فصلنامه گیاه‌پزشکی
۱۳۹۰ -۳ (۴) : ۳۷۷ -۳۹۱

کنترل بیولوژیک عوامل کپک سبز و آبی پرتقال توسط اپی‌فیت‌های میکروبی میوه مرکبات در شمال ایران

آیت الله نصرالهی عمران *
دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، تنکابن، ایران
فرید بیگی فیروز جائی
موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، مرکز آمل، آمل، ایران
مائده سنگی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

چکیده

پوسیدگی کپک سبز و آبی مهمترین بیماری‌های پس از برداشت میوه مرکبات است که به ترتیب توسط قارچ‌های *Penicillium digitatum & Pencillium italicum* ایجاد و سالیانه منجر به از بین رفتن ۳۰٪ محصولات مرکبات می‌شوند. در روش‌های متداول برای کنترل این پوسیدگی از قارچ‌کش‌های مصنوعی نظیر ایمازالیل، تیابندازول و بنومیل استفاده می‌شود. با توجه به مضرات استفاده از سموم برای سلامتی انسان و محیط و به دلیل افزایش مقاومت قارچها نسبت به قارچ کش‌ها، کنترل بیولوژیک به عنوان جانشین مناسبی جهت کنترل این بیماری در نظر گرفته شده است. برای بررسی کنترل بیولوژیک این کپک‌ها، میکروارگانیسم‌های اپیفیت از سطح میوه‌های مرکبات باغات شمال ایران جمع‌آوری و جداسازی شد. ارزیابی اولیه برای پتانسیل بیوکنترلی از طریق این میکروارگانیسمهای اپیفیت در شرایط آزمایشگاهی و بر اساس مشاهده نتیجه تست هاله ممانعت از رشد صورت گرفت. ۶۵ ایزوله باکتریایی و مخمری به همراه ۳۰ ایزوله کپکی از خود پتانسیل کنترلی این کپک‌ها را نشان دادند. مرحله بعد روی هر میوه در ۴ نقطه با فواصل مساوی چاهک‌هایی با عمق ۲ میلی‌متر حفر گردید و به هر چاهک سوسپانسیون ایزوله‌های باکتریایی و مخمری باغلظت ۱×۱۰^{۸}سلول در میلی‌لیتر، ۲۴ ساعت قبل از سوسپانسیون عامل بیماری‌زا با غلظت ۱×۱۰^{۴} اسپور در هر میلی‌لیتر اضافه وپلیتها در دمای ۱۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند. نتایج تست‌ها براساس ظهور و شدت علائم پوسیدگی در تیمارهای میکروبی بررسی شدند. نتایج براساس ظهور و شدت علائم پوسیدگی در تیمارهای میکروبی با ایزوله‌های بیوکنترل مقایسه گردید. تست‌های

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ayat51@yahoo.co.in

بیوشیمیایی برای شناسایی ایزوله‌های بیوکنترل ۳ ایزوله‌های باکتری *Pseudomonas syringae* , دو *ایزوله از مخمری از Pantoea agglomerans* و یک ایزوله مخمر *Candida famata را* نشان دادند.

مکانیسم مهاری بیوکنترل‌ها نشان‌دهنده مدارکی در تولید رشد ترکیبات و متابولیت‌های خارج سلولی از باکتری *Pseudomonas syringae و متابولیت خارج سلولی Candida famata* که اثرات ضد قارچی بر روی *P. digitatum* & *P. italicum.* داشتند را بازگو کردند.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیکی، *Penicillium digitatum*، *Penicillium italicum*، پرتقال، اپی‌فیت میکروبی، آنتاگونیست

مقدمه

یکی از معضلات عمده در خصوص مرکبات عوارض فیزیولوژیکی، پاتولوژیکی و ضایعات قبل، حین و پس از برداشت بوده که مجموعا ۳۰٪ محصول تولید شده را از بین می‌برد (Apple & Mcoffey, 1988). در دوره پس از برداشت محصول، محصولات میوه به طور ویژه نسبت به آلودگی به عوامل بیماری‌زا حساسند زیرا مقاومت طبیعی که روی درخت داشتند را از دست داده اند. جراحات وارده در هنگام چیدن و بسته‌بندی، محل اصلی برای ورود عوامل بیماری‌زا، به خصوص در محیط‌هایی که اسپورهای *Penicillium italicum*، *Botrytis cinerea* و *Penicillium digitatum* حضور دارند می‌باشد (Arras, 1996). پوسیدگی سبز و آبی میوه مرکبات به ترتیب توسط قارچ‌های *P.italicum*، *P.digitatum* ایجاد می‌شود. در اثر زخم‌های وارده در طی برداشت، اسپورهای هوازاد بیماریزا وارد بافت میوه شده و۱۰-۵۰٪ خسارت ایجاد می‌کند (Arras, 1996). ترکیبات فراری که از بافت پوستی زخم شده کولتیوارهای مختلف مرکبات خارج می‌گردد دارای تاثیر محرک روی جوانه‌زنی اسپور و طویل شدن جرم تیوپ در *P.digitatum* و *P.italicum* می‌باشد (Droby, 2008).*P.digitatum* و *P.italicum* موجب اسیدی کردن سطح میوه مرکبات در طی پیشرفت پوسیدگی می‌شوند (Prusky *et al.*, 2004). پوسیدگی پنی‌سیلیومی لکه‌ها گسترش یافته و سریعا عمیق در روی میوه‌ها ظرف مدت چند روز ایجاد می‌گردند (Agrios *et al.*, 2005). در روش‌های معمول برای کنترل این پوسیدگی از قارچ کش‌های شیمیایی استفاده می‌شود اما به دلیل مقاومت میکروبی، فقدان قارچ‌کش دیگری برای جایگزینی و همچنین هزینه بالای تولید ترکیبات شیمیایی مصرف آنها محدود گشته است (Janisiewic & Korsten, 2002). بنابراین استراتژی کنترل باید به سمت موارد جایگزین معطوف گردد. از موارد جایگزین می‌توان به کنترل بیولوژیک اشاره نمود که به خاطر کاهش آلودگی‌های زیست محیطی و دوام و پایداری آن مورد توجه بسیاری قرار گرفته به طوری که ترکیبات بیولوژیک تجاری مختلفی مثل Aspir، Yieldplus و Biosave به صورت کاربردی

