٨٧/١/١٨١٥
٨٧/١٠/٢٢

١٩٨٦

دانشگاه تبریز
دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه:
جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

عنوان:

بررسی مقاومت نسبی ارقام تجارتی گیلاس به بیماری شانکر باکتریایی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* و تعیین نشانگرهای بیوشیمیایی مقاومت

اساتید راهنما:
دکتر حشمت اله رحیمیان
دکتر میر محمد علی محمودپور

اساتید مشاور:
مهندس ابوالقاسم قاسمی
مهندس اسماعیل ترابی

پژوهشگر:
پرتو حمزه‌نژاد

مهرماه ۱۳۸۲
شماره پایان‌نامه:۴۲

۱۳۸۷/۱۰/۲۱

۱۰۹۵۶۰

تقدیم به پدر و مادر مهربانم:

آنانکه عشقشان آسمانی و محبتشان ستودنی است.

تقدیم به همسر عزیزم:

او که همراهی صمیمی است و تمامی دشواریهای

تحصیلم را به گذشت زیبای خویش سپرد.

و خواهران گرامیم که دوستشان دارم.

نام خانوادگی دانشجو: حمزه نژاد نام: پرتو

عنوان پایان‌نامه: بررسی مقاومت نسبی ارقام تجارتی گیلاس به بیماری شانکر باکتریایی و تعیین نشانگرهای بیوشیمیایی مقاومت

اساتید راهنما: دکتر حشمت‌اله رحیمیان- دکتر میر محمد علی محمودپور

اساتید مشاور: مهندس ابوالقاسم قاسمی- مهندس اسماعیل ترابی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: مهندسی کشاورزی گرایش: بیماری شناسی گیاهی

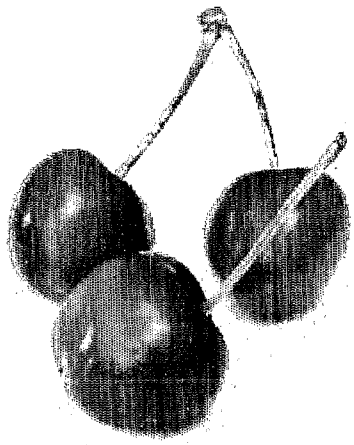
دانشگاه: تبریز دانشکده: کشاورزی تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۸۲/۷/۱۹ تعداد صفحه: ۱۲۷

واژه‌های کلیدی: شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، گیلاس، مقاومت، نشانگر بیوشیمیایی، آنزیم، پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در تمامی مناطق اصلی پرورش درختان میوه در دنیا شیوع داشته و یکی از مهمترین بیماریهای درختان میوه هسته‌دار از جمله گیلاس در بسیاری از نواحی پرورش این درختان می‌باشد. از آنجائیکه ارقام مختلف گیلاس نسبت به بیماری شانکر باکتریایی آسیب‌پذیری متفاوتی دارند، استفاده از ارقام مقاوم به این بیماری راهکار مناسبی برای کنترل آن است. نشانگرهای بیوشیمیایی مقاومت را می‌توان به‌عنوان بخشی از مکانیسم مقاومت و یک ابزار قابل اعتماد جهت پیش‌بینی مقاومت به بیماری مورد استفاده قرار داد. در این پژوهش ابتدا ارقام گیلاس از نظرآسیب‌پذیری به شانکر باکتریایی بررسی شدند، سپس آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در برهم کنش گیلاس- باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) مورد ارزیابی قرار گرفته و پیوستگی این آنزیمها با مقاومت به شانکر باکتریایی بررسی گردید. ارقام گیلاس از نظر درجه آسیب‌پذیری به شانکر باکتریایی اختلاف بسیار معنی‌داری نشان دادند. ارقام شعاع السلطنه، سیاه مشهد، بلامارکاد پیش‌رس، شبستر، حاج یوسفی، ناپلئون، دیررس ایتالیا ، رودچون و قزوین نسبت به دیگر ارقام مقاومت بالاتری نشان دادند. ارقام هیبرید شماره یک کرج، سیاه دانشکده، همدان، لامبرت، قرمز رضائیه، مشهد، زرد دانشکده، اراک، ابرده و میکرز به‌عنوان نیمه‌آسیب‌پذیر و ارقام بلادی‌باربون و قرمز باغ نو به‌عنوان آسیب‌پذیر ارزیابی شدند، ولی هیچکدام از ارقام گیلاس کاملاً مقاوم نبودند. بنابه نتایج حاصل از سنجش پروتئین قابل حل در نمونه‌های ارقام گیلاس، افزایش در میزان پروتئین در نمونه‌های آلوده به *Pss* نسبت به نمونه‌های شاهد مشاهده گردید. فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در اثر آلودگی برگها

