افزایش عمر پس از برداشت میوه‌ی هلو توسط عوامل کنترل زیستی شامل دو جدایه *Aureobasidium pullulans*

سعیده علیزاده سالطه[۱*]، جاوید عمارت پرداز[۲] و حسن خوش قلب[۳]

۱- استادیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۲- دانش آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۳- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه صنعتی شاهرود.

*مسئول مکاتبه s.alizadeh@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۲

چکیده

با توجه به ضایعات بالای پس از برداشت میوه‌ی هلو و محدودیت استفاده از قارچکش‌های شیمیایی، ارائه راهکارهای مناسب جهت کنترل عوامل بیماریزای پس از برداشت از ضرورت برخوردار است. ترکیبات طبیعی دارای خواص ضد قارچی و ضد میکروبی می‌توانند جهت افزایش عمر انبارمانی میوه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به این که بیماری پوسیدگی ریزوپوسی ناشی از *Rhizopus stolonifer*، یکی از عوامل اصلی پوسیدگی میوه‌ی هلو در مراحل مختلف پس از برداشت است، در این تحقیق اثر آنتاگونیستی دو سویه L1 و L8 مخمر *Aureobasidium pullulans* بر قارچ *R. stolonifera* بر روی میوه‌ی هلو در غلظت‌های مختلف سوسپانسیون مخمر (10^8، 10^7 و 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر) و همچنین حالت‌های مختلف استفاده از این مخمر (شسته شده (WC)، فیلتر شده (FC) و اتوکلاو شده (AC) در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که فقط در حالت سلول‌های شسته شده، هر دو جدایه‌ی مخمر به‌طورمعنی‌داری پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو را کنترل کردند. بین غلظت‌های مختلف به‌کار رفته، بالاترین غلظت (10^8) هر دو مخمر، بیشترین میزان کنترل پوسیدگی ریزوپوسی را بر روی میوه‌های هلو نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیماری‌های پس از برداشت، هلو، *Rhizopus stolonifer*.

مقدمه

میوه‌های مختلف مانند هلو دارای ضایعات پس از برداشت زیادی نظیر ناهنجاری‌ها و بیماری‌های مختلف بوده و منبع خوبی برای توسعه عوامل بیماریزایی مانند *Penicillium expansum* (Link) Thom، *Botrytis cinerea* و *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. می‌باشند که می‌توانند در حدود ۳۵-۲۰٪ خسارت وارد کنند (ماری و همکاران ۲۰۱۲، شارما و همکاران ۲۰۰۹).

پوسیدگی ریزوپوسی که توسط قارچ *R. stolonifer* ایجاد می‌شود، ازجمله مهمترین بیماری‌های پس از برداشت هلو محسوب می‌شود و موجب خسارت زیاد به این محصول به‌ویژه در طی انبار می‌گردد (نورتوور و ژو ۲۰۰۲).

امروزه به‌دلیل وجود باقیمانده‌های شیمیایی در محصولات مورد مصرف، مقاومت قارچ‌های بیماریزا به قارچکش‌ها و ارزش افزوده بالاتر این ترکیبات شیمیایی و وجود خطرات زیست محیطی و در نتیجه هشدار مجامع بین‌المللی، بسیاری از قارچکش‌های شیمیایی مانند بنومیل و ایپرودیون مورد مصرف قرار نمی‌گیرند (راسل ۲۰۰۶، ژانگ و همکاران ۲۰۰۷). این امر موجب توجه گسترده دانشمندان و مصرف‌کنندگان به استفاده از ترکیبات سالم و طبیعی شده‌است (اسپادرو و گولینو ۲۰۰۴). استراتژی‌های مختلفی مانند

استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به ویژه مخمرها و روش‌هایی مثل کیورینگ[1]، مقادیر کم نور UV-C و ترکیبات طبیعی به‌عنوان جایگزین برای قارچکش‌ها مدنظر می‌باشند. در سال‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از آنتاگونیست‌ها، به‌دلیل طبیعی و بی‌خطر بودن، جهت جلوگیری از بیماری‌های گیاهی و کاهش مصرف قارچکش‌های شیمیایی صورت گرفته است (وان و تیان ۲۰۰۲، ال-گوت و همکاران ۲۰۰٤). امروزه تعدادی از آنتاگونیست‌های فرموله شده مانند Aspire (بر پایه *Candida oleophila* Montrocher)، Biosave-100، Yield Plus (بر پایه *Cryptococcs albidus* (Saito), Skinner) و Biosave-110 به صورت تجاری در دسترس مصرف کنندگان قرار دارند و برخی نیز در حال بررسی می‌باشند (جانیسیویز و کورستن ۲۰۰۲).

