



Biological control of *Penicillium chrysogenum* by using *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula graminis* in potato

Noushin Shafiee¹, Keivan Beheshti-Maal², Hamid Reza Akkafi³,
Hashem Nayeri⁴

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran. E-mail: nushin.shafiey@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran. E-mail: kbeheshtimaal@iau.ac.ir
3. Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran. E-mail: akkafi@iau.ac.ir
4. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran. E-mail: nayeri@iau.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Fungi, one of the most important causes of potato diseases, cause a lot of economic damage worldwide. On the other hand, using fungicides is dangerous for humans and the environment. Recently, the use of biocontrol yeasts to reduce moldy pathogens of agricultural products has been proposed due to their advantages. The purpose of this research was to isolate and identify potato fungal phytopathogens and eliminate them with new yeast strains. In this research, potato mold pathogens were isolated from rotten potato parts on PDA medium. Then these isolates were examined macroscopically, microscopically, and molecularly. Different yeast isolates were also isolated from the surfaces of leaves and fruits of other plants in Isfahan province. These isolates were evaluated by killer activity, <i>in vitro</i> antagonistic activity, production of antifungal volatile compounds, and <i>in vivo</i> antagonistic activity against moldy phytopathogens. In this study, <i>Penicillium chrysogenum</i> SBAN-IAUF-11 was isolated, identified, and registered in NCBI under the accession number PP704626.1 as a potato pathogen. Among yeast isolates, A13 and A14; during killer activity, antagonistic and volatile compounds production assays; were proposed as the best antifungal isolates against <i>Penicillium chrysogenum</i> SBAN-IAUF-11. Thus, the inhibition rate of A13 and A14 against <i>Penicillium chrysogenum</i> SBAN-IAUF-11 was 54.08 and 50.57 percent in the <i>in vitro</i> antagonistic; 44 and 76 percent in the antifungal volatile compounds production; and 80.08 and 82.97 percent in the <i>in vivo</i> antagonistic assays, respectively. Finally, during molecular identification A13 and A14 were registered as <i>Aureobasidium pullulans</i> SBAN-IAUF-11 and <i>Rhodotorula graminis</i> SBAN-IAUF-4, with accession numbers PP741871 and PP741860, respectively.
Article history: Received: 19 October 2024 Revised: 28 December 2024 Accepted: 30 December 2024 Published online: Spring and Suammer 2024	
Keywords: Killer activity, Volatile compounds, <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Rhodotorula graminis</i> .	
Cite this article: Shafiee, N., Beheshti-Maal, K., Akkafi, H. R. & Nayeri, H. (2024). Biological control of <i>Penicillium chrysogenum</i> by using <i>Aureobasidium pullulans</i> and <i>Rhodotorula graminis</i> in potato. <i>Biological Control of Pests and Plant Diseases</i> , 13 (1), 1-17 DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.383827.346	
© The Author(s). DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.383827.346	Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Potato is considered an important food all over the world. Fungi are one of the most important pathogens in potatoes and cause a lot of damage in the production of this product. The use of fungicides causes damage to humans and the environment. In general, biocontrol microorganisms isolated from the surface of fruits are more compatible with the environment. Among the microorganisms, yeasts have more advantages than other microorganisms. One of the advantages of yeasts is their ability to increase on the surface of the fruit for a long time, which causes food competition between the yeast and the pathogen. The use of biocontrol yeasts against phytopathogenic molds was proposed for the first time in 1991, and since then, more research has been done

in this field. The main aim of this research was to isolate and identify potato mold pathogens and eliminate them from native yeasts in the Isfahan region.

Materials and Methods

In this research, isolation, macroscopic and microscopic examinations of potato fungal pathogens, pathogenicity test of these molds in potatoes, and their molecular identification were done. Also, new isolates of native yeasts were isolated from different regions in Isfahan province. Killing activity was measured by putting yeast isolates in the form of spots on the YEPD-MB medium, which was previously spread with the mold suspension. Measuring the *in vitro* antagonistic activity of yeasts against mold was done by simultaneously cultivating yeast and mold in a Petri dish. Measuring the *in vivo* antagonistic activity of yeasts against mold was done by classifying potatoes into positive control, treated with yeast, and negative control groups. The production of volatile compounds of yeast against mold was investigated by placing 2 plates containing yeast and mold face to face after 2 weeks. Finally, the best biocontrol isolates were identified molecularly.

Results

In this research, *Penicillium chrysogenum* SBAN-IAUF-11 was isolated as a pathogenic mold from the rotten parts of the potato. In the pathogenicity assay, this mold caused disease in healthy potatoes. In the killing activity assay, A13 and A14 were selected as killer yeasts. Also, the amount of *in vitro* antagonistic activity A13 and A14 against pathogenic mold was 54.08 and 50.57 percent, respectively. On the other hand, the inhibition rate of pathogenic mold by volatile compounds produced from A13 and A14 was 44 and 76 percent, respectively. Finally, the determination of *in vivo* antagonistic activity showed that the inhibition rate of pathogenic mold by A13 and A14 was 80/08 and 82/97 percent, respectively. Molecular studies showed that A13 and A14 were related to *Aureobasidium pullulans* SBAN-IAUF-11 and *Rhodotorula graminis* SBAN-IAUF-4, respectively. Finally, *Aureobasidium pullulans* SBAN-IAUF-11 and *Rhodotorula graminis* SBAN-IAUF-4 were registered in NCBI with accession numbers PP741871 and PP741860, respectively.

Discussion

In this study, for the first time, *P. chrysogenum* was isolated and identified as a potato pathogen from rotten potatoes. Also, in South Korea for the first time *P. sclerotigenum* and *P. polonicum*; and in Pakistan *P. solitum*, *P. polonicum*, and *P. citrinum* were isolated and identified from rotten potato tubers. Therefore, different species of *Penicillium* can be considered a great threat to potatoes in the storage stage. In this study, the suspension of the mold was used to measure the killing activity of yeasts against pathogenic mold, but in previous studies, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 was used as a sensitive strain. Using mold cells instead of sensitive yeast strain was a more accurate choice to detect killer yeasts against the same mold. The results of measuring the killing, *in vitro-in vivo* antagonistic activity, and the volatile compounds production of yeasts showed that *A. pullulans* SBAN-IAUF-11 and *R. graminis* SBAN-IAUF-4 can significantly inhibit pathogenic mold compared to previous studies. This is the first time that *R. graminis*, as a biocontrol yeast, is proposed against *Penicillium* sp. Also, in this study, for the first time, the biocontrol activity of *A. pullulans* against *P. chrysogenum* in the potato tubers is reported.

Conclusion

The results of the in-killing and antagonistic activity showed that *A. pullulans* SBAN-IAUF-11 and *R. graminis* SBAN-IAUF-4 were capable of inhibiting more than 50 percent of *P. chrysogenum* SBAN-IAUF-11. These strains can be used as a safe and suitable alternative to chemical fungicides in controlling green and blue mold in potatoes and other agricultural products.



نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، دوره ۱۳، شماره ۱

شماره الکترونیکی: ۲۴۲۳-۸۰۹۰

انتشارات دانشگاه تهران

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

کنترل بیولوژیکی *Penicillium chrysogenum* توسط *Aureobasidium pullulans* و *Rhodotorula graminis* در سبب‌زمینی مهار زیستی *Penicillium chrysogenum* عامل بیمارگر سبب‌زمینی توسط *Aureobasidium pullulans* و *Rhodotorula graminis*

نوشین شفیعی^۱ | کیوان بهشتی مآل^۲ | حمیدرضا عکافی^۳ | هاشم نیری^۴

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران. رایانامه: nushin.shafiey@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران. رایانامه: kbeheshtimaal@iau.ac.ir
۳. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران. رایانامه: akkafi@iau.ac.ir
۴. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران. رایانامه: nayeri@iau.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰ تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۳ کلیدواژه‌ها: فعالیت کشندگی، ترکیبات فرار، <i>Penicillium chrysogenum</i>، <i>Aureobasidium pullulans</i>، <i>Rhodotorula graminis</i>	اخیرا استفاده از مخمرهای مهارگر زیستی به منظور کاهش بیمارگرهای قارچی محصولات کشاورزی، به دلیل مزایای آن‌ها مطرح شده است. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیمارگر سبب‌زمینی و برطرف کردن آن‌ها توسط سویه‌های جدید مخمر بود. در این تحقیق بیمارگرهای قارچی سبب‌زمینی از قسمت‌های پوسیده سبب‌زمینی روی محیط PDA جداسازی و از لحاظ ماکروسکوپی، میکروسکوپی و مولکولی بررسی شدند. همچنین جدایه‌های مختلف مخمر از گیاهان مختلف در استان اصفهان جداسازی و فعالیت کشندگی، آنتاگونیستی آن‌ها در تولید مواد فرار ضد قارچی علیه قارچ‌های بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه <i>Penicillium chrysogenum</i> SBAN-IAUF-11 به‌عنوان قارچ بیماری‌زای سبب‌زمینی برای اولین بار جداسازی، شناسایی و با شماره دسترسی PP704626.1 در NCBI ثبت شد. از بین جدایه‌های مخمر، A13 و A14 طی سنجش‌های کشندگی، آنتاگونیستی و تولید مواد فرار؛ به‌عنوان بهترین جدایه‌های ضدقارچی علیه <i>Penicillium chrysogenum</i> SBAN-IAUF-11 مطرح شدند. به‌این‌ترتیب که میزان فعالیت بازدارندگی A13 و A14 به‌ترتیب در سنجش فعالیت آنتاگونیستی در <i>In vitro</i> به‌میزان ۵۴/۰۸ و ۵۰/۵۷ درصد، در سنجش تولید مواد فرار ضد قارچی به‌میزان ۴۴ و ۷۶ درصد، و در سنجش <i>In vivo</i> به‌میزان ۸۰/۰۸ و ۸۲/۹۷ درصد علیه قارچ بیمارگر بود. A13 و A14 طی شناسایی مولکولی، به‌ترتیب تحت‌عنوان <i>Aureobasidium pullulans</i> و <i>Rhodotorula graminis</i> SBAN-IAUF-4 و SBAN-IAUF-11، با شماره‌های دسترسی PP741871 و PP741860 در NCBI ثبت شدند.

