بررسی فعالیت بیوکنترلی مخمر *Metschenikowia pulcherrima* جدا سازی شده از سطح میوه ها علیه بیماریهای بعد از برداشت سیب

رحمت سیفی، ایرج نحوی و غلامرضا بلالی

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

چکیده.

توسعه پاتوژنهای مقاوم برای بسیاری از قارچ کشهای کلیدی ، فقدان قارچ کشهای جایگزین ونگرانیهای عمومی از نظر استفاده روز افزون آفت کشها، کنترل بیولوژیکی را بعنوان یکی از بهترین جایگزینهای پیشنهادی برای مواد شیمیایی مطرح کرده است. مخمر *Metchnikowia pulcherrima* با توجه به قابلیتهای بیولوژیکی آن در کنترل بیماری کپک خاکستری و کپک آبی بعد از برداشت سیب جداسازی و اثرات تیمار های مختلف آن در چالش با غلظتهای $۱۰^{٤}\times۵$ و $۱۰^{٥}\times۱$ اسپور در میلی لیتر پاتوژنهای بعد از برداشت *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea* مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیونهای سلولی شسته شده مخمری در غلظت $۱۰^{۸}\times۱$ واحد تشکیل کلنی در میلی لیتر فساد سیب رادر ۲۳ و ۱ درجه سانتی گراد بطور معنی داری کاهش می دهد در حالیکه کشتهای فیلتر شده از آنتاگونیستها نمی توانند محافظت بر علیه پاتوژنها را فراهم کنند. همچنین در مطالعه دیگر اثر غلظتهای مختلف پاتوژنها و مخمرها روی فعالیت بیوکنترل و کلونیزاسیون مخمر ها در زخمهای ایجاد شده بر روی سیب سنجشو مشخص شد که غلظت پاتوژنها و آنتاگونیستها تأثیر زیادی روی اثرپذیری بیوکنترل دارد و *Metchnikowia pulcherrima* در زخمهای ایجاد شده بطور خیلی سریع کلونی تشکیل می دهد و جمعیت آن در طی ۲٤ ساعت چند برابر شده و می تواند بمدت طولانی در دمای پائین زنده بماند..

واژه های کلیدی: *Metchnikowia pulcherrima*، *Penicillium expansum*، *Botrytis cinerea*، کنترل بیولوژیکی، بیماریهای بعد از برداشت

مقدمه

بیماریهای پس از برداشت، فاکتور اصلی محدود کننده در میوه ها و سبزیها برای نگهداری طولانی مدت در انبار می باشند، و فساد میوه ها بعلت آفتها و بیماریها در طول ذخیره سازی وانتقال برای فروش بالای ۲۵ درصد از کل تولید را در کشور های صنعتی شامل می شود و در کشور های در حال توسعه بعلت فقدان امکانات ذخیره سازی مناسب به ۵۰ درصد می رسد(۱۹).

Penicillium expansum عامل کپک آبی و *Botrytis cinerea* عامل کپک خاکستری مهمترین عوامل فساد و آسیبهای پس از برداشت میوه های سیب انبار شده است.

معمولترین راه آلودگی از طریق صدمات مکانیکی تازه نظیر ایجاد زخم، صدمه حشرات، آسیبهای مکانیکی در حین برداشت، بافتهای نکروتیک با منشاء متفاوت یا از طریق ساقه طبیعی یا کانال کاسه گل (Calyx) می باشد (۱ و ۲۸).

قارچکشهای شیمیایی ابزار ابتدائی برای کنترل بیماریهای پس از برداشت محسوب می شوند با این وجود بدلیل افزایش نگرانیهای عمومی برای سلامتی انسان و آلودگیهای محیطی استفاده آفت کشها و تکامل عوامل بیماریزای مقاوم به بسیاری از قارچکشهای کلیدی استفاده از قارچکشهای شیمیایی را کاهش داده است. بنابراین روشهای جایگزین

Archive of SID
www.SID.ir

برای کنترل بیماریهای پس از برداشت ضرورتاً مورد نیاز می باشد. در طول چند سال گذشته کنترل بیولوژیکی بعنوان یک استراتژی مؤثر برای پیکار با آسیبهای پس از برداشت در میوه‌ها مورد تأئید قرار گرفته است(۲، ۱۳ و۱٦).

مخمرها بعلت خصوصیت منحصر بفرد و سرعت تقسیم سلولی، تشکیل کلونی در روی کارپوسفر برای یک دوره طولانی، حساسیت پائین به قارچ کشها، خطرات کم بیماریزایی آنها در مقایسه با باکتریها و بهینه شدن شرایط بیوکنترل در سیستمهای پس از برداشت بعنوان بهترین گزینه برای انجام فرایند بیوکنترل در این زمینه انتخاب شدند و چند سالی است که در این زمینه تحقیقاتی صورت گرفته است (۲۳ و ۲٤).

اولین برنامه جستجو برای جدا سازی و تشخیص باکتریها و مخمرهای دارای پتانسیل بیوکنترل مؤثر علیه بیماریهای قارچی پس از برداشت در سال ۱۹۸٦ شروع و استفاده از میکروارگانیسمها و بویژه مخمرهایی که بطور طبیعی روی سطح میوه ها زندگی می کنند توسط محققان برای کنترل بیماریهای پس از برداشت ترجیح داده شد (۲ ، ۱۵، ۲۱، ۲۲).

چندین برنامه جهانی اخیراً برای تکامل کنترل بیولوژیکی بیماریهای پس از برداشت (Biological Control Post-harvest Diseases) شامل راهکارهای جدید و روشهایی متناسب سیستمهای پس از برداشت در حال انجام است و پروتکلهای عمومی برای کشف اثر، ارزیابی و بررسی آنها در مقیاس آزمایشگاهی، و ملزومات پیشرفت سریع بیوکنترل در حال توسعه است و در اروپا نیز برای افزایش استراتژیهای جایگزین جدید جهت کنترل بیماریهای پس از برداشت شدیداً اتفاق نظر وجود دارد(۱۹).

اولین محصول تجاری که در ایالت متحده و بوسیله اداره حفاظت محیط زیست (EPA) برای کنترل بیماریهای پس از برداشت تجویز شده است محصول باکتریایی ازسودوموناس سیرینگا (*Pseudomonas syringae*) تحت نام Bio-save ۱۰۰ و Bio-save ۱۱۰ ومحصول مخمری از کاندیدا اولئوفیلا (*Candida oleophila*) تحت نام Aspire می باشد که بصورت تجارتی فروش می رود. علاوه بر این در سایر کشورها نظیر افریقای جنوبی محصول مخمری کریپتوکوکوس آلبیدوس (*Cryptococcus albidus*) برای کنترل بیماریهای میوه تحت نام yieldplus تجویز می شود (٦ و ۱۹).

