کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۴، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (۱۱۹-۱۰۹)

بررسی امکان کنترل بیماری بلاست مرکبات با استفاده از عصارهٔ بذر گلپر و مخمرهای رورست

۱. محمد ادبی فیروزجایی؛ ۲. پژمان خدایگان*؛ ۳. فرید بیکی؛ ۴. روح‌اله صابری ریسه
۱، ۲ و ۴. کارشناس ارشد و دانشیاران، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان
۳. استادیار مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۳۰)

چکیده

بلاست مرکبات یکی از بیماری‌های مهم مرکبات در شمال کشور است که توسط گونه‌هایی از جنس سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) ایجاد می‌شود. این بیماری در شرایط اقلیمی مساعد، خسارت‌های چشمگیری به باغ‌های مرکبات وارد می‌کند. با توجه به محدودیت‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی سنتزی، کنترل بیولوژیک یا استفاده از ترکیبات گیاهی ضد میکروبی می‌تواند روشی مؤثر برای کنترل بیماری بلاست باشد. در این تحقیق اثر چند جدایهٔ مخمر رورست و عصارهٔ بذر گلپر ایرانی (*Heracleum persicum*) بر عوامل بلاست مرکبات در شرایط آزمایشگاه (آزمون هالهٔ بازدارندگی) و گلخانه، بررسی شد. جدایه‌های آنتاگونیست از نمونه‌های برگ مرکبات مناطق مختلف استان‌های شمالی کشور جداسازی شدند. همچنین، بذر گلپر از مناطق مرتفع شهرستان بابل جمع‌آوری شد. در بررسی آزمایشگاهی، عصارهٔ گلپر اثر معنی‌داری در مهار رشدی دو عامل بیمارگر از خود نشان داد، اما هیچ‌یک از جدایه‌های مخمری نتوانستند بازدارندگی علیه دو بیمارگر ایجاد کنند. نتایج بررسی گلخانه‌ای نشان داد که یکی از جدایه‌های مخمری (*Pichia* sp.) با میانگین کاهش ۷۸/۸ درصدی بهترین جدایه در کاهش شدت بیماری بلاست مرکبات بود. همچنین، عصارهٔ گلپر توانست جمعیت بیمارگرها را در سطح برگ مرکبات، نسبت به شاهد تا ۶۰ درصد کاهش دهد. یافته‌های این تحقیق نشان داد که استرین *Pichia* sp. و عصارهٔ گلپر در کنترل بیماری مؤثر هستند.

کلیدواژگان: **بلاست مرکبات، عصارهٔ گلپر، کنترل بیولوژیک، مخمر، *Pichia* sp.**

مقدمه

بیماری باکتریایی بلاست مرکبات از جمله بیماری‌های شایع در بیشتر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به استثنای مناطق گرمسیر است (Whiteside *et al*. 1988). اولین‌بار، این بیماری در سال ۱۹۱۶، از شمال کالیفرنیا گزارش شد (Coit 1916, Whiley *et al*. 2002). ابتدا، باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به‌عنوان عامل بیماری معرفی شد (Whiteside *et al*. 1988)، اما در سال ۱۳۶۷ علاوه بر این گونه، باکتری (*Pseudomonas viridiflava* (Burkholder 1930, Dowson 1939 نیز به‌عنوان عامل بلاست مرکبات شمال ایران گزارش شد (Shams-Bakhsh and Rahimian 1997). بیمارگرهای بلاست از طریق زخم ایجادشده روی بافت‌های جوان، به گیاه حمله می‌کنند. علایم بلاست روی پهنک و دمبرگ عموماً به‌صورت نقاط آبسوخته یا نواحی سیاه‌رنگ پدید می‌آیند و از هر طرف گسترش می‌یابند. در صورت آلودگی آوندهای آبکشی دمبرگ، برگ‌ها پژمرده می‌شوند و می‌ریزند. اگر این لکه‌ها دورتادور شاخه را بگیرند، بخش‌های بالایی آن‌ها خشک خواهند شد. علایم این بیماری در طول فصل رشد و به‌خصوص در مناطق

* تلفن: ۳۴۳۱۳۱۲۰۴۴
E-mail: pkhodaygan@vru ac.ir

بارانی و بادخیز با شرایط آب و هوایی مرطوب و خنک، در سرشاخه‌های جوان شدیدتر خواهد بود. گاهی ممکن است علایم بلاست با خسارت سرمازدگی اشتباه شود (Program 2012, Ferguson and Grafton-Cardwell 2014). در شرایط اقلیمی شمال ایران، به‌دلیل وجود رطوبت بالا و دمای مناسب، بیماری بلاست خسارت چشمگیری را به‌صورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها ایجاد می‌کند. برای پیشگیری و کنترل این بیماری علاوه بر رعایت بهداشت زراعی، می‌توان از سموم شیمیایی و ارقام مقاوم نیز استفاده کرد (Whiteside *et al.* 1988)؛ اما با توجه به آشکارشدن خطرهای زیست‌محیطی ترکیبات شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها، امروزه استفاده از روش‌های سالم و کم‌خطر، از جمله کاربرد ترکیبات بازدارندهٔ گیاهی و عوامل آنتاگونیستی که بتوانند در درازمدت موفقیت‌آمیز باشند، مورد توجه محققان است. تهیهٔ پایه‌های مقاوم مرکبات نیز می‌تواند روشی مناسب برای کنترل بیماری باشد. اگرچه تهیهٔ این پایه‌ها با محدودیت‌های فراوان مواجه بوده است و بسیار زمانبر خواهد بود. با توجه به سطح کشت وسیع مرکبات در شمال کشور و همچنین، گزارش‌های متعدد مبنی بر حضور عوامل بیمارگر در نقاط مختلف استان‌های شمالی، مبارزهٔ بیولوژیک با بیماری بلاست اهمیت ویژه‌ای دارد.

گلپر ایرانی با نام علمی *Heracleum persicum*، گیاهی علفی، چندساله و معطر از تیرهٔ چتریان (Umbelliferae) است. این گیاه ارزش اقتصادی، دارویی و غذایی فراوانی دارد که در نیمهٔ شمالی کشور در اراضی کوهستانی و مرتفع با آب‌وهوای معتدل، رطوبت مناسب و زمستان سرد رشد می‌کند (Hemati *et al.* 2010). تاکنون، گزارش‌های متعددی دربارهٔ خواص کشندگی عصاره‌های حاصل از این جنس گیاهی (*Heracleum* spp.) علیه باکتری‌های بالینی[1] (Ahmadian-Attari *et al.* 2009, Noudeh *et al.* 2010, Kousha and Bayat 2012) و علیه باکتری‌های بیماریزای گیاهی از جمله *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* و *Xanthomonas campestris* (Iscan *et al.* 2003)، ارائه شده است.

