مقاله کوتاه

بررسی قابلیت کنترل زیستی مخمر *Pichia guilliermondii* جداسازی شده از پارک ملی دریاچه ارومیه در کنترل بیماری‌های پس از برداشت انگور

لاچین مختارنژاد[۱]، مهدی ارزنلو[۲]

۱- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

۲-گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

مسئول مکاتبات: لاچین مختارنژاد، ایمیل: l.mokhtarnejad@gmail.com

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۲/۰۲ ۸(۲) ۱۴۳–۱۴۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۳

چکیده

بیماری‌های پس از برداشت، خسارات فراوانی در انگور ایجاد کرده و باعث کاهش کیفیت و بازار پسندی محصول می‌شوند. این بیماری‌ها توسط گروه‌های مختلف قارچی ایجاد می شوند که در بین آنها دو گونه *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea* مهمترین عوامل فساد پس از برداشت انگور در سراسر جهان می‌باشند. راهکار کنترل بیولوژیک جهت مدیریت بیماری‌های پس از برداشت به دلیل تبعات منفی استفاده از ترکیبات شیمیایی، مورد توجه واقع شده است. در این تحقیق قابلیت بیوکنترل مخمرهای جداسازی شده از حوزه دریاچه ارومیه علیه عوامل پوسیدگی پس از برداشت حبه انگور مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از یازده جدایه مخمر *Pichia guilliermondii* جداسازی و شناسایی شده از پارک ملی دریاچه ارومیه استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت بازدارندگی ۱۱ جدایه مخمر در مهار رشد دو قارچ *P. expansum* و *B. cinerea*، به روش آزمون کشت متقابل روی محیط PDA نشان داد که سه جدایه مخمر *P. guilliermondii* تاثیر قابل قبولی در مهار هر دو قارچ مذکور داشتند. تاثیر سه جدایه مخمر *P. guilliermondii* منتخب در کاهش پوسیدگی حبه‌های انگور مایه‌زنی شده با قارچ‌های *P. expansum* و *B. cinerea* در شرایط انبار مشخص کرد که هر سه مخمر به‌طور معنی‌داری از میزان کپک‌زدگی و پوسیدگی حبه‌های انگور ممانعت کرد. جدایه شماره ۸ این مخمر با ۸۲/۳ درصد کاهش تعداد حبه‌های آلوده، موثرترین تیمار در کنترل *P. expansum* بود. جدایه شماره ۱۰ این مخمر با ۷۸/۵ درصد کاهش تعداد حبه‌های آلوده، موثرترین تیمار در کنترل پوسیدگی ناشی از *B. cinerea* بود.

واژه‌های کلیدی: مخمر، کنترل بیولوژیک، بیماری‌های پس از برداشت، انگور

مقدمه

یکی از عوامل اصلی محدودکننده در صنعت نگهداری و بسته‌بندی میوه‌ها، حساسیت آن‌ها به قارچ‌های بیماری‌زای پس از برداشت است. برای مثال علت اصلی خسارت پس از برداشت محصول انگور پوسیدگی قارچی ناشی از دو قارچ *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea* می‌باشد. با وجود امکانات و تجهیزات پیشرفته انبارداری، همچنان خسارات بعد از برداشت میوه‌ها و سبزیجات در حدود ۱۰ الی ۴۰ درصد ارزیابی شده است (Arras & Arrue, 1999). به‌طور کلی کنترل بیمارگرهای قارچی در زنجیره‌های

غذایی و خوراکی انسان اساساً بر اساس استفاده از قارچ‌کش‌های سنتزی است. متاسفانه قارچ‌کش‌های شیمیایی موجب افزایش سطح باقی مانده‌های خطرناک در محیط و افزایش جمعیت سویه‌های قارچی مقاوم می‌شوند (Sharma *et al.*, 2009) به دلایل سمیت و آلودگی‌های زیست‌محیطی قارچ‌کش‌های شیمیایی و ایجاد مقاومت در قارچ‌ها، دانشمندان در پی یافتن روش‌های جایگزین ایمن و دوستدار محیط زیست هستند.

