مقاله تحقیقی

جداسازی مخمرهای رورست مرکبات و شناسایی جدایه‌های برتر در مهار بیماری کپک سبز میوه

سیما حاتمی[۱]، ولی الله بابایی‌زاد[۲]، فرید بیکی[۳]، زهره مرادی[۴]

۱، ۲، ۴–دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، استادیار،گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

۳–استادیار، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مسئول مکاتبات: فرید بیکی، ایمیل: f.beiki@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۸ ۱۱(۲) ۵۳–۶۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵

چکیده

کپک سبز یکی از مهمترین بیماری‌های میوه مرکبات در مراحل پس از برداشت و دوره انبارداری می‌باشد که در صورت عدم مدیریت درست، خسارت‌های قابل توجهی را ایجاد می‌کند، هرچند در سال‌های اخیر با استفاده از قارچکش‌های شیمیایی می‌توان این بیمارگر را مدیریت کرد، اما برای کاهش مصرف آفت‌کش و حذف باقیمانده‌های سموم، استفاده از سایر روش‌های مدیریت ضروری می‌باشد و استفاده از عوامل میکروبی در حوزه کنترل بیولوژیک یکی از این موارد مهم می‌باشد. بر اساس گزارش‌های متعدد پیشین در خصوص توانایی مخمرها در مهار بیمارگرها، در این پژوهش توانایی جدایه‌های مخمرهای بومی برای مهار بیمارگر کپک سبز، مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور نمونه‌های برگ و میوه مرکبات از مناطق مختلف استان مازندران درطی پاییز ۱۴۰۲، جمع آوری و در آزمایشگاه با استفاده از محیط کشت مالت آگار، جداسازی و خالص‌سازی شدند. به دلیل تعدد فراوان جدایه‌ها، از بین مجموعه به‌دست آمده، براساس خصوصیات فنوتیپی (شکل، رنگ و حاشیه پرگنه، خصوصیات فیزیولوژیکی و...) نماینده‌هایی انتخاب و آزمون بیوکنترل بر روی میوه مرکبات با ۴۴ جدایه مخمر انجام شد. آزمون بر روی میوه پرتقال رقم تامسون ناولی انجام شد که در زمان برداشت میزان ماده جامد محلول آن ۱۰ درجه بریکس بود. ابتدا تکه‌های میوه در داخل سوسپانسیون مخمر با غلظت 10^8سلول در هر میلی‌لیتر آب سترون، قرار داده و پس از پنج ساعت نگهداری در دمای محیط، ۱۰ میکرولیتر بیمارگر کپک سبز با غلظت 10^4سلول در میلی‌لیتر در مرکز هر قطعه برش داده شده قرار گرفت. میوه‌ها به مدت شش روز نگهداری در شرایط انباری با رطوبت بالای ۹۰ درصد تا زمان بروز علایم بیماری نگهداری شدند. نتایج تجزیه واریانس بر اساس درصد بروز بیماری نشان می‌دهد در سطح احتمال یک درصد، در بین مخمرها، اختلاف معنی‌داری از لحاظ توانایی مهار بیمارگر کپک‌سبز در شرایط انبارداری دارا می‌باشند. مقایسه میانگین درصد بروز بیماری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد نشان می‌دهد مخمرهای دو گروه آماری عملکرد بسیار خوبی داشتند. برای شناسایی این جدایه‌های برتر از تعیین ترادف ناحیه D1/D2 در قسمت Large subunit ribosomal ribonucleic acid (LSU rRNA) استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد، مخمرهای *Hanseniaspora uvarum*، *Hanseniaspora occidentalis* و *Pichia kluyveri* به عنوان برترین‌ها بوده‌اند، به طوری که بعد از شش روز مهار کاملی در بروز و توسعه بیمارگر در مقایسه با شاهد داشته‌اند.

واژه‌های کلیدی: بیوکنترل، *Penicillium digitatum*، اپی‌فیت، پس از برداشت، پرتقال

مقدمه

ایران هفتمین کشور تولید کننده مرکبات در دنیا می‌باشد و این محصول با دارا بودن سهم ۱۵/۱ درصدی از تولید، بیشترین میزان تولید در بخش محصولات باغبانی کشور را به خود اختصاص داده است (Statistics of the ministry of agriculture–Jahad, 2024) با این اوصاف، متاسفانه سالانه مقادیر زیادی از این محصول به خاطر مشکلاتی در مراحل پس از برداشت، صنایع تبدیلی، صادرات و ...از بین می‌روند. در طی مراحل انبارداری، بیمارگرهای مختلفی سبب خسارت در میوه مرکبات می‌شوند به طوری‌که بر اساس برخی گزارش‌ها خسارت تا ۳۰ درصد از کل محصول نیز ارایه شده است (Themen, 2014). ضربات مکانیکی در طی دوره پس از برداشت، سبب نفوذ بیمارگر به داخل میوه شده و سبب کاهش خصوصیات کمی و کیفی میوه می‌شوند (Sanzani *et al.*, 2016). کپک سبز میوه مرکبات ناشی از بیمارگر *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. یکی از مهمترین عوامل پوسیدگی در طی دوره انبارداری می‌باشد (Bus *et al.*, 1991). از طرفی برخی از بیمارگرهای گیاهی نظیر پنی‌سیلیوم، آسپرژیلوس، آلترناریا و ... قادرند متابولیت‌های ثانویه خطرناک (مایکوتوکسین) در میوه تولید کنند. این توکسین‌ها هم در زمانی که میوه بر روی درخت است و هم در مرحله انبارداری تولید می‌شوند و متاسفانه در صنایع تبدیلی در مراحل تولید آب میوه و با خشک کردن میوه، از بین نمی‌روند(Drusch & Ragab, 2003). به هر حال برخی از این توکسین‌ها بسیار برای انسان‌ها سرطان‌زا هستند. برای مدیریت بیمارگرها و متابولیت‌های تولیدی توسط آن‌ها، روش‌های فیزیکی، شیمیایی وکنترل بیولوژیکی موجود است. روش‌های فیزیکی نظیر پلاسمای سرد، اشعه UV و...، نیازمند تجهیزات گران‌قیمت می‌باشد و ممکن است بر کیفیت میوه نیز اثر سوء داشته باشد. از آن طرف استفاده از آفتکش‌های شیمیایی نیز ممکن است از نظر اقتصادی و کارآیی نیز قابل توجیه می باشند، ولی مضرات استفاده آن در خصوص خطرات سوء زیست محیطی، تهدید تنوع زیستی، مخاطرات ایجاد شده به سلامت انسان‌ها و.... نیز بسیار حایز اهمیت می‌باشد (Chen *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2019). تاکنون برای مدیریت این بیمارگر، از قارچکش‌های مختلفی نظیر تیابندازول، سدیم فنیل فنات، ایمازالیل و .... استفاده می‌شده است (Ismail & Zhang, 2004; Smilanick *et al.*, 1997). از طرف دیگر در طی چند دهه اخیر متاسفانه به دلیل استفاده مکرر و یا احیاناً استفاده نامناسب از آفتکش‌های شیمیایی، گزارش‌های مختلفی مبنی بر بروز جدایه‌های مقاوم این بیمارگر نسبت به انواع مختلفی از قارچکش‌ها ارایه شده است (Holmes & Eckert, 1999). از این رو در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورها، کاهش مصرف آفتکش‌های شیمیایی و تولید غذای بدون آفتکش که از اهداف توسعه پایدار نیز می‌باشد، به جد دنبال می‌شود و استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک نیز در بین مصرف کننده‌گان با اقبال خوبی مواجهه شده است(Liu *et al.*, 2013). استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف با هدف اختلال در رشد، تکثیر یا عملکرد بیمارگرهای گیاهی، آنتاگونیست گفته می‌شود (Dukare *et al.*, 2019). اگرچه اولین گزارش آنتاگونیست میکروارگانیسم‌ها، باکتری *Bacillus subtilis* بود که برای کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میوه هلو ناشی از بیمارگر *Monilinia fructicola* استفاده شده است (Pusey & Wilson, 1984)، اما اخیراً بیشتر مطالعات بر روی مخمرهای آنتاگونیست معطوف شده است چراکه در مقایسه با قارچ‌ها و باکتری‌ها، مخمرها فواید متعددی دارند نظیر تجزیه‌کننده طبیعی، ثبات ژنتیکی، غیربیماری‌زا بودن آن‌ها و... (Hernandez–Montiel *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020). از طرفی اگر از مخمرها به عنوان قارچکش در محصولات استفاده شود، خطراتی بر روی برگ گیاه ایجاد نمی‌کند و بر خلاف آفتکش‌های شیمیایی، می‌توان در زمان‌های مختلف حتی نزدیک زمان برداشت نیز استفاده کرد و دغدغه‌های رعایت دوره کارنس وجود ندارد (Zhimo *et al.*, 2021). گزارش‌های متعددی در خصوص اثربخشی مخمرها بر روی بیمارگر کپک سبز و آبی میوه مرکبات ارایه شده است و تعدادی نیز به صورت تجاری تولید و ارایه شده است، به عنوان مثال مخمر *Candida oleophila* با نام تجاری Aspire (Hammami *et al.*,

