وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات

معاونت قرنطینه و بهداشت گیاهی

بیماری شانکر آسیایی مرکبات

Xanthomonas citri subsp. *citri*

Asiatic Citrus Canker

دفتر قرنطینه

معاونت قرنطینه داخلی

مقدمه:

مرکبات از سلسله Viridiplantae ، شاخه Spermatophyta (گلداران)، زیر شاخه Angiospermae (نهاندانگان)، رده Dicotyledonae (دولپه ای ها)، راسته ناترک سانان (Sapindales) و خانواده Rutaceae (سدابیان یا مرکبات)، یکی از مهم ترین خانواده میوه های نیمه گرمسیری بوده و از نظر مصرف دارویی و تغذیه ای و سایر مصارف، دارای اهمیت زیادی می باشند. خاستگاه اصلی مرکبات، کشورهای آسیای جنوب شرقی، هند، شبه جزیره هند، چین و ژاپن می باشد.

سطح کل باغات مرکبات دنیا ۷،۶۰۰،۰۰۰ هکتار و میزان محصول ۱۰۳،۸۰۰،۰۰۰ تن می باشد . ایران با ۳/۸ درصد سطح زیر کشت دنیا مقام هشتم و از نظر تولید، مقام هفتم را در بین کشورهای تولیدکننده مرکبات داراست. سطح زیر کشت مرکبات اعم از بارور و غیر بارور (آبی و دیم) در کشور در سال ۱۳۸۷برابر با ۲۹۰۵۷۵/۸ هکتار بوده است که در استان های ایلام (۳۹۱/۸ هکتار)، بوشهر (۳۲۰۴/۱ هکتار)، خوزستان(۵۸۰۱/۲ هکتار)، جنوب استان کرمان (۳۰۷۷۶/۳ هکتار)، سیستان و بلوچستان (۳۰۶۳/۴ هکتار)، فارس (۶۶۸۵۱/۹ هکتار)، کرمان(۱۴۵۸۱/۳ هکتار)، کرمانشاه (۳۱۸/۷ هکتار)، کهگیلویه و بویر احمد (۳۸۶۷/۸ هکتار)، گلستان (۵۲۱۲ هکتار)، گیلان (۷۸۳۱۹/۸ هکتار)، لرستان(۴۲۳/۵ هکتار)، مازندران (۱۰۳۲۱۱/۲ هکتار)، هرمزگان (۳۳۳۷۴/۶ هکتار) و یزد (۱۰۹/۹ هکتار) واقع شده است (شکل ۱).

شکل ۱: استانهای مرکبات خیز کشور

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات از مهمترین بیماریهای درختان مرکبات به شمار می آید. این بیماری در بسیاری از نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا به صورت اپیدمیک (پی در پی) در باغات مرکبات بروز می کند. علاوه براین تحت شرایط خشکی زیاد در منطقه خاور میانه نیز مشاهده شده است. تا این اواخر ۵ فرم بیماری شانکر باکتریایی در دنیا شناخته شده بود که به نامهای شانکر (Asiatic canker) A، (Concrosis B) B، (Mexican lime concrosis) C، (Citrus bacteriosis) D و (Citrus bacterial spot) E معروف بودند. اما در حال حاضر با استفاده از روشهای نوین شناسایی، تنها بیماری معتبر و مهم شانکر باکتریایی مرکبات، شانکر آسیایی مرکبات (Asiatic citrus canker) یا شانکر باکتریایی A می باشد. این فرم بیماری به لحاظ اینکه دارای دامنه وسیع میزبانی بوده و بطور کلی همه کولتیوارهای خانواده مرکبات و گیاهان مرتبط، نسبت به آن حساس هستند و نیز به جهت داشتن بیشترین رکورد میزان طغیان و اپیدمی در مناطق مرکبات خیز دنیا، از خطرناک ترین بیماری های درختان مرکبات تلقی می گردد.

تاریخچه نامگذاری عامل بیماری

باکتری عامل بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۱۵ توسط Hasse در آمریکا شناسایی و چون بیماری منشاء آسیایی داشت، به نام بیماری شانکر آسیایی یا شانکر A معرفی گردید. در طی سالیان متمادی، فرم های جدید بیماری از روی درختان مرکبات مشاهده و گزارش گردید که به تناسب نوع میزبان و انتشار جغرافیایی به نام فرم های B، C، D و E شناخته شدند. فرم B در سال ۱۹۲۷ روی درختان لیمو در آرژانتین ، فرم C در سال ۱۹۷۱ روی درختان لیمو مکزیکی در برزیل، فرم D در سال ۱۹۸۱ روی درختان لیمو مکزیکی در مکزیک و فرم E در سال ۱۹۸۴ روی درختان سیترومولو در نهالستان های فلوریدا مشاهده گردید.

Gabriel و همکاران در سال ۱۹۸۹، با بررسی سویه های مختلف این ۵ فرم، پاتوژن های *Xanthomonas campestris* pv. *citri* ،*X .c.* pv. *aurantifolia* و *X. c.* pv. *citrumelo* را به ترتیب به عنوان عامل بیماری شانکر A، شانکرهای D/C/B و شانکر E معرفی کردند. Vauterin و همکاران در سال ۱۹۹۵، گونه جدید *axonopodis* را به جای گونه *campestris* معرفی نمودند. در سال ۱۹۹۶، Young و همکاران، در فهرست باکتریهای معتبر بیماری زای گیاهی تنها نام معتبر *Xanthomonas axonopodis* pv. *ctri* (Hasse,1915) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings,1995 را به عنوان عامل بیماری شانکر مرکبات، معرفی نمودند. در سال ۲۰۰۰، Schaad و همکاران، پیشنهاد کردند تا زمانیکه اطلاعات فنوتیپیکی و هیبریداسیون DNA-DNA بدست آید، مطابق با نظر Egel و همکاران (۱۹۹۱)، زانتوموناس های مرکبات تحت نام *X. c.* pv. *citri* باقی بمانند. در سال ۲۰۰۵، Schaad و همکاران، پیشنهاد کردند که سویه های A، D/C/B و E به ترتیب بصورت *Xanthomonas smithii* subsp. *citri* (ex Hasse,1915)، *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel et al.,1989) و *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) نامگذاری شوند و در نهایت در سال ۲۰۰۶، Schaad و همکاران، بر طبق قوانین و اصول رده بندی باکتری ها، سویه های A، D/C/B و E را به ترتیب، به صورت *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ،*X. fascans* subsp. *aurantifolii* و *X. alfalfa* subsp. *citrumelonis* نامگذاری نمودند.

میزان اهمیت فرم های A-E

فرم های A-E برپایه اختصاصیت میزبان و تهاجمیت پاتوژن، قابل تشخیص هستند. فرم های B، C، D و E دارای دامنه میزبانی محدود و بیماری زایی ضعیف هستند.

