کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورۀ ۵، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵ (۱۱۰-۹۷)
DOI: 10.22059/jbioc.2016.58932

ارزیابی توانایی کنترل بیولوژیک مخمر *Pichia membranaefaciens* در برابر بیمارگرهای پوسیدگی خوشۀ انگور *Aspergillus tubingensis* و *Penicillium crustosum*

۱. سعیده رنجبر چهاربرج؛ ۲. اکبر شیرزاد*؛ ۳. مهدی ارزنلو
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه تبریز
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۱/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۱۷)

چکیده

بیماری پوسیدگی خوشه یکی از بیماری‌های مهم انگور است که توسط شماری از قارچ‌های عامل پوسیدگی انباری از جمله *Aspergillus tubingensis* و *Penicillium crustosum* ایجاد می‌شود. در این تحقیق برخی از سازوکارهای کنترل بیولوژیک دو جدایه از مخمر *Pichia membranaefaciens* شامل توانایی رقابتی، توانایی تولید سیدروفور و زهرابه (توکسین)، برهمکنش بین یاخته‌های مخمری با میسلیوم قارچی و توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده در برابر بیمارگرهای قارچی بررسی شد. در شرایط آزمایشگاهی جدایه‌های مخمر توانایی رقابتی بالایی علیه بیمارگرها در محیط کشت PDA اصلاحی با میزان پایین قند دکستروز نشان دادند. این جدایه‌ها افزون بر بازدارندگی از رشد بیمارگرها در آزمون کشت متقابل با دو میزان متفاوت قند دکستروز، توانایی تولید سیدروفور و زهرابه را هم نشان دادند. نتایج مربوط به بررسی برهمکنش‌های بین بیمارگرهای قارچی و مخمرهای آنتاگونیست، نشان داد که یاخته‌های مخمر در اتصال به میسلیوم‌های بیمارگرها توانایی بالایی دارند. در ادامۀ این بررسی برهمکنش، توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده توسط جدایه‌ها نیز مشاهده شد. در شرایط انباری میزان آلودگی خوشه‌ها به بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* توسط جدایۀ P4 به‌ترتیب ٤٩/١٦ درصد و ٦٢/٦٤ درصد و توسط P5 به‌ترتیب ٤٤/٨٨ درصد و ٥٠/٣ درصد کاهش داده شدند. بنابر نتایج این تحقیق هر دو جدایه در شرایط آزمایشگاهی و انباری قابلیت کنترل بیولوژیک رشد بیمارگرها را دارند.

کلیدواژگان: آنزیم‌های تجزیه‌کننده، سیدروفور، زهرابه.

مقدمه

انگور یکی از محصولات مهم باغبانی است که سالیانه میزان زیادی از این محصول برای عرضه در خارج از فصل و یا صادرات آن در سردخانه‌ها نگهداری می‌شود، اما در بسیاری از مواقع به دلیل رعایت نکردن اصول انبارداری، کمیت و کیفیت میوه‌ها بر اثر آلوده شدن به عامل‌های ساپروفیتی و پوسیدگی انباری به مخاطره می‌افتد و منجر به کاهش شدید ارزش بازارپسندی آن‌ها می‌شود (Coates and Johnson 1989).

بیشتر بیمارگرهای عامل پوسیدگی از راه زخم‌هایی

* تلفن: ۰۴۱۳۴۳۲۷۵۰۰، ۰۹۱۴۳۱۷۱۲۹۱
E-mail: ashirzad@azaruniv.edu

که ممکن است در طول برداشت، حمل‌ونقل و بسته بندی به وجود آید، به میزبان نفوذ می‌کنند. به دلیل وجود مقادیر بالای مواد غذایی ذخیره‌شده و قابل‌دسترس بیمارگرها، pH پایین میوه‌ها، میزان بالای رطوبت در محل انبار شده، دمای مناسب برای رشد بیمارگرها و کاهش مقاومت ذاتی میوه پس از جدا شدن از منبع گیاهی، بیشترین آمار پوسیدگی‌های انباری متعلق به گونه‌های بیماریزای قارچی است که مهم‌ترین آن‌ها شامل گونه‌های جنس *Monilinia*، *Penicillium*، *Geotrichum*، *Fusarium*، *Gleosporium*، *Rhizpopus*، *Botrytis*، *Alternaria* و *Aspergillus* است. این عامل‌های بیماریزای انباری تاکنون بیشترین گزارش را به خود اختصاص داده‌اند (Barkai-Golan 2001). افزون بر این، بسیاری از آن‌ها منبعی از میکوتوکسین‌ها بوده که اثرهای سوء در سلامتی انسان و حیوانات دارند. از جمله مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی‌قارچی که زهرابه (توکسین) تولید می‌کنند می‌توان گونه‌های جنس *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium* را نام برد. گزارش شده است که برخی از گونه‌های جنس *Aspergillus* مانند *A. niger*، *A. tubingensis* و *A. ochraceus* تولید معروف‌ترین زهرابه‌های سرطان‌زا به نام آفلاتوکسین و اکراتوکسین کرده که باعث سرطان کبد در انسان می‌شوند (Kozakiewicz 1989, Davide *et al*. 2012) و برخی از گونه‌های جنس *Penicillium* مانند *P. crustosum* و *P. expansum* به ترتیب تولید میکوتوکسین‌هایی به نام‌های پنیترم[1] و پاتولین می‌کنند (Stockenstrom *et al*. 2007, Eriksen *et al*. 2010). با توجه به اهمیت اقتصادی انگور و فرآورده‌های آن از نظر صادرات برای کشور و منطقه از یکسو و مستعد بودن آن به آلودگی‌های قارچی و بحث آلودگی به زهرابه‌های قارچی در محصولات صادراتی از سوی دیگر، این تحقیق با هدف بررسی توانایی کنترل بیولوژیک مخمرهای آنتاگونیست در برابر بیمارگرهای قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum* از عامل‌های پوسیدگی خوشهٔ انگور در شرایط آزمایشگاهی و انباری است. برای کنترل پوسیدگی خوشهٔ انگور در شرایط انباری اقدام‌هایی مانند جلوگیری از آسیب دیدن فیزیکی و شیمیایی محصولات به‌ویژه در مراحل آخر رشد خوشه، انبار کردن سریع میوه‌ها در دمای پایین، جداسازی میوه‌های آلوده و حذف آن‌ها، هوادهی و تنظیم دما و رطوبت انبار پیشنهاد می‌شود (El-Ghauth *et al*. 2002).

در گذشته برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت و پوسیدگی‌های انباری از قارچ‌کش‌های مختلفی استفاده می‌شد اما امروزه به دلیل نگرانی‌ها درباره تأثیر منفی آن‌ها بر سلامت انسان، آلودگی‌های زیست‌محیطی و بروز مقاومت در بیمارگرها، بسیاری از این سموم از بازار مصرف حذف یا مصرف آن‌ها به‌شدت کاهش یافته است و توجه محققان را به سمت یافتن روش‌های کنترل غیرشیمیایی از جمله کنترل بیولوژیکی معطوف کرده است (Kinay and Yildiz 2008).

برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت، استفاده از ریزجانداران (میکروارگانیسم‌های) آنتاگونیست می‌تواند یک جایگزین نویدبخش و مؤثر برای روش شیمیایی باشد. مخمرهای آنتاگونیست در برنامه‌های مدیریت بیماری‌های پس از برداشت جایگاه ویژه‌ای دارند. این ریزجانداران به دلیل داشتن فعالیت‌های آنتاگونیستی از جمله مسدود کردن زخم‌های موجود در سطح میوه، ایجاد رقابت بر سر فضا و مواد غذایی، پارازیته کردن عامل بیمارگر، ترشح ترکیب‌های ضد قارچی بر اثر القای مقاومت میزبان و سازوکارهای دفاعی آن، توانایی اتصال به ریسه (هیف)های قارچی بیمارگر و ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده به‌عنوان عامل‌های کنترل زیستی بسیار مهم در کنترل بیماری‌های پس از برداشت به شمار می‌آیند (Liu *et al*. 2012).

