بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين
انعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

دانشگاه سیستان و بلوچستان
تحصیلات تکمیلی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی گرایش بیوشیمی

عنوان:

بررسی پروتئین‌های ترشحی سویه ایرانی باکتری زانتوموناس سیتری در حالت القایی و غیر القایی

استاد (اساتید) راهنما:
دکتر نسرین کاظمی‌پور
دکتر سید مهدی علوی

استاد مشاور:
دکتر جعفر ولیزاده

تحقیق و نگارش:
نجمه مزدوری

(انجام این پایان نامه از محل اعتبارات طرح اولویت - محور شانکر مرکبات، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، صورت پذیرفته است. این پایان نامه همچنین، از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان بهره مند شده است)

بهمن ۱۳۸۹

دانشگاه سیستان و بلوچستان

تعهدنامه اصالت اثر

اینجانب نجمه مزدوری تعهد می کنم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این نوشته از آن استفاده شده است مطابق مقررات ارجاع گردیده است.

این پایان نامه پیش از این برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نشده است.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشگاه سیستان و بلوچستان می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو:

امضاء

تقدیم به یگانه منجی عدالت گستر جهان، . . .

او که منتظرش هستیم.

تقدیم به خانواده عزیزم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران

بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به

شجاعت می گراید

سپاس خدای را که فرصتی دست داد اندوخته‌های فکری و یافته‌های تجربی خود را بر صفحه کاغذ آورده تا در اختیار دیگران قرار گیرد و ذخیره‌ای باشد برای جهان باقی چرا که فرموده‌اند زکات علم نشر آن است.

چه خوب است بدانیم آنانکه علم می‌اندوزند و با علم جهانی را نمی‌افروزند تبهکارانند، پس با داشتن علم مسئولیت ما بیشتر می‌شود و ترازوی وظیفه ما سنگین‌تر. امید است که بتوانیم چراغی فرا روی شیفتگان علم باشیم.

سپاس و تشکر فراوان از: اساتید ارجمندم سرکار خانم دکتر نسرین کاظمی‌پور و جناب آقای دکتر سید مهدی علوی، که این پایان نامه گوشه‌ای از شاگردی من در محضر ایشان است. اساتید ارجمندم جناب آقای دکتر جعفر ولی‌زاده، و سایر اساتید محترم گروه زیست شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان که از محضر آنان بسیار بهره بردم. همچنین، مراتب قدردانی خود را به پاس مشاوره‌های تخصصی جناب آقای دکتر فرخی، عضو محترم هیات علمی گروه اولویت – محور شانکر مرکبات اعلام می‌دارم.

در اینجا شایسته است، مراتب امتنان و قدر دانی عمیق خود را از همراهی‌های معنوی و علمی تمامی دوستانم در دانشگاه سیستان و بلوچستان و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ابراز نمایم و به ویژه فرصت را مغتنم شمرده تا از زحمات بهترین دوستانم راضیه محمدپور، الناز بیرجندیان، نوشین شریفی، المیرا بهرامی‌نژاد، حمیده قاضی‌زاده، رعنا روحانی، ندا پرچمی، اقدس رمضانی، مریم کفیل، فرانک هادی، طناز گودرزی و آقایان صادق فتاحی، محمود صالحی، حسین سلطانی‌نژاد و علی شرفی تشکر کرده و امتنان خالصانه خود را تقدیم ایشان می‌دارم.

بر خود لازم می‌دانم از زحمات جناب آقای بخشی و سرکار خانم شیخ حسینی که در این مدت در کارهای اداری و آموزشی با من همکاری داشتند صمیمانه تشکر کنم.

چکیده:

باکتری *زانتوموناس سیتری* باکتری گرم منفی از شاخه پروتئوباکترها بوده که در مرکبات بیماری شانکر را ایجاد می‌کند. براساس محدوده میزبانی تا کنون دو پاتوتایپ از باکتری ایجاد کننده شانکر شناسایی شده است. پاتوتایپ A (پاتوتایپ آسیایی) که در همه واریته‌های مرکبات ایجاد بیماری شانکر می‌کند و پاتوتایپ A^* (در ایران و بعضی مناطق دیگر آسیا وجود دارد) که علی رغم شباهت ژنتیکی با پاتوتایپ A، دامنه میزبانی محدود به لیموترش دارد. این قدرت بیماری‌زایی محدود و اختصاصیت میزبانی، اگرچه تا کنون مورد مطالعه قرار نگرفته است اما، به استناد پژوهش‌هایی که در سایر گونه‌های زانتوموناس به انجام رسیده است می‌توان مفروض داشت که این اختصاصیت میزبانی و محدودیت بیماری‌زایی مرتبط با نوعی از پروتئین‌های ترشحی باکتریایی (سکرتوم) است که از طریق سیستم ترشحی نوع ۳ به درون سیتوپلاسم سلول‌های گیاه میزبان ترشح می‌گردند. تکنیک الکتروفورز دو بعدی روشی مناسب برای جداسازی و بررسی این گونه پروتئین‌ها می‌باشد. در این مطالعه به منظور بررسی و شناخت پروتئین‌های دخیل در بیماریزایی و اختصاصیت میزبانی یک سویه ایرانی (پاتوتایپ A^*) زانتوموناس سیتری، اقدام به تفکیک پروتئین‌های ترشحی آن به کمک روش الکتروفورز دو بعدی شد. سویه باکتری مورد نظر (NIGEB-202) پس از کشت در محیط‌های القایی (محیط کشت حداقل) و غیرالقایی (محیط کشت غنی) و در ابتدای فاز ثابت رشد برداشت گردیده و سکرتوم باکتری با روش‌های مختلف (استن، TCA، سدیم داکسی کلات و پیروگالل رد مولیبدات متانل) رسوب داده شد، نتایج نشان می‌دهد که از میان روش‌های مورد بررسی، روش PRMM از نظر تعداد و کیفیت پروتئین‌های ترشحی استخراجی، برتر از سایر روش‌ها می‌باشد. تعیین پروتئین‌های افتراقی بیانگر وجود پروتئین‌های اختصاصی سویه ایرانی باکتری بیماری‌زای شانکر مرکبات در محیط خارج سلولی می‌باشد.

کلمات کلیدی: زانتوموناس سیتری، الکتروفورز دو بعدی، سکرتوم، پروتئین‌های دخیل در بیماری‌زایی

فهرست مطالب فصل اول مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم مروری بر منابع

۲-۱- مرکبات ۵
۲-۱-۱- خصوصیات گیاه شناسی مرکبات ۵
۲-۱-۲- کشت مرکبات در ایران ۵
۲-۱-۳- سطح زیر کشت و میزان تولید مرکبات و صنایع جانبی ۵
۲-۱-۴- اهمیت اقتصادی مرکبات در کشاورزی ایران ۶
۲-۲- بیماری‌های عمده مرکبات ۶
۲-۲-۱- بیماری شانکر مرکبات ۷
۲-۳- تشریح بیماری شانکر مرکبات ۷
۲-۳-۱- عامل بیماری شانکر مرکبات ۸
۲-۳-۲- خسارت اقتصادی بیماری شانکر مرکبات ۸
۲-۳-۳- منشا و تاریخچه فرم های شانکر باکتریایی مرکبات ۹
۲-۴- باکتری ایجاد کننده شانکر (زانتوموناس) ۱۰
۲-۴-۱- خصوصیات عامل بیمارگر ۱۰
۲-۴-۲- دسته بندی زانتوموناس‌ها بر اساس بیماری‌زایی ۱۱
۲-۴-۲-۱- دامنه میزبانی باکتری ۱۱
۲-۴-۲-۲- بر هم‌کنش میزبان و بیمارگر ۱۲
۲-۴-۳- شناسایی بیمارگر ۱۳
۲-۴-۳-۱- چرخه زندگی بیماری ۱۳
۲-۴-۴- مکانیسم ایجاد بیماری ۱۴
۲-۴-۵- سیستم‌های ترشحی در باکتری‌های بیماریزای گرم منفی ۱۷
۲-۴-۵-۱- سیستم ترشحی نوع I ۱۸
۲-۴-۵-۲- سیستم ترشحی نوع II ۱۸
۲-۴-۵-۳- سیستم ترشحی نوع III ۱۹
۲-۴-۵-۴- سیستم ترشحی نوعIV ۱۹
۲-۴-۵-۵- سیستم ترشحی نوعV ۲۰
۲-۴-۵-۶- سیستم ترشحی نوع VI ۲۰
۲-۵- پروتئومیکس ۲۱
۲-۵-۱- تعریف واژه ژنوم و پروتئوم ۲۱

