

شناسایی گونه‌های *Monilinia* عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب در شهرستان خرم‌آباد و کنترل زیستی بیماری در شرایط انبار با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست

فاطمه دریگوند، عیدی بازگیر[✉]، مصطفی درویش‌نیا، حسین میرزایی نجفقلی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، لرستان، خرم‌آباد، ایران. [✉] bazgir.ei@lu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۶ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۵/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۰

چکیده

گونه‌های جنس *Monilinia* به‌عنوان عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای در بسیاری از اعضای خانواده Rosaceae در سراسر جهان به شمار می‌روند. این مطالعه به‌منظور شناسایی گونه‌های *Monilinia* عامل پوسیدگی قهوه‌ای درختان سیب در شهرستان خرم‌آباد با استفاده از تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی و بررسی امکان کنترل زیستی این بیماری در شرایط انباری با استفاده از چهار گونه باکتری آنتاگونیست اجرا گردید. برای این منظور از باغات سیب در شهرستان خرم‌آباد بازدید و از شکوفه‌های دارای علائم بلایت و میوه‌های دارای علائم پوسیدگی نمونه‌برداری گردید. جداسازی قارچ‌ها با استفاده از روش‌های رایج در بیماری‌شناسی گیاهی صورت گرفت. بر اساس تلفیق خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌ها روی محیط کشت PDA و همچنین نتایج به دست آمده از روش مولکولی مبتنی بر پرایمرهای اختصاصی گونه، تمامی جدایه‌ها *M. laxa* تشخیص داده شدند. خواص کنترل زیستی چهار باکتری آنتاگونیست از برداشت میوه‌های سیب مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصل از تأثیر ترکیبات فرار، غیر فرار و عصاره عاری از سلول باکتری‌ها نشان داد که جدایه‌های آزمایش‌شده دارای اثر بازدارندگی رشد میسلیوم بیمارگر می‌باشند. در این تحقیق جدایه‌های *S. AP5* و *marcescens* و *B. cereus* AP13 بیش از ۷۰ درصد بازدارندگی رشد میسلیومی بیمارگر را نشان دادند. تأثیر این دو باکتری بر میزان پوسیدگی قهوه‌ای سیب در شرایط انبار برابر با ۸۴/۲۵ و ۷۷/۸۵ درصد و تأثیر قارچ‌کش تیوفات متیل ۸۵/۶۲ درصد بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که این دو جدایه باکتریایی از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم از سیب در برابر *M. laxa* محافظت نموده و بنابراین، می‌توانند به‌عنوان عوامل کنترل زیستی بالقوه (BCAs) در درمان پیشگیرانه برای کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای در میوه‌های سیب استفاده شوند.

کلمات کلیدی: بیماری‌های پس از برداشت، مدیریت بیماری، دانه‌دارها، پوسیدگی مومیایی، باکتری‌های آنتاگونیست

Identification of *Monilinia* species, the causal agent of brown rot disease on apple in the Khorramabad region and biological control of the disease using bacterial antagonists under storage condition

Fatemeh Derikvand, Eidi Bazgir[✉], Mostafa Darvishnia, Hossein Mirzaei Najafgholi

Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural and Resources, Lorestan University, Lorestan, Khorramabad, Iran. [✉] bazgir.ei@lu.ac.ir

Received: 27 May 2023

Revised: 9 August 2023

Accepted: 11 August 2023

Abstract

Monilinia spp. cause brown rot disease on members of the of the Rosaceae family around the world. This study was conducted to identify *Monilinia* species causing brown rot disease on apple trees in the in Khorramabad region by the integration of morphological and molecular methods and biocontrol of this disease using antagonistic bacteria under storage conditions. Towards this aim, apple orchards in the Khorramabad region were inspected and samples were collected from blossom blight and fruit rot symptoms. Fungal isolates were recovered using routine plant pathology techniques. Based on the integration of morphological data and PCR amplification results using species-specific primers, all of the isolates were identified as *M. laxa*. The biological control properties of four antagonistic bacteria *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp and *Pseudomonas baetica* were tested in laboratory and storage conditions against *M. laxa* causing brown rot of apple fruits after harvesting. The results of the effects of volatile compounds, non-volatile compounds and bacterial cell-free extracts showed that the tested isolates have the effect of inhibiting the growth of pathogenic mycelium. In this study, *S. marcescens* AP5 and *B. cereus* AP13 isolates showed more than 70% inhibition of pathogenic mycelium growth. The effect of these two bacteria on the rate of apple brown rot in storage conditions was 84.25 and 77.85%, and the effect of methyl thiophate fungicide was 85.62%. The results of this research show that these two bacterial isolates protect apples against *M. laxa* through direct and indirect mechanisms and therefore, they can be used as potential biological control agents (BCAs) in preventive treatment to control brown rot disease in apple fruits.

Keywords: Post-harvest diseases; Disease management; Seeds; Decay of the mummy; Antagonist bacteria

How to cite:

derikvand F, bazgir E, darvishnia M, Mirzaei Najafgholi H, 2024. Identification of *Monilinia* species, the causal agent of brown rot disease on apple in the Khorramabad region and biological control of the disease using bacterial antagonists under storage condition. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 13 (1): 27-42.

مقدمه

آفت‌کش‌های مصنوعی را می‌توان کاهش داد و برای کنترل آفات و بیماری‌های مختلف باید از روش‌های کنترل زیستی استفاده کرد. روش کنترل زیستی یک جایگزین امیدوارکننده برای محافظت از میوه‌ها در برابر بیماری‌های گیاهی در مرحله پس از برداشت است. در این راستا باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست به‌طور گسترده‌ای برای کنترل بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Carvalho 2017; Khoshkhatti et al. 2023; Moarrefzadeh et al. 2023). کنترل زیستی پاتوژن‌های قارچی، از جمله استفاده از ریز موجودات زنده یا ترکیبات با منشأ زیستی، در حال حاضر یکی از امیدبخش‌ترین جایگزین‌های استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی در نظر گرفته می‌شود. پیش‌بینی می‌شود که فروش عوامل کنترل زیستی (Biological Control Agents) در آینده نزدیک به حدود ۱۰ درصد از کل بازار جهانی حفاظت از محصولات با نرخ رشد سالانه بین ۱۵ تا ۲۰ درصد برسد (Nishimoto 2019; Vickers et al. 2017). کنترل‌کننده‌های زیستی می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند آنتی‌بیوز، رقابت برای فضا و مواد مغذی، رابطه انگلی و القا مقاومت در گیاه میزبان علیه پاتوژن‌ها عمل کنند (Köhl et al. 2019). باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاهان (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) گروه‌های مختلفی از باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر را تشکیل داده که به‌عنوان BCA علیه بیمارگرهای گیاهی استفاده می‌شوند. این باکتری‌ها عمدتاً به جنس‌های (Henneberg) *Bacillus* (Gugliandolo), *Azospirillum* (Xu), *Acetobacter*, *Pseudomonas* (Yang), *Burkholderia* (Yabuuchi), *Streptomyces* (Henrici), *Paenibacillus* (Ash), *Serratia* (Milne), *Herbaspirillum* (Carro) و *Rhodochibium* (Backer et al. 2018; Savary et al. 2019). مطالعات علمی و برنامه‌های جهانی بر روی جداسازی عوامل کنترل زیستی (BCAs) مؤثر در برابر چندین پاتوژن قارچی پس از برداشت، از جمله گونه‌های متعلق به جنس‌های *Monilinia*, *Botrytis* و *Penicillium* بر روی بسیاری از مواد غذایی متمرکز شده‌اند (Panebianco et al. 2017; Parafati et al. 2015; Parafati et al. 2015). استفاده از باکتری‌ها در کنترل بسیاری از پاتوژن‌های پس از برداشت به‌عنوان روشی سازگار با محیط‌زیست می‌تواند موفق عمل کند. ترکیبات طبیعی تولید شده توسط باکتری‌ها منبع مهم قارچ‌کش‌های زیستی هستند و شرایط خاصی برای استخراج و

سیب (*Malus domestica* Borkh.) یکی از محبوب‌ترین میوه‌های خوراکی در سراسر جهان است و بزرگ‌ترین محصول باغی تولید شده در مناطق معتدله است. تولید جهانی سیب در ۲۰ سال گذشته بیش از دو برابر شده و از ۴۱ میلیون تن در سال ۱۹۹۰ به ۸۶ میلیون تن در سال ۲۰۱۸، با ارزش کل تجارت ۷/۵۳ میلیارد دلار رسیده است (FAOSTAT 2020). میوه سیب اغلب به مدت چندین ماه و تا یک سال در سردخانه همراه با روش‌های کنترل شده قابل نگهداری است. بازدارندگی از تکثیر و توسعه بیمارگرهای انباری، چالش مهمی برای حفظ کیفیت میوه، افزایش زمان انبارداری و حفاظت از سلامت مصرف‌کنندگان است. با این وجود، بیماری پوسیدگی قهوه‌ای، در دسرسازترین بیماری ناشی از گونه‌های *Monilinia* است که به‌طور گسترده در میوه‌های هسته‌دار و دانه‌دار هلو، آلو، زردآلو، گیلاس، زالزالک، سیب و گلابی گزارش شده است (Irani et al. 2016; Hashemi et al. 2007; Lghvani et al. 2003). پوسیدگی قهوه‌ای یکی از مهم‌ترین عوامل پوسیدگی سیب‌های انباری است و همچنین منجر به خسارت قابل توجهی در باغ و پس از برداشت می‌شود (Holb et al. 2022). سه گونه از *Monilinia* شامل *M. laxa*, *M. fructicola* (Wint) Honey و *M. fructigena* (Aderh & Ruhl.) Honey باعث پوسیدگی قهوه‌ای در مناطق تولید میوه در جهان می‌شوند. پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از قارچ *M. laxa* باعث سوختگی شکوفه‌ها، سوختگی شاخه‌ها و پوسیدگی میوه‌ها می‌شود (Luo 2017). میوه سیب مستعد ابتلا به آلودگی‌های قارچی توسط پاتوژن‌های قارچی مانند (Pers) *Penicillium* (Link) و *Monilinia* spp. *Botrytis cinerea* *expansum* است که باعث پوسیدگی‌های میوه و ایجاد خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی در انبارهای نگهداری سیب هستند. پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از گونه‌های *Monilinia* می‌تواند بر میوه‌های دانه‌دار و هسته‌دار تأثیر بگذارد (Eastwell et al. 2014). مطالعات کنترل زیستی مبتنی بر استفاده از ریز موجودات زنده برای مهار عامل بیماریزا و کاهش استفاده از قارچ‌کش‌ها در میوه‌ها در زمان انبارداری و بازاریابی برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت و کاهش خسارت و ضایعات در طول زنجیره تأمین مواد غذایی ضروری است (Eastwell et al. 2014). قارچ‌کش‌های شیمیایی اغلب به‌عنوان یکی از روش‌های اصلی برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند. با این حال، برای دستیابی به سبک زندگی پایدار، استفاده از

