باکتریهای بالقوه بیماریزای *Xanthomonas campestris* در خاک کشتزارهای ری و کرج

نیره علی‌مددی، محمدرضا صعودی*، شایسته سپهر و پریناز قدم

تهران، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکدهٔ علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱

چکیده

باکتریهای جنس *Xanthomonas* از مهم ترین باکتریهای بیماریزای گیاهان زراعی بوده و از عوامل مهم فساد پس از برداشت و خسارت اقتصادی می‌باشند. در این مطالعه ۷۱ نمونه از خاک کشتزارهای حومهٔ شهرهای ری و کرج جمع‌آوری شد. غربالگری باکتریها بر روی محیط نیمه‌انتخابی SX agar، انجام آزمونهای ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی و بررسی دو شاخص ویژهٔ ویرولانس منجر به جداسازی تعدادی جدایهٔ *X. campestris* در میان باکتریهای رشد یافته احتمالی شد. تراکم نسبی *X. campestris* در مقایسه با تراکم کل باکتریهای رشد یافته برروی محیط SX agar، ۰/۶۹ درصد بود. قابلیت تولید اگزوپلی‌ساکارید با میانگین تراکم $10/98\ g\ l^{-1}$ و میانگین ویسکوزیتهٔ ۱۴۰۳ cP و نیز وجود پیگمان زانتومونادین با شاخص جذب نوری بیشینه در طول موجهای ۴۴۴/۷ nm– ۴۴۱/۰ به عنوان دو شاخص اصلی ویرولانس این باکتریها مورد بررسی و تأیید قرارگرفت. شناسایی مولکولی ۲۵ درصد از جدایه‌های واجد فاکتورهای ویرولانس که بطور تصادفی انتخاب شدند، تعلق به گونهٔ *X. campestris* را به واسطهٔ وجود مارکر ژنی اختصاصی *hrcC* تأیید کرد. این بررسی نشان می‌دهد که علی‌رغم نبود گزارشی از شیوع بیماری، باکتریهای *X. campestris* بالقوه بیماریزا در خاک کشتزارهای کلم در حومهٔ ری و کرج یافت می‌شوند. به عنوان یک بررسی موردی، وجود این سویه‌ها در خاک به دلیل ایجاد خسارتهای ناشی از فساد محصولات که در ایران شایع است، حائز اهمیت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کلم (*Brassica oleracea*)، خاک، *Xanthomonas campestris*، اگزوپلی‌ساکارید، زانتومونادین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۹-۸۸۰۴۴۰۵۱ ، پست الکترونیکی: msoudi@alzahra.ac.ir

مقدمه

جنس *Xanthomonas* در خانوادهٔ *Xanthomonadaceae* تنها خانوادهٔ موجود در راستهٔ *Xanthomonadales* و در ردهٔ گاما- پروتئوباکتریا قرار دارد. اعضای این جنس باکتریهای میله‌ای، متحرک با یک تاژه قطبی، هوازی اجباری و کیموارگانوتروف هستند. تولید پیگمانهای زانتومونادین و اگزوپلی‌ساکارید زانتان ویژهٔ باکتریهای این جنس است و در باکتری دیگری تا کنون گزارش نشده است. اعضای این جنس در گیاهان بیماریزا بوده و بر پایهٔ همولوژی DNA به ۲۰ گونه تفکیک شده اند (۱۰). بر اساس آخرین طبقه‌بندی، گونهٔ *X. campestris* شامل پاتووارهایی است که بیشتر در گیاهان خانواده چلیپاییان (Cruciferae) بیماری ایجاد می‌کنند؛ درحالی‌که در گذشته حداقل ۱۴۱ پاتووار برای این گونه برشمرده می‌شد. در حال حاضر پاتووارهای موجود در این گونه تنها شامل *campestris*، *barbarea*، *armoraciae*، *abberans*، *incanae* و *raphani* می‌باشند (۱۰). باکتری *X. campestris* pv. *campestris* عامل پوسیدگی سیاه است و پاتووارهای دیگر اغلب علائم لکه برگی را ایجاد می‌کنند (۳۴). به طور کلی این پاتووارها بر پایهٔ ویژگیهای ریختی قابل تمایز نیستند و شناسایی این پاتووارها نیازمند شناخت گیاه میزبان است (۱۰). با این وجود تمایز آنها با آزمون بیماریزایی اغلب دشوار است (۲۲) و گاهی اوقات

Archive of SID
www.SID.ir

پاتووارهای مختلف، علائم غیرقابل تمایز از یکدیگر ایجاد می‌کنند (۳۴).

باکتری *X. campestris* دامنهٔ میزبانی وسیعی دارد و حساسیت میزبان می‌تواند متفاوت باشد (۳۴). کلم (*Brassica oleracea* var. capitata) و گل کلم (*Brassica oleracea* var. botrytis) حساسترین میزبانها می‌باشند (۲۸). پسمانهای گیاهی، بذر و علفهای هرز به عنوان منابع مهم بیماری پوسیدگی سیاه گزارش شده اند (۳۵). آلودگی از طریق خاک نیز می‌تواند رخ دهد (۲۱). این باکتری به ویژه در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب به خوبی گسترش می‌یابد و از فصلی به فصل دیگر در بذر آلوده، در خاک و حتی به مدت بیشتر در بقایای گیاهی در خاک باقی می‌ماند و به آسانی از طریق آب باران به گیاهان مجاور منتقل می‌شود (۱۸). لوپز و همکارانش (۱۹۹۹) نشان داده اند که توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید (EPS) نقش مهمی در بقای *X. campestris* در خاک دارد (۲۱).

اگزوپلی‌ساکارید زانتان از شاخصهای مهم بیماریزایی در *Xanthomonas* spp. به شمار می‌آید (۱۱). عملکردهای متنوع زانتان در باکتری شامل حفظ تعادل انرژی و کربن در سلول (۱۴)، حفاظت باکتریها در برابر ترکیبات سمی گیاه، کاهش تماس با سلولهای گیاهی و به حداقل رساندن پاسخهای دفاعی میزبان، تحریک تکثیر باکتری با طولانی کردن جذب آب توسط بافتها و پشتیبانی تهاجم یا کلونیزاسیون سیستمیک می‌باشد (۱۲). جهش‌یافتگان EPS باکتریهای *X. axonopodis* pv. *manihotis* ،*X. oryzae* pv. *oryzae* و *X. campestris* pv. *campestris* در مقایسه با سویه‌های وحشی بیماریزایی کمتری دارند. حضور EPS با شدت بیماریزایی در این باکتری همبستگی آماری دارد. اگزوپلیمر می‌تواند با کمک به بقای باکتری در برابر شرایط تنش مانند خشک شدن و عمل ترکیبات ضدمیکروبی گیاه در پایداری تجمع شرکت کند. نقش EPS در هر دو مرحلهٔ اپی‌فیتی و بیماریزایی در *X. campestris* pv. *campestris* پیشنهاد شده است (۱۲). پژوهشگران دیگر گزارش کردند که اثر مهاری اگزوپلیمر زانتان بر تجمع کالوز در عفونت‌زایی *Xanthomonas* اهمیت دارد (۳۲).

