مجله علوم كشاورزي ايران
جلد ۳۷، شماره ۵، سال ۱۳۸۵ (۸۵۶-۸۴۹)

شناسايي باكتريهاي عامل لكه برگي درختان توت در استان گيلان

مصطفي نيك نژاد كاظم پور*[۱]، اسماعيل كامران [۲] و سهيلا ساساني تالشي[۳]
۱، ۳، استاديار و مربی دانشكده كشاورزي دانشگاه گيلان
۲، كارشناس موسسه تحقيقات پرورش كرم ابريشم ، پسيخان- رشت
(تاريخ دريافت: ۸۴/۳/۱۸ - تاريخ تصويب: ۸٤/۱۱/۱۵)

چكيده

اين تحقيق بمنظور شناسايي عوامل بيماريزاي باكتريايي لكه برگي درختان توت در استان گيلان انجام شد. طي سالهاي ۱۳۸۰ الي۱۳۸۳ از توتستانهاي مختلف استان نمونه برداري شد. علايم بيماري شامل لكه هاي سوخته نامنظم روي برگ بوده كه با هاله زرد رنگ احاطه شده بودند. در شرايط مساعد اين لكه ها بتدريج گسترش يافته و تمام سطح برگ را فرا مي‌گيرد. از اندامهاي آلوده دو نوع باكتري گرم منفي با كلني‌هاي فلورسنت روي محيط **King's B** بدست آمد بر اساس مشخصات مورفولوژيك، فيزيولوژيك، بيوشيميايي، بيماريزايي روي برگهاي توت, الكتروفورز پروتئين كل سلول (**SDS-PAGE**) و با استفاده از روش واكنش زنجيره‌اي پلي‌مرآز (**PCR**) به كمك آغازگرهاي اختصاصي, نوع غالب باكتري جدا شده از درختان توت ***Pseudomonas syringae* pv.*mori*** شناسايي شد. باكتري نوع ديگر در برخي توتستانهاي استان گيلان ***P.s*.pv.*syringae*** تعيين گرديد.

واژه‌هاي كليدي: توت، **Pseudomonas syringae pv.mori** ، **P. s. pv.syringae** ، لكه برگي

مقدمه

توت (*Morus alba*) ميزبان بسياري از عوامل بيماريزاي لكه برگي مي باشد. سطح زير كشت باغات توت در استان گيلان بالغ بر سيزده هزار هكتار تخمين زده مي شود. ظاهرا بيماري لكه برگي باكتريايي از سالها قبل روي درختان توت وجود داشته است (۴). اما اخيرا با گسترش كشت ارقام پرمحصول خارجي در توتستانهاي اكثر مناطق استان گيلان، اين بيماري شيوع بيشتري يافته است. بطوريكه علايم سوختگي روي برگهاي رقم كيموچي به وفور يافت مي شود. تا بحال در جهان باكتريهاي بيماريزاي زيادي روي درختان توت گزارش نشده است و از ميان آنها تنها بيماري لكه برگي باكتريايي توت در توتستانها اهميت اقتصادي دارد. خاك، بقاياي گياهي و قلمه آلوده از منابع مهم آلودگي محسوب مي شوند. بيماري تحت شرايط رطوبت نسبي بالا (بارندگي) و دماي ۳۲- ۲۳ درجه سانتي گراد گسترش مي يابد (۲٤). در ايران اولين بار سال ۱۳۵۸ اماني و اخويزادگان (۱۳۵۷) وقوع سوختگي باكتريايي توت را از ايران از استان گيلان گزارش نمودند سپس زارعي و رحيميان (۱۳۷۹) باكتري *Pseudomonas syringae* pv.*mori* عامل بيماري سوختگي باكتريايي روي درختان توت سفيد، شاتوت و توت ژاپني را از منطقه كردان در استان تهران گزارش كردند. جلاجا و همكاران (۲۰۰۱) بيماري بلايت باكتريايي توت در اثر *P.s*.pv.*mori* را يكي از عوامل بيماريزاي لكه برگي مهم در همه توتستانهاي هندوستان گزارش كردند . با وجود اين ، كوستكا و همكاران (۱۹۸٦) از ديگر عوامل بيماريزاي سوختگي برگ توت در هندوستان را *Xylella fastidiosa* معرفي نمودند. شارما و همكاران (۲۰۰۰) استفاده ٦۰ كيلوگرم در هكتار كود پتاسه را در كاهش بيماري لكه برگي باكتريايي و ساير بيماريهاي برگي روي توت مؤثر دانستند. با وجود اين، يوشبدا و همكاران(۲۰۰۲)يك جدايه از *Bacillus amyloliquefaciens* (RC-2) را جهت كنترل همزمان بيماريهاي آنتراكنوز و بلايت

* نويسنده مسئول: مصطفی نيک‌نژاد كاظم‌پور
E-mail:nikkazem@yahoo.fr

باكتريايي توت در ژاپن مؤثر گزارش نمودند. وجود علايم لكه برگي در اغلب باغات توت استان گيلان، لزوم بررسي و شناسايي عوامل بيماريزاي باكتريايي روي درختان توت ضروري مي باشد.. بررسي هاي مقدماتي نشان داد كه اين بيماري منشاء باكتريايي دارد. بنابراين ضروري بنظر رسيد كه باكتري عامل بيماري شناسايي شود تا در آينده با انجام پژوهشهاي تكميلي روشهاي پيشگيري و مبارزه با بيماري انجام شود.

