بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای فرید بیکی فیروزجاهی رساله دکتری خود را با عنوان: " بررسی موقعیت تاکسونومیکی عوامل بیماری بلاست مرکبات و ارزیابی قابلیت کنترل بیولوژیکی بیماری به وسیله مخمرهای رورست مرکبات" در تاریخ ۹۱/۰۸/۰۸ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا بررسی کرده و پذیرش آن‌را برای دریافت درجه دکتری تخصصی (Ph.D) تائید می نمایند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	ابراهیم محمدی گل تپه	استاد	
۲- استاد راهنمای دوم	حشمت الله رحیمیان	استاد	
۳- استاد مشاور اول	مسعود شمس بخش	دانشیار	
۴- استاد مشاور دوم	علی برزگر	استادیار	
۵- استاد ناظر	سید علی موسوی	دانشیار	
۶- استاد ناظر خارجی	اسلام مجیدی هروان	استاد	
۷- استاد ناظر خارجی	علی علی‌زاده علی‌آبادی	استادیار	
۸- استاد ناظر	ناصر صفایی	دانشیار	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	ناصر صفایی	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب فرید بیکی فیروزجایی دانشجوی رشته بیماری شناسی گیاهی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۶ مقطع دکتری دانشکده کشاورزی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدین‌وسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: فرید بیکی

تاریخ: ۹۱/۸/۱۲

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، میتنبخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد/ رسالهٔ دکتری نگارنده در رشته بیماری شناسی گیاهی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر ابراهیم محمدی گل‌تپه و دکتر حشمت الله رحیمیان، مشاورهٔ جناب آقای دکتر مسعود شمس بخش و مشاورهٔ جناب آقای دکتر دکتر علی برزگر از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ۴ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ۶ اینجانب فرید بیکی دانشجوی رشته بیماری شناسی گیاهی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: فرید بیکی

تاریخ و امضاء: ۹۱/۸/۱۲

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری

رشته: بیماری‌شناسی گیاهی

گرایش: پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی

عنوان رساله:

بررسی موقعیت تاکسونومیکی عوامل بیماری بلاست مرکبات و ارزیابی قابلیت کنترل بیولوژیکی بیماری به وسیله مخمرهای رورست مرکبات

نام دانشجو:

فرید بیکی فیروزجاهی

استاد راهنما (اصلی) :

دکتر ابراهیم محمدی

استاد راهنما (دوم) :

دکتر حشمت الله رحیمیان

استاد مشاور (اول):

دکتر مسعود شمس بخش

استاد مشاور (دوم):

دکتر علی برزگر

مهر ۱۳۹۱

تقدیم به استاد ارجمند:

دکتر حشمت‌الله رحیمیان

تقدیر و تشکر

حمد بی حد و مدح بی عد، محبوبی را که فیض ساحت فیاض او بار دیگر یاری نمود تا تحقیق حاضر به اتمام رسد. اینک بر خود لازم می‌دانم از زحمات بی‌دریغ گرامیانی که مدد لطف آنان، شامل حال اینجانب شده‌است، تشکر و قدردانی نمایم:

جناب آقای دکتر ابراهیم محمدی‌گل تپه که زحمت راهنمایی قسمتی از این پایان‌نامه را تقبل فرمودند.

تقدیر خویش را سر صدق و اخلاص تقدیم می‌دارم به محضر استاد بزرگوار جناب آقای دکتر حشمت الله رحیمیان که با وسعت نظر و تذکرات مفیدشان مرا در کسب علم گیاه‌پزشکی در طی دوره کارشناسی و نیز ادامه این ره در طی مراحل کارشناسی ارشد و به خصوص دوره دکتری، رهنمایی بی‌نظیر برای اینجانب بوده‌اند.

جناب آقای دکتر مسعود شمس‌بخش و نیز آقای دکتر علی برزگر که زحمت مشاوره این رساله را تقبل نموده و نیز در فراهم نمودن بخشی از امکانات، یاری رساندند.

همکاران اینجانب در موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور(آزمایشگاه آمل)، آقای مهندس همت دادپور ریاست محترم آزمایشگاه به همراه سایر همکاران (آقایان مهندس رجب شکری، محمود حسن‌زاده، مهدی کرد، شعبان باقری، مرتضی ربیعی، عباس قاسمی و خانم مهندس فاطمه باقری)

از محققین بخش میکروبیولوژی دانشگاه UIB کشور اسپانیا نظیر آقایان دکتر جرج لالوکات، دکتر آنتونی بوسکت، خانم‌ها دکتر النا گارسیا والدس، دکتر مارگاریتا گومیلا و دکتر جوآنا پی‌نا

در نهایت سپاس فراوان و بی‌دریغ خود را نثار پدر، مادر، همسر و فرزند عزیزم می‌نمایم که همواره مشوق و پشتیبان بنده بوده‌اند.

از تمامی بزرگوارانی که در راه به ثمر رسیدن این تحقیق اینجانب را یاری نموده ولی نامشان در این قسمت ذکر نشده‌است، ضمن عرض پوزش، از لطف و محبت‌شان تشکر و قدردانی می‌گردد.

