بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

ردیابی عوامل باکتریایی سوختگی برگی لوبیا در استان های لرستان، مرکزی و همدان

پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

محمد قبادی علمی

استاد راهنما

دکترمسعودبهار

1393

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی آقای محمد قبادی علمی

تحت عنوان

ردیابی عوامل باکتریایی سوختگی برگی لوبیا در استان های لرستان، مرکزی و همدان

در تاریخ 93/10/14 توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

1- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر مسعود بهار
2- استاد مشاور پایان نامه	دکتربهرام شریف نبی
3- استاد داور	دکتر امیر مساح
4- استاد داور	دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر محمد مهدی مجیدی

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که توفیق آموختن و تفکر عطا فرمود.

از پدر، مادر و برادر عزیزم که مرا در تمام مراحل زندگی همراهی کرده و همواره پشتیبانم بوده اند نهایت سپاس و قدردانی را دارم.

از استاد راهنمای فرهیخته، بزرگوار و دلسوزم جناب دکتر مسعود بهار به خاطر تمامی زحمات، همراهی ها و آموختن اصول ارزشمند علمی و اخلاقی که همواره تا آخر عمر به خاطر خواهم داشت کمال تقدیر و تشکر را دارم. همچنین، از استاد مشاورم جناب دکتر بهرام شریف نبی به خاطر راهنمایی های ایشان سپاسگذارم. از اساتید ارجمند جناب آقای دکتر مساح و دکتر طباطبایی که زحمت داوری این پایان نامه را به عهده گرفته و با نظرات ارزشمند خود مرا در تصحیح این پایان نامه یاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از دوستان خوبم آقایان آبخشت، راغبی، غلامی، مهاجر و میرزایی و خانم ها چوپان نژاد، حقیقی و محمدپور و دانشجویان ارشد ورودی ۹۰ و ۹۲ بیماری شناسی، ۹۱ بیوتکنولوژی و ۹۲ دکتری بیماری شناسی گیاهی که لحظات خوبی را در کنارشان گذراندم سپاسگزارم و یاد و خاطره شان همواره در ذهنم خواهد ماند.

از آقایان مهندس حسینی، مهندس رخشانی، مهندس محمدی، رحمتی و عزیزی به خاطر تمامی زحماتشان در تمامی مراحل انجام این تحقیق صمیمانه تشکر می کنم.

محمد قبادی

بهمن 1393

دانشگاه صنعتی اصفهان

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به

آنان که همواره بدون هیچ چشم داشتی همواره در کنارم بوده و هستند

به ویژه

استاد علم و اخلاق جناب دکتر مسعود بهار

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب..... هشت

فهرست شکل ها..... چهارده

فهرست جداول..... هفده

چکیده..... 1

فصل اول: **مقدمه و بررسی منابع**

1-1- معرفی محصول.....2

1 -2-آفات و بیماری های مهم لوبیا.....3

1-3- تاریخچه و انواع بیماری های مهم باکتریایی لوبیا.....4

1-3-1- بیماری سوختگی معمولی لوبیا.....4

1-3-1-1- تاریخچه وقوع بیماری سوختگی لوبیا.....5

1-3-1-2- خصوصیات باکتری شناسی عامل سوختگی باکتریایی لوبیا.....6

1-3-1-3- آزمون بیوشیمیایی برای Xap و Xff.....6

1-3-1-4-نحوه ورود Xap به میزبان..... 7

1-3-1-1- جمعیت های اپی فیت باکتری عامل سوختگی معمولی لوبیا روی قسمت های هوایی گیاه.....8

1-3-1-6- دامنه میزبانی.....9

1-3-1-7- تنوع در عامل سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا.....10

الف- تنوع در بیماری زایی 10

ب- تنوع ژنتیکی در جدایه های عامل بیماری سوختگی لوبیا.....11

1-3-2- بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا.....12

1-3-2-1- بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا و خصوصیات باکتری شناسی آن.....13

