Archive of SID

مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۳۷۲-۳۶۱)

بررسی امکان بهبود کنترل بیولوژیک بیماری کپک خاکستری سیب با استفاده از مخلوط مخمرهای آنتاگونیست

اسماعیل زنگویی[1]*، حسن‌رضا اعتباریان[2]، نوازاله صاحبانی[3] و علی علیزاده[4]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیاران پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۳ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۰)

چکیده

دو جدایه مخمر A5 و A4 از گونه *Candida membranifuciens* و جدایه A6 از گونه *Pichia guilliermondii* برای کنترل بیماری کپک خاکستری سیب با عامل *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. به صورت انفرادی و مخلوط مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش سازگاری مواد بیوکنترل نشان داد که جدایه‌های مخمر A4، A5 وA6 با یکدیگر سازگار می‌باشند. نتایج آزمایش میزان جوانه اسپور بیمارگر در محیط مایع و نیزکشت متقابل با بیمارگر نشان داد جدایه‌های مخمر و مخلوط آنها به خوبی از رشد بیمارگر جلوگیری می‌کنند، میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر و درصد جوانه‌زنی اسپور بیمارگر به ترتیب بین ۱۴/۳۹ تا ۳۷/۷۳ درصد و ۱۱/۶۶ تا ۴۶ درصد متغییر بود. در شرایط انبار قطر لکه‌های ایجاد شده در اثر بیماری هنگامی که غلظت 10^8 سلول در میلی‌لیتر از مخمرهای فوق به تنهایی یا مخلوط آنها استفاده شود با مقایسه با شاهد یعنی قارچ عامل بیماری به تنهایی کاهش معنی‌داری نشان داد ($P\leq\%05$) ولی مخلوط A6+A5 در هر دو دمای ۲۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد با نشان دادن اثر سینرژیسم، بیشترین کنترل‌کنندگی را نسبت به دیگر مخمرها و مخلوط آنها داشت.

واژه‌های کلیدی: ***Botrytis cinerea*، مخلوط مخمرها و کپک خاکستری.**

مقدمه

بیماری کپک خاکستری با عامل *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.، یکی از مهمترین بیماری‌های پس از برداشت محسوب می شود و استفاده از قارچ‌کش‌ها مهمترین راه کنترل این بیماری محسوب می‌شود (Agrios, 1988). اما وجود بقایای قارچ‌کش‌ها در میوه‌ها و جدایه‌های مقاوم به آنها سبب جهت‌گیری‌های جدیدی در کنترل محصولات بعد از برداشت شده است که کنترل بیولوژیک یکی از روش‌های جایگزین مورد توجه قرار گیرد (Huang *et al*., 1995). علاوه بر آن در سال‌های اخیر بیشتر مطالعات در جهت بهبود بخشیدن به روش‌های کنترل بیولوژیک معطوف شده است، برای مثال با اضافه کردن دز پایینی از سموم، نمک‌های معدنی، کیتوزان[1]، قندهایی مانند داکسی دی گلوکز[2] به همراه آنتاگونیست‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (Janisiewicz, 1996). یکی دیگر از راه های بهبود کنترل بیولوژیک، مخلوط کردن عوامل بیوکنترل با یکدیگر علیه بیمارگرها می‌باشد. در بسیاری از منابع استفاده از مخلوط آنتاگونیست‌ها دارای فوایدی ذکر شده که: افزایش طیف اثر آنتاگونیست‌ها (Leibinger *et al*., 1997)، امکان استفاده از مکانیسم‌های کنترل متفاوت (Guetsky *et al*., 2002)، ترکیب ویژگی‌های مختلف

1. Chitosan
2. Deoxy- D-Glucose

* نویسنده مسئول: اسماعیل زنگویی تلفن: ۰۹۱۷-۷۷۲۳۶۳۰
E-mail: zanguei@hotmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

بدون استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک (Janisiewicz, 1996) و مقابله با غیر مؤثر شدن عوامل بیوکنترل در شرایط متغیر محیطی (Guetsky, 2001) از آن جمله می‌باشند. Janisiewicz & Bors (1995) نشان دادند که مخلوط دو جدایه از باکتری *Pseudomonas syringae* و یک جدایه مخمر به نام *Candida oleophila* نتایج مطلوبی در کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت دارند. Calvo *et al.* (2003) مخلوطی از جدایه‌های مختلف دو گونه مخمر *Rhabdotorula* و *Cryptococus* استفاده کردند و نتایج مطلوبی در کنترل دو بیماری پوسیدگی خاکستری و آبی روی سیب به طور همزمان به دست آوردند. علاوه بر آن کنترل بیولوژیک پوسیدگی خاکستری و آبی سیب با استفاده از مخلوط جدایه‌های مخمر جدا شده از سطح سیب نیز بررسی شده است و نتایج نشان داد که کنترل‌کنندگی مخلوط مخمرها با یکدیگر به مراتب از کاربرد انفرادی آنها بهتر بوده است (Janisiewicz, 1996). پژوهشگران دیگر مخلوط آنتاگونیست‌ها در کنترل بیولوژیک مناسب‌تر از زمانی می‌دانند که هرکدام از انتاگونیست‌ها به تنهایی استفاده شود (Guetsky *et al.* 2002). Guetsky *et al.* (2001) مخلوط مخمر *Pichia guilliermondii* و باکتری *Bacillus mycoides* را در شرایط محیطی متفاوت آزمایش کردند و نتیجه این شد که مخلوط آنها همواره طیف اثر بیشتری نسبت به حالت انفرادی در کنترل کپک خاکستری توت فرنگی دارند.

در این بررسی اثر جدایه A4 و A5 مخمر *Candida membranifuciens* و جدایه A6 از گونه *Pichia guilliermondii* و مخلوط آنها با یکدیگر در کنترل بیولوژیک کپک خاکستری سیب و همچنین وقوع نوع تقابل بین مخلوط‌ها (سینرژیسم یا آنتاگونیسم) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه مخمرهای آنتاگونیست و عامل بیماری

در این بررسی دو جدایه مخمر A4 و A5 از گونه *Candida membranifuciens* و جدایه A6 گونه *Pichia guilliermondii* استفاده گردید. این جدایه‌ها توسط Alavi Fard (2008) از روی سیب و از منطقه کرج جداسازی شده بودند. ضمناً برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها پس از اطمینان از خالص بودن، یک لوپ از آنها به محیط کشت شامل: ۳ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره مالت،۱۰ گرم گلوکز و ۲۰ گرم آگار (pH=۶-۵) و یک لیتر آب مقطر بود اضافه گردید و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Krever van, 1984). قارچ عامل بیماری جدایه *Botrytis cinerea* BC1 بود که از کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت شد.

