مقاله کوتاه

کنترل بیولوژیک بیماری کپک آبی سیب توسط مخمر *Metschnikowia pulcherrima* و بررسی امکان تلفیق آن با سیلیکون و برخی مکانیسم‌های دفاعی*

BIOLOGICAL CONTROL OF APPLE BLUE MOLD DISEASE WITH *Metschnikowia pulcherrima* ALONE AND IN COMBINATION WITH SILICON AND ITS MECHANISMS OF ANTAGONISM

لیلا ابراهیمی، حسن رضا اعتباریان، حشمت اله امینیان و نوازاله صاحبانی [۱]**

(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۷)

چکیده

چکیده: فعالیت بیوکنترلی مخمر *Metschnikowia pulcherrima* به تنهایی و در ترکیب با سیلیکون علیه قارچ *Penicillium expansum* و توانایی مخمر برای القای پاسخ‌های دفاعی در بافت میوه سیب مورد بررسی قرار گرفت. در شرایط آزمایشگاهی، میزان درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر با انجام آزمون‌های کشت متقابل، متابولیت‌های غیرفرار و مواد فرار مورد آزمایش قرار گرفت. در شرایط آزمایشگاهی، غلظت‌های مختلف سیلیکون رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری را به‌خوبی کنترل کرد. غلظت‌های مختلف سیلیکون در شرایط آزمایشگاهی در محیط مایع روی جمعیت مخمر تأثیر چندانی نداشت. در بررسی‌های انباری، هر یک از زخم‌های روی میوه‌ها با ۲۰µl سوسپانسیون مخمر و سیلیکون به تنهایی و ترکیب مخمر با غلظت‌های مختلف سیلیکون تلقیح شدند. بعد از ۲٤ ساعت ۲۰µl سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر در محل زخم‌ها مایه‌زنی شد. سپس سیب‌ها در دو دمای ۴°C و ۲۰°C نگهداری شدند. قطر لکه‌ها در دمای ٤°C و ۲۰°C، به ترتیب، چهل‌وپنج و پانزده روز بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. سیلیکون تأثیر معنی‌داری بر جمعیت مخمر در محل زخم‌ها نداشت. در هر دو شرایط دمایی مخمر همراه با سیلیکون اثر کنترلی بهتری نسبت به مخمر و سیلیکون به تنهایی داشت. فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل در میوه‌های مایه‌زنی شده با مخمر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: بیوکنترل، پراکسیداز، سیب، سیلیکون، فنل کل

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: le_ebrahimi@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و دانشیاران حشره شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

مقدمه

بیماری‌های قارچی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشت سیب هستند که این عوامل قارچی گاهی اوقات باعث خسارت بالغ بر ۵۰٪ در میوه‌ها می‌شوند (Eckert & Ogawa 1988). اولین راه کنترل بیماری‌های بعد از برداشت میوه‌ها، استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌باشد که امروزه به دلایل مختلفی این روش کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از بین روش‌های مختلف کنترل بیماری‌های پس از برداشت، می‌توان به کنترل بیولوژیک اشاره کرد (Spotts *et al*. 1998). از طرفی، کاربرد برخی عوامل بیوکنترل به تنهایی، اغلب کنترل قابل قبولی را از نظر اقتصادی فراهم نمی‌کند، در حالی‌که در ترکیب با سایر استراتژی‌ها، آثار عامل بیوکنترل به مراتب افزایش خواهد یافت (Guo Tian 2005). یکی از راه‌کارهایی که در این زمینه وجود دارد، استفاده از موادی همچون سیلیکون می‌باشد که سیلیکون از جمله عناصر ساختمانی مهم در گیاهان می‌باشد و اثر کنترلی خوبی روی بیماری‌های قارچی دارد. *کین و تیان* (Qin and Tian 2005) گزارش کردند که سیلیکون به‌طور موثری فعالیت بیوکنترلی مخمر *Cryptococcus laurentii* را علیه بیماری کپک آبی و پوسیدگی قهوه‌ای میوه گیلاس افزایش داد.

