

همراهی اروینیا‌های پکتولیتیک با پوسیدگی جوانه‌ی مرکزی نخل در استان فارس*

Association of pectolytic erwinias with palm bud rot disease in Fars province

الهه جعفری و سید محسن تقوی**

بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

پذیرش ۱۳۸۶/۱۲/۱

دریافت ۸۵/۱۱/۸

چکیده

از آذر سال ۱۳۸۳ تا خرداد ۱۳۸۴ از مناطق مختلف خرما خیز استان فارس بازدید به عمل آمد و از درختان دارای علائم پوسیدگی نرم شامل لهیدگی برگ‌های جوان باز نشده (spear)، محور اصلی برگ، برگچه‌ها و جوانه‌ها، تغییر رنگ برگ‌های بیرونی و درونی، قهوه‌ای شدن بافت آوندی و لزج شدن مغز ساقه (تجمع ترشحات باکتری در مغز ساقه) نمونه‌برداری شد. تعداد چهل جدایه‌ی باکتری با استفاده از محیط کشت های YDC، EMB و CPG از بافت‌های آلوده جدا گردید. جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری بودند و روی محیط EMB پرگنه‌های سبز متالیک و روی محیط CPG پرگنه‌های سفید-کرم، براق و برجسته ایجاد کردند. براساس آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی جدایه‌ها به عنوان (Pcc) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* و *Dickeya chrysanthemi* تشخیص داده شدند. جدایه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی، نقوش الکتروفورز پروتئین‌ها و اندازه‌ی قطعات DNA تکثیر شده در حضور آغازگرهای اختصاصی EXPCCR/EXPCCF در واکنش PCR مورد مقایسه قرار گرفتند. نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های تشخیص داده شده به عنوان Pcc به نقوش جدایه‌ی مرجع Pcc (اهدایی آزاد، دانشگاه

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شیراز

**مسئول مکاتبه

ریورساید) شباهت داشت. در نخل زینتی پنجه‌ای علائم لهیدگی، قهوه‌ای شدن بافت و سبزرندی برگ‌ها روی گیاهان مایه‌زنی شده توسط یک نماینده از جدایه Pc و یک نماینده از جدایه‌های *D. chrysanthemi* ایجاد شد. در انجام PCR، نوزده جدایه‌ی نماینده که براساس خصوصیات باکتری شناسی به عنوان Pcc تشخیص داده شده بودند با جفت آغازگرهای اختصاصی مذکور قطعه‌ی قابل انتظار ۵۵۰ جفت بازی را تکثیر کردند.

واژه‌های کلیدی: نخل، پوسیدگی جوانه مرکزی، *Pectobacterium carotovorum* subsp. *D. chrysanthemi* و *carotovorum*

مقدمه

نخل گیاهی نهان‌دانه از تیره‌ی نخلیان (Palmeaceae) و از جنس *Phoenix* که به جز *P. dactylifera* L. (نخل خرما) سایرین درختان زینتی هستند (Mozafarian 1994). سطح زیر کشت خرما در کشور طبق آمارنامه‌ی سال ۱۳۸۴ حدود ۲۱۶ هزار هکتار می‌باشد که از این مقدار ۸۲/۲ درصد سطح درختان بارور و بقیه سطح زیر کشت نهال می‌باشد. بیشترین سطح زیر کشت درختان بارور خرما با ۱۷/۹ درصد سطح بارور خرما در کشور به استان خوزستان تعلق دارد. استان‌های هرمزگان، سیستان و بلوچستان، بوشهر، فارس و کرمان (جیرفت و کهنوج) به ترتیب ۱۶/۶، ۱۵، ۱۳/۹، ۱۲/۷ و ۱۲/۲ درصد سهم از سطح بارور خرما در کشور را به خود اختصاص داده‌اند. پنج استان مذکور جمعاً ۸۸/۳ درصد از سطح بارور این محصول را دارا می‌باشند (Ministry of Jihad Keshavarzi 2005). از دیدگاه صادرات غیر نفتی، معیشت و نیز اشتغال کشاورزان و ساکنین استان‌های جنوبی کشور خرما اهمیت بسیاری دارد (Karampour et al. 2004).