(2022 و مخمر *Cryptococcus albidus* با نام تجاری Yield Plus (Taqarort *et al.*, 2008) به منظور کنترل پوسیدگی بعد از برداشت ناشی از کپک سبز و آبی میوه مرکبات روانه بازار شده‌اند. در همین راستا برای سایر محصولات ترکیبات تجاری متنوعی از مخمرها ارایه شده است و به چند مورد می‌توان اشاره نمود نظیر آفتکش‌های زیستی Nilo از مخمر *Metschnikowia fructicola* NRRL Y–27328 برای انگور، توت فرنگی، بلوبری و هسته‌داران (Authority *et al.*, 2017)، Excellence Bio–Nature از مخمر *Metschnikowia pulcherrima* ، Boni–Protectl از مخمر *Aureobasidium pullulans* و Nexy از مخمر *Candida oleophila* (Droby *et al.*, 2016; Sipiczki, 2020) و بلاخره Zymaflore Egide از ترکیب دو مخمر *M. pulcherrima* و *Torulaspora delbrueckii*برای حفظ زیستی آب میوه و انگور(Windholtz *et al.*, 2021). در ایران نیز به دلیل اینکه برای نگهداری از میوه مرکبات در طی دوره انبارداری، از انواع مختلف آفتکش‌های شیمیایی استفاده می‌شود، لذا معرفی و تولید انبوه میکروارگانیسم‌های بومی به عنوان جایگزین آفتکش‌های شیمیایی تجاری یک اولویت بسیار خوب محسوب می‌شود.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی مخمرها

به منظور جداسازی مخمرها، نمونه‌برداری در پاییز ۱۴۰۲ از باغ‌های مرکبات استان مازندران انجام شد. نمونه‌ها شامل برگ و میوه ترجیحاً از باغ‌های‌که پیشتر از قارچکش استفاده نشده بود، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. تعدادی میوه و برگ جمع‌آوری شده از هر باغ، در داخل ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به همراه یک میلی‌لیتر توین ۲۰ قرار داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد تا مخمرهای رورست از سطوح برگ جدا شوند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله بر روی محیط کشت مالت آگار (Malt agar) به صورت چمنی کشت شدند. به منظر جلوگیری از رشد باکتریها، از سولفات استرپتومایسین به میزان (w/v)0.1% (Wang *et al.*, 2009) به همراه آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (100ppm) و آمپی‌سیلین (50ppm) (Benbow & Sugar, 1999) در محیط کشت استفاده شد. تشتک کشت به مدت سه روز پس از کشت دادن سوسپانسیون، در انکوباتور و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. مخمرهای رشد یافته برای خالص‌سازی مجدداً، کشت مخطط انجام شد. مخمرهای خالص برای مطالعات بعدی، در یخچال نگهداری شدند.

گروه‌بندی مخمرهای خالص شده

به دلیل تعداد زیاد جدایه‌های مخمر به دست آمده، از بین آنها بر اساس خصوصیات فنوتیپی و عمدتا بر اساس رنگ، حاشیه و ارتفاع پرگنه گروه‌بندی مقدماتی انجام و ۴۴ جدایه به عنوان نماینده گروه‌ها برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شدند.

تهیه بیمارگر، اثبات بیماری‌زایی و شناسایی آن

برای تهیه بیمارگر کپک سبز، از میوه‌های انباری که پیشتر با قارچکش تیمار شده‌اند ولی باز علایم بیماری بر روی آن‌ها توسعه یافته بود، انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. با کمک لوپ سترون، توده‌ای از اسپورهای بیمارگر از روی میوه برداشته و در چند میلی‌لیتر آب مقطر سترون همراه با توین ۲۰ (با غلظت ۰.۰۱ میلی لیتر در لیتر) مخلوط و سپس به صورت خطی روی محیط کشت آب آگار (WA) کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای خالص‌سازی، چند تک اسپور جوانه‌زده هر جدایه، انتخاب و برای انجام سایر مراحل بر روی محیط کشت PDA منتقل شدند. برای تهیه سوسپانسیون با کمک هماسیتومتر، غلظتی معادل 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب سترون برای هر جدایه تهیه شد. برای آلوده‌سازی، ابتدا زخم‌هایی بر روی میوه پرتقال رقم تامسون ناول ایجاد و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر روی آن تزریق شد. پس از چهار روز نگهداری میوه در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، علایم بیماری ظاهر شد و جدایه‌ای که توانایی تولید علایم شدیدتری را داشته است، برای ادامه بررسی‌ها، انتخاب شد. جدایه برتر بیمارگر با استفاده از کلید

تشخیص برپایه خصوصیات ماکروسکوپی نظیر ریخت‌شناسی پرگنه، رنگ پرگنه از بالا و پایین، میزان تولید اسپور و نیز از خصوصیات میکروسکوپی نظیر ابعاد کنیدیوم و فیلالید و متولا شناسایی شد.

