نشریه دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، زمستان ۱۳۹۲ (ص۳۰۵-۲۹۹)

کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی آلترناریایی گوجه‌فرنگی توسط استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* UTPf68 و *Bacillus subtilis* UTB96

سلیمان قاسمی[1]، مسعود احمدزاده[2*] و سیاوش ترابی[3]
۱، ۳، محققان شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا - کرج
۲، استاد، گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱۲ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۲/۱۳)

چکیده

میوه‌های گوجه‌فرنگی هم در مزرعه و هم در انبار در معرض پوسیدگی‌های میکروبی پس از برداشت قرار دارند. در این پژوهش پس از جداسازی عوامل پوسیدگی، دو باکتری بیوکنترل *Bacillus subtilis* UTB96 و *Pseudomonas fluorescens* UTPf68 که تولید نیمه‌انبوه آنها در بیوراکتور صنعتی با موفقیت به انجام رسیده بود، در دو حالت کشت متقابل و بررسی روی میوه‌ها، بر این بیمارگرها بررسی شدند. طبق نتایج به‌دست‌آمده از کشت متقابل، باکتری *B. subtilis* UTB96 توانست به‌ترتیب به میزان ۶۸/۷ و ۸۱/۷ درصد از رشد قارچ‌های *Alternaria alternata* و *Penicillium* sp. جلوگیری کند. همچنین باکتری *P. fluorescens* UTPf68 نیز به‌ترتیب به میزان ۶۲/۲ و ۲۴/۳ درصد از رشد میسلیوم قارچ‌های *A. alternata* و *Penicillium* sp. جلوگیری کرد. همچنین نتایج نشان داد که این باکتری‌ها تأثیر خوبی در جلوگیری از رشد قارچ *A. alternata* روی گوجه‌فرنگی دارند. تا آنجا که باکتری *B. subtilis* UTB96 توانست ۹۲/۵ درصد از رشد قارچ *A. alternata* جلوگیری کند. باکتری *P. fluorescens* UTPF68 نیز به میزان ۷۶/۵ درصد از رشد میسلیوم قارچ *A. alternata* و ایجاد پوسیدگی روی گوجه‌فرنگی جلوگیری کرد. نتایج این پژوهش به همراه تحقیقات تکمیلی دربارهٔ این باکتری‌های مفید می‌تواند به توسعه و کاربردی شدن کنترل بیولوژیک بیماری‌های پس از برداشت کمک کند.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های پس از برداشت، گوجه‌فرنگی، *Alternaria alternata*، *Bacillus subtilis* UTB96، *Pseudomonas fluorescens* UTPf68.

مقدمه

فساد میکروبی ناشی از پاتوژن‌های گیاهی یکی از فاکتورهای مهم و تعیین‌کننده در کیفیت محصولات تازه‌خوری است. خسارت‌های پس از برداشت با توجه به نوع محصول و حتی منطقهٔ جغرافیایی متفاوت است. این میزان از ۴ تا ۸ درصد در کشورهای با سیستم‌های سرمایشی پیشرفته، تا ۵۰ درصد در کشورهای با حداقل امکانات در حوزهٔ انبارداری متفاوت است (Eckert & Ogawa, 1985).

گوجه‌فرنگی (*Lycopersican esculentum*) یکی از منابع ارزشمند برای بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانت‌ها (لیکوپن، آسکوربیک‌اسید و فنل‌ها) در رژیم غذایی ما است (George *et al*., 2004). میکروارگانیسم‌های زیادی وجود دارند که باعث پوسیدگی پس از برداشت گوجه‌فرنگی می‌شوند. مهم‌ترین پاتوژن‌های پس از برداشت که از روی گوجه‌فرنگی گزارش شده‌اند، شامل *A. Alternata* (Feng & Zheng, 2007) و *Rhizopus stolonifer* (Stevens *et al*., 1997) می‌شوند.

