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

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هفتم ● شماره ۳ ● صفحات ۱۸۲ تا ۱۸۹ ● پاییز ۱۳۸۸

کنترل بیولوژیکی دوجدایه مخمراز Saccharomyces cerevisiae علیه بیماری کپک آبی سیب (Penicillium expansum) در جهت کاهش آلودگی زیست محیطی

*جلال غلام نژاد[۱]، دکتر حسن رضا اعتباریان[۲]، محمد علی شیخ بیگ گوهرریزی[۳]، ابوذر نعمتی[۴]، فاطمه ناصری نسب[۵]

تاریخ اعلام وصول: ۸۸/۴/۲۸ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۸/۷/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: در دهه‌های اخیر باقیماندهٔ سموم بر روی میوه‌ها باعث ایجاد نگرانی‌هایی در جوامع علمی شده است. درحال حاضر کنترل بیولوژیک به عنوان یک روش جایگزین استفاده از سموم مطرح شده است و موفقیت‌های چشمگیری در زمینه استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت (از جمله کپک آبی سیب) به دست آمده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تحقیقاتی (original) دو گونه از مخمر Saccharomyces cerevisiae (۶۹، ۰۴) به جای قارچ‌کش‌های معمولی که برای کنترل بیماری انباری کپک آبی سیب مورد با عامل Penicillium expansum مورد استفاده قرار می‌گیرند، به کار گرفته شد. عامل کپک آبی سیب از بافت آلودهٔ سیب جداسازی شد. آزمون تست تقابل، متابولیت‌های خارج سلولی و مواد فرار در آزمایشگاه برای ارزیابی قدرت بیوکنترلی مخمرها به‌کار برده شد. در آزمایش‌های انباری زخم‌های ایجاد شده بر روی سیب با ۴۰µl میکرولیتر سوسپانسیون مخمر آنتاگونیست (۱۰۷ کنیدی در میلی لیتر) و ۲۴ ساعت بعد ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ عامل بیماری (۱۰۵ کنیدی در میلی لیتر) مایه زنی شد. سیب‌های مایه‌زنی شده در ۲۰°C و ۵°C در انبار قرار گرفتند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

یافته‌ها: همه جدایه‌ها رشد قارچ P.expansum هم در آزمایشگاه و هم در انبار را کاهش دادند. درآزمون کشت متقابل میزان کاهش رشد بین ۳۳/۱۲ تا ۵۸/۴، در مورد گاز فرار ۵۴/۹۳ تا ۷۲/۸۷ و در تست متابولیت‌های خارج سلولی بین ۵۰/۲۳ تا ۷۶/۲۳ متغییر بود. هر دو جدایه مخمر مساحت لکه‌ها را کاهش دادند. در تست‌های انباری مساحت لکه‌ها در روی سیب در ۵°C از ۱۴۱۶ تا ۱۴۳۵ میلی‌مترمربع در مقایسه با ۳۱۵۱/۱ میلی‌مترمربع، در شاهد کاهش نشان دادند. در دمای ۲۰°C مساحت لکه از ۱۳۴۷ تا ۱۵۹۸ متغییر بود در حالی‌که میانگین مساحت در شاهد ۳۲۵۷/۴ میلی‌متر بود.

نتیجه‌گیری: هر دو ایزوله از مخمر S. cerevisiae علیه کپک آبی سیب در هر دو دما موثر بودند و می‌توانند به عنوان دوعامل بیوکنترل جدید کپک آبی سیب به کار برده شوند.

کلمات کلیدی: Saccharomyces cerevisiae، Penicillium expansum، بیوکنترل، تست مواد فرار، تست متابولیت‌های خارج از سلولی، محیط زیست

مقدمه

سیب یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در دنیا و ایران است. یکی از مناطق عمده تولید این محصول در شمال غرب ایران واقع شده است. نظر به استفاده از سیب در تمام سال نیاز این محصول

۱ـ پژوهشگر علوم کشاورزی، ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه گیاه پزشکی، کارشناسی ارشد (*نویسنده مسوول)
تلفن: ۰۹۱۳۲۵۱۷۲۷۷ آدرس الکترونیک: jalalgholamnejad2006@gmail.com
۲ـ استاد، ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه گیاه پزشکی
۳ـ پژوهشگر علوم کشاورزی، ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه باغبانی، کارشناسی ارشد
۴ـ پژوهشگر علوم کشاورزی، ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد
۵ـ پژوهشگر علوم کشاورزی، ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه گیاه پزشکی، دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد

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

به انبارداری امری اجتناب ناپذیر است.

با وجود امکانات و تجهیزات پیشرفته انبارداری خسارات بعد از برداشت میوه‌ها و سبزیجات در حدود ۴۰ –۱۰ درصد ارزیابی شده است (۱).

مهمترین قارچ‌هایی که در انبار به سیب خسارت می‌زنند Penicillium expansum: Link عامل کپک آبی سیب، Botrytis cinerea Pers: Fr. عامل کپک خاکستری سیب و قارچ‌های دیگری نظیر Alternaria sp. می‌توان نام برد (۲).

از موثرترین راه‌ها برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت استفاده از قارچ کش‌ها از جمله تیابندازول است، اما به دلیل به مخاطره افتادن سلامت انسان از یک طرف و مقاومت قارچ‌ها به سموم از طرف دیگر ضرورت دستیابی به روش‌های جایگزین برای کنترل شیمیایی را طلب می‌کند (۳).