ارزیابی توان بیوکنترل مخمرها بر روی میوه

تهیه مایه تلقیح (اینوکلوم) مخمر

از محیط کشت مایع Nutrient–Yeast extract–Glucose Broth (NYGB) (نوترینت براث هشت گرم، عصاره مخمر پنج گرم، گلوکز ۱۰ گرم در یک لیتر آب) برای مایه تلقیح استفاده شد (Cao *et al.*, 2001). پس از تلقیح مخمرها به داخل محیط، ارلن‌ها به مدت ۷۲ تهیه ساعت بر روی شیکر با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، قرار داده شدند تا به خوبی رشد کنند. سوسپانسیون حاصله، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفوژ شدند (De Capdeville *et al.*, 2002). با پخش رسوب به دست آمده در آب مقطر، سوسپانسیون حاوی 10^8 سلول مخمر در هر میلی‌لیتر تهیه شد.

تهیه میوه با شاخص رسیدگی مناسب

برای برداشت میوه و احیاتاً صادرات میوه، می‌بایست میوه به اندازه کافی رشد نموده و از نظر رسیدن وضع مطلوبی داشته باشد. هرچند شکل و اندازه میوه بیانگر میزان رشد و نمو میوه می‌باشند، اما برای تعیین درجه بلوغ فیزیولوژیکی نیاز است تا میزان ماده جامد محلول یا بریکس با Total Soluble Solid (TSS) آن ارزیابی شود که بدین منظوراز دستگاه رفرکتومتر دیجیتال مدل EZDO PDR–108 استفاده شد. برای این منظور تعداد ۱۰ عدد میوه پرتقال رقم تامسون ناول سالم و یکنواخت از جهات مختلف و از بخش‌های مختلف درخت انتخاب شده، سر و ته میوه از هر طرف به اندازه یک و نیم سانتیمتر بریده شد. از هر قسمت یک قطره بر روی صفحه رفرکتومتر قرار داده تا عدد بریکس به صورت درصد نشان داده شود. بر اساس استانداردهای رایج حداقل درجه بریکس برای پرتقال باید شش و نیم باشد که این عدد برای رقم تامسون معمولاً از نیمه اول آذر به بعد حاصل خواهد شد، بدین منظور نمونه های میوه مرکبات در نیمه دوم آذر ماه به بعد برای آزمایش برداشت شد.

ضدعفونی و برش میوه

به منظور ارزیابی مقدماتی توان بیوکنترل مخمرها، ابتدا آزمایش بر روی پوست میوه‌های برش خورده انجام شد. برای این کار ابتدا میوه‌ها ابتدا در آب معمولی شسته، پس از خشک شدن با محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت یک دقیقه ضدعفونی انجام شد تا سایر عوامل میکروبی رورست میوه حذف شوند (Kassim *et al.*, 2020)، پس از آبشویی مجدد با آب سترون، میوه‌ها در شرایط دمای اتاق خشک شدند.

بررسی کارآیی مخمر در مهار بیمارگر کپک سبز بر روی پوست میوه

از آنجایی که در عمل، خیلی از خسارت های ناشی از پوسیدگی میوه مرکبات در طی برداشت و انبارداری عمدتاً به دلیل خراش‌های سطحی ایجاد شده بر روی میوه می‌باشد، در آزمایشگاه نیز مشابه آن، با استفاده از برس‌های زبر، بر روی سطوح خارجی میوه خراش‌هایی کوچک ایجاد شد به طوری که بتوان تراوش اسانس را بر روی سطوح میوه مشاهد کرد که نشان می‌دهد منافذی برای ورود اسپورهای بیمارگر تشکیل شده است. پس از ایجاد خراش، پوست میوه به ابعاد سه در سه سانتی‌متر برش داده شد. میوه‌ها به مدت ۶۰ ثانیه داخل سوسپانسیون تهیه شده مخمر قرار داده شده و بعد بر روی کاغذ صافی قرار داده تا کاملا خشک شود. پنج ساعت پس از تلقیح با سلول مخمر به عنوان عامل بیوکنترل، ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون بیمارگر بر روی پوست خارجی میوه و در مرکز قطعه برش داده شده قرار داده شد. در نمونه شاهد مثبت تنها از سوسپانسیون بیمارگر استفاده شد. نمونه‌ها در داخل ظروفی با رطوبت بالای ۹۰ درصد قرار داده شد. به منظور تامین رطوبت از کاغذ صافی مرطوب در ظروف مورد استفاده شد. کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای هر جدایه مخمر نیز ۲۷ پوست میوه برش خورده در نظر گرفته شد.

بررسی مخمرها در مهار تولید اسپور توسط بیمارگر

از آنجایی که بیمارگر کپک سبز مرکبات دارای اسپورهای هوازاد می‌باشد، از این رو هر عاملی که سبب شود تا اسپورهای کمتری تولید شود، طبیعتاً سبب کاهش آلودگی‌های ثانویه در طی دوره انبارداری خواهد شد. بدین منظور ۲۰ روز پس از آلوده سازی، میزان تولید اسپور بیمارگر در تعامل با مخمر در مقایسه با شاهد فقط بیمارگر ارزیابی شد. برای این منظور کلیه تکه‌های پوست میوه هر تکرار در داخل ارلن با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب سترون ریخته شده، پس از اضافه کردن چند قطره توین، به مدت دو ساعت بر روی شیکر با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا کلیه اسپورها در داخل آب شناور شوند، سپس با استفاده از لام هماسیتومتر، تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر محلول شمارش شد.

شناسایی مخمرهای برتر با استفاده از تعیین ترادف

استخراج DNA

استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (Ausubel *et al.*, 2003). مقداری از پرگنه تازه کشت شده بر روی محیط کشت مالت آگار MA (۲۴ تا ۴۸ ساعته)، به لوله‌های میکروتیوب حاوی ۶۰۰ میکرولیتر بافر Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) انتقال داده شد و سوسپانسیون مخمر با کدورت قابل ملاحظه‌ای تهیه شد. پس از به‌هم‌زدن کامل، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ الی ۷۰ درجه سلسیوس در آب ولرم قرار داده شد و هر ۱۰ دقیقه، لوله‌ها به آرامی تکان داده شد، سپس ۶۰۰ میکرولیتر ترکیب ایزوآمیل الکل با کلروفرم خنک به لوله اضافه و مجدداً به آرامی به‌هم زده شد. نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و در ادامه مقدار ۲۰۰ الی ۳۰۰ میکرولیتر از فاز رویی به لوله اپندورف جدید منتقل شدند و هم حجم آن (۲۰۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپانول خنک به لوله اضافه شد و پس از به‌هم زدن آرام به مدت یک ساعت، در فریزر با دمای منفی ۲۰درجه سلسیوس قرار داده شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محتویات بالایی تخلیه شده و ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد سرد به رسوب باقیمانده اضافه شد، مجدداً لوله‌ها به آرامی به‌هم زده و سپس به مدت سه الی پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. کلیه محتویات میکروتیوب تخلیه شده و پس از قرار گرفتن در زیر هود و خشک شدن رسوب، به آن ۷۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و بعد از ۲۴ ساعت درون یخچال چهار تا شش درجه سلسیوس نگهداری و پس از آن به فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس انتقال داده شدند.

