فصلنامه گیاه‌پزشکی
۱۳۹۰ -۳ (۳) : ۲۲۳-۲۳۳

فعالیت دفاعی سیب‌های مایه زنی شده با مخمر *Pichia guilliermondii* و سیلیکون در مقابل *Penicillium expansum*

لیلا فراهانی *

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، باشگاه پژوهشگران جوان، اراک، ایران

حسن رضا اعتباریان

گروه بیماری شناسی گیاهی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

در این تحقیق تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز و نیز ترکیبات فنلی در میوه سیب، پس از تیمار با مخمر *Pichia guilliermondii* A6 و سیلیکون (Si) و مایه زنی با قارچ عامل بیماری کپک آبی *Penicillium expansum* F1 بررسی شد. نمونه برداری در روزهای صفر، دوم، چهارم، ششم و هشتم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری انجام گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی روز های نمونه برداری افزایش یافته و بیشترین فعالیت آنزیم در روز هشتم در تیمار ترکیبی مخمر با سیلیکون (AS) با مقدار ۱۶۸/۵۸ ΔOD/Min/mg Protein مشاهده شد. نتایج مربوط به مقدار ترکیبات فنولی نیز نشان دهنده بیشترین مقدار این ترکیبات در روز دوم پس از مایه زنی عامل بیماری در تیمار ASF با مقدار ۴۷/۲۵ µg/g FW بود. بر اساس نتایج این آزمایش چنین به نظر می رسد که افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و نیز ترکیبات فنولی می تواند دلیلی بر القای این ترکیبات دفاعی در میوه سیب باشد.

واژه های کلیدی: کپک آبی سیب، POD، ترکیبات فنولی، سیلیکون

مقدمه

گیاهان در مقابل عوامل بیماریزا، از خود، با مکانیسم های مختلفی دفاع می کنند (Benhamou *et al*., 1998). تحقیقات زیادی در رابطه با کنترل بیماریهای پس از برداشت از

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Lfarahani@alumni.ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

جمله کپک آبی سیب با استفاده از آنتاگونیست های باکتریایی، قارچی و مخمری وجود دارد (Etebarian *et al*., 2005; Gholamnejad *et al*., 2010). یکی از ساز و کارهای عوامل بیوکنترل در کنترل بیماریهای پس از برداشت تحریک واکنش های بیوشیمیایی بافت میزبان گیاهی بر علیه عامل بیماریزا می باشد (Stevens *et al*., 1999). فاکتور های خارجی مانند اسید سالیسیلیک (Murphy *et al*., 2000)، و بنزوتیادیازول (Benhamou *et al*., 1998) نیز سبب افزایش حفاظت گیاهان در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری زا می شود. سیلیکات سدیم عنصری است که از نظر بیولوژیکی فعال بوده و دارای اثرات مفید زیادی بر ویژگی های فیزیولوژیکی و ساختاری گیاهان می باشد مانند اثرات مثبت در مقابل تنش های زنده و غیر زنده، سمیت زدایی عناصر، بهبود رشد گیاه و مقاومت گیاهان در برابر آلودگی عوامل بیماریزای قارچی (Epstein, 1999). مکانیسم حفاظت گیاهان در برابر بیماری های قارچی با سیلیکون به خوبی شناخته شده نمی باشد. احتمالاً سیلیکون از طریق تحریک دفاع بیوشیمیایی گیاه شامل تجمع لیگنین، ترکیبات فنولی و نیز پروتئین های مرتبط با بیماریزایی در گیاهان آلوده عمل می کند. Bi و همکاران در سال ۲۰۰۶ با تحقیق بر روی اثر سیلیکات سدیم و اکسید سیلیکون بر روی ارقامی از طالبی دریافتند که تیمار با سیلیکون در غلظت ۱۰۰ mM سبب فعال شدن دو آنزیم دفاعی پراکسیداز و کیتیناز شد. مخمر *Pichia guilliermondii* نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم های پراکسیداز، کاتالاز، PAL و ترکیبات فنولی در پرتقال رقم تامسون در مقابل پوسیدگی کپک سبز شده است که دلیلی بر القای مقاومت سیستمیک میوه در مقابل این عامل بیماری می باشد (Ghasemi, 2010).

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 Golden Delicious پس از تیمار با مخمر *Pichia guiiliermondii* (A6) و سیلیکون در مقابل *Penicillium expansum* (F1) عامل بیماری کپک آبی سیب می باشد.

