Pseudomonas marginalis: یک بیمارگر بالقوه برای گیاهان گلخانه‌ای و گیاهان زراعی با سیستم آبیاری بارانی

ناصر امانی‌فر[1*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۲)

چکیده

طی سال‌های ۹۶-۱۳۸۹، از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری، تعداد ۲۴۳ نمونه از گیاهان زراعی (با سیستم آبیاری بارانی) و گلخانه‌ای با علائم لکه‌های نکروتیک، سوختگی حاشیه برگ، پوسیدگی میوه و پژمردگی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها موردبررسی آزمایشگاهی برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های همراه با علائم فوق بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی قرار گرفتند و جنس‌های مختلفی از باکتری‌ها جداسازی شد، اما فراوانی جداسازی باکتری‌های فلورسنت بیشتر از سایر جنس‌های باکتری‌ها بود. ۵۳/۵ درصد جدایه‌ها به *Pseudomonas marginalis* و ۱۸/۲ درصد به *P. syringae* pv *syringae* تعلق داشتند. جدایه‌های*P. marginalis* از خیار، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل، گندم، چغندرقند و دیفن باخیا و جدایه‌های *P. syringae* pv *syringae* از خیار، چغندرقند، گندم و گوجه‌فرنگی در میزبان خود بیماری‌زا بودند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای عمومی 16Sf/16Sr و R1378/PO27F، طراحی‌شده برای γ-Proteobacteria انجام شد و هم‌ردیف سازی ترادف نوکلئوتیدها در بانک جهانی ژن تشخیص باکتری‌های جداشده را بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تأیید کرد. ارزیابی فایلوژنتیکی بر اساس ترادف نوکلئوتید ژن 16SrDNA برای ۱۰ جدایه ایرانی *P. marginalis* نشان داد که از نظر مولکولی از هم متمایز هستند. این پژوهش نشان داد که جدایه‌های *P. marginalis* می‌توانند به‌عنوان بیمارگر بالقوه برای گیاهان زراعی، با سیستم آبیاری بارانی و گیاهان گلخانه‌ای در شرایط مساعد باشند.

کلیدواژه: آبیاری بارانی، باکتری‌های فلورسنت، برگ سوختگی.

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sahragardn@yahoo.com

۱. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد.

Pseudomonas marginalis as a potential pathogen of greenhouse grown plants and crops with sprinkler irrigation

N. Amanifar[1*]

(Received: 11.11.2018; Accepted: 12.5.2019)

Abstract

During 2010-2017, samples of different plants grown in greenhouses and crops with sprinkler irrigation systems, in Chaharmahal va Bakhtiary province, showing symptoms of necrotic spots, marginal leaf blight, fruit rot, and wilting were collected and tested for the presence of bacteria associated with those symptoms. The isolated bacteria were identified based on standard methods for the identification of plant pathogenic bacteria. Pathogenicity of strains was tested on appropriate hosts under greenhouse conditions. Although various genera of bacteria were isolated, isolation frequency of fluorescent pseudomonads was more than other genera of bacteria. Fifty-three and a half percent of pseudomonads was identified as *Pseudomonas marginalis* and 18.2% as *P. syringae* pv *syringae*. The isolates of *P. marginalis* from cucumber, potato, tomato, pepper, wheat, beet, and dieffenbachia and strains of *P. syringae* pv *syringae* from cucumber, sugar beet, wheat, and tomato were pathogenic on their respective hosts. Polymerase chain reaction with universal primers 16Sf / 16Sr and R1378 / PO27F, designed for detection of γ-Proteobacteria, confirmed the identity of the isolated bacteria based on biochemical and physiological tests by the alignment of nucleotide sequences in the GeneBank. Phylogenetic analysis based on 16SrDNA gene sequences of 10 isolates of *P. marginalis* were differentiated from each other. This investigation showed that strains of *P. marginalis* can be potential pathogens for greenhouse plants and field crops with sprinkler irrigation.

Keywords: Fluorescent bacteria; marginal leaf blight; sprinkler irrigation

*Corresponding author's E-mail: sahragardn@yahoo.com

1. Assistant Professor, Department of Plant Protection Research; Chaharmahal va Bakhtiary Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahrekord, Iran.

مقدمه

آب یکی از محدودیت‌های اساسی در تولیدات کشاورزی جهان، به‌ویژه در مناطق خشک مانند ایران، است. استفاده از سیستم‌های آبیاری تحت‌فشار مانند بارانی و کشت گیاهان در شرایط گلخانه یکی از روش‌های مدیریت مصرف آب در این مناطق است (FAO 2011).

اغلب بیمارگرهای باکتریایی در شرایط مرطوب بیماری ایجاد می‌کنند و خسارت می‌زنند. معمولاً شرایط گلخانه مرطوب است و مناسب این بیمارگرها است. آبیاری بارانی در مزرعه ضمن افزایش رطوبت نسبی و کاهش دما در میکروکلیمای سایه‌انداز گیاه باعث توسعه بیماری‌های باکتریایی می‌شود (Rotem and Patti 1969, Ludy *et al.* 1997). چند بیمارگر باکتریایی تاکنون گزارش‌شده که در شرایط ویژه باعث سوختگی و تخریب بافت گیاهی می‌شوند (Hildebrand 1989, Wimalajeewa *et al*, 1987).

سویه‌هایی از *Pseudomonas* sp. که توانایی تولید آنزیم‌های پکتولیتیک دارند باعث پوسیدگی می‌شوند، درحالی‌که برخی سویه‌ها این توانایی را ندارند و با علائم سوختگی در گیاهان همراه هستند (Rotem and Patti 1969, Ludy *et al.* 1997, Liao and Wells 1987). برخی از گونه‌های فلورسنت از جنس سودوموناس در گیاهان بیماری‌زا هستند که گونه *Pseudomonas marginalis* یکی از این باکتری‌هاست. سویه‌های این باکتری معمولاً رورست (epiphyte) هستند، اما یک بیمارگر مهم بعد از برداشت در برخی محصولات زراعی محسوب می‌شوند (Janse et al. 1992). به‌رغم اینکه این بیمارگر یک باکتری فرصت‌طلب است اما می‌تواند باعث سوختگی برگ و پوسیدگی بافت در طول رشد رویشی گیاه در شرایط ایده آل باشد (Godfrey and Marshall 2002). برخی عوامل مانند بارندگی یا آبیاری بارانی، تغییرات دمایی، نوع خاک، سن گیاه و وضعیت تغذیه می‌توانند گیاهان را برای آلوده شدن به سویه‌های *P. marginalis* مستعد کند (Scortichini 1994, Achbani *et al.* 2014). در بین این عوامل ظاهراً سن گیاه اهمیت بیشتری دارد. تقریباً در همه گیاهانی که *P. marginalis* باعث بیماری می‌شود باکتری به‌صورت رورست از اوایل رشد گیاه تا مراحل میانی رشد زندگی می‌کند و معمولاً در مراحل پایانی رشد گیاه بیماری ایجاد می‌کند (Miller 1980). اولین بیماری که به *P. marginalis* نسبت داده شد سوختگی برگ کاهو در ایالات‌متحده آمریکا بود که توسط براون در ۱۹۱۸ گزارش شد (Brown *et al.* 1918). از آن زمان تاکنون سویه‌هایی از *P. marginalis* به‌عنوان عامل لکه برگی و پوسیدگی ساقه روی انواع میزبان‌ها مانند کاهو (Berger 1967)، سیب‌زمینی (Jinhua *et al.* 2007)، صحراگرد و همکاران ۱۳۸۵)، بقولات (Vassilev 1998)، کلم گل (Obradovic *et al.* 2002)، فیلودندرون (Schollenberger 2005)، دیفن باخیا (Scortichini 1994)، پیاز (Achbani *et al.* 2014)، آلاله قرمز (Weilan *et al.* 2018) و کدوئیان (Ghobakhloo *et al.* 2002) گزارش‌شده‌اند.

