

ارزیابی تاثیر سولفات مس بر رشد آگروباکتریوم ویتس (عامل گال طوقه درخت انگور) جداسازی شده از باغات انگور ارومیه در سال 93

فاطمه غفارنژاد مقدم¹، دکتر رضا طالبی*، دکتر امیر توکمه‌چی²

1- گروه زیست شناسی، گرایش میکروبیولوژی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

* گروه زیست شناسی، گرایش میکروبیولوژی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

2- دانشگاه ارومیه، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، ارومیه، ایران

نویسنده مسئول: فاطمه غفارنژاد مقدم

چکیده

Agrobacterium vitis سومین بیوار از خانواده *Agrobacterium tumefaciens* و عامل ایجاد تومورهایی به نام گال بر روی درخت انگور است. انگور یکی از مهمترین میوه‌های آذربایجان و به خصوص ارومیه می‌باشد؛ بنابراین محافظت از آن در برابر بیماری‌های باکتریایی مانند گال مهم به نظر می‌رسد. این باکتری‌ها در خاک زندگی می‌کنند و بیماری‌زای فرصت طلب هستند. یک دوره سرما می‌تواند عامل بوجود آمدن زخم‌هایی بر روی تنه درخت انگور باشد و *Agrobacterium vitis* با استفاده از این زخم‌ها وارد لایه‌های درونی تنه درخت می‌شود. سپس پلاسمید *Ti* خود را به درون ژنوم گیاه منتقل می‌کند. این پلاسمید قادر است ژن‌های لازم برای ترشح انواعی از هورمون‌ها مانند اوپین‌ها را که منجر به افزایش رشد سلولها و ایجاد تومور می‌شوند، را کد کند. با توجه به اینکه در سال 92 در استان آذربایجان غربی سرمازدگی موجب از بین رفتن محصولات و درختان میوه شد و تعداد زیادی از تاکستان‌های این استان به خصوص شهر ارومیه در اثر زخم‌های ایجاد شده بر تنه درختان انگور به علت سرمازدگی و ورود باکتری مذکور به درون بافت‌ها، دچار گال طوقه درخت انگور شدند، بنابراین تلاش شد تا میزان تاثیرات سولفات مس به عنوان یک ماده ضد قارچ و ضد باکتری بر آگروباکتریوم ویتس جدا شده از مزارع انگور ارومیه بررسی شود. برای رسیدن به این هدف ابتدا اقدام به جداسازی باکتری از تنه درختان دارای بافت‌های توموری مشکوک با روش آقای مور، کرده و نمونه‌های باکتریایی در شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه ارسال شد. پس از اطمینان از جداسازی صحیح باکتری‌ها از محیط از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی، آزمون واکنش زنجیره پلیمرز، و کشت بر روی گیاهان پایه، اقدام به تهیه رقت‌های دو برابر کاهش یافته از سولفات مس در لوله‌های آزمایش نموده و میزان 100 میکرولیتر از باکتری در درون هر یک از لوله‌های آزمایش کشت داده شد. سپس در طول زمان‌های مختلف از محلول‌های حاوی سولفات مس و آگروباکتریوم ویتس، بر روی پلیت-های کشت جامد بیست مانیتول آگار کشت داده و گرمخانه‌گذاری گردید. پس از 48 ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 28 درجه سانتیگراد مشاهده شد که کمترین غلظت مهارکنندگی رشد برای آگروباکتریوم ویتس غلظت 100 میکرو گرم بر لیتر سولفات مس و حداقل غلظت کشندگی سولفات مس برابر با 10 میلی گرم بر لیتر در طی 24 ساعت اولیه بعد از تلقیح باکتری به محیط حاوی سولفات مس است.