لوله تندش (درازا)، تعداد لوله تندش و فاصله نخستین انشعاب تا کنیدیوم) در سه تکرار محاسبه شد و مقایسه آن‌ها با مشخصات ثبت‌شده برای گونه‌های *Monilinia* در کلید شناسایی *Van Leeuwen et al.* (2002) صورت گرفت. میانگین ابعاد کنیدیوم‌ها با استفاده از فتومیکروسکوپ مجهز به نرم‌افزار Digital Camera Viewer 6.0 بر اساس اندازه (عرض و طول) ۵۰ کنیدیوم برای هر جدایه اندازه‌گیری شد (*Yin et al.* 2015).

استخراج DNA ژنومی و PCR

میسیلیوم ۳۵ جدایه *Monilinia spp.* برای شناسایی مولکولی انتخاب شد، DNA جدایه‌های منتخب طبق روش *Moller et al.* (1992) انجام شد. جدایه‌ها در سطح گونه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طی واکنش زنجیره ای پلی مرز چند گانه (Multiplex PCR) شناسایی شدند (*Hu et al.* 2011). برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، DNA نمونه‌ها تا غلظت نهایی ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. لیست آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای شناسایی گونه‌های *Monilinia* (*Casarin et al.* 2017).

Table 1. List of specific primers used to identify *Monilinia* species (*Casarin et al.* 2017).

Primer Sequence (5-3)	Primers	Product size (bp)	Species-Specificity
F: 5' TGCACATCATATCCCTCGAC 3'	Laxa-R2	351 bp	<i>Monilinia laxa</i>
R: 5' GCAAGGTGTCAAACTTCCA 3'	MO368-5		
F: 5' AAGATTGTCACCATGGTTGA 3'	MO368-10R	535 bp	<i>M. fructicola</i>
R: 5' GCAAGGTGTCAAACTTCCA 3'	MO368-5		
F: 5' AGATCAAACATCGTCCATCT 3'	MO368-8R	402 bp	<i>M. fructigena</i>
R: 5' GCAAGGTGTCAAACTTCCA 3'	MO368-5		

محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام و در دستگاه ژل داک توسط نور فرابنفش (UV) مشاهده شد. به‌عنوان استاندارد برای مقایسه اندازه باندهای تقویت‌شده، از نشانگر وزن مولکولی DNA Ladder 100pb (Invitrogen) استفاده شد.

آماده‌سازی میوه سیب

میوه‌های سالم سیب رقم (Golden delicious) با اندازه یکنواخت و بدون لکه یا پوسیدگی در مرحله بلوغ تجاری در پاییز ۱۴۰۱-۱۴۰۲ از باغات شهر خرم‌آباد جمع‌آوری شدند. میوه‌های جمع‌آوری‌شده قبل از برداشت هیچ‌گونه تیمار

بهینه‌سازی تأثیر متابولیت‌های ثانویه که دارای اثر آنتی‌بیوتیکی هستند مورد نیاز است (*Dikin et al.* 2003).

مطالعه حاضر با هدف شناسایی عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب در شهرستان خرم‌آباد استان لرستان و نیز بررسی فعالیت آنتاگونیستی برخی سویه‌های باکتریایی برای کنترل عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی و انباری در مقایسه با قارچکش تیوفانات متیل انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی، شناسایی ریخت‌شناختی

در مجموع ۱۰۰ نمونه شکوفه و میوه سیب آلوده با علائم پوسیدگی قهوه‌ای از باغ‌های شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری شد، از هر نمونه دو جدایه با استفاده از روش جداسازی تک اسپور جداسازی شدند و جدایه‌های منتخب روی محیط کشت عصاره سیب زمینی، دکستروز-آگار (PDA) کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها بر اساس بررسی مشخصات اسپورودوکیموم (رنگ و ابعاد روی بافت گیاهی)، پرگنه (سرعت رشد روی محیط کشت، رنگ و حاشیه پرگنه، نحوه اسپورزایی)، کنیدیوم (شکل و اندازه کنیدیوم) و ویژگی‌های

مخلوط واکنش حاوی ۱۰-۱۵ نانو گرم DNA، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر واکنش 10X، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مول از هر یک از dNTPها، پنج پیکومول از هر یک از آغازگرها (جدول ۱)، ۰/۵ واحد آنزیم DNA پلی‌مرز بود. حجم مخلوط واکنش با استفاده از آب مقطر سترون به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد (*Lghvani et al.* 2016). واکنش PCR شامل مراحل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله نهایی گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. الکتروفورز

رشد قارچ از روش کشت دوگانه استفاده شد (Grzegorzczak *et al.* 2017; Parafati *et al.* 2017). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی (1×10^8 CFU/mL) در تشتک پتری حاوی محیط کشت سترون NA کشت داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. سپس دیسک‌های میسلیومی با قطر پنج میلی‌متر از میسلیوم در حال رشد فعال *M. laxa* در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. در شرایط سترون با برداشتن درب تشتک‌های پتری، تشتک پتری حاوی قارچ را روی تشتک پتری حاوی باکتری به صورت وارونه قرار داده و سپس با پارافیلیم لبه‌های دو تشتک پتری برای جلوگیری از نشت گاز به بیرون مسدود و تشتک پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. قطر میسلیوم قارچی با فواصل زمانی ۲۴ ساعته برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و میزان کاهش رشد میسلیومی بعد از ۱۴ روز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. جهت اطمینان تمام آزمایش‌ها دو بار تکرار شد و هر تیمار شامل چهار تکرار بود.

(۱)

$$I (\%) = (T - C) / (C) \times 100$$

I) درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیماری‌زا، C قطر پرگنه قارچ در پتری شاهد، T قطر پرگنه تیمار در تشتک پتری تیمار).

بررسی اثر ترشحات مایع

این آزمون به روش Kraus & Loper (1992) انجام شد. سوسپانسیون سویه‌های باکتری‌های آنتاگونیست با غلظت 1×10^8 CFU/mL تهیه شد، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون به‌طور یکنواخت روی محیط کشت PDA کشت و توسط یک چوب‌پنبه سترون‌شده پخش شد. سپس ظروف پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. سپس در شرایط کاملاً سترون در زیر هود میکروبیولوژیکی، باکتری‌های آنتاگونیست با کمک پنبه سترون‌شده از سطح تشتک پتری پاک شد. سپس پنبه آغشته به کلروفرم را به مدت ۳۰ ثانیه در داخل تشتک پتری و روی درب آن قرار داده شد تا باقیمانده باکتری‌ها در اثر بخار کلروفرم کاملاً از بین بروند. در مرحله بعد دیسک‌های میسلیومی از کشت ۴۸ ساعته قارچ عامل بیماری در وسط تشتک پتری قرار گرفتند. درصد ممانعت از رشد میسلیوم جدایه قارچ بیماری‌زا طبق رابطه ۱ محاسبه شد.

قارچ‌کشی دریافت نکرده بودند. سیب‌ها پس از شستن با آب برای حذف آلودگی‌های سطحی، به مدت هفت دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم تجاری ۰/۱ درصد غوطه‌ور، پس از آن با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند (Grzegorzczak *et al.* 2017).

آماده‌سازی آنتاگونیست

جدایه‌های باکتری (*Bacillus cereus* (ON526813)، *Serratia* (ON526812)، *Bacillus sp* (ON526806) و *marcescens* (ON526811) و *Pseudomonas baetica* (ON526811) از خاک ریزوسفر درختان سیب جدا شدند. باکتری‌ها با استفاده از توالی 16S rRNA و مقایسه توالی‌ها با درصد همولوژی بالا از بانک ژن بانک (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) شناسایی شدند. آنتاگونیست‌های باکتریایی در آزمایشگاه در محیط مایع (LB) اصلاح‌شده با ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا استفاده بعدی نگهداری شدند. غلظت نهایی هر آنتاگونیست باکتریایی با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۶۰۰ نانومتر بر روی 1×10^8 CFU/mL تنظیم شد (Parafati *et al.* 2017).

قارچ‌کش مورد استفاده

قارچ‌کش متیل تیوفانات (۱ گرم در لیتر) محصول شرکت آریا شیمی به‌عنوان کنترل مثبت برای آزمایش‌های انباری استفاده شده است.

آماده‌سازی پاتوژن

سوسپانسیون کنیدیومی *M. laxa* از کشت ۱۴ روزه روی محیط PDA با افزودن پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی Tween 20 و خراش دادن ملایم سطح پرگنه با یک اسکالپل برای جدا کردن میسلیوم و کنیدیوم از محیط PDA تهیه شد. غلظت نهایی سوسپانسیون کنیدیومی با استفاده از لام گلبول شمار در حد 1×10^6 کنیدیوم در میلی‌لیتر تنظیم شد (Lahlali *et al.* 2020).