در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی دربارهٔ توان بیوکنترلی مخمرها انجام شده است که سهم مرکبات از این عوامل بیوکنترل بیشتر به بیماری‌های قارچی پس از برداشت معطوف شده است. از این عوامل بیوکنترل می‌توان به *Pichia guilliermondii*، *Debaryomyces hansenii*، *Candid oleophila*، *Kloeckera apiculata*، *Metschnikowia pulcherrima* در کنترل کپک سبز و آبی (Droby *et al.* 1989, Wilson and Chalutz 1989, Chalutz and Wilson 1990, El-Neshawy and El-Sheikh-Aly 1998, Lahlali *et al.* 2004, Long *et al.* 2007) و مخمر *D. hansenii* در کنترل بیماری پوسیدگی ترش (Droby *et al.* 1989, Chalutz and Wilson 1990) و مخمرهای *C. sake*، *C. formata*، *C. saitona*، *Aureobasidium pullulans*، *Saccharomyces cerevisiae*، *M. fruticola*، *M. pulcherrima* در کنترل سایر پوسیدگی‌های میوهٔ مرکبات (Sharma *et al.* 2009) اشاره کرد. برای کنترل بیماری بلاست مرکبات نیز بررسی‌های Beiki *et al.* (2012) نشان دادند که مخمرهای *Rhodotorula* sp.، *C. magnus*، *Cryptococcus albidus* و *Sporobolomyces ruberrimus* توان بیوکنترلی مناسبی علیه بیمارگر *P. syringae*، دارند. با توجه به اهمیت کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی و با توجه به توان بیوکنترلی مخمرها و خواص کشندگی عصاره‌های گیاهی در کنترل بیمارگرهای گیاهی، این تحقیق به‌منظور ارزیابی امکان کنترل بیولوژیک بلاست باکتریایی مرکبات با استفاده از مخمرهای رورست مرکبات شمال کشور و عصارهٔ بذر گلپر، در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ جدایه‌های بیماریزا و آنتاگونیست

دو جدایهٔ بیماریزای بلاست، *P.s.* pv. *syringae* و *P. viridiflava*، از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی ایستگاه تحقیق و توسعهٔ کنترل بیولوژیک آمل تهیه شد. به‌منظور اطمینان از بیماریزایی این دو جدایه، پس از کشت آن‌ها روی محیط کشت KB و اطمینان از خالص‌بودن هریک از آن‌ها، از کشت ۲۴ ساعتهٔ سوسپانسیون‌هایی با غلظت‌های 10^9 تا 10^4 سلول در

1. Clinical

هر میلی‌لیتر با آب مقطر سترون تهیه شد. از هریک از غلظت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون آن، برای بررسی بیماریزایی، به برگ‌های جوان آلمو و نارنج، تزریق شد (Yessad *et al.* 1992).

به‌منظور جداسازی جدایه‌های مخمری، در سه فصل بهار، تابستان و پاییز ۱۳۹۲ از مناطق مختلف استان‌های شمالی کشور (مازندران، گیلان و گلستان)، از درختان مرکبات بدون علایم آلودگی به بیماری بلاست، نمونه‌برداری، به‌صورت تصادفی، انجام شد. بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، بلافاصله جداسازی آغاز شد. برای جداسازی، نمونه‌ها در فلاسک‌های ارلن جداگانه حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر توئین (Tween) سترون، روی گردانندهٔ دورانی قرار داده شدند (Sakthivel and Mew, 1991). پس از گذشت ۱ ساعت، از هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر در تشتک‌های حاوی محیط کشت مالت آگار (Malt Agar) کشت و در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس به‌مدت سه تا پنج روز نگه‌داری شدند. پس از ظهور کلنی‌ها، از هر تشتک تک‌کلنی‌هایی که ظاهر مخمری داشتند، برگزیده و دوباره روی محیط کشت مزبور با انتخاب کلنی‌های مخمری تا رسیدن به خلوص کامل، کشت شدند. پس از خالص‌سازی و مشاهدهٔ میکروسکوپی، کلنی‌ها با توجه به رنگ، شکل ظاهری و جمعیت انتخاب و گروه‌بندی شدند. از هر گروه، یک جدایه به‌عنوان نماینده انتخاب و در بررسی‌های خصوصیات بیوکنترلی به‌کار برده شدند.

بررسی اثر آنتی‌بیوز مخمرها درون تشتک پتری

آزمون هالهٔ بازدارنده به‌منظور بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های رورست بر عوامل بیماریزا، انجام شد. در این بررسی بعد از تهیهٔ تشتک‌های محتوی محیط کشت NA، سطح محیط با ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های بیمارگر مایه‌زنی و سپس، دیسک‌های کاغذی سترون روی محیط کشت جامد مورد نظر در تشتک قرار گرفتند. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ مخمرها روی هر دیسک گذارده شد. کشت‌ها به انکوباتور با دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس منتقل و بعد از دو تا سه روز تشکیل هاله بررسی شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد (Mercier and Lindow 2001).

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها در گلخانه

تهیهٔ گیاه برای انجام آزمون

برای بررسی کارایی جدایه‌های مخمری در شرایط گلخانه‌ای، برای هر جدایه سه نهال آلمو (*Citrus macrophylla*) و سه نهال نارنج (*C. aurantifolia*) با برگ‌های جوان و هم‌سن، در نظر گرفته شد. به‌منظور ایجاد شرایط یکسان، نهال‌های دوساله، چهار هفته قبل از آزمون در شرایط گلخانه‌ای سربرداری شدند. در این دوره مراقبت‌های متداول انجام شد تا از مصرف کود و سموم شیمیایی خودداری شود.

