پنجمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، دانشکده کشاورزی
۲۸-۲۷ بهمن ماه ۱۳۸۹

بررسی اثر کنترل کنندگی مخمر آنتاگونیست *Pichia guilliermondii* M63 بر روی بیماری پس از برداشت کپک آبی با عامل *Penicillium italicum* روی میوه پرتقال تامسون در دمای ۲۰ و ۵ درجه سانتی گراد

راحیل قاسمی سردره*، حسن رضا اعتباریان، نواز اله صاحبانی، حشمت اله امینیان و لیلا فراهانی
گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
Rahil.ghasemi@gmail.com*

چکیده

یکی از خسارات عمده مرکبات در دنیا شیوع و گسترش فزاینده پوسیدگی پس از برداشت می باشد که توسط کپک آبی(*Penicillium italicum*) بوجود می آید. تاثیر جدایه ی آنتاگونیست*Pichia guilliermondii* M63 در کنترل رشد میسلیومی در آزمون کشت متقابل، آزمون متابولیت فرار و آزمون ترکیبات غیر فرار در روی محیط کشتPDA انجام گرفت که مساحت پرگنه ها بطور معنی داری کاهش یافت. در بررسی اثر جدایه ی مخمر در کنترل بیولوژیک بیماری کپک آبی بر روی پرتقال برای دوره انبار، چهار طرف میوه ها با سوراخهایی به عمق ۳mm زخمی شدند و ۴۰µl از سوسپانسیونcells/ mL $۱×۱۰^{۸}$ از جدایه های مخمر و سپس بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۲۰µl از سوسپانسیون با غلظتcells/ mL $۱×۱۰^{۵}$ قارچ عامل بیماری تلقیح شد و سپس میوه ها در دو دمای$۲۰^{\circ}C$ و $۵^{\circ}C$ قرار گرفتند. در هر دو دما مساحت لکه های ایجاد شده بطور معنی داری کاهش یافت.

واژگان کلیدی: *Pichia guilliermondii* M63، *Penicillium italicum*، پرتقال و کنترل بیولوژیک

مقدمه

پرتقال دومین میوه پرمصرف در دنیاست. نظر به استفاده از پرتقال در تمام سال نیاز این محصول به انبارداری امری اجتناب ناپذیر است. با وجود امکانات و تجهیزات پیشرفته انبارداری خسارات بعد از برداشت میوه ها و سبزیجات در حدود ۴۰-۱۰٪ ارزیابی شده است(Wilson & Wisniewski, 1994). یکی از مهمترین قارچ هایی که در انبار به پرتقال خسارت می زنند قارچ *Penicillium italicum* Wahmer. عامل کپک آبی می باشد که به دلیل داشتن توکسین حائز اهمیت است. از موثرترین راه ها برای کنترل بیماری های بعد از برداشت استفاده از قارچ کش ها از جمله تیابندازول و سدیم اورتوفنیل فنات است، ولی با توجه به اثرات سوء مبارزه شیمیایی از جمله فقدان خاصیت انتخابی کافی، تاثیر سوء روی موجودات غیر هدف، تهدید سلامتی انسان و جانوران و محیط زیست، نابودی دشمنان طبیعی و ایجاد نژادهای مقاوم عامل بیماریزا، نیاز به یک روش جایگزین مبارزه شیمیایی کاملا مشخص می شود(Janisiewicz *et al.*,2001).

مواد و روش ها

عامل بیماری و آنتاگونیست : جدایه مخمر *Pichia guilliermondii* M63 به عنوان آنتاگونیست و یک جدایه از قارچ *Penicillium italicum* به عنوان عامل بیمارگراز آزمایشگاه بیماری شناسی دانشگاه تهران(پردیس ابوریحان) دریافت شد.

تهیه سوسپانسیون قارچ عامل بیماری: سوسپانسیون قارچ عامل بیماری از کشت۷ تا۱۰ روزه روی محیط کشتPDA تهیه شد.به این ترتیب که با یک لوپ مقداری از اسپور قارچ عامل بیماری برداشته شد و سپس در ۱۰ میلی لیتر آب مقط استریل حاوی ۰/۰۵٪(حجم به حجم) توین ۲۰ غوطه ور گردید. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت $۱۰^{۵}$ کنیدی در هر میلی لیتر با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر استریل استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون آنتاگونیست: ابتدا به ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت NYDB یک لوپ از سلول های مخمر افزوده شد. سپس روی شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ٤٨ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. (El Ghaouth *et al*., 1998). پس از آن با استفاده از لام هماسیتومتر سوسپانسیون آنتاگونیست در غلظت مورد نظر ($۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی لیتر) تهیه گردید.