در کشاورزی ارگانیک استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید (به‌ویژه مخمر و باکتری)، راهی جایگزین و سالم در مدیریت عوامل بیماری‌زای گیاهان پس از برداشت باز کرده است (Janisiewicz & Korsten, 2002) به‌طوری‌که در ۳۵ سال گذشته، فعالیت‌های تحقیقاتی گسترده‌ای برای کشف و توسعه پتانسیل مخمرها به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی عوامل بیمارگرهای پس از برداشت میوه انجام شده است (Zhimo *et al.*, 2020). مخمرها قارچ‌های تک سلولی هستند و در طبیعت روی سطوح میوه‌ها و سبزیجات به طور گسترده وجود دارند و گاهی نسبت به نور خورشید و خشکی مقاوم هستند. تعدادی از آن‌ها از قبیل *Rhodotorula mucilaginosa, Pichia guilliermondii, Candida membrafaciens* و *Sacharomyces cervisieae* در کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی پس از برداشت نقش مهمی ایفا می‌کنند (Freimoser *et al.*, 2019) و برخی از آن‌ها نظیر مخمر *Candida oleophila* به‌عنوان یک عامل کنترل زیستی بیماری‌های پس از برداشت تحت عنوان تجاری Aspire TM توسط Environmental Protection Agency (EPA) در ایالات متحده ثبت شده است (EL–Neshawy, 1997).

در سال‌های اخیر محیط‌هایی با شرایط افراطی از جمله محیط‌های با فعالیت آبی کم، تنوع بالاتری از قارچ‌ها بویژه مراحل غیرجنسی آسکومیست‌ها را آشکار کرده است (Butinar *et al.*, 2007). در چنین محیط‌هایی قارچ‌ها توسط استراتژی‌های مختلف قادرند خود را با شرایط اکولوژیکی سازگار نمایند (Zak &Wildman, 2004). پارک ملی دریاچه ارومیه، منطقه حفاظت شده‌ای است که محدوده‌ای از شرایط معمولی تا افراطی محیطی با محدودهٔ *EC* خاک ۰/۹–۶۸ دسی‌زیمنس بر متر را نشان می‌دهد (Imanfar & Mohebi, 2007).

در تحقیق حاضر، به‌منظور کنترل زیستی دو بیماری کپک خاکستری و کپک آبی انگور، توانایی جدایه‌های جنس *Pichia* (*Meyerozyma*) جداسازی شده از پارک ملی دریاچه ارومیه علیه دو گونه بیماری‌زا *P. expansum* و *B. cinerea* روی انگور مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه بیمارگر

دو بیمارگر *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea* جداسازی شده از باغات انگور حوزه دریاچه ارومیه، از آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز دریافت شد. نمونه‌ها روی محیط PDA کشت گردید.

تهیه مخمرهای آنتاگونیست

این تحقیق با استفاده از ۱۱ جدایه مخمر *Pichia guilliermondii* جداسازی شده از پارک ملی دریاچه ارومیه انجام گرفت. این مخمرها در سال ۱۳۹۴ توسط مختارنژاد و همکاران (Mokhtarnejad *et al.*, 2015) جداسازی و شناسایی شده بود. مخمرها در محیط گیلسرول و در کلکسیون آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه تبریز نگهداری شده بود.

جهت بررسی اولیه آزمون کشت متقابل انجام شد. پس از جامد شدن محیط PDA ابتدا در یک نیمه از تشتک پتری در فاصله یک سانتی‌متری از لبه آن قرصی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از محیط کشت جوان قارچ بیمارگر پنی‌سیلسیوم یا بوتریتیس (۲روزه روی WA) قرار داده شد. ۴۸ ساعت بعد از قرار گرفتن حلقه قارچ بیمارگر بر روی محیط کشت، سوسپانسیون اسپور به غلظت ۱×۱۰^{۶} از جدایه‌های مخمر به سطح دیگر پتری‌دیش اضافه گردید. برای شاهد به جای سوسپانسیون مخمر از آب مقطر سترون استفاده گردید. سپس تشتک‌های پتری به مدت ۱۸ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در داخل انکوباتور قرار داده شد

و قطر پرگنه جدایه‌های قارچ بیمارگر اندازه‌گیری شده و مساحت آن‌ها محاسبه گردید. در نهایت درصدکاهش رشد مسیلیوم قارچ ارزیابی گردید (Etebarian *et al.*, 2005).

