جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 4, Winter 2011, p. 368-376

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، ص ۳۷۶-۳۶۸

بررسی امکان بیوکنترل باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri* عامل بیماری شانکر مرکبات با استفاده از باکتری های اپی فیت آنتاگونیست، در شرایط آزمایشگاه

محمد کاظم منتخبی[۱*] - حشمت الله رحیمیان[۲] - ماهرخ فلاحتی رستگار[۳] - بهروز جعفر پور[۴]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۳
تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات با عامل *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* یکی از بیماریهای مهم مرکبات در دنیا می باشد. این بیماری بیش از یک دهه است که در منطقه جنوب کشور استقرار یافته و در حال گسترش می باشد. در این تحقیق پتانسیل باکتری های اپی فیت سطح برگ مرکبات به عنوان یکی از عوامل بیوکنترل بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. در سالهای ۱۳۸۰و ۱۳۸۱ تعداد ۴۵۳ جدایه از برگهای مرکبات جمع آوری شده از مناطق مختلف هرمزگان، جیرفت و مازندران خالص سازی شدند. سپس اثر بازدارندگی از رشد جدایه های مذکور روی باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در روی محیط کشت (YNA) مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تعداد ۲۶ جدایه توانستند از رشد باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* جلوگیری کنند. جدایه هایی که فعالیت آنتاگونیستی داشتند از نظر خصوصیات فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج آزمونهای واکنش گرم، تولید رنگ فلورسنت، واکنش اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین و چربی (توئین ۸۰)، تولید لوان و استفاده از منابع کربنی در پنج گروه مجزا قرار گرفتند. چهار گروه از آنها گرم منفی بوده و طبق نتایج بدست آمده و خصوصیات ذکر شده در منابع این گروه ها با باکتری های *Pseudomonas fluorescens* I، *P.fluorescens* V، *P.viridiflava* و *P.syringae* مشابهت داشتند. یک گروه از باکتری ها گرم مثبت و هوازی بوده و تولید اندوسپور نمودند که بر اساس خصوصیات فنوتیپی در جنس *Bacillus* قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: شانکر باکتریایی مرکبات، *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*، مبارزه بیولوژیک، باکتری های اپی فیت، آنتاگونیست

مقدمه

سطح زیر کشت مرکبات در دنیا حدود ۱/۶ میلیون هکتار می‌باشد و میزان متوسط محصول مرکبات در جهان بالغ بر ۶۷۹۶۷۹۰۰ تن است (۳و۱۰). سطح زیر کشت مرکبات کل کشور حدود ۲۶۸ هزار هکتار برآورد شده است که ۸۷/۰۷ درصد سطح درختان بارور مرکبات و۱۲/۹۳ درصد این سطح، نهال بوده و میزان تولید مرکبات کشور حدود ۴/۲۷ میلیون تن می‌باشد (۱).

بیماری شانکر مرکبات در سال ۱۸۹۹ برای اولین بار در ژاپن بر روی برگهای واشنگتن ناول مشاهده گردید ولی نامی برای آن مشخص نشد (۹). در سال ۱۹۱۴ برگر و همکاران شانکر را به‌عنوان یک بیماری جدید معرفی کردند (۱۵).

اولین بار هس این بیماری را توصیف و عامل آن را *pseudomonas citri* نامگذاری کرد (۲۵). نام عامل این بیماری *Xanthomonas axonopodis* Sturt and Garces emend Vauterin *et al.* 1995 می‌باشد که دارای ۳ پاتوار و مشتمل بر ۵ تیپ می‌باشد.

1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* CHasse Dye [syn. *X. compestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]
که شامل پاتوتیپ A یا تیپ آسیایی عامل بیماری است.
2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (syn.*X. c.* pv.*aurantifolii*)
که شامل پاتوتیپهای B ، C و D می‌باشد.
3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citromelo* (Vauterin et al., 1995)
که شامل پاتوتیپ E یا شانکر فلوریدایی عامل بیماری است (۲۶).

اخیراً نامگذاری جدیدی به صورت زیر بر اساس مشخصات مولکولی برای این پاتوژن پیشنهاد شده است (۲۳).

1.*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*
2.*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*

۱-موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی
(*- نویسنده مسئول: Email: montakhabii@yahoo.com)
۲ - استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران
۳و۴- استادان گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

3. *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelo*

بیماری باکتریائی شانکر مرکبات اولین بار در ایران بر روی لیمو مکزیکی از منطقهٔ کهنوج استان کرمان بوسیله علیزاده و رحیمیان (۷) گزارش شد. وقوع فرم آسیایی شانکر برای اولین بار در ایران توسط مستوفی‌زاده و رحیمیان (۴) گزارش گردید. مستوفی‌زاده قلمفرسا (۵) استرین‌های مختلف شانکر مرکبات در جنوب را بر اساس دامنهٔ میزبانی و خصوصیات فنوتیپی در سه گروه مختلف قرار داد. رحیمیان و همکاران (۲۰) گسترش شانکر را در استان‌های جنوبی بررسی نموده و گزارش کرده‌اند این بیماری در اکثر باغات استان هرمزگان، کهنوج و تعدادی از باغات جیرفت و سیستان و بلوچستان وجود دارد و درختان لیموترش به پاتوتیپهای موجود حساسیت بالایی داشته ولی ارقام پرتقال، نارنگی و نارنج حساسیت کمتری دارند.

