فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲
صص ۶۲-۴۷

بهبود کنترل بیولوژیک کپک خاکستری سیب با استفاده از مخلوط جدایه‌های مخمر و سیلیکون و القای پاسخ های دفاعی

اسماعیل زنگویی*[۱]، حسن رضا اعتباریان[۲]، نوازاله صاحبانی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۸

چکیده

در این پژوهش جدایه مخمر A5 از گونه *Candida membranifuciens* و جدایه A6 از گونه *Pichia guilliermondii* به صورت انفرادی و مخلوط با سیلیکون (Si) برای کنترل بیماری کپک خاکستری سیب با عامل *Botrytis cinerea* مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش اثر غلظت‌های گوناگون سیلیکون بر روی جدایه‌های مخمر در شرایط آزمایشگاه نشان داد سیلیکون سبب کاهش رشد مخمرها می‌گردد. هم‌چنین سیلیکون مانع جوانه‌زنی اسپور قارچ عامل بیماری در غلظت‌های بالای ۰/۸٪ w/v می‌گردد. نتایج آزمایشات در شرایط انبار نیز نشان داد مخلوط جدایه A5 + سیلیکون ۰/۲درصد و جدایه A6 + سیلیکون ۰/۲ درصد با قطر لکه برابر با ۳/۸۷ و ۳/۴۸ میلی متر در دمای ۴ درجه سانتی گراد و هم‌چنین در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد تیمار A5+ سیلیکون ۰/۲ با ایجاد قطر لکه معادل ۵/۲۳ میلی متر، بیش‌ترین کنترل کنندگی را نسبت به دیگر تیمارها به صورت انفرادی و مخلوط با سیلیکون دارند. توانایی مخلوط جدایه مخمر A5 و سیلیکون ۰/۲ درصد در القای پاسخ‌های دفاعی در بافت سیب نشان داد این مخلوط چهار روز بعد از مایه زنی عامل بیماری فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش می‌دهد. علاوه بر آن این مخلوط دو روز بعد از مایه زنی سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی نیز می‌گردد. مطابق نتایج این پژوهش مخلوط مخمرها بهمراه سیلیکون با افزایش القاء مقاومت در بافت میوه سیب، سبب بهبود کنترل بیولوژیک می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: کپک خاکستری سیب، پراکسیداز، ترکیبات فنلی، کاتالاز، سیلیکون

[۱] - دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] - استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری
[۳] - دانشیار گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران
* - نویسنده مسئول مقاله: zanguei@hotmail.com

مقدمه

بیماری کپک خاکستری سیب با عامل قارچی *Botrytis cinerea* یکی از مهمترین بیماری‌های پس از برداشت به شمار می‌رود و استفاده از قارچ کش‌ها نیز مهمترین راه کنترل این بیماری می‌باشد، اما وجود بقایای سموم و ایجاد جدایه‌های مقاوم به آنها سبب جهت گیری‌های جدیدی در کنترل بیماری‌های محصولات بعد از برداشت شده است که کنترل بیولوژیک یکی از آنها بشمار می‌رود (Janisiewicz, 1988). در این بین مخمرهای آنتاگونیست با رقابت مستقیم و اشغال زیستخوان اکولوژیکی و القا مقاومت به عوامل بیماری زا در گیاه سبب کنترل بیمارگرها می‌شوند (Wisniewski *et al.*, 1991). یکی از خصوصیات مقاومت القایی گفته شده همراه بودن این نوع مقاومت با تغییرات بیوشیمیایی مختلفی در گیاه از جمله افزایش پروتیئن‌های مرتبط با بیماریزایی، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و افزایش میزان کل ترکیبات فنلی در گیاه می‌باشد (Franceschi *et al.*, 1998). اما بیش‌تر مواد بیوکنترلی که استفاده شده اند در شرایط استفاده تجاری و مرحله فرمولاسیون معمولا به اندازه کاربرد سموم موثر نیستند و برای بهبود اثر بیوکنترلی آنها استراتژی‌های مختلفی پیشنهاد شده است، برای مثال افزایش کیتوزان، سالسیلیک اسید، بیکربنات سدیم، قارچ کش‌ها و سیلیکون به همراه مواد بیوکنترل از این موارد می‌باشند (Yao *et al*., 2004). سیلیکون دومین عنصر فراوان پوسته زمین بوده و علاوه برآن در بافت گیاهی نیز وجود دارد که بیش‌تر نقش آن حفاظت در برابر بیمارگرها و کمک به رشد در گیاهان می‌باشد (Epstein, 1999). *سی بولد و همکاران* (Seebold *et al*., 2001) نشان دادند کاربرد سیلیکون سبب کاهش شدت بیماری بلاست توسط قارچ *Magnaporthe grisea* در برنج می‌گردد. علاوه بر آن ثابت شده است که سیلیکون در کاهش بیماری‌های گندم (B´elanger *et al*., 2003)، هلو (Biggs *et al*., 1997) و توت فرنگی (Kanto *et al*., 2004) نیز موثر می‌باشد. مکانیسم حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرهای قارچی با سیلیکون به خوبی شناخته شده نمی‌باشد. احتملا سیلیکون مشابه آنتاگونیست‌ها با تحریک دفاع بیوشیمیایی گیاه شامل تجمع لیگنین، ترکیبات فنلی و نیز پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی در گیاهان عمل می‌کند. در پژوهشی ثابت شده است که سیلیکون سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL، پلی فنول اکسیداز و پراکسیداز در گیاهان می‌گردد (B´elanger *et al*., 1995). در پژوهشی دیگر تیمار طالبی با غلظت ۱۰۰ mM سیلیکون، قبل از مایه زنی با *Trichoderma roseum* سبب جلوگیری از شدت و شیوع پوسیدگی‌های بعد از برداشت شد که این جلوگیری با القاء آنزیم‌های پراکسیداز و کیتیناز در میوه-های تیمار شده ارتباط داشت (Bi *et al*., 2006). *چریف و همکاران* (Cherif *et al*., 1994)، نیز گزارش کردند فعالیت چندین آنزیم از جمله پراکسیداز در خیار تیمار شده با سیلیکون محلول و مایه زنی شده با *Pythium ultimum* افزایش می‌یابد. *تیان و همکاران* (Tian *et al*., 2005) نشان دادند مخلوط سیلیکون و مخمر بیماری‌های بعد از برداشت میوه جوجوبا (*Simmondsia chinesis*) را کاهش خواهد داد. هم‌چنین ثابت گردیده است که مخلوط مخمر *Cryptococcus laurentii* به همراه سیلیکون در میوه گیلاس، با افزایش القاء آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز توسط سیلیکون سبب بهبود کنترل بیولوژیک می‌گردند (Qin and Tian, 2005). این پژوهش به منظور بررسی اثر سیلیکون به صورت انفرادی و مخلوط با مخمرهای آنتاگونیست بر روی میوه سیب در کنترل بیماری کپک خاکستری و هم‌چنین بررسی مکانیسم القاء مقاومت در آن انجام گرفت.

مواد و روش ها

تهیه آنتاگونیست‌ها و عامل بیماری

در این پژوهش یک جدایه مخمر A5 از گونه *Candida membranifuciens*، جدایه A6 از گونه *Pichia guilliermondii* و قارچ عامل بیماری جدایه *Botrytis cinerea* از کلکسیون آزمایشگاه قارچ شناسی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تهیه شدند (Alavifar, 2007). هم‌چنین سیلیکات سدیم (Sigma) با استفاده از یک فیلتر میکروپور استریل و با آب مقطر به غلظت مورد نظر رسید.

اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون روی جوانه زنی اسپور بیمارگر

این آزمایش بر اساس روش *درابی و همکاران* (Droby *et al*., 1997) با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا ۵ میلی لیتر محیط Potato Dextrose Broth (PDB) درون لوله‌های ۱۰ میلی لیتری ریخته و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور *Botrytis cinerea* با غلظت 10^6 در هر میلی لیتر درون لوله‌ها ریخته شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون اسپور عامل بیماری ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. سپس غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۲٪ w/v سیلیکون به لوله‌ها اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۲۰ ساعت در روی شیکر در ۱۲۰ دور در هر دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و پس از این مدت با استفاده از یک لام میکروسکوپی حدود ۱۰۰ اسپور بیمارگر از نظر تعداد اسپورهای جوانه زده، شمارش و مورد مقایسه قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در ۴ تکرار انجام شد.

بررسی جمعیت جدایه‌های مخمر در حضور غلظت‌های سیلیکون در محیط کشت مایع

این آزمون مطابق روش *ژنیسویکس و بور* (Janisiewicz and Bors, 1995) با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا محیط کشت Nutrient Yeast Dextrose Broth (NYDB) تهیه گردید. سپس ۵ میلی لیتر از این محیط درون لوله‌های ۱۰ میلی لیتری ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد سترون شد. پس از سرد شدن محیط‌های مذکور غلظت‌های فیلتر شده ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵٪ w/v سیلیکون اضافه گردید سپس سوسپانسیون 10^7 از جدایه‌های مخمر تهیه و ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون هر آنتاگونیست به لوله‌ها اضافه گردید. در ادامه هر یک از لوله‌ها روی شیکر دورانی ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق (شرایط آزمایشگاه) نگه داری شدند و در زمان‌های ۱۵ و ۳۰ ساعت بعد از شروع آزمایش به ترتیب از هر کدام از ویال‌ها نمونه‌های ۱۰۰۰ µl از محیط برداشته و برای بدست آوردن جمعیت مخمر نمونه‌های مذکور با انجام سری رقت سازی در غلظت‌های 10^3، 10^4 و 10^5 روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) برای رشد پرگنه مخمر ریخته شدند. پرگنه‌ها نیز با استفاده از دستگاه پرگنه شمار، شمارش شدند. آزمایش در قالب فاکتوریل در پایه طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور A و B در ۳ تکرار صورت گرفت. فاکتور A دارای ۳ سطح (زمان نمونه برداری) و فاکتور B دارای ۶ سطح (جمعیت مخمرهای آنتاگونیست در حالت مخلوط با سیلیکون یا انفرادی) بود.

بررسی اثر جدایه‌های مخمر و مخلوط آنها با سیلیکون در کنترل بیماری کپک خاکستری سیب در شرایط انبار

در این آزمایش سیب‌های گلدن دلیشز به منظور ضد عفونی ابتدا به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم۰/۱ درصد غوطه ور شده و سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. در ادامه سوراخ‌هایی به عمق ۳ و قطر ۲/۵ میلی متر در اطراف دم سیب با استفاده از یک میخ سترون ایجاد شد، سپس سوسپانسیون 10^7 سلول در میلی لیتر مخمر تهیه و در هر زخم ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون انفرادی آنتاگونیست‌ها، سیلیکون فیلتر شده (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ ٪ v/w) و نسبت‌های مساوی۵۰:۵۰ مخلوط آنها اضافه شد (در تیمار شاهد آلوده به بیمارگر و شاهد سالم از آب مقطر سترون به جای سوسپانسیون آنتاگونیستها یا سیلیکون استفاده شد). در ادامه غلظت 10^5کنیدی در میلی لیتر قارچ عامل بیماری تهیه و بعد از ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون عامل بیماری به هر زخم اضافه شد. در این مرحله نیز زخم‌های مایه زنی نشده با بیمارگر، با آب مقطر استریل تیمار شدند اما بدلیل اینکه قطر لکه در آنها صفر بود این تیمارها در تمام آزمایشات صورت گرفته این پژوهش در آنالیز منظور نشدند. (سپس میوه‌ها در ظروف پلاستیکی با پوشش منتقل و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. لازم به ذکر است که در طول این مدت داخل ظروف مرطوب می‌شد. در این آزمایش برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار معادل یک سیب بود و هم‌چنین هر سیب دارای سه محل زخم شده بود، که قطر زخم‌هایی که دارای علایم آلودگی به کپک خاکستری بودند در روز پانزدهم بعد از مایه کوبی قارچ عامل بیماری با استفاده از کولیس اندازه گیری شدند. این آزمون به صورت فاکتوریل و با دو فاکتور در پایه کاملا تصادفی انجام شد. فاکتور A شامل غلظت‌های سیلیکون در چهار سطح: شاهد بدون سیلیکون، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ ٪ v/w سیلیکون و فاکتور B شامل مخمر آنتاگونیست در سه سطح شامل: شاهد بدون مخمر، جدایه‌های مخمری A5 و A6 بود. قارچ عامل بیماری شامل تیمارهای بدون قارچ بود که به دلیل تکرار در تمام تیمارها در نظر گرفته نشد. هم‌چنین این آزمون با تیمارها و طرح آزمایشی مشابه در دمای ۴ درجه سانتی گراد

به صورت مجزا نیز انجام گرفت، با این تفاوت که قطر لکه‌ها در روز سی ام بعد از مایه زنی بیمارگر اندازه گرفته شدند (Etebarian *et al*., 2005).

بررسی تغییرات جمعیت مخمرهای آنتاگونیست در حالت کاربرد انفرادی و مخلوط با سیلیکون در شرایط انبار

تغییرات جمعیت مخمرهای آنتاگونیست *C. membranifaciens* (A5) و *P. guilliermondii* (A6) در حالت انفرادی و مخلوط با غلظت ۰/۲ درصد سیلیکون در زخم‌های سیب در روزهای ۰، ۱۵ و ۳۰ بعد از مایه زنی بیمارگر مورد محاسبه قرار گرفت. ابتدا مطابق آزمایش قبل میوه‌های سیب استریل و با مخمر و سیلیکون به صورت انفرادی و مخلوط تیمار شدند و بعد از نگهداری در رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۴ درجه سانتی گراد، در زمان های مذکور یگ گرم از بافت سیب در محل زخم برداشته و توسط هاون در ده میلی لیترآب مقطر استریل له شد و با انتقال به لوله‌های حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل به مدت یک دقیقه ورتکس گردید سپس برای بدست آوردن جمعیت مخمر نمونه‌های برداشته شده مذکور سری رقت سازی انجام گرفت و ۱۰۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف در روی محیط‌های PDA معمولی ریخته شد و در نهایت پرگنه مخمرها بعد از ۳ روز با استفاده از دستگاه پرگنه شمار شمارش شدند.