تهیهٔ مایهٔ تلقیح بیمارگر و آنتاگونیست

برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح مخمرهای رورست، جدایه‌ها روی محیط مالت آگار حاوی ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، به‌صورت چمنی کشت شدند. از کشت تازهٔ آن‌ها سوسپانسیون توسط آب مقطر سترون تهیه شد و پس از شمارش با لام هماسیتومتر، غلظت 10^9 سلول در میلی‌لیتر هر جدایه استفاده شد. برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح جدایه‌های بیمارگر، هریک از جدایه‌ها روی محیط کشت KB، به‌صورت چمنی کشت شدند. از کشت یک‌روزهٔ آن‌ها سوسپانسیونی با غلظت 10^4 سلول در میلی‌لیتر آب مقطر سترون (براساس کدورت‌سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر) تهیه شد (Brandl 2008).

بررسی تأثیر جدایه‌ها در کاهش شدت بیماری

برای بررسی تأثیر جدایه‌های مخمری علیه عوامل بیماری بلاست در دو گیاه آلمو و نارنج، هریک از سوسپانسیون‌های تهیه‌شدهٔ مخمرها تا مرحلهٔ جاری‌شدن آب از سطح برگ‌ها، در هنگام غروب آفتاب، مه‌پاشی شدند. پاشیدن سوسپانسیون به فواصل یک روز، سه‌بار تکرار شد (Shulaev *et al.* 1995). در این مدت نهال‌ها در شرایط رطوبتی اشباع و دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. یک روز بعد از آخرین اسپری، برگ‌های هر دو رقم از مرکبات برداشت و برای انجام آزمون بیماریزایی به آزمایشگاه منتقل شدند. بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون بیمارگر با غلظت معادل 10^4 سلول در هر میلی‌لیتر، با استفاده از سرنگ‌های سترون به هر برگ تزریق شد. پس از ده روز نگه‌داری

برگ‌ها در ظروف سترون، تحت دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس و رطوبت در حد اشباع، میزان گسترش علایم بیماری با کمک دستگاه Dino Capture ثبت شد. به‌ازای هر تیمار، حداقل ۳۰ برگ به‌کار برده شد که در هر برگ نیز آزمون در هر دو نیمهٔ برگ، نسبت به رگبرگ میانی، انجام شد. در تیمارهای شاهد، نهال‌ها به‌جای سوسپانسیون مخمری با آب اسپری شدند و بررسی بیماریزایی نیز کاملاً مشابه تیمارهای مذکور اجرا شد (Mercier and Lindow 2001, Beiki *et al.* 2012). درصد کاهش شدت بیماری با کمک فرمول زیر، به‌طور مستقیم با اندازه‌گیری مساحت قسمت آلوده و مقایسهٔ آن با شاهد مثبت، محاسبه و ارزیابی شد (Campbell and Madden 1990).

$$PI = \left[(T - C)/C \right] \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

PI: درصد بازدارندگی، T: مساحت قسمت آلوده در تیمار و C: مساحت قسمت آلوده در شاهد.

تهیهٔ عصارهٔ بذر گلپر و بررسی آزمایشگاهی توان ضد باکتریایی

برای بررسی خواص ضد باکتریایی عصارهٔ هیدروالکلی گلپر از روش خیساندن[1] استفاده شد. بذرهای گلپر از ارتفاعات شهرستان بابل (مازندران) جمع‌آوری و به‌صورت طبیعی در محیط سایه، خشک شد و سپس، با استفاده از آسیاب برقی پودر شد. برای عصاره‌گیری ۲۰ گرم از بذر آسیاب‌شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد حل و محلول حاصل به‌مدت ۷۲ ساعت در ظرف دربسته روی دستگاه همزن قرار داده شد. پس از این مدت، محلول با استفاده از صافی واتمن شمارهٔ ۴۱ صاف شد. عصارهٔ به‌دست‌آمده قبل از آزمایش تا حد تغلیظ کاملاً خشک شد تا هیچ الکلی در آن باقی نماند (Sharififar *et al.* 2009). برای بررسی تأثیرات ضد میکروبی آن علیه عوامل بیماری بلاست، عصارهٔ تهیه‌شده با غلظت ۱۰۰ و ۵۰ درصد با روش انتشار در دیسک، در شرایط درون شیشه‌ای با اندازه‌گیری قطر هالهٔ بازدارندهٔ رشد بررسی شد. از دیسک‌های کاغذی آغشته به آب مقطر سترون به‌عنوان کنترل منفی (شاهد) استفاده شد.

1. Maceration

بررسی گلخانه‌ای توان عصارهٔ گلپر در کاهش مستقیم جمعیت بیمارگرها

تهیهٔ بیمارگرهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک

به‌منظور ردیابی و پایش جمعیت بیمارگرها، باکتری‌های *P.s.* pv. *syringae* و *P. viridiflava* جهش‌یافته مقاوم به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (Pss^r و Pv^r)، ساخت شرکت سیگما، از تیپ وحشی دو بیمارگر بلاست، با استفاده از تکنیک Gradient plate به‌دست آمدند (Bryson and Szybalski 1952). محیط کشت KB همراه با غلظت‌های مختلف و افزایشی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین تهیه و در ظروف تشتک پتری ریخته شد. برای نفوذ بیشتر و بهتر آنتی‌بیوتیک‌ها به تمامی قسمت‌های محیط کشت و همچنین، برای ندیدن آلودگی، تشتک‌های پتری حداقل ۲۴ ساعت استراحت داده شدند. غلظت اولیهٔ آنتی‌بیوتیک در شروع این پروسه کمتر از حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)[2] بوده است که به‌تدریج افزایش یافت و از مقدار MIC فراتر رفت. سوسپانسیونی با غلظت $۱۰^۴$ سلول در هر میلی‌لیتر از باکتری‌های بیمارگر تهیه و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون روی تشتک‌ها پخش شد. تشتک‌های کشت داده‌شده به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس، کلنی‌های فلورسنت و مقاوم از سطح تشتک‌ها انتخاب و به محیط‌های حاوی غلظت‌های بالاتر تتراسایکلین منتقل و مخطط شدند. این فرآیند ادامه پیدا کرد تا سرانجام کلنی‌های مقاوم روی محیط KB حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به مقدار ۲۵ µg در هر میلی‌لیتر محیط کشت (Marconi *et al.* 1996)، کشت انبوه داده و نگه‌داری شد. به‌منظور اطمینان از ایجاد جهش در جدایه‌های بیمارگر، کشت جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته روی محیط KB حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۲۵ µg/ml) با هم مقایسه شدند. همچنین، به‌منظور اطمینان از پایداری جهش در جدایه‌های بیمارگر، جدایه‌های جهش‌یافته چندین مرتبه روی محیط KB بدون آنتی‌بیوتیک تجدید کشت شدند. به‌منظور اطمینان از پایداری بیماریزایی جدایه‌های جهش‌یافته، سوسپانسیونی با غلظت $۱۰^۴$ سلول در هر

2. Minimum Inhibitory Concentration

میلی‌لیتر، حاصل از کشت تازهٔ جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در آب مقطر سترون تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون توسط سرنگ سترون به پارانشیم برگ گیاهان شمعدانی، توتون، آلمو و نارنج تزریق شد (Balestra and Varvaro 1995). در طی مقاوم‌سازی کشت‌های باکتری‌ها در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس روی محیط NYDA (۲۳ گرم آگار مغذی، ۵ گرم عصارهٔ مخمر، ۱۰ گرم دکستروز، ۱ لیتر آب مقطر، اسیدیتهٔ نهایی برابر با ۶/۸) نگه‌داری شدند.

