مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۴، سال ۱۳۸۳ (۹۱۹-۹۱۱)

بررسی ویژگیهای باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات جنوب ایران و ارزیابی توان آنتاگونیستی آنها علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات

غلام خداکرمیان
استادیار، مجتمع آموزش عالی ابوریحان، دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۱۰/۱۷

خلاصه

از نمونه‌های برگ، شاخه‌های جوان و میوه مرکبات استانهای کرمان و هرمزگان تعداد ۳۰ استرین از باکتریهای جنس سودوموناس فلورسنت کننده جدا و ویژگیهای فنوتیپی و اسیدهای چرب آنها تعیین گردید. نتایج بررسیهای فنوتیپی نشان داد که این استرینها به دو گونه *P. fluorescens* بیووارهای سه و پنج و *P. putida* bv. B تعلق دارند. آنالیز اسیدهای چرب استرینهای نماینده *P. fluorescens* و *P. putida* با کروماتوگرافی گاز-مایع به ترتیب وجود ۱۶ و ۱۳ اسید چرب را در هریک مشخص نمود که اسیدهای چرب 3-OH 0 : 10، 0 : 12، 12:0 2-OH ، 3-OH 0 : 12، 16:0، 16:1w7c و 17: 0 CYCLO در استرینهای *P. fluorescens* و اسیدهای چرب 3-OH 0 : 10، 0 : 12، 12:0 2-OH ، 3-OH 0 : 12، 16:0، 16:1w7c ، 17: 0 CYCLO و 19:0cyclow8c در استرینهای *P. putida* مهم بودند. بررسی توانایی بیوکنترل استرینهای منتخب علیه باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* عامل بیماری شانکر آسیایی مرکبات در شرایط آزمایشگاه نشان داد که این استرینها بازدارنده بوده و دارای تواناییهای متفاوت هستند. کاربرد استرینهای منتخب نماینده هر دو گونه فوق در شرایط گلخانه برای کنترل بیماری شانکر باکتریایی لیموعمانی تعداد لکه‌های بیماری را بین ۲۳/۷۸٪ تا ٦٤٪ کاهش دادند.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas fluorescens*، *P. putida*، pv. citri *Xanthomonas axonopodis*، بیوکنترل شانکر باکتریایی مرکبات، کروماتوگرافی گاز-مایع، اسید چرب، جنوب ایران

مقدمه

درختان مرکبات از گونه‌های بومی شرق آسیا سرچشمه گرفته‌اند که اکنون در کشورهای آرژانتین، استرالیا، برزیل، چین، کوبا، مصر، هند، اسرائیل، ایتالیا، ژاپن، مکزیک، مراکش، آفریقای جنوبی، اسپانیا و آمریکا کشت می‌شوند. در ایران مناطق کشت مرکبات شامل استانهای گیلان، مازندران، سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، خوزستان و فارس می‌باشد(۱).

عامل بیماری شانکرمرکبات *Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces emend Vauterin *et al.* است که دارای سه پاتووار شامل *X. a.* pv. *citri* یا تیپ A، *X. a.* pv. *aurantifolii* یا تیپهای B ، C، و D و *X. a.* pv. *citrumelo* یا تیپ E می‌باشد(۲۷). بیماری شانکر مرکبات نخست در اواخر قرن نوزده در ژاپن دیده شد. در آمریکا پیشینهٔ آن به سال ۱۹۱۰ برمی‌گردد که در این سال پایه‌های نارنج سه

برگ آلوده از ژاپن به آمریکا وارد شد. پاتوتیپ A یا فرم آسیایی دارای گسترده‌ترین دامنه میزبانی بوده که به دلیل دامنه میزبانی گسترده و شدت تخریب آن جزء بیماریهای قرنطینه‌ای شمرده می‌شود. این پاتوتیپ بیشتر کولتیوارهای مرکبات را آلوده می‌کند ولی درختان گریپ‌فروت، انواع لیموهای ترش و شیرین و برخی کولتیوارهای پرتقال نسبت به آن حساسیت بیشتری دارند. در ایالت فلوریدای آمریکا در خلال برنامه ریشه‌کنی پاتوتیپ A در طی چند نوبت میلیونها اصله درخت و دهها نهالستان تخریب و سوزانده شده‌اند علائم شانکر آسیایی مرکبات، روی برگها، میوه‌ها و شاخه‌های جوان به صورت زخمهای برجسته‌ای است که این زخمها نخست در پشت برگ و سپس بر روی آن دیده می‌شوند. همزمان با گسترده شدن زخمها کناره‌های آنها برجسته شده و قسمت میانی آنها فرورفته می‌گردد که به آن فرم آتشفشانی می‌گویند (۸، ۹، ۱۱، ۱۲، ۲۱).

