نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ص ۴۲-۳۵

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 1, Spring 2010, p. 35-42

کنترل بیولوژیکی کپک خاکستری و القای پاسخ‌های دفاعی در سیب توسط *Saccharomyces cerevisiae*

فاطمه سادات علوی فرد[۱*] - حسن رضا اعتباریان[۲] - نوازا... صاحبانی[۳] - حشمت ا... امینیان[۴]

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۲
تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۲۲

چکیده

فعالیت بیوکنترل مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بر علیه بیماری کپک خاکستری سیب و توانایی آن برای القای پاسخ‌های دفاعی در بافت میوه سیب مورد بررسی قرار گرفت. در شرایط آزمایشگاه میزان بازدارندگی از رشد عامل بیماری در آزمون کشت متقابل ۲۴٪ و در آزمون متابولیت‌های فرار ۵۶٪ بود. در شرایط انبار زخم‌های میوه سیب با ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر 10^7 اسپور در میلی لیتر مایه زنی شدند و پس از ۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کنیدی 10^5 اسپور در میلی لیتر *B. mali* در هر زخم مایه زنی شد. سیب‌ها به مدت ۸ روز در دمای $20^{\circ}C$ نگهداری شدند. قطر لکه‌ها چهار و هشت روز پس از مایه زنی عامل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. *S. cerevisiae* پس از ۸ روز میزان آلودگی را ۷۴/۷ درصد کاهش داد. این آنتاگونیست علاوه بر کنترل کپک خاکستری موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید که بیشترین میزان آن دو روز بعد از مایه زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. آنتاگونیست دو روز پس از مایه زنی قارچ عامل بیماری، فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش و چهار روز پس از مایه زنی فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش داد. ترکیبات فنلی در میوه سیب تیمار شده با آنتاگونیست و *B. mali* افزایش یافت و بیشترین میزان آن شش روز پس از تیمار مشاهده شد. بر اساس نتایج این تحقیق مکانیسم مخمر *S. cerevisiae* در کنترل کپک خاکستری سیب احتمالا القای مقاومت و تولید مواد بازدارنده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماریهای پس از برداشت: پراکسیداز، ترکیبات فنولی*Botrytis mali*. *Malus domestica*

مقدمه

بیماری کپک خاکستری که توسط گونه‌های *Botrytis cinerea* Pers ex Fr (۱۴) و *B.mali* Ruehle (۳۴) ایجاد می‌شود و یکی از مهمترین بیماری‌های بعد از برداشت میوه‌های مختلف از جمله سیب است. مؤثرترین و رایج ترین روش کنترل بیماری‌های بعد از برداشت سیب استفاده از قارچ کش‌های صنعتی مخصوصاً تیابندازول می‌باشد (۳۹). اما نگرانی‌هایی که در مورد بقایای قارچ کش در محیط و افزایش مقاومت جدایه‌های عوامل بیماری زا پس از برداشت به قارچ کش‌ها وجود دارد، جستجو برای یافتن روش‌های کم زیان تر و ایمن تر را افزایش داده است. در سال‌های اخیر تلاشهای زیادی در استفاده از آنتاگونیست‌های میکروبی برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت انجام شده است و اطلاعات زیادی در این زمینه موجود می‌باشد (۴۶). عوامل بیوکنترل به تنهایی یا به عنوان بخشی از مدیریت تلفیقی آفات و بیماریها برای کاهش استفاده از سموم، به کار گرفته می‌شود. چندین میکرو ارگانیسم که به صورت طبیعی بر روی سطح میوه‌ها وجود دارند، برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت شناخته شده اند که برخی دارای توان بالایی در کاهش شیوع بیماری‌های قارچی بعد از برداشت بر روی میوه‌های مختلف در مقیاس آزمایشگاهی و همچنین در مقیاس صنعتی می‌باشند (۲۸). به عنوان مثال باکتری *Pseudomonas fluorescens* pf1 *توانست بیماری کپک خاکستری سیب را به میزان قابل ملاحظه ای کاهش دهد* (۳۴) تاثیر جدایه ۶- ۱۱۰۰ از باکتری *P.fluorescens* علیه کپک ابی سیب گزارش شده است (۱۶). همچنین جدایه En74-1 از باکتری *Bcillus lichniformis* علیه کپک خاکستری سیب مورد بررسی قرار گرفته است (۲۱). مخمرهای *Cryptococcus* (Kufferath) Skinner *laurentii*، *Pichia guilliermondii* Wickerham، *Kloeckera apiculata* (Reess) Janke،

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، استاد، استادیار و استادیار، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان
(* - نویسنده مسئول: Email: alavi_6180@yahoo.com)

Sporobolomyces roseus Kluyver & van Niel و *Candida oleophila* Montrocher در آزمایش‌های انجام شده بر علیه کپک خاکستری سیب مؤثر بودند (۲۲، ۳۲، ۳۳ و ۴۱).