بررسی تغییرات کمی برخی ترکیبات دفاعی در میوه سیب

به منظور بررسی بیش‌تر مکانیسم‌های کنترل بیماری کپک خاکستری سیب توسط مخلوط جدایه مخمر A5 *C. membranifuciens* و سیلیکون ۰/۲ ٪، میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز و کاتالاز و مقدار فنل کل میوه سیب مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا میوه‌های سیب همانطور که در آزمایش قبل شرح داده شد، ضد عفونی و سپس مایه زنی شدند. سپس میوه‌ها در ظروف پلاستیکی قرار داده و سطح آنها با کیسه پلاستیکی پوشانده شد. سیب‌ها به مدت ۱۱ روز در ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در طی این مدت مرتب درون کیسه‌ها مرطوب نگه داشته می‌شد. میزان تغییرات آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و نیز میزان فنل کل به ترتیب در روزهای ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از مایه زنی بیمارگر اندازه‌گیری شد. تیمارهای این آزمایش شامل: میوه‌های تیمار شده با جدایه مخمر A5، سیلیکون با غلظت ۰/۲٪ و مخلوط سیلیکون ۰/۲٪ + مخمر، میوه‌های مایه زنی شده یا مخلوط آنتاگونیست با سیلیکون ۰/۲٪ به همراه قارچ عامل بیماری، سیب‌هایی آلوده که فقط زادمایه قارچ عامل بیماری را دریافت کرده بودند (شاهد آلوده) و سیب‌های شاهد سالم را شامل می‌شد. این آزمایش به صورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و B در قالب طرح کاملا تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت. فاکتور A دارای ۸ سطح (شامل تیمارهای ذکر شده) و فاکتور B نیز دارای چهار سطح (چهار زمان نمونه برداری یعنی ۲، ۴، ۶ و ۸ روز بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری) بود.

تهیه عصاره و ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش *گنگ و همکاران* (Gong *et al*., 2001) استفاده شد. ابتدا یک گرم از بافت میوه را داخل هاون قرار داده و با سه میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵مولار با PH برابر ۷ کاملا مخلوط شد. پس از به دست آمدن یک مخلوط هموژن، ۱/۵میلی لیتر از مخلوط حاصل بلافاصله به داخل ویال‌های ۲ میلی لیتری منتقل و در دستگاه سانتریفیوژ در g۱۴۰۰ به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول بالایی حاصل برای اندازه گیری فعالیت آنزیم در فریزر در۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور ارزیابی فعالیت پراکسیداز به یک میلی-لیتر از عصاره تهیه شده، ۱۳/۵میلی لیتر بافر EMS با pH برابر ۵/۵، یک میلی لیتر فنیل دی آمین اضافه شد و قبل از اندازه-گیری تغییرات جذب، ۲۴ میکرولیتر پراکسید هیدروژن به مخلوط واکنش اضافه گردید. سپس مقدار جذب پس از افزودن پراکسید هیدروژن و اختلاط سریع در ۴۸۵ نانومتر با فواصل ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه در دمای اتاق اندازه گیری شد. تغییرات جذب در دقیقه در میلی گرم پروتئین به عنوان واحد فعالیت پراکسیداز در نظر گرفته شد.

تهیه عصاره آنزیمی و بررسی میزان فعالیت آنزیمی کاتالاز

ابتدا مقدار یک گرم از بافت میوه سیب در سه میلی لیتر بافر تریس- کلرید هیدروژن،۵۰ میلی مولار با PH برابر با ۸/۵ که حاوی ۲میلی مولار EDTA و۱۰درصد پلی وینیل پیرولیدون بود، عصاره گیری شد. پس از عصاره گیری کامل، محلول حاصل به لوله‌های مخروطی شکل منتقل و توسط سانتریفیوژ g۱۴۰۰۰ دور به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در داخل

یخچال سانتیرفیوژ شد (Gong *et al*., 2001). مقدار پروتئین تام طبق مطابق روش *برادفورد* تعیین شد (Bradford, 1967). فعالیت آنزیم کاتالاز نیز بر اساس میلی مولار پراکسیداز هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین، اقتباس شده از روش *دو و برام‌لاگ* ارزیابی گردید (Du and Bramlage, 1995).

استخراج، تهیه منحنی استاندارد و اندازه گیری مقدار کل مواد فنلی

جهت استخراج ترکیبات فنلی، یک گرم از بافت سیب در محل زخم جدا و ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید، سپس بافت میوه درون هاون چینی عصاره گیری شد. در نهایت عصاره حاصل در ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی داخل لوله‌ها، حاوی ترکیبات فنلی است و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در ادامه و به منظور تهیه محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد ۱۰ میلی گرم از اسید کافئیک در ۵ میلی لیتر متانول خالص شده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ ، ۵، ۶ و ۸ میلی لیتر از این محلول جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. به این ترتیب هر ۰/۵ میلی لیتر از محلول در هر یک از لوله‌ها به ترتیب ۵ ، ۱۰ ،۲۰ ، ۳۰ ، ۴۰ ، ۵۰ ، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم اسید کافئیک داشت. به منظور تعیین فنل کل، عصاره بدست آمده در آزمایش همانند روش تهیه منحنی استاندارد عمل شد، تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی-لیتر فنل استخراج شده گیاه استفاده گردید (Etebarian, 1988).

محاسبات آماری

به منظور تجزیه تحلیل آماری اعداد برای پارامترهای مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی واریانس از نرم افزار SAS 9.0 استفاده گردید. و میانگین‌ها با روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. داده‌ها قبل از آنالیز واریانس با فرمول‌های (Y = Ln (X)، Y= Log (X) و $Y=\sqrt{x}$) نرمال شدند (Little and Hills, 1978).

نتایج

اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون روی جوانه زنی اسپور بیمارگر

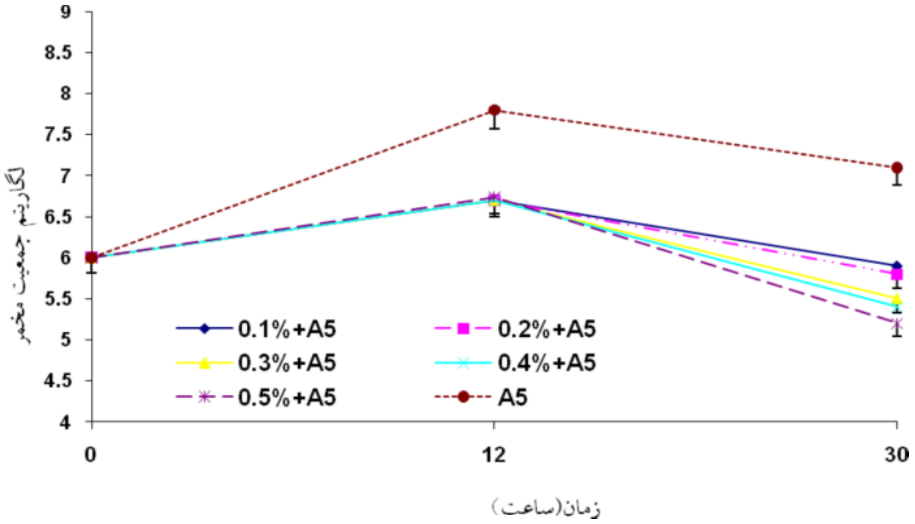
نتایج آزمایش نشان داد که تیمارهای امتحان شده جوانه زنی اسپور قارچ عامل بیماری را به طور متفاوتی کاهش می-دهند ($P\leq0.01$). میزان جوانه زنی اسپور بیمارگر در محیط کشت حاوی غلظت ۰/۱ ٪ سیلیکون بیش‌ترین میزان بود که با میزان جوانه زنی در غلظت ۰/۲٪ در یک سطح از نظرآماری قرار داشت. هم‌چنین نتایج نشان داد غلظت‌های ۰/۸، ۱ و ۲ درصد در یک سطح از نظر آماری کمترین جوانه زنی اسپور بیمارگر را سبب شدند (جدول ۱).

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون (w/v ٪ ۰/۱ , ۰/۲ , ۰/۴ , ۰/۶ , ۰/۸ , ۱ , ۲) در میزان جوانه زنی اسپور *B.cinerea* در محیط PDB در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد. هر تیمار دارای چهار تکرار بوده و تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند ($P\leq0.05$).