مورد استفاده قرار می‌گیرد (Smilanick & Dennis-Arrue, 1992; Obagwu & Korsten, 2003b; Zhou Ting *et al.*, 2001). جایگزین بیولوژیک میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست بعنوان اپی فیت میکروبی بوده که فعالیت بیوکنترلی خود را از طریق مکانیسم‌های متعددی شامل تولید آنتی‌بیوتیک، تولید آنزیم‌های کشنده، هیپرپارازیتیسم، رقابت بر سر مواد غذایی و فضا و تولید سیدروفور انجام می‌دهند (Sharma *et al.*, 2009). در مطالعات مختلف گونه‌های باکتریایی و قارچی *Bacillus subtilis*، *Candida sake*، *Candida saitoana*، *Candida fomata*، *Zygoascus hellenicus*، *Rhodotorulla glutinus*، *Pantoea agglomerans*، *Debaryomyces hansenii* به عنوان اپی‌فیت‌های باکتریایی و مخمری میوه مرکبات جدا و گزارش شده اند (Arras 1996; May *et al.*, 1997; Useall *et al.*, 2008). لذا با توجه به مقاومت گسترده قارچ‌های مذکور به سموم شیمیایی، می‌توان محصولات بیولوژیک را از میکروفلور طبیعی مناطق مختلف تهیه کرده تا در استفاده کاربردی از آن، بقاء و سازگاری با شرایط محیطی همان منطقه را داشته باشد. مطالعات اکولوژی، فیزیولوژی و بررسی اکولوژی عوامل کنترل بیولوژیک به شناخت بهتر اثرات محیط بر بقاء و توزیع این عوامل کمک خواهد کرد. در پی یافتن برخی از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست در آزمایشگاه، مطالعات وسیع‌تری را میتوان برای توسعه محصولات بیولوژیک بعنوان آنتاگونیست‌های میکروبی در سطح تجاری استفاده نمود.هدف از این تحقیق کنترل بیولوژیکی عوامل کپک سبز و آبی پرتقال شمال ایران توسط اپی‌فیت‌های باکتریایی و مخمری میوه مرکبات جدا شده از همین منطقه بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق مقطعی حدود ۳۰۰ ایزوله اپیفیت از سطح میوه مرکبات سالم از ۴۲ منطقه شهرهای شمالی کشور (گیلان، مازندران، گلستان) به صورت تصادفی به تفکیک منطقه جداسازی و برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از سطح آنها مورد استفاده قرارگرفتند. طرح آزمایشی کاملا تصادفی برای ارزیابی پتانسیل آنتاگونیستی ایزوله‌های اپی‌فیت به کار رفته است. از پرتقال رقم محلی برای تست در مرحله In *vivo* استفاده شد. بر اساس ارزیابی که توسط موسسه تحقیقات مرکبات کشور انجام ودر زمان برداشت میزان مواد جامد محلول میوه ۱۱/۵۶ میزان اسیدیته آن ۲/۴۹۳ بوده است. با توجه به اطلاعات جمع آوری شده برای هر یک ایزوله‌ها کد مربوط به منطقه جداسازی و شماره ایزوله در نظر گرفته شد، ایزوله‌های مشابه از لحاظ مرفولوژی مربوط به یک منطقه در یک کد قرار داده شده و در مراحل مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقات کنترل بیولوژیک شهرستان آمل انتقال داده شد و نمونه برداشت شده از هر منطقه به تفکیک برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از سطح آنها مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها در ظروف یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل و

۱۰۰ میکرولیتر از توئین ۲۰ به مدت ۱ ساعت در شیکر دورانی قرار داده شد و در نهایت آب مقطر حاوی میکروفلور سطحی میوه برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل از هر نمونه به صورت سفره ای بر روی محیط‌های کشت PDA (Potato Dexteros Agar) و NA (Nutrint Agar) کشت داده شد. همه محیط ها در انکوباتور ۲۵ درجه انکوبه گردید. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت کلنی‌های میکروارگانیسم‌های رشد کرده روی محیط‌های مذکور بر اساس مرفولوژی و رنگ جداسازی شده و در محیط کشت جدید کشت شدند. خالص سازی ایزوله‌های باکتریایی و مخمری از روش استریک صورت گرفت (Pitt ,J.,2005 -Brenner Don J ,2005) و خالص سازی ایزوله‌های کپکی از روش نوک هیف کردن، با برش انتهای میسیلیوم قارچ در حاشیه کلنی و انتقال آن به محیط جدید صورت گرفت برای نگه داری طولانی مدت ایزوله‌های باکتریایی و مخمری در گلیسرول ۲۰٪ و ایزوله‌های قارچ کپکی در محیط کشت PDA شیب دار در لوله قرار داده شدند. ایزوله‌ها در این مرحله شناسایی نشدند، بلکه هرایزوله با یک کد خاص نام گذاری شد (Arras ,G.,1996, Thonglem,k,2007)کلنی‌های باکتریایی ومخمری رشد کرده روی محیط‌های مذکور جداسازی و کد گذاری شدند .پس از کشت سوسپانسیون ذکر شده ۲۹۲ ایزوله باکتریایی و مخمری و ۱۹۰ ایزوله قارچ کپکی جداسازی شدند. پس از تست در شرایط آزمایشگاهی و انتخاب ۹۰ ایزوله دارای پتانسیل آنتاگونیستی بر اساس مشاهده هاله ممانعت از رشد قارچ‌های پاتوژن به بررسی توان بیوکنترلی آنها بر روی میوه پرتقال در شرایط انبار پرداخته شد.