بررسی تأثیر باکتری‌های جدا شده بر رشد قارچ بیماری‌زا در شرایط برون تنی (*in vitro*)

بررسی اثر ترشحات گازی

به‌منظور بررسی تأثیر ترشحات گازی (Volatile organic compounds) تولیدشده توسط سویه‌های باکتریایی در کاهش

سابقه استفاده از قارچ‌کش انتخاب و روی هر سیب زخمی (به قطر سه میلی‌متر و عمق چهار میلی‌متر) در دایره استوایی ایجاد شد. سیب‌ها به دسته‌های شش تایی تقسیم شدند. میوه‌ها در سینی‌های پلاستیکی حاوی دستمال کاغذی مرطوب در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند، هر زخم با ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست تلقیح شد، در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به‌جای سوسپانسیون باکتریایی استفاده گردید و اجازه داده شد تا خشک شوند. کیسه‌های حاوی سیب‌های تلقیح شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد یا ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میوه‌های تیمار شده ۲۴ ساعت بعد با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون کنیدیومی *M. laxa* با غلظت 1×10^6 کنیدیوم در میلی‌لیتر تلقیح شدند. سپس میوه‌ها به مدت یک ماه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قارچ‌کش متیل تیوفانات (یک گرم در لیتر) به مقدار ۲۰ میکرولیتر برای هر زخم به‌عنوان تیمار کنترل شیمیایی استفاده گردید. میوه‌های سیب تیمار شده با آب مقطر سترون و فقط با تلقیح قارچی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. داده‌های مربوط به بروز بیماری (Disease Incidence) (درصد میوه‌های پوسیده) و شدت بیماری (Disease Severity) (قطر ناحیه آلوده اطراف زخم برحسب میلی‌متر) اندازه‌گیری و برای تجزیه و تحلیل آماری مورد استفاده قرار گرفتند. قطر ناحیه آلوده با استفاده از کولیس ثبت شد. شدت بیماری‌زایی بر اساس فرمول شماره ۲ (Lahlali et al., 2020) و درصد بیماری‌زایی بر اساس (جدول ۲) و فرمول شماره ۳ محاسبه شدند (Cardoso et al. 2004):

(۲)

$$DS (\%) = (DT) / (DC) \times 100$$

در این رابطه DT بیانگر قطر ناحیه آلوده (میلی‌متر) در تیمار قارچ و آنتاگونیست و DC قطر ناحیه آلوده (میلی‌متر) در تیمار قارچ است.

(۳)

$$DI = \frac{\sum Xini}{N} \times 100$$

در این رابطه DI بیانگر میزان وقوع بیماری، X تعداد میوه‌های بیمار و N تعداد کل میوه‌های ارزیابی شده است.

بررسی اثر ترشحات مایع فیلتر شده عاری از سلول باکتری (cell free extract) این آزمون به روش (Cirvilleri et al. 2005) انجام شد. ابتدا هر جدایه باکتری درون ارزن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط NB (Nutrient Broth; Merck Germany) سترون کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتور دورانی با دور ۱۲۵ rpm در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ۴۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های رشد کرده به داخل فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور شش هزار سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی به‌دست‌آمده با استفاده از فیلترهای میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرومتری سترون گردیدند و در لوله فالكن سترون دیگری ریخته شدند. برای بررسی تأثیر عصاره باکتریایی به‌دست‌آمده این عصاره‌ها به نسبت ۲۵ درصد به محیط کشت PDA با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد اضافه گردیدند. پس از جامد شدن محیط دیسک‌های میسیلیومی با قطر پنج میلی‌متر از میسیلیوم در حال رشد فعال *M. laxa* در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA کشت شدند. در تشتک شاهد به‌جای عصاره باکتریایی از محیط کشت NB سترون استفاده گردید. تشتک‌های کشت داده‌شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا زمانی که رشد میسیلیوم‌های قارچ بیمارگر در تیمار شاهد به نیم سانتی‌متری لبه تشتک شاهد رسید نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۲۴ ساعته قطر پرگنه قارچ برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر طبق رابطه ۱ محاسبه شد.

بررسی اثر جدایه‌های باکتری در کنترل بیماری پوسیدگی

قهوه‌ای سیب در دمای ۴ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار (۴ جدایه باکتری، قارچ‌کش تیوفانات متیل و شاهد) در چهار تکرار (هر تکرار شامل ۶ میوه سیب) انجام گردید. ابتدا سوبه‌های باکتریایی در محیط NB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. سوسپانسیون حاصل در ۷۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، در بافر فسفات رقیق شد و غلظت آن به 1×10^8 CFU/mL سلول باکتری تنظیم شد.

میوه‌های سیب سالم رقم با اندازه یکنواخت از باغ بدون

جدول ۲. سیستم نمره‌دهی برای محاسبه درصد بیماری‌زایی.

Table 2. Scoring system for percentage of pathogenicity.

Percentage of symptoms	No.
Asymptomatic	1
Soft caries (1-25%)	2
Early stage of the disease (limited mycelium) (26-50%)	3
Intermediate stage of disease (mycelium / sporulation) (51-75%)	4
Advanced stage of the disease (mycelium / abundant sporulation) (76-100%)	5

نتایج

ویژگی‌های ریخت‌شناسی

علائم بیماری در باغ‌های سیب به صورت پیدایش پوسیدگی قهوه‌ای روی میوه‌های سیب و حالت مومیایی شدن میوه‌ها دیده شد (شکل ۱- A). این پوسیدگی روی میوه سیب در باغ همراه با نواحی نکروزه، با بالشک‌های نخودی رنگ و کنیدیوم-برهای متعدد (شکل ۱- B) روی میسیلیوم همراه بود. بررسی ریخت‌شناختی پرگنه و سرعت رشد جدایه‌های قارچ روی محیط کشت PDA نشان داد که رنگ پرگنه در شرایط تاریکی خاکستری‌رنگ و در شرایط روشنایی/ تاریکی قهوه‌ای روشن بود، و قطر پرگنه روی PDA پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و روشنایی به ترتیب ۴۳/۷ و ۲۸/۹ میلی‌متر، لبه پرگنه رزتی شکل و دارای قوس‌های خاکستری است (شکل ۱- D)، کنیدیوم‌ها لیمویی شکل (شکل ۱- E)، با میانگین $13/63$ (۸/۳۴ تا $17/28$) $\times 10^4$ (۱۰/۴۳ تا $7/35$) تا $14/45$ میکرومتر، طول لوله تندش در این جدایه‌ها ۱۶۰ میکرومتر و فاصله اولین انشعاب تا کنیدیوم ۶۰ میکرومتر و دارای الگوی جوانه‌زنی با تنها یک لوله جوانه در هر کنیدیوم (شکل ۱- I). بر اساس علائم بیماری ایجادشده، ریخت‌شناسی پرگنه قارچ‌های جداشده، ویژگی‌های ریخت‌شناختی کنیدیوم و نحوه کنیدیوم‌زایی و آرایش کنیدیوم‌ها روی کنیدیوم‌بر و الگوی جوانه‌زنی کنیدیوم‌های قارچ‌های جداشده، عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب *M. laxa* شناسایی شد.

شناسایی مولکولی عامل پوسیدگی قهوه‌ای سیب

شناسایی گونه‌های جدایه *Monilinia* spp با پرایمرهای اختصاصی Laxa-R2 و MO368-5 تأیید شد، زیرا یک قطعه PCR از ۳۵۱ جفت باز برای همه جدایه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۲). این اندازه قطعه فقط برای نمونه *M. laxa* انتظار می‌رود. با توجه به اینکه پرایمرها برای دو گونه *M. fructicola* و *M. fructigena* به ترتیب قطعاتی به اندازه ۵۳۵ و ۴۰۲ جفت باز را تولید کردند از این رو با توجه به اندازه

بررسی کارایی جدایه‌های انتخاب شده باکتری در کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انبار

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار (دو جدایه باکتری، قارچ‌کش تیوفانات متیل و شاهد) در چهار تکرار (هر تکرار شامل یک کیسه پلاستیکی حاوی ۱۰ میوه سیب) انجام گردید. دو جدایه باکتری دارای حداکثر کارایی در آزمون‌های قبلی برای این مرحله انتخاب شدند. میوه‌های سیب سالم رقم با اندازه یکنواخت از باغ بدون سابقه استفاده از قارچ‌کش انتخاب شدند. میوه‌های سیب (به قطر سه میلی‌متر و عمق چهار میلی‌متر) در چهار نقطه مساوی زخمی شدند. آن‌ها سپس در سوسپانسیون باکتریای (1×10^8 CFU/mL) به مدت دو دقیقه غوطه‌ور شدند. میوه‌های سیب در کیسه‌های پلاستیکی (۱۰ میوه سیب / کیسه) با چهار تکرار قرار داده و در انبار در دمای چهار درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، میوه‌های سیب با سوسپانسیون کنیدیوم (1×10^6 کنیدیوم در میلی‌لیتر) *M. laxa* تلقیح و در انبار در دمای چهار درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. تعداد میوه‌های آلوده هر پنج روز یک‌بار تا زمانی که سیب‌ها در تیمارهای شاهد کاملاً آلوده شدند شمارش شد. آزمایش در طول زمان دو بار تکرار شد. میزان بروز بیماری (%) برای هر تیمار بر اساس فرمول شماره چهار محاسبه شد (Lahlali et al. 2020):

(۴)

