فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹۲
صص ۷۲-۶۳

بررسی عکس العمل ارقام تجاری پنبه نسبت به بیماری بلایت باکتریائی با عامل *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*

فروغ گنجعلی*[۱]، نادرحسن زاده[۲]، مرتضی عرب سلمانی[۳]، سعیدرضایی[٤]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۳

چکیده

بلایت باکتریایی پنبه با عامل باکتریائی *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* (ex. *X. axonopodis* pv. *malvacearum*) از بیماریهای مهم قرنطینه ای درکشور محسوب می شود. درخصوص ارزیابی واکنش ارقام مختلف پنبه نسبت به این بیماری در شرایط گلخانه‌ای گزارش رسمی در دست نیست. برای این منظور از سه مرحله کوتیلدونی، گلدهی وغوزه دهی گیاه برای انجام این پژوهش استفاده شد. در بررسی اثر مایه زنی روی غوزه‌ها در شرایط آزمایشگاه (درون شیشه‌ای) از طرح کاملا تصادفی در٤ تکرار و در بررسی اثر مایه زنی بر روی گیاهچه‌ها، غوزه‌ها و برگ‌ها در گلخانه از شش تکرار استفاده شد. زادمایه از مخلوط ۵ جدایه در غلظت $۱۰^{٦}$ سلول در میلی‌لیتر تهیه شد. جهت ارزیابی حساسیت برگ‌ها از سیستم هانتر و ارزیابی حساسیت غوزه‌ها به روش هیلاکس انجام شد. جهت آزمایش در مرحله گلدهی، برگ‌ها سه روز متوالی با سوسپانسیون باکتری محلول پاشی شدند. جهت تلقیح غوزه‌ها نیز از غوزه‌هایی که در سن سه هفتگی بودند استفاده شد. غوزه‌ها با سوزن استریل در دو ناحیه زخم و با پنبه آغشته به سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. برای هر یک از مراحل تلقیح روی پنبه یک شاهد در نظر گرفته شد. از آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد از بین ۸ رقم مورد مطالعه حساس‌ترین آنها، رقم بومی (از گونه *Gossypium herbaceum*) و سه رقم سای اکرا، سیندوز و بختگان جزو مقاوم‌ترین ارقام بودند. نتایج مرحله غوزه‌دهی همسو با نتایج مرحله گلدهی بود. در هر دو آزمایش مقایسه میانگین داده-ها نیز نشان داد اختلاف معنی‌داری بین همه ارقام جز سه رقم بختگان، سای اکرا و سیندوز وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: واکنش ارقام، پنبه، *Xanthomonas malvacearum*

[۱] – دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۲]– دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۳]– استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، تهران، ایران.

[٤]– استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*– نویسنده مسئول مقاله: f_ganjali@yahoo.com

مقدمه

در کشور ما عوامل بیماری‌زای گوناگونی با مقدار خسارت متفاوت به محصول پنبه زیان وارد می‌نمایند. بر اساس داده‌های ارائه شده در پانزدهمین گردهمائی مسئولین اجرائی، تحقیقاتی وکارشناسان پنبه کشور در سال ۱۳۸۳ بیماری‌های مرگ گیاهچه و پژمردگی ورتیسیلیومی از عمده بیماری‌های خسارت زا بر روی محصول پنبه می‌باشند (Khozeini *et al*., 2007). از دیگر بیماری‌های مهم و قرنطینه‌ای بلایت باکتریائی پنبه است که ابتدا از مناطق یزد و میبد (Amani, 1972) گزارش و سپس از دیگر مناطق کشور به‌گونه مشخص مانه و سملقان در استان خراسان، استان‌های گلستان و سمنان (شهرستان گرمسار) مشاهده وگزارش گردید (Arabsalmani *et al*., 2002)، که به دلیل آزادی واردات و صادرات پنبه محلوج و پنبه دانه این مسئله دور از انتظار نبوده است (Khozeini *et al*., 2007).