کنترل *R. stolonifer* توسط مخمر *Pichia membranefaciens* Hansen (فان و تیان ۲۰۰۰) و *P. caribbica* بر روی هلو (یو وهمکاران ۲۰۱۳) و همچنین *P. caribbica* بر روی توت‌فرنگی (ژائو و همکاران ۲۰۱۲) و همچنین کنترل *Cercospora beticola* توسط آنتاگونیست *Trichoderma harzainaum*، *Acremonium strictum* و *Geliocepahlis* sp. (موسوی و ارزنلو، ۱۳۹٤)گزارش شده است. ایزوله‌های *Kloeckera apiculata*، *Candida guilliermondii* (مک لافلین و همکاران ۱۹۹۲) و *Enterobacter cloacae* (اسپات و همکاران ۱۹۹۸) نیز توانسته‌اند به‌طور نسبی پوسیدگی ریزوپوسی را روی هلو کنترل‌کنند. همچنین *Debaryomyces hansenii* (ماندال و همکاران ۲۰۰۷) و *Cryptococcus laurentii* (ژانگ و همکاران ۲۰۰۷) نیز به‌عنوان عوامل کنترل زیستی موثر در پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو گزارش شده‌اند.

قارچ *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud جزو شبه مخمرهاست که عموما در بسترهای مختلف مانند برگ گیاهان زراعی (گروب و همکاران ۲۰۱۱)، دانه‌ی غلات (واچوسکا و همکاران ۲۰۱۳)، میوه‌ها (تورناس و اوپال ممون ۲۰۰۹) و فرآورده های غذایی (برگوفر و همکاران ۲۰۰۳) یافت می‌شود. *A. pullulans* در کنترل تعدادی از بیماری‌های پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها مانند: *B. cinerea* و *R. stolonifer* در توت فرنگی و *B. cinerea* در گیلاس (ایپولیتو و همکاران ۲۰۰۰) و *Monilinia* spp. روی هلو وآلو (ژانگ و همکاران ۲۰۱۰) و همچنین بیماری-های پس از برداشت میوه سیب بسیار موثر بوده است (ژانگ و همکاران ۲۰۱۰، ماری و همکاران ۲۰۱۲). دی فلیچ و همکاران (۲۰۰۸) برای اولین بار مشاهده کردند که سه سویه *A. pullulans* به‌طور موثری موجب کاهش پوسیدگی ناشی از آسپرژیلوس و تولید آفلاتوکسین بر روی انگور شده‌است. دو سویه *A. pullulans* (L1 و L8) جدا شده از میوه‌ی هلو جهت کنترل قارچ‌های *Monilinia laxa*، *M. fructicola* و *M. fructigena* به‌کار رفته و بروز بیماری پوسیدگی قهوه ای را تا بیش از ۸۹٪ کاهش‌داده‌اند (ماری و همکاران ۲۰۱۲).

مکانیسم‌های مختلفی در مورد فعالیت بیوکنترلی مخمرها گزارش شده که در بین آنها اثر متقابل بین مخمر و پاتوژن مطرح استرقابت برای مواد غذایی و فضا (بنچکرون و همکاران ۲۰۰۷) به‌عنوان عامل اصلی در این امر شناخته می‌شود. تعداد زیاد سلول های مخمر و کلنی شدن سریع در زخم ها جهت رقابت برای فضا و مواد غذایی با عوامل بیماری زا از فاکتورهای با اهمیت می‌باشند. به‌علاوه چندین مکانیسم دیگر شامل القای مقاومت در بافت میزبان، تولید آنتی‌بیوتیک‌ها یا متابولیت‌های ضد قارچی و پارازیتیسم مستقیم (حمله به اندام قارچ بیماریزا)، کاهش و مختل شدن فعالیت

[1]Curing

آنزیمی عوامل بیماری‌زا نیز مطرح می‌باشند (کاکسیونی و گیزاردی ۱۹۹٤).

هدف از انجام این تحقیق تعیین تاثیر *A. pullulans* در کاهش بروز پوسیدگی ریزوپوسی بر روی میوه‌ی هلو بود. بدین منظور، دو سویه *Aureobasidium* در غلظت‌های مختلف و همچنین روش‌های مختلف استفاده از آنتاگونیست، جهت کنترل قارچ بیماریزای *R. stolonifer* و بررسی مکانیسم عمل آن بر روی میوه‌ی هلو "رقم ردهون[1]" مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، قارچ *R. stolonifer* از سطح میوه‌های هلوی آلوده جمع‌آوری شده و خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور صورت پذیرفت. جدایه‌ها درآزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تهران، مورد شناسایی قرار گرفت و بررسی بیماریزایی و تاثیر تیمارهای مورد نظر بر روی آن در آزمایشگاه گروه باغبانی دانشگاه تبریز انجام گردید. نمونه میوه در بشرهای یک لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ مولار در pH ٦/۸) با تکان دادن در روتاری شیکر به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱٤۰ دور در دقیقه (rpm) شسته شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در ٤۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. دو میلی‌لیتر از محلول رویی نگه‌داشته‌شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های رقیق‌شده به تشتک های پتری حاوی PDA دارای استرپتومایسین و نئومایسین (۰/۱ ٪) جهت جلوگیری از آلودگی باکتریایی منتقل‌شد. تشتک های پتری در دمای ۲۵°C به‌مدت سه روز در گرمخانه قرار گرفته و پرگنه‌های در حال رشد زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. مخمرهای با ویژگی‌های متفاوت انتخاب شده و با سه بار مخطط کردن مجدد، تک کلونی‌ها روی محیط کشت NYDA (هشت گرم nutrient broth ، پنج گرم عصاره‌ی مخمر، ۱۰ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) خالص‌سازی شدند. دو سویه L1 و L8 بعد از شناسایی براساس مشاهدات میکروسکوپی مورد استفاده قرار گرفتند.