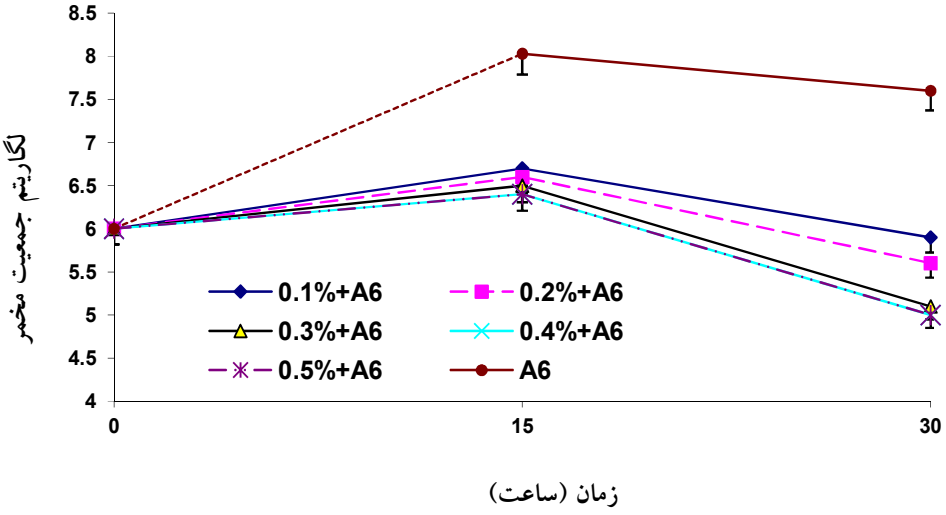
تیمارها	درصد اسپور جوانه زده
2 %+P	c ۶/۶۶
1 %+P	c ۵/۳۳
0.8 %+P	c ۷/۳۳
0.6 %+P	b ۱۹
0.4 %+P	b ۲۲/۳۳
0.2 %+P	ab ۴۱
0.1 %+P	a ۶۰

بررسی جمعیت جدایه‌های مخمر در حضور غلظت‌های سیلیکون محیط کشت مایع

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که در مورد تاثیر غلظت‌های گوناگون سیلیکون روی میـزان رشـد هـر دو جدایـه مخمـر *Candida membranifuciens* (A5) و *Pichia guilliermondii* (A6) بین تیمارها اختلاف معنی دار وجود دارد، اما بین زمان ها و نیز اثر متقابل آنها اختلاف معنی دار وجود ندارد ($P\leq0.01$). از طرفی همان طور که از شکل ۱ نیز استنباط می‌شـود، در ایـن آزمایش جمعیت جدایه مخمری A5 در حضور غلظت‌های مختلف سیلیکون ابتدا افزایش یافته سـپس تـا انتهـای آزمـایش بـه شدت در قیاس با کاربرد انفرادی آنتاگونیست کاهش می‌یابد. نتایج آزمایش اثر غلظت‌های مختلف سـیلیکون بـر روی جمعیـت مخمر *Pichia guilliermondii* (A6) نیز نشان داد جدایه مخمر مانند فوق به شدت تحت تاثیر غلظـت‌هـای مختلـف سـیلیکون می‌باشد (شکل ۱ الف و ب).



(الف)



(ب)

شکل۱- جمعیت مخمرهای A5 (الف) و A6 (ب) در حالت انفرادی و مخلوط با غلظت‌های مختلف سیلیکون (w/v ٪ ۰/۱ , ۰/۲ , ۰/۳ , ۰/۴ , ۰/۵) در محیط کشت مایع. اعداد مربوط به نمودار میانگین سه تکرار می باشد.

بررسی اثر جدایه‌های مخمر و مخلوط آنها با سیلیکون در کنترل کپک خاکستری سیب در شرایط انبار

نتایج کاربرد آنتاگونیست‌ها و مخلوط آنها با سیلیکون در غلظت ۰/۲ درصد در شرایط انبار نشان داد بین تیمارها و روزهای اندازه گیری قطر لکه و اثر متقابل آنها تفاوت معنی دار ($P\leq0.01$) وجود دارد. نتایج هم‌چنین نشان می‌دهد در دمای ۴ درجه سانتی گراد مخلوط A5+ سیلیکون ۰/۲ درصد و A6+ سیلیکون ۰/۲ درصد در روزسی ام بعد از مایه زنی بیمارگر به ترتیب با قطر لکه‌ای معادل ۸۷/ ۳و ۴۸ /۳ میلی متر بیش‌ترین میزان کنترل فساد ایجاد شده توسط بیمارگر را سبب می‌شوند، که در مقایسه با کاربرد مخمرها به صورت انفرادی کنترل بهتری ایجاد کردند. کمترین میزان کنترل پوسیدگی در این دما مربوط به استفاده از سیلیکون به صورت انفرادی بود که کنترلی محسوسی را سبب نشد و با شاهد تفاوت معنا داری نداشت. نتایج در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نیز نشان داد تیمار A5+ سیلیکون ۰/۲ درصد در روز پانزدهم بیش‌ترین میزان کنترل را با قطر لکه‌ای برابر با ۵/۲۳ میلی متر را ایجاد کرده است که با دیگر تیمارها بجزء تیمار A5+ سیلیکون ۰/۱ درصد و A6+ سیلیکون ۰/۳درصد در روز پانزدهم از نظر آماری در یک سطح قرار داشت (جدول ۲).

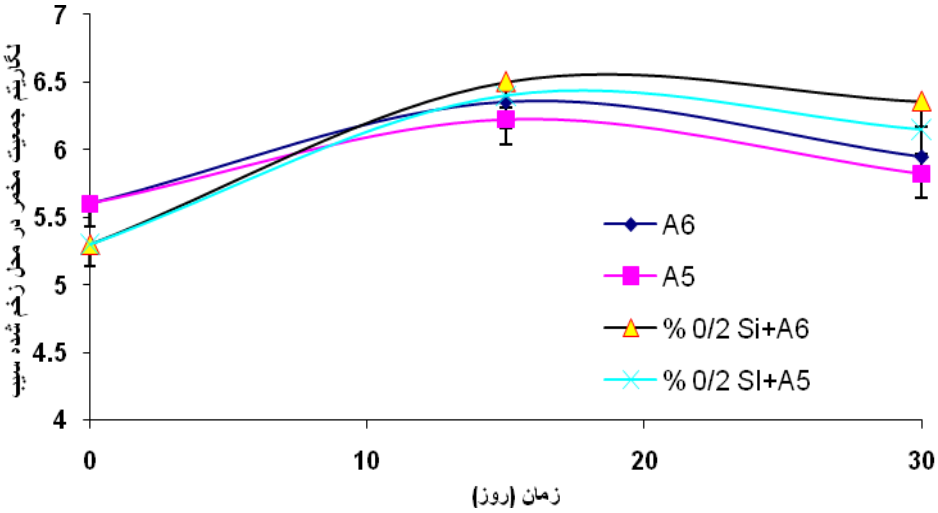
جدول ۲- اثر جدایه‌های مخمر و مخلوط آنها با غلظت‌های مختلف (۰/۱ ,۰/۲ , ۰/۳ ٪ W/V) در کنترل *B.cinerea* روی میوه سیب پس از ۳۰ و ۱۵ روز به ترتیب در دمای۴ و ۲۰ درجه سانتی گراد.