مواد و روش ها

میوه سیب

جهت انجام آزمایش های ، میوه های سیب رقم Golden Delicious از میدان های میوه و تره بار شهرستا ن پاکدشت تهیه شد سیب‌های انتخاب شده بدون هر گونه زخم، لهیدگی و یا سوراخ بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب جدایهٔ قارچ عامل بیماری و مخمر آنتاگونیستقارچ

Penicillium expansum F1 و یک جدایه مخمر *Pichia guilliermondii* A6 از آزمایشگاه بیماری شناسی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت گردید.

تهیه سوسپانسیون قارچ عامل بیماری

سوسپانسیون قارچ عامل بیماری از کشت ۷-۱۱۰ روزه روی محیط کشت PDA تهیه شد. ابتدا یک لوپ از اسپور قارچ عامل بیماری از روی محیط کشت برداشته شد و بعد در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه ور گردیدند. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت های مورد نیاز استفاده شد. غلظت مورد نیازکه ۱×۱۰^{۵} کنیدی در هر میلی لیتر آب مقطر استریل بود، با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر سترون به دست آمد (Batta, 2004).

تهیه سوسپانسیون آنتاگونیست

در هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ۵۰ میلی لیتر از محیط NYDA (Nutrient Yeast Dextrose Agar) ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شد. پس از سرد شدن محیط به هر ارلن مایر یک لوپ از سلول های مخمر افزوده شد. سپس ارلن مایرها روی شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند . سپس سلول های مخمر با سانتریفیوژ g× ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه از محیط مایع جدا شده و دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد (El-Ghaouth *et al*., 1998). پس از آن با استفاده از لام هماسیتومتر سوسپانسیون آنتاگونیست در غلظت مورد نظر $۱۰^{۸}$ سلول در میلی لیتر تهیه گردید.

سیلیکون (Si) به فرم سیلیکات سدیم از شرکت Sigma خریداری شد. سیلیکون براحتی در آب حل می شود. ابتدا مقداری سیلیکون را با استفاده از فیلتر میکروپور (ساخت شرکت Starius) استریل و با استفاده از آب مقطر استریل در غلظت ۰/۱٪ وزن/حجم تهیه گردید.

مایه زنی مخمر آنتاگونیست، سیلیکون و قارچ عامل بیماری

قبل از انجام آزمایش میوه ها به مدت ۱ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ غوطه ور شده، ۲ بار با آب مقطر استریل شست شو داده شده و در نهایت به مدت ۳ ثانیه دراتانول ۷۰ ٪ قرار گرفتند و سپس در دمای اطاق خشک شدند. بر روی میوه های سیب با استفاده از یک سوزن استریل دو چاهک به عمق ۳ میلی‌متر ایجاد شد. سپس هر چاهک با ۲۰ میکرولیتر از ۱- سوسپانسیون مخمر آنتاگونیست A6 ($۱۰^{۸}$سلول در میلی لیتر) ۲- محلول Si در غلظت ۰/۱٪ وزن به حجم ۳- سوسپانسیون مخمرهای آنتاگونیست A6 ($۱۰^{۸}$ سلول در میلی لیتر) با Si در غظت ۰/۱٪و ۴- آب مقطر استریل مایه زنی شد. پس از ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر

Archive of SID

www.SID.ir

سوسپانسیون 10^5 اسپور در میلی لیتر قارچ عامل بیماری به داخل هر چاهک مایه زنی شد. سیب ها در ظروف یکبار مصرف و ظروف با سیب های درونشان در کیسه های پلاستیکی قرار داده شده و داخل پلاستیک ها آب مقطر استریل اسپری شد. سپس به انکوباتور با دمای ۲۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. نمونه گیری در روزهای صفر، دو، چهار، شش و هشتم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری انجام گرفت. جدول یک تیمارهای مختلف این آزمایش را نشان می دهد.

