Archive of SID

فصلنامه‌ی فیزیولوژی و تکنولوژی پس از برداشت فرآورده‌های باغی
سال اول، شماره‌ی اول، تابستان ۱۳۹۱
صص ۸۷-۷۹

مقایسه تاثیر تیمار باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده ازسطح میوه لیموترش(*Mexican lime*)،آب‌گرم و قارچ کش تیابندازول در کنترل بیماری کپک سبزمیوه لیموترش(*Penicillium digitatum*)

محمدامین تقی پور *
کارشناسی ارشد، دانشگاهآزاداسلامی، واحدشیراز، گروه گیاه پزشکی
ساغرکتابچی
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، درسوسپانسیون 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 ۱۰۰-۷۵ و ۴۹-۲۵ درصد راداشتند. درمقایسه 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
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱/۱۹ ، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۵/۶

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیموترش‌از خانواده سداب با نام علمی *Citrus aurantifolia* است. در ایران *Citrus aurantifolia* (لیمو ترش) به لیمو شیشه ، لیموجهرمی ، لیموعمانی ، 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. digitatum* و*P. italicum* 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 شایع‌ترین روش‌های مبارزه در مراحل قبل و بعد از برداشت برای کاهش این بیماری‌ها، استفاده از قارچ کش‌های مختلف به ویژه تیابندوزال، ایمازالیل، کاربندازیم و بنومیل می‌باشد(Eckert, 1990). امروزه خطر استفاده از مواد شیمیایی برای انسان و اثرات مخربی کهدر محیط زیست به‌جا می‌گذارند، زمینه را برای فعالیت و تحقیقات بیشتر در زمینه استفاده از روش‌های جایگزین، که یکی از ایمن‌ترین و مهم‌ترین آن ها 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 آلودگی های بعد از برداشت مرکبات مورد استفاده قرار می گیرند (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.

www.SID.ir

Archive of SID

جدا سازی باکتری‌های سطح میوه لیموترش

بخشی از پوست میوه لیمو به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متری جدا ودر پنج میلی لیتر آب مقطر سترون مخلوط شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون به دست آمده را در ظروف پتری با قطر هشت سانتی‌متر ریخته و سپس به ظروف پتری محیط کشت آگار مغذی (Nutrient agar) به صورت روش آمیختگی اضافه و در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد 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 خالص‌سازی شدند.

شناسایی باکتری‌های 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 باکتری‌های 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 میلی‌لیتر، 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 میلی‌لیتر به مدت دو دقیقه غوطه ور شدند و سپس به مدت ۱۰ روز در دمای۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰ درصد نگهداری شدند.

مقایسه تیمارهای باکتری آنتاگونیست، آب گرم و قارچ کش تیابندازول

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 تیمارباکتری، 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 سانتی‌گرادقرار داده شدند. برای اعمال تیمار قارچ‌کش، میوه‌های آغشته به اسپورهای قارچ مذکور به مدت دو دقیقه در پودر وتابل تیابندازول ۶۰ درصد-

www.SID.ir

Archive of SID

[2-(Thiazol -4-yl)-1H-benizimida] zole با غلظت ۱/۵در هزار غوطه‌ور شدند. از آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده گردید. میوه‌های تیمار شده به مدت ۱۰روز 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 وبحث

تهیه *Penicillum digitatum*

قارچ از میوه‌های لیموترش که آلوده به کپک سبز بودند، جداسازی شد و بعد از خالص کردن قارچ به روش تک ریسه 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 باکتری های استخراج شده از سطح میوه لیموترش

از بین باکتری های 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 درجدول۱ 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).

جدول۱- 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*

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

www.SID.ir

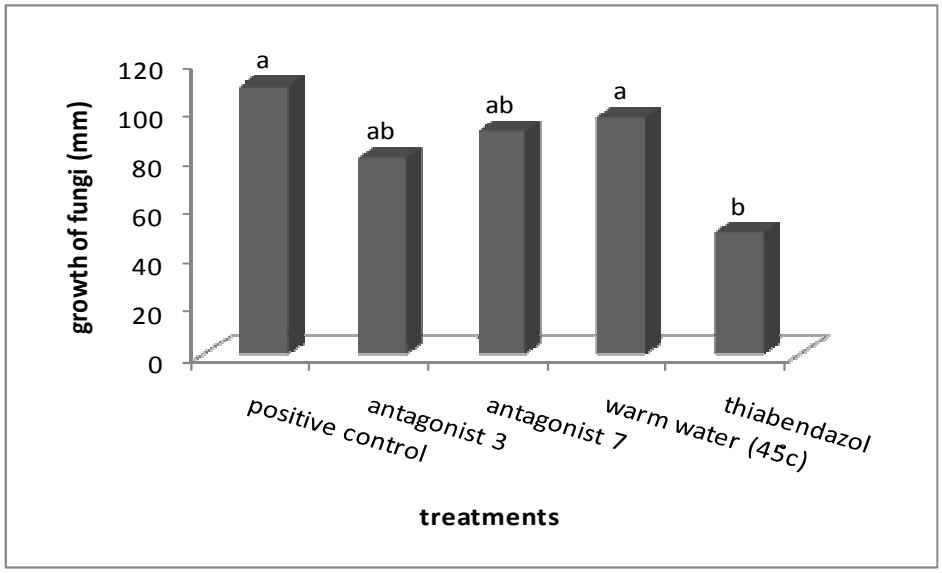
Archive of SID

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 نمونه‌های تیمار شده با آنتاگونیست‌های 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 معنی‌دار داشت. آنتاگونیست‌های باکتریایی نیز عملکرد بهتری در جلوگیری از رشد و گسترش کپک سبز داشتند و از اینnظر با شاهد و نمونه آب گرمتفاوت معنی دار نشان دادند (جدول ۲ و شکل۱).

جدول۱- مقایسه تاثیر بازدارندگی باکتری های آنتاگونیست، آب گرم و قارچکش در جلوگیری ازپیشرفت عفونت های ناشی از *Penicilliumdigitatum*.

تیمار	قطر پرگنه قارچ (میلی متر)
شاهد	۱۱۰/۰۰a
Bacillus subtilis	۸۰/۶۷ab
Pseudomonas fluorescens	۹۱/۳۳ab
آب گرم ^{c}۴۵	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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 پسودوموناس 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 سانتی‌گرادبه 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 حرارت۵۰-۴۵درجه سانتی‌گراد است که باعث پژمردگی میوه می شود. این امر استفاده از آب گرم در جهت کنترل بیماری‌های بعد از برداشت را با مشکل مواجه می‌کند (Conway, 1999). دراین تحقیق مشخص شد توانایی برخی باکتری‌های آنتاگونیست جداشده از پوست میوه لیموترش در کنترل کپک سبز از روش استفاده از آب گرم ۴۵ درجه سانتی‌گرادهم بیشتر است. این خصوصیتآنتاگونیستی می‌تواند *B. subtilis* را به عنوان یک عامل بیوکنترل بیماری کپک سبز معرفی نماید. این باکتری بومی سطح لیموترش بوده است و می توان 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 روش ها 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.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Conway, W. S., Janisiewicz, W. J., Idein, J. O., &Sams, C. E., (1999). Sterategy 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 postharvesr 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–Dieguez, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Postharvest Physiology and Technology of Horticultural Crops
No. 1, 2012: 79-87

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 suspenssion 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 suspenssions containing 10^8 cells ml^{-1} for two min, 45°C warmed water for five min, and 0.15% Thiabendazol soloution 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

www.SID.ir