



Identification of the causal agent of citrus bacterial canker and its biocontrol using epiphytic bacteria under greenhouse conditions

K. Hasani ¹, F. Shahryari ^{*2}, A. Aali Mohammadi ¹

1. Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran (shahryari@znu.ac.ir)

Received: 11 December 2024

Revised: 6 April 2025

Accepted: 22 April 2025

Abstract

Background and Objectives

Citrus is important for wealth generation and economic development in many countries worldwide. It is a subtropical fruit mainly originating in India, Iran, China, Japan, and some Southeast Asian countries. The bacterial canker is one of the most destructive citrus diseases that affects all citrus varieties and causes massive financial losses to the citrus industry worldwide, either in terms of a decrease in the quantity and quality of fruit production, reduced access to export markets, or the expenses associated with the prevention and control of the disease. Canker lesions begin as light yellow, raised, spongy blister-like formations on the leaves, twigs, and fruit surface. As the lesions enlarge, the spongy formations collapse, and brown depressions appear in their central portion, forming a crater-like appearance. This research aimed to identify the causal agent of citrus canker, isolate bacterial epiphytes from citrus trees (northern and southern regions), and examine their antagonistic activity against the pathogenic isolate under laboratory and greenhouse conditions.

Materials and Methods

In this study, epiphytic bacterial isolates from 100 samples of branch, leaf, and fruit of various citrus trees (orange, lemon, lime, etc.) obtained from Mazandaran, Gilan, Khuzestan, and Kerman provinces were isolated on a nutrient agar culture medium. Moreover, the pathogenic strain CC29 was isolated from infected Lime trees and identified based on phenotypic features, and a pathogenicity test was prepared by the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture of the University of Zanjan. The antagonistic activity of the epiphytic isolates against the pathogenic strain CC29 was measured by co-inoculation method under *in vitro* conditions. Antagonist isolates were selected and identified based on physiological and biochemical tests. In greenhouse experiments, the selected antagonistic epiphyte isolates were inoculated in the leaves of two-year-old seedlings of the Mexican lime cultivar two days before pathogen inoculation. The seedlings were kept in a greenhouse at 25°C to 27°C and 55 % to 60 % relative humidity. After one month, the disease severity was calculated using Motic Images Advanced 3.2 software. This experiment was conducted in a completely randomized statistical design in four repetitions. Data analysis was performed using SAS version 9.4 software.

Results

In this study, molecular identification based on the partial 16S rRNA gene nucleotide sequences, the pathogenic isolate showed the highest similarity to the type strain *Pantoea agglomerans* strain H68. In the antagonistic activity tests, out of 311 isolates, 82 isolates were selected based on negative results in the hypersensitivity reaction on tobacco and geranium leaves and soft rot on potato slices. In *in vitro* conditions, 32 isolates showed an inhibition zone against *Pantoea agglomerans* strain CC29, with the largest inhibition zone diameter being five millimeters for isolate 45. In the greenhouse condition, the antagonistic activity of 13 selected epiphyte isolates against strain CC29 was investigated in the leaf tissue. The variance analysis of data showed that the effects of treatments on the reduction of symptom severity were significant at the 1 % level. The epiphytic isolate 22 reduced the disease severity compared to the positive control and had the greatest effect in reducing the spread of symptoms. These isolates belong to the genus *Pseudomonas* sp. based on phenotypic characteristics.

Discussion

This study demonstrated that *Pantoea agglomerans* has the potential to play diverse roles in interactions with plants, as previous studies have shown. The strains of this species have the potential to act as a causal agent of disease in one host and as a biological control agent in others. Because this species is used as a biological control agent for fungal and bacterial plant pathogens, it is essential to be aware of its pathogenic potential to prevent undesirable or dangerous effects. Although the antagonistic activity of bacterial isolates *in vitro* conditions is acceptable. However, the results may differ *in vivo* conditions due to the unpredictable behavior of antagonistic organisms in different conditions. According to the results, it would be beneficial to investigate the interaction between *Pantoea agglomerans* strain CC29 identified in this study and *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Keywords: Antagonistic activity, Limequat, Mexican Lime, *Pantoea agglomerans*, Pathogenicity

Associate editor: R. Rezaei (Ph.D.)

Citation: Hasani, K., Shahryari, F., & Aali Mohammadi, A (2025). Identification of the causal agent of citrus bacterial canker and its biocontrol using epiphytic bacteria under greenhouse conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 48(1), 87-103. <https://doi.org/10.22055/ppr.2025.48548.1780>.



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۴

doi 10.22055/ppr.2025.48548.1780

شناسایی عامل شانکر باکتریایی مرکبات و کنترل زیستی آن با استفاده از باکتری‌های اپی فیت در شرایط گلخانه

کیمیا حسنی^۱، فاطمه شهریاری^{۲*}، اشکان عالی محمدی^۱

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- * نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران (shahryari@znu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۰۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۱

چکیده

مرکبات در بسیاری از کشورهای جهان نقش مهمی در تولید ثروت و توسعه اقتصادی به عهده دارند. بیماری‌های گوناگون تهدید دائمی برای کشت مرکبات است و می‌توانند باعث کاهش قابل توجه تولید آن‌ها در بسیاری از مناطق در حال رشد جهان شوند. هدف این پژوهش شناسایی باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات، جداسازی اپی‌فیت‌های باکتریایی از درختان سالم مرکبات (شمال و جنوب) و بررسی فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها علیه عامل شانکر مرکبات در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بود. براساس شناسایی مولکولی با توالی‌های نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA جدایه بیمارگر بیشترین شباهت را با سویه H68 از گونه *Pantoea agglomerans* نشان داد. جدایه‌های اپی‌فیت از ۱۰۰ نمونه شاخه، برگ و میوه‌های درختان مرکبات (استان‌های مازندران، گیلان، خوزستان و کرمان) روی محیط کشت अगर غذایی جداسازی شدند. از ۳۱۱ جدایه باکتریایی اپی‌فیت، تعداد ۸۲ جدایه که در آزمون‌های فوق حساسیت روی برگ توتون و شمعدانی و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی منفی بودند برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی انتخاب شدند. در شرایط آزمایشگاه با روش کشت همزمان، ۳۱ جدایه اپی‌فیت علیه جدایه بیمارگر هاله بازدارندگی ایجاد کردند که بیشترین قطر هاله بازدارندگی مربوط به جدایه ۴۵ با پنج میلی‌متر بود. فعالیت آنتاگونیستی در شرایط گلخانه روی برگ نهال‌های دو ساله رقم مکزیکن لایم با ۱۳ جدایه منتخب نشان داد که اثر تیمارها در کاهش گسترش علائم بیماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود و جدایه ۲۲ با سطح آلودگی ۹/۸۴ درصد نسبت به شاهد مثبت، بیشترین اثر را در کاهش گسترش علائم داشت.

کلیدواژه‌ها: بیماری‌زایی، *Pantoea agglomerans*، فعالیت آنتاگونیستی، لایمکوات، مکزیکن لایم

دبیر تخصصی: دکتر رسول رضائی

مقدمه

مرکبات از میوه‌های نیمه‌گرمسیری و خاستگاه اصلی آن در هند، ایران، چین، ژاپن و برخی از کشورهای جنوب شرقی آسیا است (Seidipoor et al., 2018). صنعت تولید مرکبات پس از سیب مقام دوم جهانی را به خود اختصاص داده است و در بسیاری از کشورهای جهان نقش مهمی در تولید ثروت و توسعه اقتصادی دارد (Glynn 2015). مناطق کشت مرکبات در ایران، شمال نواحی سواحل دریای خزر، جنوب استان کرمان (بم و جیرفت)، هرمزگان، خوزستان و فارس هستند (Ardestani, 2014). مرکبات مانند بسیاری از محصولات گرمسیری و نیمه-گرمسیری، میزان بسیاری از بیماری‌های قارچی، نامندی، ویروسی و باکتریایی است. بیماری‌های باکتریایی تهدیدی دائمی برای کشت مرکبات هستند و می‌توانند باعث کاهش قابل توجه تولید مرکبات در بسیاری از مناطق در حال کشت شوند. شانکر باکتریایی مرکبات با عامل *Xanthomonas citri* subsp. *(Xcc)* بیماری مخربی است که همه ارقام آن را آلوده می‌کند و موجب خسارت گسترده می‌شود که شدت آلودگی آن بسته به گونه باکتری، ارقام گیاهی و شرایط آب و هوایی متفاوت است (CABI, 2022). این بیماری در ایران برای اولین بار سال ۱۳۶۸ در شهرستان کهنوج واقع در استان کرمان گزارش شده است (Alizadeh & Rahimian, 1990).

