مقایسه روش‌های کنترل بیماری لکه برگی باکتریائی هسته داران در باغ‌های استان گلستان

سعید نصراله نژاد[۱]، کامران رهنما[۱] و عمران عالیشاه[۲]
[۱]اعضای هیات علمی بخش گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]عضو هیات علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان
پست الکترونیک: snasrollanejad@ yahoo.com

چکیده

بیماری لکه برگی باکتریایی از بیماری‌های مهم درختان میوه هسته‌دار در استان گلستان است که در چند سال گذشته علاوه‌بر شانکر باکتریایی *Pseudomonas syringae pv. syringae* درختان میوه هلو و آلو شناسایی شده است. این باکتری تولید پرگنه‌های زرد تا نارنجی روی محیط کشت YDC، NAG و NAC نمود. این باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی، احیاء نیترات منفی، استفاده از اغلب منابع کربنی مثل ترهالوز، دی فرکتوز و ساکاروز مثبت بودند. متحمل در حضور نمک طعام ۲ درصد مثبت، اما در حضور نمک طعام ٦ درصد منفی بودند. با توجه به سایر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ظاهر شدن علائم بیماری پس از یکماه با اثبات تست بیماریزایی روی نهال هلو (ردکاپ، دکسی رد و ارکی گلو) عامل بیماری بنام *Xanthomonas arboricola pv. pruni* تشخیص داده شد. جهت بررسی و کنترل این بیماری با استفاده از طرح آماری کامل تصادفی در شرایط باغ در دو منطقه از استان در چهار تکرار از هر رقم با استفاده از سموم مسی در دوزهای مختلف در سه مرحله (دی ماه، اسفند ماه و اواخر فروردین ماه) سمپاشی شدند. نتایج سمپاشی نشان تفاوت آماری معنی داری در بین تیمارهای مختلف وجود دارد. ترکیب بردو بیشترین تأثیر (کاهش آلودگی تا میزان ۵ درصد) نسبت به شاهد (۳٤ تا ٤۵ درصد آلودگی) داشته است. پس از آن به‌ترتیب محلول بردو، بردو اکسی کلرورمس و محلول بردو اکسی کلرورمس و بردو بهترین تأثیر را داشتند. کمترین تأثیر مربوط به زمانی بود که در هر سه مرحله سمپاشی اکسی کلرورمس بکار گرفته شد. از بین ارقام مختلف شلیل رقم ردگلو حساسترین و ارقام سانکین و نکتارد با کمترین میزان آلودگی (به‌ترتیب ۳ و ٤ درصد) متحمل‌ترین ارقام شناخته شدند. از بین ارقام آلو، رقم سانتاروزا حساسترین و ارقام آلوبخارا و گوجه سعدی کاملاً عاری از آلودگی بودند. وضعیت آلودگی در بین ارقام هلو، به‌ترتیب ارقام ارلی گلو و اسپرینگ کرست متحمل‌ترین و ارقام ردکاپ، دکسی رد و هلو انجیری (٤۸ درصد آلودگی) به‌ترتیب حساسیت زیادی نسبت به عامل بیماری برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: عامل بیماری لکه برگی باکتریایی، مبارزه شیمیایی، محلول بردو، اکسی کلرورمس

