دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
دانشکده کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد
مهندسی کشاورزی- بیماری شناسی گیاهی

بررسی امکان کنترل بیماری بلاست مرکبات با استفاده از برخی عوامل آنتاگونیست

استادان راهنما
دکتر پژمان خدایگان
دکتر فرید بیکی

استاد مشاور
دکتر روح اله صابری ریسه

نگارنده
محمد ادبی فیروزجایی

مهر ۱۳۹۳

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان
دانشکده‌ی کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد
رشته‌ی مهندسی کشاورزی - بیماری شناسی گیاهی

محمد ادبی فیروزجایی

بررسی امکان کنترل بیماری بلاست مرکبات با استفاده از برخی عوامل آنتاگونیست

در تاریخ ۹۳/۷/۲۶ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه‌ی عالی به تصویب نهایی رسید.

	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر پژمان خدایگان	استادیار	
۲- استاد راهنما	دکتر فرید بیگی	استادیار	
۳- استاد مشاور	دکتر روح الله صابری	استادیار	
۴- داور داخل گروه	دکتر احمد حسینی	استادیار	
۵- داور داخل گروه	دکتر حسین علایی	استادیار	
۶ – نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی	دکتر علی توکلی	دانشیار	

تمامی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های حاصل از پژوهش موضوع این پایان‌نامه، متعلق بهدانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان است

چکیده:

بلاست باکتریایی یکی از بیماری‌های مهم مرکبات شمال ایران می‌باشد که به وسیله گونه‌هایی از جنس سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) ایجاد می‌شود. این بیماری در فصول سرد و خنک و یا بلافاصله پس از آن باعث ایجاد آسیب قابل توجهی به درختان می‌گردد. کنترل بیولوژیک می‌تواند روشی موثر برای کنترل این بیماری باشد. به‌منظور بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری، در سال ۱۳۹۲ نمونه‌هایی از برگ مرکبات سالم، از مناطق مختلف استان‌های مازندران، گیلان و گلستان جمع‌آوری شد و فعالیت بیوکنترلی باکتری‌ها و مخمرهای جداشده از نمونه‌های مذکور، در شرایط گلخانه و آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی گلخانه‌ای نشان داد که برخی جدایه‌های باکتریایی و مخمری، توانستند سبب کاهش ۶۶ تا ۸۰ درصدی علایم بیماری گردند. همچنین برخی از این جدایه‌ها توانستند جمعیت پاتوژن‌ها را ۳۷ تا ۷۶ درصد کاهش دهند. ارزیابی آزمایشگاهی از جمله بررسی هاله ممانعت از رشد، متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی، تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور بازدارنده، توان تشکیل بیوفیلم و غیره نشان داد که این جدایه‌ها پتانسیل کنترل این بیماری را دارند. برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی برتر، بخشی از ناحیه 16S rDNA آن‌ها با بکارگیری آغازگر اختصاصی تکثیر و تعیین ترادف شد. با مقایسه نتایج در پایگاه اینترنتی NCBI، جدایه‌های برتر به عنوان *Pseudomonas monteilii*، *Stenotrophomonas maltophilia*، *Serratia marcescens*، *Bacillus* sp. شناسایی شدند. این جدایه‌های باکتریایی به همراه جدایه مخمری J20، بیماری بلاست را بهتر از سایر گونه‌های رورست کنترل نمودند.

واژگان کلیدی: بلاست مرکبات، کنترل بیولوژیک، باکتری‌ها و مخمرهای رورست مرکبات، *Pseudomonas viridiflava*، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*،

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۱

مقدمه ۱

۱-۱- مرکبات و اهمیت آن ۱
۱-۲- بیماری بلاست مرکبات، اهمیت و علائم آن ۲
۱-۳- اهداف تحقیق ۳