جدول ۱- نحوه ترکیب تیمارها در بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز و اندازه گیری ترکیبات فنولی در روزهای صفر، دو، چهار، شش و هشتم پس از مایه زنی عامل بیماری

Table 1. Treatments in study of peroxidase and phenolic compounds in apple fruit in days 0, 2, 4, 6 and 8 after pathogen inoculation

number	treatments
1	*P. guilliermondii* (A6)- A
2	Si 0.1%- S
3	*P. expansum* F1- F
4	*P. guilliermondii* (A6) + Si 0.1%- AS
5	*P. expansum* F1 + Si 0.1%- FS
6	*P. expansum* F1 + *P. guilliermondii* (A6) + Si 0.1%- ASF
7	Sterile distilled water- w

A= *P. guilliermondii*(A6); S= 0.1% Si; F= *P. expansum* (F1); AS= *P. guilliermondii*(A6)+ 0.1% Si; FS= *P. expansum* (F1)+ 0.1% Si; ASF= *P. guilliermondii* (A6)+ *P. expansum* (F1)+ 0.1% Si; W= آب مقطر استریل

اندازه گیری آنزیم پراکسیداز

استخراج عصاره

استخراج عصاره سیب به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش Gong *et al*. (2001) به شرح زیر انجام شد. یک گرم از بافت سیب که از محل مایه زنی جدا شده را در ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۷) در یک هاون چینی کاملاً له شد. برای این که یک مخلوط هموژن از عصاره به دست آید بلافاصله سوسپانسیون حاصله را به ویال های ۲ میلی لیتری منتقل و در دستگاه میکروسانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مخلوط رویی جهت بررسی میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز برداشته شد و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش اصلاح شدهٔ Vetter *et al.*, (1958) توسط Gorin & Heidema, (1974) انجام شد. ارزیابی پرکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Milton Roy Company- Unterfoehring -Germany بدین صورت انجام

Archive of SID

www.SID.ir

شد. مخلوط واکنش شامل۳۲/۲ میکرو لیتر از عصاره تهیه شده ،۰/۴۵۳ میلی لیتر بافر MES[1] (Merck ,Darmstadt ,Germany) با pH ۵/۵ و سپس ۳۲/۲ میکرو لیتر فنیلن دی آمین ۰/۱٪ اضافه شد و قبل از اینکه تغییرات جذب را اندازه گیری کنیم، ۳/۸۷ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به مخلوط واکنش اضافه گردید. قبل از اندازه گیری جذب برای صفر کردن دستگاه، ازمخلوط واکنش بدون افزودن پراکسید هیدروژن به عنوان بلانک استفاده شد و دستگاه با آن صفر شد. بعد از این مرحله پراکسید هیدروژن را به مخلوط واکنش اضافه و پس از اختلاط سریع مقدار جذب در nm ۴۸۵ با فواصل ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه در دمای اتاق اندازه گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین (ΔOD /Min./mg. protein) بیان شد. جهت تهیه ۰/۱ مول MES بافر مقدار ۲۱/۳ گرم از آن در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. pH محلول را با استفاده از pH متر، NaOH و اسید کلریدریک غلیظ، روی ۵/۵ تنظیم شد.

ارزیابی میزان ترکیبات فنولی

استخراج فنول از میوه سیب

در ابتدا مقدار ۱ گرم از بافت میوهٔ سیب در هاون چینی که در ظرف دیگری دارای یخ قرار داده شده، در ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد، کاملاً له و عصاره گیری شد. مخلوط حاصل از پارچه ململ دولایه عبور داده شد و باقیمانده بافت له شده داخل هاون و بافت چسبیده به پارچه ململ دو بار و هر بار بوسیله سه میلی لیتر متانول ۸۰ درصد شستشو و صاف گردید و به عصاره اول اضافه شد. نهایتاً عصاره حاصل در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی داخل لوله ها حاوی ترکیبات فنلی است که جهت آزمایشات بعدی در لوله های درب دار ۱۰ میلی لیتری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Etebarian, 1988).

تهیه محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

۱۰ میلی‌گرم اسید کافئیک را در پنج میلی لیتر متانول خالص کاملاًحل نموده و حجم نهایی آن با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ ، ۱ ، ۲ ، ۳ ، ۴ ، ۵ ، ۶ ، ۸ میلی لیتر از این محلول جداگانه در لوله های کوچک آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. به این ترتیب در ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر یک از این لوله ها به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و۸۰ میکروگرم اسید کافئیک وجود داشت (Etebarian, 1988).

[1] Morpholino ETHANE sulfonic acid, Monohydrate
[2] ρ- phenylenediamine

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه کربنات سدیم اشباع

به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر در حالی‌که بر روی شیکر قرار داشت، به تدریج کربنات سدیم اضافه وکاملاً حل شد. آنقدر کربنات سدیم باید اضافه شود که در ته ظرف رسوب تشکیل شود. میزان حل شدگی کربنات کلسیم در این محلول باید به حدی باشد که پس از گذشت یک یا دو روز هنوز مقدار کمی رسوب داشته باشد (Etebarian, 1988). معرف فولین به صورت آماده و از شرکت Merck خریداری شد.

