مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد پنجم، شماره اول، ۱۳۹۶
۱-۱۴
www.jcri.ir

پایش عامل بیماری سوختگی باکتریایی پنبه و بررسی باکتری‌های گرم منفی رورست در بذر پنبه

محمدرضی نتاج[۱*]، غلام خداکرمیان[۲]

[۱]دانشجوی دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
[۲]استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان،ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱۵

چکیده

فیلوسفر مکانی برای زندگی ریزموجودات است. باکتری‌ها از جمله ساکنین فراوان فیلوسفر هستند که تعداد آنها تحت تاثیر گونه گیاه و نوع برگ قرار می‌گیرد. باکتری‌های متعددی بصورت رورست در سطح اندام‌های هوایی و بذور گیاه وجود داشته و در شرایط مساعد باعث بروز بیماری می‌شوند. در طی سال‌های اخیر با بروز همه‌گیری بیماری بلایت باکتریائی پنبه در کشور و بخصوص استان گلستان در سطح وسیع نظریاتی مبنی بر وجود رورستی باکتری در سطح بذور پنبه مطرح گردید. به منظور شناسائی باکتری‌های گرم منفی موجود در سطح بذور پنبه، ازبذور توصیه شده ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید بصورت تصادفی نمونه برداری شد. با قرار دادن بذور در داخل آب مقطر سترون و افزودن مقداری توئین ۲۰ به عنوان ماده شوینده و قرار دادن محیط فوق در دمای اتاق به مدت یک ساعت به شستشوی بهتر باکتری‌های موجود در سطح بذور کمک شد. سوسپانسیون فوق در روی محیط کشت مناسب مخطط گردید. در ادامه باکتری‌های رشد کرده جداسازی، خالص‌سازی و بر اساس منابع معتبر باکتریولوژی شناسائی شدند. بر اساس نتایج حاصل گونه‌های *Psuodomonas fluorescens*، *P. syringae*، *Pantoea annanas* و *Pectobacterium* sp. شناسایی شدند. هیچ موردی از وجود باکتری *Xanthomonas citri* subsp.*malvacearum* به عنوان عامل بیماری بلایت باکتریایی به‌صورت رورست در بذور پنبه به اثبات نرسید.

واژه‌های کلیدی: سوختگی باکتریایی، *Xanthomonas citri* sub sp. *malvacearum*، رورست، پنبه و بذر.

*نویسنده مسئول: mrazinataj@yahoo.com

مقدمه

وجود مواد غذایی برای بقا و زندگی کلیه موجودات زنده، ضروری است. گیاهان عالی به عنوان یک تولید کننده اولیه، منابع اصلی کربن و انرژی را برای تعداد زیادی از موجودات شامل ریزموجودات تا انسان فراهم می‌کنند (برنسیچ و ویننز، ۲۰۰۵). تعداد زیادی از ریزموجودات در رابطه نزدیک با گیاهان میزبان زندگی کرده و از این رابطه کربن و دیگر مواد غذایی را از میزبان بدست می‌آورند. اتفاقاتی که منجر به استقرار این برهمکنش‌ها می‌شود مولکول‌های سیگنال مرتبط با گیاهان است که به وسیله پروتئین‌های گیرنده باکتریایی شناسائی می‌شود. این شناسایی می‌تواند نقش مهمی در اختصاصیت و طیف میزبانی باکتری ایفا کند (برنسیچ و ویننز، ۲۰۰۵).

فیلوسفر سطح اندام‌های هوایی گیاهان و مکانی برای زندگی ریزموجودات است. قندهای ساده مانند گلوکز، فروکتوز و سوکروز مواد کربنی غالب در روی برگ‌ها و ساقه بوده که از قسمت‌های زخمی یا منافذ ترشحی به خارج راه می‌یابند (توکی، ۱۹۷۰). در این قسمت‌ها بیشترین جمعیت رورستی را می‌توان مشاهده کرد (مرسیر و لیندو، ۲۰۰۰). ساکنین میکروبی فیلوسفر شامل جنس‌های مختلف باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها، جلبک‌ها و با جمعیت کمتری پروتوزواها و نماتدها هستند. باکتری‌ها بخصوص باکتری‌های *Pseudomonas syringae* و .*Pantoea* spp فراوان‌ترین ساکنین فیلوسفر هستند (اندروز و هریس، ۲۰۰۰). گونه گیاه و نوع برگ تاثیر به‌سزایی در تعداد باکتری‌های فیلوسفر دارد. برای مثال تعداد باکتری در فیلوسفر گیاهان پهن برگ مانند خیار و لوبیا به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان پهن برگ دارای برگ‌های مومی و گراس‌ها است. از سوی دیگر سطح قسمت‌های هوائی گیاه (فیلوسفر) در معرض تغییرات سریع و مداوم دما، رطوبت، اشعه ماورا بنفش، رطوبت نسبی و شیب غلظت مواد غذائی است (برنسیچ و ویننز، ۲۰۰۵).