درحال حاضر افزایش نگرانی‌ها را در مورد به مخاطره افتادن سلامت انسان ناشی از باقیماندهٔ سموم بر روی محصولات انباری از یک طرف، افزایش مقاومت قارچ‌ها ناشی از استفادهٔ روز افزون قارچ‌کُش‌ها از طرف دیگر دانشمندان را به فکر استفاده روش‌های جایگزین از قارچ‌کش انداخته است (۴).این مواد شیمیایی علاوه بر این که بر روی میوه باعث ایجاد بیماری‌های خطرناک از جمله سرطان در انسان می‌شوند، باقیمانده‌های به دلیل دیر تجزیه شدن آن‌ها ممکن است وارد ذخایر آب زیر زمینی و باعث آلودگی آب‌های زیر زمینی شود. در نتیجه کنترل بیولوژیک با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به عنوان یک روش جایگزین امیدبخش پیشنهاد شد.

در میان روش‌های مختلف پیشنهادی کنترل بیولوژیک از موفقیت نسبی بیشتری برخوردار شد. این روش به تنهایی و یا بخشی از روش‌های کنترل بیماری‌های بعد از برداشت مورد بررسی قرار گرفت (۵).

در این بررسی دو جدایه از مخمر Saccharomyces cerevisiae از پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج دریافت شد. یک جدایه از قارچ Penicillium expansum هم از سطح سیب‌های آلوده جداسازی گردید و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی گردید.

جدایه‌های مخمر در کنترل قارچ عامل بیماری کپک آبی سیب (P.expansum) در شرایط آزمایشگاه و در شرایط انبار روی میوه سیب مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تحقیقاتی (original) می‌باشد.

عامل بیماری: قارچ عامل بیماری (Penicillium expansum) از میوه آلوده سیب سردخانه مهرشهر کرج جدا و خالص سازی گردید. این جدایه قارچی روی محیط Potato Dextrose Agar (PDA) در دمای ۴°C نگهداری و هر چند وقت یک‌بار جهت حفظ خصوصیات فیزیولوژیکی و بیماریزایی به سیب مایه زنی شده و از آن جدا شد (۶).

آنتاگونیست: دوجدایه از مخمر S. cerevisiae از پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج دریافت شد.

تهیه سوسپانسیون قارچ عامل بیماری: سوسپانسیون قارچ عامل بیماری از کشت ۷ تا ۱۰ روزه روی محیط کشت PDA تهیه شد. به این ترتیب که با یک لوپ مقداری از اسپور قارچ عامل بیماری برداشته شد و سپس در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم) توین ۲۰ غوطه ور گردید. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت مورد نیاز استفاده شد. غلظت مورد نیاز (۱۰۵×۱کنیدی در هر میلی لیتر) با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر استریل به دست آمد (۷).

تهیه سوسپانسیون آنتاگونیست: در هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ۵۰ میلی لیتر از محیط NYDA (Nutrient Yeast Dextrose Agar) ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شد. پس از سرد شدن محیط به هر ارلن مایر یک لوپ از سلول‌های مخمر افزوده شد. سپس ارلن مایرها روی شِیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس سلول‌های مخمر با سانتریفیوژ g × ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه از محیط مایع جدا شده و دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (۸). پس از آن با استفاده از لام هماسیتومتر سوسپانسیون آنتاگونیست در غلظت‌های مورد نظر (10^5، 10^6، 10^7، 10^8 سلول در میلی لیتر) تهیه گردید.

سیب: سیب‌های مورد استفاده در این بررسی سیب‌های زرد رقم گُلدِن دِلیشِز بودند که از باغات دماوند تهیه شده بود. پس از شست و شوی سیب‌ها با آب، سیب‌ها به مدت ۱ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱٪ تجاری قرار داده و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۵٪ شسته شده و سرانجام سه بار با آب مقطراستریل

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

آب کشیده شدند. سپس بر روی هر سیب سه چاهک به فواصل مساوی با میخ استریل به قطر ۲/۵ mm وبه عمق ۳mm زده شد (۹).

اثر ایزوله‌های S. cerevisiae روی قارچ expansum در شرایط آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل (Dual culture)

این آزمون بر اساس روش Dennis and Webster (۱۹۷۱) انجام شد (۱۰). ابتدا هر پتری به کمک ماژیک به دو قسمت مساوی تقسیم شد سپس درون هر تشتک پتری به میزان ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت PDA ریخته شد. پس از جامد شدن محیط در یک نیمه ازتشتک پتری در فاصله یک سانتی متری از لبه آن پلاکی از محیط کشت جوان قارچ بیمارگر (۲روزه روی WA) قرار داده شد. جدایه‌های مخمر در محیط NYDB کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با ۲۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس ۴۸ ساعت بعد از گذاشتن پلاگ قارچ عامل بیماری، به کمک لوپ استریل نیمی از سطح محیط کشت به سوسپانسیون هر کدام از جدایه‌های مخمر آغشته گردید. برای شاهد به جای سوسپانسیون مخمر از آب مقطر استریل استفاده گردید. پتری‌ها به مدت ۱۸ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس قطر کلونی جدایه‌های قارچ اندازه‌گیری شده و مساحت آنها محاسبه شد. پس از اینکه در تیمار شاهد قارچ به خط وسط پتری رسید، میزان رشد شعاعی جدایهٔ قارچ اندازه گیری و سپس مساحت کلونی قارچی محاسبه شد و در نهایت درصد کاهش رشد مسیلیوم قارچ با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۱).