برخی جدایه‌های *P. marginalis* قابل‌تشخیص از بیووارهای *P. fluorescens* با آزمون‌های فیزیولوژیکی نیستند (Lelliott *et al.* 1966). بر اساس ترادف 16S rRNA جدایه‌های *P. marginalis* در گروه *P. fluorescens* جای دارند (Anzai *et al.* 2000).

در سال‌های اخیر بیماری‌زایی برخی سویه‌های *P. marginalis* از میزبان‌های گوناگون زراعی در ایران در شرایط مزرعه و گلخانه جداسازی و اثبات‌شده است

(قاسمی و صالحی ۱۳۸۰، شهریاری و همکاران ۱۳۸۴، صحراگرد ۱۳۸۵، صحراگرد و همکاران ۱۳۸۵). هدف از این پژوهش تعیین نقش *P. marginalis* و فراوانی آن در ایجاد بیماری در انواع گیاهان زراعی با آبیاری بارانی و گیاهان گلخانه‌ای در مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در سال‌های ۹۶-۱۳۸۹، تعداد ۲۴۳ نمونه گیاهی (شامل برگ، ساقه و در مواردی میوه) از بوته‌های خیار، گوجه‌فرنگی، فلفل، بادمجان، توت‌فرنگی، آلستومریا، شمعدانی، دراسنا، رز، ژربرا، دیفن باخیا، چغندرقند، لوبیا، سیب‌زمینی و گندم، دارای علائم لکه برگی، سوختگی برگ، لکه روی میوه، پوسیدگی ساقه، پژمردگی بوته و پوسیدگی میوه، از مزارع و گلخانه‌های استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد و برای جداسازی باکتری‌های همراه با علائم به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی

قطعاتی به طول ۱۰-۵ میلی‌متری از نمونه‌ها، از مرز قسمت آلوده و سالم جدا شد و دو بار در آب مقطر سترون به مدت سه دقیقه شستشو شدند. حدود یک گرم از بافت‌های شسته شده درون لوله‌آزمایش حاوی آب مقطر سترون قرار داده شد. لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه درون یخچال نگهداری شدند سپس با شیکر لوله به هم زده (vortexed) شدند تا یاخته‌های احتمالی باکتری از بافت گیاه وارد آب شوند. مقدار ۵۰ میکرو لیتر از آب شسته نمونه‌ها روی محیط کشت‌های آگار مغذی بعلاوه سوکروز (آگار مغذی ۲۸ گرم، سوکروز ۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) و King's B (پروتئوز پپتون ۲۰ گرم، K_2HPO_4 ۲ گرم، KH_2PO_4 ۲ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۵ گرم، گلیسرول ۱۵ میلی‌لیتر، آگار ۱۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) پخش شد. برای هر نمونه دو ظرف پتری از هر محیط کشت در نظر گرفته شد. ظروف پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پرگنه های باکتری‌های رشد کرده در محیط‌های کشت مذکور خالص‌سازی شدند (Fahy and Persley 1983, Schaad *et al.* 2001).

آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی

آزمون گرم به روش KOH سه درصد برای هر جدایه باکتری انجام شد. تولید رنگدانه فلورسانس پرگنه های باکتری روی کشت ۴۸ ساعته در محیط King's B زیر تابش فرابنفش بررسی شد. آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شامل رشد در شرایط بی‌هوازی (O/F)، متابولیسم گلوکز، کاتالاز، ایندول، رشد در دمای ۴ و ۴۰ درجه سلسیوس، تحمل نمک (۷ و ۱۰ درصد NaCl)، هیدرولیز ژلاتین، آسکولین، نشاسته و توئین ۸۰، فعالیت تایروزیناز، فعالیت هسته یخ و تولید اسید از: دی-آرابینوز، مانتیول، دکستروز، سوربیتول، گلوکز و لاکتوز به روش فهی و پرسلی (Fahy and Persley 1983) و شاد (Schaad *et al.* 2001) انجام شد. آزمون‌های لوپات (LOPAT) (تولید لوان، واکنش اکسیداز، لهانیدن غده سیب زمینی، دی‌هیدرولاز آرجنین و ایجاد فوق حساسیت در توتون رقم وایت بارلی) انجام شد (Lelliott et al. 1966). یک جدایه *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* از گندم به‌عنوان شاهد برای همه آزمون‌ها استفاده شد.

شکل ۱- آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های Pseudomonas marginalis روی گیاهان جداشده در شرایط گلخانه.

Fig 1. Pathogenicity test *Pseudomonas marginalis* isolated from various plants under greenhouse conditions.

آزمون بیماری‌زایی

بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه نارس گلابی و سیب، بوته‌های دیفن باخیا، رز، فلفل، شمعدانی، خیار، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، چغندرقند و گندم در شرایط گلخانه انجام شد. برای تهیه مایه بیماری از یاخته‌های ۴۸ ساعته روی King's B آموده‌ای با غلظت ۱×۱۰^{۸} (CFU/ml) (OD600 = 0.6) در آب مقطر سترون تهیه شد. میوه‌ها و گیاهان به روش تزریق و یا پاشیدن (spray) آموده با مایه بیماری تلقیح شدند. در روش تزریق ۲۰۰ میکرو لیتر از آموده باکتری به زیرپوست میوه، برگ یا ساقه با استفاده از سرنگ انسولین تزریق شد. درروش پاشیدن، آموده باکتری روی میوه‌ها، برگ‌ها و ساقه‌ها پاشیده شد. برای بررسی اثر رطوبت نسبی بالا تعدادی از گلدان‌ها بعد از تیمار آلوده سازی با کیسه‌های شفاف پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت پوشانده شدند (شکل ۱) و تعدادی بدون پوشش در گلخانه (دمای ۶ ± ۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. میوه‌ها دردمای ۲۵ درجه سلسیوس در اتاق رشد نگهداری شدند. نتایج آزمایش پس از دو روز الی شش هفته بر اساس ایجاد علائم نکروز، آب سوختگی یا کلروز روی میوه و برگ و گال ساقه ارزیابی شد. از آب مقطر به‌جای آموده باکتری برای گیاهان شاهد استفاده شد.

استخراج دی ان ای باکتری

دی ان ای باکتری به روش اسوبل و همکاران استخراج شد (Ausubel *et al.* 1992). از کشت ۲۴ ساعته یاخته‌های باکتری روی محیط King's B استفاده شد. یاخته‌های باکتری دو بار در بافر TAS (50 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8) شستشو شدند سپس در ۵۰۰ میکرو لیتر از همان بافر آموده باکتری تهیه شد. به آموده SDS و proteinase K اضافه شد و لوله‌ها به مدت یک ساعت در ۵۰ درجه نگهداری شدند. با استفاده از CTAB و کلروفرم پروتئین‌ها و دیگر ترکیبات یاخته باکتری حذف شدند. با اضافه کردن اتانول خالص و به دنبال آن شستشو با اتانول ۷۰ درصد دی ان ای باکتری جدا شد و در آب مقطر دو بار سترون حل شد و در دمای

جدول ۱- آغازگرهای مورداستفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز .

Table 1 - Primers used for polymerase chain reaction.