تاثیر روش‌های مختلف استفاده از مخمر در کنترل *R. stolonifer* (A.C یا W.C و F.C)

هر یک از آنتاگونیست‌های L1 و L8 رشدکرده در ارلن مایر حاوی ۷۵ میلی‌لیتر محیط کشت NYDB[2] (NYDA بدون آگار) بر روی شیکر (۱٤۰ rpm) به‌مدت ٤۸ در دمای ۲۵°C قرار داده‌شد. سلول‌های مخمر با سانتریفوژ کردن در ٤۸۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه برداشت شده و مجددا در آب مقطر استریل ریخته‌شدند. یک نمونه (پنج میلی‌لیتر) از سلول‌های هر ایزوله اتوکلاو گردید (۱۲۰ درجه‌ی سانتیگراد به‌مدت ۲۰ دقیقه) و به‌عنوان سوسپانسیون سلولی اتوکلاو شده[3] (AC) در نظر گرفته شد. نمونه دیگر (۵ میلی‌لیتر) مجددا سانتریفوژ شده و دو بار با آب مقطر استریل شستشو گردید تا محیط کشت حذف شده و به‌عنوان سوسپانسیون سلولی شسته شده[4] (WCS) (10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) در نظر گرفته‌شود. همه سوسپانسیون‌های سلولی به 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر توسط هماسیتومتر تنظیم گردید. محلول رویی حاصل از اولین سانتریفوژ، توسط میکروفیلتر استریل (۰/٤۵ µm) استریل گردید و به‌عنوان فیلتر کشت[5] (FC) در نظر گرفته شد. برای هر تیمار، ۲۰ میوه‌ی هلو در نظر گرفته شده و پس از ضدعفونی سطحی و سپس هواخشک کردن، زخمی گردیده و با ۲۰ میکرولیتر AC یا WCS و FC یا آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد تیمار شدند. بعد از خشک کردن در

[1] *Prunus persica* L. cv. Redheaven

[2] Nutrient Yeast Dextrose Broth

[3] Autoclaved cell suspensions

[4] Washed cell suspensions

[5] Culture filtrates

معرض هوا (حدود دو ساعت)، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ *R. stolonifer* توسط میکروپیپت در محل زخم تزریق شد. میوه‌ها بعد از تیمار و تلقیح در دمای ۲۰°C نگهداری شدند. میزان بروز بیماری (درصد میوه‌های آلوده) چهار روز پس از انبار مورد بررسی قرار گرفت.

تاثیر غلظت‌های مختلف آنتاگونیست‌ها جهت کنترل *R. stolonifer*

سوسپانسیون‌های سلولی مخمر L1 و L8 از پرگنه‌های رشد کرده در محیط NYDA بعد از ۴۸ ساعت در ۲۵°C به‌دست آمدند. غلظت‌های نهایی (C_1) 10^6، (C_2) 10^7 و (C_3) 10^8 سلول در میلی‌لیتر با رقیق کردن توسط آب مقطر استریل تهیه‌شدند. میوه‌های هلو پس از زخم شدن با ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های L1 و L8 تیمار شدند. بعد از حدود دو ساعت قرارگرفتن در معرض هوا و خشک شدن، میوه‌ها با تزریق ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *R. stolonifer* به محل زخم، تلقیح شدند. میوه‌ها در دمای ۲۰°C به‌مدت چهار روز نگهداری شده و سپس مشاهده پوسیدگی میوه‌ها انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار برای هر تیمار و تعداد ۲۰ نمونه میوه در هر تکرار انجام گرفت. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار MSTST-C مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

تاثیر روش‌های مختلف استفاده از مخمر (L1 و L8) بر میزان بروز پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو

فعالیت حالتهای مختلف دو سویه آنتاگونیست *A. pullulans* (L1 و L8) جهت کنترل پوسیدگی ریزوپوسی ناشی از قارچ *R. stolonifer* بر روی میوه‌ی هلو رقم "ردهون" در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تاثیر متقابل دو سویه L1 و L8 آنتاگونیست *Aureobasidium* بر میزان بروز پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو، بیانگر معنی‌دار بودن اشکال مختلف این دو آنتاگونیست بود.

