مجله کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
شماره دوم، ۱۳۹۱ (۱۵۳-۱۴۱)

کنترل بیولوژیک کپک خاکستری سیب با استفاده از ترکیب چند جدایه مخمر و باکتری *Bacillus subtillis* و القای پاسخ‌های دفاعی

اسماعیل زنگویی*[1]،حسن رضا اعتباریان[2] و نوازالله صاحبانی[3]
۳،۲،۱ : دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد واستادیارپردیس ابوریحان دانشگاه تهران

چکیده

دو جدایه مخمر A5 وA4 از گونه *Candida membranifuciens* و جدایهA6 از گونه*Pichia guilliermondii* همچنین دو جدایه باکتری B2 و B6 از گونه*Bacillus subtilis* برای کنترل بیماری کپک خاکستری سیب با عامل *Botrytis cinerea Pers.:Fr.* به صورت انفرادی و مخلوط مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش سازگاری مواد بیوکنترل با استفاده از آزمون تولید ترکیبات خارج سلولی به روش سلوفان و کشت همزمان دو آنتاگونیست در محیط کشت جامد نشان داد، جدایه های مخمر با باکتری سازگار می‌باشند. آزمایش بررسی تقابل آنتاگونیست‌ها در محیط کشت مایع ثابت کرد جمعیت جدایه‌های مخمر در حضور جدایه‌های باکتری به‌خوبی تا انتهای آزمایش مشابه کاربرد انفرادی رشد می‌کنند. نتایج آزمایشات در شرایط انبار نیز نشان داد مخلوط هایB2+A5 وB6+A6 با قطر لکه برابر با ۵/۲۳ و ۷/۴۳ میلی‌متر در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و همچنین در دمای ٤ درجه سلسیوس بترتیب با ایجاد قطر لکه معادل ۳/٤۸ و ۳/۸۷ میلی متر، بیشترین کنترل کنندگی را نسبت به دیگر آنتاگونیست ها و مخلوط آن ها دارند. توانایی مخلوط آنتاگونیستی B2+A5 در القای پاسخ‌های دفاعی در بافت میوه سیب نشان داد این مخلوط دو روز بعد از مایه‌زنی سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و ترکیبات فنلی می‌شود علاوه بر آن، این مخلوط چهار روز پس از مایه‌زنی عامل بیماری فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش می‌دهد. مطابق نتایج این پژوهش مخلوط عوامل آنتاگونیست با افزایش القای مقاومت در میوه سیب، سبب بهبود بیوکنترل می‌گردند.

واژه های کلیدی: مخلوط آنتاگونیست ها، کپک خاکستری،پراکسیداز،کاتالاز و فنل

مقدمه

بیماری کپک خاکستری سیب با عامل قارچی *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. یکی از مهمترین بیماریهای پس از برداشت محسوب می شود. استفاده از سموم نیز از مهمترین روش های کنترل بیماری های بعد از برداشت می باشد، اما وجود بقایای سموم و ایجاد جدایه‌های مقاوم به آنها سبب جهت گیری های جدیدی در کنترل بیماری های محصولات بعد از برداشت شده است که کنترل بیولوژیک یکی از آنها محسوب می‌گردد (Janisiewicz 1988). در بیشتر مطالعات از یک آنتاگونیست در بیوکنترل استفاده شده است (Etebarian, *et al*. 2005) .اما استفاده از مخلوط آنتاگونیست ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال کالوو و همکاران نشان دادند که مخلوط جدایه‌های

