فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۹۱- ۹۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

بیوکنترل عامل مولد بیماری شانکر مرکبات با استفاده از ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط قارچ *Aspergillus awamori* K-03

سارا کاظم زاده: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه شاهرود، ایران، sara.kazemzadeh@yahoo.com
ناصر فرخی*: استادیار زیست شناسی مولکولی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی، دانشگاه شاهرود، ایران، nfarrokh@nigeb.ac.ir
سعید امین‌زاده: استادیار بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، aminzade@nigeb.ac.ir
سید مهدی علوی: استادیار زیست شناسی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، mealavi@nigeb.ac.ir
ابوالفضل مسعودی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه شاهرود، ایران، redclover.iut@gmail.com
مجتبی ممرآبادی: استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی، دانشگاه شاهرود، ایران، momamar@yahoo.com
طناز گودرزی: کارشناس گروه شانکر مرکبات، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، goodarzi@nigeb.ac.ir

چکیده

مقدمه: بیماری‌های باکتریایی از جمله دلایل اصلی خسارت در گیاهان به شمار می‌آیند. در این میان، باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات *Xanthamonas citri* ssp. *citri (Xcc)* کشت لیمو در سراسر دنیا را تحت تأثیر خود قرار داده است.

مواد و روش‌ها: توانایی آنتاگونیستی ترکیبات ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *Aspergillus awamori* K-03 علیه ۲۶ سویه از باکتری *Xanthomonas citri* ssp. *citri* با استفاده از روش دیسک بر روی محیط PDA بررسی شد. همچنین، طیف بازدارندگی این ترکیبات ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر از جمله *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Erwinia amylovora* و *Pseudomonas fluorescense* و دو پاتوژن مهم انسانی *Salmonella typhi* و *Staphylococcus aureus* ارزیابی شد.

نتایج: ترکیبات ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *A. awamori* K-03 توانایی کنترل کنندگی باکتری‌های مورد مطالعه در این آزمایش را داشت و توانست ویژگی‌های ضد میکروبی خود را در برابر گرما و همچنین، طیفی از اسیدیته‌های اسیدی و قلیایی حفظ کند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج بررسی‌های ما در شرایط آزمایشگاهی ثابت کرد که می‌توان از ترکیب ضد میکروبی موجود در عصاره خام قارچ *A. awamori* K-03 به عنوان عاملی برای بیوکنترل باکتری‌های پاتوژن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: قارچ، ترکیبات ضدمیکروبی، بیماری شانکر مرکبات، باکتری *زانتوموناس*

* نویسنده مسؤول مکاتبات، دانشکده فناوری‌های نوین و مهندسی انرژی، دانشگاه شهید بهشتی، ایران

مقدمه

بیماری باکتریایی شانکر آسیایی مرکبات از جمله بیماری‌های باکتریایی است که بر روی درختان میوه ایجاد می‌شود. عامل این بیماری دارای دو تیپ متفاوت A و A^* است. اگرچه سویه‌های تیپ A در بیشتر مناطق کشت و تولید مرکبات دیده می‌شود ولی سویه‌های تیپ A^* تنها در هند، تایلند و کشورهای حوزه خلیج فارس از جمله ایران شناسایی شده‌اند و دامنه میزبانی آن‌ها تنها محدود به درخت لیموترش است. این بیماری در سال ۱۸۹۹ برای نخستین بار در ژاپن بر روی برگ‌های واشنگتن ناول مشاهده شد ولی نامی برای آن مشخص نشد (۱). برگر و همکاران[1] شانکر را به عنوان بیماری جدید معرفی کردند (۲). این بیماری نخستین بار در ایران بر روی لیموی مکزیکی از منطقه کهنوج استان کرمان به‌وسیله علیزاده و رحیمیان[2] گزارش شد (۴). رحیمیان و همکاران[3] گسترش شانکر را در استان‌های جنوبی بررسی و گزارش کردند این بیماری در بیشتر باغات استان هرمزگان، کهنوج و تعدادی از باغات جیرفت و سیستان و بلوچستان وجود دارد. همچنین، درختان لیموترش به پاتوتیپ‌های موجود حساسیت بالایی داشته ولی ارقام پرتقال، نارنگی و نارنج حساسیت کمتری دارند (۵ و ۶).