A. alternata معمول‌ترین بیمارگر پس از برداشت است که سبب پوسیدگی سیاه گوجه‌فرنگی می‌شود (Feng & Zheng, 2007; Wang *et al*., 2008). این پاتوژن‌ها معمولاً در طبیعت به‌صورت همه‌جازی وجود

* نویسنده مسئول: مسعود احمدزاده تلفن: ۰۹۱۲۲۶۰۹۱۰۰ E-mail: ahmadz@ut.ac.ir

دارند (Whitaker, 1996). گوجه‌فرنگی‌های برداشت‌شده زمانی که در مزرعه هستند بار میکروبی زیادی را روی خود دارند. در نتیجهٔ بسته‌بندی ضعیف و مدیریت ناصحیح، میوه‌های له‌شده یا زخمی در شرایط مساعد به عوامل ایجادکنندهٔ پوسیدگی اجازهٔ رشد و توسعه می‌دهند. گوجه‌فرنگی هم در مزرعه و هم در انبار در معرض این پوسیدگی‌ها قرار دارد. بنابراین، باید به روش‌های کاربردی که کیفیت محصول برداشت‌شده را حفظ کند توجه شود (Mahovic *et al*., 2004).

تاکنون کنترل بیولوژیک بیماری‌های پس از برداشت میوه‌های مختلف با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست جداشده از بافت‌های گیاهی با موفقیت انجام گرفته است (Janisiewicz & Korsten, 2002; Zheng *et al*., 2005; Zheng *et al*., 2007) و برخی از این آنتاگونیست‌ها با موفقیت در کنترل بیولوژیک بیماری‌های پس از برداشت میوهٔ گوجه‌فرنگی استفاده شده‌اند (Schena *et al*., 1999; Wang *et al*., 2008).

سودوموناس‌های فلورسنت از مهم‌ترین عوامل کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی هستند که به‌صورت مستقیم، با تولید و ترشح متابولیت‌های بازدارنده و سیدروفورها، سبب محدود شدن یا توقف رشد بیمارگرهای گیاهی به‌ویژه قارچ‌ها می‌شوند و برخی با تولید هورمون‌های مختلف سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند. باکتری *P. fluorescens* UTPf68 یکی از استرین‌های مهم و مؤثر در زمینهٔ بیوکنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد است که در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران شناسایی و ارزیابی شده است و تولید نیمه‌صنعتی آن نیز در شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا انجام گرفته است. این استرین هم به‌لحاظ تولید متابولیت‌های بیوکنترلی و هم از نظر قدرت بیوکنترلی در شرایط گلخانه‌ای در جایگاه مطلوبی قرار دارد که می‌توان به عنوان یک جدایهٔ باارزش در جهت اهداف کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی در ایران از آن استفاده کرد (Ahmadzadeh & Ghasemi, 2012).

باکتری *Bacillus subtilis* یکی از پرکاربردترین باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی است (Ongena & Jacques, 2008). این باکتری به همراه دیگر گونه‌های باسیلوس، مادهٔ مؤثر حدود نیمی از آفت‌کش‌های زیستی تجاری شده در بازارهای دنیا را به خود اختصاص داده است (Fravel, 2005). بیشتر اعضای جنس باسیلوس قادرند طیف وسیعی از ملکول‌های فعال بیولوژیکی را با خاصیت بازدارندگی در برابر رشد بیمارگرها تولید کنند (Emmert & Handelsman 1999). همچنین توانایی تولید اسپور که مقاومت زیادی در شرایط خشکی دارد، قابلیت این باکتری را به عنوان بهترین کاندیدا برای ساخت آفت‌کش‌های بیولوژیکی افزایش داده است. به طور متوسط ۴ تا ۵٪ ژنوم این گونه برای سنتز آنتی‌بیوتیک اختصاص داشته و توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی متعدد با ساختارهای متفاوت را دارد (Stein, 2005).