$$n = (a - b)/a \times ۱۰۰$$

n = درصد بازدارنگی از رشد عامل بیماری

a = مساحت کلونی عامل بیماری در پتری شاهد

b= مساحت کلونی عامل بیماری در پتری تیمار

آزمون تولید مواد فرار ضد قارچی توسط جدایه‌های آنتاگونیست

این آزمون مطابق روش لیلبرو (۲۰۰۵) Lillbro انجام شد (۱۲). دو لوپ از سوسپانسیون سلول‌های مخمر در محیط NYDB از کشت ۲۴ ساعته در روی محیط MEA (Malt Extract Agar) کامل پخش شد. سپس در پتری دیگر حاوی محیط PDA پلاگی از قارچ (محیط کشت ۶ روزه) به قطر ۱ سانتی متر در وسط این محیط کشت قرار داده شد. سپس در کنار شعله و در شرایط استریل تشتک‌های حاوی قارچ عامل بیمارگر و مخمر روی هم قرار داده شد و لبه‌های آنها به کمک پارافیلم کامل پوشانیده بعد از ۲۵ روز قطر کلونی‌های قارچ اندازه‌گیری و سپس مساحت آنها محاسبه گردید و طبق فرمول ذکر شده در بند ۲-۶-۱ درصد کاهش رشد میسیلیومی قارچ به دست آمد.

آزمون تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌های آنتاگونیست

این آزمون مطابق روش Weller (۱۹۸۸) انجام شد (۱۳). ابتدا سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست که در محیط NYDB به روش گفته شده تهیه شده بودند در روی محیط PDA به صورت یکنواخت کشت داده شدند. سپس پتری‌ها به مدت ۹۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵±۱ C° قرار گرفتند. بعد از این مدت در شرایط استریل زیر هود، کلونی‌های مخمر با کمک پنبه استریل از سطح محیط پاک شدند. سپس پتری‌ها وارونه شده و یک پنبه آغشته به کلروفرم در درون پتری و بر روی درب آن قرار داده شد تا باقیمانده‌های مخمر نیز در معرض بخار کلروفرم قرار گیرند و به‌طور کامل کشته شوند. بعد از مدت ۲۵ دقیقه درب پتری‌ها را به صورت نیمه باز کرده تا بخار کلروفرم به‌طور کلی خارج شود. سپس یک پلاگ ازکشت ۴۸ ساعته قارچ عامل بیماری در وسط پتری‌ها قرار داده شد این پلاگ به منظور جلوگیری از پخش شدن اسپور از روی محیط WA برداشته شد. در پتری شاهد نیز به جای جدایه مخمر از آب مقطر استریل استفاده شد. بعد از ۱۸ روز قطر کلونی قارچ اندازه‌گیری شد.وطبق فرمول موجود در بند ۲-۶-۱ درصد کاهش رشد محاسبه گردید. این آزمون‌ها هر کدام به صورت جداگانه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های مخمر در شرایط دمایی ۲۰°C و ۵°C

سیب‌ها ابتدا کامل با آب شسته شدند و بعد همان‌طور که در بند ۲-۵ توضیح داده شده است ابتدا ضد عفونی و سپس سوراخ شدند. پس از این مرحله ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر (تهیه شده با توجه به بند ۲-۴) با غلظت میلی لیتر $۱\times۱۰^{+۷}$/ CFU، به هر چاهک از سیب

تلقیح شد. سپس سیب‌ها هر کدام داخل یک ظرف یک‌بار مصرف گذاشته شده و در نهایت با خود ظرف داخل یک کیسه پلاستیکی گذاشته شدند. جهت حفظ رطوبت و جلوگیری از خشک شدن سیب‌ها با آب استریل در درون کیسه‌ها اسپری شد ورطوبت نسبی درون کیسه‌ها در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) نگه داشته شد. در این آزمایش ما دو تیمار مخمر (دوایزوله مخمر) و یک شاهد داریم. به ازای هر تیمار ۴ سیب را مورد آزمایش قرار می‌دهیم در نتیجه حجم نمونه‌های مورد آزمایش قرار گرفته در هر دما ۸ عدد سیب می‌باشد و ۴ عدد سیب هم مربوط به شاهد می‌باشد.

پس از ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچی (تهیه شده با توجه به بند۲-۳) به داخل چاهک‌های تیمار شده با سوسپانسیون مخمری تلقیح شد. وسپس سیب‌ها با پلاستیک و حفظ رطوبت لازم به انبارهای موردنظر و با دمای مشخص انتقال داده‌شدند. زخم‌های مایه کوبی نشده، با آب مقطر استریل تیمار شدند (۶). سیب‌ها در دمای ۱±۲۰ و ۵درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سیب‌ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۰°C نگهداری شدند و هر ۸ روز یک‌بار قطر لکه‌ها، همچنین جمعیت قارچ و جمعیت مخمر اندازه‌گیری می‌شد.