با اینحال بر خلاف موفقیتهای بدست آمده نتایج حاصله ازاستفاده از آنتاگونیستهای میکروبی تحت شرایط تجارتی و در مقیاسهای بزرگ، ناکافی و غیر دائمی است. بنابر این برای ماکزیمم کردن عمل عوامل بیوکنترل، تشخیص عوامل بیولوژیکی مؤثر با ویژگیهای مناسب شرایط محیطی، ضروری است وجود تعداد زیادی از عوامل بیوکنترل مؤثر با زیستگاههای اکولوژیکی مختلف با مکانیسم عمل متفاوت می تواند استفاده از دو یا چند میکروارگانیسم را در یک استراتژی ترکیب یافته پیشنهاد کند.

مواد و روشها

نمونه برداری و جدا سازی مخمرها: عوامل بیوکنترلی مورد استفاده در این مطالعه سویه های مخمری است که از سطح میوه های سیب ، گلابی و گِیلاس سالم جمع آوری شده از باغستانهای تولیدی اصفهان جداسازی شده است. بمنظور جداسازی مخمرها، تکه های (۱۳ میلی متر قطر و ۲ میلی متر ضخامت) از قسمتهای پوست سیب در لوله های پلاستیکی استریل محتوی ۵ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه استریل غوطه ور و با مخلوط کن همگن گردید سپس مخلوط حاصله بطور سریالی رقیق و در ۲۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۲٤ ساعت درانکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر از هر یک از رقتها روی پلیتهای PDA محتوی ۲۵۰ میلی گرم در لیتر کلرامفنیکل برای ٤-۳ روز گسترش داده شد (۵، ۲۹ و ۳۳). ایزوله های مخمری از کشت خالص بر

Archive of SID
www.SID.ir

اساس ویژگیهای فیزیولوژیک، مرفولوژیک وبیوشیمیایی (تخمیر هیدارتهای کربن، جذب ترکیبات کربنی، جذب ترکیبات نیتروژنی، رشد در ۵۰ درصد گلوکز وفعالیت اوره آز) با روش Kurtzman and Fell(1998) شناسایی شدند(۲۱).

تهیه عوامل بیماریزا: برای اسپورزایی، عوامل بیماریزای مورد نظر روی مالت اکسترکت آگار (عصاره مالت ۳۰ گرم، پپتون میکولوژیک ۵ گرم و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب دیونیزه) برای ٤ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در تاریکی و٤ روز درفاصله ٤۰ سانتیمتری زیر لامپ uv با یک فتوپریود ۱۲ ساعته کشت داده شد.

۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل محتوی محلول توین ۸۰ (۰/۰۱ درصد) به کشتهای در حال اسپورزایی از عوامل بیماریزا مورد نظر اضافه شده و سپس کلنیها با استفاده از یک چاقوی استریل شده با شعله به نرمی تراشیده شد . سوسپانسیون اسپوری جمع آوری شده به یک لوله سانتریفوژ منتقل و در٦۰۰۰ دور در دقیقه(g ۲۵۰۰) برای ۵ دقیقه و در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید ،سپس رسوب اسپورها در ۵ میلی لیتر آب دیونیزه استریل سوسپانسه شد . روش شستشو ۳ بار تکرار و غلظت اسپورها با استفاده از یک هموسیتومتر برای غلظتهای مورد نظر تنظیم گردید (١٤ و ۳۱).

تهیه آنتاگونیستها: ایزوله های مخمری روی ظرفهای کشت حاوی NYDA (نوترینت برات: ۸ گرم، عصاره مخمر: ۵ گرم، دکستروز: ۱۰ گرم وآگار: ۲۰گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) کشت و برای ٤۸ ساعت درتاریکی ودر دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد . یک لوپ کامل از کشت به یک فلاسک ارلن مایر۲۵۰ میلی لیتری محتوی ۱۰۰ میلی لیتر از NYDB منتقل سپس فلاسکها بمدت ٤۸ ساعت د ر تاریکی و ۲۵ درجه سانتی گراد در روی یک شیکر چرخشی با۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه گردید . کشتها در فاز سکون توسط سانتریفوژ با٦۰۰۰ دور در دقیقه (g ۲۵۰۰) بمدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی گراد رسوب و جمع آوری شدند. سلولها در آب دیونیزه استریل دوباره سوسپانسیون شده و سپس رسوب جمع آوری گردید. این عمل ۳ بار تکرار شد و بعد از آن غلظت سلولها توسط یک هموسیتومتر در حد مورد نیاز شمارش و تنظیم گردید. اندازه گیری واحد تشکیل کلنی (Colony Forming Unit) (cfu) هم انجام شد (۵، ۱۱، ۱۷ و ۱۸).

بررسی اثر آنتاگونیستی مخمر ها در محیط ساختگی (*In vitro*): نسبت رشد عوامل در محیطهای ساختگی نظیر PDA ، NYDA ، YPD(عصاره مخمر، ۱۰ گرم، دکستروز: ۲۰ گرم ، پپتون: ۲۰گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) با ۲۰ گرم در لیتر آگار –آگار و Apple –آگار(۸۰ درصد عصاره سیب و۲۰ گرم در لیتر آگار–آگار، pH= ۵/۵) بررسی گردید . بدین صورت که یک قطره از سوسپانسیون سلولهای مخمری را روی سوبسترا در پتری دیشهای با قطر ۹۰ میلیمتر و به فاصله۲۰ میلیمتر از حاشیه بصورت نوار کشت (Strip) شد یک دیسک میسلیومی ٦ میلیمتری از عامل بیماری به فاصله ۳۲ میلی متر از حاشیه و ۳۲ میلیمتر از کشت نواری آنتاگونیست روی محیط گذاشته شده است. پتری دیشها در ۲۳ درجه سانتی گراد و در تاریکی انکوبه شد سپس رشد شعاعی میسلیومها اندازه گیری شد.