کلمات کلیدی: ارومیه، سولفات مس، آگروباکتریوم ویتس، گال طوقه انگور

مقدمه:

انگور یکی از مهمترین محصولات کشاورزی در نقاط مختلف ایران و به خصوص در آذربایجان بوده و از نظر اقتصادی ارزش بالایی دارد بنابراین هر عامل تهدید آمیزی که موجب کاهش میوه‌دهی انگور شود باید بلوکه گردد. گال یکی از این عوامل تهدید کننده است که توسط آگروباکتریوم ویتس ایجاد می‌شود. این باکتری با استفاده از زخم‌های روی تنه درخت که توسط سرما یا اشتباهات انسانی ایجاد می‌شوند، وارد گیاه می‌شود (Chilton et al., 1977; Chilton et al., 1974). آگروباکتریوم ویتس یک باکتری خاکزی و بیماری‌زای فرصت طلب است. این باکتری پس از ورود به داخل بافت گیاه، پلاسمید خود را به درون ژنوم گیاه انتقال داده و گیاه شروع به ساختن برخی از هورمون‌های رشد مانند اوپین‌ها می‌کند. این هورمون‌ها می‌توانند موجب به هم ریختگی سیستم رشد سلولی شده و سلول‌ها با بی‌نظمی رشد کرده و ایجاد گال، نوعی بافت نکروزه که در ارتفاع 15 سانتیمتری سطح خاک ایجاد می‌شود، کند (Ulker et al., 1982; Ream et al., 1982; Matthyse et al., 1986; Chilton et al., 1974; Burr, 1999).

با توجه به این که استان آذربایجان غربی یکی از استان‌های سردسیر ایران می‌باشد و هر ساله سرمازدگی موجب به وجود آمدن خسارات بالایی به باغداران می‌شود و همچنین به دلیل شیوع بالای بیماری گال طوقه انگور در مزارع انگور شهر ارومیه، به دنبال راهی برای از بین بردن این باکتری

بیماری‌های فرصت طلب قبل از ورود آن به درون تنه انگور بودیم. در برخی از روستاهای آذربایجان کشاورزان جهت مقابله با این بیماری اقدام به ریشه کنی درختان انگور و سوزاندن آنها می‌کنند که این کار موجب ایجاد خسارات مالی بسیاری می‌شود. از آنجایی که سولفات مس ماده‌ای بسیار بی‌ضرر برای خاک و میکروارگانیسم‌های مفید خاک می‌باشد، در نتیجه هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات سولفات مس بر روی آگروباکتریوم ویتیس بود.

مواد و روش‌ها:

جداسازی باکتری از محیط

برای یافتن تاثیر سولفات مس بر روی رشد آگروباکتریوم ویتیس، ابتدا سعی در جدا سازی باکتری از بافت‌های مشکوک شد. از آنجایی که در سال 92 یک دوره سرم‌زدگی در استان رخ داده بود، بنابراین بهترین زمان نمونه برداری برای جداسازی باکتری از اواخر بهار شروع شده و تا اوایل تابستان ادامه یافت؛ زیرا این زمان بهترین زمان برای رشد باکتری مذکور در درون تنه‌های درختان و ایجاد گال طوقه است (تصویر 1). برای رسیدن به این هدف، در روز های مذکور ابتدا به شناسایی روستاهایی که مشکوک به وجود نشانه‌های گال در آنها اقدام شد. جامعه آماری شامل درختان انگور دارای گال در 5 مزرعه در مناطق قامت و امامزاده ارومیه (45 درجه و 12 دقیقه طول شرقی و 37 درجه و 31 دقیقه عرض شمالی) بودند. برای این کار، ابتدا بر اساس روش آقای مور، تنه درختان بیمار به وسیله آب مقطر استریل و سپس با الکل 70 درصد به مدت 2 دقیقه شسته شد. سپس بافت نکرزه تا رسیدن به بافت سبز رنگ به وسیله اسکالپل استریل برداشته شد (Ataee et al., 2011)، آگروباکتریوم ویتیس اغلب در ناحیه بافت سبز رنگ زندگی می‌کند. بافت سبز جداسازی شده، و در درون ظروف استریل پر شده با آب مقطر استریل قرار داده شده (Moore, 1988) و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه برای انجام آزمون های تشخیصی فرستاده شد. این کار برای 20 نمونه گرفته شده از 5 مزرعه پرورش انگور انجام شد (جدول 1).

