جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی اثر بیوکنترلی استرین‌هایی از *Bacillus subtilis* به تنهایی یا در تلفیق با بی‌کربنات سدیم روی کپک سبز مرکبات

مریم زمانی[۱]، عباس شریفی تهرانی[۲] و مسعود احمدزاده[۳]

چکیده

در این تحقیق اثر دو استرین از *Bacillus subtilis* به تنهایی و در تلفیق با بی‌کربنات سدیم روی *Penicillium digitatum* عامل بیماری کپک سبز مرکبات مورد بررسی قرار گرفت. کاربرد سوپانسیون $۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر از این استرین‌ها روی میوه‌های آلوده شده با بیمارگر، حداقل باعث ۵۵ درصد کاهش پوسیدگی در میوه‌ها پس از ۵ هفته نگه‌داری در دماهای ۴، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد گردید و بهترین نتیجه توسط استرین BN با ۷۷/۳ درصد کاهش بیماری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد حاصل شد. کاربرد تلفیقی استرین‌های آنتاگونیست و بی‌کربنات سدیم ۳ درصد نیز باعث بیش از ۶۷ درصد کاهش میزان پوسیدگی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گردید و بهترین نتیجه از کاربرد تلفیقی استرین BN (۵×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر) با بی‌کربنات سدیم ۳ درصد به‌دست آمد (۷۹/۲۶٪ کاهش بیماری). بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که استرین‌های باکتری *B. subtilis* از جوانه زدن اسپورهای بیمارگر جلوگیری می‌کنند و محیط کشت فیلتر شده و عاری از سلول این استرین‌ها نیز قادر به کنترل این بیمارگر روی سطح میوه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus subtilis*، *Penicillium digitatum* ، کنترل بیولوژیکی، بی‌کربنات سدیم.

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب فارغ التحصیل دوره کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، استاد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم باغبانی و گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

پرتقال (*Citrus sinensis*) پس از سیب دومین میوه پر مصرف در جهان می‌باشد. بیماری‌های پس از برداشت ناشی از *Penicillium italicum* عامل کپک آبی و *Penicillium digitatum* عامل کپک سبز همواره منجر به ایجاد زیان‌های عمده‌ای در پروسه پس از برداشت می‌شوند. قارچ‌کش‌ها مهم‌ترین ابزار کنترلی این خسارت‌ها می‌باشند. اما سویه‌های مقاوم بیمارگرها به این قارچ‌کش‌ها و نیز تاثیرات سوء این ترکیبات روی سلامت عمومی مصرف کنندگان و محیط زیست نیاز به دست‌یابی به روش‌های جایگزین برای این ترکیبات را الزامی می‌کند (اسپوتس، ۱۹۸۴؛ هولمز و ایکرت، ۱۹۹۰؛ ویسنویسکی و ویلسون، ۱۹۹۲).

در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات شیمیایی نظیر نمک‌های کربنات و بی‌کربنات و نیز تیمارهای فیزیکی نظیر تابش اشعه UV با دز پایین، تیمارهای حرارتی و پوشش دادن به‌وسیله بعضی روغن‌های معدنی مثل پارافین مایع قبل از انبار به عنوان روش‌های جایگزین موثر در عین حال فاقد اثرات جانبی روی محیط‌زیست و سلامت عمومی مصرف کنندگان توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. بی‌کربنات سدیم، به عنوان یک افزودنی در صنایع غذایی به منظور تعدیل pH، بهتر کردن طعم و ترکیب مواد غذایی وکاهش میزان فساد آن مورد استفاده قرار گرفته است. این ترکیب اثرات کنترلی بسیار مطلوبی روی *P. digitatum* نشان داده است (اسمیلانیک و دنیس آرو، ۱۹۹۲). باید خاطر نشان کرد که این ترکیب روی اسپورهای بیمارگر دارای اثرات کشندگی ضعیفی است و اثرات کنترلی آن چندان پایدار نمی‌باشد لذا با تلفیق استفاده از این ترکیب با یک آنتاگونیست موفق با پایداری طولانی، می‌توان به‌خوبی اثرات کنترلی آن را بهبود بخشید (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

کنترل بیولوژیکی خسارت‌های پس از برداشت با استفاده از آنتاگونیست‌های میکروبی را نیز می‌توان به عنوان یک روش جایگزین مناسب برای قارچ‌کش‌های مصنوعی دانست (اوزال و همکاران، ۲۰۰۱). اولین عامل بیوکنترلی که برای مبارزه با بیماری‌های پس از برداشت معرفی شد باکتری *B. subtilis* بود که بیماری پوسیدگی قهوه‌ای هلو را کنترل می‌کرد (پوسی و ویلسون، ۱۹۸۴). گزارش‌های متعددی از استفاده از سویه‌های مختلف این باکتری در کنترل بیماری‌های پس از برداشت در سیب، هسته‌داران و مرکبات وجود دارد. اباگو و کورستن در سال ۲۰۰۳ با استفاده از استرین‌هایی از این باکتری توانستند خسارت کپک سبز مرکبات را تا بیش از۷۰ درصد کاهش دهند (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳). نوشین و همکاران در سال ۱۳۸۵ اثر کنترلی استرین‌هایی از *Bacillus* sp. را در تلفیق با یون کلسیم روی کپک سبز و آبی مرکبات آزمایش کرده و نشان دادند که کاربرد تلفیقی یون کلسیم و استرین‌های باسیلوس به‌صورت معنی‌داری خسارت ناشی از کپک‌های سبز و آبی را روی ارقام محلی و تامسون کاهش می‌دهد. تاکنون در ایران پژوهشی در مورد تلفیق بی‌کربنات سدیم با *B. subtilis* به منظور کنترل کپک سبز مرکبات انجام نشده است. این پژوهش اثرات کنترلی *B. subtilis* در تلفیق با بی‌کربنات سدیم در کنترل کپک سبز مرکبات (*P. digitatum*) را مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