تهیه منحنی استاندارد فنل(اسید کافئیک) و معادله رگرسیون

در لوله آزمایش ۱۰ میلی لیتری هفت میلی لیتر آب مقطر ریخته شد. سپس مقدار ۰/۵ میلی لیتر از غلظت های مختلف آماده شده اسید کافنیک در مرحله قبل، به آن اضافه و به دنبال آن ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. پس از مختصری اختلاط، محلولی به رنگ سبز متمایل به زرد به دست‌آمد. سه دقیقه پس از افزودن معرف فولین یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی آن با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده‌شد. پس از مختصری اختلاط رنگ خاکستری تیره به دست آمد. پس از یک ساعت میزان جذب نور در λmax=۷۲۵ nm اندازه‌گیری شد. برای هر کدام از غلظت های مختلف اسید کافئیک به طور جداگانه این مراحل انجام شد. برای هر غلظت سه تکرار منظور گردید. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از محلولی که فاقد اسید کافئیک بود وبه همان میزان آب مقطراضافه شده بود استفاده شد. به منظور تهیه فنل کل عصاره به دست آمده در آزمایش‌ها همانند روش تهیه منحنی استاندارد عمل شد. با این تفاوت که از ۰/۵ میلی لیتر از عصارهٔ استخراج شده از گیاه استفاده شد (Etebarian, 1988).

تجزیه تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS version 9 آنالیز شدند. میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن ($p \leq 0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

نتایج آزمایش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز در روزهای صفر، دوم، چهارم و ششم و هشتم پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری وجود دارد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به تدریج افزایش یافته است. حداکثر مقدار آن در روز هشتم مشاهده شد. در روز هشتم بین تیمار های مورد مطالعه (به جز شاهد) تفاوت معنی دار آماری

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده نشد و بیشترین فعالیت در تیمار AS (مخمر *P. guilliermondii* و Si در غلظت ۰/۱٪ wt/vol با ۱۶۸/۵۸ ΔOD/Min/mg Protein مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج مربوط به میزان ترکیبات فنولی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از نظر میزان فنول در روز های دوم، چهارم و ششم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری وجود دارد. میزان فنول به تدریج افزایش یافته و حداکثر مقدار آن در روز دوم نسبت به روز های دیگر مشاهده شد.

جدول ۲- فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه سیب تیمار شده با آب مقطر استریل، قارچ عامل بیماری، مخمر آنتاگونیست A6، Si، مخمر + Si، قارچ + Si و مخمر+ قارچ + Si در روز های صفر، دوم، چهارم، ششم و هشتم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری

Table 1. Treatments in study of peroxidase and phenolic compounds in apple fruit in days 0, 2, 4, 6 and 8 after pathogen inoculation

number	treatments
1	*P. guilliermondii* (A6)- A
2	Si 0.1%- S
3	*P. expansum* F1- F
4	*P. guilliermondii* (A6) + Si 0.1%- AS
5	*P. expansum* F1 + Si 0.1%- FS
6	*P. expansum* F1 + *P. guilliermondii* (A6) + Si 0.1%- ASF
7	Sterile distilled water- w

هر تیمار دارای چهار تکرار بود. بین تیمارهایی که در هر ستون با حروف مشترک نشان داده شده اند، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p<۰/۰۵$).

A= *P. guilliermondii* (A6); S= 0.1% Si; F= *P. expansum* (F1); AS= *P. guilliermondii* (A6)+ 0.1% Si; FS= *P. expansum* (F1)+ 0.1% Si; ASF= *P. guilliermondii* (A6)+ *P. expansum* (F1)+ 0.1% Si; W= آب مقطر استریل

