



القای پاسخ‌های دفاعی و کنترل بیولوژیک بیماری کپک آبی میوه سیب *Penicillium expansum* به وسیله‌ی مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* (A1)

جلال غلام نژاد*^۱، حسن رضا اعتباریان^۲، فاطمه ناصری نسب^۳

چکیده

در این تحقیق، جدایه‌ی A1 از مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* برای کنترل کپک آبی سیب *Penicillium expansum* به کار گرفته شد. آزمون تست تقابل، متابولیت‌های خارج سلولی و مواد فرار در آزمایشگاه برای ارزیابی قدرت بیوکنترلی مخمر به کار برده شد. این جدایه از مخمر رشد قارچ *P. expansum* را کاهش داد. در آزمون کشت تقابل، میزان کاهش رشد ۶۰/۹۷ درصد، در مورد گاز فرار ۹۰/۵۷ درصد، و در تست متابولیت‌های خارج سلولی ۸۳/۳۶ درصد بود. در آزمایش‌های انباری چاهک ایجاد شده روی سیب با ۴۰ μl میکرولیتر سوسپانسیون مخمر آنتاگونیست و ۲۴ ساعت بعد ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شد. سیب‌های مایه‌زنی شده در ۲۰ و ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در انبار قرار گرفتند. مساحت لکه‌ها در روی سیب‌های تیمار شده با مخمر در هر دو دما در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری نشان دادند. در قسمت دوم آزمایش، توانایی مخمر در القاء دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز و همچنین ترکیبات فنلی در بافت میوه سیب بررسی شد. میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و میزان ترکیبات فنل کل در روزهای دوم، چهارم، ششم، هشتم و دهم بعد از مایه‌زنی عامل بیماری اندازه‌گیری شد. این جدایه‌ی مخمری، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داد که این افزایش در روز ششم بعد از مایه‌زنی، عامل بیماری به حداکثر میزان خود رسید. بیشترین میزان کل ترکیبات فنلی هم در سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با جدایه‌ی مخمر در روز ششم بعد از مایه‌زنی دیده شد که نسبت به شاهد آب مقطر به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود.

واژه‌های کلیدی: *Penicillium expansum*، *Rhodotorula mucilaginosa* A1، پراکسیداز، کاتالاز، کنترل بیولوژیک، ترکیبات فنلی.

۱- دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه گیاه پزشکی.

۲-

۳-

*نویسنده مسئول مقاله: jalalgholamnejad2006@gmail.com

مقدمه

سیب یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در دنیا و ایران است. یکی از مناطق عمده‌ی تولید این محصول، در شمال غرب ایران واقع شده است. نظر به استفاده از سیب در تمام سال، نیاز این محصول به انبارداری امری اجتناب ناپذیر است. بعد از برداشت میوه و سبزیجات، خسارت در سطح بالایی قرار دارد که بسته به تکنولوژی مورد استفاده در بسته‌بندی و شرایط انبارداری مانند دما و رطوبت متفاوت است. این‌گونه خسارات، اساساً به‌وسیله‌ی عوامل قارچی به‌وجود می‌آید و این عوامل به‌وسیله‌ی زخم‌هایی که در طول انبارداری، حمل و نقل و فرآوری به‌وجود می‌آید، محصولات را آلوده می‌کنند (Arras and Arru, 1999).

مهم‌ترین قارچ‌هایی که در انبار به سیب خسارت می‌زنند *Penicillium expansum* Link عامل کپک آبی سیب، *Botrytis cinerea* Pers: Fr. عامل کپک خاکستری سیب و قارچ‌های دیگری نظیر *Alternaria sp.* هستند (Wisniewski and Wilson, 1992).

از مؤثرترین راه‌ها برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت، استفاده از قارچ‌کش‌ها است، اما به‌دلیل به‌مخاطره افتادن سلامت انسان از یک طرف و مقاومت قارچ‌ها به سموم از طرف دیگر، ضرورت دستیابی به روش‌های جایگزین برای کنترل شیمیایی الزامی است.

در دهه‌های اخیر افزایش نگرانی‌ها در مورد به‌مخاطره افتادن سلامت انسان (ناشی از مصرف بی‌رویه قارچ‌کش‌ها)، دانشمندان را به فکر استفاده از روش‌های جایگزین انداخته است تا اینکه کنترل بیولوژیک با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به‌عنوان یک روش جایگزین امیدبخش پیشنهاد شد (Wisniewski and Wilson, 1992).

در میان روش‌های مختلف پیشنهادی، کنترل بیولوژیک از موفقیت نسبی بیشتری برخوردار شد. این روش به‌تنهایی و یا به‌عنوان بخشی از روش‌های کنترل بیماری‌های بعد از برداشت مورد بررسی و استفاده قرار می‌گیرد (Gullino et al, 1995). در این بررسی، یک جدایه‌ی (A1) از مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* که در سال ۱۳۸۶ از روی سطح سیب سالم به‌وسیله‌ی علوی فرد جداسازی شده بود، از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی پردیس ابوریحان دریافت شد (علوی فرد، ۲۰۰۸). یک جدایه از قارچ *Penicillium expansum* هم از سطح سیب‌های آلوده جداسازی گردید و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی گردید.