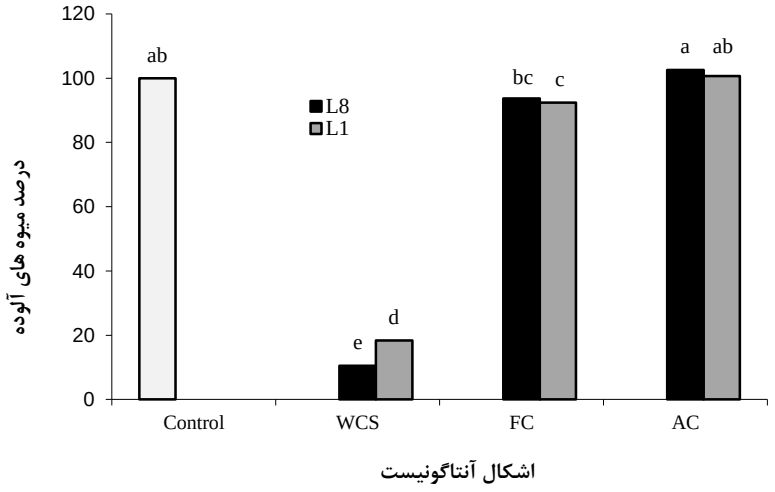
نتایج حاصل از مقایسه میانگین بین حالت‌های مختلف دو آنتاگونیست نشان داد که سلول‌های W.C.S. توانستند بیماری پوسیدگی ریزوپوسی را بر روی میوه‌ی هلو کنترل کنند و تعداد میوه‌های کمی آلوده شدند (L1:۱۸/۳۴٪ و L8:۱۰/۴۸). میوه‌های تیمار شده با سلول‌های اتوکلاو شده آنتاگونیست (AC) بیشترین میزان آلودگی را نشان دادند که حتی بیش از تیمار شاهد بود (L1:۱۰۰/۷۰٪ و L8:۱۰۲/۵۹). همچنین سلول‌های فیلتر شده (F.C) نیز نتوانستند به‌خوبی پوسیدگی ریزوپوسی را کنترل کنند (L1: ۹۲/۴۳٪ و L8:۹۳/۶۶) (شکل ۱).

تاثیر غلظت‌های مختلف مخمر (L1 و L8) بر میزان بروز پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو

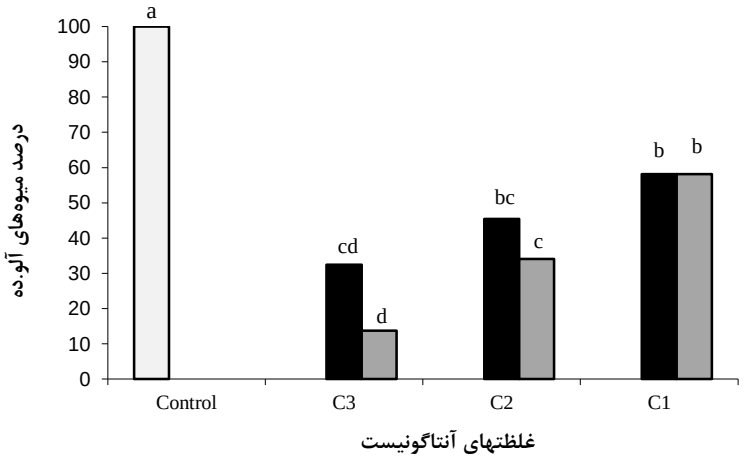
سه غلظت مختلف دو سویه L1 و L8 آنتاگونیست *A. pullulans* (C_1) 10^6، (C_2) 10^7 و (C_3) 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) در برابر قارچ *R. stolonifer* بر روی میوه‌ی هلو رقم "ردهون" در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از تاثیر متقابل دو سویه L1 و L8 مخمر بر میزان بروز پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو، بیانگر معنی‌دار بودن غلظت‌های مختلف به‌کار برده شده‌ی مخمرها در این آزمایش بود.

نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین بین غلظت‌های مختلف دو سویه *Aureobasidium* نشان داد که با وجود این که هر سه غلظت آنتاگونیست‌ها نسبت به تیمار کنترل به‌طور مناسبی بروز پوسیدگی را کنترل کردند، هر دو سویه *Aureobasidium* بیشترین کنترل قارچ بیماریزا را از نظر درصد میوه‌های آلوده



شکل۱- مقایسه میانگین تاثیر متقابل حالتهای مختلف (WCS، AC و FC) دو سویه L1 و L8 آنتاگونیست *Aureobasidium* بر میزان بروز پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو.



شکل۲- مقایسه میانگین تاثیر متقابل غلظتهای مختلف ((C_1)$۱۰^{۶}$، (C_2) $۱۰^{۷}$ و (C_3) $۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر) دو سویه L1 و L8 مخمر بر میزان بروز پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی هلو.

در بیشترین غلظت به‌کاررفته نشان دادند، طوری‌که غلظت $۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر کمترین میزان میوه‌های آلوده شده توسط قارچ *R. stolonifer* را موجب شد (L1:۳۲/۴۳٪ و L8:۱۳/۷۴). با یک واحد کاهش غلظت مخمر L1 ($۱۰^{۷}$)، تاثیر آن بر کنترل بیماری پوسیدگی ریزوپوسی نیز کاهش یافت و به ۳۴/۰۶ ٪ رسید. غلظت متوسط آنتاگونیست L8 نیز موجب بروز ۴۵/۴۳ ٪ هلوهای آلوده به قارچ گردید.

