



Evaluation the Inhibitory Effects of Chemical Compounds for Controlling on *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, the Causal Agent of Saffron Corm Rot

Maryam Khezri^{1*}, Mahmoud Reza Karimi Shahri² and Abolghasem Ghasemi³

Article type:

Research Article

Article history:

Submitted: 27 April 2024

Revised: 2 July 2024

Accepted: 22 August 2024

Available Online: 22 August 2024

How to cite this article:

Khezri, M., Karimi Shahri, M.R., and Ghasemi, A. 2024. Evaluation the Inhibitory Effects of Chemical Compounds for Controlling on *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, the Causal Agent of Saffron Corm Rot. *Saffron Agronomy & Technology*, 12(2), 211-224.

DOI: 10.22048/jsat.2024.454510.1529

Abstract

Saffron corm rot is caused by the bacterium *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (Bgg) is an important disease affecting saffron cultivation. This study aimed to evaluate the effect of different doses of sodium bicarbonate and three copper-based compounds (copper oxychloride, Bordeaux and Nordox) on the population of Bgg isolates *in vitro*. Additionally, the sensitivity of the Bgg isolates to 21 antibiotics was investigated. Two weeks after inoculation, the disease symptoms appeared as dry rot and brown lesions around the inoculated area. Varying degrees of virulence were observed among the Bgg isolates, with the Bg16 inducing the most severe symptoms. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined as copper oxychloride 3.5/1000, Bordeaux and sodium bicarbonate 12%, and Nordox 1.5/1000. The Bgg isolates were sensitive to nine antibiotics. The largest inhibitory zone diameters were observed around trimethoprim-sulfamethoxazole, nalidixic acid, gentamicin, and amikacin discs. One week after cultivation, the copper compounds decreased the bacterial population compared to the control, but no significant difference was observed between them in the second week. The most effective treatments in reducing the Bgg population were copper oxychloride at 2/1000 and 3/1000, Bordeaux at 8% and 10%, and Nordox at 1/1000 and 1.5/1000. The efficacy of the identified effective treatments will be further evaluated under field conditions.

Keywords: Saffron, Disinfestation, Copper compounds, Antibiotic, Disease management.

1 -Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

2 -Assistant Professor, Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Mashhad, Iran.

3 -Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran



Corresponding author: ma_khezri@yahoo.com

مقاله پژوهشی

ارزیابی تأثیر چند ترکیب شیمیایی بر کنترل باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران

مریم خضری^{۱*}، محمودرضا کریمی شهری^۲ و ابوالقاسم قاسمی^۳

تاریخ دریافت: ۸ اردیبهشت ۱۴۰۳

تاریخ بازنگری: ۱۲ تیر ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۱ شهریور ۱۴۰۳

خضری، م.، کریمی شهری، م.ر.، و قاسمی، ا. ۱۴۰۳. ارزیابی تأثیر چند ترکیب شیمیایی بر کنترل باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران، ۱۲(۲): ۲۱۱-۲۲۴.

چکیده

پوسیدگی باکتریایی بنه از بیماری‌های مهم گیاه زعفران است که توسط باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (Bgg) ایجاد می‌شود. در این تحقیق، تأثیر بی‌کربنات سدیم و سه ترکیب شیمیایی بر پایه مس (اکسی کلرور مس، بردو و نوردوکس) در غلظت‌های مختلف، بر جمعیت جدایه‌های باکتری Bgg در محیط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت، همچنین حساسیت جدایه‌های باکتری نسبت به ۲۱ آنتی‌بیوتیک بررسی شد. علائم ایجاد شده روی بنه‌ها دو هفته پس از مایه‌زنی، به صورت پوسیدگی خشک همراه با قهوه‌ای شدن بافت اطراف ناحیه مایه‌زنی شده بود. توان جدایه‌ها در ایجاد بیماری‌زایی روی بنه‌ها متفاوت بود و بیشترین علائم توسط جدایه Bg16 ایجاد شد. حداقل غلظت بازداندگی از رشد باکتری ترکیب اکسی کلرور مس ۳/۵ در هزار، بردو و بی‌کربنات سدیم ۱۲ درصد و نوردوکس ۱/۵ در هزار تعیین شد. جدایه‌های باکتری نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک حساسیت نشان دادند، بزرگترین هاله بازدارنده از رشد در اطراف دیسک‌های تری‌متوپریم‌سولفام‌توکسازول، نالیدیکسیک‌اسید، جنتامایسین و آمیکاسین تشکیل شد. شمارش پرگنه‌های باکتری‌ها یک هفته پس از کشت نشان داد، سموم مسی موجب کاهش جمعیت باکتری نسبت به تیمار شاهد شدند اما در هفته دوم، تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت. بر اساس نتایج این تحقیق، مؤثرترین تیمارها در کاهش جمعیت باکتری در محیط آزمایشگاه، تیمارهای اکسی کلرور مس ۲ در هزار و ۳ در هزار، بردو ۸ درصد و ۱۰ درصد و نوردوکس ۱ در هزار و ۱/۵ در هزار بودند. تأثیر این تیمارها بر بیماری پوسیدگی بنه زعفران در محیط مزرعه مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت.

کلمات کلیدی: زعفران، ضدعفونی سطحی، ترکیبات مسی، آنتی‌بیوتیک، مدیریت بیماری.