به *Pss* در ارقام نسبتاً مقاوم و تا حدودی در نیمه‌آسیب‌پذیر برحسب پروتئین کل محلول و هم برحسب وزن تر بافت افزایش یافت، ولی در ارقام آسیب‌پذیر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز افزایش چندانی نداشت. فعالیت این آنزیم در بافتهای آلوده به‌مراتب بیش از بافتهای سالم بود که بیانگر فعال شدن پاسخ دفاعی گیاه علیه عامل بیماریزا بود. در بررسی بدست آمده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید، باندهای ایزوزایمی پلی‌فنل‌اکسیداز ارقام مختلف گیلاس الگوی مشابهی نشان دادند. ایزوزایمهای این آنزیم در همه ارقام از نوع آنیونی بوده و در ژل جداکننده تشکیل شدند. هیچ باند ایزوزایمی کاتیونی در بین ارقام مختلف مشاهده نشد. با توجه به فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در اکسیداسیون فنل‌ها به کینون‌ها و همچنین لیگنینی کردن بافت، مرتبط بودن این آنزیم در مقاومت به بیماری شانکر باکتریایی محرز به نظر می‌رسد. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که فعالیت این آنزیم در بافت آلوده بیش از بافتهای سالم بوده و این فعالیت در ارقام نسبتاً مقاوم بیش از ارقام دیگر مشاهده گردید. در الگوی ایزوزایمی پراکسیداز، ارقام مختلف باندهای ایزوزایمی مشابهی را نشان دادند. از نظر وزن مولکولی اختلافی بین ایزوزایمهای ارقام مختلف دیده نشد. ایزوزایمها از نوع آنیونی تشخیص داده شدند که بین سلولی بوده و در لیگنین‌سازی و چوب‌پنبه‌ای شدن دیواره سلولی دخالت دارند و می‌توان گفت که در این سیستم میزبان-پاتوژن ارتباط زیادی بین فعالیت پراکسیداز و مقاومت به بیماری وجود دارد. فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام گیلاس نزدیک به صفر بوده و تکرارهای متعدد و تغییر در میزان مواد آزمایشی نیز منجر به واکنش فعالی از این آنزیم نگردید. در الگوی ایزوزایمی کاتالاز ارقام مختلف هیچ باندی در زمینه آبی ژل مشاهده نشد و احتمالاً این آنزیم فعال نبوده است. بنابه نظر محققین، آنزیم کاتالاز در مکانیسم دفاعی برعلیه تنش‌های محیطی و بیمارگرها نقش داشته ولی عمل حفاظتی آن چندان قوی نیست زیرا مکان اصلی آن در پراکسی‌زومها میباشد. با توجه به نتایج این پژوهش آنزیم کاتالاز را نمی‌توان به‌عنوان نشانگر مقاومت به بیماری شانکر باکتریایی در ارقام گیلاس به حساب آورد. بنابه نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز میزان فعالیت آنزیم در نمونه‌های آلوده به *Pss* نسبت به نمونه‌های شاهد تغییر چندانی نداشته و فعالیت این آنزیم همگام با روند مقاومت به شانکر باکتریایی ارزیابی نشد. الگوی ایزوزایمی آنزیم سوپراکسیدیسموتاز در ارقام مختلف مشابه بوده و از نظر وزن مولکولی اختلافی بین ایزوزایمها مشاهده نگردید. استفاده از این آنزیم به‌عنوان نشانگر بالقوه برای بررسی مقاومت به بیماری شانکر باکتریایی ارقام مختلف گیلاس توصیه نمی شود.



فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- هدف ۳

۱-۳- عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار و خصوصیات باکتری شناختی آن ٤

۱-٤- علائم بیماری شانکر باکتریایی در ختان میوه هسته‌دار ۷

۱-٥- دامنه میزبانی ۱۲

۱-٦- چرخه بیماری ۱۲

۱-۷- اهمیت اقتصادی بیماری ۱٥

۱-۸- عوامل در گسترش پاتوژن و پیشرفت بیماری ۱٦

۱-۸-۱- اسیدیته (pH) خاک ۱٦

۱-۸-۲- عناصر موجود در خاک ۱٦

۱-۸-۳- سرمازدگی ۱٦

۱-۸-٤- علف‌های هرز و بقایای گیاهی ۱۷

۱-۸-٥- زخم ۱۸

۱-۸-٦- رطوبت ۱۸

۱-۸-۷- حضور عوامل دیگر آلودگی ۱۸

۱-۹- مدیریت و کنترل بیماری ۱۹

۱-۹-۱- استفاده از ارقام مقاوم ۱۹

۱-۱۰- آنزیم‌ها ۲۰

۱-۱۱- آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (Polyphenol oxidase) ۲۱