سنجش بیوکنترلی مخمرها علیه *B. cinerea* و *P. expansum* در روی میوه های سیب: زخمهای یک شکل با ٤ میلیمتر عمق و ۳ میلی لیتر در نواحی استوائی (Equator) میوه با استفاده از یک چاقوی استریل ایجاد شده و سپس ۳۰ میکرو لیتر از مخلوط غنی سلولهای شسته نشده با غلظت cfu/ml $۱۰^{۸}\times$ ۱ ، سوسپانسیون سلولی شسته شده در غلظت cfu/ml $۱۰^{۸}\times$ ۱ ،کشتهای مخمری فیلتر شده با غشاء ۰/۲ میکرومتر، کشتهای مخمری اتوکلاو شده در ۱۲۰ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ دقیقه، از نمونه های محتوی سلولهای مخمری در غلظت cfu/ml $۱۰^{۸}\times$ ۱ و آب مقطر استریل (کنترل) به هر جایگاه زخم با پیپت

Archive of SID

www.SID.ir

ریخته و بعد از ٤ ساعت ۱۵ میکرو لیترازسوسپانسیون اسپوری *B. cinerea* با غلظت $۱۰^{۵}$ × ۱ اسپور و *P.expansum* باغلظت $۱۰^{٤}$ × ۵ اسپوردر هر میلی لیتر به هر زخم تلقیح شد میوه ها پس از خشک شدن در هوا، به وقوع بیماری (Disease Incidence) و یا میزان عفونت (Infection Rate) و شدت بیماری (Severity) یا قطر زخم (Lesion Diameter) پس از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و ۳۰ روز انکوباسیون در دمای ۱درجه سانتی گراد ،مشاهده و اندازه گیری شد (۱۱ و ۳٤).

اثرات آنتاگونیستی غلظتهای مختلف مخمر بر *B. cinerea*و *P.expansum* سطح میوه های سیب: سلولهای مخمری با تلقیح در فلاسکهای ارلن مایر۲۵۰ میلی لیتری محتوی۵۰ میلی لیتر محیطNYDA و قرار دادن آنها در شیکر چرخشی با ۲۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده و سپس سلولها بوسیله سانتریفوژ در ٦۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه جدا و دو مرتبه با بافر فسفات ۰/۰۵ مولار در pH۷/۰ شستشو و در آب دوبار تقطیر بصورت سوسپانسیون در آمد. غلظت سلولها در سوسپانسیون با یک هموسیتومتر اندازه گیری و به مقدار د لخواه تنظیم شد. اسپور های *B. cinerea* و *P.expansum* از کشتهای ۲ هفته ای با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر محتوی ۰/۰۵ حجمی حجمی توین ۸۰ جمع آوری و تعداد اسپور ها با یک هموسیتومترمشخص شد. زخمهای یک شکل با عمق ٤ وطول ۳ میلی لیتر در نواحی استوائی میوه با استفاده از یک چاقوی استریل ایجاد گردید. سوسپانسیون سلولی مخمر های شسته شده در غلظتهای $۱۰^{۵}$ ، $۱۰^{٦}$ ، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی لیتر آماده و سوسپانسیونهای کنیدیایی از *B. cinerea* در غلظتهای $۱۰^{۳}$ ، $۱۰^{٤}$ ،$۱۰^{۵}$ و $۱۰^{٦}$اسپوردر هر میلی لیتر و *P.expansum* در غلظتهای $۱۰^{۳}$ ×۵ ، $۱۰^{٤}$ ×۵ ، $۱۰^{۵}$ ×۵ و$۱۰^{٦}$ ×۵ اسپور در هر میلی لیتر تهیه و سپس مقادیر۳۰ میکرو لیتر ازتیمار های مختلف مخمری به هر جایگاه زخم تلقیح شد. بعد از ٤ ساعت ۱۵ میکرولیترسوسپانسیون اسپوری *B. cinerea* و*P.expansum* درغلظتهای مختلف به هر زخم تلقیح شد بعد از خشک شدن میوه ها در هوا، آنها در جعبه های پلاستیکی به اندازه ٤۰ ×۳۰ ×۱۰ سانتیمتر پوشیده شده با روکش بمنظور ایجاد رطوبت بالا قرار داده شد. میوه ها در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد نگهداری و شدت بیماری یا قطر زخم ۷ روز پس از تلقیح در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد مشاهده و اندازه گیری گردید (۱۰ و ۳۰). در دو آزمایش اخیر ۳ تکرار برای هر تیمار وجود داشت که در هرآزمایش میوه ها ی هر تیمار بطور تصادفی از هر سینی انتخاب و آزمایش ۳ بارتکرار شد.

دینامیک جمعیتی مخمر در زخمهای سیب در حضور یا عدم حضور عوامل بیماریزا: سه زخم در هر میوه در فواصل مساوی اطراف ساقه میوه سیب ایجاد و سپس ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت $۱۰^{۸}$ cfu/ml × ۱ از مخمرها برای هر زخم بکار برده شد. همچنین برای تحقیق دینامیک جمعیتی در حضور عوامل بیماریزا دو عدد از زخمهای تیمار شده با سوسپانسیون سلولی مخمر ،با سوسپانسیون اسپوری *B. cinerea* و *P.expansum* در غلظتهای$۱۰^{۵}$ × ۱ و $۱۰^{٤}$ × ۵ اسپور در هر میلی لیتر تلقیح شد. میوه ها دردمای ۲۳ و ۱درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند.

اندازه گیری جمعیت ازنمونه های موجود در دمای ۲۳ روز درجه سانتی گراد یکساعت بعد از تلقیح (زمان صفر) و بمدت ۷ روز ادامه یافت. برای میوه های انبار شده در دمای ۱ درجه سانتی گراد، نمونه برداری بعد از ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و۹۰ روز انجام شد .نمونه گیری با برداشت بافتهای زخم بوسیله یک سوراخ کن چوب پنبه، انجام شد. استوانه های منتج (۱ سانتیمتر قطر و ۱ سانتیمتر عمق) با ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار در۷/۰ pH

Archive of SID
www.SID.ir

در هاون آسیاب شد. سریهای ۱۰ بار رقیق شده از هر یک از رقتها در بافر فسفات ساخته شد و۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به محیط کشت انتقال یافت. پلیتها در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد برای ٤٨ ساعت انکوبه شده و شمارش کلنی بصورت تعداد تغییر یافته $\log_{10}$ سلولها در هر زخم بیان شد (۸، ۹، ۲۰، ۲۵ و ۲۷). ۳ تکرار برای هر تیمار و هر آزمایش ۲ مرتبه انجام شده است.

نتایج

بررسی اثر آنتاگونیستی مخمرها در محیط ساختگی: برای بررسی اثر آنتاگونیستی مخمرها علیه *B. cinerea* و *P.expansum* در محیط ساختگی، مخمرها و عوامل بیماریزا همزمان در محیطهای ساختگی کشت داده شد (جدول ۱).

