فصلنامه‌ی تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره‌ی چهارم، زمستان ۱۳۹۲
صص ٦٠- ٤٧

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

جلال غلام نژاد*[1]، حسن رضا اعتباریان[2]، فاطمه ناصری نسب[1]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲

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 به‌کار برده شد. این جدایه از مخمر رشد قارچ *P. expansum* را کاهش داد. در آزمون کشت تقابل، میزان کاهش رشد ٦٠/٩٧ درصد، در مورد گاز فرار ٩٠/٥٧ درصد، و در تست متابولیت‌های خارج سلولی ٨٣/٣٦ درصد بود. در آزمایش‌های انباری، چاهک ایجاد شده روی سیب با ٤٠ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر آنتاگونیست و ٢٤ ساعت بعد با ٢٠ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شد. سیب‌های مایه‌زنی شده در٢٠ و ٥ 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 میوه‌ی سیب بررسی شد. میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز ،کاتالاز و میزان ترکیبات فنلی 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 نیز در سیب‌های آلوده‌ی تیمار شده با جدایه‌ی مخمر در روز ششم بعد از مایه‌زنی دیده شد که نسبت به شاهد آب مقطر به طور معنی‌داری افزایش یافته بود.

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

---

[1]- کارشناس ارشد گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[2]- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
* 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 به آن وارد می‌شود که بسته به تکنولوژی مورد استفاده در بسته‌بندی و شرایط انبارداری مانند دما و رطوبت، متفاوت است. این‌گونه خسارات، اساساً به وسیله‌ی عوامل قارچی به وجود می‌آید و این عوامل به وسیله‌ی زخم‌هایی که در طول انبارداری، حمل و نقل و فرآوری ایجاد می‌شوند، 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 به مخاطره 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 به مخاطره افتادن سلامت انسان (ناشی از مصرف بی‌رویه قارچ‌کش‌ها)، دانشمندان را به فکر استفاده از روش‌های جایگزین انداخته است. کنترل بیولوژیک با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، به عنوان یکی از روش‌های جایگزین امیدبخش پیشنهاد شده (Wisniewski and Wilson, 1992) و در میان روش‌های مختلف پیشنهادی، از موفقیت نسبی بیشتری برخوردار شده است. 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، 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 A1 *R. mucilaginosa* 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 فنلی 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 چهار درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری و هر سه هفته یک بار 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 ۱۳۸٦ 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 ۱۰-۷ روزه بر روی محیط 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 با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر استریل غلظت مورد نیاز(۱×۱۰^{۵} کنیدی در هر میلی‌لیتر) به دست آمد (Batta, 2004).

تهیه‌ی سوسپانسیون آنتاگونیست

در هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط NYDA (Nutrient Yeast Dextrose Agar) ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد. پس از سرد شدن محیط، به هر ارلن مایر یک لوپ از سلول های مخمر افزوده شد. سپس ارلن مایرها روی شیکر با سرعت ۲۰۰ حرکت در دقیقه و به مدت ٤۸ ساعت، در دمای اتاق قرار گرفتند. سلول‌های مخمر پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۳۰۰۰g 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 ($۱۰^{۵}$،$۱۰^{٦}$،$۱۰^{۷}$، $۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر) تهیه گردید.

میوه‌ی سیب

سیب‌های مورد استفاده در این بررسی، سیب زرد رقم گلدن دلیشز بوده که از باغات دماوند تهیه شده بود. پس از شستشوی سیب‌ها با آب، آنها را به‌مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱٪ قرار داده و سپس به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۵٪ شسته شده و سرانجام سه بار با آب مقطر سترون 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 جدایه‌های *R. mucilaginosa* روی قارچ *P. expansum* در شرایط آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل (Dual culture)