جداسازی و خالص کردن باکتری‌ها

برای خالص کردن باکتری‌ها از بافت‌های تنه درخت ابتدا بافت‌ها در داخل بشرهای مجزای حاوی 200 میلی لیتر آب مقطر قرار داده شده و به مدت 45 دقیقه بر روی شیکر هم زده شد، سپس محلولها با استفاده از کاغذ صافی واترمن شماره 42 صاف شده و رقت هایی تا 10^{-5} از هر نمونه تهیه شدند. با استفاده از سمپلر، 50 میلی لیتر از هر رقت برداشته شده و بر روی بیست مانیتول آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و در انکوباتور 28 درجه سانتیگراد برای 24 تا 48 ساعت قرار داده شدند. بیست مانیتول آگار دارای مواد غذایی لازم مانند عصاره مخمر، مانیتول، دی پتاسیم فسفات، سولفات منیزم و کلرید سدیم بوده و محیط مناسبی برای باکتری مورد نظر است. پس از 48 ساعت، 5 نوع کلنی در محیط‌های کشت طبق جدول 2 ظاهر شدند که برای بدست آوردن نمونه‌های خالص هر کدام از کلنی‌ها به تعداد 5 بار کشت متوالی، پاساژ داده شدند. سپس 2 نمونه از کلنی‌ها که دارای خصوصیات ظاهری مشابه آنچه که در کتاب میکروبیولوژی برگه آمده است (Garety, 2005)، کشت مجدد داده و پس از ظاهر شدن کلنی‌های ریز سفید رنگ مروریدی (تصویر 2) و کلنی‌های سفید رنگ مات بزرگ، آزمون‌های شناسایی برای گونه‌های باکتریایی، مشابه آنچه که برای نمونه‌های استاندارد شناسایی آگروباکتریوم ویتیس انجام می‌شود، انجام گرفت.

تست های بیوشیمیایی

ابتدا رنگ آمیزی گرم را انجام دادیم. یکی از گونه‌های باکتریایی گرم منفی کوکوباسیلی و دیگری گرم مثبت کوکسی بود که از این بین باکتری‌های گرم منفی باسیلی سفید مروریدی ریز به عنوان آگروباکتریوم ویتیس احتمالی انتخاب شد. ظاهر آنها در سرم فیزیولوژی استریل و در زیر میکروسکوپ با لنز 40x به صورت دسته‌های 2 یا چندتایی چوب کبریتی بود و دارای حرکت ویبره مانند و لرزشی بودند. بنابراین باکتری‌ها در محیط‌های افتراقی و انتخابی لازم مانند TSI, MRVP, SIM، اوره آز، سیمون سترات کشت داده شده و در دمای 28 درجه سانتیگراد به مدت 24 تا 48 ساعت انکوبه شدند؛ همچنین آزمون‌های بیوشیمیایی مانند اکسیداز، کاتالاز، رشد در غلظت نمکی 2٪ و رشد در 35 درجه انجام گردید (Garety, 2005; Kuzmanovic et al., 2012). پس از بررسی نتایج، مشخص شد که یکی از گونه‌های باکتریایی جداسازی شده آگروباکتریوم ویتیس بود (جدول 3).

تائید باکتری با روش PCR

برای تائید باکتری‌های جدا شده از آزمون PCR استفاده شد. آزمون PCR به وسیله دو نوع پرایمر یک نوع برای آگروباکتریوم تومه فاسینیس و نوع دیگر برای آگروباکتریوم ویتیس، جمعا 4 پرایمر: 2 پرایمر فوروارد و 2 پرایمر ریورز مورد استفاده قرار گرفت (Brenic et al., 2005; Akramee, 2010). تست PCR در جدول 4 آمده است.

آزمون های بیماری‌زایی طبیعی

جهت اطمینان از وجود عامل بیماریزا (پلاسمید) در باکتری، باکتری‌ها بر روی گیاهان پایه کشت داده شدند.