تیمار هلوهای آلوده شده به بیماری پوسیدگی ریزوپوسی با دو سویه L1 و L8 در کمترین غلظت به‌کار رفته ($۱۰^{۶}$) نیز توانستند به‌طور معنی‌داری بروز بیماری پوسیدگی ریزوپوسی را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دهند (L1:۵۸/۱۸٪ و L8:۵۴/۵۷).

بر اساس نتایج حاصل از بازداری از رشد قارچ ریزوپوس بر روی میوه‌های هلو، می‌توان گفت که با کاربرد سه غلظت آنتاگونیست‌ها، به‌طور معنی‌داری،

آنتاگونیست L1 توانست درصد رشد پوسیدگی ریزوپوسی را نسبت به آنتاگونیست L8 کاهش دهد. استفاده از غلظت $۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر آنتاگونیست L1 با ۸۳/۵۱ درصد بازداری از رشد قارچ *R. stolonifer* بهترین نتیجه را در پی داشت. با این وجود می‌توان گفت سلول‌های شسته شده L8 نسبت به تیمارهای دیگر به میزان زیادی مانع رشد قارچ *R. stolonifer* بر روی میوه‌ی هلو شد (جدول ۱).

جدول ۱- درصد بازداری از رشد پرگنه قارچ ***R. stolonifer*** توسط اشکال مختلف و غلظت‌های متفاوت دو آنتاگونیست **L1** و **L8**.

تیمار	L1	٪	L8
حالت‌های آنتاگونیست			
W.C (سلول‌های شسته شده)		۸۲/۰۱	۹۰/۱۷
A.C (سلول‌های اتوکلاو شده)		-۳/۱٤	-۱/۷۲
F.C (سلول‌های فیلتر شده)		٦/٦۳	٥/۲۳
غلظت‌های آنتاگونیست			
C1 ($۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر)		۸۳/٥۱	۷٥/۷٦
C2 ($۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر)		۷۳/٥٦	٦۳/۹۷
C3 ($۱۰^{٦}$ سلول در میلی‌لیتر)		٤۸/۳٤	٥۱/۳٥

بحث

تاثیرات آنتاگونیستی دو سویه مخمر *A. pullulans* L1 و L8 بر قارچ *R. stolonifer* روی میوه‌ی هلو در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. با وجود این‌که مطالعات متعددی درباره اثرات بیوکنترلی عوامل مختلف در برابر بیماری‌های مختلف پس از برداشت انجام پذیرفته است و سویه‌های مختلفی از مخمر *Aureobasidium* sp. موجب کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه‌هایی مانند گیلاس (شنا و همکاران ۲۰۰۳)، توت فرنگی (لیم و همکاران ۱۹۹۷) سیب (بنچکرون ۲۰۰۷)، هلو، شلیل و سیب (ژانگ و همکاران ۲۰۱۰) و شلیل (ماری و همکاران ۲۰۱۲) شده‌اند، اما مطالعات معدودی درباره فعالیت این مخمر بر علیه قارچ *R. stolonifer* انجام شده است

یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های مسئول پوسیدگی پس از برداشت میوه‌ی هلو، قارچ *R. stolonifer* می‌باشد. *A. pullulans* فعالیت بازدارندگی در مقابل بیماری‌های قارچی در انبار و مزرعه دارد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، مخمر به‌کار برده شده در کنترل این قارچ و کاهش بروز پوسیدگی ریزوپوسی بر روی هلو موثر بود، لذا استفاده از آن به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر آنتاگونیست‌ها می‌تواند در فرمولاسیون و تولید قارچکش‌های زیستی[1] جدید به‌کار رود.

با توجه به اهمیت کنترل زیستی پاتوژن‌های مختلف، شارما و همکاران (۲۰۰۹) مکانیسم‌های مرتبط با آنتی بیوز[2]، پارازیتیسم (مثل اتصال مستقیم به پاتوژن‌ها یا ترشح ترکیبات مخرب عوامل بیماریزا)، القای مقاومت و رقابت بر سر فضا و منابع محدود را پیشنهاد نموده‌اند.