در دمای۵°C نیز سیب‌ها به مدت ۳۲ روز نگهداری شدند و هر ۱۰ روز یک‌بار قطر لکه‌ها، همچنین جمعیت قارچ و جمعیت مخمر اندازه‌گیری می‌شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی غلظت‌های مختلف جدایه‌های مخمر (10^5، 10^6، 10^7 و 10^8) در کنترل بیماری کپک آبی سیب در شرایط دمایی ۲۰°C

در این آزمایش در چاهک‌های ایجاد شده بر روی سیب‌ها ابتدا ۴۰ µL از سوسپانسیون مخمری مانند آنچه که در بند ۲-۴ شرح داده شد تهیه شد، با این تفاوت که غلظت‌های مختلف 10^5، 10^6، 10^7و10^8 سلول در میلی لیتر به دست آمد. هر دو ایزولهٔ مخمری در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت‌های مذکور به داخل هر چاهک مایه زنی شد، ۲۴ ساعت بعد ۲۰µL سوسپانسیون 10^5 اسپور در هر میلی لیتر در داخل هر چاهک مایه زنی شد و مانند بند ۲-۷ سیب‌ها در ظروف پلاستیکی قرار داده شدند و سپس در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند، در این آزمایش ما دو جدایه مخمری و چهار غلظت مخمر و یک تیمار شاهد داریم در نتیجه حجم نمونه‌های مورد آزمایش ۳۶، ۱۶ عدد برای هر تیمار و ۴ عدد سیب مربوط به شاهد می‌باشد (۱۳).

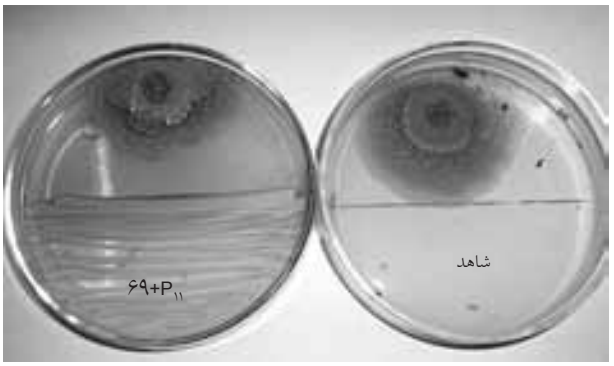
تعیین جمعیت مخمر وقارچ

این آزمایش طبق روش Nunes et al. (۲۰۰۱) با کمی تغییر انجام شد (۱۲). این آزمایش فقط در مورد جدایه مخمری ۶۹ انجام گرفت. در این‌جا از محل زخم‌ها توسط چوب پنبه سوراخ‌کن و به کمک اسکالپل قطعاتی به وزن ۱ گرم بیرون آورده شد و در میلی لیتر ۹ آب مقطر استریل قرار داده شد به مدت ۲-۱ دقیقه ورتکس شد تا کامل مخلوط شود سپس از این سوسپانسیون تا رقت 10^{-6} تهیه شد در همه این رقت‌ها لوله‌ها با استفاده از دستگاه ورتکس به‌طور کامل همگن شدند.سپس ۲۰۰ µL از این سوسپانسیون‌ها بر روی محیط PDA ریخته شد و پس از ۴۸ ساعت ت عداد کلونی‌های مخمر با دستگاه کلنی کانتر مورد شمارش قرار گرفت. برای هر تیمار (رقت) ۴ تکرار در نظر گرفته‌شد (۳).

یافته‌ها

اثر ایزوله‌های S. cerevisiae روی قارچ بیمارگر درشرایط آزمایشگاه

نتایج آزمون کشت متقابل نشان داد که هر دو ایزوله مخمری نسبت به شاهد (آب مقطر استریل) باعث کاهش رشد میسیلیوم قارچ شدند و در نتیجه اثر بازدارندگی بر روی قارچ بیمارگر داشتند. در این آزمون ایزوله ۶۹، ۵۸/۴ درصد و ایزوله‌ی ۰۴، ۳۳/۱۲ درصد رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر را کاهش داد.(شکل ۱) در آزمون تولید مواد



شکل ۱- اثر آنتاگونیست Saccharomyces cerevisiae ۶۹ در آزمون کشت متقابل در تقابل با پاتوژن P_{11}

جدول ۱- اثر ایزوله‌های مخمری ۶۹ و ۰۴ از مخمر S. cerevisiae بر روی رشد قارچ P.expansum

کشت متقابل	مواد فرار	تولید آنتی بیوتیک	تیمار
Dual cultur	**Volatile metabolites**	**Production of antibiotic**	**Treatments**
۵۸/۴ b	۵۴/۹۳ b	۷۶/۲۳ b	P+۶۹
۳۳/۱۲b	۷۲/۸۷ b	۵۰/۲۳c	P +۰۴
۰a	۰a	۰a	آب مقطر + p

اعداد جدول میانگین چهار تکرار است. اعدادی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن (P<۰/۰۵) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.
ایزوله‌های ۶۹ و ۰۴مربوط به مخمر S. cerevisiae و P قارچ بیمارگر P.expansum است

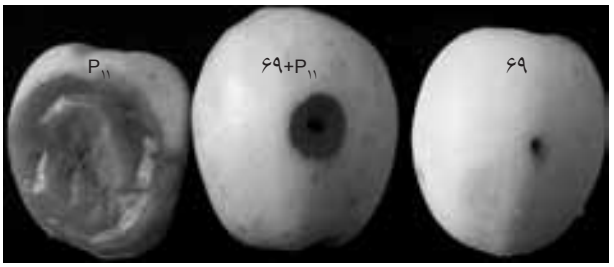
فرار ایزوله ۶۹ با ۵۴/۹۳ درصد و ایزوله ۰۴ با ۷۲/۸۷ درصد باعث کاهش رشد قارچ بیمارگر شدند و هر دو ایزوله نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار از خود نشان دادند. در آزمون تولید آنتی بیوتیک نیز همه ایزوله‌ها با شاهد تفاوت معنی‌دار داشتند. در این آزمون ایزوله ۶۹، ۷۶/۲۳ درصد و ایزوله‌ی ۰۴، ۵۰/۲۳ درصد کنترل کنندگی بر روی قارچ عامل بیمارگر داشتند. (جدول ۱)

اثر آنتاگونیستی جدایه‌های مخمر در شرایط دمایی ۲۰°C و ۵°C

هر دو جدایه ۶۹ و ۰۴ مربوط به مخمر S. cerevisiae در کنترل کپک آبی سیب در هر دو دمای ۲۰°C و ۵°C مؤثر بود.