فرید بیکی فیروزجاهی

چکیده

بیماری بلاست مرکبات یکی از مهمترین بیماری‌های مرکبات در استان‌های شمالی کشور می‌باشد که به وسیله باکتری سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) ایجاد می‌شود و در شرائط اقلیمی مساعد، خسارت‌های قابل توجهی را به باغات مرکبات، وارد می‌سازد. به منظور بررسی پراکنش گونه‌های عامل یا همراه بیماری در مناطق مختلف استان مازندران و مناطقی از استان‌های گیلان و گلستان و نیز بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی، جدایه‌های بیمارگر در سال‌های۸۹-۱۳۸۷ از درختان آلوده جمع‌آوری شدند. پس از جدا و خالص‌سازی و اثبات بیماری‌زائی روی برگ‌های نارنج (*Citrus aurantium*)، ۱۱۵ جدایه بیماری‌زا به‌دست آمد. بر اساس خصوصیات بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی، جدایه‌ها در ۱۶ گروه مجزا قرار گرفتند. جدایه‌ها در تولید لوان، لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی و آرژی‌نین دی‌هیدرولاز متغیر، در ایجاد فوق حساسیت در توتون مثبت و در آزمون تولید اکسیداز منفی بودند. اعضای تعدادی از گروه‌ها علی‌رغم داشتن توانائی لهانیدن برش سیب‌زمینی، شباهت چندانی با *P. viridiflava* نداشتند. بر پایه ویژگی‌های بیوشیمیائی، جدایه‌های گروه‌های VI الی XI (حدود ۳۹٪ کل جدایه‌ها)، به عنوان جدایه‌های *P. syringae*، و جدایه‌های گروه XII (حدود ۳٪ کل جدایه‌ها)، به عنوان جدایه‌های *P.viridiflava*، شناسائی شدند. برای بررسی تکمیلی با روش‌های مولکولی، قسمتی از دو ژن خانه دار *rpoD* و *gyrB* همراه با 16S rDNA برای جدایه‌های مورد بررسی تعیین ترادف گردید. در درخت فیلوژنی ترسیمی، جدایه‌ها در ۱۷ گروه مجزا قرار گرفتند. گروه‌های I-V و XIV، VI-XIII و XV-XVII به ترتیب در شاخه‌های *P. fluorescens*، *P. syringae* و *P.putida* قرار داشتند. تنوع جدایه‌های مورد بررسی بر پایه انگشت نگاری ژنتیکی حاصل از BOX-PCR و ERIC-PCR و نیز تلفیق داده‌های آن‌دو نشان داد که جدایه‌ها به‌ترتیب در سطح شباهت ۳۱، ۳۳ و ۴۱ درصد، در ۱۶، ۱۵ و ۱۹ گروه مجزا قرار می‌گیرند. نتایج انگشت‌نگاری ژنتیکی نشان می‌دهد که این آزمون قادر است جدایه‌ها را در سطح گونه و پایین‌تر از یکدیگر تفکیک نماید. برای بررسی امکان کنترل بیمارگر با کمک مخمرها، از باغات مرکبات شمال کشور، مخمرهائی جداسازی شدند و ارزیابی توان بیوکنترلی آن‌ها در شرایط گلخانه با مایه‌زنی یک جدایه *P. syringae* بر روی رقم نارنج صورت گرفت. پاشش مخمر سه بار و به فواصل دو روزه انجام شد و پس از آن، مایه‌زنی بیمارگر صورت گرفت. تجزیه واریانس آزمایش براساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن اجرا شد. برای شناسائی جدایه‌های برتر، ناحیه ITS آن‌ها با به کارگیری پرایمرهای ITS1 و ITS4 تکثیر و تعیین ترادف شد. با مقایسه نتایج در پایگاه اینترنتی NCBI، مخمرهای برتر به عنوان *Sporobolomyces ruberrimus* ، *Cryptococcus albidus* ، *C. magnus* و *Rhodotorula sp.* شناسائی شدند. *S. ruberrimus* بیماری را بهتر از سایر گونه‌ها کنترل کرد.

کلمات کلیدی: بلاست مرکبات، کنترل بیولوژیک، *Pseudomonas*، rep-PCR، *rpoD*، *gyrB*، 16S rDNA، *Sporobolomyces, Cryptococcus, Rhodotorula*.

فهرست مطالب

۱. مقدمه ۱

۲. مروری بر مطالعات انجام شده ۵

۲-۱. بیماری بلاست مرکبات ۵

۲-۲.کنترل بیولوژیک بیماری بلاست مرکبات با استفاده از مخمر ۱۹

۳. مواد و روش‌ها ۲۴

۳-۱. نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌ها ۲۴

۳-۲. آزمون بیماریزایی در گلخانه و در طبیعت ۲۵

۳-۳. آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های عامل بلاست مرکبات ۳۰