1-3-2-2- علائم بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا.....14

1-3-3- عوامل بیمارگر جنس *Pseudomonas* در لوبیا 15

1-3-4- بیمار سوختگی هاله دار لوبیا 15

1-3-4-1- خصوصیات باکتری شناسی عامل بیماری سوختگی هاله دار لوبیا.....16

1-3-4-2- نحوه پراکنش.....16

1-3-4-3- توکسین تولیدی توسط باکتری سوختگی هاله دار لوبیا.....17

1-3-5- بیماری بلایت باکتریایی لوبیا 18

1-3-5-1- خصوصیات باکتری شناسی عامل بیماری بلایت باکتریایی لوبیا.....19

1-3-6- نکروز باکتریایی لوبیا.....19

1-3-6-1- خصوصیات باکتری شناسی 20

1-4- ردیابی عوامل باکتریایی آلوده کننده موجود در گیاه لوبیا.....21

1-4-1- استفاده از محیط های کشت انتخابی و نیمه انتخابی برای تفکیک باکتری ها 21

1-4-2- روش های سرولوژیکی 23

1-4-3- روش های مبتنی بر PCR.....24

1-5- اهداف پروژه.....29

فصل دوم: **مواد و روش ها**

2-1- نمونه برداری از مزارع لوبیا برای جداسازی عامل بیماری 32

2-1-1- جدسازی باکتری های عامل بیماری از نمونه های آلوده لوبیا.....33
2-1-2- جداسازی عوامل باکتریایی از دانه های آلوده لوبیا 33
2-2- تعیین بیماری زایی جدایه های باکتریایی لوبیا 34
2-3- تزریق سوسپانسیون حاوی باکتری به غلاف لوبیا سبز.....34
2-4- واکنش فوق حساسیت جدایه ها در توتون 35
2-5- مطالعه مشخصات بیوشمیایی جدایه ها 35
2-6- آزمون تشخیص زانتومونادین 35
2-7- آزمون الیزای غیر مستقیم.....36
2-8- استخراج DNA از جدایه ها.....37
2-8-1- استخراج DNA به روش موری و تامسون.....37
2-8-2- استخراج DNA به روش یامچی و همکاران 38
2-8-3- استخراج DNA به روش جوشاندن 38
2-9- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز DNA در ژل آگارز.....39
2-10- واکنش زنجیره ای پلی مراز برای شناسایی جدایه های باکتریایی لوبیا.....39
2-10-1- مواد لازم برای انجام واکنش PCR برای Xff و Xap.....39
2-10-1-1- آغازگرهای اختصاصی 39
2-10-1-2- مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP) 40
2-10-1-3- بافر PCR.....40
2-10-1-4- کلرید منیزیم.....40

2-10-1-5- آنزیم Taq DNA Polymerase.....42

2-10-1-6- Master mix.....42

2-10-2- آماده سازی شرایط واکنش PCR.....42

2-10-3- مواد لازم برای انجام واکنش PCR برای شناسایی عمومی باکتری های *Pseudomonas*.....43

2-10-4- مواد لازم برای انجام واکنش PCR برای شناسایی باکتری *Curtobacteriumflaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.....44

2-11- الکتروفورز محصول PCR.....45

2-11-1- تعیین توالی نوکلئوتیدی.....45

2-12- بهینه سازی آزمون Duplex PCR.....46

2-13- تعیین میزان حساسیت PCR برای شناسایی باکتری های Xap و Cff.....47

فصل سوم: **نتیجه گیری و بحث**

3-1- نمونه برداری از مزارع آلوده و دارای علائم پژمردگی و سوختگی.....48

3-2- کشت نمونه های جمع آوری شده لوبیا.....52

3-3- جداسازی کلنی ها بر اساس مشخصات ظاهری کلنی و بیماری زایی 49

3-4- تفکیک جدایه های باکتریایی لوبیا بر اساس خصوصیات بیماری زایی، بیوشیمیایی و مولکولی.....56

3-4-1- جدایه های گروه I.....56

3-4-1-1- آزمون بیماری زایی جدایه های گروه I.....56

الف- آزمون بیماری زایی روی بوته لوبیا.....56

ب- آزمون بیماری زایی جدایه های گروه II روی غلاف لوبیا سبز.....57

3-4-1-4-2- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی جدایه های گروه I.....58

3-4-1-4-2- آزمایش الیزای غیرمستقیم برای شناسایی باکتری های Xap موجود در تراوشات باکتریایی 62

