

مقاله تحقیقی

معرفی مخمرهای *Rhodotorula mucilaginosa* و *Candida membranifaciens* به عنوان عوامل موثر در کنترل بیولوژیک بیماری های کپک سبز و آبی میوه مرکبات

فرید بیکی فیروزجاهی

استادیار، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۶

۱۲(۲) ۱-۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲

چکیده

پوسیدگی های پس از برداشت در میوه های مرکبات یکی از چالش های اساسی در زنجیره تولید و نگهداری این محصولات به شمار می رود که عمدتاً بر اثر فعالیت بیمارگرهای قارچی ایجاد می شود. در این میان، بیماری های کپک سبز (*Penicillium digitatum*) و کپک آبی (*P. italicum*) از مهم ترین عوامل خسارت زا محسوب می شوند. مدیریت این بیماری ها معمولاً از طریق مصرف قارچ کش های شیمیایی انجام می گیرد، اما نگرانی های مربوط به آثار زیست محیطی و بروز جدایه های مقاوم، ضرورت توسعه و به کارگیری روش های جایگزین را بیش از پیش آشکار ساخته است. در سال های اخیر، استفاده از عوامل مهارزیستی به ویژه مخمرهای آنتاگونیست، به عنوان رویکردی پایدار و سازگار با محیط زیست برای کنترل بیماری های پس از برداشت میوه های مرکبات، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. این پژوهش با هدف ارزیابی توان مهارزیستی مخمرهای جدا شده از سطوح میوه های مرکبات در برابر عوامل بیماری های کپک سبز و آبی میوه مرکبات انجام شده است. برای این منظور، نمونه های میوه از باغ های مختلف استان مازندران جمع آوری و مخمرهای بومی متنوعی از آن ها جداسازی گردید. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، نماینده هایی از هر گروه مخمر انتخاب و توانایی آن ها در مهار رشد و توسعه آلودگی ناشی از قارچ های یاد شده بر روی میوه پرتقال رقم تامسون ناول مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سطح میوه ها با ایجاد خراش های سطحی مشابه حالت طبیعی ایجاد و سپس در سوسپانسیون مخمر (با غلظت 10^8 سلول در هر میلی لیتر آب) قرار داده شدند. پس از آن، آلوده سازی میوه ها با استفاده از سوسپانسیون اسپور قارچ های بیمارگر (با غلظت 10^5 اسپور در هر میلی لیتر) انجام گرفت. پس از گذشت دو هفته نگهداری در شرایط انباری، درصد بروز بیماری ثبت و داده ها بر اساس طرح آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج نشان می دهد نوع مخمر و نوع بیمارگر هر دو اثر معنی داری بر میزان کارایی مهارزیستی دارند. شناسایی مولکولی جدایه های برتر با استفاده از تعیین ترادف ناحیه ژنی ITS با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ITS1 و ITS4 انجام شد و بر این اساس دو مخمر به ترتیب به عنوان *Rhodotorula mucilaginosa* و *Candida membranifaciens* شناسایی گردیدند. ارزیابی کارایی مهارزیستی بر اساس فرمول ابوت نیز نشان می دهد این دو مخمر در کاهش پوسیدگی به ویژه ناشی از کپک سبز بسیار مؤثر بوده اند، به طوری که کارایی آن ها در مهار کپک سبز به ترتیب ۹۸ و ۹۹ درصد برآورد شد. در مقابل، در خصوص کنترل کپک آبی، کارایی کمتر بوده و به ترتیب ۵۰ و ۵۸ درصد گزارش می گردد. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می دهد استفاده از مخمرهای آنتاگونیست بومی می تواند به عنوان جایگزینی زیست سازگار و مؤثر برای قارچ کش های شیمیایی در مدیریت پوسیدگی های پس از برداشت میوه های مرکبات مورد استفاده قرار گیرد و راهکار مناسبی برای توسعه سیستم های مدیریت تلفیقی بیماری های پس از برداشت ارائه دهد.

واژه های کلیدی: پوسیدگی انباری، *P. italicum*، *Penicillium digitatum*، مهارزیستی

مقدمه

میزان تولید محصولات باغی، قارچ و گلخانه‌ای در کشور، حدود ۲۴/۶۹ میلیون تن می‌باشد و مجموع ارقام مرکبات با تولید حدود ۵/۲۷ میلیون تن، حدود ۲۱/۳۴ درصد از کل تولید باغی کشور را به خود اختصاص داده است (Agriculture statistics, 2023). پوسیدگی پس از برداشت خسارت‌های قابل توجهی را در انواع محصولات کشاورزی نظیر میوه‌ها، سبزیجات، غلات و سایر محصولات گیاهی وارد می‌سازد (Wang et al., 2022). در مرکبات تعداد بسیار زیادی از عوامل بیمارگر گیاهی سبب پوسیدگی پس از برداشت در مراحل انبارداری می‌شوند، دو بیمارگر کپک سبز و آبی میوه مرکبات که به ترتیب توسط قارچ‌های *Penicillium digitatum* (1881) (Pers.) Sacc., و *P. italicum* (1894) Wehmer, و Fung. Ital.: tab. 894 Hedwigia 33: 211 ایجاد می‌شوند به عنوان عمده‌ترین عوامل بیماری‌زای پس از برداشت مرکبات محسوب می‌شوند (Regnier et al. 2014)، قارچ‌های *Geotrichum*، *Alternaria*، *Phytophthora*، *Colletotrichum* نیز در رده‌های بعدی اهمیت قرار دارند (Ezzougari et al., 2024). میوه‌ها از طریق پوست صدمه‌دیده در طی مراحل برداشت، انتقال، بسته‌بندی و انبارداری دچار آلودگی می‌شوند (Chen et al., 2019). این عوامل بیماری‌زا ضمن ایجاد پوسیدگی و خسارت کمی، با رشد بر روی میوه‌ها، ممکن است مایکوتوکسین‌هایی تولید کنند که می‌توان از آن‌ها به عنوان عوامل ایجاد کننده سرطان نام برد (Dukare et al., 2019)، امروزه برای مدیریت آن، از قارچ‌کش‌هایی نظیر ایمازالیل، تیابندازول و پیریمتانیل استفاده می‌شود (Ferraz et al., 2016)، اما استفاده مکرر از این قارچ‌کش‌ها سبب بروز مقاومت خواهد شد و آلودگی‌های زیست محیطی و خطرات ایجاد شده برای موجودات زنده را نیز در پی خواهد داشت. در طی یک دهه اخیر برخی از تحقیقات اخیر به سمت استفاده از روش‌های جایگزین موثر و پایدار، گرایش پیدا کرده است و تلاش گسترده‌ای در خصوص بهره‌گیری از عوامل زیستی به منظور مهار بیمارگرها انجام شده است. از بین این عوامل، مخمرها