۱-۱۱-۱- نقش آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در مقاومت ۲۳

۱-۱۲- آنزیم پراکسیداز (Peroxidase) ۲٥

۱-۱۲-۱-نقش آنزیم پراکسیداز در مقاومت ۳۰
۱-۱۳- آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (Superoxide dismutase) ۳۳
۱-۱۳-۱- نقش آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مقاومت ۳۵
۱-۱٤- آنزیم کاتالاز (Catalase) ۳۷
۱-۱٤-۱- نقش آنزیم کاتالاز در مقاومت ۳۸

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- محل اجرای آزمایش ٤۰
۲-۲- مواد گیاهی ٤۱
۲-۳- تهیه سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ٤۲
۲-٤- تهیه مایه تلفیح ٤۲
۲-٥- آلوده سازی ارقام گیلاس به باکتری *Pss* ٤۳
۲-٦- داده برداری از ارقام آلوده شده گیلاس ٤٤
۲-۷- طرح آماری مورد استفاده در آزمایش ارزیابی مقاومت نسبی ٤٤
۲-۸- ارزیابی ماکرهای بیوشیمیایی مقاومت ٤٥
۲-۹- طرح آماری مورد استفاده در آزمایش ارزیابی مارکرهای بیوشیمیایی مقاومت ٤٥
۲-۱۰- آلوده سازی ارقام گیلاس ٤٦
۲-۱۱- نمونه برداری از برگهای گیلاس ٤۷
۲-۱۲- عصاره گیری از برگ‌های نمونه‌برداری شده ٤۷
۲-۱۳- اندازه‌گیری پروتئین کل محلول نمونه ٤۹
۲-۱٤- استاندارد کردن سیستم جهت سنجش فعالیت آنزیمی ٥۰
۲-۱٤-۱- استاندارد کردن سیستم جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ٥۰
۲-۱٤-۲- استاندارد کردن سیستم جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ٥۱
۲-۱٤-۳- استاندارد کردن سیستم جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ٥۱
۲-۱٥- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ٥۲
۲-۱٦- رنگ آمیزی باندهای ایزوزایمی پلی‌فنل‌اکسیداز ٥۳
۲-۱۷- اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز ٥٤
۲-۱۸- رنگ آمیزی باندهای ایزوزایمی پراکسیداز ٥٤
۲-۱۹- اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ٥٥
۲-۲۰- رنگ آمیزی باندهای ایزوزایمی سوپراکسیددیسموتاز ٥٦
۲-۲۱- اندازه گیری فعالیت ایزوزایم‌های کاتالاز ٥٦

۲۲-۲- رنگ آمیزی باندهای ایزوزایمی کاتالاز ۵۷

فصل سوم: نتایج و بحث

۱-۳- دسته‌بندی ارقام تجارتی گیلاس برحسب مقاومت به بیماری شانکر باکتریایی ۵۸
۲-۳- ارزیابی مارکرهای بیوشیمیایی مقاومت ۶۱
۱-۲-۳- اندازه‌گیری پروتئین قابل حل در محلول نمونه ۶۱
۲-۲-۳- استاندارد کردن سیستم جهت سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۲
۳-۲-۳- اندازه گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۵
۴-۲-۳- رنگ آمیزی ایزوزایم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز ۷۳
۵-۲-۳- استاندارد کردن سیستم جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ۷۶
۶-۲-۳- اندازه‌گیری فعالیت ایزوزایمهای پراکسیداز ۷۹
۷-۲-۳- باندهای ایزوزایمی پراکسیداز ۸۷
۸-۲-۳- نتایج حاصل از استاندارد کردن سیستم جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۰
۹-۲-۳- نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۵
۱۰-۲-۳- ایزوزایم های سوپراکسیددیسموتاز ۹۹
۱۱-۲-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ۱۰۵
۱۲-۲-۳- رنگ‌آمیزی ایزوزایم‌های کاتالاز ۱۰۵
۳-۳- بحث ۱۰۶

فصل چهارم: منابع

فهرست شکل‌ها:

۱-۱- علائم بیماری شانکر باکتریایی گیلاس ۱۱
۱-۲- ارقام تجارتی گیلاس مورد استفاده در ارزیابی مقاومت ۴۲
۲-۲- شانکر ایجاد شده روی شاخه گیلاس ۲۰ روز پس از تلقیح *Pss* ۴۴
۳-۲- علامت گذاری برگهای ارقام مختلف گیلاس آلوده شده با پاتووار *Pss* ۴۷
۴-۲- عصاره‌های حاصل از برگهای نمونه برداری شده ۴۸
۱-۳- نقوش ایزوزایمی پلی‌فنل‌اکسیداز برگهای ارقام گیلاس ۲۴ ساعت پس از تلقیح ۷۴
۲-۳- نقوش ایزوزایمی پلی‌فنل‌اکسیداز برگهای ارقام گیلاس ۷۲ ساعت پس از تلقیح ۷۵
۳-۳- نقوش ایزوزایمی پراکسیداز برگهای ارقام گیلاس ۲۴ ساعت پس از تلقیح ۸۸
۴-۳- نقوش ایزوزایمی پراکسیداز برگهای ارقام گیلاس ۷۲ ساعت پس از تلقیح ۸۹
۵-۳- نقوش ایزوزایمی سوپراکسیددیسموتاز برگهای ارقام گیلاس ۲۴ ساعت پس از تلقیح ۱۰۱
۶-۳- نقوش ایزوزایمی سوپراکسیددیسموتاز برگهای ارقام گیلاس ۴۸ ساعت پس از تلقیح ۱۰۲

۷-۳- نقوش ایزوزایمی سوپراکسیددیسموتاز برگهای ارقام گیلاس ۷۲ ساعت پس از تلقیح ۱۰۲
۸-۳- نقوش ایزوزایمی سوپراکسیددیسموتاز برگهای ارقام گیلاس ۹۶ ساعت پس از تلقیح ۱۰۳
۹-۳- اثر بازدارنده‌های KCN و H_2O_2 روی ایزوزایم‌های سوپراکسیددیسموتاز (بازدارنده‌ها در چاکهای ژل ریخته شده است) ۱۰۴
۱۲-۳- اثر بازدارنده‌های KCN و H_2O_2 روی ایزوزایم‌های سوپراکسیددیسموتاز (برشهای مختلف ژل در داخل محلول بازدارنده قرار داده شدند) ۱۰۴

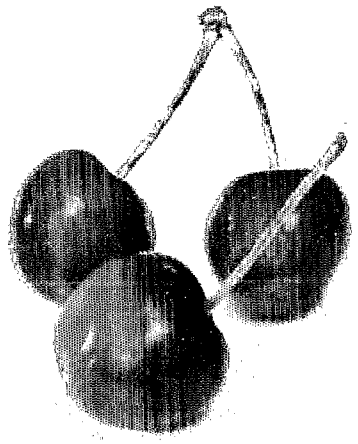
فهرست نمودارها:

۱-۳- سنجش پروتئین استاندارد با استفاده از آلبومین سرم گاوی ۶۱
۲-۳- استاندارد کردن زمان اندازه‌گیری جذب در سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۲
۳-۳- تعیین طول موج ماکزیمم در سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۳
۴-۳- تعیین pH اپتیمم بافر در سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۳
۵-۳- تعیین بهترین غلظت پرولین در سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۴
۶-۳- تعیین بهترین غلظت کتکول در سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۴
۷-۳- تاثیر غلظت های مختلف پروتئین در سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز ۶۵
۸-۳- مقایسه فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در هوای آزاد ۷۰
۹-۳- مقایسه فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گلخانه ۷۱
۱۰-۳- استاندارد کردن زمان اندازه‌گیری جذب در سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ۷۶
۱۱-۳- تعیین طول موج اپتیمم در سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ۷۷
۱۲-۳- تعیین pH اپتیمم بافر در سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ۷۷
۱۳-۳- تعیین بهترین غلظت گوئیکول در سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ۷۸
۱۴-۳- تعیین بهترین غلظت پراکسیدهیدروژن در سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز ۷۸
۱۵-۳- تاثیر غلظت های مختلف پروتین در سنجش فعالیت آنزیم فعالیت آنزیم پراکسیداز ۷۹
۱۶-۳- مقایسه فعالیت آنزیم پراکسیداز در هوای آزاد ۸۴
۱۷-۳- مقایسه فعالیت آنزیم پراکسیداز در گلخانه ۸۵
۱۸-۳- استاندارد کردن زمان اندازه‌گیری جذب در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۰
۱۹-۳- تعیین طول موج اپتیمم در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۱
۲۰-۳- تعیین pH اپتیمم بافر در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۱
۲۱-۳- تعیین مناسب‌ترین میزان KCN در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۲
۲۲-۳- تعیین بهترین میزان NBT در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۲
۲۳-۳- تعیین بهترین میزان متیونین در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۳

