مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۶ ، شماره ۴، سال ۱۳۸۹

مطالعه میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز و فنل کل در میوه‌های سیب رقم زرد تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Penicillium expansum* عامل کپک آبی سیب

Study of Changes in Peroxidase Enzyme and Total Phenol in Golden Delicious Apple Fruits Inoculated with an Antagonistic Isolate of *Pseudomonas fluorescens* and *Penicillium expansum* the Causal Agent of Apple Blue Mould

فرودعلی خزائی[۱]، حسن‌رضا اعتباریان[۲]، علی روستائی[۳] و علی علیزاده[۴]

۱- کارشناس ارشد بیماریهای گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد ورامین، پیشوا
۲ و ۳- استاد، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران
۴- استادیار، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۸/۶

چکیده

خزائی، ف. ع.، اعتباریان، ح. ر.، روستائی، ع.، و علیزاده، ع. ۱۳۸۹. مطالعه میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز و فنل کل در میوه‌های سیب رقم زرد تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Penicillium expansum* عامل کپک آبی سیب. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۶ (۴): ۴۳۳ - ۴۱۹.**

در این تحقیق میزان تغییرات برخی ترکیبات دفاعی گیاهی از جمله آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل در میوهٔ سیب رقم زرد، پس از مایه‌زنی با یک جدایه آنتاگونیست باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Penicillium expansum* بررسی شد. برای این منظور از جدایه *P. fluorescens* F7 که کارایی آن در کنترل بیماری کپک آبی سیب قبلاً به اثبات رسیده‌بود، استفاده شد. استخراج و اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و فنل کل به ترتیب در روزهای سوم، ششم، نهم و دوازدهم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری انجام شد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل در میوه‌های سیب تیمار شده با تیمار باکتری و قارچ به صورت توأم، در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در این تیمار بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل در روز نهم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد که افزایش در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی، می‌تواند دلیلی بر القای این ترکیبات دفاعی در میوهٔ سیب توسط باکتری *P. fluorescens* باشد.

واژه‌های کلیدی: القای مقاومت، آنزیم پراکسیداز، فنل کل، *Pseudomonas fluorescens*، *Penicillium expansum*.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: fkhazaii@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

میوه‌ها به دلیل داشتن ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات آنتی‌اکسیدان بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند. از آنجائیکه سلامتی با نوع رژیم غذایی رابطه دارد، انسان مصرف‌کننده را بر آن داشته است تا به دنبال غذایی عاری از بقایای سموم، توکسین‌ها و میکروارگانیسم‌های مضر باشد. میزان خسارت وارده بر میوه‌جات از مزرعه، انبار و تا مصرف، به دلیل فقدان امکانات انبارداری مناسب در کشورهای توسعه یافته تا ۲۵٪ (Harvey, 1978) و در کشورهای درحال توسعه تا ۵۰٪ نیز می‌رسد (Eckert and Ogawa, 1985).

امروزه به دلیل توجه ویژه به سلامتی انسان و محیط زیست (Wilson and Wisniewski, 1994) و همچنین مقاوم شدن برخی جدایه‌های عوامل بیماریزای پس از برداشت به سموم (Romano *et al.*, 1983; Spotts and Cervantes, 1986) انگیزه‌ها برای یافتن روش‌های جایگزین برای سموم بسیار بیشتر شده‌است. در این بین کنترل بیولوژیک به تنهایی و یا در تلفیق با سایر روش‌های کنترل بیماری آیندهٔ امیدوارکننده‌ای از خود نشان داده است. در راستا و تقویت هرچه بیشتر کنترل بیولوژیک، القای مقاومت در میوه‌ها و استفاده از فراورده‌های گیاهی و یا حیوانی که خاصیت ضد قارچی دارند نیز مورد توجه قرار گرفته است (Spadaro and Gullino, 2004).

در زمان تهاجم قارچ به میوه، عامل بیماریزا با استراتژی‌های دفاعی میزبان، مانند تجمع عناصر تشکیل دهندهٔ سدهای دفاعی، تولید ترکیبات ضدمیکروبی که مستقیماً مانع تهاجم عامل بیماریزا می‌شوند و با گروههای مختلف فعال اکسیژن خصوصاً سوپراکسید (O_2^-) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) که توسط میزبان در محل حمله تولید می‌شوند نیز روبرو خواهد شد. گروههای فعال اکسیژن باعث اکسید شدن ترکیبات داخل سلول از جمله چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند.

گیاهان نیز دارای ساز و کارهای ضد اکسیداسیونی در جهت کاهش اثر رادیکالهای آزاد می‌باشند. این سازوکارها شامل بروز تغییراتی در میزان آنزیم‌های دفاعی گیاه مانند کاتالاز (Catalase)، پراکسیداز (Peroxidase)، پلی‌فنل‌اکسیداز (Polyphenol oxidese)، آنزیم PAL (Phenylalanine ammonialyse) و ترکیبات دیگری از جمله فنل‌ها می‌باشد (Staskawicz *et al.*, 1995).

در زمان تحریک گیاه توسط برخی مواد شیمیایی، نژادهای ناسازگار عوامل بیماریزا و یا عوامل بیماریزایی که ظهور علائم آنها وابسته به شرایط محیطی است، ظرفیت دفاعی گیاه بالا می‌رود، که این حالت به القاء مقاومت تعبیر می‌شود (Gorlach *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1991).