تکثیر ناحیه D1/D2 برای تعیین ترادف

برای شناسایی مخمرها از تعیین ترادف ناحیه D1/D2 با آغازگرهای D1:(5′–GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG –3′) و D2: (5′–GGTCCGTGTTTCAAGACGG –3′) استفاده شد. در PCR این ناحیه، قطعه‌ای به طول ۶۰۰bp–۵۶۴ تولید شد. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس ۲۸ چرخه مجزا (شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای۶۰ درجه سلسیوس و گسترش DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت۶۵ ثانیه) و سرانجام یک مرحله بسط نهائی به مدت هفت دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد.

نتایج

شناسایی بیمارگر

برای شناسایی بیمارگر، از خصوصیات ماکروسکوپی شامل ریخت شناسی پرگنه، رنگ پرگنه از بالا و پایین، میزان تولید اسپور و نیز از خصوصیات میکروسکوپی نظیر ابعاد کنیدیوم و فیلالید و متولا استفاده شد. اسپورها با سطحی صاف با ابعادی حدود ۶×۴ میکرومتر، به صورت بیضوی تا استوانه‌ای، فیالید سیلندری به ابعادی حدود ۱۳ میکرومتر و متولا نیز سیلندری به طور متوسط ۱۷ میکرولیتر می‌باشد. پرگنه‌های ایجاد شده بر روی میوه، با رنگ سبز و هاله میسلیوم سفید دراطراف آن با وسعت بیشتری به وجود

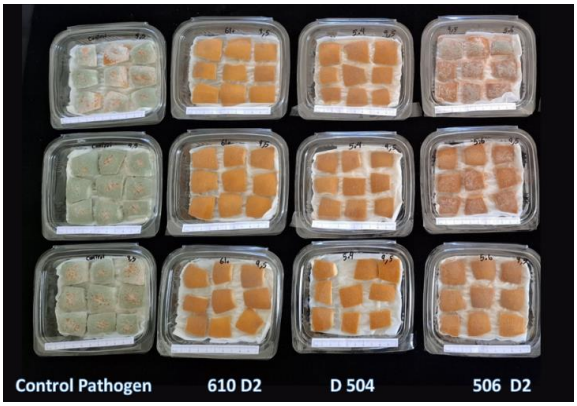
می‌آید که از مشخصه‌های بیمارگر *P. digitatum* می‌باشد (Palou, 2014).

ماده جامد محلول میوه پرتقال رقم تامسون

از این شاخص که به همراه سایر خصوصیات فیزیکی نظیر رنگ و اندازه که برای ارزیابی شاخص رسیدگی برای تعیین زمان درست برداشت استفاده می‌شود، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پرتقال تامسون دارای بریکس ۱۰ می‌باشد و استانداردهای لازمه برای برداشت را دارا می باشد.

بررسی کارآیی مخمر در مهار بیمارگر کپک سبز بر روی پوست میوه

میوه‌های آلوده شده شش روز در شرایط دمای انبار (۱۰ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. در طی این مدت علایم بیماری به تدریج ظاهر و نتایج ثبت شد. نتایج نشان می‌دهد برخی از مخمرها توانایی خوبی در مهار توسعه بیمارگر در مقایسه با شاهد داشته‌اند(شکل ۱). پس از ثبت نتایج، در قالب طرح کاملاً تصادفی با کمک نرم‌افزار SAS تجزیه وتحلیل آماری انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاصل درصد بروز بیماری در هر تیمار نشان می‌دهد بین مخمرهای مورد استفاده تفاوت معنی‌داری در مهار بیمارگر در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۱). با توجه به معنی‌دار شدن داده‌ها در سطح احتمال یک درصد ، می‌توان گفت تیمارهای اعمال شده از نظر توان بازدارندگی از رشد بیمارگر کپک سبز بر روی تکه‌های پوست میوه مرکبات با یکدیگر متفاوت می باشند که این تفاوت را می‌توان با روش دانکن، گروه‌بندی نمود. در بین مخمرها توانایی متفاوتی در مهار بیمارگر برای ایجاد بیماری مشاهده شد، برخی از آن‌ها قادر بودند تا مهار بسیار خوبی را انجام دهند. بر این اساس کلیه مخمرها را می‌توان در ۱۴ گروه مجزا با گروه آماری یکسان گروه‌بندی کرد(جدول۲).



شکل۱– توانایی مهار بیماری کپک سبز میوه مرکبات توسط مخمرهای برتر بعد از شش روز نگهداری در شرایط انباری در مقایسه با شاهد

Fig. 1. The ability to control green mold disease in citrus fruits by superior yeasts after six days of storage under packinghouses conditions in compared to the control

جدول ۱– تجزیه واریانس درصد بروز بیماری در تعامل انواع مخمرهای رورست بومی برای مهار بیمارگر کپک سبز میوه مرکبات

Table 1. Analysis of variance of disease incidence percentage in the interaction of native yeast species for the control of citrus fruit green mold pathogen

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	54	2952.3	14.67**	<.0001
Error	110	201.2		
Corrected Total	164			

Coeff. Var .= 21

** There is a significant difference at the 1% level

جدول ۲. مقایسه میانگین و گروه‌بندی درصد بروز بیماری کپک سبز مرکبات در تعامل بیمارگر با مخمرهای مورد بررسی

Table 2. Comparison of mean and grouping of percentage incidence of citrus green mold disease in pathogen interaction with studied yeasts

Disease Incidence Mean(%)	Duncan Grouping	Yeast Treatment	Disease Incidence Mean(%)	Duncan Grouping	Yeast Treatment
59.33	bcdefg	202D2	100	a	Control, 407,509,620,800
56	cdefg	11	96.3	ab	406, 500, 510, 601, 621, 803
55.67	cdefg	700,703D2	92.67	abc	7, 12, 200, 404, 411, 508, 515, 618
55.33	cdefg	513	89	abcd	604
52	defgh	702	85.3	abcd	5, 6, 8, 408, 416, 707
40.33	efghi	705 D2	81.67	abcd	415
33.33	fghij	302–1	77.67	abcd	403
25.67	ghij	4, 10, 300	74.3	abcde	9
18.33	hij	304D2	74	abcde	404 D
7.33	ij	D504, 507D2	70.67	abcde	1
3.67	j	501D2, 506D2	66.67	abcdef	2
0	j	610D2, 617D2	66.33	abcdef	3, 404 C, 414, 514
			63	abcdef	602

* In the control treatment, only a pathogen suspension with a concentration of 10^4 cfu/ml was used.

بررسی میزان توان مخمرها در مهار تولید اسپور توسط بیمارگر

برای بررسی میزان مهار تولید اسپور توسط بیمارگرها در مقایسه با شاهد، ۲۰ روز پس از آلوده سازی، تعداد اسپورها با کمک لام هماسیتومتر شمارش شد. نتایج نشان می‌دهد که میانگین تعداد اسپورها در هر یک میلی‌لیتر به ترتیب ۱۰۶ × ۵ سلول در هر میلی‌لیتر سوسپانسون برای تیمار بیمارگر به عنوان شاهد مثبت و ۱۰۶ × ۴.۲۵، ۱۰۶ × ۳ و ۱۰۶ × ۲.۵ سلول در هر میلی‌لیتر سوسپانسون برای جدایه‌های۵۰۶D۲، ۶۱۰D۲، ۵۰۴D۲ می باشد. این نتایج نشان می‌دهد که مخمرها صرف‌نظر از توانایی در مهار توسعه بیمارگر، مانع از تولید اسپور نیز شده‌اند که این کاهش اینوکلوم سبب کاهش آلودگی‌های ثانویه در انبار نیز خواهد شد.

