کنترل بیولوژیک بیماری بلاست مرکبات با استفاده از چند گونه مخمر به‌دست آمده از باغات مرکبات شمال ایران

فرید بیکی[۱]، ابراهیم محمدی گل‌تپه[۱]، حشمت‌اله رحیمیان[۲]، مسعود شمس بخش[۱]، علی برزگر[۲]، آنتونی بوسکت[۳] و جرج لالوکات[۳]

۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه UIB، اسپانیا

مسئول مکاتبات: حشمت‌اله رحیمیان، H.Rahimian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۵ | ۱ (۱) ۵۳-۶۴ | تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۵

چکیده

بلاست مرکبات یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در استان‌های شمالی کشور می‌باشد که توسط چند گونه از باکتری بیمارگر سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) ایجاد می‌شود. این بیماری در شرایط اقلیمی مساعد، خسارت‌های قابل توجهی را به باغات مرکبات وارد می‌سازد. در این بررسی، سعی شد تا از باغات مرکبات شمال کشور، مخمرهایی جداسازی و معرفی شوند که دارای توان کنترل بیولوژیک قابل قبولی علیه این بیمارگر باشند. ارزیابی در شرایط گلخانه‌با مایه‌زنی یک جدایه از باکتری بیماریزای *Pseudomonas syringae* روی رقم نارنج صورت گرفت. پاشش مخمر سه بار و با فاصله های‌زمانی دو روزه انجام شد و پس از آن، مایه‌زنی بیمارگر صورت گرفت. تجزیه‌و تحلیل آماری نتایج آزمایش براساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن اجرا شد. برای شناسایی جدایه‌های برتر، ناحیه‌ی ITS آن‌ها با به‌کارگیری پرایمرهای ITS1 و ITS4 تکثیر و تعیین توالی شد. با مقایسه‌ی نتایج در پایگاه اینترنتی NCBI، مخمرهای *Sporobolomyces ruberrimus*، *Cryptococcus albidus*، *C. magnus* و *Rhodotorula* sp. به‌عنوان آنتاگونیست‌های برتر شناسایی شدند. براساس نتایج، *S. ruberrimus* مؤثرترین مخمر بوده و بیماری را بهتر از سایر گونه‌ها کنترل نمود.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، بلاست مرکبات، *Pseudomonas*، *Sporobolomyces*، *Cryptococcus* و *Rhodotorula*

مقدمه

بیماری بلاست مرکبات (Citrus blast) از جمله بیماری‌های شایع در اکثر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به‌استثنای مناطق گرمسیر می‌باشد که به‌وسیله‌ی باکتری سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) ایجاد می‌شود (Snowdon, 1990; Whiteside *et al.*, 1989). در ایران، این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۶۶ از درختان مرکبات استان مازندارن گزارش شد (Shams-Bakhsh & Rahimian, 1997). برای پیشگیری و کنترل این بیماری‌به‌غیر از رعایت بهداشت زارعی، می‌توان از سموم شیمیایی و ارقام مقاوم نیز استفاده نمود (Whiteside *et al.*, 1989). مصرف سموم شیمیایی ضمن داشتن خطرات سوء زیست محیطی، سبب بروز جدایه‌های مقاوم بیمارگر نیز می‌شوند (Gnanamanickam, 2007; Hwang *et al.*, 2005)، طی سال‌های اخیر، تلاش بر این بوده است تا با کاهش مصرف سموم شیمیایی، سایر روش‌های جایگزین نظیر استفاده از عوامل بیولوژیک، افزایش یابد. کنترل بیولوژیک تعاریف متنوعی دارد ولی در مفهوم کلی، واژه‌ی کنترل بیولوژیک یا بیوکنترل اشاره به استفاده از میکروارگانیسم‌های طبیعی علیه بیمارگر دارد (Barkai-Golan, 2001). در دهه‌های گذشته در خصوص توانایی آنتاگونیستی مخمرها، گزارش‌های بسیاری ارایه شده است. در دهه‌ی ۱۹۸۰ افرادی همچون

جانی‌سیویز (Janisiewicz, 1987) و چالوتز و همکاران (Chalutz *et al*., 1988)، جنبه‌های مثبتی در مورد توانایی مخمرها در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزیجات، ارایه کرده‌اند. در سال‌های پس از آن نیز تحقیقات زیادی در مورد توان بیوکنترلی مخمرها صورت‌گرفت و عمده‌ی آن تحقیقات به‌زمینه‌ی کنترل بیماری‌های قارچی در گیاهان مختلف از جمله مرکبات اختصاص یافته‌است. کارآیی مخمرهای *Pichia guilliermondii*، *Debaryomyces hansenii*، *Candida oleophila*، *Kloeckera apiculata* و *Metschnikowia pulcherrima* در کنترل کپک سبز و آبی میوه‌ی مرکبات (Chalutz & Wilson, 1990; Droby *et al*., 1989; El-Neshawy & El-Sheikh, 1998; Lahlali *et al*., 2004; Long *et al*., 2007; Wilson & (Chalutz, 1989) و مخمر *D. hansenii* در کنترل بیماری پوسیدگی ترش میوه‌ی مرکبات (Chalutz & Wilson, 1990; Droby *et al*., 1989) گزارش شده است. مؤثر بودن مخمرهای *C. sake*، *C. formata*، *C. saitona*، *Aureobasidium pullulans*، *Saccharomyces cerevisiae*، *M. fructicola*، *M. pulcherrima*، در کنترل سایر پوسیدگی‌های میوه در مرکبات (Sharma *et al*., 2009) از جمله دیگر گزارش‌های منتشر شده است. از بین موارد یادشده، مخمر *D. hansenii* دارای بیش‌ترین اثر بیوکنترلی روی بیمارگرها در مرکبات، بوده‌است (Chalutz *et al*., 1988; Karabulut & Baykal, 2003; Wilson & Chalutz, 1989; Wisniewski *et al*., 1988). در ایران نیز گزارش‌هایی درخصوص توان کاهش بیماری‌های گیاهی با برخی مخمرها ارایه شده است. در این زمینه، می‌توان به تأثیر مخمر *M. pulcherrima* در کاهش کپک آبی میوه مرکبات (*Ghasemi et al*., 2011) و کپک آبی یا خاکستری سیب (*Seyfi et al*., 2006)، *C. membranifuciens* در کاهش بیماری کپک خاکستری سیب (Gholamnejad *et al*., 2010; Zangouei *et al*., 2010) و *Rhodotorula mucilaginosa* و *S. cerevisiae* روی کاهش کپک آبی سیب (Gholamnejad *et al*., 2010; Gholamnejad *et al*., 2009) اشاره نمود.