۲-۵-۱-۱- مطالعه ژنوم یا پروتئوم؟ ۲۲
۲-۵-۱-۲- چگونگی مطالعه پروتئوم ۲۳
۲-۵-۲- مطالعه پروتئوم بر پایه الکتروفورز دو بعدی ۲۴
۲-۵-۲-۱- تاریخچه الکتروفورز دوبعدی ۲۵
۲-۵-۳- جداسازی و تخلیص پروتئین‌ها ۲۶
۲-۵-۳-۱- مشکلات مطالعه پروتئین‌ها با تکنیک الکتروفورز دوبعدی ۲۷
۲-۵-۳-۲- ظاهرسازی و نشاندار کردن پروتئین‌های جدا شده بعد از الکتروفورز دو بعدی..... ۲۸
۲-۵-۳-۳- نشاندار کردن پروتئین‌ها در طی تهیه نمونه ۲۸
۲-۵-۳-۴- نشاندار کردن بعدی پروتئین‌ها پس از جداسازی ۲۸
۲-۵-۴- نرم‌افزارهای دسته‌بندی نتایج حاصل از الکتروفورز دوبعدی..... ۲۹
۲-۵-۵- اصول طیف سنجی جرمی ۳۰
۲-۵-۵-۱- نحوه عملکرد طیف سنج جرمی ۳۰
۲-۵-۵-۲- استفاده از MALDI-TOF در پروتئومیکس ۳۲
۲-۵-۵-۳- مشکلات پروتئومیکس ۳۳
۲-۶- هدف تحقیق ۳۴

فصل سوم

۳-۱- مواد مورد نیاز آزمایش ۳۶
۳-۲- وسایل مورد استفاده ۳۶
۳-۳- طرز تهیه محلول‌ها ومحیط‌های مورد استفاده ۳۷
۳-۳-۱- آماده سازی محیط مایع YP ۳۷
۳-۳-۲- آماده سازی محیط جامد YPGA ۳۷
۳-۳-۳- آماده سازی محیط مایع MM1 ..... ۳۷
۳-۳-۴- آماده سازی محلول PRMM برای رسوب پروتئین‌های محلول ۳۸
۳-۴- روش انجام کار ۳۸
۳-۴-۱- سویه‌های باکتریایی..... ۳۸
۳-۴-۱-۱- آماده سازی سویه‌های هدف..... ۳۸
۳-۴-۱-۲- رسم منحنی رشد باکتری در محیط MM1 و YP ۳۸
۳-۴-۱-۳- کشت باکتری به منظور استخراج پروتئین‌های ترشحی..... ۴۰
۳-۴-۲- روش‌های مختلف عصاره‌گیری از گیاه میزبان..... ۴۰
۳-۴-۲-۱- عصاره گیری با استفاده از اتوکلاو ۴۱
۳-۴-۲-۲- عصاره گیری با استفاده از هموژنیزه کردن بافتی ۴۱
۳-۴-۲-۳- تهیه عصاره به روش دم کردن عصاره ۴۱
۳-۴-۳- روش‌های مختلف رسوب‌دهی پروتئین‌های ترشحی..... ۴۲
۳-۴-۳-۱- رسوب دهی پروتئین‌ها بوسیله استن ۴۲
۳-۴-۳-۲- رسوب دهی پروتئین‌ها بوسیله TCA ۴۲
۳-۴-۳-۳- رسوب دهی پروتئین‌ها بوسیله محلول داکسی کلات ۴۲

۳-۴-۳-۴- رسوب دهی پروتئین‌ها بوسیله محلول PRMM ۴۳
۳-۴-۴- غلظت سنجی پروتئین به کمک روش برادفورد..... ۴۳
۳-۴-۵- تهیه ژل پلی آکریل آمید..... ۴۵
۳-۴-۵-۱- آماده سازی آگارز نیم در صد..... ۴۸
۳-۴-۶- الکتروفورز با روش SDS-PAGE..... ۴۸
۳-۴-۶-۱- انجام SDS-PAGE برای بررسی عصاره‌های مختلف..... ۴۹
۳-۴-۷- الکتروفورز دو بعدی..... ۴۹
۳-۴-۸- رنگ آمیزی ژل به کمک نیترات نقره..... ۵۰
۳-۴-۹- اسکن و آنالیز ژل‌ها ۵۱