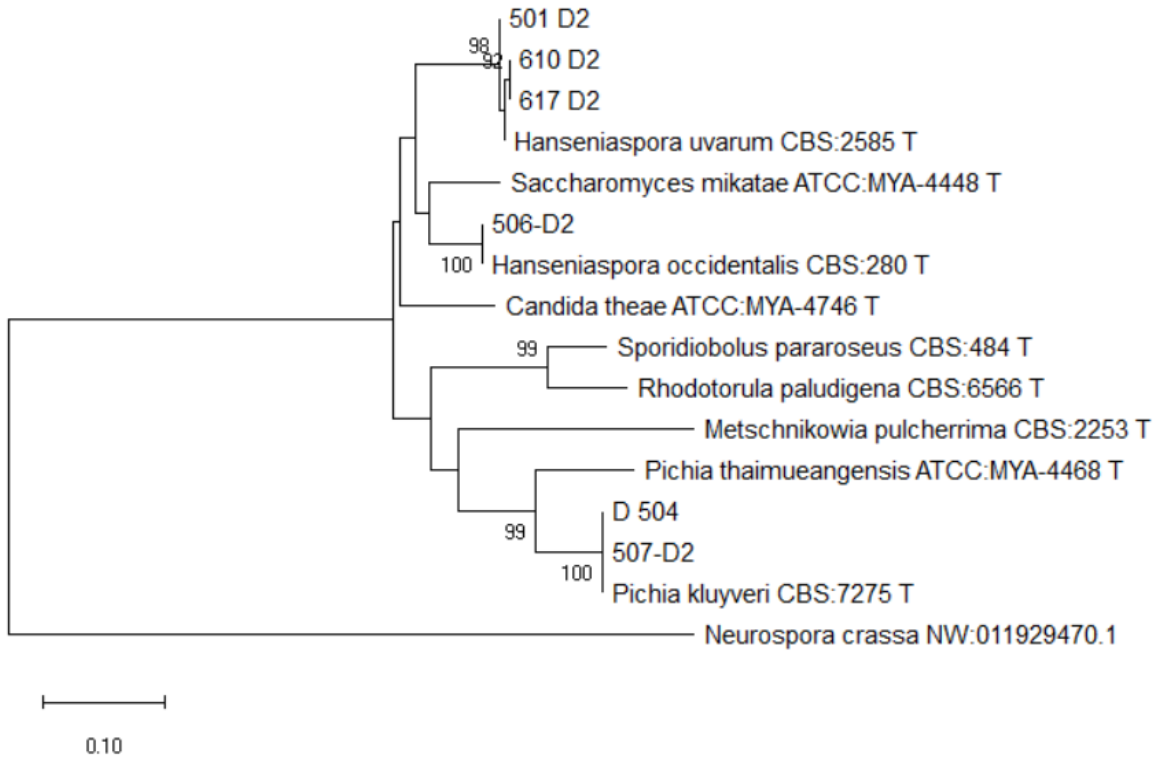
شناسائی مخمرهای موثر بر اساس خصوصیات ژنتیکی

برای شناسائی مخمرها، ناحیه بین D1/D2 آن‌ها پس از تکثیر با PCR تعیین ترادف شد. در PCR این ناحیه، قطعه‌ای به طول ۶۰۰bp—۵۰۰ تولید شد. برای همردیف سازی چندگانه (multiple alignment) ترادف‌های بدست آمده از جدایه‌های مورد بررسی، از نرم‌افزار Bioedit 7.0.9.0 استفاده شد. نتایج حاصل از تعیین ترادف، با کمک نرم‌افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) با ترادف‌های موجود مخمرها مقایسه شد. بر پایه ٪۱۰۰—۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی بر اساس جدول شناسایی شدند و جدایه‌های در بانک ژن NCBI ثبت شدند (جدول ۳). برای مقایسه تشابه و فاصله ژنتیکی ترادف‌های به‌دست آمده به همراه سایر ترادف‌های مخمرهای استاندارد برگرفته از GenBank، از نرم‌افزار Mega X استفاده شد (Felsenstein, 1989)). درخت فیلوژنتیکی با روش آماری Neighbour–Joining و ماتریکس فاصله بر اساس مدل Jukes–Cantor ترسیم گردید (Jukes & Cantor, 1969) (شکل ۲).

جدول ۳ – مشخصات ثبت توالی‌های جدایه‌های مخمر برتر در آزمون کنترل بیولوژیکی و ارایه مشخصات جغرافیایی مناطق جداسازی از استان مازندران

Table 3. Sequence accession numbers of superior isolates in biological control assay and their geographical origins from Mazandaran province.

Isolate	GPS position	Accession Nr D1/D2 domain in NCBI	D1/D2 domain closest type strain	Similarity (%)
501 D2	N36.497553 E52.889628	PQ686301	*Hanseniaspora uvarum* CBS286 T	100
506 D2	N36.497553 E52.889628	PQ180322	*H. occidentalis* CBS783 T	99.8
D 504	N36.42288 E52.91681	PQ180320	*Pichia kluyveri* CBS7275 T	100
507 D2	N36.42288 E52.91681	PQ686308	*P. kluyveri* CBS7275 T	100
610 D2	N36.475903 E52.132050	PQ686322	*H. uvarum* CBS2585T	99.8
617 D2	N36.475903 E52.132050	PQ686323	*H. uvarum* CBS2584 T	99.8



شکل ۲– ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های مخمر رورست برتر مرکبات با یکدیگر و نیز با جدایه‌های قارچی استاندارد بر اساس اساس توالی ناحیه D1/D2 LSU. دندروگرام به روش Neighbour–Joining ترسیم و ماتریکس فاصله بر اساس روش Jukes–Cantor با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap محاسبه شده است و مقادیر مساوی و یا بالاتر از ۷۰۰ نکرار در هر گره نشان داده شده است. *Neutospora crassa* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تغییر ۰/۱ نوکلئوتید در هر جایگاه است

Fig. 2. Phylogenetic relationship of citrus superior epiphytic yeast isolates to each other and to standard fungal isolates based on the D1/D2 LSU region sequences. Dendrograms were drawn using the Neighbor–Joining method and distance matrices were calculated using the Jukes–Cantor method with 1000 Bootstrap replicates. Bootstrap values of 700 or more (from 1,000 replicates) are indicated at the nodes *Neutospora crassa* was used as an outgroup. The dashed line reflects a 0.1 nucleotide change at each position.