تفاوت‌های موجود در محیط‌های فیزیکوشیمیائی محیط‌های بالای سطح خاک با محیط زیر خاک در جمعیت باکتری‌های ریشه تاثیر دارند. به‌طور مثال باکتری‌های رنگدانه‌دار و رنگی که به‌ندرت در ریزوسفر یافت می‌شوند در باکتری‌های سطح برگ غالب هستند که احتمالاً به علت تاثیر تشعشعات خورشید در اکولوژی فیلوسفر است.

سوختگی باکتریایی پنبه یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای پنبه می‌باشد که در اکثر مناطق پنبه‌کاری دنیا وجود دارد و در فصولی که شرایط محیطی برای گسترش این بیماری مناسب باشد، کاهش عملکرد شدیدی را سبب می‌شود (هیلوکس، ۱۹۹۲). در ایران در سال ۱۳۳۸ توسط دفتری از طالخونچه اصفهان، در خرداد ماه ۱۳۳۹ توسط شریف از اقلید فارس، در مهر ماه ۱۳۴۶ توسط امانی از امیر آباد میبد و یزد، در شهریور ماه ۱۳۴۷ توسط بهداد از کمندان رودشت اصفهان و توسط شریف از درگز گزارش شده است (بهداد، ۱۹۹۶). همچنین این بیماری از منطقه عشق‌آباد بجنورد (عرب سلمانی

و همکاران، ۲۰۰۲) و مانه و سملقان خراسان و استان‌های مازندران، گلستان و سمنان (گرمسار) (عـرب سلمانی و همکاران، ۲۰۰۲؛ رزاقی و همکاران، ۲۰۰۶) مشاهده و گزارش شده است.

عامل بیماری باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* [(ex Smith, 1901) (شاد و همکاران، ۲۰۰۶)، یک باکتری بذرزاد است که در گونه‌های زراعی پنبه مانند *Gossypium hirsutum*، *G.arboreum*، *G.herbaceum* و *G. barbadens* منجر به بیماری می‌شود. منبع آلودگی به بیماری معمولا از بذر و بقایای گیاهی تأمین می‌شود و گیاهان آلوده بعنوان کانون‌های ثانویه بیماری بشمار می‌روند این باکتری بر روی گیاه نیز قادر است به‌صورت رورست زندگی نماید (هیرانو و آپر، ۱۹۸۳). مهمترین منبع مایه تلقیح مواد گیاهی خشک محصول برداشت شده قبلی است (موهان، ۱۹۸۳). بقاء باکتری در بذر، ۱۲ ماه پس از برداشت محصول به تدریج شروع به ضعیف شدن می‌کند، ولی در شرایط مساعد نگهداری بذر (دمای پنج درجه سانتی‌گراد) باکتری تا بیش از دو سال زنده می‌ماند (مهتا و همکاران، ۲۰۰۵). به‌طور طبیعی درصد آلودگی بذر پنبه به باکتری عامل سوختگی خیلی پایین است. با وجود این، تحت شرایط محیطی مساعد مزرعه همین میزان کم آلودگی منجر به اپیدمی بیماری می‌شود (هانتر و برینکرهاف، ۱۹۶۳).