۳-۴. بررسی‌های ژنوتیپی جدایه‌های عامل بلاست مرکبات ۳۰

۳-۴-۱. مواد مورد استفاده برای آزمون‌های مولکولی ۳۰

۳-۴-۲. استخراج DNA ۳۱

۳-۴-۳. انگشت نگاری ژنتیکی ۳۱

۳-۴-۴. الکتروفورز ۳۲

۳-۴-۵. تکثیر و تعیین ترادف برخی از ژن‌های جدایه‌ها ۳۲

۳-۴-۵-۱. تکثیر ژن 16S rDNA و *gyrB* ۳۲

۳-۴-۵-۲. تکثیر ژن *rpoD* ۳۳

۳-۴-۵-۳. تخلیص محصول PCR ۳۳

۳-۴-۵-۴. تکثیر ژن‌ها برای تعیین ترادف ۳۳

۳-۴-۶. بررسی فیلوژنتیکی ۳۴

۳-۵. ارزیابی قابلیت کنترل بیولوژیکی بیماری به وسیله مخمرهای رورست مرکبات ۳۴

۳-۵-۱. جداسازی مخمرها ۳۴

۳-۵-۲. ارزیابی توان بیوکنترلی مخمر در آزمایشگاه ۳۵

۳-۵-۳. ارزیابی توان بیوکنترلی مخمر در گلخانه ۳۵

۳-۵-۳-۱. تهیه مایه تلقیح (اینوکلوم) مخمر ۳۵

۳-۵-۳-۲. آماده‌سازی گیاه برای آزمون ۳۵
۳-۵-۳-۳. تهیه باکتری بیمارگر ۳۶
۳-۵-۳-۴. بررسی امکان القاء مقاومت در گیاه با پاشش سوسپانسیون مخمر ۳۶
۳-۵-۳-۵. بررسی امکان ممانعت از پیشرفت بیماری در روش تزریق متقابل ۳۶
۳-۵-۴. شناسائی مخمرهای مفید ۳۹
۳-۵-۴-۱. بررسی خصوصیات فنوتیپی مخمرها ۳۹
۳-۵-۴-۲. بررسی خصوصیات ژنتیکی مخمرها ۳۹
۳-۵-۴-۲-۱. تکثیر ژن ITS برای تعیین ترادف ۳۹
۳-۵-۴-۲-۲. تخلیص محصول PCR ۳۹
۳-۵-۴-۲-۳. تکثیر ژن‌ها برای تعیین ترادف ۳۹
۴. نتایج ۴۰
۴-۱. بررسی جدایه‌های عامل بیماری بلاست مرکبات ۴۰
۴-۱-۱. ویژگی‌های فنوتیپی ۴۰
۴-۱-۲. بیماری‌زایی ۴۵
۴-۱-۳. بررسی‌های ژنوتیپی ۴۶
۴-۱-۳-۱. انگشت‌نگاری ژنتیکی ۴۶
۴-۱-۳-۲. تعیین ترادف نواحی نیمه حفاظت شده ژنوم ۵۲
۴-۲. کنترل بیولوژیکی با کمک مخمرها ۶۷
۴-۲-۱. روش پاشش مخمر بر روی نهال ۶۷
۴-۲-۲. روش تزریق متقابل مخمر و باکتری در برگ ۶۸
۴-۲-۳. شناسائی مخمرهای موثر بر اساس خصوصیات ژنتیکی ۶۹
۴-۲-۴. بررسی خصوصیات فنوتیپی ۷۰
۵. بحث ۷۱
۶. فهرست مراجع ۸۸
۷. چکیده انگلیسی ۱۰۱

فهرست اشکال

شکل۱- علایم طبیعی بیماری بلاست بر روی برگ‌ها و سرشاخه‌های جوان پرتقال واشنگتن ناول ۲۵

شکل۲- مکان تزریق مخمر و بیمارگر بلاست مرکبات بر روی برگ نارنج در روش تزریق متقابل ۳۷

شکل۳ - حالت‌های مختلف پیشرفت بیماری بلاست مرکبات در تقابل با مخمر در برگ نارنج ۳۸

شکل۴- دندروگرام تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های باکتری‌های همراه با بیماری بلاست مرکبات شمال ایران، تشابه جدایه‌ها بر پایه ضریب تشابه ساده و رابطه آن‌ها بر اساس خوشه‌بندی میانگین‌های حسابی بی‌وزن (UPGMA) تعیین و منعکس گردیده است. گروه‌های هفده‌گانه از I تا XVII شماره‌گذاری شده‌اند ٤٤

شکل۵-گسترش سوختگی بر روی برگ‌های نارنج ۷، ۱۳ و ۱۹ روز، به‌ترتیب از چپ به راست، پس از مایه‌زنی و نگهداری نهال‌ها در شرایط طبیعی ٤٥

شکل۶– نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های سودوموناس‌های گروه V همراه با بیماری بلاست مرکبات با BOX-PCR در ژل آگارز ۱/۵٪، M: نشانگر جرم مولکولی(Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III)، C: شاهد منفی، P. r.: جدایه استاندارد*Pseudomonas rhodesiae* LMG 17764T ٤٧

شکل۷– شکل سه بعدی نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های سودوموناس‌های گروه I همراه با بیماری بلاست مرکبات با BOX-PCR، M: نشانگر جرم مولکولی (Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III، شرکت Bioron، آلمان) از ۵۰۰ بازی تا ۲ کیلو بازی، C: شاهد منفی، P. o.: جدایه استاندارد *P. orientalis* DSM 17489T ٤٧

شکل۸- دندروگرام ترسیم شده بر اساس شباهت *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان در مقایسه با یکدیگر و با برخی از جدایه‌های مرجع در BOX-PCR بر اساس ضریب تشابه ژاکارد تعیین و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است. ٤٨