در۲۰°C مساحت لکه پوسیدگی در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست۶۹ هشت روز پس از مایه زنی با عامل بیمارگر mm^2 ۷۶۶/۱۷ در مقایسه با mm^2 ۱۷۸۱/۴۲ در شاهد و پس از پانزده روز mm^2 ۱۳۴۷/۲ در مقایسه با mm^2 ۳۲۵۷/۴۴در شاهد بود. در مورد ۰۴ هشت روز پس از مایه زنی با عامل بیمارگر mm^2 ۸۵۲/۰۷ در مقایسه با mm^2 ۱۷۸۱/۴۲ در شاهد و پس از پانزده روز mm^2 ۱۵۹۸/۹ در مقایسه با mm^2 ۳۲۵۷/۴۴در شاهد بود (شکل۲)، (جدول ۲).

در۵°C، مساحت لکه پوسیدگی در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست ۶۹ بیست روز پس از مایه زنی با عامل بیمارگر mm^2 ۳۷۲/۱۱ در مقایسه با mm^2 ۸۲۵/۷۸ در شاهد و پس از سی دو روز mm^2 ۱۴۱۶/۱ در مقایسه با mm^2 ۳۱۵۱/۱۷ در شاهد بود. در مورد ۰۴ بیست روز پس از مایه زنی با عامل بیمارگر mm^2 ۴۴۵/۴۶ در مقایسه با mm^2 ۸۲۵/۷۸در شاهد و پس از سی و دو mm^2 ۱۴۳۵/۶۵ در مقایسه با mm^2 ۳۱۵۱/۱۷ در شاهد بود. (جدول ۳)



شکل ۲- اثر بازدارندگی مخمر آنتاگونیست ۶۹ S. cerevisiae از گسترش پوسیدگی روی سیب توسط قارچ بیماری‌زا بعد از ۸ روز نگهداری در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد

بررسی اثر آنتاگونیستی غلظت‌های مختلف جدایه‌های مخمر

در مورد هر دو مخمر ۶۹ و ۰۴ سطوح رقت $۱۰^۷$و $۱۰^۸$تفاوت معنی‌داری باهم ندارند. بهترین سطوح کنترل کنندگی در مورد این دو مخمر همان سطح $۱۰^۷$ است. به عبارت دیگر زمانی که مخمرها

جدول ۲- مساحت پوسیدگی سیب‌های مایه زنی شده با P. expansum بعد از تیمار با ۶۹ و ۰۴ از مخمر S. cerevisiae پس از ۸ و ۱۵ روز در دمای ۲۰°C

مساحت پوسیدگی(cm^2) پس از ۱۵ روز	مساحت پوسیدگی(cm^2) پس از ۸ روز	تیمار
۳۲۵۷/۴۴a	۱۷۸۱/۴۲a	*P. expansum*
۱۳۴۷/۲ b	۷۶۶/۱۷ b	P+۶۹
۱۵۹۸/۹ b	۸۵۲/۰۷ b	P+۰۴

هر تیمار دارای ۴ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن (P<۰/۰۵) با هم اختلاف معنی‌دار دارند.
ایزوله‌های ۶۹ و ۰۴مربوط به مخمر S. cerevisiae و P قارچ بیمارگر P.expansum است

جدول ۳- مساحت پوسیدگی سیب‌های مایه زنی شده با P. expansum بعد از تیمار با ۶۹ و ۰۴ از مخمر S. cerevisiae پس از ۲۰ و ۳۲ روز در دمای ۵°C

تیمار	مساحت پوسیدگی(cm^2) پس از ۲۰روز	مساحت پوسیدگی(cm^2) پس از ۳۲ روز
P. expansum	۸۲۵/۷۸a	۳۱۵۱/۱۷a
P+۶۹	۳۷۲/۱۱b	۱۴۱۶/۱۵ b
P+۰۴	۴۸۵/۸b	۱۴۳۵/ ۶۵b

هر تیمار دارای ۴ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن(P<۰/۰۵) با هم اختلاف معنی‌دار دارند.
ایزوله‌های ۶۹ و ۰۴مربوط به مخمر S. cerevisiae و P قارچ بیمارگر P.expansum است

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف مخمر ۶۹ و ۰۴ از مخمر S. cerevisiae در کنترل بیماری کپک آبی میوه سیب بر روی سیب رقم زرد مایه زنی شده با جدایه P۱۱ از قارچ P. expansum، در دمای ۲۰°C