پرتقال: پرتقال های مورد استفاده در این بررسی پرتقال های رقم تامسون ناول بودند. پس از شستشوی پرتقال ها با آب، پرتقال ها به مدت ۱ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۰/۱٪ تجاری قرار داده و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۵٪ شسته شدند. سپس بر روی هر پرتقال ٤ چاهک به فواصل مساوی با میخ استریل به قطرmm ۳ و عمق ٤mm زده شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی و جمعیت مخمر آنتاگونیست *Pichia guilliermondii* M63 در کنترل بیماری کپک آبی پرتقال در شرایط دمایی ۲۰ و ۵ درجه سانتی گراد:

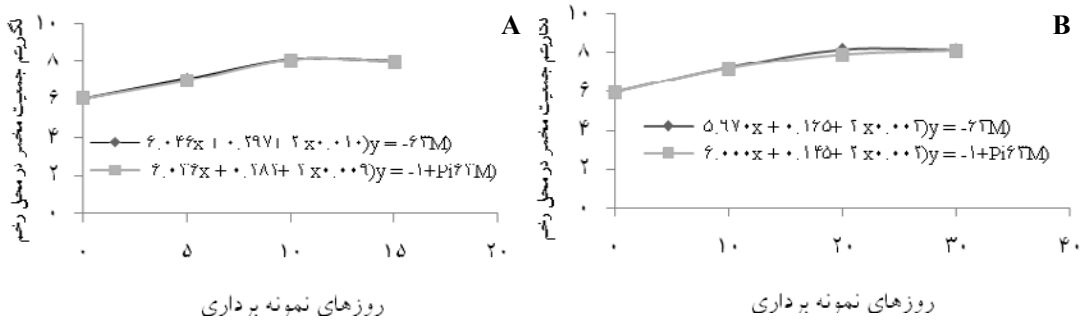
ابتدا ٤٠ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر با غلظت ۱×۱۰^{۸}سلول در میلی لیتر به هر چاهک از پرتقال مایه زنی شد. سپس از ٢٤ ساعت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچی به داخل سوراخ‌های تیمار شده با سوسپانسیون مخمری ، مایه زنی شدند. وسپس پرتقال ها به انکوباتورهای با دمای مشخص انتقال داده شدند. چاهک های مایه کوبی نشده، با آب مقطر استریل تیمار شدند . اندازه گیری جمعیت مخمر طبق روش Nunes و همکاران در سال ۲۰۰۱ با کمی تغییر انجام شد .از محل چاهک‌ها به کمک اسکالپل قطعاتی به وزن ۱ گرم بیرون آورده شد و در۹ میلی لیتر آب مقطر استریل قرار داده شد سپس از این سوسپانسیون تا رقت $۱۰^{-٦}$ تهیه شد.و ۲۰۰µL از آن بر روی محیط PDA ریخته‌شد، و پس از ٤٨ ساعت تعداد پرگنه‌های مخمر شمارش شد. پرتقال ها به مدت ۱۵ روز در دمای$۲۰\pm۱^{\circ}C$ نگهداری شدند و هر ۵ روز یکبار قطر لکه ها وجمعیت مخمر اندازه گیری شد. در دمای $۵^{\circ}C$ نیز به مدت ۳۰ روز و هر ۱۰ روز یکبار قطر لکه ها و جمعیت مخمراندازه گیری شد.