3-4-1-4-4- استفاده از روش PCR برای شناسایی دقیق باکتری Xap.....63

الف- استخراج DNA.....63

ب- روش های مولکولی مورد استفاده برای شناسایی باکتری های Xap و Xff.....64

ج- تعیین توالی نوکلئوتیدی جدایه های گروه I و بلاست آنها در بانک ژن.....66

3-4-2- جدایه های گروه II.....67

ج- تعیین توالی نوکلئوتیدی جدایه های گروه I و بلاست آنها در بانک ژن.....67

3-4-2-1-تست بیماری زایی جدایه های گروه II.....67

3-4-2-1-1- تزریق جدایه های گروه II به بوته لوبیا.....67

3-4-2-1-1- تزریق سوسپانسیون حاوی جدایه های گروه I به غلاف لوبیا سبز.....67

3-4-2-2- خصوصیات بیوشیمیایی گروه II.....69

3-4-2-3- اثبات زانتومونادین نبودن زردی کلنی های گروه II.....72

3-4-2-4- استفاده از روش های مولکولی برای شناسایی جدایه های گروه II.....73

3-4-2-5-- نتایج حاصل از توالی یابی جدایه های CA1، CB10 و CB11 و بلاست این توالی ها در بانک ژن.....76

3-4-3- جدایه های گروه III.....78

3-4-3-1- تست بیماری زایی جدایه های گروه III.....79

الف- تلقیح سوسپانسیون حاوی جدایه ها به بوته لوبیا.....79

بق- تزریق سوسپانسیون جدایه های گروه III به غلاف لوبیا سبز.....79

4-3 -3-2- شناسایی جدایه های گروه III با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی.....81

4-3 -3-3- استفاده از روش های مولکولی برای شناسایی باکتری های گروه III.....84

4-3 -3-4- بررسی توالی جدایه های PA1 و PO17 با استفاده از جستجوی بلاست بانک ژن.....85

5-3- شناسایی همزمان باکتری های Cff و Xap با استفاده از روش Duplex PCR.....90

7-3- تعیین حساسیت روش PCR برای شناسایی باکتری های Cff و Xap.....97

فصل چهارم: **نتیجه گیری کلی و پیشنهادات**

1-4- نتیجه گیری کلی 101

2-4- پیشنهادات.....106

پیوست 1: بافرها.....107

پیوست 2: محیط های کشت 109

منابع 114

چکیده انگلیسی 125

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل 3-1- علائم لکه برگی، سوختگی و خشکیدگی بوته ها در مزارعه ای در شهرستان خنداب استان مرکزی.....50

شکل 3-2- علائم پژمردگی بوته های لوبیا در مزرعه ای در روستای ایجان- جاورسیان استان مرکزی 50

شکل 3-3- ظهور لکه های آبسوخته همراه با هاله ای زرد روی برگ های بوته لوبیای مبتلا به بیماری لکه برگی باکتریایی....51

شکل 3-4- لکه های آب سوخته ریز روی غلاف لوبیا از مزرعه ای در خنداب استان مرکزی.....51

شکل 3-5- دانه های لوبیای جمع آوری شده از بوته های مبتلا به لکه برگی و پژمردگی.....52

شکل 3-6- الف) ترشحات باکتریایی(ooze) خارج شده از ساقه. ب) ترشحات خارج شده از دم برگ های دارای علائم آلودگی پژمردگی و لکه برگی.....53

شکل 3-7- تصویر کلنی جدایه های گروه I، II و III.....56

شکل 3-8- بیماری زایی جدایه گروه I در بوته لوبیا 20 روز پس از تلقیح با سوسپانسیون حاوی باکتری.....58

شکل 3-9- غلاف های لوبیای سبز پنج روز پس از تزریق جدایه Xap(شاهد مثبت) و T(جدایه گروه I) 58

شکل 3-10- تصویر مربوط به اوج جذب باکتری های Xap(شاهد مثبت) (A) و جدایه XA1(B) به عنوان جدایه گروه I...59

شکل 3-11- کشت جدایه های گروه I روی محیط حاوی تیروزین جهت مشاهده تولید ملانین.....61

شکل 3-12-تصویر ژل آگارز 1/2% TBE مربوط به واکنش PCR برای تکثیر قطعه 730bp جدایه های گروه I توسط جفت آغازگر X4c-F/X4e-R.....65

شکل 3-13- تصویر ژل آگارز 1/2% TBE وباند تکثیر شده برای باکتری Xff .در بین جدایه های گروه I.....65

شکل 3-14- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه XA1 با توالی جدایه FO681495 در بانک ژن.....66