Primer	Primer sequences	Gene	Annealing temperature (°C)	Amplicon length (bp)	Reference
16Sf	5' –TGG TAG TCC ACG CCC TAA AC-3'	16S rDNA	57	210	Chen *et al.*, 2005
16Sr	5' –CTG GAA AGT TCC GTG GAT GT-3'				
R1378	5' –CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'	16S rDNA	58	1100	Gai *et al.*, 2011
PO27F	5'–GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'				

۲۰- درجه سلسیوس برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نگهداری شد (Amanifar *et al.* 2014).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

از دو جفت آغازگر عمومی16Sf/16Sr (ساخت شرکت Macrogen کره جنوبی) و R1378/ PO27F (ساخت شرکت IDT(Integrated DNA Technologies) آمریکا) طراحی‌شده برای تکثیر قطعه‌ای از 16S rRNA گروه γ- Proteobacteria استفاده شد (جدول ۱) (Yakoubou and Coté, 2010). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از TaKaRa TaqTM Hot Start Version, Takara Bio Inc.) در حجم ۲۵ میکرو لیتری انجام شد. آموده پی سی آر شامل ۱۲/۵ میکرو لیتر از Master Mix (2 × Premix)، ۱/۵ میکرو لیتر از هر آغازگر (با غلظت 0.1 µM) و ۸ میکرو لیتر آب مقطر سترون و ۱/۵ میکرولیتر از دی ان ای باکتری یا قسمتی از پرگنه باکتری بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در یک ترمال سایکلر (Thermal cycler) ساخت شرکت Biotech انگلستان با برنامه‌ای به شرح زیر انجام شد: ۹۶ درجه سلسیوس به مدت شش دقیقه برای واسرشت نمودن اولیه دی ان ای، یک برنامه ۳۵ چرخه ای با دمای ۹۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشته سازی، دمای ۵۸-۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه به منظور اتصال آغازگرها، دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه برای تکثیر و یک چرخه به منظور تکثیر نهایی با دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

محصول پی سی آر در ژل آگاروز یک درصد در شدت‌جریان پنج ولت بر سانتی‌متر به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. ژل با اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) برای ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از شستشوی ژل در آب مقطر، در دستگاه ژل داکیومنتیش برای مشاهده قطعات تکثیرشده و تهیه عکس قرار گرفت (Amanifar *et al.* 2016). از روش استات سدیم برای خالص‌سازی محصول پی سی آر (Sambrook & Russell 2001) استفاده شد. محصول پی سی آر برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. ترادف نوکلئوتیدهای جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار NCBI-BLAST هم‌ردیف سازی شدند. ترادف ۱۰ جدایه از *P. marginalis* با رس شمارهای MG458677، MK506353، MK506354، MK506355،MK506356 ، MK506357، MK506358، MK506359 MK510836 و MK510837 در GenBank database بارگزاری شدند.

درخت فیلوژنتیکی ترادف های نوکلئوتیدی ۱۰ جدایه *P. marginalis* در مقایسه با ترادف سه رس شمار موجود در بانک ژن مربوط به *P. marginalis* (رس شمار Celery MG765472)، *P. syringae* (رس‌شمار

شکل ۲- علائم شاخص بیماری‌های ناشی از *Pseudomonas marginalis* روی بادمجان(۱)، فلفل(۲)، گوجه‌فرنگی(۳)، برگ، میوه و گل خیار(٤، ٥ و٦)، چغندرقند(۷) و ساقه و بوته سیب‌زمینی(۸ و ۹)

Figure 2. Typical diseases symptoms on eggplant(1), pepper(2), tomato(3), cucumber(4,5 and 6), sugarbeet(7) and potato(8 and 9) caused by *Pseudomonas marginalis.*

KC816628) و گونه ناشناخته *Pseudomonas* sp. (رس شمار MH998406) با استفاده از نرم افزار MEGA7 رسم شد(Kumar *et al.* 2016).

نتایج

علائم و میزان بیماری در مزرعه و گلخانه

علائم بیماری در میزبان‌های مختلف متفاوت بود. همه میزبان‌ها علائم سوختگی حاشیه برگ نشان دادند. بیشترین میزان سوختگی حاشیه برگ در خیار، سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی مشاهده شد. علاوه بر سوختگی حاشیه برگ علائم نکروز در سایر اندام‌ها، پوسیدگی میوه در خیار، ریزش میوه و گل، لکه‌های آب سوخته و شانکر ساقه نیز مشاهده شد (شکل ۲). عمومی‌ترین علائم بیماری‌های باکتریایی در گیاهان گلخانه‌ای لکه برگی و سوختگی برگ بود که در شرایط رطوبت نسبی بالا ترشحات باکتریایی (oozing) مشهود بود.

در مزارع سیب‌زمینی، چغندرقند و گندم وقوع بیماری از ۲۰ تا ۱۰۰ درصد مشاهده شد، این وضعیت در مزارع با سیستم آبیاری بارانی مشهود بود و در مزارع با آبیاری غرقابی به‌ندرت دیده شد. در گلخانه‌های خیار، گوجه‌فرنگی، فلفل، بادمجان و دیفن باخیا با افزایش رطوبت نسبی به بیش از ۸۰ درصد میزان آلودگی و شدت بیماری افزایش نشان داد. میزان آلودگی در خیار و گوجه‌فرنگی تا ۱۰۰ درصد نیز مشاهده شد.

باکتری‌های جداشده از گیاهان گلخانه‌ای

سویه‌هایی از *P. marginalis* (از خیار، گوجه‌فرنگی،

جدول ۲- وضعیت پراکنش و میزان آلودگی گیاهان گلخانه‌ای به بیمارگرهای باکتریایی در استان چهارمحال و بختیاری طی سال‌های ۹۶-۱۳۸۹ .

Table2. Status of distribution and infection rate percent of bacterial diseases of greenhouse grown plants in Chahar Mahal va Bakhtiary province during 2010-2017.

Plant	Sampled region	Isolated bacteria	Infection (%) (based on symptoms)
Cucumber	Farsan	*Pseudomonas marginalis*	46
	Junghan	*P. marginalis Pseudomonas syringae,*	37
	Hafshegan	*P. syringae*	55
	Shahrekord	*P. marginalis*	10
	Lordegan	*P. marginalis*	5
	Lordegan	*P. marginalis*	20
	Rostam Abad	*P. marginalis Pectobacterium* sp.,	40
	Hafshegan	*P. syringae*	5
	Borujen	*P. syringae*	2
Tomato	Hafshegan	*P. marginalis P.syringae,*	15
	Junghan	*Xanthmonas* sp.	5
	Borujen	*Xanthmonas* sp.	5
	Shurab	*P. marginalis*	3
	Lordegan	*Xanthmonas* sp.	5
Rose	Borujen	*A. tumefacians*	60
	Lordegan	*Xanthmonas* sp. *Pectobacterium* sp.,	8
	Farsan	*A. tumefacians*	45
Pepper	Hafshejan	*P. marginalis*	20
	Soreshjan	*Xanthmonas* sp. , *P. marginalis*	5
Eggplant	Borujen	*P. marginalis*	10
Strawberry	Soreshjan	*P. marginalis Xanthmonas* sp.,	5
Alestomeria	Rostam Abad	*Xanthmonas* sp.	1
Geranium	Soreshjan	*Xanthmonas* sp. *Pectobacterium* sp.,	3
Dracaena	Soreshjan	*Xanthmonas* sp.	1
Dieffenbachia	Shahrekord	*P. marginalis Dickeya* sp.,	5
Gerbera	Soreshjan	*Xanthmonas* sp.	1

فلفل، توت‌فرنگی، بادمجان و دیفن باخیا)، *P. syringae* (از خیار و گوجه‌فرنگی)، *Agrobacterium tumefacians* (از رز)، *Xanthomonas* sp. (از رز، گوجه‌فرنگی، فلفل، توت‌فرنگی، آلسترومریا، شمعدانی، دراسنا و ژربرا)، *Pectobactrium* sp. (از خیار، رز و شمعدانی) و *Dickeya* sp. (از دیفن باخیا) به‌عنوان باکتری‌های همراه با بیماری‌های گیاهان گلخانه‌ای شناسایی شدند. بیشترین فراوانی مربوط به سویه‌هایی از *P. marginalis* بود، خسارت این باکتری در گلخانه‌های خیار اقتصادی و قابل‌توجه بود. در برخی از گلخانه‌ها درصد آلودگی بیش از ۶۰ درصد با شدت بیماری بالا در گیاهان به این بیمارگرها مشاهده شد (جداول ۲ و ۳). از ۵۳/۵ درصد نمونه‌ها *P. marginalis* جدا شد.

ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سودوموناس‌های مرتبط با علائم توصیف‌شده در جدول ۴ نشان داده‌شده است. همه جدایه‌ها گرم منفی بودند و در محیط کشت King's B رنگدانه سبز فلورسنت تولید کردند. آزمون‌های بیوشیمیایی، مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی نشان داد که جدایه‌های باکتری به *P. marginalis* تعلق دارند. بااین‌وجود جدایه‌های *P. marginalis* از میزبان‌های

جدول ۳- جداسازی *Pseudomonas marginalis* از نمونه‌های گیاهی با علائم سوختگی برگ در مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری در سال‌های ۹۶-۱۳۸۹ .

Table 3. Isolation of *Pseudomonas marginalis* from plant samples with leaf blight symptoms in different locations in Chahar Mahal va Bakhtiari province during 2008 to 2015.

plant	Number of plant sampled	Sampling date	location	Number of *P. marginalis* strains isolated
cucumber	14	July-August 2010	greenhouse	5
	12	December-January 2011	greenhouse	3
	18	March-April 2013	greenhouse	9
	7	June-July 2014	greenhouse	2
	23	May-June 2015	greenhouse	11
tomato	5	December-January 2011	greenhouse	3
	13	March-April 2013	greenhouse	5
	7	May-June 2015	greenhouse	3
sugarbeet	12	August-September 2008	field	2
	5	July-August 2010	field	2
	7	August-September 2017	field	1
potato	10	July-August 2008	field	8
	6	July-August 2012	field	4
	13	August-September 2017	field	9
wheat	12	May-June 2014	field	3
	5	April-May 2015	field	1
pepper	3	May-June 2015	greenhouse	2
eggplant	5	May-June 2015	greenhouse	2
strawberries	7	June-July 2014	greenhouse	0
alstromeria	6	May-June 2015	greenhouse	0
geranium	4	May-June 2014	greenhouse	0
dracaena	3	June-July 2014	greenhouse	0
diffenbachia	6	May-June 2014	greenhouse	3
bean	10	June-July 2011	field	0
gerbera	7	June-July 2014	greenhouse	0
roses	12	July-August 2008	greenhouse	0
	9	April-May 2015	greenhouse	0

مختلف در ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متفاوت بودند (جدول ۴).

آزمون فوق حساسیت

نتایج آزمون فوق حساسیت روی برگ توتون نشان داد که جدایه‌های *P. marginalis* از خیار، چغندرقند، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و دیفن باخیا بعد از ۲ تا ۴ روز باعث ایجاد کلروز و نکروز در برگ توتون شدند، درحالی‌که جدایه‌های گندم و بادمجان باعث واکنش در برگ توتون نشدند.

آزمون بیماری‌زایی

در آزمون بیماری‌زایی در بوته‌هایی که با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شده بودند، همه جدایه‌های *P. marginalis* در میزبان‌های خود باعث سوختگی و نکروز برگ بعد از ۲ تا ۶ روز شدند. در بوته‌های بدون پوشش پلاستیکی تنها جدایه‌های خیار علائم سوختگی، ۸ روز بعد از مایه‌زنی ایجاد کردند. روی گیاهان شاهد هیچ علائمی مشاهده نشد.

در اثبات بیماری‌زایی روی میوه‌های نارس سیب و گلابی تنها جدایه‌های خیار، گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی،

جدول ٤- ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های *Pseudomonas marginalis* جداشده از میزبان‌های مختلف

Table 4. Biochemical and physiological characteristics of the isolates of *Pseudomonas marginalis* from different hosts.

	P. marginalis from								*P. syringae* pv *syringae* from
character	potato	sugarbeet	wheat	cucumber	tomato	pepper	eggplant	dieffenbachia	wheat
Gram reaction	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fluorescence on KB	+	+	+	+	slight	+	+	+	+
colony color	white	white	white	white	white	white	white	white-creamy	white
levan	–	–	–	–	–	–	–	–	+
oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	–
potato rot	+	+	+	+	–	+	+	+	–
arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Tobacco hypersensitivity	+	+	–	+	+	+	–	+	+
O/F test	O	O	O	O	O	O	O	O	O
catalse	+	+	+	+	+	+	+	+	+
indole	–	–	–	–	–	–	–	–	–
gelatine hydrolysis	+	+	+	+	–	+	+	+	–
aesculin hydrolysis	+	+	–	+	–	+	+	–	+
hydrolysis of Tween 80	+	–	+	–	–	–	–	–	–
urease	+	+	+	+	+	+	+	+	–
ice nucleation	+	+	+	–	+	–	–	–	+
growth at 41°C	–	+	–	+	+	+	+	+	–
growth at 4°C	+	–	+	+	–	+	+	+	+
utilization of: glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose	+	+	–	+	+	+	–	+	–
arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
dextrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ - positive reaction, – - negative reaction, O - oxidative metabolism, ND - not determined

پنج روز بعد از مایه‌زنی علائم نکروتیک مشاهده شد (شکل ۳ و ۴). روی میوه‌های شاهد هیچ علائمی ایجاد نشد (جدول ۵). باکتری‌ها از لکه‌های گیاهان مایه‌زنی شده روی محیط کشتKing's B جدا شدند و با آزمون‌های LOPAT تشخیص جدایه‌های *P. marginalis* تأیید شد.

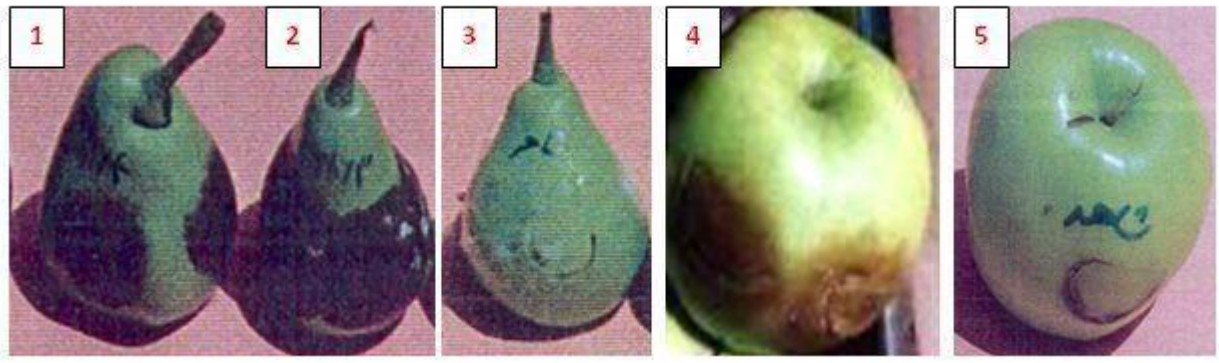
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

قطعات مورد انتظار ۱۱۰۰ و ۲۱۰ جفت بازی به ترتیب با استفاده از آغازگرهایR1378/ PO27F و 16Sf/16Sr برای جدایه‌های*P. marginalis* از خیار، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، چغندرقند، فلفل، بادمجان، گندم و دیفن باخیا تکثیر شد (شکل ۵). هم‌ردیف سازی ترادف قطعات تکثیری 16SrRNA با ترادف‌های موجود در بانک ژن نشان داد که از ۹۷ تا ۹۹ درصد شباهت بین ترادف‌های حاصل از این پژوهش با ترادف‌های موجود این باکتری در بانک ژن وجود دارد.