جدول۱: تأثیر مخمر های *M. pulcherrima* علیه *B. cinerea* و *P.expansum* در کشت هم زما ن در محیط شیشه. الف) *B. cinerea* و ب) *P.expansum*

محیط کشت مورد استفاده	زمان پس از کشت همزمان (روز)	میانگین مهار (میلیمتر)
الف)		
عصاره سیب زمینی دکستروز آگار(PDA)	۵	۰/۰
عصاره مخمر پپتون دکسترز آگار(YPDA)	۵	۵/۷
نوترینت یست دکستروز آگار (NYDA)	۵	۱۰/۱
عصاره سیب- آگار(Apple-Agar)	۵	۰/۰
ب)		
عصاره سیب زمینی دکستروز آگار(PDA)	۲۰	۲/۹
عصاره مخمر پپتون دکسترز آگار(YPDA)	۲۸	عدم مشاهده رشد روی پلیتها
نوترینت یست دکستروز آگار (NYDA)	۲۸	عدم مشاهده رشد روی پلیتها
عصاره سیب- آگار(Apple-Agar)	۱۰	۱۰/۹

همانطورکه مشاهده می شود بعد از ۵ روز میانگین قطر هاله عدم رشد *B. cinerea* به حدود ۵/۷ میلیمتر در محیط YPD و ۱۰/۱ در محیط NYDA توسط مخمر *M. pulcherrima* می رسد. که در مورد *P.expansum* بعد از ۲۸ روز در محیط YPD وNYDA فاقد رشد است و در محیطPDA قطر هاله عدم رشد ۲/۹ میلیمتر می باشد .در محیط عصاره سیب-آگار *B. cinerea* مهار نشده ولی بعد از ده روز قطر هاله عدم رشد توسط مخمر *M. pulcherrima* ۱۰/۹ میلیمتر بوده است

سنجش بیوکنترلی مخمرها علیه *B. cinerea* و *P. expansum* در سطح میوه های سیب: سلولهای شسته شده مخمر *M. pulcherrima* تنها توانستند میزان *B. cinerea* را در دمای ۱ درجه سانتی گراد به صفر کاهش دهند ولی در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد نتوانستند بیماری را بطور کامل مهار کنند بطوریکه وقوع بیماری ۲۷/۵ درصد برای کپک خاکستری و ٢٤ درصد را برای *P. expansum* بود. سلولهای شسته نشده فعالیت بیوکنترلی کمتری نسبت به سلولهای شسته شده نشان دادند بطوریکه در هر دو دمای ۲۳ و ۱ درجه سانتی گراد بیماری با شدت

Archive of SID
www.SID.ir

کمتری بروز کرد. سلولهای اتوکلاو شده و کشتهای فیلتر شده هم هیچ تأثیری روی فعالیت بیوکنترلی نداشتند بطوریکه از نظر شیوع بیماری با تیمار کنترل برابر و حتی بیشتر از آن بودند که در جداول ۲ و۳ نشان داده شده است.

جدول۲: تأثیر مخمر *M. pulcherrima* روی *B. cinerea* و *P.expansum* در زخمهای سیب بعد از ۳۰ روز نگهداری در ۱ درجه سانتی گراد

تیمار	قطر پوسیدگی(میلیمتر)		نسبت عفونت(در صد)	
	B. cinerea	***P.expansum***	***B. cinerea***	***P.expansum***
سلولهای شسته نشده	۱/٦۲	۱/۳	۱۰/٤۸	۸/۲
کشتهای صاف شده	٦/۷۳	۳/۱	٤۰/۰	۳۸/۸
سلولهای شسته شده	۰/۳٤	۰/۰	۱/۰	۰/۰
سلولهای اتوکلاوشده	۷/۳٤	۳/۱	٤۹/٦	٤۱/۳
کنترل(آب مقطر)	٦/۵	۳/۲	۳۳/۷	۱٤/۵

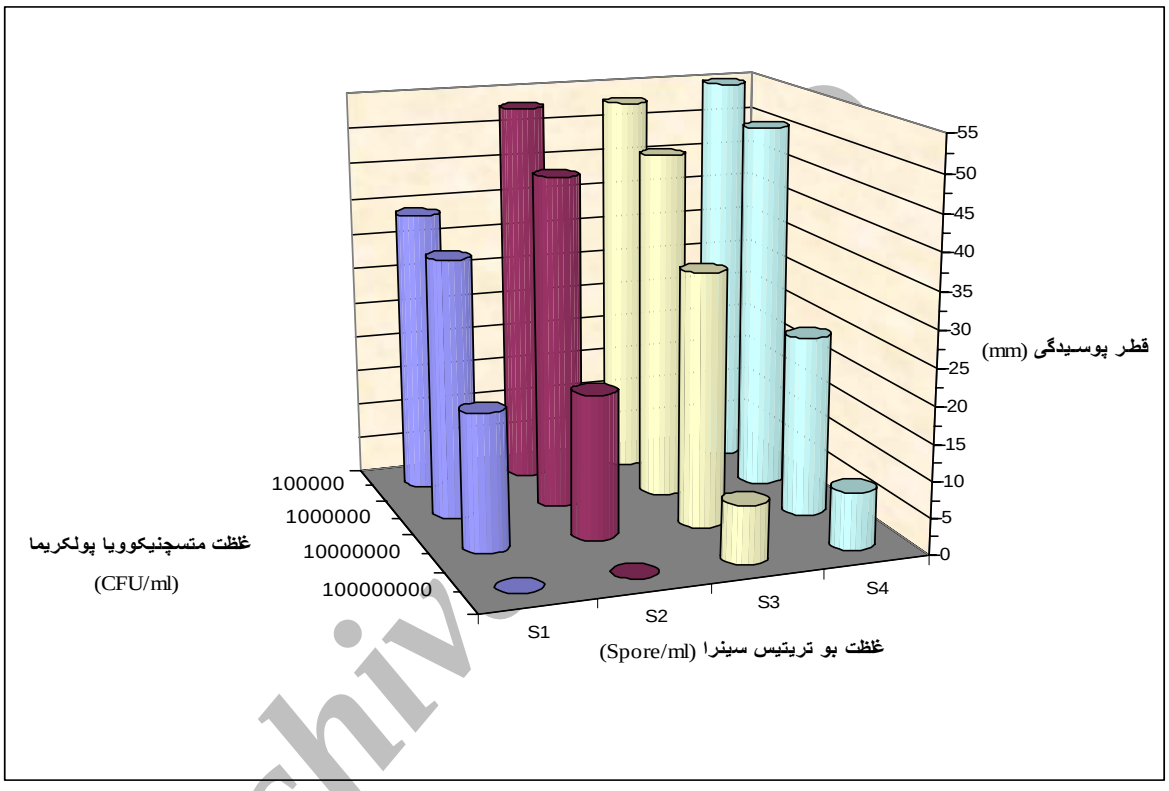
جدول۳: تأثیر مخمر *M. pulcherrima* روی *B. cinerea* و *P.expansum* در زخمهای سیب بعد از ۷ روز نگهداری در۲۳ درجه سانتیگراد