میوه‌های مورد استفاده در این پژوهش همه از رقم تامسون بود و فاقد هرگونه عارضه فیزیولوژیک یا زخم بودند و قبل از هرگونه تیمار شیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

استرین‌های *B. subtilis* BS و *B. subtilis* BN به روش نانس و همکاران (۲۰۰۱) از سطح اندام‌های هوایی گریپ فروت شهرستان نشتارود واقع در استان گیلان در پاییز ۱۳۸۳ جداسازی و شناسایی گردید. جدایه‌های باکتریایی بر اساس جداول شاد و همکاران (۲۰۰۱)، از نظر قطر سلول باکتری، تولید اسپور و واکنش‌های کاتالاز، تولید اندول، احیای نیترات، لیسیتیناز، استفاده از سیترات، رشد در نمک طعام ۷ درصد، رشد در دماهای ۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵/۷ و ۶/۸ مورد بررسی قرار گرفتند. برای تفکیک گونه ها از یکدیگر نیز، جدایه‌ها از نظر شکل و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

موقعیت اندوسپور، تولید اسید از دی گلوکز، ال آرابینوز، دی زایلوز، دی مانیتول، هیدرولیز کازئین، ژلاتین و نشاسته مطالعه شدند (جدول ۱).

الف) تهیه مایه تلقیح قارچ *P. digitatum*

جدایه *P. digitatum* M121 که از سطح میوه گریپ فروت آلوده جداسازی و از میان ۷ جدایه دیگر به عنوان مهاجم‌ترین جدایه شناسایی شده بود (زمانی و همکاران،۱۳۸۷)، از کلکسیون آزمایشگاه مبارزه بیولوژیک بخش بیماری‌شناسی دانشگاه تهران (پردیس کشاورزی و منابع طبیعی- کرج) دریافت و برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. به کشت‌های یک هفته‌ای جدایه مذکور روی محیط PDA، نگهداری شده در دمای ۲۰ درجه، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد تریتون X-۱۰۰ افزوده شد و سطح تشتک پتری به کمک یک لوله خمیده شیشه‌ای سترون تراشیده شد و سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ ۴ لایه سترون جهت جدا کردن میسلیوم‌های همراه و کنیدیوفورها عبور داده شد. سوسپانسیون حاصله به کمک هماسیتومتر یا توسط اسپکتروفتومتر با جذب ۰/۱ در ۴۲۵ نانومتر به غلظت 10^{6} اسپور در هر میلی‌لیتر رسید که این غلظت حالت معمول و توصیه شده در آزمایش‌های پس از برداشت است (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

ب) تهیه سوسپانسیون باکتری

به منظور تهیه سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها، توده‌ای از کشت جوان باکتری به درون ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط Nutrient Yeast Dextrose Broth شامل ۸ گرم Nutrient broth، ۱۰ گرم دکستروز، ۵ گرم عصاره مخمر در حجم کل ۱ لیتر آب مقطر انتقال یافت و پس از هم زدن به مدت ۲۴ ساعت در شیکر– انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶۰ تکان در دقیقه، قرار گرفت. سپس در $8315 \times g$ به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ گردید. از سلول‌های رسوب یافته در آب دیونیزه سوسپانسیون تهیه گردید و غلظت آن توسط هماسیتومتر به غلظت مطلوب 10^{8} سلول باکتری در هر میلی‌لیتر رسانیده شد (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

ج) بررسی اثر استرین‌های باکتریایی روی جوانه زنی اسپور قارچ *P. digitatum*

۵ میلی لیتر محیط PDB درون لوله‌های درپیچ‌دار کوچک ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور *P. digitatum* با غلظت 10^{6} اسپور در هر میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های استرین‌های باکتریایی با غلظت 2×10^{7} سلول در هر میلی‌لیتر به آن اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۱۳ ساعت درون شیکر-انکوباتور تنظیم شده روی ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس سوسپانسیون مذکور، ۱۰۰ مرتبه رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط آب آگار کشت داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت نگه‌داری در ۲۰ درجه سانتی‌گراد پرگنه‌های تشکیل شده شمارش گردید (یاو و همکاران، ۲۰۰۴).