مقدمه

بیماری لکه برگی باکتریائی (شانکر) درختان میوه هسته‌دار یکی از مهمترین بیماری‌های باغ‌های هلو، شلیل، آلو و... در اکثر نقاط دنیا از جمله ایران (استان های گلستان و مازندران) می‌باشد که علائم بیماری غالبا بصورت خشکیدگی سرشاخه‌ها، ایجاد زخم و تراوش صمغ از محل آلودگی، ایجاد لکه یا زخم‌های ریز و برجسته قهوه‌ای رنگ روی پوست میوه، سوراخ شدن پهنک برگ و در نهایت باعث خشک شدن شاخه‌های اصلی و مرگ درخت می‌گردد. اولین گزارش از بیماری لکه برگی و شانکر هسته‌داران مربوط به برژنیسکی (۱۹۰۲) بوده (۱۹) که عامل بیماری شانکر درختان زردآلو و گیلاس را در منطقه کراکو لهستان یک نوع باکتری تشخیص داد. سپس محققین آلمانی شانکر باکتریائی را که موجب خسارت شدید درختان گیلاس در آلمان گشته بود را گزارش و عامل بیماری را *Pseudomonas spongiosa* نامید (٦). در اسپانیا عامل صمغ زدگی گیلاس را باکتری *Ps. Cerasus* نامید (۱۲). در آمریکا تحقیقات زیادی را روی بیماری شانکرو علت صمغ زدگی در کالیفرنیا انجام شده و نکات مهمی در این زمینه روشن گردید (۱۷). در انگلستان بین سال‌های ۱۹۲۸ تا ۱۹٤۰ طی بررسی بیماری لکه برگی باکتریائی و شانکر, تیپ‌های مختلف مشخص گردید و دو گونه *Ps. Mors-prunorum* و *Ps. Prunicola* را عامل بیماری ذکر کرد (٦).

شکل ۱- علائم بیماری لکه برگی باکتریائی روی میوه شلیل (سمت راست) و غربالی شدن روی برگ (سمت چپ).

الیوت (۱۹۵۱) تمام این گونه‌ها را بجز *Ps.Mors-prunorum* را تحت عنوان *Pseudomonas syringae* نامگذاری کرد. در ایران بیماری شانکر درختان زرد آلو و گیلاس در اصفهان و در اطراف تهران با عامل *P. syringae* تشخیص و گزارش شده است (۷ و۲). عامل بیماری شانکر هسته‌داران (زرد آلو، هلو و آلبالو) در منطقه ییلاقی غرب مازندران و از استان‌های چهار

محال و بختیاری، تهران، فارس و مازندران نیـز گـزارش گردیـد (۱ و ٤). همچنـین شـمس بخـش و رحیمیان (۱۳٦۸) از مازندران و باکتری *P.syringae* را از روی هسته داران بـه‌عنوان عامـل شـانکر معرفی کردند (۱۸).

در چند سال اخیر بـاکتری *Xanthomonas arboricola p.v. pruni* از روی درختـان میـوه هسته‌دار در استان گیلان جداسازی و گزارش شد (۳). در ایران کارهای چندانی در رابطه با مبـارزه بـا این بیماری صورت نگرفته است و در سالهای اخیر این بیماری در باغهـای اسـتان گلسـتان در سـطح وسیعی گسترش و اپیدمی شده است بطوری که در برخی از سـال‌ها در بعضـی بـاغهـا تـا صددرصـد آلودگی نیز مشاهده شده است (نگارنـدگان). در ایـن مقالـه سـعی شـده تـا روش مبـارزه شـیمیائی و همچنین ارقام متحمل مناسبی برای کنترل این بیماری در منطقه بدسـت آورده و بـه باغـداران معرفـی گردد.