فصل دوم ۵

پیشینه پژوهش ۵

۲-۱- بیماری بلاست باکتریایی مرکبات ۵
۲-۲- کنترل بیماری بلاست مرکبات ۶

فصل سوم ۹

مواد و روش‌ها ۹

۳-۱- نمونه برداری ۹
۳-۲- جداسازی و خالص‌سازی عوامل آنتاگونیست ۹
۳-۳- نگهداری جدایه‌های آنتاگونیست ۱۰
۳-۴- گروه بندی جدایه‌های آنتاگونیست ۱۰
۳-۵- بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌ها در گلخانه ۱۱
۳-۵-۱- بررسی توان جدایه‌ها در کاهش شدت بیماری ۱۱
۳-۵-۱-۱- تهیه جدایه‌های بیمارگر، مایه تلقیح آنتاگونیست‌ها و گیاهان ۱۱
۳-۵-۱-۲- انجام بررسی توان جدایه‌ها در کاهش شدت بیماری ۱۲
۳-۵-۲- بررسی توان جدایه‌ها در کاهش جمعیت بیمارگرها در سطح گیاه ۱۳
۳-۵-۲-۱- تهیه بیمارگرهای مقاوم به آنتی بیوتیک ۱۳
۳-۵-۲-۲- انجام بررسی توان جدایه‌ها در کاهش جمعیت بیمارگرها در سطح گیاه ۱۴.
۳-۶- شناسایی باکتری‌های منتخب ۱۵
۳-۶-۱- بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی ۱۵

عنوان **صفحه**

۳-۶-۲- بررسی‌های ژنوتیپی باکتری‌ها ۱۶
۳-۶-۲-۱- استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها ۱۶
۳-۶-۲-۲- سنجش مقدار DNA استخراج شده ۱۷
۳-۶-۲-۳- تشخیص مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۱۷
۳-۶-۲-۳-۱- تکثیر بخشی از ژن 16S rDNA ۱۷
۳-۶-۲-۳-۲- ترکیب واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ناحیه‌ی 16S rDNA ۱۸
۳-۶-۲-۳-۳- برنامه حرارتی واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ناحیه‌ی 16S rDNA ۱۸
۳-۶-۲-۴- الکتروفورز محصولات تکثیر شده در PCR ۱۹
۳-۶-۲-۵- تعیین توالی، تجزیه و تحلیل داده‌ها ۱۹
۳-۷- بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی ۲۰
۳-۷-۱- بررسی قدرت بازدارندگی بیمارگرها درون تشتک پتری ۲۰
۳-۷-۲- بررسی تاثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای جدایه‌های منتخب ۲۰
۳-۷-۳- بررسی تاثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای اتوکلاو شده جدایه‌های منتخب ۲۱
۳-۷-۴- بررسی تولید مواد فرار توسط باکتری‌های آنتاگونیست ۲۱
۳-۷-۵- بررسی تولید سیدروفور به روش CAS-Agar ۲۲
۳-۷-۶- بررسی سیدروفور موثر علیه بیماریگر ۲۲
۳-۷-۷- بررسی آنتی بیوتیک موثر توسط عوامل آنتاگونیست ۲۲
۳-۷-۸- ردیابی تولید آنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید (PCA) در جدایه‌های آنتاگونیست ۲۳
۳-۷-۹- بررسی تولید سیانید هیدروژن ۲۳
۳-۷-۱۰- سنجش تشکیل هسته یخ جدایه‌ها ۲۴
۳-۷-۱۱- بررسی بیوفیلم جدایه‌های منتخب در پلیت ۹۶ خانه‌ای ۲۵
۳-۷-۱۲- بررسی بیوفیلم جدایه‌های منتخب بر روی برگ ۲۵
۳-۷-۱۳- بررسی تحرک ۲۶
۳-۷-۱۴- تعیین منحنی رشد آنتاگونیست‌ها ۲۶
۳-۷-۱۵- بررسی سازگاری عوامل بیوکنترلی نسبت به یکدیگر در کشت متقابل ۲۶
۳-۸- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۲۷

عنوان | صفحه

فصل چهارم ۲۹

نتایج و بحث ۲۹

۴-۱- نمونه برداری، جداسازی، خالص سازی و نگهداری جدایه‌ها ۲۹
۴-۲- گروه بندی جدایه‌ها ۳۲
۴-۳- بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌ها در گلخانه ۳۴
۴-۳-۱- بررسی توان جدایه‌ها در کاهش شدت بیماری ۳۴
۴-۳-۲- بررسی توان جدایه‌ها در کاهش جمعیت بیمارگر در سطح گیاه ۳۹
۴-۴- شناسایی جدایه‌های منتخب ۴۲
۴-۵- بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی ۵۳
۴-۵-۱- بررسی قدرت بازدارندگی بیمارگرها درون تشتک پتری ۵۳
۴-۵-۲- بررسی تاثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای (میکروپور و اتوکلاو) ۵۴
۴-۵-۳- بررسی تولید مواد فرار توسط باکتری‌های آنتاگونیست ۶۰
۴-۵-۴- بررسی تولید سیدروفور به روش CAS-Agar ۶۱
۴-۵-۵- بررسی سیدروفور و آنتی بیوتیک موثر علیه بیمارگرها ۶۳
۴-۵-۶- بررسی آنتی بیوتیک فنازین -۱-کربوکسیلیک اسید ۶۴
۴-۵-۷- بررسی تولید سیانیدهیدروژن ۶۵
۴-۵-۸- سنجش تشکیل هسته یخ جدایه‌ها ۶۶
۴-۵-۹- بررسی بیوفیلم جدایه‌ها ۶۸
۴-۵-۱۰- بررسی تحرک ۷۱
۴-۵-۱۱- تعیین منحنی رشد آنتاگونیست‌ها ۷۲
۴-۵-۱۲- بررسی سازگاری عوامل بیوکنترلی نسبت به یکدیگر با کشت متقابل آتناگونیست‌ها ۷۳