زانتومونادین‌ها پیگمانهای زرد رنگ متصل به پوشش سلولی و شامل مخلوطی از استرهای آریل- پلی‌ان برم‌دار می‌باشند. این پیگمانها در همهٔ گونه‌های *Xanthomonas* وجود دارند اما سویه‌های بدون پیگمان نیز گاهی یافت می‌شود (۱۰). زانتومونادین‌ها در حفاظت در برابر آسیب ایجاد شده توسط نور مرئی در حضور اکسیژن نقش دارند و در بقای اپی‌فیتی مؤثرند. بقای اپی‌فیتی برای باکتریهای جنس *Xanthomonas* در پایداری موفق بیماری ضروری است (۲۳).

بیماریهای ناشی از *Xanthomonas* spp. در ایران اغلب توسط متخصصین کشاورزی گزارش شده است؛ هرچند که این بیماریها چندان شایع به نظر نمی‌رسند، ولی گزارشهای متعدد از رخدادهای پراکنده وجود دارد. باکتری *X. axonopodis* pv. *citri* عامل شایع شانکر مرکبات در جنوب ایران است (۳). در آمارهای مؤسسه آفات و بیماریهای گیاهی ایران (در مجلهٔ بیماریهای گیاهی) و کنگرهٔ سالانه گیاهپزشکی ایران گزارشهای متعدد ولی پراکنده از رخداد بیماریهای ناشی از زانتومونادها در گیاهان زراعی مانند مرکبات، پنبه، گردو، مریم گلی، نعناع، کلم و گیاهان زینتی در ایران وجود دارد. اخیراً تراکم بالای *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در بذرهای لوبیا در استان مرکزی نشان داده شده است (۱).

جنس *Xanthomonas* یکی از شش جنس اصلی باکتریهای مولد فساد در میوه و سبزی (بیماریهای پس از برداشت) در جهان است. لذا اگرچه این باکتریها بیماری شایعی در ایران ایجاد نمی‌کنند ولی وجود آنها در خاک می‌تواند منجر به آسیب به محصول و زیان اقتصادی شود (۹). از آنجایی که تولید اگزوپلی‌ساکارید و پیگمان زانتومونادین از مهم ترین شاخصهای ویرولانس در *Xanthomonas campestris*

www.SID.ir

می‌باشند، در این پژوهش جستجو و غربالگری سویه‌های مولد زانتان و پیگمان در خاک کشتزارهای حومهٔ ری و کرج به عنوان نمونه، هدف این پژوهش قرار گرفت. وجود چنین سویه‌هایی در خاک کشتزارها هشدار دهنده است، زیرا وجود این باکتریها در خاک نه تنها در شرایط مساعد موجب بیماری گیاه می‌شود، بلکه می‌تواند منجر به بیماریهای پس از برداشت محصولات (post-harvest disease) یا همان فساد شده و خسارتهای اقتصادی بسیاری وارد کند. توجه به نقش این میکروارگانیسمها در کاهش سهم دور ریز محصولات کشاورزی پس از برداشت نقش به سزایی خواهد داشت.

مواد و روشها

موقعیت و نمونه برداری: نمونه برداری از خاک سطحی کشتزارهای حومهٔ شهرهای ری و کرج طی شهریور تا اسفند ۱۳۸۶ انجام گرفت. نمونه‌ها به روش تصادفی با نمونه برداری دستی به صورت ستونهایی از خاک با قطر تقریبی ۳/۵ cm و ارتفاع ۲۵ cm از سطح در کیسه‌های پلاستیکی نازک جمع‌آوری و در ۴ درجه سانتی گراد حداکثر تا سه هفته نگهداری شد (۱۷). موقعیت جغرافیایی محل نمونه برداری تعیین شد. pH خاک در محلول کلسیم کلراید ۰/۰۱ مولار و رطوبت نسبی نمونه‌ها طبق روشهای استاندارد اندازه‌گیری شد (۷).

جداسازی و غربالگری باکتریها: مقدار ۱۰ g خاک پس از عبور از الک با منافذ ۲ میلی متری و حذف بقایای درشت گیاهی، در ۹۵ ml محلول سدیم پیروفسفات ۰/۱ درصد (w/v) و سدیم کلراید ۰/۱ مولار سوسپانسیون شد و به مدت ۱۵ دقیقه همزنی شد (۱۷). پس از ته‌نشینی، از مایع رویی در محلول سدیم کلراید ۰/۸۵ درصد (w/v) سریال رقت تهیه شد. صد میکرولیتر از هر رقت بر روی پلیت‌های محیط نیمه‌انتخابی Selective *Xanthomonas* agar (SX) با سه تکرار کشت شد (۲۹). پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند.

کلنیهای رشد یافته بر روی محیط SX agar که خصوصیات ریخت‌شناسی مشابه با زانتومونادها (کلنیهای نیمه‌شفاف با مرکز ارغوانی مایل به آبی و هالهٔ هیدرولیز نشاسته) داشتند، به محیط Yeast Malt (YM) agar منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند (۲۴). جدایه‌هایی که بر روی این محیط رشد زرد و موکوئید داشتند، انتخاب شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها بر روی محیط آگار مغذی (Nutrient agar, NA) انجام شد.

شناسایی جدایه‌ها:

شناسایی توسط خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی: شناسایی ابتدا بر اساس ویژگیهای ریخت شناسی و بیوشیمیایی انجام گرفت. آزمونهای KOH، کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اکسیداسیون- فرمانتاسیون گلوکز (O-F)، تولید ایندول، تولید استوئین، مایع کردن ژلاتین، لیپولیز توئین ۸۰، تحمل نمک (۱۶)، احیای نیترات، تولید هیدروژن سولفید (H_2S)، فعالیت اوره‌آز، فعالیت آرژینین دی‌هیدرولاز، خاصیت فلورسنس بر روی محیط King B، رشد موکوئید بر روی محیط NA با ۵ درصد (w/v) گلوکز و یا سوکروز، تحمل دما، مهار رشد با ۰/۱ درصد (w/v) تری‌فنیل تترازولیوم کلراید (TTC)، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیز نشاسته، پروتئولیز شیر، استفاده از سیترات و پروپیونات، تولید اسید از تعدادی از کربوهیدراتها (۲۷)، رشد در تراکمهای ۳۰ درصد، ۲۰ درصد و ۱۰ درصد (w/v) گلوکز، مهار رشد در دمای ۴ درجه سانتی گراد و pH ۴/۵، استات سرب، متیل گرین و تیونین در تراکم ۰/۰۱ درصد (w/v)، فعالیت لسیتیناز (۳۰) و رشد بر روی محیط آسپاراژین (۸) برای جدایه‌های *Xanthomonas campestris* احتمالی انجام شد. در تمام آزمونهای بیوشیمیایی از کشت خالص و تازهٔ (۴۸-۲۴ ساعته) باکتریها بر روی محیط NA استفاده شد و آزمونها با سه تکرار انجام گرفت. باکتریهای *X. campestris* DSM 1706 و *X. campestris* سویهٔ b82 که از خاک ایران جدا شده

Archive of SID

www.SID.ir

بود (۴) به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند.