نخل همواره مورد هجوم عوامل بیماری‌زای متفاوتی بوده، در نتیجه بیماری‌های متعددی روی این گیاه گزارش شده است (Chase and Broschat 1991). در ایران تا کنون قارچهای *Alternaria* sp., *Amphisphaeria palmarum* (*Massariella palmarum*), *Graphiola phoenecies*, *Fusarium* sp. و همچنین *Mauginiella scaethae* (Ershad 1995) و *Aspergillus niger*, *Natrassia mangifera* از روی نخل گزارش شده است (Najafinia et al. 2004, Moosavi-Jorf et al. 1999).

پوسیدگی باکتریایی جوانه‌ی نخل از مهمترین بیماری‌های نخل است که در جنوب کنگو روی نخل روغنی (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Duff 1962)، در ناحیه القسیم عربستان سعودی روی رقم ساخاری، (suchary) نخل خرما (Abdalla 2001) و در آمریکای جنوبی جوانه‌ی نخل روغنی و نخل زیتنی (*Phoenix canariensis* Hort. ex chabaud) مشاهده و گزارش شده است (Chase & Broschat 1991).

در سال‌های اخیر گزارشی از وقوع پوسیدگی نرم جوانه‌ی مرکزی درختان خرما ی پنج تا ده ساله در استان‌های جنوبی کشور داده شده است. طبق این گزارش‌ها قارچ‌های پارازیت مانند *Thielaviopsis* sp., *Chalara* sp., *Chalaropsis* sp., *Phytophthora* sp. باکتری‌های پوده‌زی مانند *Bacillus* sp از عوامل احتمالی بیماری عنوان شدند اما فقط بیماری‌زایی *Chalara* sp و *Thielaviopsis* sp به اثبات رسیده است (Karampour et al. 2004).

این احتمال وجود دارد که باکتری‌های عامل پوسیدگی نخل از جنس‌های *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherchia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* و *Leuconosta* در مناطق مختلف استان فارس مشاهده شده است (Chase and Broschat, 1991). علائم پوسیدگی نرم نخل در سال‌های اخیر در استان فارس، تحقیق حاضر با اهداف بررسی انتشار پوسیدگی جوانه‌ی مرکزی نخل زیتنی و خرما در استان فارس، شناسایی عامل بیماری و توصیف ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آن صورت پذیرفته است.

روش بررسی

نمونه‌برداری

از آذر ماه ۱۳۸۳ تا خرداد ماه ۱۳۸۴ مناطق خرماخیز استان فارس شامل داراب، خفر، فراشبند و برازجان مورد بازدید قرار گرفتند و از درختان نخل زیتنی و نخل خرما دارای علائم پوسیدگی نرم قطعاتی جدا و درون پاکت های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی و خالص‌سازی

برای جداسازی عامل بیماری، با استفاده از یک قیچی باغبانی سترون قطعاتی از مرز بافت‌های سالم و آلوده بدون ضدعفونی سطحی جدا گردید. ده گرم بافت آلوده در یک ارلن

سترون حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون و یک درصد پیتون به مدت یک ساعت روی دستگاه تکان دهنده با ۶۰ حرکت رفت و برگشت در دقیقه قرار داده شد. سوسپانسیون به دست آمده روی محیط کشت EMB (Eosin metylene-blue) کشت داده شد و تشتک‌ها در دمای اتاق (۳۰-۲۷ °C) نگهداری شدند. بعد از ۲۴-۴۸ ساعت، تک پرگنه‌های ریز و برجسته دارای درخشندگی سبز متالیک انتخاب و برای خالص‌سازی، دوباره روی محیط کشت EMB کشت داده شدند. یک تک پرگنه از هر تشتک محیط EMB روی محیط‌های آگار غذایی NA (Nutrient agar)، YDC، CPG، (Schaad *et al.* 2001)، NGM، شامل آگار غذایی، حاوی ۱٪ گلیرول و 2mM MnCl₂ (Lee and Yu, 2006) کشت شد.

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

تعداد چهل جدایه‌ی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان فارس دارای پرگنه‌های گرد و کرم روی محیط آگار غذایی و پرگنه‌های سبز متالیک روی محیط کشت EMB، گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، بی‌هوازی اختیاری که قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون نبودند، به عنوان نماینده انتخاب و آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای در روی آنها انجام شد (Gerhardt *et al.* 1994, Fahy & Persley 1983, Schaad *et al.* 2001). جدایه‌ی مرجع *Pcc* (*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*) (اهدایی دکتر آزاد، از دانشگاه کالیفرنیا، ریورساید) در انجام کلیه‌ی آزمون‌ها و جدایه‌ی (PT) *P. carotovorum* subsp. جدا شده از سیب‌زمینی، توسط سلطانی‌نژاد و همکاران (Soltaninejad *et al.* 2005) در آزمون‌های الکتروفورز پروتئین، اثبات بیماری‌زایی روی فلفل سبز و واکنش PCR به عنوان شاهد استفاده شدند.

