

جداسازی و شناسایی اولین باکتری بومی کنترل‌کننده عامل بیماری شانکر مرکبات،

*Xanthomonas citri subsp. citri*داریوش غلامی^۱، سعید امین زاده^{۱*}، سیدمهدی علوی^۱، طناز گودرزی^۱، نسرین کاظمی پور^۲ و جعفر ولیزاده^۲^۱تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری^۲زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۹

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۷

چکیده

بیماری باکتریایی شانکر مرکبات یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های مرکبات می‌باشد و از جمله بیماری‌های قرنطینه‌ای است که خسارت شدیدی بر تولید مرکبات در ایران وارد ساخته است. باکتری عامل این بیماری *Xanthomonas citri subsp. citri (xcici)* می‌باشد. علی‌رغم وجود این بیماری در کشور ایران، تاکنون مطالعه دقیقی در جهت کنترل بیولوژیک آن انجام نگرفته است. پیتیدهای آنتی‌میکروبیال تولید شده توسط موجودات مختلف، برای این کار کاندیدهای مناسبی هستند، Lashar DGH2 نوعی باکتریوسین بومی و جدید می‌باشد که برای مهار این بیماری کاندیدای مناسبی می‌باشد. این باکتریوسین اولین باکتریوسین مهارکننده باکتری زانتوموناس در دنیاست که قادر به مهار سویه‌های ایرانی و جهانی این باکتری می‌باشد. امید است که با تحقیقات آتی بر روی این باکتریوسین و بهینه‌سازی قدرت مهارکنندگی آن بتوان گام مهمی در جهت کنترل این بیماری برداشت.

واژه‌های کلیدی: شانکر مرکبات، *Xanthomonas citri subsp. citri (xcici)*، Lashar DGH2، باکتریوسین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۴۱۲، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

گیاهان علیه این نوع پاتوژن، توسط ترکیبات مسی و آنتی‌بیوتیکها مقدر می‌باشد که هر دو مورد، جزء ترکیبات آلوده‌کننده محیطی به شمار می‌رود و در چندین مورد گزارش شده است که این ترکیبات به تولید نژادهای مقاوم باکتریهای پاتوژن گیاهی منجر شده‌اند. در سالهای اخیر تلاشهای زیادی برای پیدا کردن آنتی‌بیوتیکهای معطوف شده که باکتری نتواند در برابر آن مقاوم شود (۸). باکتریوسین‌ها، پیتیدها یا پروتئینهای آنتی‌میکروبیال ریبوزومی هستند که در دنیای میکروبی پراکنده هستند و توسط باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی تولید می‌شوند، اغلب باکتریوسین‌ها اندازه کوچکی دارند (۲۰ تا ۷۰ اسید آمینه) و دارای خصوصیات کاتیونی می‌باشند که سلولهای هدف را با ناپایداری کامل پوشش غشای درونی و یا از

سالانه بخش عمده‌ای از محصولات کشاورزی بر اثر آفات و بیماریهای گیاهی از بین می‌روند (۱). بیماری باکتریایی شانکر مرکبات بسیاری از گونه‌های مهم مرکبات از قبیل گریپ فروت، برخی پرتقالهای شیرین، لیموترش و لیموشیرین را آلوده می‌کند (۵). باکتری عامل این بیماری *Xanthomonas citri subsp. citri (xcici)* می‌باشد که دارای دو تیپ متفاوت A* و A است، اگرچه سویه‌های تیپ A در اغلب مناطق کشت و تولید مرکبات دیده می‌شود اما سویه‌های تیپ A* تنها در هند، تایلند و کشورهای حوضه خلیج فارس از جمله ایران، شناسایی شده است. نتایج حاصله از مطالعات دیگر نشان می‌دهد که علاوه بر سویه‌های تیپ A*، سویه‌هایی با دامنه میزبانی وسیع (تیپ A) و تیپهای متنوع دیگر نیز در کشور وجود دارد (۲). حفاظت