د) بررسی اثر بی‌کربنات سدیم روی جوانه زنی اسپور قارچ *P. digitatum*

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم روی میزان جوانه زنی اسپورهای *P. digitatum* غلظت‌های ۳،۱ و ۵ درصد از بی‌کربنات سدیم و غلظت 10^{6} اسپور در هر میلی‌لیتر بیمارگر آماده گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون با غلظت‌های فوق در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر مخلوط گردیدند. پس از گذشت ۳۰ ثانیه ، سوسپانسیون اسپور- نمک، ۱۰۰ مرتبه رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط آب آگار کشت داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت نگهداری در ۲۰ درجه سانتی‌گراد پرگنه‌های تشکیل شده شمارش گردید. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و تیمار شاهد در آب مقطر سترون ۲۴ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) سوسپانسیون گردید و داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفت (پالو و همکاران، ۲۰۰۱).

هـ) بررسی اثر بی‌کربنات سدیم روی رشد استرین‌های باکتریایی

سوسپانسیونی از هر باکتری به غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر به‌طور جداگانه تهیه گردید. سوسپانسیون‌ها با سرعت g × ۸۳۱۵ سانتریفوژ شدند و مجددا از سلول‌های رسوب یافته سوسپانسیون‌هایی با افزودن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول‌های۱، ۳ و ۵ درصد بی‌کربنات سدیم تهیه و به چاهک‌های پلیت الایزای سترون انتقال داده شدند. بعد گذشت ۱ ،۱۲ و۲۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از سوسپانسیون‌های حاصله به‌طور جداگانه، روی تشتک‌های NA کشت داده شد و تشتک‌ها به منظور نگه‌داری به دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انتقال یافتند. سپس با تهیه سری رقت و کشت روی محیط NA ، میزان CFU آن‌ها تعیین گردید. برای هر تیمار ۵ تکرار در نظر گرفته شد و تیمار شاهد در آب مقطر سترون سوسپانسیون گردید (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

و) بررسی اثر بی کربنات سدیم روی پوست میوه پرتقال

غلظت های ۱، ۳ و ۵ درصد از بی‌کربنات سدیم آماده گردید. میوه‌های پرتقال درون این غلظت‌ها غوطه‌ور گردیدند و سپس میوه‌ها به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافته و به مدت ۴ هفته در ابن دما نگه‌داری شدند. میوه‌ها هر هفته از نظر ایجاد خسارت‌های مربوط به نمک سوختگی مورد بررسی قرار گرفتند. میوه‌های شاهد درون آب مقطر سترون غوطه ور گردیدند. برای هر تیمار سه تکرار و هر تکرار شامل ۵ میوه پرتقال در نظر گرفته شد (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

ز) بررسی تولید ترکیبات ضد قارچی توسط استرین‌های آنتاگونیست

اثر استرین‌های باکتری روی رشد قارچ *P. digitatum* در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرارگرفت. از کشت یک هفته‌ای قارچ *P. digitatum* درون آب مقطر سترون سوسپانسیون اسپور تهیه گردید و سپس در محیط PDA غلظت نهایی 10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. در آخر پس از ریختن محیط حاصله درون تشتک‌های پتری و منعقد شدن آن، به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استرین‌های آنتاگونیست با غلظت 10^9- 10^8 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر برداشته شد و به شکل ۴ نقطه‌ای روی سطح تشتک‌های پتری محیط کشت PDA حاوی اسپورهای *P. digitatum* کشت داده شد. تشتک‌ها پس از ۴۸ ساعت نگه‌داری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، از لحاظ وجود یا عدم وجود هاله بازدارندگی و پس از ۷۲ ساعت از نظر میزان تاثیر روی اسپورزایی قارچ مورد بررسی قرار گرفتند (اسمیلانیک و دنیس آرو، ۱۹۹۲).

به منظور پی بردن به نحوه اثر استرین‌های آنتاگونیست در شرایط *in vivo*، زخم‌هایی به ابعاد ۳×۳×۳ میلی‌متر مربع با استفاده از یک سوزن سترون در منطقه استوایی میوه ایجاد شد که متعاقبا با ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور بیمارگر با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر تلقیح گردید. سپس میوه‌های تلقیح شده در ۴ تیمار به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفتند: الف) ۲۵ میکرولیتر از محیط NYDB حاوی کشت ۲۴ ساعته باکتری با 10^8 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر، ب) ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون خالص سلول باکتری با غلظت 10^8 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون (پس از ۵ مرتبه سانترفیوژ در g ×۸۳۱۵ و سوسپانسیون مجدد در آب مقطر)، ج) ۲۵ میکرولیتر محیط NYDB که باکتری‌های آن با گذراندن از صافی ۰/۲ میکرو متر جدا شده و فاقد سلول باکتری بود و د) ۲۵ میکرولیتر آب مقطر سترون تلقیح شدند، و پس از ۱ هفته نگه‌داری در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، تعداد میوه‌های آلوده مورد شمارش قرار گرفت. برای هر تیمار ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ میوه در نظر گرفته شد و داده‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفت (اسمیلانیک و دنیس آرو، ۱۹۹۲).

