

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

۱. سعیده رنجبر چهاربرج؛ ۲. اکبر شیرزاد*؛ ۳. مهدی ارزنلو

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷ - 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 ادامه این بررسی برهمکنش، توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده توسط جدایه‌ها نیز مشاهده شد. در شرایط انباری میزان آلودگی خوشه‌ها به بیمارگرهای *P. crustosum* و *A. tubingensis* توسط جدایه P4 به ترتیب ۴۹/۱۶ درصد و ۶۲/۶۴ درصد و توسط P5 به ترتیب ۴۴/۸۸ درصد و ۵۰/۳ درصد کاهش داده شدند. بنابر نتایج این تحقیق هر دو جدایه در شرایط آزمایشگاهی و انباری قابلیت کنترل بیولوژیک رشد بیمارگرها را دارند.

کلیدواژه‌گان: آنزیم‌های تجزیه‌کننده، سیدروفور، زهرابه.

مقدمه

کیفیت میوه‌ها بر اثر آلوده شدن به عامل‌های ساپروفیتی و پوسیدگی انباری به مخاطره می‌افتد و منجر به کاهش شدید ارزش بازاری آن‌ها می‌شود (Coates and Johnson 1989).

بیشتر بیمارگرهای عامل پوسیدگی از راه زخم‌هایی

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

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 به شدت 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 (میکروارگانسیم‌های) 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 ریشه (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

تهیه 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

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 *Penicillium*، *Monilinia*، *Rhizopus*، *Gleosporium*، *Fusarium*، *Geotrichum*، *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 گیاهی قارچی 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^۱ 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 خوشه انگور در شرایط آزمایشگاهی و انباری است. برای کنترل پوسیدگی خوشه انگور در شرایط انباری اقدام‌هایی مانند جلوگیری از آسیب دیدن فیزیکی و شیمیایی محصولات

قارچی *P. crustosum* و *A. tubingensis* به فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از لبه تشک پتری روی محیط کشت تولید سیدروفور (Sucrose 25 g, Ammonium sulphate 4 g, Potassium dibasic phosphate 3 g, Citric acid 1 g, sulphate 0.002 Magnesium sulphate 0.08 g, Zinc 20 g, Water 1000 ml) کشت داده شد. پس از کشت خطی جداگانه از هر دو جدایه مخمری در مقابل کلونی قارچی، تشک‌های پتری به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت به حاشیه کلونی‌های مخمری محلول پرکلرات آهن (۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن و ۰/۱ میلی‌مولار پرکلریک اسید) اضافه و سپس تشک‌های پتری به مدت پانزده دقیقه در هوای آزاد قرار داده شدند. توان تولید سیدروفور در جدایه‌های مخمری با مشاهده هاله نارنجی‌رنگ در حاشیه کلونی‌ها بررسی شد. این آزمون در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید آهن در محیط کشت تولید سیدروفور انجام و پس از رشد کامل کلونی‌های شاهد، درصد کاهش رشد بیمارگرهای قارچی بنابر رابطه 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 مبنای پس از ارزیابی توان تولید سیدروفور در جدایه‌ها، اثر یاخته‌های مخمری روی جوانه‌زنی اسپور بیمارگرها بررسی شد. در این آزمون به ۵ میلی‌لیتر آب‌میوه انگور سترون (استریل) شده با پالایشگر (فیلتر) ۰/۲ میکرومتری درون فالکن‌های ۱۵ میلی‌لیتری به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 1×10^7 cfu دو جدایه مخمری و 1×10^7 اسپور در میلی‌لیتر از بیمارگرهای *P. crustosum* و *A. tubingensis* اضافه شد. پس از مدت سیزده ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس وضعیت جوانه‌زنی صد اسپور هریک از بیمارگرهای قارچی با میکروسکوپ نوری شمارش و ثبت شد (Spadaro et al. 2002).