مواد و روش‌ها

تهیهٔ بیمارگرهای قارچی و جدایه‌های آنتاگونیست

خوشه‌های انگور مشکوک به آلودگی قارچی در سه نوبت از شهریورماه تا آبان‌ماه (۱۳۹۲)، از تاکستان‌ها و انبارهای شهرستان‌های ملکان و مراغه گردآوری و به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی بیمارگرهای قارچی از خوشه‌های آلوده، برابر با روش نیلسون و همکاران انجام شد (Nelson *et al*. 1983). شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی با استفاده از روش کلیچ و پیت انجام شد (Klich 2002, Pitt 1988). برای تأیید مولکولی

1. Penitrem

گونه‌های شناسایی‌شده بر پایهٔ ریخت‌شناسی، از دو آغازگر Forward و Reverse به ترتیب با توالی‌های ITS1; (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4; (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') استفاده شد (White *et al.* 1990). دو جدایهٔ آنتاگونیست P4 وP5 مخمر *Pichia membranaefaciens* از آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز تهیه شد و به‌منظور افزایش و کشت آن‌ها، در ارلن ۲۵۰ ml حاوی ۵۰ ml محیط NYDB[1] و در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ rpm نگهداری شدند (Chan and Tian 2005).

بررسی توانایی جدایه‌های مخمری در بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum*

برای بررسی توانایی بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی در شرایط آزمایشگاهی، جدایه‌های P4 و P5 به فاصلهٔ ۱/۵ سانتی‌متر از لبهٔ تشتک پتری به‌صورت خطی در محیط کشت PDA اصلاحی حاوی ۴ گرم قند دکستروز به‌طور جداگانه کشت داده شدند، سپس در مقابل هر جدایهٔ مخمری، یک دیسک از کشت جوان بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* به فاصلهٔ ۱/۵ سانتی‌متر از لبهٔ تشتک پتری قرار داده شد. این آزمون یک‌بار دیگر هم درPDA دست‌ساز با ۲۰ گرم قند دکستروز انجام شد (Dennis and Webster 1971). میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی در هر سه آزمون، با استفاده از رابطهٔ ۱ محاسبه شد (Etebarian *et al.* 2005).

$$GI = \frac{C - T}{T} \times 100 \qquad (۱)$$

GI: درصد بازدارندگی، C: قطر رشد میسلیوم در تیمار شاهد و T: قطر رشد میسلیوم در تیمار موردنظر.

با توجه به توان رقابتی مخمرها در آزمون کشت متقابل همراه با میزان پایین قند دکستروز، توان رقابتی جدایه‌ها در جذب میزان پایین آهن هم برابر روش زیر بررسی شد.

بررسی توان تولید سیدروفور در جدایه‌های مخمر

در آغاز به‌صورت جداگانه دیسک جوانی از بیمارگرهای قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum* به فاصلهٔ ۱/۵ سانتی‌متر از لبهٔ تشتک پتری روی محیط کشت تولید سیدروفور (Sucrose 25 g, Ammonium sulphate 4 g, Potassium dibasic phosphate 3 g, Citric acid 1 g, Magnesium sulphate 0.08 g, Zinc sulphate 0.002 g, Agar 20 g, Water 1000 ml) کشت داده شد. پس از کشت خطی جداگانه از هر دو جدایهٔ مخمری در مقابل کلونی قارچی، تشتک‌های پتری به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. درنهایت به حاشیهٔ کلونی‌های مخمری محلول پرکلرات آهن (۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن و ۰/۱ میلی‌مولار پرکلریک اسید) اضافه و سپس تشتک‌های پتری به‌مدت پانزده دقیقه در هوای آزاد قرار داده شدند. توان تولید سیدروفور در جدایه‌های مخمری با مشاهدهٔ هالهٔ نارنجی‌رنگ در حاشیهٔ کلونی‌ها بررسی شد. این آزمون در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلریدآهن در محیط کشت تولید سیدروفور انجام و پس از رشد کامل کلونی‌های شاهد، درصد کاهش رشد بیمارگرهای قارچی بنابر رابطهٔ ۱ ثبت شد (Vero *et al.* 2009).

بررسی اثر یاخته‌های مخمری روی جوانه‌زنی اسپور بیمارگرهای قارچی

آهن یکی از عناصر ضروری در جوانه‌زنی اسپور بیمارگرهای قارچی است (Matzanke *et al.* 1987). بر این مبنا پس از ارزیابی توان تولید سیدروفور در جدایه‌ها، اثر یاخته‌های مخمری روی جوانه‌زنی اسپور بیمارگرها بررسی شد. در این آزمون به ۵ میلی‌لیتر آب‌میوهٔ انگور سترون (استریل)شده با پالایشگر (فیلتر) ۰/۲ میکرومتری درون فالکن‌های ۱۵ میلی‌لیتری به‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 1×10^{7}cfu دو جدایهٔ مخمری و 1×10^{7} اسپور در میلی‌لیتر از بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* اضافه شد. پس از مدت سیزده ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس وضعیت جوانه‌زنی صد اسپور هریک از بیمارگرهای قارچی با میکروسکوپ نوری شمارش و ثبت شد (Spadaro *et al.* 2002).

1. Nutrient Yeast Dextrose Broth

بررسی فعالیت قارچ انگلی مخمرهای آنتاگونیست در برابر بیمارگرهای قارچی

بررسی برهمکنش بین یاخته‌های مخمری و میسلیوم بیمارگرها

به‌منظور بررسی چگونگی فعالیت میکوپارازیتی جدایه‌های مخمری، از کلونی قارچ‌های تازه کشت *A. tubingensis* و *P. crustosum* به‌طور جداگانه دیسکی در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت ۲ درصد آب‌میوهٔ انگور و آگار قرار داده و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۷۲ساعت، به هر یک از تشتک‌ها ۵۰ میکرولیتر از دروایه با غلظت 1×10^{8}cfu از هر جدایهٔ مخمری P4 و P5 به‌طور جداگانه به حاشیهٔ میسلیوم‌های رشدیافته اضافه و ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند و به‌منظور حذف یاخته‌های مخمری که به میسلیوم‌های قارچی اتصال نیافته‌اند، با آب مقطر سترون به مدت دو دقیقه شسته شدند. این آزمون یک‌بار دیگر هم به منظور بررسی اثر مقادیر مختلف آب‌میوهٔ انگور و مادهٔ شیمیایی روی برهمکنش، در محیط کشت‌های WA[1] با غلظت‌های ۳۰درصد، ۲۰درصد و ۱۰درصد آب‌میوهٔ انگور و SDS٪[2] ۰/۱+WA انجام شد. در این آزمایش برای بررسی چگونگی ایجاد برهمکنش از یک مادهٔ شیمیایی به‌نام سدیم دودسیل سولفات با نقطه اثر اتصال به ساختمان پروتئینی استفاده شد. سپس شمار یاخته‌های مخمری اتصال یافته به میسلیوم‌های قارچی در هریک از تشتک‌های پتری با میکروسکوپ نوری شمارش شدند (Chan and Tian 2005).

بررسی توان تولید مواد ضد قارچی توسط مخمرهای آنتاگونیست در برابر بیمارگرهای قارچی

مخمرهای آنتاگونیست پس از برهمکنش با بیمارگرها، احتمال داده می‌شود به منظور فعالیت انگلی علیه بیمارگرها تولید چندین مادهٔ ضد قارچی کنند. برای این منظور پس از کشت جداگانهٔ ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 1×10^{7} اسپور در میلی‌لیتر قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum* در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDB[3]، به مدت سه روز در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰rpm و دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر دروایه 1×10^{8}cfu از هر دو جدایهٔ مخمری به‌طور جداگانه به هر یک از نمونه‌ها اضافه و به‌مدت سه روز در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰rpm و دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. درنهایت همهٔ ویژگی‌های ریختی میسلیوم‌های قارچی با بینوکولر در مقایسه با شاهد بررسی شدند (Masih and Paul 2002).