شکل۹– نقوش قطعات حاصل از تکثیر DNA جدایه‌های گروه‌های I, II, III, IV, V, VI, VII. VIII, X, XIV, XV, XVII به‌همراه چند جدایه مرجع با کمک آزمون ERIC-PCR در ژل آگارز ۱/۵٪، M: نشانگر جرم مولکولی(Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III، شرکت Bioron، آلمان) از ۵۰۰ بازی تا ۲ کیلو بازی C: شاهد منفی. ٤٩

شکل۱۰- دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA از ارتباط جدایه‌های *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست مرکبات برپایه ضریب تشابه ژاکارد از نقوش قطعات تکثیر شده با ERIC-PCR با یکدیگر و با برخی از جدایه‌های مرجع *Pseudomonas*. ٥٠

شکل۱۱– دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA از ارتباط جدایه‌های *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست مرکبات برپایه ضریب تشابه ژاکارد از نقوش قطعات تکثیر شده با ERIC-PCR و BOX-PCR با یکدیگر و با برخی از جدایه‌های مرجع *Pseudomonas* ۵۱

شکل۱۲– تکثیر قطعه ۷۶۰ جفت بازی از ژن *rpoD* در PCR ده جدایه به عنوان نماینده از *Pseudomonas* های همراه بیماری بلاست مرکبات از مناطق شمالی کشور. M: نشانگر جرم مولکولی 1kb (محصول شرکت Biron، آلمان)، C: شاهد منفی ۵۲

شکل۱۳– تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی از ژن 16S rDNA در PCR، ۱۵ جدایه به عنوان نماینده از *Pseudomonas* های همراه بیماری بلاست مرکبات از مناطق شمالی کشور. M: نشانگر جرم مولکولی(Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III، شرکت Bioron، آلمان)، C: شاهد منفی ۵۳

شکل۱۴– تکثیر قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی از ژن*gyrB* در PCR یازده جدایه به عنوان نماینده از *Pseudomonas* های همراه بیماری بلاست مرکبات از مناطق شمالی کشور. M: نشانگر جرم مولکولی 1kb (محصول شرکت Biron، آلمان)، C: شاهد منفی ۵۳

شکل۱۵– ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست مرکبات در شمال کشور (جدایه‌های شماره ۱ تا ۱۵۰) با گونه‌های شناسایی شده سودوموناس بر اساس توالی ژن *rpoD*. دندروگرام به روش Neighbour-Joining ترسیم و ماتریکس فاصله بر اساس روش Jukes-Cantor با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap محاسبه شده است. *Cellvibrio japonicus* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تغییر۰/۰۵ نوکلئوتید در هر جایگاه است..... ٥٤

شکل۱۶- ارتباط فیلوژنتیکی نماینده جدایه‌های *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست مرکبات در شمال کشور (گروه‌های I-XVII) با جدایه‌های گونه‌های شناسایی شده سودوموناس بر اساس توالی ژن16S rDNA. دندروگرام به روش Neighbour-Joining ترسیم و ماتریکس فاصله بر اساس روش Jukes-Cantor با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap محاسبه شده است. *Cellvibrio japonicus* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تعداد ۰/۰۱ تغییرات نوکلئوتیدی در هر جایگاه است..... ۵۷

شکل۱۷- دندروگرام ترسیم شده به روش اتصال جدایه‌ها (Neighbour-Joining) بر پایه ماتریس فاصله محاسبه شده با ضریب جوکز-کانتور (Jukes-Cantor) با ۱۰۰۰تکرار Bootstrap در توالی ژن*gyrB* جدایه‌های *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست مرکبات در شمال کشور و منعکس کننده موقعیت آن‌ها در بین جدایه‌های گونه‌های نامگذاری شده *Pseudomonas*. *Cellvibrio japonicus* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تغییر ۰/۰۵ نوکلئوتید در هر جایگاه است ٦٠

شکل۱۸- ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست مرکبات در شمال کشور با یکدیگر و نیز با جدایه‌های گونه‌های نامگذاری شده جنس سودوموناس بر اساس ترادف‌های استنتاجی (Consensus sequence) ژن‌های16S rDNA، *rpoD* و *gyrB*. دندروگرام به روش Neighbour-Joining ترسیم گردیده و ماتریکس فاصله بر اساس روش Jukes-Cantor با ۱۰۰۰ Bootstrap تعیین شده است. *Cellvibrio japonicus* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تغییر ۰/۰۲ نوکلئوتید در هر جایگاه است ٦٣

شکل۱۹– ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas* همراه با بیماری بلاست مرکبات در شمال کشور با یکدیگر و نیز با جدایه‌های پاتووارهای نامگذاری شده جنس سودوموناس بر اساس ترادف‌های استنتاجی (Consensus sequence) ژن‌های 16S rDNA، *rpoD* و *gyrB*. دندروگرام به روش Neighbour-Joining با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap، ترسیم گردیده و ماتریکس فاصله بر اساس روش Jukes-Cantor تعیین شده است. *Pseudomonas aeroginosa* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تغییر ۰/۰۵ نوکلئوتید در هر جایگاه است..... ٦٦