عامل بیماری شانکر مرکبات باکتری گرم منفی *Xanthomonas citri* ssp. *citri* است که بر روی محیط‌های کشت کلونی‌های زرد رنگ ایجاد می‌کند. درجه حرارت بهینه برای رشد این باکتری ۲۸ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد است. عامل بیماری در حاشیه زخم‌های ایجاد شده روی برگ، میوه و سرشاخه‌ها تا زمان ریزش آن‌ها باقی می‌ماند، در حالی که در خاک فقط چند روز می‌تواند زنده بماند (۷).

علایم این بیماری شامل: زخم‌های برآمده و نکروتیک مشخص بر روی برگ‌ها، ساقه و میوه است. شدت بیماری باعث ریزش برگ‌ها، بدشکلی میوه‌ها، ریزش پیش از موقع میوه‌ها، خشکیدگی سر شاخه‌ها و ضعف عمومی درخت است. البته این بیماری سیستمیک نیست و فقط باعث زخم‌های موضعی می‌شود (۳، ۸ و ۹). شانکر باکتریایی به کمک قطرات باران و یا آب جاری و یا دست‌زدن به گیاهان و یا از طریق ابزار آلوده و مواد آلوده گیاهی انتقال می‌یابد. کنترل بیماری شانکر، از طریق بهداشت، شیوه‌های از بین بردن و از طریق چندین بار اسپری کردن سموم مسی، محلول بوردو و یا آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌شود (۶ و ۷).

با توجه به اهمیت استفاده از استراتژی مبارزه زیستی به‌عنوان یکی از روش‌های کنترل عوامل بیماری‌زا، در این تحقیق توانایی آنتاگونیستی عصاره خام مجموعه‌ای از جدایه‌های قارچی برای استفاده در بیوکنترل بیماری شانکر مرکبات بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی قارچ از خاک

نمونه‌برداری از خاک باغات نواحی شمال کشور (استان‌های گلستان و مازندران) و جنوب کشور (استان‌های هرمزگان، فارس و کرمان) در تابستان ۱۳۹۰ انجام شد. از هر یک از نمونه‌های خاک، سری رقتی[4] تهیه و بر روی محیط PDA (پپتون، گلوکز و آگار) کشت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در تاریکی به مدت یک هفته انکوبه شد. جدایه‌های به‌دست آمده از هر یک از نمونه‌های خاک به ظروف پتری حاوی محیط کشت آب آگار منتقل و با گرفتن تک اسپور از آن‌ها و انتقال به محیط PDA دیگری خالص شد.

تهیه عصاره خام[۵] از هر یک از جدایه‌های قارچ

برای تهیه عصاره خام از حاشیه کشت هفت روزه هر یک از جدایه‌ها، دو قطعه از محیط کشت قارچ حاوی ژلوز محیط کشت، به ابعاد تقریبی (۱ ×۱ سانتی‌متر) حاوی $۱۰^{۶}$ × ۷۵ سلول اسپور به‌طور تقریبی، جدا و در فلاسک ارلن مایر شامل: ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط PDB (شامل: ۴ گرم پپتون، ۲۰ گرم گلوکز) ریخته شد و به مدت ۲۰ روز در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. محیط کشت حاوی میسلیوم‌های قارچی، با عبور از کاغذ صافی فیلتر شد. مایع عبوری از صافی با حجم برابری از اتیل استات مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰ منفی درجه سلسیوس قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۱۶۲۷ ×g سانتریفیوژ شد. عصاره با استفاده از تبخیر چرخشی در دستگاه SpeedVac Concentrator (Eppendorf/Hamburg/Germany) به میزان ۱۰ برابر غلیظ شدند. تمامی عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۰-۱۳).