مهم میان باکتریوسین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها این است که اغلب باکتریوسین‌ها منشأ ریپوزومی دارند و ترکیبات پروتئین دار ریپوزومی می‌باشند. همچنین باکتریوسین‌ها قادرند در غلظت‌های کم و در حد پیکومول مهار کنند در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها در حد میکرومول مهار می‌کنند و در حقیقت این ویژگی‌ها، اکثر باکتریوسین‌ها را از آنتی‌بیوتیک‌ها متمایز می‌کنند (۶). تاکنون هیچ گزارشی از باکتریوسین مهارکننده زانتوموناس مشاهده نشده است، باکتریوسین *Lashar* DGH2 اولین باکتریوسین مهارکننده سویه‌های مختلف زانتوموناس عامل بیماری شانکر مرکبات در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد. به طور کلی اهدافی که از این تحقیق مورد نظر بوده است عبارتند از شناسایی باکتری مهارکننده رشد باکتری زانتوموناس، اثربخشی این باکتری بر روی باکتری عامل مولد شانکر، امکان دستیابی به باکتریوسین تولیدی توسط باکتری مورد نظر برای مطالعات آتی و بررسی امکان کاهش جمعیت عامل بیماری شانکر مرکبات و کنترل بیولوژیکی بیماری می‌باشد و همچنین اصول کاربردی از قبیل مبارزه بیولوژیک با آفات و افزایش راندمان تولید مرکبات، بهبود کیفیت میوه از طریق جلوگیری از بروز آفات و بهبود بازار مرکبات از این مطالعه متصور می‌باشد.

مواد و روشها

سویه‌های باکتریایی و محیط کشت: اندام‌های سالم و آلوده مرکبات و همچنین نمونه‌های خاک و آب از مناطق مختلف استان سیستان و بلوچستان (شهرهای نیک شهر، ایرانشهر، چابهار، جکیگور، سرباز، راسک، قصرقند) جمع‌آوری گردید. بعد از انتقال به آزمایشگاه بلافاصله عملیات جداسازی آغاز گردید جداسازی سویه‌های مختلف باکتریایی بر طبق روش مرسوم در باکتری‌شناسی انجام گرفت (۱۱) و جهت تولید باکتریوسین علیه سویه‌های مختلف باکتری زانتوموناس (۱۲۰ سویه مختلف) غربالگری انجام گردید. همه سویه‌های شاخص و تولیدکننده در

طریق مکانیسم‌های تهاجمی دیگر از قبیل فعالیت *DNase*، *RNase* و اختلال در سنتز پروتئین‌های ضروری سلول‌های هدف از بین می‌برند که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شوند (۷). باکتریوسین‌ها سموم قوی هستند که به دلیل فعالیت کشندگی قوی ولی با طیف کشندگی محدود، مورد توجه خاص قرار دارند و نکته قابل توجه این است که باکتریوسین‌ها برای انسان سمی نیستند (۳) یا سمیت آنها بسیار کم می‌باشد (۴). اغلب باکتریوسین‌ها معمولاً علیه گونه‌هایی که رابطه نزدیکی با استرین تولیدکننده دارند؛ فعالیت می‌کنند (۱۷). باکتریوسین‌ها اولین بار توسط *A. Gratia* در سال ۱۹۲۵ کشف شدند. او در حال تحقیق بر روی فرآیندی برای کشتن باکتری‌ها بود که این امر منجر به پیشرفت آنتی‌بیوتیک‌ها و کشف باکتریوسین‌ها گردید. همه این یافته‌ها به چند سال اخیر محدود می‌گردد و این نشان دهنده اهمیت کشف باکتریوسین‌ها می‌باشد. او اولین کشف خود را کولیسین نامید زیرا باعث کشتن *E. Coli* گردید ("کولیسین" به معنی کشنده *E. Coli* می‌باشد) و جالب اینجاست که این باکتریوسین از خود *E. Coli* منشأ می‌گیرد. امروزه مشخص شده است که باکتریوسین‌ها یک خانواده بزرگ و متنوع از لحاظ عملکردی را شامل می‌شوند و در واقع سمومی هستند که در دودمان‌های باکتریایی و آرکی یافت می‌شوند (۱۶). روش‌های رده‌بندی باکتریوسین‌ها بسیار متفاوت می‌باشد از جمله بر اساس سویه تولیدکننده، مکانیسم کشندگی (مانند تشکیل منفذ و فعالیت نوکلئازی)، وزن مولکولی و شیمی مولکولی (پروتئین‌های بزرگ، پلی‌پپتیدها و داشتن آمینواسیدهای غیرمعمول مانند لانتیومین‌ها)، نحوه تولید (ریپوزومی، تغییرات پس ریپوزومی و غیرریپوزومی) رده‌بندی می‌شوند (۱۰). اغلب باکتریوسین‌ها در چند مورد از آنتی‌بیوتیک‌های معمول متفاوتند: باکتریوسین‌ها یک طیف کشندگی محدودی دارند و بنابراین تنها برای باکتری که از لحاظ تاکسونمی خیلی به استرین تولیدکننده آن باکتریوسین نزدیک باشد سمی می‌باشند. از دیگر تفاوت‌های