جدایه‌ی مخمری *R. mucilaginosa* A1 در کنترل قارچ عامل بیماری کپک آبی سیب (*P. expansum*) در شرایط آزمایشگاه و در شرایط انبار روی میوه‌ی سیب مورد بررسی قرار گرفت. در قسمت دوم این تحقیق، بررسی تغییرات آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و میزان ترکیبات فنل کل میوه در اثر مایه‌زنی قارچ *P. expansum* و جدایه‌ی A1 از مخمر *R. mucilaginosa* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

عامل بیماری: قارچ عامل بیماری *Penicillium expansum* از میوه‌های آلوده‌ی سیب از سردخانه‌ی مهرشهر کرج جدا و خالص سازی گردید. این جدایه‌ی قارچی روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری و هر سه هفته یک‌بار جهت حفظ خصوصیات فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی به سیب مایه‌زنی شده و از آن جدا شد. **آنتاگونیست:** جدایه‌ی A1 از *Rhodotorula mucilaginosa* از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی پردیس ابوریحان دریافت شد. این مخمر در سال ۱۳۸۶ توسط علوی فرد از سطح سیب‌های سالم جداسازی و توسط مرکز "Identification Service CBS" (P.O.Box 85167, 3508 AD UTRECHT, The Netherland) در هلند شناسایی شد (علوی فرد، ۲۰۰۸).

تهیه‌ی سوسپانسیون قارچ عامل بیماری: سوسپانسیون قارچ عامل بیماری از کشت ۷-۱۰ روزه، از روی محیط کشت PDA تهیه شد. به این ترتیب که با یک لوپ مقداری از اسپور قارچ عامل بیماری برداشته شده و سپس در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه ور گردید. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه‌ی غلظت مورد نیاز

استفاده شد. غلظت مورد نیاز (1×10^5 کنیدی در هر میلی‌لیتر) با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر استریل به‌دست آمد (Batta, 2004).

تهیه‌ی سوسپانسیون آنتاگونیست: در هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط NYDA (Nutrient Yeast Dextrose Agar) ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شد. پس از سرد شدن محیط، به هر ارلن مایر یک لوپ از سلول‌های مخمر افزوده شد. سپس ارلن‌های مایر با شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سلول‌های مخمر پس از ۱۰ دقیقه سانتی‌فیوژ در $3000 \times g$ از محیط مایع جدا شده و دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (El-Ghaouth et al, 1998). پس از آن با استفاده از لام هماسیتومتر سوسپانسیون آنتاگونیست در غلظت‌های مورد نظر (10^8 ، 10^7 ، 10^6 ، 10^5 سلول در میلی‌لیتر) تهیه گردید.

سیب: سیب‌های مورد استفاده در این بررسی، سیب زرد رقم گلدن دلشز بوده که از باغات دماوند تهیه شده بود. پس از شستشوی سیب‌ها با آب، آنها را به‌مدت ۱ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱٪ تجاری قرار داده و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۵٪ شسته شده و سرانجام سه بار با آب مقطر استریل آب کشیده شدند. سپس بر روی هر سیب، سه چاهک به فواصل مساوی با میخ استریل به قطر ۲/۵ mm و به عمق ۳ mm زده شد (اعتباریان و همکاران، ۲۰۰۵).

اثر ایزوله‌های *R. mucilaginosa* روی قارچ *P. expansum* در شرایط آزمایشگاه آزمون کشت متقابل (Dual culture)

این آزمون بر اساس روش دنیس و ویستر (Dennis and Webster, 1971) انجام شد. ابتدا هر پتری به‌وسیله‌ی ماژیک به دو قسمت مساوی تقسیم شد؛ سپس درون هر تشتک پتری، به میزان ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت PDA ریخته شد. پس از جامد شدن محیط، در یک نیمه از تشتک پتری در فاصله یک سانتی‌متری از لبه‌ی آن پلاکی از محیط کشت جوان قارچ بیمارگر (۲روزه روی WA) قرار داده شد. جدایه‌های مخمر در محیط NYDB کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با ۲۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس ۴۸ ساعت بعد از گذاشتن پلاک قارچ عامل بیماری، به کمک لوپ استریل نیمی از سطح محیط کشت به سوسپانسیون مخمر آغشته گردید. برای شاهد به‌جای سوسپانسیون مخمر از آب مقطر استریل استفاده گردید. پتری‌ها به مدت ۱۸ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس قطر کلونی جدایه‌های قارچ اندازه‌گیری شده و مساحت آن محاسبه شد. پس از این که در تیمار شاهد قارچ به خط وسط پتری رسید، میزان رشد شعاعی جدایه‌ی قارچ اندازه‌گیری و سپس مساحت کلونی قارچی محاسبه شد و در نهایت درصد کاهش رشد مسیلیوم قارچ با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (اعتباریان، ۲۰۰۵).

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

n = درصد بازدارنگی از رشد عامل بیماری

a = مساحت کلونی عامل بیماری در پتری شاهد

b = مساحت کلونی عامل بیماری در پتری تیمار.

آزمون تولید مواد فرار ضد قارچی توسط جدایه‌های آنتاگونیست

این آزمون مطابق روش لیلبرو انجام شد (Lillbro, 2005). دو لوپ از سوسپانسیون سلول‌های مخمر در محیط NYDB از کشت ۲۴ ساعته در روی محیط MEA (Malt Extract Agar) کاملاً پخش شد. سپس در پتری دیگر حاوی محیط PDA پلاکی از قارچ (محیط کشت ۶ روزه) به قطر ۱ سانتی‌متر در وسط این محیط کشت قرار داده شد. سپس در کنار شعله و در شرایط استریل تشتک‌های حاوی قارچ عامل بیمارگر در زیر و تشتک‌های حاوی مخمر در قسمت بالا، روی هم قرار داده شد و لبه‌های آنها به کمک پارافیلیم کاملاً پوشانیده و بعد از ۲۵ روز، قطر کلونی‌های قارچ اندازه‌گیری و سپس مساحت آن محاسبه گردید و طبق فرمول ذکر شده در بند ۲-۶-۱ درصد کاهش رشد مسیلیومی قارچ به‌دست آمد.