ح) بررسی اثرات کنترلی استرین‌های آنتاگونیست روی میوه پرتقال

به منظور شبیه سازی آلودگی در آزمایش‌ها با آن‌چه که به‌طور طبیعی رخ می‌دهد، یک زخم به قطر ۱ و عمق ۲ میلی‌متر روی خط استوایی هر میوه به کمک

یک سوزن سترون ایجاد گردید. سپس میوه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در داخل سوسپانسیون باکتریایی غوطه ور گردیدند و پس از خشک شدن سطح آن‌ها در هوای آزاد، به مدت ۳۰ ثانیه با یک افشانه، به آرامی و با فشار بسیار کم از فاصله ۳۰ سانتی‌متری با سوسپانسیون 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر قارچ بیمارگر آلوده گردیدند. پس از خشک شدن، میوه‌ها را روی صفحات فیبری مخصوص چیده و به دماهای ۴، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. تیمار شاهد در دو شکل: ۱- میوه‌های غوطه‌ور شده در آب و بدون آلودگی (شاهد سالم) و ۲- میوه‌های غوطه‌ور شده در آب و آلوده شده با بیمارگر (شاهد آلوده) مورد بررسی قرار گرفتند و تعداد میوه‌های سالم تا ۵ هفته، هر هفته شمارش گردید. برای هر تیمار ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ میوه (۴۵ میوه ۴۵ نقطه زخم) در نظر گرفته شد و داده‌ها در قالب طرح بلوک کامل تصادفی تجزیه آماری گردید.

ت) بررسی اثر استرین‌های آنتاگونیست در تلفیق با بی‌کربنات سدیم در کنترل خسارت قارچ *P. digitatum* روی میوه

سلول‌های خالص استرین‌های آنتاگونیست تهیه شده و در محلول ۳ درصد از بی‌کربنات سدیم سوسپانسیون گردید. میوه‌های پرتقال پس از آلوده شدن با *P. digitatum* به مدت ۲ دقیقه در سوسپانسیون نمک-باکتری غوطه‌ور شدند و پس از خشک شدن روی صفحات فیبری مخصوص چیده شده و به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. تیمارها عبارت از میوه‌های سالم (شاهد سالم)، پرتقال‌های غوطه‌ور شده درآب مقطر سترون (شاهد آلوده)، پرتقال‌های غوطه‌ور شده در محلول ۵ درصد ازبی‌کربنات سدیم و پرتقال‌های غوطه‌ور شده در سم ایمازالیل بودند. هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ میوه پرتقال بوده است و داده‌ها (درصد پرتقال‌های سالم و درصد بازدارندگی) در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی مورد تحلیل آماری قرار گرفت (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

ی) تجزیه داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (V6.12) انجام گردید. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

الف) شناسایی استرین‌های باکتریایی

استرین‌های مذکور از نظر آزمون گرم، مثبت بوده و تولید اسپور می‌نمودند و فاقد میسلیوم هوایی در آگار مغذی بودند. با توجه به نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی خصوصیات هر دو جدایه با گونه *B. subtilis* مطابقت داشت.

ب) بررسی اثر استرین‌های باکتریایی روی جوانه زنی اسپور قارچ *P. digitatum*

استرین‌های آنتاگونیست باعث کاهش معنی‌داری در میزان جوانه‌زنی اسپورهای بیمارگر به نسبت تیمار شاهد شدند (جدول ۲).

ج) بررسی اثر بی‌کربنات سدیم روی جوانه زنی اسپور قارچ *P. digitatum*

بی‌کربنات سدیم در هر سه غلظت مورد استفاده درصد جوانه زنی اسپورهای بیمارگر را کاهش داد. با افزایش غلظت بی‌کربنات سدیم کارایی آن افزایش یافت (شکل ۱).

د) بررسی اثر بی‌کربنات سدیم روی پوست میوه پرتقال

پس از گذشت ۴ هفته نگه‌داری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد هیچ اثری از سوختگی ناشی از تیمار با نمک بی‌کربنات سدیم روی پوست هیچ کدام از میوه‌ها مشاهده نگردید. هم‌چنین هیچ خسارت داخلی یا کاهش وزنی بارزی روی میوه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد دیده نشد.

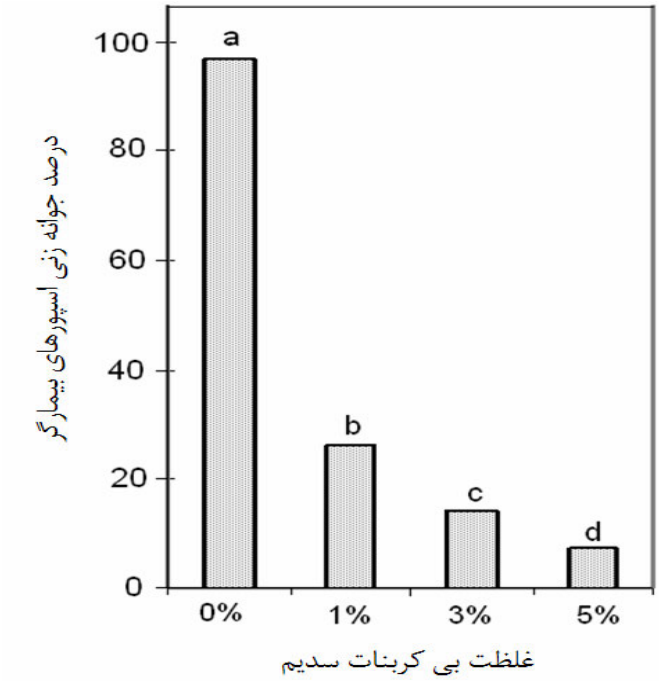
جدول ۱: خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استرین‌های باکتریایی