بوته شمعدانی، بوته گوجه فرنگی و درخت انگور

برای کشت باکتری در ساقه گیاهانی چون شمعدانی، بوته گوجه فرنگی و درخت انگور، ابتدا از هر گیاه، 3 نمونه که دارای شرایط فیزیولوژیکی و ظاهری خوبی بودند انتخاب شده و به مدت یک ماه در محیط آزمایشگاهی گلخانه ای طبیعی نگهداری شدند. سپس برای انجام عملیات کشت، ساقه و تنه هر یک از گیاهان بوسیله آب مقطر استریل و الکل 70٪ شسته و استریل شد. سپس با استفاده از یک عدد سوزن استریل شده با الکل قسمتی از کلنی‌های کشت تازه برداشته شده و در محل ساقه با ارتفاع 15 سانتیمتر از سطح خاک به صورت عمقی و تا عمق 2 میلی متر تلقیح شد؛ محل تلقیح با استفاده از پنبه استریل مرطوب شده با آب مقطر استریل و پارافیلیم پانسمان شده و به مدت 45 تا 60 روز در محیط گلخانه ای دارای شرایط دمایی 25 تا 28 درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Kuzmanovic et al. 2012). پس از طی زمان مورد نظر، مشاهده شد که کلنی‌های باکتریایی در همه ساقه‌های تلقیح شده گیاه شمعدانی و همچنین تنه‌های درخت انگور رشد کرده و ایجاد بافتی شبیه بافت نکروزه در محیط طبیعی را کرده اند ولی در ساقه‌های بوته‌های گوجه فرنگی رشد باکتری مشاهده نشد.

آزمون های آنتی باکتریالی

پس از انجام همه این آزمون‌ها و اطمینان از صحت جداسازی باکتری، کلنی‌های باکتریایی آگروباکتریوم ویتیس در داخل کشت مایع پپتون واتر (مرک، آلمان) به صورت جداگانه و به روش زیر کشت داده شدند:

ابتدا 0/25 گرم از پودر محیط آب پپتونه در 10 میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شده و جهت استریل شدن محیط در اتوکلاو به مدت 20 دقیقه حرارت داده شد. سپس 2 کلنی از باکتری‌های محیط جامد بوسیله لوب استریل در محیط مایع کشت داده شده و در انکوباتور 28 درجه سانتیگرادی به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شد. در مرحله بعدی، به تعداد 30 لوله آزمایش آب مقطر به میزان 10 میلی لیتر در انکوباتور به مدت 20 دقیقه حرارت داده شدند تا استریل گردند؛ پس از سرد شدن لوله‌ها، میزان 1 گرم از سولفات مس (مرک، آلمان) در داخل یکی از لوله‌های آزمایش حاوی 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شده و به وسیله شیکر مخلوط شد، سپس به وسیله سمپلر، میزان 100 میکرولیتر از محلول سولفات مس به لوله آزمایش دوم حاوی 10 میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شده و به وسیله شیکر هم زده شد تا رقت 10^{-2} ایجاد گردد؛ این کار تا تهیه رقت 10^{-8} انجام شده و از لوله آزمایش آخر هم 100 میکرولیتر برداشته شده و دور ریخته شد. پس از انجام این مراحل به هر یک از لوله‌های آزمایش میزان 100 میکرولیتر از محلول کشت مایع حاوی آب پپتونه (مرک، آلمان) و آگروباکتریوم ویتیس، انتقال داده شد. کشت زمان صفر دقیقا پس از تلقیح بر روی پلیت‌های حاوی محیط تریبیک سوی آگار و بیست مانیتول آگار انجام گرفت و پس از نوشتن مشخصات در انکوباتور به مدت 48 ساعت و در دمای 28 درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از گذشت زمان‌های 2، 4، 6، 22 و 24 ساعت از زمان تلقیح نیز کشت بر روی محیط‌های مذکور به تعداد 2 تکرار انجام شد.

نتیجه گیری

تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط‌های کشت پس از 48 ساعت توسط دستگاه کلنی شمار، شمارش شده و در جدول 5 ثبت گردید. همانگونه که مشاهده می‌شود، تعداد کلنی‌های رشد کرده در پلیت‌ها با گذشت زمان کاهش می‌یابد تا اینکه به صفر می‌رسد. بنابراین بهترین دوز مصرفی به عنوان حداقل غلظت مهار کننده رشد آگروباکتریوم ویتیس (MIC) غلظتی از سولفات مس است که در پلیت‌ها، دارای تعداد کمتری کلنی باکتریایی رشد کرده باشد و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) اولین پلیت خالی از باکتری رشد کرده بعد از MIC در نظر گرفته شد. بدین صورت، بر اساس نمودار 1 سولفات مس با غلظت 10^{-4} گرم بر لیتر به عنوان حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و غلظت 10^{-2} گرم بر لیتر به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد.

