The University of Tehran Press

Biological Control of Pests and Plant Diseases

Online ISNN: 2322-2883

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

Biological control of *Alternaria solani* by tomato epiphyte yeasts and investigation of some their biocontrol mechanisms

Turaj Nader[1], Mohammad Ali Tajick Ghanbary [2], lachin Mokhtarnejad[3]✉, Siamak Hanifeh[4]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: turajnader@gmail.com
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: m.tajick@sanru.ac.ir
3. Corresponding Author, Plant Protection Research Department,West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran. E-mail: L.mokhtarnejad@gmail.com
4. Forest and rangelands Department,West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran. E-mail: syamak441@yahoo.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 14 June 2024

Revised: 18 July 2024

Accepted: 24 July 2024

Published online: Spring 2023

Keywords:

antifungal activities,

early blight,

Postharvest diseases,

Aureobasidium pullulans.

ABSTRACT

Early blight disease (is caused by *Alternaria solani* Sor) is a limiting factor in tomato production and various studies showed that yeasts are potential for biocontrol of these diseases. The present study aims is to demonstrate the antagonistic effect of the tomato epiphytic yeasts on the mycelial development of *A. solani* and study their mode of action. *In vitro*, seventeen epiphytic yeast strains of tomato were evaluated against *A. solani*. Results showed that 15 isolate are able to control of *A. solani.* In the postharvest experiments, the abilities of yeast strains to reduce the severity of *A. solani* on tomato fruit rot were conducted. *In vitro* two isolates of *Aureobasidium pullulans* (N3 and N4) reduced the fruit rot over than 85%. Results of the study on biocontrol mechanisms showed that all tested isolates except isolates N14 and N15 were able to significantly inhibit the growth of *A. solani* through the formation of volatile compounds (VOCs). Study on the ability of isolates to produce enzymes, sidrophore and formation of biofilm showed that five isolates were able to produce pectinase, four isolates were able to produce amylase, five isolates produced protease, five isolates were able to produce siderophore and seven isolates were able to form biofilm. In conclusion, our results confirm the potential of *A. pullulans* (N3, N4) as biocontrol agents against *A. solani* and suggested it as a suitable option for controlling postharvest diseases of tomatoes.

Cite this article: Nader, T., Tajich Ghanbary, M. A., Mokhtarnejad, I. & Hanifeh, S. (2024). Biological control of *Alternaria solani* by tomato epiphyte yeasts and investigation of some their biocontrol mechanisms. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 12 (1), 95-110. DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.376680.344

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.376680.344

Extended Abstract

(*Solanum lycopersicum* L.) is the world's second most important vegetable crop, with a total production of 182 million tons in 2018. The main postharvest fungal diseases of tomato fruit caused by various pathogenic fungi include *Alternaria alternate*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. *A. solani* is a saprophytic pathogen of tomato causing postharvest black rot at high frequency. Different strategies as fungicides, resistant hybrids, and cultural practice are generally used as commercial strategies to prevent postharvest diseases. However, the use of fungicides intensively may help pathogen to be resistant as well as fungicides released to the environment. However, it may represent environmental and health hazards. Therefore, its application is becoming more limited to the consumer's anxieties and the human health importance In organic farming, in which chemical pesticides are prohibited, other additional control methods, such as biological methods, need to be investigated. Microbial biocontrol agents (BCA) are sustainable tools in crop protection against damage caused by plant pathogens. In integrated pest

management, the use of effective biocontrol agents is considered first before chemical pesticides are applied. In recent years, some antagonists have been successfully applied in the biocontrol of postharvest diseases of tomato fruit. *Aureobasidium pullulans*, a cosmopolitan yeast-like fungus, is found to be an effective biological agent for controlling postharvest rots of cherry tomatoes. The assays indicated production of volatile organic compounds (VOCs), competition for nutrients, biofilm formation, production of sidrophore and Enzymes as mechanisms of action of yeast isolates. Collectively, our results showed the potential of yeast isolates that were isolated from tomato phyllosphere s of tomato to control the mycelial development of *A. solani* and some mechanisms of action of these yeasts. The aim of this study was to investigate the efficacy of tomato epiphytic yeast strains in reducing the postharvest tomato fruit disease caused by A. solani and determine the mode of action of these strains.

Among 17 yeast strains tested against *A. solani* using in vitro dual culture assays. Based on the results, 15 yeast isolates showed inhibitory activity against *A. solani* at dual culture assays. The growth of *A. solani* mycelium was significantly inhibited by yeast strains compared to the control ($p = 0.05$). On the 14 day of the assay, the N4 and N3 strains inhibited the mycelium growth by 70.76% and 70.33, respectively. In the present investigation, post-harvest treatment of tomato fruits with the native antagonists isolated from tomato significantly reduced the severity of *Alternaria* fruit rot. The differences between isolates in isolates efficacies were statistically significant ($P < 0.05$). Among the antagonistic microorganisms tested, *A. pullulans* was the most effective for controlling Alternaria fruit rot of tomato fruits. Postharvest treatment of tomato fruits with isolates N4 and N3 reduced the fruit rot lesion size by 88.23% and 86.83%, respectively, compared to untreated control.

Production of diffusible and volatile substances was conducted on agar plates. Production of diffusible substances was evaluated using the dual culture method. For evaluation of volatile antifungal metabolites by yeast isolates, the two plates were placed “mouth to mouth”, wrapped to gather with parafilm. In both assays plates were incubated for 14 days at 24 °C. After incubation, colony diameter was used to calculate inhibition. All experiments were performed in triplicate. For postharvest assays, artificial wounds (5 mm deep and 4 mm wide) were performed using a sterile tool on superficially sanitized pears (3 wounds per fruit). Yeast suspension (20 µL, 1 × 108 cells/mL) of respective yeast was individually inoculated into the wounds. Inoculated fruits were placed on tray packs in boxes and incubated for 21 days at 4 °C and seven days at 24 °C.

In order to characterize the capability of the selected yeasts to produce and secrete fungal cell wall lytic enzymes (esterase, protease, amylase, and pectinase), qualitative tests were performed on solid media. Production of lytic exoenzymes by yeast strains was determined. Results showed that six different isolates could produce protease, amylase and pectinase. Amylase production was not observed in any of the strains. Also seven isolate were able to formation biofilm and five isolates were able to production of sidrophore.

In summary, our data show that the yeast strain *A. pullulans* (isolates N3, N4) has potent antifungal activity as demonstrated by in vitro inhibitory activity against *A. solani*. Further, postharvest treatment of tomato fruits with *A. pullulans* significantly reduced the *Alternaria* fruit rot. The present investigation was carried out under high inoculum conditions. Under normal postharvest conditions, treatment of tomatoes with *A. pullulans* would be expected to give better protection against fruit rot because of usually low inoculum levels. Furthermore, we demonstrated the production of VOCs, protease and Amylase enzyms, Sidrophore and biofilm formation by *A. pullulans*. The antagonistic activity of *A. pullulans* might be due to the synergistic effects of diffusible and volatile antimicrobial compounds.