گونه‌های شناسایی شده بر پایه 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 جدایه آنتاگونیست P4 و P5 مخمر *Pichia membranaefaciens* از آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز تهیه شد و به منظور افزایش و کشت آن‌ها، در ارلن ۲۵۰ ml حاوی ۵۰ ml محیط NYDB^۱ 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 فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از لبه تشک پتری به صورت خطی در محیط کشت PDA اصلاحی حاوی ۴ گرم قند دکستروز به طور جداگانه کشت داده شدند، سپس در مقابل هر جدایه مخمری، یک دیسک از کشت جوان بیمارگرهای *P. crustosum* و *A. tubingensis* به فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از لبه تشک پتری قرار داده شد. این آزمون یک‌بار دیگر هم در PDA 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 رابطه ۱ محاسبه شد (Etebarian et al. 2005).

$$GI = \frac{C-T}{T} \times 100 \quad (1)$$

GI: درصد بازدارندگی، C: قطر رشد میسلیم در تیمار شاهد و T: قطر رشد میسلیم 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 به صورت جداگانه دیسک جوانی از بیمارگرهای

کشت PDB^۳، به مدت سه روز در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰rpm و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر دروایه 1×10^8 cfu از هر دو جدایه مخمری به‌طور جداگانه به هر یک از نمونه‌ها اضافه و به‌مدت سه روز در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰rpm و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. درنهایت همه ویژگی‌های ریختی میسلیموم‌های قارچی با بینوکولر در مقایسه با شاهد بررسی شدند (Masih and Paul 2002). به‌منظور بررسی نقش دیگر متابولیت‌های بازدارنده 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 *P. crustosum* و *A. tubingensis* در مرکز هر یک از تشتک پتری‌ها قرار داده و به فاصله ۴ سانتی‌متر از کلونی قارچی، دو جدایه 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 رابطه 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 تازه جدایه 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 ۱۰۰۰ ml, pH= 4.5) قرار داده شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. توان تولید زهرابه با تشکیل هاله بی‌رنگ شفاف در حاشیه کلونی‌های هر دو جدایه 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).

بررسی فعالیت قارچ انگلی مخمرهای آنتاگونیست در برابر بیمارگرهای قارچی

بررسی برهمکنش بین یاخته‌های مخمری و میسلیموم 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 آب‌میوه انگور و آگار قرار داده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۷۲ ساعت، به هر یک از تشتک‌ها ۵۰ میکرولیتر از دروایه با غلظت 1×10^8 cfu از هر جدایه مخمری P4 و P5 به‌طور جداگانه به حاشیه میسلیموم‌های رشدیافته اضافه و ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و به‌منظور حذف یاخته‌های مخمری که به میسلیموم‌های قارچی اتصال نیافته‌اند، با آب مقطر سترون به مدت دو دقیقه شسته شدند. این آزمون یک‌بار دیگر هم به منظور بررسی اثر مقادیر مختلف آب‌میوه انگور و ماده شیمیایی روی برهمکنش، در محیط کشت‌های WA^۱ با غلظت‌های ۳۰ درصد، ۲۰ درصد و ۱۰ درصد آب‌میوه انگور و SDS^۲ ۱٪/۱۰+WA انجام شد. در این آزمایش برای بررسی چگونگی ایجاد برهمکنش از یک ماده شیمیایی به‌نام سدیم دودسیل سولفات با نقطه اثر اتصال به ساختمان پروتئینی استفاده شد. سپس شمار یاخته‌های مخمری اتصال یافته به میسلیموم‌های قارچی در هر یک 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 ماده ضد قارچی کنند. برای این منظور پس از کشت جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 1×10^7 اسپور در میلی‌لیتر قارچی *P. crustosum* و *A. tubingensis* در ۵ میلی‌لیتر محیط

1. Water Agar
2. Sodium Dodecyl Sulphate

3. Potato Dextrose Broth

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 به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق به‌منظور خشک شدن قرار داده شدند. در نهایت حبه‌های انگور به‌طور تصادفی با سوزن سترون سوراخ و با سوسپانسیون 1×10^7 اسپور در میلی‌لیتر بیمارگرهای قارچی اسپری‌پاشی شدند. پس از فاصله زمانی دو ساعت، سوسپانسیون مخمری 1×10^8 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 درجه سلسیوس، میزان کاهش بیماری پوسیدگی خوشه انگور در مقایسه با شاهد بررسی شد (Zahavi *et al.* 2000).