استناد: شفیعی، نوشین؛ بهشتی مآل، کیوان؛ عکافی، حمیدرضا و نیری، هاشم (۱۴۰۳). کنترل بیولوژیکی *Penicillium chrysogenum* توسط *Aureobasidium pullulans* و *Rhodotorula graminis* در سبب‌زمینی مهار زیستی *Penicillium chrysogenum* عامل بیمارگر سبب‌زمینی توسط *Aureobasidium pullulans* و *Rhodotorula graminis*. نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، ۱۳ (۱)، ۱-۱۷. DOI: <https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.383827.346>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.383827.346>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

سیب‌زمینی از نظر اهمیت غذایی در رتبه چهارم بعد از برنج، گندم و ذرت رتبه‌بندی شده است (Ibrahim et al., 2014). این گیاه بخش بزرگی از تغذیه جمعیت جهان در سال‌های آینده را به خود اختصاص خواهد داد و دارای اهمیت اقتصادی زیادی است ولی به خاطر بیماری‌های مختلف عملکرد این محصول به‌طور قابل توجهی افت می‌کند. بیماری‌های زیادی وجود دارد که غده‌های سیب‌زمینی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. شناسایی این بیماری‌ها و پیشگیری و درمان آن‌ها کمک در بهبود صنعت تولید سیب‌زمینی می‌کند (Fahim Abbas et al., 2013). در حال حاضر سطح زیر کشت سیب‌زمینی در دنیا و ایران ۱۶۴ هزار هکتار است (Dadrasi et al., 2022).

قارچ‌ها به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری‌های پس از برداشت سیب‌زمینی، خسارات اقتصادی زیادی در سراسر جهان ایجاد می‌کنند. تاکنون برخی از این قارچ‌های بیمارگر مانند *Aspergillus flavus*، *Rhizopus stolonifer*، *Fusarium oxysporum* و برخی از گونه‌های *Penicillium* از غده‌های پوسیده سیب‌زمینی جدا شده‌اند (Ibrahim et al., 2014). *Penicillium*، یک قارچ بیمارگر متعلق به جنس آسکومیست‌ها است که منجر به بیماری کپک آبی روی خیلی از مواد خوراکی مانند غلات، حبوبات، ذرت، میوه‌جات و سبزیجات می‌شود. این جنس شامل حدود ۳۰۰ گونه است. برای مثال *Penicillium solitum* آنزیمی به نام پلی‌گالاکتوروناز تولید می‌کند که باعث شکسته شدن دیواره سلولی و بیماری‌زایی قارچ در گیاهان می‌شود (Shah et al., 2023). کپک آبی سیب‌زمینی ابتدا از طریق زخم در غده‌ها نفوذ کرده و بافت داخلی را آلوده می‌کند. اولین علامت عفونت کپک آبی ایجاد لکه‌های نرم و آبی روی سطح غده است (Kim et al., 2016).

برای کنترل این بیماری‌ها، استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی بیشترین استفاده را دارد که معمولاً کم‌هزینه و اثربخش هستند. ولی استفاده مداوم از این قارچ‌کش‌ها باعث ایجاد سویه‌های قارچی مقاوم، سرطان‌زایی، آسیب به جنین و آلودگی محیط زیست می‌شود. بنابراین، استفاده از یک روش جایگزین برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت سیب‌زمینی ضروری است (Zhang et al., 2019).

عوامل مهار زیستی میکروبی به‌عنوان جایگزین موثر برای قارچ‌کش‌ها محسوب می‌شود. همچنین اکثر میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست که از سطح میوه‌ها جدا شده‌اند، بسیار با محیط سازگار هستند و ممکن است آنتاگونیست‌های بهتری نسبت به عوامل دیگر مهار زیستی باشند (Perez et al., 2016). به‌طور خاص، مخمرها به‌عنوان عوامل مهار زیستی، از مزایایی مانند سرعت بالای رشد در فرمانتور با استفاده از سوبسترای ارزان قیمت؛ تحمل زیاد نسبت به طیف گسترده ای از دما، pH و سطح اکسیژن؛ و توانایی تکثیر روی سطح میوه برای مدت طولانی برخوردارند (Ferraz et al., 2016). توانایی تکثیر مخمرها روی سطوح میوه‌ها و سبزیجات به دلیل استفاده آن‌ها از مواد مغذی میزبان بدون ایجاد بیماری‌زایی می‌باشد. تکثیر مخمر روی سطح میوه‌جات و سبزیجات باعث ایجاد رقابت غذایی و فضایی بین مخمرها و بیمارگرهای گیاهان و همچنین القا یک سری آنزیم‌های مرتبط با دفاع در میزبان می‌شوند (Zhu et al., 2019). علاوه بر این، آن‌ها مانند بسیاری از قارچ‌ها یا باکتری‌ها، اسپورهای آلرژی‌زا، مایکوتوکسین یا آنتی‌بیوتیک تولید نمی‌کنند (Edward-Rajanayagam et al., 2023).

در ابتدا استفاده از مخمرهای مهار زیستی علیه کپک‌های بیمارگر گیاهی توسط Jacobs and Van-Vuoren (۱۹۹۱) پیشنهاد شد. از آن زمان به بعد گزارشات متعددی از این روش برای کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی گزارش شد. Walker و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند سویه‌های *Pichia anomala*، *P. membranifaciens* و *Saccharomyces cerevisiae* مانع برخی پوسیدگی‌های چوب و بیمارگرهای قارچی گیاهان می‌شود. Weiler and Schimitt در سال ۲۰۰۳ *Fusarium oxysporum* را توسط *Zygosaccharomyces bailii* کنترل کردند. Santos and Marquina در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که *Botrytis cinerea*، عامل بیماری کپک خاکستری در انگور، توسط *P. membranifaciens* کنترل می‌شود (Santos et al., 2004; Rosa et al., 2010).

هدف از این مطالعه جداسازی بیمارگر قارچی سیب‌زمینی، برطرف کردن این بیمارگر توسط جدایه‌های جدید مخمرهای بومی منطقه اصفهان و بررسی مکانیسم مهار زیستی این آنتاگونیست‌ها در کنترل بیمارگر قارچی می‌باشد. به‌هرحال، هیچ

گزارشی مبنی بر جداسازی مخمرهای کشنده بومی و بررسی مکانیسم‌های بیوکنترلی آن‌ها علیه بیمارگرهای قارچی سیب‌زمینی وجود ندارد.

روش‌شناسی پژوهش

جداسازی و بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی بیمارگرهای قارچی سیب‌زمینی

غده‌های آسیب دیده سیب‌زمینی با آب مقطر شسته و سپس با پنبه الکلی خشک شدند. تکه‌های ۵×۵ میلی‌متر از قسمت‌های آسیب دیده توسط اسکالپل استریل بریده و روی محیط PDA (g/L، سیب‌زمینی، ۲۰۰؛ دکستروز، ۲۰؛ و آگار، ۲۰) کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. کلنی‌های مشابه از لحاظ ظاهری به پلیت‌های جدید منتقل شدند (Thilagam et al., 2018; Shah et al., 2023). جدایه‌های قارچی ابتدا از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی و سپس میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند (Ibrahim et al., 2014; Agu & Chidozie 2021).

تست بیماری‌زایی کپک

غده‌های سیب‌زمینی سالم در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۲ درصد (حجم/حجم) به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی و با آب مقطر شسته و خشک شدند. یک طرف غده‌ها توسط یک خلال دندان استریل سوراخ و به میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ به غلظت ۱×۱۰^۶ کنیدی بر میلی‌لیتر در این حفره‌ها تزریق شد. پس از قرار دادن غده‌ها داخل بسته‌های پلاستیکی، به منظور حفظ رطوبت ته ظرف مقداری آب مقطر استریل ریخته شد. این بسته‌ها به مدت ۳ هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس مجدداً اقدام به جداسازی و خالص‌سازی جدایه قارچی تلقیح شده گردید (تقی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱).