مواد و روشها

بازديد از توتستان

طي سالهاي۱۳۸۰ تا ۱۳۸۲ از توتستانهاي مختلف استان گيلان شامل پسيخان، لاهيجان ، لنگرود، پرند و صومعه سرا بازديد به عمل آمد. در هنگام بازديدها ، انواع لكه برگي ها مورد بررسي قرار گرفتند و از برگهاي درختان توت كه داراي سوختگي برگ بودند نمونه ها جمع آوري شده و در داخل كيسه هاي پلاستيكي به آزمايشگاه منتقل شدند.

جداسازي عوامل بيماريزا

از توتستانهاي آلوده هر درخت ۵ برگ با علايم مشخص بيماري انتخاب شدند. برگهاي آلوده ابتدا در جريان ملايم آب شسته شده و قطعاتي حدود يك سانتي متر مربع شامل قسمت سالم و بافت آلوده مورد نظر بريده شده و بطور جداگانه توسط هيپوكلريد سديم يك درصد به مدت يك دقيقه ضدعفوني سطحي شدند و سپس سه بار (هر بار ده دقيقه) با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. بافتهاي آلوده را در آب پپتونه كاملا له شدند و ۳۰ دقيقه در شرايط آزمايشگاه قرار گرفتند. عصاره بدست آمده توسط آب مقطر سترون تا $۱۰^{۶}$ ×۱ سلول باكتري در ميلي ليتر رقيق شدند. سپس از هر رقت ۱۰۰ ميكروليتر برداشته و روي محيط آگار مغذي سوكروز دار (NAS) و King’s B حاوي آنتي بيوتيك اكتيديون (۵۰ ميكروگرم در ميلي ليتر) با يك ميله شيشه‌اي خميده پخش گرديد. تشتك‌هاي پتري در دماي ۲۷ درجه سانتي گراد به مدت ۳ روز نگه داري شدند. كلني هاي رشد يافته براساس شكل ظاهري و رنگ بررسي و كلني‌هاي غالب انتخاب و خالص سازي شدند. آزمون‌هاي فيزيولوژيكي, بيوشيميايي و تغذيه‌اي به روش معمول براي باكتريهاي گرم منفي انجام شد (۲۰، ۲۲). مورفولوژي كلني ها روي محيط King B بررسي گرديد. قابليت جدايه ها در ايجاد فوق حساسيت در توتون و شمعداني (۱۲)، توليد سيرنگومايسين توسط روش ياسد و همكاران (۲۵) و تشكيل هسته يخ طبق روش هاي توصيه شده (۵ و ۱۷) تعيين گرديد.

آزمون اثبات بيماريزايي

برگهاي توت رقم كموچي كه حساس به لكه برگي بود جهت مايه زني استفاده شد. براي مايه زني برگها ، از كشت ۲٤ ساعته جدايه هاي باكتريايي در آب مقط سترون استفاده گرديد. با اين منظور، يك توده از كشت هاي باكتريايي در آب مقطر سترون بصورت سوسپانسيون با غلظت $۱۰^{۸}$ × ۱ سلول باكتري در ميلي ليتر تهيه شد. جهت مايه زني از روش ياسد و همكاران (Yassad-Carreau) استفاده شد. بدين ترتيب، روي برگها و شاخه هاي جوان، توسط تيغ اسكالپل يك برش بشكل T زده شد و سپس ۵۰۰ ميكروليتر از سوسپانسيون باكتري در محل زخم قرار داده شد. براي شاهد از آب مقطر استفاده گرديد. برگها ي شاخه هاي جوان مايه زني شده به منظور حفظ رطوبت در تشتك پتري به قطر ۳۰۰ ميلي متر حاوي كاغذ صافي مرطوبت به ۱۰ الي ۱۵ روز قرار گرفتند. در صورت بروز علايم بيماري ، جداسازي عامل بيماري از برگها و شاخه هاي جوان مايه زني شده به روش قبلي تكرار شد.