شناسایی با استفاده از مارکر ژنی اختصاصی گونه: شناسایی مولکولی با استفاده از ردیابی یک ژن اختصاصی گونه بر روی ۹ جدایهٔ *Xanthomonas campestris* احتمالی به عنوان نماینده و یک جدایهٔ دروغین به عنوان شاهد منفی انجام گرفت. استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام شد (۱۵). برای انجام PCR، از پرایمرهای اختصاصی گونه (HrcCF2 و HrcCR2) معرفی شده توسط زاکاردلی و همکارانش (۳۳) که بخشی از ژن *hrcC* متعلق به باکتری *X. campestris* را تکثیر می‌کنند، استفاده شد که توسط شرکت سیناژن (CinnaGen) ساخته شد. پس از تعیین مقادیر بهینه برای دمای اتصال و تراکم یون منیزیم، PCR نهایی در مخلوط واکنش ۲۵ µl حاوی ۰/۵ µM از هرکدام از پرایمرهای HrcCF2 و HrcCR2، ۲۰۰ µM از هرکدام از دزوکسی ریبونوکلئوتیدها (dNTPs)، ۲ mM $MgCl_2$، ۱/۲۵ U آنزیم Taq– DNA پلیمراز و ۱/۲۵ µl از DNA به عنوان الگو انجام گرفت.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از کشتزارهای حومهٔ کرج و ری

تاریخ نمونه‌برداری	منطقه	موقعیت جغرافیایی	مزرعه	محصول زراعی	pH†	رطوبت نسبی* (٪)	شمارهٔ نمونه‌ها
۸۶/۶/۱۶	جعفرآباد	N ۳۵° ۳۳/۸۳۹ E ۵۱° ۲۳/۴۹۵	۱	گل کلم	۸/۰	۱۹/۷۰	۱-۴
۸۶/۷/۷	محمدشهر	N ۳۵° ۴۵/۲۴۱ E ۵۰° ۵۵/۲۰۰	۲	کلم (سبز و قرمز)	۷/۷	۱۸/۶۹	۵-۱۲
۸۶/۷/۲۷	کهریزک	N ۳۵° ۳۰/۸۵۰ E ۵۱° ۲۱/۷۱۸	۳	کلم (قرمز)	۸/۱	۲۱/۷۹	۱۳-۱۷
۸۶/۷/۲۷	حمزه آباد	N ۳۵° ۲۸/۸۷۸ E ۵۱° ۲۱/۵۲۲	۴	کلم (سبز)	۸/۲	۱۹/۳۸	۱۸-۲۳
۸۶/۹/۶	ولدآباد	N ۳۵° ۴۴/۸۴۶ E ۵۰° ۵۲/۸۰۹	۵	کلم (قرمز)	۷/۶	۱۵/۱۱	۲۴-۲۸
		N ۳۵° ۴۴/۸۱۰ E ۵۰° ۵۲/۸۴۹	۶	کلم (قرمز)	۷/۷	۱۵/۵۲	۲۹-۳۴
		N ۳۵° ۴۴/۷۷۸ E ۵۰° ۵۲/۸۲۶	۷	کلم (سبز)	۷/۴	۱۷/۴۸	۳۵-۴۱
		N ۳۵° ۴۴/۷۸۰ E ۵۰° ۵۲/۸۶۱	۸	اسفناج و کلم	۷/۶	۱۵/۰۰	۴۲
		N ۳۵° ۴۴/۸۲۳ E ۵۰° ۵۲/۸۲۸	۹	گل کلم	۷/۷	۱۸/۰۰	۴۳
۸۶/۱۲/۴	محمدشهر	N ۳۵° ۴۵/۲۴۱ E ۵۰° ۵۵/۲۰۰	۲	کلم (سبز و قرمز)	۷/۸	۲۲/۶۹	۴۴-۵۱
۸۶/۱۲/۴	ولدآباد	N ۳۵° ۴۴/۸۴۶ E ۵۰° ۵۲/۸۰۹	۵	کلم (قرمز)	۷/۸	۲۴/۲۲	۵۲-۵۶
		N ۳۵° ۴۴/۸۱۰ E ۵۰° ۵۲/۸۴۹	۶	کلم (قرمز)	۷/۸	۲۲/۹۶	۵۷-۶۲
		N ۳۵° ۴۴/۷۷۸ E ۵۰° ۵۲/۸۲۶	۷	کلم (سبز)	۷/۶	۲۲/۹۹	۶۳-۷۰
		N ۳۵° ۴۴/۷۸۰ E ۵۰° ۵۲/۸۶۱	۸	اسفناج و کلم	۷/۷	۲۰/۲۹	۷۱

† میانگین حاصل از pH تمام نمونه‌ها در هر مزرعه

* میانگین حاصل از رطوبت نسبی تمام نمونه‌ها در هر مزرعه

Archive of SID

www.SID.ir

برنامه تکثیر شامل مراحل واسرشتی اولیه در ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتی در ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در ۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود. نمونه‌های فاقد DNA الگو و فاقد یکی از پرایمرها به عنوان شاهد منفی بررسی شدند. از DNA به دست آمده از باکتری *X. campestris* DSM 1706 در نمونه شاهد مثبت استفاده گردید. قطعات تکثیر شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید مرئی شدند. واکنش PCR برای هر جدایه با دو تکرار انجام شد.

ارزیابی فاکتورهای ویرولانس: تولید اگزوپلی‌ساکارید: تولید اگزوپلی‌ساکارید در جدایه‌های زرد و موکوئید و باکتریهای *X. campestris* سویه‌های b82 و DSM 1706 به عنوان شاهد با استفاده از محیط تولید سنتزی مورد بررسی قرار گرفت. یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط شیبدار YM agar به لوله حاوی ۵ ml محیط YM broth انتقال داده شد و به مدت یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس از کشت یک شبه به میزان (v/v) ۲ درصد به محیط YM broth به عنوان پیش‌کشت تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت گرماگذاری شد. از محیط پیش‌کشت به میزان (v/v) ۵ درصد به فلاسکهای ارلن مایر ml-۲۵۰ حاوی ml ۵۰ محیط تولید تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و rpm ۱۴۰ به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. آزمایش با چهار تکرار انجام شد. ترکیب محیط تولید سنتزی عبارت است از ($g\ l^{-1}$): سوکروز صنعتی ۲۰، نیتروژن ۰/۲۸، پتاسیم ۰/۲۸، فسفر ۰/۱۲، منیزیم ۰/۰۲ (pH ۷).

ویسکوزیتهٔ ظاهری مایع تخمیر توسط ویسکومتر بروک فیلد با استفاده از سوزن شماره ۳ در rpm ۶۰ در دمای اتاق ($26 \pm 2^{\circ}C$) تعیین شد (۵). اگزوپلی‌ساکارید با استفاده از ایزوپروپانول (۱/۵ برابر حجم مایع تخمیر) و سدیم کلراید رسوب داده شد (۵). رسوب حاصله پس از صاف شدن به مدت ۲۴ ساعت در 50 ± 5 درجه سانتی گراد در آون تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد (۲۶). تعیین معنی‌دار بودن داده‌ها با آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون توکی (Tukey) با فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد توسط نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۵/۲ انجام گرفت.

استخراج پیگمان و تعیین طیف جذبی: پس از ۴۸ ساعت رشد بر روی محیط NA، سلولهای باکتریایی از سطح برداشته و به ml ۳ متانول در لوله آزمایش درپیچ‌دار اضافه شدند. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی در حمام آب ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا آب محتوی نمونه تبخیر شود و جذب نوری عصاره حاوی پیگمان به ۰/۴ در nm ۴۴۳ برسد. سپس عصاره‌ها برای تعیین جذب بیشینه توسط اسپکتروفوتومتر پرتونگاری شدند (۲۷). این آزمون با دو تکرار و سه بار رسم طیف در هر تکرار انجام شد. میانگین طول موجی که دارای بیشترین جذب بود، به عنوان λ_{max} گزارش شد.

