



## مقاله پژوهشی

## فوتوپ بیماری‌زایی *Xanthomonas citri* pv. *citri* عامل شانکر باکتریایی مرکبات و سنجش اثربخشی ترکیبات مسی در مهار آن در شرایط آزمایشگاهی

زهرا ابراهیمی<sup>۱</sup> و سید محسن تقوی<sup>۲\*</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۶)

## چکیده

استفاده فراوان از باکتری‌کش‌های مسی در برخی از گونه‌های باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی، از جمله *Xanthomonas citri* pv. *citri* مقاومت در برابر مس ایجاد کرده است. در این پژوهش به بررسی فوتوپ بیماری‌زایی باکتری عامل شانکر مرکبات و اثربخشی ترکیبات مسی در مهار این بیماری‌گر پرداخته شده است. نمونه‌برداری از باغ‌های مرکبات طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ انجام شد. صد و هفده باغ مرکبات مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس ویژگی‌های فوتویی و ژنوتیپی ۱۳۲ جدایه به عنوان *Xanthomonas citri* pv. *citri* شناسایی شدند. فوتوپ‌های مختلف بیماری‌زایی توسط ده جدایه نماینده روی ارقام مختلف لیموترش، پرتقال، گریپ‌فروت و سیتروملو مشاهده شد اما ارقام نارنگی علائم بیماری را نشان ندادند. همه جدایه‌ها سطح متوسطی از حساسیت به مس را نشان دادند و در محیط کشت حاوی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس رشد کردند. غلظت‌های بالای سولفات مس (۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، از رشد بیشتر از ۹۰ درصد جدایه‌ها جلوگیری کردند. کربوکسیلات مس در غلظت ۰/۷۵ گرم بر لیتر جلوی رشد بیش از ۸۵ درصد از جدایه‌ها را گرفت. همچنین بهترین بازدارندگی از رشد ترکیب اکسی کلرید مس، در غلظت‌های بالاتر از ۳ گرم بر لیتر مشاهده شد و مخلوط بور دو در غلظت ۱/۵ میلی‌لیتر در لیتر از رشد بالای ۸۰ درصد جدایه‌ها جلوگیری کرد. هیچ یک از خوشه‌های ژنی مقاومت به ترکیبات مسی *copLAB* و *copABCD* در جدایه‌های بررسی شده در این پژوهش ردیابی نشد. سنجش دقیق فوتوپ بیماری‌زایی و میزان تحمل مس توسط باکتری عامل شانکر مرکبات منجر به تصمیمات مطمئن‌تری در مدیریت این بیماری می‌شود.

کلمات کلیدی: شانکر مرکبات، ترکیبات مسی، *copLAB*، *copABCD*

\*بخشی از یک رساله دکتری ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران

\*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [mtaghavi@shirazu.ac.ir](mailto:mtaghavi@shirazu.ac.ir)

۱- دانشجوی دکتری بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران

۲- استاد بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران



DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021796.450

## Research Article

# Pathological phenotypes of *Xanthomonas citri* pv. *citri* causal agent of citrus bacterial canker and in vitro efficiency assessment of copper compounds in its inhibition

Zohreh Ebrahimi<sup>1</sup> and Seyed Mohsen Taghavi<sup>2\*\*</sup>

(Received: 12.05.2024; Accepted: 15.06.2024)

## Abstract

As a consequence of the abundant use of copper bactericides, some species of plant pathogenic bacteria, including *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc), have developed resistance to copper. This study evaluates pathological phenotypes and in vitro efficiency of prevalent copper compounds in inhibiting Xcc. Sampling was conducted across citrus orchards during 2021-2022. One hundred and seventeen citrus orchards were surveyed and 132 strains identified as *Xanthomonas citri* pv. *citri* based on phenotypic and genotypic characteristics. Different pathogenic phenotypes were observed by inoculating the representative strains on different cultivars of lime, orange, citrumelo and grapefruit, but tangerine cultivars did not show disease symptoms. All the strains showed an intermediate level of sensitivity and grew in the medium containing 100 and 150 mg/l of copper sulfate. In addition higher concentrations (250, 300, 350 and 400 mg/liter) showed inhibition rate more than 90%. Copper carboxylate at the concentration of 0.75 g/liter prevented the growth of more than 85% of the strains. Also, Copper oxychloride showed the best inhibition rate in concentrations higher than 3 g/liter. 1.5 ml/liter of Bordeaux mixture controlled more than 80% of the strains. None of copper resistance gene clusters *copLAB* and *copABCD* were detected in tested *Xanthomonas citri* strains. The proper characterization of pathological phenotypes and sensitivity to copper leads more confident decisions in citrus canker disease management.

**Keywords:** Citrus canker, Copper bactericides, *copLAB*, *copABCD*

\*A Part of a PhD dissertation presented to the College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

\*\*Corresponding author's E-mail address: mtaghavi@shirazu.ac.ir

1 PhD. student, Department of Plant protection, College of Agriculture, Shiraz University, Iran

2 Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

## مقدمه

بستگی دارد. این موضوع دلیل اصلی تفاوت دامنه میزبانی در پاتوتیپ‌های  $A^*$  و  $A^w$  است. بیمارگر دیگری به نام *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* شامل پاتوتیپ‌های B و C است که تأثیر بسیار محدودتری بر صنایع مرکبات دارد (Rossetti 1977).

باکتری‌کش‌های مبتنی بر مس به طور گسترده‌ای برای کنترل بیماری‌های باکتریایی گیاهی در جهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال، کاربرد مکرر باکتری‌کش‌های مبتنی بر مس باعث تکامل و توسعه جدایه‌های باکتریایی مقاوم به مس می‌شود (Lai et al. 2021). از آنجایی که ترکیبات مسی هیچ اثر درمانی یا سیستمیکی ندارند، فقط به عنوان اقدامات پیشگیرانه مورد استفاده قرار می‌گیرند. این امر مدیریت بیماری را آسان‌تر می‌کند زیرا میزان مایه تلقیح ایجاد شده روی بافت‌های آسیب‌پذیر گیاه را کاهش می‌دهند و از ایجاد بیماری جلوگیری می‌کنند (Lamichhane et al. 2018). مقاومت به مس برای اولین بار در آرژانتین در دهه ۱۹۹۰ و دو دهه بعد در جزیره رئونیون در فرانسه شناسایی شد (Behlau et al. 2011, Richard et al. 2017). محبوب‌ترین فرمولاسیون‌های مبتنی بر مس عبارتند از اکسی کلرید مس، مخلوط بوردو، هیدروکسید مس یا اکسید مس (Graham et al. 2016, Behlau et al. 2017b). اگرچه مس یک عنصر مورد نیاز برای متابولیسم سلولی گونه‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی است، اما در مقادیر زیاد برای باکتری‌ها خطرناک است زیرا باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌شود که به نوبه خود آسیب‌های سلولی را ایجاد می‌کند (Chillappagari et al. 2010). سیستم‌های مقاومت متعددی در میکروارگانیسم‌ها برای حفظ هموستاز مس در شرایط استرس تکامل یافته‌اند. این سیستم‌ها مسئول نفوذ و خروج یون‌های مس در سلول‌ها هستند (Xiaojing et al. 2022). سه سیستم مختلف مقاومت در برابر مس، از جمله سیستم کروموزومی *cohABCD*

مرکبات از محصولات مهم در سراسر جهان است و چندین دهه است که توسط بیماری‌های مختلفی تهدید می‌شود. یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های این محصول، شانکر باکتریایی است که به صنعت کشت مرکبات آسیب جدی رسانده است (Graham et al. 2004). عامل این بیماری باکتری *Xanthomonas citri* pv. *citri* دارای دامنه میزبانی گسترده‌ای در میان گونه‌ها و ارقام مختلف مرکبات است (Gottwald et al. 1993). علائم بیماری در همه بافت‌های هوایی دیده می‌شود و در حالت شدید، باعث ایجاد جوش و لکه‌های برجسته روی میوه، برگ و ساقه و هم‌چنین ریزش برگ و میوه می‌شود (Gottwald et al. 2002). بیماری شانکر مرکبات در ایران اولین بار در سال ۱۳۶۸ توسط علیزاده و رحیمیان از منطقه کهنوج استان کرمان از گیاه لیموترش گزارش شد و در سال ۱۳۷۵ در مناطق جنوبی کشور اپیدمی گردید (مستوفی‌زاده و رحیمیان ۱۳۷۵). این بیماری در مناطق جنوبی کشور از جمله هرمزگان، کرمان، سیستان و بلوچستان، کهگیلویه و بویراحمد، فارس و بوشهر باعث بروز مشکلاتی برای باغداران گردیده است.