بررسی توانایی مخمرهای آنتاگونیست در کلنیزاسیون بافت سطحی زخمی میوه انگور

برای بررسی کلنیزاسیون مخمرها در بافت سطحی زخمی میوه، حبه‌های انگور با سوزن سترون سوراخ و با سوسپانسیون حاوی 1×10^8 cfu اسپری‌پاشی شدند. در نهایت به مدت ده روز در شرایط انباری نگهداری شدند. در هر فاصله 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 مرحله رقیق‌سازی در محیط کشت NYDA، تشتک‌های پتری که در آن کلونی مخمرها قابل‌شمارش بودند انتخاب و جمعیت مخمرها در طول دوره زمانی نگهداری در شرایط انبار بررسی و ثبت شد (Fan and Tian 2000).

تجزیه و تحلیل آماری

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

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 میسلیم 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 ۲ mg/ml دیواره‌یاخته‌ای بیمارگرهای قارچی) منتقل و در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Lilly and Barnett 1951). سپس در فاصله زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت، نمونه‌ها از کاغذ صافی عبور داده شدند و در هر مرحله زمانی ۲۵۰ میکرولیتر از حالت (فاز) پالایش‌شده به ۲۵۰ میکرولیتر محلول لامینارین اضافه و به مدت دو ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به محصول واکنش منتقل و به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در نهایت پس از اضافه شدن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در نمونه‌ها، میزان جذب محصول واکنش در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر) خوانده و ثبت شد (Chan and Tian 2005).

بررسی فعالیت آنزیم اگزوکتیناز

برای این منظور پس از اضافه شدن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کیتین به ۰/۵ میلی‌لیتر محصول واکنش پالایش‌شده در فاصله زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت، به مدت دو ساعت در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید اضافه و به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت پس از اضافه شدن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون، میزان جذب محصول واکنش در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری خوانده و ثبت شد (Chan and Tian 2005). در هر دو آزمون برای استخراج دیواره‌یاخته‌ای بیمارگرهای قارچی

دکستروز مربوط به هر دو جدایه P4 و P5 بود. درحالی‌که بیشترین میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر *P. crustosum* مربوط به P4 بود. بنابراین احتمال دارد که قند به‌عنوان یک ماده مغذی بتواند عامل رقابت بین بیمارگرها 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 میسلیمی 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 *P. crustosum* و *A. tubingensis* توسط دو جدایه 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 (۱۰ و ۱۰۰ 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 جدایه مخمری با نمایان شدن هاله نارنجی‌رنگ پس از اضافه کردن محلول پرکلرات آهن به حاشیه کلونی‌های مخمر در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن اثبات شد (شکل ۱).

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

نتایج

شناسایی بیمارگرهای قارچی بر پایه مشخصات مولکولی و ریختی

بیمارگرهای قارچی *P. crustosum* و *A. tubingensis* بر پایه ویژگی‌های ریختی و به ترتیب با استفاده از کلیدهای کلیچ و پیت شناسایی شدند (Klich 2002, Pitt 1988). مقایسه توالی ناحیه ITS-rDNA ایجادشده در این تحقیق، با توالی‌های جدایه‌های استاندارد در بانک ژن (NCBI) (Blast Search) نشان داد که توالی هر دو جدایه 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 پایه ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها همخوانی داشت.