خصوصیات	واکنش	
	BS	BN
قطر سلول > یک میکرون	-	-
تحرک	+	+
موقعیت اسپور	مرکزی	مرکزی
تولید اسید از:		
دی گلوکز	+	+
ال آرابینوز	+	+
دی زایلوز	+	+
دی مانیتول	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+
هیدرولیز کازئین	+	+
تولید اندول	-	-
لیسیتیناز	-	-
کاتالاز	+	+
احیای نیترات	+	+
رشد در ۵ درجه سانتی‌گراد	+	+
رشد در ۴۵ درجه سانتی‌گراد	+	+
رشد در pH = ۵/۷	+	+
رشد در pH = ۶/۸	+	+
رشد در نمک طعام ۲ درصد	+	+
رشد در نمک طعام ۵ درصد	+	+
رشد در نمک طعام ۷ درصد	+	+
استفاده از سیترات	-	-
رشد غیر هوازی در محیط مایع گلوکز	+	+

جدول ۲: درصد جوانه زنی اسپورهای کپک سبز در محیط کشت مایع PDB حاوی استرین‌های باکتریایی

استرین‌ها	درصد جوانه زنی اسپورهای بیمارگر	درصد بازدارندگی
B. subtilis BN	۱۷/۶۷ a	۷۸/۵ a
B. subtilis BS	۳۴/۲۱ b	۶۱/۹۶ b
شاهد	۹۶/۱۷ c	۰c

تیمارهایی که دارای حرف مشترک هستند در سطح ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند .



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم روی جوانه‌زنی اسپورهای قارچ *P. digitatum*

ه) بررسی اثر بی‌کربنات سدیم روی رشد استرین‌های باکتریایی

رشد استرین‌های باکتریایی هم تحت تاثیر غلظت باکتری و هم مدت زمانی که سلول باکتری تحت تاثیر ترکیب قرار گرفته بود. استرین‌ها در مقایسه با شاهد در محلول ۱ و ۳ درصد از سدیم بی‌کربنات، در هر سه زمان به صورت نرمال رشد کرده است. اما در مورد محلول ۵ درصد، در هر سه زمان اختلاف معنی‌داری با شاهد دیده شده است. تعیین جمعیت به‌وسیله تهیه سری رقت و کشت روی تشتک‌های پتری محتوی NA، کاهش بیش از ۵۲ درصد در شمار CFUهای زنده و قادر به رشد در غلظت ۵ درصد از بی‌کربنات سدیم نشان داده است، که بدترین حالت مربوط به نگه‌داری سوسپانسیون باکتری و نمک ۵٪، به مدت ۲۴ ساعت بوده است. با توجه به نتایج فوق غلظت ۳ درصد از SB برای ادامه آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).

و) بررسی تولید ترکیبات ضد قارچی توسط استرین‌های آنتاگونیست

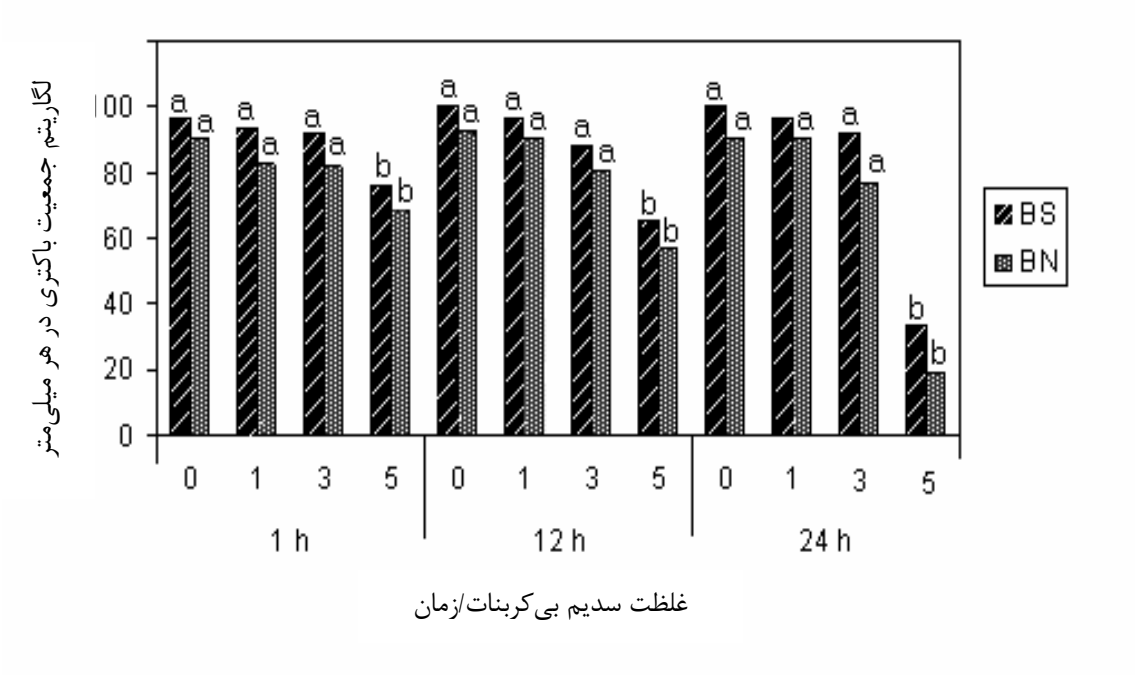
در کشت متقابل استرین‌های BN و BS با بیمارگر، پس از ۴۸ ساعت نگه‌داری در ۲۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب هاله بازدارندگی به قطر ۱۱ و ۸ میلی‌متر روی تشتک‌های پتری محتوی PDA مشاهده شد. روی میوه، محیط فاقد سلول باکتری، سوسپانسیون خالص سلول باکتری ونیز محیط کشت محتوی سلول‌های باکتری همگی از رشد بیمارگر ممانعت به عمل آوردند (جدول ۳).