آزمون تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌های آنتاگونیست

این آزمون مطابق روش ورو و همکاران انجام شد (Vero et al, 2001). ابتدا سوسپانسیون مخمر آنتاگونیست که در محیط NYDB به روش گفته شده تهیه شده بود، در روی محیط PDA به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس پتری‌ها به مدت ۹۶ ساعت در انکوباتور با دمای $25 \pm 1^\circ \text{C}$ قرار گرفتند. بعد از این مدت، در شرایط استریل زیر هود، کلونی‌های مخمر با کمک پنبه استریل از سطح محیط پاک شدند. سپس پتری‌ها وارونه شده و یک پنبه آغشته به کلروفرم در درون پتری و بر روی درب آن قرار داده شد تا باقی‌مانده‌های مخمر نیز در معرض بخار کلروفرم قرار گیرند و کاملاً کشته شود. بعد از مدت ۲۵ دقیقه درب پتری‌ها را به صورت نیمه باز کرده تا بخار کلروفرم کاملاً خارج شود. سپس یک پلاک از کشت ۴۸ ساعته‌ی قارچ عامل بیماری در وسط پتری‌ها قرار داده شد. این پلاک به منظور جلوگیری از پخش شدن اسپور از روی محیط WA برداشته شد. در پتری شاهد نیز به جای جدایه‌ی مخمر از آب مقطر استریل استفاده شد و همانند سایر تیمارها از کلروفرم هم استفاده گردید. بعد از ۱۸ روز، قطر کلونی قارچ اندازه‌گیری شد و طبق فرمول موجود در بند ۲-۶ درصد کاهش رشد محاسبه گردید. این آزمون‌ها هر کدام به صورت جداگانه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شدند.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های مخمر در شرایط دمایی ۲۰ و ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

در ابتدا سیب‌ها کاملاً با آب شسته شده و سپس همان‌طور که در بند ۲-۵ توضیح داده شده است؛ ابتدا ضد عفونی و سپس سوراخ شدند. پس از این مرحله، ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر (تهیه شده با روشی که قبلاً ذکر گردید) با غلظت 1×10^7 سلول قارچی در هر میلی‌لیتر 1×10^7 /CFU، به هر چاهک از سیب تلقیح شد. سپس سیب‌ها هر کدام داخل یک ظرف یک‌بار مصرف گذاشته شده و در نهایت با خود ظرف داخل یک کیسه پلاستیکی گذاشته شدند. جهت حفظ رطوبت و جلوگیری از خشک شدن سیب‌ها با آب استریل در درون کیسه‌ها اسپری شد و رطوبت نسبی درون کیسه‌ها در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) نگه داشته شد.

پس از ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچی (تهیه شده با توجه به بند ۲-۳) به داخل چاهک‌های تیمار شده با سوسپانسیون مخمری، تلقیح شد. سپس سیب‌ها با پلاستیک و حفظ رطوبت لازم به انبارهای موردنظر و با دمای مشخص انتقال داده شدند. زخم‌های مایه‌کوبی نشده، با آب مقطر استریل تیمار شدند (اعتباریان و همکاران، ۲۰۰۵). سیب‌ها در دمای 20 ± 1 و ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سیب‌ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و هر ۸ روز یکبار قطر لکه‌های مخمر اندازه‌گیری می‌شد.

در تیمار دمای 5°C نیز سیب‌ها به مدت ۳۲ روز نگهداری شدند و هر ۱۰ روز یکبار قطر لکه‌ها اندازه‌گیری می‌شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و میزان ترکیبات فنلی در سیب‌های تیمار شده با قارچ عامل بیماری و مخمر آنتاگونیست در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

به منظور بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز، کاتالاز و تغییرات فنل کل، میوه‌های سیب سالم تهیه شد. میوه‌های سیب همان‌طور که در بند ۳-۵ توضیح داده شد، ضد عفونی شدند. تمام مراحل دیگر این آزمایش از قبیل مایه‌زنی مخمر و مایه‌زنی قارچ، همانند آزمایشات مربوط به انبار انجام شد و همان جدایه‌ی مخمری که در آزمایشات مربوط به آزمایشگاه استفاده شده بود، به کار گرفته شد.

در این آزمایش‌ها، تیمارها شامل شاهد سالم (سیب‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل)، سیب‌هایی که تنها با مخمر آنتاگونیست مایه‌زنی شده بود، سیب‌های آلوده که فقط اینوکولم قارچ عامل بیماری را دریافت کرده بود و سیب‌های که با قارچ عامل بیماری و آنتاگونیست مایه‌زنی شده بودند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها به صورت طرح فاکتوریل 4×5 که فاکتور A شامل ۴ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۵ زمان نمونه برداری (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری) بود که در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میزان تغییرات آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و نیز تغییرات فنل کل در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بررسی شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل و سنجش پروتئین استاندارد

به‌منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره‌ی مورد آزمایش جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1967).

تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی پراکسیداز

برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش گنگ و همکاران استفاده شد (Gong et al, 2001). ابتدا هاون چینی در ظرف یخ قرار داده شد. سپس یک گرم از بافت میوه را داخل هاون قرار داده و با سه میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۷ کاملاً مخلوط شد. پس از به‌دست آمدن یک مخلوط هموزن، ۱/۵ میلی لیتر از مخلوط حاصل بلافاصله به داخل ویال های ۲ میلی لیتری منتقل و در دستگاه میکروسانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰g به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول بالایی حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در فریزر در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

ارزیابی میزان فعالیت پراکسیداز، بر اساس روش ارائه شده در مقاله‌ی گنگ و همکاران (۲۰۰۱) اقتباس شده از روش وتر و همکاران انجام شد. ارزیابی فعالیت پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Milton Roy Company-Unterfoehring-germany به شرح زیر انجام شد: به یک میلی لیتر از عصاره‌ی تهیه شده، ۱۳/۵ میلی لیتر بافر MES (Merck, Darmstadt, Germany) با pH برابر ۵/۵، یک میلی لیتر فنیلن دی آمین اضافه شد و قبل از اندازه‌گیری تغییرات جذب، ۲۴ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به مخلوط واکنش اضافه گردید. برای صفر کردن دستگاه، مخلوط واکنش قبل از افزودن پراکسید هیدروژن به‌عنوان بلانک در نظر گرفته و دستگاه با آن صفر شد و سپس مقدار جذب پس از افزودن پراکسید هیدروژن و اختلاط سریع در ۴۸۵ nm با فواصل ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب در دقیقه در میلی گرم پروتئین به‌عنوان واحد فعالیت پراکسیداز در نظر گرفته شد.

تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی کاتالاز

برای بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز، از روش گنگ و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. مقدار یک گرم از بافت میوه‌ی سیب در سه میلی لیتر بافر تریس-کلرید هیدروژن، ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸/۵ که حاوی ۲ میلی مولار EDTA و ۱۰ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون بود، عصاره‌گیری شد. پس از عصاره‌گیری کامل، محلول حاصل به لوله‌های مخروطی شکل اپندرف منتقل و توسط میکروسانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در داخل یخچال سانتریفیوژ شد و محلول بالایی حاصل برای انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار پروتئین تام طبق روش برادفورد تعیین شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط گنگ و همکاران (۲۰۰۱) اقتباس شده از دو و پرام لاگ به شرح زیر ارزیابی شد (Du and Bramlage, 1995). ۰/۲۵ میلی لیتر عصاره با ۲ میلی لیتر بافر تریس-اسید کلریدریک ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۶/۸ که حاوی ۵ میلی مولار پراکسید هیدروژن بود، مخلوط گردید. فعالیت آنزیم یک‌بار در زمان صفر و یک‌بار پس از گذشت ده دقیقه با افزودن ۰/۲۵ میلی لیتر تیتانیوم تتراکلرید متوقف شد. جذب محلول‌ها نسبت به آب با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت کاتالاز بر اساس میلی مولار پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین در ۴ تکرار اندازه‌گیری شد.

رسم منحنی استاندارد H_2O_2

به این منظور، غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی مولار از H_2O_2 در بافر تهیه شد و جذب آنها در ۴۱۵ نانومتر محاسبه شد و منحنی H_2O_2 رسم گردید.

ارزیابی میزان فنل کل

تهیه‌ی محلول پایه‌ی غلظت‌های فنل استاندارد

۱۰ میلی‌گرم از اسید کافئیک (Fluka, Germany) در پنج میلی‌لیتر متانول خالص حل شده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ میلی‌لیتر از این محلول جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب هر ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول در هر یک از لوله‌ها به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰ میکروگرم اسید کافئیک را داراست (اعتباریاریان و همکاران، ۲۰۰۵).

تهیه‌ی منحنی استاندارد و معادله رگرسیون

مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف قبلاً تهیه شده‌ی اسید کافئیک را در هفت میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. سه دقیقه بعد از افزودن معرف فولین، یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی محلول با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت یک ساعت، میزان جذب نور در $\lambda_{max} = 725 \text{ nm}$ اندازه‌گیری شد. این مراحل به‌طور جداگانه برای هر کدام از غلظت‌های مختلف اسید کافئیک انجام شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، از محلولی که فاقد اسید کافئیک بود و به همان میزان آب مقطر اضافه شده بود؛ استفاده شد. به‌منظور تعیین فنل کل، عصاره‌ی به دست آمده در آزمایش‌ها همانند روش تهیه‌ی منحنی استاندارد عمل شد. تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی‌لیتر فنل استخراج شده‌ی گیاه استفاده شد (اعتباریاریان و همکاران، ۲۰۰۵).

استخراج فنل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی، یک گرم بافت سیب در محل زخم (چاهک) توزین شد و ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید، سپس بافت میوه درون هاون چینی عصاره‌گیری شد. مخلوط حاصله از دو لایه پارچه‌ی ململ عبور داده شد و باقی‌مانده‌ی بافت له شده، داخل هاون و بافت چسبیده به پارچه‌ی ململ دو مرتبه هر بار با سه میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد شستشو و صاف گردید و به عصاره‌ی اول اضافه شد. درنهایت، عصاره‌ی حاصل در ۱۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش روپی داخل لوله‌ها، حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله‌های درب دار ۱۰ میلی‌لیتری در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (اعتباریاریان و همکاران، ۲۰۰۵).

نتایج و بحث

اثر آنتاگونیست *R. mucilaginosa* روی قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه (in vitro)

نتایج آزمون کشت متقابل نشان داد که این مخمر نسبت به شاهد (آب مقطر استریل)، باعث کاهش رشد میسیلیوم قارچ شد و در نتیجه اثر بازدارندگی بر روی قارچ بیمارگر داشت. در این آزمون ایزوله‌ی A1 از مخمر *R. mucilaginosa*، ۶۰/۹۷ درصد رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر را کاهش داد. در آزمون تولید مواد فرار ۹۰/۵۷ درصد باعث کاهش رشد قارچ بیمارگر شد و نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار از خود نشان داد. در آزمون تولید آنتی‌بیوتیک نیز با شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. در این آزمون ۸۳/۳۶ درصد کنترل‌کنندگی بر روی قارچ عامل بیمارگر داشت (جدول ۱).