درخت فیلوژنی ترسیم‌شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن 16SrDNA ۱۰ جدایه*P. marginalis* شناسایی‌شده در این پژوهش به همراه یک ترادف موجود در بانک ژن نشان داد که بین جدایه های مختلف *P. marginalis* تنوع وجود دارد، این تنوع در جدایه های یک میزبان نیز دیده می‌شود، به‌طوری‌که جدایه های خیار در دوشاخه مختلف قرار گرفتند. رس شمار موجود در بانک ژن مربوط به *P. marginalis* (رس شمار Celery MG765472) با جدایه های این پژوهش در یک شاخه و *P. syringae* (رس شمارKC816628) و گونه ناشناخته *Pseudomonas* sp. (رس شمار MH998406) در شاخه جداگانه قرار گرفتند(شکل ۶).

شکل۳- آزمون واکنش فوق حساسیت توتون (۱) و اثبات بیماری‌زایی*Pseudomonas marginalis* در سیب‌زمینی(۲ و ۳)

Figure 3. Tobacco hypersencitivity reaction test(1) and pathogenicity test *Pseudomonas marginalis* on potato(2 and 3).



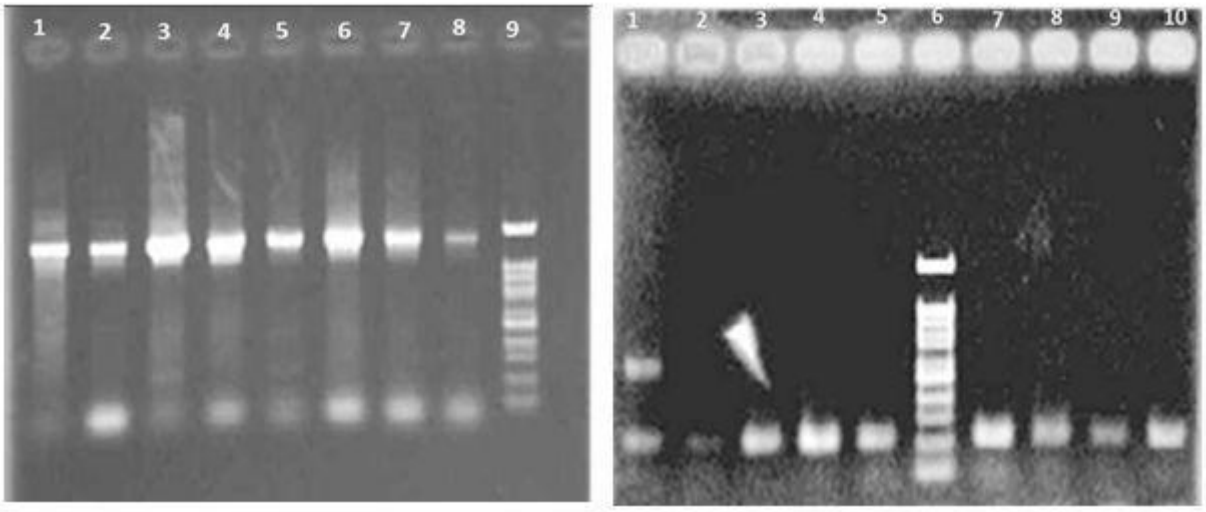
شکل ٤- آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های*Pseudomonas marginalis* روی میوه‌های نارس سیب و گلابی: ۱- جدایه‌های چغندرقند، ۲- جدایه گوجه‌فرنگی، ۳- شاهد، ٤- جدایه خیار و ۵- شاهد

Figure 4. Pathogenicity test for isolates of *Pseudomonas marginalis* on immaure pear and apple fruits: 1. isolate of sugarbeet, 2. isolate of tomato, 3. control, 4. isolate of cucumber and 5. control

جدول ۵- نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی برخی از جدایه‌های*Pseudomonas marginalis* از میزبان جداشده و میوه‌های نارس سیب و گلابی.

Table 5. Results of pathogenicity tests of some isolates of *Pseudomonas marginalis* on their respective hosts and pear and apple fruits.

Isolated from	number of isolates tested	Number of isolates pathogenic on their hosts	Number of isolates pathogenic on pear and apple fruits
potato	6	4	5
sugarbeet	2	1	1
wheat	2	1	1
cucumber	7	5	6
tomato	4	3	3
pepper	2	1	1
eggplant	2	0	0
dieffenbachia	2	1	1



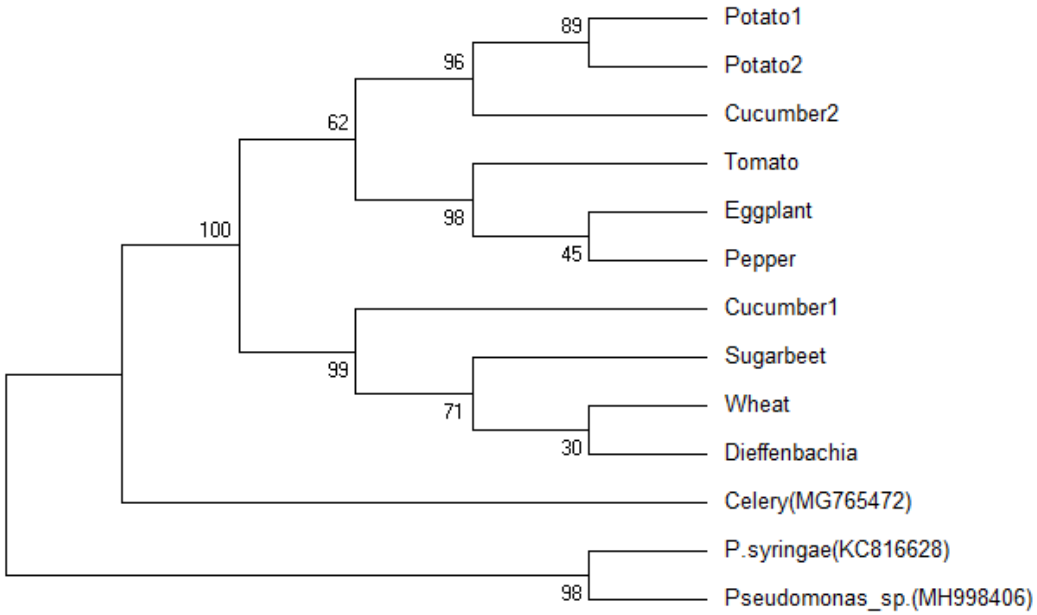
شکل۵- نقوش الکتروفورزی محصولات تکثیری با استفاده از جفت آغازگرهای ژن‌های 16SrRNA برای جدایه‌های *Pseudomonas marginalis*، شکل سمت چپ: قطعه تکثیری حدود ۱۱۰۰ جفت بازی با استفاده از جفت آغازگرR1378/PO27F جدایه‌های خیار، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، چغندرقند، فلفل، بادمجان، گندم (راهک های ۱ تا ۸)، راهک ۹ مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی، شکل سمت راست: قطعه تکثیری حدود ۲۱۰ جفت بازی با استفاده از جفت آغازگر 16Sf/16Srجدایه‌های خیار، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، چغندرقند، فلفل (راهک های ۱ تا ۵)، بادمجان، گندم، دیفن باخیا و نمونه از *Pseudomonas syringae* جداشده از گندم(راهک های ۷ تا ۱۰)، راهک ٦ مارکر 100 bp.