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
* - نویسنده مسئول: ma_khezri@yahoo.com

مقدمه

باکتری خاکبرد *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (Severini) Yabuuchi et al., 1993 عامل بیماری پوسیدگی باکتریایی بنه زعفران، یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، هوازی اجباری و فاقد اسپور است که با یک تاژک قطبی حرکت می‌کند. این باکتری در رده Betaproteobacteria، راسته Burkholderiales و خانواده *Burkholderiaceae* قرار دارد (Schaad et al., 2001). پاتووار *gladioli* یکی از چهار پاتووار گونه *Burkholderia gladioli* است که موجب بروز پوسیدگی در بنه زعفران می‌شود، سایر پاتووارهای این گونه شامل *agraricola* (عامل پوسیدگی نرم در پیاز خوراکی)، *cocovenerans* (عامل پوسیدگی نرم در قارچ خوراکی) و *Elshafie et al., 2021* (موجب مسمومیت مواد غذایی) می‌باشند (Elshafie et al., 2021; Peng et al., 2017)، علاوه بر آن، بروز پوسیدگی نرم در گیاهان مختلفی مانند ذرت، برنج و پیاز گل‌های ارکیده، زنبق و گلابول، به‌دنبال آلودگی با سویه‌های مختلف *B. gladioli* گزارش شده است (Coenye & Vandamme, 2003; Nandakumar et al., 2009; Gijon-Hernandez et al., 2017; Moon et al., 2011).

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چندساله از تیره زنبقیان که به‌عنوان یک گیاه دارویی و چاشنی گران‌بها شناخته می‌شود (Ren et al., 2023). منشا زعفران کشورهای ایران، اسپانیا و یونان است که در حال حاضر نیز جزو بزرگترین کشورهای کاشت زعفران در دنیا به‌شمار می‌آیند (Bahrani et al., 2020). در بین کشورهای تولیدکننده زعفران، ایران با سهم ۸۸/۸۰ درصدی، بیشترین میزان تولید این گیاه ارزشمند در دنیا را به خود اختصاص داده است. پس از ایران کشورهای هند (۵/۸۰ درصد)، یونان (۱/۹۰ درصد)، افغانستان (۱/۵۸ درصد)، مراکش (۰/۶۸ درصد)، ایتالیا (۰/۶۰ درصد)، اسپانیا (۰/۲۶

درصد)، چین (۰/۲۶ درصد) و آذربایجان (۰/۰۶ درصد) قرار دارند (Gupta et al., 2021).

مقدار تولید زعفران در کشور در سال ۱۴۰۰ حدود ۲۷۷ تن و سطح زیر کشت بارور آن بیش از ۱۰۱ هزار هکتار بوده است. بیشترین سطح مربوط به استان‌های خراسان رضوی (حدود ۷۶ هزار هکتار) و خراسان جنوبی (حدود ۱۵ هزار هکتار) است. پس از این دو استان، به ترتیب استان‌های خراسان شمالی، اصفهان، کرمان، یزد و فارس قرار دارند (Anonymous, 2022).

پوسیدگی بنه زعفران یکی از عوامل کاهش عملکرد و تولید بنه‌های دختری در مزارع زعفران است که توسط عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی ایجاد می‌شود (Gupta et al., 2020; 2021; Ramezani Kaporchali et al., 2022; Khaledi et al., 2024). پوسیدگی باکتریایی بنه زعفران اولین بار از ایتالیا توسط فیوری و همکاران (Fiori et al., 2011) گزارش شد. این بیماری موجب نرمی و لهیدگی جوانه برگ و گل زعفران و بروز لکه نکروزه قهوه‌ای‌رنگ روی غلاف می‌شود. در طی این بیماری بنه‌ها نکروزه می‌شوند اما پوسیدگی نرم و لهیدگی در آن‌ها رخ نمی‌دهد. در بخش‌های آلوده مزرعه، جوانه‌های برگ و گل در زیر خاک مانده و یا به صورت کامل سبز نمی‌شوند و این بخش‌ها در مزرعه به صورت کچلی دیده می‌شوند (Khezri et al., 2023). در سال ۲۰۱۱، این بیماری در مزارع ساردینای مرکزی ایتالیا موجب خسارت شدید به گل‌ها شد و در نتیجه آن، خسارت و کاهش گلدهی تا ۸۰ درصد در این مزارع گزارش گردید (Fiori et al., 2011). پوسیدگی بنه جدی‌ترین بیماری زعفران در چین است که تولید این محصول با ارزش را تهدید می‌کند. در صورت فراهم شدن شرایط مناسب برای توسعه بیماری، ممکن است تا ۷۰ درصد بنه‌ها در زمان انبارداری و کاشت بیمار شوند که موجب کاهش کیفیت بنه‌ها و در نهایت خسارت‌های اقتصادی زیادی شود (Hu et al., 2021). در ایران نیز، در سال‌های اخیر علائم بیماری پوسیدگی

بنه، غلاف و برگ زعفران در استان خراسان رضوی مشاهده و گزارش شده است (Karimi Shahri et al., 2019; 2020). مطالعات بسیار محدودی در زمینه مدیریت بیماری پوسیدگی باکتریایی بنه زعفران در جهان و ایران انجام شده است، با توجه به اهمیت محصول زعفران در صادرات غیرنفتی ایران و خسارت‌زایی بالای باکتری عامل بیماری پوسیدگی بنه در گلدهی زعفران، ضروری است راه‌کارهای مناسب و مؤثر در کنترل و کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری بررسی گردد. بر این اساس، در این تحقیق مقدماتی تأثیر بی‌کربنات سدیم و چند ترکیب باکتری‌کش با پایه مس، بر رشد و جمعیت جدایه‌های باکتری *B. gladioli* pv. *gladioli* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

باکتری عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران
پنج جدایه باکتری *B. gladioli* pv. *gladioli*، جداسازی شده از بنه زعفران آلوده به بیماری پوسیدگی بنه، از مجموعه باکتری‌های بیماری‌زای بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی (Bg15 و Bg16)، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی (Bg147، Bg150 و Bg168) دریافت شد. بیماری‌زایی این جدایه‌ها پیش‌تر مورد ارزیابی قرار گرفته و اثبات شده بود.

ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌های باکتری

به منظور ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های مورد استفاده در پژوهش و علائم ایجاد شده روی بنه‌های زعفران، کشت ۲۴ ساعته از جدایه‌های باکتری روی محیط کشت NA تهیه شد. پوشال اطراف بنه‌ها حذف شد و بنه‌ها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سه

مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. سپس با استفاده از سوزن سترون، در چهار ناحیه روی بنه و یک ناحیه روی جوانه زخم ایجاد شد و پرگنه باکتری در این نواحی قرار داده شد. تیمار شاهد، در ناحیه زخم شده، آب مقطر سترون قرار داده شد. بنه‌های مایه‌زنی شده تا دو هفته در دسیکاتور در دمای اتاق نگهداری شدند و از نظر ظهور علائم بیماری مورد بررسی قرار گرفتند (Fiori et al., 2011).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد^۱ (MIC) ترکیبات شیمیایی
جهت ارزیابی تأثیر باکتری‌کشی ترکیبات شیمیایی مورد مطالعه روی رشد باکتری، پنج جدایه باکتری بیماری‌زای *B. gladioli* pv. *gladioli*، روی محیط NA کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت، سوسپانسیون جدایه‌ها با غلظت 1×10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر (1 CFU ml^{-1}) در محیط مایع لوریا برتانی برات^۲ (LB) تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به لوله‌های حاوی چهار میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی اضافه شد. تیمارهای شیمیایی در پنج غلظت مختلف شامل اکسی‌کلرور مس (۱/۵، ۲، ۳، ۳/۵ و ۴ در هزار)، بردو (۵، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد)، نوردوکس (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ در هزار) و بی‌کربنات سدیم (۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد) بودند. دو شاهد شامل لوله‌های حاوی محیط کشت مایع LB دارای باکتری و محیط کشت مایع LB فاقد باکتری در نظر گرفته شد. لوله‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، رشد باکتری با مشاهده چشمی کدورت ایجاد شده در لوله‌ها و مقایسه با تیمارهای شاهد بررسی شد. کمترین غلظت ترکیب شیمیایی که در آن باکتری رشد نکرده بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (Talibi et al., 2011). مشخصات ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

1- Minimum inhibitory concentration

2- Luria-Bertani broth

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها

Table 1- The chemical compounds used in the experiments

نام عمومی Generic name	نام تجاری و فرمولاسیون Trade name and formulation	شرکت تولیدکننده (کشور) Company (Country)
اکسی کلرور مس Copper oxychloride	Copper oxychloride 35% WP	Shyam Chemicals Co. (India)
بردو Bordeaux	Bordeaux Daroogostar 18% SC	Daroogostar Co. (Iran)
نوردوکس Nordox	Cobre Nordox 75% WG	Nordux chemical Co. (Norway)
بی‌کربنات سدیم Sodium bicarbonate	-	Merk Co. (Germany)

جدایه‌های باکتری بیماری‌زا در محیط کشت نوترینت برات^۲ (NB) کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس سوسپانسیون 1×10^9 CFU ml⁻¹ از جدایه‌های باکتری تهیه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در سطح محیط کشت نوترینت آگار حاوی یک درصد گلوکز^۳ (NAG) به طور یکنواخت پخش گردید. پس از ۱۵ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فاصله ۲۵ میلی‌متر از هم روی محیط کشت قرار داده شد. برای هر دیسک آنتی‌بیوتیک سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. میزان حساسیت جدایه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها، با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشد باکتری تعیین گردید (Psallidas, 1993).

هدف از انجام آزمون آنتی‌بیوگرام، بررسی حساسیت یا مقاومت جدایه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بود. از نتایج این آزمون، در شمارش جمعیت باکتری استفاده شد، به این صورت که محیط کشت NA حاوی چند آنتی‌بیوتیک که جدایه‌های باکتری به آن‌ها مقاوم بودند، تهیه و تغییرات جمعیت باکتری روی آن ارزیابی شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی^۱ (MBC) ترکیبات شیمیایی جهت تعیین MBC، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از تیمارهایی که در سنجش MIC باکتری در آن‌ها رشد نکرده بود، روی محیط کشت NA فاقد ترکیب شیمیایی واگشت شد. تشتک‌های پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس از نظر ظهور پرگنه‌های باکتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. کمترین غلظت ترکیب شیمیایی که در آن باکتری روی محیط کشت NA رشد نکرد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Talibi et al., 2011).

آنتی‌بیوگرام

جهت بررسی حساسیت جدایه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها، از ۲۱ آنتی‌بیوتیک شامل اریترومایسین، استرپتومایسین، امی‌پنم، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آمیکاسین، پنی‌سیلین، تتراسایکلین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، جنتامایسین، ریفامپین، سفالکسین، سفتی‌زوکسیم، فورازولیدن، کلرامفنیکل، کلوزاسیلین، مروپنم، نالیدیکسیک‌اسید، نوویوسین، نیتروفورانتوئین و ونکومایسین استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به صورت آماده مصرف، از شرکت پادتن طب تهیه شدند. غلظت آنتی‌بیوتیک در دیسک‌های مورد استفاده، در جدول ۲ آورده شده است.