شناسایی مولکولی بیمارگر کپکی سیب‌زمینی

DNA ژنومی کپک به شرح زیر استخراج شد. یک لوپ پر از کپک به میکروتیوب حاوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز، ۳۰۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم و ۳۰۰ میلی‌گرم گلاسبید^۱ قرار داده، به مدت ۳ دقیقه ورتکس و با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی به یک لوله جدید منتقل و به میزان حجم یکسان کلروفرم به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی به یک لوله جدید منتقل و ۲/۵ برابر حجم آن اتانول مطلق و ۰/۱ حجم آن استات سدیم ۳ مولار با pH ۵/۲ اضافه گردید. سپس به مدت حداقل ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع‌رویی دور انداخته شد. رسوب با اتانول سرد (۷۰ درصد) شسته شد. سپس به میکروتیوب‌های کاملاً خشک شده ۳۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به عنوان DNA خالص تا انجام مرحله PCR نگهداری شد (Erami et al., 2023). تکثیر DNA با استفاده از پرایمرهای عمومی ITS1-ITS4 در مخلوط واکنشی به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس، ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس و ۲ میکرولیتر DNA الگو صورت گرفت. این واکنش شامل دناتوراسیون اولیه^۲ در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه؛ به دنبال آن ۳۵ چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه؛ و اکستنشن نهایی^۳ در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه بود. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد (وزن/حجم) در بافر TBE، با اتیدیوم بروماید (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رنگ آمیزی و سپس با استفاده از نور UV مشاهده شدند. محصولات PCR به منظور تعیین توالی به

1Glass bead

2Initial denaturation

3Final extension

شرکت زیست فن‌آوری پیشگام ارسال شدند. توالی‌ها بعد از ارزیابی نوکلئوتید به نوکلئوتید و اصلاح نهایی به منظور تعیین جنس و گونه، بلاست و در بانک جهانی NCBI ثبت شدند (Aboutalebian et al., 2019).

جداسازی مخمرهای بومی

میوه‌ها و برگ‌های گیاهانی مانند سیب، نارنج، نارنگی، پرتقال، گریپ فروت، کامکوات و سیب زمینی جمع‌آوری شد. سوپ‌های مرطوب استریل روی سطح برگ‌ها و میوه کشیده و با فاصله در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ ml محیط YEPD-Broth (گرم/لیتر، عصاره مخمر، ۱۰؛ پپتون، ۲۰؛ و دکستروز، ۲۰) همراه با ۱۰۰ mg/l آمپی‌سیلین و ۵۰ mg/l کلرامفنیکل قرار داده شدند. ارلن‌ها در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴h با سرعت ۱۴۰ دور بر دقیقه هوادهی شدند. سپس این سوسپانسیون روی YEPD-Agar (گرم/لیتر، عصاره مخمر، ۱۰؛ پپتون، ۲۰؛ دکستروز، ۲۰؛ و آگار، ۲۰) حاوی آنتی‌بیوتیک کشت خطی داده شد. پلیت‌ها در ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸h انکوبه شدند. سپس به منظور خالص‌سازی، کلنی‌های مشابه به پلیت دیگر پاساژ داده شدند. در نهایت کلنی‌های خالص‌شده از لحاظ ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند (Perez et al., 2016).

سنجش فعالیت بازدارندگی مخمر

یک سوسپانسیون کنیدی از کپک ۵ روزه به غلظت 10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون روی سطح یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت YEPD-MB (گرم/لیتر، عصاره مخمر، ۱۰؛ پپتون، ۲۰؛ دکستروز، ۲۰؛ آگار، ۲۰؛ و متیلن بلو، ۰/۰۳) بافرشده در pH ۴/۷-۴/۳ پخش شد. سویه‌های مختلف مخمر در مناطقی به قطر ۰/۸ cm در پلیت توسط خلال دندان استریل لکه‌گذاری شدند. انکوباسیون پلیت‌ها ۳-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد (Moura et al., 2021).

شناسایی مولکولی مخمرهای کشنده

برای شناسایی مخمرها از روش کلنی-PCR استفاده شد. به این ترتیب که یک کلنی از مخمر خالص ۴۸ ساعته در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون و در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس داخل یخ قرار داده شد. نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت ۱ میکرولیتر از فاز رویی جهت انجام PCR استفاده شد. تکثیر DNA با استفاده از پرایمرهای 5'-Fuy1 و 3'-TGAAACTGCGAATGGCTC-3' Ru1 و 5'-CAGGCACACCCCGACTATCC-3' انجام شد. این پرایمرها یونیورسال و مربوط به 18S-rRNA هستند که بر اساس مطالعات همولوژی طراحی شدند. این واکنش شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه؛ به دنبال آن ۳۵ چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۴۸ درجه سلسیوس برای ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۵۰ ثانیه؛ و اکستنشن نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه صورت گرفت. پس از الکتروفورز و مشاهده طول محصول PCR، قطعه تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت زیست فن‌آوری پیشگام ارسال شد. توالی‌ها بعد از ارزیابی نوکلئوتید به نوکلئوتید و اصلاح نهایی به منظور تعیین جنس و گونه، بلاست و در بانک جهانی NCBI ثبت شدند (Walch et al., 2016).

سنجش فعالیت آنتاگونیستی مخمر علیه قارچ در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)

این تست بر اساس کشت همزمان قارچ بیمارگر و مخمر آنتاگونیست در یک پلیت انجام شد. به این ترتیب که به منظور تهیه پلیت‌های تیمار، یک سوسپانسیون کنیدی از قارچ بیمارگر ۵ روزه به غلظت 1×10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر تهیه شد. ۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون در مرکز پلیت‌های PDA ریخته شد. سپس مخمر ۴۸ ساعته در محیط YEPD-Agar در ۲ قسمت کناری پلیت، به صورت موازی و به فاصله ۳ cm از مرکز پلیت کشت داده شد. پلیت کنترل، شامل پلیت PDA تلقیح شده با سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر بدون مخمر بود. پلیت‌ها در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ روز انکوبه شدند (Perez et al., 2016).

(et al., 2016). سپس قطر قارچ‌های رشد یافته اندازه گیری و مساحت آن‌ها محاسبه گردید. در نهایت میزان کنترل اعمال شده یا بازدارندگی این مخمر به عنوان شاخص کنترل (CI) طبق فرمول ۱ محاسبه شد (Sanzani et al., 2021). این آزمایش ۳ بار تکرار شد.

فرمول (۱)

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

n = میزان مهار رشد پاتوژن

a = مساحت عامل بیماری در پلیت شاهد

b = مساحت عامل بیماری در پلیت تیمار

بررسی تولید ترکیبات فرار ضد قارچی توسط مخمر

یک سوسپانسیون از جدایه‌های مخمر ۴۸ ساعته به غلظت 1×10^8 cell/ml تهیه و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون روی پلیت YEED-Agar پخش شد. این پلیت ها ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون کنیدی قارچ ۵ روزه به غلظت 10^6 در مرکز پلیت‌های PDA تلقیح شد. پلیت حاوی قارچ بیمارگر با پلیت حاوی مخمر ۲۴ ساعته به صورت رو در رو قرار گرفتند. سپس به منظور عدم ورود و خروج هوا، ۳ دور پارافیلیم به دور آن‌ها پیچیده شد. این پلیت ها ۱۰ روز در ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پلیت کنترل، شامل محیط PDA تلقیح شده با سوسپانسیون اسپور قارچ بصورت فیس توفیس با پلیت فاقد مخمر بود. در نهایت درصد نسبی مهار رشد قارچ بیمارگر توسط مواد فرار تولید شده از مخمر طبق فرمول ۱ سنجیده شد. این آزمایش ۳ بار تکرار شد (Agirman & Erten, 2020).

سنجش فعالیت آنتاگونیستی مخمر علیه قارچ در *In vivo*

ابتدا سیب‌زمینی‌های سالم با هیپوکلریت سدیم $0.2\% (v/v)$ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و در آب مقطر شسته شدند. سپس روی هر غده با خلال دندان استریل، سه سوراخ در یک راستا ایجاد و در هر سوراخ ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر آنتاگونیست به غلظت 1×10^8 cell/ml و $20 \mu l$ سوسپانسیون اسپور بیمارگر به غلظت 1×10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر تزریق شد. برای کنترل مثبت، سوسپانسیون بیمارگر و برای کنترل منفی، سوسپانسیون آنتاگونیست یا آب مقطر استریل به غده‌ها تزریق گردید. پس از قرار دادن غده‌های تیمار شده درون بسته‌های پلاستیکی، به منظور حفظ رطوبت ته این ظروف مقداری آب مقطر استریل ریخته شد. این بسته‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ هفته قرار گرفتند (شریفی و همکاران، ۲۰۰۹). پس از اندازه‌گیری میانگین قطر زخم در گروه‌های کنترل و تیمار، میزان بازدارندگی رشد بیمارگر توسط جدایه‌های مخمر بر اساس فرمول ۱ سنجیده شد.