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

نتایج مقایسه میانگین داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که میزان بازدارندگی دو جدایه 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

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	
		<i>A. tubingensis</i>	<i>P. crustosum</i>
P4 strain	PDA culture medium with 20 g of glucose	31.48 ^a	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 رابطه $GI = \frac{C-T}{T} \times 100$ به دست آمده است که در آن GI: درصد بازدارندگی از رشد C: قطر رشد میسلیم در تیمار شاهد و T: قطر رشد میسلیم در بیمارگر است.

b. حروف همسان در هر ستون نشانگر نبود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است. مقایسه 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.

جدول ۲. 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

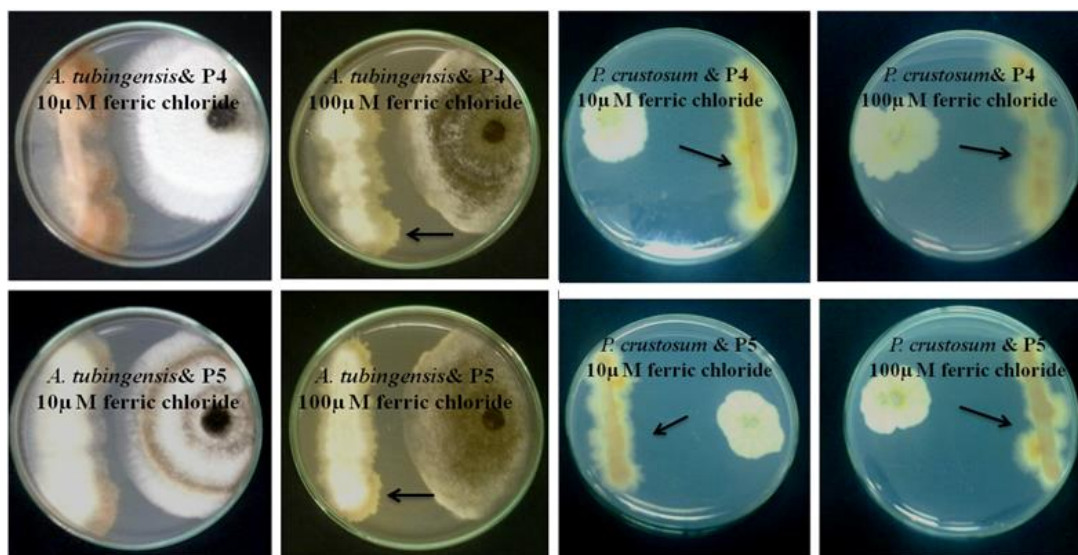
Yeast	Ferric chloride concentration (μM)	Fungal pathogens	
		<i>A. tubingensis</i>	<i>P. crustosum</i>
P4 strain	10	62.22 ^a a ^b	46 b
	100	55.89 a	42 b
	500	36 c	32.59 cd
P5 strain	10	49.63 b	61.78 a
	100	44 b	50 ab
	500	27.77 d	38.88 bc

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

b. حروف همسان در هر ستون نشانگر نبود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است. مقایسه 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.

^bValues 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 جدایه مخمری در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن در برابر قارچ‌های بیمارگر. جهت نما نشانگر تولید هاله نارنجی رنگ حاشیه 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)

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

میزان جوانه‌زنی اسپوره‌های بیمارگرهای قارچی در تعامل با یاخته‌های مخمر

جوانه‌زنی اسپوره‌های بیمارگرهای قارچی در حضور دروایه یاخته‌های مخمر به طور شایان توجهی کاهش یافته بود. به طوری که میزان جوانه‌زنی اسپوره‌های *A. tubingensis* و *P. crustosum* در تعامل با جدایه P4 به ترتیب ۲۴ درصد و ۳۰/۶۷ درصد و در تعامل با جدایه P5 به ترتیب ۲۲/۳۳ درصد و ۲۷/۳۳ درصد بود.