واکنش‌های دفاعی القا شده می‌توانند فقط در محلی که تحریک صورت گرفته اتفاق

Archive of SID

www.SID.ir

بیفتند (القای موضعی)، که تولید ترکیباتی مانند هیدروکسی پرولین‌ها، لیگنین و فیتو آلکسین‌ها در محل تحریک و مرگ سریع سلولها در محل ورود عوامل بیماریزا (واکنش فوق حساسیت) از جملهٔ این موارد است. در صورتیکه این واکنش‌ها در کل بافت و یا قسمت‌های مختلف گیاه تحریک شده القاء شوند (القای سیستمیک) (Diby and Sharma, 2005).

مقالات زیادی در رابطه با کنترل بیماریهای پس از برداشت از جمله کپک آبی سیب (Blue mould) با استفاده از آنتاگونیست‌های باکتریایی، قارچی و مخمری وجود دارد. یکی از ساز و کارهای عوامل بیوکنترل در کنترل بیماریهای پس از برداشت تحریک واکنش های بیوشیمیایی بافت میزبان گیاهی بر علیه عامل بیماریزا می‌باشد(Stevens *et al.*, 1999).

جدایه‌های *Pseudomonas fluorescence* باعث افزایش میزان آنزیم‌های پراکسیداز (PO)، پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)، کاتالاز (CAT) و فنیل آلانین آمونیو لایز (PAL) در قسمتهای مختلف گیاه فلفل سیاه از ریشه تا ساقه در مقابل قارچ *Phytophthora capsici* شدند. که دلیل بر القای مقاومت سیستمیک در گیاه بر علیه این عامل بیماریزا می‌باشد (Diby and Sharma, 2005).

در پی تیمار گیاهان با PGPR ها (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)، افزایش چشمگیری در مقدار فیتوالکسین‌ها (Van Peer *et al.*, 1991) ترکیبات فنلی (Piga *et al.*, 1997)، پراکسیدازها (Albert and Anderson, 1987; Zdore and Anderson, 1992)، سطوح mRNA های شناساگر فنیل آلانین آمنیولاز (PAL) و همچنین میزان چوبی شدن گیاه، مشاهده شده است (Anderson and Guerra, 1985).

ترکیبات فنلی جزو ترکیباتی هستند که در تمام گیاهان شامل میوه جات، سبزیجات، غلات و... وجود دارند. این ترکیبات جزو متابولیتهای ثانویه گیاهان هستند (Taiz and Zeiger, 2002). به طور طبیعی بالغ بر ۸۰۰۰ ترکیب فنلی مختلف با تأثیرهایی از قبیل دخالت در ساخت دیوارهٔ سلولی، دخیل در مکانیسم دفاعی گیاه و دخیل در خصوصیات میوه مانند رنگ، عطر، طعم و مزه، در گیاه وجود دارد. همچنین ترکیبات فنلی به عنوان شاخص‌هایی برای مراحل فیزیولوژیکی در طول رشد میوه نیز در نظر گرفته می‌شوند (Macheix *et al.*, 1990).

ساخته شدن ترکیبات فنلی در گیاهان از طریق جدا شدن عامل آمینی از فنیل آلانین توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیو لایز (PAL) صورت می گیرد. آنزیم PAL به صورت غیر مستقیم در ساختن چندین ترکیب فنلی، از جمله پلیمرهای سازندهٔ دیواره سلولی دخالت دارد (Parr and Bolwell, 2000).

بر اساس یافته‌های و نیوسال (Matern and Kneeusal, 1998) اولین مرحله در فعالیت دفاعی گیاه، تجمع ترکیبات فنلی در

Archive of SID

www.SID.ir

محل آلودگی بوده که باعث توقف و یا کند شدن رشد عامل بیماریزا می‌شود. بسیاری از ترکیبات فیتوالکسینی شناخته شده متعلق به گروه فنل‌ها می‌باشند (Kindl, 1994). مقدار این ترکیبات با توجه به بافت مورد حمله قرار گرفته متفاوت می‌باشد (Harborne, 1994). تنش‌های شیمیایی، مکانیکی و یا بیولوژیکی متابولیسم ترکیبات فنلی را در میوهٔ سیب تغییر می‌دهند (Mayr *et al.*, 1994). میزان فعالیت آنزیم‌های اکسیدکنندهٔ فنل‌ها در ارقام مقاوم و یا در بافت‌های مورد حمله بسیار بیشتر از ارقام حساس و یا گیاهان مصون می‌باشد (Agrios, 1988).

هدف از انجام این تحقیق، بررسی میزان تغییرات برخی ترکیبات دفاعی گیاه از جمله آنزیم پراکسیداز و میزان فنل کل موجود در میوه سیب رقم زرد پس از مایه‌زنی با قارچ *p. expansum* و باکتری *p. fluorescens* f7 و همچنین اثر توام این قارچ و باکتری در افزایش این متابولیت‌ها می باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب میوه‌های سیب

جهت انجام آزمایشات، میوه‌های سیب رقم زرد (Golden Delicious) از میدان‌های میوه و تره بار شهرستان‌های پاکدشت و ورامین تهیه شد. سیب‌های انتخاب شده بدون هر گونه زخم، لهیدگی و یا سوراخ بودند.