فصل چهارم

۴-۱- انتخاب محیط کشت مناسب برای رشد باکتری..... ۵۳
۴-۱-۱- مقایسه رشد باکتری هدف در محیط حداقل (MM1) و محیط غنی (YP)..... ۵۴
۴-۲- مقایسه روش‌های مختلف رسوب دهی برای تغلیظ پروتئین‌های ترشحی..... ۵۵
۴-۳- مقایسه کمی پروتئین‌های ترشحی..... ۵۶
۴-۴- مقایسه کیفی پروتئین‌های ترشحی..... ۵۶
۴-۵- مقایسه روش‌های مختلف تهیه عصاره گیاه میزبان..... ۵۷
۴-۶- تعیین ویژگی‌های پروتئین‌های ترشحی حاصل از باکتری بیماری‌زای شانکر مرکبات..... ۵۹
۴-۷- آنالیز ژل‌ها..... ۶۳

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری..... ۶۷
منابع..... ۷۴

فهرست جدول‌ها

عنوان جدول **صفحه**

جدول ۳-۱: جذب نمونه‌های آلبومین سرم گاوی برای رسم منحنی استاندارد ۴۴

جدول۳-۲: مواد و طرز تهیه ژل ۱۲٪ ۴۶

جدول ۳-۳: مواد و طرز تهیه ژل ۴٪ ۴۶

جدول ۳-۴: مواد و طرز تهیه بافر رهیدراسیون ۴۷

جدول ۳-۵: مواد و طرز تهیه بافر متعادل سازی ۴۸

جدول ۴-۱: غلظت پروتئین‌های ترشحی باکتری NIGEB-202 رسوب داده با روش‌های مختلف رسوب‌دهی پروتئین ۵۶

جدول ۴-۲: اطلاعات مربوط به لکه‌های پروتئینی با توجه به آنالیز Melanie ۶۴

جدول ۴-۳: اطللعات مربوط به لکه‌های پروتئینی با توجه به نتایج MALDI-TOF-TOF ۶۵

فهرست شکل‌ها

عنوان شکل **صفحه**

شکل ۲-۱- نمونه‌های آلوده به شانکر ۷

شکل ۲-۲- نمایی شماتیک از باکتری زانتوموناس ۱۰

شکل ۲-۳- نمایی شماتیک از سیستم‌های ترشحی نوع ۱، ۳، ۴ و ۵ در باکتری‌های گرم منفی ۱۸

شکل ۲-۴- نمایی شماتیک از سیستم ترشحی نوع دو ۲۰

شکل ۲-۵- تصویری از الکتروفورز دو بعدی ۲۴

شکل ۲-۶- طیف سنجی جرمی یک نمونه پروتئینی ۳۲

شکل ۲-۷- استفاده از MALDI در پروتئومیکس ۳۳

شکل ۳-۱- دستگاه الکتروفورز یک بعدی مربوط به شرکت Bio-Rad ۳۶

نمودار ۳-۲:منحنی استاندارد غلظت پروتئین مربوط به BSA ۴۵

نمودار۴-۱: نمایش منحنی رشد ۵۵

شکل شماره ۴-۲: الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید ۵۷

شکل ۴-۳: الکتروفورز دو بعدی ۵۸

شکل ۴-۴: الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از روش‌های مختلف عصاره‌گیری ۵۸

شکل ۴-۵: مقایسه پروفایل دوبعدی پروتئین‌های ترشحی ۵۹

شکل۴-۶: الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۵۹

شکل ۴-۸: مقایسه الگوی دو بعدی پروتئین‌های ترشحی ۶۱

شکل ۴-۹: نمایش تفاوت لکه‌ها با وضوح بیشتر ۶۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

شانکر باکتریایی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های مرکبات است [۱و۲]. اعتقاد بر این است که این بیماری از جنوب آسیا و هند منشا گرفته اما، امروزه باکتری عامل این بیماری در بیش از ۳۰ کشور دنیا از جمله ایران شناسایی شده است [۳].

در این بیماری، زخم‌ها حدود ۷ تا ۱۰ روز پس از آلودگی ظاهر می‌شود این علائم ابتدا بصورت دایره‌ای بوده اما کم کم تغییر شکل داده و از حالت دایره منظم خارج شده و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای سوخته همراه با آب سوختگی حاشیه‌ها در می‌آید و ممکن است بر روی برگ هاله زرد رنگ نیز ایجاد کند. زخم‌ها در مرکز بصورت فرو رفته بوده و در نهایت بصورت کرکی و اسفنجی در می‌آید. زخم می‌تواند بر روی میوه و شاخه نیز ایجاد شود که گاهی بصورت تاول دیده می‌شود. بالغ شدن بافت‌ها منجر به مقاومت آنها در برابر بیماری می‌شود، این بدان معناست که بافت‌های جوان نسبت به باکتری حساس‌ترند [۴].

