جداسازی و شناسایی اولین باکتری بومی کنترل کننده عامل بیماری شانکر مرکبات، *Xanthomonas citri* subsp.citri

داریوش غلامی[۱و۲] ، سعید امین زاده [۱*]، سیدمهدی علوی[۱] ، طناز گودرزی[۱] ، نسرین کاظمی پور[۲] و جعفر ولیزاده[۲]

[۱]تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۲]زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۹

چکیده

بیماری باکتریایی شانکر مرکبات یکی از مخرب ترین بیماریهای مرکبات می باشد و ازجمله بیماریهای قرنطینه ای است که خسارت شدیدی بر تولید مرکبات در ایران وارد ساخته است. باکتری عامل این بیماری *Xanthomonas citri subsp.citri(xcici)* می باشد. علی رغم وجود این بیماری در کشور ایران، تاکنون مطالعه دقیقی در جهت کنترل بیولوژیک آن انجام نگرفته است. پپتیدهای آنتی میکروبیال تولید شده توسط موجودات مختلف، برای این کار کاندیدهای مناسبی هستند، Lashar DGH2 نوعی باکتریوسین بومی و جدید می باشد که برای مهار این بیماری کاندیدای مناسبی می باشد. این باکتریوسین اولین باکتریوسین مهار کننده باکتری زانتوموناس در دنیاست که قادر به مهار سویه های ایرانی و جهانی این باکتری می باشد. امید است که با تحقیقات آتی بر روی این باکتریوسین و بهینه سازی قدرت مهارکنندگی آن بتوان گام مهمی در جهت کنترل این بیماری برداشت.

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

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

مقدمه

سالانه بخش عمده ای از محصولات کشاورزی بر اثر آفات و بیماریهای گیاهی از بین می روند(۱). بیماری باکتریایی شانکر مرکبات بسیاری از گونه های مهم مرکبات از قبیل گریپ فروت، برخی پرتقالهای شیرین، لیموترش و لیموشیرین را آلوده می کند (۵). باکتری عامل این بیماری *Xanthomonas citri subsp.citri(xcici)* می باشد که دارای دو تیپ متفاوت A و A^* است، اگرچه سویه های تیپ A در اغلب مناطق کشت و تولید مرکبات دیده می شود اما سویه های تیپ A^*، تنها در هند، تایلند و کشورهای حوضه خلیج فارس ازجمله ایران، شناسایی شده است. نتایج حاصله از مطالعات دیگر نشان می دهد که علاوه بر سویه های تیپ A^*، سویه هایی با دامنه میزبانی وسیع (تیپ A) و تیپهای متنوع دیگر نیز در کشور وجود دارد (۲). حفاظت گیاهان علیه این نوع پاتوژن، توسط ترکیبات مسی و آنتی بیوتیکها مقدور می باشد که هر دو مورد، جزء ترکیبات آلوده کننده محیطی به شمار می رود و در چندین مورد گزارش شده است که این ترکیبات به تولید نژادهای مقاوم باکتریهای پاتوژن گیاهی منجر شده اند. در سالهای اخیر تلاشهای زیادی برای پیدا کردن آنتی بیوتیکهایی معطوف شده که باکتری نتواند در برابر آن مقاوم شود (۸). باکتریوسین ها، پپتید ها یا پروتئینهای آنتی میکروبیال ریبوزومی هستند که در دنیای میکروبی پراکنده هستند و توسط باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی تولید می شوند، اغلب باکتریوسین ها اندازه کوچکی دارند (۲۰ تا ۷۰ اسید آمینه) و دارای خصوصیات کاتیونی می باشند که سلولهای هدف را با ناپایداری کامل پوشش غشای درونی و یا از