بحث

امروزه در حوزه کشاورزی تلاش می‌شود تا ضمن حفظ پایداری زیست محیطی، اقتصادی و اجتماعی به تولید محصولات کشاورزی ایمن و مطلوب رسیده شود. برنامه‌ریزی درست در بخش کشاورزی می‌تواند موجب کاهش بخش زیادی از تهدیدها و چالش‌ها گردد. کشاورزی یکی از مقوله‌های اقتدار و امنیت ملی هر کشوری است زیرا تأمین امنیت غذایی در گرو کشاورزی پایدار با بهره‌وری بالا می‌باشد. بنابراین در سالیان اخیر، تولید محصول سالم، رویکرد اصلی دولت‌ها می‌باشد، لذا ضروری است تا آفتکش زیستی موثر، کم یا بی خطر و با نقطه اثر متمایز در مقایسه با قارچکش‌های مصرف شده قبلی، ارایه شود تا بتوان با اطمینان بیشتری به اهداف ذکر شده دست یافت. در این بررسی از اکوسیستم روروست شاخ و برگ و میوه مرکبات، مخمرها جداسازی و خالص‌سازی شدند، پس از گروه‌بندی مقدماتی جدایه‌ها، نماینده‌هایی انتخاب و از آن‌ها در آزمون بیوکنترل بر روی میوه استفاده شد. نتایج بررسی‌ها و شناسایی جدایه‌های برتر بر اساس تعیین ترادف ناحیهD1/D2 نشان می‌دهد که جدایه‌های *Hanseniaspora occidentalis*، *H. uvarum* و *Pichia kluyveri* از نظر میزان کارایی در مهار بیمارگر برتر از سایر مخمرها قرار می‌گیرند. جدایه‌های D۲ ۶۱۷ ، D۲ ۶۱۰ و D۲ ۵۰۱ مربوط به مخمر *H. uvarum* بیشترین کارایی در مهار بیمارگر را داشته است. جدایه D۲۵۰۶ در درجه بعدی کارآیی قرار داشته و متعلق به گونه *H. occidentalis* می‌باشند و جدایه‌های D۲۵۰۷ و D۵۰۴ مربوط به گونه *P. kluyveri* عملکرد کمتری نسبت به دو گونه پیشین داشته است. عملکرد مخمر *H. uvarum* در این بررسی در مهار بیماری کپک سبز بسیار عالی بوده است. در بررسی‌های پیشین سایر محققان نیز گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر بخشی خوب این گونه بر روی بیماری ارایه کرده‌اند (Taqarort *et al.*, 2008). در تحقیقی، ۷ روز پس از نگهداری میوه تیمار شده با این مخمر در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، میزان آلودگی کپک سبز در پرتقال ناشی از بیمارگر *P. digitatum* ۳۰ الی ۳۵ درصد کاهش یافت و برای اثربخشی بیشتر در ترکیب با اسید فسفاتیدیل کولین فیتیک میزان درصد بروز آلودگی به سطح ۶–۵ درصد کاهش یافت (Li *et al.*, 2016). در بررسی دیگر، همین مخمر توانست درصد پوسیدگی ناشی از کپک سبز مرکبات را به میزان ۶۶.۶۷ درصد کاهش دهد(Liu *et al.*, 2017). در کیوی نیز، توانایی این مخمر برای مهار دو بیمارگر *Botrytis cinerea* و *Alternaria alternata* نشان داد پس ازچهار روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه‌سلسیوس، آلودگی تا سطح ۵۳–۴۵ درصد در مقایسه با شاهد کاهش یافت و این درحالی است که اگر در ترکیب با بتا آمینوبوتیریک اسید باشد، درصد بیماری تا سطح ۳۵–۳۰ درصد کاهش خواهد یافت (Cheng *et al.*, 2019). در انگور نیز این مخمر با غلظت cells/mL ۱×۱۰^۸ سبب مهار نسبی بیمارگر *Botrytis cinerea* شده است به طوری که ایندکس بیماری در مقایسه با شاهد تا حد ۵۱/۸ درصد کاهش یافت (Qin *et al.*, 2015). تصور می‌شود سالیسیلیک اسید در مکانیسم‌های دفاعی مانند افزایش مقدار لیگنین که مکانیسم مهمی در برابر عفونت‌های قارچی است، نقش موثری دارد (Ahima *et al.*, 2020) و در ترکیب با این مخمر نیز در افزایش فعالیت این آنزیم موثر است (Qin *et al.*, 2015). برای این مخمر مکانیسم‌های متنوعی در کنترل بیولوژیکی ارایه شده است، نظیر تولید ترکیبات فرار (Oztekin *et al.*, 2023)، تحریک سیستم القاء مقاومت در گیاه میزبان و فعال شدن ژن‌ها و آنزیم‌های CHT و GLU در کیوی (Cheng *et al.*, 2019) و .... . همچنین با استفاده از خصوصیات آنتاگونیستی سبب کاهش تولید مایکوتوکسین تولیدی (AOH, AME, TeA) توسط *A. alternata* در انگور می‌گردد (Prendes *et al.*, 2021). از مخمر *H. occidentalis* گزارش‌های کمتری در مقایسه با گونه قبلی ارایه شده است. این مخمر از خانواده Saccharomycetaceae در شاخه Ascomycota می‌باشد و فرم غیرجنسی آن متعلق به قارچ *Kloeckera javanica* می‌باشد که می‌توان از خاک و نیز از روی سطوح انگور پیدا کرد، نمونه‌هایی از این جنس نیز از مرکبات پوسیده (پرتقال، لیموترش، نارنگی و گریپ فروت) در آرژانتین نیز جداسازی شده است (Spencer *et al.*, 1992). در ایران نیز