باکتری عامل بیماری قادر است در تمام مراحل رشد گیاه و به همه قسمت‌های هوایی بوته حمله نماید و علائم متفاوتی شامل سوختگی گیاهچه، سیاه شدن ساقه، لکه زاویه‌ای برگ و پوسیدگی را ایجاد می‌نماید. بیمارگر پس از زمستان‌گذرانی در بذر و بقایای خشک شده گیاه و با کاشت پنبه و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی آلودگی ایجاد می‌کند. باکتری عامل بیماری با باد، باران و آبیاری بارانی از گیاه آلوده به گیاهان سالم انتقال می‌یابد (سرینیواسان، ۱۹۹۴). علائم بیماری در روی کوتیلدون به‌صورت لکه‌های سبز روشن تا قهوه‌ای مایل به سیاه مشاهده می‌شود و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی برای شیوع بیماری، سبب سوختگی گیاهچه می‌شود. بیماری روی برگ به صورت لکه‌های آب سوخته است که به تدریج بزرگ و قهوه‌ای متمایل به تیره شده و به علت آنکه پیشرفت بیماری به رگبرگ‌ها محدود می‌شود. لکه‌های روی برگ به‌صورت گوشه‌دار مشاهده می‌گردند. در نتیجهٔ آلودگی اندام‌های هوایی گیاه، ظاهر آب‌سوخته و شفاف به خود گرفته و علائم سبز تیره در آنها ایجاد می‌شود. زخم‌های قهوه‌ای تیره در ناحیه طوقه طویل شده و حالت ساق سیاه بوجود می‌آید. در صورتی که ترشحات درخشان باکتریایی در سطح ساقهٔ آلوده قابل رویت باشد ممکن است گوموز نیز دیده شود. در ساقه و شاخه‌ها زخم‌های فرورفته و نکروزه نیز به‌طول چند سانتی‌متر دیده می‌شوند که در مراحل پیشرفته ممکن است تمام گیاه به‌صورت اسکلت عریان سیاه رنگ مشاهده شود. لکه‌های آب‌سوخته و زاویه‌دار کوچک در ادامه تبدیل به لکه قهوه‌ای تیره تا سیاه شده که به رگبرگ‌ها محدود شده و حالت زاویه‌ای مشاهده می‌شوند. در صورت شدت بیماری و با ورود باکتری به درون سیستم

آوندی، رگبرگ‌ها نیز تغییر رنگ داده، قهوه‌ای و نکروزه شده و باعث گسترش آلودگی می‌شوند که در این حالت سوختگی رگ‌برگ رخ می‌دهد. در برخی از ارقام برگ‌های آلوده زرد و چروکیده شده و ریزش می‌کنند. لکه‌های آب‌سوخته سیاه و گرد روی غوزه بوجود آمده که از مرکز قهوه‌ای می- و در آلودگی‌های شدید، با گسترش آن به داخل، موجب تغییر رنگ و تخریب الیاف و بذر می‌شود و گاه به داخل بذر هم وارد شده و آلودگی داخلی ایجاد می‌شود (موهان، ۱۹۸۳). در ایران هیچ گزارشی مبنی بر وجود یا عدم وجود رورستی باکتری عامل سوختگی برگ پنبه در بذرهای مورد استفاده وجود ندارد.

روش تحقیق

در سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۳، ازبذور پنبه، ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید فاقد علائم بیماری، به‌صورت تصادفی از داخل توده کیسه‌های بذر نمونه‌برداری شد. توده‌های ۵۰ گرمی از بذور در فلاسک‌های حاوی آب مقطر سترون همراه با مقدار بسیار کمی از مواد دترجنت مانند توئین ۲۰ و قرار دادن در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت به شستشوی بهتر باکتری‌های موجود در سطح بذور کمک شد. سپس سوسپانسیون فوق در روی محیط کشت پپتون سوکروز آگار (PSA) حاوی ۰/۳۵ گرم $Ca(No_3)_2$، ۰/۳۵ گرم $FeSO_4$، ۱/۴ گرم Na_2HPo_4، ۳/۵ گرم پپتون، ۱۴ گرم سوکروز، ۱۰/۵ گرم آگار و ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با اسیدیته ۶/۸ مخطط گردید (مهتا و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین بذوردر روی محیط ذکر شده قرار گرفته و تشتک‌های فوق به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. باکتری‌های رشد کرده جداسازی، خالص‌سازی و بر اساس منابع معتبر باکتریولوژی، شناسایی شدند.

