مقاله تحقیقی

کنترل بیولوژیک بیماری کپک خاکستری کیوی با استفاده از مخمرهای بومی جدا شده از ایران

فرید بیکی

مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: فرید بیکی، پست الکترونیک: Farid Beiki: f.beiki@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۰۴ ۴۸ –۳۱ (۲)۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۰۴

چکیده

کپک خاکستری میوه کیوی‌فروت که توسط قارچ *Botrytis cinerea* ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشت کیوی‌فروت می‌باشد. به منظور استفاده از عوامل بیوکنترل برای پیشگیری از این بیماری، در این بررسی سعی‌شد تا توان مخمرهای بومی کشور بر روی این بیمارگر ارزیابی شود. بدین منظور از ۵۱ نمونه ارسالی از گیاهان مختلف در کشور طی سال۱۳۹۴، ۳۴ جدایه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی پرگنه‌ها، به عنوان نماینده انتخاب شدند. آزمایشات براساس توان بازدارندگی توسعه بیمارگر توسط مخمرها روی میوه و با دو روش حفر چاهک و نیز بررسی بر روی برش میوه کیوی‌فروت در تشتک شیشه‌ای، انجام شد. ارزیابی نتایج آزمایشات بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ و نیز شاخص بیماری‌زایی انجام گرفت. نتایج نشان داد مخمرهای *Aureobasidium pullulans*، *Candida membranifaciens*، *Cryptococcus albidus*، *Metschnikowia koreensis*، *Ogataea cortices*، *Papilioterama flavescens*، *Rhodotorula mucilaginosa* و *R. glutinis* که بر اساس تعیین ترادف قسمتی از ناحیه ITS شناسایی شدند، پتانسیل بازدارندگی از رشد بیمارگر کپک خاکستری کیوی‌فروت را دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: مخمر، بوتریتیس، کپک خاکستری، کیوی‌فروت، کنترل بیولوژیک

مقدمه

بیماری کپک خاکستری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خسارت‌زا در کیوی محسوب می‌شود که عامل آن قارچ*Botrytis cinerea* می‌باشد (Brook, 1990). طبق بررسی‌های انجام یافته این بیمارگر عامل اکثر پوسیدگی‌های انباری میوه کیوی‌فروت در مناطق شمالی کشور می‌باشد (Taheri *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر در دنیا به دلیل خطرات سوء زیست محیطی ناشی از مصرف آفت‌کش‌ها، استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید با اقبال خوبی مواجه شده است. در دهه‌های گذشته در خصوص توانایی آنتاگونیستی مخمرها، مطالب بسیاری بیان شده است. از دهه ۱۹۸۰ جنبه‌های مثبتی مبنی بر اینکه مخمرها دارای توانایی کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزیجات می‌باشند، ارائه شده است (Janisiewicz, 1988). از خصوصیات برتر مخمرها می‌توان به تحمل و سازگاری بیشتر نسبت به نوسانات حرارتی در دماهای پایین و بالا، تحمل در طیف گسترده‌ای از رطوبت نسبی، نوسانات pH، سطوح اکسیژن پایین و تحمل به اشعه UV را نام برد. علاوه بر آن، مخمرها قادرند تا شرایط سطوح میوه یعنی غلظت شکر بالا، افزایش فشار اسمزی و پایین بودن pH را نیزتحمل کنند (Spadaro *et al.*, 2010). مخمرها در مقایسه با سایر عوامل میکروبی مفید، قادرند در شرایط خشک، میزان سطوح کلنیزه شده را در مدت بیشتری حفظ کنند. مخمرها، پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولید می‌کنند و در حالی که بقاء خود را افزایش می‌دهند، افرایش جمعیت بیمارگر را نیز محدود می‌سازند، آن‌ها قادرند از مواد غذایی به سرعت

استفاده کرده و سریع‌تر تکثیر یابند(Sharma *et al.*, 2009). مخمرهایی که پیشتر توانایی آنها به عنوان عوامل بیوکنترل گزارش شده است از منابع مختلفی مانند سطح میوه، ساقه و برگ، ریشه و حتی خاک به دست آمده‌اند. به عنوان مثال *Candida oleophila*، *Pichia guilliermondii*، *Cystofilobasidium infirmominiatum* و *Candida saitoana* به ترتیب از سطح میوه سیب (Mercier & Wilson, 1994)، میوه مرکبات (Droby *et al.*, 1993)، میوه لیمو (Vero *et al.*, 2011)، میوه نارنج (El–Ghaouth *et al.*, 1998)، *Rhodotorula glutinis* از ساقه و برگ گوجه‌فرنگی (Kalogiannis *et al.*, 2006)، *Kloeckera apiculate* از ریشه مرکبات (Long *et al.*, 2007)، *Pichia caribbica* از خاک باغ‌های میوه (Zhao *et al.*, 2012) جداسازی شده‌اند.

در سال‌های اخیر، تعدادی از عوامل بیوکنترل جهت کنترل مؤثر بعضی از بیمارگرهای پس از برداشت میوه مرکبات گزارش شده‌اند. مخمر *P. guilliermondii* روی کپک سبز مرکبات (McLaughlin *et al.*, 1990)، مخمرهای *C. oleophila*، *Debaryomyces hansenii*، *Kloeckera apiculata* و *Pichia anomala* بر علیه پوسیدگی‌های پنیسیلیومی (El–Neshawy & El–Sheikh, 1998; Lahlali *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2002)، مخمرهای *Candida sake*، *C. formata*، *C. saitona*، *Aureobasidium pullulans*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Metschnikowia fructicola*، *Cryptococcus laurentii* و *M. pulcherrima* روی پوسیدگی میوه مرکبات (Liu *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2009)، مخمرهای *C. laurantii*،*Cryptococcus albidus* (Helbig, 2002) و مخمر *Candida intermedia*، (Huang *et al.*, 2011) روی کپک خاکستری میوه توت‌فرنگی و تأثیر مخمرهای *C. laurentii*، *C. flavus*، *Kluyveromyces* spp.، *Trichosporon pullulans* با کاهش جوانه‌زنی کنیدی‌ها و بازدارنگی از رشد میسلیوم‌های بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی (Cheah *et al.*, 1992; Cook *et al.*, 1999; Duncan, 1991) را نام برد. مخمرهای *Sporobolomyces roseus* برای بیماری کپک خاکستری سیب (Filonow *et al.*, 1996) ، *C. albidus* برای کپک خاکستری و کپک آبی سیب (Calvo *et al.*, 2003; ChandGoyal & Spotts, 1996; Tian *et al.*, 2002)، *R. glutinis* برای پوسیدگی خاکستری هلو (Zhang *et al.*, 2008a) و کپک آبی سیب (Calvo *et al.*, 2003; Castoria *et al.*, 2005) و *R. aurantiaca* برای کپک آبی گلابی(ChandGoyal & Spotts, 1996) مؤثر بوده‌اند. برخی از مخمرها نظیر *D. hansenii* بر روی طیف وسیع‌تری از بیمارگرهای گیاهی موثر می‌باشد (Karabulut & Baykal, 2003; Wilson & Wisniewski, 1989; Wisniewski *et al.*, 1988).

در پی موفقیت برخی از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست در آزمایشگاه، مطالعات وسیع‌تری توسط چندین شرکت برای توسعه محصولات بیولوژیک شکل گرفت، بطوری‌که تعدادی از آنتاگونیست‌های میکروبی مجوز ثبت و اجازه استفاده در سطح تجاری را کسب کرده‌اند، نظیر ارایه مخمر *C. oleophila* با نام تجاری Aspire توسط شرکت Ecogen آمریکا و نیز جدایه‌ای دیگر از آن با نام تجاری Nexy که در بلژیک تجاری شد و بعدها در کل اتحادیه اروپا گسترش یافت (Lahlali *et al.*, 2011; Spadaro *et al.*, 2013)، مخمر *C. sake* با نام تجاری Candifruit توسط شرکت Sipcam–Inagra در اسپانیا برای سیب و انگور (Calvo–Garrido *et al.*, 2014; Vorstermans & Creemers, 2010). *C. albidus* با نام تجاری Yiledplus از کانادا با گسترش جهانی برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزیجات (Sharma *et al.*, 2009)، Metschnikowia fructicola با نام تجاری Shemer توسط شرکت Bayer آلمان (Ferrari *et al.*, 2007)، و قارچ مخمر مانند *A. pullulans* با نام تجاری Boni–protect توسط شرکت Bioprotect آلمان بر علیه بیمارگرهای پنیسیلیوم، بوتریتیس و مونیلینیا در سیب (Spadaro & Droby, 2016; Weiss *et al.*, 2006) را نام برد.