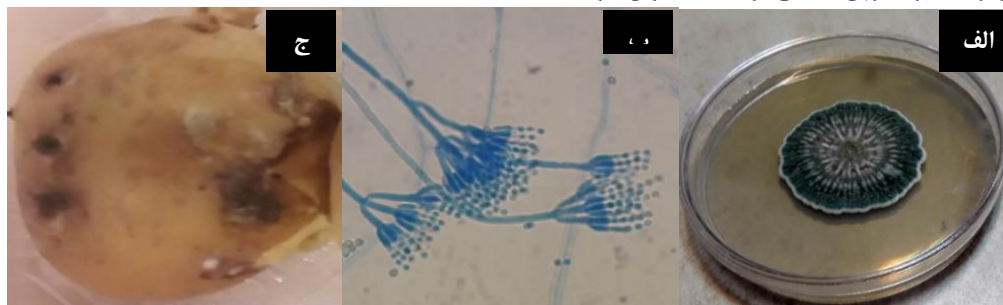
یافته‌های پژوهش

جداسازی و بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی بیمارگرهای قارچی سیب‌زمینی

در این بررسی از غده‌های سیب‌زمینی آسیب‌دیده در مناطق مختلف استان اصفهان از جمله فروشگاه‌ها، مزارع و انبارهای مختلف شهر اصفهان، داران، فریدون‌شهر و سامان نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی قارچ صورت گرفت. تعدادی از جدایه‌های قارچی که دارای خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مشابه بودند، به عنوان بیمارگر قارچی سیب‌زمینی در نظر گرفته شدند. بررسی‌های ماکروسکوپی (شکل ۱الف) و میکروسکوپی (شکل ۱ب) نشان داد که این جدایه‌ها مربوط به گونه‌ای *Penicillium* می‌باشند. جدایه P8، به عنوان گونه‌ای *Penicillium* جداسازی شده از غده سیب‌زمینی منطقه سامان، برای مطالعات بیشتر به عنوان بیمارگر قارچی سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت.

تست بیماری‌زایی *Penicillium*

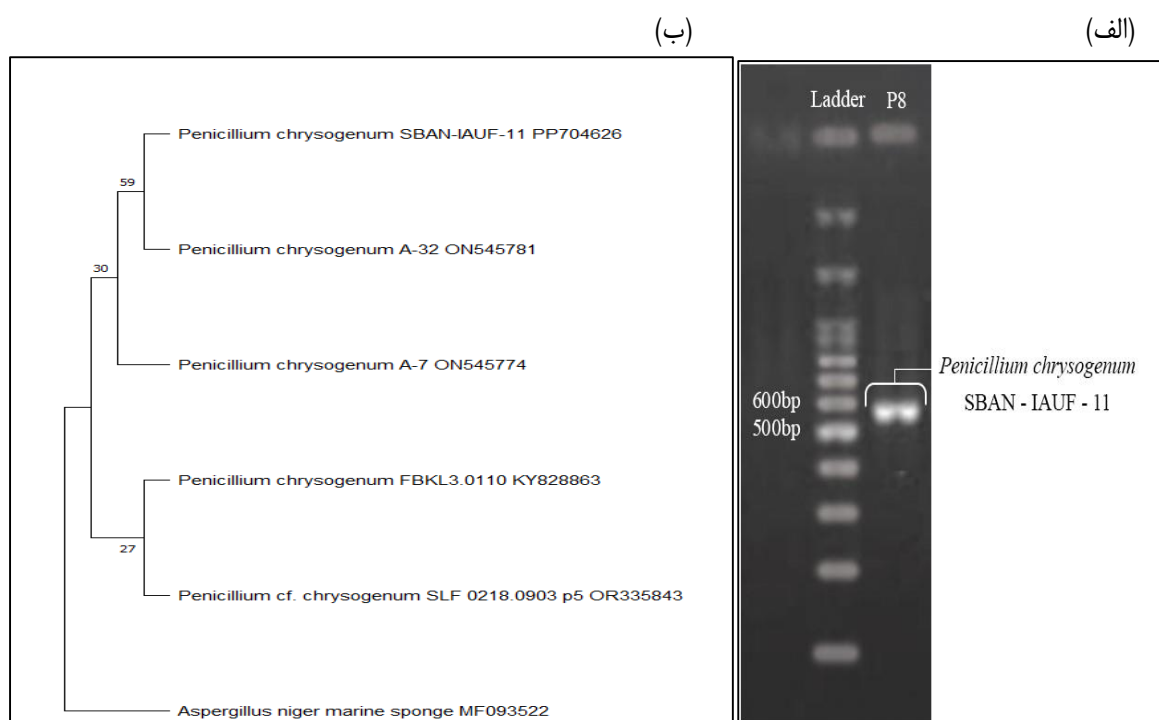
این تست بر اساس اصول کخ انجام شد. به این ترتیب که ۳ هفته پس از تلقیح سوسپانسیون کنیدی جدایه P8 به سیب‌زمینی، وجود بیماری و پوسیدگی قارچی در آن از نظر ظاهری تایید شد (شکل ۱ج). مجدداً از قسمت‌های دیگر سیب‌زمینی که در آن تلقیح اولیه صورت نگرفته بود روی محیط PDA کشت داده و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. قارچ رشد یافته پس از بررسی‌های میکروسکوپی و میکروسکوپی با قارچ اولیه، به عنوان گونه‌ای *Penicillium*، مطابقت داشت.



شکل ۱. الف) شکل میکروسکوپی جدایه قارچ. ب) شکل میکروسکوپی جدایه قارچ. ج) فنوتیپ پوسیده سیب‌زمینی پس از تلقیح قارچ

شناسایی مولکولی بیمارگر قارچی سیب‌زمینی

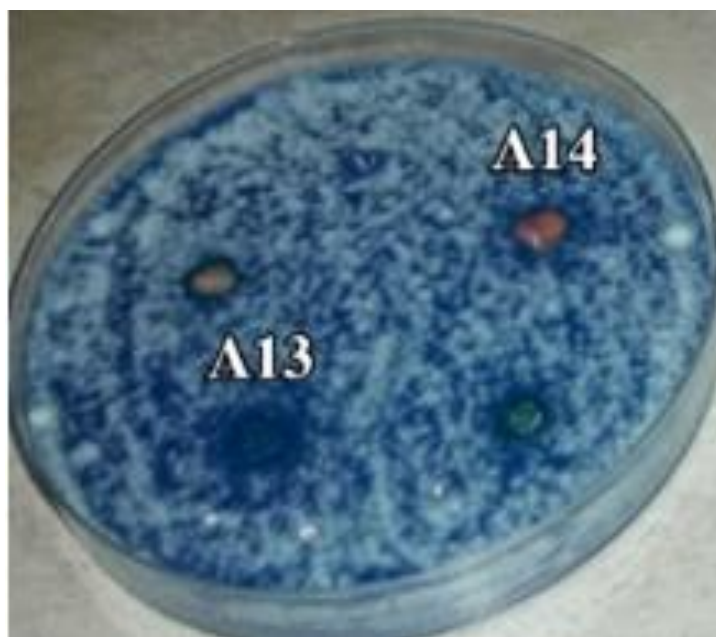
برای شنایی این بیمارگر قارچی سیب‌زمینی در حد گونه، از روش شناسایی مولکولی استفاده شد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR در این جدایه با استفاده از مارکر ۱۰۰ بیس‌پیر نشان داد که طول محصول بین ۵۰۰-۶۰۰ بیس‌پیر است (شکل ۲ الف). همچنین نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد که طول این محصول ۵۷۰ بیس‌پیر است. پس از تطابق دادن توالی s-18rDNA با تمام توالی‌های موجود در بانک ژنی، توسط نرم افزار BLAST مشخص گردید که این جدایه با توالی SLF-*Penicillium chrysogenum* 0218.0915 p4، ۹۵ درصد پوشش و ۹۹/۲۶ درصد مشابهت دارد. درخت فیلوژنی قطعه ترادف-یابی شده این جدایه رسم شد (شکل ۲ ب). سپس سویه شناسایی شده در بانک جهانی NCBI تحت عنوان SBAN-IAUF-*Penicillium chrysogenum* 11 با شماره دسترسی PP704626.1 ثبت شد.



شکل ۲. الف) نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR جدایه قارچ. ب) رسم درخت فیلوژنی برای *Penicillium chrysogenum* SBAN-IAUF-11 با استفاده از روش Bootstrap consensus و انتخاب *Aspergillus niger* به عنوان Out group.