غلام نژاد و همکاران چهار جدایه *Saccharomyces cerevisiae* را علیه کپک آبی سیب مؤثر گزارش کردند (۱۸).

یکی از ترکیبات بیولوژیکی تحت عنوان Aspire حاوی مخمر *Candida oleophila* Montroche علیه بیماری‌های بعد از برداشت سیب در ایالات متحده به ثبت رسیده است. Yild plus حاوی مخمر *Cryptococcus albidus* در آفریقای جنوبی به ثبت رسیده است (۴). مکانیسم هایی مثل رقابت برای مواد غذایی و فضا، مایکوپارازیتیسم، مقاومت القا شده و تولید آنزیم‌های لیتیک برای مخمرهای آنتاگونیست گزارش شده است (۱۴ و ۵۳). مکانیسم القاء مقاومت در میزبان (۱۳) از طریق تجمع فیتوالکسین‌ها (۴۲) و افزایش فعالیت آنزیم هایی مثل پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز نیز امکان پذیر است (۵۴).

هدف این تحقیق ارزیابی و توانایی جدایه *Sacchromyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen PTCC 5204 در کنترل کپک خاکستری با عامل Bm_2 *Botrytis mali* و همچنین بررسی تاثیر این جدایه آنتاگونیست و عامل بیماری بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و ترکیبات فنلی در بافت میوه سیب بود.

مواد و روش ها

عامل بیماری و آنتاگونیست: در این بررسی از جدایه Bm_2 قارچ Botrytis mali که از سردخانه مهر شهرکرج از روی سیب الوده به بیماری کپک خاکستری استفاده شد. این جدایه قبلا تو سط میکانی و همکاران با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی و سکانس DNA ژن بتا توبولین تشخیص داده شده است (۳۴). قارچ عامل بیماری روی محیط دکستروز اگار (PDA) در دمای $4^{o}C$ نگهداری گردید. جدایه PTCC 5204 مخمر Sacchromyces cerevisiae از پژوهشکده بیوتکنولوژی، مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های عفونی و صنعتی ایران دریافت شد. برای انجام آزمایشها، مخمر در ارلن ۲۵۰ ml حاوی ۵۰ml محیط Nutrient yeast dextrose broth (NYDB: Nutrient broth ، ۸ g ، yeast extract، ۵ g و Dextrose ، ۱۰g در یک لیتر آب) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق روی شیکر با ۲۰۰ rpm قرار داده شد.

آزمایشهای کنترل بیولوژیک در شرایط ازمایشگاه: به منظور ارزیابی اثر جدایه آنتاگونیست روی رشد عامل بیماری، آزمون کشت متقابل (۹) و آزمون متابولیت‌های فرار (۲۶) بیماری انجام شد. این آزمایشها روی محیط سیب زمینی دکستروز اگار(PDA) در طشتک‌های پتری ۹ سانتیمتری در چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد.

برای انجام آزمون کشت متقابل یک لوپ از محیط NYDB حاوی مخمر در یک نیمه طشتک پتری پخش شد و پلاکهایی از کلونی‌های پنج روزه قارچ عامل بیماری در نیمه دیگر پتری به فاصله ۱/۵ سانتیمتر از لبه طشتک پتری قرار داده شد. شاهد آزمایش طشتک‌های حاوی قارچ عامل بیماری به تنهایی بود. طشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز نگهداری شدند و سپس قطر کلونی قارچ عامل بیماری اندازه گیری شده و درصد بازدارندگی با فرمول زیر محاسبه گردید (۱۶).

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

n = درصد بازدارنگی از رشد عامل بیماری

a = مساحت کلونی عامل بیماری در پتری شاهد

b = مساحت کلونی عامل بیماری در پتری تیمار

به منظور انجام آزمون متابولیت‌های فرار یک لوپ از محیط NYDB حاوی سلول‌های مخمر در روی محیط MEAC (malt extract agar به علاوه ۰/۰۱٪ کلرامفنیکل) پخش شد. پلاگ میسلیومی قارچ عامل بیماری از کشت‌های پنج روزه برداشته شده و در مرکز طشتک پتری حاوی محیط PDA قرار گرفت. درب ظشتک‌ها برداشته شده و روی هم به صورت "دهان به دهان" قرار گرفتند و پس از بستن پارافیلم به دور ظشتک‌ها طوری در انکوباتور قرار داده شد که آنتاگونیست در پایین و عامل بیماری در بالا قرار بگیرد. پس از ۱۰ روز قطرکلنی عامل بیماری اندازه گیری شده و درصد بازدارنگی با فرمول بالا محاسبه گردید.

