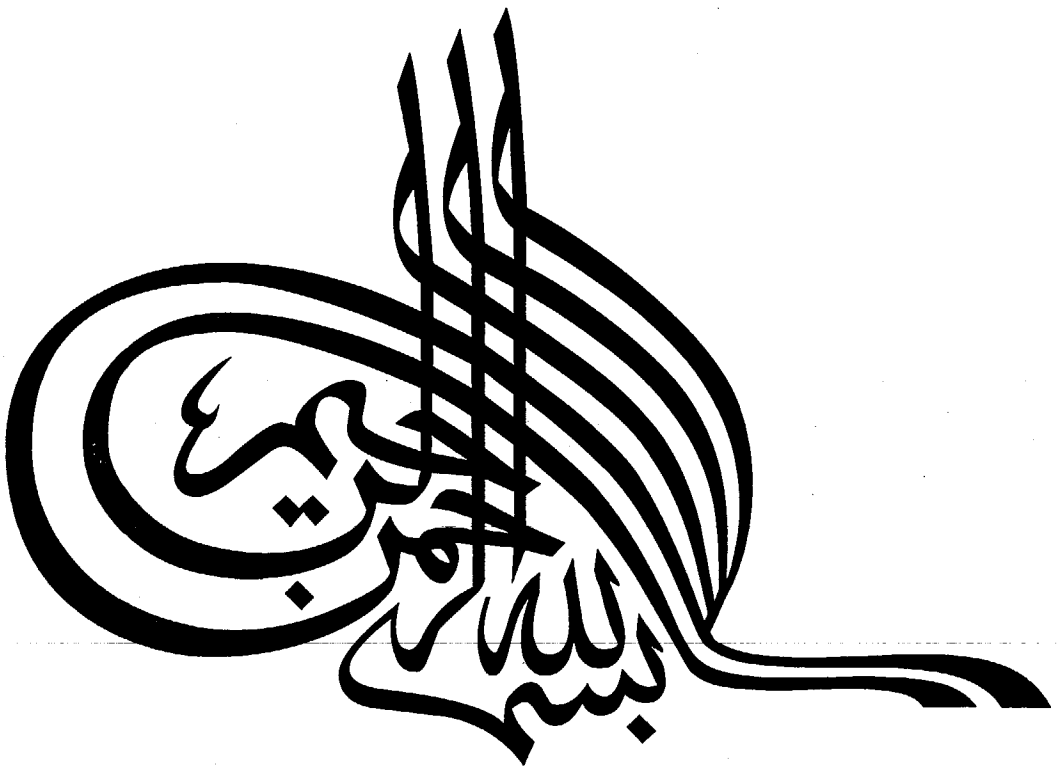

٣٤٠٩٣

۱۳۸۰ /۲/ ۳۰

مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

بسم الله الرحمن الرحیم

بررسی استرینهای عامل شانکر باکتریایی مرکبات در استانهای کرمان، هرمزگان و سیستان و بلوچستان

توسط

شعبان کیا

پایان نامه

ارائه شده به دانشکده تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیتهای
تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته

بیماری شناسی گیاهی

۱۰۹۱۵

از

دانشگاه شیراز

شیراز، ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: **عالی**

امضاء اعضاء کمیته پایان نامه:

دکتر سید محسن تقوی، استادیار بخش گیاه پزشکی (رئیس کمیته).....

دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی، استاد بخش گیاه پزشکی.....

دکتر سید علی اکبر بهجت نیا، استادیار بخش گیاه پزشکی.....

اسفند ماه ۱۳۷۹

۳۴۰۹۳

تقدیم به:

محبتهای پدر و مادرم

روح پاک خواهرم

مهربانیهای همسر عزیزم

و گل خوشرنگ بیتا

سپاسگزاری

سپاس می گویم پروردگار یکتا را که با لطف و عنایت خود به پایان بردن این تحقیق را امکان پذیر ساخت. پیش از هر چیز در برابر تمام کسانی که تاکنون در تربیت من نقشی داشته اند سر فرود می آورم. بر خود لازم می دانم از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر سید محسن تقوی به خاطر راهنمائیها و کمکهای ارزنده اشان در جهت پیشبرد این تحقیق تشکر و قدر دانی نمایم. از استاد عزیزم جناب آقای دکتر حشمت الله رحیمیان که در طول این تحقیق راهنما و مشوق من بودند سپاسگزاری می نمایم. از اساتید گرامی جناب آقای دکتر ضیاءالدین بنی هاشمی و جناب آقای دکتر سید علی اکبر بهجت نیا به خاطر راهنمائیهای ارزنده اشان تشکر می نمایم. همچنین از آقای مهندس ولی الله بابایی زاد، آقای مهندس رضا مستوفی زاده، آقای مهندس محمد صالحی و خانم مهندس نرجس جلیانی به خاطر کمکها و راهنمائیهایشان صمیمانه تشکر و قدر دانی می نمایم. از تمامی کارکنان بخش گیاه پزشکی به خاطر کمکها و همکاریهایشان تشکر می نمایم. از تمامی دوستانی که در طول این مدت به نحوی با اینجانب همکاری نموده اند، بخصوص از آقای عباس بتولی آرانی صمیمانه تشکر و قدر دانی می نمایم. در پایان از خانواده محترم همسرم به خاطر محبتهای بیدریغشان سپاسگزاری می نمایم.