انتخاب جدایهٔ قارچ عامل بیماری

جدایه Pe2 *Penicillium expansum* از میوه‌های سیب آلودهٔ جمع‌آوری شده از سردخانهٔ مهرشهر کرج جدا شد و در مطالعات آزمایشگاهی، بیماریزایی بسیار شدیدی از خود نشان داد (Khazaee, 2010). سوسپانسیون اسپور مورد استفاده از کشت‌های ۱۰-۷ روزه قارچ بر روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar, Merck) برداشت شد و غلظت آن، با استفاده از لام گلبول‌شمار در حدود ۱×۱۰^{۴} Con./ml تنظیم شد (Nunes *et al.*, 2001).

انتخاب جدایهٔ باکتری آنتاگونیست

جدایهٔ F7 *P. fluorescens* نیز از سطح میوه‌های سیب جمع‌آوری شده از سردخانهٔ مهرشهر کرج جدا شد و در بررسی‌های آزمایشگاهی و انبار، اثر کنترل‌کنندگی خوبی بر علیه رشد میسیلیومی Pe2 *P. expansum* و بیماری کپک آبی از خود نشان داد (Khazaee, 2010). رقت سوسپانسیون باکتری، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۲۰ nm بر روی ۰/۳-۰/۲ = OD تنظیم شد. میزان جمعیت باکتری در این محدودهٔ نوری حدود ۱×۱۰^{۹} CFU./ml. تخمین زده شده است (Nunes *et al.*, 2001).

مایه‌زنی باکتری آنتاگونیست و قارچ عامل بیماری

میوه‌های سیب ابتدا کاملاً با آب شسته شد، سپس به مدت ۷ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲٪ گذاشته شدند. میوه‌ها پس از دو بار شستشو با

Archive of SID

www.SID.ir

آب مقطر استریل، در الکل اتانول ۹۵٪ فرو برده شدند. پس از آن میوه‌ها بر روی یک سطح استریل گذشته شده و اجازه داده شد تا کاملاً خشک شوند (Sholberg *et al*., 1995).

با استفاده از یک میخ استریل سه سوراخ (۳ × ۳ × ۳ mm) با فاصله‌های مساوی در هر سیب ایجاد شد (Etebarian *et al*., 2005).

میزان ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (۱×۱۰^{۹} CFU/ml) به هر یک از سوراخ‌ها تزریق شد. سیب‌های مایه‌زنی‌شده، هر کدام به طور جداگانه داخل یک ظرف یکبار مصرف گذاشته شد و با خود ظرف، داخل یک کیسه پلاستیکی قرار داده شدند. برای حفظ رطوبت داخل کیسه در هنگام نیاز چند پاشش از آب مقطر استریل به وسیله مه‌پاش دستی به داخل آن پاشیده شد.

پس از ۲۴ ساعت، مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچی (۱×۱۰^{۴} Con./ml) به داخل سوراخهای تیمار شده با سوسپانسیون باکتری، مایه‌زنی شد. سیب‌ها با حفظ پلاستیک و رطوبت لازم به انبارهای مورد نظر و با دمای مشخص انتقال داده شدند (Etebarian *et al*., 2005).

آزمایشات مربوط به اندازه‌گیری میزان فنل کل و میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز به طور جداگانه و هر کدام با ۴ تیمار (باکتری تنها، قارچ تنها، باکتری و قارچ توأم و سیب‌های فقط سوراخ شده) و ۶ تکرار (هر سیب یک تکرار) در دمای $۲۰\ ^{o}C$ انجام شد. برای هر کدام از این آزمایشات در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری میزان فنل کل و میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز، اندازه‌گیری شد.

استخراج عصاره و اندازه‌گیری میزان آنزیم پراکسیداز

ابتدا در محیط یخ، پنج گرم از بافت سیب (از محل مایه زنی شده) در ۱۵ ml بافر فسفات (0.05 M, pH:7.0) حاوی (Poly vinyl poly pyrolidone) PVPP (w/v ٪۱۰) و EDTA ۰/۱ M (Ethylene di amine tetra acetic acid) در یک هاون چینی کاملاً له شد. مخلوط حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g در دمای $۴\ ^{o}C$ سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون رویی جهت بررسی میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز برداشته شد (Gong *et al*., 2001).

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش اصلاح شدهٔ وتر و همکاران (Vetter *et al*., 1956) توسط گورین و هیدما (Gorin and Heidema, 1976) به شرح زیر انجام شد.

در ابتدا مخلوط واکنش با ترکیبات زیر تهیه شد:

a.	عصارهٔ استخراج شده از سیب.	۰/۱ ml.
b.	MES buffer(pH : ۵/۵ ،۰/۱ M)	۱/۳۵ ml.
c.	H_2O_2	٪۰/۰۵
d.	فنیلن دی آمین	٪۰/۱

برای تهیه این ترکیب ابتدا قسمتهای d, b, a با هم مخلوط و در کیووت دستگاه

Archive of SID

www.SID.ir

اسپکتروفوتومتر ریخته شد. سپس قسمت c نیز به مخلوط درون کیووت اضافه شد و بلافاصله تغییرات جذب نور در طول موج ۴۸۵ nm به مدت ۳ دقیقه و هر ۱۵ ثانیه یکبار اندازه‌گیری شد (Gorin and Heidema, 1976). مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین (Δ OD /Min./mg. protein) بیان شد.

برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین تام موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد (Bradford, 1976) به شرح زیر تعیین شد:

تهیه معرّف براد فورد

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم پودر کوماسی بریلیانت بلو (G 250) را در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ حل کرده (محلولی زنگالی رنگ)، سپس بر روی شیکر مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محلول اسید فسفریک ۸۵٪ (W/V) به صورت قطره قطره به محلول فوق اضافه شد. رنگ محلول به تدریج تغییر نموده و نهایتاً قهوه‌ای روشن شد (Bradford, 1976).

تهیه محلول پایه پروتئین استاندارد

مقدار پنج میلی‌گرم از پروتئین استاندارد (Fluka) در پنج میلی لیتر بافر فسفات سدیم (pH :۷ ؛۵۰ mM) mM حل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پروتئین استاندارد مورد استفاده آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin = BSA) فراکسیون پنج بود.

تهیه منحنی استاندارد پروتئین

مقادیر ۶۰، ۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۷۰ میکروگرم از محلول پروتئین استاندارد (BSA stock) به طور جداگانه به سه میلی‌لیتر معرف برادفورد در لوله‌های آزمایش کوچک (پنج میلی‌لیتری) اضافه شد. پس از اختلاط کامل بلافاصله با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور آنها در طول موج ۵۹۵ nm اندازه‌گیری شد. لوله‌های حاوی صفر میکرولیتر پروتئین استاندارد جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد (Bradford, 1976).

تعیین میزان پروتئین عصاره

مقدار ۳۵ میکرولیتر از عصاره هر نمونه سیب با سه میلی‌لیتر معرف براد فورد در یک لوله آزمایش کوچک مخلوط شد، سپس میزان جذب در ۵۹۵ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Bradford, 1976). برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. میانگین جذب نور برای هر نمونه محاسبه و با استفاده از فرمول یا منحنی استاندارد میزان کل پروتئین هر نمونه در ۳۵ میکرو لیتر آن محاسبه گردید.

ارزیابی میزان فنل کل (Total phenol)

استخراج فنل از میوهٔ سیب

ابتدا در محیط یخ مقدار دو گرم از میوهٔ سیب (محل مایه‌زنی) در هاون چینی حاوی ۱۰ml اتانول اسیدی ۱٪ (۱٪ HCL-ethanol) سرد، کاملاً کوبیده شد. سپس عصارهٔ حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ ^{o}C با دور ۱۲۰۰۰ g

Archive of SID

www.SID.ir

سانتریفیوژ شد. پس از عمل سانتریفیوژ مخلوط رویی جهت مراحل بعدی نگهداری شد (Pirie and Mullinis, 1976).

تهیه محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

مقدار ۱۰ میلی‌گرم اسید کافئیک در پنج میلی‌لیتر متانول خالص کاملاً حل شده و حجم نهایی آن با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷/۵ و ۸ میلی‌لیتر از این محلول، به طور جداگانه در لوله‌های کوچک آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب در ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هر یک از لوله‌ها به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم اسید کافئیک وجود داشت (Etebarian, 1988).

تهیه کربنات سدیم اشباع

برای این منظور در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، (در روی شیکر) آنقدر کربنات سدیم حل شد تا اینکه در ته ظرف، رسوب کربنات سدیم به وجود آمد. این محلول باید طوری باشد که پس از گذشت یک یا دو روز هنوز مقدار کمی رسوب داشته باشد (Etebarian, 1988). معرف فولین مورد نیاز نیز به صورت آماده خریداری شد.

تهیه منحنی استاندارد فنل(اسید کافئیک) و معادله رگرسیون

در لوله‌های آزمایش ده میلی‌لیتری مقدار هفت میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف آماده شده اسید کافئیک در مرحله قبل، به آن اضافه و به دنبال آن ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. پس از مختصری اختلاط، محلولی به رنگ سبز متمایل به زرد به دست آمد. دقیقاً سه دقیقه پس از افزودن معرف فولین یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی آن با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از مختصری اختلاط رنگ محلول خاکستری تیره شد. پس از گذشت یک ساعت میزان جذب نور هر یک از محلول‌ها در طول موج ۷۲۵ nm اندازه‌گیری شد (Etebarian, 1988). برای هر غلظت سه تکرار منظور شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از محلولی که فاقد اسید کافئیک بود و به همان میزان آب مقطر اضافه شده بود، استفاده شد.

به منظور اندازه‌گیری میزان فنل کل موجود در عصاره‌های استخراج شده، همانند روش تهیه منحنی استاندارد عمل شد. با این تفاوت که به جای اسید کافئیک، از ۰/۵ میلی لیتر از عصارهٔ استخراج شده از گیاه استفاده شد.