برخی محققین آنتی‌بیوز یا تولید ترکیبات آنتی-بیوتیک توسط آنتاگونیست را فاکتور مهمی در مکانیسم بازدارندگی به ویژه در شرایط بسته انبار می‌دانند، مانند پیرولنیترین[3] که توسط *Pseudomonas*

[1]Biofungicides
[2]Antibiosis
[3]Pyrrolnitrin

cepacia جهت کنترل قارچ‌های *B. cinerea* و *P. expansum* بر روی سیب و گلابی (جانیسیویز و رویتمن ۱۹۸۸) تولید می‌شود. برخی دیگر تاثیر این ترکیبات تولید شده توسط آنتاگونیست‌ها را بر میزان رشد و شکل اسپور و تعداد کلونی‌های تشکیل شده قارچ‌های بیماریزا مثل *P. expansum*، *B. cinerea* و *R. stolonifer* (مرسیر و جیمنز ۲۰۰٤) گزارش کرده‌اند. در نتایج به‌دست آمده در آزمایش حاضر، سلول‌های شسته شده (WCS) از هر دو سویه *Aureobasidium*، رشد پاتوژن را بعد از ٤ روز در دمای ۲۰°C کنترل کردند، ولی میوه‌های تیمار شده با سلول‌های فیلتر شده و اتوکلاو شده نتوانستند بروز این بیماری را کنترل کنند. عدم وجود فعالیت بازدارندگی توسط سلول‌های فیلتر شده با نتایج به‌دست آمده توسط ژانگ و همکاران (۲۰۱۰) و ماری و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. عدم تراوش ترکیبات آنتی بیوتیکی در سلول‌های فیلتر شده (FC) عامل مهم و مثبتی برای ثبت پتانسیل عوامل بیوکنترلی است. عدم تاثیرگذاری سلول‌های شسته شده و اتوکلاو شده بر رشد و گسترش آلودگی قارچی می‌تواند بدین معنی باشد که تولید آنتی بیوتیک‌ها در مکانیسم عمل آنتاگونیستی *Aureobasidium* نقشی نداشته‌اند.

یکی دیگر از مکانیسم‌های مطرح، القای مکانیسم دفاعی میزبان با تولید آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی می‌باشد (بنهامو و برودر ۲۰۰۰). طی تحقیق انجام شده، تولید آروبازیدین A[1] (یک دپسی پپتید حلقوی ضد قارچی) توسط *A. pullulans*، منجر به بازداری از جوانه‌زنی اسپور و رشد هیف قارچ در شرایط *In-vitro* گردیده‌است (ژیااوپینگ و همکاران ۲۰۰۷) که می‌تواند در مورد کنترل قارچ عامل پوسیدگی ریزوپوسی نیز نقش داشته‌باشد. آنزیم‌های لایتیک[2] تولید شده توسط مخمرها نیز می‌توانند دیواره سلولی قارچ‌های بیماریزا را از بین ببرند. به‌عنوان مثال *Candida guilliermondii* و *C. oleophila* دیواره سلولی *B. cinerea* را نابود می‌کنند (سالیکاریاس و همکاران ۲۰۰۲)، همچنین ثابت شده‌است که آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی تولید شده توسط *P. guilliermondii* Wick. نیز در برابر *Colletotrichum capsici* (چانچایکچاوویوات و همکاران ۲۰۰۸) و *B. cinerea* (ژانگ و همکاران ۲۰۱۱) موثر می‌باشند. تولید ترکیبات غیرفرار، مکانیسم آنتاگونیستی مهمی بر علیه عوامل بیمارگر به حساب می‌آید (موسوی و ارزنلو، ۱۳۹٤).

سویه‌های مختلف *A. pullulans* دارای فعالیت آنزیمی بالایی هستند که می‌تواند در ممانعت از رشد فیتوپاتوژن‌ها نقش کلیدی ایفا کند و بسته به دما، نوع تخمیر[3]، منبع کربنی، pH و رطوبت متغیر است. در بررسی‌های انجام شده، تولید اندوگلوکاناز، گزیلاناز، بتا-گلوکوزیداز (لیت و همکاران ۲۰۰۸)، پلی گالاکتوروناز (استراتیلووا و همکاران ۲۰۰٦)، کیتیناز (اندوکیتیناز، کیتوبیزیداز[4]) و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز در بافت و محل زخم میوه سیب (کاستوریا و همکاران ۲۰۰۱) و همچنین تولید پولولان[5] در فرآورده های غذایی گزارش شده است (دونوت و همکاران ۲۰۱۲). سویه‌های این مخمر به‌طور موثری توانسته‌اند رشد قارچ‌های *P. expansum*، *R. stolonifer* و *A. niger* بر روی میوه انگور (کاستوریا و همکاران ۲۰۰۱) و همچنین *A. carbonarius* بر روی انگور و توت‌فرنگی (دی فلیچ و همکاران ۲۰۰۸)، *B. cinerea* و *P. expansum* بر روی سیب (منیر و همکاران ۲۰۰۷) و سه گونه جنس Monilinia را بر روی هسته داران (ماری و همکاران ۲۰۱۲) کنترل کنند.