نتایج

جداسازی و غربالگری باکتریها: هفتاد و یک نمونهٔ خاک از نه کشتزار در پنج منطقه در حومهٔ شهرهای کرج و ری جمع‌آوری شد (جدول ۱). میانگین تراکم کل باکتریهای رشد یافته بر روی محیط نیمه‌انتخابی SX agar در هر نمونهٔ خاک $1/16 \times 10^{4}$ cfu g^{-1} به دست آمد. بر اساس ویژگیهای ریخت‌شناسی کلنیها روی محیطهای SX agar (کلنیهای نیمه‌شفاف با مرکز ارغوانی مایل به آبی) و YM agar (کلنیهای زرد و موکوئید) (شکل ۱) و همچنین واکنش گرم (باکتریهای گرم منفی)، ۷۸ جدایه از ۱۶ نمونه پس از بررسی ۷۱ نمونهٔ خاک انتخاب شد. مشخصات مربوط به جداسازی باکتریها از خاک به تفکیک نمونه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

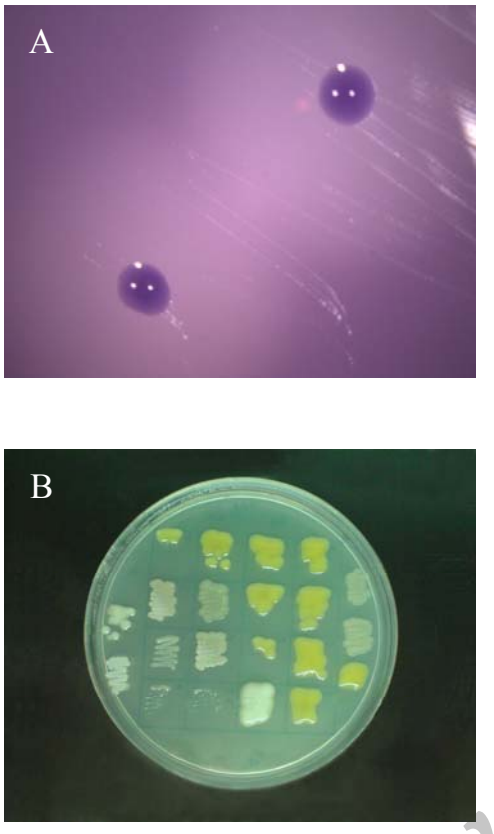
حاوی جدایه‌های *Xanthomonas campestris* احتمالی و نمونه‌های حاوی جدایه‌های دروغین (جدایه‌های زرد رنگ و موکوئید دیگر) در جدولهای ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲- تراکم و تعداد جدایه‌های *Xanthomonas campestris*

شمارهٔ نمونه	تعداد†	نام	تراکم ($cfu\ g^{-1}$)	تراکم نسبی (٪)
۳	۲	SAM 0301, SAM 0302	$۱/۲۴\times۱۰^{۱}$	۰/۵۲
۴	۱	SAM 0401	$۱/۲۴\times۱۰^{۱}$	۰/۵۶
۳۳	۴	SAM 3301-SAM 3304	$۱/۵۷\times۱۰^{۱}$*	۰/۲۷*
۴۱	۱	SAM 4101	$۳/۹۹\times۱۰^{۱}$	۰/۱۹
۴۲	۲۲	SAM 4201-SAM 4222	$۲/۷۴\times۱۰^{۲}$	۱/۹۰
کل	۳۰		$۷/۰۹\times۱۰^{۱}$	۰/۶۹

† تعداد جدایه‌های منتخب * تراکم تخمینی

میانگین تراکم جدایه‌های *X. campestris* احتمالی در ۵ نمونهٔ خاک حاوی این باکتریها و در کل نمونه‌ها به ترتیب $۱۰^{۱}\times ۷/۱$ و $۱۰^{۰}\times ۴/۹۹$ $cfu\ g^{-1}$ بود. در نمونه‌های مثبت میانگین درصد تراکم باکتریهای هدف نسبت به تراکم کل باکتریها ۰/۶۹ درصد بود. میانگین تراکم جدایه‌های دروغین در ۱۲ نمونه حاوی آنها $۱۰^{۲}\times ۱/۰۲$ $cfu\ g^{-1}$ بود و میانگین درصد تراکم آنها نسبت به تراکم کل باکتریها ۲/۵۶ درصد به دست آمد.



شکل ۱- ریخت جدایه‌های *Xanthomonas campestris* احتمالی بر روی محیطهای SX agar، کلنیهای نیمه‌شفاف با مرکز ارغوانی مایل به آبی و هالهٔ روشن هیدرولیز نشاسته در اطراف آن (A) و YM agar، کشت جدایه‌های زرد رنگ و موکوئید (B)

شناسایی براساس ویژگیهای ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی: چهل و هشت جدایه بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی کلیدی شامل حرکت، اوره‌آز، تولید H_2S، استفاده از آسپاراژین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، رشد بر روی مهار رشد با ۰/۱ درصد (w/v) TTC، تحمل نمک، رشد موکوئید بر روی ۵ درصد سوکروز، اکسیداز، هیدرولیز نشاسته، تولید اسید از سوکروز و استفاده از سیترات و پروپیونات از سایر جدایه‌ها متمایز شدند. آنها همچنین در بررسی اولیه برای تولید اگزوپلی‌ساکارید و داشتن پیگمانی با طیف جذبی مشابه با زانتومونادین پاسخ منفی دادند. این باکتریها به دلیل فقدان دو فاکتور اصلی ویرولانس، جدایه‌های دروغین نامیده شدند. به این ترتیب، ۳۰ جدایهٔ

Archive of SID

www.SID.ir

X. campestris احتمالی واجد شاخصهای ویرولانس متمایز شدند و آزمونهای بیوشیمیایی بیشتر بر روی آنها انجام شد (جدول ۴).

جدول ۳- تراکم و تعداد جدایه‌های دروغین

شمارهٔ نمونه	تعداد†	نام	تراکم ($cfu\ g^{-1}$)	تراکم نسبی (٪)
۱۰	۲	SAM 1001, SAM 1002	۸/۲۹×۱۰^۱	۰/۵۸۰
۱۳	۳	SAM 1301-SAM 1303	۱/۲۳×۱۰^۱	۰/۵۶
۱۴	۲	SAM 1401, SAM 1402	۸/۷۸×۱۰^۰	۳/۵۸
۱۶	۳	SAM 1601-SAM 1603	۱/۳۳×۱۰^۱	۲/۷۴
۲۵	۱	SAM 2501	/۸۵×۱۰^۱* ۳	۰/۰۷*
۲۷	۲	SAM 2701, SAM	/۶۲×۱۰^۱* ۷	۰/۱۴*
۲۸	۲	SAM 2801, SAM 2802	۸/۵۲×۱۰^۰	۰/۵۵
۴۱	۱	SAM 4102	۳/۹۹×۱۰^۱	۰/۱۹
۴۵	۴	SAM 4501-	۱/۷۷×۱۰^۱	۱/۲۱
۴۶	۳	SAM 4601-	۱/۳۲×۱۰^۱	۱/۳۸
۴۹	۱۹	SAM 4901-	۶/۵۰×۱۰^۲	۱۴/۴۴
۵۱	۶	SAM 5101-	۲/۵۸×۱۰^۲	۵/۲۳
کل	۴۸		۱/۰۲×۱۰^۲	۲/۵۶