پاتوتیپ‌های مختلفی از این باکتری توصیف شده است. نوع A می‌تواند باعث ایجاد شانکر بر روی تمام انواع مرکبات شود و دامنه میزبانی وسیعی دارد. در مقابل، پاتوتیپ‌های  $A^*$  و  $A^w$  دامنه میزبانی محدودی دارند که در شرایط طبیعی محدود به لیموترش شیرازی (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) هستند. پاتوتیپ  $A^w$  دارای ویژگی منحصر به فرد ایجاد واکنش فوق حساسیت در زمان مایه‌زنی غلظت بالای آن به گریپ‌فروت (*C. paradisi*) است. گفته شده که این ویژگی به وجود یک تغییرگر نوع III به نام *avrGf1*

نمونه‌برداری طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۰ از باغ‌های مرکبات استان‌های جنوب، جنوب غرب و جنوب شرق ایران انجام شد. تعداد باغ‌ها، نمونه‌ها و منطقه نمونه‌برداری در جدول ۱ آمده است. بافت‌ها و میوه‌های دارای علائم مشکوک به شانکر از ارقام مختلف مرکبات جمع‌آوری و برای جداسازی به آزمایشگاه منتقل شدند. بافت‌های مرکبات با هیپوکلیت سدیم ۱ درصد به مدت ۲۰ ثانیه ضدعفونی و سپس دو تا سه بار با آب مقطر سترون ضدعفونی سطحی شدند. بافت بین قسمت آلوده و سالم جهت جداسازی باکتری مورد استفاده قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت YPGA کشت شد (Schaad et al. 2001). تست‌های پتری به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس کلنی‌های زرد رنگ مشکوک به *Xanthomonas* خالص‌سازی شدند. جدایه‌های باکتری برای استفاده‌های بعدی در آب مقطر سترون نگهداری شدند. برای نگهداری بلند مدت جدایه‌ها از مخلوط آب و گلیسرول به نسبت ۵۰-۵۰ در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

#### شناسایی اولیه جدایه‌های باکتری بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی

کشت‌های خالص شبیه به *Xanthomonas* spp. با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تشخیصی اولیه گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد هوازی و بی‌هوازی، کشت روی محیط YDC، هیدرولیز توین ۸۰، هیدرولیز نشاسته، لوان، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز کازئین مورد سنجش قرار گرفتند (Schaad et al. 2001) و مجموعه‌ای از ۱۳۲ جدایه برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند. جدایه مرجع *Xanthomonas citri* pv. *citri* ICMP 24 به عنوان شاهد در تمام آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی گنجانده شد.

و سیستم‌های پلاسمیدی *copABCD* و *copLAB* در زانتوموناس‌های بیمارگر گیاهی یافت شده است (Fan et al. 2022, Richard et al. 2017). تجزیه و تحلیل کمی بیان ژن‌های کروموزومی در *Xanthomonas citri* جدایه‌هایی را تحت عنوان متحمل معرفی کرده است که این جدایه‌ها قادر به تحمل سولفات مس تا غلظت ۱۵۰-۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر هستند و دلیل آن افزایش بیان ژن‌های کروموزومی *cohA* و *cohB* که مستقیماً بر هومستاز مس تاثیر می‌گذارند ذکر شده است (Marin et al. 2019). ژن‌های پلاسمیدی، در جدایه‌های *Xanthomonas* و *Pseudomonas* مقاوم به ترکیبات مسی، نقش غالب دارند (Cooksey 1993). بیشتر جدایه‌های زانتاموناسی که به عنوان مقاوم در برابر مس معرفی می‌شوند، به دلیل وجود خوشه ژنی *copLAB* در پلاسمید آن‌ها است (Behlau et al. 2011, 2013, 2017a). این ژن‌ها به دلیل قرار داشتن روی پلاسمید، توسط انتقال افقی بین جدایه‌ها (پدیده Conjugation یا الحاق) منتقل می‌شوند (Behlau et al., 2011, 2012, 2013). به دلیل استفاده گسترده از ترکیبات مسی به عنوان روشی برای مهار بیماری شانکر باکتریایی مرکبات، نیاز مداوم به بررسی و سنجش جدایه‌ها از لحاظ القای مقاومت به مس احساس می‌شود. همچنین بیماری‌زایی جدایه‌های ایرانی روی میزبان‌های مختلف مرکبات نیازمند بررسی‌های دقیق است. بنابراین هدف از این پژوهش ردیابی مولکولی ژن‌های القاگر مقاومت به مس، سنجش سطح تحمل مس، کارایی ترکیبات مسی در کنترل باکتری *X. citri* pv. *citri* جدا شده از مناطق مختلف ایران و سنجش فنوتیپ بیماری‌زایی این بیمارگر در میزبان‌های مختلف مرکبات می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری و جداسازی

جدول ۱- اطلاعات مناطق و باغ‌های نمونه برداری شده

Table 1- Information of sampled areas and orchards

Province	County	Number of				Identified as	Sampling date
		Surveyed orchards	Samples	Infected orchards	Isolates		
Bushehr	Dashtestan	8	20	5	8	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	May 2021
Bushehr	Jam	18	32	6	6	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Sep 2021
Bushehr	Riz	5	10	5	7	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Sep 2021
Bushehr	Tangestan	10	25	0	0	-	Nov 2021
Bushehr	Tangetan	12	25	0	0	-	Nov 2021
Fars	Jahrom	10	20	5	11	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	July 2021
Fars	Ghiro Karzin	4	8	4	4	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	July 2021
Fars	goyom	2	4	2	3	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	June 2022
Fars	Darab	2	4	1	1	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	July 2022
Fars	Fasa	3	3	0	0		
Kerman	Jiroft	4	4	4	8	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	July 2022
Sistan Baluchestan	Sarbaz	12	38	10	32	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Aug 2022
Sistan Baluchestan	Rask	15	33	9	22	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Aug 2022
Sistan Baluchestan	Qasre qand	10	27	6	28	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Aug 2022
Sistan Baluchestan	Iranshahr	2	2	2	2	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	Sep 2022

(۲) به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای C ۷۲° به مدت ۴۰ ثانیه و در آخر یک گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. آغازگرهای X-ITS و LipF/R به منظور تشخیص جنس *Xanthomonas*، آغازگر J-pth1/2 برای تشخیص گونه *Xanthomonas citri*، آغازگر Ms<sup>+</sup>/Ms<sup>-</sup> برای تشخیص پاتوتیپ A\* و آغازگر M<sup>+</sup>/M<sup>-</sup> برای تشخیص پاتوتیپ A استفاده شدند. اطلاعات آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

#### سنجش فنوتیپ بیماری‌زایی جدایه‌های ایرانی *Xanthomonas citri* pv. *citri* روی میزبان‌های مختلف مرکبات

سنجش فنوتیپ بیماری‌زایی با استفاده از روش مایه‌زنی برگ‌های جدا انجام شد (Pruvost et al. 2015). برگ‌های جوان نهال‌های ۲ ساله از ۱۰ میزبان (گونه‌ها و ارقام مختلف) مرکبات شامل لیموترش شیرازی (*C. aurantifolia*)، پرشین‌لایم (*C. latifolia*)، لیموی خارگی (*C. limon*)، لیموشیرین (*C. limettioides*)، پرتقال ناول (*C. sinensis* cv. Washington Navel)،

#### شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی

برای استخراج DNA، هر جدایه روی محیط کشت آگار غذایی حاوی عصاره مخمر کشت و پس از ۴۸ ساعت سوسپانسیون با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> تا ۱۰<sup>۷</sup> سلول باکتری در هر میلی‌لیتر (واحدهای تشکیل‌دهنده پرگنه یا Cfu/ml) تهیه شد. سوسپانسیون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش لیز، و سپس به مدت ۳ دقیقه روی یخ قرار داده و در نهایت به مدت ۳ دقیقه با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به عنوان DNA الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت عمومی PCR پلیمر DNA آمپلیکون، Taq DNA Polymerase، Ampliqon A/S، (Odense, Denmark) مطابق با توصیه‌های شرکت سازنده، ۲ میکرولیتر DNA و یک میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها تهیه شد. چرخه PCR طبق برنامه حرارتی واسرشته‌سازی اولیه در دمای C ۹۴° به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA در دمای C ۹۴° به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای مخصوص هر آغازگر (جدول