فصل پنجم ۷۵

نتیجه گیری و پیشنهادها ۷۵

۵-۱- نتیجه گیری ۷۵

عنوان **صفحه**

۵-۲- نتیجه گیری کلی ۷۶
۵-۳- پیشنهادات ۷۸
منابع ۷۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ A: دمبرگ آلوده و پیشرفت بیماری در امتداد رگبرگ میانی برگ، B: سرشاخه جوان آلوده به بلاست، بر گرفته از (Mirik *et al*, 2005)، C: دمبرگ آلوده به بلاست همراه با خشکیدگی و پیچیدگی برگ، برگرفته از (Reuther, 1989) ۶

شکل ۴-۱ توان بیماریزایی بر روی برگ آلمو و نارنج (به ترتیب الف و ب) و علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های رورست مرکبات با پتانسیل القاء واکنش فوق حساسیت بر روی توتون (ج) و شمعدانی (د).....۳۳

شکل ۴-۲ کلنی‌های باکتریایی جداشده از سطح مرکبات بر روی محیط KB (Bacteria) و کلنی‌های مخمری جداشده از سطح مرکبات بر روی محیط NA (J1، J20 و F) ۳۴

شکل ۴-۳ علائم بلاست بر روی برگ‌های نارنج حاصل از تزریق سوسپانسیون مادری و رقت‌های یک تا شش سوسپانسیون باکتری Pv (نیمه چپ برگ‌ها) و باکتری Pss (نیمه راست برگ‌ها)....۳۵

نمودار ۴-۱ مساحت میزان گسترش بیماری (شدت بیماری) بر حسب سانتی متر مربع بعد از ۱۰ روز در تیمارهایی که با بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* بر روی گیاه آلمو مایه زنی شدند ۳۷

نمودار ۴-۲ مساحت میزان گسترش بیماری (شدت بیماری) بر حسب سانتی متر مربع بعد از ۱۰ روز در تیمارهایی که با بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* بر روی گیاه نارنج مایه زنی شدند.....۳۷

نمودار ۴-۳ مساحت میزان گسترش بیماری (شدت بیماری) بر حسب سانتی متر مربع بعد از ۱۰ روز در تیمارهایی که با بیمارگر *P. viridiflava* بر روی گیاه نارنج مایه زنی شدند.....۳۸

نمودار ۴-۴ مساحت میزان گسترش بیماری (شدت بیماری) بر حسب سانتی متر مربع بعد از ۱۰ روز در تیمارهایی که با بیمارگر *P. viridiflava* بر روی گیاه آلمو مایه‌زنی شدند.....۳۸

شکل ۴-۴ مقایسه شدت بیماری بلاست ناشی از سه بار پاشش سوسپانسیون جدایه‌ها قبل از مایه‌زنی بیمارگر *P. viridiflava* در مقایسه با با پاشش آب به عنوان شاهد (C+) در نهال آلمو .۳۹

نمودار ۴-۵ کاهش جمعیت بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* مقاوم به آنتی بیوتیک حاضر بر روی نهال‌های تیمار شده با عوامل بیوکنترل در مقایسه با شاهد (C+) که بجای سوسپانسیون عوامل بیوکنترل با آب اسپری شدند.....۴۱

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۶ کاهش جمعیت بیمارگر *P. viridiflava* مقاوم به آنتی بیوتیک حاضر بر روی نهال-های تیمار شده با عوامل بیوکنترل در مقایسه با تیمار شاهد (+C) که بجای سوسپانسیون عوامل بیوکنترل با آب اسپری شدند ۴۱

شکل ۴-۵ ساختار Prodigiosin برگرفته از (Williamson *et al.*, 2006) ۴۷

شکل ۴-۶ بازدارندگی از رشد بیمارگرهای بلاست، بوسیله جدایه‌های M2، M3، Pa و B بر روی محیط NA ۵۴

نمودار ۴-۷ تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو نشده جدایه‌ها در غلظت ۱۰۰٪ بر بیمارگر *P. viridiflava* و کدورت آنها در چهار بازه زمانی صفر، یک، دو و سه روز پس از مایه‌زنی ۵۶

