

مقایسه تاثیر تیمار باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از سطح میوه لیموترش (*Mexican lime*)، آب گرم و قارچ کش تیابندازول در کنترل بیماری کپک سبز میوه لیموترش (*Penicillium digitatum*)

محمدامین تقی پور*

کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه گیاه پزشکی

ساغر کتابچی

استادیار، گروه گیاه پزشکی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز، استان فارس- ایران

عباس شرزهای

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، گروه گیاهپزشکی

چکیده

در این تحقیق عملکرد باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از سطح میوه لیموترش با تیمار آب گرم با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و قارچ‌کش تیابندازول در جلوگیری از رشد و گسترش بیماری کپک سبز میوه لیموترش بررسی شد. میوه‌های لیمو بعد از ضدعفونی سطحی و ایجاد زخم‌های سطحی، در سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری غوطه‌ور شده و بعد از خشک شدن، به طور جداگانه در تیمارهای مختلف، شامل سوسپانسیون آنتاگونیست با غلظت ۱۰۸ سلول در هر میلی‌لیتر به مدت دو دقیقه، آب گرم به مدت پنج دقیقه و قارچ‌کش با غلظت ۱/۵ در هزار به مدت دو دقیقه قرار گرفتند. از بین باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از سطح پوست میوه لیمو، جدایه‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* بیشترین اثر بازدارندگی به ترتیب به میزان ۷۵-۱۰۰ و ۲۵-۴۹ درصد را داشتند. در مقایسه قدرت بازدارندگی تیمارهای مختلف، قارچ‌کش، آنتاگونیست‌های مذکور و آب گرم، به ترتیب به میزان ۷۰، ۱۰۰ و ۵۰ درصد در رتبه اول تا سوم قرار گرفتند. با توجه به مشکل پلاسیدگی برخی میوه‌ها بعد از غوطه‌ور شدن در آب گرم و اثرات منفی زیست محیطی سموم شیمیایی و به دلیل تاثیر بیشتر آنتاگونیست‌های استخراج شده از سطح میوه لیموترش نسبت به آب گرم، این باکتری‌ها به عنوان آنتاگونیست‌های موثر در بیوکنترل بیماری کپک سبز میوه لیموترش معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: لیمو ترش، کنترل بیولوژیک، کپک سبز

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: amin_taghipoor@yahoo.com

مقدمه

لیموترش از خانواده سداب با نام علمی *Citrus aurantifolia* است. در ایران *Citrus aurantifolia* (لیمو ترش) به لیمو شیشه، لیمو جهرمی، لیمو عمانی، لیموشیرازی و نظایر آنها معروف است. بیماری‌های پس از برداشت در مرکبات خسارات فراوانی را ایجاد نموده که اغلب این بیماری‌ها ناشی از آلودگی‌های میوه در حین برداشت، جابجایی، بسته بندی و نگهداری در اماکن فروش این محصولات می‌باشد (Zamani, 2009). از عمده ترین بیمارگرهای این گیاه می‌توان به *P. italicum* و *P. digitatum* اشاره نمود که به ترتیب مولد کپک سبز و آبی هستند (Hernandez, 2010). این قارچ‌ها با تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی موجب تجزیه پکتین دیواره سلولی پوست میوه و نرم شدن میوه مرکبات می‌شود. از شایع ترین روش‌های مبارزه در مراحل قبل و بعد از برداشت برای کاهش این بیماری‌ها، استفاده از قارچ کش‌های مختلف به ویژه تیابندوزال، ایمزالیل، کاربندازیم و بنومیل می‌باشد (Eckert, 1990). امروزه خطر استفاده از مواد شیمیایی برای انسان و اثرات مخربی که در محیط زیست به جا می‌گذارند، زمینه را برای فعالیت و تحقیقات بیشتر در زمینه استفاده از روش‌های جایگزین، که یکی از ایمن ترین و مهم ترین آن‌ها کنترل بیولوژیکی است، فراهم آورده است. غوطه‌ور کردن میوه در آب گرم می‌تواند یک راهکار مناسب برای کنترل بیمارگرهای سطح میوه باشد. این روش با غیر فعال کردن آنزیم‌های هیدرولیز کننده دیواره سلولی و اتیلن باعث ماندگاری محصولات بعد از برداشت می‌گردد (Reyes, 2004). اخیراً عوامل بیوکنترل میکروبی برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت میوه توجه زیادی را به خود جلب کرده است به طوری که بسیاری از متابولیت‌های آنتاگونیست‌ها به منظور مبارزه با آلودگی‌های بعد از برداشت مرکبات مورد استفاده قرار می‌گیرند (Smilanick, 1992). در این تحقیق روش‌های مختلف کنترل بیماری کپک سبز بررسی و تاثیر تیمارهای سم، آب گرم و آنتاگونیست در جلوگیری از رشد و اسپورزایی قارچ عامل بیماری با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری میوه لیموترش

لیموترش (*Mexican lime*) از باغ‌های شهرستان‌های جهرم و داراب تهیه شد. میوه‌ها بدون زخم، سالم و با اندازه متوسط با محیط حدود ۸۰ میلی متر انتخاب شد.