علائم این بیماری به صورت زخم‌های نکروتیک قهوه‌ای تا قهوه‌ای روشن با حاشیه برآمده (آشفشانی شکل) روی برگ، ساقه و میوه مشاهده می‌شود. شانکر باکتریایی باعث ریزش برگ، بدشکلی میوه، سرخشیدگی شاخه و زوال عمومی درخت می‌شود (CABI, 2022; Sherafati et al., 2013). حساسیت رقم‌های مختلف مرکبات در برابر این بیماری متفاوت است. رقم‌های گریپ فروت، لیموترش و لیمو دارای حساسیت بالا و رقم پرتقال شیرین نسبتاً حساس و رقم‌های کامکوات و کالاموندین کمترین حساسیت را دارند (Ference et al., 2018). این بیماری در شرایط دمای بالا، بارندگی و بادهای شدید، گسترش می‌یابد. در صورت شدت بیماری، برگ‌ها

شروع به خزان زودرس کرده و گیاهان جوان از بین می‌روند و به طور قابل توجهی ماندگاری میوه مرکبات را در انبار کاهش می‌دهد (Zia Ur Rehman et al., 2021).

علاوه بر گونه ذکر شده به عنوان عامل بیماری شانکر مرکبات، باکتری *Pantoea agglomerans* نیز به خاطر انعطاف‌پذیری ژنتیکی می‌تواند تهدیدی جدید برای کشت مرکبات باشد. در پژوهشی این گونه با جمعیت بالا از بافت‌های آلوده گریپ فروت استان کرمان (جیرفت) جداسازی و بیماری‌زایی آن تایید شده است (Sherafati et al., 2014).

شیوه‌های مدیریتی مانند استفاده از نهال‌های عاری از بیماری، هرس و سوزاندن شاخه‌های آلوده، سمپاشی با باکتری‌کش‌های مبتنی بر مس و توسعه ارقام مقاوم می‌توانند تا حدودی بروز شانکر مرکبات را کاهش دهند (Islam et al., 2019). استفاده طولانی مدت و بیش از حد سموم مسی می‌تواند باعث تجمع مس در خاک و ایجاد مقاومت بیمارگر شود. همچنین روش توسعه رقم‌های مقاوم نیز زمان‌بر، پرهزینه و در دسترس نیستند (Al-Saleh, 2014; Islam et al., 2019).

شواهد فراوانی مبنی بر تحریک رشد یا حفاظت از گیاهان در برابر تنش‌های مختلف توسط باکتری‌های غیربیماری‌زای مستقر در سطح برگ وجود دارد (Schlechter et al., 2019). اما عملکرد بیشتر این باکتری‌های مفید، تغییر در ساختار و ترکیب جمعیت آن‌ها در طول زمان و تعامل آن‌ها با گیاه میزبان تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است (Spicer & Woods, 2022). برای کنترل و کاهش خسارت شانکر باکتریایی مرکبات، کنترل زیستی با باکتری‌های اپی‌فیت و اندوفیت پیشنهاد شده است (Al-Saleh, 2014; Islam et al., 2019; Poveda et al., 2021). باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از درختان سالم مرکبات در برابر عامل بیماری شانکر آسیایی مرکبات ناشی از *X. citri* subsp. *citri* بررسی شده است که پنج جدایه از بین ۲۲ جدایه آنتاگونیست، قابلیت بالایی در مهار رشد باکتری بیمارگر در شرایط آزمایشگاه داشتند (Al-Saleh,

جدا شده از بافت‌های لیموترش آلوده به شانکر که بر اساس آزمون‌های فنوتیپی و بیماری‌زایی به عنوان عامل بیماری شانکر مرکبات شناسایی شده بود، از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه زنجان تهیه شد.

آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه بیمارگر

جدایه بیمارگر روی محیط آگار غذایی کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس سوسپانسیونی از باکتری با غلظت 0.2×10^8 جذب نوری^۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد و ۵۰۰ میکرولیتر به وسیله سرننگ سترون به بافت پارانشیم برگ تزریق شد. در این آزمون از آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده شد. آزمون بیماری‌زایی جدایه بیمارگر با سه تکرار روی رقم‌های مختلف لیموترش (نهال‌های دوساله ارقام لیمو لایمکوات چهار فصل و مکزیکن لایم) انجام شد. ایجاد علائم پس از گذشت ۱۴-۷ روز مورد بررسی قرار گرفت (Khodakarmian, 2004).

استخراج DNA و شناسایی مولکولی جدایه بیمارگر

برای استخراج DNA جدایه بیمارگر از روش لایز قلیایی استفاده شد. برای شناسایی مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز^۲ جهت تکثیر و تعیین ترادف ژن 16S rRNA با آغازگرهای عمومی 5'-CAG GCC TAA CAC 63F (3'-ATG CAA GTC-3') و 5'-GGG CGG 1387R (3'-WGT GTA CAA GGC-3') انجام شد (Marchesi et al., 1998). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموساکلر (BIO-RAD T100, Singapore)، با مراحل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴/۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی ارسال شده از شرکت توالی‌یابی سینوهه (شیراز، ایران) با

2014). در داخل کشور، توان آنتاگونیستی باکتری‌های اپی‌فیت جداسازی شده از مرکبات استان‌های کرمان و هرمزگان علیه باکتری Xcc در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شده است. کاربرد جدایه‌های بازدانه منتخب در شرایط گلخانه تعداد لکه‌های بیماری شانکر باکتریایی در رقم لیموعمانی بین ۲۳/۷۸ تا ۶۴ درصد کاهش داد (Khodakarmian, 2004). اثر باکتری‌های اپی‌فیت به دست آمده از نمونه‌های مرکبات استان‌های هرمزگان، کرمان و مازندران علیه عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات در شرایط آزمایشگاه نیز گزارش شده است (Montakhabi et al., 2010). این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت عمدتاً از درختان مرکبات شمال کشور و بررسی فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها علیه عامل بیماری شانکر مرکبات در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت و تهیه جدایه بیمارگر

از میوه، شاخه و برگ ارقام مختلف درختان مرکبات استان‌های مازندران، گیلان و تعداد محدودی نمونه از مناطق جنوبی کشور (دزفول، خرمشهر و جیرفت) نمونه برداری تصادفی انجام شد. بافت‌های حاصل از هر رقم در باغ درون یک پاکت کاغذی گذاشته شدند و از مجموع ۱۰۰ پاکت حاوی نمونه‌های گیاهی، جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت به صورت مجزا از برگ، شاخه و میوه در آزمایشگاه انجام شد.

ابتدا بافت‌های گیاهی شستشوی سطحی شدند و سپس با ۱۰-۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مدت یک ساعت شیک شدند. از سوسپانسیون حاصل مقدار ۵۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت آگار غذایی ریخته شد. پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس کلونی‌هایی با ظاهر و ویژگی‌های متفاوت (رنگ، بافت و اندازه) انتخاب شدند و خالص‌سازی انجام شد. همچنین جدایه CC29

تشکیل هاله بازدارندگی از رشد در اطراف جدایه اپی‌فیت به عنوان مثبت بودن فعالیت آنتاگونیستی علیه باکتری بیمارگر در نظر گرفته شد (Dhanasekaran et al., 2005).