بررسی سازگاری مواد بیوکنترل با یکدیگر در شرایط آزمایشگاه

این آزمون مطابق روش Janisiewicz & Bors (1995) با کمی تغییر، به منظور بررسی روند تغییرات جمعیت مخمرها و مخلوط آنها انجام شد. ابتدا محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز (PDB) تهیه گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر از این محیط درون لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردید. در ادامه برای به دست آوردن سوسپانسیون جدایه‌های مخمر ابتدا با استفاده از یک لوپ قطعه‌ای از پرگنه مخمر به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید، سپس با استفاده از لام هماسیتو متر و آب مقطر سترون به غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر رسانیده شدند. در تیمارهایی که شامل آنتاگونیست انفرادی بودند ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^7 سلول در میلی‌لیتر هر آنتاگونیست به لوله‌ها اضافه گردید. در تیمارهای مخلوط آنتاگونیست‌ها نیز ابتدا سوسپانسیون جدایه‌های مخمر در لوله‌های ۲ میلی‌لیتری به نسبت مساوی (۵۰ :۵۰) و دو به دو با یکدیگر مخلوط گردید، سپس۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخلوط حاصل به لوله‌ها اضافه گردید. در تیمار شاهد نیز ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. لوله‌ها روی شیکر دورانی ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و به ترتیب در زمان‌های ۱۵ و ۳۰ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

بعد از شروع آزمایش از هر کدام از لوله‌ها ۱۰۰۰ میکرولیتر برداشته شد، و برای به دست آوردن جمعیت مخمرها، نمونه‌های برداشته شده مذکور را با انجام سری رقت‌سازی روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA با سه تکرار کشت داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت در محیط کشت PDA کلونی‌ها با استفاده از دستگاه کلونی شمار شمارش شدند. تشخیص کلونی‌ها در محیط کشت بر اساس تفاوت مرفولوژیکی مخمرها صورت گرفت، بدین صورت که مخمرهای A5 به صورت کپه‌ای و ظاهری آتشفشانی، مخمرهای A6 صاف و بدون حاشیه با ظاهری لکه روغن مانند و مخمرهای A4 با کلنی های حاشیه دار و نوک دار در روی محیط کشت قابل تمایز بودند (Mclaughlin *et al.*, 1990). آزمایش در قالب طرح فاکتوریل در پایه تصادفی با دو فاکتور A و B در ۳ تکرار صورت گرفت. فاکتور A دارای ۳ سطح (زمان نمونه‌برداری) و فاکتور B دارای ۶ سطح (جمعیت مخمرهای آنتاگونیست در حالت مخلوط یا انفرادی) بود. تیمار ها نیزعبارت بودند:

۱. جدایه A4 C. membranifuciens

۲. جدایه A5 C . membranifuciens

۳. جدایه A6 P. guilliermondi

۴. مخلوط S1 شامل (A4+A5): *C.membranifuciens*(A4)+*C.membranifuciens*(A5).

۵. مخلوط S2 شامل (A4+A6): *C. membranifuciens*(A4) + *P. guilliermondi*(A6).

۶. مخلوط S3 شامل (A6+A5): *P. guilliermondi*(A6) + *C. Membranifuciens* (45).

کشت متقابل مخمرها و مخلوط آنها با قارچ عامل بیماری

این آزمون بر اساس روش Denis & Webster (1971) با کمی تغییر انجام شد. ابتدا سوسپانسیون 10^7 سلول در میلی‌لیتر جدایه‌های مخمر و مخلوط ۵۰:۵۰ آنها مطابق آزمون فوق تهیه گردید. سپس در یک طرف از سطح تشتک‌های به قطر ۴/۵ سانتی‌متر حاوی ۷ میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA)، سوسپانسیون انفرادی یا مخلوط دو به دو آنها به وسیله لوپ سترون کاملاً پخش شد. در تشتک‌های پتری شاهد به جای سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها با آب مقطر سترون آغشته گردید. سپس تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. در ادامه با فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک قرصی از محیط کشت ۵ روزه قارچ عامل بیماری قرار داده شد. پتری‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شدند و قطر پرگنه قارچ عامل بیماری و درصد کاهش رشد میسلیوم مطابق با فرمول زیر برای هر یک از جدایه‌ها محاسبه گردید (Etebarian *et al.*, 2005):

$$n = (a - b)/a \times 100.$$

که در این فرمول: n: درصد بازدارنگی از رشد عامل بیماری، a: قطر کلونی عامل بیماری در پتری شاهد، b: قطر کلونی عامل بیماری در پتری تیمار می‌باشد. این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد.

بررسی اثر مخمرها و مخلوط آنها بر روی جوانه‌زنی اسپور عامل بیماری

این آزمایش بر اساس روش Droby *et al.* (1997) با کمی تغییر انجام شد. ابتدا ۵ میلی‌لیتر محیط PDB درون لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس سترون گردید. در ادامه برای به دست آوردن غلظت عامل بیماری، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به تشتک پتری حاوی پرگنه دو هفته‌ای قارچ عامل بیماری اضافه گردید و با استفاده از یک میله شیشه‌ای سترون اسپورهای قارچ از سطح محیط کشت شسته و با استفاده از لام هماسیتومتر (Boeco, W. Germany) و افزودن آب مقطر به غلظت 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر رسانیده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور فوق درون لوله‌ها ریخته شد، در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون اسپور عامل بیماری ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته شد. سپس سوسپانسیون 10^7 سلول در میلی‌لیتر از هر یک از جدایه‌های مخمر و مخلوط ۵۰:۵۰ آنها با یکدیگر مطابق آزمایش‌های قبلی تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل به ترتیب در تیمارهای انفرادی یا مخلوط به لوله‌ها اضافه گردید. لوله‌ها به مدت۲۰ ساعت در روی شیکر تنظیم شده در

www.SID.ir

Archive of SID

۱۲۰ دور در هر دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از این مدت در حدود ۱۰۰ اسپور از بیمارگر از نظر تعداد اسپورهای جوانه زده مورد مقایسه قرار گرفتند. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تکرار انجام شد.