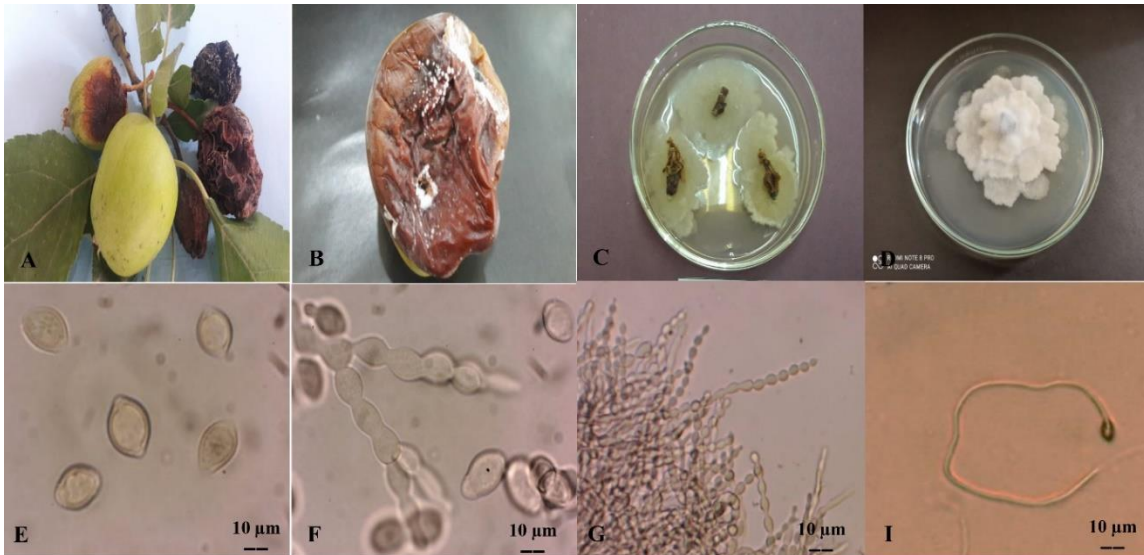
$$100 \times \text{تعداد کل میوه‌ها} \times \text{تعداد میوه‌های آلوده} = (\%) \text{ وقوع بیماری}$$

تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها دو بار در طول زمان انجام شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab18 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

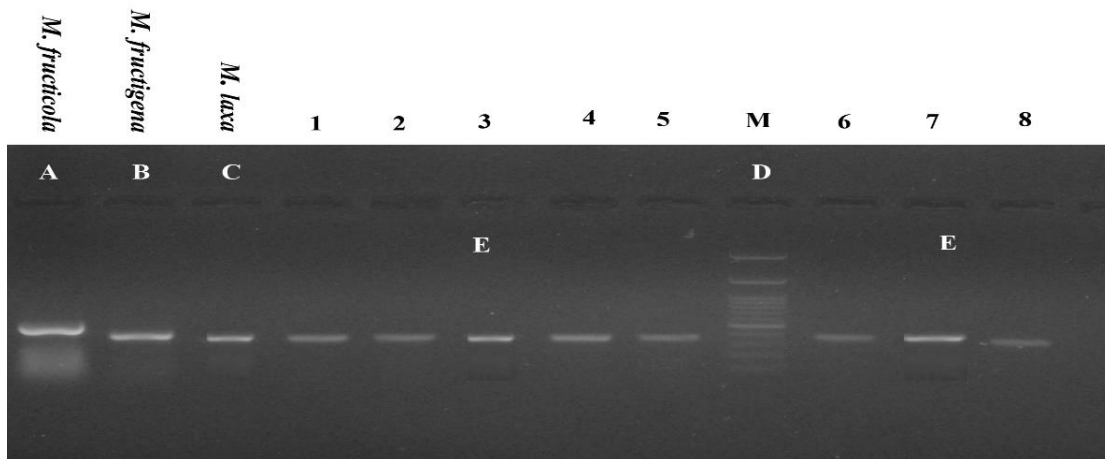
fructigena CBS101501 اهدایی دکتر ارزنلو از دانشگاه تبریز صورت گرفت.

قطعه تولیدشده گونه موردبررسی قارچ *M. laxa* شناسایی شد (شکل ۲). نمونه‌های مرجع با کدهای M509 = *M. laxa* و M510 = *M. fructicola* GF57، CBS10153 و M533 = *M.*



شکل ۱. پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از *Monilinia laxa* در سیب. A: علامت پوسیدگی قهوه‌ای بر روی میوه سیب، B: یک میوه آلوده به پوسیدگی قهوه‌ای پوشیده از توده کنیدیوم مایل به نخودی و اسپورودوکيوم، C: شکوفه‌های آلوده به پوسیدگی قهوه‌ای، D: پرگنه هفت روزه روی PDA، E-G: زنجیره‌های مونیلیوئیدی و کنیدیوم‌های لیمویی شکل، H: جوانه‌زنی لوله تندش.

Figure 1. Brown rot caused by *Monilinia laxa* on apple. A: Symptom of brown rot on apple, B: Brown rot infected fruit covered with the beige spore mass and sporodochia, C: Blossoms infected with brown rot, D: 7 days old colony on PDA, E-F-G: Monilioid chains and lemon shaped conidia, H: Germ tube and spore germination.

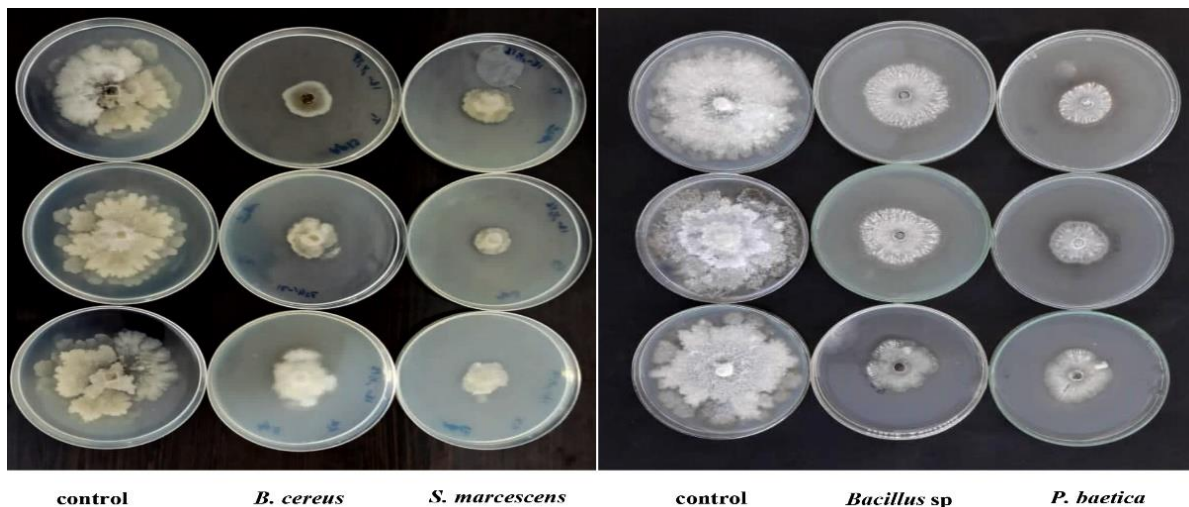


شکل ۲. تشخیص گونه‌های *Monilinia* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طی واکنش زنجیره ای پلی مرز، A: ستون ۵۳۵ bp نمونه مرجع *M. fructicola*، B: ستون ۴۰۲ bp نمونه مرجع *M. fructigena*، C: ستون ۳۵۱ bp نمونه مرجع *M. laxa*، D: ستون M -100 bp مارکر DNA، E: ستون‌های ۱ تا ۸ نمونه‌های جداشده از سیب.

Figure 2. Identification of *Monilinia* species based on species-specific primers using polymerase chain reaction. The product of the reaction of multiple chains with specific primers of four *Monilinia* species: A: Column 535 bp reference sample *M. fructicola*, B: Column 402 bp reference sample *M. fructigena*, C: Column 351 bp reference sample *M. laxa*, D: Column M -100 bp DNA Ladder, E: Columns 1 to 8 isolated samples of apples

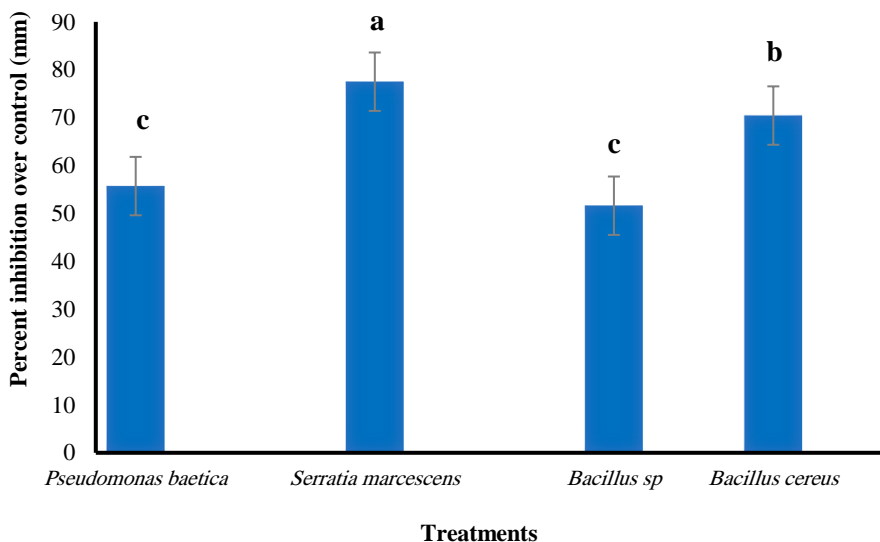
چهار جدایه آزمایش شده (شکل‌های ۳ و ۴) *S. marcescens* و *B. cereus* مؤثرترین سویه‌ها در مهار رشد میسلیومی (۷۷٫۵، ۷۰٫۴۳ درصد) بودند. سویه‌های *P. baetica* و *Bacillus sp.* به ترتیب ۵۵/۷٪ و ۵۱/۶۲٪ رشد میسلیومی قارچ را مهار کردند.

تأثیر ترکیبات آلی فرار بر رشد میسلیومی قارچ *M. laxa* هر چهار جدایه *S. marcescens*، *P. baetica*، *Bacillus sp.* و *B. cereus* جدا شده از ریزوسفر درختان سیب در شرایط آزمایشگاهی رشد میسلیوم *M. laxa* را مهار کردند. در بین



شکل ۳. کاهش قطر رشد میسلیوم *M. laxa* ناشی از *Serratia marcescens*، *Pseudomonas baetica*، *Bacillus sp.* و *B. cereus* روی دکستروز آگار سیب‌زمینی به روش متابولیت‌های فرار.