بیماری شانکر مرکبات توسط باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ایجاد می‌شود. علی رغم قرار گرفتن این باکتری در فهرست بیمارگرهای قرنطینه‌ای و اعمال برنامه‌های مدون ردیابی و کنترل از سوی سازمان‌های جهانی، باز هم شاهد گسترش این بیماری در بسیاری از کشورهای جهان هستیم [۵]. خسارت‌های اقتصادی ناشی از باکتری‌های جنس زانتوموناس، به طور کلی، و گونه سیتری به طور اختصاصی، سبب گشته تا مطالعات فراوانی روی شناخت مکانیسم‌های بیماری‌زایی این باکتری، تدوین پروتکل‌های ردیابی و کنترل آن و نیز بهبود سیستم‌های متفاوت میزبانی به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صورت پذیرد. در این میان، نتایج بدست آمده در خصوص ژنتیک بیماری‌زایی باکتری‌های این جنس و کشف بسیاری از ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی و اختصاصیت میزبانی از اهمیت برخوردار است. از بین ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌توان ژن‌های *hrp* را نام برد که کد کننده پروتئین های سیستم ترشحی نوع ۳ (T3SS: Type III Secretion System) هستند. این سیستم به عنوان مسئول انتقال و تحویل پروتئین‌های موسوم به "پروتئین‌های افکتور"[1] به داخل سلول گیاه میزبان شناخته شده است[۶-۷]. برهم کنش این پروتئین های ترشحی با پروتئین های سلول میزبان منجر به انجام بسیاری از واکنش‌های داخلی سلول میزبان مثل مرگ برنامه ریزی شده سلول، کنترل تنظیم بیان برخی ژن ها و بر هم زدن سیستم ایمنی میزبان می شود [۸].

[1] Effector proteins

خوشبختانه، پیشرفت‌های حاصله در زیست فناوری سبب ساز دستیابی به بسیاری از ناشناخته‌های علمی گشته است. در این میان، رمزگشایی از ژنوم موجودات زنده شاید از جذاب‌ترین و هیجان‌انگیزترین دست‌آوردهای علمی قرون اخیر بوده است. حوزه پروکاریوت‌ها و به خصوص پاتوژن‌های باکتریایی نیز از این پیشرفت‌ها بهره‌مند گردیده و به مدد پیشرفت‌های حادثه در روش‌های توالی یابی و گونه بسیاری از رموز ژنتیک در این بیمارگرها شناسایی شده‌اند. در همین راستا، ژنوم چند گونه از زانتوموناس‌های بیماری‌زا از جمله *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (سویه MAFF-311018) *X.oryzae* pv. *Oryzae* (سویه ۸۰۰۴) *X.oryzae* pv. oryzicala (سویه MAFF-311018) *X.citri* subsp. citri (سویه ۳۰۶ از تیپ بیماری‌زایی A-*xcici*) رمزگشایی شده‌اند [۹-۱۲]. با این وجود بررسی پروتئین‌های دخیل در بیماری‌زایی این باکتری‌های پاتوژن، خصوصاً پروتئین‌های ترشحی با محدودیت‌هایی روبرو بوده است و در مقایسه با ژنوم، مطالعات بسیار کمی روی پروتئوم باکتری‌های بیماری‌زا انجام شده است [۱۳]. با این وجود، دسترسی به منابع اطلاعات ژنوم، مبنای مقایسه مطلوبی برای داده‌های پروتئوم محسوب می‌شود [۱۳].

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱- مرکبات

۲-۱-۱- خصوصیات گیاه شناسی مرکبات

مرکبات جز راسته *Graniales*، خانواده *Rutaceae* و زیر خانواده *Aurantioideae* می باشد. در زیر خانواده *Aurantioideae*، دو قبیله *Glauseneae* و *Citreae* وجود دارد. قبیله *Citreae*، شامل ۲۸ جنس می‌باشد که جنس سیتروس[1] و سایر جنس های نزدیک به آن شامل *Fortunella*، *Poncirus*، *Eremocitrus*، *Microcitrus* و *Clymenia* جز این قبیله محسوب می‌شوند [۱۴].