بررسی اثر جدایه‌های مخمر مخلوط آنها در کنترل کپک خاکستری سیب و در دماهای ۲۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد

در این آزمایش اثر مخمرها و مخلوط آنها علیه کپک خاکستری بر روی سیب‌های Delicious_Golden مورد بررسی قرار گرفت. میوه‌ها به منظور ضد عفونی ابتدا به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد غوطه‌ور شده و سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. در ادامه سوراخ‌هایی به عمق ۳ و قطر ۲/۵ میلی‌متر در اطراف دم سیب با استفاده از یک میخ سترون ایجاد شد، و سپس سوسپانسیون آنتاگونیست‌های A4، A5 و A6 و مخلوط آنها با یکدیگر به نسبت مساوی ۵۰:۵۰ و نیز سوسپانسیون بیمارگر مطابق آنچه قبلاً ذکر شد تهیه گردید. در ادامه در هر زخم ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها یا مخلوط آنها مایه‌زنی گردید. بعد ار ۲۴ ساعت نگهداری در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^5 کنیدی در هر میلی‌لیتر از بیمارگر نیز به هر زخم اضافه شد. زخم‌های مایه‌زنی نشده، با آب مقطر استریل تیمار شدند. میوه‌ها در ظروف پلاستیکی با پوشش پلاستیکی قرار گرفتند و به ترتیب به مدت ۱۵ و ۳۰ روز در دماهای ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. درون کیسه‌ها با آب مقطر سترون تا پایان آزمایش مرطوب نگهداشته داشته شد. در این آزمایش برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار معادل یک سیب بود و همچنین هر سیب دارای سه محل زخم شده بود، که برای اندازه‌گیری قطر زخم‌هایی که دارای علایم آلودگی به کپک خاکستری بودند به ترتیب در روز پانزدهم و سی‌ام بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری از کولیس استفاده شد.این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تکرار انجام شد.

درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر برای هر یک از مخمرها و مخلوط آنها طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Etebarian *et al*., 2005):

$$\text{٪ بازدارندگی از رشد بیمارگر} = \frac{\text{قطر لکه در شاهد} - \text{قطر لکه در تیمار}}{\text{قطر لکه در شاهد}} \times ۱۰۰$$

علاوه بر آن فرمول Limple *et al*. (1962) برای بررسی نوع تقابل بین مخلوط‌ها (سینرژیسم یا آنتاگونیسم) استفاده شد:

$$Ee = X + Y - X.Y/100$$

بر اساس این فرمول X و Y دو جزء تشکیل‌دهنده مخلوط می‌باشند که مقدار هر یک به صورت درصد بازدارندگی نسبی بیان می‌شوند، اگر مقدار درصد بازدارندگی هر یک از مخلوط‌ها بیشتر از مقدار مورد انتظار (Ee) محاسبه شده با فرمول لیمپل باشد، اثر بین اجزای مخلوط سینرژیسم می‌باشد. بر همان اساس اگر درصد بازدارندگی هر یک از مخلوط‌ها کمتر از مقدار مورد انتظار (Ee) باشد میان اجزاء مخلوط اثر آنتاگونیسم (ضد یکدیگر) وجود دارد.

اثر غلظت مخمر در کنترل بیماری کپک خاکستری سیب

ابتدا سیب‌ها مطابق آزمون فوق ضد عفونی شدند و سوراخ‌هایی به عمق ۳ و قطر ۲/۵ میلی‌متر در اطراف دم سیب و با استفاده از یک میخ سترون ایجاد شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از غلظت‌های 10^6، 10^7 و 10^8 سلول در میلی‌لیتر از مخمرهای آنتاگونیست و مخلوط ۵۰:۵۰ آنها در هر یک از غلظت‌های فوق که مطابق آزمون‌های قبلی به دست آمده بودند به زخم‌های ایجاد شده در سیب مایه‌زنی شد. ۲۴ ساعت بعد ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^5 کنیدی در میلی‌لیتر بیمارگر در زخم‌ها مایه‌زنی شد. زخم‌های مایه‌زنی نشده نیز، با آب مقطر استریل تیمار شدند. سپس میوه‌ها در دماهای ۲۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۱۵ و ۳۰ روز نگهداری شدند، و در نهایت با اندازه‌گیری قطر لکه‌های ایجاد شده میزان کنترل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

بازیافت جمعیت آنتاگونیست‌ها از محل زخم شده سیب

جمعیت مخمر و مخلوط آنها در سیب‌هایی که در

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند در روزهای پانزدهم و سی‌ام بعد از مایه‌زنی بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این ترتیب که ابتدا با استفاده از یک چوب‌پنبه سوراخ‌کن از محل زخم شده سیب یک گرم بافت جدا کرده و درون لوله‌هایی که محتوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل بودند منتقل گردیدند، سپس به مدت یک دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شدند. با انجام سری رقت‌سازی، ۱۰۰۰ میکرولیتر از این هر یک از رقت ها روی محیط کشت حاوی PDA پخش شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. و در نهایت کلنی مخمرها بعد از ۳ روز با استفاده از دستگاه کلونی شمار، شمارش شدند. کلنی مخمرها در حالت مخلوط با استفاده از تفاوت مرفولوژیکی هر یک از مخمرها در محیط کشت مشابه آزمون تقابل مخمرها در محیط مایع تشخیص داده شدند.

محاسبات آماری

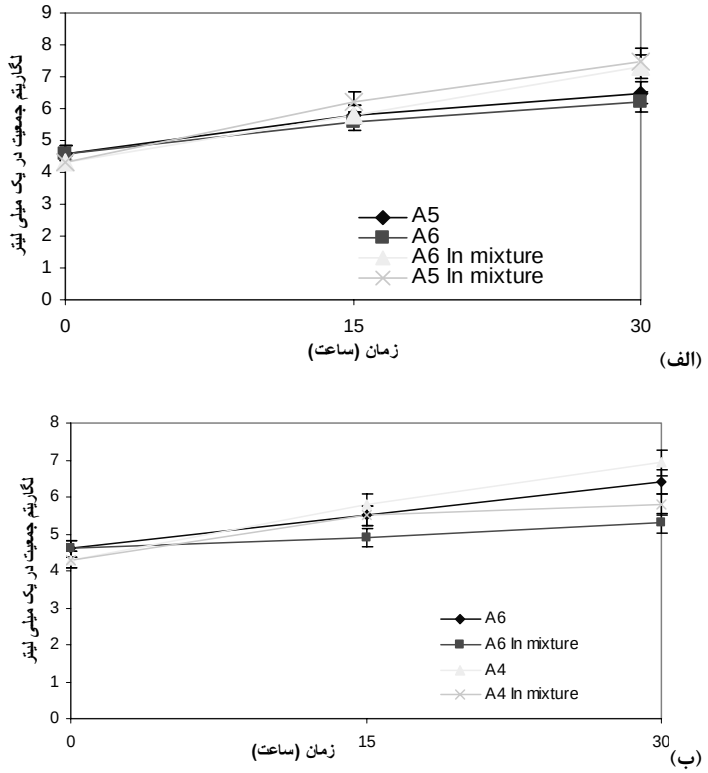
به منظور تجزیه تحلیل آماری اعداد برای پارامترهای مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی واریانس از نرم‌افزار SAS 9.0 استفاده گردید. و میانگین‌ها با روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. داده‌ها قبل از آنالیز واریانس با فرمول‌های زیر نرمال شدند:

$Y = Ln(X)$ $\quad$ $Y = Log(X)$ $\quad$ $Y = \sqrt{X}$

نتایج

بررسی سازگاری مواد بیوکنترل با یکدیگر در شرایط آزمایشگاه

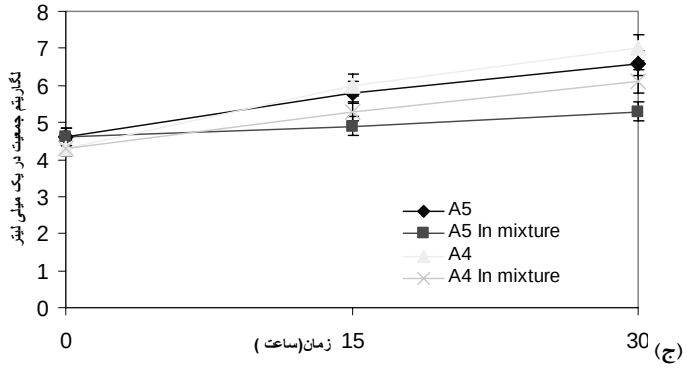
نتایج تجزیه تحلیل آماری آزمایش تاثیر جدایه‌های مخمر A4، A5 و A6 روی میزان رشد یکدیگر، نشان داد بین تیمارها (جمعیت مخمرهای آنتاگونیست در حالت مخلوط یا انفرادی) اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P\leq\%01$)، اما بین زمانهای شمارش کلونی و نیز اثر متقابل زمان با تیمار ها اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. به عبارت دیگر در این آزمایش هر یک از جدایه‌های مخمر در حالت مخلوط دو به دو با یکدیگر به خوبی تا انتهای آزمایش مشابه کاربرد انفرادی آنها در محیط PDB رشد می‌کنند (شکل ۱).



شکل ۱- جمعیت مخمرهای A5، A6 و A4در حالت انفرادی و مخلوط در محیط PDB در دمای ۱±۲۵ درجه. مخلوط A6+A5 (الف)، A4+A6 (ب) و A4+A5 (ج). اعداد مربوط به نمودار، میانگین سه تکرار می‌باشد. خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

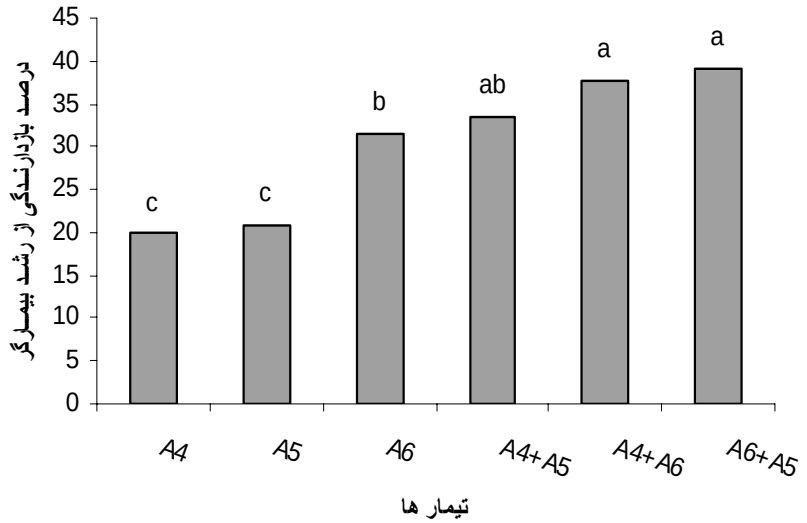


کشت‌متقابل مخمرها و مخلوط آنها با قارچ عامل‌بیماری

نتایج این آزمایش نشان داد مخلوط‌های A6+A5 و A6+A4 با درصد کاهش رشد بیمارگر به ترتیب ۳۹/۱۴ و ۳۷/۷۳ در یک سطح و مخلوط A4+A5 با مخمر A6 به صورت انفرادی در سطح دیگر باعث کاهش رشد پرگنه بیمارگر شدند (شکل ۲).

بررسی اثر مخلوط مخمر در جوانه‌زنی اسپور بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

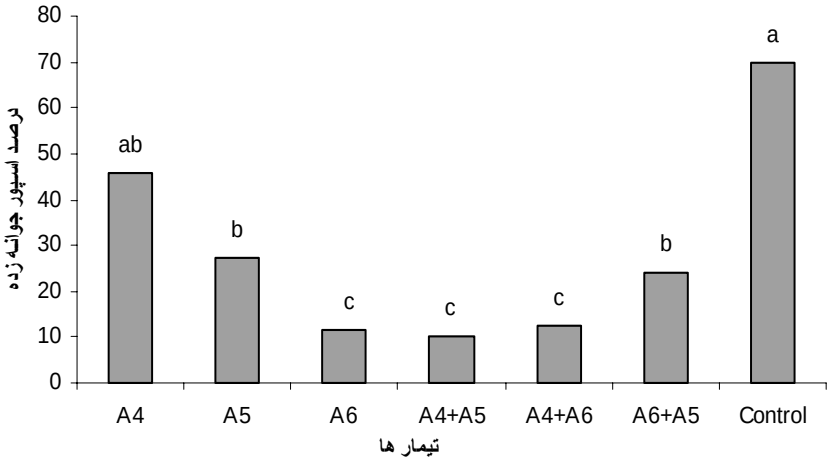
میزان جوانه‌زنی اسپور بیمارگر ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری به همراه مخمرهای آنتاگونیست و مخلوط آنها نشان داد که مخلوط A4+A5، A4+A6 و مخمر آنتاگونیست A6 در کاهش جوانه‌زنی اسپور قارچ عامل بیماری از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشته و کمترین میزان جوانه‌زنی اسپور بیمارگر در محیط حاوی این تیمارها مشاهده شد. بیشترین میزان جوانه‌زنی اسپور نیز در محیط حاوی جدایه آنتاگونیست A4 مشاهده شد (شکل۳).