آزمون آنتاگونیستی بر اساس مهار رشد پاتوژن‌ها بر روی میوه: برای ارزیابی درصد مهار رشد شعاعی میسیلیوم قارچ‌های بیماری‌زا توسط تیمارهای میکروبی نسبت به تیمار شاهد از فرمول $(R_1 - R_2) /R_1 \times 100$ استفاده شدند، که در آن R_1 قطر میسیلیوم قارچ شاهد و R_2 قطر میسیلیوم قارچ تیمار شده بودند سپس نمودار مربوط به داده‌ها توسط نرم افزار آماریSPSS ترسیم گشت.

جداسازی عوامل کپک سبز و آبی از سطح میوه‌های پوسیده

به وسیله میله شیشه‌ای استریل از مناطق حاوی کپک سبز و آبی به طور جداگانه نمونه‌برداری شد و بر روی محیط کشت پتیدو دکستروز آگار (Potato Dexteros Agar) کشت داده شد.

آزمون آنتاگونیستی بر اساس رویت هاله بازدارندگی از رشد پاتوژن‌ها در محیط کشت

۱. تهیه سوسپانسیون از پاتوژن‌ها

از اسپور قارچ‌های پاتوژن سوسپانسیون با رقت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. شمارش اسپورها توسط لام هموسیتومتر صورت گرفت (Zhang & Swingle, 2003).

۲. تهیه اینوکلوم باکتریائی ومخمری

دیسک‌هایی به قطر معین ومساوی از محیط کشت حاوی باکتری و مخمرجداسازی شدند.

۳. یافتن عوامل میکروبی موثر بر روی عوامل بیماری‌زای کپک سبز و آبی

ابتدا بر روی محیط PDA وNAسوسپانسیون میکروبی با رقت 10^{4} اسپور در میلی لیتر از قارچ‌های پاتوژن کشت داده و سپس دیسک اینوکلوم‌های باکتریایی و مخمری بر روی آن قرار گرفتند. پس از رشد قارچ بیماری‌زا، پلیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته سپس جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی از روش کشت متقابل برای جدایه های باکتریایی و قارچی استفاده شد.هاله عدم رشد بر روی محیط نشانگرتوانایی خاصیت آنتاگونیستی جدایه ها میباشد (May *et al.*, 1997).

آزمون آنتاگونیستی روی میوه مرکبات

برای هر ایزوله آنتاگونیست ۳ میوه پرتقال از یک رقم در نظر گرفته شد ابتدا میوه‌ها توسط آب شستشوی سطحی شدند در مرحله دوم به مدت ۵ دقیقه در محلول ۵٪ هیپوکلرید سدیم ضدعفونی سطحی شده و سرانجام توسط آب مقطر استریل آبکشی انجام شد. پس از خشک شدن میوه ها در هوای آزاد، روی هر پرتقال در چهار نقطه با فواصل مساوی، توسط میله فلزی استریل سوراخ‌هایی با عمق ۲ میلی‌متر حفر گردیدند (شکل ۱). سپس در هر تیمار ۲۰میکرولیتر از سوسپانسیون ایزوله باکتریایی با غلظت 1×10^{8} سلول در میلی‌لیتر و ایزوله مخمری با غلظت 1×10^{8} سلول با روش کدورت در میلی‌لیتر به هر یک از سوراخ‌ها تلقیح گشت و ۲۴ ساعت بعد سوسپانسیونی با غلظت 10^{4} اسپور در میلی لیتر از پاتوژن مربوطه به آن نواحی تلقیح شدند و تکرارهای مربوط به هر تیمار را در پوشش نایلونی قرار داده و در دمای ۱۵ درجه سلسیوس و رطوبت طبیعی محیط نگهداری شدند. در مورد تیمار شاهد به جای تیمار میکروبی از آب مقطر استریل استفاده شدند. پس از گذشت یک هفته نتایج مربوط به هر تیمار آنتاگونیستی مورد ارزیابی قرار گرفته و با تیمار شاهد مقایسه شدند. آنتاگونیست‌هایی که درممانعت از بروز بیماری، ممانعت از تولید اسپور و یا کاهش در میزان تولید اسپور توسط پاتوژن‌ها موثر بودند، به عنوان عامل بیوکنترل انتخاب شدند (Obagwu & Korsten, 2003; Arras, 1996).

شناسایی عوامل بیوکنترل موثر روی میوه

شناسایی عوامل بیوکنترل با کمک تست‌های بیوشیمیایی و کلید شناسایی آنها صورت گرفت تست‌های تشخیصی صورت گرفته شامل رنگ آمیزی گرم، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، اکسیداز، احیاء نیترات، آرژنین دی‌هیدرولاز، رشد در محیط هوازی/ بی‌هوازی، اندول، H_2S، اوره‌آز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز اسکولین، لیپاز، تولید لوان، استفاده از قندها

واسیدها، تولید پیگمان زرد بر روی محیط YDC[1] (عصاره مخمر ۱۰ گرم، گلوکز ۲۰ گرم، کربنات کلسیم ۲۰ گرم، آگار ۱۵ گرم و ا لیتر آب مقطر) و تولید پیگمان فلورسنت در محیط B Kings[1] می‌شدند (May *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2000; Schaad *et al.*,*2001*).