به‌منظور بررسی نقش دیگر متابولیت‌های بازدارندهٔ تولیدشده توسط جدایه‌های مخمری در میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرها برابر با روش مونتیلیگر و همکاران با اندکی تغییر انجام شد. یک دیسک جوان از هر کلونی قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum* در مرکز هر یک از تشتک پتری‌ها قرار داده و به فاصلهٔ ۴ سانتی‌متر از کلونی قارچی، دو جدایهٔ مخمری P4 و P5 به‌طور جداگانه با گوش پاک‌کن سترون به‌صورت دایره‌ای پیرامون هر یک از کلونی‌های قارچی کشت داده شد (Montealegre *et al.* 2013). درصد کاهش رشد بیمارگرهای قارچی برابر با رابطهٔ ۱ ثبت شد.

بررسی توان تولید زهرابه در مخمرهای آنتاگونیست

با توجه به آزمون پیشین احتمال داده می‌شود عامل کشنده‌ای هم در فعالیت قارچ انگلی جدایه‌ها در برابر رشد بیمارگرها دخیل باشد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از کشت تازهٔ جدایهٔ مخمری در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت تولید زهرابه (Agar 20 g, Glucose 20 g, Methylene blue 0.03 g, Phosphate/citrate buffer Sabouraud Agar MB 1000 ml, pH= 4.5) قرار داده شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. توان تولید زهرابه با تشکیل هالهٔ بی‌رنگ شفاف در حاشیهٔ کلونی‌های هر دو جدایهٔ مخمر بررسی شد. این آزمون یک‌بار دیگر هم به‌صورت کشت متقابل هر یک از جدایه‌ها با بیمارگرهای قارچی روی محیط کشت مربوطه انجام شد (Portes *et al.* 2013).

1. Water Agar
2. Sodium Dodecyl Sulphate
3. Potato Dextrose Broth

بررسی توان تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده در جدایه‌های مخمری

بررسی فعالیت آنزیم بتا- ۱، ۳- گلوکاناز

فعالیت قارچ انگلی مخمرهای آنتاگونیست علیه بیمارگرها را می‌توان به تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده توسط جدایه‌ها پس از اتصال محکم به میسلیوم بیمارگرها نسبت داد (Tayel *et al.* 2013). برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از مخمر تازه کشت در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت Lilly Barnett (همراه‌شده با ۲mg/ml دیوارهٔ یاخته‌ای بیمارگرهای قارچی) منتقل و در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰rpm و دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند (Lilly and Bernett 1951). سپس در فاصلهٔ زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت، نمونه‌ها از کاغذ صافی عبور داده شدند و در هر مرحلهٔ زمانی ۲۵۰ میکرولیتر از حالت (فاز) پالایش‌شده به ۲۵۰ میکرولیتر محلول لامینارین اضافه و به مدت دو ساعت در دمای۴۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به محصول واکنش منتقل و به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. درنهایت پس از اضافه شدن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در نمونه‌ها، میزان جذب محصول واکنش در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) خوانده و ثبت شد (Chan and Tian 2005).

بررسی فعالیت آنزیم اگزوکیتیناز

برای این منظور پس از اضافه‌شدن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کیتین به ۰/۵ میلی‌لیتر محصول واکنش پالایش‌شده در فاصلهٔ زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت، به مدت دو ساعت در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰rpm و دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید اضافه و به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. درنهایت پس از اضافه شدن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون، میزان جذب محصول واکنش در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری خوانده و ثبت شد (Chan and Tian 2005). در هر دو آزمون برای استخراج دیوارهٔ یاخته‌ای بیمارگرهای قارچی به‌عنوان منبع کربنی برای مخمرها از روش پیشنهادی سالیگ‌کاریاس و همکاران استفاده شد (Saligkarias *et al.* 2002).

بررسی توانایی جدایه‌های مخمر در کنترل بیمارگرهای قارچی در شرایط انباری

در آغاز برای هر تیمار شش خوشه و هر خوشه نزدیک به ده حبه انگور تهیه و به مدت دو دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضدعفونی شدند. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق به‌منظور خشک شدن قرار داده شدند. درنهایت حبه‌های انگور به‌طور تصادفی با سوزن سترون سوراخ و با سوسپانسیون ۱×۱۰^{۷} اسپور در میلی‌لیتر بیمارگرهای قارچی اسپری‌پاشی شدند. پس از فاصلهٔ زمانی دو ساعت، سوسپانسیون مخمری ۱×۱۰^{۸}cfu به خوشه‌های موردآزمایش اسپری‌پاشی شدند. برای حفظ میزان بالای رطوبت نسبی، خوشه‌ها در کیسه‌های نایلونی سیاه‌رنگ نگهداری شدند. پس از نگهداری خوشه‌ها به مدت ده روز در دمای ۲۳-۲۰ درجهٔ سلسیوس، میزان کاهش بیماری پوسیدگی خوشهٔ انگور در مقایسه با شاهد بررسی شد (Zahavi *et al.* 2000).

بررسی توانایی مخمرهای آنتاگونیست در کلنیزاسیون بافت سطحی زخمی میوهٔ انگور

برای بررسی کلنیزاسیون مخمرها در بافت سطحی زخمی میوه، حبه‌های انگور با سوزن سترون سوراخ و با سوسپانسیون حاوی ۱×۱۰^{۸} cfu اسپری‌پاشی شدند. درنهایت به مدت ده روز در شرایط انباری نگهداری شدند. در هر فاصلهٔ زمانی پس از انجام مایه‌زنی، به‌طور تصادفی حبه‌هایی از هر خوشه انتخاب و درون هاون چینی به‌طور کامل خرد و همگن شدند. پس از انجام مرحلهٔ رقیق‌سازی در محیط کشت NYDA، تشتک‌های پتری که در آن کلونی مخمرها قابل‌شمارش بودند انتخاب و جمعیت مخمرها در طول دورهٔ زمانی نگهداری در شرایط انبار بررسی و ثبت شد (Fan and Tian 2000).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل داده‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS انجام شد. بررسی‌های آزمایشگاهی و انباری در قالب

طرح کامل تصادفی با سه تکرار صورت پذیرفت و کل آزمایش‌ها نیز دو بار انجام شد. برای مقایسهٔ میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۱درصد استفاده شد.

نتایج

شناسایی بیمارگرهای قارچی بر پایهٔ مشخصات مولکولی و ریختی

بیمارگرهای قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum* بر پایهٔ ویژگی‌های ریختی و به ترتیب با استفاده از کلیدهای کلیچ و پیت شناسایی شدند (Klich 2002, Pitt 1988). مقایسهٔ توالی ناحیهٔ ITS-rDNA ایجادشده در این تحقیق، با توالی‌های جدایه‌های استاندارد در بانک ژن NCBI (Blast Search) نشان داد که توالی هر دو جدایهٔ قارچی با توالی قارچ‌های *A. tubingensis* (accNUM: GU134883.1) و *P. crustosum* (accNUM: KT876720.1) بیشترین درصد همسانی را داشته‌اند. این شناسایی با نتایج به‌دست‌آمده بر پایهٔ ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها همخوانی داشت.

نتایج آزمون‌های بررسی توانایی جدایه‌های مخمر در بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی

نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که میزان بازدارندگی دو جدایهٔ مخمر در محیط کشت PDA حاوی میزان پایین قند دکستروز در مقایسه با میزان بالای آن در محیط، بیشتر بوده است. به‌طوری‌که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرها در محیط کشت حاوی میزان بالای قند دکستروز شایان‌توجه نبود (جدول ۱). بیشترین بازدارندگی از رشد بیمارگر *A. tubingensis* در محیط کشت حاوی میزان پایین قند دکستروز مربوط به هر دو جدایهٔ P4 و P5 بود. درحالی‌که بیشترین میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر *P. crustosum* مربوط به P4 بود. بنابراین احتمال دارد که قند به‌عنوان یک مادهٔ مغذی بتواند عامل رقابت بین بیماگرها و جدایه‌های آنتاگونیست باشد. از سوی دیگر جدایه‌های مخمر به دلیل وجود عامل محدود رشدی در محیط، برای به‌دست آوردن مواد قندی بیشتر، وارد حالت میسلیومی شدند و با اشغال فضای بیشتری از محیط، مواد قندی بیشتری را جذب کردند و از این راه بازدارندگی بیشتری از رشد بیمارگرها را باعث شدند.