مخمرها با مکانیسم‌های متنوعی در کاهش بیماری مؤثرند که مهم‌ترین آن‌ها، رقابت بر سر مکان (Mercier & Wilson, 1994) و غذا (Arras *et al*., 1998)، برقراری رابطه‌ی انگلی با بیمارگر (Wisniewski *et al*., 1991) و القای مقاومت در گیاه (El-Ghaouth *et al*., 2001) می‌باشند. تاکنون اکثر این نوع مکانیسم‌ها در بیمارگرهای قارچی مورد بررسی قرار گرفته است، ولی در خصوص بیمارگرهای باکتریایی، القای مقاومت نسبت به سایر مکانیسم‌ها بیش‌تر مورد توجه بوده است. در مرکبات از القای مقاومت مخمر *C. oleophila* برای کاهش بیماری کپک آبی میوه‌ی گریپ‌فروت استفاده شده و با این مکانیسم، بیوسنتر اتیلن، فعالیت فنیل آلانین آمین‌لیاز، تجمع فیتوالکسین، کیتیناز و ۱-۳ اندوگلوکاناز افزایش یافته است. همچنین محققان توانسته‌اند با کمک مخمر، سیستم دفاعی گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis* sp.) را در برابر باکتری *P. s.* pv. *syringae* القا کرده و سبب بروز مقاومت نسبت به این باکتری شوند (Raacke *et al*., 2006). در پی موفقیت برخی از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست در کنترل عوامل بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی، مطالعات گسترده‌تری برای توسعه‌ی محصولات بیولوژیک صورت گرفته و تعدادی از آنتاگونیست‌های میکروبی نظیر *C. oleophila* و *Cryptococcus albidus* به‌ترتیب تحت عناوین تجاری Aspire و Yiledplus مجوز ثبت و اجازه‌ی استفاده در سطح تجاری را کسب کرده‌اند (Sharma *et al*., 2009). در ایران استراتژی کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای گیاهی از سالیان دور مورد توجه جدی قرار گرفته و علی‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته، کاربرد عملی آن‌ها در سطح مزرعه با موفقیت چندانی همراه نبوده است. با توجه به مزیت‌های برشمرده شده در خصوص استفاده از مخمرها و نیز با وجود دانستن چالش‌های موجود در کاربرد عملی آن، در این بررسی سعی 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 شوند.

مواد و روش‌های پژوهش

جداسازی مخمر

برای جداسازی مخمرها، از باغات مرکبات متروکه‌ای که سم‌پاشی‌های متداول صورت نگرفته و درختان آن نیز فاقد علایم بیماری بلاست بوده‌اند، نمونه‌هایی از برگ و میوه جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری از باغ‌های استان‌های گلستان، گیلان و مازندران انجام گرفت. برای ثبت موقعیت جغرافیایی جدایه‌های جمع‌آوری شده، از دستگاه موقعیت‌یاب جهانی (Global Positioning System)، (مدل GPS Etrex Vista HCx) استفاده شد (جدول ۱). برای جداسازی مخمرها در آزمایشگاه، تعدادی میوه و برگ جمع‌آوری شده از هر منطقه، در داخل فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری، حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون و یک میلی‌لیتر توین ۲۰ منتقل شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه با کمک دستگاه تکان‌دهنده (Shaker) با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به‌دست آمده، روی محیط کشت مالت آگار (Malt Agar) حاوی سولفات استرپتومایسین به‌میزان 0.1 %(w/v) (Wang *et al.*, 2009)، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (100ppm) و آمپی‌سیلین (50ppm) (Benbow & Sugar, 1999) کشت شد و به‌مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری گردید. پس از خالص‌سازی و مشاهده در میکروسکوپ، نمونه‌ها تا زمان انجام آزمون، در یخچال نگهداری شدند. برای گروه‌بندی اولیه‌ی کلیه‌ی جدایه‌های به‌دست آمده، مشخصات ماکروسکوپی (رنگ و شکل) پرگنه‌ها بررسی و از هر گروه یک جدایه انتخاب و آزمون بیوکنترل در شرایط گلخانه به‌کار برده شد.