در ایران نیز در سال‌های اخیر تحقیقاتی در خصوص مخمرها انجام شده است. مخمرهای *P. guilliiermondii*، *Candida membranifaciens* و *Rhodotorula mucilaginosa* را که از سطح سیب جداسازی شده بودند قادر به کنترل کپک خاکستری سیب هستند (Alavi Fard *et al.*, 2012) البته دو مخمر اخیر به‌همراه مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در کنترل کپک آبی سیب نیز مؤثر گزارش شده است (Gholamnejad *et al.*, 2009a; Gholamnejad *et al.*, 2010; Gholamnejad *et al.*, 2009b; Gholamnejad *et al.*, 2009c). در بررسی‌های تکمیلی مشخص شد در سیب مکانیسم القاء مقاومت نسبت به کپک آبی با کمک مخمر *S. cerevisiae* (Alavifard *et al.*, 2010) و نسبت به کپک خاکستری توسط مخمر *C. membranifaciens* قابل حصول است (Alavifard *et al.*, 2012). در خصوص ترکیب مخمرها با هم و یا استفاده از سایر ترکیبات برای بهبود کارآیی مخمرهای به دست آمده نیز بررسی‌هایی انجام شده است (Zangoei *et al.*, 2014; Zangouei *et al.*, 2014; Zangouei *et al.*, 2010) و حتی در خصوص تعدادی از آنها فرمولاسیونی برای تجاری‌سازی ارایه شده است (Khoshayand *et al.*, 2014; Mokhtarnejad *et al.*, 2011; Mokhtarnezhad *et al.*, 2010). از استان‌های شمالی ایران نیز تعدادی مخمر از اندام‌های هوایی و میوه مرکبات جداسازی شدند و مخمرهای *Sporobolomyces ruberrimus*، *Cryptococcus albidus*، *C. magnus* و *Rhodotorula* sp. برترین جدایه‌ها از لحاظ ایجاد القاء مقاومت در نهال مرکبات نسبت به بیماری بلاست باکتریایی مرکبات بوده‌اند(Beiki *et al.*, 2013) لازم به ذکر است گونه *C. albidus* به‌دست آمده همان گونه‌ای است که در اروپا با نام تجاری Yiledplus برای مصارف کنترل بیولوژیک عرضه می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های گیاهی

به منظور جداسازی مخمرهای رورُست از برخی مناطق مختلف کشور سال ۱۳۹۴، ۵۱ نمونه اندام هوایی (عمدتاً شاخ و برگ‌های کیوی و نیز از برخی محصولات دیگر)، به آزمایشگاه ارسال شدند (جدول ۱).

تهیه مخمر

برای استخراج مخمرهای رورُست از نمونه‌های گیاهی، نمونه‌ها در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ (Tween 20) و بافر فسفات (NaCl %0.8, KCl %0.02, NaH_2PO_4 % 0.115, K_2HPO_4 % 0.25) (Obanor *et al.*, 2002) بر روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه و با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله بر روی محیط کشت مالت آگار (Malt agar)، حاوی سولفات استرپتومایسین به میزان 0.1% (w/v) (Peng & Sutton, 1991) به همراه آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (100ppm) و آمپی‌سیلین (50ppm) (Benbow & Sugar, 1999) کشت و به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از خالص‌سازی و اطمینان وجود مخمر با مشاهده در زیر میکروسکوپ، از ۵۱ نمونه گیاهی ارسالی، ۳۴ جدایه مخمر بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی از جمله شکل، رنگ و میزان رشد پرگنه و نیز بر اساس در نظرگرفتن مکان جداسازی، به عنوان نماینده انتخاب شدند. لازم به ذکر است در برخی از نمونه‌های ارسالی بیش از یک جدایه مخمر خالص‌سازی شده‌است (جدول ۱). برای بررسی توانایی بیوکنترل بر روی میوه کیوی‌فروت، مخمرهای مورد بررسی ابتدا روی محیط غذایی مالت آگار کشت داده شده و از کشت ۲۴ ساعته آن‌ها، سوسپانسیونی در آب مقطر با غلظت 10^{10} اسپور در هر میلی‌لیتر با کمک لام گلبول‌شمار تهیه شد(Bora *et al.*, 2004).

تهیه بیمارگر

برای تهیه بیمارگر، چند میوه کیوی‌فروت آلوده به عامل کپک خاکستری از باغ‌های کیوی‌فروت مناطق مختلف استان‌های شمالی کشور جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه منتقل و با الکل اتیلیک ۹۶ درصد ضدعفونی سطحی شدند. پرزهای سطحی روی میوه

نیز با شعله حذف شدند. به منظور جداسازی بیمارگر، از پوست میوه در حدفاصل نواحی سالم و آلوده به‌وسیله اسکالپل سترون بریده و بر روی تشتک غذایی حاوی عصاره سیب‌زمینی، دکستروز و آگار کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای خالص‌سازی از روش تک‌اسپور استفاده شد. سوسپانسیون رقیقی از اسپورهای قارچ بر روی محیط کشت آب‌آگار پخش و ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. اسپورهای در حال تندش جدا و به محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز آگار منتقل و در انکوباتور نگهداری شد. جدایه‌های خالص‌شده در یخچال نگهداری شدند.

جدول ۱–مشخصات نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده از ایران بر اساس زمان جمع‌آوری

Table 1. Characteristics of plant specimens collected from Iran based on time of collection

Yeast code	City	Host	Date	Yeast code	City	Host	Date
23	Babol	Kiwifruit	2015/05/03	17	Sari	Pomegrenate	2015/07/22
13	Nour	Kiwifruit	2015/06/08	22	Behshahr	Citrus	2015/07/22
45	Nowshahr	Kiwifruit	2015/06/08	29	Behshahr	Rice	2015/07/22
46	Chalus	Kiwifruit	2015/06/08	30	Juybar	Rice	2015/07/29
19	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	10	Sari	Cucumber	2015/07/29
9	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	25	Juybar	kiwifruit	2015/07/29
47	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	32	Sarayan	Pistachio	2015/08/29
3	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	33	Sarayan	Pistachio	2015/08/29
15,26	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	21	Kharvana	Mulberry	2015/09/23
48	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	124	Kelachai	Kiwifruit	2015/09/23
49	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	27	Foman	Kiwifruit	2015/09/23
50	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	152	Rasht	Kiwifruit	2015/09/23
14	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	153	Rasht	Kiwifruit	2015/09/23
57	Nashtarud	Kiwifruit	2015/06/08	154	Rasht	Kiwifruit	2015/09/23
2	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	20	Ramsar	Kiwifruit	2015/09/23
58	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	1	Kharvana	Mulberry	2015/10/08
24,31	Tonekabon	Kiwifruit	2015/06/08	28	Chaboksar	Citrus	2015/10/20
8	Chalus	Kiwifruit	2015/06/08	306	Chaboksar	Kiwifruit	2015/10/29
4	Chalus	Kiwifruit	2015/06/08	307	Chaboksar	Kiwifruit	2015/10/29
11	Nowshahr	Kiwifruit	2015/06/08	308	Kelachai	Kiwifruit	2015/11/23
18	Behshahr	Citrus	2015/06/24	311	Shalman	Kiwifruit	2015/11/23
55	Kordkuy	Kiwifruit	2015/06/30	38	Astaneh	Kiwifruit	2015/11/23
16	Gorgan	Kiwifruit	2015/06/30	318	Fouman	Kiwifruit	2015/11/23
5,7,12	Amol	Kiwifruit	2015/07/18	322	Anzali	Kiwifruit	2015/11/23
34	Shirgah	Kiwifruit	2015/07/18	324	Anzali	Kiwifruit	2015/11/23
6	Neka	Citrus	2015/07/22				

آزمون بیماری‌زایی

برای آزمون بیماری‌زایی از میوه‌کیوی‌فروت رقم هایوارد استفاده شد. میوه‌ها پس از شستشو در هیپوکلریت سدیم ۱درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. به منظور رفع ماده ضدعفونی کننده، مجدداً میوه‌ها با آب سترون شسته شدند. پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی، قسمتی از پوست میوه با کمک اسکالپل سترون برداشته و ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ خالص شده با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر بر روی زخم‌های میوه قرار داده و میوه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بروز علایمی همچون نرم شدن میوه در اطراف چاهک تزریق، به منزله بیماری‌زا بودن قارچ در نظر گرفته شد.

تهیه سوسپانسیون بیمارگر

برای تهیه سوسپانسیون، از شدیدترین جدایه بیماری‌زا برای ادامه کار استفاده شد. به این منظور، از کشت تازه قارچ و با کمک هماسیتومتر سوسپانسیونی با غلظت 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و برای آزمون بیماری‌زایی ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون مورد استفاده قرار می‌گرفت. برای استفاده از دیسک میسلیومی نیز با کمک چوب پنبه سوراخ کن از حاشیه کشت جوان استفاده شد.