جدا سازی باکتری های سطح میوه لیموترش

بخشی از پوست میوه لیمو به ابعاد ۲×۲ سانتی متری جدا و در پنج میلی لیتر آب مقطر سترون مخلوط شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون به دست آمده را در ظروف پتری با قطر هشت سانتی متر ریخته و سپس به ظروف پتری محیط کشت آگار مغذی (Nutrient agar) به صورت روش آمیختگی اضافه و در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد. پس از انقضای این مدت بر اساس تفاوت در رنگ، حاشیه، وضعیت روی سطح محیط و قوام پرگنه‌ها، جدایه‌های مختلف تفکیک و جهت بررسی‌های بعدی خالص سازی شدند.

شناسایی باکتری های سطح میوه لیموترش

جدایه‌هایی که از نظر شکل و خصوصیات بیوشیمیایی متفاوت بودند خالص شده، به محیط N.A منتقل و پس از اطمینان از خلوص آن‌ها، با استفاده از کلیدهای معتبر و استاندارد باکتری شناسی، شناسایی شدند (Garrity, 1995). جدایه‌هایی که اثر آنتاگونیستی داشتند بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی تا سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند.

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری های سطح میوه در مقابل قارچ عامل کپک سبز روی میوه لیموترش (*in vivo*)

ابتدا میوه‌های سالم و هم اندازه لیمو در اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی، سپس زخمهای کوچکی در سطح میوه ایجاد گردید. پس از سه ساعت غوطه‌وری در سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی لیتر، به طور جداگانه در سوسپانسیونی از جدایه‌های B-3، B-7، B-8 که در بین جدایه‌ها بیشترین خاصیت آنتاگونیستی داشتند با غلظت 10^8 سلول باکتری در هر میلی لیتر به مدت دو دقیقه غوطه ور شدند و سپس به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰ درصد نگهداری شدند.

مقایسه تیمارهای باکتری آنتاگونیست، آب گرم و قارچ کش تیا بندازول

میوه‌های لیمو بعد از ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۰ درصد و ایجاد زخم سطحی، در سوسپانسیون اسپور *P. digitatum* با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی لیتر به مدت سه ساعت غوطه‌ور شدند. سپس میوه‌ها برای تیمار باکتری، به مدت دو دقیقه در سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست با غلظت 10^8 سلول در هر میلی لیتر قرار داده شدند. به منظور اعمال تیمار آب گرم، میوه‌های لیموترش آغشته به اسپورهای *P. digitatum* به مدت پنج دقیقه در آب گرم با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. برای اعمال تیمار قارچ‌کش، میوه‌های آغشته به اسپورهای قارچ مذکور به مدت دو دقیقه در پودر و تابل تیا بندازول ۶۰ درصد-

سترون به عنوان شاهد استفاده گردید. میوه‌های تیمار شده به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۴°C و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰ درصد نگهداری شدند (Janisweics, 1987).

طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایشها در قالب طرح کامل تصادفی (CRD) انجام گرفت و تیمارها در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن (Duncan) انجام شد.

نتایج و بحث

تهیه *Penicillium digitatum*

قارچ از میوه‌های لیموترش که آلوده به کپک سبز بودند، جداسازی شد و بعد از خالص کردن قارچ به روش تک ریشه با استفاده از اصول کخ اثبات بیماری زایی انجام شد، سپس به منظور نگهداری بلند مدت کشت‌های خالص قارچ در ظروف پتری در دمای بهینه ۲۶ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند.

شناسایی باکتری‌های استخراج شده از سطح میوه لیموترش

از بین باکتری‌های خالص شده از سطح میوه، سه جدایه که از نظر خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی متفاوت بودند انتخاب و شناسایی شدند.

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های سطح میوه‌های لیموترش در مقابل *P. digitatum* در شرایط درون زیوه‌ای (*in vivo*)

اثر آنتاگونیستی و میزان بازدارندگی باکتری‌ها در سطح میوه‌های لیموترش در جدول ۱ نشان داده شده است. سه جدایه انتخابی که اثر آنتاگونیستی از خود نشان دادند (جدایه ۳، ۷ و ۸) با شاهد تفاوت معنی دار داشته ولی با یکدیگر تفاوت معنی داری نشان ندادند (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر بازدارندگی جدایه های باکتری در مقابل توسعه آلودگی ناشی از کپک سبز در میوه لیموترش بعد از مایه زنی با سوسپانسیون اسپور *Penicillium digitatum*