تیمارها	قطر لکه (mm) در دمای ۴ درجه	قطر لکه (mm) در دمای۲۰درجه
0.1%Si	a ۳۴/۸۳	b۱۵/۲۲
0.2%Si	a ۳۳/۲۹	b۱۵/۰۵
0.3%Si	a ۳۴/۶۷	a۲۸/۶۹
A5	b۱۱ /۶۷	bc۱۳/۵۷
A6	b ۱۶/۰۱	dbc۱۲/۹۹
0.1% Si+A5	b ۱۲/۴۶	b۱۶/۳۳
0.2%Si+A5	d ۳/۸۷	e ۵/۲۳
0.3%Si+A5	b ۱۴/۳۶	dbec۱۱/۶۶
0.1%Si+A6	b ۱۱/۰۸	dec۸/۲۲
0.2%Si+A6	d ۳/۴۸	de۷/۴۳
0.3%Si+A6	dc ۵/۱۶	b۱۶/۷۴
Control	a ۳۵/۰۱	a۳۷/۲۸

هر تیمار دارای چهار تکرار بوده و تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند ($P\leq0.05$). قطر لکهٔ آلوده میلی متر (mm) می‌باشد. جدایه A5 گونه *C.membranifaciens* و جدایه A6 گونه *P.guilliermondii* می باشند.

بررسی تغییرات جمعیت مخمرهای آنتاگونیست در حالت کاربرد انفرادی و مخلوط با سیلیکون در دمای $4^{\circ}C$

نتایج بررسی جمعیت مخمر بر روی میوه سیب نشان داد که رشد مخمرها در حالت انفرادی متفاوت از مخلوط آنها با سیلیکون با غلظت ۰/۲ درصد می‌باشد. در مورد مخمر *C. membranifuciens* (A5) با غلظت اولیه ۴×۱۰^{۵} در روز پانزدهم بعد از مایه زنی در دمای ۴ درجه سانتی گراد به غلظت $۲/۵\times۱۰^{۶}$ و تا روز سی ام $۱/۱\times۱۰^{۶}$ می‌رسد. در خصوص مخلوط انتاگونیست مذکور با سیلیکون نیز مشاهده می‌شود که آنتاگونیست به بالاترین جمعیت خود در حضور سیلیکون در روز پانزدهم (۴×۱۰^{۶}) می‌رسند در صورتی که جمعیت مخمر در حالت کاربرد انفرادی از این میزان کمتر بود. در خصوص جدایه *P. guilliermondii* A6 نیز در روز پانزدهم بعد از مایه زنی مشاهده می‌شود که آنتاگونیست به بالاترین جمعیت خود در حالت مخلوط با سیلیکون می‌رسد ($۲/۵\times۱۰^{۶}$) در صورتی که جمعیت مخمر در حالت کاربرد انفرادی معادل $۱/۶۸\times۱۰^{۶}$، و از این میزان کمتر است (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی تغییرات جمعیت جدایه مخمر آنتاگونیستی A5 *C . membranifaciens* و جدایه A6 *P.guilliermondii* در حالت کاربرد انفرادی و مخلوط با غلظت ۰/۲ درصد سیلیکون در شرایط انبار. اعداد مربوط به میانگین سه تکرار می‌باشند.

بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز

نتایج آزمایش نشان داد که در مورد تاثیر کاربرد انفرادی و مخلوط آنتاگونیست A5 *C. membranifaciens* و سیلیکون با غلظت ۰/۲ درصد روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه سیب بین تیمارها و روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی دار ($P\leq0.01$) وجود دارد. مقایسه میانگین تیمارها در هر روز نشان داد: در روز دوم سیب‌های آلوده تیمار شده با مخلوط مخمر A5 *C.membranifaciens* به همراه غلظت ۰/۲ درصد سیلیکون از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با دیگر تیمارها اختلاف معنی داری نشان داد. سیب‌های تیمار شده با این مخلوط در روز چهارم با شاهد آلوده در یک سطح آماری قرار گرفته ولی همچنان نسبت به دیگر تیمارها در سطح بالاتری قرار گرفت. در روز ششم و هشتم بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در سیب‌های آلوده شاهد دیده شد. در بین روزهایی که نمونه برداری صورت گرفت حداکثر میزان فعالیت آنزیم در سیب‌های آلوده تیمار شده با مخلوط آنتاگونیست A5 *C.membranifaciens* و سیلیکون ۰/۲ درصد در روز دوم بعد از مایه زنی عامل بیماری مشاهده شد. فعالیت آنزیم در سیب‌های تیمار شده با تیمار فوق در روز چهارم کاهش معنی داری نسبت به روز دوم داشته و تا روز ششم دارای روند کاهشی داشت، اما در روز هشتم مجدد کمی افزایش پیدا کرد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در شاهد آلوده در روزهایی که نمونه برداری صورت گرفت در روزهای چهارم بعد از مایه زنی دیده شده و در روزهای ششم و هشتم کاهش یافته ولی این کاهش بین این دو روز معنی دار نبود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر قارچ عامل بیماری کپک خاکستری، غلظت ۰/۲ درصد سیلیکون، مخمر*Candida membranifaciens* A5 و مخلوط آنها روی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه سیب. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه در میلی گرم پروتئین تام نشان داده شده است.

تیمارها	روزهای بعد از نمونه برداری			
	۲	۴	۶	۸
S	a ۰/۳۳۲F	b ۰/۳۵۷F	b ۰/۳۷E	ab ۰/۳۴۷E
S+P	d ۰/۳۸۷E	b ۰/۵۴۲D	a ۰/۶۰۲B	c ۰/۵۰۲D
Y	a ۰/۵۵۵D	b ۰/۴۵۲E	c ۰/۳۳۲F	d۰/۳۰۷F
Y+P	a ۰/۷B	a ۰/۶۸۳B	b ۰/۵۷۷C	b ۰/۵۶C
Y+S	a ۰/۶۵۲C	b ۰/۶۱۵C	c ۰/۵۴۲D	d ۰/۴۸۲D
Y+S+P	a ۰/۹۴A	b۰/۷۲۲A	c ۰/۵۴۴D	d ۰/۶۳۵B
P	c ۰/۳۹E	a ۰/۷۱۵A	b ۰/۶۷۵A	b ۰/۶۶۵A
Control	a ۰/۳۱۵F	a ۰/۳۲۲G	b ۰/۲۸۱G	a ۰/۳۰۷F

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: آب مقطر استریل، P: *B.cinerea*، Y: *C.membranifaciens*، S : Si 0/2%، Y+P: مخمر *B,cinerea* +*C.membranifaciens* ، S+P: *B.cinerea*+ Si 0/2 %، Y+S: مخمر *C.membranifaciens* A5 + : Si 0/2% Y+B+P: مخمر *C.membranifaciens* A5 + *B.cinerea* + Si 0/2 % باشند.