شکل۲۰– مقایسه کاهش گسترش بیماری بلاست مرکبات ناشی از ۳ بار پاشش مخمر جدایه ۲ قبل از مایه زنی با بیمارگر(شکل راست) در مقایسه با پاشش آب قبل از مایه زنی با بیمارگر به عنوان شاهد(شکل چپ) بر روی نهال‌های نارنج..... ٦٧

شکل۲۱- مقایسه میانگین بازداری از گسترش بیماری بلاست مرکبات در اثر القاء مقاومت توسط ۳ بار پاشیدن مخمرهای مورد بررسی بر روی نارنج در فاصله‌های زمانی ۲ روزه قبل از تزریق بیمارگر جدایه ۶۳ باکتری *Pseudomonas* (بر حسب میلی‌متر مربع) و گروه‌بندی میانگین آن‌ها بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪..... ٦٨

شکل۲۲- مقایسه میانگین بازداری از گسترش بیماری بلاست مرکبات توسط مخمرهای مورد بررسی در روش تزریق متقابل مخمر و بیمارگر جدایه ۶۳ باکتری *Pseudomonas* در برگ نارنج، بر اساس ایندکس گسترش بیماری..... ٦٩

شکل۲۳- قطعه تکثیر شده ITS در جدایه‌های مخمر، M نشانگر جرم مولکولی (Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III، شرکت Bioron، آلمان)، C: شاهد منفی (آب مقطر به‌جای DNA الگو)..... ٦٩

شکل ۲۴- مرفولوژی پرگنه گونه‌های مخمرموثر در کنترل بیولوژیکی بیماری بلاست مرکبات روی محیط کشت WL nutrient agar، به‌ترتیب عبارتنداز A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp. ٧٠

شکل۲۵- سلول‌های مخمرهای موثر در کنترل بیولوژیکی بیماری بلاست مرکبات با میکروسکوپ نوری، زمینه شفاف. طول خط نشانه ۱۰ میکرومتر است. A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp. ٧٠

فهرست جداول

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های *Pseudomonas* spp. به‌دست آمده از درختان آلوده به بلاست از استان‌های گیلان، مازندران و گلستان ۲۶

جدول۳- ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های باکتری جدا شده از نمونه‌های مرکبات دارای علایم بلاست در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان ۴۱

۱. مقدمه

مرکبات یکی از مهمترین محصولات کشاورزی در دنیا بوده که از نظر تولید جهانی آن، ایران جایگاه بالایی را در بین ده کشور اول تولید کننده دارا می‌باشد. بیماری‌های مختلف ویروسی، قارچی و باکتریائی سبب خسارت‌های قابل توجهی روی این گروه از مخصولات می‌شوند. بیماری بلاست مرکبات (Citrus Blast) از جمله بیماری شایع در اکثر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به استثنای مناطق گرمسیر می‌باشد (Whiteside *et al.*, 1989). این بیماری از کشورهای استرالیا، ژاپن، افریقای جنوبی، برخی از کشورهای حاشیه مدیترانه و آسیای مرکزی، امریکا و استرالیا گزارش شده است (Whiteside *et al.*, 1989). در شرائط اقلیمی شمال ایران، به دلیل وجود رطوبت بالا و دمای مناسب، بیماری بلاست خسارت قابل توجهی را بصورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها ایجاد می‌کند. عامل بیماری یک نوع باکتری با نام *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* معرفی شد (Whiteside *et al.*, 1989). این احتمال وجود دارد که باکتری عامل بیماری در بعضی از نقاط مازندران *P. s.* pv. *syringae* و در نواحی دیگری از استان *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder 1930) Dowson 1939 باشد (Shams-Bakhsh and Rahimian, 1997). در جنوب ایران، تاکنون گزارشی از وجود بیماری ارایه نشده است (Razinataj and Taghavi, 2004; Taghavi and Ziaee, 2003). در اوائل قرن ۲۰، جنسن(Jensen, 1909)، خصوصیات فیزیولوژیکی را به عنوان معیار اصلی برای تاکسونومی باکتری‌ها مطرح نمود. ویژگی‌هائی نظیر بیماری‌زائی و دامنه‌میزبانی، به عنوان یک معیار کمکی، در تعیین ویژگی‌های تاکسونومیکی مورد استفاده قرار گرفت (Palleroni, 2003). تا سال ۱۹۲۱، طبقه‌بندی گونه‌ها همچنان بر اساس خصوصیات فنوتیپی استوار بود، بطوری‌که در آن شرایط، سودوموناس‌ها به صورت باکتری‌هائی گرم منفی، میله‌ای، بدون اسپور و هوازی که به‌وسیله یک تاژک قطبی حرکت می‌کنند توصیف می‌شدند (Holt *et al.*, 1994). در طی سال‌های پس از معرفی جنس سودوموناس، تغییرات زیادی در تاکسونومی و نیز توصیف آن، بوجود آمده است. این جنس متشکل از گونه‌هائی است که توان استفاده از دامنه وسیعی از مواد ارگانیک و غیر ارگانیک را دارند و در شرایط محیطی متفاوت رشد می‌کنند. بسیاری از بیمارگرهای مهم گیاهی از گونه‌های این جنس بوده (Palleroni, 1992) و گونه‌های آن از جمله متنوع‌ترین و گسترده‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشند (Young, 1996). یکی از مهم‌ترین گونه‌های این