مقدار ترکیبات فنولی در سیب‌های تیمار شده با مخمر *P. guilliermondii* A6 و Si در غلظت ۰/۱٪ wt/vol و قارچ عامل بیماری F1 در روز دوم نسبت به سایر روز ها با µg/g FW ۴۷/۲۵ بیشترین مقدار داشته و سپس در روزهای چهارم، ششم و هشتم و هشتم کاهش یافته است. در روز های دوم و هشتم تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از نظر مقدار ترکیبات فنولی وجود نداشته است. در روز دوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری تفاوت معنی‌داری بین تیمار های AS (مخمر و Si در غلظت ۰/۱٪ wt/vol)، A (مخمر *P. guilliermondii*) و Si (در غلظت ۱٪ wt/vol) مشاهده نشد، هرچند بیشترین مقدار ترکیبات فنولی به تیمار Si اختصاص داشت. در روز چهارم مقدار ترکیبات فنولی به تدریج کاهش یافته در حالیکه بیشترین مقدار به تیمار ASF و S اختصاص داشت. در روز ششم نیز بیشترین مقدار ترکیبات فنولی در سیب های تیمار شده با ASF مشاهده شد (جدول ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- میزان فنول کل در میوه سیب تیمار شده با آب مقطر استریل، قارچ عامل بیماری، مخمر آنتاگونیست A6، Si، مخمر + Si، قارچ + Si و مخمر+ قارچ + Si در روز های صفر، دوم، چهارم، ششم و هشتم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری

Table 3. Peroxidase activity in apple treated with Si and *P. guilliermondii* (A6) against *P. expansum* (F1) in days 0, 2, 4, 6 and 8 after pathogen inoculations

Peroxidase activity (ΔOD 485 nm/Min/mg Protein)					treatments
8	6	4	2	0	
157.1 a	116.33a	134.2a	38.55b	24.97a	ASF
168.58a	89.81a	65.96b	23.26c	12.87b	AS
152.24a	83.06a	57.12b	55.6a	5c	A
145.38a	33.24b	77.8b	60.98a	5.35c	S
143.84a	86.64a	58.27b	35.62b	0.58d	F
128.75a	77.49a	70.83b	26.81bc	14.78b	FS
22.31b	20.77b	21.92c	19.63a	0.54d	W

هر تیمار دارای چهار تکرار بود. بین تیمارهایی که در هر ستون با حروف مشترک نشان داده شده اند، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی داری وجود نداشت (p<۰/۰۵).

A= *P. guilliermondii* (A6); S= 0.1% Si; F= *P. expansum* (F1); AS= *P. guilliermondii* (A6)+ 0.1% Si; FS= *P. expansum* (F1)+ 0.1% Si; ASF= *P. guilliermondii* (A6)+ *P. expansum* (F1)+ 0.1% Si; W= آب مقطر استریل

There were four replicates for each treatment. In each column, the means with the same letter had no significant difference according to Duncan Multiple Range test (Putrescine 2.5 m/mol<0.05).

A= *P. guilliermondii* (A6), S= Si 0.1%, F= *P. expansum* (F1), AS= *P. guilliermondii* (A6) + Si 0.1%, FS= *P. expansum* F1 + Si 0.1%, ASF= *P. expansum* F1 + *P. guilliermondii* (A6) + Si 0.1%, W= Sterile distilled water.

بحث

گیاهان در مقابل عوامل بیماریزا، به روش های مختلفی، از خود دفاع می کنند (Benhamou *et al*., 1998). به نظر می رسد تحریک سیستم دفاعی گیاه، مهمترین مکانیسم عنصر سیلیکون در گیاهان باشد (Belanger *et al*., 1995). نتایج نشان دهنده بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه های تیمار شده با ترکیب مخمر *P. guilliermondii* (A6) و سیلیکون در روز هشتم بود. به نظر می رسد این تیمار ترکیبی یک محرک در القا و سنتز آنزیم پراکسیداز باشد که نقش دفاعی در بافت میوه علیه قارچ عامل بیماری ایفا می کند. تحقیقات دیگر محققین نیز بر القاء سیستم دفاعی سیلیکون و افزایش فعالیت آنزیم های دفاعی از جمله پراکسیداز اشاره می کند (Qin & Tian., 2005). تیمار ارقام مختلف طالبی با غلظت mM ۱۰۰ سیلیکون نیز، قبل از مایه زنی با *T. roseum*، سبب جلوگیری از شدت و شیوع بیماری شد که این جلوگیری با القاء آنزیم های POD و کیتیناز در میوه های تیمار شده ارتباط داشت (Bi *et al*., 2006). در تحقیق آنها فعالیت آنزیم پراکسیداز در روزهای سوم و ششم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری به ترتیب در ارقام New Queen و ۸۶۱۰ دیده شد. بر اساس نتاج این تحقیق و نتایج دیگر محققین به نظر می رسد زمان بیشترین فعالیت دفاعی میزبان، تحت تاثیر عامل بیماری، نوع القاگر، نوع گیاه میزبان و حتی ارقام مختلف میزبان باشد. افزایش فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

چندین آنزیم از جمله POD در گیاهان خیار تیمار شده با سیلیکون محلول و مایه زنی شده با *Pythium ultimum* نیز گزارش شده است (Cherif *et al*., 1994).