الکتروفورز پروتئین

این آزمون به روش لملی (Laemmli 1970) و آزوبیل و همکاران (Ausubel *et al.* 1987) انجام شد. ابتدا سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته‌ی ۱۱ جدایه (A2, F27, F24, F21, B8, K12, K7, F23, F18)، دو جدایه‌ی مرجع *Pcc* و (PT) روی محیط آگار غذایی تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از حذف رانشین، به ته‌نشین حاصل آب مقطر اضافه و سوسپانسیونی با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (با غلظت حدود ۱۰^۸ cfu/ml) با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV - Spekol)

اندازه‌گیری تهیه شد. سایر مراحل به صورتی که قبلاً شرح داده شده (Soltaninejad *et al.* 2005) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

از کشت ۴۸ - ۲۴ ساعته‌ی هجده جدایه (B3, B8, B9, B10, B11, B13, F6, F18, F19, F22, F26, K1, K3, K5, K7, دو جدایه‌ی مرجع Pcc و PT) در آب مقطر سترون سوسپانسیون با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (غلظت حدود 10^8 cfu/ml) تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه در لوله‌های اپندورف سترون جوشانده شدند. از سوسپانسیون‌های مذکور به عنوان DNA قالب در واکنش PCR همراه با آغازگرهای اختصاصی EXPCCR / EXPCCF (Kang *et al.* 2003).

EXPCCR: 5'-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3
EXPCCF: 5'-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3'

استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر $10 \times$ PCR Buffer، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱۰ pmol از هر یک از آغازگرها، ۱/۲۵ میلی‌مولار از هر باز سازنده dNTP و ۰/۲۵ واحد از Taq-DNA Polymerase (شرکت سیناژن، تهران) و ۱/۵ میکرولیتر از DNA قالب و آب مقطر سترون انجام گرفت چرخه گرمایی اولیه شامل ۴ دقیقه در $94^\circ C$ و ۳۰ چرخه شامل ۱ دقیقه در $94^\circ C$ ، ۱ دقیقه در $60^\circ C$ و ۲ دقیقه در $72^\circ C$ بود. در آخر ۷ دقیقه در $72^\circ C$ برای طویل شدن رشته‌ها به کار برده شد (Kang *et al.* 2003).

ژل آگارز به روش (Sambrook *et al.* 1989) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) ژل بر روی صفحه‌ی UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از Gel documentation از ژل عکسبرداری شد. از مارکر Standard Molecular Marker 100bp DNA Ladder (شرکت سیناژن، تهران) برای تعیین اندازه قطعات استفاده شد.

اثبات بیماری‌زایی

تعدادی نهال یک یا دو ساله‌ی نخل زیتنی (پنجه‌ای) از فضای سبز کارخانه سیمان داراب و تعدادی نهال یک یا دو ساله‌ی نخل زیتنی (پنجه‌ای واشنگتونی) و نخل خرما از نهالستان‌های شیراز تهیه شد. از کشت ۴۸ ساعته‌ی جدایه‌ها بر روی محیط کشت آگار غذایی سوسپانسیون

به غلظت حدود 10^8 cfu/ml (با چگالی نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در آب مقطر سترون تهیه و دو میلی‌لیتر آن با یک سرنگ پنج میلی‌لیتری به طوقه‌ی نهال‌ها تزریق و با نوار پارافیلیم پوشانده شد. برای حفظ رطوبت، کل گیاه به کمک افشانه آب پاشی و به مدت دو روز با کیسه نایلونی پوشانده و در گلخانه با دمای 25°C نگهداری شدند. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون به عنوان کنترل منفی و از جدایه‌ی مرجع Pcc به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند.