نمودار ۴-۸ تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو نشده جدایه‌ها در غلظت ۵۰٪ بر بیمارگر P. *viridiflava* و کدورت آنها در چهار بازه زمانی صفر، یک، دو و سه روز پس از مایه‌زنی ۵۶

نمودار ۴-۹ تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو نشده جدایه‌ها در غلظت ۱۰۰٪ بر بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* و کدورت آنها در چهار بازه زمانی صفر، یک، دو و سه روز پس از مایه‌زنی .. ۵۷

نمودار ۴-۱۰ تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو نشده جدایه‌ها در غلظت ۵۰٪ بر بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* و کدورت آنها در چهار بازه زمانی صفر، یک، دو و سه روز پس از مایه‌زنی .. ۵۷

نمودار ۴-۱۱ مقایسه تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو شده ($Outo^+$) و اتوکلاو نشده ($Outo^-$) در غلظت ۱۰۰٪ بر کدورت بیمارگر *P. viridiflava* در بازه ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی این بیمارگر ۵۸

نمودار ۴-۱۲ مقایسه تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو شده ($Outo^+$) و اتوکلاو نشده ($Outo^-$) در غلظت ۵۰٪ بر کدورت بیمارگر *P. viridiflava* در بازه ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی این بیمارگر ۵۸

نمودار ۴-۱۳مقایسه تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو شده ($Outo^+$) و اتوکلاو نشده ($Outo^-$) در غلظت ۱۰۰٪ بر کدورت بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* در بازه ۷۲ ساعت پس از مایه-زنی این بیمارگر..... ۵۹

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱۴مقایسه تاثیر ترشحات مایع برون سلولی اتوکلاو شده ($Outo^+$) و اتوکلاو نشده ($Outo^-$) در غلظت ۵۰٪ بر کدورت بیمارگر *P. viridiflava* در بازه ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی این بیمارگر ۵۹

نمودار ۴-۱۵ میانگین قطر کلنی بیمارگرها در شرایط تحت تاثیر مواد فرار آنتاگونیست‌ها (برحسب میلی‌متر)..... ۶۱

شکل ۴-۷ ظهور هاله نارنجی در اطراف تعدادی از کلنی باکتری‌های منتخب در نتیجه تولید سیدروفور ۶۲

نمودار ۴-۱۶ نسبت قطر هاله به قطر کلنی بر حسب سانتی‌متر در روزهای یک تا ده روز بعد از کشت جدایه‌ها بر روی محیط کشت CAS آگار ۶۳

شکل ۴-۸ بازدارندگی نسبی علیه بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* حاصل از ترکیبات خارج سلولی باکتری Pa ۶۴

شکل ۴-۹ ظهور هاله بازدارنده علیه بیمارگر *P.s.* pv. *syringae* حاصل از ترکیبات خارج سلولی تولید شده توسط جدایه‌ها و نفوذ آن به محیط کشت حاوی کلرید آهن ۶۴

شکل ۴-۱۰ بررسی تولید HCN جدایه‌های برتر و مقایسه تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف با تغییر رنگ کاغذ صافی تیمار شاهد..... ۶۶

شکل ۴-۱۱ عدم تشکیل هسته‌یخ در سوسپانسیون جدایه‌های M3، B، M2 و Pa در مقایسه با سوسپانسیون *P.s.* pv. *syringae* (بیمارگر بلاست مرکبات) ۶۸

شکل ۴-۱۲ تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها بر روی دیواره و کف چاهک‌های پلیت الیزا که با محلول کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. ۷۰

نمودار ۴-۱۷ قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌ها بر اساس میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر (بیوفیلم پلیت)-داده‌ها میانگین سه تکرار برای هر جدایه می‌باشند. ستون‌هایی که با حروف مختلف نمایش داده شده‌اند براساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند. ۷۰

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۱۳ تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها بر روی سطح برگ آلمو که با کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند..... ۷۱

نمودار ۴-۱۸ میانگین میزان تحرک جدایه‌های برتر در بازه زمانی یک تا سه روز پس از مایه‌زنی ۷۱

شکل ۴-۱۴شکل‌های مختلف تحرک جدایه‌ها بر روی محیط Swarming agar پس از ۲۴ ساعت. تحرک دایره‌ای نامنظم (M2)، تحرک دندریت مانند (M3)، تحرک دایره‌ای منظم (Pa) و تحرک چشم گاوی نامنظم (B)، نام‌ها بر گرفته از (Kearns, 2010) ۷۲