الكتروفورز پروتئين

جدايه هاي مربوطه به همراه جدايه هاي استاندارد دريافتي از كشور فرانسه كلكسيون باكتريهاي بيماريزاي فرانسه (CFBP)روي محيط NAكشت داده شد .بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسيوني از آنها در بافر آب مقطر سترون تهيه شد . سوسپانسيون حاصل به مدت ۱۰ دقيقه در ۱۰۰۰۰ x g بوسيله سانتريفوژ رسوب داده شد و رسوب حاصل بوسيله ۱۰۰ ميكروليتر بافر نمونه ۱/۰۲ ميلي گرم تريس، ۸/۵۵ گرم ساكارز، ۵ ميلي گرم بروموفنل آبي، ۰/۵ ميلي ليتر EDTA 0.5 M، ۲/۵ ميلي ليتر بتا مركاپتوفنل و۱۵ ميلي ليتر SDS 10% در ۳۲ ميلي ليتر آب مقطرتهيه شد و به مدت ۱۵ دقيقه در حمام آب جوش قرار داده شد .نمونهها به مدت ۱۰ دقيقه در x g ٦۸۰۰ سانتريفوژ شد. مقدار ۵۰ ميكروليتر از فاز رويي هر نمونه برداشته و در هر چاهك ريخته شد(۲۱). الكتروفورز پروتئين در ژل اكريل آميد با استفاده از سيستم ناپيوسته (discontinuos)

لملي (۱۹۷۰) صورت گرفت (۳). غلظت اكريل آميد در ژل جدا كننده ۱۰% و در ژل فشرده كننده ٤/٥% بود. الكتروفورز با شدت جريان ثابت ۱۵ ميلي‌آمپر انجام شد. جهت رنگ‌آميزي ژل در محلول كوماسي بريليانت بلو در متانول، آب مقطر و اسيد استيك به نسبت ٥ : ٥ : ۱ روي دستگاه تكان دهنده به مدت ٤ ساعت قرار داده شد. جهت رنگبري، ژل در حلال فوق)فاقد رنگ (تا زمان وضوح نوارهاي پروتئيني) به مدت ٢٤ ساعت روي دستگاه تكان دهنده قرار گرفت

تشخيص جدايه‌ها بوسيله واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز[1] (**PCR**)

سلولهاي *P.s.*pv.*mori* با روش PCR و آغازگر هاي اختصاصي[2] ("5 GG TTT TTA ACG CTG GG 3") D21 و ("5 GGG CAA ATA CTC GGA TT 3") D22 شناسايي شدند. (۱۸)

جهت تشخيص سلولهاي *P.s.*pv.*mori* يك كلني از باكتري را برداشته و در لوله هاي آزمايش محتوي ٤/٥ ميلي ليتر آب مقطر سترون قرار داده، سپس به مدت ۱۰ دقيقه آنرا در حمام بن ماري در دماي ۱۰۰ درجه سانتي گراد قرار داده و بلافاصله لوله‌ها در ظرف محتوي يخ گذاشته شدند. از سوسپامسيون باكتري جهت تكثير DNA در ۹۰ ميكروليتر مخلوط اوليه شامل ۲ ميكروليتر از آغازگر هاي اختصاصي، ٤ ميكروليتر

dNTP (Desoxyribonucleotide Triphosphate) ، ٦ ميكروليتر كلرور منيزيم ۲۵ مولار ، ۱۰ ميكروليتر بافر ۱۰ برابر غلظت، ۲/ ميكروليتر Taq polymerase ، ٦٥/٨ ميكروليتر آب مقطر سترون دو بار تقطير شده به هر لوله اضافه شد و سپس جهت اجتناب از تبخير در طول انجام مراحل PCR به لوله ۵۰ ميكروليتر قطره روغن معدني اضافه گرديد. لوله در دستگاه PCR قرار داده شده و برنامه مخصوص آن شامل ٦۰ ثانيه در ۹٤ درجه سانتي گراد جهت جدا شدن رشته هاي DNA و سپس به تعداد ۳۷ چرخه بترتيب ٦۰ ثانيه در ۵۲ درجه سانتي گراد و سپس ٦۰ ثانيه در ۷۲ درجه سانتي گراد قرار گرفتند. در پايان لوله ها در ٤ درجه سانتي گراد قرار گرفتند.بعد از پايان يافتن تكثير DNA باكتري ميزان ۱۰ ميكروليتر از هر محصول PCR را برداشته و روي ژل آگارز ۲ درصد در داخل بافر TBE (Tris/base ۸ گرم، اسيد بوريك ۵/۵ گرم ، EDTA نيم مولار با pH= ۸ نيم مولار، و آب مقط سترون ۱۰۰۰ ميلي ليتر) قرار گرفتند. سپس ژل آگارز در دستگاه الكتروفورز با جريان ۱۰۰ ولت قرار گرفت. بعد از اتمام الكتروفورز ژل اگارز را در اتيديوم بروماید (۱۰ ميكروگرم در ميلي ليتر) به مدت ۱۵ دقيقه قرار داده و سپس جهت رؤيت باندهاي DNA ، ژل را زير نور ماوراء بنفش بررسي شدند. تمام باندها كه در سطح شاهد مثبت قرار گرفته اند بعنوان تيمار مثبت در نظر گرفته شد. از جدايه استاندارد[3] *P.s.*pv.*mori* CFBP 1642 ارسالي از مركز تحقيقات باكتريولوزي آنژه – فرانسه، جهت مقايسه استفاده شد.