بررسی ویژگی‌های آنتاگونیستی جدایه‌های اپی‌فیت تولید سیانید هیدروژن

جدایه‌های اپی‌فیت منتخب به صورت چمنی روی محیط King's B کشت شدند. سپس کاغذ صافی به معرف (محلول دو درصد کربنات سدیم و ۵ درصد اسید پیکریک) آغشته و در قسمت درب تشتک‌های پتری قرار داده شد. تشتک‌های پتری به شکل وارونه در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و بعد از گذشت ۱۰ روز تغییر رنگ کاغذ صافی بررسی شد. تشتک پتری حاوی کاغذ صافی آغشته به معرف همراه با محیط کشت بدون باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. رنگ کرم در کاغذ صافی بیانگر حداقل میزان و رنگ آجری بیانگر حداکثر میزان تولید سیانید هیدروژن است (Alwani et al., 2011).

تولید آنتی‌بیوتیک

جدایه‌های اپی‌فیت منتخب روی محیط آگار غذایی حاوی یک درصد گلوکز و کلرید آهن III به غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار به صورت لکه‌ای کشت شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، پرگنه‌ها با پنبه سترون پاک شدند. سپس در قسمت درب تشتک‌های پتری چند قطره کلروفرم ریخته و به صورت وارونه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط سترون هوادهی انجام شد. سوسپانسیونی از جدایه‌ی بیمارگر با غلظت ۰/۱ جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و روی محیط به شکل چمنی کشت شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت تشکیل هاله بازدارنده بررسی شد (Shahryari et al., 2005).

تولید سیدروفور

در این آزمون محیط کشت‌های آگار غذایی حاوی یک درصد سوکروز و ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن III تهیه شد.

برنامه Chromas ver 2.6 اصلاح و به کمک نرم افزار BLAST میزان شباهت جدایه با گونه‌های موجود در بانک ژن مشخص شد. توالی‌های هم‌تراز با استفاده از نرم افزار MEGA X (بر اساس روش بیشینه درست نمایی^۱ با ۱۰۰۰ تکرار نمونه برداری^۲) بررسی شد و روابط فیلوژنتیکی آن‌ها با ترسیم درخت فیلوژنتیکی مشخص شد (Kumar et al., 2018). توالی نوکلئوتیدی حاصل در پایگاه داده در بانک ژن^۳ ثبت شد.

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های اپی‌فیت

جدایه‌های اپی‌فیت روی محیط کشت آگار غذایی کشت شده و خصوصیات ظاهری هر جدایه ثبت شد. آزمون گرم با روش حلالیت در پتاس سه درصد (Suslow et al., 1982)، آزمون فوق حساسیت روی برگ شمعدانی و توتون (Lozano & Sequeira, 1970)، آزمون لهانیدن در ورقه-های سیب‌زمینی (Schaad et al., 2001; Fahy & Persely, 1983) و آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، لوان و آرزنین دی‌هیدرولاز انجام شد. رشد جدایه‌های آنتاگونیست در اسیدیته‌های مختلف (۴/۵، ۵ و ۵/۵)، مولاریته‌های متفاوت نمک طعام (۰/۵، ۱ و ۱/۵) و رشد در دمای چهار و ۴۱ درجه سلسیوس بررسی شد (Schaad et al., 2001).

بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اپی‌فیت علیه باکتری بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌ها در مقابل باکتری بیمارگر با روش کشت همزمان انجام شد. در این روش سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته باکتری بیمارگر با غلظت 10^8 CFU/mL (ضریب جذب نوری ۰/۲ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه شد، سپس ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده روی محیط کشت آگار غذایی حاوی گلوکز (یک درصد) ریخته و به طور یکنواخت پخش شد، پس از جذب کامل سوسپانسیون، جدایه‌های اپی‌فیت به صورت لکه‌ای و با اندازه کاملاً یکسان در سطح محیط کشت شدند و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

توان کنترل زیستی جدایه‌های اپی فیت منتخب در شرایط گلخانه با چهار تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از شرایط آزمایشگاه و گلخانه توسط نرم افزار SAS Ver 9.4 انجام شد.

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌های اپی فیت

در مجموع ۱۰۰ نمونه ترکیبی از بافت‌های مختلف شامل شاخه‌های جوان به همراه برگ و میوه از ارقام مختلف مرکبات جمع‌آوری شد (جدول ۱). از بافت‌ها روی محیط آگار غذایی ۳۱۱ جدایه باکتریایی اپی فیت بر اساس ویژگی‌های ظاهری کلونی انتخاب و خالص‌سازی شد. به منظور نگهداری پرگنه-های خالص شده، جدایه‌ها روی محیط آگار غذایی کشت شدند. سوسپانسیون غلیظ از هر جدایه در آب مقطر سترون تهیه و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. برای نگهداری طولانی مدت، جدایه‌ها در محیط مایع اکشت شدند و سپس به حجم نهایی سوسپانسیون باکتری ۲۰ درصد گلیسرول سترون اضافه شد و به دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

اثبات بیماری‌زایی جدایه بیمارگر

سوسپانسیون باکتری بیمارگر به وسیله سرنگ سترون در چهار تکرار به بافت پارانثیم برگ‌های نهال لیموترش (رقم-های لایمکوات چهار فصل و مکزیکن لایم) تزریق شد. علائم روی برگ رقم لایمکوات چهار فصل بعد از گذشت چهار روز به صورت لکه‌های آب سوخته قابل مشاهده بود. پیشرفت بیماری از روز هفتم به صورت نقاط بسیار ریز نکروزه در برگ دیده شد که با گذشت زمان بافت مردگی و نکروز با جوش‌های بسیار ریز گسترش یافت. در تیمار شاهد منفی (آب مقطر سترون) هیچگونه علائمی مشاهده نشد (شکل ۱). علائم در رقم مکزیکن لایم بعد از گذشت چهار روز به شکل نکروز قابل مشاهده بودند. همچنین آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه بیمارگر، روی میوه نارس، میوه جدا شده از نهال و شاخه (با سه تکرار) انجام شد که نتایج این آزمون‌ها، منفی بود.

جدایه‌ها به صورت لکه‌ای کشت و بعد از ۲۴ ساعت پرگنه‌ها با پنبه سترون پاک شدند. روی درب تشتک‌های پتری چند قطره کلروفرم ریخته شد و به مدت یک ساعت به صورت وارونه قرار گرفت. بعد از تهویه، تشتک‌های پتری حاوی کلرید آهن و فاقد آن به مدت چهار ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا آنتی‌بیوتیک احتمالی تولید شده توسط جدایه‌ها غیر فعال شود. عدم وجود هاله در پتری حاوی کلرید آهن III و وجود هاله در پتری فاقد کلرید آهن III پس از کشت چمنی بیمارگر به عنوان وجود سیدروفور ارزیابی شد (Shahryari et al., 2005).

بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اپی فیت منتخب علیه بیمارگر در شرایط گلخانه

از کشت تازه باکتری بیمارگر و جدایه‌های آنتاگونیست منتخب روی محیط کشت آگار غذایی، به ترتیب سوسپانسیونی با غلظت 10^8 CFU/mL (ضریب جذب نوری ۰/۲ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه شد. در این پژوهش از نهال‌های دو ساله رقم مکزیکن لایم پیوند خورده روی پایه نارنج سه برگ استفاده شد. سوسپانسیون باکتری‌های اپی فیت به وسیله سرنگ سترون به بافت پارانثیم برگ تزریق و سوسپانسیون بیمارگر نیز با فاصله دو روز به بافت برگ تزریق شد. در تیمارهای شاهد جدایه‌های اپی فیت، باکتری بیمارگر و آب مقطر سترون به صورت جداگانه به بافت برگ تزریق شدند. این آزمون در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. نهال‌ها در گلخانه با دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند (Khodakarmian, 2004). پس از گذشت یک ماه سطح آلوده برگ به کمک نرم افزار Motic Images Advanced 3.2 اندازه‌گیری شد و درصد شدت بیماری با فرمول مساحت بافت آلود تقسیم بر مساحت کل بافت ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد.