2- Nutrient broth medium

3- Nutrient agar medium plus 1% glucose

1- Minimum bactericidal concentration

جدول ۲- آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در آزمون آنتی‌بیوگرام

Table 2- Antibiotics used in the antibiogram test

آنتی‌بیوتیک Antibiotic	غلظت Concentration*	آنتی‌بیوتیک Antibiotic	غلظت Concentration
Erythromycin اریترومایسین	15	Cefalexin سفالکسین	30
Streptomycin استرپتومایسین	10	Ceftizoxime سفتی‌زوکسیم	30
Imipenem ام‌پنم	10	Furazolidone فورازولیدون	100
Ampicillin آمپی‌سیلین	10	Chloramphenicol کلرامفنیکل	30
Amoxicillin آموکسی‌سیلین	25	Cloxacillin کلوگزاسیلین	1
Amikacin آمیکاسین	30	Meropenem مروپنم	10
Penicillin پنی‌سیلین	10	Nalidixic acid نالیدیکسیک‌اسید	30
Tetracycline تتراسایکلین	30	Novobiocin نووبیوسین	30
Trimethoprim sulfamethoxazole تری‌متوپریم‌سولفامتو‌کسازول	75.23	Nitrofurantoin نیتروفوران‌توئین	300
Gentamicin جنتامایسین	10	Vancomycin ونکومایسین	30
Rifampin ریفامپین	5		

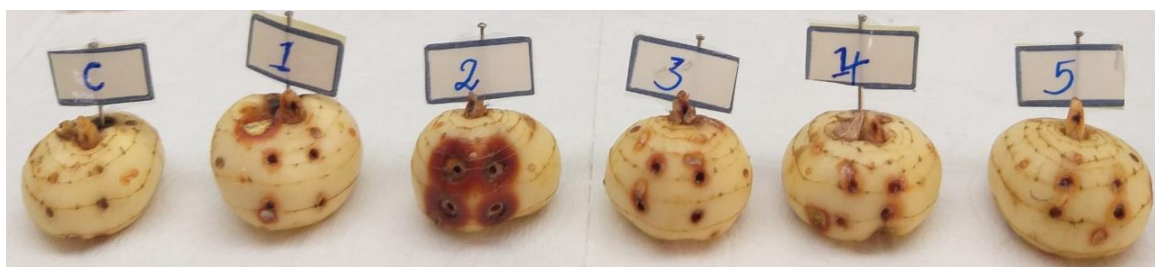
* میکروگرم در دیسک. (Microgram per disc.)

شد. پس از هوادهی و خشک شدن، بنه‌ها در ظروف در بسته پلی‌اتیلنی قرار داده شدند. در تیمار شاهد، پس از قرار گرفتن بنه‌ها در سوسپانسیون باکتری، به جای تیمار شیمیایی روی آن‌ها آب مقطر سترون اسپری شد. جمعیت باکتری پس از یک و دو هفته شمارش شد. جهت تعیین جمعیت باکتری، از هر تیمار دو بنه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون غوطه‌ور شد و ظروف شیشه‌ای حاوی بنه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر تیمار، روی محیط کشت NA حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین جی (5 mg.L^{-1})، اریترومایسین (5 mg.L^{-1}) و کلرامفنیکل (5 mg.L^{-1}) پخش شد. شمارش پرگنه‌های باکتری‌ها، ۲۴ ساعت پس از کشت انجام شد (Duineveld & Van Veen, 1999). این آزمون در قالب طرح کامل تصادفی با ۱۳ تیمار و سه تکرار

اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی روی جمعیت باکتری‌های موجود روی بنه‌ها

به منظور ارزیابی تأثیر تیمارهای شیمیایی مختلف بر جمعیت باکتری، پوشال اطراف بنه‌ها حذف شد. بنه‌ها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند، سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شده و به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون $1 \times 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ پنج جدایه باکتری مورد مطالعه، غوطه‌ور شدند. پس از آبیگری، به مدت یک ساعت به منظور خشک شدن، بنه‌ها در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس محلول غلظت‌های مختلف چهار ترکیب شیمیایی مورد مطالعه، شامل اکسی‌کلرور مس ($1/5$)، ۲ و ۳ در هزار، بردو (۵، ۸ و ۱۰ درصد)، نوردوکس ($1/5$)، ۱ و ۰/۵ در هزار) و بی‌کربنات سدیم (۴، ۶ و ۸ درصد) روی بنه‌ها اسپری

مزارع جدید کشت زعفران، انجام شده است. در بخش آزمایشگاه، عملکرد نمک بی کربنات سدیم و سه ترکیب شیمیایی با پایه مس شامل نوردوکس، بردو و اکسی کلرور مس بر جمعیت و بیماری زایی باکتری عامل بیماری مورد آزمایش قرار گرفت. بررسی علائم ایجاد شده روی بنه‌های زعفران دو هفته پس از مایه‌زنی با جدایه‌های باکتری *B. gladioli* pv. *gladioli* به صورت بروز پوسیدگی خشک همراه با قهوه‌ای شدن بافت اطراف ناحیه مایه‌زنی شده بود. سطح نکروزه شده در محل مایه‌زنی نشان داد توان جدایه‌ها در ایجاد پوسیدگی روی بنه‌ها متفاوت بود. بیشترین علائم نکروز و پوسیدگی، در بنه‌های مایه‌زنی شده با جدایه Bg16 مشاهده شد. شدت علائم ایجاد شده توسط سایر جدایه‌ها تقریباً مشابه بود (شکل ۱).



شکل ۱- علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* روی بنه زعفران. شاهد (C)، جدایه Bg15 (1)، جدایه Bg16 (2)، جدایه Bg147 (3)، جدایه Bg150 (4) و جدایه Bg168 (5).

Figure 1- Symptoms produce by *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* isolates on saffron corm. Control (C), Bg 15 (1), Bg 16 (2), Bg 147 (3), Bg 150 (4) and Bg 168 (5).