ارزیابی کارآیی مخمرها در گلخانه

تهیه اینوکلوم مخمر

از محیط کشت مایع NYGB (هشت گرم محیط کشت مایع Nutrient Broth) حاوی پنج گرم عصاره‌ی مخمر، ده گرم گلوکز و یک لیتر آب مقطر) برای تهیه اینوکلوم مخمر، استفاده شد (Cao *et al.*, 2001). هریک از جدایه‌های مخمر به‌طور جداگانه به داخل فلاسک محتوی NYGB منتقل شدند و فلاسک‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. محتویات هر فلاسک به‌مدت ۱۲ دقیقه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند (De Capdeville *et al.*, 2002). از رسوب به‌دست آمده، سوسپانسیونی غلیظ با غلظت تقریبی 10^{10} سلول مخمر در هر میلی‌لیتر (توسط لام هماسیتومتر) تهیه شد.

تهیه‌ی گیاهان آزمون

برای ارزیابی کارآیی جدایه‌های مخمر در بازداری از رشد باکتری و توان القای مقاومت در گیاه، برای هر جدایه چهار نهال دوساله‌ی نارنج (*Citrus aurantifolia*) تهیه شد. چهار هفته قبل از ارزیابی، به‌منظور به‌دست آوردن برگ‌های تازه و هم‌سن، همه‌ی نهال‌ها سربرداری شدند. در این مدت، ضمن آبیاری مداوم، از مصرف هرگونه کود و یا سموم شیمیایی برای گیاه خودداری شد.

تهیه‌ی بیمارگر

از کشت ۲۴ ساعته‌ی جدایه‌ی ۶۳ گونه *P. syringae* عامل بلاست مرکبات که قبلاً بیماری‌زایی آن‌ها اثبات شده بود، برای تهیه‌ی سوسپانسیون عامل بیماری‌زا استفاده شد. جدایه روی محیط Nutrient NA (agar) کشت و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، نگهداری شد. پس از رشد، سلول‌های باکتری در آب مقطر پخش شده و با کمک اسپکتروفوتومتر، کدری سوسپانسیون (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۲ واحد (معادل 10^{8} سلول در هر میلی‌لیتر) تنظیم شد.

بررسی میزان کنترل عامل بیمارگر

برای بررسی تأثیرات آنتاگونیستی مخمرها در گیاه علیه عامل بیماری بلاست مرکبات، به ازاء هر تیمار مخمر، ۴ نهال نارنج با برگ‌های جوان و هم‌سن، در نظر گرفته شد. سوسپانسیون مخمرها با غلظت 10^{10} سلول در هر میلی‌لیتر، روی گیاه پاشیده شد. پاشش مخمرها به فواصل هر دو روز، تکرار شد. در این مدت گیاهان در فیتوترون و در دمای ۱۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. ۴۸ ساعت پس از پاشش بار سوم مخمرها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بیمارگر بلاست با غلظت 10^{8} سلول در هر میلی‌لیتر، روی هر برگ تزریق و دور ناحیه‌ی آب‌سوخته شده در اثر تزریق،

علامت‌گذاری شد. پس از یک هفته نگهداری در دمای ۱۵ درجه‌ی سلسیوس با رطوبت نسبی در حد اشباع، مساحت ناحیه‌ی گسترش علایم، با کمک دستگاه Dino Capture بر حسب میلی‌متر مربع، ثبت گردید. در این آزمون به ازاء هر تیمار، ۵۰ تکرار در نظر گرفته شد. هفت روز پس از مایه‌زنی بیمارگر به برگ نهال‌های نارنج در تیمارها و شاهد، میزان گسترش بیماری بر حسب میلی‌مترمربع و با کمک دستگاه Dino capture ثبت گردید. داده‌ها، به‌صورت طرح بلوک کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند.

شناسایی مخمرهای برتر

برای شناسایی ضمن بررسی خصوصیات فنوتیپی، از خصوصیات ژنتیکی آن نیز استفاده شد.

بررسی خصوصیات فنوتیپی مخمرها

برای بررسی خصوصیات مرفولوژیکی پرگنه‌ها، جدایه‌ها روی WL nutrient agar کشت شدند. جهت بررسی ابعاد سلول‌های مخمر، از میکروسکوپ Leica DM2500 M استفاده شد. ابعاد ۱۰۰ سلول مخمری که به‌صورت تصادفی انتخاب شده بودند در دو جهت طولی و عرضی اندازه‌گیری و میانگین کلی ابعاد بر حسب میکرومتر، ثبت شد.

بررسی خصوصیات ژنتیکی مخمرها

الف) تکثیر ناحیه‌ی ITS برای تعیین ترادف

استخراج DNA از سلول‌های تازه کشت شده مخمرها روی محیط کشت Wl nutrient agar، با استفاده از کیت Wizard Genomic DNA Purification Kit (شرکت Promega) انجام شد. برای تکثیر ناحیه‌ی ITS، از دو آغازگر زیر استفاده شد (White *et al.*, 1990).