† تعداد جدایه‌های منتخب * تراکم تخمینی

با انجام این آزمونها، شباهت فنوتیپی این جدایه‌ها به اعضای جنس *Xanthomonas* بیشتر مورد تأیید قرار گرفت؛ همهٔ این جدایه‌ها در حضور تراکم ۰/۰۱ درصد متیل گرین رشد نمودند که این متفاوت از نتیجهٔ منابع دیگر است (۱۰ و ۳۰). همهٔ این جدایه‌ها که قادر به رشد بر روی محیط SX agar، دمای ۳۶ درجه سانتی گراد و تراکم ۱۰ درصد گلوکز، هیدرولیز نشاسته، توئین ۸۰ و ژلاتین، پروتئولیز شیر، استفاده از سیترات و پروپیونات، تولید اسید از گلوکز، سوکروز، آرابینوز، زایلوز، فروکتوز، گالاکتوز، مانوز، مالتوز، رافینوز، ترهالوز و سلوبیوز بودند، طبق طبقه‌بندی بر اساس ویژگیهای فنوتیپی (۳۰) متعلق به فنون *X. campestris* می‌باشند. بیشتر سویه‌ها قادر به مصرف لاکتوز نمی‌باشند؛ هرچند که بخشهایی از توالی اپرون لاکتوز در آنها وجود دارد و امکان احیای مصرف لاکتوز در سویه‌های جهش‌یافته نشان داده شده است (۲).

در میان خصوصیات بررسی شده، تفاوتهای کمی میان ۳۰ جدایهٔ *X. campestris* احتمالی و حتی سویه‌های شاهد مشاهده شد. از مجموع ۵۳ تست انجام شده برای سویه ها تنها در ۶-۱ آزمون از میان آزمونهای تحمل دما، تحمل نمک، لسیتیناز و تولید اسید از رافینوز، لاکتوز، مانیتول و مانوز میان جدایه‌ها تفاوت مشاهده شد (جدول ۵).

شناسایی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه: شناسایی ژنتیکی ۹ جدایهٔ *Xanthomonas campestris* احتمالی که به عنوان نماینده و به صورت تصادفی انتخاب شدند، بر اساس پرایمرهای اختصاصی مؤید یک مارکر ژنی برای گونهٔ *X. campestris* انجام گرفت که پیش‌تر توسط زاکاردلی و همکارانش معرفی شده بود (۳۳). پس از انجام PCR، قطعه DNA مورد نظر به طول حدود ۵۲۰ bp از هفت جدایه شامل SAM 3301، SAM 4101، SAM 4204، SAM 4205، SAM 4210، SAM 4213 و SAM 4217 و همچنین سویهٔ شاهد مثبت (*X. campestris* DSM 1706) به دست آمد و شناسایی آنها به *X. campestris* را

Archive of SID

www.SID.ir

تأیید نمود، اما از DNA جدایه‌های SAM 0302، SAM 0401 و جدایهٔ دروغین چنین نتیجه‌ای حاصل نشد (شکل ۲).

فاکتورهای ویرولانس: هیچ‌کدام از ۴۸ جدایهٔ دروغین قادر به تولید اگزوپلی‌ساکارید در محیط سنتزی به کار رفته نبودند، اما تولید اگزوپلی‌ساکاریدی با ویسکوزیته بالا در همهٔ جدایه‌های *X. campestris* احتمالی مشاهده شد (جدول ۵). میانگین تولید خام اگزوپلی‌ساکارید در این جدایه‌ها ۱۰/۹۸ g l^{-1} (حداکثر ۱۲/۱۰ g l^{-1}) و میانگین ویسکوزیتهٔ ظاهری مایع تخمیر ۱۴۰۳ cP (حداکثر ۱۵۵۴ cP) به دست آمد. ویسکوزیتهٔ مایع تخمیر و میزان تولید خام اگزوپلی‌ساکارید جدایه‌های SAM 0301، SAM 0302، SAM 0401 و SAM 4205 نسبت به جدایه‌های دیگر کمتر و از لحاظ آماری متفاوت بود ($p<0/05$).

جدول ۴- آزمونهای بیوشیمیایی متمایز کنندهٔ جدایه‌های ***Xanthomonas campestris*** احتمالی از یکدیگر[۱]

باکتریها / آزمونها[۲]	SAM 0301	SAM 0302	SAM 0401	SAM 4201	SAM 4206	SAM 4213	جدایه‌های *X. campestris* دیگر	*X. campestris* DSM 1706 و b82[۳]	*X. campestris*[۴]
تحمل نمک (٪)	۵	۵	۵	۴	۴	۴	۴	۴	
تحمل دما (°C)	۳۸	۳۹	۳۹	۳۸	۳۷	۳۷	۳۸	۳۷	
لسیتیناز	+	+	+	−	−	−	−	−	+
تولید اسید از:									
D- مانوز	+	+	+	−	−	+	−	+	+
رافینوز	+	+	+	−	−	−	−	−	v[۶]
لاکتوز	w[۵]	+	W	−	−	−	−	−	v
مانیتول	+	−	+	−	−	−	−	−	

[۱] نتایج دیگر آزمونهایی که موجب تمایز جدایه‌های ***Xanthomonas campestris*** احتمالی از یکدیگر نشد: حرکت (+)، کاتالاز (+)، اکسیداز (−)،احیای نیترات (+)، O-F (O)، تولید H_2S (+)، تولید ایندول و استوئین (−)، اوره‌آز و آرژینین دی‌هیدرولاز (−)، فلورسنس در محیط KingB، رشد در محیط آسپاراژین (−)، هیدرولیز اسکولین، کازئین، نشاسته، ژلاتین و توئین ۸۰ (+)، توانایی رشد در ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ گلوکز،(−)، رشد موکوئید در ۵٪ گلوکز و سوکروز (+)، ۰/۱٪ TTC، ۰/۰۱٪ استات سرب و ۰/۰۱٪ تیونین (−) و ۰/۰۱٪ متیل گرین (+)، رشد در ۴°C (−)، استفاده از سیترات و پروپیونات (+)، تولید اسید از L- رامنوز، L- سوربوز، آدونیتول، سوربیتول، میواینوزیتول، D- ملزیتوز، اینولین و دکسترین (−) و L- آرابینوز، ترهالوز، D- گلوکز، D- گالاکتوز، D- زایلوز، D- فروکتوز، سوکروز، سلوبیوز و مالتوز (+)

[۲] آزمونها در سه تکرار انجام گرفت. [۳] سویه‌های شاهد

[۴] ویژگیهای مربوط به فنون *X. campestris* طبق بررسی ون دن موتر و سوئینگز (۳۰) که در اینجا به صورت زیر نمایش داده شد: +: ۷۰٪ < سویه‌ها، −: ۳۰٪ > سویه‌ها و v: ۷۰-۳۰٪ سویه‌ها. [۵] w: ضعیف [۶] v: متغیر

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- میزان رشد در محیط پیش‌کشت، ویسکوزیتهٔ ظاهری مایع تخمیر و میزان تولید خام اگزوپلی‌ساکارید در جدایه‌های زرد رنگ و موکوئید و سویه‌های شاهد