تفاوت فرم D با فرم های A، B و C عدم بروز علائم بیماری روی میوه بود. از آنجاییکه بروز علائم در بیماری شانکر ناشی از فرم E، با سایر شانکرها متفاوت بود، این بیماری به نام لکه باکتریایی مرکبات (Citrus bacterial

(spot شناخته شد. زیرا علائم در فرم های A-D به صورت لکه های برجسته و غالباً چوب پنبه ای می باشد، ولی علائم در بیماری شانکر ناشی از فرم E به صورت لکه های صاف همراه با آبسوختگی و با هاله های کلروتیک ظهور می کند. البته روی شاخه ها علائم بصورت برجسته و فاقد هاله های کلروتیک می باشد.

فرم های C و D به خودی خود در طبیعت ناپدید می شوند و در حال حاضر تعداد کمی از سویه های آنها باقی مانده است و لذا اعتقاد بر این است که این سویه ها از نوع بیماری زای ضعیف هستند. از طرفی فرم B نیز از فرم ملایم شانکر آسیایی مرکبات قلمداد شده است (شکل ۲). از این رو تنها فرم A و E باقی می ماند. با توجه به اینکه علائم بیماری شانکر ناشی از فرم E هیچ شباهتی به علائم بیماری شانکر ناشی از فرم های A-D ندارد، قدرت بالقوه باکتری عامل بیماری برای افزایش جمعیت خود کم است و تنها در نهالستانها و روی برخی از درختان جوان مرکبات، لکه برگی ایجاد می کند، لذا تهدیدی برای تولیدات مرکبات تلقی نمی شود و اهمیت خود را به مرور زمان از دست داد.

بنابراین در حال حاضر تنها شانکر آسیایی مرکبات (شانکر A) حائز اهمیت می باشد (شکل ۳). زیرا دارای دامنه میزبانی وسیعی است و به همه گونه ها و هیبریدهای مرکبات و پونسیروس حمله می کند، بیشترین سطح انتشار را در باغات مرکبات جهان داراست، سویه های کاملاً مهاجم و بیماریزا دارد و شدت بیماری زایی سویه های آن به اندازه ای است که در شرایط حاد بیماری، موجب برگ ریزی، ریزش میوه، مرگ شاخه و در نهایت کاهش کیفی و کمی محصول می شود.

شکل ۲: میوه های لیموترش آلوده به شانکر فرم B در آرژانتین

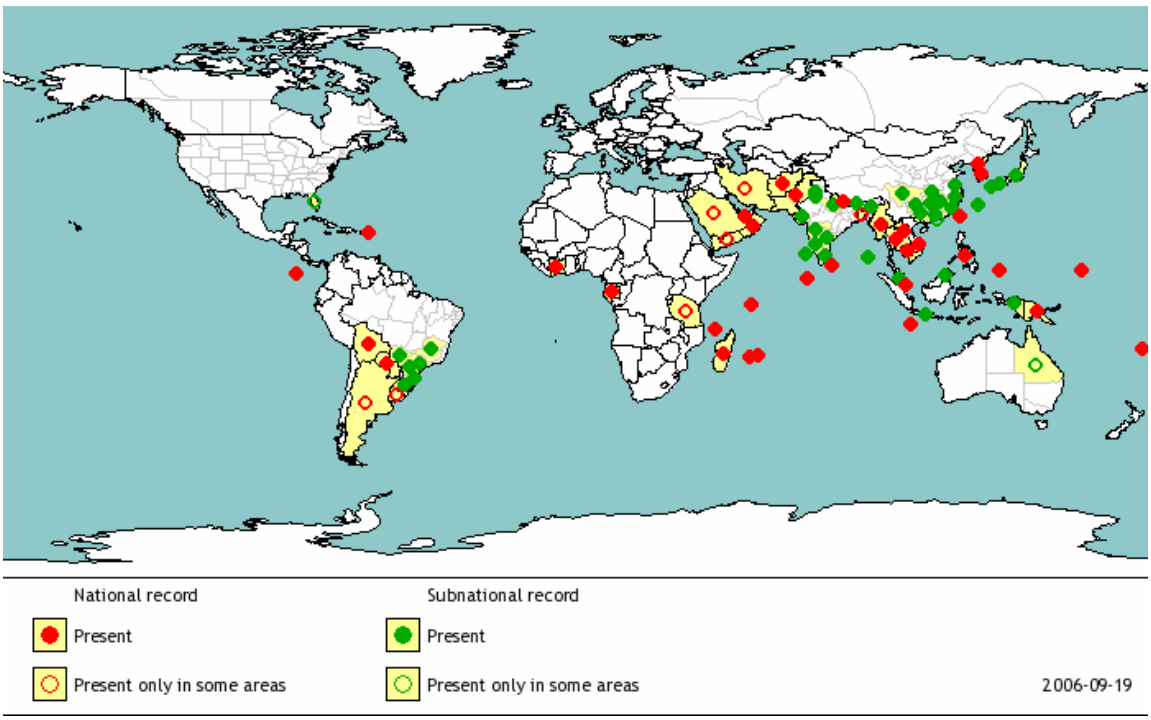
شکل ۳: جوش های ایجاد شده روی برگ گریپ فروت در اثر شانکر فرم A، همراه با هاله های زرد رنگ اطراف جوشها

تاریخچه عامل بیماری در دنیا

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات از قدیم الایام در کشورهای جنوب آسیای شرقی شایع بوده است (وجود علائم شانکر بر روی میوه های جمع آوری شده از هند در سال ۱۸۲۳ که در هرباریوم موزه های انگلستان و آمریکا وجود دارد، موید این مطلب است). اما شناخت اولیه بیماری مربوط به سال ۱۹۱۰ می باشد که پایه های نارنج سه برگ (Trifoliate orange) از کشور ژاپن وارد کشور آمریکا شد و در فاصله سال های ۱۳-۱۹۱۲ بیماری در نهالستانهای مرکبات آن کشور مشاهده شد.

در حال حاضر بیماری در کشورهای زیر وجود دارد (شکل ۴):

- آسیا: افغانستان، امارات متحده عربی، اندونزی، ایران، بنگلادش، پاکستان، تایلند، تایوان، چین، ژاپن، سریلانکا، سنگاپور، عراق، عربستان سعودی، عمان، فیلیپین، کامبوج، کره، لائوس، مالدیو، مالزی، میانمار، نپال، ویتنام، هند، هنگ کنگ و یمن
- آفریقا: زئیر، ساحل عاج، سیشیل، جزیره ریونیون، کومور، گابن، ماداگاسکار، موریتیوس
- آمریکای شمالی: مکزیک، ایالات متحده آمریکا، فلوریدا
- آمریکای جنوبی: آرژانتین، برزیل، پاراگوئه و اروگوئه
- اقیانوسیه: استرالیا، پاپوا گینه نو، پالائو، جزایر کوکوس، جزایر ماریانای شمالی، جزیره کریسمس، فیجی، گوام، میکرونزی، نیوزیلند



شکل ۴: نقشه پراکنش بیماری شانکر باکتریایی مرکبات در دنیا

تاریخچه عامل بیماری در ایران

این بیماری ابتدا در سال ۱۳۶۸ در شهرستان کهنوج، واقع در جنوب استان کرمان و پس از آن به ترتیب سال، در مناطق نامبرده ذیل مشاهده و گزارش شده است (شکل ۵).