شکل 3-15- مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه XA1 با جدایه FO681495.....66

شکل 3-16- بیماری زایی جدایه های باکتریایی گروه II روی بوته لوبیا.....68

شکل 3-17- تصویر بیماری زایی سوسپانسیون تزریق شده حاوی جدایه های گروه II به غلاف لوبیا.....69

شکل 3-18-تصویر مربوط به کلنی های گروه II روی محیط NBY(سمت چپ تصویر) و NAS(تصویر سمت راست.....72

شکل 3-19- تصویر مربوط به اسپکتروفتومتری نمونه های Xap(A)، CA1(B) و CB11(C).....73

شکل 3-20- تصویر ژل آگارز 1/2% با بافر TBE مربوط به واکنش PCR برای شناسایی باکتری های Cff در بین جدایه های گروه دو.....76
شکل 3-21- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه های CA1، CB10 و CB11 در بانک ژن.....77
شکل 3-22- همردیف سازی توالی جدایه های CA1، CB10 و CB11 با توالی های مربوط به باکتری Cff موجود در بانک ژن با شماره ژن AJ307048، AJ307050 و AJ307051.....77
شکل 3-23- تصویر بیماری زایی جدایه ی PO17 روی بوته و غلاف لوبیا.....80
شکل 3-24- بیماری زایی جدایه PO17 روی غلاف لوبیا سبز شش روز پس از تزریق.....81
شکل 3-25- تصویر مربوط به کلنی های جدایه های PO17، PA1، PO18 و PK10روی محیط های NAE.....84
شکل 3-26- توالی های تکثیر شده جدایه های گروه III با استفاده از جفت آغازگر عمومی-Ps-for/Ps-rev.....85
شکل3-27- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه PO17 در بانک ژن.....87
شکل 3-28- نتایج حاصل از بلاست توالی جدایه PA1 در بانک ژن.....88
شکل 3-29- مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه ی PO17 پس از همردیف سازی با توالی جدایه K8/A1 و LPPA 264.....88
شکل 3-30- مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه PA1 با جدایه های CL-07 و IARI HHS1- 33-1.....89
شکل 3-31- مقایسه توالی نوکلئوتیدی جدایه PA1 با جدایه های CL-07 و IARI HHS1- 33-1استفاده از نرم افزار CLCبرای هم ردیف سازی (Alignment)، توالی نوکلئوتیدی جدایه های PA1 با توالی جدایه های IARI HHS1-33-1 و CL-07.....90
شکل3-32- باندهای های تکثیر شده با جفت آغازگر Cff-For2/Cff-Rev4 مربوط به باکتری Cff در نمونه های لوبیای مشکوک به آلودگی همزمان با Cff و Xap.....92
شکل 3-33- قطعات تکثیر شده با جفت آغازگر X4c-F/X4e-R مربوط به نمونه های انتخاب شده مشکوک به آلودگی مخلوط.....93
شکل 3-34- قطعات باندهای تکثیر شده از عصاره حاوی تراوشات باکتریایی آب مربوط به جفت آغازگرهای اختصاصی باکتری های Cff و Xap در واکنش Duplex PCR.....94
شکل 3-35- باندای های تکثیر شده با جفت آغازگر های اختصاصی باکتری های Cff و Xap در Duplex PCR پس از استخراج DNA از باکتری های رشد کرده در محیط NB.....94

شکل 3-36- توالی های تکثیر یافته جدایه CA1 در رقت های مختلف با جفت آغازگر Cff-For2/Cff-Rev4.....98

شکل 3-37- توالی های تکثیر یافته جدایه Xap در رقت های مختلف با جفت آغازگر X4c-F/X4e-R.....98

شکل 3-38- تصویر مربوط به Duplex PCR در رقت های متفاوت دو باکتری Xap و Xap با استفاده از جفت آغازگرهای Cff-For2/Cff-For4 و X4c-F/X4e-R.....99

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول 2-1- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی Xff و Xap.....40

جدول 2-2- اجزای واکنش PCR مربوط به جفت آغازگر Xf1/Xf2.....40

جدول 2-3- برنامه دمایی مربوط به جفت آغازگر X4c/X4e و Xf1/Xf2.....41

جدول 2-4- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی عمومی باکتری های سودوموناس.....43