دارای ویژگی‌های خوبی نظیر پایداری، تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، استفاده سریع از مواد غذایی و تکثیر آسان، عدم تولید آنتی‌بیوتیک، تحمل و سازگاری بیشتر نسبت به نوسانات حرارتی، رطوبت نسبی، pH، سطوح اکسیژن، اشعه UV، فشار اسمزی می‌باشد (Sharma et al., 2009; Spadaro et al., 2010). در سال‌های اخیر، تعدادی از مخمرهای موثر در مهار کپک‌های سبز و آبی میوه مرکبات گزارش شده‌اند، نظیر مخمرهای *Pichia guilliermondii* Wick. (1966)، *Candida oleophila*، *Debaryomyces hansenii*، (1952)، *Kloeckera apiculata*، *Pichia anomala*، *C. sake*، *C. famata*، *C. saitoana*، *Aureobasidium pullulans*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Metschnikowia fructicola*، *Cryptococcus laurentii*، *M. pulcherrima* (Droby et al., 2002; El-Neshawy & El-Sheikh, 1998; Lahlali et al., 2004; Liu et al., 2010; Long et al., 2007; McLaughlin et al., 1990; Sharma et al., 2002; Singh et al., 2009). به منظور کاهش مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی و کاهش باقی‌مانده آن‌ها در بقایای میوه‌های مرکبات، مخمرهای روروست مرکبات از باغ‌های شمال کشور جداسازی، خالص‌سازی و پس از بررسی‌های مهارزیستی، برترین آن‌ها از نظر توان مهار کردن این بیمارگرهای مرکبات، معرفی می‌شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی مخمرها

به منظور جداسازی مخمرهای روروست، نمونه‌هایی از باغ‌های مرکبات مناطق مختلف شمال کشور مرکبات انتخاب و به آزمایشگاه ارسال شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌ها درون ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد تووین ۲۰ (Tween 20) و بافر فسفات (NaCl %0.8, KCl %0.02, NaH₂PO₄ % 0.115, K₂HPO₄ % 0.25) (Obanor et al., 2002) به مدت ۳۰ دقیقه و با دور rpm 150 قرار داده شد، سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر روی محیط کشت مالت آگار (Malt agar)، حاوی آنتی‌بیوتیک‌های سولفات استرپتومایسین به میزان ۰/۱٪ (w/v) (Wang et al., 2009)، کلرامفنیکل (100 ppm) و آمپی‌سیلین (50 ppm)، Benbow

کشت شدند. بعد از تولید اسپور، ابعاد و خصوصیات آن با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد (Visagie et al., 2009).

اثبات بیماری زایی جدایه های بیمارگر

برای دو بیمارگر مورد بررسی، با کمک هماسیتومتر (0.0025 میلی متر مربع با عمق 0.1 میلی متر)، سوسپانسیون با غلظت 10^5 اسپور در هر میلی لیتر آب سترون تهیه شد. بعد از شستشوی میوه ها و خشک کردن آن ها، خراشی با کمک اسکالپل بر روی میوه پرتقال رقم تامسون ناول ایجاد و 10 میکرولیتر از سوسپانسیون های تهیه شده، بر روی آن تزریق شد و در دمای اتاق نگهداری شدند. به منظور حفظ رطوبت، میوه ها درون نایلون پلاستیکی قرار داده شدند. یک هفته بعد از بروز علائم بیماری، پُرآزارترین جدایه ها از نظر وسعت ایجاد بیماری، انتخاب شدند.

ارزیابی توان مهار کنندگی عوامل بیماری کپک سبز و آبی مرکبات توسط مخمرهای منتخب بر روی میوه پرتقال

برای ارزیابی توانایی مخمرها در کاهش شدت بیماری کپک سبز و آبی، میوه های پرتقال تامسون ناول با اندازه و میزان رسیدگی یکسان و بدون آسیب فیزیکی، انتخاب شدند. به مدت یک دقیقه با محلول هیوکلریت سدیم دو درصد ضد عفونی و سپس با آب مقطر شسته و خشک شدند. از آنجایی که در عمل، خیلی از خسارت های ناشی از پوسیدگی میوه مرکبات در طی برداشت و انبارداری عمدتاً به دلیل خراش های سطحی ایجاد شده بر روی میوه می باشد، در آزمایشگاه نیز برای انجام آزمون، بر روی سطوح خارجی میوه خراش هایی کوچک با استفاده از برس های زبر، ایجاد شد به طوری که بتوان تراوش روغن اسانسی را بر روی سطوح میوه مشاهده کرد. سپس میوه ها، درون سوسپانسیون مخمر با غلظت 10^8 cfu/ml (سلول در میلی لیتر) به مدت دو دقیقه غوطه ور شدند تا سلول های مخمر کاملاً سطوح زخمی را بپوشانند. پس از تلقیح مخمرها، میوه ها به مدت 5 ساعت بر روی سید در دمای اتاق قرار داده شده تا کاملاً خشک شوند. آنگاه برای تلقیح

(Sugar, 1999) کشت و به مدت سه روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از جداسازی تک کلون ها و خالص سازی، نمونه ها برای انجام سایر بررسی ها، در یخچال نگهداری شدند. به علت تعدد جدایه های مشابه، کلیه جدایه ها بر اساس چند خصوصیت ریخت شناسی پرگنه (از لحاظ رنگ و شکل، نحوه گسترش و حاشیه پرگنه)، به گروه هایی تقسیم شدند. در آزمون بیوکنترل، 20 نماینده انتخاب شدند تا توانایی مهار آن ها بر روی قارچ های بیمارگر ارزیابی شوند.