شکل ۲- درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر روز دهم پس از مایه‌زنی توسط مخمر و مخلوط آنها در آزمون کشت متقابل. هر تیمار دارای سه تکرار و تیمارهایی که دارای حرف مشترک بودند در آزمون دانکن با هم تفاوت معنی‌داری ندارند ($P\leq\%05$).

www.SID.ir

Archive of SID

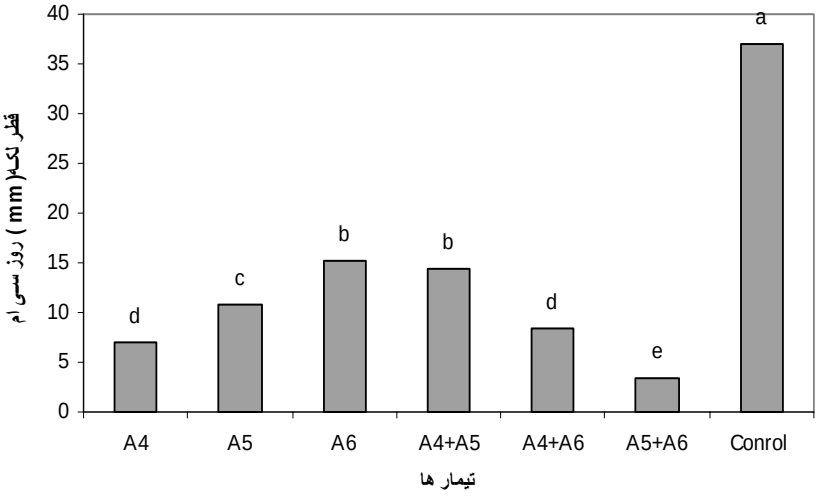


شکل ۳- درصد اسپور جوانه زده بیمارگر پس از مایه‌زنی با مخمرهای آنتاگونیست و مخلوط آنها در محیط PDB. هر تیمار دارای سه تکرار و تیمارهایی که دارای حرف مشترک بودند در آزمون دانکن با هم تفاوت معنی‌داری ندارند (P≤%05).

بررسی اثر جدایه‌های مخمر به تنهایی و مخلوط در کنترل کپک خاکستری سیب ودر دماهای ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد

نتایج این آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد بیشترین میزان کنترل توسط مخلوط A5+A6 در مقایسه با دیگر تیمارها به صورت انفرادی و مخلوط حاصل شده که قطر لکه‌ای معادل ۳/۳۳ میلی‌متر را ایجاد می‌کند. کمترین میزان کنترل پوسیدگی نیز مربوط به جدایه A4 و مخلوط A4+A5 بود. نتایج در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نیز مشابه دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود (شکل۴).

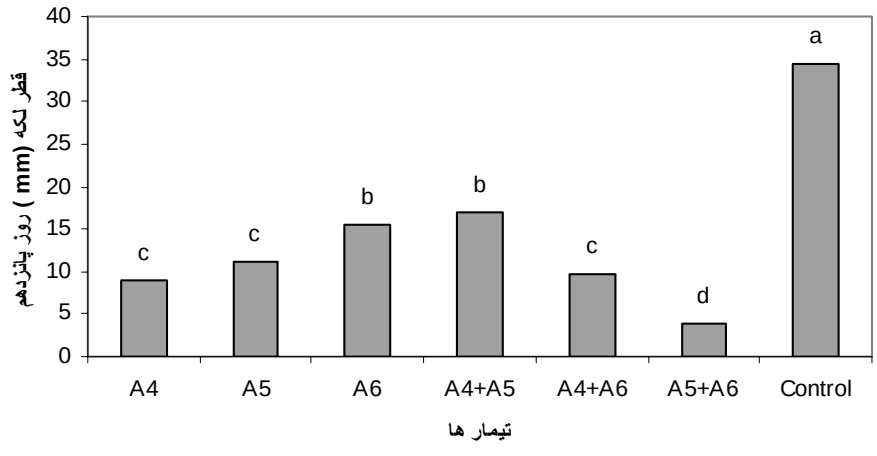
علاوه بر آن درصد بازدارندگی از توسعه بیمارگر (EI) و اثرات مورد انتظار (Ee) مطابق فرمول Limpel *et al.* (1962) نیز بررسی شد. نتایج نشان داد اجزای تشکیل‌دهنده مخلوط A6+A5 دارای اثر سینرژیسم در کنترل کپک خاکستری سیب هستند و مقدار EI از مقدار Ee محاسبه شده بیشتر می‌باشد. این نتیجه در هر دو دمای ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. در دیگر مخلوط‌ها A6+A4 و A4+A5 مقدار Ee محاسبه شده بیشتر از مقدار درصد بازدارندگی (EI) بود که نشان‌دهنده اثرآنتاگونیسمی (ضد یکدیگر) میان این دو مخلوط است (جدول۱).



الف)

www.SID.ir

Archive of SID



ب)

شکل ۴- قطر لکه‌های ایجاد شده روی میوه سیب تیمار شده با *B.cinerea*، مخمرهای آنتاگونیست و مخلوط آنها پانزده و سی روز پس از مایه‌زنی به ترتیب در دماهای ۴ درجه سانتی‌گراد (الف) ۲۰ درجه سانتی‌گراد (ب). هر تیمار دارای چهار تکرار بوده تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند ($P\leq0.05$).

جدول ۱- درصد بازدارندگی از بیمارگر، توسط مخمرها، مخلوط آنها و مقدار مورد انتظار در مخلوط آنها (Ee) مطابق فرمول لیمپل

	۴ °C		۲۰ °C	
تیمار ها	درصد بازدارندگی (EI)	(%) Ee	درصد بازدارندگی (EI)	(%) Ee
A4	۵۹/۱۴ d		۵۵/۱۹ c	
A5	۷۰/۹۶ c		۶۷/۶۸b	
A6	۸۱/۱۷ b		۷۴/۲۹ b	
A4+A5	۶۱/۰۴ d	۹۱/۶۹	۵۰/۸۸ c	۹۴/۵۳
A4+A6	۷۷/۲ b	۸۸/۴۷	۷۱/۷۵b	۹۲/۳
A6+A5	۹۰/۹۸ a	۸۵/۵۱	۸۸/۶ a	۸۸/۱۳