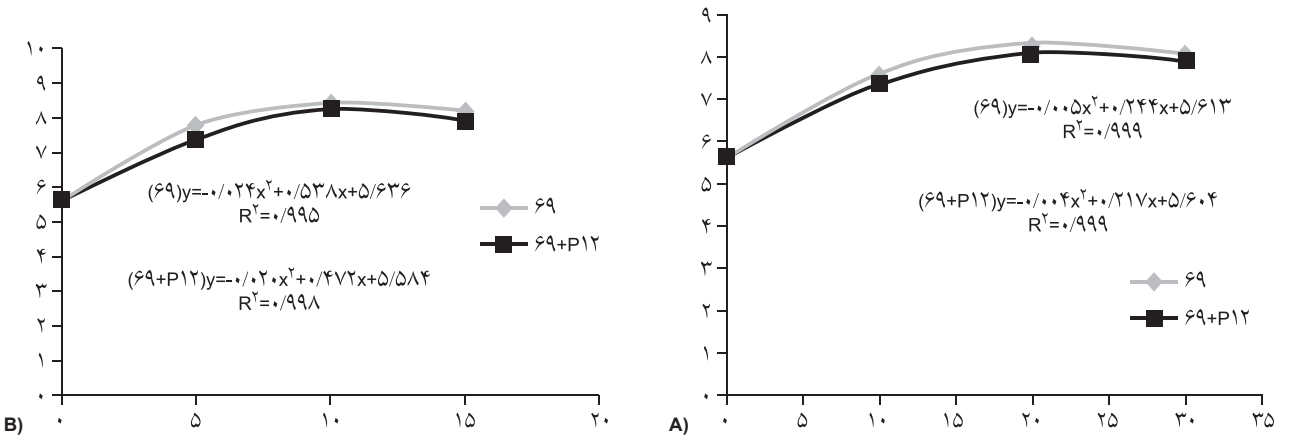
غلظت‌های مختلف مخمر	مساحت لکه‌های ایجاد شده در اثر جدایه‌ی P_{11}
۶۹ *S. cerevisiae* $۱۰^۵$ سلول در میلی لیتر	۸۸۱/۲f
۶۹ *S. cerevisiae* $۱۰^۶$ سلول در میلی لیتر	۶۹۸/۳g
۶۹ *S. cerevisiae* $۱۰^۷$ سلول در میلی لیتر	۳۰۹/۲۴h
۶۹ *S. cerevisiae* $۱۰^۸$ سلول در میلی لیتر	۲۳۸h
۰۴ *S. cerevisiae* $۱۰^۵$ سلول در میلی لیتر	۱۴۳۳/۵۸c
۰۴ *S. cerevisiae* $۱۰^۶$ سلول در میلی لیتر	۱۳۰۴/۸۸d
۰۴ *S. cerevisiae* $۱۰^۷$ سلول در میلی لیتر	۱۱۵۲/۵۹e
۰۴ *S. cerevisiae* $۱۰^۸$ سلول در میلی لیتر	۸۴۴/۶۶e
Control	۳۰۶۱/۰۸a

اعداد جدول میانگین چهار تکرار می‌باشند.
تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده‌شده‌اند در آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.
داده‌ها نرمال بودند.

در غلظت $۱۰^۷$ به کار روند با سطوح پایینی خود اختلاف معنی‌دار دارند، ولی زمانی که غلظت از$۱۰^۷$ بالاتر رفت دیگر تفاوتی در سطوح کنترل کنندگی مخمرها رخ نمی‌دهد. (جدول ۴)

تعیین جمعیت مخمر و قارچ

لگاریتم جمعیت جدایه‌ی مخمری ۶۹ در میوه‌های تلقیح شده با مخمر آنتاگونیست و قارچ عامل بیماری در هر دو دما (۵، ۲۰



شکل۳- منحنی تغییرات جمعیت مخمر۶۹ S. cerevisiae در دمای ۵°C (شکل A) و ۲۰°C اعداد مربوط به نمودار، میانگین سه تکرار است

درجه‌ی سانتی‌گراد) افزایش یافته و معادله آن بر روی نمودار ذکر شده است که در آن y لگاریتم تعداد مخمرها و x تعداد روزهای پس از تلقیح است در مورد این مخمر جمعیت آن تا روز بیستم افزایش پیدا کرد، در روز بیستم به بیشترین مقدار خود رسید و سپس سیر نزولی طی کرد. (شکل۳)

بحث و نتیجه‌گیری

در آزمون کشت متقابل جدایه‌های آنتاگونیست به خوبی رشد میسلیومی عامل بیماری را کنترل نکردند، این امر نشان می‌دهد که شاید مخمرهای آنتاگونیست در محیط آگاردار آنتی بیوتیکی بر علیه قارچ عامل بیماری تولید نکرده‌اند.

در آزمون‌های آزمایشگاهی ما سطح کنترل کنندگی آنتاگونیست‌ها در آزمون تولید آنتی بیوتیک قابل توجه بوده است، نتیجه این آزمون با نتایج آزمون ذکر شده یعنی آزمون تقابل مطابقت ندارد، چون در این آزمون به میزان زیادی یعنی ۷۶/۲۳ درصد کنترل کنندگی مشاهده شد؛ که این امر نشان دهنده‌ی تولید آنتی بیوتیک زیاد در محیط کشت است. البته مقداری هم می‌تواند به علت بقایای زنده‌ی مخمر در محیط کشت باشد.

کنترل کنندگی این دو جدایه مخمر در آزمون متابولیت‌های فرار در سطح بالایی قرار داشت این میزان در بالاترین مقدار ۷۲/۸۷ بود. اغلب کشت‌های مخمری اسیدهای فرار و غیر فرار تولید می‌کنند (۱۴). ترکیبات فرار و غیرفرار تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های بیوکنترل ممکن است در کنترل عامل بیماری مؤثر باشد (۱۵).