گزارشی مبنی بر تاثیر خوب این گونه بر روی بیمارگر *Botrytis cinerea* در سیب ارایه شده است (Alizadeh *et al.*, 2020). مخمر *P. kluyveri* نیز از آسکومیست‌هایی است که به خانواده Pichiaceae مرتبط می‌باشد و در مرحله تولیدمثل جنسی تولید اسکوسپور می‌کند (Buzzini *et al.*, 2017). در بررسی شرایط آزمایشگاهی نشان داد این مخمر قادر است بر روی تشتک کشت با غلظت 1×10^8 cells/mL، بیمارگرهای *Monilinia laxa* و *Botrytis cinerea* را به ترتیب به میزان ۵۴/۶ و ۴۴/۵ درصد کاهش دهد(Mewa Ngongang *et al.*, 2021). این مخمر با همین غلظت توانست میزان درصد بروز بیماری ناشی از قارچ *Alternaria alternata* را به میزان ۲۰/۷ –۷/۴ درصد در مقایسه با شاهد کاهش دهد (Vilaplana *et al.*, 2020). گاهی اوقات میزان تاثیر مخمر می‌تواند در حد آفتکش‌شیمیایی نیز کارا باشد. به عنوان مثال، در بررسی توانایی مهار پوسیدگی سیاه در میوه اژدهای قرمز توسط *Candida inconspicua* و *Pichia kluyveri* ، نتایج پس از ۲۱ روز نگهداری با مخمرهای آنتاگونیست بنشان داد به ترتیب ه ۲۰.۵٪ و ۷.۴٪ آلودگی کاهش یافت، این در حالی که بیماری در میوه تیمار شده با ایمازالیل تنها به میزان ۴۷.۶٪ کاهش یافته است (Vilaplana *et al.*, 2020). در ایران نیز از تاثیر خوب *P. kluyveri* بر روی کپک آبی میوه مرکبات در بررسی آزمایشگاهی گزارش شده است (Ghasemi *et al.*, 2011). یکی از نکات منفی در خصوص استفاده از روش‌های فیزیکی برای مدیریت بیماری‌های میوه، احتمال تاثیر منفی بر کیفیت میوه می‌باشد. خوشبختانه در مورد مخمر تاکنون هیچ تاثیر منفی مخمرهای کنترل زیستی در هیچ میوه ای مشاهده نشد. چندین محقق قبلاً گزارش داده اند که مخمرهای کنترل زیستی تأثیری بر معیارهای کیفی مانند سفتی میوه، مواد جامد محلول کل و اسیدیته قابل تیتراسیون در طول ذخیره سازی ندارند (Li *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2015; Solairaj *et al.*, 2020; Vilaplana *et al.*, 2020). حبیبا و همکاران دریافتند که سفتی میوه کینو با افزایش دوره نگهداری برای نمونه های تیمار نشده و تیمار شده با مخمر به طور قابل توجهی کاهش یافته است علاوه بر این، افزایش کل مواد جامد محلول و افت غلظت اسید اسکوربیک در میوه‌های تیمار شده با مخمر در مقایسه با مجموعه میوه‌های گیاهی تیمار نشده کمتر بود (Noreen *et al.*, 2019). در مورد استفاده از مخمر کنترل زیستی، مهم‌ترین مسئله اثر مضر مخمر و هر گونه اثر تخمیر در زخم‌های میوه است. به احتمال زیاد، هیچ تاثیر منفی مخمرهای کنترل زیستی در هیچ میوه‌ای مشاهده نشه است. بر اساس گزارش‌های محققان پیشین، مخمرهای کنترل زیستی تأثیری بر معیارهای کیفی مانند سفتی میوه، مواد جامد محلول کل و اسیدیته قابل تیتراسیون در طول ذخیره سازی ندارند (Li *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2015; Solairaj *et al.*, 2020; Vilaplana *et al.*, 2020). با توجه به نتایج این بررسی و تحقیقات پیشین، به نظر می‌رسد پتانسیل خوبی در کشور برای استفاده از توان این عوامل بیوکنترل بومی وجود دارد که می‌توان از آن بهره بیشتری برد.

References

Ahima, J., Zhang, H., Apaliya, M.T., Yang, Q. & Jiang, Z. 2020. The mechanism involved in enhancing the biological control efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* with salicylic acid to postharvest green mold decay of oranges. Journal of Food Measurement and Characterization, 14: 3146–3155.

Alizadeh, M., Vasebi, Y. & Safaie, N. 2020. Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. Open Agriculture, 5: 404–440.

Authority, E.F.S., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Byers, H. & Chiusolo, A. 2017. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Metschnikowia fructicola* NRRL Y-27328. EFSA Journal, 15: e05084.

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.

Bus, V., Bongers, A. & Risse, L. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. Plant Disease, 75: 1098–1100.

Buzzini, P., Lachance, M.A. & Yurkov, A. 2017. Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. Springer. p.

Cao, H., Baldini, R. L. & Rahme, L. G. 2001. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. Annual review of phytopathology, 39: 259–284.

Chen, C., Guo, J., Kahramanoğlu, I. b., Wan, C., Gan, Z. & Chen, J. 2020. Biocontrol Bacterium *Paenibacillus Brasilensis* YS–1 Fermented Broth Enhances the Quality Attributes and Storability of Harvested "Newhall" Navel Oranges. ACS Food Science & Technology, 1: 88–95.

Cheng, L., Nie, X., Jiang, C. & Li, S. 2019. The combined use of the antagonistic yeast *Hanseniaspora uvarum* with β–aminobutyric acid for the management of postharvest diseases of kiwifruit. Biological Control, 137: 104019.

De Capdeville, G., Wilson, C.L., Beer, S.V. & Aist, J.R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. Phytopathology, 92: 900–908.

Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D. & Jijakli, M.H. 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. Postharvest Biology and Technology, 122: 22–29.

Drusch, S. & Ragab, W. 2003. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. Journal of food protection, 66: 1514–1527.

Dukare, A.S., Paul, S., Nambi, V.E., Gupta, R.K., Singh, R., Sharma, K. & Vishwakarma, R.K. 2019. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: A review. Critical reviews in food science and nutrition, 59: 1498–1513.

Felsenstein, J. 1989. Mathematics vs. evolution: mathematical evolutionary theory. Science, 246: 941–942.

Ghasemi, S., Etebarian, H., Sahebani, N. & Aminian, H. 2011, Control of blue mold on orange fruit by yeast, *Metschnikowia pulcherrima* (m54) and induction of b 1,3–glucanase enzyme in albedo and flavedo tissues. 27–28 July, Biological Control Development, Tehran, Iran., 477.

Hammami, R., Oueslati, M., Smiri, M., Nefzi, S., Ruissi, M., Comitini, F., Romanazzi, G., Cacciola, S. O. & Sadfi Zouaoui, N. 2022. Epiphytic Yeasts and Bacteria as Candidate Biocontrol Agents of Green and Blue Molds of Citrus Fruits. Journal of fungi, 8: 818.

Hernandez–Montiel, L.G., Droby, S., Preciado–Rangel, P., Rivas–García, T., González–Estrada, R. R., Gutiérrez–Martínez, P. & Ávila–Quezada, G.D. 2021. A sustainable alternative for postharvest disease management and phytopathogens biocontrol in fruit: Antagonistic yeasts. Plants, 10: 2641.

Holmes, G.J. & Eckert, J.W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. Phytopathology, 89: 716–721.

Ismail, M. & Zhang, J. 2004. Post–harvest citrus diseases and their control. Outlooks on Pest Management, 15: 29–35.

Jukes, T.H. & Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. Mammalian protein metabolism, 3: 21–132.

Kassim, A., Workneh, T.S. & Laing, M. D. 2020. A review of the postharvest characteristics and pre–packaging treatments of citrus fruit. AIMS Agriculture and Food, 5: 337–364.

Li, W., Zhang, H., Li, P., Apaliya, M.T., Yang, Q., Peng, Y. & Zhang, X. 2016. Biocontrol of postharvest green mold of oranges by *Hanseniaspora uvarum* Y3 in combination with phosphatidylcholine. Biological Control, 103: 30–38.

Li, X., Wang, D., Cai, D., Zhan, Y., Wang, Q. & Chen, S. 2017. Identification and high–level production of pulcherrimin in *Bacillus licheniformis* DW2. Appl Biochem Biotechnol, 183: 1323–1335.

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S. & Liu, Y. 2013. Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. International Journal of Food Microbiology, 167: 153–160.

Liu, Y., Wang, W., Zhou, Y., Yao, S., Deng, L. & Zeng, K. 2017. Isolation, identification and in vitro screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. Biological Control, 110: 18–24.