جدول 2-5- اجزای واکنش مربوط به جفت آغازگر Ps-for و Ps-rev.....43

جدول 2-6- برنامه دمایی مربوط به جفت آغازگر *Pseudomonas*.....44

جدول 2-7- مشخصات آغازگر های مورد استفاده برای شناسایی باکتری Cff.....44

جدول 2-8- برنامه دمایی مربوط به جفت آغازگر Cff.....45

جدول 2-9- اجزای واکنش PCr مربوط به آغازگرهای Cff و Xap در واکنش Duplex PCR.....46

جدول 2-10- برنامه دمایی مربوط به جفت آغازگر های Cff و Xap در واکنش Duplex PCR.....47

جدول 3-1- مشخصات جدایه های باکتریایی به دست آمده از نمونه های مبتلا به لکه برگی و پژمردگی لوبیا مربوط به گروه I.....60

جدول 3-2- مشخصات جدایه های باکتریایی به دست آمده از نمونه های مبتلا به لکه برگی و پژمردگی لوبیا مربوط به گروه II.....71

جدول 3-3- مشخصات بیوشیمیایی جدایه های گروه II.....75

جدول 3-4- مشخصات جدایه های باکتریایی به دست آمده از نمونه های مبتلا به لکه برگی و پژمردگی لوبیا مربوط به گروه II.....83

جدول3-5- مشخصات نمونه های انتخاب شده برای آزمون روش Duplex PCR.....96

چکیده

لوبیا به دلیل داشتن مقادیر بالای پروتیئن و انرژی، بعد از غلات و سیب زمینی از مهمترین محصولات کشاورزی به حساب می آید. بیماری های باکتریایی نظیر سوختگی معمولی لوبیا(*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*)،سوختگی هاله دار لوبیا (*Pseudomonas savastonoi* pv. *phaseolicola*) و پژمردگی باکتریایی لوبیا (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccufmaciens*) از عوامل محدود کننده تولید این محصول در بسیاری از مناطق کشت لوبیا در دنیا می باشند. در سالهای اخیر، بیماریهای لکه برگی و پژمردگی در مزارع لوبیای استان های لرستان و مرکزی، خسارات زیادی را به این محصول وارد کرده است که به ظن باکتریایی بودن، تشخیص عوامل ایجاد کننده این بیماری ها ضروری بود. جهت تعیین عوامل بیمارگر باکتریایی احتمالی در این مزارع، از گیاهان لوبیای واجد علایم لکه برگی و پژمردگی درمزارع مختلف استانهای مزبور نمونه برداری شد. از کشت نمونه های مزبور در محیط های کشت عمومی و اختصاصی57 جدایه باکتریایی به دست آمد. جدایه های مزبور با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی در سه گروه قرار متفاوت گرفتند. جدایه های باکتریایی گروه I گرم منفی بوده وکلنی های زرد شفاف مایل به لیمویی داشتند که بر اساس خصوصیات بیماری زایی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی(Xap)*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* تشخیص داده شدند. این جدایه ها با جفت آغازگر اختصاصی X4c-F/X4e-Rدر واکنش PCRیک باند730bp مربوط به Xap را تکثیر نمودند. به دلیل ناتوانی در تولید رنگدانه ملانین در محیط کشت و نیز عدم تکثیر باند 450bp با جفت آغازگر اختصاصی Xf1/Xf2، هیچ کدام از این جدایه ها *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*، تشخیص داده نشدند. جدایه های باکتریایی گروه II گرم مثبت بوده و روی محیط آگار غذایی (NA) کلنی های زرد مایل به کرم و یا صورتی داشتند. با انجام آزمون- های بیماری زایی و بیوشیمیایی جدایه های گروهII، تعلق این جدایه ها به باکتری (Cff) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccufmaciens* عامل پژمردگی باکتریایی لوبیا معلوم گردید. همچنین، این جدایه ها در واکنش PCR با جفت آغازگر اختصاصیCff-For2/Cff-Rev4، یک باند 306bp تکثیر نمودند. توالی یابی نوکلئوتیدی این باند و همردیف سازی آن با توالی های موجود در بانک ژن، شباهت 97 درصدی توالی این جدایه ها با جدایه های Cff موجود بانک ژن را مشخص کرد.جدایه های Cffبه دست آمده در این بررسی روی محیط NBYکلنی های زرد و صورتی کاروتنوئیدی داشتند. جدایه های باکتریایی موجود در گروه III به واسطه گرم منفی بودن و تولید ماده فلئورسنت در محیط King's B از بقیه مجزا شدند. پس از انجام آزمون های مختلف، بیشترین شباهت بیوشیمیایی برای یکی از جدایه ها با باکتری *P.viridiflava* به دست آمد و سایر جدایه ها نیز که توانایی بیماری زایی در غلاف و بوته لوبیا را نداشتند از دور آزمایشات حذف شدند. پس از تکثیر قسمتی از ناحیه 16S rDNAاین جدایه با جفت آغازگر Ps-For/Ps-Rev و توالی یابی قطعه آن معلوم شد که این جدایه ها به لحاظ ترادف نوکلئوتیدی نیز با جدایه *P.viridiflava* مشابهت کامل دارد. پس از تایید وجود دو باکتری Xapو Cffبه عنوان عوامل اصلی لکه برگی و پژمردگی در مزارع لوبیای استان های لرستان و مرکزی، به منظور به دست آوردن یک روش سریع، حساس و کم هزینه برای ردیابی همزمان دو باکتری در بذرهای آلوده، از روش Multiplex PCR، با به کارگیری جفت آغازگرهای اختصاصی باکتری های (Xf1/Xf2)Xap و Cff (Cff-For2/Cff-Rev4)، استفاده شد که به ترتیب منجر به تکثیر باندهای 306bp و 730bp گردید. به این ترتیب معلوم شد که Multiplex PCR می تواند یک روش کارآمد، سریع و کم هزینه برای ردیابی همزمان باکتری های Cffو Xap در بذر لوبیای آلوده باشد.