علائم این بیماری شامل زخم های برآمده و نکروتیک مشخص بر روی برگها، ساقه و میوه می‌باشد. شدت بیماری باعث ریزش برگها، بد شکلی میوه‌ها، ریزش پیش از موقع میوه، خشکیدگی سر شاخه‌ها و ضعف عمومی درخت می‌شود. البته این بیماری سیستمیک نمی‌باشد و فقط باعث زخمهای موضعی می‌گردد (۱۴،۱۵،۲۳ و ۲۴).

با توجه به اهمیت استفاده از استراژدی مبارزه بیولوژیک به عنوان یکی از روش های کنترل عوامل بیماریزا، در این تحقیق، باکتری های اپی فیت و آنتاگونیست از باغات مرکبات مناطق شمالی و جنوبی کشور جدا سازی شده و توانایی آنتاگونیستی آنها جهت استفاده در بیوکنترل بیماری شانکر مرکبات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی

در اوایل مهر ماه و اواخر آذر ماه سال ۱۳۸۰ از برگ های مرکبات مناطق جنوب کشور شامل اطراف بندرعباس، میناب، توکهور، چراغ‌آباد، سرزه و شمیل استان هرمزگان و اطراف جیرفت، علی‌آباد، خیرآباد، کهنوج، منوجان، بارگاه، رضاآباد و بهارآباد استان کرمان نمونه برداری به عمل آمد. مرحله دوم نمونه برداری در آبان ماه ۱۳۸۰، خرداد و مرداد ماه ۱۳۸۱ از برگ های مرکبات مناطق شمالی کشور شامل باغات اطراف ساری، دامیر، سنگریزه، فیروز کنده، جویبار، چفت، اطراف قائم شهر، سنگ تاب، کلار پشت، صفرآباد و کیاکلا صورت گرفت. نمونه ها درون پاکت های کاغذی قرار داده شده و به آزمایشگاه حمل گردید و در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد.

جداسازی باکتری از برگهای مرکبات به روش ساکتی ول و میو (۲۱) با تغییری جزیی انجام شد. از هر نمونه به شکل تصادفی چهار گرم برگ جدا کرده، پس از خرد کردن در ۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی یک قطره توئین ۲۰(Tween 20) به مدت نیم ساعت با شیکر دورانی تکان داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون بدست آمده روی محیط کشت YNA (Yeast extract Nutrient Agar) پخش شد. برای هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد. تشتک های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری شدند. با توجه به رنگ، اندازه، شکل ظاهری و جمعیت، تک کلنی‌هایی انتخاب و خالص شدند.

خالص سازی و نگهداری جدایه ها

برای اطمینان از خلوص باکتری های جدا شده، هر تک کلنی روی محیط کشت NAS (Nutrient Agar Sucros) مخطط گردید. سپس از هر تشتک پتری یک کلنی برداشته و به صورت نقطه ای روی محیط NAS مجدد کشت شد. سپس سوسپانسیون نسبتا کدری از هر جدایه تهیه و در ظروف پلاستیکی دربسته در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد.

بررسی خصوصیت آنتاگونیستی جدایه ها

برای انجام این آزمایش یک جدایه *X. a.* pv. *citri* پاتوتیپ A یا شانکرآسیایی استفاده شد (۲). از کشت ۴۸ تا۷۲ ساعته جدایه روی محیط کشت NAS، سوسپانسیونی در آب مقطر سترون تهیه و جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر نزدیک به ۰/۱ واحد، به طور تقریبی معادل 1×10^{7} سلول باکتری (cfu)[1] در میلی لیتر تنظیم گردید. از جدایه‌های جمع آوری شده نیز به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت NAS کشت و سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون 1×10^{7} باکتری در میلی لیتر *X. a.* pv. *citri* به روی سطح تشتک های پتری به طور یکنواخت پاشیده شد و به مدت ۱۵دقیقه تشتک ها با در باز در زیر هود قرار داده شد تا سطح آنها کاملا خشک شود. تشتک ها ی پتری به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا اثرات متقابل دو باکتری بر روی هم ظاهر گردد. این آزمایش در دو تکرار انجام گردید. در مواردی که جدایه ها دارای حالت آنتاگونیستی نسبت به *X. a.* pv. *citri* بودند، پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت اطراف آنها یک هاله شفاف که نشانه عدم رشد پاتوژن است دیده شد. به این ترتیب جدایه های آنتاگونیست از بقیه مجزا شدند.

بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی جدایه ها

بر اساس جمعیت تقریبی اولیه باکتری ها بر روی برگ و توانایی آنتاگونیستی آنها علیه عامل بیماری شانکر مرکبات، تعداد ۲۶ جدایه انتخاب و آزمایشهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه ای بر اساس روشهای معمول و استاندارد باکتریولوژی شاد انجام گرفت (۲۲).