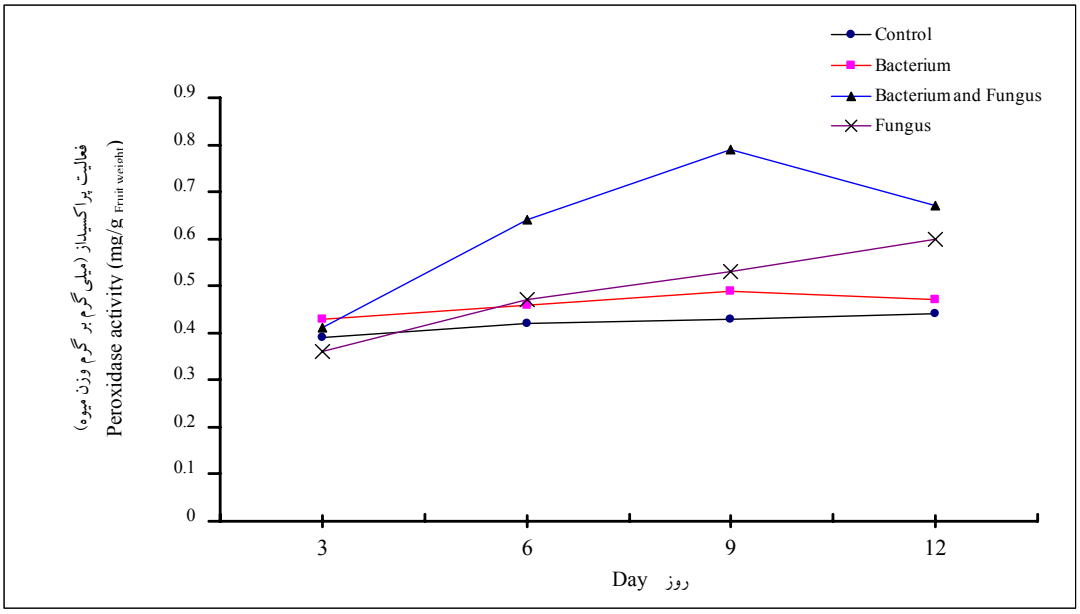
نتایج و بحث

تغییرات آنزیم پراکسیداز

در این آزمایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌های بررسی‌شده به تدریج افزایش یافت و در روز نهم به بیشترین حد خود رسید و سپس مجدداً کمی رو به کاهش گذاشت (شکل ۱). میزان فعالیت آنزیم

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (ΔOD_{485}.min/g.protein) موجود در بافت میوهٔ سیب رقم زرد، بر اثر مایه‌زنی با جدایه باکتریایی *P. fluorescens* F7 و جدایهٔ قارچی Pe2 *P. expansum*، در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری در دمای ۲۰ °C

†. هر کدام از نقاط روی نمودار، میانگین سه تکرار می‌باشند.

Fig. 1. Changes in peroxidase enzyme activity (ΔOD_{485}.min/g. protein) in apple fruit *cv*. Golden delicious after inoculation by *P. fluorescens* F7 and *P. expansum* Pe2 at 3, 6, 9,12 days after inoculation with pathogen at 20 °C.

†. Each point represents the mean of three replications

پراکسیداز، در روز نهم در میوه‌های تیمار شده با باکتری، قارچ، قارچ و باکتری توأماً، نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری و قارچ)، به ترتیب ۲۳، ۴۰ و ۷۸ درصد افزایش داشت.

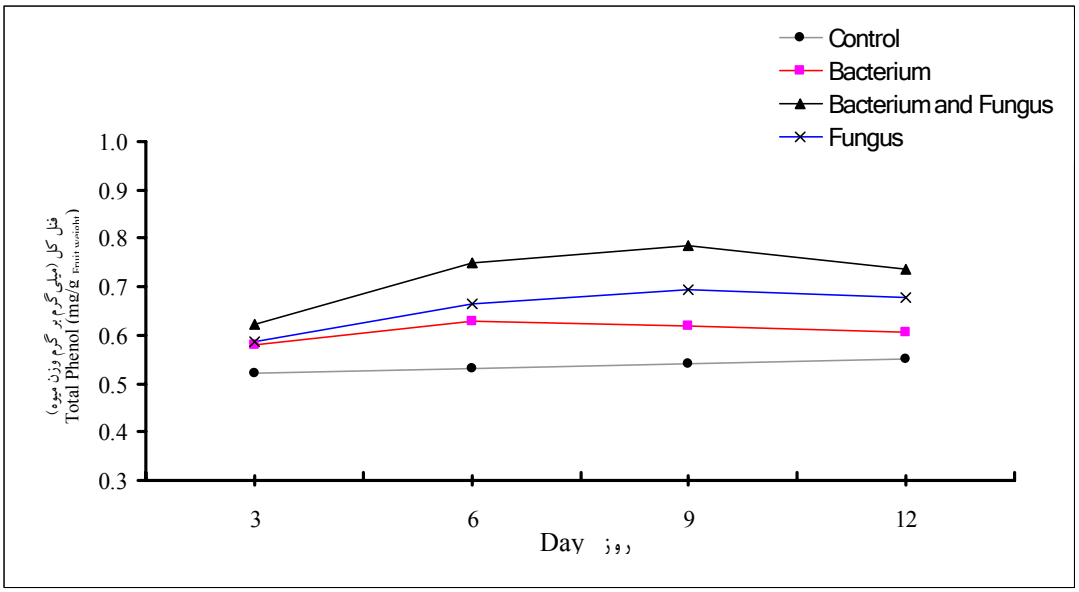
تغییرات میزان فنل کل درمیوهٔ سیب در طول آزمایش در دمای ۲۰ °C

مقدار ترکیبات فنلی (mg/$g_{\text{وزن میوه}}$) در میوه به تدریج افزایش یافته و در روز نهم به بیشترین حد خود رسید و سپس به تدریج رو به کاهش گذاشت (شکل ۲). میزان ترکیبات فنلی، در روز نهم در میوه‌های تیمار شده با باکتری، قارچ، قارچ و باکتری توأماً، نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری و قارچ)، به ترتیب ۱۹، ۲۸ و ۴۶ درصد بالاتر بود.