سنجش فعالیت بازدارندگی مخمر

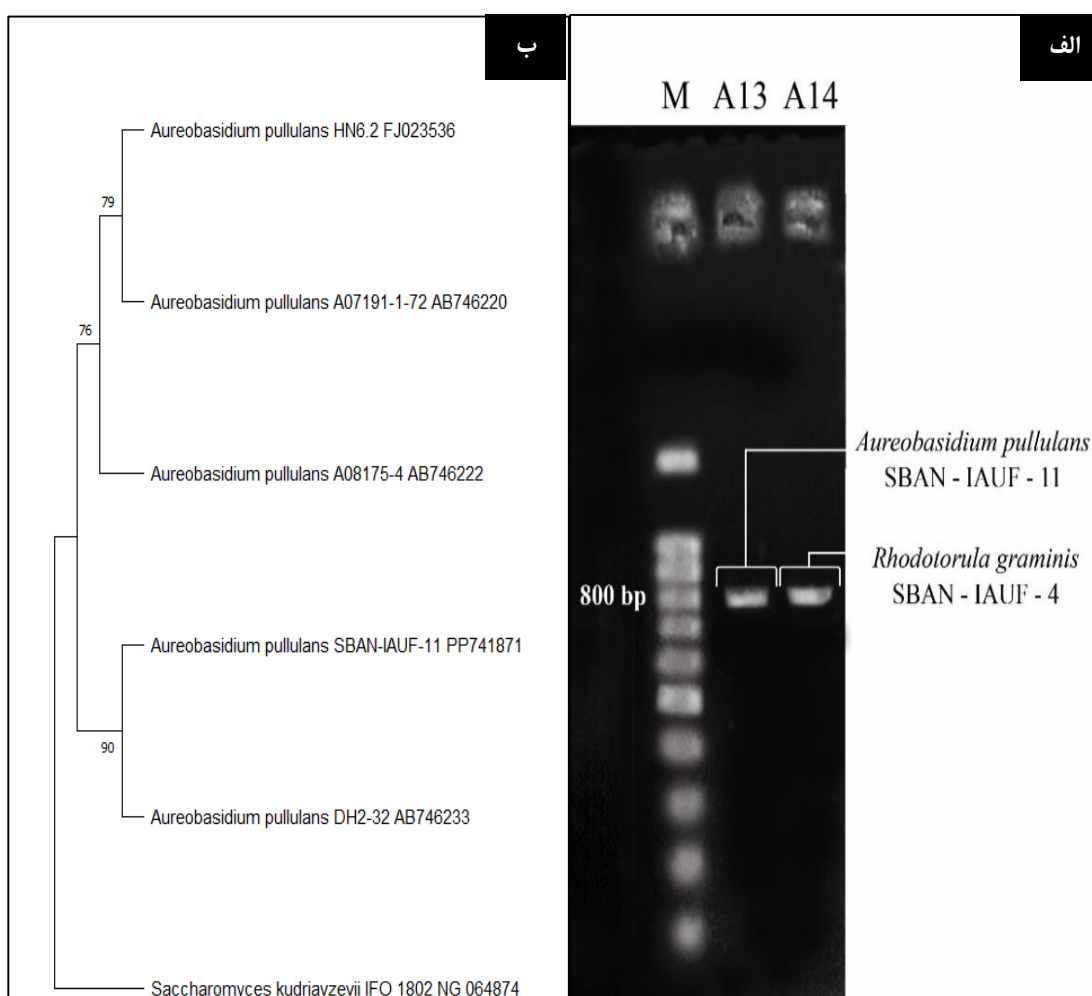
در این بررسی همه جدایه‌های مخمری روی محیط YEPD-MB، که قبلاً توسط سوسپانسیون *Penicillium chrysogenum* پخش شده بود، لکه‌گذاری شدند. پس از دوره انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف هر جدایه اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که جدایه‌های A13 و A14 که از میوه سیب قرمز جدا شده بودند، با تولید هاله عدم رشد اطراف خودشان، دارای اثر کشندگی بیشتری نسبت به سایر جدایه‌های مخمری علیه قارچ بیمارگر بودند (شکل ۳).

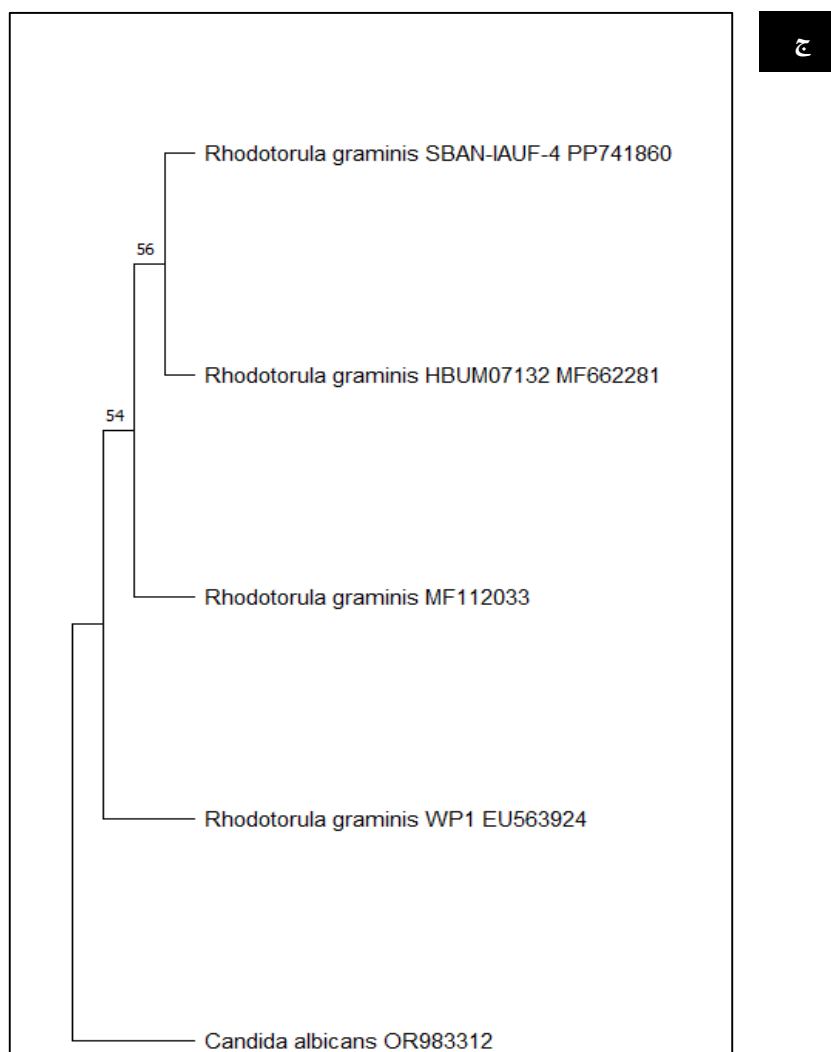


شکل ۳. نتایج حاصل از سنجش فعالیت کشندگی جدایه‌های A13 و A14

شناسایی مولکولی مخمرهای کشنده

برای شناسایی ۲ جدایه A13 و A14 در حد گونه، به عنوان برترین جدایه‌های آنتاگونیست، از روش شناسایی مولکولی استفاده شد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR در این جدایه با استفاده از مارکر ۱۰۰ بیس‌پیر نشان داد که طول محصول ۸۰۰ بیس‌پیر است (شکل ۴ الف). پس از تطابق دادن توالی ۱۸s-rDNA با تمام توالی‌های موجود در بانک ژنی، توسط نرم افزار Blast مشخص گردید که جدایه A13 با توالی *Aureobasidium pullulans* 19GCAS005، ۹۷ درصد پوشش و ۹۷/۲۶ درصد مشابهت، همچنین جدایه A14 با توالی *Rhodotorula graminis* culture MUT<ITA>:73، ۹۸ درصد پوشش و ۹۹ درصد مشابهت دارد. سویه‌های شناسایی شده تحت عنوان *Aureobasidium pullulans* SBAN-IAUF-11 و *Rhodotorula graminis* SBAN-IAUF-4 به ترتیب با شماره دسترسی PP741871 و PP741860 در NCBI ثبت شدند. درخت فیلوژنی *Aureobasidium pullulans* SBAN-IAUF-11 (شکل ۴ ب) و *Rhodotorula graminis* SBAN-IAUF-4 (شکل ۴ ج) رسم شد.

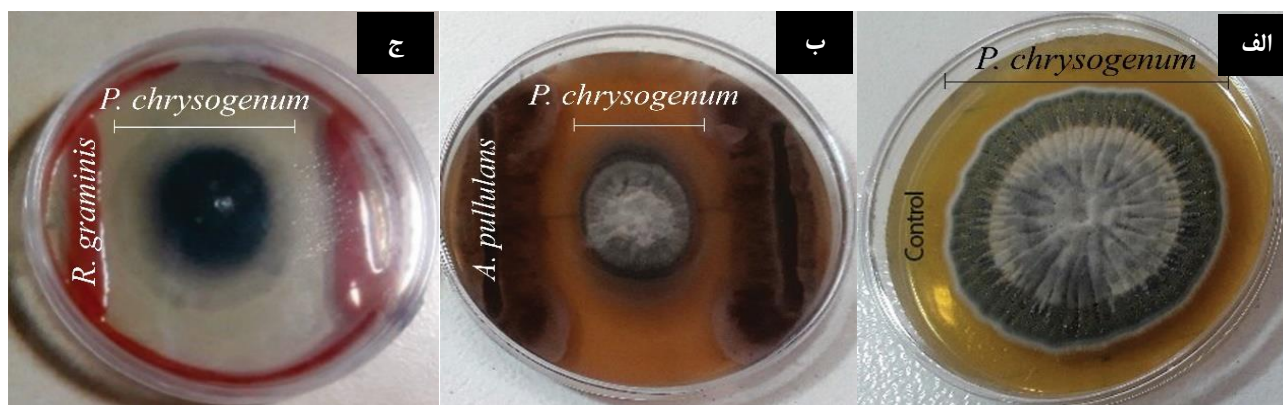




شکل ۴. الف) نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR در *Aureobasidium pullulans* و *Rhodotorula graminis*. ب) رسم درخت فیلوژنی برای *Aureobasidium pullulans* SBAN-IAUF-11 با استفاده از روش Bootstrap consensus و انتخاب *Saccharomyces kudriavzevii* به عنوان Out group. ج) رسم درخت فیلوژنی برای *Rhodotorula graminis* SBAN-IAUF-4 با استفاده از روش Bootstrap consensus و انتخاب *Candida albicans* به عنوان Out group.