بررسی گلخانه‌ای توان عصارهٔ گلپر در کاهش مستقیم جمعیت بیمارگرها

از دو باکتری بیماریزای مقاوم به آنتی‌بیوتیک سوسپانسیونی به غلظت 10^4 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه و به‌صورت مه‌پاش در اتاق ایزولهٔ گلخانه تا مرحلهٔ جاری‌شدن آب از سطح برگ‌ها، بر نهال‌های آلمو و نارنج با چهار تکرار اسپری شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از اسپری، هر نهال با کمک یک پاکت پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت پوشانده شد. دمای گلخانه ۱۵ درجهٔ سلسیوس بود. یک روز پس از اسپری عوامل بیماریزا، عصارهٔ گلپر با غلظت نهایی ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی نهال‌ها پاشیده شد. شش روز (۱۴۴ ساعت) پس از اسپری عصاره، ۱۰ گرم (سطحی معادل ۷۵۰ سانتی‌متر مربع) از بافت برگی هر نهال نمونه‌برداری شد و هر نمونه به ارلن حاوی ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر سترون و ۵۰۰ میکرولیتر توئین ۲۰ سترون انتقال یافت و به‌مدت ۳۰ دقیقه با کمک گردانندهٔ دورانی با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد. پس از تهیهٔ سری رقت، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت KB حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و قارچ‌کش بنومیل به‌صورت چمنی کشت انجام شد. پتری‌ها به‌مدت ۲ الی ۳ روز در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری و کلنی‌های فلورسنت مشاهده‌شده شمارش و ثبت شدند. در این بررسی برای تیمارهای شاهد، بجای اسپری عصاره از آب مقطر سترون استفاده شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

شناسایی مقدماتی مخمرها

مورفولوژی کلنی‌های مخمر و ویژگی‌های فیزیولوژیک براساس الگوی ارائه‌شده بررسی شد (Kurtzman and Fell 1998). برای استخراج DNA ژنومی مخمرها از روش Walsh *et al.* (1991) استفاده شد. مقداری از کلنی جوان حاصل مخمرهای تازه کشت‌شده روی محیط کشت مالت آگار برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری سترون حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول چلکس ۵ درصد منتقل شد. میکروتیوب‌ها به‌مدت حداقل ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس، میکروتیوب‌ها به‌مدت ۸ دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار گرفت و پس از آن، به‌مدت ۱۲-۱۰ ثانیه با دور آهسته با دستگاه گردانندهٔ لوله تکان داده شدند. این مرحله دو مرتبه تکرار شد. مادهٔ چلکس و بقایای دیواره و محتویات سلولی با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه و دور ۱۵۰۰۰g رسوب داده شد. محلول رویی که حاوی DNA استخراج‌شده بود به میکروتیوب‌های جدید منتقل و تا انجام PCR و تکثیر DNA در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد. برای تکثیر ناحیهٔ ژنی ITS از جفت آغازگرهای ITS1 و ITS4، هریک با توالی زیر استفاده شد (White *et al.* 1990).

ITS1: 5′- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3′

ITS4: 5′- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3′

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر MJ mini TM (BIORAD) و در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحلهٔ واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس، سپس، واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه طراحی شد. سه مرحلهٔ فوق سی و پنج‌بار تکرار شدند و بسط نهایی به‌مدت ۷ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس انجام شد. بعد از مشاهدهٔ باند شارپ مورد نظر و نبود باند اضافی، محصول PCR برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج تعیین توالی پس از اصلاح و هم‌ردیف‌سازی به کمک نرم‌افزار bioEdit و Chromas pro، برای شناسایی در پایگاه اینترنتی NCBI میزان شباهت آن با گونه‌های موجود در این پایگاه بررسی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد و داده‌ها با نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند.

نتایج

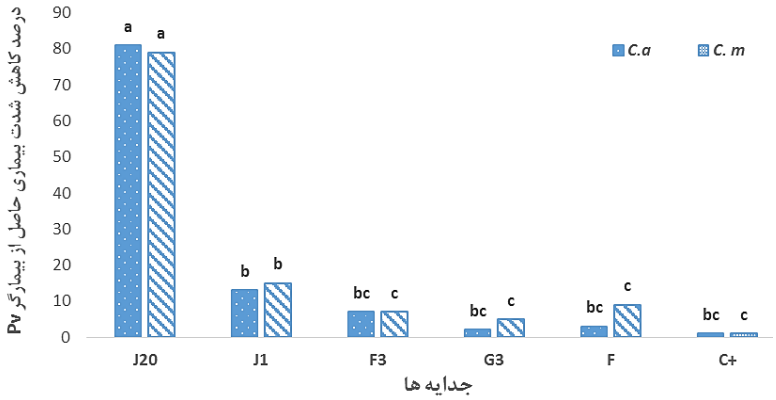
دو جدایهٔ بیماریزا تا ۲ روز پس از تزریق، علایم مشابه بلاست روی برگ‌های آلمو و نارنج ایجاد کردند. برای تهیهٔ جدایه‌های مخمری آنتاگونیست، بیش از ۱۱۰ نمونه سرشاخه و برگ درختان نارنگی، نارنج، تامسون و پرتقال که در بهار، تابستان و پاییز ۱۳۹۲، از شصت و دو منطقهٔ شمالی کشور جمع‌آوری شده بودند، در مجموع نوزده جدایهٔ مخمری جداسازی شد. پس از گروه‌بندی جدایه‌ها براساس رنگ، شکل ظاهری کلنی‌ها، پنج جدایهٔ مخمری به‌عنوان نماینده انتخاب و در بررسی‌های بیوکنترلی به‌کار برده شدند (شکل ۱).