آزمایش‌های کنترل بیولوژیک در *in vivo* : برای انجام آزمایش‌ها ابتدا میوه‌های سیب از واریته Golden Delicious در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱٪ ضدعفونی شدند و دو بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و سپس به مدت ۵ ثانیه در اتانول ۷۰٪ غوطه ور شدند. پس از خشک شدن میوه‌ها در معرض هوا، توسط سوزن سترون روی هر سیب سه زخم به قطر ۳ میلی متر و عمق ۵ میلی متر ایجاد شد. سوسپانسیون مخمر به روش القوس و همکاران (۱۴) با استفاده از لام گلبول شمار در غلظت 1×10^{7} اسپور در میلی لیتر تنظیم شد. زخم‌ها با ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر تیمار شدند و برای شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. بعد از ۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون عامل بیماری با غلظت 1×10^{5} اسپور در میلی لیتر به هر زخم مایه زنی شد. در شاهد آب مقطر سترون بکار برده شد. میوه‌های تیمار شده در جعبه هایی گذاشته شده و درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند. با پاشیدن آب سترون در درون کیسه‌ها رطوبت نسبی داخل آنها در سطح بالایی نگاه داشته شد و در دمای $20^{o}C$ نگهداری شدند. تیمارها شامل شاهد سالم، میوه‌های

آلوده ای که فقط زادمایه قارچ عامل بیماری را دریافت کرده بود، میوه هایی که تنها با مخمر آنتاگونیست مایه زنی شده بود و میوه‌های مایه زنی شده با مخمر آنتاگونیست بعلاوه قارچ عامل بیماری بودند. به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و میزان ترکیبات فنلی، نمونه برداری از بافت میوه‌های سیب ۲، ۴، ۶ و ۸ روز بعد از آلودگی با قارچ عامل بیماری انجام گرفت. آزمایش به صورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و B در قالب طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتور A دارای چهار سطح (شامل چهار تیمار ذکر شده) و فاکتور B نیز دارای چهار سطح (شامل چهار زمان نمونه برداری) بود. قطر لکه‌های ایجاد شده روی میوه سیب در روزهای مختلف اندازه گیری شده و میزان تغییرات آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و نیز تغییرات فنل کل در روزهای ۲ ، ۴، ۶ و ۸ بررسی شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره سیب: به منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره سیب مورد آزمایش جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم از روش برادفورد (۶) استفاده شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD): ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش گنگ و همکاران (۱۷) تغییر یافته روش وتر و همکاران (۴۷) انجام شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش گنگ و همکاران (۱۷) تغییر یافته روش دو و برام لاگ (۱۲) ارزیابی شد.

تهیه منحنی استاندارد فنل با استفاده از غلظت‌های مختلف اسید کافئیک: رسم منحنی استاندارد فنل با استفاده از روش ارائه شده توسط اعتباریان (۱) انجام گرفت.

استخراج فنل گیاه: استخراج فنل از بافت گیاه به روش ارائه شده توسط اعتباریان (۱) صورت گرفت.

آنالیز آماری: آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن ($p\leq ۰/۰۵$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

تاثیر جدایه آنتاگونیست روی رشد عامل بیماری در آزمایشگاه: جدایه مخمر در آزمون کشت متقابل ۲۳/۶٪ و در آزمون متابولیت‌های فرار ۵۵/۶٪ از رشد میسلیومی *B. mali* Bm_2 جلوگیری کرد (جدول ۱).

تاثیر جدایه آنتاگونیست روی رشد عامل بیماری در انبار: جدایه PTCC 5204 در کنترل کپک خاکستری سیب در دمای ۲۰°C مؤثر بود. مساحت لکه پوسیده در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست چهار روز پس از مایه زنی عامل بیماری ۰/۰۴ سانتیمتر مربع در مقایسه با ۰/۴۰ سانتیمتر مربع در شاهد و پس از هشت روز ۴/۳ سانتیمتر مربع در مقایسه با ۱۷/۵۶ سانتیمتر مربع در شاهد بود (جدول ۲).

بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز : سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست در روز دوم از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با سیب‌های آلوده شاهد و سیب‌های سالم شاهد افزایش معنی داری نشان دادند اما در روز چهارم تفاوت فعالیت آنزیم در بین سیب‌های تیمار شده با این آنتاگونیست و سیب‌های شاهد سالم معنی دار نبود. در روزهای ششم و هشتم سیب‌های آلوده تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به شاهد سالم مجددا افزایش نشان دادند که این افزایش در روز هشتم از نظر آماری معنی دار نبود. در روزهای چهارم، ششم و هشتم بیشترین فعالیت آنزیم در بین تیمارها در سیب‌های آلوده شاهد دیده شد (شکل ۱).