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، دوره ۱۲، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۸۰۹۰-۲۴۲۳

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

کنترل زیستی *Alternaria solani* به وسیله مخمرهای اپیفیت گوجه‌فرنگی و بررسی برخی از مکانیسم‌های بیوکنترلی آن‌ها

تورج نادر[۱] | محمدعلی تاجیک قنبری[۲] | لاچین مختارنژاد[۳]✉ | سیامک حنیفه[۴]

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: turajnader@gmail.com

۲. گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: m.tajick@sanru.ac.ir

۳. نویسنده مسئول، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران. رایانامه: L.mokhtarnejad@gmail.com

۴. بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران. رایانامه: syamak441@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۳
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۲

کلیدواژه‌ها:
بیماری‌های پس از برداشت، بلایت زودرس، فعالیت ضد قارچی، Aureobasidium pullulans

چکیده

بیماری لکه موجی یا سوختگی زودرس (با عامل قارچی *Alternaria solani* Sor) یکی از عوامل محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی به شمار می‌آید و مطالعات مختلف نشان داده که مخمرها دارای توانایی بالقوه برای کنترل زیستی این بیماری می‌باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر آنتاگونیستی مخمرهای اپیفیت گوجه-فرنگی بر مهار رشد قارچ *A. solani* و همچنین بررسی برخی مکانیسم‌های بیوکنترلی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. بدین منظور توانایی بیوکنترلی ۱۷ جدایه مخمر اپیفیت میوه گوجه فرنگی علیه قارچ بیمارگر *A. solani* مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس نتایج، ۱۵ جدایه موفق به مهار رشد *A. solani* شدند. به منظور ارزیابی میزان مهار پوسیدگی ناشی از قارچ *A. solani* بر روی میوه گوجه‌فرنگی، بررسی-هایی در شرایط پس از برداشت انجام گردید. نتایج حاصل از کاربرد جدایه‌ها در آزمایشگاه نشان داد که دو جدایه از گونه *Aureobasidium pullulans* (N4 و N3) با مهار پوسیدگی بالای ۸۵ درصد، موثرترین جدایه‌ها بودند. همچنین نتایج مطالعه بر روی مکانیسم‌های بیوکنترلی نشان داد که تمام جدایه‌های بررسی شده به غیر از جدایه‌های N14 و N15 با تولید متابولیت‌های فرّار به طور معنی‌داری از رشد قارچ *A. solani* جلوگیری کردند. بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آنزیم‌ها، تولید سیدروفور و تشکیل بیوفیلم نشان داد که پنج جدایه قادر به تولید پکتیناز، چهار جدایه قادر به تولید آمیلاز و پنج جدایه قادر به تولید پروتئاز بودند. همچنین پنج جدایه قادر به تولید سیدروفور و هفت جدایه قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. به طور کلی بر اساس نتایج این پژوهش، گونه *A. pullulans* (N3 و N4) دارای پتانسیل بالایی در مهار قارچ *A. solani* بوده و گزینه مناسبی برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت گوجه‌فرنگی می‌باشد.

استناد: نادر، تورج؛ تاجیک قنبری، محمدعلی، مختارنژاد، لاچین و حنیفه، سیامک (۱۴۰۲). کنترل زیستی *Alternaria solani* به وسیله مخمرهای اپیفیت گوجه‌فرنگی و بررسی برخی از مکانیسم‌های بیوکنترلی آن‌ها. *نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی*، ۱۲ (۱)، ۱۱۰-۹۵. DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.376680.344

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.376680.344

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) نخستین محصول مهم از محصولات صیفی و سبزی در جهان می‌باشد که در سال ۲۰۲۲ تولید کل آن ۱۸۶ میلیون تن گزارش شده است (FAO, 2022). بیماری‌های پس از برداشت موجب از بین رفتن بخش عمده‌ای از این تولیدات می‌گردد که در کشورهای در حال توسعه این میزان تا ۵۰ درصد نیز گزارش شده است (FAO, 2021). به طور کلی میوه گوجه‌فرنگی در طول دوره رشد و پس از برداشت تحت تاثیر بیماری‌های قارچی و باکتریایی متعددی قرار می‌گیرد که موجب کاهش کمیت و کیفیت آن می‌گردند (Singh *et al*., 2017). قارچ *Alternaria* spp. از بیمارگرهای رایج گوجه‌فرنگی می‌باشد که می‌تواند در مزرعه، حین برداشت، جابجایی و پس از برداشت بر روی گوجه‌فرنگی ایجاد آلودگی کند (Barth *et al*. 2009). انواع مختلفی از قارچ کش‌های شیمیایی برای کنترل پوسیدگی پس از برداشت میوه‌ها و سبزیجات با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال، استفاده طولانی مدت از قارچ‌کش‌ها منجر به توسعه سویه‌های مقاوم از بیمارگرها می‌شود (Holmes and Eckert, 1999; Bakade *et al*., 2022) که در نتیجه آن، در سال‌های اخیر بسیاری از این سموم شیمیایی بی اثر گردیده‌اند (Rosslenbroich and Stuebler, 2000). علاوه‌بر این نگرانی‌های مصرف کنندگان از باقیمانده سموم در مواد غذایی، روش‌های کنترل بیماری را به سمت دیگری سوق می‌دهد (Wu *et al*., 2023). در حال حاضر چندین رویکرد بیولوژیکی امیدوارکننده که شامل استفاده از MCP[1] (Guillen *et al*., 2007)، کیتوزان (Liu *et al*., 2007)، اسانس‌های گیاهی (Feng and Zheng, 2007; Tzortzakis, 2007) و آنتاگونیست‌های میکروبی (Schena *et al*., 1999; Xi and Tian, 2005) می‌باشد، به عنوان روش‌های جایگزین سموم شیمیایی برای کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی یکی از مهم‌ترین روش‌های جایگزین سموم شیمیایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی هستند (Bonaterra *et al*., 2022) که علاوه بر اینکه سازگاری بالایی با محیط زیست دارند، تاثیر منفی بر روی سلامتی انسان نداشته و موجب ایجاد مقاومت در بیمارگرها نمی‌شوند (Jaiswa *et al*., 2022). در بین میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، مخمرها به دلیل پایداری زیاد، نیازهای غذایی ساده، ثبات ژنتیکی بالا، ایمن بودن و اثر بازدارندگی بالا در مقابل طیف وسیعی از قارچ‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند (Zhang *et al*., 2019). بر اساس مطالعات صورت گرفته، مخمرها به سرعت تکثیر شده و با کلونیزه کردن و اشغال فضا، به طور موثری رشد بیمارگر را مهار می‌کنند (Spadaro and Droby, 2016).

علاوه بر این، مخمرهای آنتاگونیست می‌توانند با افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی، مقاومت میوه‌ها در برابر بیماری را افزایش داده و موجب القا مقاومت گردند (Apaliya *et al*., 2017). بر اساس مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر مخمرها قادر به کنترل بیماری‌های پس از برداشت گوجه‌فرنگی می‌باشند. در سال ۲۰۲۰ مخمر *Rhodotorula minuta* به عنوان یک مخمر موثر در کنترل بلایت آلترناریایی گوجهفرنگی معرفی شد و بر اساس مطالعات صورت گرفته مکانیسم بیوکنترلی این مخمر می‌تواند بر اساس تولید متابولیت‌های فرار باشد (Setiawan *et al*., 2020). *Aureobasidium pullulans* یک قارچ شبه مخمر می‌باشد که برای کنترل زیستی بیماری‌های گوجه‌فرنگی به طور موفقیت‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است (Schena *et al*., 1999). مخمر *Crytococcus laurentii* به عنوان عامل کنترل زیستی پوسیدگی پس از برداشت ناشی از *Botrytis cinerea* و *Pythium aphanidermatum* شناخته شده که می‌تواند بروز بیماری‌های گوجه‌فرنگی گیلاسی را به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های مختلف بی‌کربنات سدیم کاهش دهد (Xi and Tian, 2005).

این مطالعه با هدف بررسی امکان استفاده از جدایه‌های مخمری جداسازی شده از فلور برگ و میوه گوجه‌فرنگی در کنترل بیماری بلایت آلترناریایی گوجه‌فرنگی در مرحله پس از برداشت صورت گرفته است.

1methylcyclopropene

روش‌شناسی پژوهش

تهیه جدایه‌های مخمر

۱۷جدایه مخمر جداسازی شده از فیلوسفر گوجه‌فرنگی (نادر، ۱۴۰۲) از کلکسیون مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان آذربایجان‌غربی تهیه گردید. اسامی جدایه‌ها و گونه‌ها در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

جدول۱. نام گونه‌ها و شماره جدایه‌های مورد استفاده در این بررسی

گونه‌ها	شماره جدایه‌ها
Aureobasidium pullulans	N1, N2, N3, N4, N9, N13
Cystobasidium slooffiae	N7a, N7b, N10, N14
Trichomonascus vanleenenianus	N8
Naganishia adeliensis	N11, N12, N15
Naganishia uzbekistanensis	N16, N17, N18

تهیه قارچ بیمارگر

جدایه بیمارگر *A.solani* با شماره کلکسیونی IRAN556 از کلکسیون قارچ‌های زنده ایران، بخش رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه گردید. جدایه‌ها در محیط کشت PDA[1] رشد داده شده و جهت اثبات آزمون بیماری‌زایی روی میوه گوجه‌فرنگی آزمایش شدند.