کارایی مخمرها در شرایط آزمایشگاهی

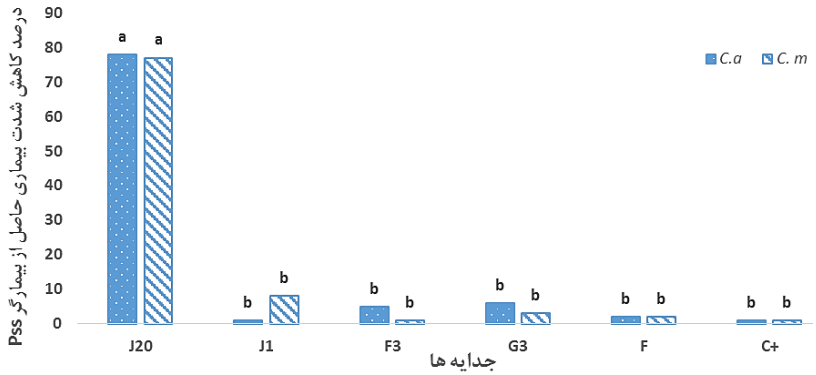
در بررسی آزمون هالهٔ بازدارنده هیچ‌یک از جدایه‌های مخمری توان بازدارندگی رشدی علیه دو عامل بیماریزا را نداشتند. اگرچه در بررسی گلخانه‌ای هیچ‌یک از جدایه‌های مخمری کاملاً مانع از بیماریزایی بیمارگرها نشدند؛ اما جدایهٔ J20 توانست بازدارندگی نسبی را علیه دو بیمارگر از خود بروز دهد (شکل ۲). نتایج نشان داد که در سطح ۱ درصد، بین تیمار J20 و شاهد از نظر کاهش شدت بیماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به‌طوری که، این جدایه با میانگین کاهش ۷۸/۸ درصدی بهترین جدایه در کاهش شدت بیماری بلاست مرکبات بود (شکل‌های ۳ و ۴).

شکل ۱. کلنی‌های مخمری جداشده از سطح مرکبات روی محیط آگار مغذی

شکل ۲. مقایسهٔ شدت بیماری بلاست ناشی از سه‌بار پاشش سوسپانسیون جدایهٔ مخمری J20 قبل از مایه‌زنی بیمارگر بلاست در مقایسه با پاشش آب به‌عنوان شاهد (C+) در برگ مرکبات



شکل ۳. درصد کاهش شدت بیماری در تیمارهایی که پس از سه‌بار پاشش سوسپانسیون مخمرهای رورست روی برگ نارنج (C. a) و آلمو (C. m) با بیمارگر Pv مایه‌زنی شدند.



شکل ۴. درصد کاهش شدت بیماری در تیمارهایی که پس از سه‌بار پاشش سوسپانسیون مخمرهای رورست روی برگ نارنج (C. a) و آلمو (C. m) با بیمارگر Pv مایه‌زنی شدند.

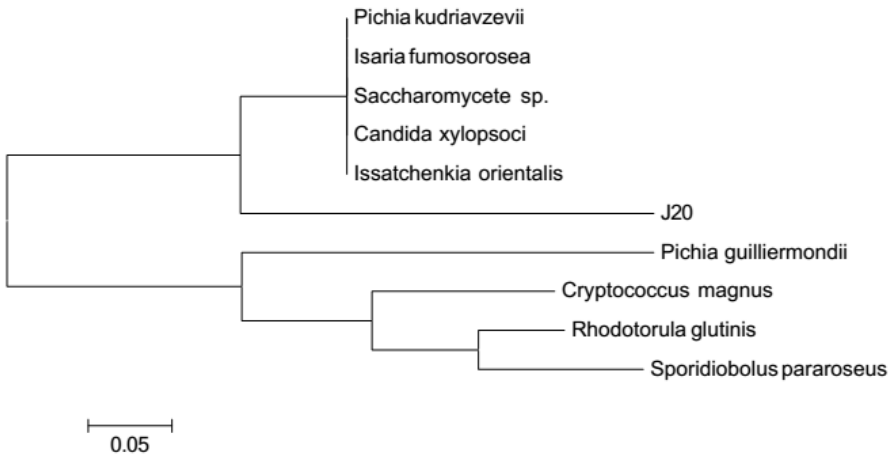
شناسایی مقدماتی مخمر

کلنی‌های جدایهٔ مخمری J20 که براساس ویژگی آنتاگونیستی مطلوب ارزیابی شده بودند، دارای سلول‌های کشیده، به‌صورت منفرد یا در زنجیره‌های دوجفتی با توانایی تولید اسپورهای منفرد بودند. این جدایه توانایی استفاده از منابع کربنی گلوکز، سوکروز، سوربوز، ترهالوز، آرابینوز، سلبیوز، رافینوز را داشت، اما از لاکتوز، لاکتات، رامنوز، اریتریتول و میواینوزیتول به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده نکرد. با توجه به گزارش انواع پلاسمید و امکان انتقال افقی ژن (HGT) در مخمرها (Marsit *et al.* 2015)، تنوع در متابولیسم‌های یک گونهٔ مخمری (Hayman and Bolen 1991) و حتی تولید رنگدانه‌های متنوع (Dutova and Tolstorukov 1997, Naatsaari *et al.* 2012)، دور از انتظار نخواهد بود. نتایج داده‌های حاصل از توالی‌یابی بخشی از ناحیهٔ ITS در ژنوم هسته‌ای جدایهٔ مخمری، ارتباط فیلوژنتیکی نزدیک آن‌را با جدایه‌هایی از جنس‌های *Isaria*، *Sccharomycta*، *Candida* و *Issatchenkia* نشان داد (شکل ۵). با توجه به اینکه فرم جنسی (تلئومورف) بسیاری از گونه‌های *Issatchenkia* و *Candida*، به گونه‌های *Pichia* تعلق دارد (Deak 2007, Kurtzman *et al.* 2011)، و با توجه به ویژگی‌های فیزیولوژیک و تلفیق این اطلاعات با درصد مشابهت ناحیهٔ ITS این جدایه احتمالاً به جنس *Pichia* sp. تعلق دارد، اما برای شناسایی دقیق جنس و گونهٔ این استرین به بررسی‌های تکمیلی و دقیق‌تری از جمله توالی‌یابی بخش D1/D2 زیرواحد LSU نیاز است (Suh *et al.* 2006).