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های مخمر روی عوامل پوسیدگی حبه‌های انگور

پس از شست‌وشوی سطحی حبه‌ها با آب جاری، برای انجام ضدعفونی سطحی، حبه‌ها به‌مدت۲۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم ۲٪ غوطه‌ور شده و سپس دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند و نهایتاً به‌مدت ۵ ثانیه با الکل اتیلیک ۹۰ درصد ضدعفونی سطحی شد و سپس بر روی آن‌ها زخمی به قطر ۰/۴ mm ایجاد و سوسپانسیون مخمر با غلظت 1×10^{8} سلول در میلی‌لیتر، که جمعیت آن با استفاده از لام هماسیتومتر تنظیم گردیده بود، بر روی حبه‌های انگور اسپری شد. بعد از آن حبه‌ها داخل ظرف یکبار مصرف منتقل شده و در درون کیسه پلاستیکی قرار داده شد. جهت حفظ رطوبت و جلوگیری از خشک شدن حبه‌ها، درون کیسه‌ها با آب مقطر سترون اسپری شد و رطوبت نسبی درون کیسه‌ها در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) حفظ گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر بر روی حبه‌های تیمار شده با سوسپانسیون مخمری، اسپری گردید وسپس با حفظ رطوبت لازم به انکوباتورهای موردنظر و با دمای ۸ درجه سلسیوس انتقال داده شد (Jijak *et al.*, 1999). پس از دو هفته نگهداری در دمای ۸ درجه سلسیوس، تعداد حبه های آلوده در هر تیمار شمارش شد و میزان مهار بیماری توسط مخمرها محاسبه گردید. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی و با چهار تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ واحد آزمایشی) انجام شد.

نتایج و بحث

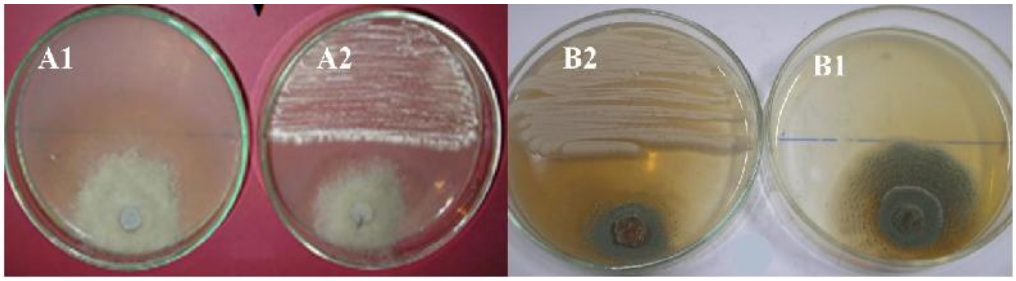
نتایج حاصل از تاثیر یازده جدایه مخمر در مهار رشد هر دو قارچ بر روی محیط کشت مشخص کرد مخمرجدایه ۱۰ از بیشترین قدرت بازدارندگی در مهار هر دو قارچ را برخوردار است بطوریکه قطر هاله بازداندگی آن در برابر *P. expansum* و *B. cinerea* به ترتیب ۸ و ۱۲ میلی متر بود (شکل ۱). مخمرهای جدایه های ۳ و ۸ نیز با قطر هاله بازدارندگی برابر با ۵–۶ میلی متر علیه هر دو قارچ موثر بودند. مابقی جدایه‌ها در مهار رشد قارچ ها موثر نبودند.

تاثیر مخمرهای منتخب در کنترل کپک زدگی حبه های انگور ناشی از *P.expansum*

هر سه مخمر به طور معنی داری از میزان کپک‌زدگی پنیسلیومی حبه‌های انگور ممانعت کردند. مخمر شماره ۸ با ۸۲/۳ درصد کاهش تعداد حبه های آلوده؛ موثرترین تیمار بود. مخمر شماره ۱۰ با ۴۱/۴ درصد کاهش در گروه بعدی قرار گرفت. مخمر شماره ۳ با ۲۵/۸ درصد کاهش تعداد حبه های کپک زده، کم اثرترین بود.

تاثیر مخمرهای منتخب در کنترل کپک‌زدگی حبه‌های انگور ناشی از *B. cinerea*

هر سه مخمر به طور معنی داری از میزان کپک‌زدگی بوتریتیسی حبه‌های انگور ممانعت کردند. مخمر شماره ۱۰ با ۷۸/۵ درصد کاهش تعداد حبه های آلوده؛ موثرترین تیمار بود. مخمر شماره‌های ۸ و ۳ به‌ترتیب با ۵۰/۷ درصد و ۴۷/۱ درصد کاهش در گروه بعدی قرار گرفتند.