نتايج

جدا سازي عامل بيماري

سه روز پس از كشت برگهاي آلوده روي محيطKing’s B ، كلني هاي فلورسنت ، كرم رنگ ، محدب، شفاف، گرد با سطح ناصاف ظاهر شدند كه اكثريت غالب كلني هاي باكتريايي را شامل مي شدند. از نمونه هاي جمع آوري شده طي سه فصل زراعي ۱۳۸۰ الي ۱۳۸۲ در استان گيلان ، ٦٨ جدايه كه توانايي توليد رنگ فلورسنت روي محيط King’s B داشتند جداسازي و ٤٨ جدايه بعنوان نماينده انتخاب و ديگر آزمونهاي بيوشيميايي و فيزيولوژيك روي آنها انجام شد.

اثبات بيماريزايي

كليه ٤٨ جدايه هايي كه باعث ايجاد فوق حساسيت روي توتون شدند در آزمون بيماريزايي روي توت ، پس از ۱۵ و ۲۰ روز بترتيب روي برگ و شا خه هاي جوان رقم كيموچي توليد علايم بيماري نمودند. علايم بيماري توسط جدايه ها به دو شكل مشاهده گرديد. تعدادي از جدايه تنها ايجاد سوختگي برگ بصورت لكه هاي نكروتيك نمودند. تعدادي ديگر از جدايه ها روي برگ علايم بيماري بصورت سوختگي همراه با هاله كلروتيك اطراف لكه نكروتيك توليد كردند. علايم بيماري روي شاخه هاي جوان بصورت لكه هاي نكروز طولي بطرف پايين

1. Polymerase chain reaction
2. Specific primers
3. Collection Francais de la Bacteries Phytopathogens

مشاهده گرديد. اين كاملا شبيه علايم مشاهده شده در شرايط باغ روي درختان توت ديده شد. علايم بيماري در همه جدايه ها روي شاخه‌هاي جوان يكسان مشاهده گرديد. برگها و شاخه هاي جواني كه توسط آب مقطر سترون مايه زني شده بودند،هيچگونه علايمي نشان ندادند.

ويژگي هاي فنوتيپي

ويژگي هاي مورفولوژيك

جدايه ها داراي سلولهاي ميله اي شكل با ٤ الي ٦ تاژك قطبي در دوطف بودند. اين باكتريها در برابر رنگ آميزي گرم ، واكنش منفي نشان دادند. چسبندگي و كش دار بودن سوسپانسيون اين جدايه ها در برابر هيدروكسيد پتاسيم سه درصد و رشد روي محيط EMB اين ارزيابي را تاييد نمود. كليه جدايه ها روي محيط King's B ، حالت فلورسنت داشتند. ولي توليد كلني هاي درشت لعابدار روي محيط ساكارز نشان دادند كه كليه جدايه ها لوان مثبت بودند.

ويژگي هاي فيزيولوژيك

تزريق سوسپانسيون جدايه هاي بيماريزا روي توت در پارانشيم زيرين برگهاي توتون و شمعداني باعث سوختگي محل تزريق در مدت ٢٤ ساعت گرديد. در اين مدت برگهاي تزريق شده با آب مقطر سترون هيچگونه واكنشي نشان ندادند. بروز واكنش فوق حساسيت در توتون و شمعداني بعنوان مشخصه‌هاي بيماريزايي جدايه ها ارزيابي گرديد. در بررسي توليد سيرنگومايسين، جدايه‌هاي *P.s.*pv.*syringae* تشكيل هاله بازدارندگي در اطراف كلني هاي قارچ *Geotrichum candiun* نمودند. از نظر فعاليت ايجاد هسته يخ در سوسپانسيون با غلظت ۱×۱۰^{۸} سلول در ميلي ليتر جدايه هاي *P.s.*pv.*syringae* در ٤- درجه سانتي گراد و *P.s.*pv.*mori* در ٨- درجه سانتي‌گراد به مدت يك ساعت مؤثر بودند. در بررسي فعاليت پكتوليتيك، هيچكدام از جدايه ها نتوانستند ورقه هاي سيب زميني را له نمايند. حداكثر دماي رشد جدايه هاي باكتريايي ٤٠ درجه سانتي گراد و بالاترين ميزان تحمل نمك آنها ٣/٥ درصد بود.