سال ۱۳۷۴: شهرستانهای رودان و میناب (استان هرمزگان)

سال ۱۳۷۵: شهرستانهای جیرفت، عنبرآباد و منوجان (جنوب استان کرمان)، شهرستان بندرعباس (استان هرمزگان)

سال ۱۳۷۶: شهرستان های حاجی آباد و جاسک (استان هرمزگان)، شهرستانهای ایرانشهر، نیک شهر، راسک و چابهار (استان سیستان و بلوچستان)

سال ۱۳۸۴: شهرستان قیروکارزین (استان فارس)

سال ۱۳۸۶: شهرستان ارزوئیه (استان کرمان)، شهرستان جهرم (استان فارس)

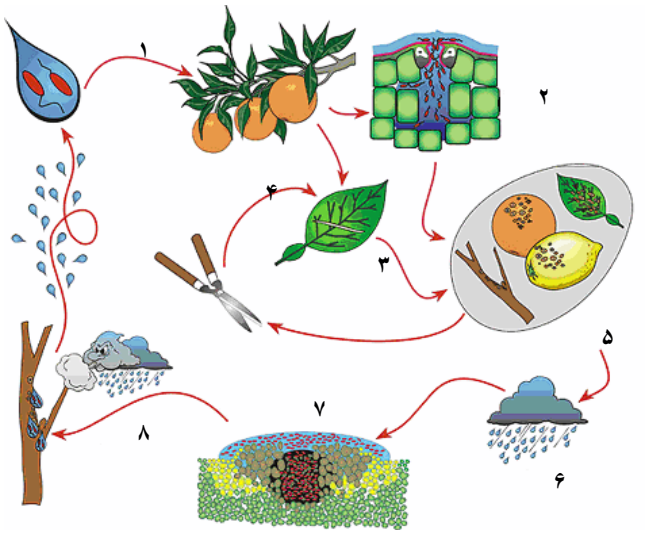
سال ۱۳۸۷: شهرستانهای لارستان و داراب (استان فارس)

سال ۱۳۸۹: شهرستان دره شهر(استان ایلام)

شکل ۵: نقشه پراکنش بیماری شانکر در ایران

چرخه بیماری

باکتری عامل بیماری در زخم های روی برگ، میوه و ساقه تکثیر می شود. وجود رطوبت کافی روی زخم ها منجر به ترشح باکتری به خارج و انتشار آن به سایر قسمتهای گیاه و همچنین گیاهان دیگرمی شود (شکل ۶).



شکل ۶: چرخه بیماری باکتری عامل بیماری شانکر

۱: قطرات باران حاوی اینوکلوم بیماری به همراه باد باعث انتقال باکتری عامل بیماری به گیاهان سالم می شوند.

۲: آب باران حاوی اینوکلوم بیماری، از طریق روزنه ها وارد بافت گیاه سالم شده و یک ستون آب بین سطح برگ و بافت مزوفیل، تشکیل می شود. باکتری های موجود در آب از طریق این ستون آب، آلودگی ایجاد می کنند.

۳: زخم ها و خراشیدگی های روی سطح گیاه باعث باز شدن بافت مزوفیل و نفوذ مستقیم اینوکلوم بیماری به داخل بافت گیاه می شوند.

۴: انجام هرس یا سایر عملیات باغبانی، باعث زخم شدن بافت گیاه و در نتیجه ایجاد آلودگی شده و/ یا باکتری های عامل بیماری از طریق ابزار باغبانی، بطور مکانیکی منتقل می شوند.

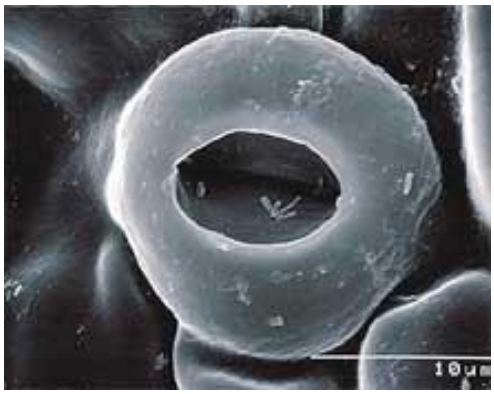
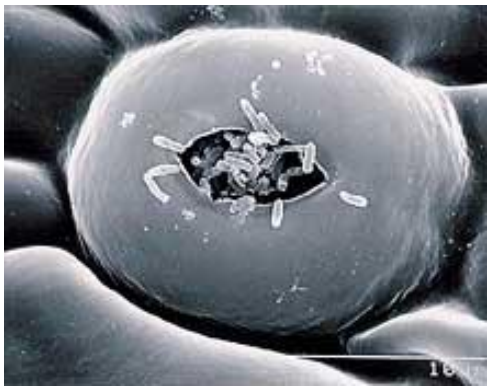
۵: باکتری های عامل بیماری باعث آلودگی برگ، میوه و شاخه های جوان می شوند.

۶: ریزش باران، انجام عملیات آبیاری یا تشکیل شبنم، باعث می شود که ترشحات باکتریایی به خارج از زخم ها و روی سطح گیاه تراوش نماید.

۷: زخم ها آتشفشانی شکل شده و سلولهای هیپر پلازی تشکیل می دهند که سلول های مرده با مرکز فرو رفته را احاطه می کنند. غالباً زخم ها با یک حلقه یا هاله کلروتیک، احاطه می شوند.

۸: باران توام با باد باعث ترشح و انتقال آب حاوی اینوکلوم از تراوشات روی سطح گیاه آلوده می شود.