مواد و روش‌ها

روش جدا سازی عامل بیماری: شاخه‌های دارای علائم بیماری شانکر با آب معمولی شسـته و پـس از شستشو در آب مقطر استریل, از حد فاصل نسج آلوده و سالم, پرپاراسیون تهیـه گردیـد مقـداری از نسج این ناحیه در آب مقطر استریل له گشته و روی محیط کشت مصـنوعی آگـار مغـذی (N.A) در تشتک پتری دیش کشت و در دمای ۲۷ درجه نگهداری شدند. کلنی ۳ تا ۵ روزه را تک ایزوله کرده و روی محـیط کشـت King-B و آگـار مغـذی حـاوی ۵ درصـد سـاکارز در تشـتک پتـری منتقـل و مشخصات کلنی مطالعه گردید. برای تشخیص افتراقی جنس و گونه، از محیط کشت آگار مغذی, شـیر تورنسل دار, ژلاتین غذائی, عصاره مخمر, پپتون و پروتئوزپپتون استفاده شد. برای بررسی تولیـد لـوان از محیط کشت آگار مغذی حاوی سوکروز ۵ درصد از روش شاد (۲۰۰۱)، تولید آنزیم کاتـالاز از آب اکسیژنه ۲۰درصد، هیدرولیز نشاسته از محیط کشت آگار مغذی حاوی دو دهم درصد نشاسته و معرف لوگل بروش بلازویک (۱۷)، تولید آنزیم لیپاز از روش سیرا (۸)، آزمون لهیـدگی سـیب‌زمینی و احیـاء نیتـرات از روش لیـوت (۱۱)، میـزان تحمـل نمـک طعـام از محـیط کشـت دای (۱۹٦۲) Yeast Salt Broth(YSB)، آزمون ام – آر– وای – بی (M.R.V.P) از محیط کشت دای، آزمون آرژنین دی هیدرولاز از محیط کشت تورنلی و برای مشاهده کپسول از مرکب چین وبرای دیدن تازک

از روش لایف سن (۱۵)، فوق حساسیت (HR) در برگ گیاه شمعدانی با روش کلمنت و همکاران (۱٤) صورت گرفت.

آزمون بیماریزایی: برای این منظورسوسپانسیون سلول باکتری و آب مقطر استریل (شاهد) روی گیاهان میزبان (هلو و شلیل و.....) و میوه گلابی نارس مایه‌زنی گردید. بعد از اینکه سوسپانسیون باکتری زیر پوست شاخه‌های جوان تزریق گردید، علائم بیماری بین یک تا سه ماه مد نظر و مورد بررسی قرارگرفت. همچنین تزریق سوسپانسیون رقیق باکتری (10^6 سلول باکتری در میلی‌لیتر) چهار جدایه به چهار برگ جوان نهال هلو دو ساله به اثبات رسید. بررسی‌هایی جهت پیدا کردن ارقام مقاوم و کنترل شیمیائی بصورت طرح بلوک کامل تصادفی با ٤ تکرار در ۷ تیمار به اجرا در آمد.

مقایسه روش‌های مختلف کنترل شیمیائی بیماری: بمنظور مقایسه روش‌های مختلف کنترل لکه برگی باکتریایی هسته‌داران طرح بلوک کامل تصادفی با ۷ تیمار در ٤ تکرار در دو منطقه (گرگان و علی آباد) و در گنبد بصورت سه تیمار مستقل به اجرا درآمد.

تاریخ مرحله اول سمپاشی ۲۰ دی ماه ۱۳۸۳ بود و تاریخ دومین سمپاشی۱۷ اسفند ۸۳ و تاریخ سومین سمپاشی ۲۷ فروردین ۸٤ (بعد از گل دهی) انجام شده است. مرحله اول و دوم سمپاشی (اکسی کلرور مس۲۰درصد، ۵ در هزار) و ترکیب بردو (۱۸ درصد) در مرحله اول ۱۰ در هزار ولی در مرحله دوم ۵ در هزار صورت گرفته است. هر درخت به‌عنوان یک تکرار (برای آماربرداری از هر درخت ۲٤ سرشاخه) در نظر گرفته شد. در مجموع ۲٤ درخت در هر منطقه مورد بررسی قرارگرفتند. آمار برداری به فاصله یک ماه بعد از گلدهی در سه مرحله متوالی (به فاصله یک ماه) انجام شد در نهایت داده‌های بدست آمده با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با برنامه کامپیوتری ساس تجزیه آماری گردیدند.