بررسی تولید متابولیت‌های خارج سلولی

بر اساس روش کراس و لوپر سوسپانسیون هر ایزوله آنتاگونیست به صورت چمنی در محیط کشت PDA در پتری پخش می‌گردد پس از ۳ روز قرارگیری در دمای ۲۵ درجه سطح محیط با استفاده از اسکالپل تراشیده می‌شود تا از وجود آنتاگونیست عاری گردد و به مدت ۳۰ دقیقه در معرض پنبه آغشته به کلروفرم قرار می‌گیرد سپس درب تشتک پتری در شرایط سترون ۱۰ دقیقه باز نگه داشته می‌شود تا کلروفرم از سطح محیط خارج گردد سپس از حاشیه کلنی قارچ پاتوژن دیسکی با قطر معین جدا و در وسط پتری قرار می‌دهیم. پس از تکمیل رشد شاهد که این تیمار روی آن صورت نگرفته، نتایج پتری های تیمار شده را با آن مقایسه می‌کنیم (Arras, 1996).

نتایج

آزمون آنتاگونیستی بر اساس رویت هاله بازدارندگی از رشد پاتوژن‌ها درمحیط کشت

وجود هاله ممانعت از رشد قارچ‌های پاتوژن در اطراف ایزوله‌های آنتاگونیست حاکی از ترشح مواد ضد قارچی در محیط پیرامون آن بوده و بنابراین به عنوان معیار پتانسیل آنتاگونیستی در نظر گرفته می‌شدند. ایزوله‌های موثر در این مرحله بر اساس رویت هاله ممانعت از رشد پاتوژن انتخاب شده و در تست بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

ایزوله‌های برتر از نظر در صد مهار رشد هر دو قارچ و عدم ایجاد علائم نامطلوب بر پوست میوه انتخاب شدند. شکل‌های ۱ و ۲ نشان دهنده درصد مهار رشد قارچ‌های بیماری‌زا توسط تیمارهای موثر بودند. نتایج جداول تجزیه واریانس نشان دهنده معنی دار بودن کلیه تست ها بوده است و با توجه به جداول حاصل از تست مقایسه میانگین دانکن، تیمارهای مختلف در چندین گروه قرار گرفتند و میان اعضاء گروه های مختلف از لحاظ در صد مهار رشد پاتوژن در سطح ۵٪ تفاوت معنی داری وجودداشته اما میان اعضاء یک گروه از لحاظ در صد مهار رشد پاتوژن در سطح ۵٪ تفاوت معنی داری وجود ندارد. با استفاده از نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری و همچنین بررسی مداوم تاثیر تیمار در کنترل بیماری، ایزوله‌های برتراز لحاظ درصد کنترل بیماری در ۶ روز ابتدایی و تداوم کنترل بیماری پس از آن و عدم ایجاد علائم نامطلوب بر اپی‌کارپ میوه به عنوان عوامل بیوکنترل کپک سبز و آبی انتخاب شدند و درکدهای a_1، a_2،

[1] yeast extract dextrose carbonate calcium

a_3، a_4، a_5، a_6 قرار گرفتند و شناسایی در حد جنس و گونه برای این ایزوله‌ها انجام گرفت. در مواد وروش ها بایستی گفته شود چگونه انتخاب شدندبا توجه به جدول برای هر یک کد مربوط به منطقه جداسازی و شماره ایزوله در نظر گرفته شد، ایزوله‌های مشابه از لحاظ مرفولوژی مربوط به یک منطقه در یک کد قرار داده شده و در مراحل مختلف مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول۱- تجزیه واریانس اثر ایزوله‌های قارچی بر رشد کپک سبز

Table 1. Statistical analysis of the effect on the growth of green mold isolates

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	Sig.
Treatment	202270.943	28	7223.962	3.392	0
Error	679424.685	319	2129.858		
Total	881695.628	347			

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ایزوله های قارچی بر رشد کپک آبی

Table 2. Analysis of variance of fungal isolates on growth of blue mold

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	Sig.
Treatment	172202.253	28	6150.080	5.437	0
Error	360834.562	319	1131.143		
Total	533036.815	347			

جدول۳- تجزیه واریانس اثر ایزوله های باکتریایی در مهار کپک سبز

Table 3. Analysis of variance for the control of green mold of bacterial isolates

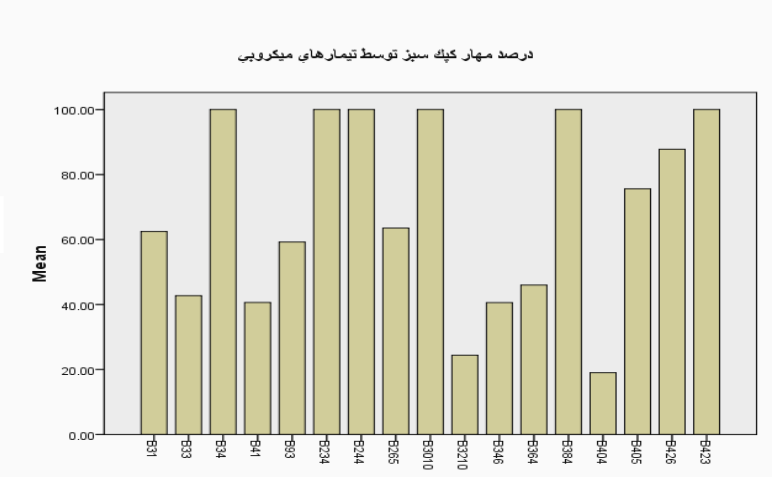
	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	Sig.
Treatment	1280429.999	49	26131.224	7.743	0
Error	1856109.547	550	3374.745		
Total	3136539.546	599			