ITS1: 5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3´

ITS4: 5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3´

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، نیم میکرومولار از هر نوع آغازگر، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، یک میلی‌مولار dNTPs و ۱/۵ واحد Taq پلی‌مراز بود. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه، سپس ۳۵ چرخه‌ی مجزا (شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به‌مدت یک‌دقیقه در دمای ۵۵ درجه‌ی سلسیوس و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۱/۵ دقیقه) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه بود (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

ب) تخلیص محصول PCR

قطعات ITS تکثیر شده، با استفاده از Microcon-centrifugal filter (شرکت Millipore) خالص‌سازی شدند. محصول‌نهایی، تا زمان استفاده‌ی بعدی، در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

پ) تعیین ترادف

تعیین ترادف کلیه ژن‌های مورد بررسی، از هر دو سمت (Forward , Reverse) انجام گرفت. آغازگرها و شرایط مورد استفاده، همان آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر اولیه، بودند. برای تکثیر از کیت Big Dye 3.1. Terminator Cycle Sequencing Kit (شرکت Applied Biosystem) استفاده شد.

نتایج

کارآیی مخمر در گلخانه

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪، بین تیمارها و شاهد از نظر کاهش بیماری وجود دارد. در مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪، جدایه‌ی ۲ در مقایسه با شاهد و سایر جدایه‌ها، تأثیر بیش‌تری را در کاهش بروز بیماری داشت (شکل ۱).

شناسایی مخمرهای برتر

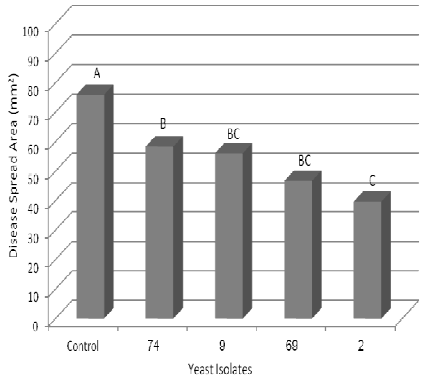
بررسی خصوصیات ژنتیکی مخمرها

برای شناسایی مخمرها، ناحیه ۵۶۴ جفت بازی، ITS آن‌ها تکثیر و تعیین ترادف شدند (شکل ۲). نتایج حاصل از تعیین ترادف، با کمک پایگاه GenBank (NCBI) شناسایی شدند (جدول ۱).

بررسی خصوصیات فنوتیپی

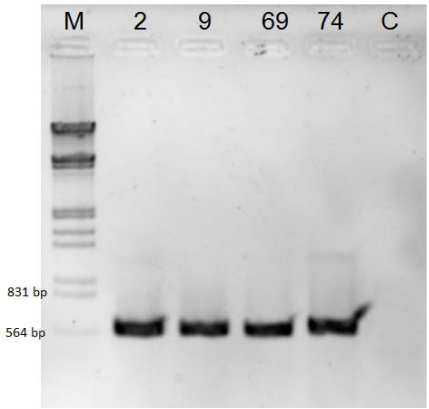
پرگنه‌ی مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* (جدایه‌ی ۲) قرمز رنگ و سلول‌ها بیضی شکل با ابعاد

۵/۵ × ۴/۱ میکرومتر، پرگنه‌ی *C. albidus* (جدایه‌ی ۹) به‌رنگ سفید شیری و سلول‌های کروی شکل با ابعاد ۵/۲ × ۵/۰ میکرومتر، در *C. magnus* (جدایه‌ی ۶۹) پرگنه به‌رنگ کرم با سلول‌هایی با ابعاد ۵/۳ × ۴/۶ میکرومتر و رنگ پرگنه در مخمر *Rhodotorula* sp. (جدایه‌ی ۷۴) صورتی رنگ بوده و سلول‌های آن بیضی شکل و به ابعاد ۶/۲ × ۴/۵ میکرومتر بودند (شکل‌های ۳ و ۴).



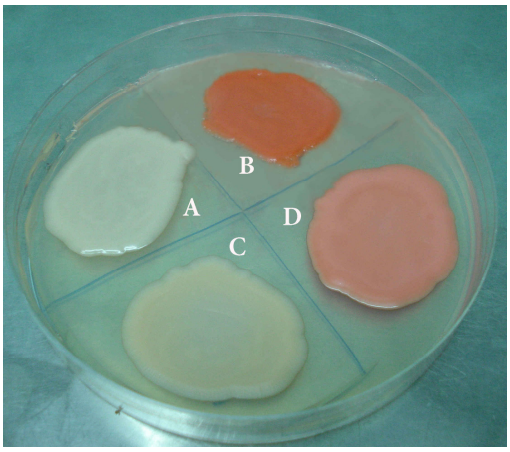
شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین تأثیر جدایه‌های مختلف مخمر در شدت بیماری بلاست (بر حسب میلی‌متر مربع) بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن.

Fig. 1- Mean comparison of effect of different yeast isolates (see Table 1) on blast disease severity (lesion diameter) using Duncan multiple range test.



شکل ۲- قطعه‌ی تکثیر شده ITS در چهار جدایه‌ی مخمر به‌کار برده شده در کنترل بیولوژیکی بیماری بلاست پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، M نشانگر جرم مولکولی و C کنترل منفی.

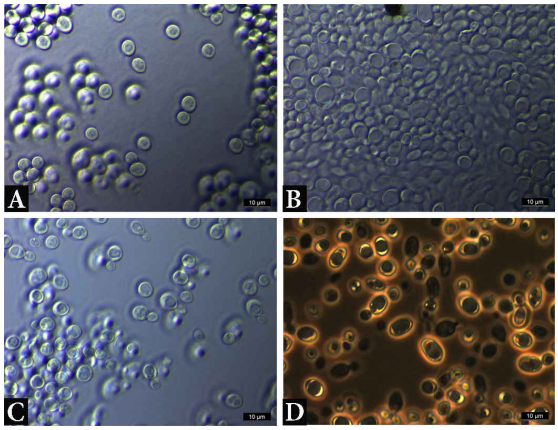
Fig. 2- Agarose-gel electrophoresis of PCR products of ITS region of four yeast isolates used in biocontrol of citrus blast. Lane M, molecular size markers (Lambda DNA/EcoRI/Hind III); lane C, negative control.