چکیده

بررسی استرینهای عامل شانکر باکتریایی مرکبات در استانهای کرمان، هرمزگان و سیستان و بلوچستان

توسط

شعبان کیا

در این تحقیق تعداد ۵۴ جدایه باکتری از اندامهای مختلف مرکبات (برگها، شاخه ها و میوه ها) آلوده به شانکر مرکبات که دارای لکه های مدور، برجسته، چوب پنبه ای منفرد یا پیوسته به رنگ قهوه ای با هاله ای زردرنگ در اطراف لکه ها بودند، از مناطق مختلف استانهای کرمان، هرمزگان و سیستان و بلوچستان در طی سالهای ۱۳۷۸ تا ۱۳۷۹ جدا گردید. آزمونهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، حساسیت به آنتی بیوتیکها، بیماریزایی، دامنه میزبانی و همچنین سرولوژی و الکتروفورز پروتئین روی این جدایه ها انجام شد.

بر اساس بررسی های انجام شده، جدایه های مورد بررسی دارای سلولهای میله ای شکل با یک تاژک قطبی، گرم منفی، هوازی اجباری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بودند. تولید ایندول، استوئین و اوره آز نکردند، ولی از سیستئین گاز H2S تولید نمودند، اسکولین را هیدرولیز کردند ولی قادر به احیاء نیترات به نیتریت نبودند. همچنین نتوانستند از ادونیتول و سوربیتول اسید تولید کنند. بنابراین تمامی جدایه ها به عنوان جنس *Xanthomonas* تشخیص داده شدند. به خاطر توانایی جدایه ها در استفاده از دکسترین، ترهالوز، ال- آلانین، سوکسینیک اسید، گلوتامیک اسید و عدم

استفاده از ال- رامنوز، فرمیک اسید، والریک اسید و گلوکورونیک اسید در گونه *Xanthomonas axonopodis* قرار میگیرند.

از نظر خصوصیات فنوتیپی، جدایه های مورد بررسی دردو گروه قرار گرفتند. جدایه های گروه نخست ویژگیهای شانکر آسیایی (فرم A) را داشته ولی جدایه های گروه دوم ویژگیهای بینابینی داشته، بطوریکه بر اساس خصوصیات فنوتیپی نمی توان آنها را به هیچکدام از فرمهای شناخته شده A، B، C، D و E منسوب کرد. جدایه های گروه نخست دامنه میزبانی وسیعی داشته و تقریباً روی تمام ارقام مرکبات مورد بررسی بیماریزا بوده و از این نظر مشابه شانکر آسیایی یا فرم A (*X. axonopodis* pv. *citri*) بودند. دامنه میزبانی جدایه های گروه دوم محدود بوده و تنها روی لیمو ترش، لیمو تغن و لیمو شیرین بیماریزا بوده بنابراین مشابه فرمهای B، C و D شانکر مرکبات (*X. axonopodis* pv. *aurantifolii*) بودند.

در آزمون نشت دو طرفه در آگار، تمامی جدایه های مورد بررسی در برابر آنتی سرمهای تولید شده واکنش نشان دادند و تولید خطوط رسوبی نمودند ولی این واکنشها از لحاظ شدت و ضعف و تعداد خطوط با یکدیگر تفاوت داشتند.

جدایه های مورد بررسی از نظر نقوش الکتروفورز پروتئین با یکدیگر تفاوت داشته و در دو گروه قرار گرفتند. یک گروه از جدایه ها از نظر نقوش الکتروفورز پروتئین شباهت به شانکر آسیایی (فرم A) داشته و گروهی دیگر از جدایه ها که با فرم A متفاوت بودند.