(جدول ۱)- درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی *B. mali* Bm_2 توسط جدایه Saccharomyces cerevisae PTCC5204 در آزمایشگاه

جدایه مخمر	کشت متقابل ۷ روز بعد از مایه زنی	متابولیت‌های فرار ۱۰روز بعد از مایه زنی
PTCC 5204	۲۳/ ۶۲۳	۵۵/۵۶۸

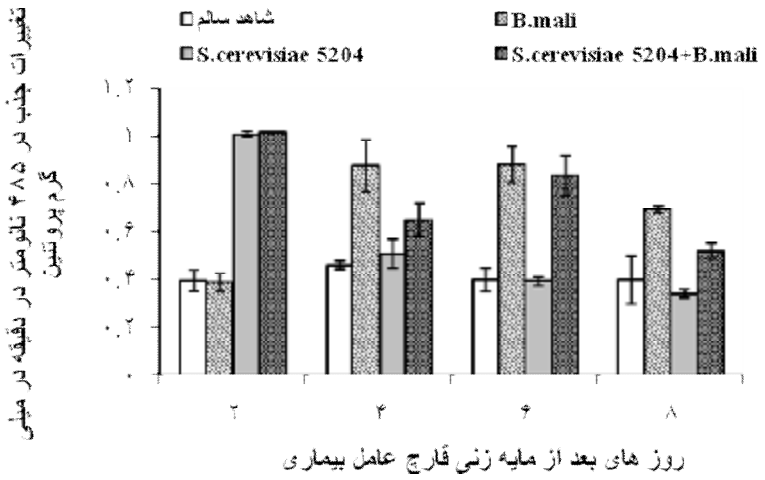
هر تیمار دارای چهار تکرار است

(جدول ۲)- مساحت لکه پوسیده سیب‌های تیمار شده با *S. cerevisiae* PTCC 5204، ٤ و ۸ روز بعد از مایه زنی عامل بیماری در دمای ۲۰°C

تیمار	مساحت (cm^2) بعد از ٤ روز	مساحت لکه‌های پوسیده (cm^2) بعداز۸روز
B. mali Bm_2	۰/۴۰a	۱۷/۵۶a
S. cerevisiae PTCC 5204+ *B. mali* Bm_2	۰/۰۴b	۴/۳b

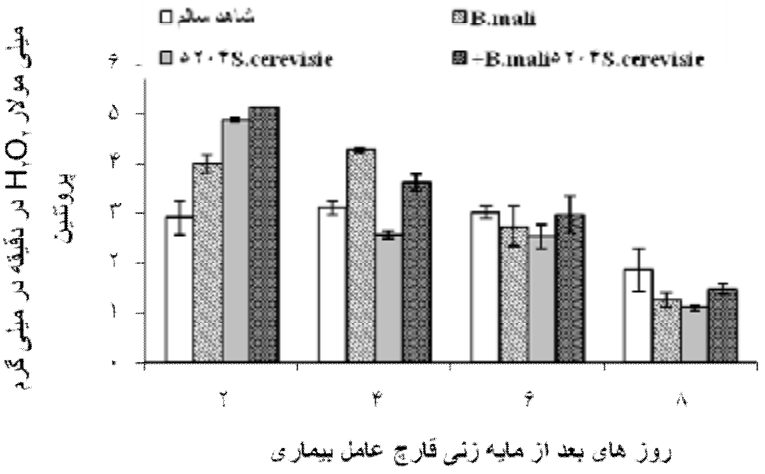
هر تیمار دارای چهار تکرار بوده و میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($p\leq 0.05$) اختلاف معنی دار دارند.

بررسی تغییرات آنـزیم کاتـالاز: میـوه‌هـای تیمـار شـده بـا آنتاگونیست در روز دوم از نظر میـزان فعالیـت آنـزیم در مقایسـه بـا سیب‌های آلوده شاهد و سیب‌های سالم شـاهد افـزایش معنـی داری نشان دادند. در روز چهارم فعالیت آنزیم به ترتیب در سیب‌های آلوده شاهد، سیب‌های آلوده تیمار شده با آنتاگونیست، سیب‌های سالم شاهد و سیب‌های سالم تیمار شده با آنتاگونیست بیشـتر بـود. در روزهـای ششم و هشتم همه تیمارها در یک سطح قرار گرفتند (شکل ۲).