تهیه سوسپانسیون حاوی مخمر

از محیط کشت مایع حاوی عصاره مخمر و گلوکز NYGB (نوترینت براث هشت گرم، عصاره مخمر پنج گرم، گلوکز 10 گرم در یک لیتر آب) برای مایه تلقیح استفاده شد (Wodzinski et al., 1994). پس از تلقیح مخمرها به داخل محیط، ظروف ارلن به مدت 72 ساعت بر روی شیکر با دور 150 دور در دقیقه و در دمای 25 درجه سلسیوس، قرار داده شدند تا به خوبی رشد کنند. سوسپانسیون حاصل، به مدت 5 دقیقه با سرعت 3000 دور در دقیقه سانتریفوژ شدند (Malisorn et al., 2025). با پخش رسوب به دست آمده در آب مقطر سترون، سوسپانسیون حاوی 10^8 سلول مخمر در هر میلی لیتر تهیه شد.

تهیه بیمارگر

بیمارگرهای مورد استفاده برای این پژوهش، از میوه های آلوده در طبیعت انتخاب شدند. به منظور انتخاب جدایه های پُرآزار قارچ های بیمارگر، از چند منطقه نمونه های میوه مرکبات انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شد. با کمک لوپ سترون، توده ای از اسپورهای بیمارگر از روی میوه ها برداشته و در چند میلی لیتر آب مقطر سترون همراه با توپین 20 (با غلظت 0.01 میلی لیتر در لیتر) مخلوط و سپس با کمک لوپ سترون به صورت خطی روی محیط کشت WA کشت و یک هفته در دمای 25 درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از خالص سازی، مجدداً در محیط غذایی عصاره مالت اکسترکت آگار (MEA) برای بررسی های ریخت شناختی

PCR در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA نمونه، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از دو آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و ۱/۵ واحد Taq پلی راز می باشد. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه مجزا (شامل واسرشته سازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ °C و تکثیر DNA در دمای ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه) بوده و یک مرحله بسط تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه نیز انجام شد (Esteve-Zarzoso et al., 1999). نمونه ها برای تخلیص محصول PCR و تکثیر ژن های مورد بررسی، از هر دو سمت (Forward, Reverse) و نیز تعیین ترادف به شرکت توپازژن ارسال شد. برای هم ردیف سازی چندگانه (multiple sequence alignment) توالی های به دست آمده از جدایه های مورد بررسی، از نرم افزار BioEdit 7.0.9.0 استفاده شد. جهت مقایسه میزان تشابه و فاصله ژنتیکی بین توالی های مورد نظر و توالی های منتخب از پایگاه GenBank، از نرم افزار MegaX بهره گرفته شد (Felsenstein, 1989). تحلیل روابط فیلوژنتیکی جدایه های مخمری بر اساس توالی ناحیه ITS انجام گرفت. دندروگرام با استفاده از الگوی Neighbour-Joining و بر پایه ماتریس فاصله محاسبه شده به روش Jukes-Cantor ترسیم شد. جهت ارزیابی پایداری گره ها، آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. درخت حاصل با استفاده از *Byssoschlamys spectabilis* به عنوان outgroup ریشه دار گردید (Kumar et al., 2018).

نتایج

خصوصیات بیمار گرها

در اثبات بیماری زایی جدایه های بیمارگر، ۳-۴ روز بعد از آلوده سازی و نگهداری در دمای اتاق، حاشیه منطقه آلوده سازی به صورت آب سوخته و لزوج و با رنگی شفاف تر ظاهر شد، به تدریج میسلیم سفید رنگ ابتدا در مرکز و بعد از رشد بیشتر، عمدتاً در حاشیه منطقه آلوده قابل مشاهده

بیمارگر، قطره ای حاوی ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی بیمارگر با غلظت 10^4 cfu/ml بر روی سطوح خراشیده میوه قرار داده شد. برای تیمار شاهد، از آب مقطر سترون، استفاده شد. به منظور حفظ رطوبت برای بیماری زایی، سبدهای میوه های تیمار شده، درون پوشش پلاستیکی قرار داده شده و تا زمان بروز علائم و ثبت تعداد میوه های آلوده، در دمای حدود ۲۰ درجه سلسیوس، نگهداری شدند (Li & Liu, 2024). آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای هر تیمار، سه تکرار و در هر تکرار از ۱۵ میوه استفاده شد. از آب سترون به عنوان تیمار شاهد و از آفتکش شیمیایی زداتان ۲۰ (Xedathan 20) به عنوان تیمار مقایسه ای در نظر گرفته شد. میوه ها به مدت دو هفته تا ظهور کامل علائم و ثبت تعداد میوه های آلوده، نگهداری شدند. داده ها با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند. برای ارزیابی کارایی مخمرها نیز از فرمول ابوت (Abbott) به صورت زیر استفاده گردید (Piepho et al., 2024):

$$E = \frac{C-T}{C} \times 100\%$$

E: درصد کارایی مخمر در مهار بیمارگر، C: تیمار شاهد

بیمارگر، T: تیمار حاصل از برهمکنش مخمر و بیمارگر

E: Percentage Efficacy of Yeast in Pathogen Inhibition, C: Pathogen-Inoculated Control, T: Yeast-Pathogen Interaction Treatment

شناسایی مخمرها با استفاده از تعیین ترادف ژنتیکی

برای شناسایی جدایه های برتر از روش تعیین ترادف ناحیه ژنی ITS شامل قسمتی از SSU و LSU و کل ناحیه ITS1، ITS2 و ITS3 امکان پذیر است. لذا برای تکثیر این ناحیه از آغازگرهای

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' استفاده شد

(White et al., 1990). برای استخراج DNA از سلول های کشت شده به مدت ۴۸ ساعت روی محیط کشت مالت آگار و با استفاده از کیت Wizard Genomic DNA Purification Kit (محصول شرکت Promega، شهر Madison، کشور آمریکا) انجام شد. اجزای مخلوط واکنش