شکل۳- پرگنه‌ی گونه‌های‌مخمر مؤثر در کنترل بیولوژیکی بیماری بلاست مرکبات روی محیط کشت WL nutrient agar

A. *Cryptococcus albidus*, B. *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.

Fig. 3- Colony morphology of effective yeast species in biocontrol of citrus blast disease on WL nutrient agar. A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.



شکل۴- سلول‌های مخمرهای مؤثر در کنترل بیولوژیکی بیماری بلاست مرکبات:

A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.

Fig. 4- Cellular morphology of yeast isolates proved to be effective in biocontrol of citrus blast A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی گونه‌های مخمر مؤثر در کنترل بیولوژیکی بلاست مرکبات.

Table1- Geographical locations of promising yeast species in the biocontrol of citrus blast disease.

Position	City	Province	Yeast	Isolate
N36 22.833 E52 40.121	Babol	Mazandaran	*Sporobolomyces ruberrimus*	2
N36 44.558 E53 52.727	Galogah	Golestan	*Cryptococcus albidus*	9
N36 37.579 E51 32.158	Chalus	Mazandaran	*Cryptococcus magnus*	69
N37 10.278 E50 07.923	Langroud	Gilan	*Rhodotorula* sp.	74

بحث

در سال‌های گذشته، درخصوص توانایی آنتاگونیستی مخمرها تحقیقات متعددی انجام شده است (Chalutz *et al.*, 1988; Droby & Chalutz, 1994; Droby *et al.*, 1989). بررسی اخیر به‌منظور یافتن مخمرهایی که دارای توان خوبی در بیوکنترل بیماری بلاست مرکبات باشند، انجام شده است. نتایج تحقیق نشان داد که تعدادی از مخمرهای به‌دست آمده از استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، در کنترل بیولوژیک بیماری بلاست مرکبات کارآیی داشتند. در گذشته نیز گزارش‌های متنوعی مبنی بر مؤثر بودن این گونه‌ها یا گونه‌های دیگر از این جنس‌ها ارایه شده است که می‌توان به تعدادی از آن‌ها اشاره نمود: مخمرهای *Sporobolomyces roseus* برای بیماری کپک خاکستری سیب (Filonow *et al.*, 1996)، *C. albidus* برای کپک خاکستری و پوسیدگی آبی سیب (Calvo *et al.*, 2003; Chandgoyal & Spotts, 1996; Tian *et al.*, 2002)، *C. magnus* برای آنتراکنوز پاپایا (De Capdeville *et al.*, 2007)، *Cryptococcus laurentii* برای پوسیدگی‌های ترش مرکبات (Liu *et al.*, 2010)، *R. aurantiaca* برای کپک آبی گلابی (Chandgoyal & Spotts, 1996) و *R. glutinis* برای پوسیدگی خاکستری گلابی (Zhang *et al.*, 2008) و کپک آبی در سیب (Calvo *et al.*, 2003; Castoria *et al.*, 2005). در تحقیق حاضر نیز از بین چهار گونه مخمر برتر، مخمر *S. ruberrimus* بیش‌ترین کارآیی را در مقایسه با بقیه دارا بود، در حالی‌که *C. albidus* از لحاظ استفاده در کنترل بیولوژیک، پیشینه‌ی بهتری داشته و به‌صورت تجاری تهیه (با نام Yield Plus) و به‌منظور کاهش خسارت بیماری‌های مختلف مصرف شده است (Bar-Shimon *et al.*, 2004). دانستن نحوه‌ی اثر عامل بیوکنترل، بسیار حایز اهمیت بوده و با داشتن اطلاعات جامع‌تر، می‌توان آنتاگونیست‌های مؤثرتری را نیز از طبیعت انتخاب نمود (Wilson & Chalutz, 1989). برای آنتاگونیست‌های میکروبی، چندین نحوه‌ی اثر، ارایه شده است که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: تولید آنتی‌بیوتیک، رقابت بر سر مکان و غذا، پارازیته نمودن بیمارگر و همچنین القای مقاومت در گیاهان (Droby *et al.*, 2000; El-Ghaouth, 1997; El-Ghaouth *et al.*, 2001) و از میان مکانیسم‌های ذکر شده، رقابت بر سر غذا و مکان به‌عنوان مهم‌ترین مکانیسم معرفی شده است (Droby *et al.*, 1992). در مخمرها نیز، هرچند مکانیسم‌هایی که در کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد، به‌طور کامل بررسی نشده است، اما ظاهراً مخمرها آنتی‌بیوتیک تولید نکرده و گاهی اوقات به این خاطر نسبت به باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک، ترجیح داده می‌شوند (Chandgoyal & Spotts, 1996; Droby & Chalutz, 1994; Kurtzman & Fell, 1998). به‌طورکلی مهم‌ترین‌مکانیسم‌هایی که طی آن، مخمرهای بیوکنترل قادر هستند تا میزان بیماری را کاهش دهند عبارتند از: اتصال عوامل آنتاگونیست به هیف بیمارگرها (Arras *et al.*, 1998)، رقابت بر سر مواد غذایی (Arras *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 1992)، رقابت بر سر مکان (Mercier & Wilson, 1994) و پارازیت مستقیم هیف (Wisniewski *et al.*, 1991). به‌نظر می‌رسد در این بررسی، هیچ کدام از مکانیسم‌های ذکر شده در کنترل بیولوژیک باکتری‌ها کاربردی نداشته‌اند، زیرا باکتری سودوموناس، فاقد هیف بوده و از نظر اندازه نیز به