تیمار	قطر پوسیدگی(میلیمتر)		نسبت عفونت(در صد)	
	B. cinerea	***P.expansum***	***B. cinerea***	***P.expansum***
سلولهای شسته نشده	۱۳/۲	۱۱/۵	۳۷/۰	٦۲/۰
کشتهای صاف شده	٤۱/۸	۲۰/۲	۹۷/۰	۹۸/۰
سلولهای شسته شده	۹/۵	۷/۰	۲۷/۵	۲٤/۰
سلولهای اتوکلاوشده	٤۲/۰	۲۱/٤	۱۰۰	۱۰۰
کنترل(آب مقطر)	۳۷/۰	۱۹/۹	۱۰۰	۱۰۰

تأثیر غلظتهای مختلف عوامل بیماریزا و آنتاگونیست بر تکامل زخم در میوه سیب: غلظت عوامل بیماریزا و آنتاگونیست بطور معنی‌داری در اثر بیوکنترل مؤثر است و غلظتهای مختلف مخمر *M. pulcherrima* نیز در فعالیت بیوکنترلی علیه غلظتهای مختلف عوامل بیماریزا مؤثر می باشد بطوریکه *M.*

Archive of SID
www.SID.ir

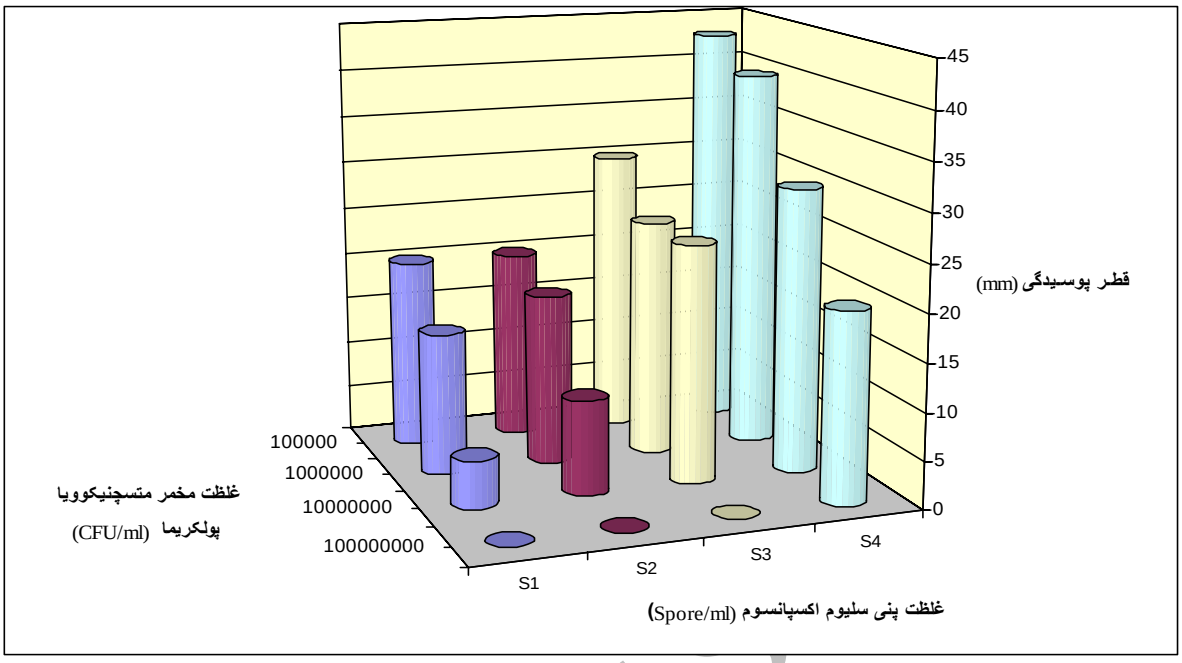
pulcherrima در cfu/ml 10^8 بیشترین فعالیت علیه *B. cinerea* را در مقایسه با غلظتهای پایین‌تر نشان می دهد گرچه در این نمی تواند بیماری حاصل از غلظتهای اسپوری بالاتر از 10^5 اسپور بیماریزا بطور کامل مهار کند. در غلظتهای cfu/ml 10^5 و cfu/ml 10^6 مخمرها تقریباً هیچگونه فعالیت بیوکنترلی نشان ندادند مخمر *M. pulcherrima* علیه *P. expansum* هم نتایجی مشابه البته با فعالیت بیوکنترلی بهتر نسبت به *B. cinerea* نشان داد بطوریکه توانست با غلظت cfu/ml 10^8 بیماری حاصل از غلظت $10^5 \times 5$ اسپور بیماریزا در میلی لیتر را مهار کند (نمودار ۱ و۲) .