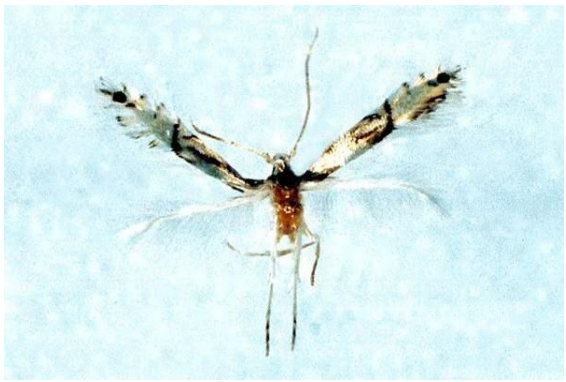
همانطور که مشخص شد، باران توام با باد، مهمترین عامل طبیعی انتشار باکتری عامل بیماری می باشد. اساساً غلظت باکتری ها بسته به سن زخم ها، بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میلیون سلول در هر قطره آب می باشد. باد و بارانهای شدید مانند طوفان و بادهای شنی، در مناطقی که منابع فعال اینوکلوم در دسترس است، شیوع بیماری را افزایش می دهد، زیرا افزایش سرعت باد در فصل بارندگی به برگها و شاخه های درختان مرکبات، صدمه رسانده و آنها را زخمی می کند و باعث ایجاد آبسوختگی بافتهای گیاهی می شود. باد و بارانهای شدید می تواند باکتری ها را تا ۱۰۰ متر یا حتی بیشتر، در قطرات باران یا ذرات آئروسل پخش نماید. وزش باد با سرعت ۸ متر در ثانیه در شرایط بارانی باعث انتشار تراوشات باکتریایی در سطح درختان و نفوذ باکتری از طریق منافذ روزنه ای می شود (شکل ۷). انجام آبیاری بارانی خصوصاً در نهالستانهای تولید درختان جوان عاری از شانکر نگرانی زیادی ایجاد می کند. همچنین زخم های حاصل از خراشیدگی (شکل ۸)، تغذیه حشراتی نظیر مینوز برگ مرکبات (شکل ۹ و ۱۰) و زخم های ناشی از انجام عملیات هرس (شکل ۱۱) منجر به نفوذ باکتری عامل بیماری به داخل بافت گیاه می گردد.

شکل ۷: باکتری های عامل بیماری شانکر در حال ورود به اتاقک روزنه (سمت راست) و
درون اتاقک روزنه (سمت چپ) در برگ گریپ فروت

شکل ۸: خراشیدگی های روی برگ لیموترش که منجر به آلودگی به باکتری عامل بیماری شانکر شده است

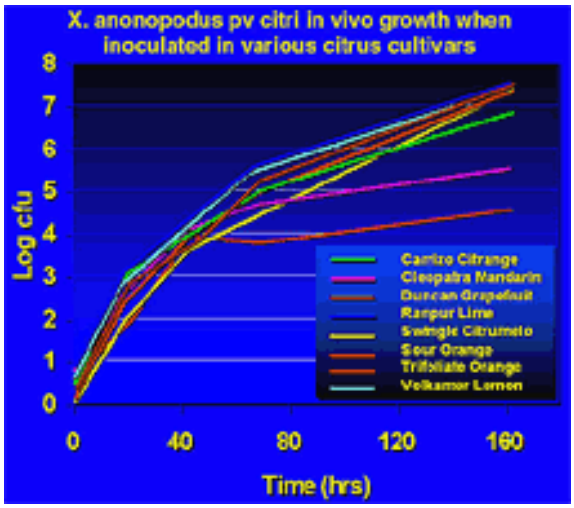
شکل ۹: دالانهای ایجاد شده در اثر تغذیه مینوز مرکبات در سمت راست و دالانهای ایجاد شده توسط آفت مذکور
در سمت چپ که باکتری عامل بیماری شانکر، وارد آن شده و مزوفیل برگ را آلوده نموده است.



شکل ۱۰: حشره بالغ و لارو مینوز آسیایی مرکبات درون دالان تغذیه

شکل ۱۱: انجام عملیات هرس در باغ مرکبات که منجر به افزایش تعداد زخم ها و انتشار باکتری عامل بیماری شانکر می شود.

اساساً زمانیکه زخم ها در حال توسعه هستند، باکتری عامل بیماری نیز تکثیر می شود و تعداد باکتری های تولید شده در هر زخم بستگی به حساسیت میزبان دارد (شکل ۱۲).



شکل ۱۲: تکثیر باکتری عامل بیماری شانکر در گونه ها و ورایته های مختلف مرکبات در شرایط آزمایشگاهی

همچنین نقل و انتقال اندام های گیاهی شامل پوست درخت، میوه، گل، گل آذین، کاسه گل، برگها، ساقه ها، شاخه ها، تنه ها، سرشاخه ها و چوب داخلی و خارجی، باعث انتقال باکتری عامل بیماری شده و در مسافت های طولانی

از طریق وسایل حمل و نقل، انتقال خاک و نهال، منتقل می شود. اما گزارشی مبنی بر انتقال باکتری عامل بیماری از طریق پیاز، غده، کورم، ریزوم، ریشه و بذور حقیقی، وجود ندارد.
تراوشات باکتریایی روی سطح گیاه، بعد از مدتی در مجاورت هوا، خشک شده و سلولهای باکتریایی موجود در این تراوشات، از بین می روند. نور مستقیم خورشید باعث تسریع در مرگ و از بین رفتن باکتری های عامل بیماری می شود. باکتری ها به مدت چند روز در خاک و چندین ماه در بقایای گیاهی داخل خاک دوام می آورند. به عبارت دیگر، باکتری ها می توانند به مدت چند سال در بافت های آلوده ای که در معرض خشکی و خاک قرار ندارند، زنده باقی بمانند. همچنین در حواشی زخم های روی برگ و میوه تا زمانیکه ریزش نموده و تجزیه شوند، زنده باقی مانده و در زخم های روی شاخه های خشبی که سن کمی دارند، دوام می آورند (شکل ۱۳).

شکل ۱۳: زخم ایجاد شده روی شاخه خشبی با قطر ۲ سانتیمتر

باکتری عامل بیماری می تواند در بافتهای گیاهی بیمار، به صورت اپی فیت روی گیاهان میزبان و غیر میزبان و به صورت ساپروفیت روی پوشش کاه و کلش دوام بیاورد. البته زخم های زمستانگذران، خصوصاً آنهایی که روی شاخ و برگهای آلوده وجود دارند، مهمترین منبع اینوکلوم برای فصل بعدی هستند. باکتری می تواند برای مدت طولانی در بافت تغییر رنگ داده پوست تنه درختان، شاخه های نیمه خشبی و سرشاخه های جانبی دوام آورد. این روش ابقاء، دلیلی بر طبیعت پراکنده این بیماری می باشد. البته به نظر می رسد که نقش باکتری ها به عنوان منابع اینوکلوم، در برگهای ریخته شده، اهمیت کمتری داشته باشد.
باکتری زمستان گذران، در اوایل بهار سال بعد، زخمهایی را تولید می کند که این زخمها تعداد زیادی باکتری را منتشر می کنند.
تمامی بافت های بالای سطح خاک مرکبات در هنگام جوانی، نسبت به باکتری عامل بیماری حساس هستند. در هوای مرطوب، سلولهای باکتریایی از زخم های موجود تراوش نموده و با فراهم شدن اینوکلوم، بیماری توسعه می یابد. همانند اکثریت بیماری های باکتریایی، پاتوژن از طریق روزنه ها و زخم ها وارد بافت گیاهی می شود. علائم اولیه حدود ۷ تا ۱۰ روز بعد از تلقیح در شرایط مناسب، روی برگها بصورت زخم های ریز تاولی شکلی، ظهور می کند. دمای مناسب برای ایجاد آلودگی بین ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتیگراد است. درصورت عدم فراهم بودن شرایط مناسب برای آلودگی و کمون، علائم ممکن است که ۶۰ روز بعد از آلودگی یا بیشتر از آن ظهور کنند.