ويژگي هاي بيوشيميايي

جدايه هاي باكتريايي در محيط بدون اكسيژن رشد نداشتند. واكنش اكسيداز بدليل عدم تغيير رنگ معرف تا زمان ٦٠ ثانيه ، منفي ارزيابي شد. افزودن سلولهاي باكتريايي به آب اكسيژنه سه درصد و عدم تشكيل حباب ، نشانه منفي بودن واكنش كاتالاز بود. جدايه هاي باكتريايي بدست آمده توانستند ژلاتين، توين ٨٠ ، اسكولين را هيدروليز نمايند با وجود اين قادر به هيدروليز نشاسته و كازئين نبودند و توانايي احيا، نيترات و توليد اندول را نداشتند. اما همه جدايه ها DNase آنها مثبت بود. نتايج آزمونهاي بيوشيميايي در جدول ١ خلاصه شده است.

مقايسه نقوش پروتئيني

كليه جدايه ها در الكتروفورز پروتئيني تام سلولي به روش (SDS-PAG) يك بعدي در ژل پلي اكريل آميد ١٢% توليد نوارهايي نمودند. نقوش الكتروفورزي جدايه ها بسيار شبيه همديگر بوده و شباهت بالايي نيز با جدايه هاي استاندارد *P.s.*pv.*mori* CFBP 1642 و *P.s.*pv.*syringae* CFBP 2027-37 داشتند (شكل ١).

تشخيص جدايه هاي ***P.s.*pv.*mori*** بوسيله **PCR**

جدايه هاي *P.s.*pv.*mori* توسط آغازگرهاي اختصاصي D21 و D22 تشخيص داده شدند. روي ژل الكتروفورز ٢ درصد باندهاي ٥٥٨ باز توسط آغازگر هاي اختصاصي تشكيل شدند. باندهاي ايجاد شده روي ژل با باندهاي شاهد مثبت (جدايه استاندارد*P.s.*pv.*mori* CFBP 1642) كاملا مطابقت داشت (شكل ٢).

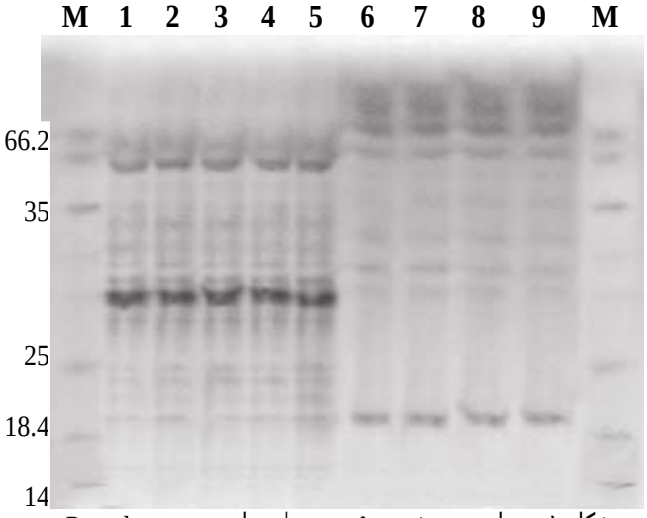
با در نظر گرفتن ويژگي هاي مورفولوژيك و نتايج حاصل از آزمونهاي فيزيولوژيك خصوصا توليد سيرنگومايسين، آزمونهاي بيوشيميايي و مقايسه نقوش پروتئيني و مقايسه اين اطلاعات با ويژگيهاي باكتريهايي كه در منابع علمي ذكر شده است ، عامل بيماري لكه برگي باكتريايي در استان گيلان *Pseudomonas syringae* pv.*mori* و *P. s.* pv.*syringae* تشخيص داده شد. نتايج بررسيها نشان داد كه پراكندگي جدايه هاي *P.s.*pv.*mori* نسبت به *P.s.*pv.*syringae* بيشتر است بطوريكه ٦٣ درصد از جدايه ها (٣٠ جدايه از ٤٨ جدايه)متعلق به *P.s.*pv.*mori* بود. با وجود اين، از نظر توان بيماريزايي و دامنه ميزباني روي ارقام توت، جدايه هاي *P.s.*pv.*syringae* در زمان كمتري علايم بيماري را روي رقم حساس كيموچي در مقايسه با ساير ارقام مانند ايكنوز (Ichnose) و شين ايكنوز (Shin-Ichnose) نشان دادند.