طریق مکانیسمهای تهاجمی دیگراز قبیل فعالیت DNase، RNase و اختلال در سنتز پروتئینهای ضروری سلولهای هدف از بین می برند که در نهایت منجر به مرگ سلولی می شوند(۷). باکتریوسین ها 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 باکتریوسین ها برای انسان سمی نیستند (۳) یا سمیت آنها بسیار کم می باشد (۴). اغلب باکتریوسین ها معمولاً علیه گونه هایی که رابطه نزدیکی با استرین تولیدکننده دارند؛ فعالیت می کنند(۱۷). باکتریوسین ها 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 آنتی بیوتیکها و کشف باکتریوسین ها گردید. همه این یافته ها به چند سال اخیر محدود می گردد و این نشان دهنده اهمیت کشف باکتریوسین ها می باشد. او اولین کشف خود را کولیسین نامید زیرا باعث کشتن *E.Coli* گردید ("کولیسین" به معنی کشنده *E.Coli* می باشد) و جالب اینجاست که این باکتریوسین از خود *E.Coli* منشاء می گیرد. امروزه مشخص شده است که باکتریوسین ها یک خانواده بزرگ و متنوع از لحاظ عملکردی را شامل می شوند و در واقع سمومی هستند که در دودمانهای باکتریایی و آرکی آ یافت می شوند (۱۶). روشهای رده بندی باکتریوسین ها بسیار متفاوت می باشد از جمله بر اساس سویه تولید کننده، مکانیسم کشندگی (مانند تشکیل منفذ و فعالیت نوکلئازی)، وزن مولکولی و شیمی مولکولی (پروتئینهای بزرگ، پلی پپتید ها و داشتن آمینواسیدهای غیرمعمول مانند لانتیونین ها)، نحوه تولید (ریبوزومی، تغییرات پس ریبوزومی و غیرریبوزومی) رده بندی می شوند(۱۰). اغلب باکتریوسین ها در چند مورد از آنتی بیوتیکهای معمول متفاوتند: باکتریوسین ها یک طیف کشندگی محدودی دارند و بنابراین تنها برای باکتری که از لحاظ تاکسونمی خیلی به استرین تولیدکننده آن باکتریوسین نزدیک باشد سمی می باشند. از دیگر تفاوتهای مهم میان باکتریوسین ها و آنتی بیوتیکها این است که اغلب باکتریوسین ها منشاء ریبوزومی دارند و ترکیبات پروتئین دار ریبوزومی می باشند. همچنین باکتریوسین ها قادرند در غلظتهای کم و در حد پیکومول مهار کنند در حالی که آنتی بیوتیکها در حد میکرومول مهار می کنند و در حقیقت این ویژگیها، اکثر باکتریوسین ها را از آنتی بیوتیکها متمایز می کنند(۶). تاکنون هیچ گزارشی از باکتریوسین مهارکننده زانتوموناس مشاهده نشده است، باکتریوسین Lashar DGH2 اولین باکتریوسین مهارکننده سویه های مختلف زانتوموناس عامل بیماری شانکر مرکبات در ایران و سایر نقاط جهان می باشد. 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 می باشد 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 می باشد.

مواد وروشها

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

محیط کشت مایع NB (Nutrient Broth) کشت داده شدند و از محیط کشت جامد NA (Nutrient Agar) استفاده گردید. از همه سویه های بیماریزا (شاخص) و همچنین سویه های تولیدکننده استوک با گلیسرول ۲۰درصد تهیه گردید و در ۷۰- درجه سانتی گراد نگه داری 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 سواپ استریل روی سطح پلیت محتوی ۱۵میلی لیتر NA تلقیح گردید سپس دیسک آغشته به ۱۰ میکرولیتر از باکتری تولیدکننده روی سطح پلیت قرار داده شد. پلیتها در دمای ۳۵درجه سانتی گراد آنکوبه و بعد از گذشت ۲۴ ساعت تشکیل هاله عدم رشد بررسی گردید. کلنی تولیدکننده هاله (سویه تولیدکننده) از دیگر کلنیها 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، سیترات، MR و سایر فاکتورها مورد ارزیابی قرار گرفت و تستهای میکروبی نیز طبق پروتکلهای استاندارد انجام شد. شناسایی بیشتر با توالی یابی 16srDNA و به دنبال آن آنالیز فیلوژنتیکی جهت شناسایی سویه تولید کننده انجام گرفت(۱۲).

تولید باکتریوسین: پیش کشت باکتری تولید کننده بعد از گذشت مدت ۲۴ ساعت آنکوباسیون، سانتریفیوژ گردید(در دور g × ۷۰۰۰ و به مدت ۱۵دقیقه) و مایع رویی از فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و مایع جمع آوری شده جهت بررسیهای آتی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

سنجش فعالیت و تعیین طیف آنتی میکروبیال: روشهای مختلفی جهت سنجش فعالیت آنتی میکروبیال باکتریوسین ها 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 ۰/۵مک فارلند آماده شد) و دیسکهای استریل بر روی محیط کشت جامد مورد نظر در پلیت قرار گرفتند و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تولیدکننده بر روی دیسک گذارده شد. پلیتها به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند و بعد از ۲۴ساعت تشکیل هاله بررسی گردید (۱۳). در روش AWDA بعد از تهیه آگار نیمه جامد(۰/۵ درصد) مقدار ۱۰۰ مایکرولیتر 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 میکرولیتر از سویه تولیدکننده به هر چاهک اضافه شد و به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد 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 نگه داری به یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید. در پایان برای

اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، جذب نمونه های خالص شده در طول موجهای ۲۶۰و 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).