**Table 2- Primer pairs used in this study**

Prime name	5´- 3´ sequence	Size of amplicon	Ann. Temp.	Target species/region	Reference
X-ITS-F3j	GGCGGGGACTTCGAGTCCCTAA				
X-ITS-F3k	GGCGGGGACTTCGAGTTCCTAA				
X-ITS-F3c	CGGGGACCTCGAGTCCCTA	254	68	ITS region	Adriko <i>et al.</i> 2014
X-ITS-F3d	GCGGGGACTTAGAGTCCCTA				
X-ITS-R2	CTGCAGGATACTGCCGAAGCA				
LipF	TATGTGATGGTCCCGACCATTC	777	57	<i>estA</i> gene	Lee <i>et al.</i> 2009
LipR	GGACTTCGCGGTCCACGTCGTAG				
J-pth1	CTTCAACTCAAACGCCGGAC	197	58	<i>pthA</i> gene	Cubero & Graham 2002
J-pth2	CATCGCGCTGTTCCGGGAG				
M+	GCTAGGTAGCGGGTCTTTCC	391	64		Yousefi-Koupaei <i>et al.</i> 2014
M-	TCGAGCTCGATGACACCTTC				
Ms <sup>+</sup>	CCGGGAACGGCAATTCCTCA	824	68		Yousefi-Koupaei <i>et al.</i> 2014
Ms <sup>-</sup>	CAGCAGGCGATTGCCTGTCT				
CopLF	CCGTGTCAGCCTCCTCACTTCTAC	356	58	Plasmid borne CopLAB gene cluster	Behlau <i>et al.</i> 2012
CopLR	CAGCGGCATGACATCCAGGCC				
CopAF	CCTCCATGGCACGGACACTTCCATC	870	58	Plasmid borne CopLAB gene cluster	Behlau <i>et al.</i> 2012
CopAR	CCAGACATATCCATCGACCCATGATCCA				
CopBF	CTCAGGATCACTCTGCACATCAG	531	57	Plasmid borne CopLAB gene cluster	Behlau <i>et al.</i> 2012
CopBR	GCACGTAGCTCTTAATCGAGTTGTC				
CopAF	GCCGTTCCGCATAGTTCAATC	171	62	Plasmid borne CopABCD gene cluster	Richard <i>et al.</i> 2017
CopAR	CGGTACTGACCTACGCAATGCTC				
CopBF	TCAACACGCTCGGATTCGTCT	225	62	Plasmid borne CopABCD gene cluster	Richard <i>et al.</i> 2017
CopBR	ACTGCTGCTACCAATCGTT				

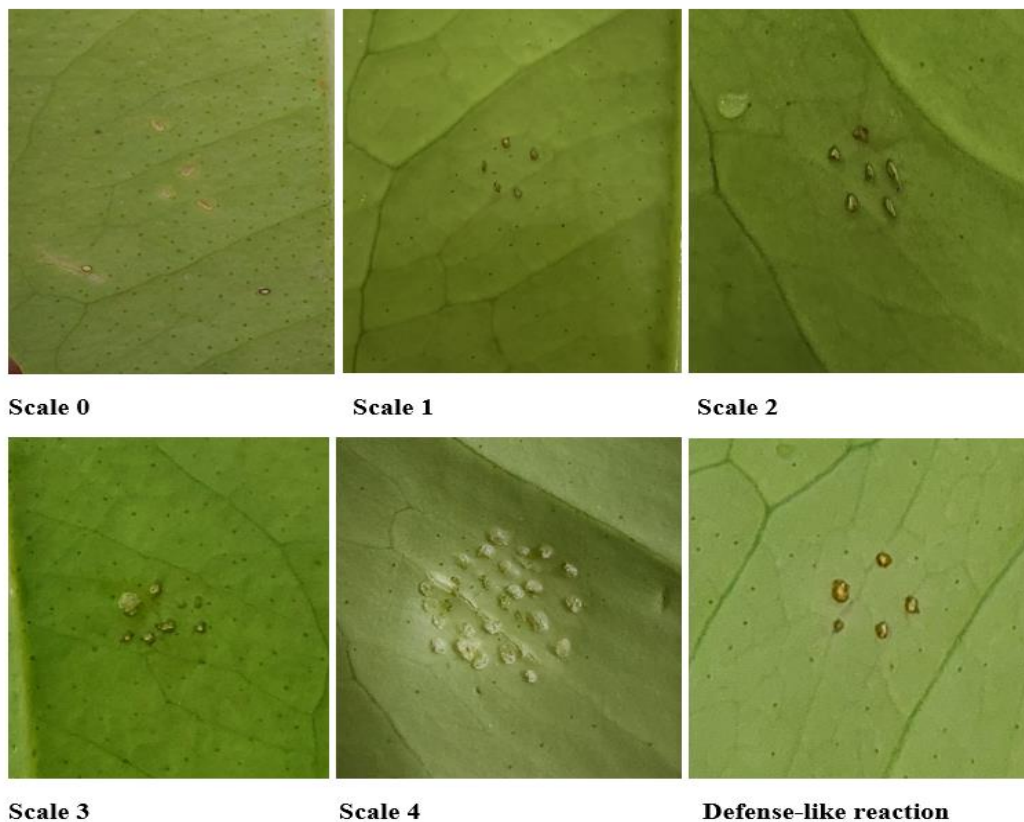
بیوتیک‌های استرپتومایسین و آمپی‌سیلین در محیط جامد محیط کشت YPGA اصلاح شده با مس برای تعیین میزان حساسیت جدایه‌ها به مس استفاده شد. سولفات مس پنج آبه (CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O) با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت پایه YPGA اضافه شد و جدایه‌ها به صورت نقطه‌ای روی آن کشت شدند (Marin et al. 2019). جدایه مقاوم به مس *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109 شاهد مثبت و جدایه حساس به مس *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807 به عنوان شاهد منفی استفاده شدند. تشتک‌های پتری حاوی باکتری به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۸°C نگهداری و رشد یا عدم رشد باکتری به ترتیب به عنوان نتیجه مثبت و منفی در نظر گرفته شد (Marin et al. 2019). سموم شیمیایی مبتنی بر مس اکسی کلرید مس (WP, 35%)، مخلوط بوردو (SC, 20%) و کربوکسیلات مس (WP, 91%) با غلظت‌های ۰/۷۵، ۱/۵، ۳ و ۴ گرم در لیتر به محیط کشت پایه YPGA اضافه شدند. همچنین آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و استرپتومایسین در غلظت‌های ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت YPGA اضافه شدند. پتری‌دیش‌های کشت شده برای سنجش رشد یا عدم رشد به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. به جهت اطمینان از صحت نتایج، برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته و آزمایش دو بار تکرار شد. درصد مهار رشد جدایه‌ها توسط هر ترکیب طبق فرمول زیر محاسبه شد (Areas et al. 2018):

$$\text{درصد مهار رشد جدایه‌ها} = \frac{\text{تعداد جدایه‌های رشد کرده} - \text{تعداد کل جدایه‌ها}}{\text{تعداد کل جدایه‌ها}} \times 100$$

پرتقال والنسیا (*C. sinensis* cv. Valencia)، گریپ فروت توسرخ (*Citrus paradisi* cv. Redblush)، نارنگی خاری (*C. reticulata*)، نارنگی کلمانتین (*C. clementina*) و سیترملو (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) تهیه شد. برگ‌ها پس از ضدعفونی سطحی درون تشتک‌های پتری حاوی آب آگار ۱ درصد قرار داده شدند و به وسیله سوزن روی هر برگ ۵ خراش ایجاد شد. ده جدایه نماینده از مناطق مختلف ایران انتخاب شدند. از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیون با غلظت ۱۰<sup>۷</sup>-۱۰<sup>۸</sup> cfu/ml در آب مقطر سترون تهیه و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی قسمت زخم‌ها قرار داده شد (Licciardello et al. 2022). شاهد‌های مثبت و منفی به ترتیب شامل جدایه مرجع *Xanthomonas citri* ICMP 24 و آب مقطر سترون بودند. تشتک‌های پتری در دمای محیط نگهداری و نتایج یک تا ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. بیماری به صورت چشمی ارزیابی و شدت بیماری بر اساس مقیاس تعریف شده توسط اسکالان و همکاران بین ۰ تا ۴ نمره‌دهی شد (Escalon et al. 2013). عدم ایجاد علائم مقیاس صفر، حاشیه آبسوخته اطراف محل زخم مقیاس ۱، جوش‌های کوچک بدون پارگی قابل مشاهده اپیدرم یا جوش‌های منفرد همراه با پارگی اپیدرم مقیاس ۲، شانکرهای کوچک (مشاهده بافت کالوز مانند) مقیاس ۳ و تشکیل شانکر و بافت کالوز گسترده مقیاس ۴ در نظر گرفته شد (Escalon et al. 2013). تصاویر دقیق از علائم در مقیاس‌های ذکر شده در شکل ۱ ارائه شده است.

ارزیابی اثربخشی ترکیبات مسی در مهار *Xanthomonas citri* pv. *citri* و حساسیت به آنتی





شکل ۱- الگوی پیشنهادی درجه بندی فنوتیپ بیماری زایی جدایه های *Xanthomonas citri* subsp. *citri* روی ارقام و گونه های مختلف مرکبات، عدم ایجاد علائم مقیاس صفر، حاشیه آبرسوخته اطراف محل زخم مقیاس ۱، جوش های کوچک بدون پارگی قابل مشاهده اپیدرم یا جوش های منفرد همراه با پارگی اپیدرم مقیاس ۲، شانکرهای کوچک (مشاهده بافت کالوز مانند) مقیاس ۳ و تشکیل شانکر و بافت کالوز گسترده مقیاس ۴ در نظر گرفته شد. بافت مردگی اطراف محل زخم به عنوان القای واکنش دفاعی در نظر گرفته شد ( Escalon *et al.* 2013).