دور $g \times 7000$ و به مدت ۱۵ دقیقه) و مایع رویی از فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و مایع جمع‌آوری شده جهت بررسی‌های آتی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

سنجش فعالیت و تعیین طیف آنتی‌میکروبیال: روش‌های مختلفی جهت سنجش فعالیت آنتی‌میکروبیال باکتریوسین‌ها وجود دارد که در این تحقیق از دو روش جاسازی در دیسک (Disc Diffusion) و جاسازی در چاهک آگار (Agar-Well Diffusion Assay) و همچنین از روش نوین DD-AWDA استفاده گردید. در روش Disc Diffusion بعد از تهیه پلیتهای محتوی محیط کشت باکتریایی NA، سطح پلیت با ۱۰۰ میکرو لیتر از باکتری هدف تلقیح (قبلا از باکتری هدف، استاندارد ۰/۵ مک فارلند آماده شد) و دیسکهای استریل بر روی محیط کشت جامد مورد نظر در پلیت قرار گرفتند و مقدار ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری تولیدکننده بر روی دیسک گذارده شد. پلیتها به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند و بعد از ۲۴ ساعت تشکیل هاله بررسی گردید (۱۳). در روش AWDA بعد از تهیه آگار نیمه جامد (۰/۵ درصد) مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از پیش کشت باکتریایی هدف در ۵ میلی لیتر از آن مخلوط شد و در یک پلیت جداگانه که قبلا دو سوم آن با محیط کشت جامد NA پر گردید افزوده و چاهکهایی به قطر ۵ میلی متر در آنها ایجاد و مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از سویه تولیدکننده به هر چاهک اضافه شد و به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و تشکیل هاله بعد از ۲۴ ساعت بررسی گردید (۱۴).

استخراج DNA باکتری تولیدکننده: برای استخراج DNA باکتری تولیدکننده از کیت استخراج DNA ژنومیک (خریداری شده از شرکت Bioneer، کره جنوبی) استفاده شد و DNA خالص شده جهت نگه‌داری به یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. در پایان برای

محیط کشت مایع NB (Nutrient Broth) کشت داده شدند و از محیط کشت جامد NA (Nutrient Agar) استفاده گردید. از همه سویه‌های بیماریزا (شاخص) و همچنین سویه‌های تولیدکننده استوک با گلیسرول ۲۰ درصد تهیه گردید و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جداسازی سویه تولیدکننده: بعد از اینکه ۵۰۰ سویه باکتریایی مختلف از منبع باکتریایی مذکور جداسازی و در محیط کشت مایع NB پیش کشت داده شد و بعد از مدت ۲۴ ساعت که از کشت آنها سپری شد هرکدام جداگانه بر روی دیسکهای مخصوص منتقل و با روش نوین DD-AWDA (Disc Diffusion-Agar Well Diffusion Assay) کشت دیسکی داده شدند، بدین ترتیب که سوسپانسیونی از هر باکتری بیماریزا با کدورتی معادل نیم مک فارلند در محیط کشت مایع NB تهیه و به وسیله سوپ استریل روی سطح پلیت محتوی ۱۵ میلی لیتر NA تلقیح گردید سپس دیسک آغشته به ۱۰ میکرو لیتر از باکتری تولیدکننده روی سطح پلیت قرار داده شد. پلیتها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد آنکوبه و بعد از گذشت ۲۴ ساعت تشکیل هاله عدم رشد بررسی گردید. کلنی تولیدکننده هاله (سویه تولیدکننده) از دیگر کلنیا جدا و جهت بررسی‌های آتی از آن استوک تهیه گردید و تستهای مورفولوژیکی (میکروبیولوژیکی) و بیوشیمیایی آن انجام شد.