روش بررسی عکس العمل ارقام به بیماری شانکر: سوسپانسیون رقیق باکتری (10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر) با سمپاش تراکتوری در سطح باغ روی درختان مورد نظر اسپری شد و از طرفی یک شاخه آلوده از سال قبل را روی هر درخت برای انتشار بهتر باکتری عامل بیماری روی آنها قرار گرفت. ارقام مختلف درختان میزبان (پس از بررسی و شناسایی) برای واکنش آنها به آلودگی، درصد آلودگی با شمارش تعداد شاخه‌های آلوده به باکتری سنجیده شدند و از هر رقم چهار درخت، ٤ تا ٦ ساله (ارقام رایج محلی و تجاری تیمارهای مورد آزمایش ما محسوب شدند) انتخاب شدند. مقایسه آماری (طرح

کامل تصادفی) در شرایط باغ به اجراء و داده‌های بدست آمده بـا آزمـون چنـد دامنـه‌ای دانکـن مـورد مقایسه قرار گرفتند و از بین ارقام مختلف، مقاومترین و حساسترین رقم معرفی و شناسایی شدند.

جدول ۱- تیمارهای مورد آزمایش و نوع سموم و مراحل استفاده.

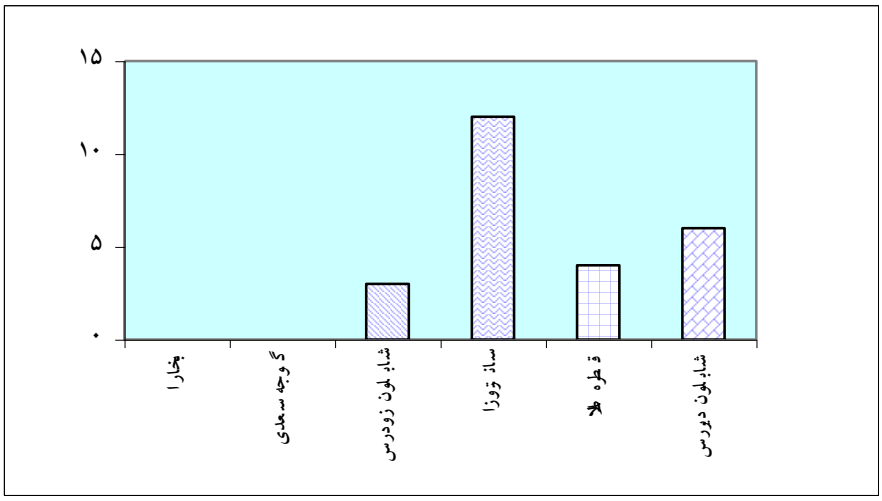
ردیف	نام محل	مرحله اول سمپاشی	مرحله دوم سمپاشی	مرحله سوم سمپاشی
۱	شصت کلا ته	ترکیب بردو	اکسی کلرورمس	ترکیب بردو
۲	شصت کلا ته	ترکیب بردو	ترکیب بردو	ترکیب بردو
۳	شصت کلا ته	شاهد	شاهد	شاهد
٤	شصت کلا ته	اکسی کلرورمس	اکسی کلرورمس	اکسی کلرورمس
٥	علی آباد	اکسی کلرورمس	اکسی کلرورمس	اکسی کلرورمس
٦	علی آباد	اکسی کلرورمس	ترکیب بردو	اکسی کلرورمس
۷	علی آباد	شاهد	شاهد	شاهد
۸	علی آباد	ترکیب بیولوژیک	ترکیب بیولوژیک	ترکیب بیولوژیک
۹	علی آباد	ترکیب بردو	ترکیب بردو	ترکیب بردو
۱۰	علی آباد	ترکیب بردو	اکسی کلرور مس	ترکیب بردو
۱۱	گنبد	شاهد	شاهد	شاهد
۱۲	گنبد	ترکیب بردو	ترکیب بردو	ترکیب بردو
۱۳	گنبد	اکسی کلرورمس	اکسی کلرورمس	اکسی کلرورمس