نمودار ۴-۱۹ نمودار میزان جذب جدایه‌ها در طول موج ۵۹۰ نانومتر در بازه زمانی صفر تا چهارده ساعت ۷۳

شکل ۴-۱۵ کشت متقابل جدایه‌های آنتاگونیست و سازگاری عوامل بیوکنترل نسبت به یکدیگر ۷۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ اطلاعات توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکنیک PCR برای تکثیر بخشی از 16S rDNA ژنوم باکتری‌ها..... ۱۸

جدول ۳-۲ مقدار و غلظت ترکیبات موجود در واکنش PCR ۱۸

جدول ۳-۳ برنامه حرارتی واکنش پی‌سی‌آر برای تکثیر بخشی از ناحیه 16S rDNA..... ۱۹

جدول ۴-۱ مشخصات جدایه‌های به‌دست آمده از نمونه‌برداری استان‌های گیلان، مازندران و گلستان ۳۰

جدول ۴-۲ درصد کاهش شدت بیماری در تیمارهایی که پس از سه بار پاشش سوسپانس جدایه‌های رورست مرکبات بر روی برگ نارنج و آلمو توسط بیمارگرهای بلاست مایه‌زنی شدند... ۳۶

جدول ۴-۳ درصد کاهش جمعیت بیمارگرهای Pss و Pv مقاوم به آنتی بیوتیک تتراسایکلین بر روی نهال آلمو و نارنج با پاشش سوسپانسیون جدایه‌های بیوکنترل در مقایسه با شاهد (+C) که به جای سوسپانسیون جدایه‌های بیوکنترل با آب مقطر سترون اسپری شده اند. ۴۰

جدول ۴-۴ ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمایی جدایه‌های باکتریایی منتخب..... ۴۲

ادامه جدول ۴-۴ ..... ۴۳

ادامه جدول ۴-۴ ..... ۴۴

جدول ۴-۵ میزان هاله بازدارندگی جدایه‌ها در برابر دو بیمارگر بلاست ۵۳

جدول ۴-۶ درصد کاهش کدورت رشد (حاصل از رشد بیمارگرهای Pv و Pss) در عصاره‌های برون سلولی اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده جدایه‌های انتاگونیست در غلظت ۱۰۰ و ۵۰ درصد ۵۵

جدول ۴-۷ تاثیر مواد فرار جدایه‌های باکتریایی بر روی دو بیمارگر بلاست در شرایط آزمایشگاهی ۶۰

جدول ۴-۸ میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه‌ها در محیط CAS آگار در فواصل زمانی یک تا ده روز پس از کشت جدایه‌ها بر روی محیط کشت (بر حسب سانتی‌متر)..... ۶۲

فصل اول
مقدمه

۱-۱- مرکبات و اهمیت آن

مرکبات گیاهانی چندساله با ارزش غذایی بالا و چشم اندازی زیبا متعلق بـه خـانواده روتاسـه[1] و زیر خانواده‌ی آورانتوییده[2] هستند. پرورش این محصولات در هند، جنوب چـین و جنـوب ویتنـام از ۲۴۰۰ سال پیش از میلاد مسیح آغاز شده است. مرکبات با تولید سالانه ۶۰ میلیون تـن محصـول و با ۱/۶ میلیون هکتار سطح زیر کشت در جهـان نقـش بسـیار مهمـی را در تولیـد ثـروت و افـزایش مبادلات تجاری ایفا می‌کنند و باعث اشتغال به‌کار ساکنین حدود ۱۲۵ کشـور مرکبـات‌خیـز جهـان شده‌اند. سطح کل باغ‌های مرکبات دنیا ۷۶۰۰۰۰۰ هکتار بوده و میزان محصـول ۱۰۳۸۰۰۰۰۰ تـن است. کشور چین اولین تولیدکننده‌ی مرکبات در دنیا می‌باشد. ایران با دارا بودن سهم ۳/۸ درصد از سطح زیرکشت مرکبات در دنیا مقام هشتم و از نظر تولید مقام هفتم و در بخـش صـادرات در بـین کشورهای صادرکننده در رتبه ۳۱ قرار گرفته است. سطح زیرکشت مرکبات کشـور، در سـال ۱۳۹۰ حدود ۲۸۱ هزار هکتار و تولید آن حدود ۴/۵ میلیون تن برآورد شده است. اسـتان مازنـدران بـا ۴۵ درصد سطح زیرکشت و ۴۷ درصد تولید، در راس تولیدکنندگان مرکبات کشور قرار دارد (آمارنامه‌ی کشاورزی، ۱۳۹۰).