پراکندگی دو گروه از جدایه ها در مناطق مختلف نمونه برداری متفاوت بود. بطوریکه دامنه گسترش جدایه های گروه نخست یا شانکر آسیایی در مناطق مختلف استانهای کرمان و هرمزگان نسبت به جدایه های گروه دوم بیشتر بوده ولی جدایه های استان سیستان و بلوچستان از گروه دوم بود.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده ..... چهار
فهرست جداول ..... نه
فهرست اشکال ..... ده
فصل اول: مقدمه ۱
فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده ۴
۲-۱- تاریخچه بیماری ۴
۲-۲- علایم بیماری ۶
۲-۲-۱- علایم روی برگ ۶
۲-۲-۲- علایم روی شاخه ۸
۲-۲-۳- علایم روی میوه ۸
۲-۳- دامنه میزبانی ۹
۲-۴- موقعیت تاکسونومیکی عامل بیماری ۱۱
۲-۵- خصوصیات گونه *Xanthomonas axonopodis* ۱۲
۲-۶- خصوصیات پاتووارهای عامل بیماری شانکر مرکبات ۱۴
۲-۷- خصوصیات مولکولی ۱۷
۲-۸- خصوصیات سرولوژیکی ۱۸
۲-۹- خصوصیات آیزوزایمی ۱۹
۲-۱۰- پراکندگی جغرافیایی بیماری ۲۰
۲-۱۱- سبب شناسی و چرخه زندگی ۲۱
۲-۱۲- همه گیری شناسی ۲۲

عنوان **صفحه**

۲-۱۳- انتقال بیماری ۲۳
۲-۱۴- منابع مایه (اینوکولوم) ۲۴
۲-۱۵- کنترل بیماری ۲۵
فصل سوم: روش تحقیق و مواد ۲۸
۳-۱- نمونه برداری ۲۸
۳-۲- جداسازی و خالص سازی ۲۸
۳-۳- نگهداری جدایه ها ۲۹
۳-۳-۱- نگهداری در آب مقطر سترون ۲۹
۳-۳-۲- نگهداری در زیر پارافین مایع سترون ۲۹
۳-۴- بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه ها ۲۹
۳-۴-۱- بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی جدایه ها ۳۰
۳-۴-۲- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه ها ۳۷
۳-۵- بررسی حساسیت جدایه ها به آنتی بیوتیکها (آنتی بیوگرام) ۳۸
۳-۶- بررسی بیماریزایی و دامنه میزبانی ۳۹
۳-۷- سرولوژی ۴۰
۳-۷-۱- تهیه ایمیونوژن ۴۰
۳-۷-۲- تهیه آنتی سرم ۴۰
۳-۷-۳- تهیه آنتی ژن ۴۱
۳-۷-۴- آزمون نشت دوطرفه در آگار ۴۱
۳-۸- الکتروفورز پروتئین ۴۲
فصل چهارم: نتایج ۴۴
۴-۱- نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی ۴۴
۴-۲- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ۴۸
۴-۳- واکنش جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیکها (آنتی بیوگرام) ۵۵

عنوان **صفحه**

۴-۴- بیماریزایی و دامنه میزبانی ۵۷
۴-۵- سرولوژی ۶۷
۴-۶- الکتروفورز پروتئین ۶۹
فصل پنجم: بحث ۷۱
فهرست منابع ۸۰
صفحه چکیده و عنوان به زبان انگلیسی

فهرست جداول

جدول **صفحه**

۲-۱- خصوصیات افتراقی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پاتوتیپ های مختلف شانکر باکتریایی مرکبات ۱۵

۴-۲- مشخصات جدایه های *Xanthomonas* جدا شده از مرکبات مناطق مختلف استانهای کرمان، هرمزگان و سیستان و بلوچستان ۴۵

۴-۳- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه های *Xanthomonas* جدا شده از مرکبات مناطق مختلف ۵۰

۴-۴- خصوصیات افتراقی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه های *Xanthomonas* جدا شده از مرکبات مناطق مختلف ۵۵

۴-۵- واکنش جدایه های *Xanthomonas* جدا شده از مرکبات مناطق مختلف در برابر آنتی بیوتیکها ۵۶

۴-۶- واکنش گونه ها و ارقام مختلف مرکبات به جدایه های *Xanthomonas* جدا شده از مرکبات مناطق مختلف ۵۹