۲-۱-۲- کشت مرکبات در ایران

از نظر تاریخی سابقه کشت مرکبات در ایران به عصر امپراتوری مادها برمی‌گردد و نوشته‌های به جای مانده گویای آنست که بالنگ[2] اولین گونه کشت شده مرکبات در سرزمین مادها بوده است. تئوفراستوس (۳۷۱-۲۸۶ ق.م) گیاهشناس یونانی از آن به عنوان "سیب پارسی" یا "سیب ماد" یاد کرده است. روایت های تاریخی گویای آنست که بالنگ توسط سربازان اسکندر به رم وارد گردید و از آنجا به نقاطی مثل چین و هند روانه شده است(www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/citron.html, www.rbg.ca/greenlegacy/pages/botanists_past.html).

۲-۱-۳- سطح زیر کشت و میزان تولید مرکبات و صنایع جانبی

در حال حاضر، گونه های متفاوت مرکبات در ایران کشت می‌شوند و سطحی معادل ۲۶۰ هزار هکتار از اراضی قابل کشت کشور را به خود اختصاص داده‌اند. اهمیت کشت و تولید مرکبات در ایران به گونه‌ای است که آن را در زمره ۲۰ محصول عمده و استراتژیک کشاورزی قرار داده است [۱۵]. در ایران سه منطقه اصلی، سواحل دریای خزر، ناحیه مرکزی و جنوبی به عنوان مراکز اصلی تولید انواع مرکبات به حساب می‌آیند [۱۸].

از نقطه نظر تولید محصول، در سال ۲۰۰۷ ایران با تولید بیش از ۳/۷ میلیون تن انواع مرکبات، مقام هفتم جهانی را در میان تولید کنندگان بزرگ این محصول کسب کرده است. در میان انواع مرکبات تولیدی ایران،

[1] *Citrus*
[2] *Citrus medica L*

لیموترش (*Citrus aurantifolia*) با تولیـدی معـادل ۱۱۰۰۰۰۰ تـن مقـام دوم را پـس از پرتقـال (*Citrus sinensis*) (۱۹۰۰۰۰۰ تن) بـه خـود اختصـاص داده و در مقیـاس جهـانی رتبـه ایـران را بـه ترتیـب پـس از کشورهای مکزیک (۱۸۲۴۸۹۰ تن)، هند (۱۴۲۰۰۰۰ تن) و آرژانتین (۱۳۰۰۰۰۰ تن) بـه مقـام چهـارم ارتقـا بخشیده است [۱۷]. از نقطه نظر تولید سرانه، ایران حائز شاخص‌هایی به مراتب بالاتر از متوسط جهـانی اسـت. گزارش‌ها نشان می دهند که سرانه تولید مرکبات در ایران ۵۶ کیلـوگرم اسـت کـه نسـبت بـه متوسـط سـرانه جهانی (۱۷ کیلوگرم) رشدی معادل ۳۴۰ درصد را نشان می‌دهد.

۲-۱-۴-اهمیت اقتصادی مرکبات در کشاورزی ایران

مرکبات یکی از مهمترین محصولات باغی در ایران به شمار می‌رود. کشت و کار این محصول و صنایع وابسته به آن نقش مهمی را در اقتصاد مناطق مرکبات خیز کشور ایفا می‌کند [۱۸].

برآوردهای ملی همچنین، حکایت از آن دارند که سطح اشتغال زایی ناشی از تولید مرکبات در ایران بسیار قابل توجه بوده است و به نظر می رسد حدود ۳۰۰۰۰۰۰ نفر به طور مستقیم (باغـدار) یـا غیـر مسـتقیم (فـرآوری، بسته بندی و حمل بار) در عرصه های مختلف مرتبط با صنعت مرکبات به کار اشتغال داشته باشند [۱۹].

۲-۲- بیماری‌های عمده مرکبات

عوامل بیماری‌زای مختلفی چون انواع قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، ویروئیدها و غیره مرکبات را تحت تاثیر قرار می‌دهند. هر کدام از این عوامل به قسمت‌های مختلف گیاه مانند تنه اصلی، ریشه، برگ، شاخه، میـوه خسـارت وارد می‌کنند.

برخی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات شامل پوسیدگی طوقه[۱] ، زوال شاخه[۲] ، پوسیدگی سیاه میوه[۳]، تریستزا[۴]، کوتولگی مرکبات[۵] ، شانکر[۶] ، بلاست[۷] ، جاروک لیموترش [۸]، ریز برگی [۱] ، نماتد ریشـه [۲] ، نماتـد زخـم ریشـه [۳] می‌باشند [۲۰].