شکل ۱– A1، قارچ *Botrytis cinerea*؛ B1، قارچ *Penicillium expansum*؛ و ممانعت از رشد قارچ A2، *B. cinerea* و B2، *P. expansum* در کشت متقابل با مخمر *Pichia guilliermondii* isolate 10 روی محیط PDA.

Figure 1. A1, *Botrytis cinerea*; B1, *Penicillium expansum*; Hyphal growth inhibition of A2, *B. cinerea* and B2, *P. expansum* by *Pichia guilliermondii* isolate 10 in dual culture method on PDA medium.

جدول ۱- اثر مخمرهای منتخب در کاهش پوسیدگی حبه‌های انگور مایه‌زنی شده با *P. expansum* پس از ۱۴ روز نگهداری در دمای ۸ درجه سلسیوس

Table 1. Effect of selected yeasts on reducing the rot of grape inoculated with *P. expansum* after 14 days of storage at 8 ° C

Treatment	Healthy grape %
Yeast isolate 3 + *P. expansum*	25.08* d**
Yeast isolate 8 + *P. expansum*	82.3 b
Yeast isolate 10 + *P. expansum*	41.4 c
Non infected control + distilled water	100.0 a
Infected control by *P. expansum* + distilled water	4.2 e

* اعداد جدول میانگین چهار تکرار می‌باشند.

** تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن در سطح ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

* Results are the mean of four replicates.
** Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر مخمرهای منتخب در کاهش پوسیدگی خاکستری حبه‌های انگور مایه زنی شده با *B. cinerea* پس از ۱۴ روز نگهداری در دمای ۸ درجه سلسیوس

Table 2. Effect of selected yeasts on reducing the grey rot of grape inoculated with *B. cinerea* after 14 days of storage at 8 ° C

Treatment	Healthy grape %
Yeast isolate 3 + *B. cinerea*	47.1* c**
Yeast isolate 8 + *B. cinerea*	50.7 c
Yeast isolate 10 + *B. cinerea*	78.5 b
Non-infected control + distilled water	100.0 a
Infected control by *B. cinerea* + distilled water	2.2 b

* اعداد جدول میانگین چهار تکرار می‌باشند.

** تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن در سطح ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

* Results are the mean of four replicates.
** Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

در کنترل زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، به‌طور طبیعی یکسری مکانیسم‌ها علیه بیماری‌زاها دخیل هستند که باعث ایجاد اختلال در چرخهٔ زندگی میکروارگانیسم هدف می‌گردد و در نهایت از توسعه و گسترش بیماری ممانعت می‌نماید. مکانیسم‌های دخیل در کنترل زیستی شامل رقابت بر سر فضا و مواد غذایی، انگل بودن، اثر ضد حیات و القای سیستم مقاومتی در میزبان می‌باشد (Janisiewicz & Korsten, 2002). نتایج آزمایشات درویفر و همکاران نشان می‌دهد که احتمالاً یکی از مکانیسم‌های کنترل کنندگی *P. anomala* بر علیه *P. roqueforti* تولید اتیل استات می‌باشد (Druvefors, 2004). لیلبرو نیز آزمون ترکیبات فرار را انجام داد که در بین چند جدایه از مخمر جنس *Pichia* و دو جدایه *P. anamola* و *P. lusitania* رشد میسلیومی *P. ruqeoforti* را کنترل نمودند (Lillbro, 2005).

یک مخمر کنترل زیستی موفق در برابر بیماری‌های پس از برداشت باید ویژگی‌هایی از قبیل داشتن ثبات ژنتیکی، اثرگذار در غلظت پایین، عدم سخت کشت بودن، سازگار در شرایط نامساعد انبار (نواسانات دمایی، تنش اکسیداتیو در میزبان، ترکیبات نامتعادل اتمسفری)، موثر علیه دامنهٔ وسیع از بیماری‌زاها در میزبان‌های مختلف، توانایی رشد در محیط کشت ارزان، فرمولاسیون قابل نگهداری و توزیع در بازار مصرف، توانایی رقابت با سایر سموم زیستی در بازار و مقاوم در برابر سایر قارچ کشها، بی‌اثر علیه میکروارگانیسم‌های غیر هدف و عدم تولید متابولیت مضر انسانی را داشته باشد (Barkai–Golan, 2001). در پایان با توجه به اینکه دمای پائین برای نگهداری طولانی مدت محصولات زیستی ضروری می‌باشد و این مسئله موجب تحمیل هزینه‌های سنگین می‌شود، لازم است کارایی محصولات زیستی به جای بررسی در دامنه دمایی محدود و کنترل شده، در دامنه دمایی وسیع‌تری مورد بررسی قرار گیرد . (Antoon & Loomans, 2020)

References

Antoon, J. & Loomans, M. 2020. Every generalist biological control agent requires a special risk assessment. BioControl, 66: 23–35.