Figure 3. Reduction of mycelial growth diameter of *M. laxa* induced by *Pseudomonas baetica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp.* and *B. cereus* on potato dextrose agar, in volatile metabolites method.



شکل ۴. اثرات متابولیت‌های فرار *Pseudomonas baetica*، *Serratia marcescens*، *Bacillus sp.* و *B. cereus* بر رشد میسلیوم *M. laxa* روی محیط کشت PDA. ستون‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری باهم ندارند ($p < 0.05$).

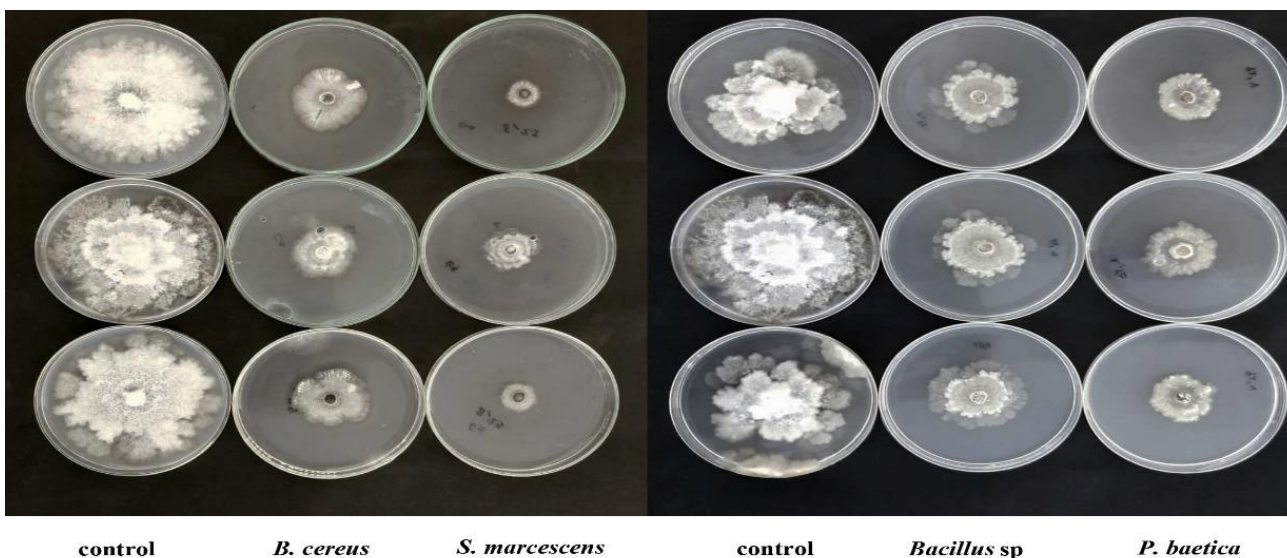
Figure 4. Effects of volatile metabolites of *Pseudomonas baetica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp.* and *Bacillus cereus* on mycelial growth of *M. laxa* on potato dextrose agar. Column with same letter are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

B. cereus و *Bacillus sp.* فعالیت بازدارندگی متفاوتی را بر رشد میسلیومی *M. laxa* نشان دادند (شکل ۵). در بین چهار جدایه

تأثیر ترشحات مایع باکتری‌ها بر رشد میسلیومی قارچ *M. laxa* ترشحات مایع چهار جدایه *P. baetica*، *S. marcescens*،

میسیلیومی و جدایه‌های *B. cereus* و *Bacillus sp.* به ترتیب

آزمایش‌شده (شکل‌های ۵ و ۶)، *S. marcescens* و *P. baetica*

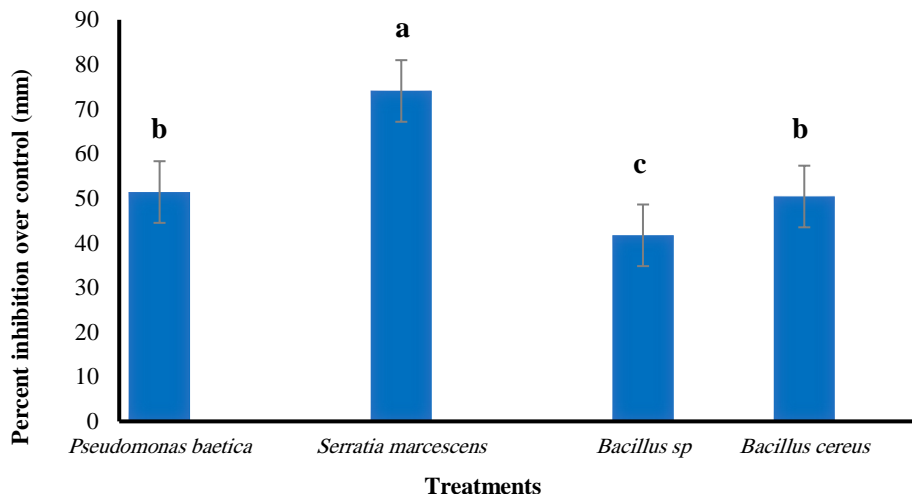


بیشترین تأثیر (۷۴/۰۵، ۵۱/۴ درصد) را در مهار رشد

میسیلیوم *M. laxa* را داشتند. ۴/۵۰٪ و ۱۷/۴۱٪

شکل ۵. کاهش قطر رشد میسیلیوم *Monilinia laxa* ناشی از *Pseudomonas baetica*، *Serratia marcescens*، *Bacillus sp.* و *Bacillus cereus* بر روی دکستروز آگار سیب‌زمینی، در سنجش متابولیت‌های غیر فرار.

Figure 5. Reduction of mycelial growth diameter of *Monilinia laxa* induced by *Pseudomonas baetica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp.* and *B. cereus* on potato dextrose agar, in non-volatile metabolites assay.



شکل ۶. اثرات متابولیت‌های غیر فرار *Pseudomonas baetica*، *Serratia marcescens*، *Bacillus sp.* و *Bacillus cereus* بر رشد میسیلیوم *Monilinia laxa* روی دکستروز آگار سیب‌زمینی. ستون با حرف یکسان با توجه به آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند ($p < 0.05$).

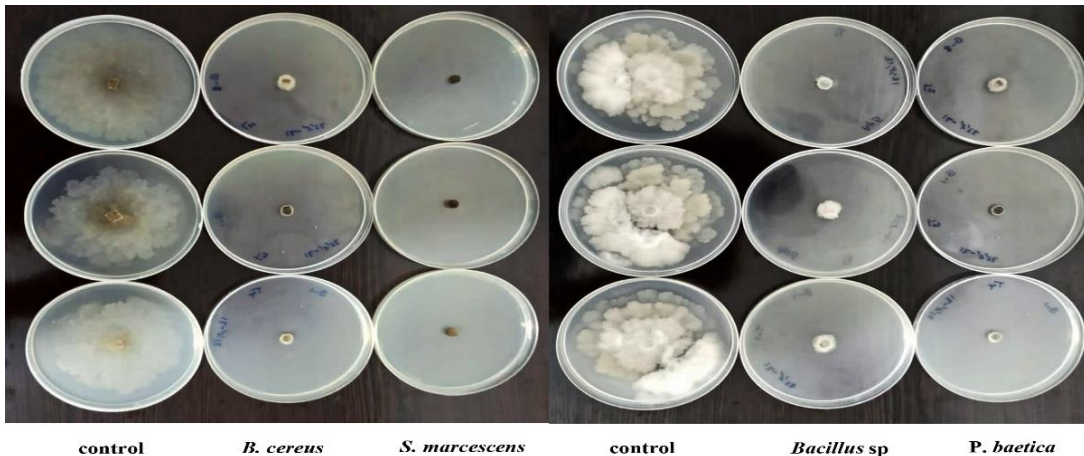
Figure 6. Effects of non-volatile metabolites of *Pseudomonas baetica*، *Serratia marcescens*، *Bacillus sp.* and *Bacillus cereus* on mycelial growth of *Monilinia laxa* on potato dextrose agar. Column with same letter are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

فرار و غیر فرار بود (تلقیح هم‌زمان) و هر چهار جدایه *P. baetica*، *S. marcescens*، *Bacillus sp.* و *B. cereus* فعالیت بازدارندگی متفاوتی را علیه *M. laxa* نشان دادند (شکل ۷). در بین چهار جدایه آزمایش‌شده (شکل‌های ۷ و ۸)، *S. marcescens* و *B. cereus* در

بررسی اثر ترشحات مایع فیلتر شده عاری از سلول باکتری بر رشد میسیلیومی *M. laxa* اثربخشی ترشحات مایع فیلتر شده و عاری از سلول باکتری‌ها بر رشد میسیلیومی قارچ *M. laxa* به‌طور قابل توجهی بالاتر از دو روش

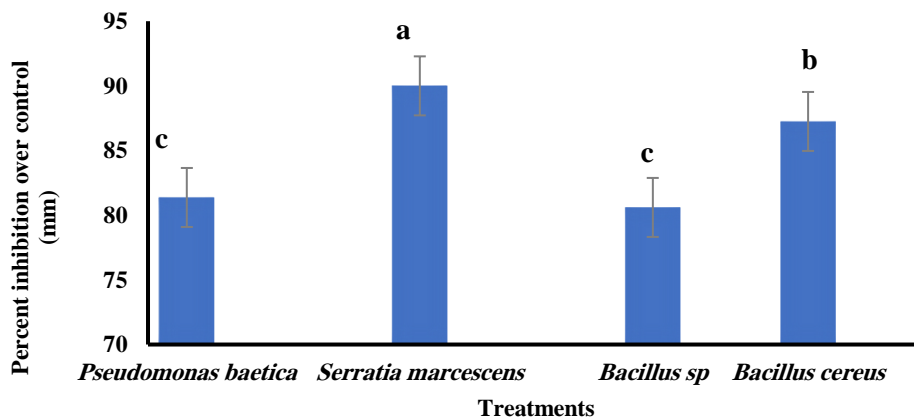
رشد میسلیم را نشان دادند.