بررسی قابلیت بیوکنترلی مخمرها در شرایط آزمایشگاه

کشت متقابل

فعالیت کنترل زیستی جدایه‌های مخمر در شرایط آزمایشگاهی در برابر *A. solani* توسط روش کشت متقابل ارزیابی شد. بدین منظور از محیط کشت PDA استفاده گردید. تشتک‌های پتری به دو قسمت تقسیم شدند و در یک طرف جدایه-های مخمری به صورت خطی کشت شدند و در سمت دیگر یک پلاگ از قارچ بیمارگر با فاصله یک سانتی‌متر از لبه تشتک پتری قرار داده شد (Afsah-Hejri, 2013). تشتک‌های پتری به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس هاله بازدارندگی اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار صورت پذیرفت. کشت بیمارگر به تنهایی و بدون حضور جدایه مخمری به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. پس از اینکه پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار شاهد تمام تشتک پتری را پر کرد، میزان رشد قطری پرگنه اندازه‌گیری و در نهایت درصد کاهش رشد مسیلیوم قارچ با استفاده از فرمول زیر ارزیابی گردید (Etebarian *et al*., 2005).

$$n = (a - b)/a \times 100$$

n = درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری

a = اندازه قطر پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری شاهد

b= اندازه قطر پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری تیمار

بررسی قابلیت بیوکنترلی مخمرها بر علیه پوسیدگی آلترناریایی در شرایط In Vitro

بدین منظور میوه‌های سالم گوجه‌فرنگی انتخاب گردید. بر روی هر گوجه‌فرنگی سه زخم به قطر پنج میلی‌متر و عمق چهار میلی‌متر ایجاد گردید. هر زخم با۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱×۱۰^{۸} مخمر تلقیح گردید. پس از دو ساعت زخم‌ها با

[1] Potato dextrose agar

۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با جمعیت ۱×۱۰^{۵} تلقیح گردیدند و پس از خشک شدن با جریان هوا، در داخل یک ظرف یکبار مصرف گذاشته شده و با پوشش‌های پلاستیکی پوشانده شدند. جهت حفظ رطوبت و جلوگیری از خشک شدن میوه‌های گوجه‌فرنگی، آب مقطر استریل در درون پوشش پلاستیکی اسپری شد و رطوبت نسبی درون پوشش پلاستیکی در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) نگه داشته شد. نمونه‌ها به مدت هفت روز در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و ۲۱ روز در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری قطر لکه‌ها از کولیس استفاده گردید و مساحت آن‌ها بر حسب میلی‌متر مربع محاسبه شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. هر تیمار شامل سه تکرار بود و برای هر تکرار، چهار واحد آزمایشی (چهار میوه گوجه‌فرنگی) در نظر گرفته شد (Zhu *et al*., 2023).

مکانیسم‌های بیوکنترلی

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی (VOCs[۱])

برای این آزمایش از محیط پایه PDA استفاده شد. مخمر بر روی سطح تشتک پتری کشت داده شد و قارچ آلترناریا نیز بر روی سطح تشتک پتری مقابل کشت داده شد. سپس صفحات پتری‌دیش رو به روی هم قرار داده شدند و با پارافیلم کاملا به هم وصل شدند (در تشتک پتری بالایی مخمر و در تشتک پتری پایینی بیمارگر). در تیمار شاهد در یک سطح بیمارگر کشت گردید و در سطح مقابل (شاهد) چیزی کشت نگردید. تشتک‌های پتری در دمای ۲۴ درجه سلسیوس و به مدت ۱۴ روز نگهداری گردیدند. بعد از ۱۴ روز قطر پرگنه‌های قارچ آلترناریا اندازه‌گیری شد و درصد مهار شدن قارچ بیمارگر توسط ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط مخمرهای آنتاگونیست در مقایسه با شاهد محاسبه گردید (Lillbro, 2005).

تولید آنزیم‌های خارج سلولی

توانایی جدایه‌های مخمر برای ترشح آنزیم‌های لیتیک (پروتئاز، پکتیناز و آمیلاز استراز) که با فعالیت بیوکنترلی مخمرها مرتبط می‌باشد، با قرار دادن ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر ($۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر) روی محیط جامد حاوی سوبستراهای آنزیمی خاص ارزیابی شد.

برای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت SM[۲] استفاده شد. تشکیل یک هاله سبک در اطراف پرگنه‌ها پس از نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز نشان دهنده فعالیت آنزیمی بود (Strauss *et al*., 2001).

فعالیت آمیلاز با استفاده از یک محیط انتخابی حاوی ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۲۰ گرم در لیتر پپتون، ۲۰ گرم در لیتر نشاسته و ۲۰ گرم در لیتر آگار ارزیابی شد. pH محیط بر روی پنج تنظیم شد. صفحات آمیلاز با محلول لوگول یک درصد (محلول یدید پتاسیم) پوشانده شدند و فعالیت آمیلاز با وجود یک هاله لزج روشن در اطراف پرگنه‌ها تشخیص داده شد، در حالی که بقیه محیط بنفش باقی ماند، زیرا محلول رنگی، نشاسته غیرهیدرولیز شده را رنگ‌آمیزی می‌کند (Pretscher *et al*., 2018).

فعالیت پکتینولیتیک با استفاده از یک محیط انتخابی حاوی ۱۲/۵ گرم در لیتر پلی‌گالاکتورونیک اسید، ۶/۸ گرم در لیتر فسفات پتاسیم ، ۶/۷ گرم در لیتر YNB[۳] بدون سولفات آمونیوم، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و ۲۰ گرم در لیتر آگار مورد آزمایش قرار گرفت. پس از نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز، پس از شستشوی پرگنه‌ها با آب مقطر، تشتک‌های پتری با ۰/۱ درصد (w/v) روتنیوم قرمز رنگ‌آمیزی شدند. پرگنه‌هایی که هاله بنفش را نشان دادند مثبت در نظر گرفته شدند (Strauss *et al*., 2001).

---

1. Volatile organic compounds
2. Skim Milk agar
3. Yeast nitrogen base

برای ارزیابی فعالیت استرازی از محیط کشت حاوی ۱٪ پپتون، ۰/۵٪ کلرید سدیم، ۰/۰۱ CaCl2_2H2O، ۱٪ توئین ۸۰ و ۲ درصد آگار استفاده گردید. تولید استراز با تشکیل یک هاله روشن اطراف پرگنه مخمر مشخص گردید (Buzzini and Martini, 2002).

تشکیل بیوفیلم

ارزیابی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های مخمری بر اساس روش (Vero *et al*., 2013) با کمی تغییرات انجام گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱×۱۰^{۸} سلول مخمر به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی ۹۰۰ میکرولیتر محیط YPD اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید. نمونه شاهد حاوی محیط YPD[۱] و بدون اضافه کردن سوسپانسون مخمر در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت میکروتیوب‌ها خالی شدند و سه بار توسط آب مقطر شسته شدند و در دمای اتاق خشک شدند. بیوفیلم‌های چسبیده به دیواره میکروتیوب ۲۰ دقیقه به وسیله کریستال ویولت ۱٪ (w/v) رنگ‌آمیزی شدند. سپس سه بار با آب مقطر استریل شسته شده و در دمای اتاق خشک شدند. کریستال ویوله چسبیده به میکروتیوب با استفاده از یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد شسته شده و میزان جذب این محلول در ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. تشکیل بیوفیلم زمانی مثبت در نظر گرفته شد که ضریب جذب بیشتر از میانگین شاهد منفی به اضافه سه بود. هر تیمار شامل شش تکرار بود.