نتایج و بحث

خصوصیات مرفولوژیک و فیزیولوژیک و بیو شیمیائی جدایه‌های باکتری از میزبان‌های هلو، شـلیل و آلو به‌شرح زیر بودند:

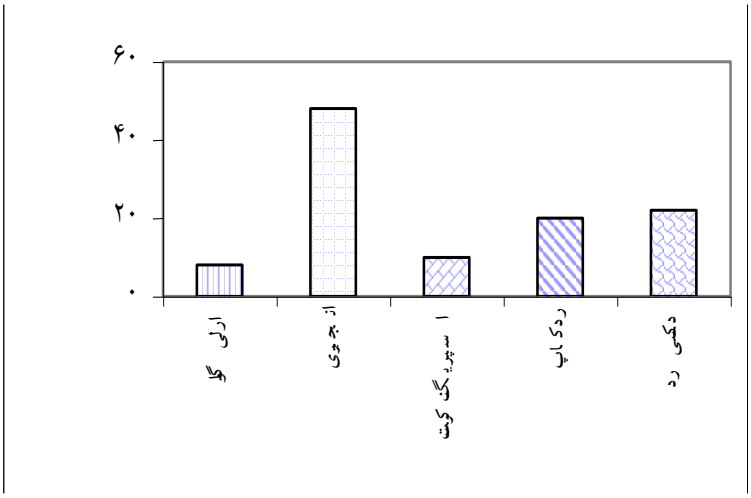
تولید پرگنه‌های زرد یا نارنجی وموکوئیدی روی محیط NAS, NAG, YDC مثبت بوده است. واکنش گرم منفی، رشد بی هوازی- هوازی O/F، نتیجه هوازی، هیـدرولیز نشاسـته منفـی، هیـدرولیز ژلاتین بعضی جدائیه‌ها مثبت و بعضـی منفـی، واکـنش فـوق حساسـیت در شـمعدانی (HR) مثبـت، چسبندگی در محیط YDC مثبت، تحرک مثبت، کاتالاز مثبت و منفی، اکسـیداز منفـی، احیـاء نیتـرات منفی، استفاده از نیترات مثبت و منفی، لوان مثبت، تجزیه پروتئین شیر مثبت و منفی، هیـدرولیز چربـی مثبت و منفی، تحمل در نمک طعام ۲ درصد مثبت، ۳درصد منفی و مثبت، ٦ درصد منفـی، اسـتفاده از

منابع کربنی: ترهالوز مثبت، دی فروکتوز مثبت، دی گالاکتوز مثبت، سلوبیوز مثبت و منفی، ساکارز مثبت، دی مانوز مثبت، گوانین منفی و آرابینوز مثبت بوده است و در تست بیماریزائی روی چند رقم هلو (ارلی گلو، رد کاپ و دکسی رد) پس از یکماه علائم شانکر ظاهر شد و از بافت آلوده مجدداً باکتری جداسازی شد. با توجه به خصوصیات فیزیکو شیمیائی فوق‌الذکر عامل بیماری باکتری *Xanthomonas arboricola pv. pruni* تشخیص داده شد و این اولین گزارش از وجود این گونه باکتری در استان مذکور می‌باشد.



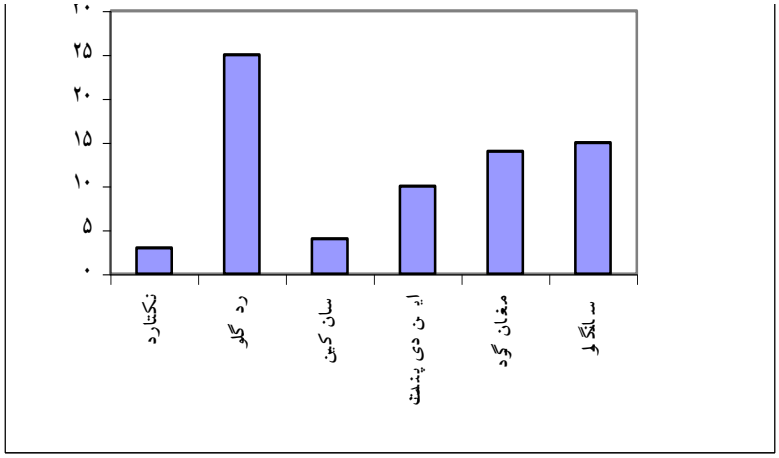
شکل ۱- وضعیت الودگی ارقام مختلف آلو به بیماری شانکر باکتریائی هسته‌داران ۱۳۸٤.