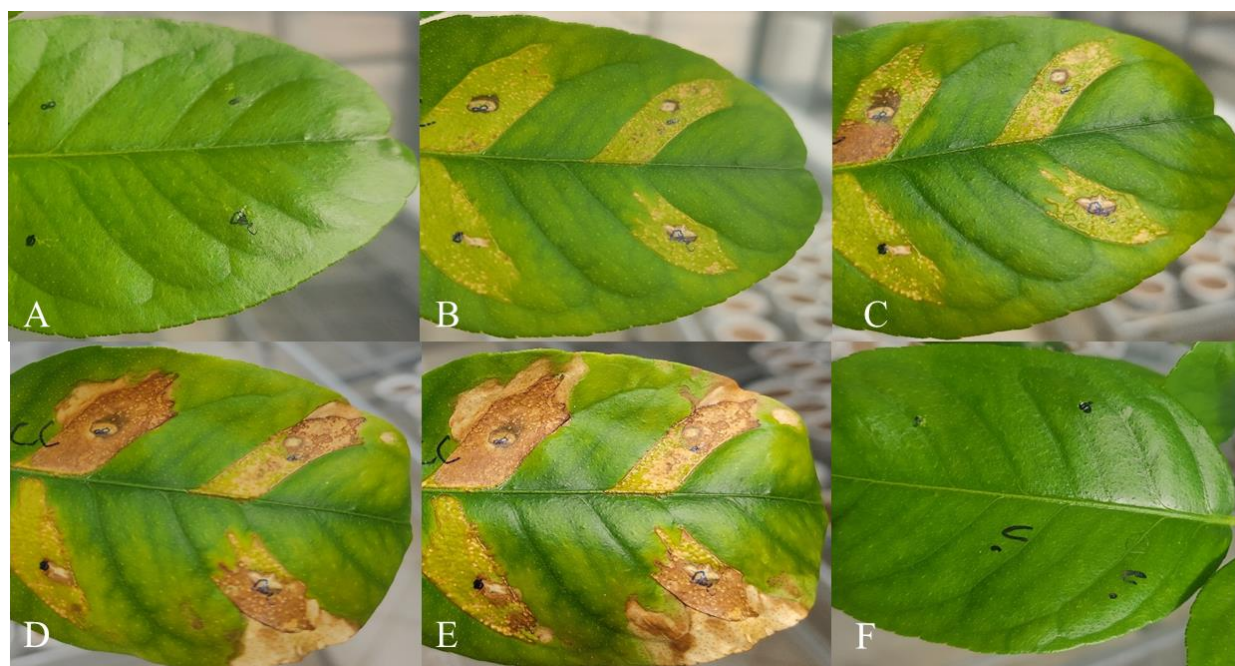
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اپی فیت در شرایط آزمایشگاه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ارزیابی

جدول ۱- خصوصیات جدایه‌های اپی‌فیت باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق (محل جمع‌آوری، بافت گیاه، میزبان و کد جدایه آنتاگونیست)

Table 1. Characteristics of bacterial epiphytic isolates used in this study (collection site, plant tissue, host, and antagonist isolate code)

County	Plant tissue	Host (Antagonist isolate code)
Rasht	Branch and Leaf	Orange (isolate 8), Lemon, Limequat (isolates 1, 2, 3, 4), Lime, Kumquat (isolates 5, 6, 7, 20, 21), Sour Orange (isolate 22)
Sari	Branch, Leaf and Fruit	Thomson (isolate 52) and Valencia Oranges, Cara Cara orange (isolate 43), Sour Orange (isolate 45), Mexican Limes (isolates 34, 35, 36, 40, 46) sweet lemon (isolate 42) and Tangerines (isolates 33, 49)
Khorramshahr	Branch and Leaf	Lemon, Tangerine, Orange and Sour Orange
Sowmesara	Branch, Leaf and Fruit	Orange and Sour Orange (13)
Talesh	Branch, Leaf and Fruit	Orange (isolates 23, 24, 25), Sour Orange (isolates 26, 27), Limequat (isolate 28), Tangerine (isolate 29) and Bergamot
Dezful	Leaf	Orange and Lemon
Fereydoun	Branch, Leaf and Fruit	Orange, Thomson Orange, Sour Orange, Grapefruit, Tangerine (isolate 54) and Lemon
Kenar	Fruit	
Jiroft	Branch and Leaf	Orange, Grapefruit, Tangerine and Lime



شکل ۱- بیماری‌زایی باکتری بیمارگر *Pantoea agglomerans* strain CC29 و مراحل پیشرفت بیماری در نهال دو ساله لیمو چهار فصل. A) تزریق سوسپانسیون جدایه بیمارگر روی برگ سالم در روز اول، B) بروز نقاط نکروزه به صورت پراکنده در سطح برگ پس از ۱۰، C) نکروزه شدن بافت برگ پس از ۱۵ روز، D) پیشرفت مناطق نکروزه در برگ ۲۵ روز بعد از تزریق، E) نکروز بیشتر مناطق آلوده پس از ۳۷ روز و F) تزریق آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی.

Figure 1. Pathogenicity of *Pantoea agglomerans* strain CC29 and stages of disease development in two-year-old four-season lemon seedling. A) Injection a suspension of pathogenic isolate onto healthy leaves on the first day, B) Appearance of necrotic spots scattered on the leaf surface after 10 days, C) Leaf tissue necrosis after 15 days, D) Progression of necrotic areas on the leaf 25 days after injection, E) Further necrosis of infected areas after 37 days, F) Injection of sterile distilled water as a negative control.

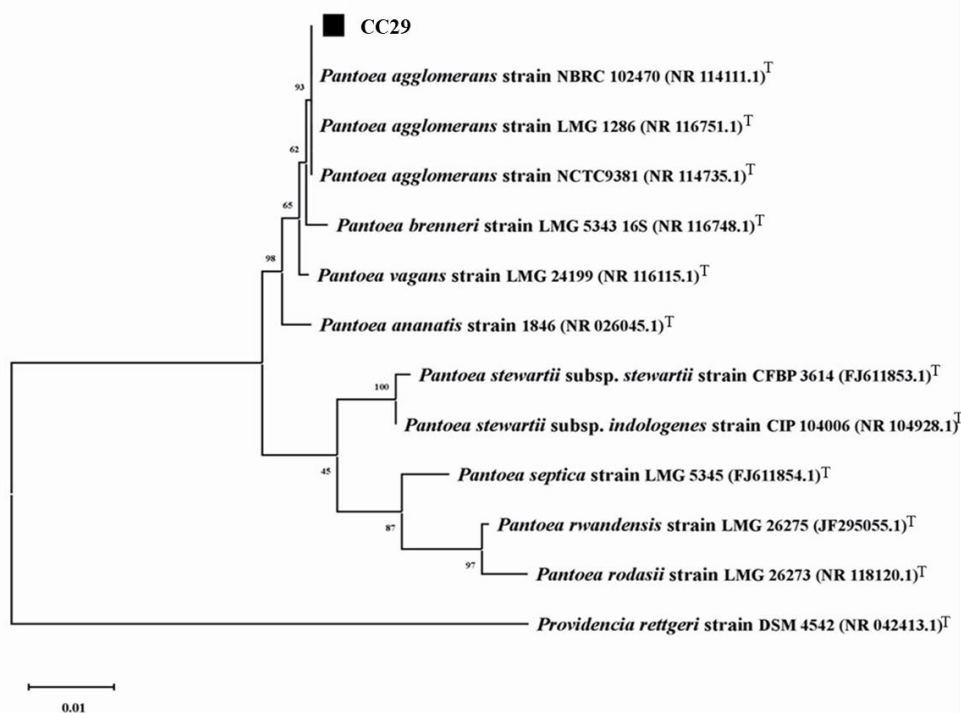
فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اپی فیت در شرایط آزمایشگاه

از مجموع ۳۱۱ جدایه اپی فیت بعد از انجام آزمون‌های واکنش فوق حساسیت در برگ شمعدانی و توتون و پوسیدگی نرم در ورقه‌های سیب زمینی، تعداد ۸۲ جدایه که نتایج دو آزمون فوق در آن‌ها منفی بود، برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاه انتخاب شد. در آزمون کشت همزمان، ۳۱ جدایه اپی فیت هاله بازدارندگی از رشد در مقابل باکتری بیمارگر تشکیل دادند. تجزیه واریانس داده‌های قطر هاله بازدارندگی بیانگر تفاوت آماری معنی دار اثر تیمارها در سطح احتمال یک درصد بود ($P \leq 0.01$). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که جدایه‌های ۴۳ و ۴۵ با هاله بازدارندگی به ترتیب ۴/۵ و پنج میلی‌متر بهترین عملکرد را داشتند (شکل ۳).

شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی جدایه بیمارگر

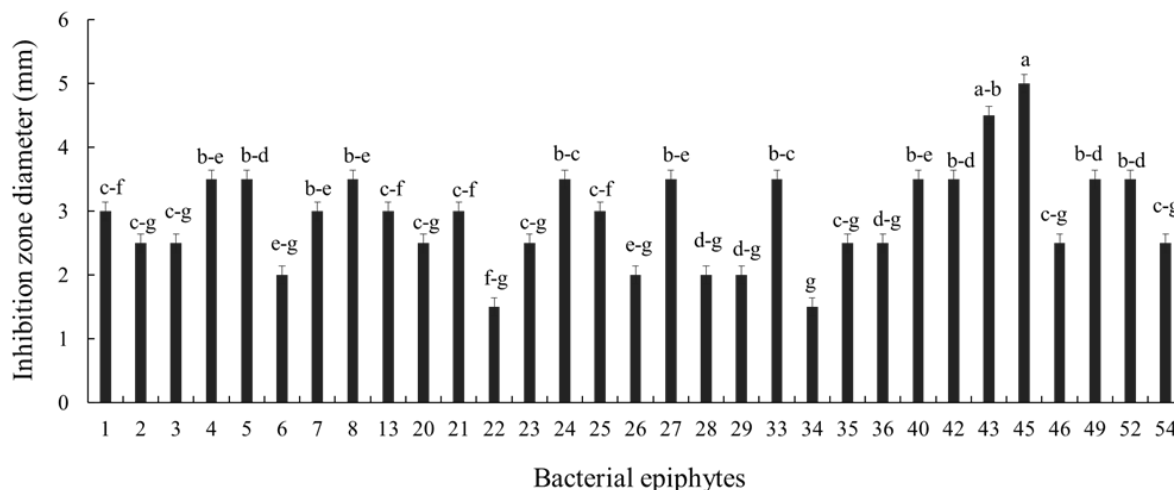
بر اساس تعیین ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن 16S rRNA به طول ۱۵۰۰ جفت باز و همردیف سازی آن با توالی‌های موجود در بانک ژن با کمک نرم افزار بلاست موجود در سایت NCBI مشخص شد که جدایه بیمارگر با سویه H68 از گونه *Pantoea agglomerans* دارای ۹۹/۷۶ درصد شباهت است. توالی نوکلئوتیدی حاصل با شماره دسترسی OR512154.1 در بانک ژن ثبت شد.

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از ژن 16SrRNA جدایه بیمارگر با دیگر جدایه‌های موجود در بانک ژن نشان داد که این جدایه با سویه‌های تیپ NBRC 102470، LMG 1286 و NCTC 9381 از گونه *P. agglomerans* در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی با توالی‌های نوکلئوتیدی بخشی از ژن 16S rDNA جدایه CC29 با توالی‌های موجود در بانک ژن بر اساس روش بیشینه درست نمایی (Maximum likelihood) با ۱۰۰۰ تکرار نمونه‌برداری (bootstrap). گونه *Providencia rettgeri* strain DSM 4542 به عنوان outgroup است. T: سویه‌های تیپ.

Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of isolate CC29 and related sequences available in the GenBank with 1000 bootstrap replications. *Providencia rettgeri* strain DSM 4542 is considered as outgroup. T: type strains.



شکل ۳- مقایسه میانگین قطر هاله بازدارندگی از رشد ایجاد شده توسط جدایه‌های باکتریایی اپی‌فیت در مقابل بیمارگر *Pantoea agglomerans* strain CC29 در شرایط آزمایشگاه. اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند. این آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

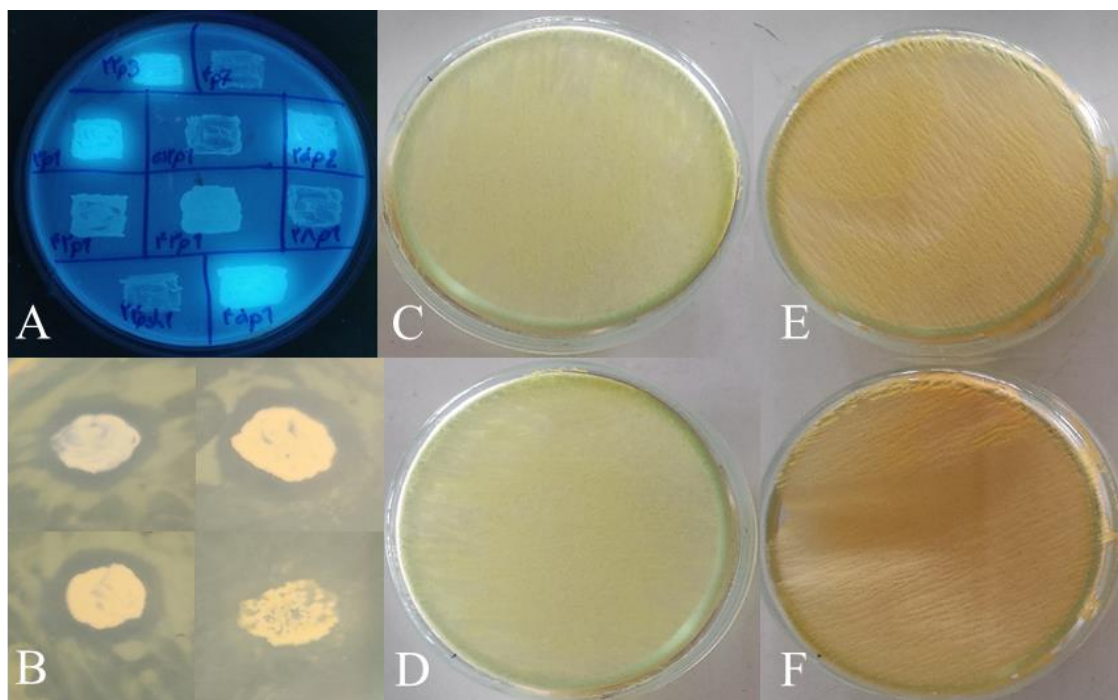
Figure 3. Mean comparison of inhibition zone diameter exhibited by epiphytic bacterial isolates against *Pantoea agglomerans* strain CC29 in *in vitro*. Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P = 0.05$). This experiment was conducted in three replications for each treatment.

در دماهای چهار و ۴۱ درجه سلسیوس رشد مناسبی داشتند. در آزمون تولید سیانید هیدروژن با توجه به تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف، جدایه‌ها به سه گروه تقسیم شدند. در گروه یک کاغذ صافی زرد رنگ و تولید سیانید هیدروژن منفی (-)، در گروه دوم کاغذ صافی کرم مایل به قهوه‌ای و میزان تولید سیانید هیدروژن متوسط و در گروه سوم کاغذ صافی آجری رنگ و میزان تولید سیانید هیدروژن حداکثر بود که در جدول ۲ و شکل ۴ آورده شده است.