جدول ۱- خصوصيات فنوتيپي سودوموناس هاي فلورسنت جدا شده از برگهاي توت در استان گيلان

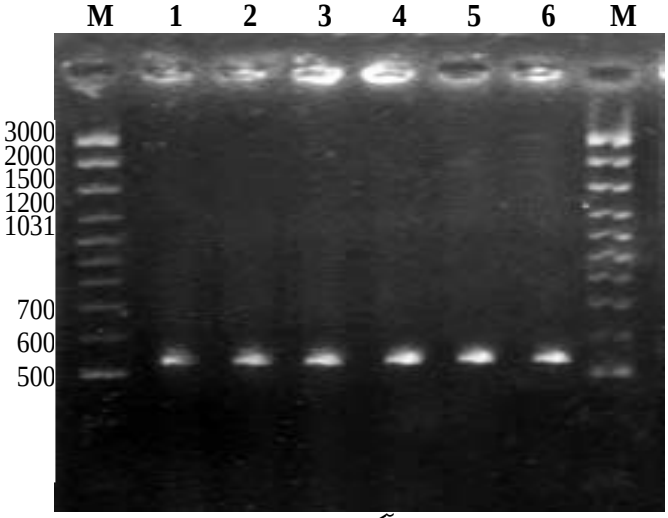
ويژگي	باكتريهاي آزمون	
	جدايه هاي *P.s*.pv.*mori*	جدايه هاي *P. s.* pv. *syringae*
رنگ‌آميزي گرم	-	-
رشد بي‌هوازي	-	-
توليدرنگدانه فلورسنت	+	+
فوق حساسيت روي توتون	+	+
فوق حساسيت روي شمعداني	+	+
تشكيل هسته يخ	-	+
توليد سيرينگومايسين	-	+
لكه برگي روي توت	+	+
لهانيدن سيب‌زميني	-	-
دهيدروليز آرژنين	-	-
لوان	+	-
احياء نيتروژن	-	-
كاتالاز	-	-
استفاده از توين ۸۰	-	-
اكسيداز	-	-
هيدروليز نشاسته	-	-
هيدروليز ژلاتين	+	+
اسكولين	+	+

ادامه جدول ۱

ويژگي	باكتريهاي آزمون	
	جدايه هاي *P.s*.pv.*mori*	جدايه هاي *P. s.* pv. *syringae*
Dnase	+	+
ايندول	-	-
توليد H_2S	-	-
ليسيتيناز	-	-
هيدروليز كازئين	+	-
MR	-	-
استفاده از ال ليزين	-	-
سيترات	+	+
تحمل نمك طعام	٤ %	٤%
استفاده از آرابينوز	-	-
اينوسيتول	-	+
مانيتول	+	+
زايلوز	+	+
تري هالوز	-	-
مالتوز	+	+
ال - تارتارات	_	_
گالاكتوز	+	+
سوربيتول	_	+
ساكارز	-	+



شكل ۱ - مقايسه نقوش پروتئيني جدايه هاي *Pseudomonas syringae* pv.*mori* و *P. s.* pv.*syringa* عامل لكه برگي درختان توت,, M شناساگر, ۱ جدايه استاندارد *P.s.* pv.*mori* CFBP1642 , ۲ الي ۵ جدايه هاي *P.s*.pv.*mori*, ٦ جدايه استاندارد *P.s*.pv. *syringae* CFBP 2027-37, ۷ الي ۹ جدايه هاي *P.s*.pv.*mori* بدست آمده از درختان توت در استان گيلان



شكل ۲- ژل الكتروفورز آگارز ۲ در صد قطعه ژن تكثير شده (۵۵۸ باز) توسط آغازگرهاي اختصاصي, M شناساگر با وزن مولكولي ۱۰۰ تا بازي، ۱،شاهد مثبت (جدايه استاندارد *P.s.* pv.*mori*;CFBP 1642)، ۲ الي ٦ جدايه هاي *P.s*.pv.*mori* بدست آمده از درختان توت در استان گيلان