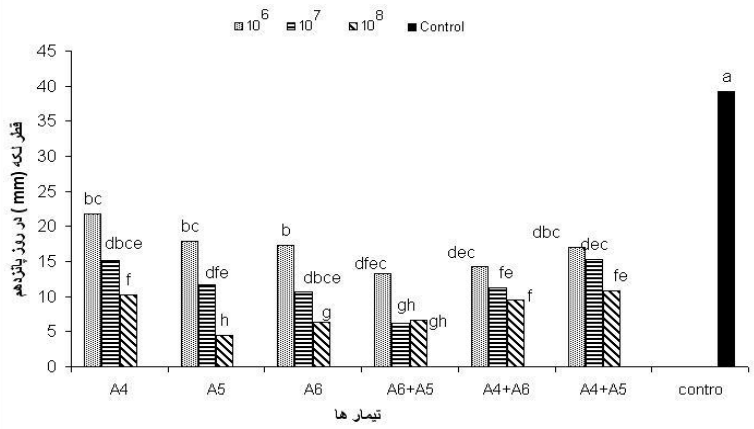
هر تیمار دارای چهار تکرار بوده و میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن ($p\leq۰/۰۵$) اختلاف معنی‌دار دارند.

اثر غلظت مخمر در کنترل بیماری‌کپک‌خاکستری سیب

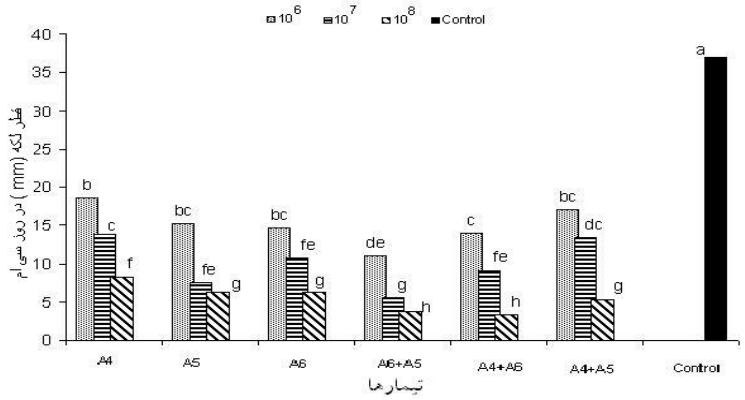
نتایج آزمایش در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد به ازای افزایش غلظت مخمر قطر لکه‌ها نیز کمتر می‌شوند. در بین تیمارهای مختلف تیمار انفرادی مخمر A5 با غلظت 10^8 قطر لکه‌های برابر ۴/۵۲ میلی‌متر را ایجاد کرد که در قیاس با دیگر تیمارها به صورت انفرادی و مخلوط کمترین قطر لکه را ایجاد کرده بود، اما در دمای ۴ درجه مخلوط‌های A4+A6 و A6+A5 با غلظت 10^8 آنتاگونیست، قطر لکه‌هایی به ترتیب برابر با ۳/۳۲ و ۳/۶۵ میلی‌متر ایجاد کردند که نسبت به دیگر تیمارها کمترین قطر لکه بیمارگر در سطح سیب را سبب شدند (شکل ۵).

www.SID.ir

Archive of SID



(الف)



(ب)

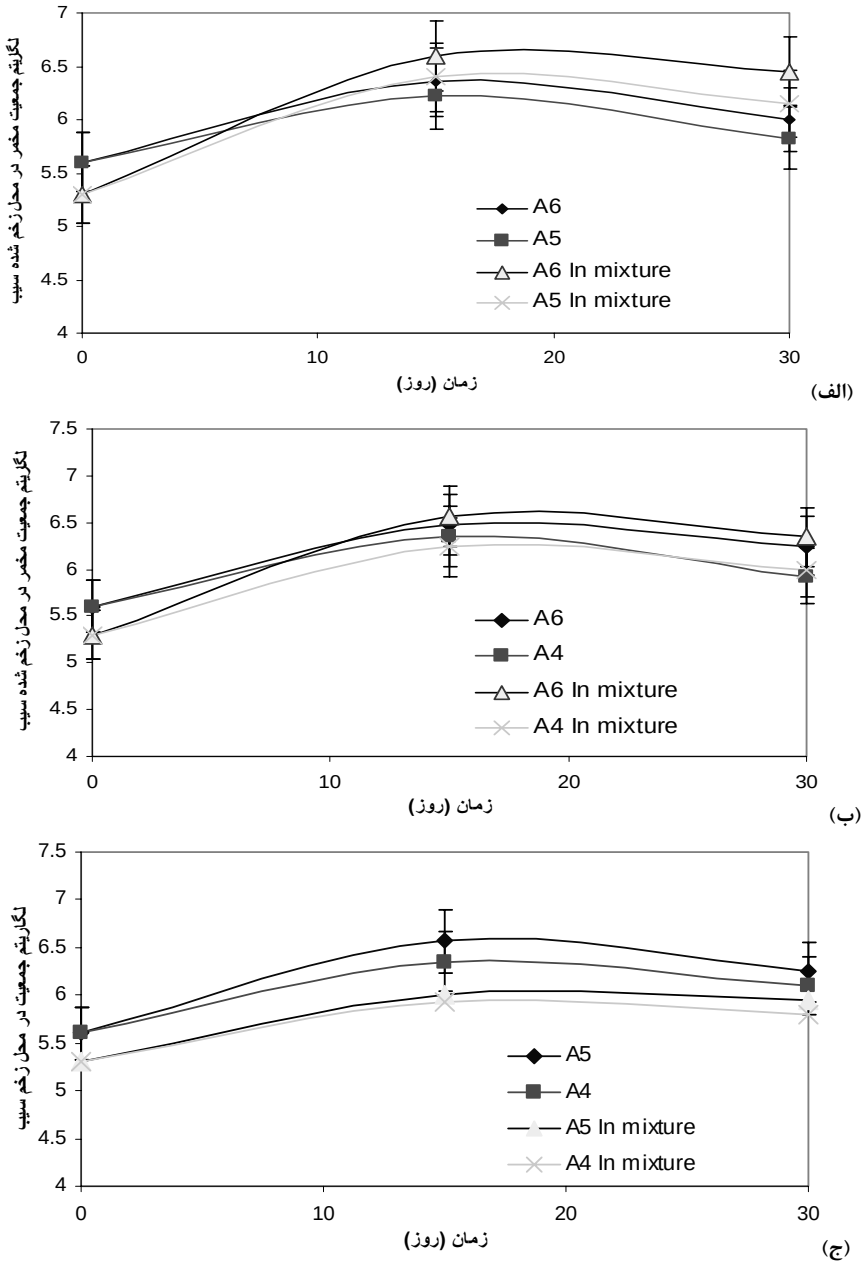
شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف جدایه‌های مخمر و مخلوط آنها جدا شده از سیب در کنترل *B.cinerea* روی میوه سیب به ترتیب پس از ۱۵ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (الف)، ۳۰ روز در ۴ درجه سانتی‌گراد (ب). هر تیمار دارای چهار تکرار بوده و تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند ($P\leq ۰/۰۵$). قطر لکهٔ آلوده (mm) می‌باشد. غلظت‌های کاربردی آنتاگونیست‌ها در حالت انفرادی و مخلوط به ترتیب $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ بود.