سنجش فعالیت آنتی‌میکروبیال عصاره‌های قارچی

عصاره ۲۰ قارچ برای سنجش فعالیت آنتی‌باکتریالی در مقابل ۲۶ سویه از باکتری زانتوموناس و همچنین، سایر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر، از جمله *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus* و *Erwinia amylovora* بررسی شد.

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت داده شده در محیط مایع (YP عصاره مخمر و پپتون) شامل: $۴×۱۰^{۲۳}$ cfu. ml^{-1} تعداد باکتری، روی سطح پتری‌هایی که حاوی محیط کشت PDA بودند با استفاده از سوآپ استریل کشت شد. مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های قارچی روی سطح دیسک‌های اتوکلاو ۵ میلی‌متری که به واسطه پانچ کاغذ صافی ایجاد شده بود، قرار گرفت و دیسک‌ها روی سطح پلیت‌های آغشته به سوسپانسیون باکتری، قرار داده شد. ظرف در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. فعالیت آنتی‌باکتریالی به شکل اندازه‌گیری قطر ناحیه بازدارنده بر حسب میلی‌متر ارزیابی شد. همچنین، برای بررسی اثر ضد قارچی سکروتوم هر یک از جدایه‌های قارچی فعالیت آن‌ها بر روی دو قارچ *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* ارزیابی شد (۱۰-۱۲ و ۱۴-۱۶).

شناسایی مولکولی جدایه قارچی دارای خاصیت آنتاگونیستی

برای شناسایی مولکولی جدایه دارای خاصیت کنترل کنندگی ابتدا با استفاده از روش CTAB[۶]، DNA ژنومی استخراج شد. سپس، با استفاده از پرایمرهای عمومی، توالی *18SrRNA* (F18S-5'-CCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' و R18S-5'- GCTTGATCCTTCTGCAGGTT-3') آن تکثیر شد و پس از تعیین توالی با توالی‌های مربوط در سایت NCBI[۷] مقایسه شد. از نرم افزار CLC Sequence Viewer 6 نیز برای ترسیم درخت فیلوژنتیک مربوط به این قارچ استفاده شد.

هر واکنش PCR[۸] شامل: ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ×۱۰، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول، Taq پلی‌مراز به میزان ۰/۲ میکرولیتر و ddH2O به میزان ۱۹ میکرولیتر استفاده شد.

تکثیر در دستگاه PCR در طی ۳۰ سیکل انجام شد. برنامه PCR شامل: ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. مرحله تطویل نهایی نیز در طی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (۱۱).

تأثیر حرارت، اسیدیته و مواد شیمیایی بر فعالیت عصاره قارچی

برای بررسی اثر اسیدیته با استفاده از بافر سدیم فسفات، اسیدیته‌های ۴ تا ۹ تهیه شد و عصاره قارچی با هر یک از اسیدیته‌های ساخته شده با نسبت ۱:۱ به مدت ۳۰ دقیقه مجاور شد. برای اندازه‌گیری مقاومت به گرما عصاره در حرارت ۵۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت قرار گرفت (۱۴-۱۶). همچنین، برای بررسی اثر مواد شیمیایی، عصاره قارچی با EDTA[۹] یک درصد به مدت ۳۰ دقیقه مجاور شد و فعالیت آنتاگونیستی در تمامی موارد با استفاده از روش دیسک بررسی شد (۱۷).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده[۱۰] (MIC)

تعیین حداقل غلظت بازدارنده عصاره قارچی با استفاده از روش Broth microdilution در میکروپلیت الایزا انجام شد. برای این کار غلظت‌های ۴ تا ۲۰۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره حاوی ترکیب آنتی‌میکروبیال تهیه شد و سپس، کدورت باکتری زانتوموناس (سویه NIGEB ۸۸) به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵×۱۰^{۵} cfu. ml^{-1} تنظیم شد. در زیر هود از هر کدام از غلظت‌های ساخته شده حجم ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. از نمونه باکتری نیز به میزان ۱ میکرولیتر به دامنه غلظت‌های ترکیب ضد میکروبی اضافه شد. در نهایت، میکروپلیت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت[۱۱].