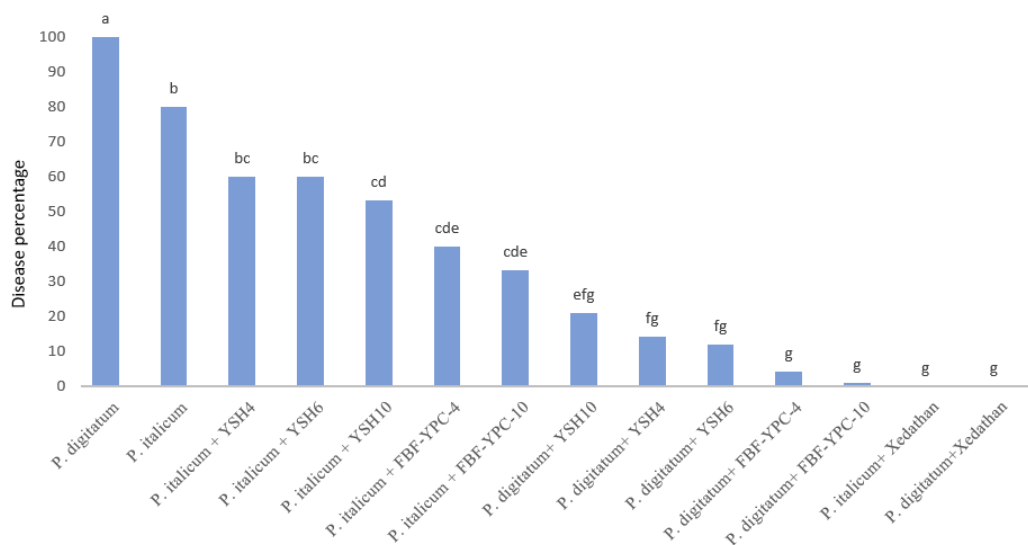
(شکل ۱). برای بررسی کارآیی هر مخمر نیز از فرمول ابوت (Abbott's formula) استفاده شده است (جدول ۱) (Piepho et al., 2024).

بر اساس مقایسه میانگین انجام شده می توان گفت اثر نوع مخمر و یا نوع بیمارگر معنی دار بوده و اثر متقابل مخمر × بیمارگر نیز معنی دار نمی باشد. توان آلودگی در بین دو نوع بیمارگر مورد بررسی در تیمارهای شاهد متفاوت بوده و کپک سبز، بیشتر خسارت را می باشد. تأثیر کارآیی مخمرها بستگی به نوع بیمارگر دارد و بر اساس شکل ۱، در مجموع مخمرها در مهار کپک سبز موفق تر از مهار کپک آبی ظاهر شدند. البته ممکن است مخمری بر روی کپک سبز مؤثر باشد اما در مهار کپک آبی، به آن اندازه مؤثر نباشد. مخمرهایی نیز وجود داشتند که در مهار هر دو بیمارگر موفق تر از سایرین ظاهر شدند. دو مخمر FBF-YPC-4 و FBF-YPC-10 مؤثرتر از سایر مخمرها بوده و علیه هر دو بیمارگر کاهش قابل توجه درصد آلودگی را نشان دادند. به طوری که از نظر کارایی در مهار بیماری کپک سبز، همراه با آفتکش شیمیایی Xedathan 20، در یک گروه آماری قرار گرفتند.

بود. بعد از چند روز، اسپورزایی از مرکز پرگنه شروع شده و میسلیم سفید رنگی آن را احاطه. این حاشیه سفید در کپک سبز دارای ضخامت بیشتر و کاملاً قابل مشاهده بود اما در کپک آبی، بسیار نازک و به مراتب ضخامت کمتری داشت.

ارزیابی توان مهارکنندگی عوامل بیماری کپک سبز و آبی توسط مخمرهای منتخب بر روی میوه پرتقال

دو هفته پس از تلقیح میوه ها با مخمر و آلوده سازی با بیمارگرها (عوامل کپک سبز و آبی میوه مرکبات) و نگهداری آن ها در شرایط انباری، درصد آلودگی تیمارها، ثبت شدند. میانگین داده های اولیه، به صورت آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با کمک نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که بین تیمارهای اعمال شده اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ وجود دارد. با توجه به معنی دار شدن داده های حاصل از نوع مخمر و یا نوع بیمارگر در سطح احتمال ۱٪، می توان گفت مخمرهای مختلف توان متفاوتی در مهار بیمارگرهای مورد بررسی دارا می باشند و نوع مخمر نقش معنی داری در کاهش آلودگی داشته است. برای گروه بندی و یافتن مخمرهای برتر، با استفاده از روش دانکن، مقایسه میانگین آنها انجام شد



شکل ۱- مقایسه میانگین و گروه بندی درصد بروز بیماری کپک سبز (*Penicillium digitatum*) و آبی (*P. italicum*) میوه مرکبات حاصل تعامل بیمارگر با مخمرهای مورد بررسی

Fig 1. Comparison of means and grouping of the incidence percentage of green (*Penicillium digitatum*) and blue mold (*P. italicum*) disease in citrus fruit resulting from the interaction of the pathogen and the examined yeasts.

جدول ۱- مقایسه درصد کارآیی جدایه‌های مخمر مورد بررسی در مهار بیمارگرهای کپک سبز (*P. digitatum*) و آبی (*P. italicum*) میوه مرکبات در مقایسه با آفتکش شیمیایی Xedathan 20

Table 1. Comparison of the efficacy percentage of examined yeast isolates in inhibiting green mold (*P. digitatum*) and blue mold (*P. italicum*) pathogens of citrus fruit, compared to the chemical fungicide Xedathan 20