2021). در شرایط محیطی و ویژگی‌های میزبانی یکسان، تفاوت در بیماری زایی و شدت علائم ایجاد شده روی میزبان، می‌تواند ناشی از فاکتورهای بیماری‌زایی باکتری باشد. ساختار سلولی، مولکول‌ها و سیستم‌های تنظیمی مؤثر در بیماری‌زایی، از جمله این فاکتورها هستند. فاکتورهای بیماری‌زایی در کلنیزه کردن سلول‌های میزبان و گریز از سیستم دفاعی آن، همچنین حرکت بین سلولی و جذب مواد مغذی از میزبان دخالت دارند. برخی از

انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به روش توکی و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 8) انجام شد. رسم نمودار نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

با توجه به این که پیش از این پژوهشی در زمینه ضدعفونی بنه‌های زعفران جهت عاری شدن از باکتری بیماری‌زای *B. gladioli* pv. *gladioli* در دنیا صورت نگرفته است، ابهامات زیادی در جنبه‌های مختلف اجرای این تحقیق وجود داشت. مطالب ارائه شده در این مقاله، دربرگیرنده نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی پژوهشی است که با هدف ضدعفونی سطحی بنه‌های زعفران جهت ممانعت از انتشار بیماری پوسیدگی باکتریایی بنه از مزارع آلوده به مناطق و مزارع عاری از بیماری، و به‌ویژه

عوامل محیطی مختلف از جمله دما، رطوبت، نور و ویژگی‌های خاک مانند اسیدیته، رطوبت و مواد غذایی بر بروز بیماری و شدت علائم آن روی محصولات کشاورزی تأثیرگذار هستند، همچنین اثر متقابل عوامل مختلف محیطی می‌تواند باعث کاهش و یا افزایش شدت بیماری‌ها گردد. بیماری‌های ایجاد شده در گیاهان نتیجه تعامل سه طرفه بین میزبان حساس، بیمارگر مهاجم و شرایط محیطی مساعد است (Pokhrel,

محیط کشت NA واکشت شدند. جدایه‌های باکتری در همه سوسپانسیون غلظت‌های MIC روی محیط NA فاقد هر گونه ترکیب شیمیایی رشد نمود. این نتایج نشان داد این ترکیبات شیمیایی در غلظت‌های بررسی شده خاصیت باکتری‌کشی نداشتند (جدول ۴).

هیچ‌گونه تنوعی از نظر حساسیت به ترکیبات مسی و بی-کربنات سدیم در بین پنج جدایه بررسی شده، مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد مقاومت به ترکیبات با پایه مس و بی‌کربنات سدیم به صورت گسترده در بین جدایه‌های *B. gladioli* استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی وجود دارد. این نتایج مشابه یافته‌های موجود از مقاومت باکتری *B. gladioli* جداسازی شده از گل ارکید در هاوایی به ترکیبات مسی و آنتی-بیوتیک استرپتومایسین می‌باشد (Keith et al., 2005).

بیمارگرها دارای طیف وسیعی از فاکتورهای بیماری‌زایی با دامنه عملکرد وسیع هستند (Bosland & Barchenger, 2024).

نتایج مشاهده‌ای آزمون بررسی حساسیت جدایه‌های باکتری به ترکیبات با پایه مس و بی‌کربنات سدیم نشان داد، با افزایش غلظت هر چهار ترکیب شیمیایی، رشد باکتری‌ها روی محیط کشت کاهش یافت. اکسی‌کلور مس در غلظت‌های ۱/۵ تا ۳ در هزار، بردو ۵ تا ۱۰ درصد، نوردوکس ۰/۵ تا ۱ در هزار و بی-کربنات سدیم ۴ تا ۱۰ درصد، هیچ‌گونه ممانعتی از رشد باکتری-ها دیده نشد و بازدارندگی از رشد باکتری‌ها در تیمارهای اکسی-کلور مس (۳/۵ و ۴ در هزار)، بردو (۱۲ و ۱۴ درصد)، نوردوکس (۱/۵، ۲، ۲/۵ در هزار) و بی‌کربنات سدیم (۱۲ درصد) مشاهده گردید، بنابراین غلظت‌های ۳/۵ در هزار اکسی‌کلور مس، ۱۲ درصد بردو و بی‌کربنات سدیم و ۱/۵ در هزار نوردوکس به عنوان MIC هر ترکیب شیمیایی تعیین شد (جدول ۳).

سوسپانسیون غلظت‌های MIC ترکیبات مورد مطالعه روی

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی روی رشد جدایه‌های باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی

Table 3- The effect of different doses of chemical compounds on growth of *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* isolates for determining the minimum inhibitory concentration

ترکیب شیمیایی Chemical compound	غلظت اول First dose	غلظت دوم Second dose	غلظت سوم Third dose	غلظت چهارم Fourth dose	غلظت پنجم Fifth dose
اکسی‌کلور مس Copper oxychloride	1.5/1000	2/1000	3/1000	3.5/1000	4/1000
رشد باکتری Bacterial growth	+	+	+	-	-
بردو Bordeaux	5/100	8/100	10/100	12/100	14/100
رشد باکتری Bacterial growth	+	+	+	-	-
نوردوکس Nordox	0.5/1000	1/1000	1.5/1000	2/1000	2.5/1000
رشد باکتری Bacterial growth	+	+	-	-	-
بی‌کربنات سدیم Sodium bicarbonate	4/100	6/100	8/100	10/100	12/100
رشد باکتری Bacterial growth	+	+	+	+	-

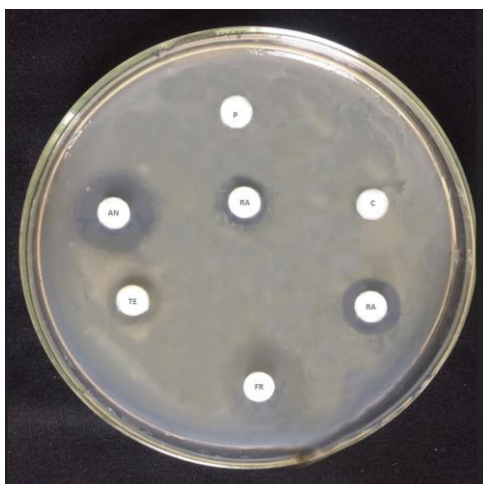
جدول ۴- تأثیر حداقل غلظت‌های بازدارندگی ترکیبات شیمیایی بر رشد جدایه‌های باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* پس از کشت روی محیط کشت نوترینت آگار

Table 4- The effect of minimum inhibitory concentrations of chemical compounds on growth of *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* isolates after cultivation on nutrient agar medium

ترکیب شیمیایی Chemical compound	غلظت Dose		
اکسی کلرور مس Copper oxychloride	3.5/1000	4/1000	
رشد باکتری Bacterial growth	+	+	
بردو Bordeaux	12/100	14/100	
رشد باکتری Bacterial growth	+	+	
نوردوکس Nordox	1.5/1000	2/1000	2.5/1000
رشد باکتری Bacterial growth	+	+	+
بی کربنات سدیم Sodium bicarbonate	12/100		
رشد باکتری Bacterial growth	+		

به آن آنتی‌بیوتیک می‌باشد. هرچه قطر هاله روشن در اطراف دیسکی بیشتر باشد، حساسیت بیشتر باکتری به آن آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهد (Yang et al., 2019).