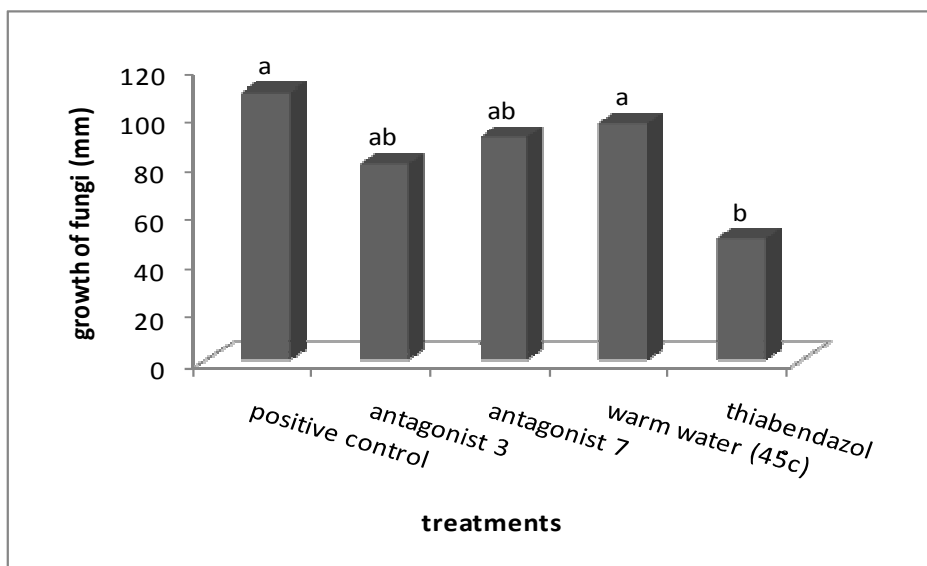
تیمار	رشد قارچ (میلی متر)	نام باکتری
شاهد	۵۵/۴۸a	---
جدایه ۳	۵۰/۰۰b	<i>Bacillus subtilis</i>
جدایه ۷	۵۰/۷۹b	<i>Pseudomonas fluorescen</i>
جدایه ۸	۵۰/۸۶b	<i>Pseudomonas sp.</i>

مقایسه عملکرد تیمارهای باکتری آنتاگونیست، آب گرم و قارچ کش تیابندازول در کنترل *P. digitatum*

میوه های تیمار شده با آب گرم توانایی چندانی در مهار رشد قارچ نداشتند و از این نظر با نمونه های تیمار شده با آنتاگونیست های باکتریایی تفاوت معنی داری نشان دادند، اما با تیمار شاهد تفاوت معنی دار نداشتند. تیمار با قارچ کش تیابندازول در مهار آلودگی بسیار موفق بود و با بقیه تیمارها تفاوت معنی دار داشت. آنتاگونیست های باکتریایی نیز عملکرد بهتری در جلوگیری از رشد و گسترش کپک سبز داشتند و از این نظر با شاهد و نمونه آب گرم تفاوت معنی دار نشان دادند (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۱- مقایسه تاثیر بازدارندگی باکتری های آنتاگونیست، آب گرم و قارچکش در جلوگیری از پیشرفت عفونت های ناشی از *Penicillium digitatum*

تیمار	قطر پرگنه قارچ (میلی متر)
شاهد	۱۱۰/۰۰a
<i>Bacillus subtilis</i>	۸۰/۶۷ab
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	۹۱/۳۳ab
آب گرم ۴۵°C	۹۷/۳۳a
قارچ کش تیابندازول	۵۰/۰۰b



نمودار ۱- مقایسه تاثیر باکتری های آنتاگونیست، تیمار آب گرم و قارچ کش تیابندازول در جلوگیری از رشد و توسعه *Penicillium digitatum* به روی میوه های لیمو ترش در دمای ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰ درصد.

از بین جدایه‌های باکتری استخراج شده از سطح پوست میوه لیموترش سه جدایه در مقابل *P. digitatum* اثر آنتاگونیستی نشان دادند. این سه جدایه متعلق به سه جنس *Pantoea*، *Pseudomonas* و *Bacillus* بودند. از بین آنتاگونیست‌های جداسازی شده از سطح میوه لیموترش *B. subtilis* بیشترین فعالیت ضد قارچی را در برابر *P. digitatum* داشت. بررسی‌ها نشان داد که قدرت آنتاگونیستی *Pantoea sp.* در مقایسه با دو آنتاگونیست دیگر بهتر است، علاوه بر این مشخص گردید که قدرت کنترل قارچ‌کش تیابندازول از سایر روش‌های کنترل مانند کاربرد آنتاگونیست‌ها و استفاده از آب گرم بیشتر است، ولی به علت اثرات زیان آور استفاده از سموم، کاربرد سموم به عنوان راهکار آخر در کنترل بیماری‌های پس از برداشت توصیه می‌شود. در پژوهش اخیر باکتری پseudوموناس جداسازی شده از سطح میوه لیموترش رقم (Mexican lime) جداسازی شد کمتر از *B. subtilis* توانست جلوی رشد بیماری کپک سبز را بگیرد، این نتایج با یافته‌های Smilanick & Denis-Arrue (1992) تطابق دارد. استفاده از آب گرم با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه توانایی جلوگیری از گسترش زخم‌های ناشی از *P. Digitatum* را دارا بود به طوری که میزان بازدارندگی آب گرم کمی کمتر از قدرت بازدارندگی *Pseudomonas fluorescens* ارزیابی شد. گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از آب گرم به تنهایی یا به همراه کاربرد قارچ‌کش در کنترل برخی از بیماری‌های بعد از برداشت وجود دارد. یکی از مشکلات استفاده از آب گرم عدم تحمل برخی محصولات در حرارت ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد است که باعث پژمردگی میوه می‌شود. این امر استفاده از آب گرم در جهت کنترل بیماری‌های بعد از برداشت را با مشکل مواجه می‌کند (Conway, 1999). در این تحقیق مشخص شد توانایی برخی باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از پوست میوه لیموترش در کنترل کپک سبز از روش استفاده از آب گرم ۴۵ درجه سانتی‌گراد هم بیشتر است. این خصوصیت آنتاگونیستی می‌تواند *B. subtilis* را به عنوان یک عامل بیوکنترل بیماری کپک سبز معرفی نماید. این باکتری بومی سطح لیموترش بوده است و می‌توان با افزایش غلظت آن به عنوان یک راهکار، جایگزین روش‌های کنترل شیمیایی برای بیماری پوسیدگی سبز به شمار آید. گرچه بر اساس نتایج به دست آمده تاثیر قارچ‌کش تیابندازول موثرتر از سایر روش‌ها در کنترل بیمارگر بود اما خطراتی مانند بقایای سموم در محصولات بعد از برداشت و مشکلات ناشی از بروز مقاومت در بیمارگرها علیه سموم مصرفی، لزوم تلاش و تحقیقات بیشتر برای دستیابی به روش‌های جایگزین و ایمن را آشکار می‌سازد.

منابع

- Conway, W. S., Janisiewicz, W. J., Idein, J. O., & Sams, C. E., (1999). Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration and biological control to reduce postharvest decay of "Gala" apples. *Horticulture Science*, 34:700-704.
- Eckert, J. W., (1990). Recent development in chemical control of postharvest diseases. *Acta Horticulture*, 296: 477-494.
- Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N., (1995). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Forth Edition. New York. Volume two: The Proteobacteria, 612-614
- Hernandez-Montiel, L. G., Ochoa J. L., Troyo-Diequez, E., & Larralde-Corona, C. P., (2010). Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology*, 56: 181-187.
- Janisiewicz, W. J., (1987). Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology*, 77: 481-485.
- Reyes, M. E. Q., Rohrbach, K. G., & Paull, R. E., (2004). Microbial antagonists control black of pineapple fruit. *Postharvest Biology*, 33: 193-203.
- Smilanick, J. L., & Denis-Arrue, R., (1992). Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant Disease*, 76: 481-485.
- Zamani, M., Sharifi-Tehrani, A., Alizadeh-Aliabadi, A., & Farzaneh, M., 2009. Biological control of green mold of oranges caused by *Penicillium digitatum* with *Pantoea agglomerans*. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 39(2): 345- 352.

**Treatment of Mexican lime fruits with surface
bacterial antagonists, warm water and Thiabendazol
and comparison of their potential to control the green mold
caused by *Penicillium digitatum***

M. A. Taghipour, S. Ketabchi, A. Sharzei

Abstract

Green mold caused by *Penicillium digitatum* is an important and destructive storage disease of citrus fruits. In this research, the inhibitory effects of bacterial antagonists isolated from the surface of Mexican lime fruits were compared with warm water and fungicide treatment. Mexican lime fruits were surface sterilized with 70% ethanol, scarred and dipped into a spore suspension of *P. digitatum* containing 10^6 spores ml^{-1} for three hours, then air dried and separately subjected to different treatments, which consisted of immersion in bacterial antagonist suspensions containing 10^8 cells ml^{-1} for two min, 45°C warmed water for five min, and 0.15% Thiabendazol solution for two min. Treated fruits were stored at 24°C and 90-95% RH. Among the examined lime surface bacteria, isolates of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* showed the highest inhibitory effect on the fungus. In comparison, however, fungicide and warm water treatments were the most and least successful methods, respectively. Due to the wilting of some fruits after thermotherapy, and the risks of chemical residues and pathogen resistance, we could introduce these bacteria as effective antagonists to control the green mold on Mexican lime fruits.

Key words: Mexican lime, biological control, green mold