از میان این ترکیبات ضدمیکروبی، پتانسیل لیپوپپتیدهای حلقوی خانواده‌های سورفکتین، ایتورین و فنجایسین برای کاربردهای بیوتکنولوژی و داروسازی به خاطر خاصیت سورفکتانتی آنها به‌خوبی شناخته شده است. تولید گروه‌های مختلف لیپوپپتیدها باعث برتری استرین‌های باسیلوس تولیدکنندهٔ آنها در جایگاه‌های اکولوژیکی می‌شود. لیپوپپتیدهای عمده تولیدی جنس باسیلوس سورفکتین و فنجایسین به‌شمار می‌روند که از بخش پپتیدی حاوی ۷ تا ۱۱ اسید امینه به‌صورت خطی یا حلقوی یا ترکیبی از آنها تشکیل شده‌اند (Bonmatin *et al*., 2003; Koumoutsi *et al*., 2004). طبق تحقیقات انجام‌گرفته استرین *B. subtilis* UTB96 توانایی خوبی در کنترل قارچ آسپرژیلوس دارد. همچنین این استرین بالاترین میزان پاک‌سازی آفلاتوکسین تولیدی این قارچ را به خود اختصاص داده است. لیپوپپتیدهای موجود در ترکیبات خارج سلولی تولید شده توسط استرین UTB96 با استفاده از متانول استخراج شده و خاصیت ضدقارچی آنها بررسی شده است. مشاهده شده که هالهٔ بازدارندگی از رشد قارچ مربوط به لیپوپپتیدهای برون‌سلولی استخراج شده نسبت به عصارهٔ برون‌سلولی افزایش داشته است و این نشان می‌دهد که بخشی از توانایی این جدایهٔ باسیلوسی در بازداری از رشد قارچ، مربوط به لیپوپپتیدهای تولید شده توسط آنها است. استرین UTB96 توانایی خوبی هم در کاهش مقدار آفلاتوکسین در محیط کشت حاوی قارچ و پسته‌های آلوده به قارچ و هم در کاهش مقدار آفلاتوکسین B_1

اضافه شده به محیط دارد. بنابراین استفاده از این استرین می‌تواند سودمند باشد و چنانچه آلودگی اتفاق بیفتد، این جدایه می‌تواند از تولید آفلاتوکسین جلوگیری کند، یا با تجزیهٔ آفلاتوکسین مقدار آن را کاهش دهد (Goreshi, 2011). همچنین مشاهده شد که کاربرد این استرین از باکتری *B. subtilis* می‌تواند ضمن کاهش رشد قارچ *Aspergillus flavus R5*، مقدار آفلاتوکسین ردیابی شده را هم در محیط مایع و هم روی پسته کاهش دهد. به‌طوری که این جدایه ۹۸/۳۸٪ مقدار آفلاتوکسین را در پسته‌های آلوده به قارچ و نسبت به شاهد کاهش داد. همچنین استرین اخیر قادر است به میزان چشمگیری آفلاتوکسین موجود در محیط را تجزیه کند و ۸۷/۲۶٪ میزان آفلاتوکسین B1 اضافه شده به محیط را کاهش دهد. قبلاً نیز توانایی باکتری *B. subtilis* در جلوگیری از رشد *A. flavus* و کاهش آفلاتوکسین گزارش شده است (Cuero *et al*., 1991; Reddy *et al*., 2009).

بررسی متابولیت‌های فرار ضدقارچی استرین UTB96 توسط قرشی نشان داد که این باکتری قادر است متابولیت‌های فرار ضدقارچی در محیط کشت PDA تولید کند که رشد قارچ را به‌طور معناداری (۱۴/۱۴٪) نسبت به شاهد کاهش داد (Goreshi, 2011).

طراحی محیط کشت صنعتی و بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری *B. subtilis* UTB96 به عنوان یکی از گزینه‌های مناسب کنترل بیولوژیک بیماری‌های پس از برداشت، با موفقیت در شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا و بخش کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران انجام گرفت (Ghasemi, 2011).