تشخیص و شناسایی سویه جدا شده: سویه جدا شده برای آزمونهای بیوشیمیایی از قبیل ژلاتین، سترات، MR و سایر فاکتورها مورد ارزیابی قرار گرفت و تستهای میکروبی نیز طبق پروتکل‌های استاندارد انجام شد. شناسایی بیشتر با توالی‌یابی 16srDNA و به دنبال آن آنالیز فیلورنتیکی جهت شناسایی سویه تولیدکننده انجام گرفت (۱۲).

تولید باکتریوسین: پیش کشت باکتری تولیدکننده بعد از گذشت مدت ۲۴ ساعت آنکوباسیون، سانتریفیوژ گردید (در

جدول ۲- غلظت‌های مخلوط PCR (این واکنش در حجم نهایی ۲۵ μl تهیه شد)

مواد	غلظت	حجم به μl
MgCl_2	۱/۵ mM	۱/۵
Reaction buffer	۱۰ X	۲/۵
dNTP(mix)	۵ mM	۱
Reverse primer	۲۰ pM	۱
Forward primer	۲۰ pM	۱
DNA template	۷۰ ng/ μl	۲
ddH ₂ O	-	۱۵/۵
Taq DNA polymerase	۱ unit	۰/۵

واکنش PCR و 16srDNA : برای تکثیر 16srDNA مربوط به باکتری تولیدکننده از روش PCR استفاده شد (۹). جدول ۱ و ۲ برنامه به کار گرفته شده در دستگاه ترموسیکلر و مخلوط واکنشها را نشان می‌دهد. ترادف آغازگر forward و reverse به کار گرفته جهت این مطالعه در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳- آغازگرهای استفاده شده جهت تکثیر 16srDNA

نام آغازگر	توالی آغازگر
Forward	5'- GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTG-3'
Reverse	5'- CCAGTTTCGAATGCAGTCCCCAG-3'

(TBE 1X) برده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با کمک دستگاه GBOX HR عکس برداری صورت گرفت (۱۵).

بحث و نتایج

جداسازی و تشخیص سوبه تولیدکننده باکتریوسین: بعد از اینکه اثر مهارى باکتری تولیدکننده مشاهده شد؛ تستهای بیوشیمیایی (جدول ۴) سوبه مورد نظر انجام گرفت و

اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، جذب نمونه‌های خالص شده در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه طیف سنج خوانده شد.

الکتروفورز DNA: پس از انجام مراحل فوق، برای مشاهده کیفیت DNA استخراج شده ۵ میکرولیتر از آن را روی الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ درصد (تهیه شده در بافر TBE 1X) برده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با کمک دستگاه GBOX HR عکس برداری صورت گرفت (۱۵).

جدول ۱- برنامه دمایی و زمانی PCR

شماره	مراحل	دما (°C)	زمان (ثانیه)
۱	Denaturation	۹۴	۳۰
۲	Annealing	۵۶	۹۰
۳	Extension	۷۴	۳۰
۴	Final-Extension	۷۴	۳۰۰
۵	Cycle Count	۳۵	-

خالص سازی محصول PCR: خالص سازی با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (خریداری شده از شرکت Roche، آلمان) انجام گرفت.

الکتروفورز 16srDNA: جهت اطمینان از درجه خلوص محصول استخراج PCR الکتروفورز ژل آگارز انجام گرفت. بدین ترتیب که ۵ میکرولیتر از آن را روی الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ درصد (تهیه شده در بافر