از ۱۳ جدایه منتخب، جدایه‌های ۱، ۷، ۴۲ و ۴۵ هاله بازدارندگی از رشد در آزمون تولید آنتی‌بیوتیک در برابر جدایه بیمارگر نشان دادند. میانگین قطر هاله بازدارندگی از رشد در هر چهار جدایه ۴-۵ میلی‌متر بود. در آزمون تولید سیدروفور هاله بازدارندگی از رشد تشکیل نشد. برای اطمینان از صحت نتایج، آزمون‌ها تکرار و با نتایج قبلی همخوانی داشت. جدایه‌های ۲۲ و ۴۵ در آزمون‌های فوق حساسیت روی برگ توتون و شمعدانی و آزمون لپانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی منفی، اکسیداز مثبت، لوآن منفی و آرژنین دی‌هیدرولاز منفی بودند.

ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های اپی‌فیت آنتاگونیست منتخب

بر اساس آزمون گرم ۴۹ درصد از جدایه‌های آنتاگونیست گرم منفی و ۵۱ درصد گرم مثبت بودند. برای انتخاب جدایه‌های متنوع و مناسب از بین ۳۱ جدایه آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه، فاکتورهای مختلفی شامل ویژگی‌های فنوتیپی (آزمون گرم، کشت در محیط کشت‌های EMB، YDC و King's B)، پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها، رقم و نوع بافت گیاه ارزیابی شد. در نهایت ۱۳ جدایه (جدول ۲) که در شرایط آزمایشگاه فعالیت آنتاگونیستی بهتری نشان دادند و از نظر سایر فاکتورها هم متفاوت از دیگر جدایه‌ها بودند برای مرحله بعدی تحقیق انتخاب شدند. همه‌ی جدایه‌های اپی‌فیت به جز جدایه ۱۳ در محیط‌های قلیایی مختلف به خوبی رشد کردند. در محیط‌های اسیدی ۲۶ درصد از جدایه‌ها دارای رشد ضعیف بودند. جدایه‌های اپی‌فیت در غلظت نیم و یک مولار نمک طعام به خوبی رشد کردند و در مولاریته یک و نیم شش جدایه رشد نکرده و یا دارای رشد ضعیفی بودند. بیشتر جدایه‌ها



شکل ۴- (A): تولید رنگدانه فلورسنت توسط برخی از جدایه‌های اپی فیت روی محیط King's B، (B): هاله بازدارندگی از رشد توسط جدایه‌های اپی فیت در مقابل جدایه بیمارگر روی محیط آگار غذایی، (C و D): عدم تولید سیانید هیدروژن در کنترل منفی و جدایه ۸، (E و F): تولید سیانید هیدروژن در کنترل مثبت (*Bacillus velezensis* JD81) و جدایه اپی فیت ۱.

Figure 4. Fluorescent pigment production by some epiphyte isolates on King's medium B (A), Inhibition zones exhibited by epiphyte isolates against pathogenic strain on nutrient agar medium, without hydrogen cyanide production in the negative control and isolate 8 (C and D), hydrogen cyanide production in the positive control (*Bacillus velezensis* JD81) and epiphytic isolate 1 (E and F).

جنس *Pseudomonas* sp. تعلق دارد. تیمار با جدایه اپی فیت ۷ با شدت بیماری ۱۷/۴۵ درصد، بیشترین سطح آلودگی را نشان داد. میزان شدت آلودگی در جدایه بیمارگر ۱۷/۰۶ درصد و کنترل منفی (آب سترون) بدون علائم بودند (شکل ۵).

بحث

سویه بیمارگر که بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و همچنین نتایج آزمون بیماری‌زایی به عنوان عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات شناخته شده بود، در این پژوهش بر مبنای شناسایی مولکولی با توالی‌یابی بخشی از ژن 16S rRNA و مقایسه آن با توالی‌های موجود در بانک ژن به عنوان گونه *P. agglomerans* شناسایی شد. در تحقیقی مشابه، با توجه به علائم بیماری توصیف شده و همچنین

بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اپی فیت منتخب در شرایط گلخانه

فعالیت آنتاگونیستی ۱۳ جدایه اپی فیت منتخب در برابر جدایه بیمارگر در بافت برگ بررسی شد. بعد از گذشت یک ماه برگ‌ها از نهال‌های رقم لیمو مکزیکن لایم جدا و در آزمایشگاه عکس برداری از سطح برگ انجام شد و شدت آلودگی تعیین شد نتایج تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت آماری معنی داری را در تیمارها در سطح احتمال یک درصد نشان داد ($F_{14,45} = 14.79$, $P < 0.0001$). مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اثر جدایه‌های اپی فیت منتخب در جلوگیری از گسترش بیماری نشان داد که در تیمار جدایه اپی فیت ۲۲ با شدت بیماری ۹/۸۴ درصد، کمترین سطح آلودگی را در بین جدایه‌های منتخب داشت، که براساس ویژگی‌های فنوتیپی به

مشخص شد که تمامی جدایه‌ها متعلق به گونه *P. agglomerans* هستند (Zamorano et al., 2022). در این تحقیق و سایر تحقیقات مشخص شده است که شناسایی دقیق گونه‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های سنتی و بر اساس آزمون‌های فنوتیپی دشوار است.

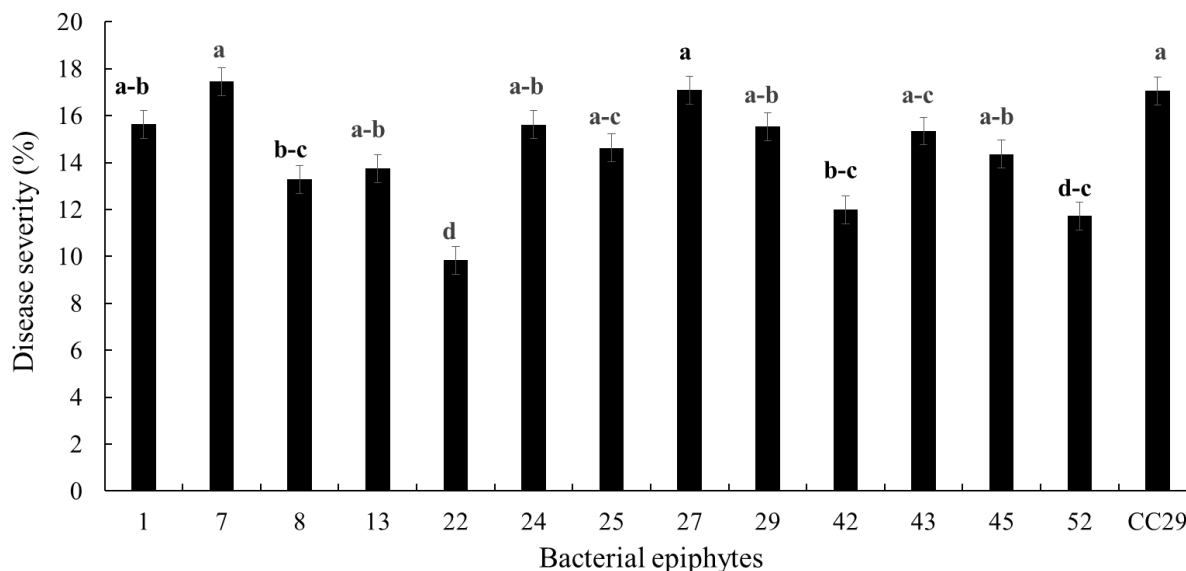
خصوصیات فنوتیپی انتظار می‌رفت که باکتری جدا شده از بافت آلوده به بیماری خشکیدگی پسته متعلق به جنس *Xanthomonas* باشد. معطوف به اینکه پرگنه‌های جدا شده از بافت، غیرفلورسنت و زرد رنگ بودند. با توالی‌یابی ژن 16S rRNA و سه ژن خانه‌داری *atpD*، *infB* و *rpoB*

جدول ۲- میزبان، شهر و ویژگی‌های فنوتیپی اپی‌فیت‌های آنتاگونیست باکتریایی

Table 2. Host, county and phenotypic characteristics of bacterial antagonistic epiphytes