اکولوژی باکتری عامل بیماری

تنها در صورتیکه اطلاعات جامع و کاملی از اکولوژی باکتری عامل بیماری در دسترس باشد، می توان نسبت به کنترل کامل بیماری اقدام نمود. از این رو بایستی سه فاکتور پاتوژن، شرایط محیطی و میزبان و همچنین اثرات متقابل آنها، مد نظر قرار داده شود.

- فاکتور بیمارگر

با توجه به اینکه درجه حرارت مورد نیاز برای رشد باکتری حداقل $10^{\circ}c$، حداکثر $38^{\circ}c$ و درجه حرارت مطلوب $28-30^{\circ}c$ می باشد، بنابراین خطر توسعه بیماری هنگامی بیشتر می شود که درجه حرارت محیط به حداکثر $30^{\circ}c$ برسد. با توجه به اینکه باکتری در سطح برگ ۶ ماه و در خاک معمولی ۹ روز دوام می آورد، بنابراین باکتری فاقد فاز خاکی بوده و قابلیت سازگاری با خاک و رقابت با آنتاگونیستهای خاک در آن، کم می باشد. از طرفی باکتری می تواند در شانکرها، بقایای گیاهی و برخی علف های هرز نیز دوام بیاورد. بطوریکه جمعیت این باکتری در هر ۹۰ دقیقه، دوبرابر می شود و یک لکه شانکر روی سطح برگ یا میوه درخت گریپ فروت حاوی $10^{6}-10^{7}$ سلول باکتری است.

- فاکتور محیط

با توجه به اینکه این بیماری مخصوص نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری است که درجه حرارت بالا توام با بارندگی دارند، لذا در زمانیکه درجه حرارت محیط زیاد و بارندگی کم است و یا هوا سرد و خشک باشد، بیماری به خودی خود کنترل می شود. عوامل موثر در تشدید و توسعه بیماری عبارتند از:

۱- بالا و پایین رفتن مداوم درجه حرارت در طول سال

۲- بالا بودن درجه حرارت توام با بارندگی و باد. درصورتیکه میانگین سرعت باد در طول بارندگی ها از ۸ متر در ثانیه بیشتر شود، احتمال بروز بیماری بسیار زیاد خواهد بود، زیرا فشار باد باعث تسهیل ورود باکتری به درون روزنه برگ شده و تشکیل علائم آبسوختگی را تشدید می کند.

۳- وجود سابقه یخ زدگی و سرمازدگی منطقه ای در سال قبل

۴- بالا بودن جمعیت مینوز مرکبات در باغات

- فاکتور میزبان

عموماً، گریپ فروت (*Citrus paradise*)، لیموترش (*C.aurantiifolia*) و نارنج سه برگ (*Poncirus trifoliata*) به باکتری عامل بیماری حساسیت بالایی دارند. نارنج (*C. aurantium*)، لیمو (*C. limon*) و پرتقال (*C. sinensis*) نسبتاً حساس و نارنگی (*C. reticulate*) نسبتاً مقاوم می باشد.

چنین استنباط می شود که میزان حساسیت میزبانها به بیماری ارتباط مستقیم با تعداد و بزرگی روزنه های برگ دارد. به همین دلیل لکه های ایجاد شده توسط بیماری روی ارقام حساس، بزرگتر (۱۰mm-۵) از لکه های ایجاد شده روی ارقام مقاوم (۲mm-۱) می باشد. از طرفی دوام باکتری عامل بیماری روی لکه های ایجاد شده در ارقام حساس بیشتر است. جمعیت باکتری در ارقام مقاوم بعد از ۳۰-۲۴ روز به میزانی کاهش می یابد که دیگر نمی توان باکتری را جداسازی نمود.

اپیدمیولوژی

شیوع شدید بیماری روی گیاهان بالغ بصورت دوره ای و پراکنده می باشد. آلودگی شدید هر ده سال یکبار و یا بعد از عدم مشاهده کامل بیماری در باغ، رخ می دهد. در واقع بیماری در باغ ها بصورت آلودگی های پنهان، در سطح غیر قابل تشخیص، وجود دارد. غیاب بیماری به مدت حداقل ۱۰ سال در باغ، دلیلی بر ریشه کنی بیماری نمی باشد.

علائم بیماری

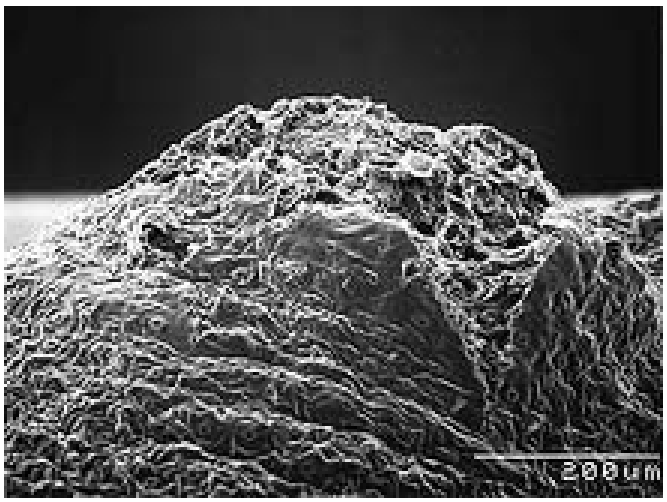
زخم های ناشی از شانکر ابتدا بصورت جوش های کوچک، گرد، اسفنجی و کمی برجسته به رنگ زرد روشن در سطح زیرین برگها، سرشاخه ها و میوه ها، توسعه می یابد (شکل ۱۴). با گسترش زخم ها، جوش های اسفنجی متلاشی شده و فرورفتگی های قهوه ای رنگی در بخش مرکزی آنها ظاهر شده و ظاهر آتشفشانی شکلی پیدا می کند. لبه های زخم ها، در بالای سطح بافت میزبان، بصورت برجسته باقی مانده و با ظاهر روغنی مانندی که دارد،

کاملاً قابل تشخیص است. زمانیکه بیماری گسترش می یابد، بخش های مرکزی برجسته، سفت و به رنگ سفید مایل به خاکستری شده و بصورت بافت مرده چوب پنبه ای زبر و خشن با هاله های زردرنگ، در می آیند (شکل ۱۵، ۱۶ و ۱۷). با افزایش سن زخم ها، ممکن است که حاشیه آبسوخته از بین برود و در ارقام مقاوم، این حاشیه تشکیل نمی شود. زخم های برجسته حاصل از آلودگی روزنه ای، بطور تیپیک، در هر دو طرف برگ قابل مشاهده هستند. در صورت شدت آلودگی، برگها ریزش پیدا می کنند (شکل ۱۸).