فعالیت میکوپارازیتی مخمرهای آنتاگونیست

برهمکنش بین یاخته‌های مخمر و میسلیم بیمارگرها مشاهده‌های میکروسکوپی نشان داد که دو جدایه مخمر

جدول ۳. برهمکنش بین یاخته‌های مخمری و میسلیم‌های بیمارگرهای قارچی در غلظت‌های متفاوت آب‌میوه و ماده شیمیایی

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

Yeast	Nutrients and chemical	Fungal pathogens			
		<i>A. tubingensis</i>		<i>P. crustosum</i>	
<i>P4 strain</i>	10% Grape juice agar	+	+	+	+
	20% Grape juice agar	+	+	+	+
	30% Grape juice agar	+	+	+	+
	0.1% SDS	-	-	-	-
<i>P5 strain</i>	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 = 0.04mm²).

++ close attachments (>1000 cells/unit), - no attachment, (1 unit = 0.04mm²).

جدول ۴. میزان بازدارندگی از رشد *A. tubingensis*

و *P. crustosum* در کشت دایره‌ای متحدالمرکز

(در محیط کشت PDA)

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

yeast	Fungal pathogens			
	<i>A. tubingensis</i>		<i>P. crustosum</i>	
<i>P4 strain</i>	84.41 ^a	a ^b	84.58	a
<i>P5 strain</i>	64.58	b	66.66	b

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

b. حروف همسان در هر ستون نشانگر نبود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است. مقایسه 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 جدایه مخمری نشان داد که هر دو جدایه *P4* و *P5* توانایی رشد و تولید آنزیم بتا-۱، ۳- گلوکوناز را در محیط کشت Lilly Barnett همراه شده با دیواره یاخته‌ای بیمارگرهای قارچی *A. tubingensis* و *P. crustosum* را دارند. بیشترین میزان تولید این آنزیم در جدایه *P4* و *P5* به ترتیب در دومین و چهارمین روز نگهداری بوده است. نتایج آزمایش مربوطه نشان داد که دیواره قارچی *A. tubingensis* منبع کربنی خوبی در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده توسط هر دو جدایه مخمر بوده است (شکل ۲).

ارزیابی فعالیت آنزیم اگزوکتینیناز

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

توان تولید مواد ضد قارچی در مخمرهای آنتاگونیست

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

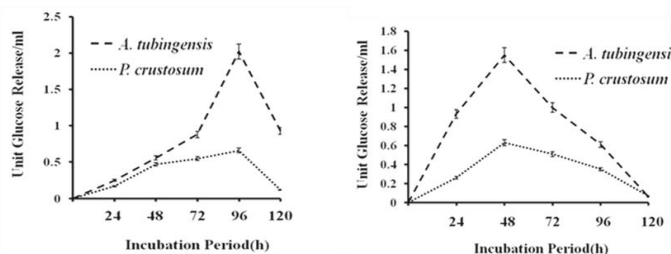
توان تولید زهرابه در مخمرهای آنتاگونیست

مشاهده‌ها نشان داد که هر دو جدایه *P4* و *P5* توانایی تولید زهرابه در شرایط اسیدی را دارند. به طوری که در اطراف کلونی‌های هر دو جدایه مخمر، هاله‌ای واضح و سفیدرنگ در محیط کشت MBA با معرف متیلن بلو مشاهده شد. این هاله شفاف اطراف کلونی‌های مخمر در کشت‌های متقابل با بیمارگرهای قارچی، به صورت یک ناحیه 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 جدایه *P5* بود (جدول ۴) و در این آزمون افزون بر نقش دیگر مواد بازدارنده در بازدارندگی از رشد بیمارگرها، هر دو جدایه آنتاگونیست وارد مرحله رشدی میسلیمومی 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.