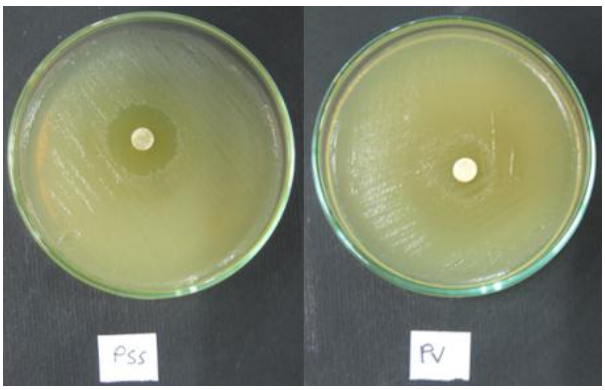
کارایی عصاره در شرایط آزمایشگاهی

در شرایط درون‌شیشه‌ای، عصارهٔ گلپر علیه هر دو عامل بیماری اثر بازدارندگی داشت (شکل ۶). برای هر دو بیمارگر، عصارهٔ ۱۰۰ درصد به نسبت عصارهٔ ۵۰ درصد بازدارندگی بیشتری نشان داد. همچنین، تجزیه و تحلیل

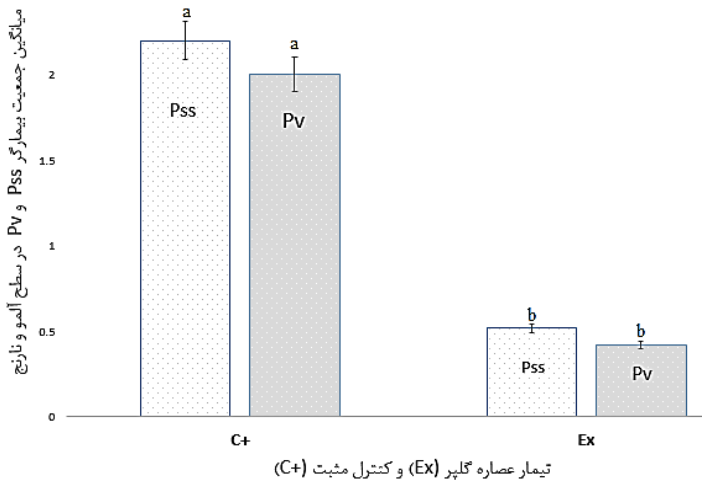
آماری نتایج بررسی گلخانه‌ای، براساس طرح بلوک کامل تصادفی نشان داد که عصارهٔ گلپر توانست جمعیت بیمارگرها را در سطح آلمو و نارنج، نسبت به شاهد تا ۶۰ درصد کاهش دهد (شکل ۷).



شکل ۵. ارتباط فیلوژنتیکی جدایهٔ مخمری مورد بررسی (J20) با برخی از گونه‌های مخمر شناسایی‌شده براساس توالی ژن ITS. درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-Joining ترسیم و ماتریکس فاصله براساس روش Jukes-Cantor محاسبه شده است. خط نشانه منعکس‌کنندهٔ تغییر 0.05 نوکلئوتید در هر جایگاه است.



شکل ۶. تشکیل هالهٔ رشدنکردهٔ دو بیمارگر بلاست (Pss و Pv) ناشی از عصارهٔ بذر گلپر به روش دیسک انتشار



شکل ۷. میانگین جمعیت بیمارگرهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک حاضر روی نهال‌های تیمارشده با عصارهٔ گلپر (Ex) در مقایسه با شاهد (+C) که بجای عصاره با آب اسپری شدند.