آلودگی شدید درختان مرکبات به پاتوتیپ A موجب ریزش برگ، ریزش میوه‌های نارس، مرگ سرشاخه‌های جوان و در نهایت زوال کامل درخت می‌شود. امروزه ۳۰ کشور دنیا با این بیماری دست به گریبان هستند ولی فرم آسیایی شانکر مرکبات (تیپ A) از جنوب آفریقا، استرالیا، جزایر فی‌جی، موزامبیک، نیوزلند و آمریکا ریشه کن شده است (۱۹، ۲۰، ۲۱). در ایران شانکر باکتریایی مرکبات نخستین بار، در سال ۱۳۶۸ بر روی درختان لیموترش در کهنوج از استان کرمان دیده و باکتری عامل آن جدا سازی و شناسایی شد(۴). در سال ۱۳۷۴ استرینهای دیگری از باکتری شانکر مرکبات از لیموترشهای بازار ساری جدا و به *X. a.* pv. *citri* نسبت داده شدند(۵). براساس مطالعات خداکرمیان و همکاران گروهی ازاسترینهای جدا شده از مرکبات جنوب ایران توانستند علائم تیپیک شانکر باکتریایی ناشی از پاتوار *X. a.* pv. *citri* (تیپ شانکر آسیایی) را روی درختان مرکبات شامل *Citrus aurantifolia, C. limettioides, C. limon, C. jambhiri, C. aurantium C. sinensis, C. grandis, Poncirus trifoliata* **X** *C. Paradisi, C. Paradisi*, *C. medica, P. trifoliata, C. reticulata* و *C. sinensis* **X** *P. trifoliata* پدید آورند (۲، ۳).

تاکنون روشهای مختلفی برای کنترل یا ریشه‌کنی درختان یا نهالهای آلوده به کار گرفته شده است. از جمله این روشها می‌توان ریشه‌کنی درختان و نهالهای آلوده، جلوگیری از ورود و پخش اندامهای گیاهی بیمار، مبارزه شیمیایی و بیولوژیکی، کاشت ارقام مقاوم و ایجاد بادشکن در اطراف و بین ردیفهای باغ را نام برد(۹، ۱۹، ۲۰، ۲۱) .

در کشور هندوستان از برگهای لیمو چهار گونه باکتری شامل: *Bacillus subtilis*، *B. polymixa*، *Pseudomonas fluorescens* و *Serratia marcescens* و سه گونه قارچ به نامهای: *Aspergillus terreus*، *Trichoderma viride* و *T. harzianum* جدا شده که در آزمایشگاه از رشد X. c. pv. citri جلوگیری کرده‌اند. درشرایط باغ B. subtilis از همه مفیدتر بوده و بیماری را ٪۶۱/۹ کاهش داده است (۱۷).

تاکنون روشهای متعددی برای شناسایی و رده‌بندی باکتریهای بیماریزای گیاهی به کار رفته از جمله بررسی ویژگیهای فنوتیپی وآنالیز اسیدهای چرب از روشهای مورد استفاده برای نیل به این هدف بوده است. کاربرد روش آنالیز اسیدهای چرب برای رده‌بندی و شناسایی باکتریها ابتدا توسط ابل و همکاران (۱۹۶۳) گزارش شد که تاکنون برای رده‌بندی و شناسایی باکتریهای زیادی استفاده شده است. بررسیهای استید (۱۹۹۲) نشان داد که باکترهای جنس سودوموناس از نظر الگوی اسیدهای چرب در شش گروه عمده قرار می گیرد که هر گروه خود دارای زیر گروههایی است (۲۳). بررسی ۹۷۵ استرین از پاتووارهای مختلف گونه‌های *Xanthomonas*، توسط یانگ و همکاران (۱۹۹۳) نشان داده که این استرینها در سطح گونه با روش آنالیز اسیدهای چرب قابل تفکیک می‌باشند (۲۸). در یک بررسی توسط ولس و همکاران (۱۹۹۳) ۱۹۰ استرین متعلق به شش جنس شامل *Erwinia, Bacillus, Clostridium, Cytophaga, Xanthomonas* و *Pseudomonas* قابل تفکیک و ردیابی بوده‌اند (۲۹). هدف از این بررسی شناسایی و ارزیابی توان آنتاگونیستی استرینهای سودوموناسهای فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات بوده تا در برنامهٔ مدیریت کنترل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

الف- نمونه‌برداری، جداسازی و به دست آورن تک‌کلنی از باکتریهای آنتاگونیست

اندامهای سالم و آلودهٔ مرکبات ازاستانهای کرمان(جیرفت و کهنوج) و هرمزگان (میناب و رودان) جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه به ازای هرگرم بافت (برگ، شاخه یا میوه) یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی آنها ریخته شد . پس از گذشت یک تا دو ساعت از هر نمونه دو تا سه لوپ در تشتکهای حاوی محیط کشت King's B کشت و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد در انکوباتور گذاشته شدند. پس از گذشت سه روز از هر تشتک تک‌کلنی یا تک‌کلنیهایی که ویژگیهای تیپ *Pseudomonas* را داشتند، برگزیده و دوباره روی محیط کشتهای مزبور تا رسیدن به خلوص کامل کشت شدند.