هدف از این پژوهش بررسی اثر آنتاگونیستی دو جدایه باکتریایی مهم در کنترل بیولوژیک پوسیدگی پس از برداشت گوجه‌فرنگی است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی عوامل پوسیدگی از روی گوجه‌فرنگی

برای این منظور چند گوجه‌فرنگی دارای علائم پوسیدگی قارچی از یکی از سردخانه‌های نگهداری این محصول در کرج که به‌شدت دچار خسارت شده بود، نمونه‌برداری شد. قطعات قارچی از قسمت‌های دارای توده‌های قارچی برداشته شد و به درون محیط کشت PDA موجود در تشتک‌های پتری منتقل شد. تشتک‌ها در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۳ تا ۵ روز قرار داده شدند. قارچ‌های مختلفی که در این تشتک‌ها رشد کردند، جداسازی و روی محیط‌های استریل PDA واکشت شدند. در نهایت، قارچ‌های خالص شده با روش سیمونس بررسی و شناسایی شدند (Simmons, 2007). قارچ‌های شناسایی شده در طول پژوهش در تشتک‌های حاوی محیط PDA در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس یخچال نگهداری شدند.

تهیه و نگهداری باکتری‌های آنتاگونیست

استرین‌های *B. subtilis* UTB96 و *P. fluorescens* UTPf68 از کلکسیون میکروبی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت شد. برای نگهداری این باکتری‌ها یک میلی‌لیتر از محلول سولفات منیزیوم ۰/۱ مولار استریل، درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اتوکلاو شده، ریخته شد. مقداری از باکتری‌های ۲۴ ساعته که روی محیط کشت NA رشد یافته بود، درون ویال‌ها منتقل گردیدند. در نهایت این ویال‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال نگهداری شدند.

کشت باکتری‌های *B. subtilis* UTB96 و *P. fluorescen* UTPf68 در بیوراکتور نیمه‌صنعتی[1]

برای مایه‌زنی فرمانتور از پیش‌کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری‌ها استفاده شد. ابتدا یک لوپ از باکتری‌های کشت شده در تشتک پتری حاوی محیط NA، به فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط غذایی مایع NB منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت به میزان ۱٪ به محیط کشت اصلی پیش‌کشت که محیط غذایی مایع NB است، تلقیح شد.

این مایهٔ تلقیح به میزان ۲۴۰۰ میلی‌لیتر در سه ارلن ۲ هزار میلی‌لیتری تهیه گردید. پیش‌کشت باکتری در شرایط استریل زیر هود داخل فلاسک تلقیح که از قبل استریل شده بود ریخته شد و سپس روی فرمانتور نیمه‌صنعتی نصب گردید. در ادامه، محیط پیش‌کشت درون بیوراکتور نیمه‌صنعتی تلقیح گردید. دمای محیط

1. Tabiat gara co. ALF-201

کشت داخل بیوراکتور روی ۲۹ درجهٔ سلسیوس و pH محیط روی ۷ تنظیم شد. برای محیط کشت مورد استفاده درون بیوراکتور از محیط کشت صنعتی طراحی شده و بهینه شده توسط قاسمی استفاده شد (Ghasemi, 2011).

بررسی آزمایشگاهی اثر باکتری‌های آنتاگونیست بر قارچ‌ها

برای بررسی قدرت آنتاگونیستی باکتری در شرایط آزمایشگاه، از روش هاجدرون و همکاران (Hagedron *et al.*, 1989) استفاده شد. در این آزمایش دو استرین باکتری هرکدام به‌طور جداگانه علیه دو قارچ *A. alternata* و *Penicillium* sp. بررسی شدند. به این ترتیب که باکتری‌ها به‌صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک‌های پتری و به فاصلهٔ یک سانتی‌متری از حاشیهٔ آنها از چهار طرف تشتک‌های حاوی محیط کشت NA+PDA مایه‌زنی شدند. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ با جمعیت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر، در مرکز تشتک کشت قرار داده شد. در تشتک پتری شاهد از آب مقطر استریل به جای باکتری استفاده گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار انجام گرفت. این تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند و زمانی که حاشیهٔ پرگنه در تشتک‌های پتری شاهد به دیوارهٔ پتری برخورد کرد، میزان رشد پرگنه اندازه‌گیری گردید.