طبق شکل ۱، متوسط آلودگی به بیماری شانکر باکتریائی در بین ارقام مختلف آلو در سطح ۵درصد اختلاف معنی‌داری داشته است. از بین ارقام مختلف آلو (شکل ۱) ارقام آلو بخارا، گوجه سعدی کاملاً مقاوم بوده اما ارقام آلو شابلون زودرس، قطره طلا و شابلون دیررس نسبتاً حساس و رقم آلو سانتروزا حساسترین رقم نسبت به بیماری شانکر هسته‌داران هستند.



شکل ۲- وضعیت آلودگی ارقام مختلف هلو به بیماری لکه برگی هسته‌داران.

مقایسه میزان حساسیت به بیماری شانکر باکتریائی دربین ارقام مختلف هلو (شکل ۲) نشان داد رقم ارلی گلو و اسپرینگ کرست متحمل‌ترین ارقام، ارقام ردکاپ و دکسی رد و انجیری بعد از آنها به‌ترتیب از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشند. همچنین رقم ارلی گلو با کمترین آلودگی (۸ درصد) و رقم هلو انجیری (٤٨ درصد) حساسترین رقم بوده است.

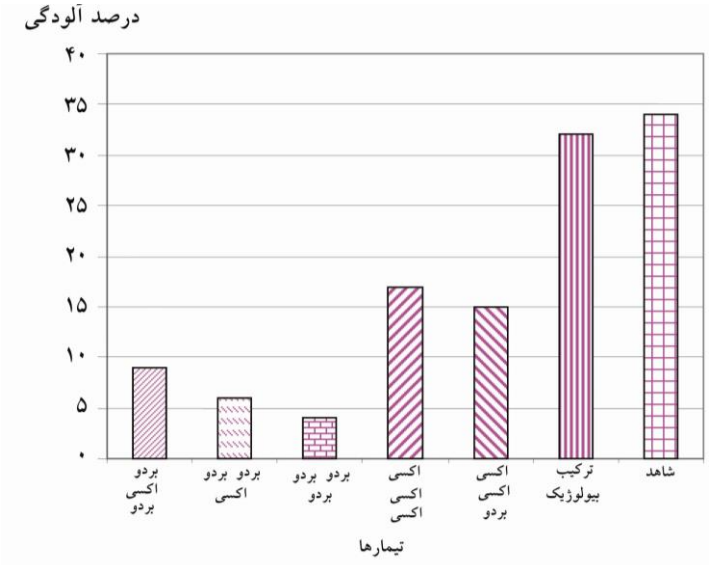


شکل ۳- وضعیت آلودگی ارقام مختلف شلیل به بیماری شانکر هسته داران.