---

[1] *Phytophtora spp*
[2] *Nattrassia mangiferae*
[3] *Alternaria alternate*
[4] Tristeza Virus
[5] *Satsuma Dwarf Virus*
[6] *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*
[7] *Pseudomonas arboricola* pv. *Citri*
[8] *Phytoplasma aurantifolia*

۲-۲-۱- بیماری شانکر مرکبات

بیماری شانکر مرکبات یکی از مهم‌ترین عوامل کاهنده محصول در مرکبات محسوب می‌شود. منشا اولیه بیماری شانکر باکتریایی مرکبات با اینکه دقیقاً مشخص نیست ولی این بیماری بر روی نمونه‌های برگی بالنگ موجود در هرباریوم گیاه شناسی انگلستان دیده شده است (این نمونه‌ها از شمال غرب هندوستان بین سال های(۳۱-۱۸۲۷) و اندونزی (۱۸۴۴-۱۸۲۴) جمع آوری شده بودند). بیماری شانکر باکتریایی مرکبات نخستین بار در اواخر قرن نوزدهم در ژاپن بر روی برگ های واشنگتن ناول مشاهده شد و در سال ۱۹۱۰ از طریق گیاهچه‌های پونسیروس و درختان نارنگی انشو از ژاپن به آمریکا وارد شده است. نخستین بار در سال ۱۹۱۵، آن را *pseudomonas citri* نامیدند [۱۸]. این بیماری در همین سال به جنوب آفریقا،استرالیا و نیوزیلند نیز وارد شده است. هم اکنون این بیماری در بیش از ۳۰ کشور گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا دیده می‌شود. منشأ این بیماری به احتمال قوی از مناطق گرم و مرطوب آسیا هم‌چون جنوب چین می‌باشد [۲۱و۲۲].

۲-۳- تشریح بیماری شانکر مرکبات

علائم بیماری شانکر آسیایی مرکبات شامل زخم‌هایی روی برگ‌ها یا ساقه و میوه می‌باشد. زخم‌ها به صورت نقاط ریز نکروزه و اندکی برآمده، بر روی بافت گیاه تشکیل می‌شوند. برگ‌ها و میوه‌های بسیار آلوده به دلیل تولید گاز اتیلن در بافت گیاه، ریزش می‌کنند (شکل ۲-۱) [۲۳].

شکل ۲-۱- نمونه‌های آلوده به شانکر، ۱: نمونه برگ آلوده به شانکر در روزهای اول ظهور علائم، ۲: نمونه برگ آلوده یک هفته بعد از ظهور علائم، ۳: نمونه میوه آلوده به شانکر (عکس‌های ۱ و۲ اقتباس از رعنا روحانی، عکس ۳ اقتباس از حسین سلطانی‌نژاد)

---

[1] *Spiroplasma citri*
[2] *Tylenchulus semipenetrans*
[3] *Pratylenchus spp*

۲-۳-۱- عامل بیماری شانکر مرکبات

عامل بیماری شانکر مرکبات دارای پاتوتیپ‌های مختلف با دامنه میزبانی محدود تا بسیار وسیع بوده و شدت بیماری‌زایی گونه‌های آن متفاوت است. جهت تفکیک پاتوتیپ‌های مختلف این بیماری، می‌توان از روش‌های معمول بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، دامنه میزبانی و روش های سرولوژیکی استفاده نمود [۲۴].