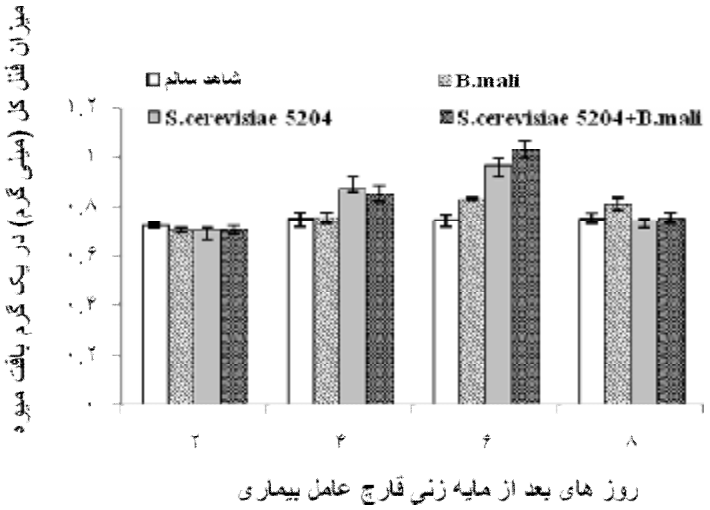
(شکل ۱)- فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه سیب تیمار شده با آنتاگونیست *S. cerevisiae* PTCC 5204 و قارچ عامل بیماری در دمای ۲۰°C

اعداد مربوط به نمودار میانگین چهار تکرار بوده و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشند. فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در ۴۸۵ نانومتر در دقیقه در میلی گرم پروتئین نشان داده شده است.



(شکل ۲)- فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه سیب تیمار شده با آنتاگونیست *S. cerevisiae* PTCC 5204 و قارچ عامل بیماری در دمای ۲۰°C

اعداد مربوط به نمودار میانگین چهار تکرار بوده و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشند. فعالیت آنزیم به صورت mM H_2O_2/min/mg Protein نشان داده شده است.



(شکل ۳)- تاثیر قارچ عامل بیماری و مخمرهای آنتاگونیست *S. cerevisiae* PTCC 5204 روی محتوای کل ترکیبات فنل در میوه سیب در دمای ۲۰°C

(اعداد مربوط به نمودار میانگین چهار تکرار بوده و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد.)

بررسی میزان تغییرات فنل کل: در بین روزهایی که نمونه برداری صورت گرفت حداکثر میزان فنل کل در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست در روز ششم مشاهده شد. میزان فنل در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به سیب‌های تیمار نشده با آنتاگونیست در روز چهارم افزایش معنی داری نشان داد در حالیکه در سیب‌های آلوده شاهد و سیب‌های سالم شاهد از نظر میزان فنل تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در روز ششم میزان فنل کل در سیب‌های آلوده شاهد نسبت به سیب‌های سالم شاهد بیشتر بوده و در سیب‌های تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به هر دوی این تیمارها بیشتر بود و در روز هشتم بین تیمار تفاوتی دیده نشد (شکل ۳).

بحث

نتایج حاصل از آزمون کشت متقابل آنتاگونیست و عامل بیماری و آزمون متابولیت‌های فرار نشان داد که جدایه مخمر توانایی تولید متابولیت هایی را داراست که احتمالاً در مکانیسم کنترل کنندگی آن مؤثر است. اغلب کشت‌های مخمری اسیدهای فرار و غیر فرار تولید می‌کنند (۲۳). ترکیبات فرار و غیرفرار تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های بیوکنترل ممکن است در کنترل عامل بیماری مؤثر باشد (۱۹، ۲۶، ۳۵، ۴۰، ۴۴) مثلاً باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus pumilus* با تولید ترکیبات فرار که خاصیت قارچ کشی دارد *B. cinerea* را روی توت فرنگی کنترل می‌کنند (۴۳). استرین‌های معینی از مخمر *S. cerevisias* توکسین هایی تولید می‌کنند که استرین‌های حساس همان گونه یا گونه‌های نزدیک را از بین می‌برد(۳۰). توکسین‌های کشنده زیادی می‌توانند روی دیگر مخمرها و حتی باکتری‌ها و قارچهای ریسه ای تاثیر بگذارند (۲۰، ۴۹، ۳۷، ۳۶).

نتیجه آزمایش در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نشان داد که جدایه *S. cerevisiae* PTCC 5204 توانایی کاهش شدت پوسیدگی و توسعه قارچ عامل بیماری را دارا است.همین جدایه توانست سطح لکه‌های مربو ط به بیمارکپک خاکستری سیب را در دمای ۴ درجه سانتی گراد به میزان۵۳ در صد کا هش دهد(۲) . پیش از این نیز گزارشهایی مبنی بر کنترل عوامل بیماری زای بعد از برداشت توسط مخمرها وجود دارد (۱۱.۴۴). به عنوان مثال جها جدایه ار *S. cerevisiae* توانست بیماری کپک ابی سیب رادر دمای ۴و ۲۵ درجه سانتی گراد کنترل کند (۱۸).