در تحقیقات انجام شده توسط کائو و همکاران (Cao *et al.*, 2005)، میزان افزایش ترکیبات فنلی در میوه های گلابی تیمار شده با قارچ *P. expansum* به میزان ۱۴/۶ درصد بالاتر از شاهد بود. در این تحقیق بیشترین افزایش ترکیبات فنلی در میوه، در روز نهم مشاهده شد که در این بین تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری، قارچ و باکتری توأم با قارچ، به ترتیب ۱۹، ۲۸ و ۴۶ درصد بالاتر از شاهد بودند.

در تحقیقات انجام گرفته توسط کائو و

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- تغییرات میزان فنل کل (mg/g$_{\text{وزن میوه}}$) موجود در بافت میوهٔ سیب بر اثر مایه‌زنی جدایه باکتریایی *P.fluorescens* F7 و جدایهٔ قارچی *P. expansum* Pe2 ، در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ پس از مایه‌زنی قارچ در دمای ۲۰ °C.

†. هر کدام از نقاط روی نمودار، میانگین ۳ تکرار می‌باشند.

Fig. 2. Change in total phenol level (mg/g fruit weight) in apple fruit *cv*. Golden delicious after inoculation with *P. fluorescens* F7 and *P. expansum* Pe2 at 3, 6, 9,12th days after inoculation with pathogen at 20 °C.

†. Each point represents the mean of three replications.

همکاران (Cao *et al.*, 2005)، میزان افزایش آنزیم پراکسیداز در میوه‌های گلابی تیمار شده با قارچ *P. expansum* ، نیز ۶۹ درصد بالاتر از شاهد بود.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در بین روزهای اندازه‌گیری شده، در روز نهم مشاهده شد. در میوه‌های تیمار شده با قارچ تنها، باکتری تنها و قارچ همراه با باکتری نسبت به شاهد، به ترتیب ۴۰، ۲۳ و ۷۸ درصد افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده گردید. در تحقیقات انجام شده توسط لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2005)، بالاترین افزایش میزان آنزیم پراکسیداز در میوه‌های سیب تیمار شده به قارچ *P. expansum* در روز هشتم گزارش شده است.

بیشترین افزایش مقاومت در میوه‌های پرتقال نسبت به قارچ *Penicillium digitatum*، ۱۴ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ اتفاق افتاد (E1 Ghaouth *et al.*, 1998). این افزایش مقاومت به دلیل افزایش میزان آنزیم‌های بتا ۱و۳-گلوکاناز، کیتیناز و پراکسیداز بود.

در میوه‌های سیب تیمار شده با مخمر *Aurebasidium pullulanse* میزان آنزیم‌های بتا ۱و۳-گلوکاناز، کیتیناز و پراکسیداز افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

یافت. این افزایش از ۲۴ ساعت پس از تلقیح عامل بیوکنترل شروع شده و در ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح به بالاترین سطح خود رسید. در میوه‌های شاهد که به آنها مخمر تلقیح نشده بود نیز میزان این آنزیم ها افزایش یافته بود امّا از مقدار آن در میوه های تیمار شده با آنتاگونیست *A. pullulanse* کمتر بود (Ippolito, and Nigro 2000). مخمر *Candid saitoana* باعث ایجاد مقاومت در میوه سیب، بر علیه بیماری کپک آبی می‌شود. مشخص شده است که استفاده از این مخمر در سطح میوه‌های سیب، ۴۸ و ۹۶ ساعت قبل از تلقیح عامل بیماری باعث افزایش معنی‌داری در کنترل این بیماری به علت القاء مقاومت در میوه می‌شود (De Capdeville *et al.*, 2002). در آزمایشات ستا و همکاران (Setha *et al.*, 2000)، مشخص شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه‌های پاپایای انبار شده در دمای $5\ ^{o}C$ بیشتر از میوه‌های انبار شده در دمای $15\ ^{o}C$ است. همچنین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در دمای $5\ ^{o}C$ تا روز پانزدهم روند افزایشی داشت، سپس به سرعت تا پایان روز انبارداری (روز سی‌ام) روند کاهشی از خود نشان داد. در تحقیقات ساری و همکاران (Sari *et al.*, 2007) مشخص شد که تجمع ترکیبات فنلی در ریشه‌های گندم تیمار شده با باکتری *Bacillus pumilus* توأم با قارچ *Gaumonnomyces graminis* بسیار بیشتر از تیمار قارچ تنها بود.