Figure 5. Gel electrophoresis pattern of PCR amplification products using *Pseudomonas marginalis* 16SrRNA genes primers. Left: PCR products (1100 bp) from bacterial colonies isolated from of cucumber, potato, tomato, sugerbeet, pepper, eggplant, wheat and diffenbakhia samples (lanes 1 to 8, respectively) amplified with R1378/ PO27F primer pair, lane 9, 100 bp DNA ladder. Right: PCR products (210 bp) from bacterial colonies isolated from of cucumber, potato, tomato, sugerbeet, pepper (lanes 1 to 5, respectively), eggplant, wheat, diffenbakhia and *Pseudomonas syringae* isolated from wheat samples (lanes 7 to 10, respectively), amplified with 16Sf/16Sr primer pair; lane 6, 100 bp DNA ladder.

بحث

نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی نشانگر وجود تفاوت‌هایی بین سویه‌های *P. marginalis* از میزبان‌های مختلف بود. این تنوع توسط دیگر محققان نیز گزارش‌شده است (Berger 1967, Ghobakhloo *et al.* 2002, Achbani *et al.* 2014, Weilan *et al.* 2018). سویه‌های *P. marginalis* ازنظر بیماری‌زایی متفاوت بودند، برخی مانند جدایه‌های بادمجان و دیفن باخیا بیماری‌زا نبودند. اما تمام جدایه‌هایی که در توتون واکنش فوق حساسیت ایجاد کردند در میزبان خود بیماری‌زا نیز بودند. برخی از سویه‌هایی که در توتون واکنش فوق حساسیت ایجاد نکردند در گیاهان میزبان بیماری‌زا بودند. داده‌های موجود نشان می‌دهد که *P. marginalis* ویژگی‌های یک بیمارگر فرصت‌طلب در شرایط مزارع با آبیاری بارانی و گلخانه دارد.

یکی از علائم اولیه مرتبط با آلودگی برگی به‌وسیله باکتری‌های گروه سودوموناس‌ها و زانتوموناس‌ها، آب سوختگی در آپوپلاست بافت‌های آلوده است (El-Banoby and Rudolph 1979)، اگرچه هنوز روشن نیست که آیا آب سوختگی یک استراتژی باکتریایی برای بازیابی



شکل٦- دندروگرام حاصل از همردیف سازی ترادف نوکلئوتیدی قطعه‌ای از ژن 16SrDNA جدایه های ایرانی *Pseudomonas marginalis* با یکدیگر و با سه جدایه موجود در بانک ژن Celery(MG765472)، *P. syringae*(KC816628) و *Pseudomonas* sp.(MH998406) به روش Neighbour-joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA7

Figure 6. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences of 16SrDNA gene of Iranian isolates of *Pseudomonas marginalis* and three isolates available in GenBank Celery(MG765472), *P. syringae*(KC816628) and *Pseudomonas* sp.(MH998406) using MEGA7 program and neighbor-joining method.

مواد مغذی است یا یک عارضه جانبی ساده از آسیب سلول میزبان ناشی از عفونت است؟ درهرصورت، حتی اگر مواد مغذی آپوپلاست برای باکتری‌های غیر بیماری‌زا در دسترس نباشند، به نظر می‌رسد همانند *P. syringae* و دیگر بیمارگرهای برگ باید سازوکارهای مؤثر بیماری‌زایی برای کسب مواد مغذی از آپوپلاست میزبان داشته باشند (Melotto *et al.* 2008). در این پژوهش نیز در اغلب موارد علائم آب سوختگی مشاهده گردید.

با توجه به محدودیت منابع آب در ایران، استفاده از سیستم‌های تحت‌فشار آبیاری مانند آبیاری بارانی در مزارع و کشت در شرایط گلخانه به‌عنوان رهیافتی توسط تولیدکنندگان پذیرفته‌شده است. در شرایط آبیاری بارانی، رطوبت نسبی افزایش و دما کاهش می‌یابد (Rotem and Palti 1969, Ludy *et al.*, 1997). این پژوهش نشان داد که در مزارع با آبیاری غرقابی و در گلخانه‌های با رطوبت نسبی کمتر از ۷۰ درصد، میزان بیماری ناشی از *P. marginalis* و جداسازی باکتری بسیار کم بود. از سوی دیگر، در مزارع با سیستم آبیاری بارانی و در گلخانه‌ها با رطوبت نسبی بیش از ۷۰ درصد، میزان بروز بیماری ،به‌ویژه با علائم لکه برگی و سوختگی حاشیه برگ، در خیار (در گلخانه) و سیب‌زمینی (در مزرعه) تا ۱۰۰درصد مشاهده شد.

اگرچه آبیاری بارانی برای بسیاری از بیماری‌ها مناسب شناخته‌شده است(Ludy *et al.* 1997)، اما تحقیقات اندکی در مورد اثر زمان آبیاری بارانی و یا مقدار آب به‌کاررفته در توسعه بیماری انجام‌شده است. به‌عنوان‌مثال، روتم و

همکاران(Rotem *et al.* 1962) دریافتند که وجود شرایط محیطی مناسب در صبح، به عبارتی آبیاری بارانی در صبح، در مقایسه با ظهر یا شب برای بیماری بادزدگی سیب‌زمینی مناسب‌تر است. آبیاری بارانی با تغییر شرایط محیطی به‌ویژه با ایجاد آب آزاد بر رشد تأثیر می‌گذارد (Rotem and Palti 1969, Ludy *et al.* 1997, Akhavan *et al.* 2013). بیماری‌های پوسیدگی نرم ناشی از باکتری‌ها تحت تأثیر حضور رطوبت آزاد در محل آلودگی قرار دارند (Ludy *et al.*, 1997). همبستگی مثبت قابل‌توجهی بین جمعیت باکتریایی و شدت بیماری در پژوهش‌های سایر محققین نشان داده‌شده است (Smitley and McCarter 1982, Ludy *et al*, 1997). به‌عنوان‌مثال، لکه برگی گوجه‌فرنگی و جمعیت رورست *P. syringae* pv. *tomato* در شرایط مرطوب (آب آزاد) و خنک سریع افزایش می‌یابد (Smitley and McCarter 1982).

در این مطالعه، بازدیدهای مزرعه‌ای و گلخانه‌ای نشان داد که قبل از طلوع آفتاب قطرات ترشحات باکتریایی (oozing) روی برگ مشاهده می‌شود که به‌تدریج باعث آب سوختگی و سوختگی حاشیه برگ می‌گردد. در شرایط رطوبت نسبی بالا در گلخانه قطرات آب از سقف گلخانه روی گیاهان می‌افتد و شرایط مناسبی را برای رشد باکتری و افزایش جمعیت فراهم می‌کند، آبیاری بارانی نیز باعث ایجاد شرایط مشابه در مزرعه می‌شود. قطرات آب روی برگ در معرض تابش نور خورشید قرار می‌گیرند و به‌عنوان ذره‌بینی عمل کرده و باعث آب سوختگی بافت زیر قطره شده و نفوذ باکتری و توسعه بیماری را تسهیل می‌کند.

اگرچه *P. marginalis* به‌عنوان یک بیمارگر فرصت‌طلب محسوب می‌شود اما در شرایط خاص و با وجود عوامل پیش آمودگی (وجود رطوبت نسبی بالا، آب آزاد در سطح اندام‌ها، دمای محیط، وضعیت تغذیه و سن گیاه) می‌تواند باعث بیماری و خسارت اقتصادی شود (Godfrey and Marshall 2002, Scortichini 1994, Achbani *et al.* 2014). سویه‌های بیماری‌زا این باکتری در مراحل پایانی رشد گیاه باعث بیماری می‌شوند (Miller 1980)، در این پژوهش نیز در مزارع چغندرقند، سیب‌زمینی و گندم و همچنین در شرایط گلخانه نیز در خیار در مراحل پایانی رشد گیاه درصد آلودگی، شدت بیماری و فراوانی جداسازی باکتری بسیار چشمگیر بود و در مراحل اولیه رشد گیاه به‌رغم شرایط دمایی و رطوبتی مناسب علائم بیماری ناشی از *P. marginalis* مشاهده نشد. بر این اساس شاید بتوان گفت که مهم‌ترین عامل پیش آمودگی برای ایجاد بیماری توسط *P. marginalis* سن گیاه باشد.