تولید سیدروفور

برای ارزیابی تولید سیدروفور از محیط کشت CAS Agar[۲] استفاده گردید (Schwyn and Neilands, 1987). مخمرها بر روی محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. تغییر رنگ محیط کشت به نارنجی نشان دهنده توانایی تولید سیدروفور بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

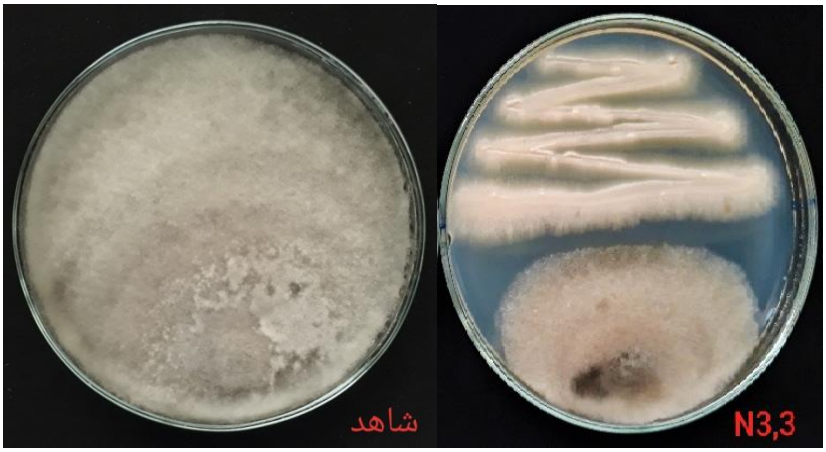
همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه یا چهار تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با روش تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1.3) و مقایسه میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایه آماری احتمال یک درصد صورت گرفت.

یافته‌های پژوهش

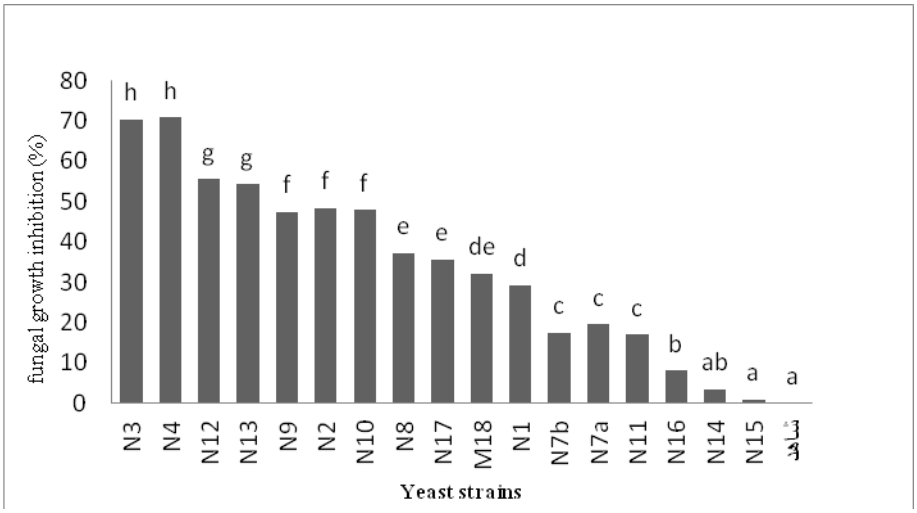
غربالگری قابلیت بیوکنترلی مخمرها بر علیه قارچ بیمارگر A. solani در شرایط آزمایشگاه

از میان ۱۷ جدایه مخمری، ۱۵ جدایه قادر به ایجاد هاله بازدارندگی معنی‌داری در برابر *A. solani* بودند (شکل ۱) و در گروه‌های آماری مختلفی گروه‌بندی شدند. از این نظر بین جدایه‌های آنتاگونیست و شاهد در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. نتایج نشان داد از میان جدایه‌های مورد آزمون، جدایه‌های (N3) *A. pullulans* و (N4) *A. pullulans* بیشترین تاثیر را در مهار رشد پرگنه قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد از خود نشان دادند. جدایه‌های N4 و N3 توانستند به ترتیب با ۷۷/۷۶ و ۷۰/۳۳ درصد از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کنند. جدایه‌های N14 و N15 در مهار رشد پرگنه بیمارگر ضعیف عمل کردند و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل۲).

۱Yeast Extract Peptone Dextrose
۲Chrome Azurol S Agar



شکل ۱. اثر جدایه N3 مخمر آنتاگونیست *Aureobasidium pullulans* در تقابل با بیمارگر *Alternaria solani* در آزمون کشت متقابل پس از ۱۴ روز نگهداری در دمای ۲۴ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی (تصویر سمت راست هاله بازدارنده ایجاد شده توسط جدایه مخمر و تصویر سمت چپ قارچ بیمارگر بدون حضور جدایه مخمری)

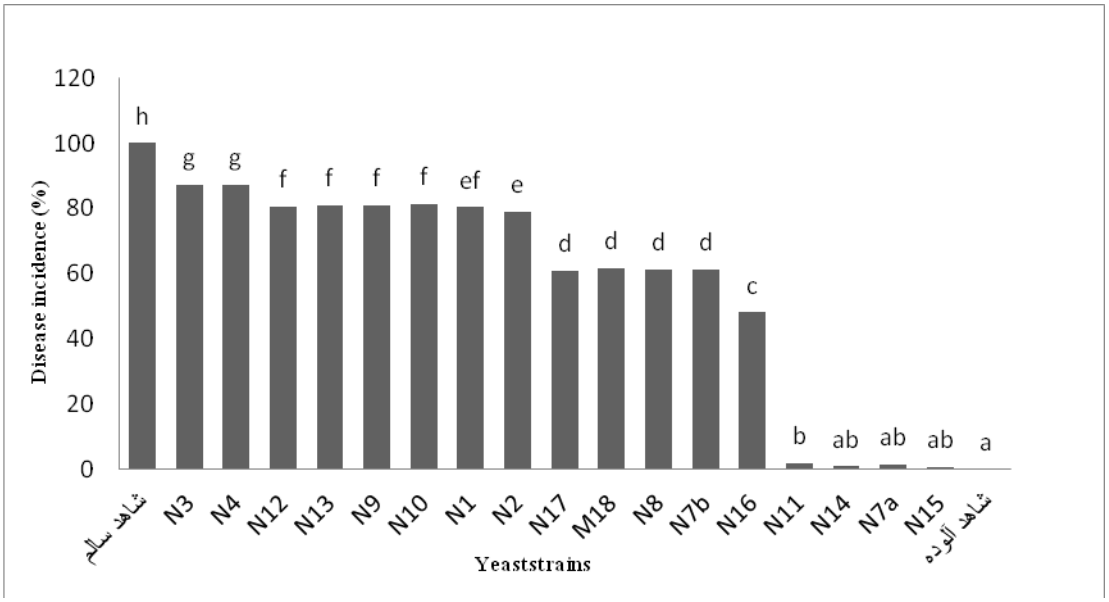


شکل ۲. نمودار درصد بازدارندگی ترکیبات غیرفرار جدایه‌های مخمری علیه *Alternaria solani* در کشت متقابل پس از ۱۴ روز، ستون‌های دارای حرف مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0.05$.) تفاوت معنی‌داری ندارند.

بررسی قابلیت بیوکنترلی مخمرها در مهار قارچ بیمارگر A. solani در شرایط In vitro

اثر جدایه‌های مخمرهای آنتاگونیست در کاهش سطح لکه های ایجاد شده توسط قارچ بیمارگر پس از ۲۱ روز نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس

همانطور که در شکل۳ مشاهده می‌شود از ۱۷ جدایه مخمر بررسی شده، ۱۴ جدایه مخمر قادر به کاهش سطح لکه ایجاد شده بر روی میوه گوجه‌فرنگی در مقایسه با شاهد بودند. بیشترین میزان کنترل بیماری مربوط به دو جدایه N4 و N3 مربوط به گونه *A. pullulans* بود که به ترتیب با ۸۸/۲۳ و ۸۶/۸۳ درصد کاهش سطح لکه، موجب کاهش شدت بیماری شدند (شکل۳).