این آزمون بر اساس روش دنیس و وبستر (Dennis and Webster, 1971) انجام شد. ابتدا هر تشتک پتری به وسیله‌ی ماژیک به دو قسمت مساوی تقسیم شد، سپس درون هر تشتک، 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 کشت جوان قارچ بیمارگر (دو روزه بر روی WA) قرار داده شد. جدایه‌های مخمر در محیط NYDB کشت داده شده و به مدت ۲٤ ساعت روی شیکر با ۲۵۰ حرکت در دقیقه قرار گرفت. سپس ٤۸ ساعت بعد از گذاشتن پلاک قارچ عامل بیماری، به کمک لوپ سترون، نیمی دیگر از سطح محیط کشت به سوسپانسیون مخمر آغشته گردید. برای تیمار شاهد، به‌جای سوسپانسیون مخمر، از آب مقطر استریل استفاده گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۱۸ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. سپس قطر کلونی جدایه‌های قارچ اندازه‌گیری شده و مساحت آن محاسبه شد. زمانی که در تیمار شاهد قارچ به خط وسط تشتک 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 ۲٤ ساعته بر روی محیط MEA (Malt Extract Agar) کاملاً پخش شد. سپس در تشتک پتری دیگر حاوی محیط PDA، پلاکی از قارچ (محیط کشت شش روزه) به قطر یک سانتی‌متر در وسط این محیط کشت قرار داده شد. سپس در کنار شعله و در شرایط سترون، تشتک‌های حاوی قارچ عامل بیمارگر در زیر و تشتک‌های حاوی مخمر در قسمت بالا، روی هم قرار داده شد و لبه‌های آنها به کمک پارافیلم کاملاً پوشانیده و بعد از ۲۵ روز، قطر کلونی‌های قارچ اندازه‌گیری و سپس مساحت آن محاسبه گردید و طبق فرمول ذکر شده در بالا، درصد کاهش رشد میسیلیومی 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 به‌صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس پتری‌ها به مدت ۹٦ ساعت در انکوباتور با دمای $۲۵\pm۱\ ^{\circ}C$ 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 ازکشت ٤۸ ساعته‌ی قارچ عامل بیماری در وسط پتری‌ها قرار داده شد. این پلاک به‌منظور جلوگیری از پخش شدن اسپور از روی محیط WA برداشته شد. در پتری شاهد نیز به‌جای جدایه‌ی مخمر از آب مقطر استریل استفاده شد و همانند سایر تیمارها از کلروفرم هم استفاده گردید. بعد از ۱۸روز، قطر کلونی قارچ اندازه‌گیری شد و طبق فرمول موجود در بند ۲-٦-۱ درصد کاهش رشد محاسبه گردید. این آزمون‌ها هرکدام به‌صورت جداگانه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ٤ 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، ٤۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر(تهیه شده با روشی که قبلا ذکر گردید) با غلظت ۱×۱۰^{۷} سلول قارچی در هر میلی‌لیتر ۱×۱۰^{۷}/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 ۲٤ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچی(تهیه شده با توجه به بند۲-۳) 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 ۱±۲۰ 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 $^{\circ}C$ ۵ 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

به‌منظور 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، ضدعفونی 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، به‌کار 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 اینوکلوم قارچ عامل بیماری را دریافت کرده بود و سیب‌های که با قارچ عامل بیماری و آنتاگونیست مایه‌زنی شده بودند. برای هر تیمار ٤ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها به‌صورت طرح فاکتوریل ٤× ۵ که فاکتور A شامل ٤ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۵ زمان نمونه برداری(۲، ٤، ٦ ، 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، ٤، ٦ ، 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 هموژن، ۱/۵ میلی لیتر از مخلوط حاصل بلافاصله به داخل ویال های ۲ میلی‌لیتری منتقل و در دستگاه میکروسانتریفیوژ در ۱٤۰۰۰g به مدت ۱٦ دقیقه در دمای ٤ 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 پرکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Milton Roy Company-Unterfoehring-germany به شرح زیر انجام شد: به یک میلی‌لیتر از عصاره‌ی تهیه شده، ۱۳/۵ میلی‌لیتر بافر MES (Merck, Darmstadt, Germany) با pH برابر ۵/۵، یک میلی‌لیتر فنیلن دی آمین اضافه شد و قبل از اندازه‌گیری تغییرات جذب، ۲٤ 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 nm ٤٨٥ با فواصل ١٠ ثانیه به مدت یک دقیقه در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین به‌عنوان واحد فعالیت پراکسیداز در نظر گرفته شد.

تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی کاتالاز

برای بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز، از روش *گنگ و همکاران* (٢٠٠١) استفاده شد. مقدار یک گرم از بافت میوه‌ی سیب در سه میلی‌لیتر بافر تریس- کلرید هیدروژن، ٥٠ میلی‌مولار با pH برابر با ٨/٥ که حاوی ٢ میلی‌مولار EDTA و ١٠ درصد پلی-وینیل پیرولیدون بود، عصاره‌گیری شد. پس از عصاره‌گیری کامل، محلول حاصل به لوله‌های مخروطی شکل اپندرف منتقل و توسط میکروسانتریفیوژ در ١٤٠٠٠ دور به مدت ١٦ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد در داخل یخچال سانتریفیوژ شد و محلول بالایی حاصل برای انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر٢٠- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار پروتیین تام طبق روش برادفورد تعیین شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط گنگ و همکاران (٢٠٠١) اقتباس شده از *دو و برام‌لاگ* به شرح زیر ارزیابی شد (Du and Bramlage, 1995). ٠/٢٥ میلی‌لیتر عصاره با ٢ میلی‌لیتر بافر تریس- اسیدکلریدریک ٥٠ میلی‌مولار با pH برابر ٦/٨ که حاوی ٥ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن بود، مخلوط گردید. فعالیت آنزیم یک‌بار در زمان صفر و یک‌بار پس از گذشت ده دقیقه با افزودن ٠/٢٥ میلی لیتر تیتانیوم تتراکلرید متوقف شد. جذب محلول‌ها نسبت به آب با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت کاتالاز بر اساس میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین در ٤ تکرار اندازه‌گیری شد.

رسم منحنی استاندارد H_2O_2

به این منظور، غلظت‌های ٠/٢٥ تا ٢/٥ میلی‌مولار از H_2O_2 در بافر تهیه شد و جذب آنها در ٤١٥ نانومتر محاسبه شد و منحنی H_2O_2 رسم گردید.

ارزیابی میزان فنل کل

تهیه‌ی محلول پایه‌ی غلظت‌های فنل استاندارد

١٠ میلی‌گرم از اسیدکافئیک (Fluka, Germany) در پنج میلی‌لیتر متانول خالص حل شده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ٥٠ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ٠/٥ ، ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٨ میلی‌لیتر از این محلول جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ١٠ میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب هر ٠/٥ میلی‌لیتر از محلول در هر یک از لوله‌ها به‌ترتیب ٥ ،١٠ ،٢٠ ، ٣٠ ، ٤٠ ،٥٠ ، ٦٠ ،٨٠ میکروگرم اسید کافئیک را داراست (اعتباریان و همکاران، ٢٠٠٥).

تهیه‌ی منحنی استاندارد و معادله رگرسیون

مقدار ٠/٥ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف قبلا تهیه شده‌ی اسید کافئیک را در هفت میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و سپس ٠/٥ 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 ١٠ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از گذشت یک ساعت، میزان جذب نور در λmax =٧٢٥nm 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 اسیدکافئیک 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 ٠/٥ میلی‌لیتر فنل استخراج شده‌ی گیاه استفاده شد (اعتباریان و همکاران، ٢٠٠٥).

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 g ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی 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 (اعتباریان و همکاران، ۲۰۰۵).

نتایج و بحث

اثرآنتاگونیست *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 درنتیجه 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
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($p<۰/۰۵$) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. ایزوله های A1 مربوط به مخمر *R. mucilaginosa* و P قارچ بیمارگر *P.expansum* است.