مهار رشد میسلیم (۹۰ و ۸۷/۲۵ درصد) مؤثرترین بودند. *P. baetica* و *Bacillus* sp. جدایه‌ها به ترتیب ۸۱/۳۷٪ و ۸۰/۱۶٪ مهار



شکل ۷. کاهش قطر رشد میسلیم *Monilinia laxa* ناشی از *Pseudomonas baetica*، *Serratia marcescens*، *Bacillus* sp و *Bacillus cereus* بر روی دکستروز آگار سیب‌زمینی، در روش فیلترهای بدون سلول.

Figure 7. Reduction of mycelial growth diameter of *Monilinia laxa* induced by *Pseudomonas baetica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus* sp and *Bacillus cereus* on potato dextrose agar, in cell-free assay.



شکل ۸. اثرات فیلترهای کشت غیرفرار *Pseudomonas baetica*، *Serratia marcescens*، *Bacillus* sp. و *Bacillus cereus* بر رشد میسلیم *Monilinia laxa* روی دکستروز آگار سیب‌زمینی. ستون با حرف یکسان با توجه به آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند ($p < 0.05$).

Figure 8. Effects of non volatile culture filtrates of *Pseudomonas baetica* , *Serratia marcescens*, *Bacillus* sp. and *Bacillus cereus* on mycelial growth of *Monilinia laxa* on potato dextrose agar. Column with same letter are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

باکتریایی تفاوت بسیار معنی‌داری وجود دارد. باکمال تعجب، هر دو جدایه باکتری *S. marcescens* و *B. cereus* حفاظت بالاتر در برابر *M. laxa* با شدت بیماری کمتر برای هر دو دمای ۴ (۳/۴-۲۶/۳۱) و ۱۵ درجه سانتی‌گراد (۲/۴۲ و ۹/۲۸) در مقایسه با شاهد آلوده نشان دادند. نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، آنتاگونیست‌های باکتریایی عملکرد بهتری را نسبت به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد را نشان دادند. با این حال، کاربرد قارچ‌کش متیل تیوفانات همیشه بهترین عملکرد را در

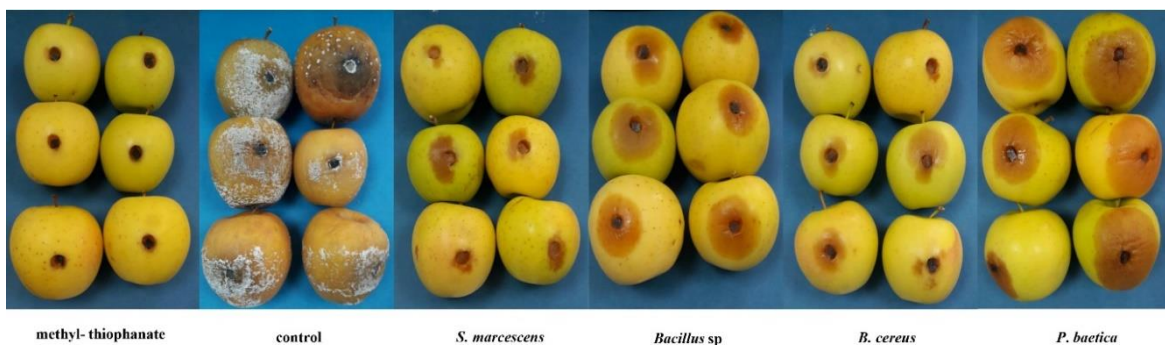
بررسی اثر جدایه‌های باکتری در کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب در دمای ۴ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد تیمار با آنتاگونیست‌های باکتریایی *S. marcescens*، *B. cereus*، *P. baetica* و *Bacillus* sp. بروز و شدت پوسیدگی قهوه‌ای را در میوه زخمی سیب تلقیح شده با *M. laxa* کاهش داد و به ترتیب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند (شکل ۹ و ۱۰). تجزیه و تحلیل آماری شدت بیماری نشان داد که بین جدایه‌های

کاهش (۱۰۰٪) بروز و شدت پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از *M. laxa* در دو دمای مختلف نشان داد (جدول ۲).



شکل ۹. اثرات *Serratia marcescens*، *Bacillus sp.* و باکتری *Bacillus cereus* و قارچ کش متیل تیوفانات بر بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب ناشی از *Monilinia laxa* در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Figure 9. Effects of *Pseudomonas baetica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp.* and *Bacillus cereus* bacteria and thiophanate methyl fungicide on apple brown rot disease caused by *Monilinia laxa* at 4 °C.



شکل ۱۰. اثرات *Pseudomonas baetica*، *Serratia marcescens*، *Bacillus sp.* و باکتری *Bacillus cereus* و قارچ کش متیل تیوفانات بر بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب ناشی از *Monilinia laxa* در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد.

Figure 10. Effects of *Pseudomonas baetica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp.* and *Bacillus cereus* bacteria and thiophanate methyl fungicide on apple brown rot disease caused by *Monilinia laxa* at 15 °C.

جدول ۲. تجزیه و تحلیل اثرات *P. baetica*، *S. marcescens*، *Bacillus sp.* و *Bacillus cereus* و قارچ کش متیل تیوفانات بر بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب ناشی از *Monilinia laxa* در دمای ۴ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد.

Table 2. Analyses of effects of *Pseudomonas baetica*, *Serratia marcescens*, *Bacillus sp.* and *Bacillus cereus* bacteria and thiophanate methyl fungicide treatments on apple brown rot disease caused by *Monilinia laxa* at 4 and 15 °C.

<i>Monilinia laxa</i>	Temperature=4 °C		Temperature=15 °C	
	DI (%)	DS (mm)	DI (%)	DS (mm)
<i>B. cereus</i> AP13	31.4 ^c	6.21 ^c	42.2 ^c	10.5 ^c
<i>Bacillus sp</i> AP6	56.7 ^b	22.9 ^b	59.7 ^b	24.1 ^b
<i>P. baetica</i> AP4	49.7 ^c	12.7 ^c	62.4 ^b	29.1 ^b
<i>S. marcescens</i> AP5	26.3 ^d	3.91 ^d	28.9 ^d	4.90 ^c
methyl-thiophanate	0.00 ^e	0.00 ^e	0.00 ^e	0.00 ^d
Control	88.4 ^a	30.3 ^a	100 ^a	48.6 ^a

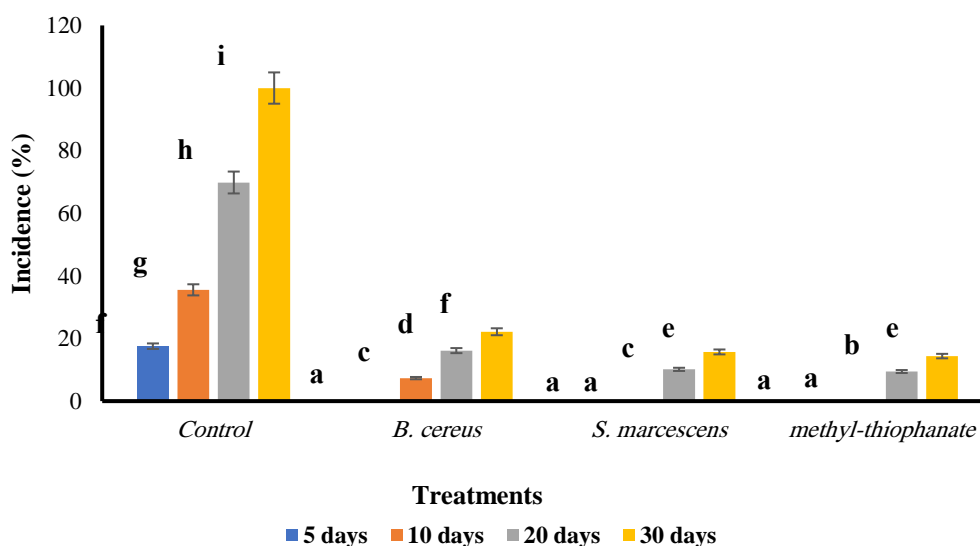
Each value represents the mean of 4 replicates (6 apple fruits). Data followed by different letters in each column are significantly different according to Fisher's least significant difference test ($P \leq 0.05$).

بیماری حاصل از آن را داشتند در این آزمایش در مقیاس بزرگ‌تر مورد استفاده قرار گرفتند و نتایج نشان داد که آلودگی در همه تیمارها به‌طور قابل توجهی با تیمار شاهد تفاوت داشتند ($P < 0.05$). در همه تیمارها بروز بیماری پوسیدگی قهوه‌ای

بررسی اثر جدایه‌های باکتری در کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای سیب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انبار جدایه‌های *S. marcescens* AP5 و *B. cereus* AP13، که در آزمایش‌های قبلی بهترین عملکرد را در کنترل بیمارگر و

به تدریج با افزایش دوره نگهداری از پنج به ۳۰ روز افزایش یافت. در ۱۰ روز، هیچ عفونتی در میوه‌های سیب تیمار شده با سویه باکتری *S. marcescens* AP5 و قارچ کش تیوفانات متیل مشاهده نشد، در حالی که در تیمار *B. cereus* AP13 بروز پنج درصد پوسیدگی مشاهده گردید که به طور قابل توجهی کمتر از کنترل شاهد با ۲۰ درصد بود. پس از ۲۰ روز نگهداری، بروز پوسیدگی میوه‌های سیب تیمار شده با *S. marcescens* AP5، *B. cereus* AP13 و قارچ کش تیوفانات متیل به ترتیب ۱۰/۱۴، ۱۶/۱۳ و ۹/۴۵ درصد و در تیمار شاهد بروز بیماری ۶۹/۸۳٪ بود. هنگامی که میوه‌های سیب تیمار نشده به طور کامل (۱۰۰٪) آلوده شدند، بروز پوسیدگی میوه‌های سیب در تیمارهای *S. marcescens* AP5، *B. cereus* AP13 و قارچ کش تیوفانات متیل به ترتیب ۱۵/۷۱، ۲۲/۱۵ و ۱۴/۳۸ درصد بود. هر دو جدایه باکتریایی محافظت قابل توجهی در برابر بیماری پوسیدگی قهوه‌ای در مقایسه با قارچ کش تیوفانات متیل در ۳۰ روز پس از دوره کمون ارائه کردند (شکل ۵).