[1] Aureobazidin A
[2] Lytic enzymes
[3] Fermentation
[4] Chitobiosidase
[5] Pullulan (poly-alpha-1,6-maltotriose)

مکانیسم دیگر تاثیرات بیوکنترلی عوامل آنتاگونیست، رقابت بر سر مواد غذایی و فضا می‌باشد که به نظر می‌رسد کلونیزاسیون سریع آنتاگونیست روی زخم‌های میوه نسبت به قارچ بیماریزا نیز می‌تواند موجب کنترل گسترش آلودگی بر روی محصولات به‌ویژه میوه‌ها گردد، این امر در *Candida oleophila* و *Cryptoccocus laurentii* در کنترل *B. cinerea* مشاهده شده است (مرسیر و ویلسون ۱۹۹۵). بر اساس نتایج حاصل از آزمایش حاضر، با کاهش غلظت آروبازیدیوم، میزان جوانه‌زنی و رشد آلودگی قارچی افزایش پیدا کرد، که این امر می‌تواند بیانگر نقش مهم رقابت تغذیه‌ای در فعالیت مخمر در برابر *R. stolonifer* و سایر عوامل بیماریزای پس از برداشت میوه‌ها باشد. در تمام موارد استفاده از آنتاگونیست با بالاترین غلظت ($۱۰^{۸}$) بهترین تیمار جهت کنترل پاتوژن بود. ولی غلظت‌های پایین تر ($۱۰^{۷}$ و $۱۰^{٦}$) تاثیر چندانی بر کنترل بیماری نداشتند. نتایج حاصل از این آزمایش، با نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققین مبنی بر کاهش درصد پوسیدگی میوه‌ها با استفاده از غلظت-های بالای آنتاگونیست، مطابقت داشت (ال-گوت و همکاران ۲۰۰٤، ماری و همکاران ۲۰۱۲). رقابت در دسترسی به مواد غذایی به‌ویژه آمینواسیدها، قندها و آهن (Fe^{3+}) نقش مهمی در مکانیسم کنترل عوامل بیماریزا توسط برخی آنتاگونیستها دارد. به‌عنوان مثال رقابت *Aureobasidium* با کپک آبی سیب برای آمینواسیدها (بنچکرون و همکاران ۲۰۰۷) و همچنین رقابت *P. aguilliermondii* با عامل آنتراکنوز در فلفل بر سر قندها و منابع نیتروژن توسط چانچایکچاوویوات و همکاران (۲۰۰۸) به اثبات رسیده است.

با توجه به موارد ذکر شده، مخمرها و میکروارگانیسم‌های شبه مخمر به‌عنوان عوامل بیوکنترل می‌توانند مورد توجه قرار گیرند، به‌ویژه به این دلیل که دارای تاثیر منفی بر محیط زیست و اثرات سمی نیستند و همچنین جهت تولید در مقیاس بزرگ به‌راحتی در محیط کشت‌های ارزان و دارای مواد غذایی ساده کشت می‌شوند.

آزمایش حاضر برای اولین بار ۲ سویه مخمر *A. pullulans* (سویه‌های L1 و L8) را جهت استفاده در قارچکش‌های زیستی به‌منظور استفاده پس از برداشت برای کنترل قارچ *R. stolonifer* در میوه‌ی هلو تایید می‌نماید.

منابع

موسوی س و ارزنلو م، ۱۳۹٤. پتانسیل بازدارندگی برخی جدایه‌های قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ *Cercospora beticola*، عامل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. پژوهش‌های کاربردی در گیاهپزشکی، جلد ٤. صفحه‌های ۱۷۱ تا ۱۸۹.

Bencheqroun SK, Bajji M, Massart S, Labhilili M, El Jaafari S and Jijakli MH, 2007. *In-vitro* and *in-situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. Postharvest Biology and Technology 46: 128-135.

Benhamou N and Brodeur J, 2000. Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. Phytopathology 90: 932–943.

Caccioni D and Guizzardi M, 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. Journal of Essential Oil Research 6: 173–179.

Castoria R, De Curtis F,Lima G, Caputo L, Pacifico S and De Cicco V, 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biology and Technology 22: 7-17.

Chanchaichaovivat A, Panijpan B and Ruenwongsa P, 2008. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. Biological Control 47: 207–215.

De Felice DV, Solfrizzo M, De Curtis F, Visconti A and Castoria R, 2008. Decrease of ochratoxin A contamination in wine grapes by strains of *Aureobasidium pullulans*. Phytopathology 98:1261–1270.

El-Ghaouth A, Wilson CL and Wisniewski ME, 2004. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In Naqvi, S.A.M.H. (Ed.) Diseases of Fruit and Vegetables 2: 511-535

Fan Q and Tian SP, 2000. Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. Plant Disease 84: 1212–1216.

Grube M, Schmid F and Berg G, 2011. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. Fungal Biology 115: 978–986.

Ippolito A, Ghaouth AE, Wilson CL and Wisniewski M, 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense response. Postharvest Biology and Technology 19: 265-272.

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

Janisiewicz WJ and Roitman J, 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology 78: 1697– 1700.

Leite RSR, Alves-Prado HF, Cabral H, Pagnocca FC, Gomes E and Da-Silva R, 2008. Production and characteristics comparison of crude b-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* & *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. Enzyme Microbial Technology 43: 391–395.

Lima G, Ippolito A, Nigro F and Salerno M, 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. Postharvest Biology and Technology 10: 169–178.