بحث

سولفات مس ماده شیمیایی قارچ کشی است که اغلب در آزمایشگاه‌های علمی برای جلوگیری از رویش قارچ‌های فرصت طلب در داخل محیط‌های کشت که در انکوباتورها قرار داده می‌شوند مورد استفاده قرار می‌گیرد. علل استفاده از این ماده و بررسی تاثیر آن بر آگروباکتریوم ویتیس: الف) آزدگی محیطی ایجاد نمی‌کند. ب) بعنوان یک ریز مغذی به خاک گیاهان اضافه می‌شود. ج) ضد قارچ است. د) ارزان قیمت است.

بنابراین از لحاظ زیست محیطی ماده‌ای بسیار بی ضرر و در برخی موارد مفید از نظر حذف پاتوژن‌های خاک و مغذی برای خاک است و می‌تواند موجب کنترل آگروباکتریوم ویتیس در سطح مزارع انگور آلوده شود. کشاورزان می‌توانند با مشاهده بروز دوره‌های سرمای آسیب رسان به محصولات و در

آخرین آبیاری که جهت انجماد خاک انجام می‌شود، اقدام به محلول پاشی و یا پودر پاشی سولفات مس نمایند و از ورود انواع باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزا از جمله باکتری مذکور به درون بافت‌های انگور ممانعت نمایند.

منابع

1. امتیازی، گیتی (1389). مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک، چاپ دوم، اصفهان: انتشارات مانی.
2. اکرمی، حسن. (1389). ژنتیک، از کلاسیک تا ژنومیک، چاپ دوم، تهران: خانه زیست شناسی.
3. براون، ترانس اوستن. (1392). کلون سازی و آنالیز ژن، ترجمه مجتبی طباطبایی یزدی، غلامرضا زرینی، ضرغام سپهری زاده، عبدالله قاسمیان و آرمان همت. (2010). تهران: خانه زیست شناسی.
4. عطایی، رمضانعلی. درخشانیپور، جلال الدین. مهرابی توانا، علی. عیدی، اکرم (1390). اثر ضد باکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم بر آگروباکتریوم تومه فاسینس. مجله طب نظامی. دوره 13، شماره 2، تابستان، صفحه 65-70.

منابع انگلیسی:

1. Burr TJ, Otten L. Crow gall of grape: Biology and disease management. Ann Rev Phytopathol. 1999;37:53-80
2. Burr TJ, Katz BH. Isolation Agrobacterium tumefaciens Biovar 3 from Grapevine Galls and Sap, and from Vineyard Soil. Ecology and Epidemiology. 1982.
3. Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW. Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974;71(9):3672-6
4. Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell. 1977;11(2):263-71.
5. de Cleene CM. Crown gall: Economic importance and control. Zentralbl Bakteriologie Naturwiss. 1979;134(6):551-4.
6. Kuzmanovic, et al. Identification of Agrobacterium vitis as a casual agent of grapevine crown gall in Serbia. Arch. Biol. Sci. Belgrade. 2012. 64(4), 1487-1494.
7. Matthyse AG. Initial interactions of Agrobacterium tumefaciens with plant host cells. Crit Rev Microbiol. 1986;13(3):281-307.
8. Moore LW. Use of Agrobacterium radiobacter in agricultural ecosystems. Microbiol Sci. 1988;5(3):92-5.
9. Petrunia IV, Frolova OY, Komarova TV, Kiselev SL, Citovsky V, Dorokhov YL. Agrobacterium tumefaciens induced bacteraemia does not lead to reporter gene expression in mouse organs. PLoS One. 2008;3(6):e2352.
10. Ream LW, Gordon MP. Crown Gall disease and prospects for genetic manipulation of plants. Science. 1982; 218(4575):854-9.
11. Tomlinson AD, Ramey-Hartung B, Day TW, Merritt PM, Fuqua C. Agrobacterium tumefaciens ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. Microbiology. 2010;156(9):2670-81.
12. Ulker B, Li Y, Rosso MG, Logemann E, Somssich IE, Weishaar B. T-DNA-mediated transfer of Agrobacterium tumefaciens chromosomal DNA into plants. Nat Biotechnol. 2008;26(9):1015-7.