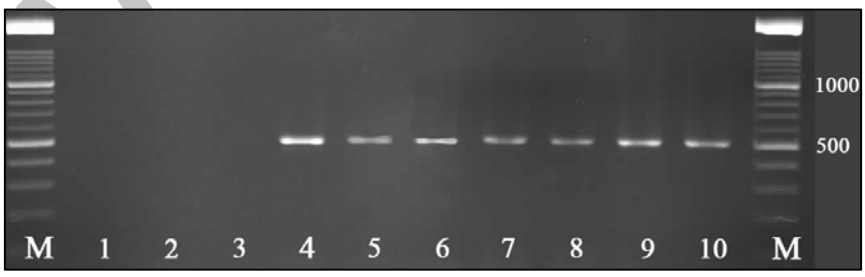
جدایه‌ها		ویسکوزیتهٔ ظاهری مایع تخمیر[†] (cP)	میزان تولید خام[†] ($g\ l^{-1}$)
X. campestris احتمالی	SAM 0301 SAM 0302 SAM 0401	۹۱۱*	۹/۵۷*
	SAM 4205	۴۱۲*	۷/۱۲*
	جدایه‌های دیگر	۱۳۹۹	۱۱/۲۷
جدایه‌های دروغین		~۱	-
X. campestris b82**		۱۴۵۹	۱۰/۸۲
X. campestris DSM 1706**		۱۵۰۸	۱۱/۴۸

[†] این مقادیر میانگین چهار تکرار می‌باشند. * تفاوت معنی‌دار در مقایسه با جدایه‌های دیگر ($p<۰/۰۵$) ** سویه‌های شاهد

جدول ۶- جذب بیشینهٔ (λ_{max}) پیگمان جدایه‌های *X. campestris* احتمالی و جدایه‌های دروغین

جدایه‌ها	λ_{max} پیگمان[†] (nm)	۴۱۰ ۴۲۰ ۴۳۰ ۴۴۰ ۴۵۰
X. campestris احتمالی	۴۴۱/۰ - ۴۴۴/۷	▬
جدایه‌های دروغین	۴۱۴/۶ - ۴۲۵/۴	▬▬▬
X. campestris b82*	۴۴۲/۸	•
X. campestris DSM 1706*	۴۴۲/۳	•

[†] λ_{max} بیانگر طول موجی است که عصارهٔ متانولی پیگمان خام در آن بیشترین جذب را دارد. این آزمون با دو تکرار و ۳ بار رسم طیف جذب در هر تکرار انجام شد. * سویه‌های شاهد



شکل ۲- آنالیز ژل الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده از DNA جدایه‌های نماینده *Xanthomonas campestris* احتمالی با استفاده از پرایمرهای HrcCF2 و HrcCR2 (ردیف M: نشانگر وزن مولکولی، ردیف ۱: یکی از جدایه‌های دروغین، ردیف ۲: SAM 0302، ردیف ۳: SAM 0401، ردیف ۴: SAM 3301، ردیف ۵: SAM 4101، ردیف۶: SAM 4204، ردیف ۷: SAM 4205، ردیف ۸: SAM 4210، ردیف ۹: SAM 4213 و ردیف ۱۰: SAM 4217). در تصویر کنترل‌های مثبت و منفی مشاهده نمی‌شوند.

www.SID.ir

در همهٔ جدایه‌های *X. campestris* احتمالی، طیف جذب نوری عصارهٔ متانولی حاوی پیگمانهایی مشابه سویه‌های شاهد بود؛ درحالی که در ۴۸ جدایهٔ دیگر، جذب بیشینهٔ عصارهٔ متانولی حاوی پیگمان در دامنهٔ ۴۲۵/۴ nm– ۴۱۴/۶ قرار گرفت (جدول ۶). بیشتر اعضای جنس *Xanthomonas* جذب بیشینهٔ اصلی در ۴۴۵ nm (۲۹) و یا ۴۴۱ nm (۲۷) نشان می‌دهند. معمولاً جذبهای بیشینهٔ فرعی در شانه‌های چپ و راست در طول موجهای ۲۲ nm کمتر و ۲۵ nm بیشتر نیز وجود دارد (۲۹).

بحث

اعضای جنس *Xanthomonas* تقریباً به طور انحصاری از زیستگاههایی که با بیماریهای گیاهی در ارتباط هستند، جداسازی می‌شوند. بیشتر گزارشهای قابل اعتماد در مورد زانتوموناداها در رابطه با وجود آنها در ضایعات تازه یا کهنه بر روی گیاهان آلوده می‌باشد. دربارهٔ جداسازی *Xanthomonas* spp. از خاک، بقایای گیاهی و گیاهان بی‌علامت گزارشهای اندکی وجود دارد، ولی اطلاعات معتبری را در مورد زیستگاههای این باکتریها فراهم می‌کند (۲۹). اگرچه حضور این باکتری در خاکهای زراعی در ایران پیش از این نشان داده شده است (۴)، این نخستین پژوهش برای جستجو و دستیابی به سویه‌های *X. campestris* در خاک کشتزارهای کلم در ایران محسوب می‌شود. در این مطالعه جدایه‌های *X. campestris* تنها از ۷ درصد نمونه‌های خاک به دست آمد و میانگین تراکم آنها در این نمونه‌ها $۷/۰۹ \times ۱۰^{۱}$ cfu g^{-1} بوده است. فوکوئی و همکارانش (۱۹۹۴) در خاک نواحی آلوده جمعیتهای cfu $۱۰^{۶}$ g^{-1} را نیز گزارش کرده اند (۲۹).

وضعیت آب و هوایی و نحوه فعالیتهای کشاورزی می‌تواند شرایط لازم برای انتشار بیماری را مساعد نماید. مطالعات بقا نشان داده که دمای بالا منجر به تجزیهٔ سریع تر بقایای گیاهی و بنابراین کاهش حفاظت از باکتری می‌گردد و رطوبت شدید محیط بی‌هوازی ایجاد می‌کند و میکروفلور خاک را تغییر می‌دهد. همچنین یک همبستگی منفی بین تعداد میکروارگانیسمهای سلولوتیک و تعداد باکتری *X. campestris.* pv. *campestris* در رطوبت نسبتاً بالا مشاهده شده است (۶ و ۱۹). علی‌رغم نبود بیماری شایع در گیاهان حساس در ایران بنابر دلایل آب و هوایی، وجود باکتری در برخی از نمونه‌های خاک کشتزارهای کلم در این بررسی قابل ملاحظه بود. گاهی گیاهان مستعد علائم بیماری را دیرتر و در هنگام ذخیره‌سازی در انبار نشان می‌دهند (۲۸). این پدیده که بیماری پس از برداشت و به عبارت دیگر فساد نامیده می‌شود، در ایران شایع است و سهمی از دور ریز محصولات جالیز و سبزیها را به خود اختصاص می‌دهد. بیماریهای پس از برداشت منجر به کاهش کیفیت محصول و زیان اقتصادی خواهند شد. عدم برداشت صحیح میوه و سبزی، عدم آماده سازی اولیه درکشتزار، آماده‌سازی و حمل و نقل نادرست و نگهداری در شرایط نامناسب موجب تلفات بخش مهمی از میوه و سبزی می‌شود که گفته می‌شود مقدار آن در مجموع از ۳۵ درصد تولیدات کشور بیشتر است.