آماده‌سازی میوه‌های گوجه‌فرنگی

گوجه‌فرنگی‌ها از بازار سبزیجات محلی (تره‌بار) خریداری شد. میوه‌های با خصوصیات ظاهری و فیزیکی و نیز سطح رسیدگی و بلوغ یکنواخت انتخاب شدند. گوجه‌فرنگی‌های خریداری شده سپس در کیسه‌های پلی‌اتیلن تمیز به آزمایشگاه آورده شد و بلافاصله به کار گرفته شد. قبل از کاربرد این میوه‌ها، برای سنجش خاصیت بیوکنترلی و یا آزمون بیماری‌زایی، میوه‌ها با آب شست‌وشو شدند، سپس سطح میوه‌ها با اتانول ۱۰درصد به مدت ۲ دقیقه، یا ۱ دقیقه در محلول رقیق سدیم هیپوکلریت (۱ درصد کلر فعال) ضدعفونی شد. میوه‌های ضدعفونی شده نهایتاً دو بار توسط غوطه‌وری در آب مقطر شسته شدند. سپس گوجه‌فرنگی‌های ضدعفونی شده در زیر هود بیولوژیک و در شرایط خشک و تمیز قرار داده شدند تا آب سطح آنها خشک شود و آمادهٔ تیمار با باکتری‌های آنتاگونیست شوند.

بررسی قدرت آنتاگونیستی

به‌منظور بررسی قدرت آنتاگونیستی باکتری علیه قارچ *A. alternata*، در دو قسمت گوجه‌فرنگی‌ها، ترجیحاً دو نقطه بین گلگاه و دمگاه زخمی به اندازهٔ ۳×۳×۳ میلی‌متر ایجاد شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^8 سلول در میلی‌لیتر روی زخم‌ها قرار گرفت. روی زخم‌های میوه‌های کنترل یا شاهد محیط کشت فاقد باکتری قرار گرفت. بعد از ۲ ساعت، زخم‌ها با ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپورهای پاتوژن با جمعیت 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر آلوده شدند. قطر زخم‌های عفونی ایجاد شده روی گوجه‌فرنگی‌ها ۷ روز پس از تلقیح آنها با باکتری‌های آنتاگونیست و قارچ *A. alternata* اندازه‌گیری شد. میوه‌ها در داخل کیسه‌های پلی‌اتیلن تمیز و استریل قرار گرفتند. برای تأمین رطوبت کافی درون کیسه‌ها و ایجاد یک میکرواقلیم مرطوب کاغذهای مرطوب استریل درون آنها قرار داده شد. تیمارها در این مدت در دمای ۱+۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. آزمایش برای هر باکتری حداقل در سه تکرار انجام گرفت که هر تکرار شامل چهار میوه (حدود ۲۵۰ گرم) بود.

طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

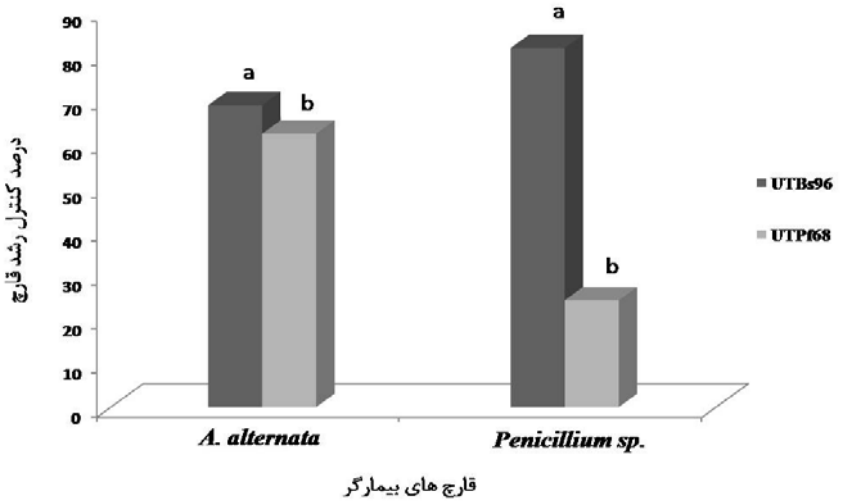
آزمایش‌های انجام گرفته در این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. داده‌های آزمایش پس از یادداشت‌برداری با نرم‌افزار SAS تجزیهٔ واریانس شده و میانگین تیمارها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. رسم نمودار نیز با نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج

اثر بازدارندگی باکتری‌ها روی بیمارگرها

نتایج کشت متقابل باکتری‌های آنتاگونیست و قارچ‌های بیمارگر ثبت و بررسی شدند. طبق نتایج، باکتری *B. subtilis* UTB96 توانست به‌ترتیب به میزان ۶۸/۷ و ۸۱/۷ درصد از رشد میسلیوم قارچ‌های *A. alternata* و *Penicillium* sp. جلوگیری کند. همچنین باکتری

P. fluorescens UTPF68 به‌ترتیب به میزان ۶۲/۲ و ۲۴/۳ درصد از رشد میسلیوم قـارچهـای *A. alternata* و *Penicillium* sp. جلوگیری کرد (شکل ۱). ازآنجایی‌که پوسیدگی گوجه‌فرنگی ناشی از بیمارگر *A. alternata* شیوع بیشتری دارد، لذا این قارچ برای مرحلهٔ بعدی و تست روی گوجه‌فرنگی‌ها انتخاب گردید.

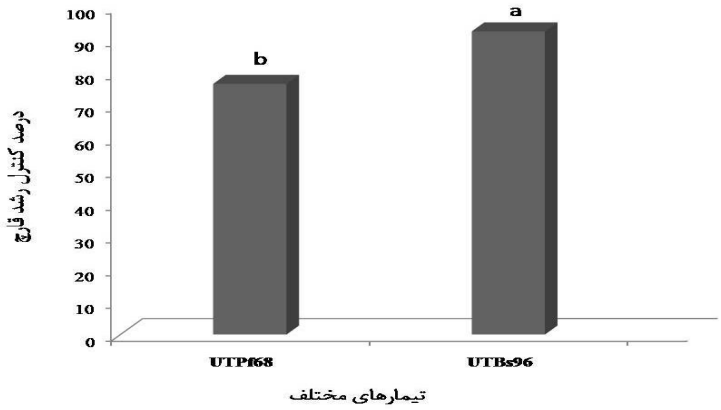


شکل ۱. اثر بازدارندگی دو باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* UTB96 و *P. fluorescens* UTPF68 روی قارچ های بیمارگر *Penicillium* sp. و *A. alternata* در شرایط آزمایشگاهی (گروه‌بندی آماری تیمارهای باکتریایی برای هرکدام از قارچها به‌صورت مجزا صورت گرفته، ولی برای مقایسهٔ بهتر نمودار هر دو یک‌جا در شکل بالا نمایش داده شده است.)

اثر کنترلی باکتری‌ها بر پوسیدگی آلترناریایی گوجه‌فرنگی

نتایج این بخش از آزمایش نشان داد که این باکتری‌ها اثر خوبی در جلوگیری از رشد قارچ *A. alternata* روی گوجه‌فرنگی دارند. در این مرحله باکتری *B. subtilis* UTB96 توانست ۹۲/۵ درصد از رشد قارچ *A. alternata* جلوگیری کند (شکل ۲). استرین *P. fluorescens* UTPF68 نیـز ۷۶/۵ درصـد از رشد میسلیـوم قـارچ *A. alternata* و ایجاد پوسیدگی روی گوجه‌فرنگی جلوگیری کرد (شکل ۲). اما رشد فوق‌العاده سریع باکتری‌های آنتاگونیست بخصوص باکتری *B. subtilis* UTB96 در محل تلقیح منجر به ایجاد لهیدگی مختصری روی میوه‌ها گردید (شکل ۳).