جدول۱- برنامه دمایی و زمانی PCR

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

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	۷۰ng/µl	۲
ddH_2O	-	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). جداول ۱ و ۲ برنامه به کار گرفته شده در دستگاه ترموسیکلر و مخلوط واکنشها را نشان می دهد. ترادف آغازگر forward و reverse به کار گرفته جهت این مطالعه در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳- آغازگرهای استفاده شده جهت تکثیر16srDNA

توالی آغازگر	نام آغازگر
5´- GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTG-3´	Forward
5´- CCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAG-3´	Reverse

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 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 سویه تولیدکننده باکتریوسین: بعد از اینکه اثر مهاری باکتری تولیدکننده مشاهده شد؛ تستهای بیوشیمیایی (جدول۴) سویه مورد نظر انجام گرفت و

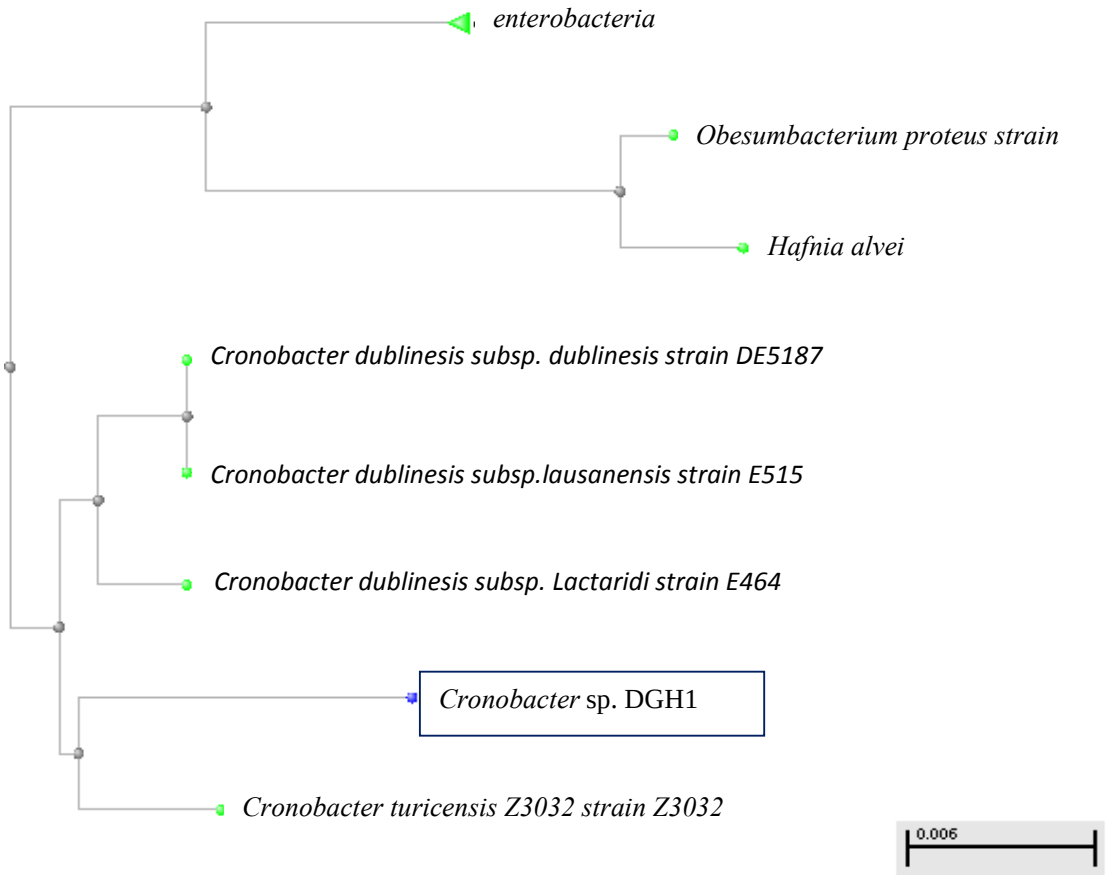
باکتری مورد نظر یک سویه جدید از کرونوباکتر تشخیص داده شد. آزمون 16srDNA مربوط به این سویه و رسم درخت فیلوژنی آن نیز تأیید کننده این ادعا می باشد (شکل۱). این باکتری بومی با نام *Cronobacter* sp. DGH1 اولین باکتری مهارکننده باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات می باشد.