به‌منظور اثبات بیماریزایی جدایه‌های احتمالی عامل بیماری بلایت باکتریائی پنبه با مایه زنی بوته‌های پنبه در شرایط مرطوب و دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد، با گذاشتن چند قطره از سوسپانسیون باکتری با غلظت مناسب از کشت ۴۸ ساعته باکتری، روی برگ‌ها و سوزن زدن در محل سوسپانسیون و همچنین تزریق سوسپانسیون باکتری در اپیدرم برگ گیاه پنبه انجام شد. علائم بیماری بعد از گذشت دو هفته بررسی شدند (خداکرمیان و همکاران، ۱۹۹۹).

بحث و نتیجه‌گیری

به‌منظور شناسائی جدایه‌های باکتریایی، پس از جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های موجود در سطح ارقام، آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیائی انجام شد. نتایج حاصله از انجام آزمایش‌ها و بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیائی جدایه‌های باکتری در جداول یک و دو آورده شده است.

جدول ۱: خصوصیات فنوتیپی و رقم بذور پنبه بر حسب جدایه‌های باکتریایی حاصل از شستشوی بذور ارقام تجاری خرداد، بختگان، سپید، ورامین و ساحل

شماره جدایه		خصوصیات فنوتیپی جدایه	رقم پنبه
۱	*P. fluorescens*	کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱ میلی‌متر	خرداد
۲		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	خرداد
۳		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	خرداد
۴		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	خرداد
۵		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	خرداد
۶		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	بختگان
۷		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	بختگان
۸		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	بختگان
۹		کرم تا نخودی، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	ساحل
۹		شیری، گرد با حاشیه صاف و ۳-۱ میلی‌متر	ساحل
۱	*P. syringae*	شیری، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	سپید
۲		زرد، گرد با حاشیه صاف کمتر از ۱ میلی‌متر	ورامین
۳		زرد، گرد با حاشیه صاف کمتر از ۱ میلی‌متر	ورامین
۱	*Pectobacterium* sp.	کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱ میلی‌متر	بختگان

ادامه جدول ۱: خصوصیات فنوتیپی و رقم بذور پنبه بر حسب جدایه‌های باکتریایی حاصل از شستشوی بذور ارقام تجاری خرداد، بختگان، سپید، ورامین و ساحل

شماره جدایه		**خصوصیات فنوتیپی جدایه**	**رقم پنبه**
۱	*Pantoea annanas*	کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	بختگان
۲		کرم تا زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	بختگان
۳		شیری، گرد با حاشیه صاف و ۱ میلی‌متر	بختگان
۴		زرد، گرد با حاشیه صاف و ۱ میلی‌متر	سپید
۵		کرم، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	سپید
۶		کرم، گرد با حاشیه صاف و ۱-۲ میلی‌متر	سپید
۷		زرد، گرد با حاشیه صاف کمتر از ۱ میلی‌متر	سپید
۸		زرد، گرد با حاشیه صاف کمتر از ۱ میلی‌متر	ورامین
۹		کرم، گرد با حاشیه صاف و ۱ میلی‌متر	ورامین
۱۰		زرد روشن، گرد با حاشیه صاف و ۱ میلی‌متر	ورامین
۱۱		کرم تا زرد گرد با حاشیه صاف نیم تا ۱ میلی‌متر	ساحل
۱۲		شیری، گرد با حاشیه صاف و کمتراز ۱ میلی‌متر	ساحل
۱۳		شیری، گرد با حاشیه صاف و ۳-۱ میلی‌متر	ساحل

جدول ۲: خصوصیات بیوشیمیائی جدایه‌های *P. fluorescens* جدا شده از شستشوی بذور پنبه ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید

آزمون / شماره ایزوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
گرم	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
فلورسنت در محیط KB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هوازی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بی‌هوازی	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
استفاده از:										
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوکروز	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
دی-مانوز	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
دی-گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
سلوبیوز	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
آرابینوز	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
دی-فروکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
ترهالوز	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+
گوانین	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
لهانیدن سیب زمینی	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
هیدرولیز نشاسته	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
احیای نیترات	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−
هیدرولیز ژلاتین	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مالونات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ال-تارتارات	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−
اورات	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
دی-گالاکتورونات	+	+	−	+	−	−	−	−	+	+
ال- مالات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استات	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
نیکوتینات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ادامه جدول ۲: خصوصیات بیوشیمیائی جدایه‌های *P. fluorescens* جدا شده از شستشوی بذور پنبه ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید

آزمون / شماره ایزوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
ال-سیستئین	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
گلیسین	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
کازئین	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مزو-اینوزیتول	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−

جدول ۳: خصوصیات بیوشیمیائی جدایه‌های *P. syringae* جدا شده از شستشوی بذور پنبه ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید

آزمون / شماره ایزوله	۱	۲	۳
گرم	−	−	−
اکسیداز	+	−	−
فلورسنت روی محیط KB	+	+	+
هوازی	+	+	+
بی‌هوازی	−	−	−
استفاده از:			
گلوکز	+	+	+
سوکروز	−	−	−
دی-مانوز	+	+	+
دی-گالاکتوز	+	+	+
سلوبیوز	+	+	+
آرابینوز	−	−	+
دی-فروکتوز	+	+	−
ترهالوز	−	−	−
گوانین	+	+	−
ال-سیستئین	−	−	−
گلیسین	+	+	+

آزمون / شماره ایزوله	۱	۲	۳
لهانیدن سیب زمینی	−	−	−
هیدرولیز نشاسته	+	+	+
احیای نیترات	−	−	−
هیدرولیز ژلاتین	−	−	−
لیپاز	+	+	+
مالونات	+	+	+
ال-تارتارات	+	+	+
اورات	+	+	−
سیترات	+	+	+
دی-گالاکتورونات	−	+	+
لاکتات	+	−	−
استات	−	−	−
نیکوتینات	+	+	+
ال- مالات	+	+	+
مزو-اینوزیتول	+	+	+
کازئین	+	+	+

جدول ۴: خصوصیات بیوشیمیائی جدایه‌های *Pectobacterium* sp. جدا شده از شستشوی بذور پنبه ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید

آزمون	
گرم	−
اکسیداز	−
فلورسنت روی محیط KB	−
هوازی	+
بی‌هوازی	+
استفاده از:	
گلوکز	+
سوکروز	−
دی-مانوز	−

آزمون	
لهانیدن سیب زمینی	+
هیدرولیز نشاسته	+
احیای نیترات	+
هیدرولیز ژلاتین	−
لیپاز	+
مالونات	−
ال-تارتارات	−
اورات	−

دی-گالاکتوز	-	سیترات	-
سلوبیوز	+	دی-گالاکتورونات	-
آرابینوز	-	لاکتات	+
دی-فروکتوز	-	استات	-
ترهالوز	-	نیکوتینات	+
گوانین	-	ال- مالات	+
ال-سیستئین	-	مزو-اینوزیتول	-
گلیسین	+	کازئین	+

جدول ۵: خصوصیات بیوشیمیائی جدایه‌های *Pantoea annanas* جدا شده از شستشوی بذور پنبه ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید

آزمون / شماره ایزوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
گرم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اکسیداز	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
فلورسنت روی محیط KB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هوازی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بی‌هوازی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لهانیدن سیب زمینی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
احیای نیترات	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هیدرولیز ژلاتین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استفاده از:												
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوکروز	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
دی-مانوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
دی-گالاکتوز	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
سلوبیوز	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
آرابینوز	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
دی-فروکتوز	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
مزو-اینوزیتول	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
مالونات	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ال-تارتارات	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
اورات	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

ادامه جدول ۵: خصوصیات بیوشیمیائی جدایه‌های *Pantoea annanas* جدا شده از شستشوی بذور پنبه ارقام تجاری ساحل، ورامین، خرداد، بختگان و سپید

شماره ایزوله / آزمون	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
سیترات	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ترهالوز	−	+	+	−	−	−	+	−	+	+	+	+
گوانین	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
دی-گالاکتورونات	−	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+
ال- مالات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ال-سیستئین	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
لاکتات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استات	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
نیکوتینات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
کازئین	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
گلیسین	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+

نتایج حاصل از بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان داد که هیچ کدام از جدایه‌های باکتریایی در روی بوته‌های پنبه بیماریزا نبودند. براساس نتایج گونه‌های *Pseudomonas fluorescens*، *P. syringae* *Pantoea annanas* و*Pectobacterium* sp. شناسایی شدند و هیچ کدام از آنها در روی بوته‌های پنبه بیماریزا نبودند.