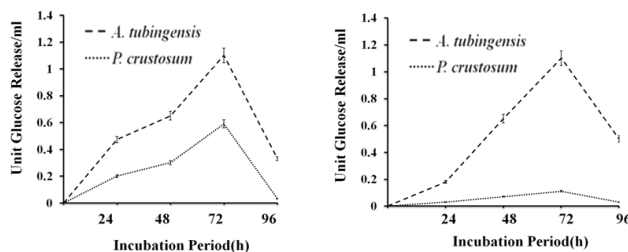
تولید این آنزیم در هر دو جدایه P4 و P5 در سومین روز نگهداری و نهفتگی (انکوباسیون) بوده است (شکل ۳).

همراه شده با دیواره یاخته‌ای از هر بیمارگر قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum* را دارند. بیشترین میزان



شکل ۲. فعالیت آنزیم بتا-۱، ۳- گلوکوناز دو جدایه مخمری P4 (سمت راست) و P5 (سمت چپ) در محیط کشت Lilly Barnett همراه شده با ۲ mg/ml دیواره یاخته‌ای از هر بیمارگر قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum*

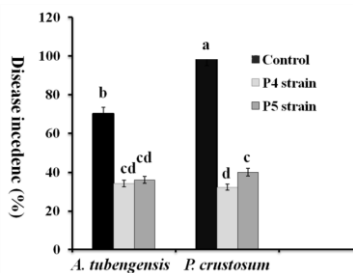
Figure 2. β -1,3-glucanase activity of P4 strain (Right) and P5 strain (Left) in Lilly–Barnett medium supplemented with 2 mg/ml CWP of *A. tubengensis* and *P. crustosum* fungal pathogen



شکل ۳. فعالیت آنزیم اگزوچیتیناز دو جدایه مخمری P4 (سمت راست) و P5 (سمت چپ) در محیط کشت Lilly Barnett همراه شده با ۲ mg/ml دیواره 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

جدایه‌ها در بافت سطحی میوه‌های زخمی شده است (شکل ۵).



شکل ۴. میزان آلودگی خوشه‌های انگور به بیمارگرهای قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum* تیمار شده با دو جدایه مخمری P4 و P5.

(مقایسه 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.

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

با توجه به شکل ۴، میزان بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی *A. tubengensis* و *P. crustosum* توسط جدایه P4 به ترتیب ۴۹/۱۶ درصد و ۶۲/۶۴ درصد و توسط جدایه P5، ۴۴/۸۸ درصد و ۵۰/۳ درصد در خوشه‌های تیمار شده در مقایسه با تیمارهای شاهد در شرایط انباری بود.

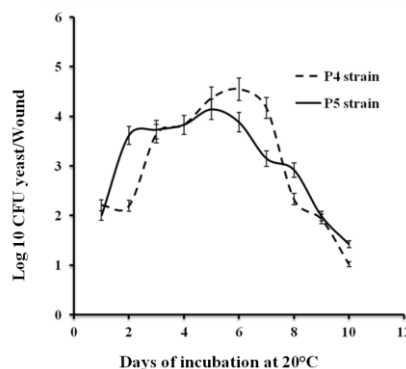
رشد جمعیت دو جدایه مخمری آنتاگونیست در کلنیزاسیون بافت سطحی میوه

نتایج ناشی از بررسی روند رشد جمعیت دو جدایه مخمر نشان داد که جمعیت هر دو مخمر آنتاگونیست در طول مدت نگهداری خوشه‌های تیمار شده در شرایط انباری تا روز هفتم، در بافت‌های زخمی افزایش یافته است و پس از این مدت به منظور به دست آوردن نتایج کنترلی بهتر نیاز به تکرار مایه‌زنی جدایه‌های مخمری است. روند افزایش جمعیت مخمرهای آنتاگونیست نشانگر کلنیزاسیون