ب- بررسی ویژگیهای فنوتیپی باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات

برای بررسی ویژگیهای فنوتیپی استرینهای مورد بررسی از روشهای استاندارد برای تعداد ۳۰ استرین انتخاب شده به شرح زیر استفاده گردید :

آزمون فوق حساسیت در توتون به روش کلمنت و همکاران (۱۹۶۴)، آزمون هوازی یا بی هوازی بودن (O/F) بـه روش هیو و لیفسون (۱۹۵۳)، آزمون اکسیداز به روش کوواکس (۱۹۵۶)، آزمون حساسیت به KOH 3 ٪ به روش ساسلو و همکاران (۱۹۸۲)، آزمونهای کاتالاز، تولید لوان بر روی محیط کشت سوکروز ۵٪ و احیای نیترات به روش لیلیوت و همکاران (۱۹۸۴)، آزمونهای تحمل نمک طعام پنج درصد، تولید آنزیمهای پکتیناز، لهاندن سیب زمینی، رشد در دمای ۴ و ۴۱ درجه سانتیگراد و تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت King's B به روش شاد (۱۹۸۸)، هیدرولیز آژرنین به روش تورنلی (۱۹۶۰)، هیدرولیز نشاسته به روش گراهام (۱۹۶۷) انجام شد. آزمونهای لیستیناز و ذوب ژلاتین به روش مک فادین (۱۹۸۰) انجام شد . برای بررسی استفاده استرینهای باکتری از کربوهیدراتهای مختلف، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی شامل گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، سوکروز، زایلوز، ترهالوز، آرابینوز، آدونیتول، سوربیتول، مزو- اینوزیتول، آلفا-متیل‌گلوکوزید، اتانول، گلیسرول، نیکوتینات، سیترات، لاکتات، مالات، تریپتوفان و آرژنین از محیط پایه آیر (۱۹۶۹) استفاده شد که غلظت نهایی این مواد به میزان ۰/۳ - ۰/۲ درصد و آگارز به میزان ۱/۲٪ و نتیجه تا یک ماه پس از کشت بررسی گردید(۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۴، ۲۵).

ج- بررسی اسیدهای چرب باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات

استخراج اسیدهای چرب به صورت زیر انجام شد. استرینهـای
باکتری در تشتکهای دارای محیط کشت آگار غذایی[1]، کشت و مدت دو روز در دمای ۲۸ درجهٔ سانتیگراد، گذاشته شدند. سپس در پلیتهای دارای محیط کشت TSA ویژهٔ آنالیز اسیدهای چرب که دارای فرمول زیر بود کشت داده شدند:

1.5% Bacto Agar (Difco)
3% Trypticase Soy Broth (BBL)

تشتکها مدت دو روز، در دمای ۲۸ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شدند. یک لوپ چهار میلی‌متری، از سلولهای باکتری، برداشت شد. اسیدهای چرب موجود در سلولهای باکتری یا FAMEs [2] با استفاده از روش استید تهیه شد (۲۲ و ۲۳).

اسیدهای چرب حاصله، به وسیلهٔ gas liquid chromatography یا GLC مدل 5890 A (Hewlett – Packard Co., Avondale. PA. آنالیز شد. ستون مورد استفاده Fused silica با ابعاد 25m x 0.2 mm پوشش داده شده با methyl phenyl silicone (Hewlett - Packard Co.) و گاز حامل هیدروژن بود.اسیدهای چرب پس از جداسازی به وسیله شناساگرFID[3] مورد شناسایی قرار گرفتند. داده‌های به دست آمده، به کامپیوتر متصل به دستگاه کروماتوگرافی گازی منتقل و توسط نرم افزار MIS version 3.2 آنالیز و ارزیابی شد.

---

1 . nutrient agar
2 . fatty acid methyl esters
3 . flame ionization detector

د- ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط آزمایشگاه.