اولین علائم بیماری به‌صورت لکه‌های گرد یا کشیده بر روی کوتیلدون‌ها (برگ‌های اولیه) ظاهر می‌شود که این لکه‌ها در ابتدا سبز تیره و آبسوخته بوده و سپس نکروز شده و به رنگ قهوه‌ای در می‌آید. با افزایش سن گیاه، لکه‌های مشابه روی ساقه ظاهر می‌شود. با گسترش لکه‌ها دور تا دور ساقه، شکستگی ساقه و مرگ اندام‌های هوائی روی می‌دهد. بر روی برگ‌ها علائم به صورت لکه‌های زاویه دار با حاشیه قرمز تا قهوه‌ای مشاهده می‌شود. علائم روی غوزه‌ها به‌صورت نقاط گرد و آب گزیده مشاهده می‌شود که به تدریج قهوه‌ای متمایل به سیاه شده و قطر آنها افزایش می‌یابد. از آنجا که بوته پنبه به عنوان یک موجود زنده همواره از سوی بسیاری از عوامل بیماری زا از جمله بیماری باکتریائی بلایت پنبه (ساق سیاه) تهدید می‌شود، لذا شناخت این عوامل و راه‌های جلوگیری و یا کاهش خسارات آنها می‌تواند پشتوانه محکم و قوی در جهت حفظ و ثبات تولید و استمرار افزایش تولید این محصول مهم باشد (Khozeini *et al*., 2007).

مطالعات رزاقی و همکاران (Razaghi *et al*., 2012)، بر روی صفات فنوتیپی و ژنتیکی از جمله آنالیزهای مربوط به پلاسمید، پروتیئن سلولی و rep-PCR تعداد ۲۵ استرین باکتری نشان داد که ایزوله‌های گلستان و کلکسیون سازمان حفظ نباتات دارای یک منشا واحد هستند که خود این در صورت احراز می‌تواند کمک موثر در شناسائی و ارزیابی ارقام مقاوم باشد. هدف از این پژوهش شناخت بیش‌تر بیماری، بررسی واکنش ارقام محلی و تجاری به عامل بیماری و شناسائی ارقام مقاوم است. برای این منظور مقدار مقاومت ۸ رقم تجاری طی سه مرحله آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

تهیه و کاشت ارقام:

هشت رقم پنبه شامل ارقام ساحل، بومی، دکتر عمومی، سای اکرا، سیندوز، بختگان، مهر و ورامین از مرکزتحقیقات پنبه کشور (ورامین) تهیه و بذر این ارقام قبل از کاشت به مدت ۱۰ دقیقه با قارچکش کاربندازیم دو در هزار ضد عفونی شدند. خاک موجود در گلخانه از خاک بایر منطقه‌ای در شمال غرب ورامین تهیه و جهت تعیین نوع و مقدار مواد آلی و هم‌چنین وجود یا عدم وجود عوامل بیماریزا به آزمایشگاه خاکشناسی ارسال شد. خاک‌های مذکور در گلدان‌های یکبار مصرف با قطر دهانه ۱۰ و ارتفاع ۲۵ سانتیمتر در سه چهارم حجم گلدان ریخته شدند و در هر گلدان ۵ عدد بذر قرار گرفت و پس از رشد دو بوته نگه‌داشته شدند. فاصله گلدان‌ها از یکدیگر۲۰ سانتیمتر و فاصله ردیف‌ها به جهت حفظ رطوبت در گلخانه ۳۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. تمامی این آزمایش‌ها در شرایط گلخانه و در قالب طرح‌های کاملا تصادفی در٦ تکراربا یک تیمار مشخص اجرا گردید. برای مایه زنی در مرحله کوتیلدونی بذور مورد استفاده به تعداد ٤ عدد بود که در٤ تکرار در داخل لیوان‌های یکبار مصرف تیمار شدند.