با توجه به اینکه فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز دوم در سیب‌های تیمار شده با مخمر نسبت به سیب‌های شاهد سالم افزایش معنی داری نشان داد چنین به نظر می‌رسد که این مخمر یک محرک در القا و سنتز آنزیم پراکسیداز می‌باشد که نقش دفاعی در بافت میوه علیه قارچ عامل بیماری ایفا می‌کند. از نتایج آزمایش مربوط به میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در میوهٔ سیب چنین استنباط شد که *Botrytis mali* فعالیت آنزیم کاتالاز را در میوه سیب افزایش داد، اما مخمر آنتاگونیست در روز دوم فعالیت کاتالاز را افزایش داده ولی در روزهای

چهارم و ششم تا حدودی فعالیت آنزیم را کاهش داده و مانع از افزایش فعالیت آنزیم توسط قارچ عامل بیماری نیز شد. چان و تیان (۷) گزارش کردند که تیمار میوه گیلاس با مخمر E.C. Hansen *Pichia membranifaciens* باعث تشدید فعالیت POD شد اما فعالیت CAT را کاهش داد. تا کنون قابلیت چندین مخمر بیوکنترل برای القاء مقاومت در میوه‌های برداشت شده به اثبات رسیده است (۱۱، ۱۵). در تحقیقی که توسط وانگ و همکاران (۵۲) انجام شد آنتاگونیست *Cryptococcus laurentii* باعث افزایش فعالیت پراکسیداز در میوهٔ هلو گردید. در این تحقیق میوهٔ هلو (*Prunus persica* cv Okub.) با قارچ بیماری زای *Penicillium expansum* و یا آنتاگونیست *Cryptococcus laurentii* مایه زنی شد، آنتاگونیست و عامل بیماری، هر دو باعث افزایش فعالیت پراکسیداز در میوهٔ هلو شدند. پراکسیدازها در فرآیند ساختن دیوارهٔ سلولی مثل اکسیداسیون فنل، سوبرینی کردن و لیگنینی شدن سلول گیاهی در حین دفاع برعلیه عامل بیماری شرکت دارند (۱۷) افزایش فعالیت پراکسیداز با القاء مقاومت ارتباط دارد (۲۹و۳۸). در گیاهانی که دفاع خیلی دیر اتفاق می‌افتد، عامل بیماری به راحتی بافت گیاه را کلونیزه می‌کند (۲۳). آنزیم کاتالاز H_2O_2 را به آب و O_2 تجزیه می‌کند و پراکسیداز با اکسیداسیون ترکیبات فنلی H_2O_2 را تجزیه می‌کند. این آنزیم‌ها به همراه آنزیم سوپراکسید دیس موتاز سیستم‌های اصلی آنزیمی سلول در برابر صدمات اکسیداتیو هستند (۴۵، ۵۲). دی گارا و همکاران (۸) بیان کردند که H_2O_2 با تسهیل و کاتالیز واکنش‌های پراکسیداز در ترکیبات ساختاری دیواره سلولی و پلی مریزاسیون لیگنین و سفت شدن دیواره سلولی باعث کاهش سرعت نفوذ عامل بیماری می‌شود. با این حال گونه‌های فعال اکسیژن (Active Oxigen Species) در غلظت‌های بالا در طی بیماری زایی ممکن است موجب انجام واکنش‌های تجزیه ای، پراکسیداسیون لیپید ها، تخریب غشاء سلولی، تجزیه پروتئین و خاموش شدن کلروفیل شوند (۵). بنابراین میزان مورد نیاز فعالیت آنتی اکسیدانتی برای نگه داشتن غلظت AOS در سطوح نسبتا پایین ضروری می‌باشد (۲۵). نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار میوه‌ها با مخمر آنتاگونیست ممکن است بر متابولیسم H_2O_2 تاثیر بگذارد و مقاومت را در میوه القاء کند. در آزمایش انجام شده به نظر می‌رسد در روز چهارم در تیمار عامل بیماری به علاوه آنتاگونیست، آنتاگونیست مانع از القاء آنزیم توسط عامل بیماری گردید. شاید آنتاگونیست با ممانعت از نفوذ عامل بیماری به داخل بافت و بیماری زایی آن مانع از القاء پراکسیداز توسط عامل بیماری شده است. در مشاهدات فراساختاری القوس وهمکاران (۱۴) در آزمایشی قطعاتی از زخم‌های سیب مایه زنی شده با عامل بیماری *B. cinerea* مورد بررسی قرار گرفت ونشان داده شد که سلول‌های قارچی موجب اضمحلال سلول‌ها در بافت زمینه ای سیب شدند. وقتی زخم‌ها با مخمر تیمار شدند مخمر موجب هیچ تغییر آشکاری درساختار دیواره‌های سلولی میزبان نگردید. در بافت سیب تیمار شده با *Candida saitoana* Nakase & Suzuki و سپس مایه زنی شده با *B. cinerea*، نشان داده شد که *C. saitoana* مانع از گسترش *B. cinerea* گردید.