آزمون توانایی بیوکنترل مخمرها بر بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی

در این قسمت، از چند آزمون مجزا برای برای ارزیابی توان بیوکنترلی مخمرها استفاده شده است. ابتدا میوه‌های کیوی‌فروت با میزان ماده جامد معادل هفت (Total Solid Solution = 7) تهیه و برای حذف عوامل میکروبی با کمک هیپوکلریت سدیم ۰/۰۲ درصد) معادل ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شده و پس از آبشویی روی کاغذ صافی سترون و در دمای محیط خشک شدند (Wei *et al.*, 2017). آزمون‌ها به دو روش حفر چاهک با کمک چوب‌پنبه سوراخ‌کن بر روی میوه و یا با استفاده از قسمت‌های برش خورده میوه به ضخامت یک سانتی‌متر در زیر پلیت شیشه‌ای انجام شد. در روش حفر چاهک، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه شده از مخمر به چاهک اضافه شد ولی در روش برش میوه، کل میوه برش خورده در داخل سوسپانسیون مخمر تهیه شده به مدت یک دقیقه، غوطه‌ور شدند. برای فاصله زمانی بین تلقیح بیمارگر بعد از تلقیح مخمر، در روش چاهک یک ساعت و برای روش برش میوه، به دلیل خشک شدن سوسپانسیون مخمر، ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. پس از انجام مراحل تلقیح، میوه‌ها در دمای ۵ یا ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای تیمارهای شاهد نیز از آب مقطر سترون استفاده شد. کلیه آزمایشات در هفت آزمون مجزا بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با حداقل ۴ تکرار اجرا شد. با ادامه آزمون‌ها، جدایه‌های موثرتر برای آزمون بعدی انتخاب می‌شدند. نحوه اجرای هر آزمون در جدول ۲ خلاصه شده است. از دو هفته تا یک ماه پس از انجام آزمون، نتایج ثبت و تجریه تحلیل شدند. میزان گسترش پرگنه بیمارگر بر حسب میلی‌متر ثبت و داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند. پس از معنی دار شدن تاثیر مخمرها در بازدارندگی از رشد بیمارگر و معنی‌دار شدن بین تیمارها در سطح یک درصد، مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن، انجام شد. در ارزیابی دیگر به منظور بررسی توان بیوکنترلی مخمرها از گسترش بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی‌فروت، از ایندکس بیماری استفاده شد. از آنجایی که در تجزیه و تحلیل‌های آماری رایج، مفاهیم دقیق شدت و درصد بیماری از هم متمایز نمی‌شوند، از این رو پس از ثبت درصد و شدت بیماری، از ایندکس بیماری برای ارزیابی توان بیوکنترلی مخمرها با قدری تغییرات از فرمول زیراستفاده شد (Cooke *et al.*, 2006).

$$\text{Disease index} = \frac{[(0\times a)+(1\times b)+(2\times c)+\cdots+(50\times ax)}{(a+b+c+\cdots+ax)}\times\frac{100}{50}$$

در این بررسی هر یک سانتیمتر از میزان گسترش علایم بیماری به عنوان یک‌شاخص در نظر گرفته شد. حروف a الی i بیانگر تعداد نمونه‌های موجود در هر یک از این شاخص‌ها می‌باشد. به عنوان مثال اگر میزان گسترش علایم دو سانتیمتر باشد و در سه مورد چنین علایمی داشته باشند در داخل پرانتر قسمت شدت بیماری ۲، می‌توان عبارت (۲×۳) را در نظر گرفت. فرمول فوق با در نظر گرفتن حداکثر ۵۰ حالت برای گسترش بیماری ارایه شده است.

شناسایی مخمرها با کمک خصوصیات مولکولی

برای بررسی موقعیت تاکسونومیکی مخمرهایی که در آزمایش‌های بررسی توان بیوکنترلی بر روی بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی‌فروت برتر بودند، از تعیین ترادف ناحیه ITS شامل قسمتی از ناحیه SSU، کل ناحیه ITS1, 5.8 S, ITS2 و قسمتی از ناحیه LSU بوده است. برای تکثیر این ناحیه از آغازگرهای ITS1:5´– TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3´ و ITS4: 5´– TCCTCCGCTTATTGATATGC– 3´ استفاده شد

(White *et al.*, 1990). برای استخراج DNA از سلول‌های کشت شده به‌مدت ۴۸ ساعت روی محیط کشت مالت آگار محصول شرکت Difco با استفاده از کیت Wizard Genomic DNA Purification Kit (محصول شرکت Promega کشور آمریکا) انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA نمونه، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، ۰/۵میکرومولار از هر یک از دو آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و ۱/۵ واحد *Taq* پلی‌مراز بود. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه مجزا (شامل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵°C و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه بوده و یک مرحله بسط تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه) نیز انجام شد (Esteve–Zarzoso *et al.*, 1999). نمونه‌ها برای تخلیص محصول PCR و تکثیر ژن‌های مورد بررسی، از هر دو سمت (forward , reverse) و نیز تعیین ترادف به شرکت توپازژن نماینده انحصاری شرکت Microsynth از کشور سوییس ارسال شد. توالی‌های حاصل با کمک نرم‌افزارهای Sequencher v5.4.6 و Bioedit v 7.0.0 ویرایش شدند و با کمک نرم‌افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology NCBI Information) با ترادف‌های موجود مخمرها بر پایه درصد تشابه نوکلئوتیدی مقایسه شدند.

جدول ۲– متغیرهای مورد استفاده در آزمون‌های مختلف به منظور بررسی کارآیی مخمرها در کنترل بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی‌فروت

Table 2. Experimental designs for the evaluation of yeast efficacy in control of kiwifruit gray mold

Steps of experiment		Table 2. Experiments				
		1	2	3	4	5
1. Yeast suspension in distilled water		❋	❋	❋	❋	❋
2. Perform experiments with	Well on the fruit	❋	❋			
	On the surface of sliced fruit			❋	❋	❋
3. Yeast were applied 1 or 24 h before pathogen inoculation		1	1	24	24	24
4. Pathogen forms	Mycelium disks			❋	❋	❋
	Spore suspension	❋	❋			
5. Replication		4	4	27	20	10
6. Storage temperature	5 ℃		❋			
	20 ℃	❋		❋	❋	❋
7. Record the results after (days)		14	14	14	14	14

نتایج و بحث

جداسازی و خالص سازی مخمرها

پس از کشت سوسپانسیون حاصله از شستشوی میوه‌های سالم، ۱۵۰ جدایه مخمر، جداسازی و خالص‌سازی شده و جهت انجام آزمون‌های آنتاگونیستی بعدی، نگهداری شدند. در بین مخمرها، تنوعی در خصوص رنگ (نظیر رنگ های قرمز، سفید شیری، کرم و صورتی)، شکل و نیز نحوه گسترش پرگنه‌ها قابل مشاهده بود از این رو بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، ۳۴ جدایه مخمر از بین آن‌ها به عنوان نماینده انتخاب شدند.

آزمون بیوکنترل

در ارزیابی تأثیر مخمرها بر قارچ عامل کپک خاکستری میوه کیوی، پس از تجزیه و تحلیل آماری و معنی‌دار شدن بین تیمارها در سطح ۱درصد (جدول ۳)، مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن، انجام شد (شکل‌های ۵–۱). مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد در بین

تیمارهای اعمال شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در برخی از آزمون‌ها جدایه‌های مخمر قادر بودند تا کاملاً مانع از پیشرفت بیمارگر شوند. در آزمون اول که با شرایط نگهداری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس انجام شده بود، چهار جدایه قادر به کنترل کامل بیمارگر شدند. در مقایسه با این آزمون، در آزمون بعدی که در شرایط نگهداری ۵ درجه سلسیوس نگهداری شده بودند، میزان رشد بیمارگر در تیمار شاهد کاهش یافته و تعداد جدایه‌های بیشتری نیز قادر بودند تا مانع از پیشرفت بیمارگر و یا سبب کاهش چشمگیر میزان رشد آن شوند. به عبارتی در دمای پایین‌تر مخمرهای بیشتری قادر بودند تا در مقایسه با بیمارگر بر سطح میوه گسترش پیدا کنند.