سنجش فعالیت آنتاگونیستی مخمر علیه قارچ در *In vitro*

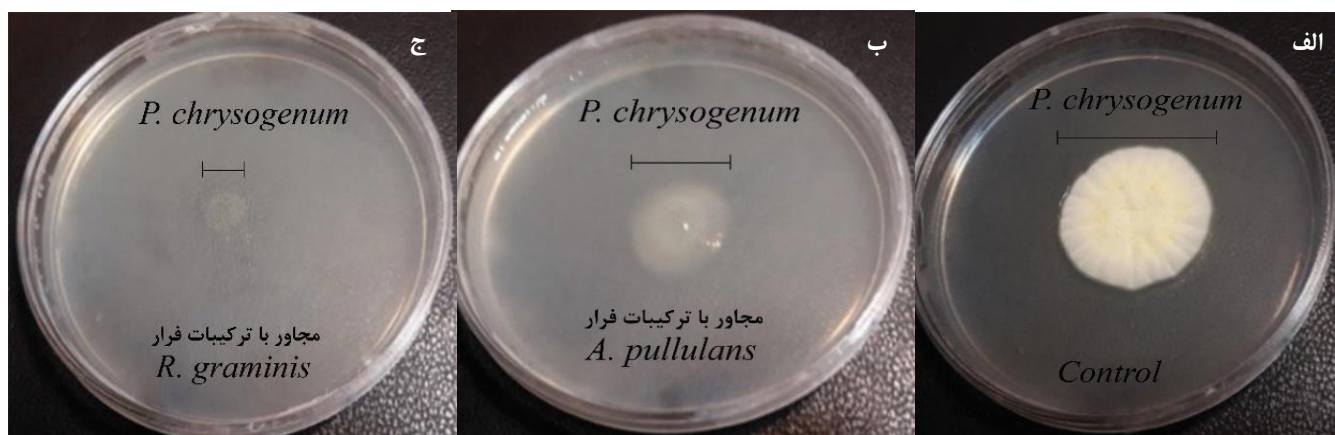
سنجش فعالیت آنتاگونیستی *A. pullulans* و *R. graminis* علیه *P. chrysogenum* به عنوان کپک بیمارگر انجام شد. قطر کپک بیمارگر رشد یافته در کلیه پلیت‌های کنترل (شکل ۵ الف)، تیمار شده با *A. pullulans* (شکل ۵ ب) و تیمار شده با *R. graminis* (شکل ۵ ج) اندازه‌گیری و بر اساس فرمول ۱ میزان مهار شدگی کپک بیمارگر توسط این دو مخمر محاسبه شد. براساس نتایج حاصل از این تست *A. pullulans* و *R. graminis* به ترتیب به میزان ۵۴/۰۸ و ۵۰/۵۷ درصد رشد کپک بیمارگر را کاهش دادند.



شکل ۵. الف) پلیت شاهد: محیط PDA که در آن فقط *P. chrysogenum* کشت داده شده است. ب) پلیت تیمار شده با *A. pullulans*: محیط PDA که در آن *P. chrysogenum* و *A. pullulans* به‌طور همزمان کشت داده شده است. ج) پلیت تیمار شده با *R. graminis*: محیط PDA که در آن *P. chrysogenum* و *R. graminis* به‌طور همزمان کشت داده شده است.

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی توسط مخمر

تست تولید ترکیبات فرار ضد قارچی توسط *A. pullulans* و *R. graminis* علیه *P. chrysogenum* انجام شد. قطر کپک رشد یافته در پلیت کنترل (شکل ۶ الف)، پلیت حاوی کپک رشد یافته در مجاورت ترکیبات فرار *A. pullulans* (شکل ۶ ب) و پلیت حاوی کپک رشد یافته در مجاورت ترکیبات فرار *R. graminis* (شکل ۶ ج) اندازه‌گیری و بر اساس فرمول ۱ میزان مهار شدگی کپک توسط این دو جدایه محاسبه شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که *A. pullulans* و *R. graminis* با تولید ترکیبات فرار ضد قارچی به‌ترتیب به میزان ۴۴ و ۷۶ درصد، دارای خاصیت بازدارندگی بودند.

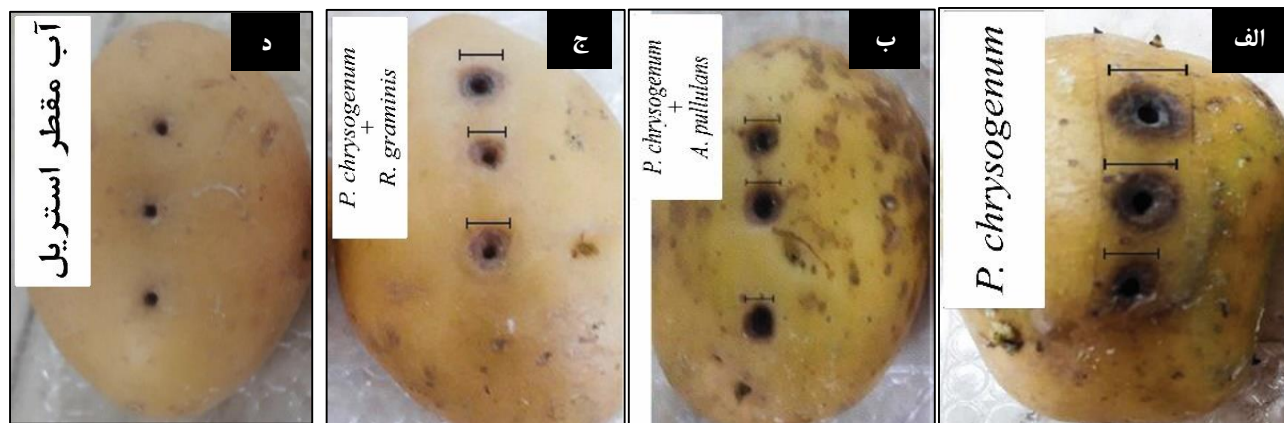


شکل ۶. الف) پلیت کنترل: کپک رشد یافته بدون مجاورت با ترکیبات فرار تولید شده توسط مخمر. ب) کپک رشد یافته در مجاورت با ترکیبات فرار تولید شده توسط *A. pullulans* (ج) کپک رشد یافته در مجاورت با ترکیبات فرار تولید شده توسط *R. graminis*

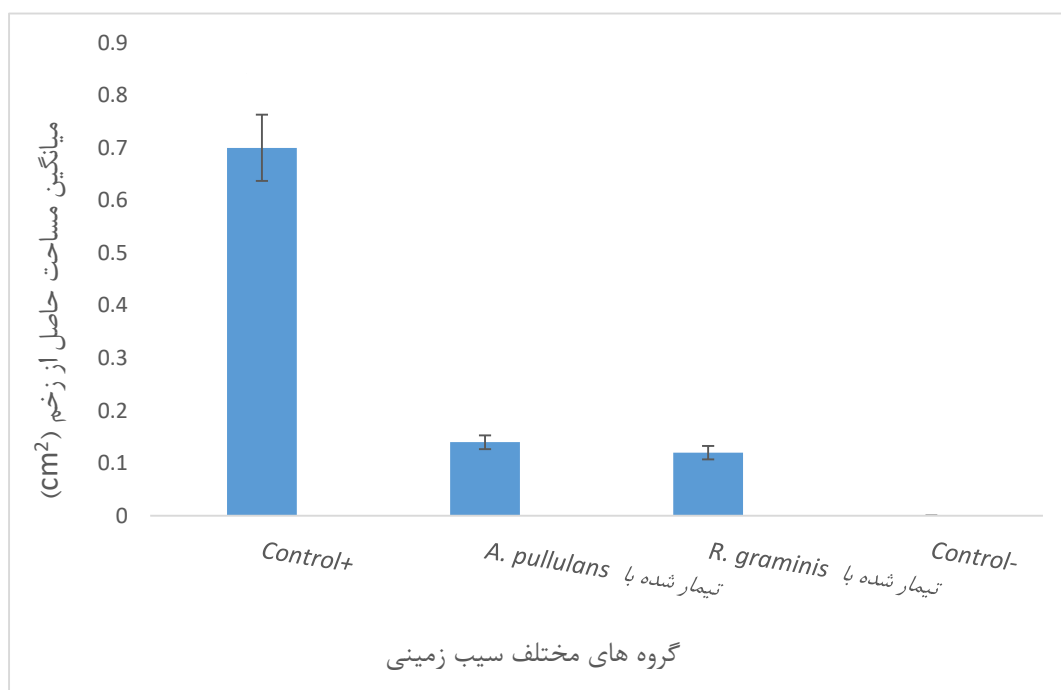
سنجش فعالیت آنتاگونیستی مخمر علیه قارچ در In vivo

در این آزمایش پس از اندازه‌گیری قطر زخم، میزان میانگین مساحت پوسیدگی پس از ۱۴ روز در گروه‌های کنترل مثبت (شکل ۷ الف)، تیمار شده با *A. pullulans* (شکل ۷ ب)، تیمار شده با *R. graminis* (شکل ۷ ج) و کنترل منفی (شکل ۷ د)

به ترتیب ۰/۶۹۳، ۰/۱۳۸، ۰/۱۱۸ و ۰ سانتی متر مکعب بود (شکل ۸). طبق فرمول ۱ میزان بازدارندگی *A. pullulans* و *R. graminis* علیه کپک بیمارگر به ترتیب به میزان ۸۰/۰۸ و ۸۲/۹۷ درصد بود.