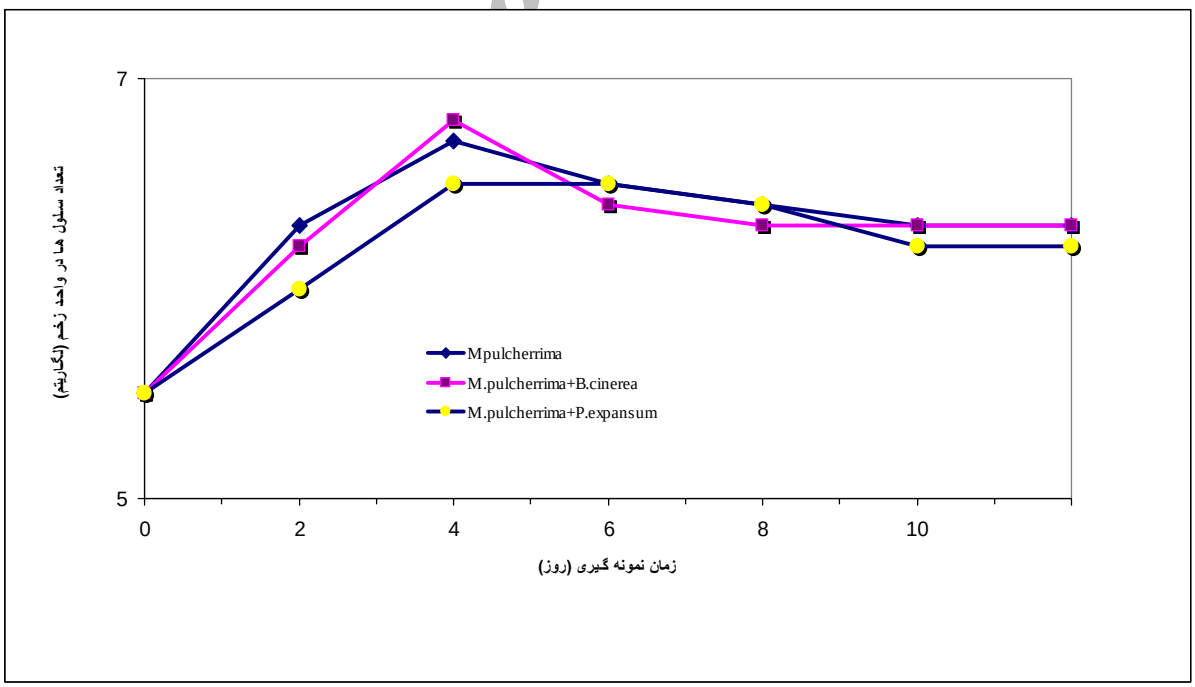
نمودار۱: تأثیر غلظتهای مختلف *M. pulcherrima* و *B. cinerea* بر روی تکامل زخم در میوه های سیب. S_1 ، S_2، S_3 و S_4 بترتیب 10^3 ، 10^4 ، 10^5 و 10^6 اسپور در هر میلی لیتر می باشند.

بررسی دینامیک جمعیتی مخمرها در زخمهای ایجاد شده در سیب بصورت تنها و یا در حضور عوامل بیماریزا: مخمر *M. pulcherrima* در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد در طول ۴۸-۲۴ ساعت اول بعد از تلقیح در زخمهای تازه حدود ۳۰-۲۵ برابر افزایش یافته و سپس در غلظت cfu/ml $10^5 \times 5$ برای یک دوره زمانی تقریباً بحالت ثابت در می آید ولی در ۱ درجه سانتی گراد افزایش جمعیت کمتر چشمگیر بوده و در طی یک دوره زمانی ۵ روزه ادامه پیدا می کند تا اینکه تراکم آن به سطحی مساوی با جمعیت زخمهای سیب ذخیره شده در ۲۳ درجه سانتی گراد برسد (نمودار۳ و ٤) .

Archive
www.SID.ir

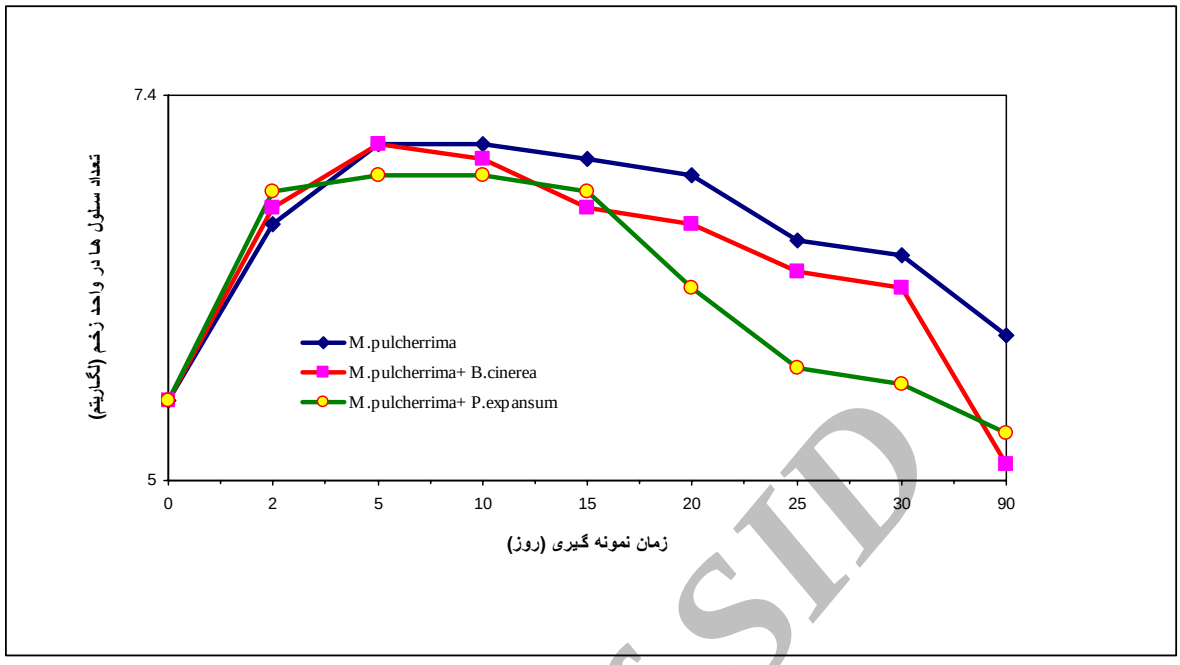


نمودار۲: تأثیر غلظتهای مختلف *M. pulcherrima* و *P.expansum* بر روی تکامل زخم در میوه های سیب. . S_1 ، S_2، S_3، S_4 بترتیب 10^3 ، 10^4 ، 10^5 و 10^6 اسپور در هر میلی لیتر می باشند



نمودار۳: بررسی دینامیک جمعیتی مخمر *M. pulcherrima* در زخمهای ایجاد شده در سیب بصورت تنها و یا در حضور *P.expansum* و *B. cinerea* در ۲۳ درجه سانتیگراد بر مبنای لگاریتم ۱۰.

www.SID.ir



نمودار٤: بررسی دینامیک جمعیتی مخمر *M. pulcherrima* در زخمهای ایجاد شده در سیب بصورت تنها و یا در حضور *P.expansum* و *B. cinerea* در ۱ درجه سانتی گراد بر مبنای لگاریتم ۱۰

بحث و نتیجه گیری

کشت همزمان مخمرها و عوامل بیماریزا پس از برداشت بر روی محیطهای ساختگی امکان مطالعه آنتاگونیسم را در شرایط ساختگی فراهم کرده است. نتایج حاصل نشان می دهد که دربعضی سوبستراها، آنتاگونیستها رشد میسلیومهای قارچی را مهار می کنند در نتیجه این فرضیه پیشنهاد می شود که احتمالاً مخمرها بایستی بعضی از متابولیتهای سمی را برای عوامل بیماریزا ترشح کنند از طرفی محیط غذایی باید بر فعالیت بیو کنترلی مؤثر باشد .عدم ناحیه مهار رشد اطراف مخمر ها در محیط NYDA نشان می دهد که هیچ ترکیب ضد قارچی علیه *B. cinerea* بوسیله مخمر در محیط تولید نشده است.