همچنین پس از ضدعفونی سطحی برگ‌های جوان باز نشده و یا تازه باز شده با الکل اتیلیک ۹۶ درصد با اسکالپل و یا با چاقوی باغبانی سترون شده با حرارت شکافی به عمق یک سانتی‌متر در برگ ایجاد شد. شکاف به وسیله لوپ و یا چاقوی سترون آغشته به کشت ۴۸ ساعته‌ی باکتری مایه‌زنی و سطح آن با نوار پارافیلیم مسدود شد. سایر مراحل مانند روش قبل صورت پذیرفت.

فلفل‌های دلمه‌ای سبز و سالم پس از شستشو با آب، با الکل اتیلیک ۹۶ درصد ضدعفونی سطحی شدند. از کشت ۴۸ ساعته‌ی جدایه‌های باکتری سوسپانسیونی به غلظت تقریبی cfu/ml 10^7 تهیه و با سرنگ به زیر بشره‌ی فلفل تزریق شد. از آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد. فلفل‌های مایه‌زنی شده به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در محفظه‌ای مرطوب در دمای اتاق نگهداری شدند (Duart *et al.* 2004).

نتیجه

علائم بیماری

در بازدیدهای به عمل آمده از مناطق مختلف خرماخیز استان فارس علائم پوسیدگی نرم جوانه‌ی مرکزی نخل با شدت متفاوت مشاهده شد. این علائم شامل ضعف عمومی گیاه، کاهش رشد، کج شدن درخت آلوده به یک سمت (به محض ظهور اولین علائم لهیدگی)، سبز - زرد شدن برگ‌های درونی، سبز - خاکستری و سرانجام برنزه شدن برگ‌های بیرونی، پوسیدگی و تغییر رنگ پایه‌ی برگ‌های آلوده، قهوه‌ای شدن بافت آوندی و تجمع توده‌ی باکتری در زمینه‌ی ژله‌ای در مغز ساقه بود. آلوده شدن جوانه‌ها نشانه‌ی پیشرفت بیماری، مرگ گیاه و ظهور چند برگ کوچک دارای رشد طبیعی‌تر نشانه‌ی بهبود جوانه‌ها بود (شکل ۱).



شکل ۱- لهیدگی مغز ساقه‌ی نخل خرما (منطقه‌ی خفر).

Fig. 1. Stem soft rot of date palm (Khafr region).

از درختان نخل دارای علائم پوسیدگی نرم جوانه‌ی مرکزی در استان فارس (مناطق داراب، خفر و فراشبند) یک باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری جداگردید. تعداد ۴۰ جدایه به همراه جدایه‌ی مرجع Pcc از لحاظ خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند.

خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

کلیه جدایه‌ها میله‌ای شکل بوده و روی محیط آگار غذایی (NA) پرگنه‌های شیری رنگ، مدور، براق با حاشیه‌ی منظم ایجاد کردند. پرگنه‌های جدایه‌ها روی محیط EMB ریز، نسبتاً برجسته، با حاشیه‌ی منظم و به رنگ سبز متالیک بودند. جدایه‌ها روی محیط YDC به خوبی رشد کرده و پرگنه‌های سفید-کرم با حاشیه‌ی صاف تولید کردند. هیچ یک از جدایه‌ها روی محیط KB رنگ فلورسنت ایجاد نکردند. جدایه‌ها همچنین روی محیط CPG پرگنه‌های سفید-کرم، براق و برجسته تولید کردند. سه جدایه F21، F24، F27 روی محیط NGM رنگ قهوه‌ای تیره ایجاد کردند

جدایه‌های منتخب دارای تاژک محیطی، قادر به رشد در شرایط بی‌هوایی و با توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بودند، ولی هیچ کدام قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی توتون، تولیدرنگدانه‌ی زرد روی محیط YDC و تولید ۳- کتولاکتوز نبودند. مشخصات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱ - خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های عامل پوسیدگی نرم جوانه‌ی مرکزی نخل جدا شده از مناطق مختلف استان‌های فارس

Table 1. Physiological, biochemical and nutritional characteristics of Palm bud rot isolates from Fars province

<i>P. carotovorum</i>	<i>D. chrysanthemi</i>	Test
-	-	واکنش گرم Gram reaction
-	-	اکسیداز Oxidase
+	+	کاتالاز Catalase
+	+	تحرك Motility
+	+	تاژک محیطی Peritrichous flagella
+	+	رشد بی‌هوایی Anaerobic growth
+	+	لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی Potato soft rot
+	+	لهانیدن فلفل سبز Green pepper soft rot
-	-	واکنش فوق حساسیت روی توتون Hypersentitive reaction on tobacco.
+	+	ایجاد رنگدانه‌ی سبز متالیک روی EMB green metallic pigment on EMB
+	+	ایجاد رنگدانه‌ی کرم براق روی CPG Cream color on CPG