کلمات کلیدی: لوبیا، واریانت صورتی، واریانت زرد، حساسیت PCR، Multiplex PCR

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

1-1- معرفی محصول

حبوبات ازجمله محصولاتی هستند که ارزش غذایی زیادی داشته و بذرهای خشک و رسیده آنها به لحاظ قابلیت نگهداری، از مهمترین منابع غذایی سرشار از پروتیین به شمار می‌روند[11 ،3]. این گیاهان به علت دارابودن 32-18 درصد پروتئین، 65-53 درصد کربوهیدرات و میزان قابل توجهی کلسیم و آهن در تامین نیازهای تغذیه‌ای انسان دارای اهمیت می‌باشند. به لحاظ زراعی نیز، حبوبات در تقویت و حاصل خیزی خاک نقش ارزشمندی دارند[10، 8، 25]. سطح زیرکشت و تولید جهانی حبوبات طی دوره‌ی 2007-2000 با 12/5 درصد افزایش از 65/5 میلیون هکتار به حدود 73/3 میلیون هکتار رسیده است. قاره ی آسیا باسطح کشتی معادل 37 میلیون هکتار بیش از 50 درصد از کل سطح زیر کشت حبوبات در جهان را در انحصار خود دارد[8]. در ایران، در حدود یک میلیون هکتار از اراضی زراعی به کشت حبوبات اختصاص دارد که معادل 500 هزار تن محصول تولید می کند. استانهای لرستان ، مرکزی، چهارمحال و بختیاری ، فارس، زنجان ، اصفهان و آذربایجان شرقی مهمترین مناطق کشت این محصولات می باشند[4، 3].