۲٤-۳- تعیین بهترین میزان ریبوفلاوین در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹۳
۲۵-۳- تعیین بهترین میزانNa,EDTA در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹٤
۲٦-۳- تاثیر غلظت‌های مختلف پروتئین در سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹٤
۲۷-۳- فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برحسب واحد ۹۸

فهرست جدول‌ها:

۱-۲-اسامی ارقام تجارتی گیلاس به‌کار رفته در آزمایش ارزیابی مقاومت نسبی به عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار..... ٤۱
۱-۳- تجزیه واریانس میانگین طول شانکر روی ۲۱ رقم مختلف گیلاس موجود در گلخانه و هوای آزاد ۵۹
۲-۳- گروهبندی ارقام گیلاس بر اساس میزان آسیب‌پذیری نسبی به شانکر باکتریایی ناشی از باکتری *Pss* ٦۰
۳-۳-تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز..... ٦۷
٤-۳-تجزیه واریانس مقایسات متعامد فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (هوای آزاد)..... ٦۸
۵-۳-تجزیه واریانس مقایسات متعامد فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (گلخانه)..... ٦۹
٦-۳- ضرایب رگرسیون رابطه بین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و میزان مقاومت نسبی ارقام گیلاس به شانکر باکتریایی..... ۷۲
۷-۳- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز ۸۱
۸-۳-تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز (هوای آزاد)..... ۸۲
۹-۳- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم پراکسیداز (گلخانه)..... ۸۳
۱۰-۳- ضرایب رگرسیون رابطه بین فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان مقاومت نسبی ارقام گیلاس به شانکر باکتریایی..... ۸٦
۱۱-۳- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۹٦
۱۲-۳- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ساعات مختلف نمونه‌برداری..... ۹۷
۱۳-۳- ضرایب رگرسیون رابطه بین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ومیزان مقاومت نسبی ارقام گیلاس به شانکر باکتریایی ۹۹



فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

ایران به علت موقعیت جغرافیایی خاص و داشتن اقلیم‌های مختلف از عمده‌ترین کشورهای تولید کننده میوه در جهان بوده و از لحاظ تولید میوه در میان ۱۰ کشور اول تولیدکننده قرار دارد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۱). با توجه به جمعیت روزافزون کشور و صادرات این محصولات به کشورهای غربی و حوزه خلیج فارس، ضروری است در جهت توسعه باغها و افزایش این محصولات برنامه‌ریزی اصولی صورت گیرد. یکی از روشهای افزایش محصولات باغی، جلوگیری از خسارت عوامل بیماریزا و آفات در باغها می‌باشد.

بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در تمامی مناطق اصلی پرورش درختان میوه در دنیا شیوع دارد. این بیماری به عنوان گموز[1]، بلاست شکوفه[2]، مرگ سرشاخه[3]، بلایت اسپور[4] نیز شناخته شده و از نظر خسارت اقتصادی یکی از مهمترین بیماریهای درختان میوه هسته‌دار در بسیاری از نواحی پرورش این درختان بشمار می‌رود (Agrioss, 1988).

در سال ۱۳۸۱ سطح مبارزه با بیماریهای گیاهی در ایران ۴۰۸۸۳ هکتار گزارش شده است که ۵۶۵۰ هکتار آن مربوط به مبارزه با بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار می‌باشد. با توجه به سطح زیرکشت ۱۲۱۶۹۶/۵ هکتاری و تولید سالانه ۱۱۲۸۴۱۹/۴

1- Gummosis
2- Blossom blast
3- Dieback
4- Spur blight

تن میوه حاصل از درختان میوه هسته‌دار در کشور (که ۲٤/۱۱۷ هکتار از سطح زیر کشت با تولید سالانه ۲۲۸/۳۹۷ تن آن مربوط به گیلاس می‌باشد) و خساراتی که بیماری شانکر باکتریایی به این محصولات وارد می‌نماید، این بیماری حائز اهمیت است (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۱؛ خرازچی، ۱۳۸۰).