مایه زنی اندام‌های گوناگون ارقام:

از کشت‌های ٤٨ساعته ٥ جدایه باکتری (با شماره کدهای ٦،١١،١٤،٢٣،١٨) سوسپانسیون مخلوط باغلظت تقریبی 10^6سلول در میلی لیتر تهیه گردید. باکتری‌های فوق از مزارع پنبه گرگان جداسازی و بر مبنای صفات بیوشیمیائی شناسائی اولیه شده بودند (Schaad *et al*., 2001). تمامی استرین‌ها دارای کلنی‌های زرد لعابی روی محیط کشت YDC، گرم منفی، با رشد هوازی و رنگدانه زانتومونادین، دارای واکنش مثبت به هیدرولیز توئین واسکولین، واکنش بازی شیرلیتموس، فعالیت کاتالاز، تولید گاز H_2S و دارای واکنش منفی به آزمون اکسیداز، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، فعالیت اوره‌آز، احیاء نیترات به نیتریت، ایندول و حساسیت به ماده TTC بودند. تولید اسید از مواد کربنی چون فروکتوز، آرابینوز، مانوز و ساکاروز مثبت بود. مراحل مایه زنی شامل سه مرحله کوتیلدونی، مرحله گلدهی و مرحله غوزه دهی بود. مایه زنی به‌صورت پاشش سوسپانسیون روی برگ‌ها در مرحله کوتیلدونی و گلدهی به جهت باز بودن روزنه‌ها در هنگام صبح انجام شد (Kangatharalingman *et al*., 2003). متوسط دما و رطوبت در گلخانه به ترتیب ٣٨°C و ٥٨٪ در روز و ٣١°C و ٦٥٪ در شب بود (Kwangyi, 1981). عمل پاشش سطح برگ‌ها در دو روز متوالی ادامه داشت. جهت مایه زنی غوزه‌ها از غوزه‌هایی با سن ٣ هفته استفاده شد. غوزه‌ها با سوزن‌های استریل در دو ناحیه زخم و با پنبه آغشته به سوسپانسیون باکتری مایه زنی شدند. برای هر یک از مراحل مایه زنی چند شاهد (بدون مایه زنی) در نظر گرفته شد (Hillocks, 1988). برای مایه زنی غوزه‌ها از طرح کاملاً تصادفی در ٦ تکرار استفاده شد.

مایه زنی غوزه‌های پنبه در شرایط آزمایشگاهی:

در این روش غوزه‌های ٨ رقم مذکور جداگانه جمع آوری، از هر رقم یک غوزه و پس از ضدعفونی با الکل در ظرف-های پلاستیکی قرار داده شدند. سطح غوزه‌ها سپس با سوزن‌های استریل در دو ناحیه زخم شده و محل زخم‌ها با پنبه آغشته به سوسپانسیون باکتری مایه زنی شدند. جهت حفظ رطوبت محیط از ظرف بزرگ حاوی آب استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در٤ تکرار و ١ تیمار انجام شد.

نتایج

نتایج تیمار برگ‌های کوتیلدونی:

تمامی برگ‌های کوتیلدونی ٥-١٠ روزه به‌گونه مرتب بعد از مرحله مایه زنی مورد بازبینی و بررسی قرار گرفتند و هیچ-یک از ارقام مورد بررسی پنبه در این مرحله رشد علائم خاصی را نشان ندادند.

نتایج تیمار برگ‌های پنبه:

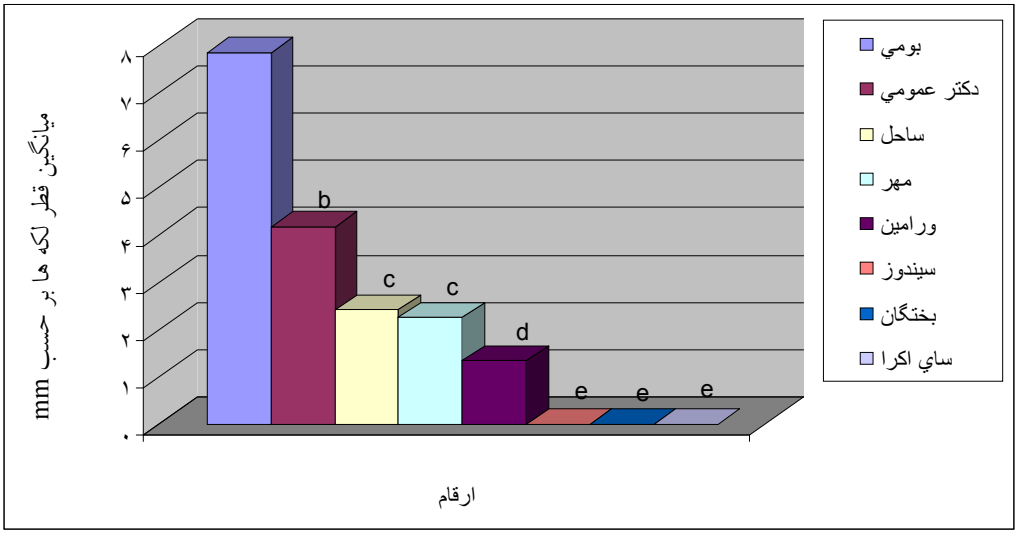
یک تا دو هفته بعد از مایه زنی، بر روی برگ‌های تیمار شده با مخلوط استرین‌های باکتری علائم بیماری به‌صورت نقاط آب سوخته مشاهده شد که بتدریج این نقاط به رنگ سیاه در آمده و در ابعاد بزرگتر قابل رویت بودند. بسته به نوع مقاومت یا حساسیت رقم لکه‌ها در حد نقاط آب سوخته تا لکه‌های زاویه‌دار امتداد یافته در طول رگبرگ اصلی مشاهده شدند. در ارقام بسیار مقاوم هیچ‌گونه علائمی دیده نشد. گیاهانی که به عنوان شاهد با آب مقطر مایه زنی شده بودند فاقد علائم بیماری بودند. به‌منظور ارزیابی درجه حساسیت و مقاومت ارقام مورد بررسی از مقیاس هانتر(Hunter, 1986) استفاده شد. در این مقیاس ارقام به چهار درجه ١، ٢، ٣ و ٤ تقسیم می‌شوند که درجات ١و ٢ شامل ارقام مقاوم و درجات ٣ و ٤ شامل ارقام حساس می‌باشند. به سبب تنوع واکنش در ارقام مورد بررسی، علائم در این درجه بندی به درجات٣ و٤ ارقام نیمه حساس و درجات ٥ و ٦ به ارقام حساس نسبت داده شدند.

با توجه به مراتب فوق نظر به اینکه ارقام سیندوز، سای اکرا و بختگان فاقد علائم بیماری بودنـد در زمـره ارقـام مقـاوم درجه ۱ و ۲ بشمار رفتند. سه رقم ورامین، ساحل و مهر نیز با توجه به علائم مشاهده شده به عنوان ارقام نیمه مقاوم درجـه ۳ و٤ دسته بندی شدند. ارقام بومی و دکتر عمومی با توجه به شدت علائم در زمره ارقام حساس با درجه حساسیت ۵ و ٦ قـرار گرفتند

نتایج تیمارغوزه‌ها در شرایط گلخانه:

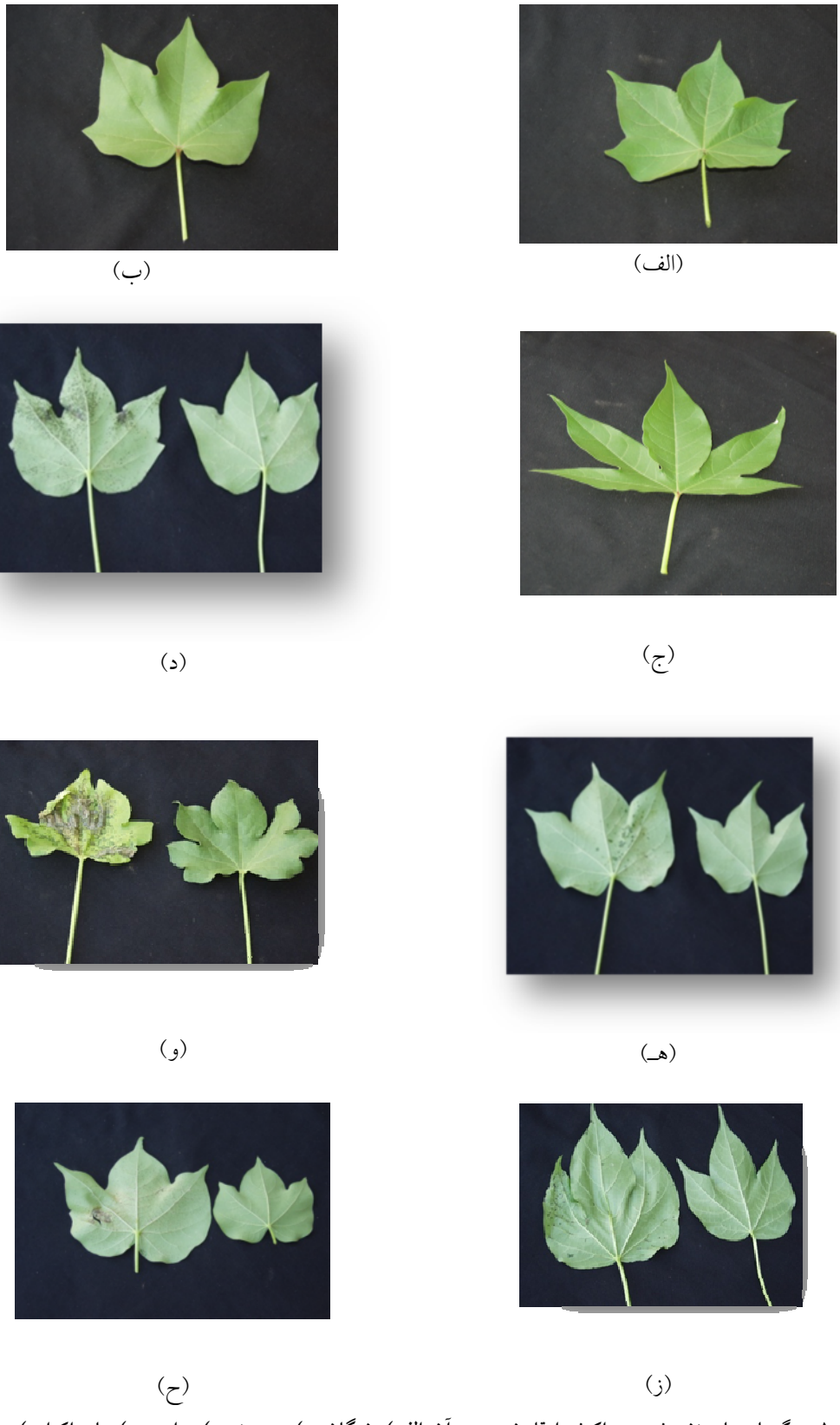
یک تا دو هفته پس از مایه زنی غوزه‌ها با توجه به درجه مقاومت یا حساسیت ارقام، لکه‌های آبسوخته‌ای بر روی غوزه-ها ظاهر شد که قطر لکه‌ها در ارقام حساس سریعا رو به افزایش گذاشت. در ارقام نیمه حساس قطر لکـه‌هـا ثابـت مانـد و در ارقام مقاوم آبسوختگی در محل مایه زنی مشاهده نشد. برای ارزیابی حساسیت یـا مقاومـت از مقیـاس دیگـر (Hillocks and Chinodyia, 1988) استفاده شد.

این مقیاس ارقام را به سه دسته حساس، نیمه حساس و مقاوم تقسیم می‌کند. مطابق شکل ۲ و نمودار ۱ میانگین قطر لکه‌ها در تیمارهای مورد بررسی بر روی ۸ رقم پنبه به جز بختگان، سیندوز و سایوکرا در سطح ۱ ٪ دارای اختلاف معنی‌داری بودند.



نمودار۱- میانگین قطر لکه‌های غوزه پنبه آلوده شده با باکتری عامل بیماری در شرایط گلخانه.

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ ٪ بودند.



(الف) (ب)

(ج) (د)