بیشترین مقدار ترکیبات فنولی نیز در روز دوم پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. ترکیبات فنولی تولید شده با فعالیت آنزیم های PPO و POD، اکسید شده و ترکیبات رنگی به نام کوئینین (Quinin) تولید می شود. کوئینین ها می توانند پلیمریزه شده و ترکیبات قهوه ای رنگی ایجاد کنند که در پروسه قهوه ای شدن شرکت داشته و برای میکروارگانیسم های مهاجم بسیار سمی هستند (Campos-Vargas *et al*., 2002).

با توجه به کارایی این عنصر، فراوان بودن آن در پوسته زمین و در دسترس بودن، به نظر میرسد انجام تحقیقات بیشتر در زمینه کارایی سیلیکون به تنهایی و همچنین در ترکیب با دیگر عوامل آنتاگونیست بر روی ارقام مختلف سیب و همچنین در مقابل طیف گسترده ای از عوامل بیماری زا، به منظور حصول غلظت مناسب و بهینه این عنصر در ایجاد مقاومت به بیماری ها ضروری باشد.

منابع

Benhamou, N. & Bélanger,R.R. 1998. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology,* 118:1203-1212.

Bélanger, R. R., Bowen, P. A., Ehret, D. L., & Menzies, J. G. 1995. Soluble silicon: Its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Disease*. 79:329-336.

Bi, Y., Tian, S.P., Guo, Y.R., Ge, Y.H. & Qin, G.Z. 2006. Sodium silicate reduces postharvest decay on Hami melons: Induced resistance and fungistatic effects. *Plant Disease*, 90:279-283.

Campos-Vargas, R. & Saltveit, M.E. 2002. Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiologia Plantarum*, 114:73-84.

Chérif, M., Asselin, A., & Bélanger, R. R. 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology*, 84, 236-242.

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

Epstein, E. 1999. Silicon. Annual *Review of Plant Physiological Molecular Biology,* 50: 641–64.

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**.** *Iranian Journal of plant pathology*, 24: 61-67 (In Persian).

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

Archive of SID

www.SID.ir

Ghasemi, R. 2010. Studies on Biological Control of Blue and Grean Mold of Orange with Some Yesats and Antagonism Mechanisms Involved. MSc thesis. Aboureihan Campus, *University of Tehran*. (In Persian).

Gholamnejad, J., Etebarian, H.R. & Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science*, 4: 001-007

Gong, Y., Toivonen, M.A., Lau, O.L. & Wiersma, A. 2001. Antioxidant system level in Braeburn apple is related to its browing disorder. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*, 42:259-264.

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

Murphy, A.M., Holcombe, L.J. & Carr, J.P. 2000. Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 57:47-54.

Qin, G.Z. & Tian, S.P. 2005. Enhancement of biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* by silicon and the possible mechanisms involved. *Phytopathology*, 95:69-75.

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., & Tang, A. Y. A. 1999. Induced resistance of sweet potato to Fusarium root rot by UV-C hormesis. *Crop Protection*, 18: 463-470.

Vetter, J.L., Steinoerg, M.P. Nelson, A. 1958. Quantitative determination of Proxidase in sweet corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6:39-41.

Archive of SID

www.SID.ir

Plant Protection Journal
2011, 3 (3): 223 - 233

Defense responses of apple treated with the yeast *Pichia guilliermondii* and silicon against *Penicillium expansum*

Leila FARAHANI
Young Researchers Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
(Corresponding author, E-mail: Lfarahani@alumni.ut.ac.ir)
Hassan Reza ETEBARIAN
Abureihan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

In this study variation of Peroxidase activity and phenolic compounds were studied after treating with *Pichia guilliermondii* (A6) and silicon (Si) and inoculation with *Penicillium expansum* (F1). The samples were taken in zero, second, fourth, sixth and eighth days after pathogen inoculation. The results showed that Peroxidase activity increased during these days and achieved the highest activity in sixth and eighth days. These results indicated that the phenolic compounds were in maximum amount in the second day after pathogen inoculation. These findings emphasized that increase in peroxidase activity and phenolic compounds could be the reason for induction of resistance in apple fruits.

Key Words: Blue mold disease, POD, Phenolic compounds, Silicon

Archive of SID

www.SID.ir