Table 1. (continued)	جدول ۱- (ادامه)	
-	-	ایجاد رنگدانه‌ی زرد روی YDC Yellow pigment on YDC
-	-	ایجاد رنگدانه‌ی فلورسنت روی KB Fluorescent on KB
+	+	رشد در 37°C ۳۷°C Growth at 37°C
+	-	رشد در غلظت پنج درصد نمک طعام Growth on 5% NaCl
+	+	هیدرولیز اسکولین Aesculine hydrolysis
-	-	هیدرولیز توئین ۸۰ Tween 80 hydrolysis
+	+	هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis
-	-	هیدرولیز کازئین Casein hydrolysis
-	-	هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis
+	-	تولید مواد احیاء کننده از ساکارز Reducing substance from sucrose
-	-	تولید ۳-کتولاکتوز 3- Ketolactose production
+	+	تولید استوئین (VP) Production of acetoin(VP)
+	+	متیل رد (MR) Methyl red (MR)
+	+	تولید H ₂ S از سیستئین H ₂ S production from cysteine
-	-	تولید لوآن Leven production
-	-	آرژنین دهیدرولاز Arginine dihydrolase
-	-	فنیل آلانین دامیناز Phenyl alanine diaminase
-	-	لیزین دکربوکسیلاز Lysine decarboxylase
-	+	تولید اندول Indol production

Table 1. (continued)		جدول ۱- (ادامه)	
-	-	Urease	اوره آز
-	+	Phosphatase	فسفاتاز
-	+	Lecithinase	لستیناز
-	+	Gas from glucose	تصاعد گاز از گلوکز
+	+	Nitrate reduction	احیاء نیترات
-	-		مصرف کتومتیل گلوکوزید
		Utilization of Ketomethyl glucoside	
+ / -	+	حساسیت به اریترومایسین (۱۵ µg/disc)	
		Sensitivity to erythromycin	
		تساثر روی ششیرلیتموس:	
		Litmus milk	
-	-	Acid reaction	- واکنش اسیدی
-	-	Alkaline reaction	- واکنش قلیایی
		Acid	تولید اسیداز:
		production from	
-	+	Arabinose	آرابینوز
+/-	-	Arabitol	آرابیتول
-	-	Adonitol	آدونیتول

+ = واکنش مثبت - = واکنش منفی +/- = متغیر

اثبات بیماری‌زایی

پس از مایه‌زنی جدایه‌ها به نخل خرما و نخل زینتی علائم لهیدگی، قهوه‌ای شدن بافت و سبزدی برگ‌های ایجاد شد (شکل ۲). از میان جدایه‌های مورد بررسی جدایه‌های F24، K7، سبب بروز علائم لهیدگی و جدایه‌ی مرجع Pcc سبب بروز علائم لهیدگی و سبزدی گردیدند. مایه‌زنی فلفل سبز با استفاده از جدایه‌ها با ایجاد علائم بسیار شدید لهیدگی همراه بود. از میان هجده جدایه‌ی مورد بررسی در این روش ۱۴ جدایه‌ی B8، B9، B10، B11، B12، B13، F13، F18، F21، F24، F27، K7 و نیز جدایه‌ی مرجع Pcc و PT واکنش مثبت و چهار جدایه‌ی

B14, F16, K12 و A1 واکنش منفی ایجاد کردند.

الکتروفورز پروتئین

نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی ۱۱ جدایه‌ی نماینده در ژل پلی‌اکریل آمید با هم مقایسه شدند. از آن جایی که خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های تشخیص داده شده به عنوان *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* و *D. chrysanthemi* تفاوت‌هایی داشتند، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی آنها نیز اندکی متفاوت بودند. براساس نقوش الکتروفورزی حاصل ۵ گروه بوجود آمدند. براساس ویژگی‌های فنوتیپی سه گروه به عنوان Pcc و دو گروه به عنوان *D. chrysanthemi* و (*P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (PT)) تشخیص داده شده بودند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