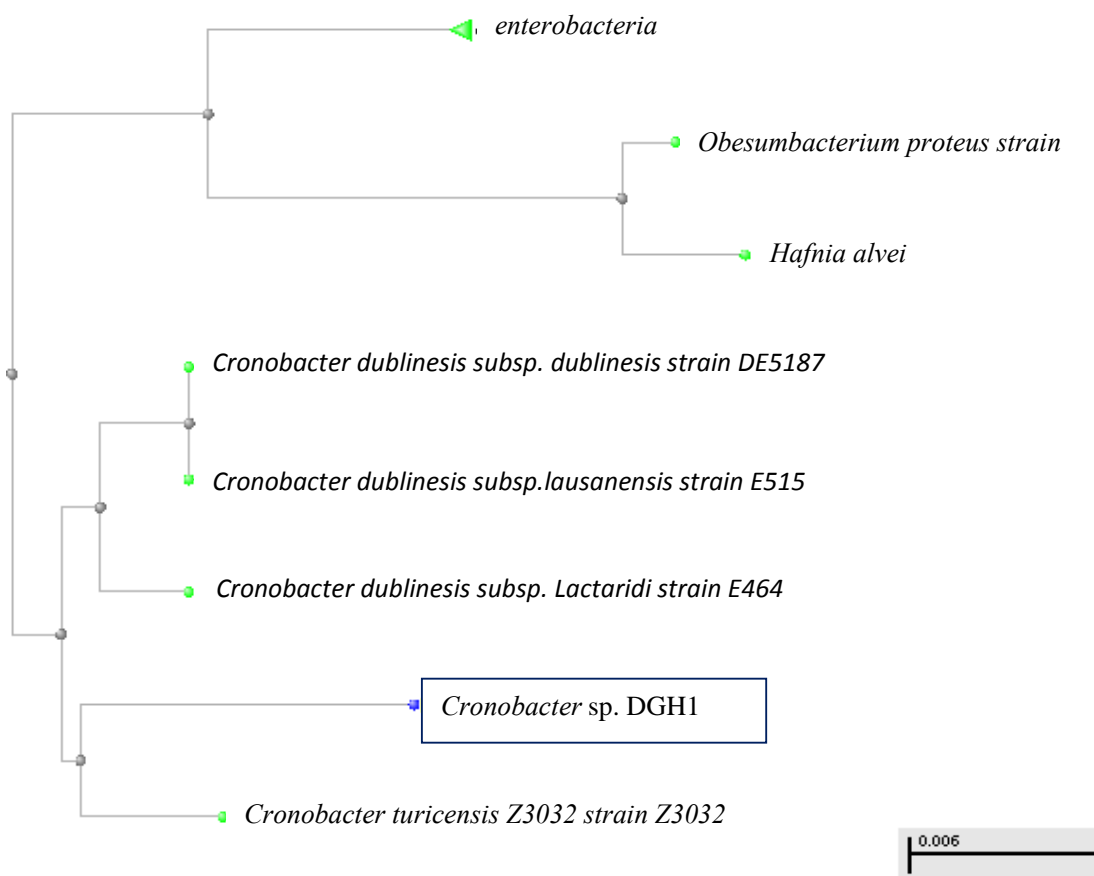
باکتری مورد نظر یک سویه جدید از کروموباکتر تشخیص داده شد. آزمون 16srDNA مربوط به این سویه و رسم درخت فیلوژنی آن نیز تأیید کننده این ادعا می‌باشد (شکل ۱). این باکتری بومی با نام *Cronobacter* sp. DGH1 اولین باکتری مهارکننده باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات می‌باشد.

جدول ۴- ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری *Cronobacter* sp. DGH1

واکنش باکتری	ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری	ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری	ماده بیوشیمیایی
+	مانیتول	-	اوره	-	اندول
-	آرابینوز	+	حرکت	-	MR ^a
+	سوریتول	+	ژلاتین	+	VP ^b
		+	گلوکز	-	H ₂ S
		-	لاکتوز	+	سیترات

a: methyl red

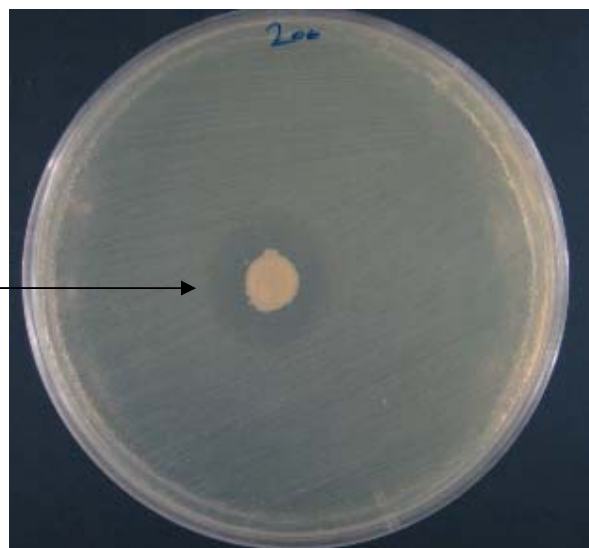
b: voges-Proskauer



شکل ۱- رسم درخت فیلوژنی. باکتری مورد نظر با کادر از سایر باکتریها قابل تشخیص می‌باشد