فهرست اشکال

شکل **صفحه**

شکل ۴-۱- لکه های برجسته و چوب پنبه ای همراه با هاله زردرنگ روی برگ لیمو ترش ۶۰
شکل ۴-۲- لکه های چوب پنبه ای و برجسته روی شاخه لیمو ترش ۶۰
شکل ۴-۳- لکه های چوب پنبه ای و برجسته روی میوه لیمو ترش ۶۱
شکل ۴-۴- لکه های چوب پنبه ای و برجسته روی برگ و میوه پرتقال ۶۱
شکل ۴-۵- لکه های چوب پنبه ای و برجسته همراه با آبسوختگی و هاله زردرنگ در برگ لیمو ترش سه هفته پس از مایه زنی با تزریق ۶۲
شکل ۴-۶- لکه های کوچک چوب پنبه ای و برجسته همراه با هاله زردرنگ در برگ لیمو ترش سه هفته پس از مایه زنی با روش سوزن زدن ۶۲
شکل ۴-۷- لکه های کوچک چوب پنبه ای و برجسته همراه با هاله زردرنگ در برگ لیمو شیرین چهار هفته پس از مایه زنی با روش سوزن زدن ۶۳
شکل ۴-۸- لکه های چوب پنبه ای و برجسته همراه با آبسوختگی و هاله زردرنگ در برگ گریپ فروت چهار هفته پس از مایه زنی با تزریق ۶۳
شکل ۴-۹- لکه های چوب پنبه ای و برجسته همراه با آبسوختگی و هاله زردرنگ در برگ پرتقال والنسیا پنج هفته پس از مایه زنی با تزریق ۶۴
شکل ۴-۱۰- لکه های چوب پنبه ای و برجسته همراه با آبسوختگی و هاله زردرنگ در برگ پرتقال محلی پنج هفته پس از مایه زنی با تزریق ۶۴

شکل **صفحه**

شکل ۴-۱۱- لکه های چوب پنبه ای همراه با هاله زردرنگ در برگ نارنگی کلمانتین شش هفته پس از مایه زنی با روش سوزن زدن..... ۶۵
شکل ۴-۱۲- لکه های چوب پنبه ای همراه با هاله زردرنگ در برگ پونسیروس شش هفته پس از مایه زنی با روش سوزن زدن..... ۶۵
شکل ۴-۱۳- زخمهای چوب پنبه ای و برجسته همراه با هاله زردرنگ روی شاخه لیمو ترش چهار هفته پس از مایه زنی..... ۶۶
شکل ۴-۱۴- زخمهای چوب پنبه ای و برجسته همراه با هاله زردرنگ روی شاخه لیمو شیرین پنج هفته پس از مایه زنی..... ۶۶
شکل ۴-۱۵- خطوط رسوبی جدایه های باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در برابر آنتی سرم تولید شده برعلیه جدایه پرتقال کهنوج در آزمون نشت دوطرفه در آگار..... ۶۸
شکل ۴-۱۶- خطوط رسوبی جدایه های باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در برابر آنتی سرم تولید شده برعلیه جدایه لیمو ترش رودان در آزمون نشت دوطرفه در آگار..... ۶۸
شکل ۴-۱۷- خطوط رسوبی جدایه های باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات در برابر آنتی سرم تولید شده برعلیه جدایه لیمو ترش سرباز در آزمون نشت دوطرفه در آگار..... ۶۹
شکل ۴-۱۸- نقوش الکتروفورز پروتئین جدایه های باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات..... ۷۰

فصل اول

مقدمه

به عقیده بسیاری از پژوهشگران منشأ مرکبات جنوب شرقی آسیا، شامل کشورهای عربی در شرق آسیا تا فیلیپین و از جنوب هیمالیا تا اندونزی یا استرالیا بوده است. در بین این مناطق وسیع، احتمالاً شمال شرقی هند و نواحی شمالی برمه موطن و مرکز اصلی مرکبات محسوب می گردد (Davies and Albrigo 1994) . به گفته تئوفراستوس گیاه شناس معروف یونانی، کشت وسیع مرکبات در ایران به ۲۳۰۰ سال پیش برمی گردد (Farahbaksh 1996). بالنگ (*Citrus medica*) یکی از گونه های مرکبات است که ۳۳۰ سال قبل از میلاد در ایران وجود داشته است (فتوحی قزوینی ۱۳۷۷).

گونه های تجارتی مرکبات به خانواده Rutaceae و زیر خانواده Aurantioideae تعلق دارند. گروه مرکبات حقیقی شامل شش جنس می باشد که مهمترین آنها جنس *Citrus* با ۱۶ گونه می باشد (Davies and Albrigo 1994). پنج گونه جنس فوق که در دنیا دارای اهمیت اقتصادی هستند عبارتند از: پرتقال (*Citrus sinensis* (L.)Osbeck)، نارنگی (*C. reticulata* Blanco)، گریپ فروت (*C. paradisi* Macf.)، لمون (*C. limon* (L.) Burm.f.) و لیمو ترش (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing) (دلفزفریتس ۱۳۶۹ ، خویی ۱۳۷۱ و Davies and Albrigo 1994).