**Figure 1-** The proposed pathogenicity phenotype scales of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on different cultivars and species of citrus: 0, no symptoms; 1, water-soaked margin surrounding the wound sites; 2, small pustules with no visible rupture of the epidermis or isolated pustules with rupture of the epidermis; 3, small canker (observation of callus-like material); 4, wide canker formation. Necrotic areas around wound sites considered as defense-like response (Escalon *et al.* 2013).

ثانیه، مرحله اتصال در دمای مخصوص هر آغازگر (جدول ۲) به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه و در آخر یک گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه به منظور ردیابی ژن های مقاومت به ترکیبات مسی استفاده شدند (Behlau *et al.* 2012, Richard *et al.* 2017).

#### ردیابی خوشه های ژنی *copABCD* و *copLAB*

آغازگرهای طراحی شده بر اساس دو خوشه ژنی *copABCD* و *copLAB* طبق چرخه دمایی واسرشته سازی اولیه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه و سپس  $30^{\circ}\text{C}$  چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰



## نتایج

ویژگی‌های جدایه‌های *Xanthomonas* sp. جدا شده از مرکبات

طی ماه‌های اردیبهشت ۱۴۰۰ تا شهریور ۱۴۰۱، یکصد و هفده باغ مرکبات در جنوب، جنوب شرق و جنوب غرب ایران مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). بر اساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی، ۱۳۲ جدایه به عنوان *Xanthomonas citri* pv. *citri* شناسایی شدند. همه جدایه‌ها گرم و اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و هوازی اجباری بودند و کلنی‌های زرد کم‌رنگ و لعابی روی محیط کشت YDC تولید کردند. علاوه بر این، قادر به هیدرولیز نشاسته، ژلاتین، کازئین و توئین ۸۰ و تولید لوان بودند اما توانایی تولید اوره‌آز را نداشتند. همه جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای LipF/R و X-ITS به ترتیب قطعه دی ان ای ۷۷۷ و ۲۵۴ جفت‌بازی را تولید کردند که نشان دهنده تعلق آن‌ها به جنس *Xanthomonas* spp است. آغازگر J-pth1/2 قطعه مورد انتظار ۱۹۷ جفت‌بازی مربوط به گونه *Xanthomonas citri* را در همه جدایه‌ها تولید کرد. PCR با آغازگرهای Ms<sup>+</sup>/Ms<sup>-</sup> قطعه مورد انتظار ۸۲۴ جفت‌بازی را در تمام جدایه‌های پاتوتیپ A\* تولید کرد و هیچ قطعه‌ای توسط آغازگرهای M<sup>+</sup>/M<sup>-</sup> تولید نشد. تمام جدایه‌ها به عنوان *Xanthomonas citri* pv. *citri* پاتوتیپ A\* شناسایی شدند.

## فنوتیپ بیماری‌زایی در گونه‌ها و ارقام مختلف مرکبات

سنجش بیماری‌زایی در میزبان‌های مختلف به منظور مقایسه فنوتیپ بیماری‌زایی با استفاده از مقیاس تعریف شده توسط اسکالان و همکاران (Escalon et al. 2013) نشان داد که همه جدایه‌های مورد بررسی، روی میزبان‌های لیموترش شیرازی و پرشین لایم بیماری‌زا بودند (تیپ بیماری‌زایی ۴). لیموترش خارگی، حساسیت کمتری نشان داد و ۱۴ روز بعد از مایه‌زنی علائم به صورت تیپ

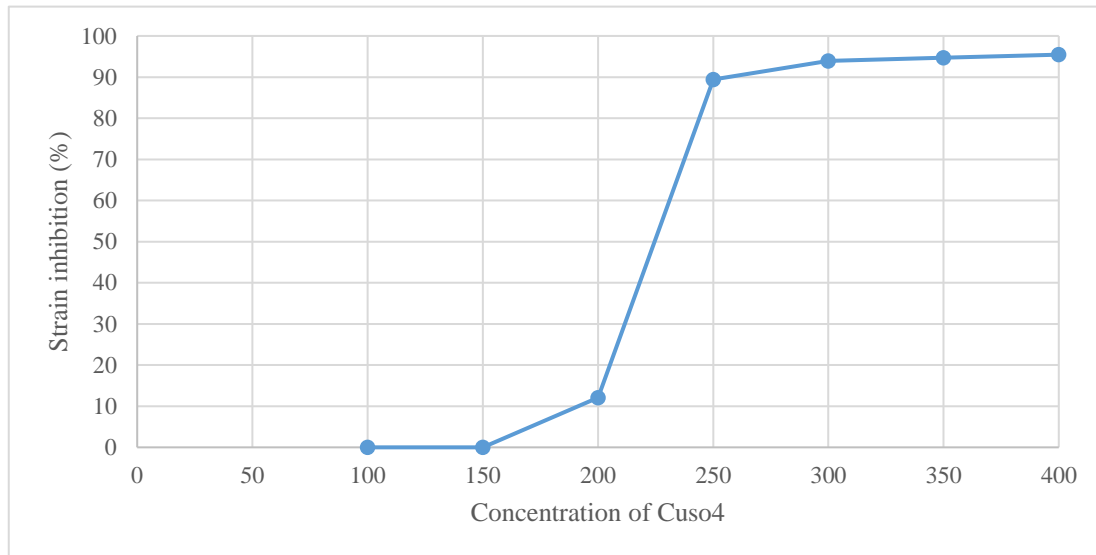
بیماری‌زایی ۲ با تفاوت‌های جزئی در علائم مشاهده شده توسط جدایه‌های مختلف بروز کرد. در گیاه لیموشیرین علائم جدایه‌های مختلف به صورت فنوتیپ بیماری‌زایی مقیاس ۳ دیده شد. علائم ایجاد شده روی ارقام مختلف پرتقال، با فنوتیپ‌ها و درجات مختلفی از شدت علائم مشاهده شد. در پرتقال ناول، جدایه‌ها علائم را به صورت‌های متفاوتی بروز دادند که هر دو فنوتیپ ۳ و ۴ با شدت‌های متفاوت در بین جدایه‌ها مشاهده شد. در پرتقال والنسیا علائم از مقیاس صفر (عدم بیماری) و در مایه‌زنی با برخی دیگر از جدایه‌ها، بیماری‌زایی با فنوتیپ ۲ و ۳ مشاهده شد. گریپ فروت توسرخ علائم از مقیاس ۲ تا ۴ (حالت شدید بیماری‌زایی) متفاوت بود، در بعضی از جدایه‌ها از روز سوم واکنشی مشابه با پاسخ دفاعی میزبان مشاهده شد (شکل ۱). در دو رقم نارنگی کلمانتین و نارنگی خاری بیماری‌زایی مشاهده نشد و همه جدایه‌ها فنوتیپ صفر را نشان دادند. همچنین در سیتروملو علائم جدایه‌های مختلف بسیار متنوع و از صفر تا ۳ متفاوت بود.

## سنجش سطح تحمل مس توسط جدایه‌ها

تمامی ۱۳۲ جدایه *Xanthomonas citri* pv. *citri* برای تعیین سطح مقاومت به مس مورد سنجش قرار گرفتند. همه جدایه‌ها سطح متوسطی از حساسیت را نشان دادند و در محیط کشت حاوی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس رشد کردند (درصد بازدارندگی از رشد صفر). علاوه بر این، ۱۲/۱۲ درصد از جدایه‌ها در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فاقد توانایی رشد بودند. افزایش غلظت سولفات مس به ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، بازدارندگی بالایی را نشان داد و باعث شد ۸۹/۳۹ درصد از جدایه‌ها توانایی تحمل این غلظت را نداشته باشند. همچنین غلظت‌های بالاتر ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۹۳/۹۳، ۹۴/۶۹ و ۹۵/۴۵ درصد بازدارندگی از رشد را القا کردند (شکل ۲). جدایه مرجع *Xanthomonas citri* ICMP 24 توانایی رشد تا غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر را

تا غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر رشد کامل داشت و جدایه حساس به مس *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807 فقط در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سولفات مس قادر به رشد بود.