این بیماری در استانهای خراسان، مرکزی، گلستان، مازندران، تهران، آذربایجان غربی و شرقی و همچنین کردستان از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و همه ساله خسارتهای جبران ناپذیری را به درختان میوه هسته‌دار وارد می‌سازد. عدم آشنایی باغداران با این بیماری و همچنین نحوه کنترل نسبتاً مشکل آن از جمله مهمترین عوامل افزایش خسارت و نابودی درختان بر اثر ابتلاء به این بیماری گزارش گردیده است.

از آنجایی که ارقام مختلف هسته‌دار نسبت به بیماری شانکر باکتریایی درختان میوهٔ هسته‌دار آسیب‌پذیری متفاوتی دارند، استفاده از ارقام مقاوم به این بیماری یکی از راههای مناسب کنترل آن است. برهم‌کنش‌های متقابل میزبان-بیمارگر جنبه‌های مختلفی از نشانگرها[1] را برای مقاومت در برمی‌گیرد. فرآیند انتخاب ارقام به روش سنتی مشکل و وقت‌گیر بوده و عوامل محیطی نیز در بروز مقاومت و میزان آن نقش داشته که این نقش اغلب منفی است. نشانگرهای بیوشیمیایی مقاومت به‌عنوان بخشی از مکانیسم مقاومت محسوب شده و به صورت یک ابزار عملی و قابل اعتماد برای پیش‌بینی مقاومت به بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Reuveni, 1995).

1- Markers

۲-۱- هدف

هدف این طرح بررسی میزان مقاومت ۲۱ رقم تجارتی گیلاس نسبت به بیماری شانکر باکتریایی است. فعالیت چهار آنزیم پراکسیداز[1]، پلی‌فنل‌اکسیداز[2]، کاتالاز[3] و سوپراکسیددیسموتاز[4] به‌عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی مقاومت در این ارقام مورد بررسی قرار گرفتند، تا بر این اساس ارقام گیلاس از نظر مقاومت به بیماری شانکر باکتریایی ارزیابی و رقم یا ارقام نسبتاً مقاوم انتخاب و معرفی گردند.

1- Peroxidase
2- Polyphenol oxidase
3- Catalase
4- Superoxide dismutase

۳-۱- عامل بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار و خصوصیات باکتری شناختی آن

سه پاتووار[1] از *Pseudomonas syringae* ممکن است عامل شانکر باکتریایی درختان میوهٔ هسته‌دار باشد:

- *P. s.* pv. *syringae* Van Hall عامل شانکر باکتریایی روی ارقام تجارتی درختان میوهٔ هسته‌دار است.

- *P. s.* pv. *morsprunorum* (Wormald) Young *et al* غالباً گیلاس، آلبالو و آلو را آلوده می‌کند.

- *P. s.* pv. *persicae* (Prunier) Young *et al* بیماری‌های لکه‌برگی، شانکر و گموز هلو را در فرانسه و زوال باکتریایی را در شلیل، هلو و آلوی ژاپنی[2] در نیوزیلند ایجاد میکند (Hattingh and Roos,1995; Cameron,1971).

هر سه پاتووار باکتری‌های گرم منفی و میله‌ای کشیده به ابعاد ۱/۵ ×۱/۲ –۰/۷ میکرومتر و متحرک با دو یا چندتاژک قطبی هستند. آنها پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات[3] را به‌عنوان ذخیره کربن جمع‌آوری نکرده و آزمونهای اکسیداز[4] و آرژنین دهیدروژناز[5] آنها منفی است.

1- Pathovar

2- *Prunus salsina*

3- Poly β-hydroxybutyrate

4- Oxidase

5- Arginine dehydrogenase

اکثر سویه‌های *P. syringae* در محیط کشت KB[1] پس از ۷۲ ساعت رشد در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد فلورسنت بوده و کلونی‌های دایره‌ای شکل با حاشیه کامل یا بریده بریده، با سطح برآمده یا فرورفته، صاف و درخشان‌که در حضور نور شیشه‌ای به‌نظر می‌رسند، تولید می‌کنند. سویه‌های مولد لوان[2] بر روی محیط کشت NSA[3] تولید کلونی‌های بزرگ به‌رنگ سفید تا کرم و دمبلی شکل می‌کنند (Jones *et al.*, 1986; Bradbury, 1986).