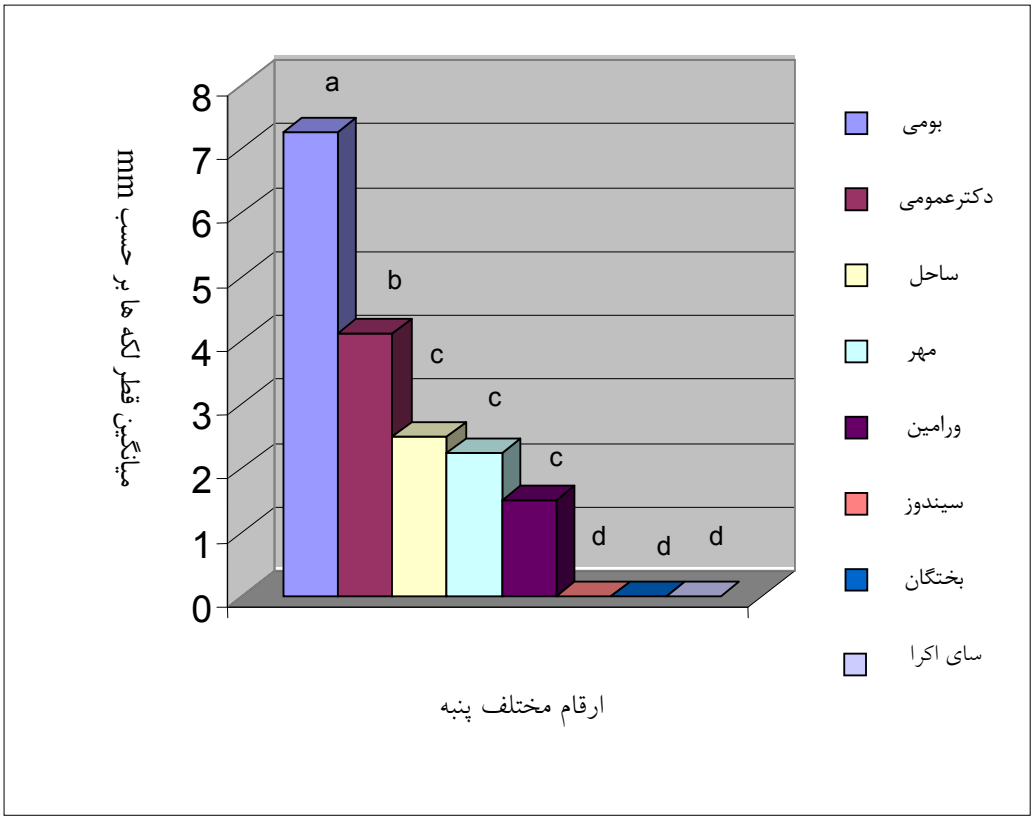
(هـ) (و)

(ز) (ح)

شکل ۱- برگ‌های مایه زنی شده و واکنش ارقام نسبت به آن: الف) بختگان ب) سیندوز، ج) ورامین، د) سای اکرا، ه) مهر، و) ساحل، ز) دکترعمومی و ح) بومی.