روش بررسی

دو جدایه A4 و A6 قارچ عامل بیماری *Penicillium expansum* (جداسازی شده از روی میوه سیب و شناسایی شده توسط *عربی* (۲۰۰۹) به روش PCR-RFLP) و جدایه M12 مخمر *Metschnikowia pulcherrima* (جداسازی شده از روی میوه سیب و شناسایی شده توسط *مختاری* (۲۰۱۰) به روش PCR-FSP) از آزمایشگاه بیماری‌شناسی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران دریافت شد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦ و ۱٪ (wt/vol)) سیلیکون روی رشد قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی (هر تیمار در چهار تکرار) بر اساس روش *دروبی و همکاران* (Droby *et al*. 2003) روی محیط کشت PDA انجام شد. اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون بر رشد مخمر در شرایط آزمایشگاهی بر اساس روش *تیان و همکاران* (Tian *et al*. 2002) در محیط NYDB (Nutrient yeast dextrose broth) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، (هر تیمار در چهار تکرار) مورد آزمایش قرار گرفت.

اسپورهای قارچ از کشت ۱۴ روزه جدایه *P.expansum* A4 روی محیط کشت PDA تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون یک لوپ از اسپور از روی محیط کشت برداشته شد و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵٪ (vol/vol) توئین ۲۰ غوطه‌ور گردید. غلظت مورد نیاز ۱×۱۰^{۵} کنیدی در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود که با استفاده از لام هماسیتومتر به‌دست آمد (Batta 1999). برای تهیه سوسپانسیون مخمر ابتدا به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت NYDB یک لوپ از سلول‌های مخمر افزوده شد. سپس روی شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت (El Ghaouth *et al*. 1998). سپس با استفاده از لام هماسیتومتر سوسپانسیون مخمر در غلظت مورد نظر (۱×۱۰^{۸} سلول در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل) تهیه گردید.

جهت انجام آزمایش از رقم زرد میوه‌های سیب استفاده شد. پس از شستشوی سیب‌ها با آب، سیب‌ها به مدت پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱٪ تجاری قرار داده شدند و پس از دو بار شستشو با آب مقطر

استریل، در اتانول ۹۵٪ فرو برده و در مجاورت هوا خشک گردیدند. سپس توسط یک میخ استریل سه سوراخ به قطرهای ۲/۵ mm و عمق ۳ mm به فاصله یکسان از گلگاه میوه در هر سیب ایجاد شد.

پس از آماده شدن سیب‌ها برای مایه‌زنی، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر و سیلیکون به تنهایی و ترکیب مخمر با غلظت‌های مختلف سیلیکون (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۱٪ (wt/vol)) در هر چاهک مایه‌زنی شد. سپس سیب‌ها داخل ظروف یک بار مصرف گذاشته شده و درون کیسه پلاستیکی قرار داده شدند. جهت حفظ رطوبت سیب‌ها با آب استریل در درون کیسه‌ها اسپری شد و رطوبت نسبی درون کیسه‌ها در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) نگه داشته شد.

پس از ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری به داخل زخم‌های تیمار شده مایه‌زنی شد. تیمارهای شاهد با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند (Etebarian *et al*. 2005). هر تیمار در چهار تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. سپس سیب‌ها در شرایط انباری با دو دمای ۲۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد، به ترتیب به مدت ۱۵ و ۴۵ روز نگه‌داری شدند.

جمعیت مخمر در میوه‌های سیب مایه‌زنی شده با قارچ به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های مختلف سیلیکون در شرایط دمایی $20^{\circ}C$ و $4^{\circ}C$ مطابق روش *نانس و همکاران* (Nunes *et al*. 2001) اندازه‌گیری شد. از محل چاهک‌ها قطعاتی به وزن یک گرم توسط اسکالپل جدا شد و در نه میلی‌لیتر آب مقطر استریل ورتکس شد تا کاملاً مخلوط شود. از سوسپانسیون حاصل تا رقت 10^{-6} تهیه شد. سپس ۲۰۰µl از سوسپانسیون‌های با رقت 10^{-5} و 10^{-6} بر روی محیط PDA پخش شد، و پس از ۲۴ تا ۳۶ ساعت، یعنی قبل از ظهور پرگنه‌های قارچ، تعداد پرگنه‌های مخمر مورد شمارش قرار گرفت. هر تیمار (رقت) دارای سه تکرار بود. جمعیت مخمر در چاهک‌های سیب در روزهای ۸ و ۱۴ بعد از مایه‌زنی مخمر (۲۰ درجه سانتی‌گراد)، و در روزهای ۳۰ و ۳۸ بعد از مایه‌زنی مخمر (۴ درجه سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گرفت.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول (POD)، استخراج عصاره سیب طبق روش *گنگ* (Gong *et al*. 2001) انجام شد. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم بر اساس روش *گورین و هلدما* (Gorin & Heldema 1976) انجام شد.

برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میکروگرم پروتئین موجود در بافت؛ میزان پروتئین تام موجود در نمونه‌ها به روش *برادفورد* (Bradford 1976) تعیین شد. استخراج فنل از بافت سیب و ارزیابی میزان فنل کل به روش ذکر شده توسط *اعتباریان* (Etebarian 1989) انجام شد. آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن ($P \leq ۰/۰۵$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتیجه و بحث

در شرایط آزمایشگاهی سیلیکون در غلظت‌های بالای ۰/۶٪ به طور کامل و صد در صد از رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری جلوگیری کرد. جمعیت مخمر همراه با سیلیکون مانند تیمار مخمر به تنهایی، در طی ۴۸ ساعت روند افزایشی داشت و سیلیکون در غلظت‌های مختلف تأثیر سوئی روی جمعیت مخمر نداشت.

در دمای ۲۰ و ٤ درجه سانتی‌گراد غلظت‌های مختلف سیلیکون و هم‌چنین مخمر آنتاگونیست هر کدام به تنهایی

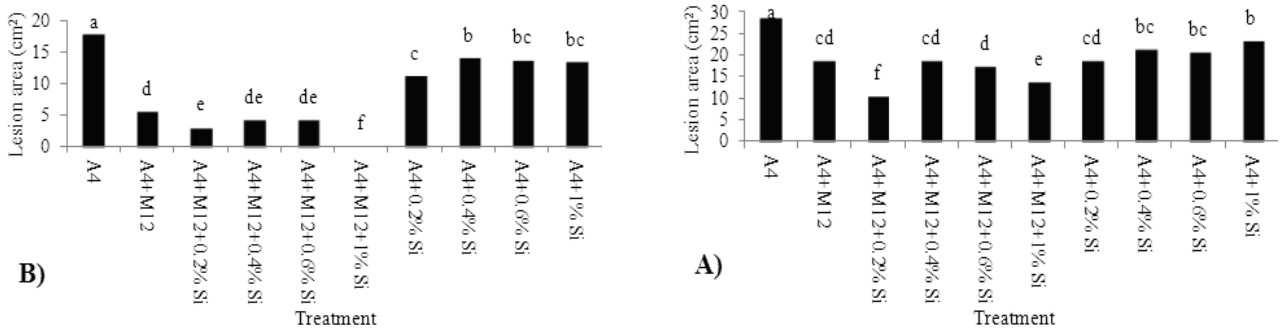
باعث کاهش مساحت لکه بیماری روی سیب شدند. بین تیمارها در هر دو شرایط دمایی تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. اما در تیمارهای مخمر آنتاگونیست در ترکیب با غلظت‌های مختلف سیلیکون کاهش بیشتری در مساحت لکه‌های روی میوه‌ها دیده شد. در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان بازدارندگی، مربوط به تیمار مخمر در ترکیب با غلظت ۰/۲٪ سیلیکون بود (شکل 1A). در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تیمار مخمر در ترکیب با سیلیکون ۱٪ به طور کامل از بیماری جلوگیری کرد (شکل 1B). کنترل بیماری توسط تیمارهای مختلف، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۰ درجه بهتر بود.