برخی محققان پیشنهاد کرده‌اند که ممکن است دمای سرد به‌عنوان یک پیش آمودگی برای پوسیدگی باکتریایی *P. marginalis* بافت‌های گیاهی باشد و یا شب‌های خنک و روزهای گرم و مرطوب در گسترش بیماری‌های باکتریایی مؤثر است (Berger 1967). عوامل دیگری همچون نوسان در بارندگی، درجه حرارت، نوع خاک و مواد مغذی قابل‌دسترس نیز ممکن است بر حساسیت گیاهان مختلف به *P. marginalis* تأثیر بگذارند (Miller 1980). در این بررسی در مزارع چغندرقند و سیب‌زمینی علائم سوختگی برگ در اواسط شهریورماه مشاهده شد، در این زمان دمای هوا در بعضی شب‌ها کمتر از ۵ درجه سلسیوس می‌رسید. باوجودی که برخی از سویه‌های *P. marginalis*به‌طور قابل‌توجهی باعث بیماری نشدند، اما متابولیتهای ثانویه دفع شده آن‌ها ممکن است شرایط مناسب را برای رشد فرم‌های بیماری‌زا از یک باکتری مشابه ایجاد کنند. این سویه‌ها گرم منفی، متغیر در تولید

لوان، اکسیداز مثبت، قادر به پوسیدگی غده سیب‌زمینی، آرژنین دی هیدرولاز متغیر واکنش‌های متفاوت در ایجاد فوق حساسیت در توتون داشتند و در محیط کشت KB رنگ‌دانه فلورسنت (زرد-سبز) تولید کردند.

مشاهدات میدانی نشان می‌دهد که در مزارع تنوع زیادی ازنظر میزان بیماری وجود دارد، اما واقعیت این است که *P. marginalis* نه‌تنها موجب بیماری می‌شود، بلکه باعث آسیب‌های اقتصادی در تولید برخی محصولات کشاورزی نیز می‌گردد. هیچ اقدامات مدیریتی خاصی برای کنترل بیماری در مزرعه توصیه نشده است(Berger 1967).

بسیاری از سودوموناس‌های فلورسنت با گونه‌های گیاهی در تعامل هستند. آن‌ها به‌طور شاخص ساکن برگ و ریشه هستند، برخی از گونه‌ها یک رابطه همزیستی خاصی با گیاهان میزبان دارند. علاوه بر این، برخی سودوموناس‌های با پتانسیل بیماری‌زایی در میزبان خود یافت می‌شوند، به‌طوری‌که در گونه خاصی بیماری‌زا هستند ولی در دیگر گیاهان غیر بیماری‌زا بوده و به‌صورت رورست زندگی می‌کنند (Kudela *et al.* 2010). *P. marginalis* به‌عنوان یکی از سودوموناس‌های فلورسنت مولد پوسیدگی نرم و اکسیداز مثبت است(Lelliott *et al.* 1966; Janse *et al.* 1992) و بر اساس آنالیز16S rRNA در گروه *P. fluorescens* قرار داده‌شده است (Anzai *et al.* 2000). بر اساس این پژوهش و مطالعات قبلی، گرچه *P. marginalis*یک باکتری رورست است، اما در شرایط خاص می‌تواند بیماری‌زا باشد. شرایط لازم برای القاء بیماری توسط این باکتری، جمعیت بالایی از باکتری، قطرات آب در سطح برگ و رطوبت نسبی بالا در محیط است (Kudela *et al.* 2010).

P. marginalis (=P. fluorescens) در اغلب گیاهان سبزی و صیفی به‌ویژه کدوئیان قابل‌انتقال با بذر هست. در گلخانه‌های ورامین خسارت این باکتری روی خیار بیشتر از سایر عوامل بیماری‌زا مانند سفیدک کرکی است و گاهی تا نابودی کامل بوته‌های خیار در برخی گلخانه‌ها قابل‌مشاهده است (شهریاری و همکاران ۱۳۸۴). در سال‌های اخیر *P. marginalis* از میزبان‌های گوناگون زراعی در ایران در شرایط مزرعه و گلخانه جداسازی و اثبات بیماری‌زایی شده است (قاسمی و صالحی ۱۳۸۰، شهریاری و همکاران ۱۳۸۴، صحراگرد ۱۳۸۵، صحراگرد و همکاران ۱۳۸۵). با توجه به اینکه این باکتری به‌صورت رورست در اغلب گیاهان دیده می‌شود، به نظر می‌رسد که شرایط گلخانه و رطوبت نسبی بالا برای بروز این باکتری به‌عنوان یک بیمارگر مساعد باشد. در این بررسی نیز در اغلب موارد از بوته‌های خیار دارای علائم لکه برگی و سوختگی برگ و پوسیدگی میوه‌های جوان باکتری *P. marginalis* جداسازی شد. این وضعیت در کشت‌های پاییزه و زمستانه بیشتر مشاهده شد که احتمالاً مربوط به شرایط محیطی مناسب (رطوبت نسبی بالا و خنک بودن دمای گلخانه) برای باکتری است، در برخی گلخانه‌ها علیه این بیمارگر در طول دوره برداشت پنج الی شش بار سم‌پاشی با ترکیبات مسی صورت می‌گیرد، که در برخی موارد نتیجه‌بخش نیست. گزارش‌هایی از مقاومت برخی از سویه‌های باکتری‌های عامل لکه برگی و سوختگی برگ ناشی از گونه‌های *Pseudomonas* , *Xanthomonas* بر ترکیبات مسی وجود دارد(Scheck and Psheidt 1998). برای مدیریت کنترل شیمیایی بیماری‌های باکتریایی ناشی از بیمارگرهای فوق استفاده از یکی از ترکیبات مانکوزب، سولفات روی و سولفات آهن به همراه ترکیبات مسی اثر هم‌افزایی (synergist) در کنترل این بیماری‌ها دارد (Scheck and Psheidt 1998) ، در سال‌های اخیر توصیه

این ترکیبات شیمیایی در کنترل شیمیایی بیماری‌های باکتریایی با علائم لکه برگی و سوختگی برگ به‌ویژه در گیاهان گلخانه‌های در مقایسه با استفاده تنها از ترکیبات مسی رضایت‌بخش بوده است.

با توجه به اینکه تقریباً تمامی بیمارگرهای باکتریایی برای تکثیر، نفوذ و ایجاد بیماری به شرایط مرطوب به‌ویژه آب آزاد نیاز دارند (Goto 1990)، لذا گلخانه این شرایط را فراهم می‌کند و شاید بتوان گفت مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی تولید محصولات گلخانه‌ای بیمارگرهای باکتریایی هستند، این در حالی است که منبع اولیه آلودگی توسط اندام‌های تکثیری آلوده یا خاک و آب آلوده فراهم شود، به همین دلیل می‌توان گفت آستانه اقتصادی خسارت بیماری‌های باکتریایی به دلیل تکثیر سریع سلول‌های باکتری به‌مراتب بایستی پائین‌تر از سایر بیمارگرها باشد. همچنین بیمارگرهای باکتریایی بافت‌های شاداب، اسفنجی و ترد را ترجیح می‌دهند که این شرایط معمولاً در گیاهان گلخانه‌ای بیشتر از شرایط مزرعه و باغ فراهم است.