در محیط Apple-Agar یا سوبسترای عصاره سیب که تصویری از شرایط غذایی زخمهای سیب می باشد مخمر متسچنیکوویا پولکریما مهار رشد تقریبا خوبی را علیه *P. expansum* نشان داده است و می توان استنباط کرد که مخمرهای مورد نظربتوانند در زخمهای سیب هم فعالیت کنترلی مشابه داشته باشند.

سوسپانسیون سلولهای مخمری شسته شده بیشترین تأثیر را در فعالیت بیوکنترلی در مقایسه با تیمارهای دیگر از خود نشان می دهد با این حال *M. pulcherrima* نتوانست بیماری را بطور کامل مهارکند گرچه بطور معنا داری وقوع بیماری را کاهش می دهد سوسپانسیون سلولی شسته نشده از مخمرها در مهار بیماری اثر کمتری در مقایسه با سلولهای شسته شده دارد و کشتهای صاف شده و اتوکلاو شده تقریبا هیچ نوع مهاری را نشان نمی دهد با استفاده از نتایج فوق می توان چنین استنباط کرد که تولید متابولیت ثانویه و سمی و یا آنتی بیوتیک توسط مخمرها نقشی در فعالیت بیوکنترلی ندارند. این نظریه توسط Droby و Chalutz نیز مورد تأیید است(۱۰ و ۱۲).

Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به نتایجی که سلولهای اتوکلاو شده نشان می دهند نقش رقابت بر سر فضا کم رنگ می شود زیرا با وجود مقدار مشخصی از سلولهای غیر فعال و مرده باز هم بیماری بطور کامل توسعه پیدا می کند . با توجه به نتایج حاصل از سلولهای زنده شسته شده و شسته نشده بنظر می رسد که فعالیت سلولهای زنده ضروری است و رقابت بر سر غذا را می توان عامل اصلی فعالیت بیوکنترلی مخمرها عنوان کرد که توسط Qing Fanو Shiping Tian نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۱۰).

کنترل پوسیدگی در واقع حاصل مبارزه غلظتهای مختلف اسپور و مخمر می باشد .مخمر*M. pulcherrima* آسیبهای پس از برداشت ایجاد شده بوسیله *P.expansum* و *B. cinerea* را در سیب کاهش داده و در هر دو مورد بهترین کنترل پوسیدگی با غلظت 10^8 سلول در میلی لیترسوسپانسیون مخمر بدست می آید. قابل اطمینان بودن و هزینه، دو فاکتور اصلی شایستگی یک سیستم بیو کنترل است بنا براین غلظت آنتاگونیستها برای فعالیت بیوکنترلی کامل، از نظر هزینه باید در سطحی قابل قبول باشد از نقطه نظر عملی بالاترین غلظت مخمر که برای استفاده تجارتی بکار می رود$10^8 \times 1$ سلول در هر میلی لیتر است. این مقدار مخمر برای ((کاندیدا اولئوفیلا)) مورد نیاز است که در محصول تجارتی Aspire مورد استفاده قرار می گیرد(۷). نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که تعداد cfu/ml 1×10^8 سلول در هر میلی لیتر از سوسپانسیون مخمر می تواند در یک سطح کنترل مساوی با قارچ کشهای بیولوژیکی تجویز شده تجارتی کنترل بیماری را فراهم کند و از نظر اقتصادی نیز سودمند باشد علاوه بر آن تولید صنعتی مخمر را با کاهش حجم کل مورد نیاز جهت تولید تسهیل کند.

تشکیل سریع کلونی در زخم بوسیله یک میکرو ارگانیسم ضروری است تا یک آنتاگونیست بالقوه باشد. مطالعات قبلی نیز نشان داده اند که آنتاگونیستها قادر به تشکیل سریع کلونی در زخمها هستند با این وجود بیشتر تحقیقات در مورد مشاهده دینامیک جمعیت با کاربرد آنتاگونیست ، بصورت تنها متمرکز شده است ولی در این مطالعه دینامیک جمعیت مخمرها در حضور و عدم حضور عوامل بیماریزا مورد بررسی قرار گرفت (۲۶) .

در شرایط تجارتی برای کاهش آسیب (تأخیر پیری) و حفظ کیفیت میوه ها ، قارچهای بیماریزا را با حرارت پایین و اتمسفر کنترل شده مهار می کنند اما بسیاری از مطالعات نشان می دهد که *P.expansum* و *B. cinerea* می تواند در چنین شرایطی رشد کرده و حتی در میوه هایی که در ۲و ٤ درجه زیر صفر نگهداری می شوند سبب آسیب شوند. بنا براین توانایی آنتاگونیستها به رشد و درجه حرارت پایین و شرایط کنترل شده درکنترل بیماریهای پس از برداشت مؤثر خواهد بود(۳۱ و ۳۲). نتایج مطالعه نشان داد که جمعیت مخمر*M. pulcherrima* طی ۲ هفته به میزان ۱/۵ واحد لگاریتمی افزایش تعداد نشان می دهد وسپس در غلظتی کمی بالاتر از مقدار اولیه در طی ۹۰ روز باقی مانده و توانستند در این مدت زنده بمانند.

منحنی رشد مخمر در۲۳ درجه سانتی گراد در زخمهای سیب نشان می دهد که سلولهای مخمر بسرعت تکثیر می یابند و سپس در یک الگوی شبیه به کاهش جمعیتهای میکروبی در اثر محدود شدن غذا شروع به کاهش می کنند. توانایی مخمرها به ازدیاد سریع در زخمها و شاید از پیش خالی کردن مواد غذایی زخمهای سیب با مصرف مواد غذایی موجود در زخم، فرآیند بیوکنترل را با رقابت بر سر غذا تسهیل می کند و ثابت می کند زمانیکه مخمرها در جایگاه زخم حاضر باشند و فعالیت کنند بیوکنترل مؤثر بدست خواهد آمد.

دانش و عمل کنترل بیولوژیکی پس از برداشت هنوز در مقایسه با تیمارهای قارچکش شیمیایی یا بیوکنترل در محل، جوان است. اما پیشرفتهای بدست آمده طی چند سال گذشته تلاش قابل توجهی بوده است و اگر ادامه پیدا

Archive of SID
www.SID.ir

کند استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک در آینده بطور وسیعی بسط پیدا خواهد نمود.