تصور می‌شود با بهینه کردن جمعیت باکتری تلقیح شده، یا استفاده از عصارهٔ برون‌سلولی باکتری‌ها که حاوی آنتی‌بیوتیک‌های قدرتمندی هستند، بتوان این مشکل را حل کرد.



شکل ۲. اثر بازدارندگی دو باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* UTB96 و *P. fluorescens* UTPF68 روی قارچهای بیمارگر *A. alternata* روی گوجه فرنگی

تیمار با باکتری **بدون تیمار**

شکل ۳. اثر بازدارندگی باکتری آنتاگونیست روی قارچ‌های بیمارگر *A. alternata* روی گوجه فرنگی

بحث

میوه‌ها و سبزیجات از مهم‌ترین محصولات گیاهی هستند که نقش مهمی در تأمین نیاز غذایی و سلامت انسان دارند. این گروه از محصولات کشاورزی به دلیل داشتن رطوبت زیاد فسادپذیرند و در دورهٔ پس از برداشت بخش عمده‌ای از آنها از بین می‌روند. گوجه‌فرنگی یکی از این محصولات است که در انبار یا سردخانه دچار پوسیدگی‌های پس از برداشت می‌شود. به دلیل بافت تازهٔ این محصول و ویژگی تازه‌خوری آن، استفاده از سموم شیمیایی معضلات جدی را به همراه خواهد داشت. از این رو تحقیقات در جهت یافتن راه‌حل بیولوژیک و غیرشیمیایی باید در دستور کار محققان حوزهٔ کشاورزی قرار گیرد. این تحقیق برای گام برداشتن در این راستا انجام گرفت. در این پژوهش ابتدا از قسمت‌های دارای علائم پوسیدگی گوجه‌فرنگی که در شرایط سردخانه (۴ تا۱۰ درجهٔ سانتیگراد) دچار آن شده بودند اقدام به جداسازی پاتوژن‌های احتمالی عامل آن گردید. در این مرحله دو قارچ بیمارگر *A. alternata* و *Penicillium* sp. جداسازی و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی شدند. این دو بیمارگر سپس برای اجرای آزمایش‌های بعدی خالص‌سازی و نگهداری شدند. نتایج این پژوهش با برخی پژوهش‌های پیشین در باب نوع بیمارگرهای پس از برداشت که معمولاً روی گوجه‌فرنگی بیماری‌زا هستند، مطابق بود؛ همچنان‌که در یکی از این پژوهش‌ها رامسی و لینک ۲۰ قارچ مختلف را از پوسیدگی‌های پس از برداشت گوجه‌فرنگی جدا کردند (Ramsey & Link, 1932). همچنین قابل ذکر است که مهم‌ترین پاتوژن‌های پس از برداشت که از روی گوجه‌فرنگی گزارش شده‌اند، شامل (Feng & Zheng, 2007) *A. alternata* و *Rhizopus stolonifer* (Stevens *et al.*, 1997) می‌شوند. *A. alternata* معمول‌ترین بیمارگر پس از برداشت است که سبب پوسیدگی سیاه گوجه‌فرنگی می‌شود (Feng & Zheng, 2007; Wang *et al.*, 2008). باکتری *B. subtilis* یکی از پرکاربردترین باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی است (Ongena & Jacques, 2008). این باکتری به همراه دیگر گونه‌های باسیلوس مادهٔ مؤثر حدود نیمی از آفت‌کش‌های زیستیِ تجاری شده در بازارهای دنیا را به خود اختصاص داده است (Fravel, 2005). قبلاً هم اثر بیوکنترلی استرین *B. subtilis* CPA-8 پس از طراحی محیط کشت صنعتی و تولید در مقیاس انبوه روی تعدادی از بیماری‌های پس از برداشت با موفقیت انجام گرفته بود (Yánez-Mendizábal, 2012). نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که باکتری‌های آنتاگونیست از جمله دو استرین باکتریایی *B. subtilis* UTB96 و *P. fluorescens* UTPF68 دارای توانایی بالقوه در کاهش پوسیدگی‌های پس از برداشت و انباری هستند. این باکتری‌ها همچنین با انجام پژوهش‌های تکمیلی دربارهٔ دامنهٔ محصولات قابل تیمار شدن، نحوهٔ کاربرد آنها در سطح انبوه، فرمولاسیون و غیره می‌توانند به عنوان گزینه‌های مناسبی برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های پس از برداشت معرفی شوند.