جدایه‌های *P. fluorescens*، در آزمون‌های اکسیداز، تولید رنگ‌دانه فلورسنت در محیط KB و رشد در محیط هوازی اجباری، مثبت ولی درآزمون‌های گرم، رشد در محیط بی‌هوازی، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز نشاسته منفی بودند (جدول ۲). جدایه‌های *P. syringae*، در آزمون‌های تولید رنگ‌دانه فلورسنت در محیط KB و رشد در محیط هوازی، مثبت ولی درآزمون‌های گرم، اکسیداز، رشد در محیط بی‌هوازی، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز نشاسته منفی بودند. این جدایه‌ها در آزمون فوق حساسیت واکنش متغیر داشتند ولی قادر به بیماری‌زایی در بوته‌های پنبه نبودند (جدول ۳).

جدایه‌های *P.annanas*، در آزمون‌های گرم، تولید رنگ‌دانه فلورسنت، اکسیداز، احیای نیترات و هیدرولیز ژلاتین منفی بوده ولی قادر به رشد در محیط‌های هوازی و بی‌هوازی بودند (جدول ۵). یک جدایه، علاوه بر خصوصیات فوق قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی بوده که به عنوان *Pectobacterium* sp. شناسائی گردید (جدول ۴).

آلودگی ناشی از باکتری *P. syringae* در فرایندی شامل: کلنیزاسیون رورستی، ورود و استقرار در فضای بین‌سلولی، تکثیر در بافت میزبان و در نهایت تولید علائم بیماری است (بوخ و همکاران، ۲۰۰۲).

باکتری *Pantoea annanas* ازروی تعداد زیادی از گیاهان از جمله، سبزیجات (بین و اورتون، ۱۹۶۹) نیشکر، جو، یولاف، گندم و چاودار(لیندو و همکاران، ۱۹۷۸)، بذور برنج، گندم، یولاف و شبدر (لیندو و همکاران، ۱۹۷۸)، پنبه (اشورث و همکران، ۱۹۷۰) و برگ و گل‌های درختان میوه (ریگل و کلوز، ۱۹۷۲) جداسازی گردید. همچنین باکتری *Pseudomonas agarici* از سلمک (رضی نتاج و تقوی،۲۰۰۰)، *Pseudomonas cichorii* از نارنج (رضی نتاج و تقوی،۲۰۰۰)، *Pseudomonas tolaasii* از بادام (رضی نتاج و تقوی،۲۰۰۰) و *Pectobacterium caratovorum* از برگ‌های نارنج و گندم و سه گونه باکتری عامل هسته یخ از سطح برگ‌های گندم، نارنج، بادام و کیسه کشیش در استان فارس (رضی نتاج و تقوی، ۲۰۰۴) به صورت رورستی جداسازی و شناسائی شدند بدون آن که اثرات بیماری‌زایی در روی گیاهانی نظیر نارنج، گندم و هسته داران داشته باشند. جمعیت‌های رورستی بالائی از جدایه‌های باکتری‌های *Pseudomonas syringae* و*Pantoea annanas* در شرایط مزرعه در روی ذرت جداسازی شدند (لیندو و همکاران، ۱۹۷۸).

در گیاهانی مانند گیلاس (فریگان و کراس، ۱۹۷۵)، گلابی (کراس، ۱۹۶۶)، هلو (داولر و ویور، ۱۹۷۵)، زیتون (لیندو و همکاران، ۱۹۷۸)، لوبیا (لیبن و همکاران، ۱۹۷۰)، سویا (لارنس و کندی، ۱۹۷۴) و یونجه، شبدر قرمز و یاس (ارکولانی و همکارن، ۱۹۷۴) باکتری*P. syringae* بدون ایجاد علائم بیماری، جدا و شناسائی شد.