جدول ۳– تجزیه واریانس میزان بازدارندگی از رشد کپک خاکستری میوه کیوی فروت توسط جدایه‌های مخمرها

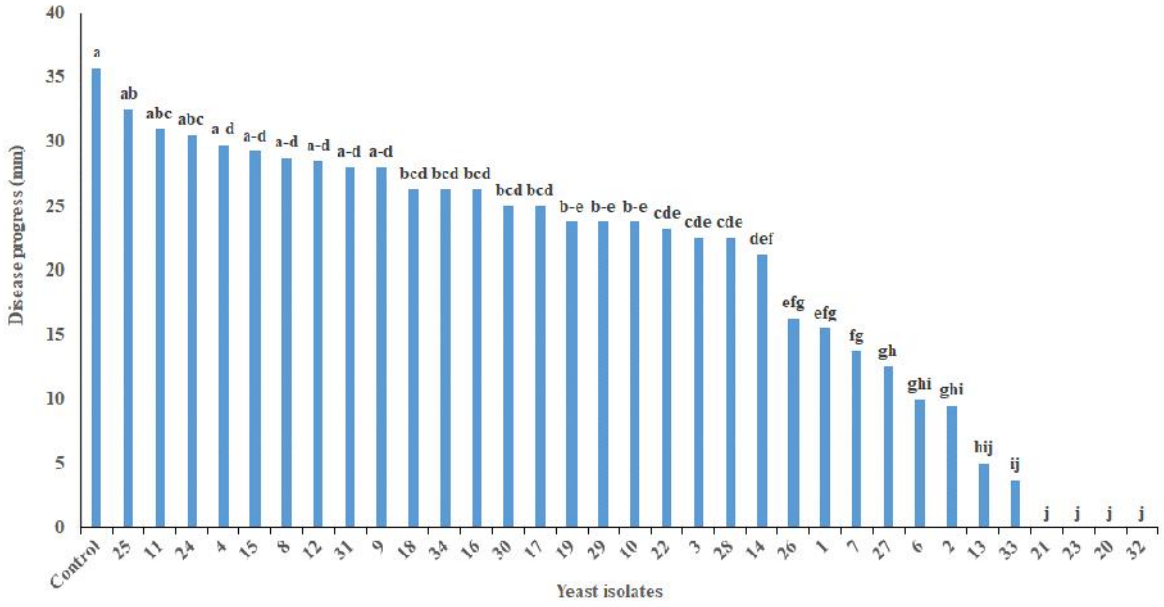
Table 3. Analysis of variance of gray molds inhibition zone on kiwifruit created by yeast isolates

	Source	DF	Mean square	Pr>F	Coefficient of Variance
Experiment 1	Treatment	33	445.2	<0.0001 **	25.6
	Error	102	26.1		
	Corrected total	135			
Experiment 2	Treatment	34	15.2	< 0.0012 **	96.18
	Error	70	6.4		
	Corrected total	104			
Experimen 3	Treatment	34	127.5	<0.0001 **	26.2
	Error	70	8		
	Corrected total	104			
Experiment 4	Treatment	7	3342.2	<0.0001 **	30.4
	Error	152	37.5		
	Corrected total	159			
Experiment 5	Treatment	7	893.1	<0.0001 **	34.02
	Error	72	22		
	Corrected total	79			

** at 99% levels of confidence

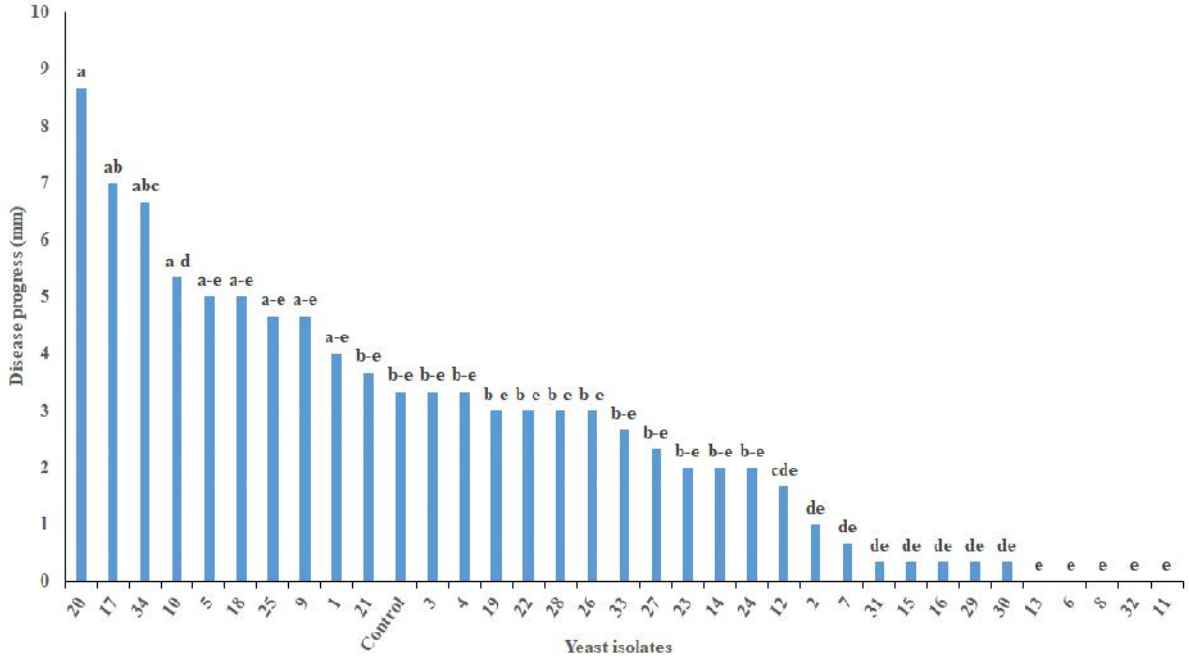
با مقایسه نتایج تجزیه تحلیل آماری بر اساس آزمون کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین آن‌ها بر اساس روش دانکن با روش ایندکس بیماری، نتایج کلی نشان می‌دهد، برآوردها تا حدی شبیه به هم می‌باشد، با این تفاوت جزیی که در آزمون دوم بر اساس ایندکس بیماری جدایه‌های ۳۱، ۳۰، ۲۹، ۱۶، ۱۵ را نیز می‌توان در بین بهترین‌های آن آزمون قرار داد. در آزمون‌های بررسی توانایی عملکرد مخمرها در شرایط برش روی میوه، نتایج به طور کامل با بررسی های پیشین انطباق نداشته است. جدایه ۳۲ که در آزمون اول و دوم مؤثر بوده، در این آزمون می توان گفت تقریباً بدون

تأثیر می باشد، برعکس جدایه شماره ۹ که در دو آزمون قبلی تقریبا بدون تأثیر بوده، در این آزمون توانسته است کاملاً مانع از رشد بیمارگر بر روی میوه‌های برش خورده شود. جدیه‌های ۲۱، ۲۰، ۱۳، ۱۱، ۶ از جمله جدایه‌هایی هستند که ضمن موثر بودن در این آزمون، حداقل در یکی از سه آزمون قبلی نیز موثر بودند (اشکال ۹–۱). در روش ایندکس بیماری که نتایج آن در شکل ۱۰ ارایه شده است، برخلاف روش‌های مرسوم تجزیه واریانس، مفاهیم شدت و درصد بیماری در نظر گرفته می‌شود. ارزیابی نهایی نشان می‌دهد نتایج کلی دو روش به‌کار رفته در این بررسی تقریباً همسان می‌باشند، از این‌رو تصور می‌شود بتوان به تنهایی از ایندکس بیماری در براورد توانایی کارآیی مخمرها استفاده نمود. از دیگر متغیرهایی که در بین آزمون‌های مختلف می‌بایست در نظر داشت و ممکن است وجود آن سبب تغییر جزیی برخی نتایج در این آزمون‌ها شده باشد، می‌توان به یکسان نبودن میوه‌های رقم هایوراد مورد استفاده در آزمون‌های مختلف اشاره نمود. از آنجایی‌که میوه‌ها تحت مدیریت باغی متفاوت نظیر تغذیه، آبیاری و اقلیم رشدی بوده‌اند، ممکن است واکنش دفاعی کمی متفاوت نیز در برابر توسعه بیمارگر داشته باشند. از این رو، آزمون‌های مختلف بر روی منابع مختلف میوه‌کیوی فروت انجام گرفته است، تا اگر توانایی مخمری در شرایط مختلف ثابت شود، احتمال موفق بودن آن در عمل نیز به مراتب بیشتر خواهد بود.



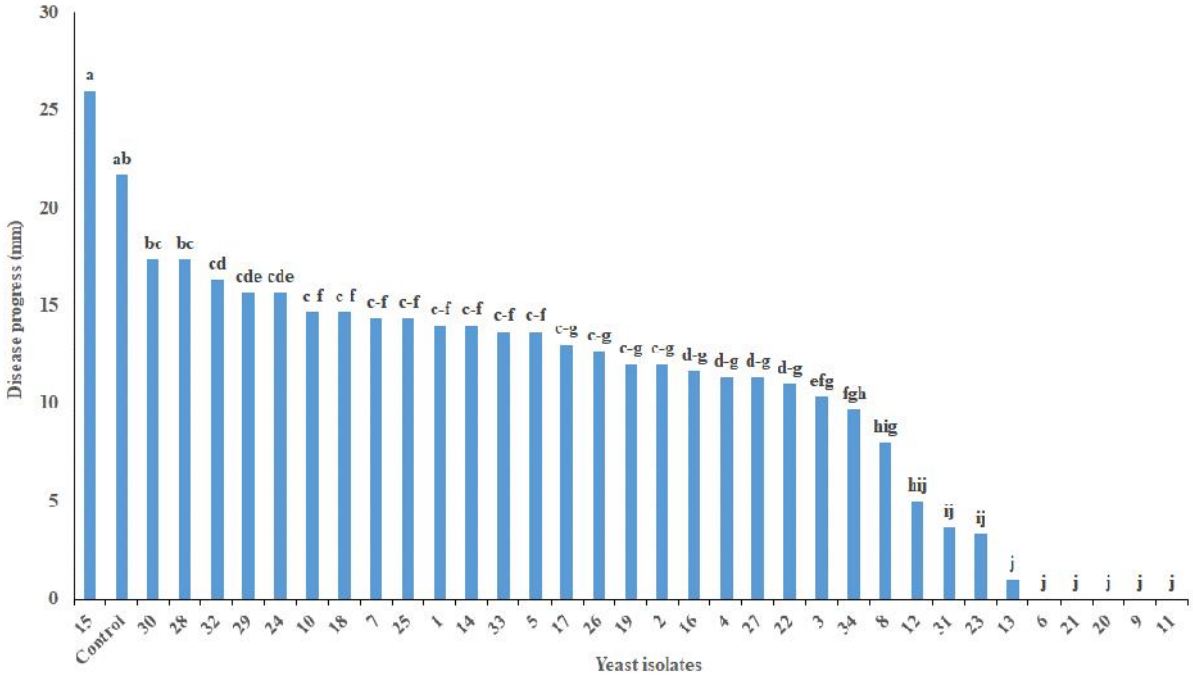
شکل ۱– مقایسه میانگین میزان بازدارندگی از رشد اسپور بیمارگر کپک خاکستری بر روی میوه کامل کیوی‌فروت (آزمون اول) توسط نماینده‌های جدایه‌های مخمر با نگهداری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس بر اساس روش دانکن در سطح یک درصد. برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر به جای مخمر استفاده شد.