افزایش ترکیبات فنلی در ریشهٔ گندم در دو روز پس از تلقیح عامل بیماریزا دیده شد و در روز ششم به بالاترین حد خود رسید و بیشترین افزایش ترکیبات فنلی در تیمار تلقیح شده با باکتری و قارچ توأم، دیده شد. میزان فنل کل در تیمارهای شاهد و تیمار باکتری تنها، در روز یازدهم پس از مایه‌زنی قارچ نسبت به روز اوج (روز ششم) به ترتیب ۳۴٪ و ۴۵٪ کاهش داشت. در این تحقیق میزان آنزیم پراکسیداز در تیمارهای دارای باکتری و قارچ به صورت توأم به تدریج افزایش یافت و تا روز چهارم به بالاترین حد خود رسید و این میزان در حدود ۵۰٪ بالاتر از تیمار شاهد بود (Sari *et al.*, 2007).

در آزمایشات هانتی و همکاران (Honty *et al.*, 2005) نشان داده شد که در رقم‌های گلابی Vicar و Bartlett با پیشرفت لکه‌های ایجاد شده توسط باکتری *Erwinia amylovora*، میزان آنزیم های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز موجود در این میوه‌ها نیز تغییر می‌کند. در گلابی‌های رقم حساس (Bartlett) این تغییرات به مدت ۴۸ ساعت روند افزایشی داشت و سپس در فاصلهٔ ۷۲-۴۸ ساعت روند کاهشی به خود گرفت. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در حواشی منطقهٔ مایه‌زنی بود. در رقم مقاوم (Vicar) تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح باکتری هیچگونه افزایش معناداری در میزان فعالیت آنزیمی دیده نشد. اما در فاصلهٔ بین ۷۲-۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری فعالیت آنزیمی به سرعت افزایش داشت و میزان این فعالیت‌ها در حواشی نقطهٔ تلقیح بیشتر بود. شاید افزایش فعالیت‌های آنزیمی در رقم‌های مقاوم دلیل بر وجود یک سیستم دفاعی کارا و موثر باشد (Honty *et al.*, 2005).

از نتایج چنین برمی‌آید که پس از بروز اولین علائم القای مقاومت، زمان محدودی برای حفاظت گیاه در برابر عوامل بیماریزا وجود دارد. و به نظر می‌رسد که برخی عوامل تقویت کنندهٔ مقاومت، مانند باکتری‌ها *P. fluorescens* می‌تواند سطح و یا مدت این حفاظت را افزایش دهند.

بدیهی است که این افزایش در میزان ترکیبات دفاعی میوه، در کاهش میزان بیماری‌زایی عامل بیماری موثر خواهد بود.

می‌توان پیشنهاد کرد که القای مقاومت می‌تواند در کنار دیگر سازوکارهای بیوکنترل مانند مبارزه بر سر غذا، جا، آنتی‌بیوز و ... در حفاظت میوه (گیاه) در برابر عوامل بیماریزای گیاهی نقش موثری داشته باشد. در راستای این هدف می‌توان از زیست فناوری در جهت بهبود توانایی جدایه‌هایی که قابلیت آنتاگونیستی بالایی دارند و یا با ایجاد جدایه‌های ترانسژنیک (تراریخته) که چندین مکانیسم عمل را با هم داشته باشند، استفاده کرد.

سپاسگزاری

از اساتید و کارشناسان گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان و همچنین دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه آزاد ورامین که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، صمیمانه تشکر می‌شود.

References

Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology, 3rd ed. Academic Press. San Diego, CA, USA. 803pp.

Albert, F., and Anderson, A. J. 1987. The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxidase. Plant Physiology 85: 535-541.

Anderson, A. S., and Guerra, D. 1985. Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponics' system. Phytopathology 75: 992- 995.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annal of Bichemistry 72: 248-254.

Cao, J., Jiang, W., and He, H. 2005. Induced resistance in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd) fruit against infection by *Penicillium expansum* by post-harvest infiltration of Acibenzolar- S-methyl. Journal of Phytopathology 153: 640-646.

Archive of SID

www.SID.ir

De Capdeville, G., Wilson, L. C., Beer, S. V., and Aist, J. R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mould in harvested 'Red Delicious' Apple Fruit. Biological Control 92 (8) 901-908.

Diby, P., and Sharma, Y. R. 2005. *Pseudomonas fluorescens* mediated systematic resistance in black pepper (*Piper nigrum* L.) is driven through an elevated synthesis of defense enzymes. Archives of Phytopathology and Plant Protection 38(2): 139-149.

El Ghaouth, A., Wilson, C. L., and Wisniewski, M. E. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology 88: 282-291

Eckert, J. W., and Ogawa, J. M. 1985. The chemical control of post-harvest diseases: subtropical and tropical fruits. Annual Review of Phytopathology 23: 421-454.

Etebarian, H. R. 1988. Evaluation of quantity changes in phenolic compound in races of barley during growth of *Puccinia hordei*, and their relation with the resistance of these races to leaf rust of barley. Plant Diseases of Iran 24: 61-67 (In Persian)

Etebarian, H. R., Sholberg, P., Eastwell, C., and Sayler, J. R. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal of Microbiology 51: 591-598.