نتایج و بحث

اثر آنتاگونیستی جدایه ی مخمر بر روی کپک آبی پرتقال در شرایط دمایی $۵^{\circ}C$ و $۲۰\pm۱^{\circ}C$: جدایه مخمر *Pichia guilliermondii* M63 در کنترل کپک آبی در دمای انبار ۵ و ۲۰درجه سانتی گراد موفق عمل نمود. در $۵^{\circ}C$ مساحت لکه پوسیدگی در پرتقال های تیمار شده با آنتاگونیست *Pichia guilliermondii* M63 بعد از گذشت ۳۰ روز مایه زنی با عامل بیمارگر٤/۳۱ میلی متر مربع

در مقایسه با ۲۴/۳۹میلی متر مربع درشاهد بود. در ۲۰±۱°C مساحت لکه پوسیدگی در پرتقال های تیمار شده با آنتاگونیست M63 بعد از ۱۵ روز مایه زنی با عامل بیمارگر۶/۰۲ میلی متر مربع در مقایسه با ۲۰/۳۳میلی متر مربع درشاهد بود.

تغییرات جمعیت مخمر آنتاگونیست در پرتقال های مایه زنی شده در شرایط دمایی ۵°C و ۲۰±۱° C



منحنی A مربوط به جمعیت مخمر *Pichia guilliermondii* M63 در دمای ۵ درجه سانتی گراد و منحنی B در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد(y لگاریتم تعداد مخمر ها و x تعداد روزهای پس از مایه زنی در دمای ۵°C و ۲۰°C می باشد)

معادله جمعیت مخمر *Pichia guilliermondii* M63 در دمای ۵ و ۲۰ درجه سانتیگراد در شکل آمده است. در ۵ درجه جمعیت مخمر تا روز بیستم افزایش پیدا کرد و سپس سیر نزولی را در طی روزهای نمونه برداری طی نمود و در ۲۰ درجه جمعیت تا روز دهم افزایش و سپس سیر نزولی را طی نمود.

نتایج آزمایش های انباری نشان داد که این جدایه آنتاگونیست توانایی کاهش شدت پوسیدگی و جلوگیری از رشد و توسعه قارچ عامل بیماری را دارا می باشد. مخمر مورد استفاده در این تحقیق هم در دمای ۲۰ و هم ۵ درجه سانتی گراد قادر به کنترل قارچ عامل بیماری بوده اند. توانایی تطبیق این مخمرها با دامنه وسیعی از دما، باعث می شود که آنها بتوانند در مکانهای مختلفی اعم از سردخانه، درحمل و نقل و نیز در مغازه ها، دوام داشته و قابل استفاده باشند. استفاده از مخمرها یک تکنولوژی جدید برای کنترل بیماری های پس از برداشت می باشد و در طولانی مدت می توان انتظار داشت که این مواد بیولوژیکی سطح کنترل قابل مقایسه ای را با سطح کنترل قارچ کشهای شیمیایی بوجود آورند. در نتیجه از این مخمرها می توان در محیط زیست استفاده کرد و علاوه بر کم کردن خسارت قارچ کشها بر روی انسان از مقاومت قارچ ها در برابر این عوامل کاست. . این منحنی های رشد ثابت می کند که که جدایه آنتاگونیست می تواند در زخم های پرتقال رشد کند و آنها را کلونیزه کند. حتی بعد از ۳۰ روز در دمای ۵ درجه سانتی گراد تعداد سلول های زنده نسبت به آنچه در ابتدا به داخل زخم ها مایه زنی شده بود بیشتر بود. احتمالا این آنتاگونیست ظرفیت بالایی برای کلونیزه کردن زخم ها دارد و می تواند آنتاگونیست موثری در جهت کنترل بیماری های پس از برداشت باشد.

نتیجه گیری کلی

نتایج این بررسی نشان می دهد که این جدایه مخمری دارای توان بیوکنترلی بر علیه بیماری کپک آبی پرتقال می باشد. در نتیجه از این مخمرها می توان در محیط زیست استفاده کرد و علاوه بر کم کردن خسارت قارچ کشها بر روی انسان از مقاومت قارچ ها در برابر این عوامل کاست.

منابع

El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., and Wisniewski, M. 1998. Ultra structural and *cytochemical* aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathol, 88: 282-291.

Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., and Vinas, I. 2001. Biological control of postharvest Pear diseases using a bacterium *Pantoea agglomerans* CPA-2. In: J. Food microbial. 701: 53-61.

Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Droby, S., and Chalutz E. 1994. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. Sci. Hort., 53: 183-189.

Janisiewicz, W.J., Tworkoski, T.J. and Kurtzman, C.P. 2001.Biocontrol potential of *Metchnikowa pulcherrima* strains against blue mold of apple. Phytopathology. Vol.91, NO. 11.1098-1107.