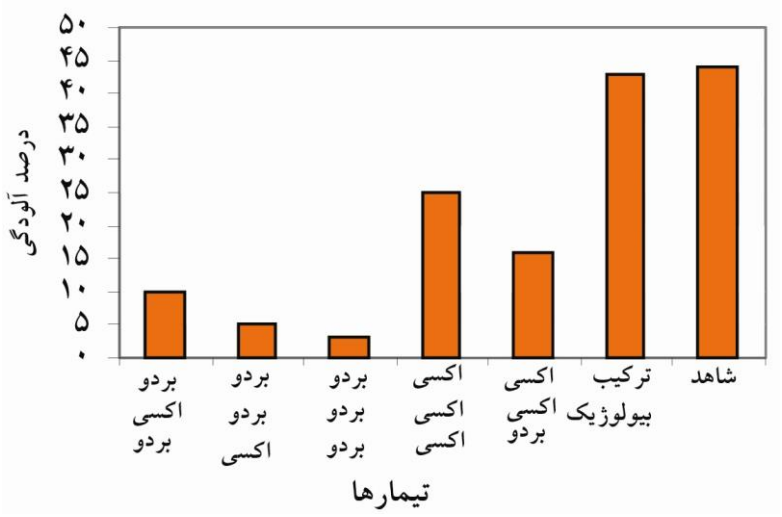
میزان آلودگی در بین ارقام مختلف شلیل در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده است، بطوری‌که رقم نکتارد و سان کین با کمترین آلودگی (شکل ٤) و ارقام این دیپندنس، مغان گرد، سانگلو و رد گلد به‌ترتیب بعد از آنها حساسترین ارقام بوده‌اند. همچنین بررسی‌ها نشان داد (شکل ۳) رقم نکتارد با ۳ درصد آلودگی و سان کین با ٤درصد متحمل‌ترین ارقام شلیل، ولی رقم رد گلد با آلودگی ۲۵ درصد حساسترین رقم شلیل بوده است و ارقام این دی پندنس، مغان گرد و سان گلو حد واسط آنها بوده‌اند. مقایسه روش‌های مختلف کنترل شیمیائی علیه بیماری شانکر باکتریائی هسته‌داران نشان داد (شکل ٤ و ۵) اسپری در سه نوبت (سمپاشی زمستانه، قبل از گل و بعد از گلدهی) با ترکیب بردو بیشترین تاثیر (کاهش آلودگی تا میزان ۵درصد) نسبت به شاهد (۳٤ تا ٤۵ درصد) داشته است و بعد از آن بردو - بردو - اکسی و بردو- اکسی- بردو در ردیف بعدی بهترین تاثیر را داشتند. کمترین تاثیر مربوط به اکسی، اکسی، اکسی و اکسی، بردو و سپس محلول بیولوژیک بوده است.

بنابراین با توجه به نتایج آزمایشات بهترین راه کنترل بیماری شانکر باکتریائی هسته‌داران در این استان (گلستان)، استفاده از ارقام مقاوم (برای احداث باغات جدید و یا واکاری در باغات قدیمی) و همچنین بعد از هرس زمستانه، سمپاشی با ترکیب بردو (۱۸درصد) ۱۰ در هزار در زمستان و سپس ۵ در هزار قبل و بعد از گلدهی می‌باشد. همچنین با توجه به حساسیت شدید هلو به این بیماری توصیه می‌گردد برای احداث باغات جدید، کاشت (درختان آلو و شلیل) ارقام مقاوم مناسب‌تر از ارقام هلو در منطقه شصت‌کلا می‌باشد. در حالی که کاشت ارقام مختلف هلو در علی آباد و گنبد مناسب‌تر از منطقه شصت‌کلا می‌باشد.

همچنین مقایسه میانگین و آنالیز واریانس (در سطح ۵درصد) کنترل شیمیائی تیمارهای مختلف علیه بیماری مذکور نشان داد اسپری در سه نوبت (سمپاشی زمستانه ، قبل از گل و بعد از گلدهی) با ترکیب بردو بیشترین تاثیر (کاهش آلودگی تا میزان ۵درصد) نسبت به اکسی کلرور مس و محلول بیولوژیک و شاهد (۳٤ تا ٤۵ درصد) را داشته است.



شکل ٤- مقایسه میزان آلودگی به بیماری لکه برگی باکتریائی هسته داران در تیمارهای مختلف سمپاشی.



شکل ٥- مقایسه میزان آلودگی به بیماری شانکر باکتریایی هسته‌داران در تیمارهای مختلف سمپاشی (شصت کلا، ١٣٨٤).