1-colony forming unit

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آزمون بیماریزایی

از کشت تازه جدایه ها سوسپانسیونی با غلظت تقریبی ۱×۱۰^{۷}(cfu) در میلی لیتر تهیه شده و توسط سرنگ به درون پارانشیم برگ گیاه توتون، شمعدانی و لیمو تزریق شد. همچنین مقداری از کلنی را به طور مستقیم روی برگ قرار داده و سپس با سوزن زخمهایی روی سطح برگ ایجاد شد. تعدادی زخم بدون استفاده از کلنی و همچنین تعدادی تزریق با سوسپانسیون پاتوژن در نظر گرفته شد. نتایج تا دو هفته بر روی این گیاهان مورد بررسی قرارگرفت.

الکتروفورز پروتئین

الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئینهای محلول سلولی در ژل پلی آکریل آمید ۱۰درصد درسیستم ناپیوسته لملی (laemmli,1970) انجام شد. سوسپانسیونی از کشت دو روزه استرین ها روی محیط کشت NB (Nutrient Broth)، در یک میلی لیتر آب مقطر تهیه و دانسیته نوری (OD) آن در طول موج ۶۳۰ نانومتر برابر با یک تنظیم شد. به نمونه ها بافر تریس حاوی سدیم دودسیل سولفات و مرکاپتواتانول اضافه شد و مدت پنج دقیقه در حمام آب، جوشانده شد. سپس به مدت ده دقیقه در۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. از پروتئینهای محلول به میزان ۵۰ میکرولیتر از هر استرین روی ژل ناپیوسته آکریل آمید حاوی ۱۰٪ آکریل آمید، به درون چاهک ها اضافه شد و الکتروفورز با جریان ثابت ۲۰ میلی آمپر تا رسیدن رنگ پیشرو به انتهای ژل ادامه یافت. سپس ژل در محلول رنگی شامل ۰/۱ درصد کومازی بلو در متانول، آب و اسید استیک به نسبت حجمی ۵:۵:۱۰ به مدت دو ساعت روی شیکر رنگ آمیزی گردید و سپس در همان محلول ولی بدون کومازی بلو تا زمان ظهور و وضوح باندها قرار داده شد. ژل حاصله جهت نگهداری به محلول اسید استیک هفت درصد منتقل و در چهار درجه سانتیگراد جهت بررسی نوارها نگهداری گردید.

بررسی تولید ترکیبات بازدارنده پاتوژن، توسط سودوموناسهای فلورسنت

این آزمون بر اساس تلفیقی از روشهای گراس و زو (۲۸) و ساکتی ول و میو (۲۱) انجام شد. ابتدا جدایه آنتاگونیست روی محیط کشت King B به صورت لکه ای کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، لایه باکتری از سطح محیط پاک و تشتکها در معرض پنج میکرولیتر کلروفرم قرار داده شدند. سپس تشتک های پتری بصورت باز به مدت یک ساعت زیر اشعه UV قرار گرفتند.۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون پاتوژن ($۱۰^{۷}$ سلول باکتری در لیتر) با پنج میلی لیتر از محلول آگار۰/۷٪ مذاب مخلوط و در سطح تشتک های پتری پخش شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری تشتک‌های پتری در ۲۵ درجه سانتیگراد، ایجاد هاله بازداری از رشد بررسی شد.

نتایج و بحث

از نمونه های جمع آوری شده درمهرماه و آبان ماه سال ۱۳۸۰از استانهای هرمزگان وکرمان به ترتیب ۷۵ استرین و ۹۱ استرین بدست آمد. از نمونه های مربوط به شمال کشور ۱۱۵جدایه در آبانماه ۱۳۸۰و به ترتیب ۹۵و۷۷ جدایه در خرداد و مرداد ماه۱۳۸۱ جدا شد.

بررسی اثرات آنتاگونیستی در آزمایشگاه

بعد از گذشت ۲۴تا ۷۲ ساعت از کشت باکتری ها، رشد باکتری های پاتوژن درتشتک های پتری بررسی گردید و مشاهده شد که در بعضی جدایه ها، دو باکتری هیچ اثری روی هم نداشته و هر یک جداگانه به رشد خود ادامه داده اند (شکل۱– B). در بعضی از جدایه ها یک هاله مشخص که ناشی از عدم رشد باکتری پاتوژن بود مشاهده شد که قطر آن در جدایه های مختلف متفاوت بود (شکل ۱– A). در مواردی اثرات بازدارندگی به صورت دو هاله مجزا از هم ظاهر شد (شکل۱– C).

از تعداد کل ۴۵۳ جدایه مورد بررسی تعداد ۹۷جدایه در اطراف خود ایجاد هاله بازدارندگی از رشد پاتوژن *X. a.* pv. *citri* را نمودند. قطر هاله بازدارندگی رشد از ۲ الی ۱۷ میلی متر در جدایه‌های مختلف متفاوت بود. نمونه هایی که دارای بازدارندگی ضعیف بوده و یا فراوانی اولیه آنها در سطح برگ کم بود حذف شده و تعداد ۲۶ جدایه برای بررسی های بعدی انتخاب شدند (جدول۲).