داشت. نتایج سنجش جمعیت جدایه‌های ایرانی *Xanthomonas citri* نشان داد که اکثر جدایه‌ها در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر حساسیت به مس را نشان می‌دهند (شکل ۲) در حالی که جدایه مقاوم *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109



شکل ۲- سنجش میزان مهار رشد جدایه‌های *Xanthomonas citri* pv. *citri* توسط غلظت‌های مختلف سولفات مس در شرایط آزمایشگاهی

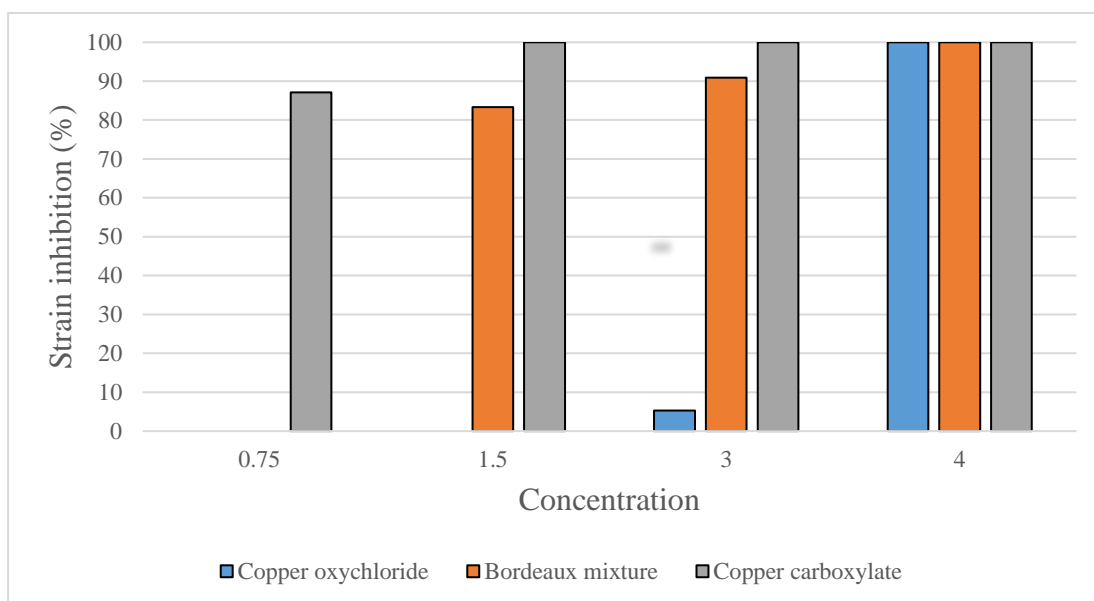
Figure 2- In vitro growth inhibition measurement of *Xanthomonas citri* pv. *citri* using different concentrations of *cusO4*

کلرید مس را داشتند (درصد بازدارندگی از رشد ۵/۳۰)، غلظت ۱/۵ گرم در لیتر از رشد هیچکدام از جدایه‌ها جلوگیری نکرد درحالی‌که در غلظت ۴ گرم در لیتر رشدی مشاهده نشد (بازدارندگی از رشد ۱۰۰ درصد) (شکل ۳). با افزودن ۰/۷۵ میلی‌لیتر در لیتر مخلوط بور دو به محیط کشت، مهار رشد جدایه‌ها مشاهده نشد اما غلظت ۱/۵ میلی‌لیتر در لیتر آن ۸۳/۳۳ درصد از جدایه‌ها را کنترل کرد. غلظت‌های ۳ و ۴ میلی‌لیتر در لیتر به ترتیب بازدارندگی ۹۰/۹ و ۱۰۰ درصد را نشان دادند (شکل ۳). آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ مهار رشد بالایی را نشان داد (به ترتیب ۹۴/۶۹ و ۹۸/۴۸ درصد).

اثربخشی غلظت‌های مختلف اکسی کلرید مس، مخلوط بور دو، کربوکسیلات مس، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین در محیط جامد

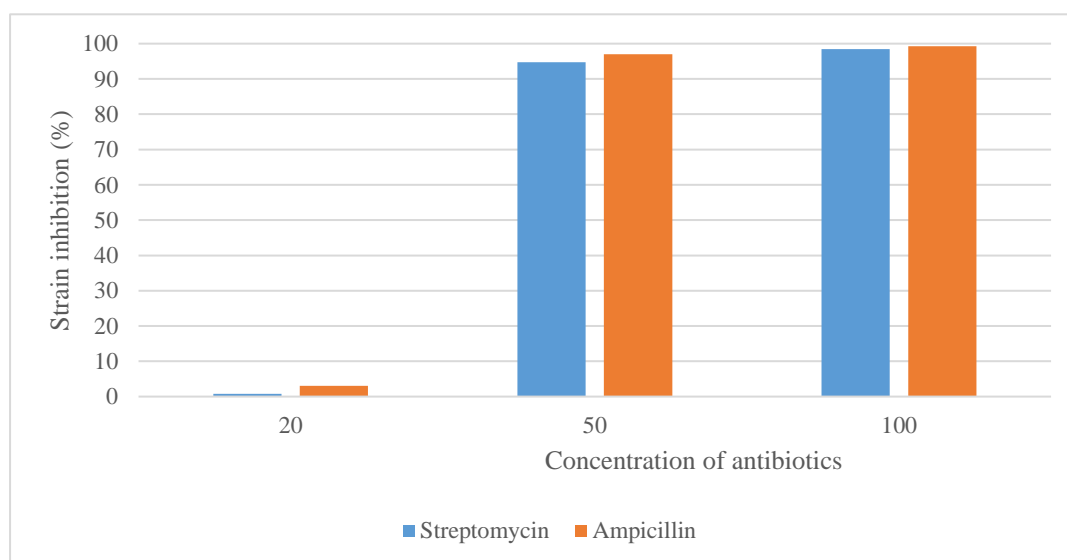
شکل‌های ۳ و ۴ اثربخشی و فعالیت ضد باکتریایی هر ترکیب را بر حسب غلظت‌های آزمایش شده نشان می‌دهد. ترکیب کربوکسیلات مس به دلیل دارا بودن درصد مس بالا (۹۱٪) در مقدار ۰/۷۵ گرم در لیتر قادر به مهار رشد ۸۷/۱۲ درصد از جدایه‌ها بود و غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر از رشد همه جدایه‌ها جلوگیری کرد. اکثر جدایه‌ها توانایی رشد در محیط اصلاح شده با ۳ گرم در لیتر اکسی

آمی سیلین در غلظت ۵۰، ۹۶/۹۶ درصد و در غلظت ۱۰۰، ۹۹/۲۴ درصد از جدایه‌ها را کنترل کرد (شکل ۴).



شکل ۳- سنجش میزان مهار رشد جدایه‌های *Xanthomonas citri pv. citri* توسط غلظت‌های مختلف اکسی کلرید مس، مخلوط بوردو و کربوکسیلات مس در شرایط آزمایشگاهی

**Figure 3- In vitro growth inhibition measurement of *Xanthomonas citri pv. citri* using different concentrations of copper oxychloride, Bordeaux mixture and copper carboxylate**



شکل ۴- درصد مهار رشد جدایه‌ها با استفاده از دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و استرپتومایسین در غلظت‌های مختلف

**Figure 4- The growth inhibition percentage of the strains using different concentrations of Ampicillin and streptomycin antibiotics**

اختصاصی مربوط به آغازگرهای طراحی شده بر اساس خوشه ژنی *copABCD* در آن‌ها ردیابی نشد. هیچ قطعه‌ای برای جدایه‌های ایرانی *Xanthomonas citri* pv. *citri* آزمایش شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی خوشه-های ژن *copLAB* و *copABCD* تکثیر نگردید. همچنین جدایه *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807 که به عنوان شاهد منفی استفاده شد، هیچ کدام از قطعه‌های مورد انتظار را تولید نکرد (شکل‌های ۵ تا ۹).

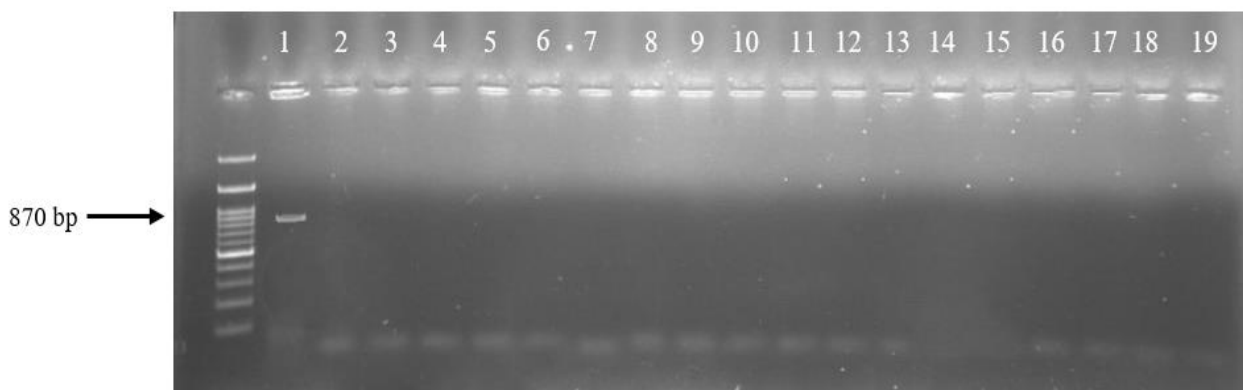
عدم وجود خوشه ژنی *copLAB* و *copABCD* القاگر مقاومت به مس در جدایه‌های بررسی شده

فقط جدایه مقاوم به مس *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109 که به عنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای خوشه ژنی *copLAB*، قطعه اختصاصی با اندازه‌های مورد انتظار ۳۵۶، ۸۷۰ و ۵۳۱ جفت‌بازی را به ترتیب با آغازگرهای CopA، CopL و CopB تکثیر کرد و قطعه