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 تشتک 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 تشتک 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 ۸۳/۳٦ 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. در۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، مساحت لکه‌ی پوسیدگی در سیب‌های تیمار شده با این آنتاگونیست، هشت روز پس از مایه‌زنی با عامل بیمارگر ۸۱۰/۷۹ mm^2 در مقایسه با ۱۷۸۱/٤۲ mm^2 در شاهد و پس از پانزده روز ۱٦٤۷/۲۰ mm^2 در مقایسه با ۳۲۵۷/٤٤ mm^2 در شاهد بود(جدول ۲).

جدول ۲- مساحت پوسیدگی سیب‌های مایه‌زنی شده با *P. expansum* بعد از تیمار با جدایه 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
P. expansum	1781.42 a	3257.44 a
P+ A1	852.07 b	1598.9 b

هر تیمار دارای ٤ تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن($p<$ ۰/۰۵) باهم اختلاف معنی‌دار دارند. ایزوله‌ی A1 مربوط به مخمر *R. mucilaginosa* و P قارچ بیمارگر *P.expansum* است.

در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مساحت لکه‌ی پوسیدگی در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست، ۲۰ روز پس از مایه‌زنی با عامل بیمارگر ۵۲٦/٦۹ mm^2 در مقایسه با ۸۲۵/۷۸ mm^2 در شاهد و پس از ۳۲ روز ۱۹۰۷/۹٦ mm^2 در مقایسه با ۳۱۵۱/۱۷ mm^2 در شاهد بود(جدول ۳).

جدول ۳- مساحت پوسیدگی سیب‌های مایه زنی شده با *P. expansum* بعد از تیمار با جدایه 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 ۳۲روز
P. expansum	825.78a	3151.17a
P+ A1	526.69b	1907.96 b

هر تیمار دارای ٤ 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.

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 افزیش نسب 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 ٤).

جدول٤- مقایسه‌ی میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (ΔOD 485/min/mg) در میوه‌ی سیب در اثر مایه‌زنی جدایه‌ی قارچی P *P.expansum* و جدایه‌ی مخمری A1 *R. mucilaginosa* به‌طور جداگانه و توأماً، در دمای ۲۰°C

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

- 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($P\leq0.05$) ارائه شده‌اند. فعالیت آنزیم به‌صورت تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام نشان داده شده است.

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

بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز

در روز دوم سیب های 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).

جدول۵- 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 توأماً، در دمای ۲۰°C

تیمار	روز های بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری				
	2	4	6	8	10
Control	C 1.94 a	C 2.09 a	C 2.1 a	C 1.93 a	C 1.87 a
P	B 2.91 b	B 3.04 b	B 4.12 a	B2.96b	B 2.81 b
A1	C 2.12 c	B 3.09 b	B 4.02 a	AB 3.42b	AB 3.21 b
P+A1	A 3.66 b	A 4.23 b	A 5.01 a	A 3.98 b	A 3.65 b

- 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($P\leq0.05$) ارائه شده‌اند.
- فعالیت آنزیم به‌صورت میلی‌مول H_2O_2 در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام(mM H_2O_2/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.

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 به علاوه‌ی قارچ عامل بیماری و میوه‌های سیب مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری به‌تنهایی وجود دارد. بیشترین میزان ترکیبات فنلی در روز ششم بود و میزان آن از روز ششم به بعد کاهش پیدا کرده و این کاهش تا روز دهم هم ادامه پیدا کرد (جدول ٦).

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 میزان فنل کل در ۵ روز نخست 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 سوبرین باعث می‌شود که اطراف محل آلودگی چوب پنبه‌ای شده و از نفوذ و توسعه‌ی عامل بیماری به بقیه‌ی قسمت‌های گیاه جلوگیری شود. 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 ۱و ۳ گلوکاناز، پراکسیداز و تشکیل سدهای ساختمانی و تجمع فیتوآلکسین‌ها را در زخم‌ها القا می‌کنند (Lima, 1998).

جدول٦- مقایسه‌ی میانگین تأثیر قارچ عامل بیماری کپک آبی *P.expansum* P_{11} و مخمر *R. mucilaginosa* A1 روی میزان فنل کل (میلی‌گرم در یک گرم بافت میوه) در میوه‌ی سیب

روز های بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری					تیمار
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($P\leq0.05$) 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 میوه های آلوده تیمار شده با مخمر *R. mucilaginosa* A1 می‌باشند.