نتایج آزمایش‌های انباری ما نشان داد که این دو جدایه آنتاگونیست توانایی کاهش شدت پوسیدگی و جلوگیری از رشد و توسعه قارچ عامل بیماری را دارا هستند. گزارش شده است که کنترل کپک‌ها در سوراخ‌های ایجاد شده روی میوه به مراتب سخت‌تر از کنترل آنها در بریدگی‌های سطحی ایجاد شده روی میوه است. هرچند که غلظت بالاتری از آنتاگونیست در سوراخ‌ها استفاده می‌شود ولی محیط سوراخ برای رشد پاتوژن در مقایسه با آنتاگونیست مناسب‌تر است (۱۶).

مخمرهای مورد استفاده در این تحقیق هم در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و هم در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد قادر به کنترل قارچ عامل بیماری بوده‌اند. توانایی تطبیق این مخمرها با دامنه وسیعی از دما، باعث می‌شود که آن‌ها بتوانند در مکان‌های مختلفی اعم از سردخانه، در حمل ونقل و نیز در مغازه‌ها، دوام داشته و قابل استفاده باشند. در آزمون مربوط به غلظت‌های مختلف مخمری نشان داده شد که فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های مورد بررسی به غلظت آن‌ها وابسته بوده و وقتی غلظت‌های $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۸}$ سلول در میلی لیتر استفاده شد در غلظت‌های $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر نسبت به غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی لیتر ازنظر سطح کنترل کنندگی در سطح پایین تری بودند در حالی‌که در غلظت $۱۰^{۸}$ سلول در میلی لیتر تفاوت معنی‌داری با غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی لیتر نداشت و از نظر کنترل کنندگی با آن در یک سطح قرار داشت. نتایج کار ما با نتایج کار جمالیزاده و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت داشت (۱۷).

منحنی‌های رشدی آنتاگونیست نیز نشان داد که بعد از ۱۵ روز در دمای ۲۰°C و ۳۲ روز در دمای ۵°C نه تنها مخمرها در زخم‌ها وجود دارند بلکه مقدار آن‌ها بیشتر از مقدار اولیه‌ی تلقیح شده‌ی آن‌ها است. این منحنی‌های رشد ثابت می‌کند که هردو ایزوله آنتاگونیست می‌توانند درچاهک‌های سیب رشد کنند و آن‌ها را کلنیزه کنند. یعنی بعد از ۲۰ روز در دمای ۵ درجه سانتی گراد تعداد سلول‌های زنده نسبت به آنچه در ابتدا به داخل زخم‌ها مایه زنی شده بود بیشتر بود. می‌توان گفت که به‌طور احتمالی این آنتاگونیست‌ها ظرفیت بالایی برای کلنیزه کردن زخم‌ها دارند و می‌توانند آنتاگونیست‌های مؤثری باشند. نتایج کار ما با نتایج میکانی و همکاران که کنترل بیولوژیک کپک خاکستری سیب به وسیله‌ی Pseudomonas fluorescens بود مطابقت داشت (۱۸).

نتایج آزمایش‌های ما در مورد مکانیسم آنتاگونیستی این مخمرهای آنتاگونیست پیشنهاد می‌کند که تولید ترکیبات فرار، پارازیتیسم، القای مقاومت و تا حدی هم تولید آنتی بیوتیک‌ها از جمله مکانیسم‌های به کار گرفته شده توسط مخمرهای آنتاگونیست می‌باشد. این نتایج با نتایج کار Batta که به کارگیری قارچ Trichoderma harzianum علیه کپک آبی سیب بود مطابقت داشت (۱۹).

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این دو ایزوله‌ی مخمری دارای توان بیوکنترلی بر علیه بیماری کپک آبی سیب هستند. استفاده از مخمرها یک تکنولوژی جدید برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت می‌باشد و در طولانی مدت می‌توان انتظار داشت که این مواد بیولوژیکی سطح کنترل قابل مقایسه‌ای را با سطح کنترل

قارچ کش‌های شیمیایی به وجودآورند. در آزمایشی که اسپارادو و همکاران انجام دادند مخمر Metcshnokowia pulcherrima سطح کنترل کنندگی همانند قارچکش تیابندازول علیه کپک آبی سیب داشت. در نتیجه از این مخمرها می‌توان در محیط زیست استفاده کرد و علاوه بر کم کردن خسارت قارچکش‌ها بر روی انسان از مقاومت قارچ‌ها در برابر این عوامل کاست (۲۰).

تا کنون در ایران پژوهشی جامع و کاربردی راجع به کنترل بیولوژیک بیماری‌های بعد از برداشت بالاخص کپک آبی سیب به وسیلهٔ مخمرها صورت نگرفته است. نظر به جایگاه عوامل بیوکنترل و استفاده از آن‌ها به جای قارچکش‌ها استفاده از این عوامل کنترل بیولوژیک امری اجتناب پذیر در ایران است. امید است دیگر محققان در زمینه‌های علوم زیستی، پزشکی و کشاورزی با همکاری هم در زمینهٔ کشت و فرموله کردن مخمرها قدم‌های موثری در جهت تجاری کردن این موجودات آنتاگونیست بردارند.

تشکر و قدردانی

بودجه این طرح از محل اعتبار طرح حوزه معاونت محترم پژوهشی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تأمین شده است در اینجا لازم می‌دانم کمال تشکر را از این حوزه داشته باشم. در ضمن در اینجا لازم می‌دانم از زحمات دکتر جواد غلام نژاد، الله یار غلام نژاد، شهرام نجفی و کوروش قلی پور تشکر کنم.