برای بررسی تأثیر باکتریهای سودوموناس فلورسنت در بازدارندگی از رشد باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط آزمایشگاه، استرینهای باکتری آنتاگونیست به صورت لکه‌ای در تشتکهای حاوی محیط King's B در قالب یک طرح کاملا تصادفی در سه تکرار کشت و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به صورت زیر مورد استفاده قرار گرفتند. برای تیمار شاهد به جای باکتری آب مقطر استریل بر روی محیط کشت قرار داده شد و در مراحل بعدی همانند سایر تیمارهای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلنیهای باکتریهای آنتاگونیست کشت داده شده توسط پنبه استریل آغشته به الکل از سطح تشتک پاک و سپس در قسمت در هر پتری دو قطره کلروفرم اضافه و به صورت وارونه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. پس از آن در تشتکها در شرایط استریل باز و به مدت ۳۰ دقیقه هوا دهی شدند و پس از آن یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیماریزا در هر پتری توسط میله شیشه‌ای پخش و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. قطر هاله بازدارندگی هر تکرار باکتری آنتاگونیست اندازه‌گیری شد و پس از ثبت در قالب طرح آماری به کار رفته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و میانگینهای آنها جهت انتخاب استرینهای مختلف از هر گروه آماری برای کاربرد در شرایط گلخانه مقایسه شد.

هـ- ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط گلخانه

برای بررسی تأثیر باکتریهای سودوموناس فلورسنت در بازدارندگی از بیماریزایی باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط گلخانه، سوسپانسیون باکتری بیماریزا و آنتاگونیست با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و صد هزار بار رقیق شد. نهالهای لیموی آب(لیمو عمانی) با سوسپانسون باکتری آنتاگونیست تا مرحله جاری شدن آب از سطح برگها توسط اسپری کردن آغشته شدند و در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر استریل استفاده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت همه نهالها توسط باکتری بیماریزا اسپری شدند و روی آنها به مدت ۲۴ ساعت پلاستیک کشیده شد و در گلخانه با دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند.

این بخش از آزمایش در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با سه تکرار و هر تکرار شامل پنج اصله نهال لیموعمانی انجام و پس از گذشت دو ماه تعداد لکه‌های موجود بر روی ۵۰ عدد برگ در هر تیمار صرفنظر از اندازه آنها شمارش و در قالب طرح اجرا شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

استرینهای بررسی شده همگی روی محیط King's B تولید رنگ فلورسنت نموده و ویژگیهای آرژنین دی‌هیدرولاز، رشد در چهار و ۴۱ درجه سانتیگراد و اکسیداز در همه آنها مثبت و اکثرا توانایی احیاء نیترات را داشتند ولی هیچیک قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون، تولید لوان روی محیط حاوی ۵٪ سوکروز و فعالیت پکتولیتیکی روی حلقه‌های سیب زمینی نبودند و جز یک گروه همه ژلاتین را هیدرولیز نمودند. نتایج آزمونهای فنوتیپی در جدول شماره یک آمده است.

نتیجه ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط آزمایشگاه به صورت تجزیه واریانس در جدول شماره سه و مقایسه میانگینها و گروه‌بندی تیمارها در جدول شماره چهار خلاصه شده است.

تجزیه آماری نتایج ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط گلخانه در جدول ۵ و مقایسه میانگینها و گروه‌بندی تیمارها در جدول ۶ خلاصه شده است.

با بررسی ویژگیهای فنوتیپی ۳۰ استرین انتخاب شده و تطبیق آن با جداول ارایه شده توسط بوسیس و همکاران (

۲۰۰۰) و شاد (۲۰۰۱) استرینهای مورد بررسی به گونه‌های *P. fluorescens* (بیووارهای یک و پنج) و *P. putida* (بیووار B) تعلق داشتند. استرینهای مورد بررسی توانایی رنگ فلورسنت روی محیط King'B را داشته و واکنش اکسیداز. آرژنین دی‌هیدرولاز، رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد در آنها مثبت و واکنش گرم، رشد در چهار درجه سانتیگراد، تولید لوان، لهاندن ورقه‌های سیب زمینی و ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون در آنها منفی بود. در سایر ویژگیهای مورد بررسی استرینهای هر گروه با جداول ارایه شده بوسیس و همکاران (۲۰۰۰) و شاد (۲۰۰۱) دارای انطباق قابل قبول جهت تفکیک در حد بیووار بوده و شناسایی شدند.