مراتب کوچک‌تر از مخمر می‌باشد. مکانیسم القای مقاومت یا القای پاسخ‌های دفاعی به‌وسیله‌ی آنتاگونیست‌های میکروبی نیز به‌عنوان نوعی دیگر از مکانیسم‌های بیوکنترل برای مخمرها معرفی شده است (Arras, 1996; Droby *et al.*, 1992; Fajardo *et al.*, 1998; Porat *et al.*, 1999). مقاومت القایی، سبب ایجاد موانع ساختاری یا تقویت آن (El-Ghaouth *et al.*, 1998) و نیز سبب تولید ترکیبات ضدمیکروبی در گیاه می‌شود که مشتمل بر تجمع سیگنال‌های مولکولی نظیر سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA)، بیان مولکول‌های ضدمیکروبی و تولید ترکیبات فنله نظیر فیتوالکسین می‌باشند (Basse & Boller, 1992; Dangl & Jones, 2001; Suzuki *et al.*, 2005). برخی از آنزیم‌های تولید شده، سبب تخریب واکنش گلیگولیز و چرخه‌ی تری‌کربوکسیلک اسید می‌گردد (Chan *et al.*, 2007). در این بررسی، پاشش مخمرها روی برگ‌های نارنج، ۳ بار و به‌فواصل دو روزه انجام شد و برای این کار از سلول‌های مخمر تازه کشت شده استفاده شد. البته نه تنها تماس با موجودات‌زنده، سبب تحریک بیان چنین مکانیسم‌های دفاعی در گیاه خواهد شد، بلکه ترکیبات متعلق به عوامل بیمارگرها نیز سبب القای بیان مکانیسم‌های دفاعی می‌شوند که به القاکننده‌های عمومی و یا مولکول‌های مرتبط با بیمارگرها (Pathogen-associated molecular patterns-PAMP) شناخته شده‌اند و شامل پپتیدها، گلیکوپروتیین‌ها، الیگوساکاریدها و یا چربی‌ها می‌باشند (Nurnberger *et al.*, 2004) در این زمینه گزارش شده است که مخمرها در مقایسه با باکتری‌ها، محرک‌های بیش‌تری را دارا هستند (Raacke *et al.*, 2006). نتایج بررسی حاضر نشان داده است که در بین کلیه‌ی جدایه‌های مورد بررسی، تنها معدودی از جدایه‌های مخمرها، قادر بودند تا در مقایسه با شاهد، مقاومت نسبی نسبت به بیماری بلاست را در گیاه مرکبات، افزایش دهند. نتایج تحقیقات پیشین، نشان داد که در القای مقاومت توسط مخمرها، مسیرهای مختلفی تأثیرگذار بوده‌اند. در تحقیقی مشابه با این بررسی، شخص شد که ترکیبات گلیکوپپتیدی دیواره‌ی سلولی مخمر سبب تجمع فیتوالکسین کامالکسین (Camalexin) و بیان ژن‌های مقاومت اکتسابی سیستمیک نسبت به باکتری *P. s.* pv. *syringae* در آرابیدوپسیس شده است. در این تحقیق ثابت شده است که مسیر اصلی القای مقاومت، مسیر سالیسیلات (Salicylate) بوده و با موتاسیون مسیر جاسمونات (jasmonate)، خللی در بروز مقاومت ایجاد نخواهد شد (Raacke *et al.*, 2006). برای اینکه سیستم SAR (systemic acquired resistance) و به‌دنبال آن، سایر واکنش‌های مرتبط فعال شده و در برگ پخش شوند، حدود ۴۸-۳۶ ساعت زمان نیاز است (Shulaev *et al.*, 1995). در بررسی حاضر نیز برای حصول اطمینان بیش‌تر در خصوص گسترش سیگنال‌های مقاومت در کل برگ‌ها، تعداد پاشش، سه بار تکرار شد و پس از هر بار پاشش ۴۸ ساعت، برای بروز سیستم مقاومت در گیاه، به آن فرصت داده شد. مخمرها پس از القای اولیه‌ی مقاومت در گیاه، قادرند تا سبب بیان انواع متفاوتی از فیتوالکسین و یا پروتیین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-Protein) شوند. به‌عنوان مثال افزایش فیتوالکسین‌های اسکوپارین (Scoparone) و اسکوپولتین (Scopoletin) در مرکبات (Arras, 1996)، افزایش آنزیم‌های مرتبط با بیماری‌زایی یعنی کیتیناز (El-Ghaouth *et al.*, 1998; El-Ghaouth *et al.*, 2000; Ippolito & Nigro, 2000)، گلوکاناز و پراکسیداز در سیب و مرکبات (El-Ghaouth *et al.*, 2000; Ippolito & Nigro, 2000) و یا آنزیم‌هایی که با اختلال در تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز بیمارگر، سبب بروز مقاومت در گیاه خواهند شد (Hashem & Alamri, 2009). فعال‌سازی سیستم مقاومت در گیاه به‌منظور بروز مقاومت در برابر بیمارگرها، همیشه یکنواخت نبوده و تحت تأثیر ارتباط متقابل بین گیاه و بیمارگر بوده و فاکتورهای مختلفی می‌توانند روی آن تأثیرگذار باشند (Elmer & Reglinski, 2006). ازاین‌رو کارآیی آن می‌تواند تا حدی با ژنوتیپ‌های بیمارگر، میزبان و نیز شرایط محیطی مرتبط باشد. با توجه به خصوصیات برجسته‌ی مخمرها نظیر غیرسمی بودن، قابل تجزیه بودن در محیط و قیمت ارزان، می‌توان از آن‌ها جهت افزایش مقاومت در گیاهان و به‌صورت گسترده در کشاورزی استفاده نمود.