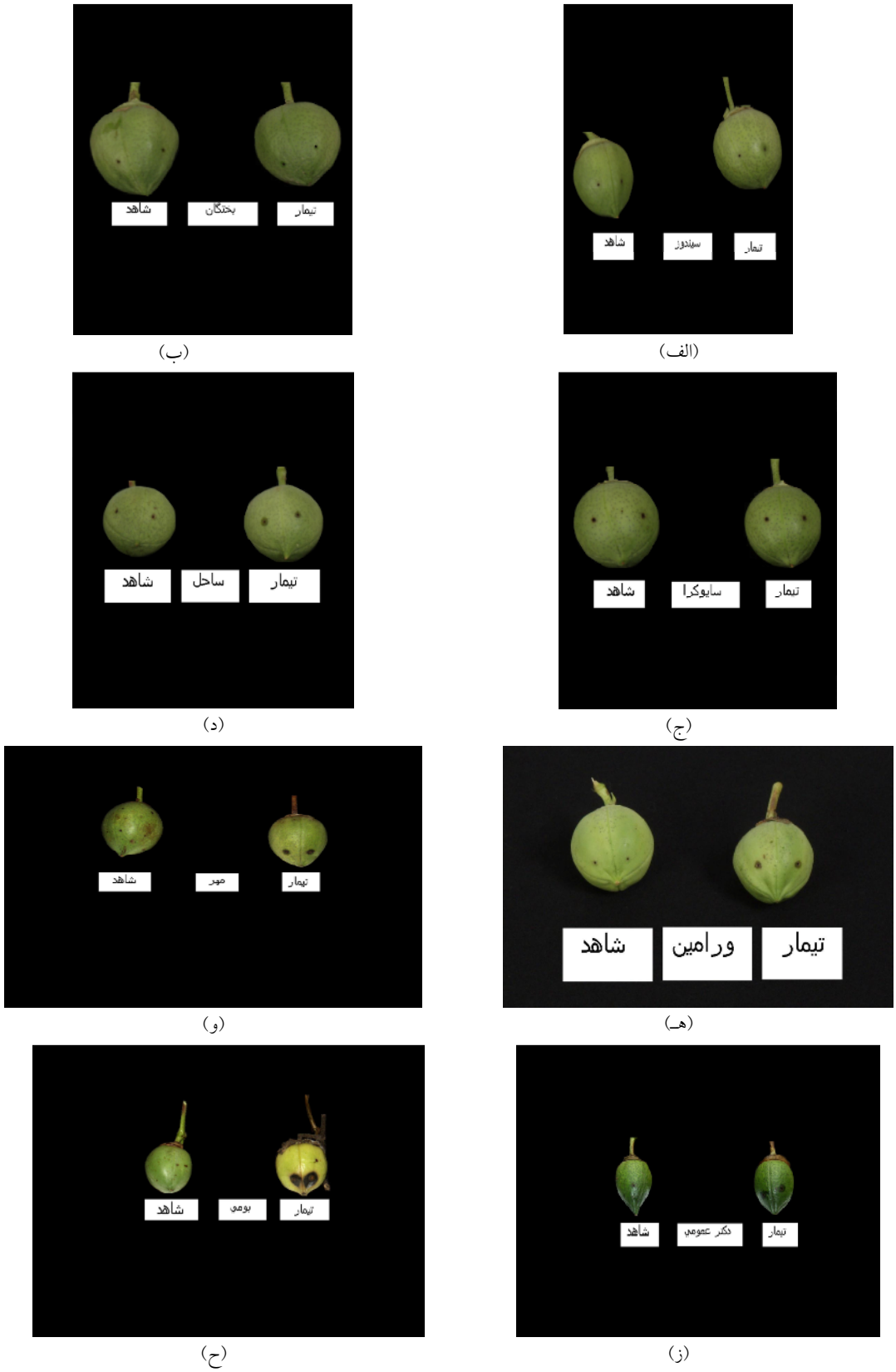
نتایج مربوط به تیمار غوزه‌ها در شرایط آزمایشگاه (*in vitro*):

نتایج این آزمایش که در ٤ تکرار انجام شد نشان داد سه رقم سیندوز، سای اکرا و بختگان بـدلیل فقـدان علائـم آشـکار بیماری جزو ارقام مقاوم می‌باشند. سه رقم ورامین، مهر و ساحل با توجه به علائم مشاهده شده جزو ارقام نیمه مقـاوم بشـمار رفتند و دو رقم دکتر عمومی و بومی نیز با توجه به شدت علائم جزو ارقام حساس قـرار گرفتنـد. نتـایج آزمـایش در هـر دو شرایط آزمایشگاه و گلخانه یکسان بود.



نمودار۲- میانگین قطر لکه‌ها غوزه پنبه آلوده به باکتری عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه

مقایسه میانگین ارقام نشان داد در همه ارقام به جز بختگان، سیندوزو سای اکرا اختلاف در سطح ٪۱ معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۲- غوزه‌های مایه زنی شده و واکنش آن نسبت به عامل بیماری. الف) بختگان، ب) سیندوز، ج) ورامین، د) سای اکرا، ه) مهر، و) ساحل، ز) دکترعمومی و ح) رقم بومی.

بحث

در ارزیابی ارقام گوناگون پنبه نسبت به بیماری بلایت در شرایط گلخانه و بر روی برگ‌های کوتیلدونی هیچ یک از ارقام به عامل بیماری حساسیت نشان ندادند. به نظر می‌رسد ارزیابی واکنش ارقام در این مرحله از رشد گیاه به پژوهش و زمان بیش‌تری نیاز دارد.