Isolate	1	7	8	13	22	24	25	27	29	42	43	45	52
Test	Lq	Kq	O	So	So	O	O	So	T	Sl	Cco	So	To
Host	Lq	Kq	O	So	So	O	O	So	T	Sl	Cco	So	To
County	Rasht	Rasht	Rasht	Sowmesara	Rasht	Talesh	Talesh	Talesh	Talesh	Sari	Sari	Sari	Sari
Gram reaction (3% KOH)	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
Yellow pigment on YDC	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Fluorescent pigment on KB	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Levan production	N	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	-	N
Arginine dihydrolase	N	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	-	N
Oxidase	N	N	N	N	+	N	N	N	N	N	N	+	N
Hypersensitive reaction on:													
Tobacco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Potato soft rot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at:													
4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	*
41 °C	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5 M NaCl	+	+	*	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+
1 M NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.5 M NaCl	-	+	+	+	-	+	+	**	+	+	*	+	*
pH: 8 & 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH: 10	+	+	-	**	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH: 4.5	+	+	*	*	+	+	+	*	+	+	+	+	*
pH: 5	+	+	+	+	+	*	+	+	*	+	+	+	*
pH: 5.6	+	+	**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of:													
Siderophore	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antibiotics	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Hydrogen cyanide	++	++	-	-	-	-	*	++	-	-	-	*	-

+ :90% or more strain positive; ++: strong positive reaction; -: more strain negative; *:50-90% of strain negative; **:80-90% of strain negative
Lq: limequat; Kq: kumquat; O: Orange; So: Sour orange; T: Tangerine; Sl: Sweet lemon; To: Thomson orange; Cco: Cara Cara orange
YDC: Yeast extract-dextrose-CaCO₃; KB: King's medium B; N: Non-determined



شکل ۵- اثر جدایه‌های اپی فیت آنتاگونیست منتخب روی شدت بیماری در برگ نهال‌های دو ساله رقم مکزیکن لایم ۳۰ روز پس از تزریق *Pantoea agglomerans* strain CC29

Figure 5. Effect of the selected antagonistic epiphyte isolates on the disease severity in the leaves of two-year-old seedlings of the Mexican lime cultivar 30 days after the injection of *Pantoea agglomerans* strain CC29.

(*vulgaris*) و گل صدف ایجاد گال می‌کنند. فرض بر این است که این دو عامل بیمارگر در ابتدا به صورت همزیست روی گیاهان میزبان خود مستقر بوده و با کسب جزایر بیماری‌زایی توانایی ایجاد گال در میزبان‌های اختصاصی را پیدا کردند (Dutkiewicz et al., 2016). در پژوهشی ذکر شده است که باکتری *P. agglomerans* قبلاً به عنوان باکتری اندوفیت مرکبات بوده است، اما توانایی ایجاد شانکر در مرکبات را به دست آورده است و ممکن است این خصوصیات را از باکتری *Xanthomonas* کسب کرده باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد (Sherafati et al., 2014). علائم بیماری ناشی از باکتری *P. agglomerans* روی میزبان گریپ فروت در پژوهش Sherafati et al. (2014) در ۱۴-۵ روز پس از تلقیح به صورت لکه‌های ابسوخته بود و با گذشت زمان و ۶۰ روز پس از تلقیح جوش‌های برجسته و چوب‌پنبه‌ای شکلی روی برگ ایجاد شد. علائم بیماری ناشی از جدایه CC29 در دو هفته پس از تلقیح مشابه پژوهش ذکر شده بود. اما ۶۰ روز پس از تلقیح روی برگ‌ها بافت نکروز با جوش‌های ریز تشکیل شدند. با توجه به

گونه *P. agglomerans* به صورت اپی فیت و اندوفیت روی گونه‌های مختلف گیاهی در محیط‌های کشاورزی و طبیعی و حتی در انسان و حیوانات وجود دارد. این باکتری دارای قابلیت‌های متابولیکی منحصر به فردی از جمله بیوسنتز آنتی-بیوتیک (آنتی-بیوتیک‌های هریکولین، پانتوسین، میکروسین، آگلومرین، آندریمید، فنازین و غیره) است (Dutkiewicz et al., 2016). این گونه به دلیل سازگاری با محیط‌های مختلف می‌تواند تهدیدی برای محصولات کشاورزی باشد و همچنین به دلیل استفاده از این گونه به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی و باکتریایی گیاهی، آگاهی از پتانسیل بیماری‌زایی آن برای جلوگیری از اثرات نامطلوب یا خطرناک، ضروری است. جدایه‌هایی از این گونه با به دست آوردن یک جزیره بیماری‌زایی از طریق پلاسمید، به بیمارگرهایی با توانایی ایجاد گال روی میزبان اختصاصی تبدیل می‌شوند (Zamorano et al., 2022). جدایه *P. agglomerans* pv. *gypsophila* روی گیاه زینتی گل صدف (*Gypsophila paniculata*) و *P. agglomerans* pv. *betae* (روی چغندر *Beta*)

این جدایه‌ها در شرایط گلخانه شدت بیماری شانکر باکتریایی رقم لیموعمانی را کاهش دادند (Khodakarmian, 2004). با توجه به اینکه آزمون‌های تولید آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن جدایه اپی‌فیت ۴۵ مثبت بود، این جدایه همراه با چند جدایه دیگر برای آزمون‌های گلخانه استفاده شدند. لازم به ذکر است که برای اطمینان از ناپرآزاری جدایه‌های اپی‌فیت، این جدایه‌ها با دو تکرار به بافت پارانشیم برگ رقم مکزیکن لایم و لایمکوات چهار فصل تزریق شدند که مشابه شاهد منفی علایمی تشکیل نشد. تحت شرایط گلخانه شدت بیماری در تیمار جدایه اپی‌فیت ۲۲ همراه با جدایه بیمارگر، ۹/۸۴ درصد بود که نسبت به شاهد مثبت بیشترین تاثیر را در جلوگیری از گسترش علایم در برگ داشت. در حالیکه در شرایط آزمایشگاه، جدایه اپی‌فیت ۲۲ دارای کمترین هاله بازدارندگی از رشد بود. این نتایج نشان دهنده رفتار متفاوت باکتری‌ها تحت شرایط مختلف است. اگرچه در آزمون‌های آزمایشگاهی با توجه به ویژگی‌های خاص و ویژه عوامل بیوکنترل، شرایط غربالگری تعداد زیادی از جدایه‌ها با هزینه کم فراهم می‌شود ولی در بسیاری از موارد فعالیت آنتاگونیستی‌ها در شرایط آزمایشگاه با گلخانه و مزرعه مشابه نیست. لذا باید یک عامل بیوکنترل برتر از نظر توانایی کنترل بیماری از بین تعداد زیادی جدایه در گیاه انتخاب شود. با توجه به نتایج حاصل پیشنهاد می‌شود تا اثر هم‌افزایی جدایه بیمارگر معرفی شده در این تحقیق با باکتری *X. citri* subsp. *citri* مورد بررسی قرار گیرد و از روش‌های غربالگری دیگری با محیط کشت‌های متنوع و روش‌های متفاوت برای انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست موثر استفاده شود.