نتایج

پس از بررسی اثر مهاری عصاره ۲۰ جدایه قارچی بر روی سویه مختلف باکتری زانتوموناس، عصاره قارچی جدایه شماره ۳ هاله عدم رشد شاخص‌تری نسبت به سایرین ایجاد کرد. پس از تکثیر ناحیه‌ی *18S rRNA* محصول PCR با کیت Roche(Penzberg/Germany) خالص و برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. نتیجه توالی‌یابی حاصل پس از انجام BLAST در سایت NCBI و رسم درخت فیلوژنتیک نشان داد که توالی حاصل به یکی از سویه‌های قارچ *Aspergillus awamori* مربوط است این قارچ با نام *Aspergillus awamori* K-03 و با شماره پذیرش KF922319 در سایت NCBI ثبت شد (شکل ۱).

در این بررسی عصاره قارچ *A. awamori* K-03 علیه ۲۶ سویه از باکتری مولد بیماری شانکر مرکبات خاصیت آنتاگونیستی نشان داد (جدول ۲). نتایج بررسی‌های ما در شرایط آزمایشگاهی ثابت کرد که می‌توان از ترکیب ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *A.awamori* K-03 به عنوان عاملی برای بیوکنترل سایر باکتری‌های پاتوژن نیز استفاده کرد. ماده ضدمیکروبی تولیدی توسط قارچ *A. awamori* K-03 علاوه بر سویه‌های مختلف باکتری زانتوموناس فعالیت بازدارندگی برعلیه سایر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر از جمله *E. coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescence* و *Erwinia amylovora* و دو پاتوژن مهم انسانی *Salmonella typhi* و *Staphylococcus aureus* را نشان داد (شکل ۲). حداقل غلظت بازدارنده برای ترکیب ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *A. awamori* K-03، ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

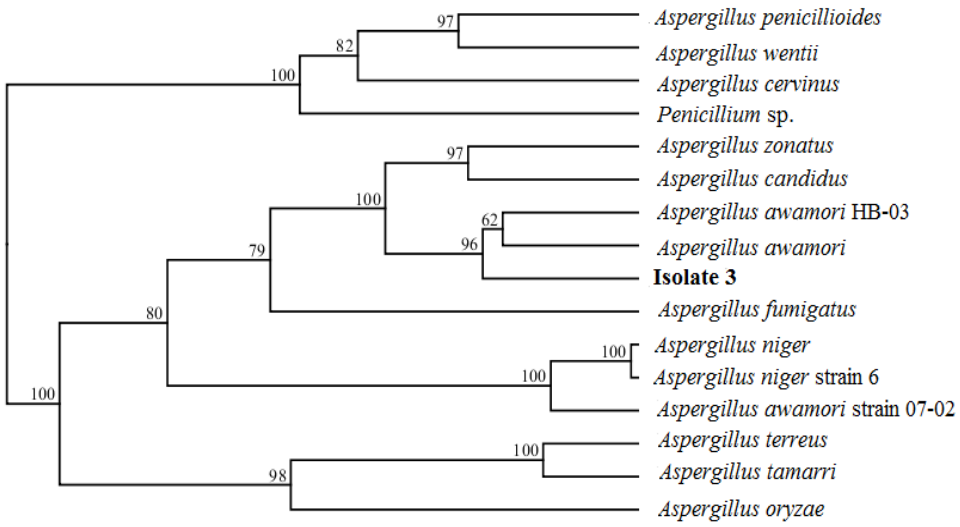
خاصیت مهم ترکیب ضدمیکروبی موجود در سکروتوم قارچ *A. awamori* K-03 پایداری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه بود. ضمن آنکه فعالیت خود را در اسیدیته‌های متفاوت و همچنین در حضور EDTA حفظ نمود.