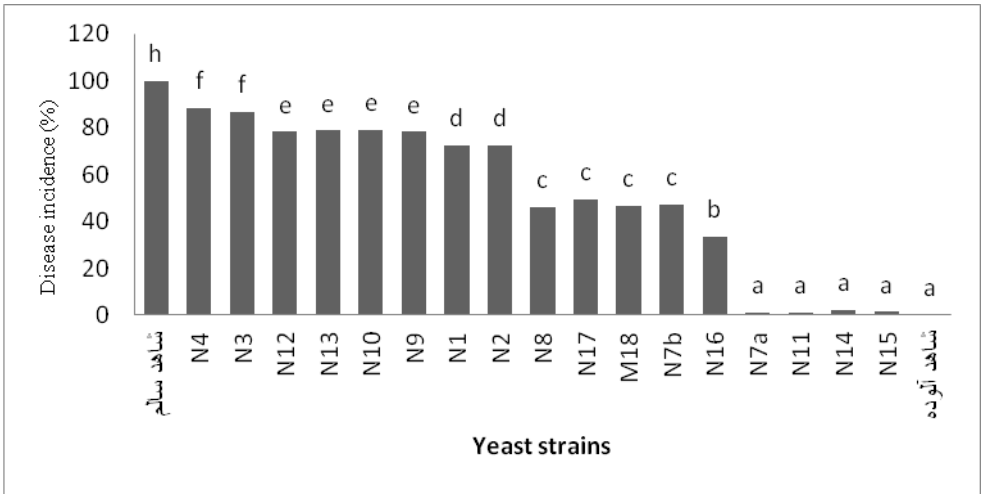


شکل۳. نمودار درصد کاهش پوسیدگی ناشی از *Alternaria solani* بر روی میوه گوجه‌فرنگی پس از ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴ ^{o}C

شکل ۴. اثر بازدارندگی جدایه‌های مخمر آنتاگونیست *Aureobasidium pullulans* از گسترش پوسیدگی ناشی از *A. solani* روی میوه گوجه-فرنگی بعد از ۲۱ روز نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس (a: تیمار مایه‌زنی شده با بیماگر+ جدایه N4 آنتاگونیست در مقابل شاهد آلوده (مایع-زنی شده فقط با قارچ بیمارگر)، b: تیمار مایه‌زنی شده با بیماگر+ جدایه N3 آنتاگونیست در مقابل شاهد آلوده، c: شاهد سالم (مایع‌زنی شده با آب مقطر در مقابل شاهد آلوده

اثر جدایه‌های مخمرهای آنتاگونیست در کاهش سطح لکه های ایجاد شده توسط قارچ بیمارگر پس از هفت روز نگهداری در دمای ۲۴ درجه سلسیوس

براساس نتایج، بیشترین شدت آلودگی با ۱۱/۹ میلی‌متر قطر لکه پوسیدگی در تیمار شاهد قارچ *A. solani* مشاهده شد و بر اساس نتایج تجزیه واریانس با تیمارهای مربوط به جدایه‌های N15، N14، N11 و N7a در یک گروه آماری قرار گرفتند. جدایه‌های N3 و N4 مربوط به گونه *A. pullulans* به ترتیب با ۳/۱ و ۳/۱۳ میلی‌متر قطر لکه پوسیده بهترین عملکرد را در کنترل بیماری از خود نشان دادند (شکل ۵).

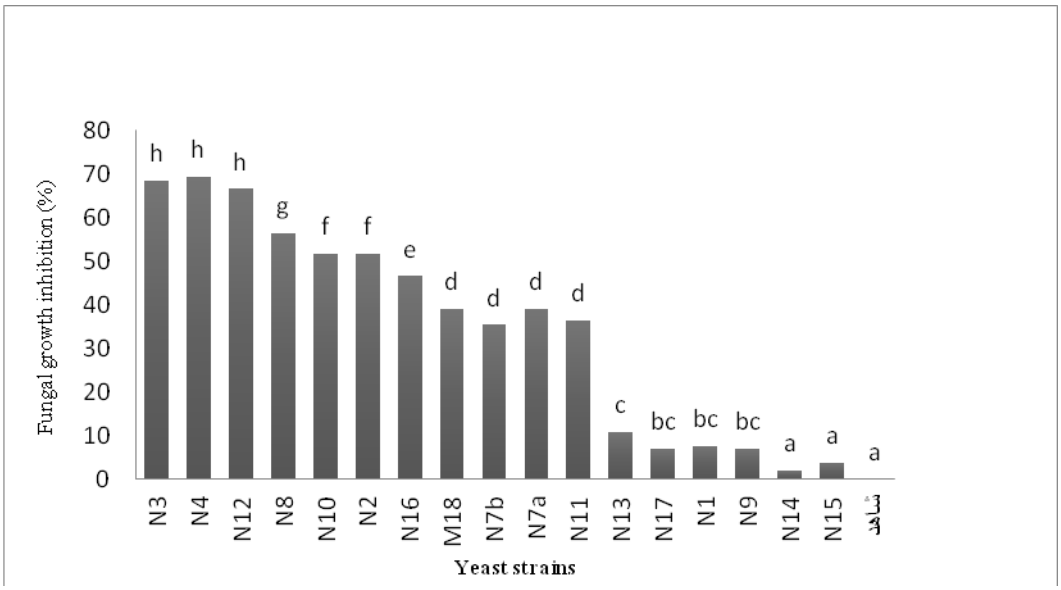


شکل ۵ . نمودار درصد کاهش پوسیدگی ناشی از *Alternaria solani* بر روی میوه گوجه‌فرنگی پس از هفت روز نگهداری در دمای ۲۴°C

مکانیسم‌های بیوکنترلی

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

از نظر مهار پرگنه قارچ آلترناریا توسط ترکیبات فرّار مخمر، بین جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد مشاهده شد. بر اساس نتایج، از بین ۱۷ جدایه بررسی شده، دو جدایه (N15) و (N14) که به ترتیب متعلق به گونه‌های *N. adeliensis* و *C. slooffiae* بودند، قادر به مهار رشد قارچ بیمارگر نبودند و با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند. جدایه‌های *A. pullulans* (N4)، *A. pullulans* (N3) و *N. adeliensis* (N12) به ترتیب با ۶۸/۳۷، ۶۹/۳۰ و ۶۶/۵۱ درصد مهار بیمارگر، بیشترین تاثیر را در مهار رشد *A. solani* از خود نشان دادند. (شکل ۶)



شکل ۶. نمودار درصد بازدارندگی ترکیبات فرار جدایه‌های مخمری علیه *Alternaria solani* پس از ۱۴ روز، ستون‌های دارای حرف مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0.05$.) تفاوت معنی‌داری ندارند.

تولید آنزیم‌های خارج سلولی

جدایه‌هایی که دارای فعالیت آنزیم خارج سلولی هستند در جدول ۲ نشان داده شده است. تولید آنزیم استراز در هیچ کدام از جدایه‌ها مشاهده نشد. پنج جدایه مخمر از تعداد ۱۷ جدایه جداسازی شده در تولید آنزیم پروتئاز که با ایجاد هاله روشن در

اطراف پرگنه مخمر مشخص می‌شود نتیجه مثبت نشان دادند که تمامی جدایه‌ها متعلق به گونه *A. pullulans* می‌باشد. از میان کل جدایه‌ها پنج جدایه از گونه *A. pullulans* و یک جدایه از گونه *N. adeliensis* قابلیت تولید پکتیناز را داشتند که با ایجاد یک هاله روشن در اطراف پرگنه بعد از اضافه کردن محلول لوگول قابل تشخیص می‌باشد. در مورد تولید آنزیم آمیلاز چهار جدایه از گونه *A. pullulans* کاملا نتایج مثبت نشان دادند و دو جدایه که به گونه‌های *A. pullulans* و *N. adeliensis* تعلق داشتند میزان کمی از این آنزیم را تولید می‌کردند.