بررسی خصوصیات فنوتیپی

بر اساس آزمون گرم، ۱۵جدایه گرم مثبت و ۱۱ جدایه گرم منفی تشخیص داده شد. در آزمون رنگ آمیزی اسپور مشخص شد تمام جدایه های گرم مثبت دارای توانایی تولید اسپور می باشند.

طبق آزمونهای اولیه انجام شده روی ۱۱جدایه گرم منفی، سه گروه فلورسنت و یک گروه غیر فلورسنت تشخیص داده شد. از آزمونهای فنوتیپی انجام شده بر روی جدایه های هر گروه نتایج زیر بدست آمد.

گروه A شامل باکتریهای گرم منفی، تقریبا میله ای شکل که بر روی محیط کینگ ب (KingB) ایجاد رنگ فلورسنت کرده، هوازی،کاتالاز، اکسیداز، لوان و ژلاتیناز مثبت، اما قادر به احیای نیترات و لهاندن ورقه های سیب زمینی نبودند.

گروه B شامل باکتریهای گرم منفی، میله ای شکل که در محیط کینگ ب ایجاد رنگ فلورسنت کرده، هوازی،کاتالاز و اکسیداز مثبت،

قادر به هیدرولیز ژلاتین ولی در احیای نیترات و تولید لوان ناتوان بودند.

گروه C شامل باکتریهای گرم منفی، میله ای شکل که ایجاد رنگ فلورسنت در محیط کینگ ب می نمایند و هوازی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، عدم توانایی در استفاده از نیترات و تولید لوان ولی قادر به هیدرولیز ژلاتین بودند.

گروه D شامل باکتریهای گرم منفی، میله ای شکل، غیر فلورسنت روی محیط کشت کینگ ب،کاتالاز و ژلاتیناز مثبت، اما اکسیداز، لوان و احیاء نیترات آنها منفی بودند.

سایر خصوصیات درجدول ۱ درج شده است.

با توجه به نتایج بدست آمده

گروه A به بیووار I از گونه *P. fluorescens* (Trevisan)Migula

گروه B به بیووار V از گونه *P. fluorescens*

گروه C به گونه *P. viridiflava*

گروهD به گونه *P. syringae* بیشترین شباهت را دارا بودند.

آزمون بیماریزایی

تمام ۲۶ جدایه آنتاگونیست که از سطح برگهای مرکبات جدا شده بودند، جهت اثبات بیماریزایی مورد بررسی قرار گرفتند. از هر جدایه به طور جدا سوسپانسیون غلیظی با آب مقطر تهیه شده و به وسیله سرنگ به درون بافت پارانشیم برگ لیمو، توتون و شمعدانی تزریق گردید. از بین تمام جدایه ها، سه جدایه در برگ شمعدانی علائم نکروزه تولید نمودند که نشانه توان بیماریزایی این جدایه ها بوده و در ادامه تحقیق این جدایه ها حذف شدند. در گیاهان شاهد که با آب مقطر تزریق شده بودند علائمی ایجاد نگردید.

بررسی نقوش الکتروفورزی پرتئینها

مشاهده نقوش پروتئینی ایجاد شده سویه های گرم منفی مشخص کرد که این جدایه ها در چهار گروه متمایز قرار می گیرند. این گروهها با وجود تشابه زیاد، اختلاف کمی با هم داشتند. البته این اختلاف ها در داخل هر گروه به حداقل رسیده و سویه های داخل هر گروه غالباً یکسان بودند.

نتایج حاصل از نمونه برداری نشان داد که فلور باکتریایی مرکبات در شمال کشور نسبت به جنوب کشور دارای تنوع بیشتری می باشد. همچنین در شمال کشور، در ماه های آبان و خرداد این تنوع از مردادماه بیشتر است. وجود چنین تغییرات و تفاوتهایی در فلور باکتریهای اپی فیت طبیعی است، چون عوامل مختلف مثل شرایط محیطی، کیفیت و کمیت این باکتریها را تغییر می دهند (۱۹). در این میان، عامل رطوبت شاید مهمترین علت این اختلافات باشد. به عقیده بلیکمن (۸) رطوبت تنها عاملی است که رشد و بقا باکتریهای اپی فیت را تحت تاثیر قرار می دهد و وجود آب آزاد یا رطوبت نسبی بیشتر از ۹۵ درصد در سطح برگ، ضروری است. چنین شرایطی عمدتاً در استان مازندران می تواند بطور دائم فراهم باشد. ولی مهمترین علت قابل ذکر برای تغییر فلور باکتریهای اپی فیت و جمعیت آنها طی فصل رشد در استان مازندران، تغییر در محیط شیمیایی سطح برگ می تواند باشد چون در اکثر مواقع رطوبت لازم برای باکتریهای اپی فیت فراهم است. اما از یک طرف با افزایش سن برگ و تغییر در شدت نور، کیفیت وکمیت مواد ترشح شده از برگ تغییر می کند و از طرف دیگر مواد مختلفی که از محیط اطراف در سطح برگ قرار می گیرند، تنوع بیشتری پیدا می کنند. بعلاوه باید قابلیت متفاوت باکتریهای مختلف در استفاده از مواد غذایی گوناگون را به این دلایل اضافه نمود (۱۸ و ۱۹). ابرین و لیندو (۱۹) نیز معتقدند شدت نور در استقرار و مقاومت باکتری روی گیاه موثر است و این مسئله می تواند دلیل تغییر جمعیت باکتری ها طی فصل رشد باشد.