در آزمون آنتی‌بیوگرام، پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در اطراف برخی از دیسک‌ها هاله بازدارنده از رشد باکتری تشکیل شد (شکل ۲). عدم رشد باکتری در مجاورت دیسک آنتی‌بیوتیک و تشکیل هاله روشن در این ناحیه نشانه حساسیت جدایه باکتری



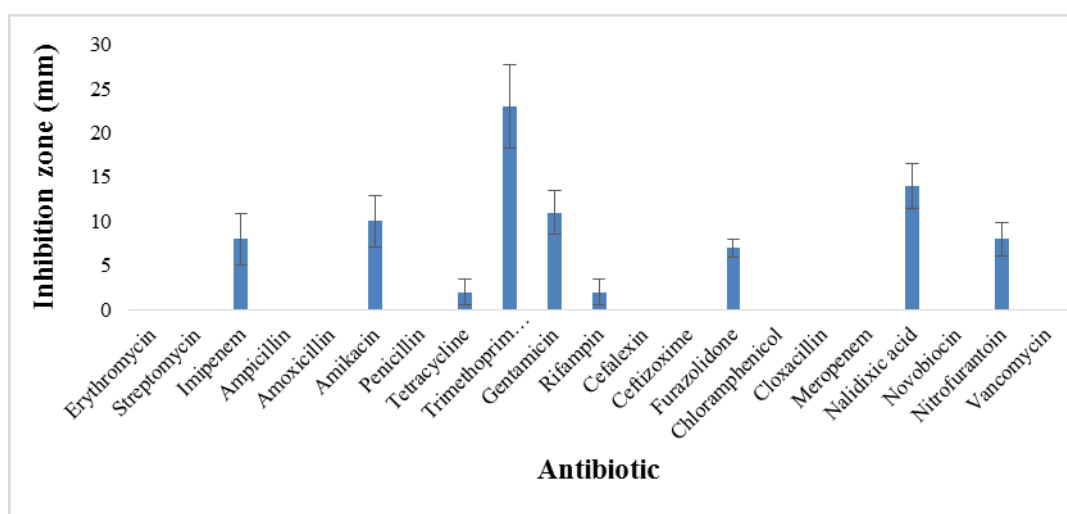
شکل ۲- ممانعت از رشد جدایه‌های باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* اطراف برخی از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک
Figure 2- Preventing the growth of *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* isolates around some of the antibiotic discs.

نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک امی‌پنم، آمیکاسین، تتراسایکلین،

از بین ۲۱ آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه، جدایه‌های باکتری

پس از این دو آنتی‌بیوتیک، جنتامایسین با قطر هاله ۱۱ میلی‌متر و آمیکاسین با قطر هاله ۱۰ میلی‌متر، بیشترین تأثیر را در ممانعت از رشد باکتری‌ها نشان دادند. باکتری‌های مورد مطالعه هیچ‌گونه حساسیتی نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک دیگر از جمله اریترومایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، پنی‌سیلین، کلرامفنیکل و سفالکسین نشان ندادند و هاله بازدارنده‌ای اطراف این دیسک‌ها تشکیل نشد (شکل ۳).

تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، جنتامایسین، ریفامپین، فوروزالیدون، نالیدیکسیک‌اسید و نیتروفورانتوئین حساسیت نشان دادند. دو آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و نالیدیکسیک‌اسید با میانگین قطر هاله بازدارنده به ترتیب ۲۳ و ۱۴ میلی‌متر، بیش از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها روی رشد جدایه‌های باکتری *B. gladioli* pv. *gladioli*، تأثیر بازدارندگی داشتند (شکل ۳).



شکل ۳- اثر بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر رشد جدایه‌های باکتری *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*
Figure 3- The inhibitory effect of different antibiotics on the growth of *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* isolates.

شمارش پرگنه‌های باکتری‌ها روی بنه یک و دو هفته پس از تیمار ترکیبات شیمیایی، با کشت سوسپانسیون روی محیط کشت NA حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین جی (5 mg.L^{-1})، اریترومایسین (5 mg.L^{-1}) و کلرامفنیکل (15 mg.L^{-1})، که جدایه‌های باکتری به آن‌ها مقاوم بودند و روی آن رشد نمودند، انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، استفاده از سموم مسی اکسی‌کلرورمس، بردو و نوردوکس در هر سه غلظت استفاده شده موجب کاهش معنی‌دار جمعیت باکتری روی بنه زعفران شد. اما تیمارهای ۴ درصد و ۶ درصد بی‌کربنات سدیم با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند و جمعیت باکتری فقط در غلظت ۸

در آزمون آنتی‌بیوگرام، جدایه‌های باکتری نسبت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک از جمله اریترومایسین، استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، پنی‌سیلین، کلرامفنیکل و سفالکسین مقاومت نشان دادند. تاکنون مطالعه منتشر شده‌ای در زمینه مقاومت سویه‌های باکتری *B. gladioli* pv. *gladioli* به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود ندارد. مکانیسم‌های مختلفی در بروز مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک گزارش شده است (Stockwell & Duffy, 2012). از نتیجه آزمون آنتی‌بیوگرام در بررسی حساسیت و مقاومت جدایه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف استفاده شد.