Fig. 1. Duncan's mean comparison test of gray mold inhibition zone on kiwifruit in 20 ˚C created by yeast isolates in the first experiment.



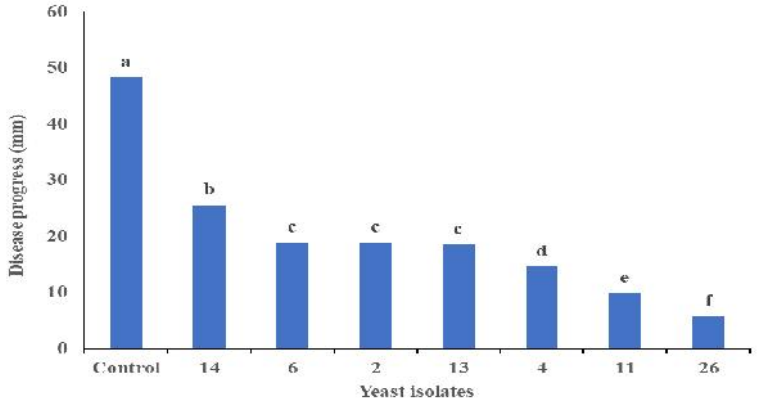
شکل ۲– مقایسه میانگین میزان بازدارندگی از رشد اسپور عامل بیماری کپک خاکستری روی میوه کامل کیوی‌فروت درشرایط نگهداری در دمای ۵ درجه سلسیوس(آزمون دوم) توسط جدایه‌های مخمر بر اساس روش دانکن در سطح یک درصد. برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر به جای مخمر استفاده شد.

Fig. 2. Duncan's mean comparison test of gray mold inhibition zone on kiwifruit in 5 ˚C created by yeast isolates in the second experiment.



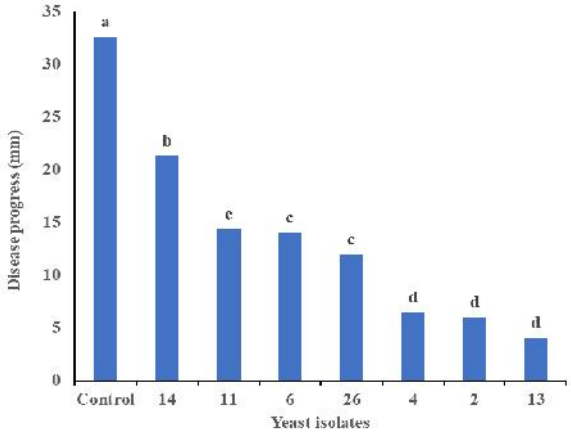
شکل ۳– مقایسه میانگین میزان بازدارندگی از رشد دیسک میسلیومی بیمارگر کپک خاکستری روی برش‌های میوه کیوی‌فروت در تشتک کشت (آزمون سوم) توسط جدایه‌های مخمر در شرایط نگهداری با دمای ۲۰ درجه سلسیوس بر اساس روش دانکن در سطح یک درصد. برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر به جای مخمر استفاده شد.

Fig. 3. Duncan's mean comparison test of gray mold inhibition zone on slice kiwifruit in 20 ˚C created by yeast isolates in the third experiment.



شکل ۴– مقایسه میانگین میزان بازدارندگی از رشد دیسک میسلیومی بیمارگر کپک خاکستری روی برش‌های میوه کیوی‌فروت در در تشتک کشت (آزمون چهارم) با استفاده از جدایه‌های مخمر و با شرایط نگهداری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با ۲۰ تکرار بر اساس و بر اساس روش دانکن در سطح ۱درصد. برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر به جای مخمر قبل از تزریق بیمارگر استفاده شد.

Fig. 4. Duncan's mean comparison test of gray molds inhibition zone on slice kiwifruit in 20 ˚C created by yeast isolates in the fourth experiment.

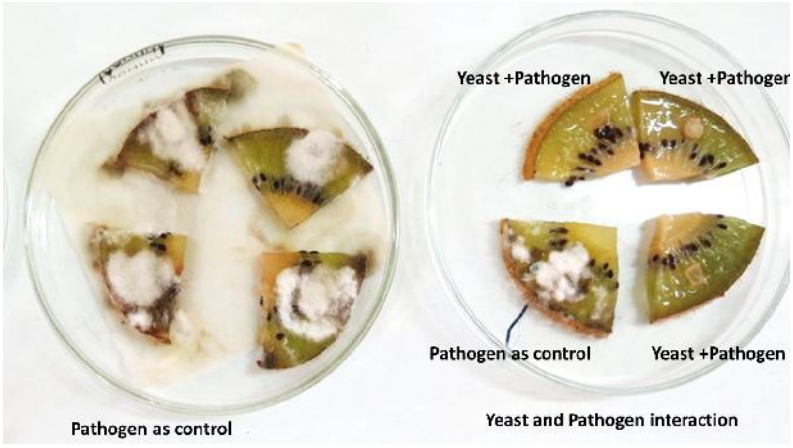


شکل ۵– مقایسه میانگین میزان بازدارندگی از رشد دیسک میسلیومی قارچ عامل بیماری کپک خاکستری روی برش‌های میوه کیوی‌فروت در تشتک کشت (آزمون پنجم) توسط جدایه‌های مخمر و با شرایط نگهداری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس بر اساس روش دانکن در سطح یک درصد برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر به جای مخمر در مرحله قبل از بیمارگر استفاده شد.

Fig. 5. Duncan's mean comparison test of gray molds inhibition zone on slice kiwifruit in 20 ˚C created by yeast isolates in the fifth experiment

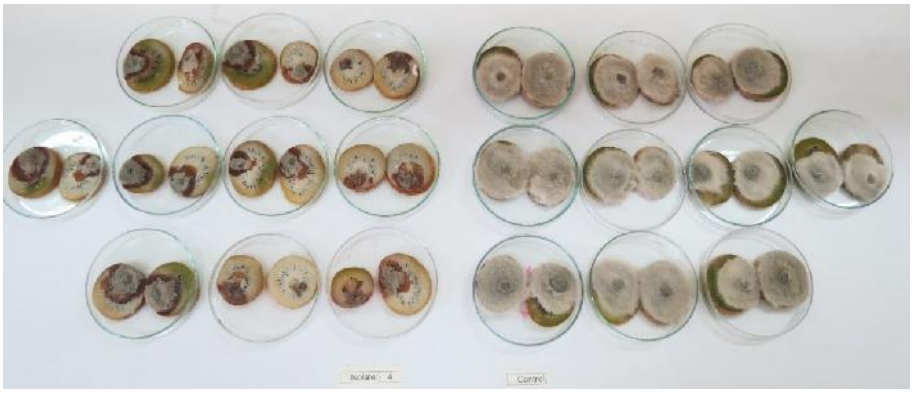
شکل ۶– تأثیر مخمر جدایه ۲۱ در بازداری از رشد بیمارگر بر روی میوه کیوی فروت در آزمون اول.

Fig. 6. The effect of yeast isolate 21 on pathogen growth inhibition of kiwifruit in the first experiment.