Gong, Y., Toivonen, P. M., Lau, O. L., and Wiersma, A. P. 2001. Antioxidant system level in "Braeburn" apple is related in its browning disorder. Botanical Bulletin of Academia Sinica 42: 259-264.

Gorin, N., and Heidema, F. T. 1976. Peroxidase activity in Golden Delicious apples as a possible parameter of ripening and senescence. Journal of Agricultural Food Chemistry 24: 200-201.

Gorlach, J., Volrath, S., Knoauf -Better, G., Hgngy, G., Beckhove, U., Kogel, K., Oostendort, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, anovel class inducers of systemic acquired resistance, activated gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8: 629- 643.

Harborne, J.B. 1994. Do natural plant phenols play a role in ecology? Acta Horticulture 381: 36-43.

Harvey, J. M. 1978. Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. Annual Review of Phytopathology 16: 321-341.

Archive of SID

www.SID.ir

Honty, K., Hevesil, M., Tothl, M., and Stefanovits-Banyai, E. 2005. Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia aymlovora.* Acta Biologica Szegediensis 49 (1-2): 127-129.

Ippolito, A., and Nigro, F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agent on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Crop Production 19: 715-726.

Khazaee, F. A., Etebarian, H. R., Roustaee, A., and Alizadeh, A. 2010. Biocontrol of Penicillium expansum casual agent of apple mould with some Pseudomans flourescens isolates in paekinghouses. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 11(1): 35-50.

Kindl, H. 1994. Biochemical mechanism controlling the formation of phenols in plants. Acta Horticulture 381: 176-184.

Liu, H., Jiang,W., Bi, Y., and Lou, Y. 2005. Post-harvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. *cv*. Jiubao) fruit to infection by *Penicilliun expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. Post-harvest Biology and Tenology 35: 263-269.

Macheix J. J., Fleuriet A., and Billot J. 1990. Fruit phenolics. Boca Raton, CRC Press: 292 pp.

Matern, U., and Kneusal, R. E. 1998. Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica 16: 153–170.

Mayr. U., Batzdorfer, R., Treutter, D., and Feucht, W. 1994. Surfactant-induced changes in phenol content of apple leaves and fruit skins. Acta Horticulture 381: 479-487.

Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., and Vinas, I. 2001. Biological control of post-harvest pear diseases using a bacterium *Pantoea agglomerans* CPA-2. International Journal of Food Microbiology 701: 53-61.

Parr, A. J., and Bolwell, G. P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Journal of Science Food Agriculture 80: 985-1012.

Piga, P., Belanger, R., Paulitzand, T. Z., and Benhanau, N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated

Archive of SID

www.SID.ir

with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescence*, strain 63-28. Physiological and Molecular Plant Pathology 50: 301-320.

Pirie, A., and Mullins, M. G. 1976. Changes in anthocyanin and phenolic content of grapevine leaf and fruit tissue treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. Plant Physiology 58: 487-492.

Romano, M. L., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 1983. Evaluation of the sensitivity to several fungicides of post-harvest pathogens in North-western Italy. Mede. Faculty LandoubouwwGent 48: 591-602.

Sari, E., Etebarian, H. R., and Aminian, H. 2007. The effects of *Bacillus pumilus*, isolated from wheat rhizosphere, on resistance in wheat seedling roots against the Take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Phytopathology 155: 720-727

Setha, S., Kanlayanarat, S., and Srilaong, V. 2000. Changes in polyamine levels and peroxidase activity in "Khakdun" Papaya (*Carica papaya* L.) under low temperature storage conditions in: quality assurance in agricultural produce. ACCIAR Proceedings 100: 593–598.

Sholberg, P. L., Marchi, A., and Bechard, J. 1995. Biocontrol of postharvest diseases of apple using *Bacillus* spp. isolated from stored apples. Canadian Journal of Microbiology 41: 247-252.

Spadaro, D., and Gullino, M. L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of post-harvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology 91 (2): 185-194.

Spotts, R. A., and Cervantes, L. A. 1986. Population, pathogenicity, and Benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. Plant Disease 70: 106-108.

Staskawicz, B. J., Ansubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G., and Jones, J. G. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. Science 268: 661-667.

Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Chalutz, E., Droby, S., Kabwe, M. K., Haung, Z., Adeyeye, O., Pusey, L. P., and Tang, A. Y. A. 1999. Induced resistance of sweet potato to Fusarium root rot by UV-C hormesis. Crop Protection 18: 463-470.

Archive of SID

www.SID.ir

Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Metraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 35: 235-270.

Taiz, L., and Zeiger, E. 2002. Plant Physiology, 3rd edition.

Van Peer, R., Niemann, G. J., and Schippers, B. 1991. Induced resistance and Phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417r. Phytopathology 81: 728-734.

Vetter, J. L., Steinberg, M. P., and Nelson, A. L. 1956. Quantitative determination of peroxidase in sweet corn. Journal of Agricultural Food Chemistry 6: 39-41.

Wei, G., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting Rhizobacteria. Phytopathology 81: 1508-1512.

Wilson, C. L., and Wisniewski, M. E. 1994. Biological control of postharvest diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, USA

Zdor, R. E., and Anderson, A. J. 1992. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. Plant and Soil 140: 99-107.

Archive of SID

www.SID.ir