Mandal G, Singh D and Sharma RR, 2007. Effect of hot water treatment and biocontrol agent (*Debaryomyces hansenii*) on shelf-life of peach. Indian Journal of Horticulture 64: 25–28.

Mari M, Martini C, Guidarelli M and Neri F, 2012. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. Biological Control 60: 132-140.

Mclaughlin RJ, Wilson CL, Droby S, Ben-Arie R and Chalutz E, 1992. Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeast *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. Plant diseases 76: 470-473.

Mercier J and Jimenez JI, 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. Postharvest Biology and Technology 31: 1–8.

Mercier J and Wilson CL, 1995. Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold (*Botrytis cinerea*) of apple. Postharvest Biology and Technology 6: 9 –15.

Mounir R, Durieux A, Bodo E, Allard C, Simon JP, Achbani EH, El-Jaafari S, Douira A and Jijakli MH, 2007. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. Biotechnology Letters 29: 553–559.

Northover J and Zhou T, 2002. Control of Rhizopus rot of peaches with treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 144–153.

Russell PE, 2006. The development of commercial disease control. Plant Pathology 55: 585 –594.

Saligkarias ID, Gravanis FT and Epton HAS, 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II-a study on mode of action. Biological Control 25:151–161.

Schena L, Nigro F, Pentimone I, Ligorio A and Ippolito A, 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biology and Technology 30: 209–220.

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

Spadaro D and Gullino ML, 2004. State of art and future perspectives of biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology 91: 185-194.

Spotts RA, Cervantes LA, Facteau TJ and Chand-Goyal T, 1998. Control of brown rot and blue mold of sweet cherry fruit with preharvest iprodione, postharvest *Cryptococcus infirmo-miniatus*, and modified atmosphere packaging. Plant Diseases 82: 1158-1160.

Stratilova´ E, Dzu´rova´ M, Breierova´ E and Omelkova´ J, 2006. Production and biochemical characterization of polygalacturonases produced by *Aureobasidium pullulans* from forest soil. Annual Microbiology 56: 35–40.

Tournas VH and Uppal Memon S, 2009. Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi. International Journal of Food Microbiology 133: 206–209.

Wachowska U, Kucharska K, Je¸dryczka M and Łobik N, 2013. Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat. Polish Journal of Environmental Studies 22: 591–597.

Wan YK and Tian SP, 2002. Antagonistical mode of *Pichia mebranefaciens* to *Rhizopus stolonifera* in wounds of peach fruit by scanning electron microscope. Acta Botanica Sinica 44: 1384-1386.

Xiaoping L, Jiye W, Ping G, Cungui M, Zhu ZR and Hongye L, 2007. *In vitro* inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. International Journal of Food Microbiology 119: 223-229.

Xu B, Zhang H, Chen K, Xu Q, Yao Y and Gao H, 2013. Biocontrol of Postharvest Rhizopus decay of peaches with *Pichiacaribbica*. Current Microbiology 67: 255-261.

Zhang D, Spadaro D, Garibaldi A and Gullino ML, 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. Biological Control 54: 172–180.

Zhang HY, Zheng XD and Yu T, 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. Food Control 18: 287–291.

Zhang S, Spadaro D, Garibaldi A and Gullino ML, 2011. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. Biological Control 57: 193–201.

Zhao LN, Zhang HY, Li J, Cui JH, Zhang XY and Ren XF, 2012. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia carribbaca* to postharvest diseases of strawberries by addition of trehalose to the growth medium. International Journal of Molecular Sciences13: 1916-1932.

Extending Shelf-life of Peach by Using Biocontrol Agents Including two Isolates of *Aureobasidium pullulans*

S Alizadeh-Salteh[1*], J Emaratpardaz[2] and H Khoshghalb[3]

[1]Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
[2]PhD Graduated of Agronomy, Plant Physiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
[3]Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Technical University of Shahrood.
*Corresponding author: **s.alizadeh@tabrizu.ac.ir**

Received: 26 Sep 2015 Accepted: 1 Fab 2016

Abstract

According to high postharvest losses of peaches and restriction of the use of chemical fungicides, it is necessary to find proper methods to control postharvest pathogens. For this purpose, natural antifungal and antimicrobial compounds like antagonists can be used to increase shelf life of fruits. Rhizopus rot that caused by *Rhizopus stolonifer* is one of the most important decays of peach fruit losses. In this research we evaluated the antifungal activity of two isolates of antagonist *Aureobasidium pullulans* (L1 and L8) against *R. stolonifer* at different concentrations of yeast suspension (10^8, 10^7, 10^6 CFU ml^{-1}) and antagonist forms (culture filtrate (CF), washed cell suspension (WCS), autoclaved cell suspension (AC)) to control the Rhizopus rot on peach and discovering the possible modes of action on peaches at 20ºC. Results showed that just washed cell suspension could control significantly incidence of peach rot. Between applied concentrations of antagonist, the highest concentration could control incidence of Rhizopus rot on peaches.

Keywords: Antagonist, Peach, *Rhizopus stolonifer*, Postharvest diseases.