جدول 1- نمونه های گرفته شده از 5 مزرعه

شماره مزرعه	باغات ایستاده	باغات پایه کوتاه
مزرعه 1 (امامزاده)	2 نمونه	2 نمونه
مزرعه 2 (امامزاده)	0 نمونه	4 نمونه
مزرعه 3 (امامزاده)	2 نمونه	2 نمونه
مزرعه 1 (قامت)	1 نمونه	3 نمونه
مزرعه 1 (قامت)	3 نمونه	1 نمونه

جدول 2- خصوصیات ظاهری کلنی های جداسازی شده از محیط طبیعی

نوع کلنی	رنگ	اندازه	شفافیت	هاله اطراف کلنی
نوع 1	زرد	بزرگ	دارد	دارد
نوع 2	زرد	کوچک	دارد	دارد
نوع 3*	سفید	کوچک	دارد	ندارد
نوع 4*	سفید	بزرگ	ندارد	ندارد
نوع 5	نارنجی	بزرگ	ندارد	ندارد

* کلنی های انتخابی برای انجام مراحل بعدی شناسایی

جدول 3: مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه برای تأیید آگروباکتریوم ویتیس .

Name	Primer	Sequence	Size
Agrobacterium tumefaciens	Forward	5'-ATCATTTGTAGCGACT-3'	730bp
	Reward	5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3'	
Agrobacterium vitis	Forward	5'-GGGGCAGGATGCGTTTTTGTAG-3'	466
	Reward	5'-GACGGCACTGGGGCTAAGAT-3'	

جدول 4- ویژگی های بیوشیمیایی آگروباکتریوم ویتیس

Studied strain	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium Vitis</i>	باکتری
+	+	+	هوازی
+	+	+	اکسیداز
+	+	+	کاتالاز
+	-	+	سیمون سیترات
+	+	+	نمک 2٪
+	+	+	رشد در 35 درجه
+	+	+	اوره
گاز+ قند+ - H ₂ S	گاز+ قند+/- - H ₂ S	گاز+ قند+ - H ₂ S	TSI
+	+	+	MR
+	+	+	SIM
-	+	-	حرکت در 7 pH

جدول 5- میزان تاثیر سولفات مس در رقتها و زمانهای مختلف بر رشد آگروباکتریوم ویتیس (CFU/ml).

زمان (ساعت)	سولفات مس (gr/l)					شاهد
	10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	0/01	1	
T=0	181	176	125	166	155	198
	175	169	119	158	160	201
T=2	242	238	229	86	65	200
	238	235	199	80	74	202
T=4	196	195	138	69	54	200
	198	198	138	60	38	200
T=6	229	222	136	53	23	197
	225	220	145	42	18	201
T=22	57	51	48	4	1	200
	50	38	20	3	1	202
T=24	42	40	32	0	0	200
	30	25	28	0	0	200

تصاویر



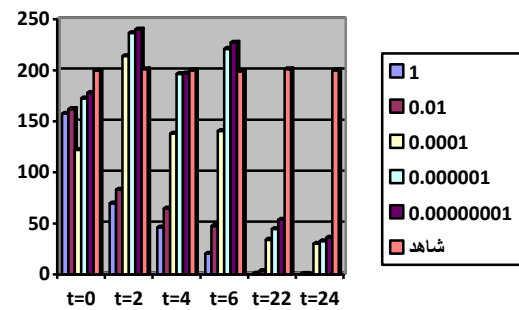
تصویر 2- کلنی های باکتریایی آگروباکتریوم ویتیس



تصویر 1- نمایی از درخت انگور آلوده به گال طوقه

نمودارها

نمودار 1- نمودار مقایسه‌ای میانگین کلنی‌های رشد کرده در محیط حاوی سولفات مس در زمان‌ها و رقت‌های مختلف



سپاسگزاری:

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه به خاطر تصویب این پایان نامه نهایت تشکر را دارند. همچنین نویسندگان این پژوهش مراتب تقدیر و تشکر خود را از زحمات آقای مهندس رضا دلشاد ابراز می‌دارند.