جدول ۱- اثر بازدارندگی از رشد قارچ *P.expansum* به‌وسیله‌ی ایزوله‌ی A1 از *R. mucilaginosa* در شرایط آزمایشگاه

تیمار	تولید آنتی‌بیوتیک	مواد فرار	کشت متقابل
Treatments	Production of antibiotic	Volatile metabolites	Dual cultur
P+ A1	83.36 b	90.57 b	60.97 b
آب مقطر + P	0a	0a	0a

اعداد جدول میانگین چهار تکرار است. اعدادی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن ($P < 0.05$) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. ایزوله‌های A1 مربوط به مخمر *R. mucilaginosa* و P قارچ بیمارگر *P.expansum* است

Values are means of 4 replicates. Means in a column with different capital letter, and those in a row with different small letters differ significantly at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test

A1: *R. mucilaginosa* , P: *P.expansum*

در آزمون کشت متقابل، مخمر آنتاگونیست به خوبی رشد میسلیومی عامل بیماری را (نسبت به دو آزمون دیگر) کنترل نکرد، در صورتی‌که در آزمون تولید مواد آنتی‌بیوتیک کنترل‌کنندگی بسیار خوبی حاصل شد. این امر نشان می‌دهد که مخمرهای استفاده شده در این مطالعه، توانایی تولید مواد آنتی‌بیوتیک با خاصیت آنتاگونیستی بالا را دارند، ولی این مواد قادر به حرکت در محیط‌های حاوی آگار نیستند و در همان جایی که تولید می‌شوند، در محیط کشت نفوذ می‌کنند، دلیل کنترل نکردن خوب در آزمون کشت متقابل، همین موضوع بود ولی در آزمون کشت تولید آنتی‌بیوتیک عامل بیمارگر درست در همان نقطه‌ای که عامل آنتاگونیست یعنی مخمر قبلاً کشت شده بود، کشت شد در نتیجه کنترل‌کنندگی خوبی را از خود نشان داد. در آزمون تولید مواد فرار به خاطر اینکه دو تشک پتری که روی هم برگردانده شده بودند به خوبی گازبندی (ایزوله) شده بودند این مواد نتوانستند خارج شوند و کنترل‌کنندگی خوبی حاصل شد، ولی در مقایسه با کشت متقابل درب تشک پتری کاملاً ایزوله نشده بود؛ چون هدف اندازه‌گیری مورد دیگری بود.

در آزمون‌های آزمایشگاهی، سطح کنترل‌کنندگی آنتاگونیست در آزمون تولید آنتی‌بیوتیک قابل توجه بوده است؛ نتیجه‌ی این آزمون با نتایج آزمون ذکر شده یعنی آزمون تقابل مطابقت ندارد، چون در این آزمون به میزان زیادی یعنی ۸۳/۳۶ درصد کنترل‌کنندگی مشاهده شد؛ که این امر نشان‌دهنده‌ی تولید آنتی‌بیوتیک زیاد در محیط کشت است. البته مقداری هم می‌تواند به علت بقایای زنده‌ی مخمر در محیط کشت باشد. البته در کشت متقابل هم مخمرهای آنتاگونیست فعال وجود دارند؛ اما به دلیل اینکه این دو یعنی عامل بیمارگر و عامل آنتاگونیست با فاصله از هم کشت شده‌اند؛ در نتیجه مخمرها قادر به اعمال مکانیسم‌های آنتاگونیستی به صورت کامل نیستند.

کنترل‌کنندگی این مخمر در آزمون متابولیت‌های فرار در سطح بالایی قرار داشت؛ این میزان در بالاترین مقدار ۹۰/۵۷ بود. اغلب کشت‌های مخمری اسیدهای فرار و غیر فرار تولید می‌کنند (Kreger and van Rij, 1984). ترکیبات فرار و غیر فرار تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های بیوکنترل ممکن است در کنترل عامل بیماری مؤثر باشد (Droby et al, 1993).

اثر آنتاگونیستی جدایه‌های مخمر در شرایط دمایی ۲۰ و ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

این مخمر توانست کپک آبی سیب را در هر دو دما کنترل کند. در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، مساحت لکه‌ی پوسیدگی در سیب‌های تیمار شده با این آنتاگونیست، هشت روز پس از مایه‌زنی با عامل بیمارگر $810/79 \text{ mm}^2$ در مقایسه با $1781/42 \text{ mm}^2$ در شاهد و پس از پانزده روز $1647/20 \text{ mm}^2$ در مقایسه با $3257/44 \text{ mm}^2$ در شاهد بود (جدول ۲).

جدول ۲- مساحت پوسیدگی سیب‌های مایه‌زنی شده با *P. expansum* بعد از تیمار با A1

از مخمر *R. mucilaginosa* پس از ۸ و ۱۵ روز در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد

تیمار	مساحت پوسیدگی (cm ²) پس از ۸ روز	مساحت پوسیدگی (cm ²) پس از ۱۵ روز
Treatments	Lesion area after 8 days(cm ²)	Lesion area after 15 days(cm ²)
<i>P. expansum</i>	1781.42 a	3257.44 a
P+ A1	852.07 b	1598.9 b

هر تیمار دارای ۴ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن ($p < 0.05$) باهم اختلاف معنی‌دار دارند.

ایزوله‌ی A1 مربوط به مخمر *R. mucilaginosa* و P قارچ بیمارگر *P. expansum* است.

Values are means of 4 replicates. Means in a column with different capital letter, and those in a row with different small letters differ significantly at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test

A1: *R. mucilaginosa* , P: *P. expansum*

در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مساحت لکه‌ی پوسیدگی در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست، ۲۰ روز پس از مایه‌زنی با عامل بیمارگر $526/69 \text{ mm}^2$ در مقایسه با $825/78 \text{ mm}^2$ در شاهد و پس از ۳۲ روز $1907/96 \text{ mm}^2$ در مقایسه با $3151/17 \text{ mm}^2$ در شاهد بود (جدول ۳).

جدول ۳- مساحت پوسیدگی سیب‌های مایه زنی شده با *P. expansum* بعد از تیمار با A1 از مخمر *R. mucilaginosa*

پس از ۲۰ و ۳۲ روز در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

تیمار	مساحت پوسیدگی (cm ²) پس از ۲۰ روز	مساحت پوسیدگی (cm ²) پس از ۳۲ روز
Treatments	Lesion area after 8 days(cm ²)	Lesion area after 15 days(cm ²)
<i>P. expansum</i>	825.78a	3151.17a
P+ A1	526.69b	1907.96 b

هر تیمار دارای ۴ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند؛ در آزمون دانکن (p < ۰/۰۵) با هم اختلاف معنی‌دار دارند.