تشکیل بیوفیلم

از بین ۱۷ جدایه مخمر بررسی شده، هفت جدایه قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که از بین آن‌ها پنج جدایه متعلق به گونه *A. pullulans*، یک جدایه متعلق به گونه *C. slooffiae* و یک جدایه متعلق به گونه *N. adeliensis* می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- تولید سیدروفور، تشکیل بیوفیلم و برخی آنزیم‌های ترشح شده توسط جدایه‌های مخمرها

جدایه‌های مخمری	تولید سیدروفور	تشکیل بیوفیلم	آنزیم پروتئاز	آنزیم استراز	آنزیم آمیلاز	آنزیم پکتیناز
A. pullulans (N1)	-	-	+	-	-	-
A. pullulans (N2)	+	+	+	-	+	+
A. pullulans (N3)	+	+	+	-	+	+
A. pullulans (N4)	+	+	+	-	+	+
C. slooffiae (N7b)	-	-	-	-	-	-
C. slooffiae (N7a)	-	-	-	-	-	-
T .vanleenenianus (N8)	-	-	-	-	-	-
A. pullulans (N9)	+	+	+	-	+	+
C. slooffiae.(N10)	-	+	-	-	-	-
N. adeliensis (N11)	+	-	-	-	-	-
N. adeliensis (N12)	-	+	-	-	+/-	+
A. pullulans (N13)	-	+	+	-	+/-	+
C. slooffiae (N14)	-	-	-	-	-	-
N. adeliensis (N15)	-	-	-	-	-	-
N. uzbekistanensis (N16)	-	-	-	-	-	-
N. uzbekistanensis (N17)	-	-	-	-	-	-
N. uzbekistanensis (N18)	-	-	-	-	-	-

تولید سیدروفور

نتایج نشان داد از بین مخمرهای مورد آزمون، پنج جدایه قادر به تولید سیدروفور بودند که از این پنج جدایه، چهار جدایه (N9, N4, N3 و N2) متعلق به گونه *A. pullulans* و یک جدایه (N11) متعلق به گونه *N. adeliensis* بود (جدول۲).

بحث

گزارشات متعددی نشان می‌هد مخمرهای جداسازی شده از محصولات گیاهی به دلیل ویژگی‌هایی مانند فعالیت آبی پایین (aw)، استفاده از منابع غذایی متنوع و سازگاری با تغییرات pH و دما (Droby *et al*., 2016; Spadaro and Droby, 2016) گزینه‌های بسیار مناسبی برای استفاده به عنوان عوامل کنترل زیستی بر علیه بیماری‌های گیاهی، به ویژه بیماری‌های پس از برداشت می‌باشند (Saligkarias *et al*., 2002; He *et al*., 2003; ; ElTarabily, 2004; Bello *et al*., 2008; Rosa-Magri *et al*., 2011; Ferraz *et al*., 2016). نتایج این تحقیق نشان داد مخمرهای جداسازی شده از فیلوسفر گوجه‌فرنگی دارای قابلیت کنترل کنندگی بر علیه قارچ عامل بیماری بلایت آلترناریایی می‌باشند. در مجموع، ۱۵ جدایه از ۱۷ جدایه بررسی شده در شرایط آزمایشگاه قادر به مهار رشد قارچ *A. solani* بودند. محدود شدن رشد میسلیوم

IWater activity

قارچ بیمارگر *Alternaria* و ایجاد هاله بازدارندگی احتمالا به دلیل ترشح مواد ضدقارچی با قابلیت انتشار توسط مخمرهای آنتاگونیست می‌باشد (Freimoser *et al*., 2019; Kohl *et al*., 2019). بیشترین میزان کنترل کنندگی قارچ *A. solani* بر روی میوه گوجه‌فرنگی با حدود ۸۷ درصد مهار پوسیدگی در هر دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس مربوط به جدایه‌های N3 و N4 بود که این جدایه‌ها در مهار رشد قارچ در شرایط آزمایشگاه (آزمون کشت متقابل) نیز بهترین نتایج را از خود نشان دادند.

مکانیسم‌های بیوکنترلی مختلفی از قبیل مایکوپارازیتیسم، تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی، سنتز ترکیبات ضد قارچی و رقابت بر سر غذا و فضا برای شبه مخمر *A. pullulans* گزارش شده است (Bozoudi and Tsaltas, 2018). نتایج این پژوهش نشان داد که جدایه‌های N3 و N4 مخمر (*A. pullulans*) قادر به تولید متابولیت‌های فرار (VOCs) می‌باشند که موجب کاهش رشد و اسپورزایی قارچ *A. solani* در شرایط آزمایشگاهی می‌گردند. تولید VOCs توسط میکروارگانیسم‌ها در مواردی که میکروارگانیسم نمی‌تواند در تماس مستقیم با سطح میوه‌ها و سبزیجات باشد، می‌تواند ابزار مهمی برای کنترل پس از برداشت بیماری‌ها باشد (Nunes, 2012). اگرچه تولید متابولیت‌های فرار یکی از مکانیسم‌های مهم مخمرها برای استقرار در برابر قارچ‌های بیمارگر می‌باشد اما تعداد گونه‌های نسبتاً محدودی قادر به تولید آن‌ها می‌باشند و همچنین تولید آن‌ها با برخی از فاکتورهای محیطی تحریک می‌شوند (Bosqueiroa *et al*., 2023). بر اساس نتایجی که در سال ۲۰۱۵ منتشر شده است، گونه *A. pullulans* در شرایط آزمایشگاه با تولید متابولیت‌های فرار و بدون هیچ تماس فیزیکی با قارچ بیمارگر *Colletotrichum acutatum* موجب مهار رشد میسلیوم‌های آن به میزان ۵۴/۴۵ درصد گردیده است (Hartatia *et al*., 2015).

دیواره سلولی قارچ‌ها از گلیکوپروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، گلوکان‌ها و کیتین (Bowman and Free, 2006) تشکیل شده است و آنتاگونیست‌ها برای شکستن این ساختار نیازمند آنزیم‌های مختلفی می‌باشند (Peberdy, 2020). در برخی موارد توانایی مخمرهای آنتاگونیست برای مهار قارچ‌های بیمارگر بستگی به توانایی آن‌ها در تولید آنزیم‌های خارج سلولی (نظیر انزیم‌های لیتیک) دارد و تولید آنزیم‌های خارج سلولی یکی از ویژگی‌های مهم برای عوامل بیوکنترلی محسوب می‌شود (Spadaro and Droby, 2016). این خواص ضد میکروبی کاملا به جنس و گونه مخمر بستگی دارد و بر اساس مرحله رشدی و غلظت بهینه مخمر تغییر می‌یابد (Martins *et al*., 2011). مشخص شده که آنزیم پروتئاز موجب کاهش جوانه‌زنی اسپور و کاهش طول لوله تندش در قارچ‌های *Penicillium expansum*، *B. cinerea*، *M. fructicola* و *A. alternata* گردیده است (Banani *et al*., 2015). بر اساس نتایج این تحقیق پنج جدایه از گونه *A. pullulans* قادر به تولید پروتئاز بودند که به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های موثر در مایکوپارازیتیسم قارچ *A. solani* بوده باشد.