ز) بررسی اثرات کنترلی استرین‌های آنتاگونیست روی میوه پرتقال

بررسی‌های صوت گرفته در دمای ۴،۱۰و ۲۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که هر دو جدایه در دماهای مذکور قادر به کنترل خسارت بیمارگر می‌باشند و به عنوان یک عامل آنتاگونیست، در دماهای مورد آزمایش خسارت بیمارگر را تا بیشتر از ۵۵ درصد کاهش دادند (شکل۳).

ح) بررسی اثر استرین‌های آنتاگونیست در تلفیق با بی‌کربنات سدیم در کنترل خسارت قارچ *P. digitatum* روی میوه

اثرات آنتاگونیستی استرین‌های باکتریایی در تلفیق با بی‌کربنات سدیم افزایش یافت و بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول۴).



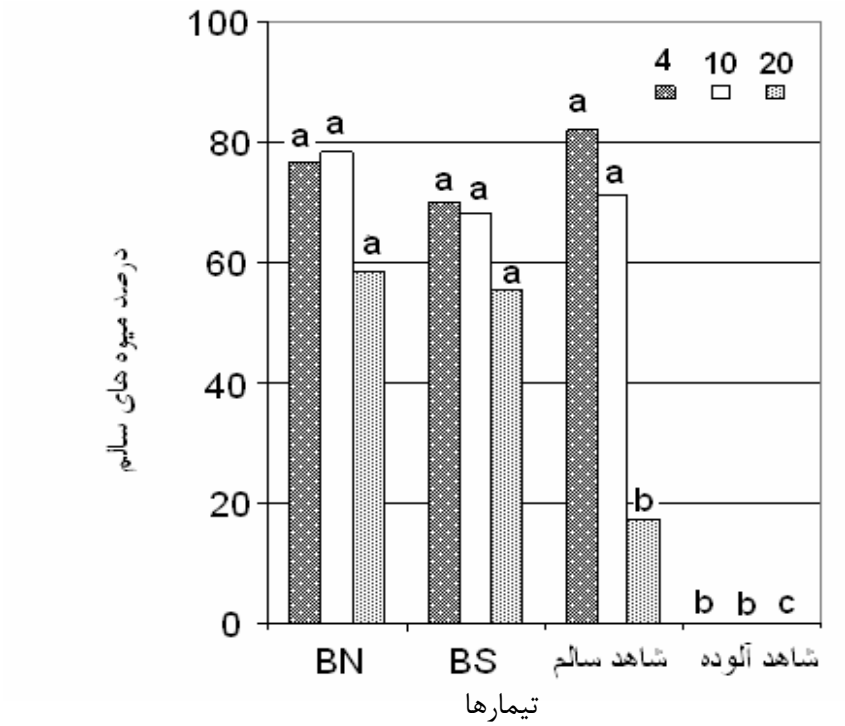
شکل ۲: اثر غلظت های مختلف بی‌کربنات سدیم روی رشد استرین‌های باکتری

جدول ۳: بررسی اثر سوسپانسیون خالص سلول باکتری در آب مقطر، محیط کشت حاوی سلول باکتری و محیط کشت فاقد سلول باکتری در کنترل *P. digitatum* روی میوه پرتقا.

جدایه باکتری	درصد میوه‌های آلوده*	
	BS	BN
محیط کشت حاوی سلول باکتری	۴۸/۲۶ d	۵۴/۲۴ d
سلول خالص باکتری	۵۲/۲۲ c	۵۸/۲۶ c
محیط کشت عاری از باکتری	۶۸/۵۴ b	۷۰/۲ b
آب مقطر سترون(شاهد)	۸۷/۲۲ a	۸۷/۲۲ a

*: درصد میوه‌های آلوده پس از یک هفته نگهداری در ۲۰ درجه محاسبه گردید.

تیمارهایی که دارای حرف مشترک هستند در سطح ۵ درصد فاقد اختلاف معنی دار می‌باشند.