به منظور شناسایی باکتریهایی آنتاگونیست، استرینهای جدا شده بر اساس نتایج آزمونهای واکنش گرم، تولید رنگ فلورسنت، واکنش اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز کازئین و چربی (توئین۸۰) و تولید لوان به گروه های زیر تقسیم شدند.

گروه A شامل سه جدایه،که خصوصیات آنها درمثبت بودن واکنش اکسیداز، عدم لهاندن ورقه های سیب زمینی، عدم ایجاد فوق حساسیت در توتون، مثبت بودن هیدرولیز ژلاتین، منفی بودن احیا نیترات، منفی بودن هیدرولیز چربی، قابلیت استفاده از ترهالوز، بتا – آلانین، دی- زایلوز، لاکتات، سیترات، ال- تایروزین، بتایین، ال- آرابینوز، فنیل آلانین، دی مانوز، دی فروکتوز، سوکروز، دی- الانین، مالونیت، ایتاکونیت، ال- لئوسین و عدم استفاده از والریت، سبکیت، دی تارتاریت در هر سه جدایه مشترک بود ولی جدایه 7E/S بر خلاف دو جدایه دیگر قادر به استفاده از اریتریتول و والریت نبود. این مشخصات در مجموع با خصوصیات ذکر شده در منابع برای باکتری *P. fluorescens* I مطابقت می نماید (۱۲).

گروه B شامل سه جدایه که در خصوصیاتی از قبیل منفی بودن تولید لوان، مثبت بودن اکسیداز، عدم لهاندن ورقه های سیب زمینی، منفی بودن فوق حساسیت در توتون، منفی بودن احیاء نیترات، مثبت بودن هیدرولیز ژلاتین و چربی و قابلیت استفاده از لاکتات، سیترات، ال- آرابینوز، ال-تایروزین، دی زایلوز، دی مانوز، دی- فروکتوز، ترهالوز، پروپیونیت، والریت، مالونیت، دی- تارتاریت، فنیل آلانین، ال- لئوسین و عدم استفاده از سوکروز، سوبکیت، ال- تارتاریت، ایتاکونیت، اریتریتول، سوربیتول، گلایسین، دی آلانین و تریپتوفان مشترک بودند که این خصوصیات با مشخصات ذکر شده در منابع برای باکتری *P. fluorescens* V مطابقت دارد ولی این جدایه ها

بـر خـلاف بـاکتری V *P. fluorescens* قـادر بـه اسـتفاده از پروپیونیت نبودند.

گروه C شامل دو جدایه کـه دارای خصوصـیات مشـترک مثبـت بودن اکسیداز و کاتالاز، منفی بودن تولید لـوان و عـدم احیـا نیتـرات، عدم استفاده از چربی، مثبت بودن هیدرولیز ژلاتین و اسـتفاده از دی- زایلوز، ال- آرابینـوز، سـیترات، دی- مـانوز، دی- فروکتـوز، لاکتـات، مالونیـت، دی تارتاریـت، سـوربیتول، اریتریتـول، ال- تـایروزین، ال- تریپتوفـان و عـدم اسـتفاده ازسـوکروز، ال- تارتاریـک، ال-لئوسـین، والریت، ترهالوز، سـبکیت، ایتاکونیـت، گلایسـین، فنیـل آلانـین مـی باشند. این دو استرین دارای برخی خصوصیات متفاوت بودنـد. جدایـه 8A/S قادر به استفاده از پروپیونیـت و بتـایین نبـود در صـورتی کـه جدایه 4A/S قادر به استفاده از این ترکیبات بود و همینطور جدایـه 4A/S قادر به استفاده از دی آلانین نبود ولی جدایه 8A/S قـادر بـه استفاده از آن بود. باتوجه به این خصوصیات و مطابقـت آن بـا منـابع، مشخصات این گروه با باکتری *P. viridiflava* بیشترین شباهت را دارد.

گروه D شامل سه جدایه که در منفی بـودن لـوان، منفـی بـودن واکنش اکسیداز، ایجاد فوق حساسیت در توتون، عـدم احیـا نیتـرات، هیدرولیز ژلاتین و استفاده از دی- زایلوز، ال- آرابینوز، سیترات، دی- مانوز، دی- فروکتوزبتایین، کوین، والریـت، مالونیـت، ال- تارتاریـت، ترهالوز، دی- آلانـین و عـدم اسـتفاده از سـوکروز، اریتریتـول، ال- لئوسـین، ال- تـایروزین، ال- تریپتوفـان، ترهـالوز، سـبکیت، ایتاکونیت،گلایسین و فنیل آلانین مشترک بودند.

جدایـه 5C/M بـر خـلاف دو جدایـه دیگـر قـادر بـه اسـتفاده ازسوربیتول و پروپیونیت نبود و همچنین جدایه 29G/A بر خلاف دو جدایه دیگر قادر به استفاده از دی-تارتاریت نبود.