توان تولید سیدروفور در مخمرهای آنتاگونیست

بیشترین میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرهای *A. tubengensis* و *P. crustosum* توسط دو جدایهٔ مخمر در غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن مشاهده شد. درحالی‌که در بالاترین غلظت کلرید آهن (۵۰۰ میکرومولار) بازدارندگی کمتری از رشد قارچ‌ها در مقایسه با میزان پایین کلرید آهن (۱۰۰ و ۱۰ میکرومولار) صورت گرفته بود (جدول ۲). مشاهده‌ها نشان داد که جدایه‌های مخمر افزون بر بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی، اسپورزایی در آن‌ها را به‌شدت کاهش داده‌اند، زیرا آهن یکی از عناصر ضروری و موردنیاز بیمارگرهای قارچی در اسپورزایی آن‌هاست (Matzanke *et al.* 1987). توانایی تولید سیدروفور توسط هر دو جدایهٔ مخمری با نمایان شدن هالهٔ نارنجی‌رنگ پس از اضافه کردن محلول پرکلرات آهن به حاشیهٔ کلونی‌های مخمر در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن اثبات شد (شکل ۱).

جدول ۱. میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum*

Table 1. Growth inhibition of *A. tubingensis* and *P. crustosum*

Yeast	Culture medium	Fungal pathogens			
		A. tubingensis		*P. crustosum*	
P4 strain	PDA culture medium with 20 g of glucose	31.48 [a]	d [b]	30.85	d
P5 strain	PDA culture medium with 20 g of glucose	36.29	cd	38.85	cd
P4 strain	PDA culture medium with 4 g of glucose	59.29	b	66.66	a
P5 strain	PDA culture medium with 4 g of glucose	53.18	b	44.44	c

a. درصد بازدارندگی از رشد بیمارگرها، توسط رابطهٔ $GI = \frac{C-T}{T} \times 100$ به دست آمده است که در آن GI: درصد بازدارندگی از رشد C: قطر رشد میسلیوم در تیمار شاهد و T: قطر رشد میسلیوم در بیمارگر است.

b. حروف همسان در هر ستون نشانگر نبود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است. مقایسهٔ میانگین با روش دانکن انجام شده است.

a. % Growth inhibition was accounted using the formula $GI= \frac{C-T}{T} \times 100$, where "GI" is the percentage growth inhibition, "C" is diameter of the mycelium growth of the control treated and "T" is diameter of the mycelium growth of pathogen.

b. Values followed by the same letter were not significantly different at 1% in each column, as determined by variance analysis followed by Duncan's test.

جدول۲. میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی در سه غلظت متفاوت کلرید آهن

Table 2. Growth inhibition of *A. tubingensis* and *P. crustosum* cultured in three different concentrations of ferric chloride

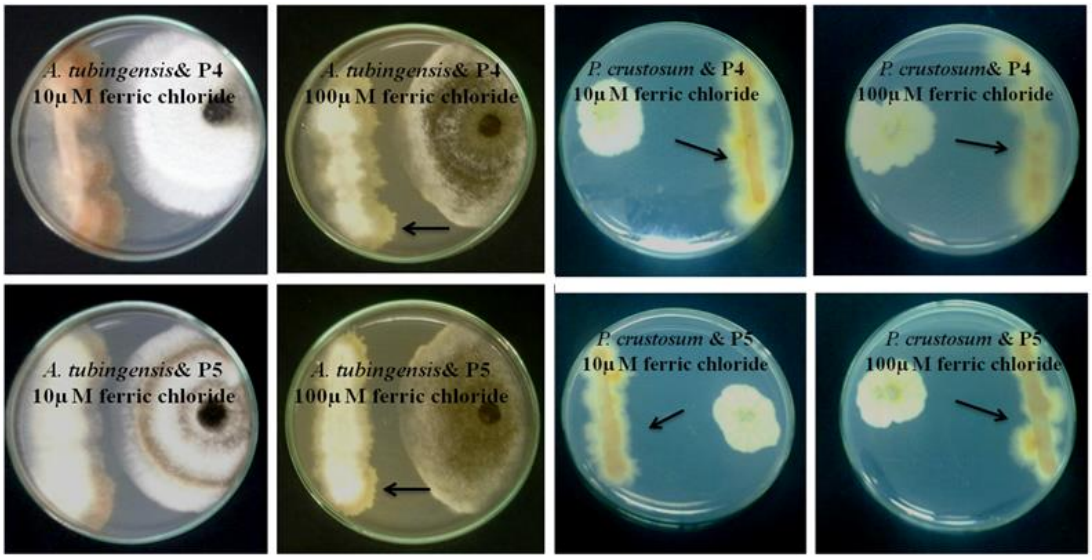
Yeast	Ferric chloride concentration (μM)	Fungal pathogens			
		A. tubingensis		*P. crustosum*	
P4 strain	10	62.22 [a]	a [b]	46	b
	100	55.89	a	42	b
	500	36	c	32.59	cd
P5 strain	10	49.63	b	61.78	a
	100	44	b	50	ab
	500	27.77	d	38.88	bc

a. درصد بازدارندگی از رشد بیمارگرها، توسط رابطهٔ $GI = \frac{C-T}{T} \times 100$ به‌دست آمده است؛ که در آن: GI: درصد بازدارندگی از رشد C: قطر رشد میسلیوم در تیمار شاهد و T: قطر رشد میسلیوم در بیمارگر است.

b. حروف همسان در هر ستون نشانگر نبود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است. مقایسهٔ میانگین با روش دانکن انجام شده است.

a. % Growth inhibition was accounted using the formula $GI= \frac{C-T}{T} \times 100$, where "GI" is the percentage growth inhibition, "C" is diameter of the mycelium growth of the control treated and "T" is diameter of the mycelium growth of pathogen.

[b]Values followed by the same letter were not significantly different at 1% in each column, as determined by variance analysis followed by Duncan's test.



شکل ۱. تولید سیدروفور توسط دو جدایهٔ مخمری در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن در برابر قارچ‌های بیمارگر. جهت نما نشانگر تولید هالهٔ نارنجی‌رنگ حاشیهٔ کلونی‌های مخمر

Figure 1. The siderophore production by two strains of yeast in culture media with 10 and 100 μM concentrations of ferric chloride against fungal pathogens (Flash indicator; the appearance of orange halos on the margin of yeast colonies)

میزان جوانه‌زنی اسپورهای بیمارگرهای قارچی در تعامل با یاخته‌های مخمر

جوانه‌زنی اسپورهای بیمارگرهای قارچی در حضور دروایهٔ یاخته‌های مخمر به‌طور شایان‌توجهی کاهش یافته بود. به‌طوری‌که میزان جوانه‌زنی اسپورهای *A. tubengensis* و *P. crustosum* در تعامل با جدایهٔ P4 به ترتیب ۲۴درصد و ۳۰/۶۷درصد و در تعامل با جدایهP5 به ترتیب ۲۲/۳۳درصد و ۲۷/۳۳درصد بود.