چندین روش برای تشخیص پاتووارهای *Pss* و *Psm* از هم وجود دارد که یکی از آنها آزمون GATTa[4] می‌باشد که شامل چهار آزمون فیزیولوژیکی بوده و به استثنای آزمون فعالیت تیروزیناز، نتایج قابل مشاهده‌ای را ارائه می‌دهند. آزمون فعالیت تیروزیناز اغلب تفسیر مشکلی دارد زیرا رنگدانه‌های سبز فلورسنت تشخیص رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز را که شاخص فعالیت تیروزیناز است، مبهم می‌سازد. پاتووار *Pss* باخصوصیت $G^+ A^+ T^- Ta^-$ و پاتووار *Psm* با خصوصیت $G^-A^-T^+Ta^+$ شناسایی می‌شوند، ولی بعضی از سویه‌های حدواسط در یک یا چند آزمون متفاوت هستند (Kotan and Sahin, 2002).

اکثرسویه‌های پاتووار *Pss* تولید توکسینی موسوم به سیرینگومایسین[5] کرده و به‌عنوان یک باکتری مولد هستهٔ یخ[6] عمل می‌کنند. سویه‌های تولید کننده سیرینگومایسین حامل

1- King B
2- Levan
3- Nutrient Sucrose Agar
4- Gelatin liquefaction, Aesculin hydrolysis, Tyrosinase activity, Tartrate utilization
5- Syringomycin
6- INA+

پلاسمید[1] هستند و ۳۰/۲ درصد از فرم‌های حدواسط نیز این توکسین را تولید می‌کنند. باکتری‌های مولد سیرینگومایسین، باکتریوسین‌های[2] سمی علیه سویه‌هایی که فعالیت هستهٔ یخ ندارند[3] تولید کرده و بدین طریق در رقابت با آنها حمایت می‌شوند (Roos and Hattingh, 1983).

تفاوتهای فنوتیپی در *Pss* بیشتر از *Psm* بوده و به‌همین دلیل از آزمونهای بیشتری برای شناخت آن استفاده می‌شود. تفاوت پاتووار *Pss* با پاتووار *Psm* براساس هیبریداسیون DNA:DNA[4] نیز تعیین می‌گردد. *P. s.* pv. *persicae* شباهت فنوتیپی زیادی با *Psm* دارد، ولی برخلاف پاتووار *Psm*، پاتووار *Pss* روی محیط‌کشت KB غیرفلورسنت بوده و روی محیط کشت Casamino acid-sucrose agar فلورسنت می‌باشد (Buonaurio and Scortichin, 1994). واکنش فوق حساسیت (HR)[5] در برگ توتون به‌عنوان یک آزمون بیماریزایی برای *Pss* به‌کار برده می‌شود (Sahin *et al.*, 1999; Klement,1982).

هرکدام از این آزمون‌ها به‌تنهایی ممکن است برای تعیین بیماریزایی سویه‌های *Pss* کافی نباشد. آزمایشات زیست‌سنجی[6] روی میوه نارس گیلاس یا کوتیلدون گیاهچه هلو نیز برای تعیین بیماریزایی سویه‌های *Pss* به‌کار برده می‌شود. وجود سویه‌های غیرفلورسنت و نیز وجود حداقل

1- Plasmid
2- Bacteriocin
3- INA-
4- DNA:DNA hybridization
5- Hypersensitive reaction
6- Bioassay

دو فرم کلنی *Pss* نشان دهنده هتروژن بودن جمعیت‌های این پاتووار است (Jones *et al.*,1986). فراهم آمدن ابزارهای بیوشیمایی جدیدتر و نیز روش‌های تشخیص ملکولی و شیمیایی، شناسایی سویه‌های *Pss* را ساده‌تر و دقیق‌تر نموده است (Rudolph, 1995; Palleroni *et al.*, 1972). استفاده از سیستم بیولوگ[1] که مشتمل بر ۹۵ نوع مختلف منبع کربن است، هتروژن بودن *Pss* را تأیید نموده است (Rudolph,1995). همچنین مشخص شده است که همولوژی DNA بین پاتووارهای مختلف *P. syringae* بین ٤٠ تا ۱۰۰ درصد است در حالی که این شباهت بین جدایه‌های مختلف یک پاتووار ۹۵ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد (Janse *et al.*, 1992; Palleroni *et al.*, 1972). سویه‌هایی که تاکنون از درختان میوهٔ هسته‌دار در ایران جدا گردیده‌اند همگی به‌عنوان *Pss* شناسایی شده‌اند (Bahar *et al.*, 1985; Shamsbakhsh and Rahimian, 1997).