فعالیت آنتی میکروبیال و محدوده آن: بعد از اینکه فعالیت آنتی میکروبیال سویه *Cronobacter* DGH1 با روش DD-AWDA بررسی گردید و سویه های مختلف باکتری پاتوژنیک تحت اثر مهارى باکتری تولیدکننده قرار گرفتند؛ به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل

گردیدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، هاله ای به قطر ۱ cm مشاهده شد (شکل ۲). از سویه جهانی CFBP-3369 به عنوان سویه شاهد استفاده گردید که این سویه نیز توسط باکتری *Cronobacter* sp. DGH1 مهار شد.

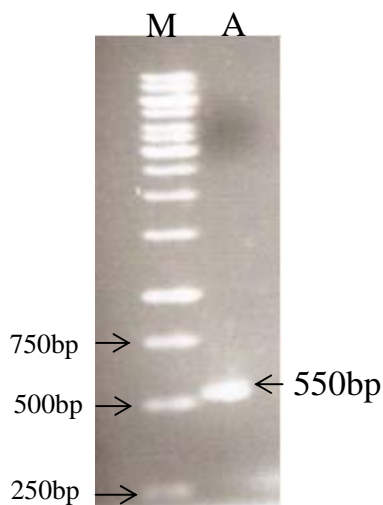


هاله عدم رشد

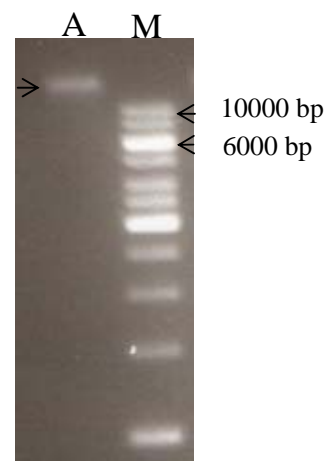
شکل ۲- تشکیل هاله عدم رشد توسط باکتریوسین ترشخی از *Cronobacter* sp. DGH1

استخراج DNA باکتری تولیدکننده: بعد از استخراج DNA از *Cronobacter* sp. DGH1 برای محصول مورد نظر الکتروفورز ژل آگارز انجام شد و اندازه DNA ژنومیک این باکتری ۱۷۰۰۰bp تخمین زده شد (شکل ۳).

الکتروفورز 16srDNA : از محصول استخراج PCR الکتروفورز ژل آگارز انجام گرفت و اندازه ژن 16srDNA باکتری مورد نظر ۵۵۰bp تخمین زده شد (شکل ۴).



شکل ۴- الکتروفورز ژل آگارز 16srDNA باکتری *Cronobacter* sp. DGH1 :A 16srDNA :M مارکر DNA



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراج شده از *Cronobacter* sp. DGH1 :A DNA باکتری :M مارکر DNA

تشکر و قدردانی: از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری که امکانات و بودجه لازم جهت انجام این