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی استرینهای سودوموناس جدا شده از فیلوسفر مرکبات جنوب ایران

نوع آزمون	*P. fluorescens* bv. III	*P. fluorescens* bv. V	*P. putida* bv. B
توانایی هوازی یا بی‌هوازی	هوازی	هوازی	هوازی
حساسیت به KOH ۳٪	+	+	+
کاتالاز	+	+	+
تحمل نمک طعام ۵٪	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	-	-	-
تولید رنگ فلورسنت	+	+	+
تولید رنگ غیرفلورسنت	-	-	-
آرژنین دی‌هیدرولاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
احیاء نیترات	+	-	-
لیسیتیناز	+	+	-
لهاندن سیب زمینی	-	-	-
ایجاد فوق حساسیت روی برگ توتون	-	-	-
تولید لوان	-	-	-
رشد در ۴ درجه سانتیگراد	-	-	-
رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	-
رشد روی:			
ال- آرابینوز	-	+	+
دی - زایلوز	+	+	+
ال- تارتاریک اسید	+	+	-
دی- آلانین	+	+	+
سوربیتول	+	+	+
ترهالوز	V	V	-
دی-گالاکتوز	+	+	-
سوکروز	V	+	+
مزواینوزیتول	V	-	-
آدونیتول	+	+	-
اتانول	-	-	-
ژرانیول	V	V	+
بوتیرات	-	V	+
والرات	-	V	+
نیکوتینات	V	-	+
فنیل استات	+	V	+
بوتیل آمین	+	+	+
گلوکز	+	+	+
فروکتوز	+	+	+
گلیسرول	+	+	+
سیترات	-	+	+
مالات	+	-	+
تریپتوفان		+	+
آرژنین			+

- : واکنش منفی جدایه به آزمون + : واکنش مثبت جدایه به آزمون

V : متغیر یا بین ۲۱ تا ۸۹ درصد جدایه ها +

نتیجه آنالیز اسیدهای چرب استرینهای مورد بررسی در جدول شماره دو خلاصه شده است.

جدول ۲- اسیدهای چرب باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات

P. fluorescens	*P. putida*
10 : 0 3OH	10 : 0
11 : 0 ISO	10 : 0 3-OH
11 : 0 3OH	12 : 0
12 : 0	12 : 0 2-OH
12 : 0 2-OH	12 : 1 3-OH
12 : 1 3-OH	12 : 0 3-OH
12 : 0 3-OH	14 : 0
14 : 0	16 : 0
14 : 0 ISO	16:1w7c
16 : 0	17 : 0 ANTISO
16:1w7c	17 : 0 CYCLO
16 : 0 ISO	18 : 0
17 : 0 ISO 3-OH	cyclow8c C19:0
17 : 0 ANTISO	
17 : 0 CYCLO	
18 : 0	

جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قطرهاله بازدارندهٔ باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات

منابع تغییرات	درجه آزادی	جمع مربعات	MS
کل	۵۹	۳۱۵/۲۹	
تیمار	۱۹	۳۱۲/۸۸	۱۶/۴۷**

خطا	۴۰	۲/۴۱	۰/۰۶

**: معنی دار در سطح یک درصد

الگوی اسیدهای چرب استخراج شده نیز با توجه به داده‌های به دست آمده برای هریک از گونه‌های شناسایی شده مشخص و تفکیک کننده بود که در جدول شماره دو خلاصه شده است. بررسیهای استید (۱۹۹۲) نشان داد که باکترهای جنس سودوموناس از نظر الگوی اسیدهای چرب در شش گروه عمده قرار گرفته که هر گروه خود دارای زیر گروه‌هایی می‌باشد که نتیجه آنالیز اسیدهای چرب با داده‌های مزبور مطابقت دارد (۲۳). یانگ و همکاران (۱۹۹۳) با کاربرد آنالیز اسیدهای چرب ۹۷۵ استرین از پاتووارهای متفاوت گونه‌های *Xanthomonas*، نشان دادند که با این روش می‌توان گونه‌های متفاوت این جنس را از همدیگر متمایز نمود. به علاوه توان این روش برای متمایز نمودن پاتووارهای درون یک گونه که بسیار به همدیگر شبیه می‌باشند، تنها به طور نسبی و در برخی موارد قابل پذیرش است. از آنجا که آنالیز اسیدهای چرب، روشی آسان و کم هزینه بوده و اجرای آن به زمان کمتری در مقایسه با برخی روشهای دیگر نیاز دارد، در مورد شمار فراوانی از استرینها قابل انجام می‌باشد. این روش به سبب مزایای گفته شده و دقت مناسب آن، در سواسازی و تفکیک گروه‌ها و گونه‌ها از همدیگر، روش ایده‌آلی است (۲۸). نتایج این قسمت نیز در حد مورد بررسی با نتایج به دست آمده توسط ولس و همکاران (۱۹۹۳) مطابقت دارد. با توجه به تنوع فراوان در میان باکتریها و نیز محدودیتها و توانمندیهای هر روش از دیدگاه شناسایی باکتریها بهترین کار استفاده از چند روش به صورت همزمان یا استفاده از تاکسونومی پلی‌فازی است تا دقت شناسایی به حد قابل اعتمادی برسد که استفاده از این روش به وسیله واندام و همکاران (۱۹۹۶) مورد بررسی قرار گرفته و توانایی آن با توجه به تحقیقات مختلف تایید شده است (۲۶).