شکل ۱۴: زخم های ناشی از شانکر روی برگ، میوه نارس و ساقه گریپ فروت

شکل ۱۵: زخم های ناشی از شانکر با حاشیه کلروتیک روی برگها

شکل ۱۶: زخم ناشی از شانکر از فاصله نزدیک که نشان دهنده ظاهر آتشفشانی شکل و آبسوختگی حواشی می باشد.



شکل ۱۷: شکل میکروسکوپی زخم ناشی از شانکر مرکبات

شکل ۱۸: ریزش برگها در آلودگی های شدید

علائم روی شاخه ها و میوه ها مشابه بوده و بصورت زخم های برجسته چوب پنبه ای با حاشیه روغنی یـا آبـسوخته ظاهر می شوند. زخمهای ایجاد شده روی شاخه فاقد حاشیه کلروز هستند (شکل ۱۹). درحالیکـه حاشـیه کلـروز در زخمهای ایجاد شده روی میوه وجود دارد (شکل ۲۰) که در نهایت شاخه ها خشکیده و میوه ها صـدمه زیـادی مـی بینند.

شکل ۱۹: زخم ناشی از شانکر روی ساقه پرتقال

شکل ۲۰: زخم های بزرگ ایجاد شده ناشی از بیماری شانکر با حاشیه کلروز روی میوه نارس

اندازه زخم های ناشی از شانکر بین ۵ تا ۱۰ میلی متر، بسته به حساسیت و سن گیـاه میزبـان، متفـاوت مـی باشـد. بطوریکه در درختان جوان حساس، تقریباً صد در صد برگها و میوه ها، آلوده می شوند و رشد و توسعه درختان جوان شدیداً آلوده، در طی چند سال، ممکن است که به تاخیر بیفتد. برگها تا ۶ هفتگی حساس هـستند و بـه دلیـل دوره کوتاه حساسیت تاولهای روی برگ متنوع نیستند. میوه تا ۹۰ روز پس از تشکیل حـساس اسـت و بـه همـین دلیـل تاولهای ناشی از بیماری شانکر از نظر اندازه یکسان نیستند. در شرایط مناسب رطوبت و دمـا، ریـزش بـرگ و میـوه، سرخشکیدگی و گاهی مرگ درخت آلوده از علائم دیگر بیماری است (شکل های ۲۱ و ۲۲). میوه های آلوده ای کـه روی درخت باقی می مانند، ارزش بازار پسندی خود را از دست می دهند (شکل ۲۳).

شکل ۲۱: ریزش میوه های پرتقال در اثر بیماری شانکر

شکل ۲۲: مرگ درخت در اثر آلودگی به بیماری شانکر

شکل ۲۳: میوه های رسیده لیموترش که دارای زخم های ناشی از شانکر بوده و بازارپسندی خود را از دست داده است.

ردیابی بیماری

به منظور تعیین حضور یا عدم حضور باکتری عامل بیماری در باغهای مرکبات، عملیات ردیابی بایستی در مناطق سالم، جدیداً آلوده و آلوده، در فصول بهار، تابستان و پاییز بعد از رشد جستها، از طریق بازرسی و معاینه برگها، میوه ها و شاخه ها در درختان هر منطقه انجام شود. بایستی بعد از نمونه برداری، هر نمونه را به همراه شماره مخصوص آن، درون کیسه پلاستیک گذارده و پس از خارج کردن هوای داخل پلاستیک، درب آن را محکم بسته و پلاستیک های حاوی نمونه را درون یخدان قرار داده و به آزمایشگاه ارسال گردد.

توجه: به منظور جلوگیری از انتشار آلودگی در حین انجام عملیات نمونه برداری، بایستی بعد از هر بار نمونه برداری، ابزار برش با استفاده از محلول هیپو کلریت سدیم ۵٪ ضد عفونی گردد.

- **بازرسی بصری**

✓ شاخه ها: در شرایط خشکی، لکه شانکر، چوب پنبه ای یا اسفنجی و برجسته بوده و سطح آن از هم گسیخته است، درحالیکه در شرایط مرطوب، شانکر به سرعت گسترش یافته و سطح آن یکدست و دارای حاشیه روغنی مانندی است. در بیشتر ارقام مقاوم، ممکن است که یک لایه کالوس، حد فاصل بافت سالم و بیمار، تشکیل شود. جهت مشاهده اثر زخم می توان سطح خشن روی شانکر را به وسیله چاقو خراش داد تا لایه چوب پنبه ای رویی، از بین برود. انجام این کار، باعث روشن شدن زخم های قهوه ای تیره رنگ در بافت های سالم سبز پوست، می شود. ناحیه تغییر رنگ داده، از نظر اندازه، شکل و عمق، متفاوت می باشد.

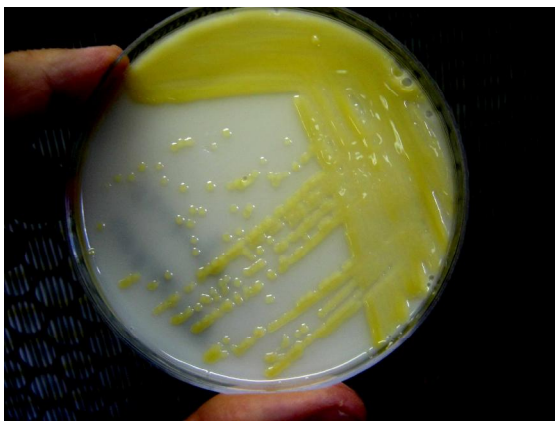
✓ برگها: در ابتدا لکه های زرد روشن در سطح زیرین برگ ظاهر می شود که پس از مدتی تبدیل به زخم های آتشفشانی قهوه ای رنگ، خشن، چوب پنبه ای و ترک دار می شوند.

✓ میوه ها: همانند برگها، زخم های آتشفشانی شکل روی میوه ها نیز گسترش می یابند. ممکن است که روی میوه های آلوده جوان، تراوشات مواد صمغی مشاهده شود. شانکر هرگز به داخل پوست میوه، نفوذ نمی کند.