بحث

برخلاف باکتری‌ها، اطلاعات زیادی دربارهٔ توان بیوکنترلی مخمرها وجود ندارد، اما در دهه‌های اخیر به توان آنتاگونیستی و مزیت استفاده از مخمرها به‌عنوان دیگر استراتژی کاهش بیماری‌های گیاهی توجه زیادی شده است. از مکانیسم‌های مهم بیوکنترلی مخمرها به رقابت بر سر مواد غذایی و مکان (Mercier and Wilson 1994, Arras *et al.* 1998)، القای پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان (El-Ghaouth *et al.* 2001) می‌توان اشاره کرد. همچنین، مکانیسم‌ها مزیت‌های بیوکنترلی همچون تولیدنکردن اسپورهای آلرژیک (حساسیت‌زا)، تولیدنکردن میکوتوکسین (Everett *et al.* 2005)، احتیاج‌های رطوبتی و غذایی کم و توانایی کلنیزاسیون سریع روی بافت‌های گیاهی، بقای ساپروفیتی بالا در شرایط سخت محیطی (Buck and Andrews 1999, Droby *et al.* 2004)، رشد در سطح زخم‌ها در نتیجهٔ جلوگیری از فعالیت بیمارگرها، را برای مخمرها دارند. تاکنون، گزارش‌های متعددی از توان بیوکنترلی گونه‌های مختلف جنس *Pichia* sp. وجود دارد که غالباً برای کنترل عوامل قارچی بیماریزا پس از برداشت معطوف می‌شود (Qing and Shiping 2000, Arras *et al.* 2002). همچنین، از جنس‌های این گونهٔ مخمری برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت مرکبات نیز استفاده شده است که نتایج مؤثری از کاربرد آن گزارش شده است (Lahlali *et al.* 2004; Nunes 2012). با توجه به نتایج مطلوب بررسی گلخانه‌ای در بازدارندگی بیماری بلاست مرکبات و مقایسهٔ آن با نتایج بررسی آزمایشگاهی، می‌توان اذعان داشت که گونهٔ مخمری *Pichia* sp. به‌طور غیر مستقیم تأثیرات بازدارنده‌ای علیه هر دو بیمارگر بلاست از خود نشان داده است که مشابه چنین تأثیرات بیوکنترلی از این جنس مخمری، تاکنون علیه دیگر بیمارگرهای گیاهی، ارائه شده است (Nantawanit *et al.* 2010). علاوه بر روش‌های کنترل بیولوژیک، استفاده از عصارهٔ گیاهی به دلیل عدم بروز مقاومت پاتوژنی، پایین‌بودن هزینهٔ تولید، آلوده‌نکردن محیط‌زیست و نداشتن عوارض جانبی برای بشر می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسب ترکیبات شیمیایی در کنترل بیمارگرهای گیاهی مطرح شود. با توجه به مزیت‌های شمرده‌شده دربارهٔ استفاده از مخمرها و عصارهٔ گیاهی، در این بررسی سعی شده است در کنار جمع‌آوری و ارزیابی توان بیوکنترلی مخمرهای بومی مناطق شمالی کشور، تأثیر عصارهٔ گیاهی بذر گلپر علیه بیمارگرهای بلاست مرکبات در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی شود. در بررسی آزمایشگاهی که از تقابل مستقیم عصاره و جدایه‌های مخمری با باکتری‌های بیمارگر استفاده شد، تنها عصارهٔ تهیه‌شده توانست علیه دو بیمارگر بازدارندگی نشان دهد. برخلاف نتایج آزمایشگاهی، در بررسی گلخانه‌ای، استرین *Pichia* sp. نتایج قابل قبولی ارائه داد. این نبود همبستگی بین نتایج آزمایشگاهی و نتایج گلخانه‌ای بنا به دلایل مختلفی می‌تواند رخ دهد که یکی از مهم‌ترین آن‌ها نبود عضو تأثیرگذار سیستم بیمارگر ـ میزبان ـ عامل آنتاگونیست، یعنی میزبان گیاهی است که در بررسی‌های گلخانه‌ای و طبیعی، نقش این عضو تأثیرگذار محرز می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که در بررسی‌های بیوکنترلی نمی‌توان به‌طور قطع به نتایج آزمایشگاهی اکتفا کرد و برای ارائهٔ یک دستاورد کاربردی و غربالگری عوامل بیوکنترل، لازم است در کنار بررسی‌های آزمایشگاهی، بررسی‌های گلخانه‌ای و در صورت امکان بررسی‌های مزرعه‌ای (باغی) نیز انجام شود. تاکنون، تحقیقات زیادی نشان داده است که بین اثر استرین‌های آنتاگونیست روی عوامل بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای می‌تواند تفاوت‌هایی وجود داشته باشد (Wagih 1991). اما آنچه اهمیت کاربردی دارد نتایجی است که از سیستم گیاه ـ بیمارگر ـ عامل بیوکنترل استخراج می‌شود. در این پژوهش، جدایه‌ای از *Pichia* sp. بهترین عملکرد کنترلی را در بین جدایه‌های منتخب برابر بیماری بلاست از خود نشان داد. به نظر می‌رسد در این بررسی مکانسیم بیوکنترلی *Pichia* sp. با القای پاسخ‌های دفاعی گیاه در ارتباط باشد که برای اطمینان از صحت نقش این مکانسیم بیوکنترلی در کنترل بیماری بلاست مرکبات به بررسی‌های بیشتری نیاز است. همچنین، در این بررسی عصارهٔ گلپر توانست علاوه بر بازدارندگی رشد در کشت متقابل، در بررسی گلخانه‌ای جمعیت دو بیمارگر را کاهش دهد که این کاهش جمعیت با توجه به عامل هستهٔ یخ‌بودن دو

بیمارگر بلاست برای مرکبات، می‌تواند در کاهش شدت بیماری و خسارت هستهٔ یخ بسیار مفید باشد، در حالی که، این دو (مخمر و عصاره) برای انسان و محیط‌زیست سمّی نیستند و می‌توانند جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتری‌کش‌هایی باشند که امکان مقاوم‌شدن بیمارگرها به آن‌ها وجود دارد. در جمع‌بندی کلی می‌توان چنین استنباط کرد که کنترل بیولوژیک روش بالقوه‌ای برای کمک به کنترل بیماری باکتریایی بلاست مرکبات است که می‌تواند به‌صورت تلفیقی با سایر روش‌های کنترلی این بیماری، استفاده شود.

REFERENCES

Ahmadian-Attari M, Esfahani HM, Amin G, Fazeli M, Jamalifar H, Kamalinia G, Khanlarbeik M, Ashtiani H, Farsam H (2009) The ethnopharmacological study on antibacterial activity of some selected plants used in Iranian traditional medicine. Journal of Medicinal Plants 8: 50-57.

Arras G, De Cicco V, Arru S, Lima G (1998) Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. Journal of horticultural science & biotechnology 73: 413-418.

Arras G, Scherm B, Migheli Q (2002) Improving biocontrol activity of *Pichia guillermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. Biocontrol Science and Technology 12: 547-553.

Balestra G, Varvaro L (1995) Epiphytic survival and control of *Pseudomonas viridiflava* on *Actinidia deliciosa*. III International Symposium on Kiwifruit 444. 745-750.

Beiki F, Gholtapeh EM, Rahimian H, Shamsbakhsh M, Barzegar A, Bisbal AB, Lalucat J (2012) Biological control of citrus blast disease using some yeast strains isolated from citrus orchards in the northern provinces of Iran. Biocontrol in Plant Protection 1: 43-64. (in Persian)

Brandl M (2008) Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157: H7 on postharvest lettuce. Applied and Environmental Microbiology 74: 5285-9.

Bryson V, Szybalski W (1952) Microbial selection. Science (New York, NY) 116: 45-51.

Buck JW, Andrews JH (1999) Attachment of the yeast *Rhodosporidium toruloides* is mediated by adhesives localized at sites of bud cell development. Applied and Environmental Microbiology 65: 465-471.

Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, New York.

Chalutz E, Wilson C (1990) Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. Plant Disease, 74: 134-137.

Coit J (1916) Citrus blast: a new disease in California. California University Journalism. Agriculture 3: 234-235.

Deak T (2007) Handbook of food spoilage yeasts, Second Edition. CRC Press.

Droby S, Bar-Shimon M, Yehuda H, Cohen L, Daus A, Goldway M, Wisniewski M (2004) Involvement of lytic enzymes in the mode of action of the yeast *Candida Oleophila* used to control postharvest diseases. International Society for Horticultural Science Meeting 2004.

Droby S, Chalutz E, Wilson C, Wisniewski M (1989) Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. Canadian Journal of Microbiology 35: 794-800.

Dutova T, Tolstorukov I (1997) Genetic control of purine biosynthesis in the yeast *Pichia methanolica*." Roman's effect" in red adenine-dependent pur6 and pur7 mutants. Genetika 33: 1345-1353.

El-Ghaouth A, Wilson C, Wisniewski M (2001) Induction of systemic resistance in apple by the yeast antagonist *Candida saitoana*. International Organisation for Biological and Integrated Control West Palaearctic Regional Section, Bulletin 24: 309-312.