ایزوله‌ی A1 مربوط به مخمر *R. mucilaginosa* و P قارچ بیمارگر *P. expansum* است

-Values are means of 4 replicates. Means in a column with different capital letter, and those in a row with different small letters differ significantly at P = 0.05 by Duncan's multiple range test

A1: *R. mucilaginosa* , P: *P. expansum*

نتایج آزمایشات انباری نشان داد که این جدایه‌ی آنتاگونیست توانایی کاهش شدت پوسیدگی و جلوگیری از رشد و توسعه‌ی قارچ عامل بیماری را دارا است. گزارش شده است که کنترل کپک‌ها در سوراخ‌های ایجاد شده روی میوه، به مراتب سخت‌تر از کنترل آنها در بریدگی‌های سطحی ایجاد شده روی میوه است. هرچند که غلظت بالاتری از آنتاگونیست در سوراخ‌ها استفاده می‌شود، ولی محیط سوراخ برای رشد پاتوژن در مقایسه با آنتاگونیست مناسب‌تر است (Conrath et al, 2002).

نتایج آزمایش نشان داد که جدایه‌ی (*R. mucilaginosa* (A1) توانایی کاهش شدت پوسیدگی و جلوگیری از رشد و توسعه‌ی قارچ عامل بیماری را در هر دو دمای ۵ و ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد داراست. توانایی تطبیق این مخمرها با دامنه‌ی وسیعی از دما، باعث می‌شود که آنها بتوانند در مکان‌های مختلفی اعم از سردخانه، در حمل و نقل و نیز در مغازه‌ها، دوام داشته و قابل استفاده باشند.

بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز

در روز دوم سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست (*R. mucilaginosa* (A1) از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با سیب‌های آلوده و سیب‌های سالم شاهد و همچنین سیب‌های سالم تیمار شده با آنتاگونیست تنها، افزایش معنی‌داری نشان دادند. سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست در روز چهارم با شاهد آلوده در یک سطح آماری قرار گرفته، ولی از نظر عددی از آن بیشتر بود و نسبت به شاهد سالم و سیب تیمار شده با آنتاگونیست تنها در سطح بالاتری قرار گرفت، در روز ششم بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روزهای قبل در سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست دیده شد و این افزایش نسبت به تیمارهای دیگر معنی‌دار بود. در روز هشتم فعالیت آنزیم نسبت به روز ششم کمتر شد. در روز دهم نیز این روند کاهش‌ی مانند روز هشتم ادامه پیدا کرد (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز ($\Delta OD 485/min/mg$) در میوه‌ی سیب در اثر

مایه‌زنی جدایه‌ی قارچی *P. expansum* P و جدایه‌ی مخمری *R. mucilaginosa* A1

به‌طور جداگانه و توأم، در دمای ۲۰°C

روز های بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری					تیمار
10	8	6	4	2	
D 0.368 a	D 0.402 a	C 0.435 a	B 0.408 a	C 0.382 a	Control
B 0.563 b	B 0.692 b	B 0.916 a	A 0.756 b	BC 0.492 c	P
C 0.435 b	C 0.561 b	B 0.791 a	B 0.578 b	AB 0.567 b	A1
A 0.717 b	A 0.887 b	A 1.12 a	A 0.892 b	A 0.667 c	P+A1

- هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند؛ با حروف مختلف بزرگ و میانگین‌هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده‌اند. فعالیت آنزیم به‌صورت تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام نشان داده شده است.

- Control، میوه‌های سالم بدون تیمار مخمر و عامل بیماری، P، شاهد آلوده، A1، میوه‌های سالم تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* A1

و P+A1 میوه‌های آلوده‌ی تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* A1 می‌باشند.

-Values are means of 4 replicates. Means in a column with different capital letter, and those in a row with different small letters differ significantly at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test (ΔOD 485/min/mg).

-Control: healthy apples (without yeast and pathogen), P: Infected treatment with pathogen, A1: inoculated healthy apples with *R. mucilaginosa*. P+A1: infected apples treated with *R. mucilaginosa*.

بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز

در روز دوم سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست *R. mucilaginosa* (A1) از نظر میزان فعالیت آنزیم نسبت به سیب‌های سالم شاهد، سیب‌های آلوده و سیب‌های سالم تیمار شده با آنتاگونیست افزایش معنی‌داری نشان دادند؛ فعالیت آنزیم در روز چهارم در سیب‌های سالم تیمار شده با این جدایه‌ی آنتاگونیست و همچنین سیب‌های آلوده در مقایسه با سیب‌های سالم شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در این روز سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها دارند. در روز ششم سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست بیشترین مقدار فعالیت را داشتند و تفاوت معنی‌داری با سیب‌های آلوده، سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست تنها و سیب‌های سالم داشتند. در روز هشتم و دهم نیز بیشترین میزان فعالیت آنزیم در سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست بود (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه‌ی میانگین تأثیر قارچ عامل بیماری کپک آبی *P.expansum* و مخمر *R. mucilaginosa* A1

روی فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه‌ی سیب به‌طور جداگانه و توأم، در دمای 20°C

روز های بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری					تیمار
10	8	6	4	2	
C 1.87 a	C 1.93 a	C 2.1 a	C 2.09 a	C 1.94 a	Control
B 2.81 b	B 2.96 b	B 4.12 a	B 3.04 b	B 2.91 b	P
AB 3.21 b	AB 3.42 b	B 4.02 a	B 3.09 b	C 2.12 c	A1
A 3.65 b	A 3.98 b	A 5.01 a	A 4.23 b	A 3.66 b	P+A1

- هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف بزرگ و میانگین‌هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف کوچک مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده‌اند.