بازیافت جمعیت آنتاگونیست‌ها از محل زخم شده سیب

نتایج بررسی جمعیت مخمر بر روی میوه سیب نشان داد که رشد مخمرها در حالت انفرادی متفاوت از مخلوط آنها می‌باشد. در مورد مخلوط جدایه‌های *C. membranifuciens* (A5) و *P. guilliermondi* (A6) در روز پانزدهم بعد از مایه‌زنی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده می‌شود که هر دو آنتاگونیست به بالاترین جمعیت خود در حالت مخلوط می‌رسند در صورتی که جمعیت مخمرها در حالت کاربرد انفرادی از این میزان کمتر است (شکل ۶- الف)، که در ادامه تا انتهای آزمایش کاهش در جمعیت دو مخمر و مخلوط آنها مشاهده می‌شود. بررسی جمعیت مخلوط A4+A6 نیز نشان می‌دهد که رشد جدایه A4 تحت تاثیر منفی حضور مخمر A6 در حالت مخلوط با آن قرار دارد (شکل۶- ب). در مورد مخلوط A4+A5 در روز پانزدهم هر دو آنتاگونیست در حالت کاربرد انفرادی به بالاترین جمعیت خود در مقایسه با مخلوط آنها با یکدیگر می‌رسند (شکل ۶- ج).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- جمعیت مخمرهای A5 و A6 (الف)، A4 و A6 (ب)، A4 و A5 (ج) در حالت انفرادی و مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. اعداد مربوط به نمودار، میانگین سه تکرار می‌باشد. خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشند.

بحث

در بسیاری از مطالعات تعداد زیادی از عوامل بیوکنترل از جمله قارچ‌ها و باکتری‌های (Leibinger *et al.*, 1997)، باکتری و مخمرهای آنتاگونیست (Janisiewcz & Bors, 1995) به صورت مخلوط علیه بسیاری از عوامل بیماری‌زا استفاده شده‌اند. در مخلوط کردن عوامل بیوکنترل، سازگار بودن آنها با یکدیگر حایز اهمیت می‌باشد (Raaijmakers *et al.*, 1995). در این پژوهش مهمترین پیش شرط برای نشان دادن سازگاری این عوامل با یکدیگر کشت همزمان این عوامل در محیط مایع بود که نشان داد، همه جدایه‌های مخمرها در حالت مخلوط به خوبی در کنار یکدیگر رشد می‌کنند. علاوه بر آن در بسیاری از مطالعات سازگاری بین عوامل تشکیل‌دهنده مخلوط آنتاگونیست‌ها را با کشت همزمان مخلوط آنتاگونیست‌ها با بیمارگر در آزمایش دو نقطه‌ای بیان کرده‌اند (Raaijmakers *et al.*,

www.SID.ir

Archive of SID

(1995). در آزمون دو نقطه‌ای این پژوهش مخلوط‌های A6+A5 و A6+A4 بیشترین درصد کاهش پرگنه بیمارگر را سبب شدند و مخلوط A4+A5 در مقایسه با دیگر مخمرها کاهش رشدی برابر یا بیشتر از حالت انفرادی مخمرها باعث شد که خود دلیلی برای سازگاری مخمرها در مخلوط با یکدیگر می‌باشد. همچنین در مطالعات دیگری ثابت شده است که ترکیب مخمرهای آنتاگونیست اثر کنترلی بیماری کپک خاکستری سیب را در مقایسه با کاربرد انفرادی این ایزوله‌ها بهبود می‌بخشد (Janisiewcz, 1996).

در این پژوهش ترکیب A5+A6 سبب بهبود کنترل بیمارگر در شرایط انبار در مقایسه با دیگر تیمارها به صورت انفرادی و مخلوط شد. علاوه بر آن فرمول لیمپل و دینامیک جمعیت دو عامل بیوکنترل در میوه سیب به ما کمک می‌کنند تا نوع تقابل میان دو عامل بیوکنترل در مخلوط‌های به کار برده شده در شرایط انبار (*in vivo*) را پیش‌بینی کنیم. در مخلوط A6+A5 درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر(EI) برای این مخلوط از مقدار مورد انتظار محاسبه شده (Ee) بیشتر بود که نشانگر یک اثر سینرژیسم بین دو عامل مخلوط شده می‌باشد و انتظار می رود رشد هر دو آنتاگونیست در این شرایط تعدیل شده باشد. بررسی آنالیز جمعیتی این دو (A6+A5) در انبار نیز نشان داد جمعیت مخمر A5 در حالت مخلوط در روز پانزدهم و نیز جمعیت مخمر A6 در همان زمان در مخلوط به طور مشخصی از میزان رشد مخمرها در حالت انفرادی بیشتر است. علاوه بر آن در مخلوط A4+A6 مقدار درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر (EI) مخلوط کمتراز مقدار درصد مورد انتظار (Ee) مربوط به آن می‌باشد، همچنین بررسی جمعیت دو آنتاگونیست در حالت مخلوط نیز نشان داد که مخمر A6 دارای یک اثر منفی بر روی جمعیت مخمر A4 است. رفتار دو عامل بیوکنترل در ترکیب A4+A5 نیز جالب است برای این که این بار جمعیت هر دو عامل در روز پانزدهم بعد از مایه‌زنی در حالت مخلوط کمتر از جمعیت آنها در حالت انفرادی است. علاوه بر آن مقدار درصد بازدارندگی (EI) محاسبه شده برای دو مخلوط A4+A5 و A4+A6 در حالت مخلوط کمتر از مقدار مورد انتظار (Ee) بود که خود نشان‌دهنده اثرات آنتاگونیسم بین دو عامل بیوکنترل در هنگام مخلوط با یکدیگر می‌باشد. اما دلیل این که چرا دو جدایه مخمر مخلوط A6+A5 در کنار یکدیگر بهتر از حالت انفرادی رشد می‌کنند را باید در ترکیبات بافت سیب و قدرت رقابتی مخمرها جستجو کرد. بررسی‌های دقیق تر نشان داده‌اند که میوه سیب در هنگام بلوغ غنی از قند می‌باشد و یک محیط مناسب برای فعالیت مخمرها ایجاد می‌کند (Fourie *et al*., 1991). Janisiewcz (1996) مخلوطی از دو جدایه مخمر با اسامی اختصاری T5-D3 و T5-E2 علیه کپک آبی سیب استفاده کرده بود. در این بررسی او نشان داد که جدایه T5-E2 از سه منبع اصلی کربن (گلوگز، فروکتوز و ساکاروز) در سیب استفاده می‌کند اما جدایه T5-D3 در استفاده از ساکاروز ناتوان است، او نتیجه گرفت که تفاوت در کنج‌های (Niches) اکولوژیکی و استفاده از مواد قندی در دو آنتاگونیست به آنها اجازه می‌دهد که در کنار یکدیگر رشد کنند و سبب بهبود کنترل بیمارگر شوند. Calvo *et al*. (2003) بیان کردند که بهبود کنترل مخلوط دو جدایه از مخمر *Rhodotorula glutinis* به دلیل رقابت مخمرها برای مواد غذایی است. وجود اسید آمینه و مواد کربوهیدرات مخصوص یکی از مخمرها در محیط سبب می‌شود که هر دو مخمر برای آن وارد رقابت نشوند (از دور رقابت خارج می‌شوند) و این شرایط سبب رشد هر دو مخمر می‌شود. قابل ذکر است که این منابع توسط بیمارگر نیز مصرف می‌شوند، ولی یک حد بالایی از مقدار قندها برای آغاز جوانه‌زنی کنیدی بیمارگرها لازم است که توانابی دو آنتاگونیست در استفاده از دو منبع مهم غذایی در سیب (اسیدهای آمینه و قندها) موجب خالی شدن مواد غذایی ضروری برای بیمارگر می شود و در نتیجه سبب بهبود کنترل بیمارگر نسبت به عوامل بیوکنترل انفرادی می‌شوند (Janisiewcz & Bors, 1995).