جنس *Pseudomonas syringae* است که بیش از ۵۰ پاتووار توصیف شده دارد (Gnanamanickam, 2007). دامنه میزبانی این گونه بسیار وسیع بوده، بطوری‌که بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی متعلق به جنس‌ها و خانواده‌های مختلف به عنوان میزبان آن قلمداد گردیده‌اند(Young, 1996). پس از معرفی اولین جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* در سال ۱۹۰۲(Klotz, 1978)، در سال‌های بعد جدایه‌های بیشتری از این پاتووار، از گونه‌های مختلف گیاهی دیگر جدا شدند و به دلیل داشتن تفاوت در دامنه میزبانی، علائم ایجاد شده روی گیاهان و نیز برخی ویژگی‌های فنوتیپی به عنوان گونه‌های جدید نامگذاری شدند. بدین ترتیب تا سال ۱۹۷۰، ۴۱ گونه سودوموناس نامگذاری شده بود (Hirano *et al.*, 1995). ویژگی میزبان اختصاصی، ویژگی مهمی بود که بیماری‌شناسان گیاهی بر اساس آن گونه‌ها را تفکیک می‌کردند. در آن زمان، با بررسی‌های انجام شده مشخص گردید که این گونه‌ها تشابه‌های زیادی با هم داشته و به جزء دامنه میزبانی، وجوه یا ویژگی‌های دیگری برای تفکیک آن‌ها وجود نداشت. بنابراین، در سال ۱۹۸۰، کلیه ۴۱ گونه موجود، در یک گونه ادغام و تحت عنوان *P. syringae* نامگذاری و هر یک از گونه‌ها به عنوان یکی از پاتووارهای آن منظور شدند (Hirano *et al.*, 1995). برای تفکیک پاتووارهای این گونه، بیماری‌زائی، دامنه میزبانی، وجود آنزیمی‌های هیدرولیکی واکنش‌های سرولوژیکی، طیف منابع کربنی مورد استفاده، محتوای اسیدهای چرب سلولی، ویژگی‌های ژنوتیپی، توانائی تشکیل هسته یخ و تولید توکسین از ویژگی‌های معمول است (Fahy and Hayward, 1983). تاکسونومی که معمولاً با سیستماتیک یا بیوسیستماتیک مترادف در نظر گرفته می‌شود، متشکل از سه قسمت مجزای گروه‌بندی (Classification)، نام‌گذاری (Numenclature) و سرانجام شناسائی موجود ناشناخته (Identification of Unknown Organisms) می‌باشد (Vandamme *et al.*, 1996; Young, 1996). اصطلاحی هم تحت عنوان تاکسونومی پلی‌فازی(Polyphasic Taxonomy) توسط کل‌ول (Colwell, 1970) ابداع که عبارت از بکارگیری روش‌های فنوتیپی، ژنوتیپی و فیلوژنتیکی جهت تعیین دقیق‌تر موقعیت تاکسونومیکی میکروب‌ها در هر سطحی از تاکسون است (Vandamme *et al.*, 1996). در مباحث سیستماتیک باکتری‌شناسی، مجموعه متنوعی از روش‌های مورد استفاده برای تاکسونومی سودوموناس‌ها، ذکر شده است (Palleroni, 2005) نظیر خصوصیات فنوتیپی، ژنتیکی و اکولوژیکی. خصوصیات فنوتیپی شامل کلیه ویژگی‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی، کموتاکسونومیکی، آنزیمی و سرولوژیکی را شامل می‌شود. جهت طبقه‌بندی مجدد برخی گونه‌های سودوموناس و یا حتی انتقال آن‌ها به