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

ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری	ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری	ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری
اندول	-	اوره	-	مانیتول	+
MR[a]	-	حرکت	+	آرابینوز	-
VP[b]	+	ژلاتین	+	سوربیتول	+
H_2S	-	گلوکز	+		
سیترات	+	لاکتوز	-		

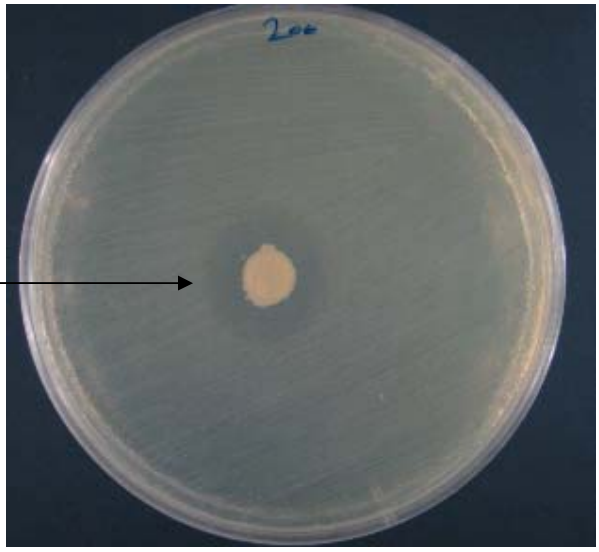
a:metyl red

b: voges-Proskauer



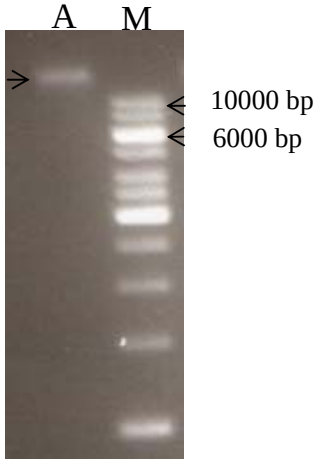
شکل ۱- رسم درخت فیلوژنی. باکتری مورد نظر با کادر از سایر باکتریها قابل تشخیص می باشد

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 مهاری باکتری تولیدکننده قرار گرفتند؛ به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، هاله ای به قطر cm ۱ مشاهده شد (شکل۲). از سویه جهانی CFBP–3369 به عنوان سویه شاهد استفاده گردید که این سویه نیز توسط باکتری *Cronobacter* sp. DGH1 مهار شد.



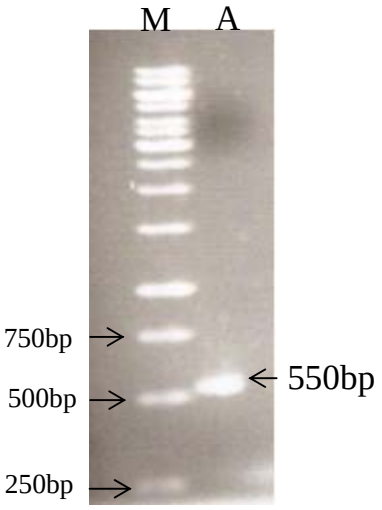
شکل ۲- تشکیل هاله عدم رشد توسط باکتریوسین ترشحی از *Cronobacter* sp. DGH1

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(شکل۳).



شکل۳- الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراج شده از *Cronobacter* sp. DGH1 A: DNA باکتری M: مارکر DNA

الکتروفورز 16srDNA : از محصول استخراج PCR الکتروفورز ژل آگارز انجام گرفت و اندازه ژن 16srDNA باکتری مورد نظر ۵۵۰bp تخمین زده شد(شکل۴).



شکل۴- الکتروفورز ژل آگارز16srDNA باکتری *Cronobacter* sp. DGH1 A: 16srDNA M: مارکر DNA

تشکر و قدردانی: از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که امکانات و بودجه لازم جهت انجام این پروژه را طی طرح ماموریت محور شماره م–۴۰۶ تأمین کرده است؛ تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱. اصفهانی، ک؛ مطلبی، م؛ زمانی، م. ۱۳۹۰، طراحی وساخت سازه های بیانی گیاهی جهت انتقال ژن های Chit42 و bgn13.1 قارچ تریکودرما به صورت منفرد و توام. مجله زیست شناسی 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

۳. 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 زیست شناسی ایران، جلد ۲۳، شماره۶، 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., Marı´a E. N., Fernando, S., 2009, "*Characterization of salivaricin 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 Laboratery 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]

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

[2] **Biology 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