٤-۱- علائم بیماری شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار

علائم این بیماری به سن درخت، رقم میزبان، نوع اندام گیاهی‌آلوده شده، سویه بیمارگر، نوع پایه، نوع منبع آلودگی، عملیات زراعی و شرایط محیطی بستگی دارد. در اغلب موارد بیش از یک علامت بیماری همزمان بر روی یک گیاه دیده می‌شود. از علائم این بیماری می‌توان به بلاست گل، مرگ جوانه‌های در حال خواب، لکه برگی‌های نکروزه، بیرنگی و یا سیاه شدن رگبرگها و برگها، ایجاد تاول روی میوه، نکروز نوک جوانه‌ها و شانکر ساقه اشاره نمود. مهمترین مشخصه

1- Biolog

این بیماری که همیشه مشهود نبوده و یا در تمامی میزبانها دیده نمی‌شود، تولید شانکر[1] به همراه ترشح صمغ[2] است (Hattingh and Roos, 1995) (شکل A ۱-۱).

شانکرها زخم‌هایی هستند که نسبت به بافت‌های سالم اطراف کمی فرورفته بوده و رنگ آنها از نارنجی روشن تا قهوه‌ای تیره متفاوت است. معمولاً از شانکرهای موجود روی درختان میوهٔ هسته‌دار مادهٔ صمغی تراوش می‌شود که این علائم به گموز موسوم هستند. نوارهای باریک قهوه‌ای رنگی از بالا و پایین شانکر به درون بافت سالم گسترش می‌یابد. ظهور شانکرها در اواخر زمستان یا اوایل بهار صورت می‌گیرد. در بهار هنگامی که درختان از خواب زمستانی بیدار می‌شوند در اطراف بیشتر شانکرها صمغ تراوش شده، از پوست گذشته و روی اندام‌های درخت می‌ریزد. شانکرهایی که موجب تراوش صمغ نمی‌شوند معمولاً شبیه به هم بوده ولی نرم‌تر، مرطوب‌تر و فرورفته بوده و ممکن است دارای بوی ترشیدگی باشند. شانکرهای ایجاد شده روی شاخه‌ها وتنه درختان بیشترین خسارت را وارد می‌سازند. شانکرهای شاخه‌ها در اطراف جوانه گل یا برگ، در قاعدهٔ شاخه‌های گل دهنده و یا در محدوده زخم‌ها (بویژه آنهایی که از هرس پاجوش‌ها ایجاد شده‌اند) گسترش می‌یابند. شانکرها به‌میزان بیشتر به سمت بالا و کمی به سمت پایین و اطراف گسترش می‌یابند و معمولاً در اواخر زمستان یا اوایل بهار شکل می‌گیرند. در صورت برش بافت‌های خارجی شانکر، بافت زیرین به‌رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز نمایان می‌شود که دارای

1- Canker
2- Gum

خطوط عمودی در داخل بافت آوندی است (Buonaurio and Scortichin, 1994) (شکل B ۱-۱).

در صورتی که شانکر دورتادور تنه یا شاخه درخت را احاطه کند، برگهای بالای آن منطقه به‌طرف داخل پیچیده و پژمرده شده و به‌رنگ سبزکمرنگ و سبز زرد درمی‌آیند. طی چند روز یا چند هفته آن شاخه یا تمام درخت در ناحیه بالای شانکر از بین رفته و بوی ترشیدگی از پوست شاخه یا درخت مرده به مشام می‌رسد. معمولاً سیستم طوقه و ریشه درخت بیمار، سالم باقی مانده و متعاقب خشک شدن قسمت‌های هوایی درخت تعداد زیادی پاجوش از پایه رشد می‌کند (Agrios, 1988; Endert and Ritchie, 1984; Goto, 1992).

عامل بیماری می‌تواند در جوانه‌های برگ و گل در حال خواب، زمستانگذرانی کند. این جوانه‌های آلوده معمولاً می‌میرند ولی بعضی در بهار باز شده و در اوایل تابستان از بین می‌روند. معمولاً برگها و میوه‌های حاصل از این جوانه‌ها خشک می‌شوند (Jones, 1971; Kotan and Sahin, 2002; Weaver, 1978).

آلودگی برگ: علائم روی برگ بصورت پراکنده دیده شده و در زمره علائم همیشگی این بیماری محسوب نمی‌شوند. لکه‌های آبگزیده با قطر ۱ تا ۳ میلی‌متر روی برگ بوجود می‌آیند. پس از بزرگ شدن برگها، لکه‌ها قهوه‌ای، خشک و شکننده می‌شوند (شکل C ۱-۱). سرانجام این مناطق افتاده و برگها ظاهری غربالی یا پاره‌پاره به‌خود می‌گیرند (Roos and Hattingh, 1987; Agrios, 1988) (شکل D ۱-۱).