سکروتوم قارچ *A. awamori* K-03 هیچ اثر کنترل‌کنندگی را در مقابل دو قارچ *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* نشان نداد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تاثیر عصاره قارچ *A. awamori* K-03 بر سویه‌های مختلف باکتریایی بیانگر وسیع الطیف بودن این ترکیب ضدمیکروبی است. این اثر بازدارندگی وسیع می‌تواند ناشی از سیستم‌های پیچیده آنتاگونیستی باشد که توسط این قارچ تولید می‌شود. نتایج حاصل از بررسی‌های ژنگ و همکاران[۱۲] مؤید همین مسئله است (۱۶).

گزارش‌های بسیاری پیرامون مقاومت ترکیبات آنتی‌میکروبیال در دماهای بالا وجود دارد که در این مطالعه این میزان به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. ژنگ و همکاران (۱۶) نشان دادند حساسیت ترکیبات آنتی‌میکروبیال نسبت به اسیدیته بسیار متفاوت است و تعداد زیادی از آن‌ها در محدوده وسیعی از اسیدیته‌ها فعال هستند. ماده استخراجی در این مطالعه، نیز همین ویژگی را نشان داده و در تمامی اسیدیته‌های تهیه شده فعالیت خود را به خوبی حفظ کردند. مشابه نتایج مژگانی و همکاران[۱۳] ترکیب عصاره دارای خاصیت ضد میکروبی با EDTA پس از ۳۰ دقیقه مجاورت تغییری را در عملکرد آن‌ها ایجاد نکرد. این عدم بازدارندگی گویای این است که کاتیون‌های فلزی نقشی در فعالیت این ماده ضد میکروبی ندارند (۱۷) (جدول ۱).

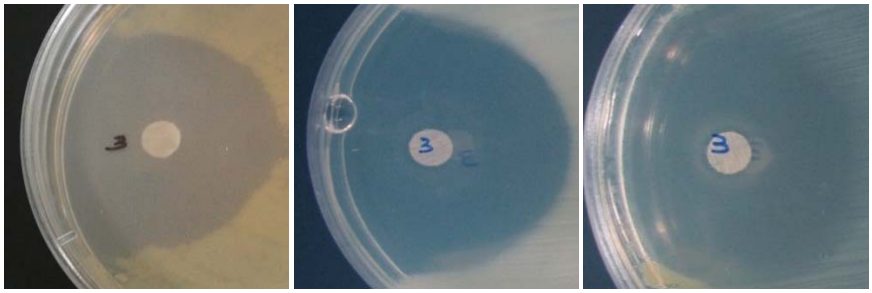


شکل ۱- بررسی توالی S rRNA۱۸ ایزوله شماره ۳ نشان داد این ایزوله یکی از سویه‌های قارچ *Aspergillus awamori* است. قرار گرفتن این سویه قارچی در یک شاخه جداگانه از درخت بیانگر این مهم است که قارچ یاد شده سویه‌ای جدید در جنس مربوط به خود است. این قارچ با نام *Aspergllus awamori* K-03 و با شماره پذیرش KF922319 در سایت NCBI ثبت شد.

جدول ۱- تأثیر عوامل بازدارنده فیزیکی و شیمیایی بر عامل بازدارنده تولید شده توسط قارچ *A. awamori* K-03

عامل	تیمار	اثر آنتاگونیستی
شلات کننده	EDTA1 درصد	+
حرارت (درجه سانتی گراد)	۵۰	+
	۷۰	+
	۹۰	+
	۱۰۰	+
اسیدیته	۴	+
	۵	+
	۶	+
	۷	+
	۸	+
	۹	+
+ همچنان اثر آنتاگونیستی خود را حفظ کرده است.		