بررسی میزان تغییرات آنزیم کاتالاز

نتایج آزمایش نشان داد که در مورد تاثیر کاربرد انفرادی و مخلوط آنتاگونیست *C. membranifaciens* A5 و سیلیکون با غلظت ۰/۲ درصد روی میزان فعالیت کاتالاز در میوه سیب بین تیمارها و روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی-دار ($P\leq0.01$) وجود داشت. از مقایسه میانگین تیمارها در هر روز استنباط می‌گردد که در روز دوم سیب‌های آلوده تیمار شده با مخلوط سیلیکون و مخمر *C. membranifaciens* A5 از نظر میزان فعالیت آنزیم نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد در این روز تیمار فوق با سایر تیمارها بغیر از شاهد سالم و سیب‌های سالم تیمار شده با سیلیکون در یک سطح قرار داشتند. سیب‌های تیمار شده با این مخلوط در روز چهارم با شاهدآلوده در یک سطح آماری قرار گرفته ولی همچنان نسبت به دیگر تیمارها در سطح بالاتری قرار گرفت. در روز ششم میان تیمارها هیچ گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در روز هشتم بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به سیب‌های سالم تیمار شده با مخلوط آنتاگونیست و سیلیکون مشاهده گردید، هم‌چنین کمترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به سیب‌های شاهد آلوده به قارچ *B. cinerea* مشاهده گردید. در بین روزهایی که نمونه-برداری صورت گرفته است در روز دوم حداکثر میزان فعالیت آنزیم در سیب‌های آلوده تیمار شده با مخلوط آنتاگونیست و سیلیکون مشاهده شد. فعالیت آنزیم در سیب‌های تیمار شده با تیمار فوق در روز چهارم کاهش معنی‌داری نسبت به روز قبل داشته و تا روز ششم و هشتم دارای روند کاهشی می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم در سیب‌های شاهد آلوده نیز در سه روز اول تفاوت معنی داری نداشتند تا در روز هشتم یک کاهش معنی داری مشاهده می‌شود (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر قارچ عامل بیماری کپک خاکستری، غلظت ۰/۲ درصد سیلیکون، مخمرA5 *membranifaciens* .C و مخلوط آنها روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه سیب. فعالیت آنزیم به صورت میلی مول H_2O_2 در دقیقه در میلی گرم پروتئین تام (mM H2O2/min/mg Protein) نشان داده شده است.

تیمارها	روزهای بعد از نمونه برداری			
	۲	۴	۶	۸
S	a۲/۷۶B	b ۰/۸۲C	b ۱/۰۴A	b ۱/۲۴AB
S+P	a ۳/۹۱A	b ۱/۷۱C	b ۲/۰۵A	b ۱/۵۸AB
Y	a۴/۳۲A	b ۲/۰۴C	b ۱/۵۶A	b ۱/۸۰AB
Y+P	a ۴/۵۱A	b ۱/۷۱C	b ۱/۵۲A	b ۱/۳۹AB
Y+S	a۴/۴۲A	b۱/۷۱C	b۱/۹۳A	b ۲/۲۶A
Y+S+P	a ۴/۵۲A	b ۳/۲۹A	c ۲/۳۲A	d ۰/۸۴AB
P	a۳/۶۶AB	a ۳/۰۶AB	ab ۲/۳۲A	b ۰/۶۲B
Control	a۰/۸۱C	a ۱/۱۹C	a۱/۳۳A	a ۱/۱۰AB

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: آب مقطر استریل، P: *B.cinerea*، Y: *C.membranifaciens*، Si 0/2% : S، Y+P: مخمر *B,cinerea +C.membranifaciens* ، S+P :*B.cinerea*+ Si 0/2 %، Y+S: مخمر Y+B+P Si 0/2%: + *C .membranifaciens* A5 :مخمر *C.membranifaciens* A5 + Si 0/2 %: + *B.cinerea* باشند.

بررسی میزان تغییرات فنل کل

نتایج این آزمایش نشان داد که در مورد تاثیر کاربرد انفرادی و مخلوط آنتاگونیست‌های *C. membranifaciens* A5 و سیلیکون روی میزان فنل در میوه سیب بین تیمارها، روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌دار ($P\leq0.01$) وجود داشت. مقایسه میانگین تیمارها در هر روز نشان داد در روز دوم میزان فنل کل در سیب‌های آلوده تیمار شده با مخلوط آنتاگونیست‌های *C.membranifaciens* A5 + سیلیکون ۰/۲درصد و نیز سیب‌های سالم تیمار شده با مخلوط‌های ذکر شده نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان دادند. در روز چهارم میزان فنل کل در سیب‌های آلوده تیمار شده با مخلوط آنتاگونیست با سیلیکون نسبت به دیگر تیمارها بیش‌تر بود و در این روز به بیش‌ترین حد خود رسیده است. این روند در روز-های ششم و هشتم نیز وجود داشت، با این تفاوت که در روز چهارم با سیب سالم تیمار شده با مخلوط فوق و در روز هشتم با سیب‌های شاهد آلوده و نیز سیب‌های آلوده تیمار شده با آنتاگونیست مخمری در یک سطح آماری قرار داشت. مقایسه میانگین داده‌ها در بین روزهای نمونه برداری نیز نشان داد که تفاوت میزان فنل کل سیب‌های تیمار شده با مخلوط مخمر *C.membranifaciens* A5 و سیلیکون دو درصد و مایه کوبی شده با قارچ عامل بیماری از روز چهارم معنی دار شده و به حداکثر رسیده و از نظر آماری با روز ششم در یک سطح معنی دار قرار می‌گیرد، تا این که در روز هشتم کاهش می‌یابد (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین تاثیر قارچ عامل بیماری کپک خاکستری، غلظت ۰/۲ درصد سیلیکون، مخمر *C. membranifaciens* A5 و مخلوط آنها روی میزان فنل کل (میلی گرم در یک گرم بافت میوه) در میوه سیب.

تیمارها	روزهای بعد از نمونه برداری			
	۲	۴	۶	۸
S	c ۰/۴۵۷D	a ۰/۶۵D	b ۰/۵۵D	b ۰/۵۵۶D
S+P	b ۰/۴۱۷D	a۰/۵۳۲E	a۰/۵۲۵D	a۰/۵۲۷D
Y	b ۰/۵۹۵B	a۰/۷۴۷BC	a ۰/۷BC	a ۰/۶۹۸B
Y+P	b ۰/۶۲۵B	a ۰/۷۸B	a ۰/۷۲۲BC	a ۰/۷۶۸A
Y+S	cb ۰/۶۹۴A	a ۰/۸۰۷AB	ab ۰/۷۴۵B	c ۰/۶۳۲C
Y+S+P	c ۰/۶۹۷A	a ۰/۸۵۲A	a ۰/۸۳A	b ۰/۷۶۲AB
P	b ۰/۶۲۹B	ab۰/۶۹۱CD	b ۰/۶۵۹C	a ۰/۷۵AB
Control	a ۰/۵۳۰C	a ۰/۵۷۷E	a ۰/۵۵۷D	a ۰/۵۴۶D

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 شده اند. تفاوت‌ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده اند. Control: آب مقطر استریل، P: *B.cinerea*، Y: *C.membranifaciens*، S : Si 0/2%، Y+P: مخمر *B,cinerea* +*C.membranifaciens* ، S+P : Si 0/2 %+ *B.cinerea*، Y+S: مخمر *C .membranifaciens* A5 + Si 0/2 %: + *B.cinerea*، Y+B+P Si 0/2%: مخمر *C.membranifaciens* A5 + Si 0/2 %: + *B.cinerea* باشند.