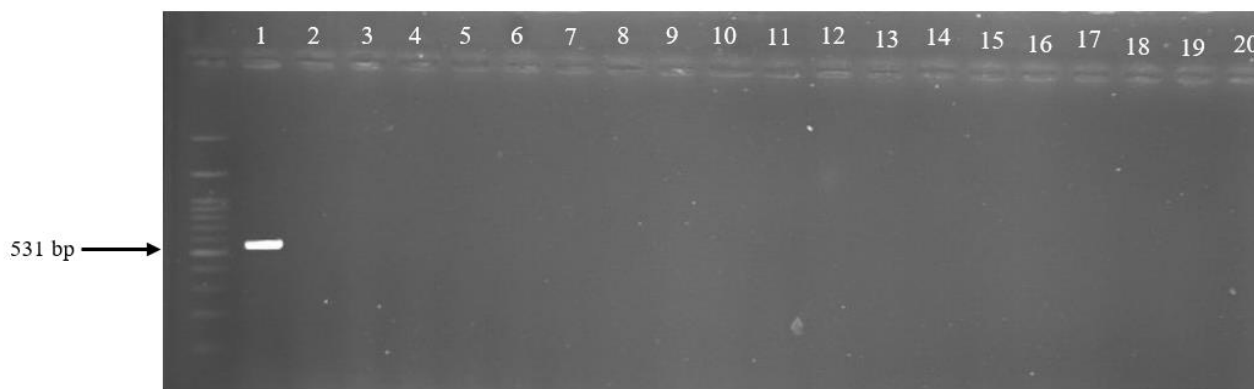
شکل ۵- ردیابی جدایه‌های مقاوم به مس با استفاده از آغازگر اختصاصی CopL (کلاستر ژنی *CopLAB*). چاهک شماره ۱ جدایه مقاوم به مس *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109. چاهک شماره ۲ جدایه حساس به مس *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807. چاهک‌های ۳ تا ۲۰ جدایه‌های حساس به مس *Xanthomonas citri* pv. *citri*.

**Figure 5- Copper-resistant Strains detection using CopL (*CopLAB* gene cluster) specific primer. Lane 1, *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109 copper resistant strain. Lane 2, *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807 copper sensitive strain. Lane 3 to 20 *Xanthomonas citri* pv. *citri* copper sensitive strains.**



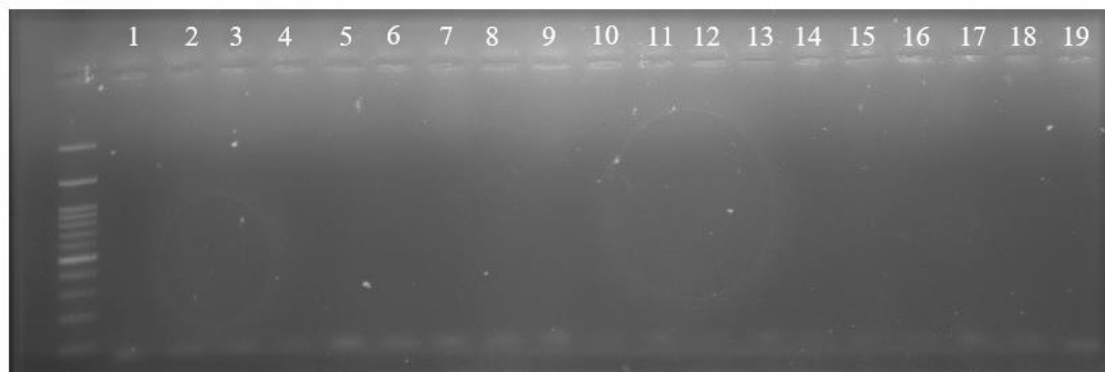
شکل ۶- ردیابی جدایه‌های مقاوم به مس با استفاده از آغازگر اختصاصی *CopA* (کلاستر ژنی *CopLAB*). چاهک شماره ۱ جدایه مقاوم به مس *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109 چاهک شماره ۲ جدایه حساس به مس *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807. چاهک‌های ۳ تا ۱۹ جدایه‌های حساس به مس. *Xanthomonas citri* pv. *citri*.

**Figure 6- Copper-resistant Strains detection using CopA (*CopLAB* gene cluster) specific primer. Lane 1, *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109 copper resistant strain. Lane 2, *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807 copper sensitive strain. Lane 3 to 19 *Xanthomonas citri* pv. *citri* copper sensitive strains.**



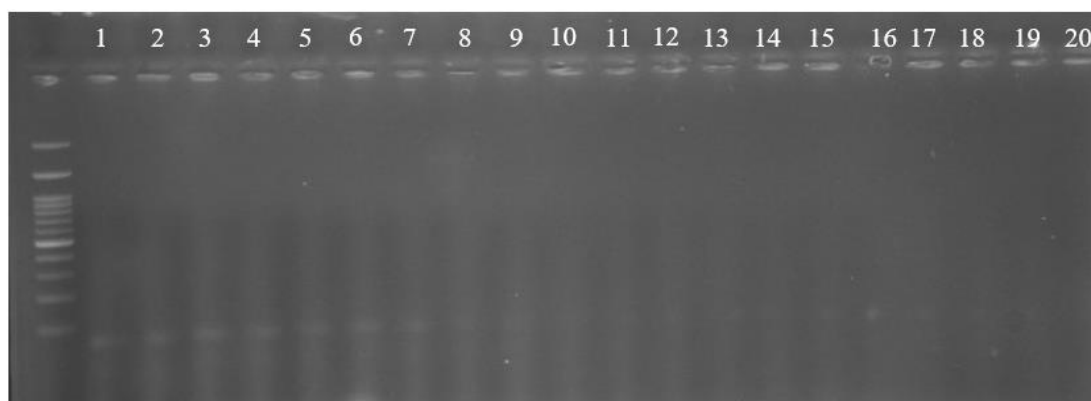
شکل ۷- ردیابی جدایه‌های مقاوم به مس با استفاده از آغازگر اختصاصی *CopB* (کلاستر ژنی *CopLAB*). چاهک شماره ۱ جدایه مقاوم به مس *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109 چاهک شماره ۲ جدایه حساس به مس *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807. چاهک‌های ۳ تا ۲۰ جدایه‌های حساس به مس. *Xanthomonas citri* pv. *citri*.

**Figure 7- Copper-resistant Strains detection using CopB (*CopLAB* gene cluster) specific primer. Lane 1, *Xanthomonas euvesicatoria* ICMP 109 copper resistant strain. Lane 2, *Xanthomonas alfalfae* subsp. *alfalfae* ICMP 15807 copper sensitive strain. Lane 3 to 20 *Xanthomonas citri* pv. *citri* copper sensitive strains.**



شکل ۸- ردیابی جدایه‌های مقاوم به مس با استفاده از آغازگر اختصاصی CopA (کلاستر ژنی *CopABCD*). چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۹ جدایه‌های حساس به مس. *Xanthomonas citri* pv. *citri*.

**Figure 8- Copper-resistant Strains detection using CopA (*CopABCD* gene cluster) specific primer. Lane 1 to 19 *Xanthomonas citri* pv. *citri* copper sensitive strains.**



شکل ۹- ردیابی جدایه‌های مقاوم به مس با استفاده از آغازگر اختصاصی CopB (کلاستر ژنی *CopABCD*). چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۹ جدایه‌های حساس به مس. *Xanthomonas citri* pv. *citri*.

**Figure 9- Copper-resistant Strains detection using CopB (*CopABCD* gene cluster) specific primer. Lane 1 to 20 *Xanthomonas citri* pv. *citri* copper sensitive strains.**

#### بحث

مرکبات به شمار رفته و مطالعه بیمارگر، تکامل و راه‌های مدیریت و پیشگیری اهمیت خاصی در کنترل آن دارد. از زمان اولین گزارش این بیماری در سال ۱۳۶۸ (علیزاده و رحیمیان، ۱۳۶۸) این بیماری از چند استان جنوبی ایران

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات به دلیل انتقال سریع و گسترده در مناطق جنوبی کشور از بیماری‌های مهم