جنس‌های دیگر نیز از این شاخص‌ها، استفاده شده است (Palleroni, 2003; Peix *et al.*, 2009). تاکسونومی اولیه اعضای این جنس در گذشته تنها بر اساس خصوصیات فنوتیپی استوار بود (Stanier *et al.*, 1966). پس از تحقیقات بیشتر در خصوص جنس سودوموناس، مشخص شده این جنس در بر گیرنده گونه‌های فراوانی است بطوری‌که به مرور زمان، فزونی تعداد آن، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرد و برای ایجاد گروه‌بندی بهتر، از شاخص‌های بیشتر و دقیق‌تری استفاده شد (Palleroni, 2008). از این‌رو علاوه بر معیارهای فنوتیپی و مطالعات اکولوژیکی، مطالعات توالی‌های نوکئوتیدی ژن‌ها نیز امروزه سبب پیشرفت‌های بزرگی در زمینه تاکسونومی کلیه موجودات از جمله باکتری‌های سودوموناس شده است. در دهه ۱۹۷۰ بررسی‌های مولکولی برای جنس سودوموناس آغاز گردید. با توسعه روش‌های استخراج DNA از سلول و الحاق مجدد DNA (Marmur, 1961) اولین مطالعات همولوژی DNA-DNA و مقایسه‌های ژنتیکی در تاکسونومی باکتری‌ها آغاز شد. برای توصیف ارتباط میان گونه‌های سودوموناس، ضمن بررسی‌های فنوتیپی، از خصوصیات DNA به‌ویژه تعیین میزان شباهت با هیبریداسیون DNA-DNA به عنوان معیار کمکی استفاده شد(Colwell and Mandel, 1964; Colwell *et al.*, 1965; Johnson and Ordal, 1968). مطالعات بعدی که به بازنگری پاتووارهای این گونه پرداخته است، تحقیقات گاردان و همکاران می‌باشد (Gardan *et al.*, 1991; Gardan *et al.*, 1992; Gardan *et al.*, 1999). در این مطالعات ۴۸ پاتوار و هشت گونه وابسته، بر اساس هیبریداسیون DNA-DNA و هیبریداسیون DNA-RNA مورد بررسی قرار گرفته و ۹ گونه ژنومی که تعدادی از آن‌ها قبلاً مشخص بودند، معرفی گردید. تعیین ترادف ژن‌های ریبوزومی گزینه‌ای مناسب برای تاکسونومیست‌ها باشد چراکه تاکسونومیست‌ها عمدتاً به دنبال مولکول‌هائی هستند تا در زمینه تکامل بتوان از آن‌ها به عنوان معیاری که دارای درجه حفظ شدگی بالا و تنوعی مطلوب در میان گونه‌های موجودات داشته استفاده نمایند. ناحیه 16S rDNA به عنوان یک شاخص مهم در زمینه طبقه‌بندی باکتری‌ها از جمله جنس و گونه‌های سودوموناس محسوب می‌شود (Anzai *et al.*, 2000; Peix *et al.*, 2009) . از دهه ۹۰ به بعد، توالی‌یابی ژن16S rDNA مربوط به کلیه باکتری‌های شناخته شده آغاز شد و از آن برای ترسیم روابط فیلوژنی باکتری‌ها استفاده شد. ژن‌های خانه‌دار که دارای توالی ژنی بسیار حفظ شده می‌باشند، از دیگر معیارهایی بوده که برای بررسی تنوع و تاکسونومی بهتر و میزان تغییرات تکاملی آن‌ها به مراتب بیشتر از ژن 16S rDNAمی‌باشد (Hilario *et al.*, 2004) از این رو پیشنهاد شده تا برای بررسی

روابط فیلوژنی بسیار نزدیک و در حد زیرگونه، مورد استفاده قرار بگیرد (Santos and Ochman, 2004) و امروزه تعیین توالی چندین جایگاه ژنی (Multilocus sequence typing-MLST)، گسترش فراوانی یافته است (Khan *et al.*, 2008) نظر به اهمیت این ژن‌ها، پیشنهاد شده تا به جای هیبریداسیون DNA-DNA، چندین ژن خانه‌دار، مورد بررسی قرار گیرند (Stackebrandt *et al.*, 2002a). هدف این تحقیق، شناسایی دقیق عامل و یا عوامل احتمالی بیماری بلاست مرکبات و نیز یافتن جایگاه دقیق تاکسونومیکی آن‌ها در بین سایر جدایه‌های سودوموناس با استفاده از تاکسونومی پلی‌فازی خواهد بود. از این رو ضمن بررسی خصوصیات تغذیه‌ای، از سایر روش‌های مولکولی نظیر تعیین ترادف ژن‌های خانه‌دار و نیز از انگشت نگاری ژنتیکی استفاده خواهد شد.

برای کنترل این بیماری معمولاً استفاده از سموم شیمیائی توصیه می‌شود (Klotz, 1978)، اما با مصرف مداوم این ترکیبات، ضمن خطر گیاه‌سوزی، احتمال بروز جدایه‌های مقاوم باکتری، (Gnanamanickam, 2007)، خطرات زیست محیطی را نیز به‌دنبال خواهد داشت. بنابراین در سال‌های اخیر تلاش بر این بوده است تا با کاهش مصرف سموم شیمیایی، استفاده از سایر روش‌های جایگزین برای کاهش خسارت‌های بیماری‌ها، افزایش یابد. روش‌هایی نظیر استفاده از ارقام مقاوم، رعایت بهداشت زراعی، کنترل بیولوژیکی و نیز روش مبارزه تلفیقی. از میان آن‌ها استفاده از کنترل بیولوژیکی به دلیل عدم خطرات زیست محیطی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در دهه‌های گذشته در زمینه توانائی آنتاگونیستی مخمرها، گزارش‌های قابل توجهی ارایه شده است. در دهه ۱۹۸۰ جانیسیویز (Janisiewicz, 1987) و چالوتز و همکاران (Chalutz *et al.*, 1988) جنبه‌های مثبتی از توانایی مخمرها در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزیجات، را ارایه کرده‌اند (Sharma *et al.*, 2009). برخی نیز در سطح تجاری تولید شده‌اند، نظیر *Cryptococcus albidus* و *C. oleophila* به‌ترتیب تحت عناوین تجاری Aspire و Yiledplus مجوز ثبت و اجازه استفاده در سطح تجاری را کسب کرده‌اند (Sharma *et al.*, 2009). در این بررسی سعی خواهد شد تا مخمرهایی از مناطق شمالی ایران، جمع‌آوری و پس از بررسی توان بیوکنترلی آن‌ها علیه عامل بیماری بلاست مرکبات، جدایه‌های برتر انتخاب و شناسایی گردند.