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 جدایه 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، شایان توجه نبود و نکته شایان توجه در این آزمون، رشد جدایه‌ها در مقایسه با آزمون کشت متقابل در میزان پایین دکستروز تنها به صورت مخمری بود. در تحقیقی در رابطه با کنترل *Colletotrichum B. cinerea* توسط قارچ مخمر *Penicillium expansum* و *acutatum* 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 هنگامی که عامل محدودی در محیط غذایی وجود داشته باشد جدایه‌ها توانایی رقابتی بالایی از خود نشان می‌دهند. بر این مبنای احتمال تولید سیدروفور در شرایط کمبود آهن بررسی شد. تولید سیدروفور به دلیل جذب ترکیب آهنی مورد نیاز ریزجانداران در شرایط کمبود آهن در سازوکار کنترل زیستی مخمرها نقش مهمی دارد (Saravanakumar et al. 2008). با توجه به نتایج به دست آمده، هر دو جدایه 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



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 به عنوان 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 جدایه مخمر P4 و P5 برای کاهش رشد بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* در فضای رقابتی مشترک، با وارد شدن به مرحله 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* هنگامی که در محیطی با میزان پایین قند کشت داده شدند توانایی رقابتی بالایی در بازدارندگی از رشد *Botrytis cinerea* نشان دادند. در

Rhizopus stolonifer همخوانی داشت. در نتایج بررسی آنان نشان داده شد که یاخته‌های مخمری در محیط کشت ۲+WA درصد آب‌میوهٔ سیب، اتصالات بسیار محکمی به میسلیم‌های بیمارگرها داشته‌اند. پس از اتصال به‌منظور انگلی کردن میسلیم‌های بیمارگرها تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده کرده‌اند. در بخشی از این بررسی نشان داده شد که مادهٔ شیمیایی سدیم دودسیل سولفات از برقراری این اتصالات 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 انگلی کردن 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 *Cryptococcus 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

(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 انگلی کردن بیمارگرها در آغاز به‌طور محکم به میسلیم‌های 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 میسلیم‌های بیمارگرها به‌منظور بررسی توانایی اتصال یاخته‌های مخمر و انهدام میسلیم‌های 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 میسلیم بیمارگرهای *A. tubingensis* و *P. crustosum* در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که هر دو جدایهٔ مخمری توانایی بالایی در اتصال به ریشه‌های قارچی را دارند. درحالی‌که مادهٔ شیمیایی سدیم دودسیل سولفات بازدارندهٔ برقراری اتصال‌ها و برهمکنش بین یاخته‌های مخمری و میسلیم‌های 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 میسلیم‌های قارچی بلوکه شود یاخته‌های مخمر توان اتصال به میسلیم‌های قارچی را نخواهند داشت. درنتیجه، یاخته‌های مخمر برای انگلی کردن میسلیم‌های قارچی در آغاز به سطح خارجی میسلیم بیمارگرها متصل و سپس تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده می‌کنند. در بررسی دیگری، نتایج همسانی در رابطه با فعالیت قارچ انگلی مخمرها از راه اتصال به میسلیم 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 *Penicillium expansum* و *Monilinia fructicola*

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*، *Issatchenkia Kluyveromyces thermotolerance*، *Candida incommunis terricola* (Bleve et al. 2006) و *Candida oleophila* (Liu et al. 2012) و *C. albida* (Lutz et al. 2013) اثبات شده است.

نتیجه‌گیری کلی

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

جدایه مخمر در رویارویی با بیمارگر قارچی وارد مرحله میسلیمی شده، با اشغال فضای بیشتری از محیط، مواد مغذی بیشتری جذب کرده و بدین روش جدایه‌های مخمر، بازدارنده گسترش رشد بیمارگرها شدند. به طوری که در تیمار شاهد دیگری که حاوی یک دیسک از محیط کشت در مرکز به جای کلونی بیمارگر قارچی بودند جدایه‌های مخمر، رشد میسلیمی 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 دایره 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

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.
- Daive 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, Saylor 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, Bennett 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, Sangorrin 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 membranaefaciens* 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*. *Journal of 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-Hussain 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, Calvo 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.

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

Saiedeh Ranjbar Chaharborj¹, Akbar Shirzad^{2*} and Mahdi Arzanlou³

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.