حیدرپناه و همکاران (Heydarpanah et al. 2019) روی گیاه هم رضایت بخش گزارش شده است. همچنین در پژوهش انجام شده توسط رحمان و همکاران (Rehman et al. 2020) طی سه سال متوالی، مخلوط بور دو بهترین کنترل کننده عامل شانکر مرکبات معرفی شده و با نتایج ما مطابقت دارد. تحت فشار انتخاب ناشی از استفاده گسترده از مواد شیمیایی مبتنی بر مس، ژن‌های مقاومت پلاسمیدی عامل اصلی پایداری و شیوع باکتری‌های مقاوم به مس با استفاده از انتقال افقی ژن در باغ‌ها هستند. بنابراین، با توجه به کارایی خوب در مقدار کم (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و آمپی‌سیلین، کاربرد این آنتی‌بیوتیک‌ها در سموم می‌تواند تا حدی استفاده از ترکیبات مسی را کاهش دهد. هرچند که استفاده طولانی مدت و نامتعادل از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز می‌تواند منجر به بروز مقاومت شود. در پژوهش مورادوئین و همکاران (Moura Duin et al. 2022) سنجش حساسیت باکتری *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* به ترکیبات شیمیایی اکسی کلرید مس، مخلوط اکسی کلرید مس و مانکوزب و مخلوط اکسی کلرید مس و فلوکسپایروکسداد نشان داد که تیمارهای مخلوط اکسی کلرید مس و فلوکسپایروکسداد باعث مهار رشد باکتری از غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر شد و ترکیب اکسی کلرید مس مخلوط با مانکوزب مهار رشد باکتری را از ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نشان داد. همچنین طبق پژوهشی که کنترل شیمیایی *Xanthomonas perforans* با استفاده از اسپری برگی ترکیبات شیمیایی اکسی کلرید مس (۱/۵ گرم بر لیتر) و مخلوط مانکوزب و اکسی کلرید مس (به ترتیب ۰/۸۸ گرم بر لیتر و ۰/۶ گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار داده است نیز ترکیب اکسی کلرید مس و مانکوزب کارایی بالاتری را در کنترل این بیماری نشان داده است (Terumi Itako et al. 2015). در نتیجه با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش و کارایی پایین اکسی کلرید مس به تنهایی در غلظت متوسط ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، ترکیب

گزارش شده است و با توجه به عدم موفقیت در ریشه‌کنی این بیماری، نیاز به بررسی‌های دقیق و گسترده در زمینه پیشگیری و کنترل آن حس می‌شود. امروزه بکارگیری سموم مسی به عنوان متداول‌ترین روش کنترل شانکر باکتریایی مرکبات مورد توجه است، اما با توجه به مضرات این سموم، پژوهش و سنجش مداوم بیمارگر طی سالیان مختلف به جهت جلوگیری از پیامدهای ناگوار استفاده بیش از حد از این سموم مثل ایجاد مقاومت در بیمارگر حائز اهمیت است. مقاومت به ترکیبات مسی در گونه‌های مختلفی از *Xanthomonas* از جمله *X. euvesicatoria* (Marco & Stall 1983, Stall et al. 1986)، *X. arboricola* pv. *juglandis* (Graham et al. 2011)، *X. alfalfae* pv. *citromelonis* و *citri* subsp. *citri* (Behlau et al. 2011) گزارش شده است. با توجه به اینکه سموم مسی (حاوی مقادیر مختلفی ماده موثره) در دوزها و مقادیر مختلفی استفاده می‌شوند، تعیین استاندارد دوز مصرفی، به جهت کنترل بیماری و عدم ایجاد مقاومت در بیمارگر ضروری است. در پژوهش حاضر، ترکیب کربوکسیلات مس به دلیل دارا بودن درصد مس بالا (۹۱٪) در مقدار ۰/۷۵ گرم در لیتر هم تا حد زیادی قادر به کنترل این باکتری است اما درصد بالای مس در این ترکیب زنگ خطری برای انتخاب جدایه‌های مقاوم در محیط است، همانطور که در فلوریدا در نتیجه ۵۰ سال استفاده از سموم بر پایه مس تقریباً صد در صد جدایه‌های *X. euvesicatoria* و *X. perforans* به عنوان مقاوم به مس شناخته شده‌اند (Pohronezny et al. 1992). در مقابل، تمام جدایه‌های *X. campestris* pv. *vitians* عامل بیماری برگی در کاهو به دلیل استفاده کمتر از سموم حاوی این عنصر به مس حساس بودند (Pernezny et al. 1995). مخلوط بور دو در مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر در لیتر اثربخشی خوبی در مهار رشد باکتری را نشان داد که کارایی این ترکیب در بازدارندگی باکتری عامل شانکر مرکبات توسط



فنوتیپ بیماری‌زایی جدایه‌های پاتوتیپ A\* روی میزبان‌هایی مثل پرتقال، گریپ فروت و نارنگی بسیار متنوع گزارش شده است (Escalon et al. 2013). در پژوهش حاضر، همه جدایه‌ها با درجات مختلفی روی ارقام مختلف لیموترش بیماری‌زا بودند. همچنین ارقام مختلف پرتقال و گریپ فروت فنوتیپ‌های بیماری را با درجات مختلفی نشان دادند اما بیماری‌زایی جدایه‌ها در هیچ کدام از ارقام نارنگی مشاهده نشد. جدایه‌های ایرانی آزمون شده توسط اسکالان و همکاران (Escalon et al. 2013) هنگامی که بر روی برگ‌های جدا شده گریپ فروت و پرتقال تلقیح شدند، علائمی شبیه شانکر ایجاد کردند، اگرچه اندازه شانکرهای ایجاد شده اغلب کوچکتر از علائم ناشی از جدایه‌های پاتوتیپ A بود. نتایج این پژوهش دشواری اختصاص جدایه‌ها به یک پاتوتیپ معین را بر اساس سنجش برگ جدا شده روی گریپ‌فروت و پرتقال نشان داد و پیشنهاد کرد که نارنگی ممکن است یک گونه مفید برای شناسایی پاتوتیپ بر اساس داده‌های آزمایش بیماری‌زایی باشد که با پژوهش ما مطابقت دارد. همچنین، سطح متوسطی از بیماری‌زایی جدایه‌های ایرانی روی پرتقال و گریپ‌فروت در جدایه‌های بررسی شده توسط پرووست و همکاران (Pruvost et al. 2015) گزارش شد که به دلیل فنوتیپ بیماری‌زایی آن‌ها به اشتباه پاتوتیپ A معرفی شده بودند (Khodakaramian & swings 2002). در بررسی‌هایی، که طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ انجام شد خسارت این بیماری عمدتاً روی لیموترش شیرازی بود و به صورت خسارت‌زا روی سایر گونه‌ها و ارقام مرکبات مشاهده نشد اما با توجه به اینکه آزمون بیماری‌زایی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که جدایه‌های ایرانی، توانایی ایجاد بیماری روی پرتقال و گریپ فروت را دارند و سطح متوسطی از بیماری را در این دو میزبان القا می‌کنند، و در باغ‌ها گونه‌ها و ارقام مختلف مرکبات در کنار یکدیگر کشت می‌شوند،

اکسی کلرید مس با سموم دیگر مثل مانکوزب و فلوکسپایروکسداد می‌تواند کارایی بهتری را در مهار باکتری ارائه دهد. جدایه‌های مقاوم به مس دارای کلاستر ژنی *copLAB* از مناطق محدودی از ایران (داراب و جهرم استان فارس) که طی سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۷ نمونه‌برداری شده‌اند گزارش شده است (Izadiyan & Taghavi 2023) اما در این بررسی، که طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ از استان‌های بوشهر، کرمان، فارس و سیستان و بلوچستان که هر ساله تحت خسارت شدید این بیماری هستند انجام شد، در هیچ‌کدام از ۱۳۲ جدایه باکتری XCC جدا شده، خوشه‌های ژنی پلاسمیدی عامل مقاومت به مس یافت نشد. طبق این پژوهش، درصد زیادی از جدایه‌های ایرانی قادر به تحمل سولفات مس تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هستند. علت این امر را احتمالاً می‌توان طبق پژوهش مارین و همکاران (Marin et al. 2019) با بیان ژن‌های کروموزومی خوشه ژنی *cohLAB* توجیه کرد. مطالعات تکمیلی در زمینه بیان این ژن‌ها برای سنجش دقیق لازم است زیرا جدایه‌های مقاوم و متحمل دو فنوتیپ متفاوت هستند و نباید به صورت مترادف به کار بروند (Marin et al. 2019). به این دلیل که جدایه‌های متحمل فاقد ژن‌های پلاسمیدی مقاومت به مس هستند و بیشتر شبیه جدایه‌های حساس هستند، تهدیدی برای استفاده از باکتری‌کش‌های مبتنی بر مس برای مدیریت شانکر مرکبات محسوب نمی‌شوند.

پژوهش‌های زیادی به جهت بررسی فنوتیپ بیماری‌زایی و دامنه میزبانی *Xanthomonas citri* pv. *citri* انجام شده است (Yan & Figueiredo et al. 2011, Escalon et al. 2013, wang 2012)، در این پژوهش‌ها، سیستم‌های ترشحی نوع سوم به عنوان عامل تنوع در فنوتیپ بیماری‌زایی و دامنه میزبانی معرفی شده‌اند. به عبارتی، تشابه و تفاوت‌های ژنتیکی با بیماری‌زایی، نوع علائم و تهاجم جدایه‌ها رابطه مستقیم دارد. همچنین

ساختار جمعیت‌های (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) می‌تواند در طول زمان تغییر کند، بنابراین نمونه‌برداری گسترده و در زمان‌های مختلف از جدایه‌ها باید در مطالعات آینده در نظر گرفته شود. همچنین بررسی مکانیسم‌های ژنتیکی کروموزومی تحمل مس در این بیمارگر باید مورد توجه قرار گیرد. درک بهتر مقاومت به مس و کنترل مصرف آن با جایگزینی ترکیبات دیگر می‌تواند به جلوگیری از گسترش جدایه‌های مقاوم به مناطق یا گیاهان جدید کمک کند.