Arras, G. & Arru, S. 1999. Integrated control of postharvest citrus decay and induction of phytoalexins by *Debaryomyces hansenii*. Adv. Horticulture Science, 13: 76–81.

Barkai–Golan, G. R. 2001. Postharvest disease of fruit and vegetables: Development and control. Amsterdam, NL: Elsevier Science B.V. 418 pp.

Butinar, L., Spencer–Martins, I. & Gunde–Cimerman, N. 2007. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. Antonie van Leeuwenhoek, 91: 277–289.

Druvefors, U.A. 2004. Yeast biocontrol of grain spoliage moulds–mode of action of *Pichia anomala*. Doctor's dissertation, performed at the Department of Microbiology Swedish University of Agriculture Science. 44pp.

EL–Neshawy, S.M. 1997. Nisin enhancement of biocontrol of postharvest disease of apple with *Candida oleophila*. Postharvest Biology and Technology, 10: 9–14.

Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., Eastwell, K.C. & Sayler, R.J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal Microbiology, 51: 591–598.

Freimoser, F.M., Rueda‐Mejia, M.P., Tilocca, B. & Migheli, Q. 2019. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35:154.

Janisiewicz, W.J. & Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual Review of Phytopathology, 40: 411–441.

Jijak, M.H., Lepoivre, P. & Grevesse, C. 1999. Yeast species for biocontrol of apple post–harvest diseases; an encouraging case of study for practical use. In: Upadhyay RK, Mukerji (eds). Biotechnological approaches in biocontrol of plant pathogens. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 31–49.

Lillbro, M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain–acomparison of mode of action of several yeast species. Master Theisis for the Agriculture Programme, animal science, performed at the Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Sciences, 21pp.

Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M. & Babai–Ahari, A. 2015. Molecular and phenotypic characterization of ascomycetous yeasts in hypersaline soils of UrmiaLake basin (NW Iran). Rostaniha, 16: 174–185.

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

Zak, J.C. & Wildman, H.G. 2004. Fungi in stressful environments. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (ed) Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods. Elsevier/Academic, London, 303–315.

Zhimo, V.Y., Biasi, A., Kumar, A., Feygenberg, O., Salim, S., Vero, S., Wisniewski, M. & Droby, S. 2020. Yeasts andBacterial Consortia from Kefir Grains Are Effective Biocontrol Agents of Postharvest Diseases of Fruits. Microorganisms, 8: 428.

Short Article

Evaluation of biocontrol potential of *Pichia guilliermondii* yeast isolated from Urmia Lake in control of postharvest diseases of grapevine

Lachin Mokhtarnejad[1], Mahdi Arzanlou[2]

1. Plant Protection Research Department, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran
2. Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Corresponding author: Lachin Mokhtarnejad, email: l.mokhtarnejad@gmail.com

Received: Apr., 22, 2021 8(2) 143–149 Accepted: Sept., 25, 2021

Abstract

Postharvest diseases cause a lot of damage to grapes and reduce the quality and marketability of the product. These infections are mainly caused by the fungal species *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*, which are the most important pathogen of postharvest grape rot worldwide. Biological control has become important to control these postharvest diseases due to the recent global awareness of the side effects of chemical agents. In this study, the biocontrol ability of yeasts isolated from Urmia Lake basin against postharvest diseases of grapes has been investigated. We used 11 yeasts belonged to *Pichia guilliermondii* species isolated from Urmia Lake basin. The results of inhibitory activity of 11 *P. guilliermondii* isolates against two postharvest pathogens of grape, *P. expansum* and *B. cinerea*, showed that three yeast isolates can considerably inhibit both fungi in dual culture method on PDA medium. Three promising isolates were selected to reduce postharvest decays of grape at the storage period. The results exhibited that three yeast isolates could significantly reduce grape decays. The yeast isolate 8 by reducing 82.3% of grape decays, showed the strongest activity against *P. expansum*. The yeast isolate 10 was found the most effective isolate to suppress *B. cinerea* decay on grape by 78.5%.

Keywords: yeast, biological control, postharvest disease, grapevine