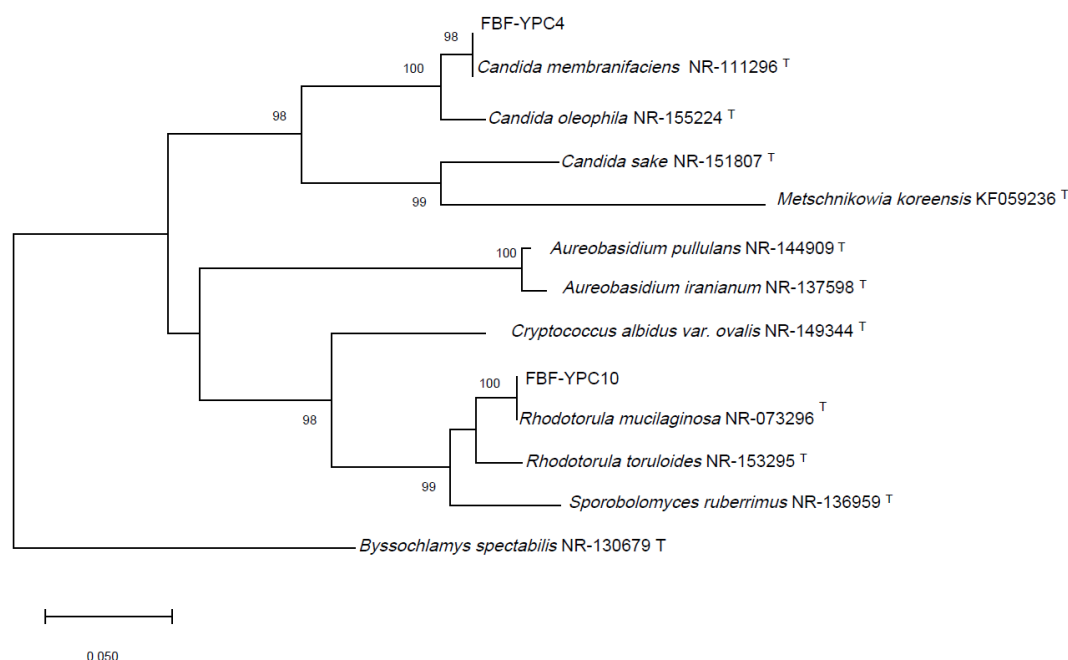
Treatment	<i>P. digitatum</i>	<i>P. italicum</i>
Xedathan 20	100	100
FBF-YPC-4	98	50
FBF-YPC-10	99	58
YSH6	88	25
YSH4	86	25
YSH10	79	33

آمده از تعیین ترادف و مقایسه آن با جدایه‌های استاندارد بر پایه ۱۰۰٪ درصد تشابه نوکلئوتیدی، جدایه FBF-YPC-4 به عنوان مخمر *Candida membranifaciens* و جدایه FBF-YPC-10 به عنوان مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* شدند (شکل ۲ و جدول ۲).

آفتکش شیمیایی نیز مانع از هر گونه رشدی توسط دو نوع بیمارگر شد و مهار کاملی را انجام داد.

شناسایی مخمرهای برتر و بررسی عملکرد آن‌ها

بر اساس آزمون مهارزیستی بر روی میوه، دو مخمر FBF-YPC-4 و FBF-YPC-10 در مقایسه با سایرین بیشترین توانایی را در مهار بیمارگر داشتند. بر اساس نتایج به دست



شکل ۲- جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های مخمر برتر در آزمون مهار بیمارگرهای کپک سبز و آبی میوه مرکبات بر اساس تعیین ترادف ناحیه ITS. از روش اتصال همسایگی (NJ) برای ترسیم درختی با اعتبارسنجی ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. *Byssoschlamys spectabilis* به عنوان گروه بیرونی به کار برده شده و خط نشانه منعکس کننده تغییر ۰/۰۵ نوکلئوتید در هر جایگاه است.

Fig 2. Phylogenetic position of the superior yeast isolates in the inhibition assay of citrus fruit green and blue mold pathogens, based on sequencing the ITS region. The neighbor-joining (NJ) method was used to construct the tree with 1000 bootstrap replicates. *Byssoschlamys spectabilis* was used as the outgroup, and the scale bar reflects a 0.05 nucleotide change per site.

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های برتر مخمر در مهار بیمارگرهای کپک سبز و آبی میوه مرکبات و ارایه درصد شباهت با نزدیکترین جدایه‌های استاندارد در بانک اطلاعاتی NCBI

Table 2. Characterization of the superior yeast isolates in inhibiting citrus fruit green and blue mold pathogens, and presentation of the percentage similarity with the closest standard isolates in the NCBI database

Yeast isolats	GenBank	Closest type strain	Similarity
FBF-YPC-4	PX237386.1	<i>Candida membranifaciens</i> NR-111296 ^T	100 %
FBF-YPC-10	PX237385.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NR073296 ^T	100 %

بحث

در این بررسی، در تیمارهای شاهد درصد بیماری‌زایی بیمارگر کپک سبز بیشتر از کپک آبی بود. عملاً در طبیعت نیز کپک سبز عامل اصلی پوسیدگی مرکبات پس از برداشت بوده و در برخی مناطق تا ۹۰ درصد خسارت را موجب می‌شود که نشان‌دهنده بیماری‌زایی شدیدتر آن نسبت به کپک آبی است (Cheng et al., 2020). در کپک سبز، سرعت رشد میسلیمی بالاتر، تولید اسپور بیشتر و با سرکوب سیستم دفاعی میزبان، آلودگی را سریع‌تر گسترش می‌دهد و محیط را اسیدی می‌کند تا آنزیم‌های تجزیه‌کننده بافت میوه بهتر عمل کنند. در مقابل، کپک آبی رشد و شدت بیماری‌زایی کمتری دارد (Macarasin et al., 2007)، هر دو برای نفوذ در میوه و شروع آلودگی نیاز به زخم دارند، کپک سبز در دمای اتاق سریع‌تر رشد می‌کند، در حالی که کپک آبی در دمای پایین‌تر فعال‌تر و شرایط با رطوبت بیشتر را ترجیح می‌دهد (Bhatta, 2022). بر اساس نتایج به دست آمده در این بررسی، مخمرهای مورد استفاده به خصوص دو گونه مخمری *R. mucilaginosa* و *C. membranifaciens* توانستند رشد و درصد آلودگی *P. digitatum* (کپک سبز) را به طور معنی‌داری کاهش دهند، در حالی که اثر آن‌ها بر *P. italicum* (کپک آبی) ضعیف‌تر بود. این محدودیت احتمالاً به ویژگی‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی خاص *P. italicum* مربوط می‌شود. بررسی‌های پیشین نیز نشان می‌دهد که مخمرها می‌توانند کپک سبز میوه مرکبات را به طور مؤثرتری نسبت به کپک آبی کنترل کنند. به عنوان مثال، نتایج یک مطالعه با ایزوله‌های مخمر و باکتری در مهار عوامل کپک سبز و آبی