جدول۴- تجزیه واریانس اثر ایزوله های باکتریایی در مهار کپک آبی

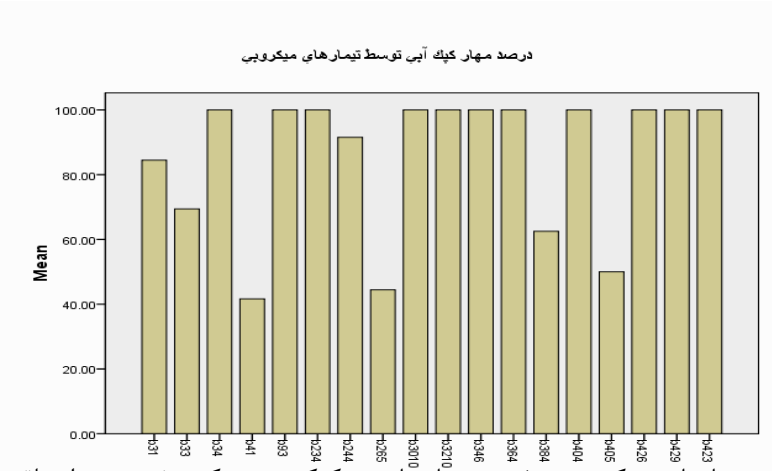
Table 4. Analysis of variance of bacterial isolates inhibit blue mold

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	Sig.
Treatment	4355650.81	49	88890.818	5.031	0
Error	9718258.631	550	17669.561		
Total	1.407E7	599			

A



B



شکل ۱- الف) اثر تیمارهای میکروبی موثر در مهار پاتوژن کپک سبز یک هفته پس از تلقیح قارچ روی اپی‌کارپ میوه ب) اثر تیمارهای میکروبی موثر در مهار پاتوژن کپک‌آبی یک هفته پس از تلقیح قارچ روی اپی‌کارپ میوه

Figure 1. Diagram of the effect of treatments in inhibiting of microbial pathogens (Green (A) and Blue (B) Molds) one week after inoculation of the fungus of fruit's epicarp

بر اساس نتایج حاصل از تست های صورت گرفته و تطبیق آن با منابع (Schaad *et al.*, 2001; Brenner-Dol *et al.*, 2005) گونه ایزوله‌های موثر به شرح زیر می‌باشد:

a_1*: Pantoea agglomerans,* a_2*: Pseudomonas syringae,* a_3: *Candida famata,* a_4: *Pantoea agglomerans,* a_5: *Pseudomonas syringae, a_6: Pseudomonas syringae*

نتایج شناسایی عوامل بیوکنترل موثر بر هر دو کپک بر طبق جداسازی فوق نشان دهنده ۳ ایزوله از باکتری *C. famata* و یک ایزوله از مخمر *P. agglomerans* دو ایزوله باکتریایی *P. syringae* بودند.

تولید متابولیت‌های خارج سلولی ضد قارچی

در این مرحله با توجه به بررسی کمی و کیفی رشد شعاعی میسیلیوم قارچ‌های پاتوژن، تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی هر یک از ایزوله‌های آنتاگونیست در مهار رشد کپک سبز و آبی مشخص گردید.

ایزوله‌های *P. syringae* قادر به کاهش رشد شعاعی میسیلیوم قارچ‌های پاتوژن بوده و همچنین حالت لیز شدگی میسیلیوم قارچی در این مورد مشاهده شده است. در مورد ایزوله a_3 با افزایش درصد متابولیت‌های خارج سلولی در محیط کشت، مهار کامل رشد قارچ مشاهده شده است ایزوله ای خوب است. نتایج حاصل ازتیمار با ایزوله‌های a_1 و a_4 تفاوت چندانی با شاهد نداشته و حاکی از عدم تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی این ایزوله ها بر رشد میسیلیوم قارچ و یا اسپوردهی آن می‌باشد (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج تاثیر مواد فرار بازدارنده رشد قارچ پاتوژن

Table 5. The influence of volatile substances inhibiting the growth of fungal pathogens

P.italicum mm	*P.digitatum* mm	Treatment code	*P.italicum* mm	*P.digitatum* mm	Treatment code
25	30	a_4	35	26	a_1
22	12	a_5	36	23	a_1
21	20	a_5	32	35	a_1
20	16	a_5	22	20	a_2
21	22	a_6	25	22	a_2
20	20	a_6	20	21	a_2
23	22	a_6	36	32	a_3
43	34	a_7	37	33	a_3
42	37	a_7	40	32	a_3
39	35	a_7	24	27	a_4
			28	31	a_4

بحث

در این تحقیق به بررسی بیماری کپک سبز آبی میوه مرکبات که توسط *P. digitatum* و *P. itlalicum* ایجاد می‌گردد، پرداخته شده است و امکان استفاده از اپی‌فیت‌های میکروبی میوه مرکبات به عنوان عامل بیوکنترل این پاتوژن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. پوسیدگی‌های قبل و پس از برداشت از بزرگترین مشکلات تولید مرکبات در کشورهای مختلف دنیا می‌باشد.