بحث

ميزان آلودگي توتستانهاي استان گيلان شامل رشت، پسيخان، پرند، صومعه سرا، لاهيجان، لنگرود، به لكه برگي باكتريايي بسيار شديد بود بطوريكه علايم سوختگي برگ روي ارقام پرمحصول مانند كيموچي بيشتر از ساير ارقام مانند ايكنوز و شين ايكنوز و محلي مشاهده گرديد. بر اساس نتايج بدست آمده در اين تحقيق، جدايه‌هاي *P.s.*pv.*mori* داراي پراكندگي بيشتري نسبت به جدايه‌هاي *P.s.*pv.*syringae* بودند و اين جدايه‌ها در تمام مناطق توتستان كاري استان روي تمام ارقام توت كشت شده در استان جداسازي شدند. با وجود اين، جدايه‌هاي *P.s.*pv.*syringae* تنها در توتستانهاي رشت و پرند كه اكثرا به كشت رقم كيموچي اختصاص داشتند جداسازي شد كه اين احتمالا نشاندهنده حساسيت زياد اين رقم در برابر لكه برگي باكتريايي مي باشد. چدايه هاي *P.s.*pv.*syringae* پس از مايه زني روي برگهاي ميزبان خود ايجاد هاله كلروتيك اطراف لكه‌هاي نكروتيك نمودند كه اين نشاندهنده توليد توكسين سيرنگومايسين در اين جدايه ها مي باشد كه اين امر در آزمونهاي فيزيولوژيك تاييد شد. نتايج اين تحقيق با پژوهشهاي ياسد و همكاران (١٩٩٤) مطابقت داشت. علائم بيماري در آزمايشگاه شباهت زيادي با علائم بيماري در باغ داشت. بر اساس نتايج آزمونهاي فنوتيپي و طيف منابع كربن بررسي شده، اختلاف داخل جدايه هاي *P.s.pv.mori* و *P.s.*pv.*syringae* مشاهده نشد. با توجه به اينكه اغلب ارقام توت در استان علايم لكه برگي باكتريايي و حساسيت را از خود نشان دادند، يكي از مطمئن ترين راههاي كاهش بيماري ناشي از اين باكتريها توليد ارقام مقاوم مي باشد. بنابراين بايد در برنامه اصلاح توت به اين امر توجه كافي كرد و در مناطقي كه آلودگي زياد است از كاشت ارقام حساسي مانند كيموچي حدالامكان خودداري كرد و در ميزان مصرف كودهاي شيميايي دقت بيشتري نمود . شارما و همكاران (٢٠٠٠) جهت كاهش ميزان سوختگي باكتريايي توت ميزان مصرف كودهاي نيتروژن ، فسفر و پتاس را بترتيب ١٥٠ ، ١٢٠ و ١٢٠ كيلوگرم در هكتار پيشنهاد كردند. جدايه هاي باكتري *P.s.*pv.*syringae* علاوه بر لكه برگي داراي فعاليت ايجاد تشكيل هسته يخ را دارا مي باشند. وجود هر كدام از باكتريهاي مولد هسته يخ و فراواني جمعيت آنها بستگي به شرايط آب و هوايي و ميزبان دارد. جمعيت باكتري بايد به اندازه كافي باشد تا بتواند بعنوان هسته يخ عمل نمايد. در اين تحقيق نتايج آزمونهاي مورفولوژيكي، بيوشيميايي , تغذيه اي و نقوش الكتروفورز پروتئين , جدايه هاي *P.s.*pv. *mori* بدست آمده از درختان توت در استان گيلان با استفاده از روش PCR به كمك آغازگرهاي اختصاصي اختصاصي مورد تائيد قرار گرفت. جدايه‌هاي *P.s.*pv.*mori* در دماي پايين‌تري نسبت به جدايه‌هاي *P.s.*pv.*syringae* در جلوگيري از تشكيل هسته يخ نقش دارد (٥, ١٧، ١٩). جدايه‌هاي *P.s.*pv.*syringae* مي‌تواند روي علفهاي هرز يكساله مانند سوروف، ماشك، يولاف و جو موشي و علفهاي هرز دائمي مانند مرغ كه در توتستانهاي استان گيلان به وفور يافت مي شود مي تواند به حالت اپي فيت زندگي كند كه در برخي گزارشها به آن اشاره شده است (٢ ، ٩، ١٠). كومار و گوپتا (٢٠٠٤) با استفاده از ميكروسكوپ الكتروني محلهاي كلنيزاسيون *P.s.*pv.*mori* روي برگهاي توت را منطقه سيوليت و شيارهاي كنار رگبرگها مشخص نمودند و اظهار داشتند كه سلولهاي باكتري قادر به نفوذ در ناحيه زير روزنه ها و تارهاي كشنده نيستند. با وجود اين، نيك نژاد (١٣٨١) با استفاده از ماركر مولكولي *LacZ* محلهاي كلنيزاسيون *P.s.*pv.*syringae* روي ريشه ، ساقه و برگهاي گوجه فرنگي را منطقه پارانشيم و آوند ها گزارش نمود.

منابع مورد استفاده **REFERENCES**

١. اماني، ب.، و م. اخويزادگان. ١٣٥٧. پيدايش بيماري باكتريايي توت در ايران. مجله بيماريهاي گياهي. جلد ١٥ . جلد ١-٤. صفحه ٦٧-٦٢.