شکل ۷– کارآیی مخمر جدایه ۶ در کنترل بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی در روش تعامل بر روی برش میوه کیوی‌فروت

Fig. 7. Efficacy of yeast isolate 6 in controlling the pathogen of kiwifruit gray mold in interaction method on fruit slice

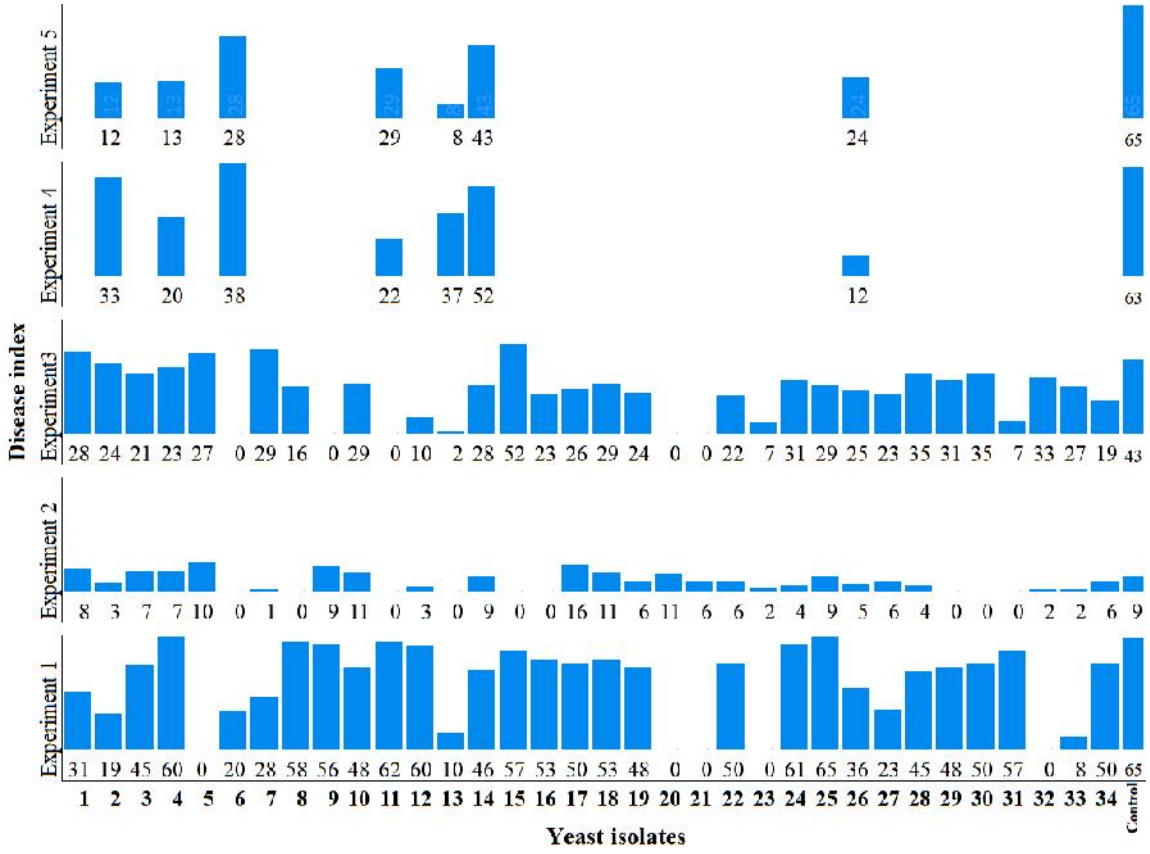


شکل ۸ – کارآیی مخمر جدایه ۴ در کنترل بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی در روش تعامل بر روی برش میوه کیوی‌فروت در داخل تشتک‌های کشت (سمت چپ) در مقایسه با شاهد بیمارگر (سمت راست) در آزمون شماره ۴.

Fig. 8. Efficacy of yeast isolate 4 in controlling the pathogen of kiwifruit gray mold in interaction method on fruit slice (left) in compare to pathogen growth as control (right) in experiment 4.

شکل ۹– کارآیی مخمر جدایه ۱۳ در کنترل بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی در روش برهمکنش بر روی برش میوه کیوی-فروت (ظرف پتری سمت چپ) در مقایسه با تیمار بیمارگر به عنوان شاهد (ظرف پتری سمت راست) در آزمون شماره ۵.

Fig. 9.Efficacy of yeast isolate 13 in controlling on pathogen of kiwifruit gray mold in interaction method on fruit slice (left) in compare to pathogen growth as control (right) in experiment 5.



شکل ۱۰– ایندکس بیماری کپک خاکستری میوه کیوی فروت در تعامل با جدایه‌های مخمر در ۵ آزمایش مجزا، در شاهد نیز از آب مقطرسترون به جای سلول‌های مخمر استفاده شد.

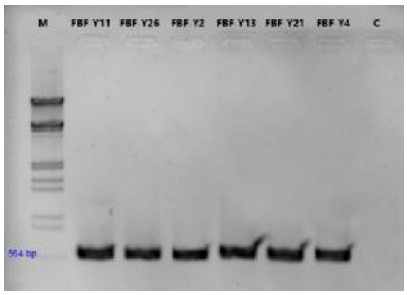
Fig. 10. Disease index of kiwifruit gray mold in interaction with yeast isolates during five separate experiments. In control, distilled water used instead of yeast cells.

مطالعات مولکولی

از جدایه‌های به‌دست آمده از کیوی، ۱۰ جدایه برتری که در کاهش رشد بیمارگر کپک خاکستری میوه مؤثرتر بودند برای شناسایی مولکولی و بررسی ارتباط فیلوژنتیکی با جدایه‌های استاندارد انتخاب شدند. پس از انجام PCR با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4، قطعه‌ای به طول ۵۶۴bp بر روی ژل آگارز الکتروفورز حاصل شد (شکل ۱۱). نتایج حاصل از تعیین ترادف، پس از بررسی و آماده‌سازی با کمک نرم‌افزارهای Sequencher v5.4.6 و Bioedit v 7.0.0 ابتدا با کمک نرم‌افزار BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool) در پایگاه اطلاعاتی (National Center for Biotechnology Information) NCBI با ترادف‌های موجود مخمرها بر پایه درصد تشابه نوکلئوتیدی مقایسه شدند. محاسبه تشابه و فاصله ژنتیکی ترادف‌های به‌دست آمده و مقایسه آن‌ها با ترادف‌های سایر جدایه‌های استاندارد مخمرهای موجود در GenBank، در جدول ۴ ارایه شده است.

با توجه به نتایج کلی آزمون‌های انجام گرفته، می‌توان اذعان نمود که به رغم اینکه برخی از جدایه‌های مخمر در کلیه تکرارهای خود قادر به کنترل بیمارگر در یک آزمون بودند اما نتوانستند در سایر آزمون‌ها، نیز موفق به کنترل بیمارگر شوند. در مجموع برخی از جدایه‌ها که در اکثر موارد مؤثر بودند عبارتند از جدایه ۱۳ با نام *C. membranifaciens*، جدایه‌های، ۲۶، ۶ و ۱۱ با نام *A. pullulans*، جدایه‌های ۲۰ و ۲۱ با نام *R. mucilaginosa*، جدایه‌های ۲ و ۴ با نام *M. koreensis*. جدایه ۹ (*P. terrestris*)، جدایه (*R. glutinis*) 8 و جدایه ۳۲ (*O. zsoltii*)، را در سری دوم می‌توان از بهترین-ها نام برد. در ایران گونه *C. membranifaciens* پیش‌تر گزارش شده و از آن برای کنترل کپک آبی سیب استفاده شده است (Farahani *et al.*, 2011; Gholamnejad *et al.*, 2010). در سیب نیز با مصرف این گونه مخمر توانستند میوه را در برابر پوسیدگی خاکستری سیب ناشی از *Botrytis mali* مقاوم‌تر کنند (Alavifard *et al.*, 2012; Fard *et al.*, 2012). در انبه نیز این گونه در کنترل بیمارگر *Colletotrichum gloeosproides* مؤثر بوده است (Kefialew & Ayalew, 2008). در خصوص گونه نزدیک به آن یعنی مخمر *C. intermedia*، علت ممانعت از جوانه زدن اسپورهای کپک خاکستری توت فرنگی، به دلیل تولید ترکیبات فرار گزارش شده است (Huang *et al.*, 2011). مخمر *A. pullulans* ساپروفیت منحصر به فردی است که در فیلوسفر بسیاری از گیاهان و بر روی انواع میوه‌های مناطق گرمسیری یافت می‌شود. به دلیل تولید ملانین، از آن به عنوان مخمر سیاه یاد می‌شود. از بسیاری مناطق مانند آلاسکا و کانادا و امریکا تا اروپا و از کشورهای آلمان، دانمارک، هلند و استرالیا، از برخی کشورهای مدیترانه و مناطق خشک نظیر مصر، عراق، پاکستان، آفریقای جنوبی، حتی از مناطق گرمسیر نظیر برزیل، هند، مالزی و جاماییکا نیز گزارش شده است (Deshpande *et al.*, 1992) و بر روی پوسیدگی پس از برداشت توت فرنگی مؤثر است (Lima *et al.*, 1997). در گزارش دیگری نیز تأثیر قارچ *A. pullulans* بر روی کنترل پوسیدگی کپک خاکستری سیب، کپک سبز گریپ فروت، بیمارگرهای *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* در انگور و دو بیمارگر *B. cinerea* و *R. stolonifer* در گوجه ارایه شده است (Schena *et al.*, 1999). این گونه بر روی *Monilinia fruticola*، *Monilinia laxa*، *Penicillium expansum* در میوه‌های سیب، انگور، هلو، توت‌فرنگی و گیلاس مؤثر بوده است (Spadaro, 2012). در تحقیقی، از بین ۲۰۰ جدایه مخمر به دست آمده از سطوح مختلف میوه‌های مختلف، مخمر *R. glutinis* یکی از بهترین مخمرهایی بود که بر روی کپک آبی سیب ناشی از قارچ *P. expansum* مؤثر بود (Lima *et al.*, 1998). در بررسی دیگری گزارش شده است که این مخمر از طریق رودوترولیک اسید بر روی این بیمارگر پس از برداشت موثر است (Calvente *et al.*, 1999). در پرتقال نیز با تحریک تولید فیتوالکسین، سبب القا مقاومت در برابر بیماری می‌شود (Arras *et al.*, 2006). این مخمر در کنترل بیماری‌های پس از برداشت گلابی نیز مؤثر می‌باشد (Zhang *et al.*, 2008b). با افزودن سالیسیلیک اسید، توانایی بیوکنترل آن بر روی کپک خاکستری میوه توت فرنگی نیز افزایش می‌یابد (Zhang *et al.*, 2010). این مخمر بر روی سایر بیمارگرها نظیر *Alternaria alternata*, *Monilinia fruticola*, *Rhizopis sltolonifer* در گیاهان سیب، گیلاس، هلو، گلابی، توت فرنگی و عناب موثر می‌باشد. گونه دیگر آن یعنی *R. mucilaginosa* نیز بر روی بیمارگرهای *B. cinerea* و *P. expansum* در سیب مؤثر می‌باشد (Spadaro, 2012). *M. koreensis* اولین بار در سال ۲۰۰۱ به عنوان گونه جدید ارایه شده است (Hong *et al.*, 2001) و تاکنون از این گونه و نیز گونه‌های *P. terrestris*, *O. zsoltii* گزارشی در خصوص مؤثر بودن به‌عنوان عامل بیوکنترل ارایه نشده است.