میوه مرکبات در تشک کشت و نیز بر روی میوه، نشان داد که مخمرها به‌طور واضح‌تر کپک سبز را در مقایسه با کپک آبی بهتر مهار کردند (۳۲ درصد در مقایسه با ۲۰ درصد) و در آزمایش بر روی میوه، باز هم کارآیی در مهار کپک سبز بیشتر بود (۹۵٪ کاهش در برابر ۹۲٪) (Hammami et al., 2022). همچنین، مطالعه‌ای دیگر نشان داد مخمرهای بومی با فعالیت ضدقارچی خود، به طور مؤثری از کپک سبز در لیموها محافظت می‌کنند و کارایی بیشتری نسبت به کپک آبی دارند (Perez et al., 2016). در ارزیابی توان مهارزیستی مخمر *Saccharomycopsis schoenii* بر روی چند عوامل بیمارگر نیز نتایج نشان داد، موفقیت در مهار جدایه‌های کپک سبز در مقایسه با کپک آبی میوه مرکبات و سیب، به مراتب بهتر بود (Pimenta et al., 2008). در مطالعه‌ای دیگر، مخمر *Debaryomyces hansenii* به طور مؤثرتری کپک سبز را نسبت به کپک آبی مهار کرد، و این نشان داد برخی از گونه‌های مخمر ممکن است تأثیر بیشتری بر روی یک بیمارگر نسبت به دیگری داشته باشند (Moraes Bazioli et al., 2019). از جنبه دیگر در یک مرور جامع نشان داده شد که مخمرهای *Candida oleophila* و *Debaryomyces hansenii* در برابر هر دو بیمارگر کپک سبز و آبی مؤثر بودند، اما اثربخشی آن‌ها بسته به شرایط خاص محیطی و نوع میوه‌ای که تیمار شد، متفاوت بود (Hammami et al., 2022). مطالعات نشان داده‌اند که برخی از مخمرهای دیگر نظیر *Pichia galeiformis* و *A. pullulans*، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر کپک‌های بیماری‌زای گیاهی دارند اما با درجات متفاوتی از اثربخشی. به عنوان مثال، *Aureobasidium pullulans*

از جمله رقابت برای منابع غذایی، القاء مقاومت، تولید ترکیبات ضدقارچی (Bhatta, 2022). به عنوان مثال *Candida membranifaciens* که یکی از مخمرهای برتر این بررسی معرفی شده است، قادر است با القاء سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های مرکبات، سبب افزایش مقاومت در برابر بیمارگرهای پس از برداشت نظیر کپک‌های سبز و آبی میوه شود (Luo et al., 2013). مصرف مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* به همراه سالیسیلیک اسید سبب افزایش پلی فنل اکسیداز در میوه مرکبات شده که در نتیجه آن میزان جوانه‌زنی اسپور کاهش یافته و درصد بیماری کپک سبز به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (Ahima et al., 2019). آزمایش‌های میدانی نشان دادند که استفاده از این مخمرها تأثیری منفی بر کیفیت یا عمر مفید میوه‌های مرکبات ندارد و به عنوان یک جایگزین پایدار برای قارچ‌کش‌های شیمیایی مطرح شده‌اند (Elash et al., 2023). ترکیب این عوامل مهارزیستی با سایر استراتژی‌های مدیریتی، مانند عصاره‌های گیاهی یا درمان‌های حرارتی، نشان‌دهنده پتانسیل بالای آنها در کنترل کپک‌های مرکبات است (Obagwu & Korsten, 2003). به طور کلی، در حالی که عوامل کنترل بیولوژیک مبتنی بر مخمر نشان‌دهنده پتانسیل آنها برای مدیریت هر دو نوع کپک سبز و آبی هست، موفقیت این عوامل می‌تواند به شدت به گونه‌های مخمر مورد استفاده، شرایط محیطی و نوع میوه مرکباتی که درمان می‌شود، بستگی داشته باشد. در بسیاری از موارد، مخمرها تأثیر بیشتری بر کپک سبز نسبت به کپک آبی نشان داده‌اند، اما این موضوع در تمام مطالعات و سویه‌های مخمر عمومیت ندارد. در نتیجه، در حالی که عوامل کنترل بیولوژیک مبتنی بر مخمر برای مدیریت این دو بیمارگر امیدبخش هستند، موفقیت این عوامل می‌تواند به طور با توجه به گونه‌های خاص مخمر و شرایطی که در آنها به کار می‌روند، متفاوت باشد. تحقیقات بیشتری برای بهینه‌سازی این استراتژی‌های مهارزیستی و تهیه فرمولاسیون مناسب از این عوامل مهار زیستی برای کاربردهای عملی در تولید مرکبات مورد نیاز است. با توجه به اثبات کارایی این دو گونه در ایران، استفاده ترکیبی از آنها با سایر عوامل

نرخ‌های بالاتری از مهار را در برابر *P. expansum* (کپک آبی) نسبت به *P. digitatum* (کپک سبز) نشان داد و تا ۸۳.۴٪ مهار برای کپک آبی و ۷۴.۷٪ برای کپک سبز را سبب شدند (Agirman & Erten, 2020). در ایران نیز در سال‌های اخیر تحقیقاتی در خصوص مخمرها انجام شده است. مخمرهای برتر این پژوهش، *Candida membranifaciens* (Lodder & Kreger) Wick. & K.A. *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. و Burton Harrison, پیشتر از درختان میوه نظیر کیوی، توت، سیب، مرکبات و نیز از خاک ایران گزارش شده‌اند (Mokhtari et al., 2011; Zhao et al., 2012; Mokhtarnejad et al., 2015) و در دو دهه اخیر بارها به عنوان عوامل مؤثر در کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت معرفی شده‌اند، نظیر تأثیر مخمر *R. mucilaginosa* در مهار کپک آبی سیب (*Penicillium expansum*) (Farahani et al., 2011; Gholamnejad et al., 2010) و نیز بر روی کپک خاکستری سیب (*Botrytis cinerea*) (Alavifard et al., 2012) گزارش شده است. دو مخمر *Candida* sp.، *Rhodotorula* sp. به همراه مخمر *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, Medd در کنترل کپک آبی سیب نیز مؤثر گزارش شده است (Gholamnejad et al., 2010) و گزارش‌هایی در خصوص امکان القاء مقاومت به بیماری کپک آبی و خاکستری در میوه سیب توسط این مخمرها ارائه شده است (Alavifard et al., 2012).