این مطالعه کارآیی نسبی محیط SX agar برای جداسازی سویه‌هایی از *X. campestris* را تأیید می‌کند. این کارآیی را در یک پژوهش بر روی سویه‌هایی از *X. campestris* و گونه‌های تجزیه‌کنندهٔ نشاسته دیگر ۲۳ تا ۱۰۰ درصد (۲۹) و در پژوهش دیگر ۱۰ درصد گزارش کرده اند (۱۳). استار (۱۹۸۱) به کاربرد محیط کشت SX agar برای جداسازی باکتری *X. campestris* اشاره کرده است. محیط نیمه‌انتخابی SX agar توسط شاد و وایت در سال ۱۹۷۴ طراحی شد و نخستین بار در مطالعهٔ مشابهی مورد استفاده قرار گرفت. دلایل این طراحی، قابلیت مصرف نشاسته توسط تمام سویه‌های *X. campestris*، اثر متیل ویولت B و متیل گرین در بهبود تمایز کلنی و انتخابی شدن بیشتر محیط و وجود عصارهٔ گوشت برای افزایش سرعت رشد *X. campestris* می‌باشد (۲۹). به‌جز *X. campestris* pv. *campestris*، باکتریهایی مانند *X. campestris* pv.

www.SID.ir

X. campestris pv. *begoniae*، *X. campestris* pv. *citri*، *X. campestris* pv. *dieffenbachiae*، *X. campestris* pv. *nigromaculans*، *X. hyacinthi*، *X. juglandis* pv. *corylina* و *X. pisi* نیز می‌توانند بر روی این محیط جداسازی شوند (۲۷). در این بررسی مشخصات کلنی و هالهٔ هیدرولیز نشاسته در مرحله غربالگری چندان مفید واقع نشدند زیرا کلنیهای بسیاری با ریخت شبیه زانتوموناداها بر روی محیط SX agar رشد کرد و وجود سویه‌هایی با فعالیت آمیلازی قوی یا تعداد زیادی از سویه‌های آمیلاز مثبت مانع از تشخیص این هاله برای کلنیهای دیگر شد. بنابراین تعداد زیادی از کلنیها به محیط YM agar منتقل شدند. تولید پیگمان زانتومونادین و پلی‌ساکارید زانتان از ویژگیهای منحصر به فرد جنس *Xanthomonas* به شمار می‌آید و تشکیل کلنیهای زرد رنگ و موکوئید از خصوصیات ریخت‌شناسی مهم در این باکتریها است. استفاده از محیط YM agar و انتخاب باکتریهای زرد و موکوئید منجر به کاهش قابل توجه در تعداد جدایه‌ها شد. علاوه بر این، تولید اگزوپلی‌ساکارید و پیگمانهای زانتومونادین در بیماریزایی این باکتریها نیز نقش مهمی دارد (۱۲ و ۲۳). بنابراین سویه‌های دارای این دو ویژگی را می‌توان بالقوه بیماریزا به شمار آورد.

همهٔ سویه‌های پیگمان‌دار جنس *Xanthomonas*، پیگمانهایی با ویژگیهای کروماتوگرافی و جذب نوری مشابه تولید می‌کنند که در باکتریهای زرد رنگ دیگر یافت نشده است (۱۰). بررسی وجود زانتومونادین‌ها و یا وجود خوشه‌های ژنی کدکننده برای سنتز آنها می‌تواند برای نسبت دادن سویه‌های ناشناخته به جنس *Xanthomonas* به کار رود. نبود زانتومونادین‌ها اثر محدودکننده بر روی بقای اپی‌فیتی و عفونت در میزبان دارد (۱۰). جداسازی از بافت گیاهی و خاک اغلب تعداد زیادی باکتریهای تولید کنندهٔ پیگمان به دست می‌دهد. یک آزمون احتمالی مناسب برای شناسایی زانتومونادین‌ها تعیین طیف جذب عصاره‌های خام می‌باشد و شناسایی دقیق‌تر نیاز به تعیین ویژگیهای کروماتوگرافی آنها دارد (۲۹). در این مطالعه تعیین طیف جذب عصاره متانولی حاوی پیگمان تمایز خوبی میان جدایه‌های *X. campestris* احتمالی و جدایه‌های دروغین ایجاد کرد.

نتایج آزمونهای ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی ۳۰ جدایهٔ زرد و موکوئید به خوبی با خصوصیات مربوط به باکتریهای جنس *Xanthomonas* (۱۰) و فنون *X. campestris* (۳۰) مطابقت داشت. در این بررسی، وجود قطعه‌ای اختصاصی در باکتری *X. campestris* از ژن *hrcC* که در خانواده ژنهای *hrp* قرار دارد، به صورت تصادفی در برخی از جدایه‌های احتمالی بررسی شد. این بررسی از یک سو صحت شاخصهای سنجش اگزوپلیمر و زانتومونادین را تأیید کرد و از سوی دیگر به عنوان مارکر ژنی وجود *X. campestris* را تأیید نمود. این جستجو توسط PCR از ۷ جدایه به عمل آمد و به این ترتیب شناسایی آنها به گونهٔ *X. campestris* تأیید شد، اما این قطعه از دو جدایهٔ *X. campestris* احتمالی دیگر و جدایه دروغین بررسی شده حاصل نشد. ژنهای *hrp* برای رشد درون گیاه و ایجاد علائم بیماری ضروری هستند. محصولات این ژنها اجزای اصلی سیستم ترشحی بوده و برای بیماریزایی کاملاً ضروری هستند (۳۳). جدایه‌های فاقد ژن *hrcC* ممکن است متعلق به گونه‌های دیگری باشند یا اینکه از زانتوموناداهای فرصت‌طلب به شمار روند. زانتوموناداهای فرصت‌طلب، جوامعی از زانتوموناداها می‌باشند که در ارتباط نزدیک با گیاهان زندگی می‌کنند، اما علائم بیماری آشکاری بر روی میزبان ایجاد نمی‌کنند و فاقد ژنهای *hrp* معمول در اعضای بیماریزای این جنس هستند (۳۱).

همهٔ جدایه‌های *X. campestris* احتمالی به دست آمده، توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید و ویسکوز نمودن مایع کشت را نشان دادند که از نظر کاربرد صنعتی بسیار با اهمیت است (۲۰ و ۲۵)؛ تراکم ۲ درصد از سوکروز در محیط تولید به کار رفت و موجب تمایز میان تعدادی از جدایه‌ها شد.

www.SID.ir

منابع

۱- اخوان، ع.، بهار، م.، سعیدی، ق. و لک، م. (۱۳۸۸). مقایسه روش‌های مختلف ردیابی باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* در بذر لوبیا. بیماریهای گیاهی، ۴۵، ۸-۱.

۲- اشرف، س.، صعودی، م. ر. و صادقی زاده، م. (۱۳۸۷). جداسازی سویه‌ای جهش یافته از باکتری *Xanthomonas campestris* برای تولید زانتان با استفاده از آب پنیر بعنوان تنها سوبسترا. مجله زیست‌شناسی ایران، ۲۱، ۱۹۳-۱۸۴

۳- خداکرمیان، غ.، رحیمیان، ح.، محمدی، م. و علامه، ع. (۱۳۷۸). خصوصیات فنوتیپی، دامنه میزبانی و چگونگی پراکنش استرینهای باکتری *Xanthomonas axonopodis* عامل شانکر مرکبات جنوب ایران. بیماریهای گیاهی، ۳۵، ۱۱۱-۱۰۲.