شکل ۳– قطعه تکثیر شده ITS در جدایه‌های برتر مخمر مورد استفاده برای آزمایشات کنترل بیولوژیک کپک خاکستری میوه کیوی‌فروت، M نشانگر جرم مولکولی Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III (شرکت Bioron، آلمان)، C: شاهد منفی.

Fig. 11. Agarose–gel electrophoresis of PCR products of ITS region of the best yeast isolates used in biocontrol experiment of kiwifruit gray mold. Lane M, molecular size markers (Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III), Lane C, negative control (Sterile distilled water instead of DNA pattern)

جدول ۴– مشخصات مؤثرترین جدایه‌های مخمر بر کنترل بیمارگر کپک خاکستری میوه کیوی‌فروت

Table 5. Characteristics of the most effective yeast isolates in controlling of kiwifruit gray mold pathogen

Code	Isolate	Accession numbers	Closest type strain	Similarity (%)
11	FBF–Y11	MK186930	*Aureobasidium pullulans* NR–144909 ^{T}	100
26	FBF–Y26	MK186940	*Aureobasidium pullulans* NR–144909 ^{T}	100
13	FBF–Y13	MK186932	*Candida membranifaciens* NR–111296 ^{T}	100
15	FBF–Y15	MK186933	*Cryptococcus albidus* NR–149344 ^{T}	100
2	FBF–Y2	MK186924	*Metschnikowia koreensis* KF059236 ^{T}	99.6
4	FBF–Y4	MK186925	*Metschnikowia koreensis* KF059237 ^{T}	100
32	FBF–Y32	MK186944	*Ogataea corticis* NR–137525 ^{T}	99
9	FBF–Y9	MK186929	*Papiliotrema flavescens* NR130696 ^{T}	99.6
29	FBF–Y29	MK186943	*Papiliotrema flavescens* NR130696 ^{T}	99.6
8	FBF–Y8	MK186928	*Rhodotorula glutinis* NR073294 ^{T}	100
16	FBF–Y16	MK186934	*Rhodotorula mucilaginosa* NR073296 ^{T}	100
21	FBF–Y21	MK186938	*Rhodotorula mucilaginosa* NR073296 ^{T}	100
20	FBF–Y20	MK186937	*Rhodotorula mucilaginosa* NR073296 ^{T}	100

T: Type strain isolate

References

Alavi Fard, F., Etebarian, H. & Sahebani, N. 2012. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. Iranian Journal of Plant Protection Science, 48: 17–26.

Alavifard, F., Etebarian, H., Sahebani, N. & Aminian, H. 2012. Induction of resistance in apple fruit inoculated with antagonistic *Candida membranifaciens* isolates and *Botrytis mali*. Journal of Crop Protection, 1: 249–259.

Alavifard, F., Etebarian, H.R., Sahebani, N. & Aminian, H. 2010. Control of grey mould and induction of defense responses in apple fruit by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection, 24: 35–42.

Arras, G., D'Hallewin, G., Molinu, M.G., Dore, A., Venditti, T., Fois, M., Lima, G. & Agabbio, M. 2006. Induction of phytoalexins biosynthesis in orange fruit by the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis*. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71: 915–21.

Beiki, F., Mohamadi Goltapeh, E., Rahimian, H., Shamsbakhsh, M., Barzegar, A., Busquets, B. & Lalucat, J. 2013. Biological control of citrus blast disease using some yeast strains isolated from citrus orchards in the Northern provinces of Iran. Biocontrol in Plant Protection, 1: 51–64.

Benbow, J.M. & Sugar, D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. Plant Disease, 83: 839–844.

Bora, T., Özaktan, H., Göre, E. & Aslan, E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. Journal of Phytopathology, 152: 471–475.

Brook, P.J. 1990. Review: *Botrytis cinerea* and fruit rot of kiwifruit, *Actinidia deliciosa*. In *Report. New Zealand Kiwifruit Marketing Board*. Auckland, New Zealand: Department of Scientific and Industrial Research. DSIR Plant Protection, 1–98.

Calvente, V., Benuzzi, D. & De Tosetti, M.I.S. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. International Biodeterioration and Biodegredation, 43: 167–172.

Calvo–Garrido, C., Viñas, I., Usall, J., Rodríguez–Romera, M., Ramos, M.C. & Teixidó, N. 2014. Survival of the biological control agent *Candida sake* CPA–1 on grapes under the influence of abiotic factors. Journal of Applied Microbiology, 117: 800–811.

Calvo, J., Calvente, V., De Orellano, M.E., Benuzzi, D. & De Tosetti, M.I.S. 2003. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. Biocontrol, 48: 579–593.

Castoria, R., Morena, V., Caputo, L., Panfili, G., De Curtis, F. & De Cicco, V. 2005. Effect of the biocontrol yeast Rhodotorula glutinis strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. Phytopathology, 95: 1271–1278.

ChandGoyal, T. & Spotts, R.A. 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. Postharvest Biology and Technology, 7: 51–64.

Cheah, L.H., Hunt, A.W. & Burge, G.K. 1992. Sulphur dioxide fumigation for control of botrytis storage rot of kiwifruit. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 20: 173–176.

Cook, D.W.M., Long, P.G. & Ganesh, S. 1999. The combined effect of delayed application of yeast biocontrol agents and fruit curing for the inhibition of the postharvest pathogen *Botrytis cinerea* in kiwifruit. Postharvest Biology and Technology, 16: 233–243.

Cooke, B.M., Gareth Jones, D. & Kaye, B. 2006. The Epidemiology of Plant Diseases. Springer, Netherlands.

Deshpande, M.S., Rale, V.B. & Lynch, J.M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. Enzyme and Microbial Technology, 14: 514–527.

Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Timar, D. & Chalutz, E. 1993. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*, a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. Biological Control, 3: 47–52.

Duncan, R. 1991. Biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit through field applications of antagonistic microorganisms, California State University, Fresno.

El–Ghaouth, A., Wilson, C.L. & Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology, 88: 282–91.

El–Neshawy, S.M. & El–Sheikh, M.M. 1998. Control of green mold on oranges by *Candida oleophila* and calcium treatments. Annals of Agricultural Sciences Cairo, 3: 881–890.

Esteve–Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 329–337.

Farahani, L., Etebarian, H.R., Sahebani, N. & Aminian, H. 2011. Biocontrol of blue mold of apple by *Candida membranifaciens* in combination with silicon. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 45: 310–317.

Fard, F., Etebarian, H. & Sahebani, N. 2012. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. Iranian Journal of Plant Protection Science, 48: 17–26.

Ferrari, A., Sicher, C., Prodorutti, D. & Pertot, I. 2007. Potential new applications of Shemer, a *Metschnikowia fructicola* based product, in post–harvest soft fruit rots control. International Organisation for Biological and Integrated Control–West Palaerctic Regionak Section, 30: 43.

Filonow, A., Vishniac, H., Anderson, J. & Janisiewicz, W. 1996. Biological control of *Botrytis cinereain* apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. Biological Control, 7: 212–220.