پروژه را طی طرح ماموریت محور شماره م-۴۰۶ تأمین کرده است؛ تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. اصفهانی، ک؛ مطلبی، م؛ زمانی، م. ۱۳۹۰، طراحی و ساخت سازه های بیانی گیاهی جهت انتقال ژن های Chit42 و bgn13.1 قارچ تریکودرما به صورت منفرد و توأم. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۴، شماره ۶، صفحات ۸۸۰-۸۹۴
۲. سلطانی نژاد، ح. ۱۳۸۹، پایان نامه کارشناسی ارشد، بررسی تنوع ژنتیکی سویه های ایرانی باکتری زانتوموناس سیتری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک
3. میرحسینی، م؛ نحوی، ا؛ امتیازی، گ؛ توسلی، م. ۱۳۸۹، بررسی تنوع کوکسیهای اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین در برخی نمونه های لبنی غیر پاستوریزه. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۳، شماره ۶، صفحات ۸۰۸-۸۱۵
4. Christopher, T., Vederas, L.a., 2012, "Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents". International Journal of Microbiology, 27:1152-8
5. Chuanfu, A., Zhonglin, M., 2012, "Non-Host Defense Response in a Novel Arabidopsis *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathosystem". PLoS ONE, 7: 1130-1131
6. Das, N.G., 2003, "Evaluation of botanicals as repellents against mosquitoes". J Vector Borne Dis, 40:49-53.
7. Diep, D., Nes, IF., 2002, "Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria". Curr Drug Targets, 3:107-122.
8. Esteban, V.P., Elvira, M.H., Mari'a E. N., Fernando, S., 2009, "Characterization of salivarin CRL 1328, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 isolated from the human vagina". Research in Microbiology, 160: 401-408.
9. Fionnuala, Mc., Alexey, Ru., Paul, M. Du., Ellen Mu., Steven, J. P., Patricia, A. B., 2005, "A Novel MATE Family Efflux Pump Contributes to the Reduced Susceptibility of Laboratory-Derived *Staphylococcus aureus* Mutants to Tigecycline". Antimicrobial agents and chemotherapy, 49: 1865-1871.
10. Graham, J.H., 2004, "*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker". Mol Plant Pathol, 5: 1-15.
11. Kohei, N., Naoki, A., Yoshiyuki, K., 2001, "Purification and Characterization of an Extracellular Poly(L-Lactic Acid) Depolymerase from a Soil Isolate, *Amycolatopsis* sp. Strain K104-1". Applied and Environmental Microbiology, 67: 345-353.
12. Kozaki, U.T., Okada, S., 1992, "Experimental manual of lactic acid bacteria". Asakurasyoten, 1: 34-37.
13. Marisa, Al., Viviana, B., Laura, G., Angela, F., Carlos, V., 2010, "In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods". International Journal of Antimicrobial Agents, 35:68-71.
14. Mohammad Azam, An.H., Aijaz, A. K., Asfia, S., Ameer, Az., 2011, "Synthesis and characterization of the antibacterial potential of ZnO nanoparticles against extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from a tertiary care hospital of North India". Appl Microbiol Biotechnol, 12:507-11
15. Sambrook J., R.D., Molecular Cloning New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
16. Sood, R., Domanov, Y., Pietiainen, M., Kontinen, V.P., Kinnunen, P.K.J., 2008, "Binding of LL-37 to model biomembranes: insight into target vs host cell recognition". Biochim. Biophys. Acta, 1778: 983-996.
17. Yurong Gao, S., Qiang Gao, Z. T., 2010, "A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage". Food Control, 21: 76-81.

Isolation and identification of the first indigenous bacterial strain against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causal agent of citrus canker disease

Gholami D.^{1,2}, Aminzadeh S.¹, Alavi S.M.¹, Goodarzi T.¹, Kazemipour N.² and Valizadeh J.²

¹National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, IRAN

²Biology Dept., Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, IRAN

Abstract

Citrus canker bacterial disease is one of the most devastating citrus diseases and including a quarantine disease that severe damage to citrus, which made Iran. Is that why this is necessary to study about inhibition of this disaster. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (xcici) is agent of this disease. In recent years, many efforts have been focused on finding antibiotics that bacteria can not be resistant against it. Antimicrobial peptides produced by different organisms, are good candidates for this approach. We were collected soil, water and plant organs samples from variation regions of sistan and balluchestan (up to ten regions) then we moved them to the laboratory under suitable conditions. Lashar DGH2 a new bacteriocin, which is native and is a good candidate for controlling this disease. This bacteriocin is the first world *Xanthomonas* inhibitory bacteriocin were used against different bacterial strains *Xanthomonas* and able to inhibit strains of this bacterium in Iran and another countries. It is hoped that, with future research on this bacteriocin and optimization of its inhibitory effect be able an important step in controlling this disease.

Key words: Citrus canker, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (xcici), Lashar DGH2, Bacteriocin