به تدریج با افزایش دوره نگهداری از پنج به ۳۰ روز افزایش یافت. در ۱۰ روز، هیچ عفونتی در میوه‌های سیب تیمار شده با سویه باکتری *S. marcescens* AP5 و قارچ کش تیوفانات متیل مشاهده نشد، در حالی که در تیمار *B. cereus* AP13 بروز پنج درصد پوسیدگی مشاهده گردید که به طور قابل توجهی کمتر از کنترل شاهد با ۲۰ درصد بود. پس از ۲۰ روز نگهداری، بروز پوسیدگی میوه‌های سیب تیمار شده با *S. marcescens* AP5، *B. cereus* AP13 و قارچ کش تیوفانات متیل به ترتیب ۱۰/۱۴، ۱۶/۱۳ و ۹/۴۵ درصد و در تیمار شاهد بروز بیماری ۶۹/۸۳٪ بود. هنگامی که میوه‌های سیب تیمار نشده به طور کامل (۱۰۰٪) آلوده شدند، بروز پوسیدگی میوه‌های سیب در تیمارهای *S. marcescens* AP5، *B. cereus* AP13 و قارچ کش تیوفانات متیل به ترتیب ۱۵/۷۱، ۲۲/۱۵ و ۱۴/۳۸ درصد بود. هر دو جدایه باکتریایی محافظت قابل توجهی در برابر بیماری پوسیدگی قهوه‌ای در مقایسه با قارچ کش تیوفانات متیل در ۳۰ روز پس از دوره کمون ارائه کردند (شکل ۵).



شکل ۱۱. بروز پوسیدگی قهوه‌ای میوه سیب ناشی از *M. laxa* (1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر) تحت درمان با *Serratia marcescens* AP5 و *Bacillus cereus* AP13 و تیوفانات متیل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت پنج، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز انکوبه شدند. داده‌ها نشان‌دهنده میانگین سه تکرار (۱۰ میوه سیب / تکرار) در هر تیمار است. ستون با حرف یکسان با توجه به آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند ($p < 0.05$).

Figure 11. Incidence of brown rot of apple fruits caused by *M. laxa* (1×10^6 spores/mL) treated by *Serratia marcescens* AP5 and *Bacillus cereus* AP13 and thiophanate methyl incubated at 4 °C for 5, 10, 20 and 30 days. Data represent the mean of three replicates (10 apple fruits/replicate) per treatment. Columns having the same letter are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

Monilinia با پرایمرهای اختصاصی انجام گردید و یک قطعه ۳۵۱ جفت بازی در محصول PCR توسط همه جدایه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۲). این واقعیت همچنین توسط Casarin et al. (2017) با جدایه‌های *Monilinia* spp که باعث پوسیدگی قهوه‌ای در هلو در برزیل می‌شود تأیید شد. در مطالعه‌ای توسط (2006) Pizzuolo et al. نویسندگان با استفاده از تکنیک RAPD، شناسایی گونه‌های جدا شده *Monilinia* را با معیارهای ریخت‌شناختی تأیید کردند. این واقعیت همچنین توسط Hu et al. (2011) و با جداسازی *Monilinia* spp که باعث پوسیدگی قهوه‌ای در هلو در چین می‌شود تأیید شد. مطالعات قبلی تنوع ژنتیکی را در بین جدایه‌های همان‌گونه *Monilinia* گزارش کرده‌اند، مانند آنچه توسط Gril et al. (2008) انجام شد، که از تکنیک AFLP استفاده

بحث

بیماری پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از گونه‌های *Monilinia* یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌ها در درختان میوه‌های هسته‌دار و دانه‌دار است. شش گونه قارچ از جنس *Monilinia* به نام‌های *M. polystroma* (Y. Harada)، *M. laxa*، *M. fructigena*، *M. fruticola* (Leeuwen) و *M. yunnanensis* (Hu) باعث بیماری پوسیدگی قهوه‌ای روی میوه‌های هسته‌دار و دانه‌دار می‌شوند؛ Hashemi et al. 2007; (Hu et al. 2011; Yin et al. 2015; Luo 2017). بررسی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های بیمارگر و مقایسه آن‌ها با منابع مربوطه (Hrustić et al. 2015; Lane 2002) نشان دادند که این جدایه‌ها متعلق به گونه *M. laxa* هستند. شناسایی جدایه‌های گونه‌های

مکانیزم اصلی برای فعالیت زیستی *B. subtilis* CPA-8 در کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از *M. laxa* و *M. fructicola* گزارش شده است (Yáñez-Mendizábal et al. 2012). علاوه بر این، درمان میوه‌های سیب با سویه *Pantoea agglomerans* EPS125 به‌طور قابل توجهی شیوع بیماری پوسیدگی قهوه‌ای (*M. laxa*) و قطر ضایعه ایجاد شده را کاهش داده است (Lahlali et al. 2020). به‌طور کلی، نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر محققین که در آن چندین سویه باکتریایی که فعالیت‌های آنتاگونیستی در برابر بیماری پوسیدگی قهوه‌ای دارند در برابر بیماری پوسیدگی قهوه‌ای مؤثر واقع شده‌اند، مطابقت دارد. در این مطالعه، دو جدایه باکتری *S. marcescens* AP5 و *B. cereus* AP13، در کنترل *M. laxa* در شرایط برون تنی (*in vitro*) و درون تنی (*in vivo*) بسیار مؤثر بودند. نتایج نشان داد که بین جدایه‌های باکتریایی برای کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای پس از برداشت ناشی از *M. laxa* تفاوت بسیار معنی‌داری وجود دارد. این توانایی برای مهار پاتوزن بسته به ماهیت، تعداد و کارایی مکانیسم‌ها و متابولیت‌های درگیر تولید شده توسط هر باکتری نیز متفاوت است. در واقع، مشخص است که باکتری‌ها می‌توانند از طریق آنتی‌بیوز با ترشح مواد ضد قارچ (ترکیبات آلی فرار) مانند HCN یا از طریق انگلی با تولید آنزیم‌های لیتیک مانند کیتیناز، گلوکاناز، آمیلاز، پروتئاز و سلولاز، رشد قارچ را مهار کنند (Sethi et al. 2018). در آزمایش‌های زیست‌سنجی آزمایشگاهی، نتایج درون تنی (میوه‌های سیب) نرخ مهار رشد قارچ *M. laxa* و شدت بیماری پوسیدگی قهوه‌ای به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر جدایه‌های باکتریایی قرار گرفتند. هر دو جدایه باکتری *S. marcescens* AP5 و *B. cereus* AP13 بالاترین نرخ مهار و کمترین شدت بیماری را نشان دادند. این نتایج مشابه نتایج Mari et al. (2012) است، آن‌ها دریافتند که اثر آنتاگونیستی *Monilinia Aureobasidium pullulans* L1 و *L8* علیه سه گونه (*M. fructigena*، *M. fructicola*، *M. laxa*) در آزمایش‌های زیستی بالاتر بود. Lahlali et al. (2020) تأکید کردند که *B. amyloliquefaciens* SF14 و *Alcaligenes faecalis* مؤثرترین باکتری‌هایی هستند که از بین ۱۸ جدایه باکتریایی آزمایش شده در کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای انتخاب شده‌اند. اثربخشی هر دو باکتری انتخاب شده قابل مقایسه یا حتی برابر با اثر قارچ‌کش تیوفانات-متیل (۱ppm) بود. هر دو باکتری انتخاب شده توانایی محافظت از میوه‌های سیب را در برابر حملات *M. laxa* از طریق دوره‌های نگهداری طولانی (۳۰ روز) نشان داده‌اند. در نهایت، استفاده از این باکتری‌ها برای کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای را می‌توان با استفاده از آن‌ها در ترکیب با سایر روش‌های سازگار با محیط‌زیست از جمله استفاده از آن‌ها، به‌ویژه، در مخلوط با افزودنی‌ها یا قارچ‌کش‌ها در غلظت کم افزایش داد (Conway et al. 2005).