References

1- Ahoun-manesh E. Osoul-e mobareze ba bimarihaye geyahi. Daneshgah-e sanatie Esfahan. p. 324. (Persian)
2- Batta YA. Effect of treatment with Trichoderma harzianum Rifia formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue mold. Food Microbiol 2004;96:281–8.
3- Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of speciesgroups of Trichoderma. I. production of non volatile antibiotics. Trans Brit Mycol Soc 1971;57:25-39.
4- Droby S, Chalutz E, Horev B, Cohen L, Gaba V, Wilson CL, et al. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by Penicillium digitatum. Plant Pathol 1993;42:418-24.
5- El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of Botrytis cinerea by Candida saitoana in apple fruit. Phytopathol 1998;88:282-91.
6- Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC, Sayler RJ. Biological control of apple blue mold with Pseudomonas fluorescens. Microbiol 2005;51:591-8.
7- Gullino ML, Migheli Q, Mezzalama M. Risk analysis in the release of biological control agents: antagonistic Fusarium oxysporum as a case study. Plant Dis 1995;79:1193-201.
8- Janisiewicz WJ, Marchi A. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain Pseudomonas syringae. Plant Dis 1992;76:550-60.
9- Kreger-van-Rij NJW, et al. The yeast: a Taxonomic Study. 3rd ed. Amsterdam: Elsivier; 1984. p. 1082.
10- Lillbro M. Biocontrol of Penicillium roqueforti on grainacomparison of mode of action of several yeast species [dissertation]. Swedish University of Agricultural Sciences; 2005.
11- Nunes C, Usall J, Teixido N, Vinas I. Biological control of postharvest pear diseases using bacterium, Pantoea agglomerans CPA– 2. Int Sci of food a Microbiol 2001;70:53-61.
12- Pierson CF, Leponis MJ, McColloch LP. Market diseases of apples, pears and quince. U.S. Dep. Agric, Agric. Handb. Vol. 376. U. S. Govt. Printing Office, Washington, DC. 1971.
13- Spadaro D, Vola R, Piano S, Gullino ML. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast Metschnikowia pulcherriima active against postharvest pathogens on apples. Postharvest boil. Technol 2002;24:123-34.
14- Tian SP, Q-Fan Y, Xu AL. Jiang. Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen Rhizopus stolonifer. Plant Dis 2002;51:352-8.
15- Weller DM. Biological control of soil borne plant pathogens,in the rhizosphere with bacteria. Annu Rev Phytopathol 1988;26:379-407.
16- Wilson CL, Wisniewski ME. Biolgical control of postharvest diseases - Theory and Practic. Florida: CRC Press,Boca Raton; 1994. p. 182.
17- Wisniewski ME, Wilson CL. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. Hort 1992;27;94–8.

Biological control of apples blue mold by two isolates of *Saccharomyces cerevisiae* in order to reduce the environmental pollution

*Gholamnejad. J; MSc[1], Etebarian. H. R; PhD[2], Sheikh Beig Goharrizi. M. A; MSc[3], Nemati. A.[4], Naseri Nasab. F[5]

Received: 19 Jul 2009 Accepted: 4 Oct 2009

Abstract

Background: In the recent decays, application of the fungicides has provided some concern in the scientific society. Recently, biological control was developed as an alternative to synthetic fungicides, and considerable success was achieved by utilizing antagonistic microorganisms for controlling postharvest diseases.

Materials and Methods: In this present research, two yeast antagonists of *Saccharomyces cerevisiae* (04, 69) applied instead of fungicide that it controlled blue mold of apple caused by *Penicillium expansum*. Blue mold agent isolated from infected apples. Dual culture, cell free metabolite and volatile test were used in vitro assay to evaluate as potential biological control agent against apple blue. In storage assays (in vivo assays), apple fruit wounds were inoculated with 40µl of yeast cell suspension (10^7cell/ml) followed 24 h later by *P.expansum* (10^5 conidia/ml). The apples were then incubated at 20°C and 5°C.

Results: The inhibition varied among isolates of yeasts and ranged from 33.12% to 58.4%, in dual culture, from 54.93% to 72.87% in volatile metabolite and from 50.23% to 76.23% in cell free metabolite test. In the storage test, two isolates of S. cerevisiae reduced the decay area from 1416 to 1435 mm^2 compared to 3151.1 mm^2 in control after at 5°C. At 20°C, the lesion area ranged from 1347 to 1598 mm^2 for the antagonist treatments compared to 3257.4 mm^2 for the control treatments.

Conclusions: The two isolates of *S. cervisiae* were the effective isolates at both tempetures in this assay and could be two of important new biological control agents for apple blue mold.

Keywords: Saccharomyces cerevisiae, Penicillium expansum, Biocontrol, Volatile test, cell free metabolite test, Environment

1- (*Corresponding author) Agriculture Sciences Researcher, Tehran University, Aboreihan Campus, Dept of Medicine Plant, Tehran, Iran. Tel: 09132517277 E-mail: jalalgholamnejad2006@gmail.com
2- Professor, Tehran University, Aboreihan Campus, Dept of Medicine Plant, Tehran, Iran
3- Agriculture Sciences Researcher, Tehran University, Aboreihan Campus, Dept of Horticulture, Tehran, Iran
4- Agriculture Sciences Researcher, Tehran University, Aboreihan Campus, Dept of Agriculture and Plant Breeding, Tehran, Iran.
5- Agriculture Sciences Researcher, Tehran University, Aboreihan Campus, Dept of Medicine Plant, Tehran, Iran.