امکان ایجاد خسارت در طول زمان و با تکامل بیمارگر وجود دارد. همچنین از آنجاییکه مقاومت به مس توسط ژن‌های پلاسمیدی کد می‌شود و این خوشه‌های ژنی به راحتی به وسیله پدیده الحاق (Conjugation) بین جدایه‌های باکتری منتقل می‌شوند (Behlau et al. 2011)، نیاز مدام به بررسی جدایه‌های مختلف عامل این بیماری حس می‌شود زیرا استفاده نامتعادل و طولانی مدت از ترکیبات حاوی مس، می‌تواند موجب انتخاب جدایه‌های مقاوم به مس شود. همچنین

## منابع

## References

- Adriko J., Mbega E.R., Mortensen C.N., Wulff E.G. and Lund O.S. 2014. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. *European Journal of Plant Pathology* 138: 293–306. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0329-x>
- Alizadeh A. and Rahimian H. 1990. Citrus canker in Kerman Province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 26:1-4.
- Areas M.S., Gonçalves R.M., Soman J.M., Souza Filho R.C., Gioria R., Silva Junior T.A.F. and Maringoni A.A. 2018. Resistance of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 90: 2375-2380. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160413>
- Behlau F., Canteros B.I., Minsavage G.V., Jones J.B. and Graham J.H. 2011. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfafa* subsp. *citrumelonis*. *Applied and Environmental Microbiology* 77:4089-4096. <https://doi.org/10.1128/AEM.03043-10>
- Behlau F., Gochez A.M., Lugo A.J., Elibox W., Minsavage G.V., Potnis N., White F.F., Ebrahim M., Jones J.B. and Rumsbhag A. 2017a. Characterization of a unique copper resistance gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad, West Indies. *European Journal of Plant Pathology* 147: 671–681. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1035-2>
- Behlau F., Graham J.H. and Jones J.B. 2012. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *European Journal of Plant Pathology* 133: 949–963. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9966-8>
- Behlau F., Hong J.C., Jones J.B. and Graham J.H. 2013. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. *Phytopathology* 103: 409–418. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0134-R>
- Behlau F., Scandelay L.H.M., Silva Junior G.J. and Lanza F.E. 2017b. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. *Crop Protection* 94:185–191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.003>
- Chillappagari S., Seubert A., Trip H., Kuipers O.P., Marahiel M.A. and Miethke M. 2010. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron sulfur cluster formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 192: 2512–2524. <https://doi.org/10.1128/jb.00058-10>
- Coletta-Filho H.D., Takita M.A., de Souza A.A., Neto J.R., Deste fano S.A.L., Hurtung J.S., and Machado M.A. 2006. Primers based on *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Applied Microbiology* 100: 279–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02787.x>
- Escalon A., Javegny S., Vernière C., Noel L.D., Vital K., Poussier S., Hajri A., Boureau T., Pruvost O.,

- Arlat M. and Gagnevin L. 2013. Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Molecular Plant Pathology* 14: 483–496. <https://doi.org/10.1111/mpp.12019>
- Fan X., Saleem T. and Zou H. 2022. Copper resistance mechanisms in plant pathogenic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea* 61: 129–138. <https://doi.org/10.36253/phyto-13282>
- Figueiredo J., Minsavage G., Graham J., White F. and Jones J. 2011. Mutational analysis of type III effector genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *European Journal of Plant Pathology*. 130: 339–347. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9757-7>
- Graham J.H., Dewdney M.M., and Yonce H.D. 2011. Comparison of copper formulations for control of citrus canker on ‘Hamlin’ orange. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 124: 79–84.
- Graham J.H., Brooks C. and Yonce H.D. 2016. Importance of early season copper sprays for protection of Hamlin orange fruit against citrus canker infection and premature fruit drop. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 129: 74–78.
- Heydarpanah S., Rezaei R., Taghavi S.M. and Charehgani H. 2019. Efficacy of different copper compounds in the control of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathotypes A and A\*. *Journal of Phytopathology* 168: 73–80. <https://doi.org/10.1111/jph.12869>
- Hoshino N., Kimura T., Yamaji A. and Ando T. 1999. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper (II) complexes. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 1245–1250. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00157-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00157-4)
- Izadiyan M. and Taghavi S.M. 2023. Diversity of copper resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains, the causal agent of Asiatic citrus canker, in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 168: 593–606. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02786-w>
- Khodakaramian G. and Swings J. 2002. AFLP fingerprinting of the strains of *Xanthomonas axonopodis* inducing citrus canker disease in southern Iran. *Journal of Phytopathology* 150: 227–231. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00746.x>
- Lai Y.R., Lin C.H., Chang C.P., Ni H.F., Tsai W.S. and Huang C.J. 2021. Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Plant Protection Science* 57: 206–216. <https://doi.org/10.17221/160/2020-PPS>
- Lamichhane J.R., Osdaghi E., Behlau F., Köhl J., Jones J.B. and Aubertot J. N. 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 38: 28–46. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- Lee Y.A., Sung A.N., Liu T.F., and Lee Y.S. 2009. Combination of chromatic differential medium and *estA*-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6831–6838. <https://doi.org/10.1128/AEM.01653-09>
- Licciardello G., Caruso P., Bella P., Boyer C., Smith M.W., Pruvost O., Robene I., Cubero J. and Catara V. 2022. Pathotyping Citrus Ornamental Relatives with *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *X. citri* pv. *aurantifolii* Refines Our Understanding of Their Susceptibility to These Pathogens. *Microorganisms* 10: 986–1000. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050986>
- Marco G.M. and Stall R.E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67: 779–781. <https://doi.org/10.1094/PD-67-779>
- Marin T.G.S., Galvanin A.L., Lanza F.E. and Behlau F. 2019. Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. *Plant Pathology* 68: 1088–1098. <https://doi.org/10.1111/ppa.13026>
- Mostofizadeh-Ghalamfarsa R. and Rahimian H. 1996. Incidence of the Asiatic form of citrus canker in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 32: 189 (short report).
- Moura Duin I., Aparecida Forasteiro T., Hitomi Sugahara Rodrigues V., Isabel Balbi-Peña M. and Pereira Leite Júnior R. 2022. In vitro sensitivity of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* and the control of bacterial leaf streak of corn with copper oxychloride alone and in mixtures with mancozeb and fluxapyroxad. *European Journal of plant pathology* 164: 263–268.

- <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02556-0>
- Pernezny K., Raid R.N., Stall R.E., Hodge N.C., Collins J. 1995. An outbreak of bacterial spot of lettuce in Florida caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Diseases* 79: 359-360. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0359>
- Pohronezny K., Stall R.E., Canteros B.I., Kegley M., Datnoff L.E. and Subramanya R. 1992. Sudden shift in the prevalent race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper fields in southern Florida. *Plant Disease* 76: 118-120. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0118>
- Pruvost O., Goodarzi T., Boyer K., Soltaninejad H., Escalon A., Alavi S. M., Javegny S., Boyer C., Cottyn B., Gagnevin L. and Verniere C. 2015. Genetic structure analysis of strains causing citrus canker in Iran reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A\*. *Plant pathology* 64: 776-784. <https://doi.org/10.1111/ppa.12324>
- Rehman M.A., Ali S.H., Khan M.N., Ahmad S. and Ali M.A. 2020. Comparative efficacy of different antibiotics, fungicides and botanical extract for the control of citrus canker of kinnow mandarin. *Pakistan journal of phytopathology* 32: 113-119. <https://doi.org/10.33866/phytopathol.030.02.0573>
- Richard D., Ravigné V., Rieux A., Facon B., Boyer C., Boyer K., Grygiel P., Javegny S., Terville M., Canteros B.I., Robene I., Verniere C., Chabirand A., Pruvost O. and Lefeuvre P. 2017. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. *Molecular Ecology* 26: 2131-2149. <https://doi.org/10.1111/mec.14007>
- Schaad N.W., Jones J.B. and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3<sup>rd</sup> ed., APS, USA. 379 P
- Stall R.E., Loschke D.C., and Jones J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 76: 240-243. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-240>
- Terumi Itako A., Batista Tolentino Júnior J., Fernandes da Silva Júnior T.A., Marcelo Soman J. and Carlos Maringoni A. 2015. Chemical products induce resistance to *Xanthomonas perforans* in tomato. *Brazilian Journal of Microbiology* 46: 701-706. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246320140177>
- Vernière C., Devaux M., Pruvost O., Couteau A. and Luisett J. 1991. Studies on the biochemical and physiological variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Fruits* 46: 160-170.
- Yan Q. and Wang N. 2012. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25: 69-84. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0121>
- Yousefi Kopaei F., Taghavi S. M., Shiotani H. and Tesuyumu Shinji. 2014. A PCR-based assay for differentiating A and A\* Type strains of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the cusal agent of Asiatic citrus canker. *Journal of General Plant Pathology* 80: 85-89. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0494-y>