بحث

نتایج پژوهش صورت گرفته در گذشته نشان داد مخلوط مخمرهای آنتاگونیست با یکدیگر سبب بهبود کنترل بیولوژیک بیماری کپک خاکستری سیب در مقایسه با کاربرد انفرادی انتاگونیست‌ها می‌گردد (زنگویی و همکاران، ۱۳۸۹). در این پژوهش نیز اثر مخلوط مخمرهای مذکور با سیلیکون مورد بررسی قرار گرفت. مطابق نتایج در شرایط آزمایشگاه غلظت‌های مختلف سیلیکون بر روی جوانه زنی اسپور قارچ عامل بیماری در محیط کشت PDB موثر می‌باشند. این نتیجه مطابق با یافته‌های *لی و همکاران* (Li *et al*., 2009) می‌باشد که نشان دادند سیلیکون در غلظت ۲۰۰ml/mol مانع جوانه زنی اسپور و رشد هیف قارچ *Fusarium sulphureum* می‌گردد. در یک پژوهش با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید جوانه زنی اسپور قارچ *Pencillum expansum* در حضور غلظت‌های مختلف سیلیکون به شدت کاهش می‌یابد (Qin and Tian. 2005). نتایج آزمایش اثر غلظت‌های مختلف سیلیکون بر روی مخمرها در پژوهش حاضر نیز نشان داد، سیلیکون دارای اثر کشنده بر روی مخمرهای انتاگونیست در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. نتایج بررسی‌های دیگر نشان دادند سیلیکون در شرایط آزمایشگاه دارای اثر کشنده بر روی *Trichothecium roseum* می‌باشد (Guo *et al*., 2007). در صورتی است که نتایج آزمایشات مخلوط مخمرهای انتاگونیست با سیلیکون در شرایط انبار نشان داد مخلوط غلظت‌های مختلف سیلیکون به همراه مخمرهای آنتاگونیست سبب بهبود کنترل بیمارگر در مقایسه با کاربرد انفرادی این مخمرها یا سیلیکون می‌گردد. تفاوت اثر در شرایط آزمایشگاه و انبار در پژوهش دیگری با استفاده از مخلوط مخمرهای انتاگونیست به همراه D deoxy – D glucose نیز مشاهده شده است (El-Ghaouth *et al*. 2000). هم‌چنین در پژوهش‌های گذشته تاکید شده است که نتایج بدست آمده در شرایط کنترل شده آزمایشگاه همیشه در شرایط انبار (طبیعی) اتفاق نمی‌افتد (Rotem *et al*., 1978). بررسی جمعیت مخمرهای آنتاگونیست و مخلوط آنها با سیلیکون در روی میوه سیب در این پژوهش نیز این نتایج را تائید می‌کند که در محیط سیب و در حضور سیلیکون مخمرهای آنتاگونیست دارای رشد بیش‌تری می‌باشند. *واینتریخت و همکاران* (Wainwright *et al*.,1997) نشان دادند که محیط های غنی و در حضور سیلیکون سبب رشد بیش‌تر قارچها می‌گردند. *تیان و همکاران* (Tian *et al*., 2005) نیز نشان دادند سیلیکون در مخلوط با مخمرهای آنتاگونیست دارای اثر سوء بر روی جمعیت مخمرها در مرحله بعد از برداشت نیست و مخمرها در این حالت در سطح میوه به سرعت رشد می‌کنند. در بسیاری از پژوهش‌ها ثابت شده است که مکانیسم اصلی کنترل مخمرها رقابت بر سر فضا و مواد غذایی می‌باشد (Lima *et al*.,1998)، نتایج پژوهش‌های مشابه نیز بیان می‌کنند

که مخمرها در محیط غنی میوه سیب و در حضور سیلیکون رشد کرده و با اشغال فضا و مصرف مواد غذایی سبب حذف مستقیم بیمارگر شده و نهایتا شرایط را برای رشد بیش‌تر خود فراهم می‌کنند. علاوه بر آن با توجه به تاثیر آنتاگونیست‌ها در القای فاکتورهای دفاعی گیاه به نظر می‌رسد که روش کنترل آنها علاوه بر مورد ذکر شده، القای واکنش‌های دفاعی گیاه نیز می‌باشد (Agrios, 1988). چنین پیش زمینه‌ای موجب شد که میزان ترکیبات دفاعی گیاه و نقش آنها در بهبود بیوکنترل مخلوط مخمر و سیلیکون در این پژوهش مورد بررسی قرار گیرد. نتایج آزمایشات مربوط به فعالیت پراکسیداز در روز دوم در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست مخمری و سیلیکون به صورت انفرادی بیان کننده افزایش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به سیب‌های شاهد سالم بود. بررسی‌های بیش‌تر نشان می‌دهند آنتاگونیست‌ها یک محرک در القا و سنتز آنزیم پراکسیداز می‌باشند که سبب سوبرینی کردن و لیگنینی شدن سلول‌ها در بافت میوه علیه قارچ عامل بیماری می‌شود. در تحقیقات نشان داده شده است که میزان آنزیم‌های پراکسیداز وکیتیناز در اثر القاء با مخمر در گیاه افزایش می‌یابد (El Ghaouth *et al*., 2003). تیمار میوه گریپ فرویت با مخمر *Candida oleophia* بر علیه عامل کپک آبی *P.expansum* نیز سبب القا مقاومت گردید (Droby *et al*., 2002). علاوه بر آن در یک بررسی ثابت شده است کاربرد سیلیکون در محل زخم شده میوه گیلاس سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌گردد (Guo and Tian., 2005). هم‌چنین نتایج آزمایش این پژوهش نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در میوه‌های سیب آلوده تیمار شده با مخمر و سیلیکون به صورت مخلوط در روز دوم می‌باشد، که این نتایج منطبق با نتایج *تینگ و زهنگ* (Ting and Zheng, 2006) است که در تحقیقی نشان دادند ترکیب مخمر *Cryptococcus laurentii* بهمراه سالسیلک اسید فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در میوه بواسطه اثر سینرژیسم مخمر و سالسیلیک اسید در کنار یکدیگر افزایش چشمگیری در مقایسه با کاربرد انفرادی آنتاگونیست یا سالسیلیک اسید می‌یابد. در روز چهارم آزمایش نیز کاهش در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده می‌گردد و علاوه بر آن سیب‌های آلوده تیمار شده با مخلوط آنتاگونیست بهمراه سیلیکون با شاهد آلوده در یک سطح قرار داشتند که این نتایج نیز منطبق با تحقیقات *وانگ و همکاران* می باشد که نشان دادند قارچ بیماری زای *Penicillium expansum* عامل کپک آبی در میوه‌های هلو سبب افزایش قابل ملاحظه فعالیت پراکسیداز می‌گردد (Wang *et al*. 2004). در بسیاری از مطالعات بیان شده است که گونه‌های اکسیژن‌های فعال (Active Oxigen Species) یک محصول طبیعی در تقابل (Interaction) میان گیاه و بیمارگر می‌باشند (Mayer *et al*., 2001)، از سوی دیگر یک سری فرایندهای آنتی اکسیدانی با حضور آنزیم کاتالاز برای کاهش صدمات در سلول گیاهی ایجاد شده اند. مطابق نتایج تحقیقات مختلف تولید اکسیژن‌های فعال به قارچ‌های نکروتروف مانند *Botrytis* به کلونیزاسیون کردن بافت گیاهی کمک می‌کنند (Elad *et al*., 2004). از نتایج آزمایش مربوط به میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در میوۀ سیب مشخص شد که مخلوط مخمر با سیلیکون در روز دوم فعالیت کاتالاز را افزایش داده ولی در روزهای چهارم تا هشتم تا حدودی فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهند ولی به نظر نمی‌آید مانع از کاهش فعالیت آنزیم توسط قارچ عامل بیماری شوند. به دلیل اینکه فعالیت آنزیم کاتالاز توسط قارچ *Botrytis cinerea* در میوه سیب آلوده شده با این بیمارگر فقط در روز دوم افزایش می‌یابد و در طول آزمایش قارچ نیز سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه سیب می‌گردد. این نتایج منطبق با نتایج *چان و تیان* است که گزارش کردند تیمار میوه گیلاس با مخمر *Pichia membranifaciens* فعالیت کاتالاز کاهش می‌یابد (Chan and Tian, 2005). محققین بر این عقیده اند که میوه سیب حاوی انواع زیادی از مشتقات فنولی و فلاونوئیدی می‌باشد و در هنگام القاء مقاومت در بافت سیب مشتقات فنلی در دیواره سلولی ته نشین شده و به عنوان یکی از اولین سدها در دفاع گیاه بر علیه آلودگی عمل نمایند (Podseked *et al*., 2000). از نتایج آزمایش مربوط به میزان ترکیبات فنل در میوۀ سیب مایه زنی شده با مخلوط آنتاگونیست‌ها مقدار مواد فنلی موجود در میوه‌های سیب روز دوم بعد از مایه زنی افزایش یافته و در روز-های متوالی نمونه برداری شده به تدریج افزایش می‌یابد. این نتایج بیانگر این مطلب است که آنتاگونیست‌ها سبب بروز واکنش دفاعی و نهایتا افزایش دادن میزان ترکیبات دفاعی بافت گیاه از جمله فنل کل خواهند شد (Ashraf *et al*,1994). علاوه بر آن پژوهش‌های تکمیلی نشان دادند که کاربرد قبل از برداشت عوامل بیوکنترل نیز ممکن است از طریق افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی و مواد فنلی و نهایتا سبب کنترل آلودگی‌های قبل و بعد از برداشت شوند (Vivekananthan *et al*., 2006). به طور کلی