در برخی موارد برهمکنش عوامل بیماری‌زای گیاهی با عوامل محیطی و تغذیه‌ای باعث تشدید خسارت بیماری‌های ناشی از عوامل زنده می‌شود. در این بررسی در برخی گلخانه‌های پرورش خیار که میزان رطوبت نسبی در حد اشباع بود، همچنین میزان مصرف کودهای ازته بیش از نیاز بوته‌های خیار است، عارضه ریزش گل‌ها و میوه‌های جوان خیار و گاهی پوسیدگی میوه مشاهده شد، در چنین مواردی شدت بیماری سوختگی برگ ناشی از *P. marginalis* افزایش چشمگیر نشان داد و از میوه‌های خیار با علائم پوسیدگی و پلاسیدگی باکتری فوق جدا شد، توصیه کاهش مصرف کودهای ازته و کاهش رطوبت نسبی گلخانه اثر فراوانی در کاهش بیماری داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش قسمتی از نتایج پروژه تحقیقاتی شماره ۰-۴۲-۱۶-۸۸۰۵۵ مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی است که اعتبار آن توسط سازمان جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری تأمین شد، از سازمان مذکور به خاطر تأمین اعتبار پژوهش فوق سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Achbani E., Sadik S., El Kahkahi R., Benbouazza A., Mazouz H. 2014. First report on *Pseudomonas marginalis* bacterium causing soft rot of onion in morocco. Atlas Journal of Biology 3:218–223.

Akhavan A., Bahar M., Askarian A., Lak M.R., Nazemi A. and Zamani Z. 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. SpringerPlus 2:41.

Amanifar N., Taghavi, T. Izadpanah K. and Babaei Gh. 2014. Isolation and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from Grapevine and Almond in Iran. Phytopathologia Mediterranea 53:318−327.

Amanifar N., Taghavi T. and Salehi M. 2016. *Xylella fastidiosa* from almond in Iran: overwinter recovery and effects of antibiotics. Phytopathologia Mediterranea 55:337-345.

Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H. and Oyaizu H. 2000. Phylogenic affiliation of the pseudomonads based on 16SrRNA sequence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:1563–1589.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.H. and Struhl K. 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, NY, USA.

Berger R. D. 1967. Marginal leaf blight of lettuce. Florida State Horticultural Society:134-138

Brown N. A. 1918. Some bacterial diseases of lettuce. Journal of Agriculture Research 13:367-388.

El-Banoby F.E. and Rudolph K. 1979. Induction of water-soaking in plant leaves by extracellular polysaccharides from phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads. Physiol. Plant Pathology 15:341–49.

Fahy P.C. and Persley GT.(eds).1983.Plant bacterial disease :A diagnostic guide . Academic Press,Sydney. 393p.

FAO. 2011. The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London. 285 p.

Ghasemi A. and Salehi S. 2001. Bacterial blight of cucurbit in Varamin. Iranian journal of Plant pathology 37 (1,2):49-50 (Short report).

Ghobakhloo A., Shahriari D., Rahimian H. 2002. Occurrence of bacterial leaf spot and blight of cucurbits in Varamin and evaluation of the resistance of some cultivars and lines of cucumber to the disease. Iranian Journal of Plant Pathology 38:59–60.

Godfrey S. A. C. and Marshall J. W. 2002. Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. Plant Pathology 51**:**155–162

Goto M. 1990. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. (Translated by: Mojtaba Mohammadi) Tehran University Press. 333 p.

Hildebrand P. D. 1989. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 11:205-214.

Janse J. D., Derks H.J., Spit B.E. and Tuin van der W.R. 1992. Classification of fluorescent soft rot *Pseudomonas* bacteria, including *P. marginalis* strains, using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 15:538–553.

Jinhua L., Zhaoxiang C., Hetong Y., Guoquan L. and Di W. 2007. First report of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China. Australasian Plant Disease Notes 2:71–73.

Kudela V., Krejzar V. and Pankova I. 2010. *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas marginalis* associated with the collapse of tomato plants in rockwool slab hydroponic culture. Plant Protection Science 46:1-11.

Kumar S., Stecher G., Li M. and Tamura K. 2016. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Lelliott R.A., Billing E. and Hayward A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. Journal of Applied Bacteriology 29:470–489.

Liao C. H. and Wells **J.** M. 1987. Diversity of pectolytic, fluorescent pseudomonads causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. Phytopathology 77:673-677.

Ludy R. L., Powelson M. L. and Hemphill D. D. Jr. 1997. Effect of sprinkler irrigation on bacterial soft rot and yield of broccoli. Plant Disease 81:614-618.

Melotto M., Underwood W. and He S.Y. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. Annual Review of Phytopathology 46:101–122.

Miller S.A.1980. Susceptibility of lettuce cultivars to marginal leaf blight caused by *Pseudomonas marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925, New Zealand Journal of Experimental Agriculture 8:169-171

Obradovic A., Mijatovic M., Ivanovic M. and Arsenijevic M. 2002. Population of bacteria infecting cauliflower in Yugoslavia. Acta Horticulturae 579:497–500.

Rotem J. and Palti J. 1969. Irrigation and plant disease. Annual Review of Phytopathology 7:267-288.

Rotem J., Palti J. and Rawitz E. 1962. Effect of irrigation method and frequency on development of *Phytophthora infestans* on potatoes under arid conditions. Plant Disease Reporter 46:145-149.

Sahragard N. 2006. Identification of bacteria associated to leaf blight of greenhouse cucumber in Chahar Mahal va Bakhtiari province. P. 223 in: Proc.17th Iran. Plant Protec. Cong., Karaj, Iran, Volume 2.

Sahragard N. , Babaee Gh. Eshaghi R. and Kevani M. 2006. Occurrence a new disease with bacterial blight symptoms on leaf and stem of potato in Chahar Mahal va Bakhtiari province. P.169 in: Proc.17th Iran. Plant Protec. Cong., Karaj, Iran, Volume 2.

Schaad N.W., Jones J.B. and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**.** APS Press, St. Paul, MN, USA. 373 p.

Scheck H. J. and Pscheidt J. W. 1998. Effect of copper based bactericides on copper -resistant and sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Disease 82:397-406.

Schollenberger M. 2005. Bacterial leaf spot of philodendron. Phytopathologia Polonica 35:103–108.

Scortichini M. 1994. Leaf spot and blight of Dieffenbachia amoena caused by *Pseudomonas marginalis* pv. Marginalis. Plant Pathology 43:941-943.

Shahriari D., Ghobakhloo A., Hafez Kh., Rahimian H. and Ghasemi A. 2005. Etiology of bacterial blight of cucurbits in Varamin and reaction of some cucumber cultivars and lines to the pathogen. Iranian journal of plant pathology 41: 79-86 (English) and 203-214 (Farsi).

Smitley D. R. and McCarter S. M. 1982. Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development. Plant Disease 66:713-717.

Vassilev V.I. 1998. *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* and some other bacteria on faba bean. Fabis Newsletter 41:21–24.

Weilan L, Leonid N. T., Seung-Han K., Seung-Yeol L., and Hee-Young J. 2018. Occurrence of Bacterial Stem Rot of *Ranunculus asiaticus* Caused by *Pseudomonas marginalis* in Korea. Research Plant Disease 24: 138-144.

Wimalajeewa D. L. S., Hallam N. D., Hayward A. C. and Price T. V. 1987. The etiology of head rot disease of broccoli. Australian Journal of Agricultural Research 38:735-742.

Yakoubou S. and Coté J.C. 2010. Phylogeny of γ-proteobacteria inferred from comparisons of 3’ end 16S rRNA gene and 5’ end 16S-23S ITS nucleotide sequences. Natural Science 2:535-543.