در شرایط انباری، کاربرد سیلیکون به تنهایی تا حدی بیماری را کنترل کرد و باعث کاهش مساحت لکه‌ها شد، اما اثر کنترلی قابل قبولی را روی بیماری نشان نداد. در حالیکه کاربرد سیلیکون همراه با مخمر آنتاگونیست، باعث افزایش خاصیت بیوکنترلی مخمر *M. pulcherrima* علیه بیماری کپک آبی سیب شد. *تیان و همکاران* (Tian *et al.* 2004) نیز گزارش کردند خاصیت بیوکنترلی مخمرهای *Cryptococcus laurentii* و *Rhodotorula glutinis* در ترکیب با سیلیکون در کنترل بیماری‌های کپک آبی و پوسیدگی آلترناریایی میوه جوجوبا افزایش یافت و سیلیکون در غلظت ۲٪ وزن به حجم بیشترین اثر را داشت. *فراهانی* (۲۰۱۱) سیلیکون را در ترکیب با مخمرهای *Candida membranifaciens* و *Pichia guilliermondii* علیه بیماری کپک آبی سیب مورد آزمایش قرار داد که در آزمایش‌های انجام شده، تیمار سیلیکون ترکیب شده با مخمر به میزان مؤثری بیماری کپک آبی را کنترل کرد. همان‌طور که دیده شد سیلیکون اثر قارچ ایستایی مستقیمی را روی قارچ عامل بیماری، در شرایط آزمایشگاهی نشان داد، اما تأثیر زیادی روی رشد آنتاگونیست نداشت. و بدین ترتیب در شرایط انباری نیز با اثر مستقیم روی قارچ عامل بیماری ممکن است باعث کاهش بیماری شده باشد.

در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، سیلیکون در غلظت ۰/۲٪ باعث افزایش جمعیت مخمر و در غلظت ۱٪ باعث کاهش آن شد. در غلظت‌های ۰/٤ و ۰/٦٪ سیلیکون تأثیری در جمعیت مخمر نداشت. در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، غلظت‌های مختلف سیلیکون باعث کاهش اندکی در جمعیت مخمر نسبت به شاهد شد. در هر دو شرایط دمایی، سیلیکون تأثیر معنی‌داری روی رشد جمعیت مخمر نداشت. این عدم تأثیر سوء سیلیکون روی عامل بیوکنترلی به عنوان یک مزیت در روش تلفیقی محسوب می‌شود.

در آزمایش‌های انجام شده توسط *فراهانی* (۲۰۱۱) رشد مخمرهای *C. membranifacien* و *P. guilliermondii* تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکون در زخم‌های روی میوه در شرایط انباری، کاهش یافت. *کین و تیان* (Qin and Tian 2005) گزارش کردند که رشد مخمر *C. laurentii* در میوه گیلاس پس از ٤٨ ساعت افزایش یافت.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان ترکیبات فنلی نشان داد که مخمر باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم و ترکیبات فنلی می‌شود و بدین ترتیب باعث القای واکنش‌های دفاعی در بافت میوه سیب می‌گردد. مقاومت در گیاهان می‌تواند از طریق القاگرهای زنده و غیرزنده ایجاد شود (Schneider *et al.* 1994). مخمرهای آنتاگونیست قادر به تولید متابولیت‌ها، کلونیزاسیون زخم‌های روی میوه و ایجاد مقاومت القایی در میوه‌ها می‌باشند. مکانیزم افزایش خاصیت بیوکنترلی مخمر آنتاگونیست توسط سیلیکون



شکل ۱. مساحت لکه در سیب‌های تیمار شده با مخمر *Metschnikowia pulcherrima* (M12) و غلظت‌های مختلف سیلیکون در کنترل قارچ *Penicillium expansum* در دمای ۲۰°C (A) و ۴°C (B)، به ترتیب، در روز پانزدهم و چهل و پنجم. هر تیمار دارای چهار تکرار بوده و تیمارهای دارای حروف مشترک در آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند (P ≤ ۰/۰۵).

Fig. 1. Effect of different concentrations of silicon and yeast on the decay area on apple fruis. Lesion area was determined 15 and 45 days after storage at 20°C (A) and 4°C (B), respectively. There were four replicates in each treatment. Values followed by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at P < 0.05.

ممکن است مربوط به القای سیستم دفاعی در میوه‌ها باشد. در آزمایش‌های انجام شده توسط *فراهانی* (۲۰۱۱) تیمار ترکیبی مخمر و سیلیکون به عنوان یک محرک در القا و سنتز آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی عمل کرد که اینها دارای نقش دفاعی در بافت میوه علیه قارچ عامل بیماری می‌باشند. *کین و تیان* (Qin and Tian 2005) گزارش کردند آنزیم‌های فنیل‌آمونیالیاز، پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز در میوه‌های گیلاس تیمار شده با سیلیکون به طور قابل توجهی افزایش یافت.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (40-39) متن انگلیسی مراجعه شود.