۲. مروری بر مطالعات انجام شده

۲-۱. بیماری بلاست مرکبات

بیماری بلاست مرکبات (Citrus Blast) و لکه سیاه میوه مرکبات (Citrus Black Pit) از جمله بیماری‌های شایع در اکثر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به استثنای مناطق گرمسیر می‌باشد که عمدتاً به وسیله جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902 ایجاد می‌شود. این بیمارگر از طریق زخم ایجاد شده روی بافت‌های جوان، به گیاه حمله می‌کند. علایم 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. علایم این بیماری درطول فصل رشد و به خصوص در شرایط هوای خنک و بارانی و در دامنه دمایی بین ^{oC}۲۰-۸ بر روی سرشاخه‌های جوان شدیدتر خواهد بود. چنانچه بلاست دیرهنگام رخ دهد، ممکن است با خسارت سرمازدگی اشتباه گردد (Whiteside *et al.*, 1989). همچنین در بیماری لکه سیاه که ناشی از این بیمارگر می‌باشد، لکه‌های فرورفته قهوه‌ای تیره تا سیاه رنگ روی میوه‌ها ایجاد می‌شود. این لکه‌ها بیشتر بر روی میوه‌های لیمو شیرین و لیموترش مشاهده می‌شود و گاهی اوقات قطر این لکه‌ها تا سه و نیم میلی‌متر هم خواهد رسید (Fawcett *et al.*, 1923). این بیماری از کشورهای استرالیا، ژاپن، افریقای جنوبی، برخی از کشورهای حاشیه مدیترانه و آسیای مرکزی، امریکا و استرالیا گزارش شده است (Smilanick *et al.*, 1996). در ترکیه *P. s.* pv. *syringae* به عنوان بیمارگر شناسایی شده است (Mirik *et al.*, 2005). در ایران، اولین بار این بیماری در سال ۱۳۶۶ بصورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌های پرتقال (*Citrus sinencis* (L.) Osbeck) و آلمو (*C. macrophylla* Wester) از مازندران گزارش شد (Shams-Bakhsh and Rahimian, 1997). باکتری از لکه‌های مدور فرورفته و سیاهرنگ روی میوه لیموترش (*C. limon* (L.) Burm f, Eureka) نیز جدا گردیده بود. این احتمال وجود دارد که باکتری عامل بیماری در بعضی از نقاط مازندران *P.*

Pseudomonas viridiflava (Burkholder 1930) Dowson و *s.* pv. *syringae* در نواحی دیگری از استان 1939 باشد(Shams-Bakhsh and Rahimian, 1997). در جنوب ایران، تاکنون گزارشی از وجود بیماری ارایه نشده است. در یک بررسی مقایسه‌ای جدایه‌های *P. viridiflava* از میزبان‌های مختلف در شهرهای شیراز، سپیدان، مرودشت، سعادت شهر، خفر، نی‌ریز، استهبان و مهارلو (Razinataj and Taghavi, 2004) و در بررسی دیگر در زمینه مقایسه جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* در مناطقی از فارس (Taghavi and Ziaee, 2003)، شواهدی که حاکی از آلودگی مرکبات به بیماری بلاست باشد، به‌دست نیامده است.

نقوش الکتروفورزی پروتیین‌های سلولی جدایه‌های *P. viridiflava* عامل بلاست مرکبات در مازندران با جدایه مرجع فرق داشته ولی تا حد زیادی با جدایه‌هایی که در اسفناج و همیشه بهار در مازندران بیماری‌زا هستند، شباهت زیادی داشته و از نظر خصوصیات فنوتیپی، پلاسمیدی و سرولوژیکی نیز واجد شباهت زیادی با یکدیگر بوده اند (Goharzadeh and Rahimian, 2000). این جدایه‌ها نظیر جدایه‌های همیشه بهار، گوجه‌فرنگی و ریحان روی محیط‌های حاوی سوکروز، لوان تولید می‌کنند (Rahimian and Zarei, 2003). ولی جدایه‌های استاندارد، فاقد این توانائی می‌باشند (Schaad *et al.*, 2001). در یک بررسی در شرایط محیطی شمال ایران، مشخص شد که *P. viridiflava* و یا جدایه‌های مشابه عامل یا همراه بلاست مرکبات قاردند تا بر روی برخی از علف‌های هرز غالب در باغ‌های مرکبات (نظیر دانه‌تسبیحی، مرغ، تاج‌خروس، چمن یک ساله، چچم، فالاریس، قیاق و چسبک) بقای رورستی داشته باشند (Sadeghi *et al.*, 2011). اولین بار جنس(.*Pseudmonas* Migula 1984, 237^{AL} (Nom. Cons., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121 در سال ۱۹۸۴ توصیف شد (Brenner *et al.*, 2005)، پژوهش‌های انجام شده در دو تا سه دهه اخیر، سبب شده است تا جنس سودوموناس قسمتی از تاریخ علم باکتری‌شناسی را به خود اختصاص دهد. در اوائل، تاکسونومی باکتری‌ها تنها بر پایه شکل و خصوصیات عمومی باکتری استوار بود که به عنوان معیارهای بسیار محدود، در تاکسونومی باکتری‌ها محسوب می‌شدند چراکه برای گروهی از باکتری‌ها که دارای خصوصیات مرفولوژیکی عمومی بودند، اصطلاح شبه جنس (Form Genera) مورد استفاده قرار می‌گرفت (Cohn, 1872). در اوائل قرن ۲۰، جنسن (Jensen, 1909)، خصوصیات فیزیولوژیکی را به عنوان معیار اصلی برای