References

Arras, G. 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. Postharvest Biology and Technology. 8: 191-198.

Arras, G., 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 and Biotechnology. 73: 413-418.

Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus, A., Goldway, M., Wisniewski, M. & Droby, S. 2004. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Current Genetics. 45: 140-148.

Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control. Elsevier Science, Amsterdam.

Basse, C. W. & Boller, T. 1992. Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells: N-linked glycans are essential for activity but act as suppressors of the same activity when released from the glycopeptides. Plant Physiology. 98: 1239-1247.

Benbow, J. M. & Sugar, D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. Plant Disease. 83: 839-844.

Calvo, J., Calvente, V., De Orellano, M. E., Benuzzi, D. & De Tosetti, M. I. S. 2003. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. Biocontrol. 48: 579-593.

Cao, H., Baldini, R. L. & Rahme, L. G. 2001. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. Annual Review of Phytopathology. 39: 259-284.

Castoria, R., Morena, V., Caputo, L., Panfili, G., De Curtis, F. & De Cicco, V. 2005. Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. Phytopathology. 95: 1271-1278.

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

Chalutz, E., Ben-Arie, R., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B. & Wilson, C. L. 1988. Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. Phytoparasitica. 16: 69-75.

Chan, Z. L., Qin, G. Z., Xu, X. B., Li, B. Q. & Tian, S. P. 2007. Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. Journal of Proteome Research. 6: 1677-1688.

Chandgoyal, T. & Spotts, R. A. 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. Postharvest Biology and Technology. 7: 51-64.

Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature. 411: 826-833.

De Capdeville, G., Wilson, C. L., Beer, S. V. & Aist, J. R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. Phytopathology. 92: 900-908.

De Capdeville, G., Souza, M. T., Santos, J. R. P., Miranda, S. P., Caetano, A. R. & Torres, F. A. G. 2007. Selection and testing of epiphytic yeasts to control anthacnose in post-harvest of papaya fruit. Scientia Horticulturae. 111: 179-185.

Droby, S. & Chalutz, E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. pp. 63-75. In: Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E. (eds.), Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables-Theory and Practice, CRC Press, Boca Raton.

Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L & 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.

Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E. 1992. Biological control of postharvest diseases: A promising alternative to the use of synthetic fungicides. Phytoparasitica. 20: 149-153.

Droby, S., Porat, R., Vinokur, V., Cohen, L., Weiss, B. & Daus, A. 2000. Induction of resistance to postharvest decay by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Photopathology. 24: 297-301.

El-Ghaouth, A. 1997. Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 19: 160-162.

El-Ghaouth, A., Wilson, C. L. & Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology. 88: 282-291.

El-Ghaouth, A., Wilson, C. & Wisniewski, M. 2001. Induction of systemic resistance in apple by the yeast antagonist *Candida saitoana*. Bulletin OILB/SROP. 24: 309-312.

El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M. & Wilson, C. L. 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. Plant Disease. 84: 243-248.

El-Neshawy, S. M. & El-Sheikh, M. M. 1998. Control of green mold on oranges by *Candida oleophila* and calcium treatments. Annals of Agricultural Sciences Cairo. 3: 881-890.

Elmer, P. A. G. & Reglinski, T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology. 55: 155-177.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 329-337.

Fajardo, J., McCollum, T., McDonald, R. & Mayer, R. 1998. Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum*. Biological Control. 13: 143-151.

Filonow, A., Vishniac, H., Anderson, J. & Janisiewicz, W. 1996. Biological control of *Botrytis cinereain* apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. Biological Control. 7: 212-220.

Ghasemi, S., Etebarian, H., Sahebani, N. & Aminian, H. 2011. Control of blue mold on orange fruit by yeast, *Metschnikowia pulcherrima* (m54) and induction of b 1,3-glucanase enzyme in albedo and flavedo tissues.Proceeding of the biological control development congress in Iran, 27-28 July, Tehran, Iran, 477. (In Persian with English summary)

Gholamnejad, J., Etebarian, H. R. & Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science. 4: 1-7.

Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Roustaee, A. & Sahebani, N. A. 2009. Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research. 49: 270-275. (In Persian with English summary)

Gnanamanickam, S. S. 2007. Plant Aassociated Bacteria. Springer, Dordrecht.

Hashem, M. & Alamri, S. 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. Postharvest Biology and Technology. 53: 123-130.

Hwang, M. S. H., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W. & Guttman, D. S. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Applied and Environmental Microbiology. 71: 5182-5191.

Ippolito, A. & Nigro, F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Crop Protection. 19: 715,723.

Janisiewicz, W. J. 1987. Postharvest biological control of blue mold on apples. Phytopathology. 77: 481-485.