شکل۳: بررسی اثرات کنترلی استرین‌های آنتاگونیست در دماهای ۴،۱۰ و۲۰ درجه سانتی‌گراد روی میوه پرتقال

جدول ۴: بررسی اثر استرین‌های آنتاگونیست در تلفیق با بی‌کربنات سدیم در کنترل خسارت قارچ *P. digitatum* روی میوه پرتقال

تیمارها*	درصد بازدارندگی
BN	۷۳/۲۶ c**
BS	۶۴/۵ f
SB (5%)	۵۴/۳ g
BN + SB (3%)	۷۹/۲۶ b
BS + SB (3%)	۶۷/۵ e
ایمازالیل	۸۲/۲۸ a
شاهد	۰ h

*: استرین‌های باکتریایی به تنهایی در غلظت $۱۰^{۸}$ و در تیمارهای تلفیقی با غلظت $۱۰^{۸}$× ۰/۵ سلول در هر میلی-لیتر به‌کار رفته است.

**: تیمارها تیمارهایی که دارای حرف مشترک هستند در سطح ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن صورت گرفته است.

بحث

از بین ۱۰۵ جدایه *Bacillus* sp. جدا شده از سطح شاخ، برگ و میوه مرکبات، ۲ جدایه BN و BS متعلق به گونه *B. subtilis* که دارای بیش‌ترین اثرات آنتاگونیستی علیه قارچ *P. digitatum* بودند (داده‌های انتشار نیافته)، برای انجام این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

در بررسی‌های نهایی سعی شد که شرایط آزمایش تا حد ممکن به شرایط کاربردی و آن چیزی که به شکل طبیعی اتفاق می‌افتد نزدیک‌تر باشد. برای این منظور میوه‌ها در حالت غوطه‌وری تحت تیمار با آنتاگونیست‌ها قرار گرفتند. از طرف دیگر زخم‌های ایجاد شده روی میوه عمیق و محدود به مزوکارپ میوه بودند و این در حالی‌است که نتایج آزمایش‌های سایر پژوهشگران

نشان داده است که عمق زخم-های ایجاد شده در شدت آلودگی اثر دارد و معمولا زخم‌های محدود به مزوکارپ بیش‌ترین میزان حساسیت به بیمارگر مذکور را سبب می‌شود (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

نمک‌های کربنات و بی‌کربنات به عنوان ترکیبات ارزان قیمت، فاقد اثرات سوء روی محیط‌زیست و در عین حال موثرمی‌توانند در کنترل بیمارهای پس از برداشت ناشی از پنیسیلیوم به‌کار روند. اثرات کنترلی نمک‌های کربنات و بی‌کربنات با غلظت‌های مورد استفاده آنان، دمای محلول‌ها و نیز مدت زمان غوطه‌وری میوه‌ها در این ترکیبات ارتباط مستقیم دارد. در این پژوهش استفاده از بی‌کربنات سدیم ۳ درصد به تنهایی و در عدم حضور آنتاگونیست در کنترل کپک سبز مرکبات موثر گزارش شده است که این با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد (پالو و همکاران، ۲۰۰۱ ؛ اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳). هم‌چنین نتایج نشان داد که استفاده از بی‌کربنات سدیم سبب افزایش توان بیوکنترلی استرین‌های آنتاگونیست می‌شود که این موضوع نیز نتایج پژوهش‌های سایر پژوهشگران را تایید می نماید (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳). در این پژوهش تفاوت چشم‌گیری در نتایج حاصل از بررسی اثر بی‌کربنات سدیم در شرایط *in vitro* با نتایج حاصل در شرایط *in vivo* به دست آمد، به‌طوری‌که این ترکیب با غلظت ۵ درصد، در بازدارندگی از جوانه زنی اسپور پنیسیلیوم در آزمایشگاه بسیار موثرتر از روی میوه عمل کرد. پژوهشگران دلیل این موضوع را برهمکنش بین نمک بی‌کربنات با ترکیبات موجود در بافت پوست میوه در محل زخم عنوان کردند که این اثر منجر به افت اثرات کنترلی آن روی میوه می‌گردد (اسمیلانیک و همکاران، ۲۰۰۱). از طرفی pH بالای محلول این نمک به عنوان مکانیسم اثر آن در کنترل پوسیدگی پنیسیلیومی پذیرفته شده است (اسمیلانیک و همکاران، ۲۰۰۱). نحوه اثر بی‌کربنات سدیم در افزودن اثر کنترلی جدایه های آنتاگونیست به درستی مشخص نشده است، اما روشن است که یکی از دلایل این امر تضعیف میسلیوم بیمارگر و به تعویق انداختن اسپورزایی آن توسط بی‌کربنات سدیم می‌باشد که به دنبال آن جدایه سریع-الرشد آنتاگونیست به سرعت محل‌های زخم روی میوه را کلونیزه و اشغال می‌نماید و میسلیوم تضعیف شده بیمارگر براحتی تحت تاثیر متابولیت‌های تولیدی آنتاگونیست از پای در می‌آید (اسمیلانیک و همکاران، ۲۰۰۱؛ اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