القاء مقاومت فرآیندی است که گیاه را برای دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا آماده می‌کند که این فرآیند با فعالیت سیستم‌های بیوشیمایی همانند آنزیم PAL ، پراکسیداز منطبق است (Bradford, 1967; Schlumbaum, 1986).

گیاهان به‌منظور از بین بردن اثرات رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس‌های زنده و غیر زنده مکانیسم‌های دفاعی خود را به‌کار 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 آلوده‌ی تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به شاهد آلوده افزایش نشان دادند، یعنی فعالیت آنزیم در سیب‌های آلوده‌ی 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 گیلاس با مخمر *Pichia membranifaciens* باعث تشدید فعالیت آنزیم پراکسیداز شد.

نتایج آزمایشات ما در مورد مکانیسم آنتاگونیستی این مخمرهای آنتاگونیست بیانگر ان است که تولید ترکیبات فرار، رقابت، القای مقاومت و تا حدی هم تولید آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله مکانیسم‌های به‌کار 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

نگارندگان از حوزه معاونت محترم پژوهشی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران که بودجه‌ی این طرح را تأمین نموده‌اند تشکر می‌نمایند. 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 ناصری نسب کمال تشکر را دارد.

References:

1. Alavifard f. 2008. Investigation biological control of grey mold by yeast and some antagonism mechanism [MSc]. [Tehran, Iran]: Abooreihan Campus, Tehran University.
2. Arras G and Arru S. 1999. Integrated control of postharvest citrus decay and induction of phytoalexins by *Debaryomyces hansenii*. Advances in Horticultural Science 13: 76–81.
3. Batta YA. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue mold. Food Microbiology 96: 281–288.
4. Bradford MM. 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 CMJ and Mauch Mani B. 2002. Priming in plant-pathogen interaction. Trends in Plant Science 7: 210–216.
6. Dennis C, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. production of non volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 25–39.
7. Droby S, Chalutz E, Horev B, Cohen L, Gaba V, Wilson CL and Wisniewski ME. 1993. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. Plant Pathology 42: 418–424.
8. Du Z and Bramlage WJ. 1995. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders. HortScience 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.
10. El-Ghaouth A, Wilson CL and Wisniewski M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology 88: 282–291.
11. Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC and Sayler RJ. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Microbiology 51: 591–598.
12. Gong Y, Toivonen PMA, Lau OL and Wiersma PA. 2001. Antioxidant system level in `Braeburn' apple is related to its browning disorder. Botanical Bulletin of Academia Sinica 42: 259–264.
13. Gullino ML, Migheli Q and Mezzalama M. 1995. Risk analysis in the release of biological control agents: antagonistic *Fusarium oxysporum* as a case study. Plant Disease 79: 1193–1201
14. Kreger-van Rij NJW.1984. The Yeast: a Taxonomic Study. 3rd ed. Amsterdam: Elsivier, 1082 p.
15. Lillbro M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain-a comparison of mode of action of several yeast species [MSc]. [Uppsala, Sweden]: Swedish University of Agricultural Sciences.
16. Lima G, De Curtis F, Castoria R and De Cicco V. 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology 8: 257–267.
17. Pierson CF, Leponis MJ and McColloch LP. 1971. Market Diseases of Apples, Pears and Quince. Vol. 376. Washington, USA: US Government Printing Office. 112 p.
18. Ramamoorthy V and Samiyappan R. 2001. Induction of defense related gene in *Pseudomonas fluorescens* treated chilli plants in response to infection by *Colletotrichum capsici*. Journal of Mycology and Plant Pathology 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 Biology and Technology 26: 91–98.
21. Wilson CL and Wisniewski M.E. 1994. Biolgical Control of Postharvest Diseases-Theory and Practic. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. 182 p.
22. Wisniewski ME and Wilson CL. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. Horticulture 27: 94–98.