٢. تقوي، س. م. و ك. كشاورز. ١٣٨١. شناسايي سويه‌هاي باكتريهاي مولد سوختگي برگ گندم در استان فارس و كهگيلويه و بويراحمد و

واكنش ارقام مختلف گندم نسبت به آنها. مجله علوم و فنون كشاورزي و منابع طبيعي. جلد هشتم. شماره چهارم. صفحه ۱۸۱-۱۷۱.
۳. بابائي زاد، و. و ح. رحيميان. ۱۳۸۱. تشخيص و تعيين پراكندگي گونه هاي باكتري خوشه صمغي در برخي مناطق گندم خيز ايران. مجله بيماريهاي گياهي. جلد ۳۸ صفحه ۵۵-۴۷.
٤. شبيريان، س. ع. م. ۱۳۷۳. پرورش كرم ابريشم. از سري كتابهاي FAO، سازمان خواروبار كشاورزي ملل متحد. ترجمه. ۱۱۸ صفحه.
۵. صحراگرد جونقاني. ن.، ض. بني هاشمي، و س. م. تقوي. ۱۳۷٦. شناسايي باكتريهاي مولد هسته يخ روي درختان ميوه هسته دار در استان گيلان . بيماريهاي گياهي . جلد ۳۳. صفحه ۲۱۵- ۲۰۹ .
٦. زارعي، ع. و ح. رحيميان. ۱۳۷۹. شناسايي عامل بيماري بلايت باكتريايي درختان توت در استان تهران. چهاردهمين كنگره گياهپزشكي ايران . دانشگاه صنعتي اصفهان. صفحه ۱۵۰.
۷. نيك نژاد كاظم پور، م. ۱۳۸۱ . مطالعه كلنيزاسيون اپي فيت و آندوفيت باكتري *Pseudomonas syringae* در گياه و خاك . مجله علوم كشاورزي و صنايع غذايي . دانشگاه فردوسي مشهد. جلد ۱٦ . شماره يك. صفحه ٦۵-۵۷ .
8. Jalaja S.Kumar, Sarkar, A. & Datta, R.K. 2001. A breakthrough in mulberry breeding in sustainable cocoon production. In global silk scenario. Proc. of the International Conference on Sericulture. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt.Ltd., pp. 242-247.
9. Fryda, S. J. & G.D. Otta.1978. Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring wheat. Phytopathology. 68 : 1064 – 1067.
10. Gardan, L. S., C. Bollet, & G. Hunault. 1991. Phenotypic heterogenicity of *Pseudomonas syringae*. Van Hall. Res. Microbiol. 142: 995-1003.
11. Kirally, Z.Z., F. Klement, F. Solymosy, & J.Voros.1974. Methods in plant pathology. Elsevier Scientific Pub. Co., Amesteadam.
12. Klement, Z., G.L. Fakas, & L. Loverkovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by pathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology. 54 : 474-477.
13. Kostka, S. J., T. A. Tattar, J. L. Sherald, & S. S. Hurtt. 1986. Mulberry leaf scorch, new disease caused by a fastidious xylem-limited bacterium. Plant Dis. 70: 690-693.
14. Kumar, V. & V. P. Gupta. 2004. Scanning electron microscopy on the Perithecial Development of *Phyllactinia corylea* on Mulberry-II. Sexual Stage. Phytopathology 152 : 169-173
15. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature., 227: 680-685.
16. Lelliot, R.A. & D.E. Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial disease of plant. Blackwell Scientific Pub. London.
17. Lindow,S.E., D.C. Arny, W.R. Barchet & C.D. Upper. 1982. Bacterial ice nucleation : a factor in frost injury to plant. Plant Physiol. 70 : 1084-1089.
18. Manceau C. & A. Horvais. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR restriction fragment length polymorphism analaysis of rRNA operon with special emphasis on *P.syringae* pv. *tomato*. Aplied and Environ. Microbio . 63, 498-505.
19. Rahimian, H. 1995. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. J. Phytopathol. 143: 321-324.
20. Schaad, N. W, J. B. Jones & W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Thrid eds. APS. St. Paul. Minnesota, USA. 373pp 19
21. Sharma, A., R. Sharma & H. Machii. 2000. Assessment genetic diversity in a *Morus* gerplasm collection using fluorescence-based AFLP marker. Teoritical Applied Genetic. 101 : 1049-1055.
22. Sulsow, T.V., M.N. Schorth, & M. Saka. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology. 72 : 917-918.

23. Sutra, L., F.Siverio, M. Lopez, G.Hunault, C.Bollet, & L.Gardan. 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolates from tomato Pith Necrosis : Emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genomospecies. Int. J. Syst. Bacteriol. 47. 4. 1020-1033.
24. United Nations. 1990. Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm. Bangkok, Thailand. 88 pp.
25. Yassad-Carreau, S., C. Manceau, & J. Luisetti. 1994. Occurrence of specific reaction induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean pods, lilac and pear plants. Phytopathology. 43 :528-536.
26. Yoshiba, S., A. Shirata, & S. Hirada. 2002. Ecological characteristics and biological control of mulberry antracnose. Japan Agricultural Research Quarterly. 36 (2) 89-95.