منابع

۱- الهی‌نیاء، ع. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۲. شناسائی عامل بیماری شانکر باکتریائی درختان میوه هسته‌دار در منطقه ییلاقی مازندران. یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. گیلان، رشت. ۱۱-٦ شهریور صفحه ۲۱۳.

۲- بناپور، الف.، زکئی، ز.، و امانی، گ. ۱۳٦۹. جداسازی *Pseudomonas syringae* از درختان گیلاس در استان تهران. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۲٦، شماره ۱-٤، صفحات ۷۲-٦۷.

۳- جامی، ف.، نیک‌نژاد کاظم‌پور، م.، خداکرمیان، غ.، و اهی‌نیا، ع. ۱۳۸۳. پروفیل استرین *Pseudomonas* و *Xanthomonas* جداسازس شده از درختان هسته‌دار و گزارش *Xanthomonas arboricola pv pruni (Xap)* از درختان هسته دار در استان گیلان. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. شهریورماه - دانشگاه تبریز. صفحه ٤۳۲.

٤-خضری، ص.، محمدی، م.، رحیمیان، ح.، شریفی‌تهرانی، ع.، و آهنگران، الف. ۱۳۸۳. مقایسه سرولوژیکی استرین‌های باکتری *Pseudomonas syringae pv. syringae* از پنج گروه میزبانی مختلف. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. شهریور ماه - دانشگاه تبریز. صفحه ۵۱۳.

۵- رحیمیان، ح.، نیکروش، ز.، عربی، ف.، و رضائیان، و. ۱۳۸۳. دخالت. *Xanthomonas arboricola pv pruni* در شکوفه‌های هلو در مازندران. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. شهریور ماه - دانشگاه تبریز. صفحه ٤۲٤.

6.Anderson, H.W. 1956. Diseases of fruit crops, Mc Graw. Hillbook. Co. Inc. NewYork. PP: 245-249.

7.Bahar, M., Mojtahadi, H., and Akhiani , A. 1982. Bacterial Canker of apricots in Isfahan. Iran .J. Plant Path. 18-: 58-68.

8.Blazevic, D., and Ederer, G.M. 1975. In Principles of Biochemical test in Diagnostic Microbiology.231page.Jhon Wiley and Sons New York.

9.Brezinski, J. 1902. Etiologie du chancre et gomme des arbres fruitiers. Acad.Sci.Compt.Rend.134:1170-1173.

10.Dye, D.W. 1962. The inadequacy the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. N.Z.J. Sci. 5: 393-416.

11.Elliot, G. 1951. *Pseudomonas syringae*: in Mannual of Bacterial plant pathogens, 2d ed., pp. 88-93. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.

12.Griffin, F.L.1911. A bacterial gummosis of cherries .Science, N.S.34:615-616.

13.Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocrysance* by the oxidase reaction. Nature (Lond) 178-703.

14.Klement, Z., Farkas, G.L. and Loverkorich, H. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathol 54:474-477.
15.Leifson, E. 1930. A method of staining bacterial flagella and capsules together with a study of the origin of flagella. J. Bact. 20:203.
16.Palleroni, N.J. 1982. The genus Pseudomonas. pp: 141-198. In N.R. Krig and J.G.Holt(eds), Bergeys Manual of systematic Bacteriology. Williams andBaltimore, Maryland.
17.Schaad, N.W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Amer. Phytopathol. Soc, St, paul, Minnesota, 388pp.
18.Shamsbaksh. H.M., and Rahimian, H. 1989. Identification of bacterial canker agent of stone fruits in Mazandaran, procceding of the ninth plant protection congress, Mashhad-Iran.:134.
19.Van-Hall, C.J.J. 1902. Bijdragen tot de kennis der Baktorieele Plantenziek Inaug Diss 122 Page. Amesterdam.