در این پژوهش با افزایش غلظت مخمر به 10^8 سلول در میلی‌لیتر میزان کنترل مخمرها و نیز مخلوط آنها افزایش یافت. بررسی‌های ثابت می‌کنند که فعالیت آنتاگونیستی مخمرها وابسته به غلظت آنها می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت بالای آنتاگونیست سبب بهبود کنترل می‌گردد که نشان‌دهنده این واقعیت است که رقابت برای فضا و مواد غذایی مهمترین نقش در بیوکنترل مخمرها در برابر بیمارگرها بازی می‌کند (Zhang *et al*., 2004).

نتایج این پژوهش بیان می‌کند با توجه به این که فضای زخم‌های روی سیب بیشتر از ظرفیت استفاده از آنتاگونیست‌های انفرادی است (Janisiewcz & Bors, 1995)، اضافه کردن یک آنتاگونیست دیگر با نمایه تغذیه‌ای متفاوت می‌تواند سبب بهبود کنترل بیمارگرها گردد.

سپاسگزاری

بودجه این طرح از محل اعتبار از حوزه معاونت پژوهشی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و صندوق حمایت از پژوهشگران کشور تأمین شده است، که به این وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از خانم مهندس مهرنوش محمدی‌فر کارشناس آزمایشگاه بیماری‌های پردیس ابوریحان تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Agrios, G. N. (1988). *Plant pathology*. (3rd ed.). Academic Press, Inc: San Diego.
2. Alavi, F. (2008). *Studies on biological control of gray mold of apple by yeast antagonists*. M. Sc. thesis of Abourayhan Campus, University of Tehran.
3. Calvo, J., Calvente, V., De Orellano, M., Benazzi, D. & DeTosetti, M. I. S. (2003). Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apple with the use of yeast mixture. *Biocontrol*, 48, 579–593.
4. Dennis, C. & Webster, J. (1971). Antagonist properties of species – groups of *Trichoderma*, III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycollogical Society*, 57, 363 -369.
5. Droby, S., Wisniewski, M. E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y. & Chalutz, E. (1997). Influence of $CaCl_2$ on *Penicillium digitatum*, grapefruit tissue and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology*, 87, 310–315.
6. Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., Eastwell, K. C. & Sayler, R. J. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 591-598.
7. Fourie, P. C., Hansmann, C. F. & Oberholzer, H. M. (1991). Sugar content of fresh apple and pear in south Africa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1938-3939.
8. Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y. & Dinoor, A. (2001). Combining biocontrol agents to reduce variability of biological control. *Phytopathology*, 91, 261-267.
9. Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E. & Dinoor, A. (2002). Improvement biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of diseade suppression. *Phytopathology*, 92, 976-985.
10. Huang, Y., Deverall, B. J. & Morris, S. C. (1995). Postharvest control of green mould on orange by a strain of *Pseudomonas glathei* and enhancement of its biocontrol by heat treatment. *Postharvest Bilology and Technology*, 5, 129-137.
11. Janisiewicz, W. J. & Bors, B. (1995). Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied Environment Microbiology*, 61, 3261-3267.
12. Janisiewicz, W. (1996). Ecological diversity, nich overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixture for biocontrol of postharvest disease of apple. *Phytopathology*, 86, 473-479.
13. Kreger Van, N, J. W. (1984). *The yeast: a taxonomic study*. (3rd ed.). Amsterdam: Elsivier, 1082 pp.
14. Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. & Mendgen, K. (1997). Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology*, 87, 1103-1110.
15. Limpel, L., Shuldt, P. & Lamont, D. (1962). In: Proceedings of *weed control by dimethyl tetrachloroterephtahlate*. Northeast Weed Control Conference. USA. 16, 48–53.
16. Mclaughlin, R. J., Wilson, C. L., Chalutz, C. P., Kurtzman, W. F. & Osman, S. F. (1990). Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 3583-3586.
17. Raaijmakers, J. M., Van der Sluis, I., Koster, M., Bakker, P. A. H. M., Weisbeek, P. J. & Schippers, B. (1995). Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 126–135.
18. Zhang, H. Y., Fu, C. X., Zheng, D. X., He, D., Shani, L. H. & Zhani, X. (2004). Effects of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner in combination with sodium bicarbonate on biocontrol of postharvest green mold decay of citrus fruit. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*, 45, 159-164.

www.SID.ir