وجود آب آزاد برای آلودگی بذرزادی بیماری بلایت باکتریائی پنبه لازم است ولی برای آلودگی‌های بعدی، رطوبت نسبی و دمای مناسب محیط لازم است. اگر رطوبت نسبی کمتراز ۲۵ درصد باشد برای آلودگی برگها باید آب آزاد و مقدار مایه تلقیح، زیاد باشد. شرایط محیطی که سبب پخش باکتری به مناطق دیگر و افزایش بیماری می‌شود شامل: رطوبت نسبی، وجود آب آزاد در اندام‌های گیاه، وزش باد و باران، حرارت محیط بخصوص حرارت داخل مزرعه و وجود زخم‌های روی برگ و اندام‌های گیاه ناشی از تگرگ، وزش باد، حشرات، طوفان‌های همراه با گرد و خاک، ماسه بادی و شن است (هیلوکس، ۱۹۹۲). آبیاری بارانی و مقدار زیاد آب در مزرعه که حرکت آن کند باشد، سبب افزایش میزان بیماری می‌شود. جبهه بیماری در مزرعه معمولا بصورت دایره‌ای در اطراف کانون آلودگی یا در جهت وزش باد و باران می‌باشد. در زمانیکه بذر داخل خاک در حال جوانه‌زنی است آلودگی در دمای بالاتر از ۲۸ وکمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد، خیلی کم، در دمای ۱۶-۲۰ درجه سانتی‌گراد میزان آلودگی متوسط ولی در ۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد میزان آلودگی خیلی شدید است. به عبارت دیگر در بروز آلودگی اولیه، دمای خاک و در آلودگی ثانویه، دما و شرایط محیطی سطح خاک موثرتر هستند. دمای ۳۵-۳۶

درجه سانتی‌گراد مساعدترین شرایط برای آلودگی ثانویه و بیماری‌زائی است و در حرارت بین ۲۹-۳۴ درجه سانتی‌گراد نیز بیماری‌زائی شدید است. بنابراین برای همه‌گیر شدن بیماری شرایط زیر لازم است:

۱. ایجاد آلودگی اولیه در گیاهچه
۲. بارندگی‌های زیاد اول فصل به خصوص تا شش هفته بعد از کاشت
۳. دوره‌های متعدد باد و باران که باعث شود رطوبت نسبی داخل مزرعه بالای ۸۵ درصد شود.
۴. حرارت مناسب ۱۷-۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب و ۲۸-۳۲ درجه سانتی‌گراد در روز برای آلودگی‌های ثانویه لازم است.

در بررسی‌های فوق هیچ کدام از جدایه‌ها خصوصیات باکتری عامل بیماری بلایت باکتریائی پنبه *Xanthomonas citri* sub sp. *malvacearum* را نداشته و وجود باکتری مزبور بصورت رورست روی بذور ارقام فوق در سال‌های مورد آزمایش پنبه به اثبات نرسید. از آنجا که این بیماری به‌صورت بذرزاد می‌باشد، به‌منظور پیشگیری از بروز بیماری بهترین و ساده‌ترین روش کاشت بذر سالم می‌باشد.

منابع

1. Andrews, L.H. and Harris, R.F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annu. Rev. Phytopathol. 38: 145-180.
2. Arab salmani, M., Rahimian, H., Azad, F. and Qhasemi, A. 2002. Cotton bacterial blight. 15th Iranian Plant Protec. Cong. Razi University, Kermanshah, Iran, pp. 119-122. (in Persian with English Abstract)
3. Arabsalmani, M., Rahimian, H., Azad, F., and Qhasemi, A. 2002 Occurrence of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in Khorasan province. In 'Proceeding of the 15th Iranian Plant Protec. Cong.' p: 68. (in Persian with English Abstract)
4. Ashworth, L.J., Hildebrand, D.C., and Schroth, M.N. 1970. Erwinia-induced internal necrosis of immaturecotto n boils. Phytopathology 60:602-607.
5. Bean, P.G., and Everton, J.R. 1969. Observations on the taxonomy of chromogenic bacteria isolated fromcannery environments. J. Appl. Bacteriol. 32:51-59.
6. Behdad, E. 1996. Iran Phytomedicine Encyclopedia, Plant Pests and Siseases, Weeds. Esfahan, Yadbood Press, 3337 pp. (in Persian with English Abstract)
7. Boch, J., Joardar, V., Gao, L., Robertson, T. L., Lim, M. and Kunkel, B. N. 2002. Identification of *Pseudomonas syringae* genes that areinduced during infection of *Arabidopsis thaliana*. Mol Microbiol 44:73–88.