کپکهای سبز و آبی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های پس از برداشت میوه مرکبات گزارش شده‌اند.در این تحقیق نمونه‌های مرکبات استفاده شده برای جداسازی میکروفلور سطحی، قبل از فصل برداشت از روی درخت جمع‌آوری شدند. این امر یافتن ایزوله‌های آنتاگونیست موثر بر ضد قارچ‌های بیماری‌زای پس از برداشت را آسان‌تر ساخته بود، زیرا یکی از دلایل مقاومت میوه به پوسیدگی قبل از برداشت محصول، وجود میکروفلور محافظ آن می‌باشد که پس از رشد، تغییر خصوصیات سطح میوه از نظر pH، مواد غذایی و ترکیبات شیمیایی،

تیمارها و تغییرات ایجاد شده در طی مراحل بسته بندی و انبارداری، این میکروارگانیسم‌ها را از بین برده و یا از جمعیت آنها می کاهد و در نتیجه قارچ‌های بیماری‌زا، فرصت ایجاد عفونت بر سطح میوه را پیدا می‌کنند. هنگامی در سطح میوه مرکبات شتشوی زیاد صورت گیرد و از آن بر روی پلیت حاوی محیط کشت آگاردار کشت دهند، تنها باکتری و مخمر نمایان می‌گردند اما وقتی شستشوی سطحی کم باشد قارچ‌های کپکی نیز در محیط رشد می‌کند. این نشان می‌دهد که باکتری‌ها و مخمرها رشد قارچ بیماری‌زا را مهار می‌کنند و به همین دلیل وقتی میوه‌ها و سبزیجات شسته می‌شوند، بیشتر مستعد به پوسیدگی می‌گردند (Chaluts & Wilson, 1990). *P. syringae* در مرحله انتخاب ایزوله‌های دارای پتانسیل مهار قارچ‌های پاتوژن بوده، و دیسک‌هایی با قطر معین از محیط کشت حاوی ایزوله‌های اپی‌فیت که جداسازی شده بود و بر روی محیط کشتی که از قبل با سوسپانسیون اسپور قارچ پاتوژن کشت شده بود، قرار داده شد و نتایج براساس مشاهده هاله ممانعت از رشد در اطراف ایزوله‌های اپی‌فیت ارزیابی گردید (May *et al.*, 1997) در بررسی اثر بیوکنترلی ایزوله‌های آنتاگونیستی جدا شده از برگ سویا، از *P. syringea* و روش انتشار مواد در آگار استفاده کردند. ایزوله‌های موثر علیه قارچ‌های پاتوژن در محیط کشت برای آزمون انتاگونیستی روی میوه در شرایط انبار استفاده شدند. روش‌های مختلفی برای بررسی فعالیت بیوکنترلی میکروارگانیسم‌ها روی میوه وجود دارد. در این تحقیق با توجه به اینکه محل اصلی ورود و بیماری‌زایی قارچ های پاتوژن جراحاتی است که در حین مراحل برداشت، بسته بندی و حمل و نقل بر روی میوه ایجاد گردیده بود، حفراتی با عمق ۲ میلی‌متر بر روی اپی‌کارپ میوه ایجاد کرده و در آن محل سوسپانسیون ایزوله های مورد آزمایش بیوکنترلی تزریق گشت. به این ترتیب تاثیر هر ایزوله به طور جداگانه در کنترل کپک سبز و آبی میوه مرکبات مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده تاثیر دو ایزوله از *P. agglomerans*، یک ایزوله از مخمر *C. famata* و ۳ ایزوله از*P. syringea* بر علیه هر دو کپک بود. با توجه به این موضوع می‌توان نتیجه گرفت باکتری‌ها و مخمرها توانایی بیشتری در کلنیزه کردن سطح میوه، تداوم و رقابت با پاتوژن را دارند و این امر با نتایج حاصل از سایر تحقیقات هماهنگی دارد. همچنین نتایج نشان داد برخی از ایزوله‌ها نه تنها تاثیری در کنترل بیماری نداشتند، بلکه در ایجاد و پیشرفت پوسیدگی موثر بوده و نسبت به شاهد درصد پوسیدگی در تیمار مربوط به آنها بالاتر بوده است. (Abraham *et al*.2010) در برای کنترل کپک سبز مرکبات، ۶۰ مخمر و ۹۲ باسیلوس از سطح میوه مرکبات از باغهای میوه مختلف درآفریقای جنوبی جدا کردند و به عنوان آنتاگونیست بر ضد *P.digitatum* را مورد ارزیابی قرار دادند. ۱۰ ایزوله از مخمر و ۱۰ ایزوله از باسیلوس کاهش قابل مشاهده‌ای در رشد کپک سبز نشان دادند (Abraham *et al*.2010). در تحقیقی دیگر از بین ۳۰۰ میکروارگانیسم جدا شده از سطح میوه، تعدادی بیشترین اثرات بازدارندگی را دارا بودند که به عنوان مثال ۳ ایزوله از