جدول ۴- مقایسه میانگین قطرهاله بازدارندهٔ باکتریهای سودوموناس فلورسنت در شرایط آزمایشگاه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد

استرین باکتری	میانگین قطر هاله بازدارنده (سانتیمتر)	گروه آماری در سطح ۱٪
PF 19	۶/۴۰	A
PF 9	۶/۱۶	A
PF 15	۵/۹۳	A
PP 1	۵/۹۳	A
PP 12	۴/۸۶	B
PF 5	۴/۸۰	B
PF 16	۳/۹۳	C
PP 2	۳/۸۳	C
PP 20	۳/۱۳	D
PF 9	۳/۰۰	D
PP 11	۲/۵۳	D
PF 10	۱/۳۳	E
PF 3	۱/۱۶	E
PF 14	۱/۰۳	E
PP 17	۰/۴۰	F
PF 7	۰/۳۶	F
PF 4	۰/۲۶	F
PP 8	۰/۰۰	F
PP 13	۰/۰۰	F
PP 18	۰/۰۰	F

- قطر هاله بازدارنده میانگین های سه تکرار می باشند .
- میانگین‌های دارای حروف گروه آماری متفاوت در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی دار دارند .

جدول ۵- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به توان آنتاگونیستی باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط گلخانه.

منابع تغییرات	درجه آزادی	جمع مربعات	MS
کل	۲۰	۶۸۳۵/۲۴	
تیمار	۶	۶۵۳۷/۹۱	۱۰۸۹/۶۵۱ **
خطا	۱۴	۲۹۷/۳۳	۲۱/۲۳۸

**: معنی دار در سطح یک درصد

جدول ۶- مقایسه میانگین توان آنتاگونیستی باکتریهای سودوموناس فلورسنت جدا شده از فیلوسفر مرکبات علیه باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط گلخانه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد

استرین باکتری	میانگین تعداد لکه‌ها در ۵۰ برگ	گروه آماری در سطح ۱٪
کنترل مثبت	۵۴/۶۶	A
PF 10	۳۵/۰۰	B
PP 12	۳۴/۶۶	B
PP 20	۱۷/۶۶	C
PF 16	۱۳/۶۶	C
PF 19	۱۳/۰۰	C
کنترل منفی	۰۰/۰۰	D

× داده‌ها میانگین های سه تکرار می باشند .
میانگین‌های دارای حروف گروه آماری متفاوت در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی دار دارند .