El-Neshawy S, El-Sheikh-Aly M (1998) Control of green mould on oranges by *Candida oleophila* and calcium treatments. Annals of Agricultural Science (Egypt) 3: 881-890.

Everett K, Vanneste J, Hallett I, Walter M (2005) Ecological alternatives for disease management of fruit rot pathogens. New Zealand Plant Protection 58: 55-61.

Ferguson L, Grafton-Cardwell EE (2014) Citrus production manual. UCANR Publications.

Hemati A, Azarnia M, Angaji A (2010) Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). Middle-East Journal of Scientific Research 5: 174-176.

Iscan G, Demirci F, Kurkcuoglu M, Kivanc M, Baser KH (2003) The bioactive essential oil of *Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt. Zeitschrift für Naturforschung C, 58(3-4): 195-200.

Kousha A, Bayat M (2012) Bactericidal and fungicidal activity of methanolic extracts of *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer against some aquatic and terrestrial animal pathogens. International Journal of Pharmacology 8(7): 652-656.

Kurtzman CP, Fell JW (1998) The yeasts: a taxonomic study, Fourth Edition, Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011) The yeasts: a taxonomic study, Fifth Edition, Elsevier Science, London.

Lahlali R, Serrhini MN, Jijakli MH (2004) Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in Morocco. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 69: 601-609.

Long C-A, Deng B-X, Deng X-X (2007) Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34-9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. Annals of Microbiology 57: 203-207.

Marconi AM, Beltrametti F, Bestetti G, Solinas F, Ruzzi M, Galli E. Zennaro E (1996) Cloning and characterization of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. Applied and Environmental Microbiology 62: 121-127.

Mercier J, Lindow S (2001) Field performance of antagonistic bacteria identified in a novel laboratory assay for biological control of fire blight of pear. Biological Control 22: 66-71.

Mercier J, Wilson C (1994) Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biological Control 4: 138-144.

Marsit S, Mena A, Bigey F, Sauvage FX, Couloux A, Guy J, Legras JL, Barrio E, Dequin S, Galeote V (2015) Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts. Molecular Biology and Evolution 32: 1695-1707.

Naatsaari L, Mistlberger B, Ruth C, Hajek T, Hartner FS, Glieder A (2012) Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. PLoS One 7: e39720.

Nantawanit, N, Chanchaichaovivat, A, Panijpan, B. and Ruenwongsa, P. (2010) Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. Biological Control 52: 145-152.

Noudeh GD, Sharififar F, Noodeh AD, Moshafi MH, Afzadi MA, Behravan E, Aref M, Sakhtianchi R (2010) Antitumor and antibacterial activity of four fractions from *Heracleum persicum* Desf. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume. Journal of Medicinal Plant Research 4: 2176-2180.

Nunes CA (2012) Biological control of postharvest diseases of fruit. European Journal of Plant Pathology 133: 181-196.

Program UOCIPM (2012) *Integrated Pest Management for Citrus*. UCANR Publications.

Qing F, Shiping T (2000) Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. Plant disease 84: 1212-1216.

Sakthivel N, Mew T (1991) Efficacy of bacteriocinogenic strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on the incidence of bacterial blight disease of rice (*Oryza sativa* L.). Canadian Journal of Microbiology 37: 764-768.

Shams-Bakhsh M, Rahimian H (1997) Comparative study on agents of citrus blast and bacterial canker of stone fruits in Mazandaran. Iranian Journal of Plant Pathology 33: 44-47. (in Persian)

Sharififar F, Moshafi MH, Dehghan-Nudehe G, Ameri A, Alishahi F, Pourhemati A (2009) Bioassay screening of the essential oil and various extracts from 4 spices medicinal plants. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 22: 317-322.

Sharma R, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50: 205-221.

Shulaev V, León J, Raskin I (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? The Plant Cell Online 7: 1691-1701.

Suh S-O, Blackwell M, Kurtzman CP, Lachance M-A (2006) Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. Mycologia 98: 1006-1017.

Wagih E (1991) Neither indole acetic acid nor bacteriocin is apparently involved in the *in vitro* antagonism between the virulent and the avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Phytopathology 132: 153-160.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10: 506-513.

Whiley AW, Schaffer BA, Wolstenholme BN (2002) The avocado: botany, production and uses. CABI Publishing. Wallingford, UK.

Whiteside JO, Garnsey SM, Timmer LW (1988) Compendium of citrus diseases. American Phytopathological Society (APS Press).

Wilson CL, Chalutz E (1989) Postharvest biological control of Penicillium rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. Scientia Horticulturae 40: 105-112.

Yessad S, Manceau C, Luisetti J (1992) A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. Plant Disease 76: 370-373.

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2015/ 2016

Investigation on control of citrus blast disease by seed extract of *Heracleum persicum* (Golpar) and epiphytic yeasts

Mohammad Adabi Firoozjaee[1], Pejman Khodaygan[2*], Farid Beiki[3] and Roohallah Saberi-Riseh[4]
1, 2, 4. Former M. Sc. Student and Associate Professors, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
3. Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO).Tehran, Iran
(Received: Apr. 21, 2015 - Accepted: Nov. 21, 2015)

ABSTRACT

Citrus blast caused by species of *Pseudomonas* spp. is one of the most important citrus diseases in north of Iran. This disease causes considerable losses to citrus orchards in conducive climatic conditions. Due to restrictions on the use of antibiotics and chemical compounds, biological control and use of plant antimicrobial compounds can be an effective way to control citrus blast disease. In this study, performance of several epiphytic yeasts isolates and Golpar seed extract on bacterial blast of citrus were studied under *in vivo* and *in vitro* conditions. Antagonistic yeasts collected from citrus leaf samples were isolated from different regions of the northern provinces. Also, Golpar seeds were collected from the highlands of the city of Babol (Mazandaran, Iran). The seed extract of Golpar showed significantly inhibited the growth of two pathogens on KB medium but none of the yeasts did not show significant growth inhibition. The results of greenhouse studies indicated that one of yeast isolate (*Pichia* sp.) reduces the severity of disease with average 78.8 percent. Also Golpar extract was able to reduce the pathogen populations by 60 percent in citrus leaves. The results showed that *Pichia* sp. and Golpar extract are effective for controlling the disease.

Keywords: biocontrol, citrus blast, golpar extract, *Pichia* sp., yeast.

* Corresponding author E-mail pkhodaygan@vru.ac.ir Tel: +98 34 31312044