منابع

1- Brown, G. E. 1994. Blue mold. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida . Available: http://edis.ifas.ufl.edu/BODY-CH10.

2- Butt, T. M. Jackson, C. W. and Magan. N. 2001. Fungal as biocontrol agents, Progress, Problems and Potential. CABI Publishing 274-279.

3- Capdeville, G., Wilson, G. L., Beer, S.V. and Aist, J. R. 2002. Alternative disease control agent induce resistant to blue mold in harvested "Red Delicious" apple fruit. Phytopathology92, 900-908.

4- Castoria, R., De-Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S. and De-Cicco, V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits, study on its modes of action. Postharvest Biol. Technol. 22,7–17.

5- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E. and Porat, R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila* . Phytopathology 92, 4, 393-399.

6- Droby, S., Wisniewski, M., El-Ghaouth, A and Wilson, C. 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. Postharvest Biology and Technology 27, 2, 127-135.

7- Droby. S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev. B.,and et al. 1998. Commercial testing of Aspire, a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. Biol. Control 12,97–101.

8- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M. 1998 Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology 88, 4, 282-291.

9- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M. 2002. Control of postharvest decay of apple fruit with *candida saitoana* and induction of defense responses. Phytopathology 93, 344-348.

10- Fan, Q. and Tian, S .2001 . Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (satio) skinner . Postharvest Biolgy and Technology 21, 341-350.

11- Fan, Q., Tian, S., Jiang, A., Xu, Y. 2001 Isolation and screening of biocontrol antagonists of diseases of postharvest fruits. China Environmental Science 21, 4, 313-316.

12- Filonow, A. B. 1998. Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. Biocontrol Sci. Technol. 8,243–56.

13- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. Trends in Biotechnology 20, 338-343.

14- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., Dinoor, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. Phytopathology 92, 9, 976-985.

15- He, D., Zheng, X. D., Yin, Y. M., Sun, P. and Zheng , H. Y. 2003. Yeast application for controlling apple postharvest disease associated with *Penicillium expansum*. Bot.Bull.Aca.sin.44,211-216.

16- Ippolito, A., El-Ghaouth, A., Wilson, C. L. and Wisniewski, M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. Postharvest Biol. Technol. 19,265–72.

17- Janisiewicz, W. J., Tworkoski, T. J., Kurtzman, C. P. 2001 Biocontrol potential of *Metchnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. Phytopathology 91, 11, 1098-1108.

18- Janisiewicz, W. J., Usall, J., Bors, B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. Phytopathology 82,1364–70.

19- Janisiewicz, W.J. and Korestent, L 2002.Biological control of postharvest disease of fruits. Annu. Rev. Phytophatol. 40, 411-441

20- Janisiewicz, W.J., Tworkoski, T. J., Sharer, C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. Phytopathology 90,1196–200.

21- Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 1998.The Yeasts. A taxonomic study (4^{TH} edition), Elsevier. Amesterdam.

22- Leibinger,W., Breuker, B., Hahn, M. and Mendgen K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology 87,1103–10.

Archive of SID
www.SID.ir

23- Lima, G., De-Curtis, F., Castoria, R. and Dem-Cicco, V. 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. Biocontrol Sci. Technol. 8, 257–67.

24- Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F. and Salerno, M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. Postharvest Biol. Technol. 10,169–78.

25- McLaughlin, R. J., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L., Chalutz, E. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. Phytopathology 80,456–61.

26- Mercier, J., Wilson, C. L. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biol. Control 4,138–44.

27- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q. and Gullino, M. L. 1997. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. Postharvest Biology and Technology, 11, 3, 131-140.

28- Report on Plant Disease.2000. Gray mold rot or Botrytis blight of vegatable. College of Agricultural, Consumer and Environmental Science. Available: http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf-pub/942.pdf.

29- Roberts, R. G. 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. Phytopathology 80,526–30.

30- Spadro, D., Vola, R., Piano, S. and Lodovica, G. M. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. postharvest Biology and Technology 24, 123-134.

31- Tian, S., Fan Q., Xu Y. and Liu, H. 2002. Biocontrol efficacy of antagonist yeasts to gray mold and blue mold on apples and pears in controlled atmospheres. Plant Disease 86, 8, 848-853.

32- Usall, J., Teixid´o, N., Fons, E. and Vi˜nas, I. 2000. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. Int. J. Food Microbiol. 58,83–92.

33- Usall, J., Teixido, N., Torres, R., De Eribe , X. O. and Vinas, I. 2001. Pilot tests of *candida sake* (CPA-1) application to control postharvest blue mold on apple fruit, Postharvest Biology and Technology 21, 141-156.

34- Vero, S., Mondino, P., Burgueno, J., soubes, M. and wisniewski, M. 2002. Characterzation of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. postharvest Biogly and Technology 26, 91-98.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of Biological control of post harvest diseases on apple by yeast *Metschenikowia pulcherrima*

Seify R., Nahvi I. and Balali G. R.

Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan

Abstract

Synthetic fungicides are primary means to control post harvest disease of fruits. The application of fungicides to fruits after harvest to reduce decay has been increasingly curtailed by the development of pathogen resistance to many fungicides and the lack of replacement fungicides. In addition, negative public perception regarding the safety of pesticides and consequent restrictions on fungicide use motivated the search for alternative approach. Biological control of post harvest diseases has emerged as one of the most promising alternative to chemicals. The yeast, *M. pulcherrima* was evaluated for biological control capability in apple against the post harvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. In this study, the effect of different treatments of yeast *M. pulcherrima* was evaluated in challenge with 5×10^4 or 1×10^5 spores/ml of *B.cinerea* and *P expansum* and effect of pathogen and yeast concentration on yeast biocontrol activity in artificial wounds. However, the growth of *B. cinerea* and *P.expansum* on the apple artificial wounds inhibited by washed cell suspensions (1×10^8 Cell per ml) of antagonism after storage in 1°C and 23°C, But there was no such Inhibition using the same concentration of washed cell suspension of antagonism. The concentrations of antagonist and pathogen spores had significant effects on biological control effectiveness. Culture filtrate of the yeast failed to provide protection against the two pathogens. Population dynamics *M. pulcherrima* in the artificial wounds was recorded in different time after inoculation at both 1°C and 23°C. *M. pulcherrima* multiplied rapidly in apple wounds in the present and absence of *B. cinerea* and *P.expansum.*

Key words: *Metchnikowia pulcherrima* ،*Penicillium expansum Botrytis cinerea*، Biological control.

Archive of SID

www.SID.ir