از نتایج آزمایش مربوط به میزان ترکیبات فنل در میوهٔ سیب چنین استنباط شد که مخمر آنتاگونیست باعث افزایش القا و سنتز ترکیبات فنلی در میوهٔ سیب می‌شود. تنش‌های شیمیایی، مکانیکی یا بیولوژیکی در متابولیسم فنلی سیب تغییراتی ایجاد می‌کنند. این تغییرات در سطح میزان فنل می‌تواند در حفاظت گیاه بر علیه تنش نقش داشته باشد (۳۱). تحقیقات ویوکانانتان و همکاران (۴۸) نشان می‌دهد که کاربرد قبل از برداشت عوامل بیوکنترل ممکن است از طریق افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی و مواد فنلی به مغلوب شدن آلودگی‌های قبل و بعد از برداشت کمک نماید. میزان پلی فنل‌ها در سیب همراه با رسیدن میوه کاهش می‌یابد و در اثر این کاهش، میوه رسیده در برابر عامل بیماری زا آسیب پذیر تر می‌شود (۳).

منابع

۱- اعتباریان ح.ر.۱۳۶۷. بررسی تغییرات کمی فنلی در ارقام مختلف جو در خلال رشد قارچ *Puccinia hordei* و ارتباط آنها با مقاومت به این ارقام نسبت به بیماری زنگ قهوه ای جو. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۲۴. صفحه ۶۱-۶۹.

۲- علوی ف. ۱۳۸۶ بررسی امکان کنبرل بیولوژیکی بیماری کپک خا کستری سیب با استفاده از برخی مخمرها و بررسی برخی از مکانیسم‌های انتاگونیستی آ نها. پایان نامه کارشناسی ارشد. پردیس ابو ریحان دانشگاه تهران

۳- میدانی ج.، و هاشمی دزفولی س.ا. ۱۳۷۶. فیزیولوژی پس از برداشت. نشر آموزش کشاورزی. ۴۰۳ ص.

4- Abaias M., Usall J., Teixido N., and Vinas I. 2003. Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. Phytopathology, 93: 436- 442

5- Bowler C., Van Montagu M., and Inze D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 43: 83–116.

6- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein –dye binding. Analytical Biochemitry, 72: 248-254.

7- Chan Z., and Tian S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Postharvest Biol. Technol., 36: 215-223.

8- De Gara L., de Pinto M.C., and Tommasi F. 2003. The antioxidant systems vis-`a-vis reactive oxygen

species during plant–pathogen interaction. Plant Physiol. Biochem. 41: 863–870.
9- Dennis C., and Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III. Hyphal interaction. Trans. Br. Mycol. Soc., 57: 363-369.
10- Droby S., and Chalutz E. 1994. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: Wilson, C.L. Wisniewski, M.E., (Eds), Biological control of postharvest diseases: Theory and Practic. CRC Press, Boca Raton, pp.63-75.
11- Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen L., Daus A., Goldschmidt E.E., and Porat R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Phytopathology, 92: 393-399.
12- Du Z., and Bramlage W.J. 1995. Peroxidative activity of apple peel in relation to development of post storage disorders. Hort Science, 30: 205-209.
13- El-Ghaouth A., and Wilson C.L. 1995. Biologically-based technologies for the control of postharvest diseases. Postharvest News Inf., 6:5N-11N.
14- 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. Phytopathology, 88: 282-291.
15- El-Ghaouth A., Wilson C.L., and Wisniewski M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. Phytopathology, 93: 344-348.
16- Etebarian H.R., Sholberg P.L., Eastwell K.C., and Sayler R.J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonase fluorescens*. Can .J.Microbial., 51:591-598.
17- Gong Y., Toivonen M.A., Lau O.L., and Wiersma A. 2001. Antioxidant system level in Braeburn apple is related to its browing disorder. Bot. Boll. Acad.Sin., 42: 259-264.
18- Gholamnejad J., Etebarian H.R., Roustaee A. and Sahebani N. 2009. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection research. 49:270-275.
19- Gupta V.K., and Utkhede R.S. 1986. Factors affecting the production of antifungal compounds by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis*, antagonists of *Phytophthora cactorum*. J. Phytopathology, 117:9-16.
20- Izgu F., and Altinbay D. 1997. Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on gram-positive pathogenic bacteria. Microbios, 89: 15-22.
21- Jamalizadeh M., Etebarian H.R., Alizadeh and Aminian H. 2008. Biological Control of Gray mold on apple fruit by *Bacillus lichniformis*(EN74-!). Phytoparasitica. 36:23-29.
22- Janisiewicz W.J., Peterson D.L., and Bors B. 1994. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. Plant Dis., 78: 466–470.
23- Kreger-van Rij N.J.W., ed. 1984. The yeast: a Taxonomic Study, 3rd edn. Amsterdam: Elsivier, 1082pp.
24- Kuc J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. Eur. J. Plant Pathol., 107:7-12.
25- Larrigaudi`ere C., Vilaplana R., Soria Y., and Recasens I. 2004. Oxidative behavior of Blanquilla pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. J. Sci. Food Agric., 84: 1871–1877.
26- Leifert C., Chidberee S.L.H., Hampson S., Workman S., Sigee D., Epton H.A.S., and Harbour A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. J. Appl. Bacteriol. 78:97-108.
27- Lillbro M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain-acomparison of mode of action of several yeast species. Master theisis for the Agriculture Programme, animal science, performed at the Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Sciences, 21pp.
28- Lima G., Ippolito A., Nigro F., and Salerno M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against post-harvest stawbery rots. Postharvest Biol Technol 10:169-178.
29- Lurie S., Fallik E., Handors A., and Shapira R. 1997. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. Physiol. Mol. Plant Pathol., 50:141-149.
30- Makower M., and Bevan E.A. 1963. In 11th International Congress in Genetics 1, 202 (cited by Druvefors, 2004).
31- Mayr U., Batzdorfer R., Treutter D., and Feucht W. 1994. Surfactant-induced changes in phenol content of apple leaves and fruit skins. Acta Horticulturae, 381: 479-487.
32- McLaughlin R.J., Quinn J.P., Betterman A., and Bookland R. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sun flower with fungus and role of antifungal compound in 33-Mercier, J., and Wilson, C.L. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and