فعالیت میکوپارازیتی مخمرهای آنتاگونیست

برهمکنش بین یاخته‌های مخمر و میسلیوم بیمارگرها

مشاهده‌های میکروسکوپی نشان داد که دو جدایهٔ مخمر P5 و P4 توانایی اتصال به میسلیوم بیمارگرهای قارچی را دارند. به‌طوری‌که شمار بسیار زیادی از یاخته‌های مخمر به میسلیوم‌های هر دو بیمارگر قارچی متصل شده بودند که نشانگر توانایی بالای جدایه‌های مخمری در اتصال به میسلیوم بیمارگرها است. بررسی میکروسکوپی نشان داد که غلظت‌های ۱۰درصد، ۲۰درصد و ۳۰درصد آب‌میوهٔ انگور هیچ تأثیری در توانایی اتصال جدایه‌های مخمر به میسلیوم‌های قارچی نداشته است. بنابراین غلظت‌های متفاوتی از مواد مغذی در توانایی اتصال یاخته‌های مخمر تأثیری ندارد. اما مادهٔ شیمیایی سدیم دودسیل سولفات با میزان ۰/۱درصد باعث نداشتن اتصال هر دو جدایهٔ مخمری به میسلیوم‌های بیمارگرهای قارچی شده بود (جدول ۳).

جدول۳. برهمکنش بین یاخته‌های مخمری و میسلیوم‌های بیمارگرهای قارچی در غلظت‌های متفاوت آب‌میوه و مادهٔ شیمیایی

Table 3. Interaction between yeast cells and fungal hyphae under different concentrations of juice and chemical compound

Yeast	Nutrients and chemical	Fungal pathogens			
		A. tubingensis		*P. crustosum*	
P4 strain	10% Grape juice agar	+	+	+	+
	20% Grape juice agar	+	+	+	+
	30% Grape juice agar	+	+	+	+
	0.1% SDS	-		-	
P5 strain	10% Grape juice agar	+	+	+	+
	20% Grape juice agar	+	+	+	+
	30% Grape juice agar	+	+	+	+
	0.1% SDS	-		-	

++ اتصال‌های بسیار قوی (>1000 cells/unit)، - نداشتن اتصال، (1 unit = 0.04mm^2).

++ close attachments (>1000 cells/unit), − no attachment, (1 unit = 0.04mm^2).

توان تولید مواد ضد قارچی در مخمرهای آنتاگونیست

با بررسی عامل آنتاگونیست و بیمارگرها در محیط کشت PDB توسط بینوکلر مشاهده شد که میسلیوم‌های بیمارگر در تماس با یاخته‌های مخمر در مقایسه با تیمارهای شاهد به‌شدت بدشکل و تخریب شده‌اند. این تخریب را می‌توان به تولید مواد ضد قارچی توسط هر دو جدایهٔ مخمر نسبت داد.

توان تولید زهرابه در مخمرهای آنتاگونیست

مشاهده‌ها نشان داد که هر دو جدایهٔ P4 و P5 توانایی تولید زهرابه در شرایط اسیدی را دارند. به‌طوری‌که در اطراف کلونی‌های هر دو جدایهٔ مخمر، هاله‌ای واضح و سفیدرنگ در محیط کشت MBA با معرف متیلن بلو مشاهده شد. این هالهٔ شفاف اطراف کلونی‌های مخمر در کشت‌های متقابل با بیمارگرهای قارچی، به‌صورت یک ناحیهٔ بازدارنده از رشد بیمارگرها هم مشاهده شد که نشانگر تولید زهرابه توسط جدایه‌های مخمر در برابر بیمارگرهای قارچی بود.

با توجه به نتایج مربوط به بررسی نقش دیگر متابولیت‌های بازدارنده در میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرها، بیشترین بازدارندگی از بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* مربوط به مخمر P4 در مقایسه با جدایهٔ P5 بود (جدول۴) و در این آزمون افزون بر نقش دیگر مواد بازدارنده در بازدارندگی از رشد بیمارگرها، هر دو جدایهٔ آنتاگونیست وارد مرحلهٔ رشدی میسلیومی شدند و با اشغال فضای بیشتری از محیط، میزان بالایی از مواد غذایی را جذب کردند و از این راه باعث کاهش رشد بیمارگرهای قارچی در مقایسه با تیمارهای شاهد شدند.

جدول۴. میزان بازدارندگی از رشد *A. tubingensis* و *P. crustosum* در کشت دایرهٔ متحدالمرکز (در محیط کشت PDA)

Table 4. Inhibition of *A. tubingensis* and *P. crustosum* growth in the concentric circle culture

yeast	Fungal pathogens			
	A. tubingensis		*P. crustosum*	
P4 strain	84.41[a]	a[b]	84.58	a
P5 strain	64.58	b	66.66	b

a. درصد بازدارندگی از رشد بیمارگرها، توسط رابطهٔ $GI = \frac{C-T}{T} \times 100$ به دست آمده است که در آن GI: درصد بازدارندگی از رشد C: قطر رشد میسلیوم در تیمار شاهد و T: قطر رشد میسلیوم در بیمارگر است.

b. حروف همسان در هر ستون نشانگر نبود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است. مقایسهٔ میانگین با روش دانکن انجام شده است.

a. %Growth inhibition was accounted using the formula $GI= \frac{C-T}{T} \times 100$, where "GI" is the percentage growth inhibition, "C" is diameter of the mycelium growth of the control treated and "T" is diameter of the mycelium growth of pathogen.

b. Values followed by the same letter were not significantly different at 1% in each column, as determined by variance analysis followed by Duncan's test.

تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده در مخمرها

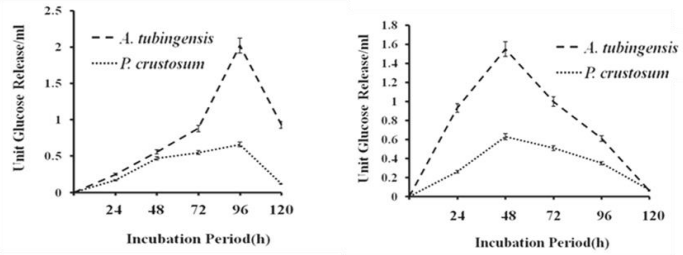
ارزیابی فعالیت آنزیم بتا- ۱، ۳- گلوکوناز

ارزیابی فعالیت آنزیم بتا-۱، ۳- گلوکوناز دو جدایهٔ مخمری نشان داد که هر دو جدایهٔ P4 و P5 توانایی رشد و تولید آنزیم بتا- ۱، ۳- گلوکوناز را در محیط کشت Lilly Barnett همراه‌شده با دیوارهٔ یاخته‌ای بیمارگرهای قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum* را دارند. بیشترین میزان تولید این آنزیم در جدایهٔ P4 و P5 به‌ترتیب در دومین و چهارمین روز نگهداری بوده است. نتایج آزمایش مربوطه نشان داد که دیوارهٔ قارچی *A. tubengensis* منبع کربنی خوبی در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده توسط هر دو جدایهٔ مخمر بوده است (شکل۲).

ارزیابی فعالیت آنزیم اگزوکیتیناز

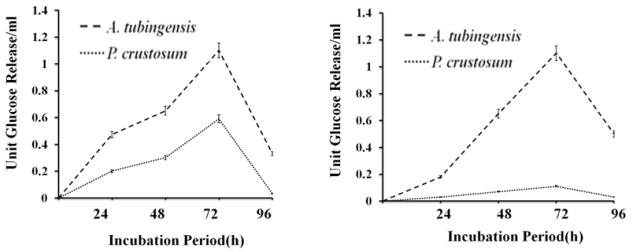
با توجه به شکل ۳، دو مخمر P4 و P5 توانایی رشد و تولید آنزیم اگزوکیتیناز در محیط کشت Lilly Barnett

همراه‌شده با دیوارهٔ یاخته‌ای از هر بیمارگر قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum* را دارند. بیشترین میزان تولید این آنزیم در هر دو جدایهٔ P4 و P5 در سومین روز نگهداری و نهفتگی (انکوباسیون) بوده است (شکل ۳).