نوزده جدایه‌ی نماینده‌ی به کار رفته جهت تکثیر با جفت آغازگر اختصاصی EXPCCR / EXPCCF (B3, B8, B9, B10, B11, B13, D6, F6, F13, F18, F19, F22, F26, K1, K3, K5, K7 و جدایه‌ی مرجع Pcc) که براساس خصوصیات افتراقی آزمون‌های باکتری شناسی به عنوان Pcc تشخیص داده شده بودند و همچنین جدایه PT در PCR قطعه‌ی قابل انتظار ۵۵۰ جفت بازی را تولید کردند در حالیکه سه جدایه‌ی به کار رفته جهت تکثیر با جفت آغازگر اختصاصی مذکور (F21, F24, F27) که براساس آزمون‌های باکتری شناسی به عنوان *D. chrysanthemi* تشخیص داده شده بودند قادر به تولید قطعه‌ی قابل انتظار ۵۵۰ جفت بازی در PCR نبودند (شکل ۳).

بحث

علائم بیماری شامل ضعف عمومی گیاه و لهیدگی برگ‌های جوان باز نشده، محور اصلی برگ، برگچه‌ها و حتی جوانه‌ها بود که با پیشرفت بیماری درصد آلودگی جوانه‌ها به حدی بالا بود که کل گیاه به سهولت از منطقه طوقه جدا و در مغز درخت توده‌ی حجیم ترشحات باکتری در زمینه‌ای ژله‌ای مشاهده می‌شد. علائم مذکور با علائم ذکر شده توسط عبدالله (Abdalla 2001) و چیس و بروسکات (Chase & Broschat 1991) مشابه بود.



شکل ۲- لهیدگی پارانشیم برگ بیرونی نخل زیتنی پنجه‌ای در آزمون اثبات بیماری‌زایی.
 Fig. 2. Leaf soft rot of ornamental palm inoculated with *Dickeya chrysanthemi* isolate F24.

از بافت‌های آلوده یک باکتری گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری جدا شد. این باکتری براساس نتایج حاصل از انجام آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی به عنوان *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* تشخیص داده شد (DeBoer & Kelman 2001). بجز سه جدایه‌ی F21، F24 و F27 خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای سایر جدایه‌های مورد بررسی شباهت زیادی به جدایه‌ی مرجع Pcc داشتند. سه جدایه‌ی F21، F24 و F27 (جدا شده از منطقه‌ی فراشبند) که در آزمون‌های رشد در 37°C ، فعالیت فسفاتاز، حساسیت به اریترومايسين، تولید اندول، تولید اسید از رافی‌نوز، ملی‌بیوز و سترات، تصاعد گاز از گلوکز، تولید H_2S از سیستین، احیاء نترات و تولید استوئین واکنش مثبت و در آزمون‌های تولید مواد احیاء کننده از ساکارز و تولید اسید از آرابتول، تری‌هالوز و سوربیتول واکنش منفی نشان دادند و روی محیط NGM نیز رنگ

قهوه‌ای تیره ایجاد کردند به عنوان *D. chrysanthemi* تشخیص داده شدند (Schaad et al. 2001, DeBoer & Kelman 2001, Lee & Yu 2006).

جدایه‌ها در برخی خصوصیات از قبیل تولید استوئین، متیل‌رد، فنیل‌آلانین دآمیناز، آرژنین‌دهیدرولاز، لیزین‌دکربوکسیلاز، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز توئین، هیدرولیز کازئین، تاثیر روی شیر لیتموس و تولید اسید از آرابینوز، اینوزیتول، سوکروز، گالاکتوز و مالتوز واکنش‌های متفاوتی نشان دادند.

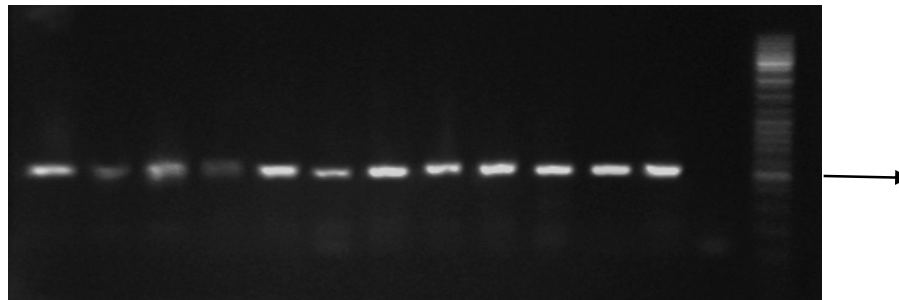
در آزمون اثبات بیماری‌زایی روی نخل جدایه‌های K7 (Pcc) و F24 (*D. chrysanthemi*) قادر به ایجاد علائم روی گیاهان مذکور لهیدگی روی نخل زیتتی و نخل خرما بودند. پس از گذشت دو تا سه هفته از زمان مایه‌زنی علائم لهیدگی و سبزدی مشهود بود (Abdalla 2001).