بررسی های آزمایشگاهی

- جداسازی باکتری عامل بیماری از بافت آلوده

جهت جداسازی، مقدار کوچکی بافت گیاهی از حد فاصل محل پیشرفته بیماری و بافت سالم با استفاده از یک اسکالپل تیز برداشته شود. این بافت بایستی با آب مقطر استریل شسته شود یا به مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه بسته به اندازه و ضخامت بافت، با کمک یک سفیدکننده خانگی (هیپو کلریت سدیم ۵/۲۵ ٪) به رقت ۱:۱۰ سطح بافت استریل شود. بعد از شستشو در آب استریل، بافت را بایستی با یک اسکالپل استریل، در یک قطره کوچکی از آب درون یک پتری دیش پلاستیکی، خرد نمود. در صورتیکه بافت گیاهی به سختی قابل بریدن باشد، می توان از یک هاون و دسته هاون استریل جهت ساییدن بافت استفاده نمود. بعد از گذشت ۲ تا ۳ دقیقه، با استفاده از یک لوپ (حلقه) سیمی از جنس پلاتین، توده له شده بافت گیاهی حاوی باکتری روی محیط کشت حاوی آگار (مانند NA) بصورت خطوطی کشیده می شود. این خطوط بایستی در چهار جهت مستقیم از چپ به راست، کشیده شوند. بعد از کشیدن چند خط در یک جهت، باید لوپ را روی شعله ضدعفونی نمود و پس از سرد شدن، خطوط را در جهت دیگر از چپ به راست ادامه داد. در صورت انجام درست این عمل یک کلونی منفرد که از دیگر کلونی ها فاصله دارد، روی هر محیط کشت تشکیل می شود که این کلنی، حاوی باکتری خالص است (شکل ۲۴).



شکل ۲۴: کشت خطی باکتری روی محیط کشت و تشکیل کلونی های منفرد و خالص باکتری

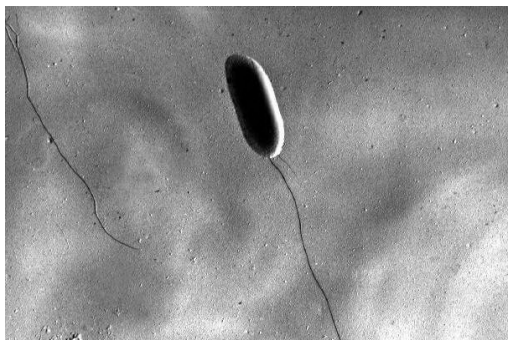
* محیط کشت Nutrient agar (NA):

Beef extract: 3.0 g/l
Peptone: 5.0 g/l
Agar: 15.0 g/l

البته می توان فرم آبگیری شده این محیط کشت را نیز به صورت تجارتی خریداری نمود.

- خصوصیات فنوتیپیکی باکتری عامل بیماری

جنس *Xanthomonas* یک باکتری میله ای شکل در اندازه ۰/۴- ۰/۷ × ۰/۷- ۱/۸ میکرومتر بوده و یک تاژک قطبی منفرد دارد (شکل ۲۵). اکثر گونه ها و پاتووارهای این جنس روی محیط کشتهای Nutrient broth-yeast extract agar (NBY) یا yeast extract-dextrose-calcium carbonate agar(YDC)به خوبی رشد کرده و کلنی های مشخص به رنگ زرد یا نارنجی تولید می کنند. همچنین روی محیط کشت YDC در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد کلنی های مخاطی تولید می کند، ولی روی محیط کشت KB رنگدانه های فلورسنت تولید نمی کند. یک باکتری گرم منفی، کاتالاز مثبت، اوره آز منفی و اکسیداز منفی بوده و رشد هوازی دارد. به غیر از یک گونه، مابقی گونه ها در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد رشد می کنند. فاقد میسیلیوم هوایی بوده و اسپور تولید نمی کند.



شکل ۲۵: باکتری جنس*Xanthomonas*

* محیط کشت Yeast extract-dextrose-$CaCo_3$ (YDC):

Yeast extract: 10.0 g/l
Dextrose(glucose): 20.0 g/l
Calcium carbonat,USP light powder: 20.0 g/l
Agar: 15.0 g/l

برای به دست آوردن یک محیط کشت سفید شیری، بایستی $CaCo_3$ از نوع بسیار خوبی باشد، در غیر این صورت، ته نشین می شود. محیط کشت بایستی به مدت یک ساعت در 10 PSI اتوکلاو شود یا اینکه دکستروز، بطور جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر آب، اتوکلاو گردد. محیط کشت اتوکلاو شده را در حمام آب ۵۰ درجه سانتیگراد، سرد نموده و قبل از ریختن آن در داخل پتری دیش، به منظور معلق شدن $CaCo_3$، تکان داده شود. در صورت ریختن محیط کشت داخل لوله، بعد از اینکه لوله ها از حمام آب برداشته شد، جهت مخلوط شدن کامل $CaCo_3$، بایستی از یک مخلوط کننده حلقوی (vortex) استفاده شود.

* محیط کشت Nutrient broth-yeast extract agar (NBY) :

Nutrient broth (Difco): 8.0 g/l
Yeast extract: 2.0 g/l
K_2HPO_4: 2 g/l
KH_2PO_4: 0.5 g/l

Glucose: 2.5 g/l
Agar: 15.0 g/l
بعد از اتوکلاو، ۱ میلی لیتر از محلول استریل ۱ مولار $MgSO_4.7H_2O$ به محیط کشت اضافه شود.

❋ محیط کشت King et al.'s medium B agar (KB)

Proteose peptone: 20.0 g/l
K_2HPO_4: 1.5 g/l
$MgSO_4.7H_2O$: 1.5 g/l
Glycerol: 15.0 ml/l
Agar: 15.0 g/l

برای تشخیص گونه و زیرگونه باکتری عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات، بایستی از روش های سرولوژیکی مانند ELISA و ملکولی مانند واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) استفاده نمود.

اهمیت مبارزه با بیماری

با توجه به مناطق کاشت و تولید مرکبات و نقشه پراکنش بیماری شانکر آسیایی مرکبات در کشور (شکل ۲ و ۳)، در حال حاضر استان های لرستان، خوزستان، ، بوشهر، کهگیلویه و بویر احمد و یزد که در مجاورت با استان های آلوده ایلام، فارس و کرمان قرار دارند، در معرض خطر آلودگی به بیماری می باشند. لذا انجام اقدامات لازم جهت جلوگیری از ورود بیماری به مناطق فوق الذکر و سایر استان های مرکبات خیز سالم کشور، امری ضروری می باشد.

کنترل بیماری

اقدامات کنترلی مشتمل بر دو قسمت است:

الف- حفاظت مناطق سالم و جدیداً آلوده که شامل رعایت اصول بهداشت، امحاء درختان آلوده و انجام عملیات هرس و برگریزی می باشد.