شکل ۲. فعالیت آنزیم بتا- ۱، ۳- گلوکوناز دو جدایهٔ مخمری P4 (سمت راست) و P5 (سمت چپ) در محیط کشتLilly Barnett همراه‌شده با ۲ mg/ml دیوارهٔ یاخته‌ای از هر بیمارگر قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum*

Figure 2. β-1,3-glucanase activitiy of P4 strain (Right) and P5 strain (Left) in Lilly–Barnett medium supplemented with 2 mg/ ml CWP of *A. tubengensis* and *P. crustosum* fungal pathogen



شکل ۳. فعالیت آنزیم اگزوکیتیناز دو جدایهٔ مخمری P4 (سمت راست) و P5 (سمت چپ) در محیط کشت Lilly Barnett همراه‌شده با ۲ mg/ml دیوارهٔ یاخته‌ای از هر بیمارگر قارچی *A. tubengensis* و*P. crustosum*

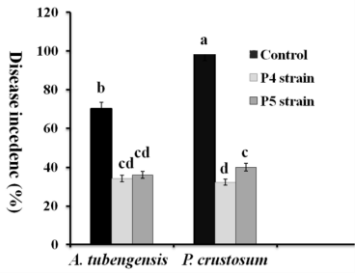
Figure 3. Exo-chitinase activities of P4 strain (Right) and P5 strain (Left) grown in Lilly–Barnett medium supplemented with 2mg/ml CWP of *A. tubengensis* and *P. crustosum* fungal pathogen

توانایی جدایه‌های مخمر در کنترل بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* در شرایط انباری

با توجه به شکل۴، میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum* توسط جدایهٔ P4 به ترتیب ۴۹/۱۶درصد و ۶۲/۶۴درصد و توسط جدایهٔ P5، ۴۴/۸۸درصد و ۵۰/۳درصد در خوشه‌های تیمارشده در مقایسه با تیمارهای شاهد در شرایط انباری بود.

روند رشد جمعیت دو جدایهٔ مخمری آنتاگونیست در کلنیزاسیون بافت سطحی میوه

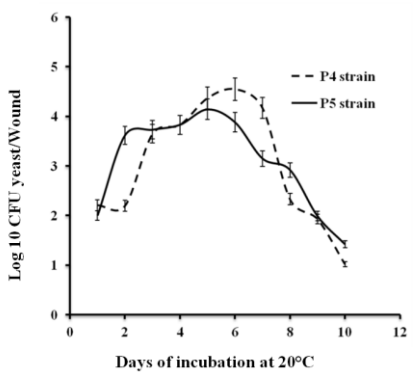
نتایج ناشی از بررسی روند رشد جمعیت دو جدایهٔ مخمر نشان داد که جمعیت هر دو مخمر آنتاگونیست در طول مدت نگهداری خوشه‌های تیمارشده در شرایط انباری تا روز هفتم، در بافت‌های زخمی افزایش یافته است و پس‌ازاین مدت به‌منظور به دست آوردن نتایج کنترلی بهتر نیاز به تکرار مایه‌زنی جدایه‌های مخمری است. روند افزایش جمعیت مخمرهای آنتاگونیست نشانگر کلنیزاسیون جدایه‌ها در بافت سطحی میوه‌های زخمی شده است (شکل ۵).



شکل ۴. میزان آلودگی خوشه‌های انگور به بیمارگرهای قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum*، تیمارشده با دو جدایهٔ مخمری P4 و P5.

(مقایسهٔ میانگین با آزمون دانکن انجام شده است. حروف همسان نشانگر نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.)

Figure 4. The infection bunches of grapes to the *A. tubengensis* and *P. crustosum* were treated with P4 strain and P5 strain. The same letters were not significantly different at 1%, as determined by variance analysis followed by Duncan's test.



شکل ۵. روند رشد جمعیت جدایه‌های مخمری در بافت سطحی زخمی خوشه‌های انگور

Figure 5. Process of population growth of yeast strains in wounds of grape bunches.

بحث

رقابت بر سر فضا و مواد مغذی یکی از سازوکارهای کنترل زیستی در ریزجانداران آنتاگونیست علیه بیمارگرهای پس از برداشت است (Di-Francesco *et al.* 2016). مخمرها برای تنفس تخمیری خود از قند به‌عنوان یک عامل مهم رشدی استفاده می‌کنند و به همین دلیل در محیطی با کمبود مواد قندی توانایی رقابتی بالایی برای جذب آن نشان می‌دهند (Mukhtar *et al.* 2010) برای اثبات این توانایی در جدایه‌های آنتاگونیست، آزمون کشت متقابل با میزان پایین قند دکستروز انجام شد. در این آزمون با توجه به میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرها، این احتمال را داد که دو جدایهٔ مخمر P4 و P5 برای کاهش رشد بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* در فضای رقابتی مشترک، با وارد شدن به مرحلهٔ میسلیومی، از راه اشغال فضای محیط کشت میزان بیشتری از مواد غذایی را جذب و از گسترش بیمارگرهای قارچی جلوگیری کردند. بخشی از نتایج این بررسی مربوط به میزان بازدارندگی بالا از رشد بیمارگر قارچی در محیط کشت حاوی میزان پایین قند با تحقیقاتی که توسط فیلونو و همکاران صورت گرفته بود، همخوانی داشت (Filonow *et al.* 1998). محققان در این تحقیق نشان دادند که مخمرهای *Cryptococcus laurentii* و *Sporobolomyces roseus* هنگامی‌که در محیطی با میزان پایین قند کشت داده شدند توانایی رقابتی بالایی در بازدارندگی از رشد *Botrytis cinerea* نشان دادند. در گزارش راسپر و همکاران نشان داده شد که مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در محیط غذایی حاوی مقادیر پایین دکستروز توانایی بازدارندگی بالایی علیه *B. cinerea* داشته است (Raspor *et al.* 2010). برای بررسی دقیق نقش وجود عامل محدود رشدی قند در بازدارندگی از رشد بیمارگرها نتایج مربوطه با نتایج ناشی از کشت متقابل در محیط کشت PDA با میزان ۲۰ گرم قند دکستروز مقایسه شدند. در نتایج مربوط به آزمون کشت متقابل با میزان ۲۰ گرم قند دکستروز هر دو جدایهٔ مخمر توانایی بازدارندگی از رشد بیمارگرها، در مقایسه با تیمارهای شاهد را داشتند. اما این میزان درصد بازدارندگی رشد بیمارگرها در مقایسه با نتایج آزمون مربوط به میزان پایین قند، شایان‌توجه نبود و نکته شایان‌توجه در این آزمون، رشد جدایه‌ها در مقایسه با آزمون کشت متقابل در میزان پایین دکستروز تنها به‌صورت مخمری بود. در تحقیقی در رابطه با کنترل *B. cinerea*، *Colletotrichum acutatum* و *Penicillium expansum* توسط قارچ مخمر مانند *Aureobasidium pullulans* نشان داده شد که مخمر آنتاگونیست در آزمون کشت متقابل در محیط کشت PDA توانایی بازدارندگی بالایی از رشد بیمارگر قارچی را دارد (Mari *et al.* 2012).

نتایج آزمایش‌ها نشان داد هنگامی‌که عامل محدودی در محیط غذایی وجود داشته باشد جدایه‌ها توانایی رقابتی بالایی از خود نشان می‌دهند. بر این مبنا احتمال تولید سیدروفور در شرایط کمبود آهن بررسی شد. تولید سیدروفور به دلیل جذب ترکیب آهنی موردنیاز ریزجانداران در شرایط کمبود آهن در سازوکار کنترل زیستی مخمرها نقش مهمی دارد (Saravanakumar *et al.* 2008). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، هر دو جدایهٔ مخمر P4 و P5 در محیط کشت حاوی میزان پایین آهن با تولید سیدروفور از گسترش رشد بیمارگرها جلوگیری کرده‌اند.

یافته‌های مربوط به توان تولید سیدروفور توسط هر دو مخمر با گزارشی که توسط اسپادارو و همکاران ارائه شده بود، همسانی داشت. محققان نشان دادند که *Metschnikowia pulcherrima* و *A. pullulans* علیه بیمارگرهای قارچی *B. cinerea*، *Monilinia laxa* و *P. expansum* توان تولید سیدروفور را داشته و از این روش باعث بازدارندگی از رشد قارچ‌ها شده‌اند (Spadaro

et al. 2011). در بررسی دیگری، نشان داده شد که شماری از گونه‌های جنس مخمر *Rhodotorula* توان تولید سیدروفور علیه بیمارگر قارچی *P. expansum* را داشته و موجب بازدارندگی از رشد قارچ شده‌اند (Sanz Ferramola *et al.* 2013).