نماینده هر دو گونه Pcc و *D. chrysanthemi* توانایی ایجاد علائم لهیدگی، قهوه‌ای شدن بافت و سبزدی برگها روی نخل زیتتی و نخل خرما را داشته ولی از نظر شدت بیماری‌زایی متفاوت بودند بطوریکه جدایه Pcc دارای شدت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به *D. chrysanthemi* بود. واکنش متفاوت جدایه‌ها در آزمون بیماری‌زایی می‌تواند به علت حساسیت متفاوت ارقام نخل (خرما و پنجه‌ای) و توانایی متفاوت جدایه‌ها در بیماری‌زایی باشد. به عنوان مثال، عبدالله در عربستان سعودی رقم Succhary نخل خرما را حساس‌ترین و ارقام Roshodi و Helwa را مقاوم‌ترین می‌داند (Abdalla 2001). علاوه بر این جدایه‌های مذکور قادر به ایجاد لهیدگی روی فلفل سبز بودند و تفاوتی بین این جدایه‌ها از نظر نوع علائم و میزان لهیدگی مشاهده نشد.

همچنین جدایه‌هایی که براساس خصوصیات فنوتیپی به عنوان *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* تشخیص داده شده بودند، در واکنش PCR با جفت آغازگر اختصاصی EXPCCR / EXPCCF قطعه‌ی قابل انتظار ۵۵۰ جفت بازی را ایجاد کردند (Kang et al. 2003) در حالیکه سه جدایه‌ی تشخیص داده شده به عنوان *D. chrysanthemi* با جفت آغازگر اختصاصی مذکور قادر به ایجاد قطعه‌ی ۵۵۰ جفت بازی مورد نظر نبودند.

با توجه به همراه بودن باکتری‌های *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* و *D. chrysanthemi* با پوسیدگی جوانه مرکزی نخل و نقش آنها در ایجاد بیماری که با گزارش

عبداله (Abdalla 2001) مطابقت دارد و همچنین نقش دیگر عوامل از جمله قارچها و باکتریها در ایجاد زوال نخل در استان فارس (Karampour *et al.* 2004)، بررسی دقیق تر جهت تعیین نقش هر یک از عوامل مذکور ضروری بنظر می‌رسد.



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی EXPCCR / EXPCCF از راست به چپ: مارکر (Standard Molecular Marker 100bp DNA Ladder)، آب مقطر سترون (به عنوان شاهد منفی)، جدایه‌ی مرجع Pcc (به عنوان شاهد مثبت)، F26 ، K5 ، B9 ، F13 ، B3 ، B13 ، K1 ، F19 ، B10 ، F6 ، K3 ، علامت فلش نشان دهنده‌ی قطعات تکثیر شده‌ی ۵۰۰ جفت بازی است.

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products with specific primers EXPCCR/EXPCCF. From right to left: Standard Molecular Marker 100bp, Sterile distilled water, Pcc reference isolate and F26, K5, B9, F13, B3, K3, F6, B10, F19, K1, B13 isolates.

رعایت اصول بهداشتی و استفاده از قارچ‌کش‌های مسی در مدیریت بیماری مفید خواهد بود. پاشیدن مخلوط بردو روی جوانه‌های نخل روغنی در جنوب آفریقا و آمریکا، بریدن و حذف برگ‌های جوان باز نشده دارای علائم پوسیدگی به منظور جلوگیری از گسترش آلودگی به جوانه‌ها از راه کارهایی هستند که در مدیریت بیماری توصیه می‌شوند (Chase & Broschat 1991). استفاده از ارقام مقاوم نخل و گسترش برنامه‌های اصلاحی با هدف کنترل بیماری مفید خواهد بود (Abdalla 2001).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (85-87) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: الهه جعفری و سید محسن تقوی، بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه شیراز