---

[1] Rotaceae
[2] Aurantioideae

۱-۲- بیماری بلاست مرکبات، اهمیت و علائم آن

پروکاریوت‌ها، فراوان‌ترین ساکنین کره‌ی زمین، در انسان، حیوان و گیاهان بیماریزا می‌باشند که از میان آن‌ها انواع بیماریزای گیاهان خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌سازند. از بین بیماری‌های مختلف ویروسی، قارچی و باکتریایی که سبب خسارت‌های قابل توجهی روی این گروه از محصولات می‌شوند، بیماری باکتریایی بلاست مرکبات[1] از جمله بیماری شایع در اکثر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به استثنای مناطق گرمسیر می‌باشد (Whiteside *et al.*, 1988). در شرایط اقلیمی شمال ایران، به دلیل وجود رطوبت بالا و دمای مناسب، بیماری بلاست خسارت قابل توجهی را به صورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها ایجاد می‌کند. در ابتدا عامل بیماری باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) معرفی شد (Whiteside *et al.*, 1988). اما در ایران علاوه بر این گونه، باکتری *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder 1930) Dowson 1939 (Pv) نیز به عنوان عامل دیگر بیماری بلاست مرکبات گزارش شده است (Shams-Bakhsh and Rahimian, 1997). این باکتری‌ها به علت توان ایجاد هسته‌یخ سبب شدت بخشیدن بیماری بر روی میزبان می‌گردند. در ایران، اولین‌بار این بیماری در سال ۱۳۶۷ به صورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌های پرتقال (*Citrus sinencis* (L.) Osbeck) و آلمو (*C. macrophylla* Wester) از مازندران گزارش شد (Shams-Bakhsh and Rahimian, 1997). در جنوب ایران، تاکنون گزارشی از وجود بیماری بلاست ارائه نشده است (Taghavi and Ziaee, 2003 ؛ Razinataj and Taghavi, 2004). این بیمارگران از طریق زخم ایجاد شده روی بافت‌های جوان، به گیاه حمله می‌کند. علائم بلاست روی پهنک و دمبرگ عموماً به‌صورت نقاط آبسوخته یا نواحی سیاه‌رنگ پدید آمده و از هر طرف گسترش می‌یابد، به‌طوری که از طرف پایین به شاخه و از طرف بالا به بخش فوقانی برگ سرایت می‌کند. اگر آوندهای آبکشی دمبرگ آلوده شوند، برگ‌ها پژمرده شده و می‌ریزند. در محور جوانه با قاعده برگ (محل اتصال به شاخه) زخم بیضی‌شکل قهوه‌ای تا سیاه‌رنگی ایجاد می‌شود. اگر این لکه‌ها دور تا دور شاخه را بگیرند، بخش‌های بالایی آن‌ها خشک خواهد شد. علائم این بیماری در طول فصل رشد و به خصوص در مناطق بارانی و بادخیز با شرایط آب‌وهوایی مرطوب و خنک در دامنه دمایی بین ۸ تا ۲۰ درجه سلسیوس بر روی سرشاخه‌های جوان شدیدتر خواهد بود. گاهی ممکن است علایم بلاست با خسارت سرمازدگی اشتباه گردد (Program, 2012 ؛ Ferguson and

---

[1] Citrus Blast

Grafton-Cardwell, 2014). تاکنون این بیماری از کشورهای آمریکا، استرالیا، ژاپن، آفریقای جنوبی، برخی از کشورهای حاشیه مدیترانه و آسیای مرکزی گزارش شده است (Coit, 1916 ؛ Smilanick *et al.*, 1996 ؛ Whiteside *et al.*, 1988). همچنین در کشور همسایه ایران، در ترکیه، باکتری *P.s.* pv. *syringae* به‌عنوان عامل بلاست شناسایی شده است (Mirik *et al.*, 2005). اما همانند مناطق جنوبی ایران، این بیماری تاکنون از مناطق گرم یا خشک مانند کشورهای برزیل، فلوریدا و آمریکای مرکزی گزارش نشده است (Reuther, 1989).