Karabulut, O. A. & Baykal, N. 2003. Biological control of postharvest diseases of peaches and nectarines by yeasts. Journal of Phytopathology. 151: 130-134.

Klotz, L. J. 1978. Fungal, bacterial, and non parasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. pp. 1-23. In: Reuther, W., Calavan, E. C. & Carman, G. E. (eds.), The Citrus Industry: IV. Crop Protection, University of California Press, Berkely.

Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. 1998. The Yeasts, a Txonomic Study. Elsevier Science, Amesterdam.

Lahlali, R., Serrhini, M. & Jijakli, M. 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.

Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B. & Zheng, X. 2010. Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. Letters in Applied Microbiology. 51: 30-35.

Long, C., Deng, B. & Deng, 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.

Mercier, J. & Wilson, C. L. 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.

Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. & Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. Immunological Reviews. 198: 249-266.

Porat, R., Vinocur, V., Weiss, B., Cohen, L. & Droby, S. 1999. Effects of various elicitors on the resistance of citrus fruit against pathogens. Phytoparasitica. 27: 157-158.

Raacke, I., Von Rad, U., Mueller, M. & Berger, S. 2006. Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by salicylic acid-dependent as well as independent mechanisms. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19: 1138-1146.

Seyfi, R., Nahvi, I. & Balali, G. 2006. Investigation of biological control of post harvest diseases on apple by yeast *Metschenikowia pulcherrima*. Iranian Journal of Biology. 19: 64-76. (In Persian with English summary)

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: 132-143. (In Persian with English summary)

Sharma, R. R., Dinesh, S. & Rajbir, S. 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. 7: 1691-1701.

Snowdon, A. L. 1990. A Colour Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Manson Publishing, London.

Suzuki, H., Reddy, M. S. S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G. D., Huhman, D. V., Sumner, L. W., Blount, J. W., Mendes, P. & Dixon, R. A. 2005. Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. Planta. 220: 696-707.

Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y. & Liu, H. B. 2002. Biocontrol efficacy of antagonist yeasts to gray mold and blue mold on apples and pears in controlled atmospheres. Plant Disease. 86: 848-853.

Wang, X., Li, G., Jiang, D. & Huang, H. C. 2009. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. Biological Control. 50: 164-171.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds.), PCR Protocols a Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego.

Whiteside, J. O., Garnsey, S. M. & Timmer, L. W. 1989. Compendium of Citrus Diseases. American Phytopathology Society Press, Minnesota.

Wilson, C. L. & Chalutz, E. 1989. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. Scientia Horticulturae. 40: 105-112.

Wisniewski, M., Wilson, C. L., Chalutz, E. & Hershberger, W. 1988. Biological control of postharvest diseases of fruit: Inhibition of *Botrytis* rot on apple by an antagonistic yeast. 46th Annual meeting of the electron microscopy society of America, 7-12 August, San Francisco, U.S.A., 290-291.

Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., Mclaughlin, R., Wilson, C. & Chalutz, E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*.1.Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 39: 245-258.

Zangouei, E., Etebarian, H. R. & Sahebani, N. A. 2010. Improving biocontrol of gray mold disease of apple using a mixture of yeast isolates. Iranian journal of plant protection science. 41: 361-372. (In Persian with English summary)

Zhang, L., Jiang, B., Mu, W. & Zhang, T. 2008. Characterization of d-tagatose 3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* SK011. Journal of Biotechnology. 136: S726-S726.

Biological control of citrus blast disease using some yeast strains isolated from citrus orchards in the northern provinces of Iran

Farid Beiki[1], Ebrahim Mohamadi Gholtapeh[1], Heshmatollah Rahimian[2], Masood Shamsbakhsh[1], Ali Barzegar[2], Antony Busquets Bisbal[3] and Jorj Lalucat[3]

1- Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- College of Agriculture, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran.

3- Department de Biologia, Microbiologia and Institut Mediterrani d'Estudis Avanc¸ ats (CSIC-UIB), Universitat de les Illes Balears, Campus UIB, 07122 Palma de Mallorca, Spain

Corresponding author: Heshmatollah Rahimian, rahimian.h@gmail.com

Received: July. 5, 2012 **1 (1) 53-64** **Accepted: Oct. 6, 2012**

Abstract

Citrus blast caused by *Pseudomonas* spp. is one of the most important diseases in the northern citrus growing provinces of Iran which causes considerable losses to citrus orchards in conducive climatic conditions. In this study, we tried to isolate and introduce some yeast strains from citrus orchards with acceptable biological control potential against the disease. The evaluations were performed under green house conditions on sour orange seedlings. Yeast cell suspensions were sprayed three times with two-days intervals on seedlings before pathogen inoculation. Statistical analysis of the results was carried out using Randomized Complete Block experimental design and comparison of disease severity means was performed by Duncan's Multiple Range Test. For the identification of the effective yeast strains, ITS regions of their rRNA operon were amplified using universal primers (ITS1 and ITS4) by PCR and the amplified fragments were sequenced. Based on the above procedures and comparison of the sequences with those deposited in the GenBank, the effective yeasts were identified as *Sporobolomyces ruberrimus*, *Cryptococcus albidus*, *C. magnus* and *Rhodotorula* sp. According to the results, *S. ruberrimus,* was the most effective yeast and controlled the disease more efficiently than other species.

Keywords: Biocontrol, Citrus blast, *Pseudomonas, Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*