سپاس‌گزاری

این پژوهش در آزمایشگاه‌های گروه گیاه‌پزشکی و گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام شده است. نگارندگان مقاله از حمایت‌ها و امکانات فراهم شده توسط دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تحقیقات انجام شده باکتری *P. agglomerans* دارای فعالیت‌های بین گونه‌ای است. به طور مثال جدایه‌هایی از این باکتری که عموماً در درختان زیتون به عنوان اندوفیت‌های بی‌ضرر وجود دارند، ممکن است با باکتری بیمارگر *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* همکاری کرده و با تشکیل یک جامعه‌ی باکتریایی پایدار و تبادل سیگنال‌های سیستم سنجش حد نصاب باعث ایجاد بیماری گال زیتون شده و شدت بیماری را افزایش دهند (Buonaurio et al., 2015). این باکتری به عنوان عامل سوختگی برگ و پوسیدگی پیاز در جورجیا، ایالات متحده آمریکا و سوختگی و پژمردگی آوندی در مزارع ذرت و سورگوم در مکزیکن گزارش شده است. همچنین مشخص شده است که *P. agglomerans* می‌تواند باعث نکروز راسی^۱ در گردو، پوسیدگی نرم باکتریایی در کلم، نکروز در عنب، انبه و آلو، بلایت در خربزه و پژمردگی در پسته شود (Zamorano et al., 2022). با توجه به مشاهده نشدن بیماری باکتریایی شانکر مرکبات در شمال کشور فرضیه مبتنی بر اینکه علاوه بر شرایط محیطی ممکن است جمعیت میکروبی درختان نیز موثر واقع شده باشد از باکتری‌های اپی‌فیت درختان مرکبات شمال کشور در این پژوهش استفاده شد. در این مطالعه نتایج حاصل از آزمون فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اپی‌فیت در برابر جدایه بیمارگر در کشت همزمان نشان داد که جدایه اپی‌فیت ۴۵ با قطر هاله بازدارندگی از رشد حدود پنج میلی‌متر بیشترین اثر را در بین جدایه‌های منتخب داشت. در حالی که در پژوهش‌های مشابه بیشترین قطر هاله بازدارندگی حدود ۳۰ میلی‌متر بوده است که از محیط کشت KB و روش کشت همزمان استفاده شد (Al-Saleh, 2014) که نشان‌دهنده تاثیر احتمالی محیط کشت استفاده شده در تولید بهتر متابولیت‌ها توسط آنتاگونیست‌ها است. همچنین در تحقیقی توانایی بیوکنترلی جدایه‌های اپی‌فیت متعلق به جنس سودوموناس حاصل از نمونه‌های برگ، شاخه‌های جوان و میوه مرکبات استان‌های کرمان و هرمزگان علیه باکتری *X. citri* subsp. *citri* در شرایط آزمایشگاه تایید شد و همچنین

References

- Alizadeh, A., & Rahimian, H. (1990). Citrus canker in Kerman province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 26, 42. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19922317497>
- Al-Saleh, M. A. (2014). Evaluation of Saudi fluorescent pseudomonads isolate as a biocontrol agent against citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp *citri* A. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology*, 6(2), 1-7. <https://www.doi.org/10.21608/eajbsg.2014.16493>
- Alvani, S., Rouhani H., & Mahdikhani Moghadam, E. (2011). Relationship between hydrogen cyanide and siderophore production by fluorescent pseudomonads of wheat rhizosphere with growth rate of the plant. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 43(1), 1-12 (In Farsi with English summary). doi: [10.22059/ijpps.2012.28640](https://doi.org/10.22059/ijpps.2012.28640)
- Ardestani, M. (2014). Analysis of the citrus market in the world and Iran. *Researches on Planning, Agricultural Economics and Rural Development*, 23p. (In Farsi).
- Buonaurio, R., Moretti, C., da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., & Venturi, V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science*, 6, 434. doi: [10.3389/fpls.2015.00434](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00434)
- CABI. (2022). Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56921>
- Dhanasekaran, D., Rajakumar, G., Sivamani, P., Selvamani, S., Panneerselvam, A., & Thajuddin, N. (2005). Screening of salt pans actinomycetes for antibacterial agents. *The Internet Journal of Microbiology*, 1(2), 6-12. <https://doi.org/10.5580/1bcc>
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M., Golec, M. & Milanowski, J. (2016). Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2), 206–222. doi: [10.5604/12321966.1203879](https://doi.org/10.5604/12321966.1203879)
- Fahy, P. C., & Persely G. J. (1983). Plant bacteria diseases: A diagnostic guide. *Academic Press, Sydney, Australia*, p, 378. <https://doi.org/10.1007/bf03212583>
- Ference, C. M., Gochez, A. M., Behlau, F., Wang, N., Graham, J. H., & Jones, J. B. (2018). Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1302-1318. doi: [10.1111/mpp.12638](https://doi.org/10.1111/mpp.12638)
- Glynn, b. (2015). Citrus cultivars and bases suitable for Iran. 9th Congress of Horticultural Sciences of Iran, Ahvaz. <https://civilica.com/doc/724904> (In Farsi with English summary).
- Islam, M. N., Ali, M. S., Choi, S. J., Hyun, J. W., & Baek, K. H. (2019). "Biocontrol of citrus canker disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using an endophytic *Bacillus thuringiensis*." *The Plant Pathology Journal*, 35(5), 486-497. doi: [10.5423/PPJ.OA.03.2019.0060](https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0060)
- Khodakarmian, G. (2004). Characterization of fluorescent pseudomonads isolated from citrus phylosphere in southern Iran and evaluation of their antagonistic activity against bacterial inducing citrus canker disease. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 35(4), 919-911 (In Farsi with English summary). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20053120558>

Kumar, S., Stecher, G., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096

Lozano, J. C., & Sequeira, L. (1970). Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology*, 60, 833-38. <https://doi.org/10.1094/phyto-60-833>

Montakhabi, M., Rahimian, H., Falahati Rastgar, M., & Jafarpour, B. (2010). Investigating the possibility of using citrus epiphyte bacteria against citrus canker disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in laboratory conditions." *Plant Protection*, 24(4), 376-368. (In Farsi) doi: [10.22067/jpp.v24i4.8117](https://doi.org/10.22067/jpp.v24i4.8117)

Poveda, J., Roeschlin, R. A., Marano, M. R., & Favaro, M. A. (2021). Microorganisms as biocontrol agents against bacterial citrus diseases. *Biological Control*, 158, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104602>

Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. *American Phytopathological Society, APS Press*, 373p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>

Schlechter, R. O., Miebach, M., & Remus-Emsermann, M. N. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: a review. *Journal of Advanced Research*, 19, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.003>

Seidipoor, E., Samadzadegan, F., Dadras Javan, F., & Askari, O. (2018). Diagnosis declines in citrus using multispectral camera-equipped unmanned aerial system. *Engineering Journal of Geospatial Information Technology*, 6(3), 31-49, URL: <http://jgit.kntu.ac.ir/article-1-616-fa.html> (In Farsi with English summary). doi: 10.29252/jgit.6.3.39

Shahryari, F., Khodakaramian, G., & Heydari, A. (2005). Assessment of antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* biovars toward *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*. *Journal of Water and Soil Science*, 8(4), 201-211 URL: <http://jstnar.iut.ac.ir/article-1-314-fa.html> (In Farsi). dor: 20.1001.1.22518517.1383.8.4.18.0

Sherafati, F., Khodaygan, P., Azadvar, M., Sedaghati, E., Saberi-Riseh, R. & Baghaee-Ravari, S., (2014). Association of *Pantoea agglomerans* with the citrus bacterial canker disease in Iran. *Journal of Crop Protection*, 3(3), 345-355. dor: 20.1001.1.22519041.2014.3.3.10.9

Sherafati, F., Khodaygan, P., Azadvar, M., Sedaghati, E., Saberi-Riseh, R., & Nourollahi kh. (2013). Identification and comparative investigation into causal agent of citrus bacterial canker in Ilam province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 36(4), 11-23. (In Farsi with English summary). dor: 20.1001.1.22519041.2014.3.3.10.9

Spicer, M. E., & Woods, C. L. (2022). A case for studying biotic interactions in epiphyte ecology and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 54, 1-93. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2021.125658>

Suslow, T. V., Schroth, M. N., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917-918. <https://doi.org/10.1094/phyto-72-917>

Zamorano, A., Zuñiga, T., Córdova, P., Higuera, G., Bertaccini, A., & Fiore, N. (2022). *Pantoea agglomerans*-induced dieback in pistachio in Chile. *Horticulturae*, 8(11), 1-12. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111052>

Zia Ur Rehman, M., Ahmed, F., Attique Khan, M., Tariq, U., Shaukat Jamal, S., Ahmad, J., & Hussain, I. (2021). Classification of citrus plant diseases using deep transfer learning. *Computers, Materials & Continua*, 70(1), 1401-1417. <https://doi.org/10.32604/cmc.2022.019046>



© 2025 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).