نتیجه این پژوهش بیان می‌کند که استفاده از آنتاگونیست‌ها به صورت مخلوط با سیلیکون بدلیل القاء بیش‌تر مقاومت در بافت میوه سیب، سبب بهبود کنترل بیولوژیک می‌گردد. هم‌چنین استفاده از انتاگونیست‌ها به صورت مخلوط با اینگونه ترکیبات شیمیایی برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت دستاورد امیدوار کننده ای است که این مواد سطح کنترل قابل ملاحظه ای را نسبت به قارچ کش‌های شیمیایی به وجود آورند.

References

1. Agrios GN .1988. Plant Pathology. 3rd ed. San Diego: Academic Press, Inc. 803 p.
2. Alavifar F. 2007. Study of the possibility of biological control of gray mold on apple by of some yeast [MSc.]. [Tehran]: University of Tehran.
3. Ashraf MY, Azmy AH and Khan SA. 1994. Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chrolophyll content in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Physiologiae Plantarum 16: 185–191.
4. B´elanger RR, Bowen PA, Ehret DL and Menzies JG.1995. Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops. Plant Disease 79: 329–336.
5. B´elanger RR, Benhamou N and Menzies JG. 2003. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Phytopathology 93: 402–412.
6. Biggs AR, El-Kholi MM, El-Neshawy S and Nickerson R .1997. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. Plant Disease 81: 399–403.
7. Bi Y, Tian SP, Guo YR, Ge YH and Qin GZ. 2006. Sodium silicate reduces postharvest decay on Hami melons: Induced resistance and fungistatic effects. Plant Disease 90: 279–283.
8. Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.
9. Chan Z and Tian S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Postharvest Biology and Technology 36: 215–223.
10. Cherif MN, Benhamou JG and Menzies RR. 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* sp. Phytopathology 84:236–242 .
11. Droby ME, Wisniewski L, Cohen B, Weiss D, Touitou Y and Eilam E. 1997. Influence of $CaCl_2$ on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*, Phytopathology 87: 310–315.
12. Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A., Goldschmidt EE and Porat R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Phytopathology 92: 393–399.
13. Du Z and, Bramlage WJ. 1995. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of poststorage disorders.HortScience 30: 205–209.
14. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P and Delen N. 2004. *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. London: Kluwer Academic Publishers. 428 p.
15. El-Ghaouth A, Smilanick JL, Wisniewski M and Wilson CL. 2000. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. Plant Disease 84: 249–253.
16. El-Ghaouth A, Wilson CL and Wisniewski M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. Phytopathology 93: 344–348.
17. Epstein E. 1999. Silicon. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50:641–664.

18. Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC and Sayler RJ. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Microbiology 51: 591–598.
19. Etebarian HR. 1988. Studies on quantitive change in phenolic compound of barly varieties during the development of puccinia hordei and the relationship between these susceptible and brown rust resistance in barley. Iranian Journal of Plant Pathology 24:61–62.
20. Franceschi VR, Krekling AA and Berryman E. 1998. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (*Pinaceae*) are a primary site of defense reactions. American Journal of Botany 85:601–615.
21. Gong Y, Toivonen MA, Lau OL and Wiersma A .2001.Antioxidant system level in Braeburn apple is related to its browning disorder. Botanical Bulletin of Academia Sinica 42: 259–264.
22. Guo Y, Liu L, Zhao J and Bi Y .2007. Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in Chinese cantaloupe (*Cucumis melo* L.). International Journal of Food Science & Technology 42:1012–1018.
23. Janisiewicz WJ. 1988. Biocontrol of post harvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology 78: 194–198.
24. Janisiewicz WJ and Bors B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. Applied and Environmental Microbiology 61:3261–3267.
25. Kanto T, Miyoshi A, Ogawa T, Maekawa Knand Aino M .2004. Suppressive effect of potassium silicate on powder mildew of strawberry in hydroponics. Journal of General Plant Pathology 70:207–211.
26. Little TM and Hills FJ. 1978. Agricultural Experimentation Design and Analysis. New York: John Wiley & Sons, Inc. 479 p.
27. Lima GDE, Curtis F, Castoria RDE and Cicco V. 1998. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology. 8: 257–267.
28. Li YC, Bi Y, Ge YH, Sun XJ and Wang Y .2009. Antifungal activity of sodium silicate on *Fusarium sulphureum* and its effect on dry rot of potato tubers. Journal of Food Science 74:213–218.
29. Mayer AM, Staples RC and Gil-ad NL. 2001. Mechanisms of the reduction of pathogens in hosts expressing the hypersensitive respone. Phytopathology 58: 33–41.
30. Podseked A, Wilska-Jeska J, Anders B and Markowski J. 2000. Compositional characterization of some apple varieties. European Food Research and Technology 210: 268–272.
31. Qin GZ, and Tian SP. 2005. Enhancement of biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* by silicon and the possible mechanisms involved. Phytopathology 95:69–75.
32. Rotem J, Cohen Y and Bashi E. 1978. Host and environmental influences on sporulation in vivo. Annual Review of Phytopathology 16:83–101.
33. Seebold W, Kucharek TA, Datnoff LE, Correa-Victoria FJ, and Marchetti MA. 2001. The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. Phytopathology 91:63–69.
34. Tian SP, Qin GZ and Xu Y .2005. Synergistic effects of combining biocontrol agents with silicon against postharvest diseases of jujube fruit. Journal of Food Protection 68:544–550.
35. Ting YU and Zheng XD. 2006. Salicylic Acid Enhances Biocontrol Efficacy of the Antagonist Cryptococcus laurentii in Apple Fruit. Journal of Plant Growth Regulation 25: 166–174.
36. Vivekananthan R, Ravi M and Ramanathan A. 2006. Pre-harvest application of a new biocontrol formulation induces resistance to post-harvest anthracnose and enhances fruit yield in mango. Phytopathologia Mediterranea 45: 126–138.
37. Wainwright M, Al-Wajeeh K and Grayston SJ .1997.Effect of silicic acid and other silicon compounds on fungal growth in oligotrophic and nutrient-rich media. Mycological Research 101: 933–938.
38. Wang YS, Tian S, Xu Y, Qin GZ and Yao H. 2004. Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated with *Cryptococcus laurenti*i or *Penicillium expansum* at 0 or 20 ˚C. Postharvest Biology and Technology 34: 21–28.

39. Wisniewski M, Biles C, Droby S, McLaughlin, R, Wilson C and Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii*: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology 39: 245–258.
40. Yao H, Tian S and Wang Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. International Journal of Food Microbiology 93:297–304.
41. Zangoei E, Etebarian HR and Sahebani N. 2011. Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. Iranian Journal of Plant protection sience 36: 322–342.