مخمرهای آنتاگونیست برای انگلی‌کردن بیمارگرها در آغاز به‌طور محکم به میسلیوم‌های قارچی متصل شده سپس تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده به‌منظور تخریب و تجزیهٔ دیوارهٔ یاخته‌ای بیمارگرها می‌کنند (Yeka Zhimo *et al.* 2014). در این تحقیق برای اثبات این سازوکار در جدایه‌ها، در آغاز برهمکنش بین یاخته‌های مخمر و میسلیوم‌های بیمارگرها به‌منظور بررسی توانایی اتصال یاخته‌های مخمر و انهدام میسلیوم‌های قارچی ارزیابی شد. سپس به بررسی تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده در جدایه‌ها پرداخته شد. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی برهمکنش بین یاخته‌های مخمری P4 و P5 با میسلیوم بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که هر دو جدایهٔ مخمری توانایی بالایی در اتصال به ریسه‌های قارچی را دارند. درحالی‌که مادهٔ شیمیایی سدیم دودسیل سولفات بازدارندهٔ برقراری اتصال‌ها و برهمکنش بین یاخته‌های مخمری و میسلیوم‌های بیمارگرها شد. نتایج مربوط به وجود مادهٔ شیمیایی سدیم دودسیل سولفات (با سازوکار عمل، ایجاد پیوند و اتصال با پروتئین‌های دیوارهٔ یاخته‌ای) نشان داد، درصورتی‌که محل اتصال یاخته‌های مخمر در میسلیوم‌های قارچی بلوکه شود یاخته‌های مخمر توان اتصال به میسلیوم‌های قارچی را نخواهند داشت. درنتیجه، یاخته‌های مخمر برای انگلی‌کردن میسلیوم‌های قارچی در آغاز به سطح خارجی میسلیوم بیمارگرها متصل و سپس تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده می‌کنند. در بررسی دیگری، نتایج همسانی در رابطه با فعالیت قارچ انگلی مخمرها از راه اتصال به میسلیوم بیمارگرها و تولید آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ دیوارهٔ یاخته‌ای قارچی گزارش شده بود (Liu *et al.* 2013). نتایج این بررسی همچنین با یافته‌های چان و تیان در رابطه با کاربرد دو مخمر *P. membranaefaciens* و *Candida albidus* علیه بیمارگرهای انباری سیب از جمله *Monilinia fructicola*، *Penicillium expansum* و *Rhizopus stolonifer* همخوانی داشت. در نتایج بررسی آنان نشان داده شد که یاخته‌های مخمری در محیط کشت WA+۲ درصد آب‌میوهٔ سیب، اتصالات بسیار محکمی به میسلیوم‌های بیمارگرها داشته‌اند. پس از اتصال به‌منظور انگلی کردن میسلیوم‌های بیمارگرها تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده کرده‌اند. در بخشی از این بررسی نشان داده شد که مادهٔ شیمیایی سدیم دودسیل سولفات از برقراری این اتصال‌ها جلوگیری کرده بود (Chan and Tian 2005). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که مخمر آنتاگونیست *Pichia anomala* در برابر بیمارگر *A. flavus* توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده از جمله اگزوکیتیناز و گلوکاناز را داشته است (Tayel *et al.* 2013).

در این تحقیق احتمال داده شد که افزون بر تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده توسط جدایه‌های مخمر، مواد ضد قارچی از جمله زهرابه و دیگر مواد بازدارنده در انگلی‌کردن بیمارگرها می‌توانند نقش داشته باشند. در ارزیابی مربوط به توان تولید زهرابه توسط جدایه‌های مخمر نشان داده شد که هر دو جدایهٔ مخمری P4 و P5 در محیط کشت MBA توان تولید زهرابه را در برابر قارچ‌های *A. tubingensis* و *P. crustosum* دارند. نتایج این بررسی با بررسی‌های پورتس و همکاران همخوانی داشت (Portes *et al.* 2013). آنان نشان دادند که مخمر آنتاگونیست *Kluyveromyces* sp. در برابر بیمارگرهای میوهٔ سیب از جمله *P. expansum* و *A. ochraceus* تولید زهرابه کرد، که با تولید هاله‌ای شفاف و جلوگیری‌کننده از رشد قارچ‌های بیماریزا توسط مخمر *Kluyveromyces* sp. در محیط کشت MBA همراه بود. در بررسی که توسط لوتز و همکاران صورت گرفته بود، ثابت کردند که مخمر *Cryptoccocus albidus* توانایی تولید زهرابه در برابر بیمارگرهای *P. expansum* و *B. cinerea* را دارد (Lutz *et al.* 2013).

در بررسی آزمایشگاهی مربوط به نقش دیگر بازدارنده‌ها در میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرها توسط مخمرهای آنتاگونیست به روش کشت دایرهٔ متحدالمرکز در مقایسه با تیمارهای شاهد که در آن‌ها به‌جای جدایه‌های مخمر از آب مقطر سترون استفاده شده بود، مشاهده شد که بیمارگرهای قارچی کمترین رشد را در مقایسه با تیمارهای شاهد داشتند. در این آزمون دو

جدایهٔ مخمر در رویارویی با بیمارگر قارچی وارد مرحلهٔ میسلیومی شده، با اشغال فضای بیشتری از محیط، مواد مغذی بیشتری جذب کرده و بدین روش جدایه‌های مخمر، بازدارندهٔ گسترش رشد بیمارگرها شدند. به‌طوری‌که در تیمار شاهد دیگری که حاوی یک دیسک از محیط کشت در مرکز به‌جای کلونی بیمارگر قارچی بودند جدایه‌های مخمر، رشد میسلیومی نداشتند. در این بررسی احتمال داده شد مواد بازدارنده هم می‌توانند در کاهش رشد بیمارگرها نقش مهمی داشته باشند. مونتیلیگر و همکاران نیز بازدارندگی از رشد بیمارگر *Rhizoctonia solani* توسط باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *B. lentimorbus* به روش کشت دایرهٔ متحدالمرکز در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند. در بررسی آنان کاهش رشد بیمارگرها به دلیل تولید مواد بازدارنده توسط باکتری‌های آنتاگونیست گزارش شد (Montealegre *et al*. 2013).

مخمرهای آنتاگونیست افزون بر داشتن توان رقابتی بالا در شرایط آزمایشگاهی، در شرایط انباری هم توانستند با کلنیزاسیون سریع بافت‌های زخمی میوه توان رقابتی بالایی را نشان دهند. در بررسی مربوط به روند رشد جمعیت مخمرها، شمارش کلونی جدایه‌ها در طول مدت انبارداری توانایی جدایه‌های مخمری در کلنیزاسیون بافت زخمی میوه را نشان داد. در بررسی که توسط محققان انجام گرفته بود، نشان داده شده که مخمر آنتاگونیست *M. pulcherrima* بافت سطحی میزبان را در برابر بیمارگر قارچی *B. cinerea* کلنیزه کرده (Parafati *et al.* 2015). همچنین در تحقیقات دیگر کلنیزاسیون بافت زخمی میزبان توسط مخمرهای *M. pulcherrima*، *Kluyveromyces thermotolerance*، *Issatchenkia terricola*، *Candida incommunis* (Bleve *et al.* 2006)، *Candida oleophila* (Liu *et al.* 2012) و *C. albidus* (Lutz *et al.* 2013) اثبات شده است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به یافته‌های این بررسی، برای کنترل زیستی مؤثر پوسیدگی خوشهٔ انگور می‌توان از این دو جدایهٔ مخمری استفاده کرد و در این تحقیق هر دو جدایهٔ مخمری در کنترل زیستی بیمارگرها تفاوت معنی‌داری از یکدیگر در شرایط آزمایشگاهی و انباری نشان ندادند و هر دو جدایه توانستند در حد شایان‌توجهی بیماری را کنترل کنند.