در بررسی درجه مقاومت و حساسیت ارقام در مرحله غوزه‌دهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه و به‌صورت مقایسه میانگین نشان داد که در همه ارقام به جز سیندوز، بختگان و سای اکرا اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بر این اساس سه رقم مذکور با داشتن درجه مقاومت ۱و۲ مقاوم‌ترین ارقام و ارقام دکتر عمومی و بومی با دارا بودن درجه حساسیت ۵ و٦ جزو ارقام حساس و ارقام ساحل، مهر و ورامین با درجه ۳ و٤ جزو ارقام نیمه حساس تقسیم بندی می‌شوند.

به‌گونه کلی با بررسی و مقایسه حساسیت ارقام پنبه در مرحله غوزه‌دهی و تلقیح برگ‌ها در زمان گل‌دهی اختلاف چندانی بین این دو مرحله رشدی دیده نشد. "با توجه به حساس بودن پنبه رقم بومی به عامل بیماری، محدودیت کاشت این رقم در مناطقی که ارقام تجاری نیز کشت می‌شود می‌تواند مقدار مصونیت ارقام تجاری حساس و نیمه حساس را افزایش دهد.

ارقام سیندوز، سای اکرا و بختگان که در ردیف مقاوم‌ترین ارقام بودند می‌توانند در صورت داشتن سایر فاکتورهای مناسب به عنوان جایگزین، با ارقام حساس و نیمه حساس معرفی گردند. ایجاد هیبریدهای جدید با استفاده از صفت مقاومت ارقام سیندوز، سای اکرا و بختگان با فاکتورهای مناسب دیگری که در ارقام تجاری حساس و نیمه حساس هستند می‌تواند به تولید پایدار پنبه کمک کند.

References:

1. Akello B and Hillocks R J. 2002. Distribution and races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* on cotton in Uganda. Journal of Phytopathology 150: 65–69.
2. Amani, B. 1972. Black stem disease of cotton. Iranian Journal Plant Disease 8: 112–121.
3. Anonymous. 1991. Bacterial blight in susceptible varieties. Australian Cotton Cooperative Research Centre. ACCRC. 27.
4. Anonymous. 2006. Report of general cotton situation in Iran. Tehran: Iran cotton Research Institute. 33 p.
5. Arabsalmani M, Rahimian H, Azad F and Ghasemi A. 2002. Cotton bacterial blight. Paper presented at: 15th Iranian Congress of Plant Protection; 7–11 September; Kermanshah, Iran.
6. Essenberg M, Cason ET, Hamilton LA, Brinkhoff Gholson RK and Richardson RE. 1979. Single cell colonies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in susceptible and immune cotton leaves. Physiological Plant Pathology 15: 53–68.
7. Hillocks RJ. 1992. Cotton disease. Wallingford, UK: CAB International. 415 p.
8. Hillocks RJ and Chinodya R. 1986. Current status of breeding cotton for resistance to bacteria blight in Zimbabwe. Tropical Pest Management 34: 303–308.
9. Hunter LA and Brinkerhoff LA. 1963. Internally infected seed as a source of inoculums for primary cycle of bacterial blight of cotton. Phytopathology 53: 1397–1410.
10. Hoseyninejad Z. 2000. Introduced of cotton varieties in Iran. Tehran: Iran cotton Research Institute Publishing. 54 p.
11. Kangatharalingam N, Pierce ML and Essenberg N. 2003. A technique for precise inoculation of the internal phyllosphere of cotton with *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. Journal of Phytopathology 93: 1204–1208.
12. Khozeini F, Ezadi H and Adeli S. 2007. The cotton quarantine blight disease. Technical leaflet No. 4, pp. 1–6, Internal quarantine group, Plant Protection Organization, Iran.
13. Nemati N. 1971. Decennial survey of cotton collection in Iran. Tehran: Iran Cotton Research Institute Publishing.70 p.
14. Razaghi A, Hasanzadeh N and Ghasemi A. 2012. Characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *Malvacearum* strains in Iran. African Journal of Microbiology Research 6: 1165–1170.
15. Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd ed. St. Paul, USA: APS Press. 373 p.
16. Tyagi AP and Olngtie PAS. 1988. Screening for resistance to bacterial blight in upland cotton. Plant Breeding Journal 10: 101–164.
17. Yi CK. 1981. β-N-Acetylglocosaminidase hydrolysis of lipopolysaccharide from *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in the cotton plant. Oklahama Academi of Science 61: 36–40.