استرینهای مورد بررسی در آزمون توان بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه، عموما دارای هاله بازدارنده رشد بودند. از تعداد ۲۰ استرین منتخب از بین ۳۰ استرین تنها تعداد سه استرین توان بازدارندگی از رشد را نداشتند. تعداد پنج استرین به کار گرفته شده در بررسیهای گلخانه‌ای که نماینده گروه‌های آماری مختلف با توجه به بررسیهای آزمایشگاهی بودند همگی توانایی کاهش تعداد لکه‌های ناشی از باکتری عامل شانکر مرکبات را داشتند ولی هیچکدام قادر به کنترل کامل بیماری نبودند. این استرینها تعداد لکه‌ها را ۲۳/۷۸٪ تا ۶۴٪ در مقایسه با کنترل مثبت کاهش دادند. الگوی عمومی توان بازدارندگی استرینها در شرایط گلخانه با گروه‌بندی استرینها از نظر توانایی بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه مطابقت داشته ولی استرینهایی که در آزمایشگاه از نظر هاله بازدارنده رشد در گروه‌های آماری متفاوت بودند، در شرایط گلخانه در یک گروه قرار گرفتند. این پدیده در بسیاری از نتایج کنترل بیولو ژیک ارایه شده توسط محققین دیگر نیز به چشم می‌خورد. از آنجا که شرایط آزمایشگاه به صورت کنترل شده و بدون دخالت میزبان می‌باشد لذا تفاوتهای دیده شده را می‌توان به دخالت شرایط محیط، میزبان و وجود سایر مکانیسمهای بیوکنترل نسبت داد. به طور کلی شرایط طبیعی بسیار پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاه بوده و در نهایت برآیند و اثر متقابل این شرایط است که سهم هریک از مکانیسمها را در بیوکنترل تعیین می‌نماید. مواد بازدارنده ترشح شده توسط میکروارگانسمها الزاما دوام یکسان نداشته و برخی از توان پایداری بیشتری برخوردارند که خود می‌تواند منشا تفاوت در عملکرد استرینها تحت شرایط متفاوت باشد به علاوه از آنجا که محیط درون ظروف پتری محدود میباشد با گذشت زمان غلظت مواد بازدارنده بالا رفته و تاثیر آن بیشتر می‌شود در حالیکه چنین شرایطی در محیط گلخانه برقرار نمی‌باشد. برخی از استرینهای باکتریایی غیر از تولید مواد بازدارنده و سیدروفور، توان رقابتی بالاتری داشته و به علاوه قادرند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمایند و مجموعه این عوامل در تلفیق با سایر شرایط محیطی تعیین کننده توانایی بیوکنترل آنها در حضور میزبان و استرین بیماریزا است. بنابراین عدم انطباق نتایج آزمایشگاه با شرایط گلخانه می‌تواند به دلایل ذکر شده قابل انتظار باشد وبه همین خاطر نمی‌توان صرفا براساس نتایج به دست آمده در شرایط آزمایشگاه اقدام به توصیه برای استفاده از استرینی خاص در شرایط گلخانه یا شرایط طبیعی نمود. نتایج این قسمت از کار نیز با داده‌های پابیترا کالیتا بورال و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت داشته و اظهارات آنها را حمایت می‌نماید (۱۷). در یک جمع بندی کلی از مجموع نتایج بدست آمده می توان چنین استنباط کرد که کنترل بیولوژیکی روش بالقوه‌ای جهت کمک به کنترل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات است که می‌تواند به صورت تلفیق با سایر روشهای کنترل از جمله هرس و تقویت غذایی درختان مورد استفاده قرار گیرد. در کنترل تلفیقی یک بیماری سعی بر آن است که یک جنبه را عملیات زراعی، باغبانی یا کنترل بیولوژیک در نظر گرفته و جنبه دیگر در صورت ضرورت و اجبار استفاده از ترکیبات شیمیایی کم خطر باشد تا در حد معقول به سلامت محیط زیست آسیب نرسد.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱ . ابراهیمی، ی. ۱۳۵۹. سیر تکاملی مرکبات در ایران. نشریه سازمان تحقیقات اصلاح بذر و نهال، آذر ۱۳۵۹، صفحات ۳۸ تا ۵۰.

۲. خداکرمیان، غ.، ح. رحیمیان، م. محمدی، و ع. علامه. ۱۳۷۸. خصوصیات فنوتیپی، دامنه میزبانی و چگونگی پراکنش استرینهای باکتری *Xanthomonas axonopodis* عامل شانکر مرکبات جنوب ایران. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۳۵: شماره ۱-۳: صفحات ۱۰۲ -۱۱۱.

۳. خداکرمیان، غ.، ژ. سوینگز، س. استوارت، س. ون‌ایژن و ح. رحیمیان. ۱۳۷۹. گروه‌بندی استرینهای باکتری عامل ایجاد زخم و لکه‌برگی مرکبات از آسیا، آمریکا و استرالیا بر اساس الگوی الکتروفورز پروتیین و سیستم بیولوگ. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۳۶: شماره ۴-۶: صفحات ۱۶۵ -۱۷۸.

۴ . علیزاده، ع. و ح. رحیمیان. ۱۳۶۹. شانکر باکتریایی مرکبات در استان کرمان. مجله بیماریهای گیاهی، ۲۶: ۱۱۸.

۵ . مستوفی‌زاده قلمفرسا، ر. ۱۳۷۵. بررسی استرینهای عامل شانکر باکتریایی مرکبات در جنوب ایران. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۷۶ صفحه.