کردند و تنوع را در بین ۶۷ جدایه *M. laxa* تأیید کردند. جداسازی عامل ایجاد علائم پوسیدگی قهوه‌ای از میوه‌های سیب آلوده منجر به بازیابی ۵۸ جدایه *M. laxa* شد. یک جایگزین ممکن و کم‌خطر برای مدیریت پوسیدگی میوه *Monilinia* کنترل زیستی با استفاده از ریز موجودات آنتاگونیستی است که اغلب از منابع غذایی و محیط طبیعی جدا می‌شوند (Grzegorzczak et al. 2017). تا به امروز، مبارزه شیمیایی با استفاده از قارچ‌کش‌ها، راهکار اصلی کنترل بیماری‌های پس از برداشت هستند. با این حال، برای دستیابی به یک سبک زندگی پایدار، استفاده از باکتری‌ها به‌عنوان BCA برای بیماری‌های قارچی به‌عنوان یکی از قابل اعتمادترین و امیدوارکننده‌ترین جایگزین‌ها برای قارچ‌کش‌های شیمیایی ظاهر شده است (Spadaro et al. 2016; Lahlali et al. 2020). در مطالعه حاضر توانایی چهار باکتری جدا شده از خاک طبیعی فراریشه باغات سیب شهرستان خرم‌آباد در کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای روی میوه‌های سیب ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که جدایه‌های باکتریایی آزمایش شده، نرخ مهار (بیش از ۷۰ درصد) رشد میسیلیومی قارچ *M. laxa* را در زیست‌سنجی آزمایشگاهی نشان دادند. این نتایج با نتایجی که قبلاً در مورد گونه‌های *Monilinia* با استفاده از گونه‌های مختلف باکتری گزارش شده بود مطابقت دارد (Aiello et al. 2019; Barka et al. 2016). نتایج نشان داد که نرخ مهار به‌دست آمده با ترکیبات آلی فرار به‌طور قابل توجهی کمتر از نرخ‌های مهار به‌دست آمده با استفاده از ترشحات مایع فیلتر نشده و فیلتر شده عاری از سلول باکتریایی (cell-free culture filtrate) است، که ممکن است نشان دهد که سویه‌ها از چندین حالت عمل برای تحریک فعالیت‌های آنتاگونیستی خود بسته به ماهیت پاتوزن استفاده می‌کنند. این نتایج همچنین با نتایج گزارش شده در مطالعات متعدد (Gotor-Vila et al. 2017; Aiello et al. 2019) مطابقت دارد. علاوه بر این، ترشحات مایع بدون سلول یک عمل بازدارنده هم‌روی جوانه‌زنی کنیدیوم و هم بر رشد قارچ *M. laxa* در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند. نتایج مشابهی توسط Zhou et al. (2008) گزارش شده است. در همین راستا، Liu et al. (2011) مهار جوانه‌زنی کنیدیوم و رشد میسیلیوم *M. fructicola* را در حضور ترشحات مایع و فیلتر شده عاری از سلول باکتریایی *B. amyloliquefaciens* C06 گزارش کرده‌اند، که ممکن است حاوی ترکیبات ضد قارچی باشد. آنتاگونیست‌های باکتریایی متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Serratia* به‌خوبی شناخته شده‌اند که می‌توانند ترکیبات آنتی‌بیوتیکی از خانواده لیپوپپتیدها مانند فنزسین و باسیلومایسین را ترشح کنند، همان‌طور که قبلاً در چندین مطالعه قبلی گزارش شده است (Dimkic et al. 2013; Lahlali et al. 2020). یافته‌های مطالعه اخیر از این فرضیه حمایت می‌کند که آنتی‌بیوز به‌شدت در فعالیت کنترل زیستی باکتری‌های مورد استفاده نقش داشته است. آنتی بیوز به‌عنوان یک

باین‌حال، قبل از حرکت به مرحله بعدی بازاریابی این باکتری‌ها به‌عنوان محصولات قارچ‌کش، باید مطالعات بیشتری انجام شود.

سیاسگزاری

بخشی از کارهای تحقیق حاضر، طی فرصت مطالعاتی داخل نویسنده اول در آزمایشگاه قارچ‌شناسی تکمیلی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز انجام شده است، بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از آقای دکتر مهدی ارزولو که در انجام این تحقیق ما را مساعدت نمودند اعلام می‌داریم.

References

- Aiello D, Restuccia C, Stefani E, Vitale A, Cirvilleri G, 2019. Postharvest biocontrol ability of *Pseudomonas synxantha* against *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit. *Postharvest Biology & Technology* 149: 83–89.
- Backer R, Rokem J. S, Praslickova D, Ricci E, Smith DL, 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9: 1473.
- Barka EA, Vatsa P, Jacquard C, Klenk HP, van Wezel GP, 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(1): 1–43.
- Cardoso JE, Santos AA, Rossetti AG, Vidal JC, 2004. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. *Plant Pathology* 53(3): 363–367.
- Carvalho FP, 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6(2): 48–60.
- Casarin JV, Casa-Coila VH, Rossetto EA, Bianchi VJ, 2017. Identification and variability of *Monilinia* spp. isolates from peach. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 12(4): 421–427.
- Cirvilleri G, Bonaccorsi A, Scuderi G, Scortichini M, 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *Journal of Phytopathology* 153(11-12): 654–666.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA, 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied & Environmental Microbiology* 71(9): 4951–4959.
- Conway WS, Leverentz B, Janisiewicz WJ, Saftner RA, Camp MJ, 2005. Improving biocontrol using antagonist mixtures with heat and/or sodium bicarbonate to control postharvest decay of apple fruit. *Postharvest Biology & Technology* 36(3): 235–244.
- Dikin AK, Sijam MAZ, Abidin, Idris AS, 2003. Biological control of seedborne pathogen of oil palm, *Schizophyllum commune* Fr. with antagonistic bacteria. *Journal of Agriculture & Biology* 5: 507–12.
- Dimkic I, Živković S, Gavrilović V, Stanković S, Fira D, 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control* 65(3): 312–321.
- Eastwell KC, Howell WE, Sutton TB, Agnello AM, Walgenbach JF, 2014. Chlorotic leaf spot (apple topworking disease). *Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests*. St. Paul: The American Phytopathological Society 95–96.
- Esmaeel Q, Miotto L, Rondeau M, Leclère V, Jacquard C, Barka EA, 2018. Paraburkholderia phytofirmans PsJN-plants interaction: from perception to the

- induced mechanisms. *Frontiers in Microbiology* 9: 2093.
- FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020.
- Gotor-Vila A, Teixidó N, Di Francesco A, Usall J, Torres R, Mari M, 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology* 64: 219–225.
- Gril T, Celar F, Munda A, Javornik B, Jakse J, 2008. AFLP analysis of intraspecific variation between *Monilinia laxa* isolates from different hosts. *Plant Disease* 92(12): 1616–1624.
- Grzegorzczak M, Żarowska B, Restuccia C, Cirvilleri G, 2017. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* & *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology* 61: 93–101.
- Hashemi SA, Khodaparast SA, Hashemi ZB, 2007. Identification of *Monilinia* species, associated with brown rot of pome and stone fruits in Guilan province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 43.
- Holb IJ, Dremák P, Barkaszi I, Abonyi F, Gáll JM, Gonda I, 2022. Developing a management strategy based on the relationships between brown rot and codling moth in two apple production systems. *Agronomy for Sustainable Development* 42(2): 30.
- Hrustić J, Delibašić G, Stanković I, Bulajić A & Tanović B, 2015. *Monilinia* spp. causing brown rot of stone fruit in Serbia. *Plant Disease* 99(5): 709–717.
- Hu MJ, Cox KD, Schnabel G, Luo CX, 2011. *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS One* 6(9): e24990.
- Irani H, Kiumarsi Sh, Ommati F, Ershad D, 2003. Etiological study of stone fruit dieback and decline in West Azarbaijan, Semnan and Kerman Provinces Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 39: 57–72 (in Persian) & 15–18 (in English).
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ, 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 845.
- Khoshkhatti N, Eini O, Koolivand D, 2023. Effect of mycorrhizal fungus *Rhizoglyphus irregularis* on the infection of tomato with Tomato bushy stunt virus. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 12(2):199–209.
- Kraus J, Loper JE, 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology* 82(3): 264–271.
- Lahlali R, Aksissou W, Lyousfi N, Ezrari S, Blenzar A, Tahiri A, Amiri S, 2020. Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit. *Microbial Pathogenesis* 139: 103914.
- Lane CR, 2002. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *EPPO Bulletin* 32(3): 489–493.
- Lghvani M, Arzanlou M, Babaeiahari A, 2016. Identification of *Monilinia* species associated with brown rot disease of stone fruit trees in West Azarbaijan province of Iran, based on morphological and molecular characteristics. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 5(1): 143–157.
- Liu J, Zhou T, He D, Li XZ, Wu H, Liu W, Gao X, 2011. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Microbial Physiology* 20(1): 43–52.
- Luo CX, 2017. Advances and prospects on researches of brown rot disease on fruits. *Acta Phytopathologica Sinica* 47: 145–153.
- Mari M, Martini C, Guidarelli M, Neri F, 2012. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biological Control* 60(2): 132–140.

- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20(22): 6115.
- Moarrefzadeh N, Khateri H, Abbasi S, 2023. Alleviation of Rhizoctonia root rot damage in common bean by some arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 12(1): 13–24.
- Nishimoto R, 2019. Global trends in the crop protection industry. *Journal of Pesticide Science* 44(3): 141–147.
- Panebianco S, Vitale A, Polizzi G, Scala F, Cirvilleri G, 2015. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. *Biological Control* 84: 19–27.
- Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G, 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology* 47: 85–92.
- Parafati L, Vitale A, Restuccia C, Cirvilleri G, 2017. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology* 63: 191–198.
- Pizzuolo PH, Chilosi G, Balmas V, Aleandri MP, Vitale S, et al., 2006. Variations in the molecular and physiological characteristics and the virulence of *Monilinia fruticola*, *M. fructigena* and *M. laxa* isolates. *Phytopathologia Mediterranea*. 2006 45(2):139–52.
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A, 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* 3(3): 430–439.
- Sethi SK, Mukherjee AK, 2018. Screening of biocontrol potential of indigenous *Bacillus* spp. isolated from rice rhizosphere against, *R. solani*, *S. oryzae*, *S. rolfsii* and response towards growth of rice. *Journal of Pure & Applied Microbiology* 12: 41–53.
- 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 in Food Science & Technology* 47: 39–49.
- van Leeuwen GCM, Baayen RP, Holb IJ, Jeger MJ, 2002. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* spp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research* 106 (4): 444–451.
- Vickers NJ, 2017. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current Biology* 27(14): R713–R715.
- Yáñez-Mendizábal V, Zerriouh H, Viñas I, de Vicente A, Teixidó N, 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology* 132: 609–619.
- Yin LF, Chen SN, Chen GK, Du SF, Chen C, Luo CX, 2015. Identification and characterization of three *Monilinia* species from plum in China. *Plant Disease* 99(12): 1775–1783.
- Zhou T, Schneider K. E & Li X. Z, 2008. Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post-harvest peach brown rot caused by *Monilinia fruticola*. *International Journal of Food Microbiology* 126: 180–185.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)