با توجه به ایـن خصوصـیات و مطابقـت آن بـا منـابع ایـن گـروه نزدیکتـرین شـباهت را بـا *P. syringae* van Hall دارنـد امـا در مواردی بین خصوصیات این گروه بـا بـاکتری *P.syringae* تفـاوت وجود دارد از جملـه باکتریهـای ایـن گـروه قـادر بـه اسـتفاده از ال- تریپتوفان و ال- تایروزین می باشند و قادر به لهاندن ورقه های سیب زمینی بوده که با آنچه در منابع ذکر شده تفاوت دارد.

نتایج آزمایشگاهی نشان داد که قطر هاله بازداری از رشد باکتری عامل شانکر در جدایه های مختلف متفاوت مـی باشـد کـه بیشـترین قطر مربوط به جدایه 8B/S بوده و جدایـه هـای 4A/S و7E/S بـه ترتیب بیشترین قطر بازداری از رشد را داشته اند.

از مکانیسمهای موثر در ایجاد این هالـه بـازداری از رشـد، تولیـد رنگهای فلورسنت توسط جدایه های آنتاگونیست می باشد. در بررسـی اثرات آنتا گونیستی جدایه های سـودوموناس مشـخص شـدکه همـه ایزوله ها غیـر از *P.syringae* روی محـیط King B (در شـرایط فقر آهن) تولید رنگهای فلورسنت می کنند. البتـه رنگهـای فلورسـنت مختلفی توسط سودوموناسها در محیطهای دارای آهن کم تولیـد مـی شود. مهمترین آنها Pyoverdin است که در زیر نـور مـاوراء بـنفش خصوصاً طول موج ۴۰۰ نانو متر به رنگ سبز فلورسنت دیده می شود که این ترکیبات در گرفتن و انتقال آهن به درون باکتری نقش دارنـد (۶و۱۶) و از این طریق مـی تواننـد در کنتـرل بیماریهـا مـوثر باشـند (۶،۱۷و۲۷).

از دیگر مکانیسم های موثر در ایجاد هاله بازداری از رشـد، تولیـد آنتی بیوتیک توسط جدایه های آنتاگونیست می باشد بـه خصـوص در جدایه های گروه D که تولید سیدروفور نمی کند ایـن احتمـال وجـود دارد که با تولید آنتی بیوتیکهایی باعث بازداری از رشد عامـل پـاتوژن شود.گروس Gross (۱۱)گزارش کرده است که حـداکثر تولیـد آنتـی بیوتیک توسط *P.syringae* در حضور گلوکز به مقدار یک درصد یا بیشتر صورت می گیرد، در ۰/۵ درصد گلـوکز، میـزان آنتـی بیوتیـک تولید شده بسیار ناچیز و در غیاب گلوکز، آنتی بیوتیک تولیـد نخواهـد شد. همچنین طبق نظر داگـلاس و همکـاران (۱۳) گروهـی از آنتـی بیوتیکهای *P.fluorescens* فقط در غیاب گلـوکز و گروهـی دیگـر فقط درحضور مقادیر نسبتاً زیاد گلوکز تولید می شوند. افزایش غلظـت گلـوکز درمحـیط موجـب افـزایش فعالیـت gluconate dehydrogenase می شود، ایـن آنـزیم روی gluconate کـه در بعضی سودوموناسها نقش مهمی در متابولیسـم گلـوکز و سـنتز آنتـی بیوتیکها به عهده دارد، موثر است (۱۳). بـا توجـه بـه ایـن گزارشـات میزان تولید آنتی بیوتیکها با توجه به شرایط محیطی و تغییر فصـول و در نتیجه تغییر میزان گلوکز متفاوت می باشد. با توجه به مطالب ذکـر شده می توان توانایی بازدارندگی از رشد را درجدایه هایی مانند گـروه D که تولید سیدروفور نمی کنند را به تولید آنتی بیوتیک توسط آنهـا نسبت داد.

در پایان بـا در نظـر گـرفتن خسـارات سـنگین بیمـاری شـانکر مرکبات در سالهایی که شرایط برای طغیان فـراهم باشـد و همچنـین آثار سوء ناشی از مصرف سموم شمیایی، می توان از یافته هـای ایـن تحقیق در استفاده از برخی گونه های اپی فیت سطح برگ مرکبات به عنوان یکی از عوامل مبارزه با بیماری شـانکر مرکبـات در اسـتراتژی مدیریت کنترل بیمارگر سود برد.

پیشنهاد می شود در ادامه این تحقیق، بررسی هایی درسطح سایر باغات مرکبات مناطق آلوده کشور انجام گیـرد و میـزان مانـدگاری و جمعیت این جدایه ها و امکان موفقیت آن در طبیعت مشخص گردد.