C⁻ NIGEB-48 NIGEB-260R2



NIGEB-218 NIGEB-381 NIGEB-252R1

شکل۲- بررسی اثر آنتاگونیستی سکروتوم قارچ *A. awamori* K-03 بر روی برخی از سویه‌های بیماری‌زای *زانتوموناس*

جدول ۲- میزان ناحیه بازدارنده سکروتوم قارچ *A. awamori* K-03 بر سویه‌های مختلف زانتوموناس و باکتری‌های دیگر

ردیف	نام سویه	قطر ناحیه بازدارنده بر حسب میلی‌متر
۱	NIGEB-213R1	۲۵
۲	NIGEB-243R2	۱۵
۳	NIGEB-31	۱۶
۴	NIGEB-287R1	۲۲
۵	NIGEB-A2L3R1L	۱۳
۶	NIGEB-213R2	۳۵
۷	NIGEB-281R23	۱۶
۸	NIGEB-216R2	۲۵
۹	NIGEB-228R1	۲۰
۱۰	NIGEB-244R1	۱۷
۱۱	NIGEB-266R2	۱۰
۱۲	NIGEB-243R1	۱۱
۱۳	NIGEB-384	۱۰
۱۴	NIGEB-170	۱۵
۱۵	NIGEB-232	۲۰
۱۶	NIGEB-385	۲۰
۱۷	NIGEB-48	۳۵
۱۸	NIGEB-218	۳۵
۱۹	NIGEB-9322	۲۵
۲۰	NIGEB-A252R1	۴۰
۲۱	NIGEB-388	۲۲
۲۲	NIGEB-380	۳۵
۲۳	NIGEB-260R2	۳۰
۲۴	NIGEB-381	۳۵
۲۵	NIGEB-242R1	۲۵
۲۶	NIGEB-269	۲۵
۲۷	*Bacillus subtilis*	۲۰
۲۸	*Erwinia amylovora*	۱۵
۲۹	*Pseudomonas fluorescens*	۲۵
۳۰	*Escherichia coli*	۲۵
۳۱	*Staphylococcus aureus*	۲۰
۳۲	*Salmonella typhi*	۲۵

در پایان، می‌توان با قاطعیت ابراز کرد که در این پروژه عامل بیماری شانکر مرکبات توانست به وسیله ترکیبات ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *A. awamori* K-03 در شرایط *in vitro* کنترل شود. بنابراین، با توجه به اهمیت استفاده از استراتژی مبارزه زیستی به‌عنوان یکی از روش‌های کنترل عوامل بیماری‌زا، سرمایه‌گذاری بر روی این ترکیبات ضدمیکروبی برای مهار بیماری شانکر مرکبات و سایر بیماری‌های باکتریایی و قارچی دیگر ارزشمند خواهد بود.

تشکر و قدردانی

هزینه اجرای این پژوهش از طریق طرح اولویت محور شانکر مرکبات با شماره (م ۴۰۶)، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تأمین شده است که بدین وسیله از تمامی اعضای محترم گروه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Civerolo E L. Citrus bacterial canker disease: An overview. *International Society Citriculture* 1981;1: 390-4.

(2) Berger E W, Stevens H E, Stirling F. Citrus canker. *Florida Agricultural Experiment Station* 1914; 124 (4): 27-53.

(3) Koizumi M. Resistance of citrus plants to bacterial canker disease: A review. *Proceedings of theInternational Society of Citriculture* 1981; 1: 402-5.

(4) Alizadeh A, Rahimian H. Citrus canker in kerman province. *Iranian Journal of PlantPathology* 1990; 26 (1-4): 1-4.

(5) Rahimian H, Khodakaramian G, Babaee-zad V, Zarei A. Widespread distribution of citrus canker in southern Iran. In *13th Iran. Plant Protection Congress*: Karaj, Iran, 1998. pp 246.

(6) Montakhabi M K, Rahimian H, Rastgar M, Jafar pour B. Possible of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biocontrol, causative agent of canker disease using bacteria. *Journal of Plant Protection* 2011; 24 (4), 368-76.

(7) Agrios G. *Plant pathology*. 5th ed. Gainesville, Florida: University of Florida, Academic Press; 2005.