سپاسگزاری

از جناب آقای مهندس عسگری‌نیا، مدیرعامل شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا به دلیل حمایت‌هایشان در

اجرای پژوهش و همچنین از کارشناسان شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا به واسطه مساعدت‌هایشان در اجرای این پژوهش تشکر می‌کنیم.

REFERENCES

1. Ahmadzadeh, M. & Ghasemi, S. (2012). Introduction of *Pseudomonas fluorescens* as a new biocontrol agent in Iran. *Biological Control of Plant Pests and Diseases*, 1, 45-54. (In Farsi).
2. Bonmatin, J. M., Laprevote, O. & Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughout Screening*, 6, 541–556.
3. Eckert, J. W. & Ogawa, J. M. (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 421–454.
4. Feng, W. & Zheng, X.D. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata in vitro* and *in vivo*. In: *Food containers*, vol. 18, 2007, p. 1126-1130.Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual review of Phytopathology*, 43, 337–359.
5. George, B., Kaura, C., Khurdiya, D. S. & Kapoor, H. C. (2004). Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. *Food chemistry*, 84, 45–51.
6. Ghasemi, S. (2011). *Application of response surface methodology to optimize cultural conditions of Bacillus subtilis UTB96 in the production process*. A thesis submitted for the M. Sc. Degree in plant pathology, University of Tehran. (In Farsi).
7. Ghoreshi, S. S. (2011). *Study on biological control of Aspergillus flavus in pistachio by using some antagonistic bacterial strains*. A thesis submitted for the M.Sc. degree in plant pathology, University of Tehran. (In Farsi).
8. 8. Hagedorn, C., Could, W. D. & Bradinelli, RT. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbiology, 55, 2793-2797.
9. Janisiewicz, W. J. & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 411-441.
10. Koumoutsi, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Gabriele, H., Franke, P., Vater, J., & Borris, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. Journal of Bacteriology, 186, 1084-1096.
11. Mahovic, M., Sargent, S. A. & Bartz, J. A. (2004). *Identifying and controlling postharvest tomato diseases in Florida*. University of Florida, 2004, from http://edis.ifas.ufl.edu/HS131.
12. Ongena, M. & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16, 115–125.
13. Ramsey, G. B. & Link, G. K. K. (1932). *Market diseases of fruits and vegetables: Tomatoes, peppers, eggplants*. US Department of Agriculture, vol. 121, pp. 1-44.
14. Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F. & Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aueobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest*, 17, 189-199.
15. Simmons, E. G. (2007). *Alternaria. An identification manual*. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
16. Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Pusey, P. L., Igwegbe, C. K., Kabwe, K., Mafolo, Y., Liu, J., Chalutz, E. & Droby, S. (1997). Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biological Control*, 10, 98-103.
17. Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J. & Zheng, X. D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodosporidium paludigenum* Fell & Tallman. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 123, pp. 234-239.
18. Whitaker, J. R. (1996). Enzymes: In: O.R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry* (pp. 431-530.), Marcel Dekker, New York.
19. Yánez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C. & Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60, 280-289.
20. Zheng, X. D., YU, T., Chen, R. L., Huang, B. & Wu, V. C. (2007). Inhibiting *Penicillium expansum* infection on pear fruit by *Cryptococcus laurentii* and cytokinin. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 221-227.
21. Zheng, X. D., Zhang, H. Y. & Sun, P. (2005). Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. In: *European Food Research Technology*, 220, 353-357.