جدول ۱ - خصوصیات فنوتیپی جدایه های آنتا گونیست جدا شده از برگ های مرکبات

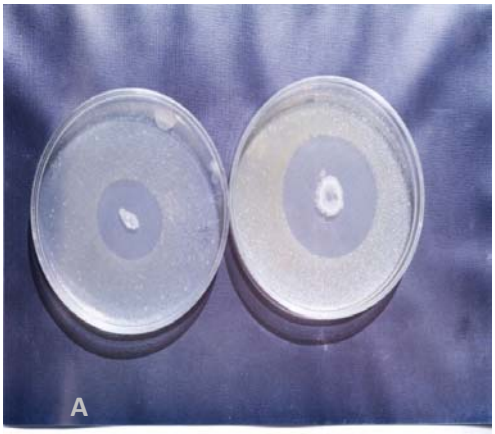
آزمون	گروه استرینها			
	A	B	C	D
واکنش گرم	−	−	−	−
تولید رنگ فلورسنت	+	+	+	−
اکسیداز	+	+	−	−
تولید لوان	+	−	−	−
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+	+
هیدرولیز توئین۸۰	−	+	−	+
هیدرولیز کازئین	+	+	+	−
کاتالاز	+	+	+	+
لهانیدن ورقه های سیب زمینی	−	−	−	+
احیاء نیترات	−	−	−	−
فوق حساسیت در توتون	−	−	−	+
تحمل نمک طعام۳٪	+	+	+	+
تحمل نمک طعام۴٪	+	+	−	−
تحمل نمک طعام۵٪	−	−	−	−
رشدهوازی/ بی هوازی	رشد هوازی	رشد هوازی	رشد هوازی	رشد هوازی
آرجنین دی هیدرولیز	+	+	−	−
استفاده از:				
دی –مانوز	+	+	+	+
سوربیتول	+	−	+	*+
دی –زایلوز	+	+	+	+
دی –فروکتوز	+	+	+	+
سوکروز	+	−	−	−
تر هالوز	+	+	−	−
بتا- آلانین	+	+	−	−
ال-تایروزین	+	+	−	+
گلایسین	−	−	−	−
دی-تارتاریت	−	+	+	*−
ال(+)تارتاریت	−	−	−	+
سیترات	+	+	+	+
والریت	*+	+	−	+
پروپیونیت	+	−	*+	*+
ال-آرابینوز	+	+	+	+
ال-لئوسین	+	+	+	−
ال-تریپتوفان	+	−	+	*+
بتائین	+	+	*+	+
لاکتات	+	+	+	+
سبکیت	−	−	−	−
کوئینیت	+	+	+	+
ایتاکونیت	+	−	−	−
اریتریتول	*+	−	+	+
دی-آلانین	+	−	*+	+

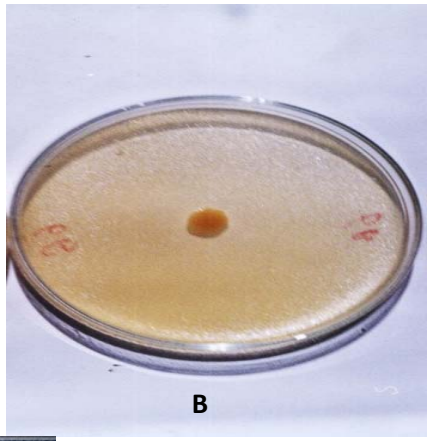
جدول ۲- جدایه های آنتاگونیست برگ های مرکبات، جمع آوری شده از استانهای مازندران،کرمان و هرمزگان

شماره	جدایه	استان	شهر/روستا
۱	29B/Z	هرمزگان	شمیل
۲	17G/A	کرمان	توکهور
۳	48G/A	کرمان	توکهور
۴	44G/A	کرمان	جهادآباد
۵	29G/A	کرمان	بارگاه
۶	5C/M	مازندران	سبزی باغ
۷	7E/S	مازندران	سنگ تاب
۸	12E/S	مازندران	سنگ تاب
۹	41/PM	مازندران	تلارپشت
۱۰	8A/S	مازندران	سنگریزه
۱۱	5A/S	مازندران	سنگریزه
۱۲	44D/M	مازندران	جویبار
۱۳	4A/S	مازندران	دامیر
۱۴	49A/S	مازندران	دامیر
۱۵	25H/M	مازندران	کیاکلار
۱۶	48F/M	مازندران	فیروز کنده
۱۷	8B/S	مازندران	چفت سر
۱۸	17B/S	مازندران	چفت سر
۱۹	19T/M	مازندران	قائم شهر
۲۰	A17a	مازندران	قائم شهر
۲۱	A14a	مازندران	قائم شهر
۲۲	A13a	مازندران	قائم شهر
۲۳	7T/S	مازندران	قائم شهر
۲۴	5S/M	مازندران	ساری
۲۵	13S/M	مازندران	ساری
۲۶	35S/M	مازندران	ساری

شکل ۱- اثر متقابل باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri* با باکتریهای اپی فیت مرکبات

A : حالت بازدارندگی از رشد پاتوژن توسط باکتری آنتاگونیست; B : عدم ظهور هاله بازدارندگی از رشد پاتوژن; C : ایجاد دو هاله بازدارندگی از رشد پاتوژن





منابع

۱- آمار نامه کشاورزی. ۱۳۸۴. اداره کل آمار و اطلاعات تهران,وزارت کشاورزی، جلد اول، صفحه ۱۰۲ .