- فعالیت آنزیم به‌صورت میلی‌مول H_2O_2 در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام ($\text{mM H}_2\text{O}_2/\text{min/mg Protein}$) نشان داده شده است.
- Control، میوه‌های سالم بدون تیمار مخمر و عامل بیماری، P، شاهد آلوده، A1، میوه‌های سالم تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* A1 و P+A1 میوه‌های آلوده‌ی تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* A1 می‌باشند.

-Values are means of 4 replicates. Means in a column with different capital letter, and those in a row with different small letters differ significantly at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test ($\text{mM H}_2\text{O}_2/\text{min/mg Protein}$)

-Control: healthy apples (without yeast and pathogen), P: Infected treatment with pathogen, A1: inoculated healthy apples with *R. mucilaginosa*. P+A1: infected apples treated with *R. mucilaginosa*.

بررسی میزان تغییرات فنل کل

میزان ترکیبات فنلی در میوه‌های سیب تیمار شده با جدایه‌ی *R. mucilaginosa* A1، به‌علاوه‌ی قارچ عامل بیماری در روزهای دوم، چهارم و ششم افزایش یافت، ولی به‌تدریج در روز هشتم کاهش یافت و این کاهش در روز دهم نیز ادامه داشت. در روز ششم و هشتم اختلاف معنی‌دار بین میزان ترکیبات فنلی میوه‌های سیب مایه‌زنی شده با جدایه‌ی A1 به‌علاوه‌ی قارچ عامل بیماری و میوه‌های سیب مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری به‌تنهایی وجود دارد. بیشترین میزان ترکیبات فنلی در روز ششم بود و بعد میزان آن از روز ششم به بعد کاهش پیدا کرده و این کاهش تا روز دهم هم ادامه پیدا کرد (جدول ۶).

از نتایج آزمایشات مربوط به القای مکانیسم دفاعی به‌وسیله‌ی مخمر به‌نظر می‌رسد که مخمر آنتاگونیست به‌عنوان یک محرک مناسب در القا و سنتز آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و میزان فنل کل می‌باشد که این ترکیبات نقش دفاعی در بافت میوه علیه قارچ عامل بیماری‌زا را ایفاء می‌کنند. از نتایج آزمایش مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز، چنین استنباط می‌شود که فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در میوه‌های آلوده‌ی تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* (A1) نسبت به شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل افزایش داشته است. میزان فنل کل در بین ۵ روز نمونه‌برداری در تیمارها نسبت به شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل افزایش داشته است. ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیشتر به عوامل بیماری‌زا توسط

محققین دیگر نیز گزارش شده است. تولید ترکیباتی مثل سوپرین باعث می‌شود که اطراف محل آلودگی چوب پنبه‌ای شده و از نفوذ و توسعه‌ی عامل بیماری به بقیه‌ی قسمت‌های گیاه جلوگیری شود. میزان فنل کل در بین ۵ روز نمونه‌برداری در تیمارها نسبت به شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل افزایش داشته است. ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیشتر به عوامل بیماری‌زا توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. در آزمایشی میزان بعضی آنزیم‌ها مانند کیتیناز، پراکسیداز، کاتالاز و ترکیبات فنلی (Ramamoorthy and Samiyappan, 2001) در اثر القا با مخمر در گیاه افزایش یافت و باعث ایجاد مقاومت در گیاه شد و این آنزیم‌ها از رشد چندین قارچ در شرایط آزمایشگاه جلوگیری کردند (Pierson et al, 1971). عوامل بیوکنترل همراه با رشد سریع در محل زخم، با بافت زخمی شده رابطه‌ی متقابل دارند و تغییرات بیوشیمیایی متفاوتی از قبیل افزایش فعالیت کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، پراکسیداز و تشکیل سدهای ساختمانی و تجمع فیتوآلکسین‌ها را در زخم‌ها القا می‌کنند (Lima, 1998).

جدول ۶- مقایسه‌ی میانگین تأثیر قارچ عامل بیماری کپک آبی *P.expansum* P₁₁ و مخمر *R. mucilaginosa* A1

روی میزان فنل کل (میلی‌گرم در یک گرم بافت میوه) در میوه‌ی سیب					تیمار
روز های بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری					
10	8	6	4	2	
B 0.63 ab	B 0.63 ab	B 0.707 a	B 0.63 ab	B 0.56 b	Control
A 0.79 a	B 0.71 a	B 0.71 a	AB 0.74 a	AB 0.66 a	P
A 0.68 a	A 0.79 a	A 0.84 a	A 0.809 a	A 0.786 a	A1
A 0.79 b	A 0.86 b	A 0.91a	A 0.82 a	A 0.821a	P+A1

- هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین‌هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف بزرگ و میانگین‌هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند، با حروف مختلف کوچک مشخص شده‌اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده‌اند.

- Control: میوه‌های سالم بدون تیمار مخمر و عامل بیماری، P، شاهد آلوده، A1، میوه‌های سالم تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* A1 و P+A1 میوه‌های آلوده تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* A1 می‌باشند.

-Values are means of 4 replicates. Means in a column with different capital letter, and those in a row with different small letters differ significantly at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range test

-Control: healthy apples (without yeast and pathogen), P: Infected treatment with pathogen, A1: inoculated healthy apples with *R. mucilaginosa*. P+A1: infected apples treated with *R. mucilaginosa*.

القاه مقاومت پروسه و فرآیندی است که گیاه را برای دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا آماده می‌کند که این فرآیند با فعالیت سیستم‌های بیوشیمیایی همانند آنزیم PAL، پراکسیداز منطبق است (برادفورد، ۱۹۶۷) و (Schlumbaum, 1986).