REFERENCES

Barkai-Golan R (2001) Postharvest diseases of fruits and vegetable: Development and control, In: Barkai-Golan R (ed.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. pp. 27-32.

Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A, Visconti A (2006) Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. International Journal Food Microbiology 108: 204-209.

Chan Z, Tian SP (2005) Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Postharvest Biology and Technology 36: 215-223.

Coates L, Johnson G (1989) Postharvest disease of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology 33: 537-547.

Davide S, Patharajan S, Lore A, Garibaldi A, Gullino M (2012) Ochratoxigenic black species of aspergilli in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR-RFLP Procedure. Toxins 4: 42-54.

Di-Francesco A, Martini C, Mari M (2016) Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. European Journal of Plant Pathology 10: 1-7.

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species groups of Trichoderma iii hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society 57: 363-369.

El-Ghaouth A, Wilson C, Wisniewski M, Droby S, Smilanick JL, Korsten L (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Applied Mycology and Biotechnology 2: 219-238.

Eriksen GS, Jaderlund KH, Moldes-Anaya A, Schonheit J, Bernhoft A, Jaeger G, Rundberget T, Skaar I (2010) Poisoning of dogs with tremorgenic Penicillium toxins. Medical Mycology 48(1): 188-96.

Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC, Sayler RJ (2005) Biological control of apple blue mold with Pseudomonas fluorescens. Canadian Journal of Microbiology 51: 591-598.

Fan Q, Tian SP (2000) Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranaefaciens*. Plant Diseases 84: 1212-1216.

Filonow AB (1998) Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. Biocontrol Science Technology 8: 243-256.

Kinay P, Yildiz M (2008) The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. Biological Control 45: 433-440.

Klich MA (2002) Identification of common Aspergillus species, In: Klich MA *(ed.),* Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. pp. 116.

Kozakiewicz Z (1989) Aspergillus species on stored products. Mycological Papers 161:181-188.

Lilly VG, Bernett HL (1951) Physiology of the fungi. McGraw-Hill, New York.

Liu J, Wisniewski M, Droby S, Norelli J, Hershkovitz V, Tian S, Farrell R (2012) Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. FEMS Microbiology Ecology 80: 578-590.

Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S, Liu Y (2013) Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. International Journal of Food Microbiology 19: 1-44.

Lutz MC, Lopes CA, Rodriguez ME, Sosa MC, Sangorrín MP (2013) Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. International Journal of Food Microbiology 17: 166-172.

Mari M, Martini C, Spadoni A, Rouissi W, Bertolini P (2012) Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biology and Technology 73: 56-62.

Masih EI, Paul B (2002). Secretion of β -1, 3-glucanase by the yeast *Pichia membranefaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mould of grapevine. Current Microbiology 44: 391-395.

Matzanke BF, Bill E, Trautwein AX, Winkelmann G (1987) Role of siderophores in iron storage in spores of Neurospora crassa and Aspergillus ochraceus. Journalof Bacteriology 169(12): 5876-5876.

Montealegre J R, Reyes R, Perez LM, Herrera R, Silva P, Besoain X (2013) Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Biotechnology. 6: 116-127.

Mukhtar K, Asgher M, Afghan S, Hussain K, Zia-ul-Hussnain S (2010) Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. Biomedicine and Biotechnology 2: 1-5.

Nelson PE, Toussoum TA, Marassas WFO (1983) Fusarium species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, The New York. pp. 193.

Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G (2015) Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. Food Microbiology 47: 85-92.

Pitt JI (1988) A laboratory guide to common Penicillium species, In: North Ryde NSW (ed.), Division of Food Processing, CSIRO, The Australia. pp.185.

Portes CS, Oliveira AV, Simer P, Lunkes AM, Coelho AR (2013) Role of killer factors in the inhibitory activity of bio-control yeasts against *Penicillium expansum* and *Aspergillus ochraceus*. Biology and Technology 56: 619-627.

Raspor P, Mikli-Milek D, Avbelj M, Cadez N (2010) Biocontrol of grey mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. Biotechnology 48(3): 336-343.

Saligkarias ID, Gravanis FT, Epton HAS (2002) Biological control of Botrytis cinerea on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182. I. In vivo studies. Biological Control 25: 143-150.

Sanz Ferramola MI, Benuzzi D, Calvente V, Calvo1 J, Sansone G, Cerutti S, Raba J (2013) The use of siderophores for improving the control of postharvest diseases in stored fruits and vegetables. Science, Technology and Education 13: 1385-1395.

Saravanakumar D, Ciavorella A, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML (2008) *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. Postharvest Biological Technology 49: 121-128.

Spadaro D, Zhang D,Garibaldi A, Gullino ML (2011) Role of competition for iron and cell wall degrading enzymes in mechanism of action of postharvest biocontrol agents. International Society for Horticultural Science 905: 87-102.

Spadaro D, Vola R, Piano S, Gullino ML (2002) Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. Postharvest Biology and Technology 24: 123-134.

Stockenstrom D, Thembo S, Balducci K, Shephard G (2007) Investigation of patulin contamination in apple juice sold in retail outlets in Italy and South Africa. Food Additives and Contaminants 24: 630-634.

Tayel AA, El-Tras WF, Moussa SH, El-Agamy MA (2013) *Antifungal action* of *Pichia anomala* against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its application as a feed supplement. Journal of the Science of Food and Agriculture 93(13): 3259-3263.

Vero S, Garmendia G, Gonzalez MB, Garat MF, Wisniewski ME (2009) Aureobasidium pullulans as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in uruguay. Biocontrol Science and Technology 19: 1033-1049.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), PCR Protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, The New York. pp. 315-322.

Yeka Zhimo V, Bhutia DD, Saha J, Panja B (2014) Exploitation of yeasts as an alternative strategy to control post harvest diseases of fruits-a review. World Applied Sciences Journal 31(5): 785-793.

Zahavi T, Cohen L, Weiss B, Schena L, Daus A, Kaplunov T, Zutkhi J, Ben-Arie R, Droby S (2000) Biological control of Botrytis, Aspergillus and Rhizopus rots on table and wine grapes in Israel. Elsevier Science 18: 115-124.

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 5, No. 1, Spring & Summer 2016

Evaluation of the biocontrol ability of *Pichia membranaefaciens* yeast against *Aspergillus tubingensis* and *Penicillium crustosum* causing bunch rot disease in grapes

Saiedeh Ranjbar Chaharborj [1], Akbar Shirzad[2*] and Mahdi Arzanlou [3]
1. M.Sc. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
(Received: Feb. 16, 2016 - Accepted: Apr. 5, 2016)

ABSTRACT

Bunch rot disease is one of the most important diseases of grapes caused by the storage rot fungi such as *Aspergillus tubingensis* and *Penicillium crustosum*. In this study, some biocontrol mechanisms of two *Pichia membranaefaciens* strains such as competitive potential, the siderophore and toxin production capacity, the interactions between yeast cells and fungal hyphae and also the ability of lytic enzymes production against fungal pathogens were investigated. The yeast strains showed higher competitive ability against the pathogens on PDA medium supplied with 4 g of dextrose. The yeast strains could inhibit the growth of the pathogens in dual culture test and also, had the siderophore and toxin production capacity. The results of the assay on the interactions between yeast cells and fungal hyphae demonstrated that yeast cells had a high capability of attaching to the pathogens hyphae. The ability of production of lytic enzymes was observed in yeast strains as well. In storage condition, P4 strain decreased the infection level *A. tubingensis* and *P. crustosum* in grapes by 49.16% and 62.64% respectively. This strain could also reduce the infection percentage by 44.88% and 50.3% respectively. The results of this study suggest the biocontrol ability of yeast strains against pathogens growth under both *in vivo* and *in vitro* conditions.

Keywords: Lytic enzymes, siderophore, toxin.

* Corresponding author E-mail: ashirzad@azaruniv.edu Tel: +98 914 3171291