their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biol. Control, 4: 138–144.
33- Mikani A., Etebarian H.R., Sholberg P.L. O'Gorman D.T., Stokes S., and Alizadeh A. 2008. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. Postharvest Biol. Technol. 48, 107–112.
34- Monhamed S., and Caunter I.G. 1995. Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain suppressive to *Bipolaris maydis*. J. Phytopathology, (Berlin) 143:111-114.
35- Polonelli L. and Morace G. 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. Journal of Clinical Microbiology, 24: 866-869.
36- Polonelli L., Dettori G., Cattel C., and Morace G. 1987. Biotyping of micelial fungus cultures by the killer system. European Journal of Epidemiology, 3: 237-42.
37- Prusky D. 2003. Mechanism of resistance of fruits and vegetables to postharvest diseases. In: Bartz, J., Brecht, J., (Eds), Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables. Marcel Dekker, New York, pp. 581-598.
38- Prusky D., Bazak M., and Ben-Arie R. 1985. Development, persistence, survival, and strategies for control of thiabendazole-resistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruit. Phytopathology, 75: 877-882.
39- Pusey L.P. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. Pestic. Sci. 27:133-140.
40- Roberts R.G. 1990. Biological control of Mucor rot of pear by *Cryptococcus laurentii, C. flavus* and *C. albidus*. Phytopathology, 80:1051.
41- Rodov V., Ben Yehoshua S., Albaglis R., and Fany D. 1994. Accumulation of phytoalexins scoparone and scopoletin in citrus fruits subjected to various postharvest treatments. Procciding of International Scientific symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, Freising Weihenstephan, Germany, September 1993, Acta Hortic., 381: 517-523.
42- Swadling I. R., and Jeffries P. 1998. Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. Biocontrol Sci. Technol., 8:439-448.
43- Teixido,N., Usall, J., and Vinas, I. 1999. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatment to prevent blue mold on apples during cold storage. Food Microbiol., 50: 302-210.
44- Tommasi F., Paciolla C., de Pinto M.C., and De Gara L. 2001. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. J. Exp. Bot., 52: 1647–1654.
45- Vero S., Mondino P., Burgaeno J., Soubes M., and Wisniewski M.E. 2002. Chracterizatioin of biological activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. Postharvest Biol. Technol., 26,91-98
46- Vetter J.L., Steinoerg M.P., and Nelson A. 1958. Quantitative determination of peroxidase in sweet corn.J.Agric. Food Chem., 6: 39-41.
47- 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. Phytopathol. Mediterr., 45: 126–138.
48- Walker G.M., McLeod A.H., and Hodgson V.J. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters, 127: 213-222.
49- Walker R., Emsile K.A., and Allan E.J. 1996. Bioassay methods for the detection of antifungal activity by *Pseudomonas antimicrobica* against the grey mould pathogen *Botrytis cinerea*. J. Appl. Bacteriol., 81: 531-537.
50- Wang Y.S., Tian S., Xu Y., Qin G.Z., and Yao H. 2004. Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated with *Cryptococcus laurentii* or *Penicillium expansum* at 0 or 20 °C. Postharvest Biol. Technol., 34: 21–28.
51- Wang Y.S., Tian S.P., and Xu Y. 2005. Effects of high oxygen concentration on pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit during postharvest periods. Food Chem., 91: 99–104.
52- Wisniewski M., Biles C., Droby S., Mclaughlin R., Wilson C., and Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliermondii* I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiol. Mol. Plant Pathol., 39: 245–258.
53- Yao H.J., and Tian S.P. 2005. Effect of biocontrol agent methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved, Applied Microbiology, 98: 941-950.