تولید استراز نیز به عنوان یکی از فاکتورهای موثر در کنترل زیستی مخمرها شناخته شده (Agarbati *et al*., 2022) که بر اساس نتایج، هیچکدام از جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق قابلیت تولید استراز را از خود نشان ندادند. در بین جدایه‌های بررسی شده، در مجموع شش جدایه قادر به تولید آمیلاز و پنج جدایه قادر به تولید پکتیناز بودند. موفق‌ترین جدایه‌های این بررسی (N3 و N4) قادر به تولید سه آنزیم آمیلاز، پکتیناز و پروتئاز بودند. آنزیم پکتیناز نقش موثری در القای مقاومت به گیاه ایفا می‌کند. همچنین مشخص شده است که این آنزیم در جلوگیری از آلودگی گیاه به بیمارگر نقش دارد (Reetha *et al*., 2014). آمیلاز موجب تجزیه نشاسته می‌گردد که در سال‌های اخیر نقش آن در کنترل قارچ‌های بیمارگر گیاهی مشخص شده است. بر اساس گزارش Huang و همکاران در سال ۲۰۲۲ تولید آمیلاز بر توانایی کلونیزه کردن عوامل کنترل زیستی تاثیرگذار می‌باشد (Huang *et al*., 2022). مطالعات نشان داده بین توانایی آنتاگونیستی مخمر *Metschnikowia andauensis* و تولید آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز رابطه مستقیمی وجود دارد (Horváth *et al*., 2021).

تولید بیوفیلم یکی از مکانیسم‌های اصلی مخمرها برای کلونیزه کردن محل زخم روی میوه می‌باشد که بدین‌وسیله از حمله قارچ بیمارگر جلوگیری می‌کند (Klein and Kupper, 2018). تشکیل بیوفیلم ممکن است منجر به افزایش مقاومت به استرس اکسیداتیو که یکی از نیازهای مهم مخمرها برای بقا و حفظ خاصیت آنتاگونیستی می‌باشد، گردد (Chi *et al*.,

(2015). بر اساس نتایج، جدایه‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم بودند در مهار بیماری بر روی میوه گوجه‌فرنگی از توانایی بالاتری برخوردار بودند و می‌توان تشکیل بیوفیلم را به عنوان یکی از مکانیسم‌های بیوکنترلی جدایه‌های موفق در این بررسی در نظر گرفت. گزارش شده است که گونه *A. pullulans* با تشکل بیوفیلم بر روی سطح گیاه زندگی می‌کند و تشکیل این بیوفیلم موجب افزایش فعالیت بیوکنترلی بر علیه قارچ‌های بیمارگر گیاهی می‌گردد (Klein and Kupper, 2018).

سیدروفورها ترکیبات خارج سلولی با وزن مولکولی پایین می‌باشند. معمولا از میکروارگانیسم‌های مولد سیدوفور به عنوان عوامل کنترل زیستی و یا محرک‌های رشد گیاه استفاده می‌شود. گزارش شده است ترکیبات سیدوفور موجب القا مقاومت به گیاه و در نتیجه ایجاد مقاومت در برابر بیمارگرهای گیاهی می‌شوند. علاوه بر این، مکانیسم اصلی میکروارگانیسم‌های تولید کننده سیدروفور، رقابت با بیمارگر برای جذب عنصر Fe^{+3} می‌باشد (Maindad *et al*. 2014). تولید سیدروفور توسط میکرو ارگانیسم‌های متعددی از قبیل *A. pullulans* گزارش گردیده و مشخص شده است *که* تولید سیدروفور یکی از مکانیسم‌های بیوکنترلی آن بر علیه بیمارگرهای قارچی می‌باشد (Setiawan *et al*., 2022). بر اساس نتایج این پژوهش علاوه بر دو جدایه برتر (N3 و N4) از گونه *A. pullulans*، دو جدایه دیگر از همین گونه (N2 و N9) و یک جدایه از مخمر *N. adeliensis* (N15) نیز قادر به تولید سیدروفور بودند که ممکن است یکی از مکانیسم‌های بیوکنترلی این مخمرها باشد.

در مجموع برای شناسایی مقدماتی آنتاگونیست‌ها، بررسی‌های آزمایشگاهی روش خوبی به شمار می‌آید. به هر حال باید به این نکته توجه داشت که به طور معمول در مطالعات آزمایشگاهی (روی محیط کشت غذایی)، اثر آنتاگونیست در مهار بیمارگر به طور مستقیم بررسی می‌شود، که این کار به تنهایی و به عنوان یک معیار کافی برای تعیین و تایید یک آنتاگونیست موفق، مفید واقع نخواهد شد. با توجه به این که اثر یک میکروارگانیسم در محیط طبیعی تحت تأثیر عوامل زیادی نظیر رطوبت، دما، اسیدیته، نوع شرایط محیطی و رفتار سایر ارگانیسم‌ها می‌باشد، می‌توان گفت، ممکن است یک جدایه در آزمایشگاه توانایی آنتاگونیستی بالایی داشته باشد، امّا در محیط طبیعی و در رقابت با سایر آنتاگونیست‌ها نتواند موّفق ظاهر شود، که یکی از دلایل اصلی آن عدم پایداری و ثبات آن‌ها در شرایط طبیعی می‌باشد. برای اینکه جدایه‌هایی با پتانسیل بالای آنتاگونیستی بتوانند قابلیت بیوکنترلی خود را در حد سلول‌های زنده آنتاگونیست حفظ نمایند، فرموله کردن مؤثر و پایدار آن‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج نشان داد که دو جدایه (N3 وN4) از گونه *A. pullulans* دارای توانایی بالایی در کنترل بیماری لکه موجی یا بلایت زودرس گوجه‌فرنگی در مرحله پس از برداشت هستند و گزینه‌های مناسبی در جهت استفاده به عنوان عوامل بیوکنترلی و کاهش استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌باشند. اسپری جدایه‌های مخمری معرفی شده روی میوه‌های رسیده در مرحله برداشت محصول گوجه‌فرنگی و یا غوطه‌ورسازی میوه‌ها داخل سوسپانسیون مخمر می‌تواند میزان خسارت ناشی از *A. solani* را در هنگام حمل‌ونقل، انبارداری و صادرات به میزان قابل قبولی کاهش دهد. مخمرهای مورد استفاده در این تحقیق در هر دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس قادر به کاهش شدت پوسیدگی و جلوگیری از رشد و توسعه قارچ عامل بیماری‌زا بر روی میوه گوجه‌فرنگی بودند. توانایی تطبیق این مخمرها با دامنه وسیعی از دما، باعث می‌شود که این جدایه‌ها قابلیت استفاده در هر دو دمای محیط و دمای سردخانه را داشته باشند. اما تحقیقات بیشتری به منظور بهره‌برداری گسترده از این عوامل کنترل زیستی مورد نیاز می باشد. به دلیل احتمال مغایرت نتایج به دست آمده در شرایط آزمایشگاه با شرایط گلخانه و سردخانه، لازم است مطالعات تکمیلی به منظور ارزیابی قابلیت بیوکنترلی جدایه‌ها در شرایط گلخانه به صورت پیش از برداشت و در شرایط سردخانه به صورت پس از برداشت صورت پذیرد. علاوه بر این برای استفاده در سطح وسیع از عوامل کنترل زیستی، آگاهی از مکانیسم‌های بیوکنترلی آن‌ها ضروری می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، این دو جدایه (N3

وN4) قادر به تولید متابولیت‌های فرار، تشکیل بیوفیلم، تولید سیدروفور و تولید آنزیم‌های لیتیک می‌باشند. با این حال ممکن است که این جدایه‌ها دارای مکانیسم‌های بیوکنترلی دیگری مانند تولید آنزیم‌های کتولیتیک، تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک، القا مقاومت و رقابت بر سر فضا و غذا باشند که لازم است پیش از کاربرد گسترده آن‌ها، مطالعات و بررسی‌های بیشتری در این خصوص انجام پذیرد.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد. نویسندگان کمال تشکر را از حمایت‌های مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌غربی و همچنین آزمایشگاه بیماری‌شناسی آن مجموعه دارند.

منابع

نادر، تورج (۱۴۰۲). مطالعه تنوع زیستی مخمر های فلور گوجه فرنگی و قابلیت آن ها در بیو کنترل بیماری بلایت آلترناریایی. *پایان‌نامه کارشناسی ارشد.* به راهنمایی محمدعلی تاجیک، ساری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم زراعی، ص ۱۱۲.