Bacillus subtilis، یک ایزوله از *Corynebacterium aquaticum*، ۱۰ ایزوله از *Pichia guilliermondii* ، ۱۲ ایزوله از *Candida sake*، ۱۲ ایزوله از *Candida saitoana*، یک ایزوله از *Candida fomata*، یک ایزوله از *Zygoascus hellenicus*، یک ایزوله از *Rhodotorulla glutinus*، یک ایزوله از *R.minuta* و یک ایزوله از *R. mucillaginosa* اشاره شده است. در این بین بیشترین بازدارندگی در آزمایشگاه توسط باکتری‌ها شامل ۵۹-۸۰٪ و توسط مخمرها ۷۶-۱۰۰٪ بوده است (Arras, 1996). باکتری *Pantoea agglimerans* نیز علیه کپک سبز اثرات خوبی داشته به طوری که در دمای ۲۰-۲۵ درجه سلسیوس برای لیمو و ۱۰-۲۰ درجه سلسیوس برای پرتقال، به ترتیب ۹۵٪ و ۵۰٪ پوسیدگی را کاهش داده است (Useall, 2008). Zamani *et al.* (2009) تاثیر باکتری *p. agglimerans* به تنهایی یا در ترکیب با محلول ۳٪ بی‌کربنات سدیم را در مهار *P. digitatum* بر روی پرتقال مورد بررسی قرار دادند. در تیمار باکتریایی کاهش کپک سبز تا ۷۵٪ در دمای درجه سلسیوس ۲۰ و ۴ درجه سلسیوس مشاهده شد و در تیمار مخلوط باکتری و بی‌کربنات سدیم، خاصیت مهار پاتوژن ۵ الی ۱۱٪ در دمای ۲۴ درجه سلسیوس و ۴۵ درجه سلسیوس افزایش یافت. همچنین برای کنترل کپک سبز ناشی از *P. digitatum* روی میوه مرکبات، چندین گونه از *باکتری* *Pseudomonas* spp. گزارش شده است (Bull *et al.*, 1997). باکتری *P. agglomerans* علیه کپک سبز اثرات خوبی داشته به طوریکه در دمای ۲۰-۲۵ درجه سلسیوس برای لیمو، ۱۰-۲۰ درجه سلسیوس برای پرتقال، به ترتیب ۹۵٪ و ۵۰٪ پوسیدگی را کاهش داده بود. همچنین نشان دادند میوه‌های تیمار شده با بی‌کربنات سدیم یا مخلوط بی‌کربنات سدیم و آنتاگونیست باکتریایی پس از ۱۴ روز ذخیره سازی در دمای ۱۰ درجه سلسیوس مقاومت شدیدی در مقابل بیماری‌زایی *P. digitatum* در مقایسه با تیمار شاهد نشان میدادند. سویه CPA-2 از *P. agglomerans* قادر به کلنیزاسیون زخم‌های میوه مرکبات در دمای اتاق یا دماهای پایین بوده و در محل آلودگی با پاتوژن مذکور، منجر به جلوگیری از ایجاد بیماری شد. همچنین سلول‌های تازه آنتاگونیست قادر به تحمل محلول ۲٪ بی‌کربنات سدیم بودند (Useall *et al.*, 2008). ترکیبی از *Candida saitoana* و 2-Deoxy-d-Glucose باعث کاهش پوسیدگی ناشی از *P. digitatum* شده بود به طوری که کپک سبز در لیمو و پرتقال را به اندازه مصرف سم شیمیایی ایمازالیل، کاهش داده بودند. در ضمن تیمار *Candida saitoana* و گلایکول کیتوسان ۲٪ به منظور کنترل بیماری‌های پس از برداشت سیب و میوه مرکبات به کار برده شد نشان دهنده موفقیت بیشتر این تیمار در کنترل پوسیدگی‌ها نسبت به زمانی که هر یک به تنهایی به کار می‌رفت، بود (El-Ghaouth *et al.*, 2000). Zhang & Swingle (2003) اثر بی‌کربنات پتاسیم را در کنترل کپک سبز و آبی مرکبات ارزیابی کردند و نتایج آنها نشان دهنده سرکوب رشد میسیلیوم قارچ *P. digitatum* و

جلوگیری از کپک سبز بود. مطالعات توسط میکروسکوپ الکترونی در محل جراحت نشان دهنده کلنیزاسیون سریع میسیلوم قارچ و محل جراحت به همراه تاثیر لیتیک و فاگوسیتیک برضد هیف بود که می‌تواند تولید فیتوالکسین‌ها (اسکوپارون و اسکوپولتین) را تحریک کند (Arras, 1996). ۱۲ ایزوله از *Debaryomyces hansenii* از محیط‌های دریایی و پری‌کارپ لیموهای مکزیکی به دست آمدند که این مخمر قادر به کنترل بیماری کپک آبی تا حدود ۸۰٪ پس از دو هفته ذخیره سازی بود (Hernández *et al*., 2010). در این بررسی مکانیسم‌های بیوکنترلی تولید متابولیت‌های خارج سلولی و مواد فرار ضد قارچی توسط ایزوله‌های آنتاگونیست، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون تولید متابولیت‌های خارج سلولی ضد قارچی ایزوله‌های *P. syringae* نشان داد که کاهش رشد شعاعی میسیلیوم قارچ‌های پاتوژن وجود داشت وهمچنین حالت لیز شدگی میسیلیوم قارچی در این مورد مشاهده شده است. در مورد ایزوله *C. famata* با افزایش درصد متابولیت‌های خارج سلولی آن در محیط کشت، مهار کامل رشد قارچ مشاهده شد. نتایج حاصل از تیمار با ایزوله‌های *P. agglomerans* تفاوت چندانی با شاهد آزمون نداشت و حاکی از عدم تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی این ایزوله‌ها بر رشد میسیلیوم قارچ و یا اسپوردهی آن بود. در مورد آزمون تولید مواد فرار ضد قارچی، ایزوله‌های مربوط به *P. syringae* تقریبا قادر به مهار ۵۰٪ رشد قارچ پاتوژن نسبت به شاهد بودند. در مورد ایزوله‌های آنتاگونیستی دیگر نتیجه مطلوبی به دست نیامد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت مکانیسم بیوکنترلی *P. syringae* و *C. famata* از طریق تولید متابولیت‌های خارج سلولی با فعالیت مهار قارچ می‌باشد. نتیجه حاصل از این تحقیق نشان دهنده نقش میکروارگانیسم‌های اپیفیت در جلوگیری از بیماری‌های قارچی پس از برداشت محصولات بود.