6. Abel, K., H. De Schmertzing, & J. I. Peterson. 1963. Classification of microorganism by analysis of chemical composition. *Journal of Bacteriology*, 85, 1039-1044.
7. Bossis, E., P. Lemanceau, X. Latour, & L. Gardan. 2001 The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie,* 20 (2000) 51–63
8. Gottwald, T.R., J. H. Graham, E. L. Civerolo, H. C. Barrett, & C. J. Hearn. 1993. Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus bacterial canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll suceptibility . *Plant Disease,* 77: 1004 -9.
9. Graham, J. H. & T. R.Gottwald. 1991. Research perspectives on eradication of citrus bacterial disease in Florida. *Plant Disease,* 75 : 1193 -1200 .
10. Graham, D. C. & W. Hodgkiss. 1967. Identification of gram negative,yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. *Jounal of Applied Bacteriology,* 30: 175 - 189.
11. Graham, J. H., T. R. Gottwald, & D. Fardelmann. 1990. Cultivar specific interaction of *Xanthomonas campestris* from Florida that cause citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Dis*ease, 74 : 753 -756.
12.Graham, J. H., T. R. Gottwald, T. D. Riley, & M. A. Bruce. 1992.Suseptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology,* 82: 452 - 457.
13. Klement, Z., G. L. Farkas, & H. Lovrekovich. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. . *Phytopathology,* 54: 474 - 477.
14. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
15. Lelliot, R. A. & Dickey, R. S. 1984**.** Genus VII Erwinia P. 469-476 In: Krieg, N. R., Halt, J. G. (ed). Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology,Vol 1. The Williams and Wilkins co., Baltimore
16. Misaghi, I. & R. G. Grogan. 1969. Nutritional and biochmical composition of plant pathogenic and saprophytic fluorescent *Pseudomonas. Phytopathology*, 59**:** 1436 – 1450.
17. Pabitra Kalita Boral, L. & K. N. Bhagabati. 1996. Phylloplane microflora of citrus and their role in managment of citrus canker . *Indian Phytopathology,* 49: 234- 237.
18. Schaad, N. W., J. B. Jones, & W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third ed. APS Press, Minnesota, 373 pp.
19. Schouties, C. L., E. L. Civerolo, J. W. Miller, R. E. Stall, C. J. Krass, S. R. Poe, & E. P. Ducharme. 1987. Citrus canker in Florida. *Plant Disease,* 71: 388 - 395.
20. Schubert, T. S., J. W. Miller, & D. W. Gabriel. 1996. Another outbreak of bacterial canker on citrus in Florida. *Plant Disease,* 80:1208.
21. Stall, R. E. & E. L. Civerolo. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Floride . *Annual Review of Phytopathology,* 29: 399-420.
22. Stead, D. E. 1989. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. *Buletin OEPP/EPPO*, 19**:** 57 -68.
23. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles *International Journal of Systematic Bacteriology,* 42:281-295.
24. Suslow, T. U., M. N. Schroth, & M. Isaka. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology,* 72: 917 - 918.
25. Thornley, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology,* 23**:** 37 52.
26. Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters, & J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematcis. *Microbiology Review,* 60: 407 - 438.

27. Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters, & J. G. Swings. 1995 . Reclassification of *Xanthomonas. International Journal of Systematic Bacteriology,* 45: 472 - 489.
28. Wells, J. M., J. E. Butterfield, & L. G. Revear. 1993. Identification of bacteria associated with postharvest diseases of fruits and vegetables by cellular fatty acid composition. *Phytopathology,* 83: 445-455.
29. Yang, P., L. Vauterin, M. Vancannyet, J. Swings, & K. Kersters. 1993. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas. Systematic and Applied Microbiology,* 16: 47 - 71.

Characterization of Fluorescent Pseudomonads Isolated from Citus Phylosphere in Southern Iran and Evaluation of Their Antagonistic Activity Against Bacterial Inducing Citrus Canker Disease

G. KHODAKARAMIAN
Assistant Professor, College of Agriculture, Aburayhan Campus, University of Tehran
Accepted. Jan. 17. 2004

SUMMARY

A total of 30 Fluorescent Pseudomonads strains were isolated from *citrus* leaves, twigs and fruits in Kerman and Hormozgan provinces. Results of characterized phenotypic features showed two groups of strains namely including *Pseudomonas fluorescens* bv. III and V, and *P. putida* bv. B. Fatty acids determination using gas-liquid chromatography indicated 16 fatty acids for *P. fluorescens* strains and 13 fatty acids for *P. putida* strains.The main fatty acids for *P. fluorescens* strains were 10: 0 3-OH, 12:0, 12:0, 12:0 2-OH, 12: 3-OH, 16:0, 16:1 w7c and 17:0 cyclo and for *P. putida* strains were 10: 0 3-OH, 12:0, 12:0, 12:0 2-OH, 12: 3-OH, 16:0, 16:1 w7c, 17:0 cyclo and 19:0 cyclo w8c. Representative strains from both groups showed antagonistic activity towards *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*, the causal agent of Asiatic citrus canker disease in petri plates. Application of some representative antagonist strains under greenhouse condition reduced number of disease lesions from 23.78% to 64%.

Key words: *Pseudomonas fluorescens, P. putida, Xanthomonas axonopodis* pv. c*itri, Citrus* bacterial canker biocontrol, Gas-liquid chromatography, Fatty acid, Southern Iran.