نتایج سایر بررسی‌ها در کشورهای دیگر نیز نشان می‌دهد مخمر *R. mucilaginosa* می‌تواند به طور مؤثری با بیمارگر *P. expansum*، که باعث کپک آبی در سیب‌ها می‌شود، مقابله کند. این مخمر در ترکیب با اسید فیتیک، کاهش قابل توجهی در آلودگی کپک آبی ایجاد کرده است (Yang et al., 2015). در یک مطالعه دیگر، مخمرهای *C. membranifaciens* و *R. mucilaginosa* به عنوان عوامل مهارزیستی در مقابل عوامل کپک‌های سبز و آبی مرکبات، مؤثر معرفی شدند (Ghosh et al., 2013). اثرات ضدقارچی این مخمرها به چندین مکانیسم مختلف نسبت داده می‌شود،

زیستی یا تیمارهای فیزیکی (مانند تیمار حرارتی) می تواند قارچ کش های شیمیایی کمک کند.
در آینده به توسعه راهکارهای پایدار و جایگزین

References

- Agirman, B. & Erten, H. 2020. Biocontrol ability and action mechanisms of *Aureobasidium pullulans* GE17 and *Meyerozyma guilliermondii* KL3 against *Penicillium digitatum* DSM2750 and *Penicillium expansum* DSM62841 causing postharvest diseases. *Yeast*, 37(9–10): 437–448. doi:<https://doi.org/10.1002/yea.3501>
- Agriculture statistics. 2023. Report on horticultural, mushroom, and greenhouse products. Ministry of Jihad–e–Agriculture, Statistics Deputy, Center for Statistics, Information Technology and Communication. 400 P. Tehran.
- Ahima, J., Zhang, X., Yang, Q., Zhao, L., Tibiru, A. M. & Zhang, H. 2019. Biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* combined with salicylic acid against *Penicillium digitatum* infection in oranges. *Biological Control*, 135: 23–32. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.04.019>
- Alavifard, F., Etebarian, H., Sahebani, N. & Aminian, H. 2012. Induction of resistance in apple fruit inoculated with antagonistic *Candida membranifaciens* isolates and *Botrytis mali*. *Journal of Crop Protection*, 1(3): 249–259.
- Bhatta, U. K. 2022. Alternative management approaches of citrus diseases caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Front Plant Sci*, 12: 833328.
- Chen, J., Shen, Y., Chen, C. & Wan, C. 2019. Inhibition of key citrus postharvest fungal strains by plant extracts in vitro and In vivo: A review. *Plants (Basel)*, 8(2). doi:10.3390/plants8020026
- Cheng, Y., Lin, Y., Cao, H. & Li, Z. 2020. Citrus postharvest green mold: recent advances in fungal pathogenicity and fruit resistance. *Microorganisms*, 8(3): 449. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/3/449>
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. & Porat, R. 2002. Induction of resistance to *penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *candida oleophila*. *Phytopathology*. doi:10.1094/phyto.2002.92.4.393
- Dukare, A., Paul, S., Nambi, V., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K. & Vishwakarma, R. 2019. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. doi:10.1080/10408398.2017.1417235
- El-Neshawy, S.M. & El-Sheikh, M.M. 1998. Control of green mold on oranges by *Candida oleophila* and calcium treatments. *Annals of Agricultural Sciences Cairo*, 3: 881–890.
- Elash, W.E.M., Aborehab, M.E.A., El-Sehrawy, O. A. M. & Shahin, S. I. 2023. Control of green and blue molds of citrus fruits using some biocontrol agents under egyptian conditions. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 51(1): 93–102. doi:10.21608/ejp.2023.199708.1089
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1): 329–337.
- Ezzougari, R., Bahhou, J., Taoussi, M., Kallali, N.S., Aberkani, K., Barka, E.A. & Lahlali, R. 2024. Yeast warriors: exploring the potential of yeasts for sustainable citrus post-harvest disease management. *Agronomy*. doi:10.3390/agronomy14020288
- Farahani, L., Etebarian, H.R., Sahebani, N. & Aminian, H. 2011. Biocontrol of blue mold of apple by *Candida membranifaciens* in combination with silicon. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 45(3): 310–317. doi:10.1080/03235408.2011.559055
- Fard, F., Etebarian, H. & Sahebani, N. 2012. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 48(1): 17–26.
- Felsenstein, J. 1989. Mathematics vs. evolution: mathematical evolutionary theory. marcus w. feldman. ed. princeton Science, 246(4932): 941–942.
- Ferraz, L., da Cunha, T., da Silva, A.C. & Kupper, K. 2016. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiol Res*, 188: 72–79.
- Gholamnejad, J., Etebarian, H. & Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science*, 4(1): 1–7.
- Ghosh, S., Santra, T. & Chakravarty, A. 2013. Study of antagonistic yeasts isolated from some natural sources of West Bengal. *Agriculture and Biology Journal of North America* 4: 33–40.
- 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(8): 818. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/8/818>