Mewa Ngongang, M., Du Plessis, H.W., Boredi, C.S., Hutchinson, U.F., Ntwampe, K.S., Okudoh, V.I. & Jolly, N.P. 2021. Physiological and antagonistic properties of *Pichia kluyveri* for curative and preventive treatments against post–harvest fruit fungi. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 71: 245–253.

Noreen, R., Ali, S. A., Hasan, K.A., Sultana, V., Ara, J. & Ehteshamul–Haque, S. 2019. Evaluation of biocontrol potential of epiphytic yeast against postharvest *Penicillium digitatum* rot of stored Kinnow fruit (*Citrus reticulata*) and their effect on its physiochemical properties. Postharvest Biology and Technology, 148: 38–48.

Oztekin, S., Dikmetas, D.N., Devecioglu, D., Acar, E.G. & Karbancioglu–Guler, F. 2023. Recent insights into the use of antagonistic yeasts for sustainable biomanagement of postharvest pathogenic and mycotoxigenic fungi in fruits with their prevention strategies against mycotoxins. J Agric Food Chem, 71: 9923–9950.

Prendes, L.P., Merín, M.G., Zachetti, V.G. L., Pereyra, A., Ramirez, M.L. & Morata de Ambrosini, V.I. 2021. Impact of antagonistic yeasts from wine grapes on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata*. Journal of applied microbiology, 131: 833–843.

Pusey, P. L. & Wilson, C. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Disease, 68: 753–756.

Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z. & Si, L. 2015. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. Postharvest Biology and Technology, 100: 160–167.

Sanzani, S. M., Reverberi, M. & Geisen, R. 2016. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. Postharvest Biology and Technology, 122: 95–105.

Sipiczki, M. 2020. *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin–producing yeasts: Fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. Microorganisms, 8: 1029.

Smilanick, J., Mackey, B., Reese, R., Usall, J. & Margosan, D. 1997. Influence of concentration of soda ash, temperature, and immersion period on the control of postharvest green mold of oranges. Plant Disease, 81: 379–382.

Solairaj, D., Legrand, N. N. G., Yang, Q. & Zhang, H. 2020. Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and in vivo biocontrol activity of selected yeasts against them. Physiological and Molecular Plant Pathology, 110: 101478.

Spencer, D. M., Spencer, J. F. T., De Figueroa, L. & Heluane, H. 1992. Yeasts associated with rotting citrus fruits in Tucumán, Argentina. Mycol Res, 96: 891–892.

Statistics of the ministry of agriculture–Jahad. 2024. Report on garden, mushroom and greenhouse products. Deputy for statistics, center for statistics, information technology and communications. 400 p.

Taqarort, N., Echairi, A., Chaussod, R., Nouaim, R., Boubaker, H., Ait Ben Aoumar, A. & Boudyach, H. 2008. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24.

Themen, D. 2014. Reduction of food losses and waste in Europe and Central Asia for improved food security and agrifood chain efficiency. 85. https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/au844e

Vilaplana, R., Cifuentes, C., Vaca, L., Cevallos–Cevallos, J. M. & Valencia–Chamorro, S. 2020. Curative activity of possible biocontrol agents in the postharvest of yellow pitahaya and organic banana. Postharvest Biology and Technology, 159: 111030.

Wang, Y., Yu, T., Li, Y., Cai, D., Liu, X., Lu, H. & Zheng, X. 2009. Postharvest biocontrol of Alternaria alternata in Chinese winter jujube by *Rhodosporidium paludigenum*. Journal of applied microbiology, 107: 1492–1498.

Windholtz, S., Redon, P., Lacampagne, S., Farris, L., Lytra, G., Cameleyre, M., Barbe, J.–C., Coulon, J., Thibon, C. & Masneuf–Pomarede, I. 2021. Non–Saccharomyces yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide. Lwt, 149: 111781.

Zhang, X., Li, B., Zhang, Z., Chen, Y. & Tian, S. 2020. Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. Journal of fungi, 6: 158.

Zhang, Y., Li, T., Liu, Y., Li, X., Zhang, C., Feng, Z., Peng, X., Li, Z., Qin, S. & Xing, K. 2019. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS–41 as biological fumigants to control Ceratocystis fimbriata in postharvest sweet potatoes. J Agric Food Chem, 67: 3702–3710.

Zhimo, V. Y., Kumar, A., Biasi, A., Salim, S., Feygenberg, O., Toamy, M. A., Abdelfattaah, A., Medina, S., Freilich, S. & Wisniewski, M. 2021. Compositional shifts in the strawberry fruit microbiome in response to near–harvest application of *Metschnikowia fructicola*, a yeast biocontrol agent. Postharvest Biology and Technology, 175: 111469.

Isolation of citrus epiphytic yeasts and identification of superior isolates in controlling green mold disease

Sima Hatami[1], Valiallah Babaeizad[2], Farid Beiki[3], Zohreh Moradi[4]

1., 2., 4. M.Sc. Student, Professor, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Mazandaran, Iran.
4. Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
Corresponding author: Farid Beiki, email: f.beiki@gmail.com

Received: Dec., 28, 2024 11(2) 53–65 Accepted: Jan., 04, 2025

Abstract

Green mold (Penicillium digitatum) is one of the most important diseases of citrus fruits during the postharvest and storage stages, which causes significant damage if not properly managed. In recent years, this pathogen has been controlled by the use of chemical fungicides. In order to reduce fungicide application and eliminate toxic residues, it is necessary to use other management methods. Use of microbial agents in biological control is one of these methods. Based on previous reports on the ability of yeasts to inhibit pathogens, the ability of native isolates to inhibit pathogen that cause green mold has been investigated. For this study, citrus fruit and leaf samples were gathered from various areas in Mazandaran province during autumn of 2023. Yeast colonies were then isolated and purified in the lab by using malt agar medium. Due to the large number of isolates, representatives of isolates were selected based on their phenotypic characteristics (shape, color and margin of the colony, physiological characteristics). The test was conducted on citrus fruits of the Thomson Novel variety and its Soluble solids concentration (SSC) content was determined to be 10 °Brix at the time of harvest. The biocontrol test was carried out on the citrus fruit with 44 yeast isolates. The fruit pieces were initially placed in a yeast suspension with a concentration of 10^8 cells per milliliter of sterile water, and after being stored for five hours at room temperature, 10 microliters of the green mold with a concentration of 10^4 cells per milliliter was added to the center of each cut piece. Fruits were stored under packinghouses conditions with over 90% humidity for six days until symptoms of disease appeared. The results of variance analysis based on the percentage of disease occurrence indicated that among the yeasts, there was a significant difference at a 1% level, regarding their ability to inhibit the green mold pathogen under storage conditions. Comparing the average percentage of disease incidence based on according to Duncan's multiple range test at significance level 1% shows that the yeasts in the two statistical groups performed very well. Sequencing the D1/D2 domain within the Large subunit ribosomal ribonucleic acid (LSU rDNA) region was employed to detect these outstanding isolates. According to the results, the top–performing yeasts were Hanseniaspora uvarum, Hanseniaspora occidentalis, and Pichia kluyveri. So that after six days, they had complete inhibition of the occurrence and development of the pathogen compared to the control.

Keywords: Biocontrol, Epiphytic, Orange, *Penicillium digitatum*, Postharvest.