۲-۳-۲- خسارت اقتصادی بیماری شانکر مرکبات

بیماری شانکر آسیایی در کنار ویروس تریستیزا و جاروک لیموترش از جمله عواملی است که سهم بسزایی در کاهش تولید مرکبات ایران داشته و سهم این محصول در صادرات کشاورزی کشور را به صفر رسانده است. باکتری عامل این بیماری، *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*، به اکثر گونه‌های مرکبات حمله می‌کند و در کلیه مناطق اصلی کشت مرکبات بجز حوزه مدیترانه شیوع دارد. این باکتری منجر به ریزش پیش از موعد میوه و تخریب ظاهر آن می‌گردد. در بسیاری از کشورها از جمله ایران، بیماری شانکر مرکبات در رده بیماری‌های قرنطینه‌ای طبقه بندی می‌شود. اثرات شدید اقتصادی این بیماری باعث پیاده سازی برنامه‌های وسیع و بسیار پرهزینه در برخی کشورهای تولید کننده مرکبات از جمله آمریکا و برزیل، گردیده است که از آن جمله می‌توان به قطع و حذف میلیون‌ها اصله درخت دراین کشورها اشاره کرد. آخرین برنامه حذف درختان آلوده در ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت و هزینه ای معادل ۱۰۰ میلیون دلار در بر داشت. آخرین آمار در ایران نیز گویای آن است که تا سال ۱۳۸۷ حدود ۱۰۰۰۰ هکتار از اراضی زیرکشت لیمو ترش در اثر بیماری‌های جاروک جادوگر و شانکر مرکبات امحا گردیده و این موضوع هم‌چنان ادامه دارد (مذاکره شخصی با محمدزاده، مدیرکل اسبق دفتر میوه های گرمسیری و نیمه گرمسیری). سالیانه صدها میلیون دلار صرف برنامه‌های کنترل و مبارزه با این بیماری در جهان می‌شود و بدون شک عمده‌ترین خسارت این بیماری را کشورهایی متحمل می‌شوند که مواجه با قوانین قرنطینه‌ای منع ورود و فروش محصولاتشان توسط سایر کشورهای جهان می‌گردند [۲۵و۲۶].

۲-۳-۳- منشا و تاریخچه فرم های شانکر باکتریایی مرکبات

سال‌ها گمان می‌شد بیماری شانکر مرکبات توسط یک نوع باکتری ایجاد می‌شود و باکتری‌های مناطق مختلف به لحاظ ژنتیکی هموژن هستند [۲۷]. در سال ۱۹۷۱ در برزیل سویه جدیدی از فرم A شناسایی گردید که فقط روی لیموترش بیماری‌زا بود. براساس تفاوت‌های فیزیولوژیکی، سرولوژیکی و بیماری‌زایی در مقایسه با *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* آن را به عنوان *Xanthomonas citri* subsp. *aurantifolia* نام‌گذاری کردند. بعدها این سویه به نام *Xanthomonas aurantifollii* (فرم C) تغییر نام یافت [۲۸و۲۹۸].

برای نخستین بار در منطقه کلیما مکزیک در سال ۱۹۸۰، سویه‌ای مشاهده گردید که از لحاظ سرولوژیکی نسبت به سه فرم A, B, C متفاوت بود، لذا این سویه، بعدها تحت عنوان شانکر D یا باکتریوز مرکبات نام برده شد وجه تمایز این فرم بیماری‌زایی با سایر فرم‌های A، B و C در عدم توانایی آن برای ایجاد علائم بیماری شانکر مرکبات روی میوه بود [۲۹]. برای اولین بار در ایالت فلوریدا آمریکا شانکر نوع E شناسایی گردید. این سویه بر اساس شباهت‌های سرولوژیکی در گروه زانتوموناس کمپستریس سیتری قرار گرفت که بعد از آن، به عنوان لکه برگی باکتریایی مرکبات معروف شد. بر اساس نتایج چند شکلی طول قطعات حاصل از آنزیم محدودالاثر[1]، تفاوت ژنتیکی فاحشی در این سویه نسبت به سایر سویه‌های Xcici مشاهده گردید. بنابراین، سویه ذکر شده به یک زیرگونه مجزا *X. citri.* pv. *Citrumelo* تبدیل گردید [۲۳] [۳۰]. بنابراین، دسته بندی کلی فرم‌های بیماری‌زای شانکر مرکبات را می‌توان تحت عنوان پاتوتایپ‌های A(*X. axonopodis* pv. *citri*)، B/C/D (*X. axonopodis* pv. *Auranrifolii*)، E (*X. axonopodis* pv. *Citrumelo*) دانست [۳۱].

در سال ۱۹۸۶، در کشور عمان، سویه دیگری از عامل شانکر باکتریایی مرکبات شناسایی گردید که صرفاً روی لیموترش بیماری‌زا بود. اما علائم حاصل از آن، بسیار شبیه به فرم آسیایی بود. این سویه بعدها تحت عنوان A* و غیر معمول آسیایی معرفی گردید [۲۴]. در ایران، شانکر آسیایی مرکبات برای اولین بار توسط علیزاده و رحیمیان (۱۳۶۸) در منطقه کهنوج از توابع استان کرمان شناسایی شد [۳۲].

[1] Restriction Fragments length Polymorphism (RFLP)