8. Brencic, A., and Winans, S.C. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interaction by plant-associated bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69:155-194.
9. Crosse, J.E. 1966. Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. Ann. Rev. Phytopathol. 4:291-310.
10. Dowler, W.M., and Weaver, D.J. 1975. Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads from apparently healthy peach trees. Phytopathology 65:233-236.
11. Ercolani, G.L., Hagedorn, D.J., Kelman, A., and Rand, R.E. 1974. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. Phytopathology 64:1330-1339.
12. Freigoun, S.O., and Crosse, J.E. 1975. Host relations and distribution of a physiological and pathological variant of *Pseudomonas mors-prunorum*. Ann. Appl. Biol. 81: 317-330.
13. Hilocks, R.J. 1992. Cotton Diseases. C.A.B. International. 415 pp.
14. Hirano, S.S., and Upper, C.D. 1983. Ecology and Epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 21: 243-69.
15. Hunter, L.A., and Brinkerhoff, L.A. 1963. Internally infected seed as a source of inoculums for primary cycle of bacterial blight of cotton. Phytopathology 53: 1397–1410.
16. Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. and Défago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Mol Plant-Microbe Interact. 5: 4–13.
17. Khodakaramian, G. Rahimian, H., Mohammadi, M. and Allameh, A. 1999. Phenotypic characteristics, host range and distribution of *Xanthomonas axonopodis*. Causal agent of citrus canker in north of Iran. Iran. J. Plant Pathol. 35: 102-112. (in Persian with English Abstract)
18. Laurence, J.A., and Kennedy, B.W. 1974. Population changes of *Pseudomonas glycinea* on germinating soybean seeds. Phytopathology 64:1470-1471.
19. Leben, C., Schroth, M.N. and Hildebrand, D.C. 1970. Colonization and movement of *Pseudomonas syringae* on healthy bean seedlings. Phytopathology 60: 677-680.
20. Lindow, S.E., Arny, D.C. and Upper, C.D. 1978. Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature. App. Environ. Microb. 36: 831-838.
21. Mehta, Y.R., Bomfeti, C., and Bolognini, V. 2005. A semi-selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infarcted cotton seed. Fitopatol. Bras. 30:5.
22. Mercier, J., and Lindow, S.E. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. Appl. Environ. Microbiol. 66:369-374.

23. Mohan, S.K. 1983. Seed transmission and epidemiology of *Xanthamonas campestris* pv. *malvacearum*. Seed Sci. and Technol. 11:569-571.
24. Razaghi, A., Hasanzadeh, N., and Ghasemi, A. 2012. Characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* strains in Iran. Afric. J. Microbiol. Res. 6:1165-1170
25. Razinataj, M., and Taghavi, S.M. 2000. The isolation and identification of *Pseudomonas agarici* from *Chenopodium album* in Fars province. Iran. J. Plant Pathol. 36: 110. (in Persian with English Abstract)
26. Razinataj, M., and Taghavi, S.M. 2000. The isolation and identification of *Pseudomonas agarici* from *Chenopodium album* in Fars province. Iran. J. Plant Pathol. 36: 110. (in Persian with English Abstract)
27. Razinataj, M., and Taghavi, S.M. 2000. The isolation and identification of *Pseudomonas cichorii* from sour orange in Shiraz. Iran. J. Plant Pathol. 36: 111. (in Persian with English Abstract)
28. Razinataj, M. and Taghavi, S.M. 2004. The isolation and identification of a soft rot bacterium on wheat and sour orange leaves. 16 th Iran. Plant Protec. Cong. Tabriz University, Tabriz, Iran, p. 517. (in Persian with English Abstract)
29. Razinataj, M. and Taghavi, S.M. 2004. The isolation and identification of three species bacterium as ice nucleation on sour orange, wheat, almond and shepherds purs. 16 th Iran. Plant Protec. Cong. Tabriz University, Tabriz, Iran, p. 518. (in Persian with English Abstract)
30. Riggle, J. H., and Klos, E.J. 1972. Relationship of *Erwinia herbicola* to *Erwinia amylovora*. Can. J. Bot. 50: 1077-1083.
31. Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3nd edition. Aps Press. St. Minnesots, USA. 373pp.
32. Srinivasan, K.V. 1994. Cotton Diseases. CIRCOT Press. 314 pp.
33. Tukey, H.B. 1970. Leaching of substances from plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 21:305-324.