۴- صعودی، م. ر. (۱۳۷۸). تولید گزانتان از سویه‌های بومی گزانتوموناس کمپستریس. دوفصلنامه علوم پایه دانشگاه الزهرا (س)، ۲۳، ۴۵-۵۵.

۵- نصر، ش. (۱۳۸۶). بررسی خواص زانتان در سویه‌هایی از *Xanthomonas campestris* با ملاحظه کاربرد در افزایش استحصال میکروبی نفت. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا (س).

6- Arias, R. S., Nelson, S. C., and Alvarez, A. M. (2000). Effect of soil-matric potential and phylloplanes of rotation-crops on the survival of a bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. European Journal of Plant Pathology, 106, 109–116.

7- Baldini, N. C., Bernhardt, L., Gutman, E. L., Kauffman, S. L., Kramer, J. G., Leinweber, C. M., and Mayer, V. A. (1996). Annual Book of ASTM Standards, Sec.4, Vol.4.8: Soil and Rock (I), American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA.

8- Bobosha, K. (2003). Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* isolates: causal agent of enset bacterial wilt disease. Thesis submitted to school of graduate students, Addis Ababa University for the M.Sc. degree in biology (applied microbiology).

9- Brath, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., and Breidt, F. (2009). Microbiological spoilage of fruits and vegetables. In Sperber, W. H.; Doyle, M. P. (Eds.), Compendium of a microbiological spoilage of dishes and beverages, Springer Science+Business Media, New York.

10- Brenner, D. J., Krieg, N. R., and Staley, J. T. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed., Vol.2, Part B: The *Gammaproteobacteria*, Springer.

11- Chan, J. W. Y. F. and Goodwin, P. H. (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. Biotechnology Advances, 17, 489–508.

12- Dunger, G., Relling, V. M., Tondo, M. L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E. G., and Ottado, J. (2007). Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. Archives of microbiology, 188, 127–135.

13- Dzhalilov, F. S., and, Tiwari, R. D. (1995). Soil and cabbage plant debris as infection sources of black rot. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 29, 383–386.

14- Esgalhado, M. E., Caldeira, A. T., Roseiro, J. C., and Emery, A. N. (2001). Polysaccharide synthesis as a carbon dissipation mechanism in metabolically uncoupled *Xanthomonas campestris* cells. Journal of Biotechnology, 89, 55–63.

15- Gomes, L. H., Duarte, K. M. R., Andrino, F. G., Cesar, F., and Tavares, A. (2000). A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. Sci. Agríc. 57, 553–555.

16- Goszczynska, T., Serfontein, J. J., and Serfontein, S. (2000). Introduction to Practical Phytobactriology, a Manual for Phytobactriology, first Ed., Safrinet (South Africa) Pretoria.

17- Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., Mc Inerney, M. J., and Stetzenbach, L. D. (2002). Manual of Environmental Microbiology, 2nd Ed., ASM Press, Washington, DC.

18- Jensen, B. D., Massomo, S. M. S., Swai, I. S., Hockenhull, J., and Andersen, S. B. (2005). Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). European Journal of Plant Pathology, 113, 297–308.

19- Kocks, C. G., Ruissen, M. A., Zadoks, J. C., and Duijkers, M. G. (1998). Survival and extinction of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in

Archive of SID

www.SID.ir

soil. European Journal of Plant Pathology, 104, 911–923.

20- Leela, G. K., and Sharma, G. (2000). Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. Bioprocess Engineering, 23, 678–689.

21- López, N. I., Haedo, A. S., and Méndez, B. S. (1999). Evaluation of *Xanthomonas campestris* survival in a soil microcosm system. International Microbiology, 2, 111–114.

22- Massomo, S. M. S., Nielsen, H., Mabagala, R. B., and Mansfeld-Giese, K. (2003). Identification and characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, Biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. European Journal of Plant Pathology, 109, 775–789.

23- Poplawsky, A. R., Urban, S. C., and Chun, W. (2000). Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 5123–5127.

24- Rodríguez, H., and Aguilar, L. (1997). Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 18, 232–234.

25- Rosalam, S., and England, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas* sp.. Enzyme and Microbial Technology, 39, 1921–1929.

26- Rottava, I., Batesini, G., Silva, M. F., Lerin, L., de Oliveira, D., Padilha, F. F., Toniazzo, G., Mossi, A., Cansian, R. L., Luccio, M. D., and Treichel, H. (2009). Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. Carbohydrate Polymers, 77, 65–71.

27- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Ed., American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

28- Sherf, A. F., and MacNab, A. A. (1986). Vegetable Diseases and Their Control, 2nd Ed., John Wiley and Sons, New York.

29- Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., and Schlegel, H. G. (1981). The Prokaryotes, Vol.1, Springer Verlag, Berlin.

30- Van den Mooter, M., and Swings, J. (1990). Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. International Journal of Systematic Bacteriology, 40, 348–369.

31- Vauterin, L., and Swings, J. (1997). Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19, 77–82.

32- Yun, M. H., Torres, P. S., Oirdi, M. E., Rigano, L. A., Gonzalez-Lamothe, R., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Dankert, M. A., Bouarab, K., and Vojnov, A. A. (2006). Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. Plant Physiology, 141, 178–187.

33- Zaccardelli, M., Campanile, F., Spasiano, A., and Merighi, M. (2007). Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. Eur. J. Plant Pathol. 118, 299–306.

34- Zhao, Y., Damicone, J. P., Demezas, D. H., and Bender, C. L. (2000). Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. Plant Disease, 84, 1008–1014.

35- Zhao, Y. F., Damicone, J. P., and Bender, C. L. (2002). Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. Plant Disease, 86, 883–888.

Archive of SID

www.SID.ir

Potentially virulent isolates of *Xanthomonas campestris* from agricultural soil of Ray and Karaj

Alimadadi N., Soudi M.R., Sepehr S. and Ghadam P.

Microbiology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I. R. of Iran

Abstract

The *Xanthomonas* genus is one of the most important groups of crop plant pathogenic bacteria and they are one of main causal agents of post-harvest spoilage and economical loss. In this research, 71 agricultural soil samples collected from suburb of Ray and Karaj cities. Screening of bacteria on semiselective SX agar medium, performing morphological and biochemical tests and evaluation of two specific virulence factors resulted in a number of *X. campestris* isolates among all putative growing bacteria. Relative percentage of *X. campestris* to total number of bacteria grown on SX agar was 0.69%. Capability of exopolysaccharide production by average concentration of 10.98 g l^{-1} and average viscosity of 1403 cP and presence of xanthomonadin pigment with maximum absorbance index within the range of 441.0-444.7 nm wavelengths, as two main virulence factors, was determined and confirmed. Molecular identification for 25% of the randomly selected isolates possessing virulence factors, indicated *X. campestris* species by confirming the presence of specific *hrcC* gene marker. This study indicates that despite lack of any report on prevalence of the related diseases, the potentially virulent *X. campestris* can be found in soil of cabbage farms in suburb of Ray and Karaj cities. As a case study, existence of these strains in soil is noticeable because of probability of losses caused by spoilage of agricultural products which is prevalent in Iran.

Keywords: cabbage (*Brassica oleracea*), soil, *Xanthomonas campestris*, exopolysaccharide, xanthomonadin

Archive of SID

www.SID.ir