(8) Schoulties C L, Civerolo E L, Miller J W, Stall R E, Krass C J, Poe S R, et al. Citrus canker in Florida. *Plant Disease.* 1987; 71 (5): 355-88.

(9) Stall R E, Seymour C. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. *Plant Disease.* 1983; 67 (5), 581-5.

(10) Mayr-Hartings A, Hedges A J, Berkeley R C W. Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiology* 1972; 7 (8): 315-422.

(11) Radji M, Sumiati A, Rachmayani R, Elya B. Isolation of fungal endophyte from *Garcinia mangoostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology.* 2011; 10 (1): 103- 7.

(12) Silva M G, Dose A. The best penicillin for resistant bacteria. *Journal of Antibiotics.* 2004; 48 (5): 562-9.

(13) Tong W Y, Darah I, Latiffeh Z. Antimicrobial activities of endophytic fungul isolation from medicinal herb Orthosiphon stamineus benth. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5 (5): 831-6.

(14) Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, Balti R, Kamoun A S, Naseri M. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 2010; 37 (5): 805-13.

(15) Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman H G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature Biotechnology.* 1981; 292 (5820): 246–8.

(16) Zheng S, Liu Q, Zhang G, Wang H, Ng T B. Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom *Clitocube sinopica*. *ABPs* 2010; 1 (57): 43-8.

(17) Mojgani N, Ismail khanian S, Ameli M, Usefi A. Detection and characterization of a bacteriocin RN78 prouced by *Lactobacillus acidophilus* strain isolated from a cheese sample. *Pajouhesh & Sazandegi* 1385; 72 (3): 36-42.

---

[1]- Berger et al
[2]- Alizadeh and Rahimian
[3]- Rahimian et al.
[4]- Serial dilution
[5]- Crude extract
[6]- Crude extract
[7]- http://www.ncbi.nlm.nih.gov
[8]- Polymerase Chain Reaction
[9]- EthyleneDiamineTetraacetic Acid
[10]- Minimum Inhibitory Concentration
[11]- http://www.nccls.org
[12]- Zheng et al.
[13]- Mojgani et al.

Biocontrol of Causative Agent of Citrus Canker Disease Using Antimicrobial Substances Produced by *Aspergillus awamori* K-03

Sara Kazemzadeh
M.Sc of Biotechnology, Shahrood University, Iran, sara.kazemzadeh@yahoo.com
Naser Farrokhi *
Assistant Professor of Molecular Biology, Shahrood University, Iran, nfarrokh@nigeb.ac.ir
Saeed Aminzadeh
Assistant Professor of Biochemistry, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, aminzade@nigeb.ac.ir
Seyed Mehdi Alavi
Assistant Professor of Molecular Biology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, mealavi@nigeb.ac.ir
Abolfazl Masoudi
M.Sc of Biotechnology, Shahrood University, Iran, redclover.iut@gmail.com
Mojtaba Mamarabadi
Assistant Professor of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shahrood University, Shahrood, Iran, momamar@yahoo.com
Tannaz Gudarzi
Technical Research Assistant of Citrus Canker Group, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, goodarzi@nigeb.ac.ir

Abstract

Introduction: Bacterial phytopathogens have a great impact on yield loss. In between, the causative agent of citrus canker *Xanthomonas citri* subsp. *citri (Xcc)*, has influenced citri culture worldwide.

Materials and methods: Antimicrobial efficacy of *Aspergillus awamori* K-03 secrotome was tested against 26 strains of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* using disc diffusion method.

Results: The secretome managed to control other Gram positive and negative bacterial pathogens including *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* and *Erwinia amylovor*. The secretome was heat stable and remained active in wide ranges of pH (4-9).

Discussion and conclusion: Our result demonstrates that the *A. awamori* K-03 secretome has antimicrobial activity and can be used as a biocontrol agent.

Key words: Fungi, Antimicrobial substances, Canker disease, *Xanthomonas citri* ssp. *citri*

* Corresponding author, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Iran
Received: June 8, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013