Gholamnejad, J., Etebarian, H., Sheikh Beig Goharrizi, M.A., Nemati, A. & Naseri Nasab, F. 2009a. Biological control of apple blue mold by two isolates of *Saccharomyces Cerevisiae* in order to reduce the environmental pollution. Annals of Military and Health Sciences Research, 7: 182–189.

Gholamnejad, J., Etebarian, H.R. & Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science, 4: 1–7.

Gholamnejad, J., Etebarian, H.R., Sahebani, N.A. & Roustaee, A. 2009b. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Iran against blue mould of apple in order to reduce the environmental pollution. Journal of International Environmental Application & Science, 4: 28–36.

Gholamnejad, J., Etebarian, H., Roustaee, A. & Sahebani, N. 2009c. Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research, 49: 270–275.

Helbig, J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. BioControl, 47: 85–99.

Hong, S.G., Chun, J., Oh, H.W. & Bae, K.S. 2001. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 1927–1931.

Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H. & Huang, H.C. 2011. Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. Phytopathology, 101: 859–69.

Janisiewicz, W. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology, 78: 194–198.

Kalogiannis, S., Tjamos, S.E., Stergiou, A., Antoniou, P.P., Ziogas, B.N. & Tjamos, E.C. 2006. Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato. European Journal of Plant Pathology, 116: 69–76.

Karabulut, O.A. & Baykal, N. 2003. Biological control of postharvest diseases of peaches and nectarines by yeasts. Journal of Phytopathology–Phytopathologische Zeitschrift, 151: 130–134.

Kefialew, Y. & Ayalew, A. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). Postharvest Biology and Technology, 50: 8–11.

Khoshayand, M., Mokhtarnejad, L., Etebarian, H., Farzaneh, M. & Sheikhpour, P. 2014. Screening and optimization of industrial medium for mass production of *Candida membranifaciens*, biocontrol agent of blue mold and gray mold diseases of apple. Applied Research in Plant Pathology, 2: 1–15.

Lahlali, R., Serrhini, M. & Jijakli, M. 2004. Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in Morocco. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 69: 601–609.

Lahlali, R., Raffaele, B. & Jijakli, M.H. 2011. UV protectants for Candida oleophila (strain O), a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. Plant Pathology, 60: 288–295.

Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. & De Cicco, V. 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post–harvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology, 8: 257–267.

Lima, Giuseppe, Ippolito, Antonio, Nigro, Franco & Salerno, Mario. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. Postharvest Biology and Technology, 10: 169–178.

Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B. & Zheng, X. 2010. Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. Letters in Applied Microbiology, 51: 30–35.

Long, C., Deng, B. & Deng, X. 2007. Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34–9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. Annals of Microbiology, 57: 203–207.

McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Chalutz, E., Kurtzman, C.P., Fett, W.F. & Osman, S.F. 1990. Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Applied and Environmental Microbiology, 56: 3583–3586.

Mercier, J. & Wilson, C.L. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biological Control, 4: 138–144.

Mokhtarnejad, L., Etebarian, H.R., Fazeli, M.R. & Jamalifar, H. 2011. Evaluation of different formulations of potential biocontrol yeast isolates efficacy on apple blue mold at storage condition. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44: 970–980.

Mokhtarnezhad, L., Etebarian, H. & Fazeli, M. 2010. Survival of *pichia guilliermondii* yeast isolate in powder formulation and its potential for biological control of blue mold of apple. Iranian Journal of Plant Protection Science, 41: 9–18.

Obanor, F., Walter, M., Waipara, N. & Cernusko, R. 2002. Rapid method for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in plant tissues. New Zealand Plant Protection, 55: 150–153.

Peng, G. and Sutton, J. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. Canadian Journal of Plant Pathology, 13: 247–257.

Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F. & Droby, S. 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. Postharvest Biology and Technology, 17: 189–199.

Sharma, R., Singh, D. & Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control, 50: 205–221.

Singh, N., Singh, R., Bhunia, A. & Stroshine, R. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* o157: h7 on lettuce and baby carrots. LWT–Food Science and Technology, 35: 720–729.

Spadaro, D. 2011. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetable. pp. 461-474. In: UNESCOEOLSS Joint Committee (ed). Agricultural Sciences, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO. Eolss Publishers, Oxford. London.

Spadaro, D. & Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. Trends in Food Science & Technology, 47: 39–49.

Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. 2013. Discovery, development and technology transfer of biocontrol agents for postharvest disease control. II International Symposium on Discovery and Development of Innovative Strategies for Postharvest Disease Management, April 28, Kusadasi, Turkey, 23–36.

Spadaro, D., Ciavorella, A., Dianpeng, Z., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. 2010. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. Canadian Journal of Microbiology, 56: 128–37.

Taheri, H., Ershad, J. & Fifaei, R. 2009. Identification of fungus agents that cause kiwi fruit rots in cool storages. Pajouhesh Va Sazandgi, 81: 34–39.

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

Vero, S., Garmendia, G., Garat, M.F., de Aurrecoechea, I. & Wisniewski, M. 2011. *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. Acta Horticulturae, 905: 169–180.

Vorstermans, B & Creemers, P. 2010. Current status of development of biological control products for postharvest use in Europe. International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities, Leesburg, VA, USA, 313–318.

Wei, W., Wang, X., Xie, Z., Wang, W., Xu, J., Liu, Y., Gao, H. & Zhou, Y. 2017. Evaluation of sanitizing methods for reducing microbial contamination on fresh strawberry, cherry tomato and red bayberry. Frontiers in Microbiology, 8: 2397–2397.

Weiss, A., Mögel, G. & Kunz, S. 2006. Development of" Boni–Protect"–a yeast preparation for use in the control of postharvest diseases of apples. 12th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit–Growing, 31st January to 2nd February, Weinsberg, Germany, 113–117.

Wilson, C.L. & Wisniewski, M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. Annual Review of Phytopathology, 27: 425–441.

Wisniewski, M., Wilson, C., Chalutz, E. & Hershberger, W. 1988. Biological control of postharvest diseases of fruit: inhibition of *Botrytis* rot on apple by an antagonistic yeast. Proceeding of the 46th annual meeting of the electron microscopy society of America, 1988, San Francisco, USA, 290–291.

Zangoei, E, Etebarian, H. & Sahebani, N. 2014. Biological control of apple gray mold by mixtures of *Bacillus subtilis* and yeast isolates. African Journal of Food Science, 8: 155–163.

Zangouei, E., Etebarian, H. & Sahebani, N. 2014. Improvement in the biological control of gray mold of apples with mixtures of silicon and yeast isolate and induction of defense responses. Quarterly Journal of Research in Plant Pathology, 2: 49–64.

Zangouei, E., Etebarian, H., Sahebani, N. & Alizadeh, A. 2010. Improving biocontrol of gray mold disease of apple using a mixture of yeast isolates. Iranian Journal of Plant Protection Science, 41: 361–372.

Zhang, H., Ma, L., Wang, L., Jiang, S., Dong, Y. & Zheng, X. 2008a. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters. Biological Control, 47: 60–65.

Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Zhang, H. & Zheng, X. 2008b. Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. International Journal of Food Microbiology, 126: 167–71.

Zhang, H., Ma, L., Jiang, S., Lin, H., Zhang, X., Ge, L. & Xu, Z. 2010. Enhancement of biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* by salicyclic acid against gray mold spoilage of strawberries. International Journal of Food Microbiology, 14: 122–5.

Zhao, L., Zhang, H., Li, J., Cui, J.J., Zhang, X. & Ren, X. 2012. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia carribbica* to postharvest diseases of strawberries by addition of trehalose to the growth medium. International Journal of Molecular Sciences, 13: 3916–3932.

Research Article

Biological control of kiwifruit gray mold disease using native yeasts isolated from Iran

Farid Beiki

Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Corresponding author: Farid Beiki: f.beiki@gmail.com

Received: Oct., 26, 2019 7(2) 31–48 Accepted: June, 24, 2020

Abstract:

Botrytis gray mold of kiwifruit is one of the most important fungal diseases that causes a significant damage to the kiwifruit during harvest and postharvest stages. The aim of this study was to find some effective isolates of native yeasts that have a good biocontrol effects on the pathogen, *Botrytis cinerea*. Fifity one plant samples were collected from different part of Iran during 2015–2016. Thirthy four yeast isolates were selected as representative based on the morphological characteristics of the colonies and the size of the cells. The experiment carried out to examine the yeasts ability in pathogen inhibition on Hayward cultivar of kiwifruit based on two assays, in well on fruit and on fruit slices in Petri dishes. Results based on partial ITS region sequence region showed and according to Duncan's multiple range test at significance level 1% as well as index disease (ID), the yeasts including *Aureobasidium pullulans, Candida membranifaciens, Cryptococcus albidus, Metschnikowia koreensis, Ogataea cortices, Papilioterama flavescens, Rhodotorula mucilaginosa* and *R. glutinis* have the most potential to pathogen growth inhibition.

Keywords: yeast, Botrytis, gray mold, kiwifruit, biological control