۲- خداکرمیان غ. و رحیمیان ح. ۱۳۸۷. خصوصیات فنوتیپی، دامنه میزبانی و چگونگی پراکنش استرینهای باکتری Xanthomonas axonopodis عامل شانکر مرکبات جنوب ایران. بیماریهای گیاهی، جلد ۳۵، صفحه ۱۰۹.

۳- خوئی س. ۱۳۷۱. اصول تغذیه مرکبات . انتشارات معلم, ۲۶۶صفحه.

۴- مستوفی زاده قلمفرسا ر. و رحیمیان ح. ۱۳۷۵. وقوع آلودگی نوع آسیایی شانکرباکتریایی مرکبات در ایران . بیماریهای گیاهی , جلد ۳۲, صفحه ۲۹۰.

۵- مستوفی زاده قلمفرسا ر. ۱۳۷۵. بررسی استرینهای عامل شانکر مرکبات در جنوب ایران. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. صفحه ۷۶ .

6- Ahl P. , Voisard C., and Defago G. 1986. Iron bound-siderophores, cyanic acid, and antibiotics involved in suppression of *Thielaviopsis basicola* by a *Pseudomonas fluorescens* strain . J. Phytopathology 116: 121-134.

7- Alizadeh A., and Rahimian H. 1990. Citrus canker in kerman province. Iran. J.plant Pathol. 26(1-4): 42.

8- Blakeman J.P. 1982. Phylloplane interaction. Pages 307-333. In: phytopathogenic Prokaryotes, Vol. 1,M.S. Mount and G. H. Lacy (eds.), Academic Press, New York. 541 pp

9- Civerolo E.L. 1981. Citrus bacterial canker disease :An overview . Proc .Int . Soc. Citriculture. 1:390-394.

10- Davies F.S., and Alborigo L.G. 1994. Citrus. CABI Press. 254pp.
11- Gross D. 1985. Regulation of syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production. Journal of Applied Bacteriology 58: 167-174.
12- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., and Williams S.T. 1994.Bergey's Manual of Determinative Bacteriology , 9th ed.,Williams &Wilkins, Baltimore.787 pp.
13- James DW Jr, Gutterson NI. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. Appl Environ Microbiol. Nov;52(5):1183–1189.
14- Koizumi M. 1981. Resistance of citrus plants to bacterial canker disease :A review. Proc . Int. Soc . Citric. 1:402-405.
15- Koizumi M. 1985. Citrus canker: The world situation . Pages 2-7 in : citrus Canker: An International perspective. Timmer L. W., ed. Gainesville, USA.
16- Leong J. 1986. Siderophores :Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens . Annu. Rev . Phytopathol. 24:187-209.
17- Liao C.H. 1989. Antagonism of *Pseudomonas putida* strain pp22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. Plant Dis . 73:223-226.
18- Morris C.E., and Rouse D.I. 1991. Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial population . Pages 63-82. In: Biological Control on the Phylloplane , 3th ed, C. E. Windels and S. E. Lindow (eds.), Am.Phytopathol. Soc .St.Paul, MN. 169 pp.
19- O'Brien R.D., and Lindow S.E. 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria . Phytopathology 79:619-627.
20- Rahimian H., Khodakaramian G., Babaee-zad V., and Zarei A. 1998.Widespread distribution of citrus canker in southern Iran. 13th Iran. Pant protect. Cong. Karaj. 246.
21- Sakthivel N ., and Mew T.W. 1991. Efficacy of bacteriocinogenic strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* on the incidence of bacterial blight disease of (*oryza sativa* L.). Can . J . Microbiol 37:764-768.
22- Schaad N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria, 2th ed . Am. Phytopathol. Soc, St. Paul, MN. 158 PP.
23- Schaad N.W., Postnikova E., Stromberg V.K., Lacy G.H., Stromberg P.E., Vidaver A.K., Sechler A., Agarkova I. 2005. Reclassification of Xanthomonas campestris pv. citri (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as X. smithii subsp. citri (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., X. fuscans subsp. aurantifolii (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and X. alfalfae subsp. citrumelo (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; X. campestris pv malvacearum (ex Smith 1901) Dye 1978 as X. smithii subsp. smithii nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (*ex* Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (*ex* Riker *et al*., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. fuscans" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (*ex* Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. fuscans sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol*., 2005, 28, 494-518.).
24- Schoulties C.L., Civerolo E.L., Miller J.W., Stall R.E., Krass C.J., Poe S.R., and DuCharme E.P. 1987. Citrus canker in Florida.plant Dis. 71:388-355.
25- Stall R.E., and Seymour C. 1983. Canker, athreat to citrus in the Gulf-Coast states . Plant Dis.67:581-585.
26- Swings J.G., and Civerolo E.L. 1993. *Xanthomonas* . Chapman and Hall. 399pp.
27- Vauterin L., Hoste B., Kersters K., and Swings J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas* . Int . J. Sys . Bacteriol . 45: 472-489.
28- XU G.W., and Gross D.C. 1986. Field evaluations of the interactions among fluorescent pseudomonads, *Erwinia carotovora*, and potato yields. Phytopathology 76:423-430.
29- XU G.W., and Gross D.C. 1986. Selection of Fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppression of potato seed piece decay . Phytopathology 76:414-422.