این سم با غلظت دوم سم اکسی کلرور مس تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۵). از آنتی بیوتیک‌ها، و ترکیبات شیمیایی با پایه مس در کنترل جدایه‌های بیماری‌زای *Burkholderia* روی میزبان‌های برنج و گیاهان زینتی استفاده شده است (Shahjahan et al., 2000; Keith et al., 2005).

درصد بی‌کربنات سدیم نسبت به شاهد کاهش معنی دار نشان داد (جدول ۵).

از بین سه سم دیگر، نوردوکس در سه غلظت مصرفی و بردو در غلظت ۱۰ درصد، بیشترین تأثیر را در کاهش جمعیت باکتری روی بنه نشان دادند. بردو نیز در هر سه غلظت، تأثیر بیشتری از اکسی کلرور مس نشان داد گرچه غلظت دوم و سوم

جدول ۵- لگاریتم میانگین جمعیت باکتری روی بنه زعفران پس از تیمار با ترکیبات شیمیایی

Table 5- The average bacterial population on saffron corm after treatment by chemical compounds

شیمیایی ترکیب Chemical compound	غلظت Dose	لگاریتم جمعیت باکتری Log of bacterial population	
		هفته اول First week	هفته دوم Second week
		اکسی کلرور مس Copper oxychloride	1.5/1000 2/1000 3/1000
بردو Bordeaux	5/100 8/100 10/100	4.60 c 4.52 d 4.06 g	4.52 bc 4.44 bc 4.41 bc
نوردوکس Nordox	4/100 6/100 8/100	4.78 ab 4.77 ab 4.73 b	4.77 a 4.76 a 4.67 a
بی‌کربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.5/1000 1/1000 1.5/1000	4.46 ef 4.44 f 4.11 g	4.41 bc 4.37 c 4.00 d
شاهد Control	-	4.79 a	4.69 a

* در هر ستون، داده‌های با حروف غیرمشابه بر اساس آزمون توکی با هم تفاوت معنی داری دارند ($p < 0.05$).

In each column, the data with different letters are statistically different based on Tukey's test ($p < 0.05$).

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش مقدماتی، تیمارهای اکسی کلرور مس ۲ در هزار و ۳ در هزار، بردو ۸ درصد و ۱۰ درصد و نوردوکس ۱ در هزار و ۱/۵ در هزار بیشترین تأثیر را بر کاهش جمعیت باکتری روی بنه‌های زعفران در دسیکاتور داشتند، این تیمارها جهت ضدعفونی بنه‌ها و بررسی تأثیر آن‌ها بر شدت علائم و بیماری ایجاد شده در محیط مزرعه مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

نتیجه گیری

با عنایت به این که هر ساله تعداد زیادی بنه زعفران از استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی، که برخی از مزارع

در هفته دوم، در تیمارهای نوردوکس بیشترین تأثیر در غلظت دوم و سوم دیده شد. غلظت اول نوردوکس با غلظت‌های دوم و سوم اکسی کلرور مس و بردو تفاوت معنی داری نداشتند، همچنین تفاوت معنی داری بین سه غلظت بی‌کربنات سدیم و غلظت ۱/۵ در هزار سم اکسی کلرور مس با تیمار شاهد وجود نداشت و همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۵). دلیل این موضوع می‌تواند به تجزیه ترکیبات شیمیایی و کاهش اثر بازدارندگی آن‌ها با گذشت زمان مربوط باشد، همچنین سازگاری جدایه‌های باکتری با شرایط محیط زیست آن‌ها نیز می‌تواند موجب کمتر شدن تأثیر این ترکیبات بر جمعیت باکتری شود.

از کاشت به‌عنوان آخرین راه‌کار و با هدف جلوگیری از انتشار بیماری از مزارع آلوده به مزارع جدید و با در نظر گرفتن عدم وجود باقیمانده سم روی محصول زعفران قابل بررسی است. بر اساس نتایج این تحقیق، مؤثرترین تیمارها در کاهش جمعیت باکتری در محیط آزمایشگاه، تیمارهای اکسی‌کلرور مس ۲ در هزار و ۳ در هزار، بردو ۸ درصد و ۱۰ درصد و نوردوکس ۱ در هزار و ۱/۵ در هزار بودند که در محیط مزرعه مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت.

آن‌ها به باکتری *B. gladioli* pv. *gladioli* آلوده هستند، جهت کشت در مزارع جدید به سایر استان‌ها ارسال می‌شود، ضروری است اقدامات لازم جهت بهداشت و سالم‌سازی بنه‌ها انجام شود. به دلیل وجود محدودیت در باکتری‌کش‌های مسی در دسترس و وجود عناصر ژنتیکی متحرک در ژنوم باکتری‌ها، که موجب بروز مقاومت به این ترکیبات می‌شوند، پیشگیری از بیماری‌های گیاه زعفران با انجام اقداماتی که منجر به اجتناب از آلودگی شود، گزینه مناسب‌تری می‌باشد و ضدعفونی بنه‌ها پیش