اگرچه تیمارهای میکروبی توانایی کنترل برخی پاتوژن‌های میکروبی محصولات آسیب پذیر را دارا می‌باشند و از لحاظ زیست محیطی مورد پسند هستند، اما به تنهایی قادر به کنترل طولانی و مداوم بیماری نبوده و برای دستیابی به این هدف باید از موارد مکمل شامل فرمولاسیون میکروارگانیسم با موادی که توانایی بقاء آن را در محیط فراهم می‌سازد و همچنین تیمارهای غیر میکروبی که با میکروارگانیسم مورد استفاده سازگار باشد و منجر به افزایش کارایی آن در کنترل بیماری می‌گردد بهره برد . در موارد شیوع گسترده بیماری بایستی از ترکیب تیمار میکروبی و قارچ کش‌های شیمیایی سازگار با میکروارگانیسم، در غلظت‌های پایین‌تر استفاده نمود، تا علاوه بر کنترل بیماری از خطرات ناشی از استفاده بی رویه سموم نیز کاسته شود.

منابع

Abraham, A., Laing, M. & Bower, J. 2010. Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. *Biological Control*, 53: 32–38.

Agrios, G. 2005 *Plant Pathology* .5th ed. Dana Dreibelbis.

Apple, D, & Mcoffey,R. 1988. Biological control of postharvest pathogen *P.digitatum* on Eureka lemons. *Phytopathology*, 12:1595.

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

Arras, G. & D Hallewin, G. 1994. In vitro and *in vivo* control of *P. digitatum* and *Botrytis cinerea* in citrus fruit by *Bacillus subtilis* strains. *Agric Mediter*, 124:56-61.

Brenner-Don J., Krieg Noel R. & Staley James, T 2005. BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology. Springer US.1136pp.

Bull C.T, Stack J.P & Smilanick J.L. 1997. *Pseudomonas syringae* strain ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biology control,* 8:81-88.

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

Droby, S. Eick, A. , Macarisin , D, Cohen, L., & Rafael, G. 2008. Role of citrus volatiles in host recognation, germination and growth of *penicillium digitatum* and *penicillium italicum*. *Post harvest Biology & Technology*, 49:386-396.

El-Ghaouth ,A., Smilanick,J., Wisniewski ,M. & Wilson,R. 2000. Improved control of Apple and citrus fruit decay with a combination of *candida saitoana* and 2-Deoxy-d-Glucose. *Plant Disease.* 84:249-253.

Hung, Y., Deverall, B. & Morris, S. 2000. Postharvest control of green mold on oranges by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. *Postharvest Biology Technology*. 3:129-137.

Hernández,M., Guillermo ,L. & Luis Ochoa, J. 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology Technology*. 56: 181-187.

Janisiewic, W. & Korsten,L. 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. *Annual Review of phyto*pathology. 40:411-441.

May, R., Volksch, B., Kampmann, G. 1997. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae pv.glycinea* in vitro and planta. *Microbial Ecol*ogy. 34: 118-124.

Obagwu, J. & Korsten, L. 2003a. Integrated control of citrus green and blue mold using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology Technology*. 28:187-۹4

Obagwu, J. & Korsten, L. 2003b. Control of citrus green and blue molds with garlic extracts. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 221–225.

Pitt, J. & Hoching, A. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed., London Academic Press.

Prusky, D., McEvoy, J., Saftner,R., Conway,W. & Jonss,R. 2004. Relationship between host acidification and virulence of *penicillium spp*. On apple and citrus fruit. *Phytopathology* 94,1.

Schaad, N. W, Jones, B., Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant *Pathogenic Bacteria*. Third Edition.

Sharma, R. R, Singh, D., Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists . *Biological Control*. 50 : 205–221.

Smilanick, J., Dennis-Arrue, R. 1992. Control of green mold of lemon with Pseudomonas species. *Plant Disease*. 76:481-485.

Thonglem K., Plikomol A & Pathom-aree W. 2007. Growth inhibition of *Penicillium digitatum* by antagonistic microorganisms isolated from various parts of orange tree. *Maejo International Journal Science and Technology*, 01(02), 208-215.

Useall, J., Teixido, N., Vias, I., Smilanick,J..2008. Biological control of *P. digitatum* on citrus fruits with the antagonistic bacterium *Pantoea agglimerans*. IV International conference on Postharvest Science.

Usall, J., Smilanick, J. Palou, l., Denis-Arrue, N., Teixido, N. & Torres, R. 2008. Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 50 :1–7.

Zamani, M., Sharifi Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Hosseininaveh, V., Mostofy, M. 2009. Control of *Penicillium digitatum* on orange fruit combining *Pantoea agglomerans* with hot sodium bicarbonate dipping. *Plant Pathology*, 91 (2): 437-442.

Zhang, H., Zheng , X., Yu-fang, XI. 2005. Biological control of postharvest blue mold of oranges by *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. *Biology Control*, 50: 331–342.

Zhang, J. & Swingle, P. 2003. Control of green mold on florida citrus fruit using bicarbonate salts. *Proceeding of Florida state Horticultcher society*, 116:375-378.

Zhou ting, C., Liu ,W. T, Schaneider, E. 2001. Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *pseudomonas syringae. plant Pathology*, 23:246-252.