گرچه تولید مواد ضد قارچی توسط استرین‌های آنتاگونیست دقیقاً مورد بررسی قرار نگرفت، اما بازدارندگی از جوانه‌زنی اسپور بیمارگر می‌تواند دلیلی برای تولید این ترکیبات توسط استرین‌های مذکور باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که کنترل بیولوژیکی بیماری‌های پس از برداشت میوه‌ها در طی دوره انبارداری و فروش امکان‌پذیر است اما توسعه تجاری آنتاگونیست‌های موثر نیازمند انتخاب استرین‌هایی با خواص فنوتیپی و کاربردی مناسب برای سیستم‌های کنترل بیولوژیک پس از برداشت است. لازم به‌ذکر است که یکی از نکات حایز اهمیت در کنترل بیماری‌های پس از برداشت توجه به زمان برداشت میوه‌ها می‌باشد. در واقع میزان حساسیت بافت میوه به عوامل بیمارگر پس از برداشت تا حد زیادی به زمان برداشت میوه‌ها مرتبط است. به هر صورت برای انتخاب روش‌های کنترلی مناسب و نیز زمان صحیح اعمال این روش‌ها برای رسیدن به حداکثر بازدهی در کنترل بیماری‌های پس از برداشت، مطالعات عمیق و بنیادین در فیزیولوژی میوه ضروری به نظر می‌رسد (کمپف و ولف، ۱۹۸۹).

سپاسگزاری

میوه‌های مورد استفاده در این پژوهش از موسسه تحقیقات مرکبات رامسر تهیه گردید که بدین‌وسیله از همکاری موسسه مذکور تشکر می‌گردد.

منابع

زمانی، م.، شریفی تهرانی، ع.، احمدزاده، م.، علیزاده علی آبادی، ع. و فرزانه، م. ۱۳۸۷. بررسی اثر باکتری *Pantoea agglomerans* در کنترل کپک سبز میوه پرتقال (*Penicillium digitatum*). مجله علوم کشاورزی ایران، ج ۲۹. زیر چاپ.

نوشین، م، روستایی، ع. م.، رحیمیان، ح.، اعتباریان، ح. ر.، امینیان، ح.، سبحانی‌پور، ع. و فرهمند. س. ۱۳۸۵. ارزیابی تاثیر یون کلسیم بر کنترل کپک سبز و کپک آبی پرتقال توسط باکتربهای آنتاگونیست. هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.

Holmes, G. J. and Eckert, J. W. 1990. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* to postharvest citrus fungicides in California. Phytopatology. 89:716-721.

Kempf, H. J. and Wolf, G. 1989. *Erwina herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondite* f.sp. *tritici* on wheat. Phytopathology.79:990-994.

Nunes, C., Usall, J., Taxidó, N. and Viñas, I. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. Int. J. Food Micrbiol. 70: 53-61.

Obagwe, J. and Korsten, L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biol. Technol. 28:187-194.

Palou, L., Smilanick, J. L., Usall, J. and. Vñas , I. 2001. Postharvest decay blue and green molds of oranges by hot water, sodium bicarbonate and sodium carbonate. Plant Dis. 85:371-376.

Pusey, P. L. and Wilson, C. L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis.* Plant Dis. 98:753-756.

Smilanick J. L. and Denis-Arrue, R .1992. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* speicies. Plant Dis. 76:481-485.

Smilanick, J. L., Usall, J. and Vñas , I. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. Plant Dis. 85: 371- 376.

Shaad, N. W., Jones, J. B., and Chum, W. 2001. Laboratory guide for identifcation of plant pathogenic bacteria. 3nd edition, APS Press, 379pp.

Spotts, R. A. 1984. Environmental postharvest decay. In: Moline, H. E., (Ed) Postharvest pathology of fruit and vegetables: Postharvest losses in perishable crops. University of California Bulletin, vol.1914. pp 67-72.

Usall, J., N. Teixidó, I. and J. Smilanick. 2001. Biological control of *Penicillium digitatum* on citrus fruits with the antagonistic bacterium *Pantoea agglomerans* .Acta Hort . 4th. Int.conf. On Postharvest.

Wisniewski, M. E. and Wilson, C. L. 1992. Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: Recent Advances. HortSci. 27:94-98.

Yao, H., S. Tian and Wang, Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. Int. J. Food Microbiol. 93:297-304.

Evaluation of Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis* Strains Alone or in Combination with Sodium Bicarbonate on Citrus Green Mold

Zamani[1], M., Sharifi Tehrani[2], A. and Ahmadzadeh[3], M.

Abstract

In this study the effect of two strains of *Bacillus subtilis* alone or in combination with sodium bicarbonate on controlling citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* was investigated. Application of 10^8 cfu/ml of bacterial strains on artificially inoculated fruits by *P. digitatum* caused at last 55% reduction of rotted fruits after 5 weeks storage at 20, 10 and 4 ˚C. Integrated application of antagonistic strains with sodium bicarbonate (3% w/v) resulted in more than 67% decay reduction in 4 ˚C and the best result, 79.26% disease reduction, was obtained by integrated use of BN strain (5×10^7 cfu/ml) with 3% sodium bicarbonate. Laboratorial assays showed that these strains inhibit pathogen spore germination and also their culture filtrate and cell-free culture are able to control of the pathogen on the surface of fruit.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Penicillium digitatum*, biological control, sodium bicarbonate

1, 2 and 3. M.Sc. instructor, Professor and Assistant professor, plant pathology of respectively Department. of Plant Protection, University of Tehran

---