بر طبق آمار سال زراعی ۷۷-۱۳۷۶، سطح زیر کشت مرکبات در ایران حدود ۲۳۰ هزار هکتار بوده که از این مقدار ۹۱/۳ درصد آن بارور و بقیه نهال بوده است. از مجموع ۲۱۰ هزار هکتار باغات بارور مرکبات حدود ۳/۵ میلیون

تـن میـوه مرکبـات برداشـت شـده اسـت (اداره کـل آمـار و اطلاعـات وزارت کشاورزی ۱۳۷۸). براساس آمار سازمان خوار و بـار جهـانی (FAO)، در سـال ۱۹۹۸ تولید کل محصول مرکبات در جهـان بیـش از ۱۰۰ میلیـون تـن بـوده است (FAO 1998). ایران در بین کشورهای خـاور میانـه از نظـر سـطح زیـر کشت مقام سوم و از نظر تولید مقام پنجم را دارد (Farahbaksh 1996).

یکی از محدودیتهای مهم در تولید مرکبات در سراسـر دنیـا بیماریهـای ناشی از باکتریها، فیتوپلاسماها، قارچها و ویروسها می باشد. از بین بیماریهای باکتریایی مرکبات، شانکر باکتریایی مرکبات، میوه سبز مرکبات و کلروز ابلقی مرکبات اهمیت بیشتری دارنـد و بلاسـت یـا Black pit مرکبـات از اهمیـت کمتری برخوردارند. در حال حاضر شانکر باکتریایی مرکبات یکی از مهمـترین بیماریهای مرکبات در سراسردنیاست (Davies and Albrigo 1994).

شانکر باکتریایی مرکبات بطور گسترده در تمـام منـاطق مرکبـات خـیز دنیـا انتشـار دارد و هـر سـاله خسـارات زیـادی را بـه محصـول مرکبـات وارد می سازد (Knorr *et al.* 1957). ایـن بیمـاری در ایـران اولیـن بـار در سـال ۱۳۶۸ در منطقه کهنوج کرمان مشاهده شـد (علـیزاده و رحیمیـان ۱۳۶۹) و درسالهای ۷۵-۱۳۷۴ در مناطق جنوبـی ایـران بـه صـورت اپیدمـی درآمـد و خسارات زیـادی را بـه باغـات لیمـو تـرش وارد سـاخت (حسـن زاده ۱۳۷۷). این بیماری در مناطق وسیعی از اسـتانهای کرمـان و هرمزگـان (رحیمیـان و همکاران ۱۳۷۷) و مناطقی از سیستان و بلوچستان انتشـار دارد (حسـن زاده ۱۳۷۷).

شانکر باکتریایی مرکبات دارای پنج فـرم یـا پـاتوتیپ A، B، C، D و E است کـه شـانکر آسـیایی (فـرم A) خطرنـاکترین نـوع شـانکر اسـت. ایـن نوع شـانکر دارای دامنـه میزبـانی وسـیعی بـوده و مـی توانـد بیشـتر ارقـام و گونه های تجاری مرکبات را آلوده کند. آلودگی مرکبات بـه ایـن نـوع شـانکر می تواند سبب ریزش برگ، آسیب شدید به میوه، ریـزش میـوه هـای نـارس، مرگ شاخه های جوان و زوال درخت گردد (Schubert and Miller 1996).

عامل بیماری شانکر مرکبات شامل سه پاتووار از *Xanthomonas axonopodis* می باشد که از نظر خصوصیات فنوتیپی، بیماریزایی و دامنه میزبانی با یکدیگر متفاوتند (Schubert and Miller 1996).

روشهای مختلفی ازجمله بررسی خصوصیات فنوتیپی، سرولوژیکی، ژنتیکی و دامنه میزبانی جهت شناسایی و تفکیک پاتوتیپهای باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات بکار می رود. به خاطر اهمیت بیماری شانکر باکتریایی مرکبات و گسترش آن در مناطق مرکبات خیز جنوب ایران، در این تحقیق علاوه بر تعیین پراکندگی بیماری در مناطق مختلف استانهای کرمان، هرمزگان و سیستان و بلوچستان ، خصوصیات فنوتیپی، بیماریزایی، دامنه میزبانی، سرولوژیکی و نقوش الکتروفورز پروتئین باکتری عامل بیماری در مناطق مذکور مورد مطالعه و مقایسه قرارگرفته است.