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*, 35(6): 1547–1549.
- Lahlali, R., Serrhini, M. & Jijakli, M. 2004. Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in Morocco. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 69(4): 601–609.
- Li, J.Y. & Liu, C.H. 2024. Exploring the Potential of *Candida* sp. SW4–6 as a Probiotic for Enhancing Water Quality in Aquaculture. *Microorganisms*, 13(1). doi:10.3390/microorganisms13010042.
- Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B. & Zheng, X. 2010. Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. *Letters in applied microbiology*, 51: 30–35. doi:10.1111/j.1472–765X.2010.02851.x
- Long, C., Deng, B. & Deng, X. 2007. Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34–9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. *Annals of microbiology*, 57(2): 203–207.
- Luo, Y., Zhou, Y. & Zeng, K. 2013. Effect of *Pichia membranaefaciens* on ROS metabolism and postharvest disease control in citrus fruit. *Crop Protection*, 53: 96–102. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.06.015>
- Macarasin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M. & Droby, S. 2007. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Phytopathology*, 97(11): 1491–1500. doi:10.1094/phyto-97-11-1491
- Malisorn, A., Cheirsilp, B., Billateh, A., Louhasakul, Y. & Upaichit, A. 2025. Bioconversion of agro-industrial carbon wastes into biodiesel feedstocks with superior fuel properties by promising oleaginous yeasts and cultivation strategies. *Carbon Resources Conversion*: 100354. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crcon.2025.100354>
- McLaughlin, R.J., Wilson, C. L., Chalutz, E., Kurtzman, C.P., Fett, W.F. & Osman, S.F. 1990. Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11): 3583–3586. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC185026/>
- Mokhtari, M., Etebarian, H., Mirhendi, S. & Razavi, M. 2011. Identification and phylogeny of some species of the genera *Sporidiobolus* and *Rhodotorula* using analysis of the 5.8 s rDNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Archives of Biological Sciences*, 63(1): 79–88.
- Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A. & Turchetti, B. 2015. Molecular identification of basidiomycetous yeasts from soils in Iran. *Rostaniha*, 16(1): 61–80.
- Moraes Bazioli, J., Belinato, J. R., Costa, J. H., Akiyama, D. Y., Pontes, J. G. d. M., Kupper, K. C., Augusto, F., de Carvalho, J. E. & Fill, T. P. 2019. Biological control of citrus postharvest phytopathogens. *Toxins*, 11(8): 460. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/8/460>
- Obagwu, J. & Korsten, L. 2003. Control of citrus green and blue molds with garlic extracts. *European Journal of Plant Pathology*, 109(3): 221–225.
- Perez, M. F., Contreras, L., Garnica, N. M., Fernández-Zenoff, M. V., Farías, M. E., Sepulveda, M., Ramallo, J. & Dib, J. R. 2016. Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PLoS One*, 11(10): e0165590. doi:10.1371/journal.pone.0165590
- Piepho, H.-P., Malik, W. A., Bischoff, R., El-Hasan, A., Scheer, C., Sedlmeier, J. E., Gerhards, R., Petschenka, G. & Voegelé, R. T. 2024. Efficacy assessment in crop protection: a tutorial on the use of Abbott's formula. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(6): 2139–2160.
- Pimenta, R.S., Silva, F.L., Silva, J.F., Morais, P.B., Braga, D.T., Rosa, C.A. & Corrêa Jr, A. 2008. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 85–90.
- Sharma, R., Dinesh, S. & Rajbir, S. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50(3): 205–221. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.001
- Singh, N., Singh, R., Bhunia, A. & Stroshine, R. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* o157: h7 on lettuce and baby carrots. *LWT–Food Science and Technology*, 35(8): 720–729. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643802909333>
- Spadaro, D., Ciavarella, A., Dianpeng, Z., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. 2010. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Can J Microbiol*, 56(2): 128–137. doi:10.1139/w09-117
- Visagie, C.M., Roets, F. & Jacobs, K. 2009. A new species of *Penicillium*, *P. ramulosum* sp. nov., from the natural environment. *Mycologia*, 101(6): 888–895.
- Wang, Z., Sui, Y., Li, J., Tian, X. & Wang, Q. 2022. Biological control of postharvest fungal decays in citrus: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. doi:10.1080/10408398.2020.1829542
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315–322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications* 1st ed. San Diego: Academic Press.

- Wodzinski, R., Umholtz, T., Rundle, J. & Beer, S.V. 1994. Mechanisms of inhibition of *Erwinia amylovora* by *Erwinia herbicola* in vitro and in vivo. Journal of applied microbiology, 76(1): 22–29.
- Yang, Q., Zhang, H., Zhang, X., Zheng, X. & Qian, J. 2015. Phytic acid enhances biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apples. Front Microbiol, 6: 1296.
- Zhao, L., Zhang, H., Li, J., Cui, J. J., Zhang, X. & Ren, X. 2012. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* to postharvest diseases of strawberries by addition of trehalose to the growth medium. International Journal of Molecular Sciences, 13(3): 3916–3932.

Introduction of *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa* Yeasts as Effective Biocontrol Agents against Citrus Fruit Green and Blue Mold Diseases

Farid Beiki Firouzjahi

Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Corresponding author: Farid Beiki, email: f.beiki@gmail.com

Received: Sat., 04, 2025

12(2) 1–12

Accepted: Dec., 07, 2025

Abstract

Postharvest decay in citrus fruits is considered one of the major challenges in the production and storage chain of these products, primarily caused by the activity of fungal pathogens. Among these, green mold (*Penicillium digitatum*) and blue mold (*P. italicum*) are regarded as the most important agents of damage. Management of these diseases is usually carried out by using chemical fungicides; however, concerns regarding their environmental impact and the emergence of resistant strains have increasingly highlighted the need to develop and apply alternative methods. In recent years, the use of biocontrol agents, especially antagonistic yeasts, has attracted considerable attention from researchers as a sustainable and environmentally friendly approach to controlling postharvest diseases in citrus fruits. This study was conducted to evaluate the biocontrol potential of yeasts isolated from citrus fruits surfaces against the causal agents of green and blue mold diseases in citrus. To this purpose, fruit samples were collected from various orchards in Mazandaran province, and various indigenous yeasts were isolated from them. Based on phenotypic characteristics, representatives from each yeast group were selected, and their ability to inhibit the growth and development of infections caused by the aforementioned fungi was examined on Thomson Navel oranges. First, superficial scratches similar to natural damage were made on the surface of the fruits, after which they were placed in a suspension of yeast (at a concentration of 10^8 cells per milliliter of water). Subsequently, the fruits were inoculated with a suspension of pathogenic fungal spores (at a concentration of 10^5 spores per milliliter). After two weeks of storage under warehouse conditions, the incidence of disease was recorded and the data were subjected to statistical analysis based on a factorial experimental design in a completely randomized layout. The results show that both the type of yeast and the type of pathogen have a significant effect on the biocontrol efficiency. Molecular identification of the superior isolates was carried out using sequencing of the ITS gene region with specific ITS1 and ITS4 primers, and based on this, the two yeasts were identified as *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*, respectively. Biocontrol performance assessment according to Abbott's formula also shows that these two yeasts were highly effective in reducing decay, especially decay caused by green mold, with their efficacy in controlling green mold estimated at 98% and 99%, respectively. In contrast, for controlling blue mold, the efficacy was lower, reported at 50% and 58%, respectively. Overall, the results of this study indicate that the use of indigenous antagonistic yeasts can serve as an effective and eco-friendly alternative to chemical fungicides in the management of postharvest decay in citrus fruits and offers a suitable strategy for the development of integrated postharvest disease management systems.

Keywords: Postharvest decay, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, Biocontrol