گیاهان به‌منظور از بین بردن اثرات رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس‌های زنده و غیر زنده مکانیسم‌های دفاعی خود را به کار می‌گیرند، چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیس میوتاز، پلی فنل اکسیداز و ترکیباتی شبیه به فنل به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه که در پاسخ به استرس در گیاهان تجمع می‌یابند به اثبات رسیده‌اند (Elad and Chet, 1987).

از نتایج آزمایش مربوط به میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه‌ی سیب چنین استنباط می‌شود که قارچ *Penicillium expansum* فعالیت آنزیم کاتالاز را در میوه‌ی سیب افزایش می‌دهد. این مخمر آنتاگونیست هم در تمام روزهای نمونه‌برداری فعالیت کاتالاز را افزایش داد. در تمام روزهای نمونه‌برداری سیب‌های آلوده تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به شاهد آلوده افزایش نشان دادند، یعنی فعالیت آنزیم در سیب‌های آلوده تیمار شده با آنتاگونیست، بیشتر از شاهد آلوده است و می‌توان نتیجه گرفت که آنتاگونیست در همه‌ی روزها علاوه بر بیمارگر باعث افزایش القای آنزیم کاتالاز در میوه‌ها می‌گردد. چان و تیان در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که تیمار میوه‌ی گیلای با مخمر *Pichia membranifaciens* باعث تشدید فعالیت آنزیم پراکسیداز شد.

نتایج آزمایشات ما در مورد مکانیسم آنتاگونیستی این مخمرهای آنتاگونیست پیشنهاد می‌کند که تولید ترکیبات فرار، رقابت، القای مقاومت و تا حدی هم تولید آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله مکانیسم‌های به کار گرفته شده توسط مخمرهای آنتاگونیست می‌باشد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این ایزوله‌ی مخمری دارای توان بیوکنترلی علیه بیماری کپک آبی سیب است.

استفاده از مخمرها یک تکنولوژی جدید برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت می‌باشد و در طولانی‌مدت می‌توان انتظار داشت که این مواد بیولوژیکی سطح کنترل قابل مقایسه‌ای را با سطح کنترل قارچ‌کش‌های شیمیایی به‌وجود آورند.

تشکر و قدردانی

بودجه‌ی این طرح از محل اعتبار طرح حوزه معاونت محترم پژوهشی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تأمین شده است. در اینجا لازم می‌دانم کمال تشکر را از این حوزه داشته باشم. ضمناً از کلیه کسانی که نگارندگان را در طول این تحقیق یاری رساندند از جمله آقایان آرش و آوش غلام نژاد، شهرام نجفی و عباس نصری نسب کمال تشکر را دارم.

Archive of SID

References:

1. Alvifard, f. 2008. Investigation biological control of grey mold by yeast and some antagonism mechanism. Master science thesis. Abooreihan campus, Tehran University, 194 p.
2. Arras, G., and Arru, S. 1999. Integrated control of postharvest citrus decay and induction of phytoalexins by *Debaryomyces hansenii*. Adv. Hort. Sci. 13: 76-81.
3. Batta, Y.A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifia formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue mold. Food Microbiol. 96: 281– 288.
4. Bradford, M.M. 1967. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
5. Conrath, U., Pieters, C.M.J. and Mauch Mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interaction. Trends Plant Sci. 7: 210-216.
6. Dennis, C., Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. production of non volatile antibiotics. Trans. Brit. Mycol. Soc., 57: 25-39.
7. Droby, S., Chalutz. E., Horev, B., Cohen L., Gaba, V., Wilson, C.L., and Wisniewski, M.E. 1993. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathol., 42: 418-424.
8. Du, Z. W.J. Bramlage. 1995. Proxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. Hort. Sci., 30: 205-209.
9. Elad, Y., Chet, I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of Pythium damping-off by bacteria. Phytopathology. 77:190- 195 (cited by Guetsky et al.,2002).
10. El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., and Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathol. 88: 282-291.
11. Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., Eastwell, K.C., and Sayler, R.J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Microbiol. 51: 591-598.
12. Gong, Y ., Toivonen , P.M.A., Lau, O.L., and Wiersma., P.A. 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple is related to its browning disorder. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 259-264.
13. Gullino, M.L., Migheli, Q., Mezzalama, M. 1995. Risk analysis in the release of biological control agents: antagonistic *Fusarium oxysporum* as a case study. Plant Dis. 79: 1193-1201
14. 16. Kreger-van Rij, N.J.W., ed. 1984. The yeast: a Taxonomic Study, 3rd edn. Amsterdam: Elsevier, 1082pp.
15. Lillbro, M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain-a comparison of mode of action of several yeast species. Master thesis for the Agriculture Programme, animal science, performed at the Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Sciences 21pp.
16. Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. De Cicco, V. 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. Biocontrol Sci and Technol. 8: 257-267.
17. Pierson. C. F., Leponis, M. J., and McColloch, L.P. 1971. Market diseases of apples, pears and quince. U.S. Dep. Agric., Agric. Handb. Vol. 376. U. S. Govt. Printing Office, Washington, DC.

18. Ramamoorthy, V., and Samiyappan, R. 2001 .Induction of defense related gene in *PseudoA4nas fluorescens* treated chili plants in response to infection by *Colletotrichum capsica*. J. Mycol Pathol. 31: 146-155.
19. Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U., and Boller, T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. Nature 324: 365–367.
20. Vero, S., Mondino, P., Burgaeno, J.Soubes, M., and Wisniewski,M., 2002. Chracterizatioin of biological activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. Postharvest boil. and Technol., 26,91-98.
21. Wilson,C.L.,Wisniewski, M.E. 1994. Biolgical control of postharvest diseases - Theory and Practic. CRC Press, Boca Raton, Florida,182pp.
22. Wisniewski, M.E. and Wilson, C.L. .1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. Hort. 27, 94–98.