شکل ۷. الف) کنترل مثبت: تلقیح قارچ بیمارگر به سیب زمینی. ب) تیمار شده توسط *A. pullulans*: تلقیح قارچ بیمارگر و *A. pullulans* به سیب زمینی. ج) تیمار شده توسط *R. graminis*: تلقیح قارچ بیمارگر و *R. graminis* به سیب زمینی. د) کنترل منفی: تلقیح آب مقطر تزریق شده به سیب زمینی.



شکل ۸. میزان میانگین مساحت پوسیدگی سیب زمینی های مایه زنی شده در گروه های مختلف سیب زمینی پس از ۲ هفته. میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($P < 0.05$) با هم اختلاف معنی دار دارند.

بحث

در این مطالعه برای اولین بار در ایران از غده های سیب زمینی پوسیده *P. chrysogenum* SBAN-IAUF-11، به عنوان قارچ بیمارگر سیب زمینی، جداسازی شد. غده های پوسیده منطقه سامان در استان اصفهان که دارای لکه های قهوه ای مایل به

سبز همراه با بوی تعفن بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. کپک جدا شده از این غده‌ها دارای مرفولوژی یکسان و مربوط به گونه‌ای *Penicillium* بود. این جدایه طی شناسایی مولکولی به عنوان، *P. chrysogenum* شناسایی شد. از طرفی برای اولین بار در کره جنوبی، کپک آبی بنام *P. oxalicum* از ریشه سیب‌زمینی شیرین جداسازی شد (Paul et al., 2016). همچنین طی بررسی روی بیماری‌های پس از برداشت سیب‌زمینی، دو گونه *Penicillium* به نام‌های *P. sclerotigenum* و *P. polonicum* از غده‌های پوسیده سیب‌زمینی در کره جنوبی جداسازی شدند (Kim et al., 2016). از طرفی در پاکستان، ۳ گونه *Penicillium* به نام‌های *P. solitum*، *P. polonicum* و *P. citrinum* از سیب‌زمینی‌های پوسیده جداسازی و شناسایی شدند (Shah et al., 2023). جداسازی گونه‌های مختلف *Penicillium* از سیب‌زمینی‌های پوسیده طی تحقیقات حاضر و سراسر جهان نشان می‌دهد که این بیمارگرهای گیاهی می‌توانند تهدید بزرگی برای سیب‌زمینی در مرحله انبار محسوب شوند.

به‌طور کلی جداسازی مخمرهایی که به طور طبیعی در سطح برگ و میوه گیاهان وجود دارند به دلیل سازگار بودن آن‌ها با شرایطی که در میوه و سبزی حاکم است و همچنین بی‌خطر بودن آن‌ها الویت دارند. بنابراین در این مطالعه، مخمرهای بومی معمولاً از سطوح برگ و میوه گیاهان جداسازی شدند. همچنین برای سنجش فعالیت کشندگی از پلیت‌هایی حاوی محیط کشت YEPD-MB بافرشده در pH ۴/۳-۴/۷ استفاده شد. براساس مطالعات قبلی، برای اولین بار توسط Woods & Bevan مشخص شد فعالیت کشندگی مخمرها در این رنج از pH به حداکثر می‌رسد (Perez et al., 2016). از طرفی در یک مطالعه از پلیت‌هایی حاوی محیط کشت YEPD-MB بافرشده در pH ۴/۳-۴/۷ برای سنجش کشندگی مخمرها استفاده شد (Rosa et al., 2010). همچنین در یک بررسی دیگر از پلیت‌هایی حاوی محیط کشت YEPD-MB بافرشده در pH ۴/۶ استفاده شد (Moura et al., 2020). در آزمایش حاضر برای سنجش کشندگی مخمرها علیه بیمارگرهای قارچی، لکه‌گذاری جدایه‌های مخمر روی محیط YEPD-MB، که قبلاً توسط سوسپانسیون *P. chrysogenum* SBAN-IAUF-11 پخش شده بود، انجام شد. درحالی که در مطالعات قبلی از *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 به عنوان سلول حساس، برای سنجش اثر کشندگی مخمرها علیه سلول‌های کپکی استفاده شد (Moura et al., 2021; Rosa et al., 2010). استفاده از سلول کپک، به عنوان سلول حساس، به جای سویه استاندارد مخمر انتخاب دقیق‌تری جهت شناسایی مخمرهای کشنده علیه کپک مورد نظر بود.

در مطالعه حاضر *A. pullulans* SBAN-IAUF-11 و *R. graminis* SBAN-IAUF-4، با تولید ترکیبات فرار ضد قارچی باعث کاهش رشد *P. chrysogenum* SBAN-IAUF-11 به ترتیب به میزان ۴۴ و ۷۶ درصد شدند. همچنین در یک مطالعه دیگر تولید ماده فرار ضد قارچی توسط ۲ سویه *A. pullulans* به نام‌های L1 و L8 بررسی شد. در این بررسی، سویه L1 کپک‌های بیمارگر سیب، به نام‌های *B. cinerea*، *Colletotrichum acutatu* و *Penicillium expansum* را به ترتیب به میزان ۲۹/۴، ۲۷/۵ و ۱۷/۶ درصد؛ و سویه L8 این ۳ کپک را به ترتیب به میزان ۴۳/۱، ۱۲/۵ و ۲۷/۶ درصد کاهش داد (Mari et al., 2012). از طرفی یک مطالعه دیگر، *A. pullulans* GE1 با تولید مواد فرار ضد قارچی از رشد ۲ کپک بیمارگر سیب به نام‌های *P. digitatum* و *P. expansum* به ترتیب به میزان ۳۴/۲۱ و ۳۵/۶۱ درصد جلوگیری کرد (Agirman & Erten, 2019). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از میزان بازدارندگی رشد کپک بیمارگر توسط تولید ترکیبات فرار ضد قارچی در ۲ سویه شناسایی شده بیشتر از سویه‌های مذکور در مطالعات قبلی بود.

در مطالعه حاضر طی سنجش *In vivo* *A. pullulans* SBAN-IAUF-11 و *R. graminis* SBAN-IAUF-4 میزان پوسیدگی *P. chrysogenum* SBAN-IAUF-11 را در سیب زمینی به ترتیب به میزان ۸۰/۰۸ و ۸۲/۹۷ درصد کاهش دادند. از طرفی در بررسی‌های قبلی طی سنجش *In vivo*، استفاده از سویه‌های مختلف *A. pullulans* به نام‌های L47، LS236 و LS250 باعث کاهش کپک‌های بیمارگر انگور شد. به این ترتیب که سویه‌های L47، LS236 و LS250 به ترتیب *Rhizopus stolonifera*، *Aspergillus niger* و *B. cinerea* را به میزان ۵۴/۸، ۷۰/۷ و ۶۱/۳ درصد کاهش داد (Schena et al., 1999). همچنین در مطالعات دیگر، طی سنجش *In vivo*، استفاده از سویه‌های مختلف *A. pullulans* باعث کاهش پوسیدگی کپکی گیلاس و گوجه‌فرنگی، که عامل آن‌ها *B. cinerea* و *Phytophthora infestans* بود، به میزان ۴۷ و ۳۲/۲ درصد شد (Schena

(et al., 2003; Di Francesco et al., 2017). همچنین در یک مطالعه دیگر میزان پوسیدگی *Geotrichum citri-aurantii* در پرتقال طی سنجش *In vivo* با استفاده از سویه‌ای از *A. pullulans* به میزان ۳۰ درصد کاهش یافت (Ferraz et al., 2016). بنابراین میزان بازدارندگی *A. pullulans* SBAN-IAUF-11 در تحقیق حاضر نسبت به سایر سویه‌های *A. pullulans* در مطالعات قبلی بالاتر بود.

