدایه *Xanthomonas* spp. از یولاف وحشی، جوخودرو، پوآ و قیاق بدست آمد. مشخصات میزبان، تعداد نمونه‌ها، محل جمع آوری نمونه‌ها و جدایه‌های بدست‌آمده در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. نتایج سایر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی حاصل از نمونه‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است. باکتری *Erwinia amylovora* (*Ea*) عامل آتشک گلابی از علف هرز پنجه مرغی و فرز از باغ به بسیار آلوده به این باکتری از منطقه گلمکان و بخش خرو از شهرستان نیشابور جداسازی گردید که می‌تواند به علت تراوشات زیاد باکتری بر روی علف‌هرز چند ساله در کف باغ باشد. در بین عوامل باکتریایی، باکتری‌هایی از جنس و گونه‌های *Pseudomonas* spp.، *Xanthomonas* spp. و *Pantoea* spp. روی گیاهان هرز یک ساله یا چند ساله یا درختان میوه بصورت رورست یا بیماری زا وجود دارند. این باکتری‌ها به روش‌های گوناگون بر روی درختان میوه دانه‌دار منتقل شده و باعث بروز خسارت می‌گردند. بیش‌تر گیاهان به‌وسیله جمعیت‌های بالایی از یک یا چند گونه باکتری بصورت رورست (اپی فیت) پوشیده (کلونیزه) می‌شوند. تغییرات فصلی زیادی در جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ روی گیاهان یک ساله و چند ساله گزارش شده است. جمعیت کم از باکتری‌های فوق معمولا روی بافت‌های گیاهان چند ساله در زمستان یا برگ‌های کوتیلدونی گیاهان یک ساله دیده می‌شود (Lindow *et al.*,1978). تاکنون از علف‌های هرز تیره گرامینه، لگومینوز و سولاناسه باکتری‌هائی وابسته به جنس‌های متعدد گزارش گردیده است (Samuel,2007; Eskandari *et al.*,2008). لذا پیشنهاد می‌شود جدایه‌های زیادی از محصولات متفاوت زراعی، باغی و میزبان‌های ثانوی از مناطق گوناگون کشور جمع‌آوری و مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گیرند. تا موقعیت تاکسونومیکی هر کدام از باکتری‌های بدست آمده و رابطه احتمالی آنها با میزبان ثانوی و محصول اصلی مشخص شده و زیر گونه‌های احتمالا جدید شناسایی شوند.

References

1. Bultreys A and Kaluzna M. 2010. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morspruorum* race 1 and race 2. Journal of Plant Pathology 92(1, Supplement), S1 21–S1 33.
2. Eskandari F, Bruckart W L, Schaad N W, Sechler A J, Postnikova E N, Caesar A J and Coombs E. 2008. First report of crown gall caused by *Agrobacterium* sp. on diffuse knapweed *(Centaurea diffusa)*. Plant Disease 92: 487.
3. Fahy P C and Persley C J. 1983. Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide. Sidney, Australia: Academic Press.
4. Ghadiri H. 2002. Weed Science Principles and Practices (translation). Shiraz, Iran: University of Shiraz Press.
5. Gross D C, Cody Y S, Proebsting E L, Radamaker G K and Spott T A. 1983. Distribution, population dynamics, and characteristics of ice nucleation -active bacteria in deciduous fruit tree orchards. Applied and Environmental Microbiology 46: 1370–1379.
6. Kaluzna M, Ferrante P, Sobiczewski P and Scortichini M. 2010. Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-pcr and mlst. Journal of Plant Pathology 92(3): 781–787.
7. Kropff M J and Vanlour H H. 1993. Crop-Weed Interactions. Wallingford, UK: CAB International.
8. Lelliot R A, Billing E and Hayward A C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. Journal of Applied Bacteriology 29: 470–489.
9. Lindow S E, Arny D C and Upper C D.1978. Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature. Applied and Environmental Microbiology 36: 831–838.
10. Mohammadi M. 1999. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology (translation). Tehran: University of Tehran Press.
11. Mohammadi M, Ghasemi A and Rahimian H. 2001. Phenotypic characterization of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall, the causal agent of bacterial canker disease of stone fruit trees. Journal of Agricultural Science and Technology 3: 51–56.
12. Sahragard N, Banihashemi Z and Taghavi M. 1977. Identification of ice nucleation active bacteria on stone fruits in Fars province. Iranian Journal of Plant Pathology 33: 209–215.
13. Schaad N W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press. 158 p.
14. Rashed Mohaseel M H and Mosavi S K. 2007. Principles in Weed Management (translation). Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad Press.
15. Samuel S G. 2007. Plant-Associated Bacteria. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
16. Zohour Paralak E, Rahimian H, Arab F and Nikravesh Z. 2002. Pear blast disease in Khorasan. Paper presented at: 15th Iranian Plant Protection Congress; 7–11 September; Kermanshah, Iran.