۱-۳- اهداف تحقیق

برای پیشگیری و کنترل این بیماری به غیر از رعایت بهداشت زراعی، می‌توان از سموم شیمیایی و ارقام مقاوم نیز استفاده نمود (Whiteside *et al.*, 1988). مصرف سموم شیمیایی ضمن داشتن خطرات سوء زیست محیطی، سبب بروز جدایه‌های مقاوم نیز می‌شوند (Gnanamanickam, 2006). امروزه استفاده از روش‌های سالم و کم خطر که بتواند در دراز مدت موفقیت آمیز باشد مورد توجه محققین قرار گرفته است. از جمله این روش‌ها که امروز کاربرد فراوانی یافته است بکارگیری دشمنان طبیعی عوامل بیمارگر گیاهی در جهت کنترل بیولوژیکی آن‌ها می‌باشد. بسیاری از مطالعات نشان داده است که میزان قابل توجه از ارگانیسم‌های موجود در محیط قادرند رشد عوامل بیماری‌زا و پیشرفت بیماری ناشی از آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند، تأثیری که سایر ارگانیسم‌ها در شرایط طبیعی روی پیشرفت بیماری‌های گیاهی داشته‌اند، همواره عاملی برای افزایش مطالعات در این زمینه بوده است. در مورد کنترل بیماری بلاست مرکبات، فرضیه‌ای که این پژوهش حول محور آن انجام گرفته است، حضور مخمرها و باکتری‌های آنتاگونیست با توان بیوکنترلی قابل قبول علیه بیمارگرهای عامل بلاست در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای است، از این رو در تحقیق حاضر اثر باکتری‌ها و مخمرهای رورست[1] و بومی برای کنترل عوامل باکتریایی بلاست مرکبات مورد بررسی قرار می‌گیرد تا عامل مناسبی جهت کنترل موثر این بیماری معرفی گردد.

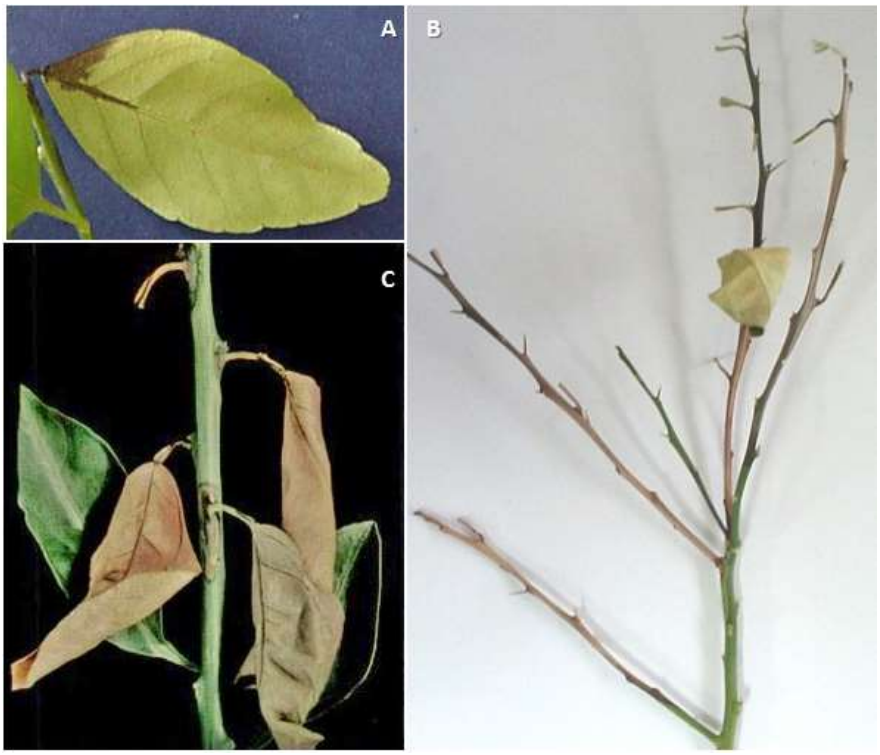
---

[1] Epiphyte

فصل دوم
پیشینه پژوهش

۲-۱- بیماری بلاست باکتریایی مرکبات

بلاست مرکبات از جمله بیماری‌های شایع در اکثر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به استثنای مناطق گرمسیری می‌باشد که به وسیله سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* و *Pseudomonas viridiflava* ایجاد می‌شود (Whiteside *et al.*, 1988 ؛ Klotz, 1978). بلاست مرکبات اولین بار در سال ۱۹۱۶ از شمال کالیفرنیا گزارش شد (Hodgson, 1917 ؛ Coit, 1916 ؛ Whiley *et al.*, 2002). در ایران برای اولین بار، در سال ۱۳۶۷ این بیماری به صورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌های پرتقال و آلمو از شمال کشور (مناطق بابل و ساری) توسط شمس بخش و رحیمیان گزارش شد. بیمارگرهای بلاست به راحتی از طریق زخم روی بافت‌های جوان به گیاه حمله می‌کنند. علائم بلاست روی پهنک و دمبرگ عموما به صورت نقاط آبسوخته یا نواحی سیاه پدید آمده و از هر دو طرف گسترش می‌یابد، بطوری که از طرف پایین به شاخه و از طرف بالا به بخش‌های فوقانی برگ سرایت می‌کند. اگر آوندهای آبکشی دمبرگ آلوده شوند برگ‌ها پژمرده و می‌ریزند (شکل ۲-۱). چنانچه بلاست پس از یک دوره سرما و یخبندان رخ دهد، ممکن است با خسارت سرمازدگی اشتباه گردد (Whiteside *et al.*, 1988).