ب- کنترل بیماری در مناطق آلوده که شامل استفاده از بادشکن، کاربرد سموم مسی و مبارزه با آفت مینوز مرکبات می باشد.

بطور کلی، کاربرد تلفیقی روش های کنترل بیماری شانکر مرکبات که در ذیل بیان شده است، کمک موثری در رفع یا کاهش آلودگی می نماید.

۱- مبارزه قانونی

- ✓ اتخاذ تدابیر قرنطینه ای به منظور جلوگیری از نقل و انتقال هر گونه اندام تکثیری (قلمه، پیوندک و نهال)، چوب تر و خشک و میوه مرکبات از مناطق آلوده به مناطق سالم
- ✓ امحاء تمامی نهال های آلوده و مشکوک در سطح نهالستان
- ✓ ریشه کنی و سوزاندن درختانی که بیش از ۵۰٪ آلودگی دارند (شکل ۲۶).

شکل ۲۶: ریشه کنی و سوزاندن درختان آلوده به بیماری شانکر

✓ رعایت اصول بهداشتی در نهالستان ها و باغ های مرکبات شامل:

* ضدعفونی ابزار و وسایل باغبانی، پس از کار کردن از یک درخت به درخت دیگر، کفش و لباس کارگران و ماشین آلات مورد استفاده در باغات آلوده، قبل از خروج از باغ، با استفاده از محلول وایتکس ۵٪ یا محلول آمونیاک ۲۰۰۰ppm (شکل ۲۷).

شکل ۲۷: محل ضدعفونی کفش و لباس پرسنل، ابزار و چرخ ماشین آلات
به منظور جلوگیری از انتشار باکتری عامل بیماری شانکر

* ضدعفونی کامل سطح میوه ها با یکی از دو روش ذیل:

۱- به صورت غوطه وری در کلر ۲٪ (محلول تجاری هیپوکلریت سدیم حاوی ۲۰۰ppm کلر که برای تهیه آن، حدود ۴ میلی لیتر از محلول فوق را در یک لیتر آب حل کرده و همراه با ۰/۰۵ ٪ از یک سورفکتانت غیر یونی (مانند سیتووت) در pH = ۶ -۷/۵ استفاده می شود) به مدت دو دقیقه و سپس شستشوی میوه ها با آب کافی.

تذکر: محلول ضدعفونی کننده بایستی به صورت روزانه تهیه شود.

۲- به صورت غوطه وری در محلول Sodium Ortho Phenyl Phenate (SOPP) (با ماده موثره ۲- ۱/۸۶ درصد و pH =۱۱/۵ -۱۲/۲) به مدت ۴۵ تا ۶۰ ثانیه، به طوریکه باقیمانده SOPP روی میوه، بعد از ضدعفونی و شست و شو، از ۱۰ppm بیشتر نباشد.

رعایت موارد ذیل در نقل و انتقال میوه ضروری است:

الف- در زمان برداشت، میوه ها از شاخ و برگ، تمیز و پاک شده باشند.

ب- میوه ها در خارج از محیط باغ، جمع آوری، ضدعفونی و بسته بندی شوند.

ج- عملیات ضدعفونی توسط شرکتهای مجاز ضدعفونی و با نظارت مدیریت حفظ نباتات استان ها و شهرستان ها یا کلینیک های گیاهپزشکی انجام شده و گواهی ضدعفونی و گواهی عدم آلودگی محموله، توسط آنها، صادر گردد.

د- گواهی ضدعفونی و گواهی عدم آلودگی بایستی به مامورین قرنطینه در پستهای قرنطینه ارائه شود.

بدیهی است صدور برگ گواهی بهداشت جهت نقل و انتقال اندام های تکثیرشونده گیاهی (قلمه، پیوندک و نهال) منوط به رعایت توصیه های ارایه شده و عدم آلودگی آنها به عوامل خسارتزای قرنطینه ای و مهم می باشد.

- ✓ هدایت میوه های آلوده به کارخانه مشخص جهت آبگیری در استان های شدیداً آلوده، با هماهنگی مدیریت باغبانی استان، به منظور جلوگیری از انتقال بیماری توسط میوه

۲- مبارزه زراعی

- ✓ اجتناب از کوددهی زیاد خصوصاً کودهای ازته و آبیاری بیش از اندازه جهت جلوگیری از پیدایش شاخه های جوان و تازه و افزایش شدت آلودگی
- ✓ برگرداندن خاک به عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر و آبیاری پس از آن به منظور کاهش سریع جمعیت باکتری در خاک (زیرا باکتری نمی تواند در خاک، دوام بیاورد)
- ✓ هرس کامل شاخه های آلوده در درختانی که کمتر از ۵۰٪ آلودگی داشته و علائم بیماری در آنها محدود به سرشاخه ها می باشد.
- ✓ استفاده از علف کش های مناسب جهت برگریزی در درختانی که ارتفاع زیادی دارند و امکان هرس کامل شاخه های آلوده در آنها وجود ندارد و جمع آوری و سوزاندن برگهای ریخته شده
- ✓ با توجه به اینکه انجام عملیات هرس یا برگریزی به تنهایی تاثیر چندانی در کاهش شدت بیماری ندارد، لذا سمپاشی درختان با ترکیبات مسی، بعد از انجام این عملیات، به منظور جلوگیری از آلودگی مجدد جستهای تازه رشد کرده، در زمانیکه رشدشان به نیمه رسیده باشد، ضروری است.
- ✓ عملیات هرس یا پیوند بایستی در فصول خشک سال که رطوبت محیط پایین بوده و شرایط محیطی برای انتشار باکتری عامل بیماری از روی درختان هرس شده به درختان سالم مجاور، مساعد نیست، انجام شود.
- ✓ استفاده از بادشکن در اطراف و داخل ردیف های درختان که باعث کاهش انتشار باکتری عامل بیماری از طریق باران توام با باد و کاهش صدمات ناشی از بادهای شنی شده و در کنترل بیماری روی ارقام حساس بسیار موثر می باشد (شکل ۲۸).

شکل ۲۸: استفاده از بادشکن در اطراف درختان مرکبات

- ✓ استفاده از ارقام مقاوم مانند نارنگی و پرتقال والنسیا
- ✓ جمع آوری و از بین بردن علف های هرز موجود در نهالستان ها و باغ ها، به منظور جلوگیری از بقای باکتری عامل بیماری در آنها

۳- مبارزه شیمیایی

الف- سمپاشی درختان با سموم مسی مانند بردو فیکس ۱۸٪ SC در زمان تورم جوانه ها (قبل از باز شدن گلها) به صورت یک نوبت سم پاشی با غلظت ۸ در هزار و پس از ریزش گلبرگها با غلظت ۵ در هزار، هر ۱۵ روز یکبار به مدت سه ماه

ب- سمپاشی علیه آفت مینوز مرکبات با سموم ثبت شده مجاز