در بین حبوبات، لوبیا به لحاظ وسعت کشت و مصرف غذایی جهانی از اهمیت بیشتری برخوردار است ومقدار 25/5 میلیون تن از تولید جهانی حبوبات را به خود اختصاص داده است[4، 8]. لوبیا گیاهی است علفی، یکساله، دارای ساقه بندبند، خود گشن و از نظر کروموزومی 2n=22 ، که گونه های مختلف آن از نظر شکل بوته، طول، غلاف، تعداد دانه در غلاف و اندازه ی دانه بایکدیگر متفاوت می باشند. لوبیا با اسم علمی .*Phaseolus vulgaris* L و با نام انگلیسی commonbean از راسته ی *Rosales*، خانواده ی *Fabaceae* و زیر خانواده ی*Papilionidae* می باشد و از نظر الگوی رشدی به چهارتیپ بوته‌ای، بوته‌ای با کمک پیچ، نیمه رونده خوابیده و کاملا رونده تقسیم می شود[9،14].لوبیا گیاهی است حرارت دوست[1] و در مناطق دارای آب و هوای گرم مانند آمریکای جنوبیبه خوبی رشد می‌نماید. با این حال، این محصول در مناطق معتدل و سردسیر نیز قابل کشت بوده و به خوبی محصول می‌دهد، با این تفاوت که در مناطق گرمسیر مانند آمریکای‌جنوبی بیش از یکبار در سال می‌توان آنرا کشت کرد. اصولاً چون لوبیا یک کشت بهاره می‌باشد، از نظر آب و هوا دارای محدودیت چندانی نیست و در اکثر نقاط کشور می‌توان آن را کشت نمود[10، 8]. حداقل دما برای جوانه زدن لوبیا بین 12-10درجه سلیسوس و دمای بهینه برای رشد و تکامل لوبیا 20تا 28درجه سلسیوس بوده و درمجموع دمای موردنیاز برای رشد طبیعی آن از $1500C^{\circ}$ تا $3000C^{\circ}$ می‌باشد. مراحل رشد و نمو لوبیا به دو مرحله اصلی شامل پنج مرحله‌ی رویشی و پنج مرحله‌ی زایشی تقسیم می شود. فاز رویشی دارای پنج مرحله‌ی اصلی جوانه زنی، سبز شدن، ظهور برگ های اولیه، پیدایش اولین سه برگچه ای و ظهور سومین سه برگچه‌ای می باشد و فاز زایشی شامل پنج مرحله ی غنچه دهی، گل‌دهی، تشکیل غلاف، پرشدن غلاف و مرحله ی رسیدگی است[9] .

1-2- آفات و بیماری های مهم لوبیا

لوبیا نیز همانند سایر محصولات کشاورزی مورد هجوم آفات و بیماری‌های مختلفی قرار می گیرد که از جمله ی این آفات می توان به مگس لوبیا(*Hymelia cilicrura*) ، مگس سفید(*Bemisia tabaci*) و شته

1-Termophilus

باقلا(*Aphis faba*) اشاره کرد[9]. عوامل قارچی مهمی نظیر آنتراکنوز لوبیا(*Colletotrichum lindemathianum*)، پژمردگی آوندی (*Fusarium oxysporum* fsp. *phaseoli*)، لکه‌برگی آلترناریایی (*Alternaria* spp.)، زنگ(*Uromyces appendiculatus*)،مرگ گیاهچه لوبیا (*Pythium* spp.) و ویروس هایی مانند ویروس موزاییک زرد لوبیا(*Bean yellow mosaic virus*)، ویروس موزاییک یونجه(*Alfalfa mosaic virus*) و ویروس موزاییک معمولی لوبیا(*Bean common mosaic virus*) این گیاه را مورد حمله قرار می دهند[43، 44]. سوختگی معمولی لوبیا (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*)، سوختگی هاله‌دار لوبیا(*Pseudomonas savastonoi* pv.*phaseolicola*)، لکه قهوه ای باکتریایی لوبیا (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) و پژمردگی باکتریایی لوبیا (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) از جمله بیماری های باکتریایی می باشند که به محصول لوبیا خسارت زیادی وارد می کنند[36، 44، 103].

1-3- تاریخچه و انواع بیماری های مهم باکتریایی لوبیا

1-3-1- بیماری سوختگی معمولی لوبیا

بیماری سوختگی معمولی لوبیا یک بیماری برگی بوده و باعث ایجاد خسارت روی برگ، ساقه، غلاف و دانه این گیاه می شود[39]. علائم بیماری به صورت لکه های آب سوخته کوچک روی برگ دیده می شود که به مرور زمان به یکدیگر متصل شده و پس از نکروز لکه ها، برگ ها به صورت کامل خشک می شوند. عامل بیماری پس از تشکیل غلاف باعث ایجاد لکه های آب سوخته روی آن می شود که رنگ لکه ها به مرور زمان تغییر کرده، قهوه ای شده و بعد از مدتی این غلاف ها خشک و چروکیده می شوند. روی دانه‌ها نیز بسته به رقم لوبیا تغییر رنگ های مختلفی دیده می شود، به طوری که دانه‌ها عموما به رنگ قهوه ای مایل به خاکستری و زرد درآمده و چروکیده می شوند[19]. عامل بیماری روی ساقه نیز باعث ایجاد لکه های قهوه ای کشیده ای می شود[39، 100].