Agarbati, A., Canonico, L., Pecci, T., Romanazzi, G., Ciani, M. & Francesca, C. (2022). Biocontrol of Non-Saccharomyces Yeasts in Vineyard against the Gray Mold Disease *Agent Botrytis cinerea*. *Microorganisms*, *10*, 200.

Afsah-Hejri, L. (2013). Saprophytic yeasts: effective biocontrol agents against *Aspergillus flavus*. *International Food Research Journal*, *20(6)*, 3403-3409.

Apaliya, M. T., Zhang, H. Y., Yang, Q. Y., Zheng, X. F., Zhao, L. N., Kwaw, E. & Mahunu, G. K. (2017). *Hanseniaspora uvarum* enhanced with trehalose induced defense-related enzyme activities and relative genes expression levels against *Aspergillus tubingensis* in table grapes. *Postharvest Biology and Technology, 132*, 162–170.

Barth, M., Hankinson,. TR., Zhuang, H. & Breidt, F. (2009). Microbiological spoilage of fruits and vegetables. In: Sperber

WH, Doyle MP, editor. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. New York, *Springer*, p.

135–183.

Bosqueiroa, A. S., Bizarria R. & Rosa-Magri, M. M. (2023). Biocontrol of post-harvest tomato rot caused by *Alternaria arborescens* using *Torulaspora indica*. *Biocontrol Science and Technology, 33(2), 115-132.*

Bakade, R. R., Sundaresha, S. & Lal, M. (2022) Management strategies and alternatives for fungicidal resistance in potato. Pesticides: updates on toxicity, efcacy and risk assessment. *IntechOpen*, London, UK, ISBN 1803560398.

Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A. & Gullino, M. L. (2015). Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. *International Journal of Food Microbiology,199*, 54–61.

Bello, G., D., Mónaco, C., Rollan, M. C., Lampugnani, G., Arteta, N., Abramoff, C., Ronco, L. & Stocco, M. (2008). Biocontrol of postharvest grey mould on tomato by yeasts. *Journal of Phytopathology*, *156(5)*, 257–263.

Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G. & Montesinos, E. (2022). Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms 10*, 2-17.

Bowman, S. M. & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays, 28(8)*, 799–808.

Bozoudi, D. & Tsaltas, D. (2018). The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*, *4*, p 85.

Buzzini, P. & Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology, 93,* 1020–1025.

Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., Sun, Z., Sui, Y., & Liu, J. (2015). Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological Control, 90,* 113–119.

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.

El-Tarabily. (2004). Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Microbiology, 96(1),* 69–75.

Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., Eastwell, K. C., & Sayler, R. J. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology, 51,* 591-598.

FAO. (2022) FAOSTAT: Production: Crops and livestock products. In: FAO. Rome. Cited December 2022. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL

Feng, W. & Zheng, X. D. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata in vitro* and *in vivo*. *Food Control, 18,* 1126–1130.

Ferraz, L. P., da Cunha, T., da Silva, A. C., & Kupper, K. C. (2016). Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiological Research,* 72–79.

Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B. & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35,* 154.

He, D., Zheng, X. D., Yin, Y. M., Sun, P., & Zhang, H. Y. (2003). Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica, 44,* 211–216.

Guillen, F., Castillo, S., Zapata, P. J., Martinez-Romero, D., Serrano, M. & Valero, D. (2007). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit: 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology, 3,* 23–27.

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

Horváth, E., Dályai, L., Szabó, E., Barna, T., Kalmár, L., Posta, J., Sipiczki, M., Csoma, H. & Miklós, I. (2021). The antagonistic *Metschnikowia andauensis* produces extracellular enzymes and pulcherrimin, whose production can be promoted by the culture factors. *Scientific Reports,11,* 10593.

Hartatia, S., Wiyonob, S., Hidayatc, S. H. & Sinaga, M. S. (2015). Mode of Action of Yeast-Like Fungus Aureobasidium pullulans in Controlling Anthracnose of Postharvest Chili. Basic and Applied Research, 20(2), 253-263.

Huang, Q., Liu, H., Zhang, J., Wang, S., Liu, F., Chengdie, L. & Wang, G. (2022). Production of extracellular amylase contributes tothe colonization of Bacillus cereus 0–9 in wheat roots. *BMC Microbiology, 22(1),* 1–13.

Lillbro, M. (2005). Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain–acomparison of mode of action of several yeast species. (Master Theisis for the Agriculture Programme, animal science, performed at the Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Sciences), 21pp.

Kohl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontier Plant Science*, 10, 845.

Liu, J., Tian, S., Meng, X. & Yong, X. (2007). Effect of chitosan on control postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology, 44,* 300–306.

Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N. & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology, 29,* 365–373.

Nader, T. (2024). Biodiversity of Tomato Yeastes Flora and Their Ability to Biocontrol of *Alternaria blight* on tomato. (Master dissertation, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari).

Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology,133(1),* 181–196.

Peberdy, J. F. (2020). Mycolytic enzymes. In Fungal Protoplasts; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 31–44.

Reetha, S., Selvakumar, G.F., Bhuvaneswari, G., Thamizhiniyan, P.& Ravimycin, T. (2014). Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis. International Letter of Science, 13*, 75-80.

Rosa-Magri, M. M., Tauk-Tornisielo, S. M., & Ceccato-Antonini, S. R. (2011). Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 54(1),* 1–5.

Rosslenbroich, H. J. & Stuebler, D. (2000). *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection, 19*, 557–561.

Saligkarias, I. D., Gravanis, F. T., & Epton, H. A. S. (2002). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants using epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I–182: I. *in vivo* studies. *Biological Control, 25(2),* 143–150.

Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochemistry, 160*, 47–56.

Singh, V. K., Singh, A. K. & Kumar, A. (2017). Diseasemanagement of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *Biotechnology, 7*, 255-267.

Spadaro, D. & Droby, S. (2016) Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food and Science Technology, 47*, 39–49.

Setiawan, W., Wiyono, S., Napitupulu, T. P., Kanti Idris, K., Tondok, E. T., Sumerta, I. & Sudiana, I. M. (2022). Biocontrol Activity, Mode of Action, and Colonization of *Aureobasidium pullulans* Dmg 30 DEP on Controlling Early Blight Disease on Tomato Plant. *Hayati journal of Bioscience, 29*, 321- 329.

Setiawan, W.,Wiyono, S., Toding Tondok, F., Kanti, A. & Sudiana, M. (2020). In Vitro Study of Action Mode of *Rhodotorula minuta* Dmg 16 BEP as Biocontrol Agents on *Alternaria solani*. *Journal Perlindungan Tanaman Indonesia, 24(1),* 28–33.

Strauss, M., Jolly, N., Lambrechts, M. & Rensburg, P. (2011). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology, 91*,182–190.

Tzortzakis, N. G. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8,* 111–116.

Vero, S., Garmendia, G., González, M. B., Bentancur, O., & Wisniewski, M. (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple. *FEMS Yeast Research, 13(2),* 189–199.

Wu, P. H., Chang, H. X. & Shen, Y. M. (2023) Efects of synthetic and environmentally friendly fungicides on powdery mildew management and the phyllo - sphere microbiome of cucumber. *PLoS ONE 18(3)*, 282-2899.

Xi, L., Tian, S.P., 2005. Control of postharvest diseases of tomato fruit by combining antagonistic yeast with sodium bicarbonate. *Scientia Agricultura Sinica, 38*, 950–955.

Zhang, Q. R., Zhao, L. N., Li, Z. B., Li, C., Li, B., Gu, X. Y., Zhang, X. Y. & Zhang H. Y. (2019) Screening and identifcation of an antagonistic yeast controlling postharvest blue mold decay of pears and the possible mechanisms involved. *Biological Control, 133*, 26–33.

Zhu, M., Yang, Q., Godana, E. A., Huo, Y., Hu, S., & Zhang, H. (2023). Efficacy of *Wickerhamomyces anomalus* in the biocontrol of black spot decay in tomatoes and investigation of the mechanisms involved. *Biological Control, 186*, 1053-1056.