این برای اولین بار است که *R. graminis* به عنوان یک مخمر مهار زیستی علیه *Penicillium sp* مطرح می‌شود. از طرفی در مطالعات قبلی خاصیت مهار زیستی *A. pullulans* علیه گونه‌های مختلف *Penicillium* مانند *Penicillium expansum* و *Penicillium digitatum* در سیب و گلابی بررسی شده است (Mounir et al., 2007; Agirman & Erten, 2020; Ferreira- Pinto et al., 2006). ولی برای اولین بار است که خاصیت مهار زیستی *A. pullulans* علیه *P. chrysogenum* در محافظت از غده سیب‌زمینی مطرح می‌شود. برای مثال Schena و همکاران (۲۰۰۳)، Mari و همکاران (۲۰۱۲)، Di Francesco و همکاران (۲۰۱۷)، Klein and Kupper (۲۰۱۸)، Galli و همکاران (۲۰۲۱) و Di Francesco و همکاران (۲۰۲۱) خاصیت مهار زیستی *A. pullulans* را به ترتیب روی پوسیدگی‌های قارچی در گیلاس، سیب، گوجه فرنگی، مرکبات، انگور و غلات که بررسی کردند ولی تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر سنجش خاصیت مهار زیستی *A. pullulans* علیه بیماری‌های قارچی سیب‌زمینی صورت نگرفته است.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر طی سنجش‌های فعالیت کشندگی، آنتاگونیستی در *In vivo-In vitro*، و تولید ترکیبات فرار مشخص شد *A. pullulans* SBAN-IAUF-11 و *R. graminis* SBAN-IAUF-4 به عنوان سویه‌های جدید جداسازی شده از مناطق بومی استان اصفهان، دارای خاصیت مهار زیستی بالایی علیه *P. chrysogenum* SBAN-IAUF-11، به عنوان کپک بیمارگر سیب-زمینی، هستند. زیرا میزان فعالیت کشندگی و آنتاگونیستی در *In vitro-In vivo* در آن‌ها بالاتر از ۵۰ درصد بود. این سویه‌های جدید می‌توانند در آینده در پیشگیری و کنترل گونه‌های مختلف *Penicillium* در سیب‌زمینی و محصولات کشاورزی دیگر، به عنوان جایگزین قارچ‌کش‌ها، مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

تقی‌زاده، زهرا؛ محمدی، صدیقه؛ علایی، حسین (۱۳۹۱). کنترل بیولوژیک پوسیدگی خشک فوزاریومی غده‌های سیب‌زمینی توسط گونه‌های آنتاگونیست *Trichoderma spp* و *Talaromyces flavus*. فصلنامه فیزیولوژی و تکنولوژی پس از برداشت فراورده‌های باغی، ۷۵-۸۷.

شریفی، کسری؛ زارع، رسول؛ زمانی زاده، حمید رضا؛ ارجمندیان، امیر (۱۳۸۷). بررسی گونه‌های فوزاریوم، عامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی در استان‌های اردبیل، تهران و همدان، مجله آفات و بیماری‌های گیاهی، ۹۳-۱۱۴.

REFERENCES

- Aboutalebian, S., Mahmoudi, S., Mirhendi, H., Okhovat, A., Abtahi, H., Chabavizadeh, J. (2019). Molecular epidemiology of otomycosis in Isfahan revealed a large diversity in causative agents. *Journal of medical microbiology*, 68(6), 918-923.
- 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.
- Agu, K.C., Chidozie, C. P. (2021). An improved slide culture technique for the microscopic identification of fungal species. *International Journal of Trend in Scientific Research and*

- Development*, 6(1), 243-254.
- Dadrasi, A., Torabi, B., Rahimi, A., Soltani, A., Zeinali, E. (2022). Modeling potential production and yield gap of potato using modelling and GIS approaches. *Ecological Modelling*, 471, p.110050.
- Di Francesco, A., Di Foggia, M., Corbetta, M., Baldo, D., Ratti, C., Baraldi, E. (2021). Biocontrol activity and plant growth promotion exerted by *Aureobasidium pullulans* strains. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1233- 1244.
- Di Francesco, A., Milella, F., Mari, M., Roberti, R. (2017). A preliminary investigation into *Aureobasidium pullulans* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora infestans* of tomato. *Biological control*, 114, 144-149.
- Edward-Rajanayagam, R. M., Narvaez-Zapata, J. A., Ramirez-Gonzalez, M.D., de la Cruz-Arguijo, E. A., López-Meyer, M., Larralde-Corona, C. P. (2023). Yeast mixtures for postharvest biocontrol of diverse fungal rots on citrus Limon var eureka. *Horticulturae*, 9(5), 1-11.
- Erami, M., Aboutalebian, S., Hezaveh, S. J., Ghazvini, R. D., Momen-Heravi, M., Jafari, Y., Ahsanirani A.H., Basirpour, B., Matini, A. H., Mirhendi, H. (2023). Microbial and clinical epidemiology of invasive fungal rhinosinusitis in hospitalized COVID-19 patients, the divergent causative agents. *Medical mycology*, 61(3), 1-8
- Fahim Abbas, M., Irshad, F. N., Irshad, G. (2013). Important fungal diseases of potato and their management-a Brief review. *Journal of Mycopath*, 11(1), 45-50.
- 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. *Journal of Microbiological Research*, 188, 72- 79.
- Ferreira-Pinto, M. M., Moura-Guedes, M. C., Barreiro, M. G., Pais, I., Santos, M. R., Silva, M. J. (2006). *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of blue mold in " Rocha" pear. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 71, 973-978.
- Galli, V., Romboli, Y., Barbato, D., Mari, E., Venturi, M., Guerrini, S., Granchi, L. (2021). Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries. *Sustainability*, 13(16), 1-11.
- Ibrahim, M., Shehu, K., Sambo, S., Tukur, U., Umar, I. A., Tafinta, I. Y. (2014). Identification of fungi associated with storage rots of Irish Potato (*solanum Tuberosum* l.) tubers in Sokoto Metropolis. *Journal of Biological Sciences*, 2(2), 1-4.
- Kim, W. K., Hwang, Y. S., Yu, S. H. (2008). Two species of *Penicillium* associated with blue mold of yam in Korea. *Mycobiology*, 36(4), 217-221.
- Klein, M. N., Kupper, K. C. (2018). Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. *Food microbiology*, 69, 1-10.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., Bertolini, P. (2012). Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 73, 56-62.
- Mounir, R., Durieux, A., Bodo, E., Allard, C., Simon, J. P., Achbani, E. H., El-Jaafari, S., Douira, A., Jijakli, M. H. (2007). Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnology letters*, 29:553-559.
- Moura, V. S., Pollettini, F. L., Ferraz, L. P., Mazzi, M. V., Kupper, K. C. (2021). Purification of a killer toxin from *Aureobasidium pullulans* for the biocontrol of phytopathogens. *Journal of Basic Microbiology*, 61(2), 77-87.
- Paul, N. C., Nam, S. S., Yang, J. W., Kachroo, A. (2018). First report of blue mold caused by *Penicillium oxalicum* in sweetpotato (*Ipomoea batatas*) in Korea. *Plant Disease*, 102(6), 1-5.
- Perez, M. F., Contreras, L., Garnica, N. M., Fernandez-Zenoff, M. V., Farias, M. E., Sepulveda, M., Ramallo, J., Dib, J. R. (2016). Native killer yeast as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *Plos One*, 11(10), 1-21.

- Rosa, M. M., Tauk-Tornisielo, S. M., Rampazzo, P. E., Ceccato-Antonini, S. R. (2010). Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspora lobose* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *Journal of Microbiol Biotechnol*, 26, 1491-1502.
- Santos, A., Sánchez, A., Marquina, D. (2004). Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological research*, 159(4), 331-338.
- Sanzani, S.M., Sgaramella, M., Mosca, S., Solfrizzo, M. Ippolito, A. (2021). Control of *Penicillium expansum* by an epiphytic basidiomycetous yeast. *Horticulturae*, 7(11), 1-10.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., Ippolito, A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 30(3), 209-220.
- Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3), 189- 199.
- Shah, S. H., Shan, X., Baig, S., Zhao, H., Ismail, B., Shahzadi, I., Majeed, Z., Nawazish, S., Siddique, M., Baig, A. (2023). First identification of potato tuber rot caused by *Penicillium solitum*, its silver nanoparticles synthesis, characterization and use against harmful pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1-12.
- Sharifi, K., Zare, R.A., Zamani-Zadeh, H.R., Arjmandian, A. (2009). *Fusarium* species causing dry rot of potatoes in Ardabil, Tehran and Hamedan Provinces. (in Persian)
- Taghizadeh, Z., Mohammadi, S., Alaie, H. (2012). Biological control of dry rot of potatoes tubers by *Fusarium solani* using antagonistic *Trichoderma* spp and *Talaromyces Flavus*. *Journal of Postharvest physiology and Technology of horticultural crops*, 75-87. (in Persian)
- Thilagam, R., Kalaivani, G., Hemalatha, N. (2018). Isolation and identification of phytopathogenic fungi from infected plant parts. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 10(1), 26-28.
- Walch, G., Knapp, M., Rainer, G., Peintner, U. (2016). Colony-PCR is a rapid method for DNA amplification of hyphomycetes. *Journal of Fungi*, 2(2), 1-10.
- Zhang, Q., Zhao, L., Li, Z., Li, C., Li, B., Gu, X., Zhang, X., Zhang, H. (2019). Screening and identification of an antagonistic yeast controlling postharvest blue mold decay of pears and the possible mechanisms involved. *Journal of Biological Control*, 133, 26-33.
- Zhu, H., Zhao, L., Zhang, X., Foku, J. M., Li, J., Hu, W., Zhang, H. (2019). Efficacy of *Yarrowia lipolytica* in the biocontrol of green mold and blue mold in *Citrus reticulata* and the mechanisms involved. *Biological Control*, 139, 1-8.