منابع

- Anonymous (2022). Agriculture Statistics, Chapter 3: Horticultural and greenhouse products report. Ministry of Jihad Agriculture Publications, Information and Communication Center, Programming Deputy, Tehran, Iran. 307 pp. (In Persian).
- Bahrani, A., Mirmohammadsadegh, S. S., Zare-Hoseini, S. F., Mousavi-Tabari, R., & Saket, S. (2020). Saffron in the ancient history of Iran. In A. Koocheki and M. Khajeh-Hosseini (eds). Saffron: Science, Technology and Health. Elsevier Inc. United Kingdom. p. 23-34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818638-1.00003-4>.
- Bosland, P. W., & Barchenger, D. W. (2024). Resistance: the Pathogen. Breeding Disease-Resistant Horticultural Crops. Academic Press, 97-125.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5, 719-729. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x>.
- Duineveld, B., & Van Veen, J. (1999). The number of bacteria in the rhizosphere during plant development: relating colony-forming units to different reference units. *Biology & Fertility Soils*, 28, 285-291. <https://doi.org/10.1007/s003740050495>.
- Elshafie, H., Racioppi, R., Bufo, S., & Camele, I. (2017). *In vitro* study of biological activity of four strains of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* and identification of their bioactive metabolites using GC-MS. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.04.014>.
- Fiori, M., Ligios, V., & Schiaffino, A. (2011). Identification and characterization of *Burkholderia* isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 450-461. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8730.
- Gijon-Hernandez, A., Teliz-Ortiz, D., Cardenas-Soriano, E., De Leon, C., Mora-Aguilera, A., Mejia-Sanchez, D., & De La Torre-Almaraz, R. (2011). Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. *Plant Disease*, 92, 1249. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-8-124C>.
- Gupta, V., Kumar, K., Fatima, K., Razdan, V. K., Sharma, B. C., Mahajan, V., Rai, P. K., Sharma, A., Gupta, V., Hassan, M. G., & Hussien, R. (2020). Role of biocontrol agents in

- management of corm rot of saffron caused by *Fusarium oxysporum*. *Agronomy*, *10*, 1398. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091398>.
- Gupta, V., Sharma, A., Rai, P. K., Gupta, S. K., Singh, B., Sharma, S. K., Singh, S. K., Hussain, R., Razdan, V. K., Kumar, D., Paswal, S., Pedit, V., & Sharma, R. (2021). Corm rot of saffron: epidemiology and management. *Agronomy*, *11*, 339. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020339>.
- Hu, S., Wang, X. X., Sun, W. J., Wang, L. L., & Li, W. K. (2021). Investigation on main disease types of *Crocus sativus* in Chongming. *Chinese Society of Plant Pathology*, *1*, 148-178. <https://doi.org/10.26914/c.cnkihy.2021.063781>.
- Karimi Shahri, M. R., Kamali, H., & Sajadinejad, M. (2019). Occurrence of *Burkholderia gladioli* bacterial disease in saffron fields of Razavi Khorasan province. In Proceedings of 6th National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran, Iran. 13 February 2019. (In Persian).
- Karimi Shahri, M. R., Sedaghati, N., Mostafazadeh, S., Yardehnavi, F., & Zareh Hosseini, H. (2020). Molecular detection of *Burkholderia gladioli* in saffron fields of Razavi Khorasan province. In Proceedings of 4th International and 16th Iranian Genetic Congress. Iran, 15-17 April 2020. (In Persian with English Summary).
- Keith, L. M., Sewake, K. T., & Zee, F. T. (2005). Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii. *Plant Disease*, *89*, 1273-1278. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1273>.
- Khaledi, N., Rezaei, M., & Alizadeh Farddarabad, M. (2024). Investigation into the prevalence of fusarium corm rot disease in saffron fields of Iran. *Saffron Agronomy & Technology*, *11*(4), 393-412. <https://doi.org/10.22048/jsat.2024.410910.1501>. (In Persian with English Summary).
- Khezri, M., Karimi Shahri, M. R., & Ghasemi, G. (2023). Bacterial rot disease of saffron corm and leaf. *Plant Pathology Science*, *12*(1), 74-83. <https://doi.org/10.2982/PPS.12.1.74>. (In Persian with English Summary).
- Moon, H., Park, H. J., Jeon, A., Han, S. W., & Park, C. J. (2017). Isolation and identification of *Burkholderia gladioli* on *Cymbidium* orchids in Korea. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *31*, 280-288. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1268069>.
- Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., Clark, C. A., Cartwright, R. D., & Rush, M. C. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Disease*, *93*, 896-905. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>.
- Peng, Z., Dottorini, T., Hu, Y., Li, M., Yan, S., Fanning, S., Baker, M., Xu, J., & Li, F. (2021). Comparative genomic analysis of the foodborne pathogen *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* harboring a bongkrekic acid biosynthesis gene cluster. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 628538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628538>.
- Pokhrel, B. (2021). Effects of environmental factors on crop diseases. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, *12*, 553. <https://doi.org/10.35248/2157-7471.21.12.553>.
- Psallidas, P. G. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellana*. *Plant Pathology*, *42*, 358-363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01512.x>.
- Ramezani Kaporchali, M., Safarnezhad, M. R., Ghasemi, A., & Farrokhi, N. (2022). Study flagellum and *fliC* of the causative bacterial agent of saffron corm rot disease *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, a strategy in the identification and prevention of disease spread. *Saffron Agronomy & Technology*, *10*(3), 261-

270.
<https://doi.org/10.22048/jsat.2022.342484.1461>
. (In Persian with English Summary).
- Ren, T., Dai, D., Yu, M., Li, T., & Zhang, C. (2023). Identification and characterization of pathogens causing saffron corm rot in China. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1188376. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188376>.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press. 373 pp.
- Shahjahan, A. K., Rush, M. C., Groth, D., & Clark, C. (2000). Panicle blight. *Rice Journal*, *15*, 26-29.
- Stockwell, V. O., & Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et Technique*, *31*(1), 199-210. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2104>.
- Talibi, I., Amkraz, N., Askarne, L., Msanda, F., Saadi, B., Boudyach, E. H., Boubaker, H., Bouizgarne, B., & Ait Ben Aoumar, A. (2011). Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(17), 4332-4338.
- Yang, K., Li, H. Z., Zhu, X., Su, J. Q., Ren, B., Zhu, Y. G., & Cui, L. (2019). Rapid antibiotic susceptibility testing of pathogenic bacteria using heavy-water-labeled single-cell Raman spectroscopy in clinical samples. *Analytical Chemistry*, *91*(9), 6296-6303. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01064>.