شکل ۲-۱ A: **دمبرگ آلوده و پیشرفت بیماری در امتداد رگبرگ میانی برگ،** B: **سرشاخه جوان آلوده به بلاست، بر گرفته از** (Mirik *et al*, 2005)، C: **دمبرگ آلوده به بلاست همراه با خشکیدگی و پیچیدگی برگ، برگرفته از** (Reuther, 1989).

۲-۲- کنترل بیماری بلاست مرکبات

در شمال کشور به علت شرایط اقلیمی، بیماری بلاست مرکبات خسارت‌های فراوانی به باغات مرکبات وارد می‌کند. برای کنترل این بیماری احداث باغ در بادپناه[1] و یا استفاده از گیاهان بادشکن[2] در حاشیه باغ، حذف شاخه‌های آلوده و محلول پاشی درختان آلوده با ترکیب بوردو[3] توصیه می‌شود (Reuther, 1989).

---

[1] Leeward
[2] Windbreak
[3] Bordeaux Mixture

برای کاهش خسارت بیماری و نیز جهت کاهش مصرف سموم که خود نیز دارای اثرات مضر زیست‌محیطی می‌باشند، یافت عوامل میکروبی جهت کنترل بیولوژیک این بیماری، بسیار ارزشمند و اقتصادی خواهد بود. برای کنترل بیماری‌های حاصل از سودوموناس‌ها از روش‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. اما کاربرد هر روش ضمن فواید، معایبی نیز با خود به همراه دارد. برای مثال، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها صرف نظر از گران بودن، خطر افزایش مقاومت در بین میکروب‌ها را نیز در پی خواهد داشت، از این رو در بسیاری از کشورها مصرف آن محدود یا ممنوع شده است (Gnanamanickam, 2006). همچنین مصرف مداوم سموم مسی، ضمن خطر گیاه سوزی، امکان بروز جدایه‌های مقاوم را نیز به همراه دارد (Gnanamanickam, 2006). به غیر از این روش‌های کنترل، استفاده از ارقام مقاوم، استفاده از ترکیبات شیمیایی و رعایت بهداشت باغی، استفاده از کنترل بیولوژیکی نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

با توجه به اهمیت و خسارت این بیماری در شمال کشور تاکنون در زمینه کنترل بیولوژیک این بیماری در ایران گزارش‌های اندکی وجود دارد. در بررسی بیکی و همکاران (۲۰۱۲) سعی شد تا از باغات مرکبات شمال کشور، مخمرهایی جداسازی و معرفی شوند که دارای توان بیوکنترلی قابل قبولی علیه بیمارگر بلاست داشته باشند. بررسی بیکی و همکاران، در شرایط گلخانه بر روی نارنج، علیه یک جدایه از باکتری بیماریزای *Pseudomonas syringae* صورت گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که مخمرهای *Sporobolomyces ruberrimus*، *Cryptococcus albidus*، *C. magnus*، *Rhodotorula* sp. به عنوان آنتاگونیست‌های برتر شناسایی شدند و گونه *S. ruberrimus* نیز بیماری را بهتر از سایر گونه‌ها کنترل نمود. همچنین در بررسی علیمی و جهان تیغ (۲۰۱۳) استفاده از ترکیبات طبیعی باکتری‌کش که برخی از این ترکیبات در عصاره گیاهان دارویی بومی یافت می‌شوند مورد بررسی قرار گرفت. این گیاهان دارویی شامل ریحان (*Ocimum basilicum*)، پونه (*Mentha pulegiu*)، رزماری (*Rosmarinas officinalis*)، اسطوخودوس (*Lavanduia anyustifolia*)، آویشن (*Thymus persicus*) و گزنه (*Urtica Dioica*) بودند. اثر این عصاره‌ها در میزان وسعت هاله بازدارندگی در محیط کشت آگار غذایی[1] در مقابله با باکتری بیماری‌زای *P. viridiflava* با یکدیگر و در مقابل سم اکسی‌کلرورمس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت میانگین بالاترین میزان بازداری به ترتیب مربوط به

---

[1] Nutrient Agar