* نویسنده مسئول: اسماعیل زنگویی تلفن: ۰۹۱۷۷۷۲۳۶۳۰ E-mail: zanguei@hotmail. Com

مختلف دو گونه مخمر *Rhabdotorula* و *Cryptococus* نتایج مطلوبی در کنترل پوسیدگی های پس از برداشت دارند (Calvo *et al.* 2003). همچنین ثابت شده است که تلفیقی از چند آنتاگونیست کپک خاکستری و کپک آبی سیب را همزمان کنترل می‌کند (Janisiewicz, 1988) تحقیقات دیگر نیز نتایج مشابه به‌دست آوردند (Leibinger *et al.* 1997، Janisiewicz 1996، Guetsky *et al.* 2002). بررسی‌ها نشان می‌دهند که آنتاگونیست‌ها درحالت انفرادی یا مخلوط با یکدیگر برای کنترل بیمارگرها دارای مکانیسم‌های کنترل متفاوتی هستند از آن جمله می‌توان به آنتی بیوتیک‌های تولیدشده توسط باکتری ها ازجمله *Bacillus subtilis* اشاره کرد که نقش زیادی درکاهش بیماری‌ها ایفا می کنند (Toure, 2004). مخمرها نیز به خوبی کارایی خود را در مبارزه علیه بیمارگرها نشان داده‌اند، مهمترین مکانیسم کنترل مخمرهای آنتاگونیست نیز شامل رقابت مستقیم و اشغال جایگاه اکولوژیکی است (Droby *et al.* 1991). علاوه بر آن، بررسی‌ها نشان می‌دهند آنتاگونیست‌ها دارای مکانیسم‌های کنترلی دیگری از جمله القا مقاومت به عوامل بیماریزا در گیاه نیز می‌باشند. یکی از خصوصیات مقاومت القایی در گیاهان همراه بودن این نوع مقاومت با تغییرات بیوشیمیایی مختلفی در گیاه از جمله افزایش پروتیئن های مرتبط با بیماریزایی، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز و افزایش میزان کل ترکیبات فنلی گیاه است (Franceschi *et al.* 1998 ، Bowler *et al.* 1992). در این مورد نیز تحقیقات زیادی انجام شده است برای مثال در تحقیقی برای کنترل پوسیدگی‌های بعد از برداشت در سیب ازگونه مخمر *Aureobsidium pullulans* به تنهایی استفاده شد که باعث افزایش در فعالیت β-1-3 *glucanase* ، کیتیناز و پراکسیداز شد (Ippolito *et al.* 2000). تیمار میوه گریت فرویت با مخمر *Candida oleophia* علیه عامل کپک آبی *P.expansum* سبب القا مقاومت می گردد (Droby et al. 2002). تحقیقات دیگر نیز نتایج مشابه را به‌دست آوردند (Wang et al.2004 ، EL Ghaouth et al. 1998). علاوه بر آن تحقیقات نشان می دهد عوامل بیوکنترل در حالت مخلوط نیز سبب افزایش پاسخ‌های دفاعی در گیاهان می شوند، در تحقیقی کاربرد مخلوط چند گونه از عوامل PGPR (Plant Growth Promotion Rhizobacteria) در سطح ریشه گیاهان نشان داد که مخلوط این میکروارگانیسم‌ها سبب افزایش آنزیم‌های دفاعی گیاه ازجمله پراکسیداز و ترکیبات فنلی نسبت به کاربرد انفرادی آنها می‌شود (Chen *et al.* 2000). این تحقیق به منظور ارزیابی امکان کنترل بیولوژیک کپک خاکستری سیب در حالتی که مخلوطی از جدایه های باکتری باسیلوس و مخمر استفاده می‌شوند و بررسی برخی از مکانیسم های القاء مقاومت آنها صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه آنتاگونیست‌ها و عامل بیماری

در این تحقیق دو جدایه مخمر A4 و A5 از گونه *Candida membranifuciens*، جدایهA6 از گونه *Pichia guilliermondii* و از کلکسیون آزمایشگاه قارچ شناسی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تهیه شدند (Alavifar 2007). قارچ عامل بیماری جدایه *Botrytis cinerea* و همچنین دو جدایه باکتری B2 و B6 از گونه *Bacillus subtilis* بود که از سطح سیب و از منطقه کرج جدا و خالص سازی شده بود.

بررسی ایجاد هاله بازدارندگی در محیط کشت حاوی مخلوط آنتاگونیست ها در شرایط آزمایشگاه

این آزمون به منظور تعیین سازگاری دو عامل بیوکنترل در شرایط آزمایشگاهی با روش ویلسون و لیندو (Wilson and Lindow 1994) انجام شد. بدین منظور قطعات ۱۵ میلی‌متری از کشت چند روزه هر یک از جدایه‌های مخمر با استفاده از لوپ بیولوژیک در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد، تشتک‌های پتری مذکور به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. سپس سوسپانسیون جدایه‌های باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (λ=590 nm و OD=0.05) با جمعیت باکتری معادل $۱۰^{۷}$ سلول در میلی لیتر بدست آمد و در ادامه سوسپانسیون مذکور در سطح تشتک‌های پتری پخش شد، سپس تشتک ها را مجددا در انکوباتور قرار

داده و در ادامه، ایجاد هاله در اطراف پرگنه مخمرها بررسی گردید. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۷ تیمار شامل محیط های کشت حاوی پرگنه جدایه‌های A4، A5 و A6 به همراه سوسپانسیون باکتری B2 و B6 و محیط کشت فاقد پرگنه مخمر (شاهد) در چهار تکرار انجام شد.

بررسی تاثیر ترشحات مایع خارجی سلولی جدایه‌های باکتری بر روی مخمرها با استفاده از روش سلوفان

این آزمایش بر اساس روش دنیس و وبستر (Dennis and Webster 1971) برای بررسی اثر محیط کشت حاوی متابولیت های خارج سلولی باکتری *B. subtilis* بر روی رشد پرگنه جدایه‌های مخمر انجام شد. در این آزمایش ابتدا کاغذ های مخصوص سلوفان سترون گردید. کاغذهای مذکور در سطح تشتک های سترون حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند. سپس پرگنه هایی از کشت ۴۸ ساعته جدایه های B2 و B6 باکتری *B. subtilis* توسط لوپ سترون روی این لایه کاغذ پخش شد، و به مدت ۴۸ ساعت در ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند که در این مدت اجازه داده شد که متابولیت‌های ترشحی از باکتری‌ها وارد محیط کشت شوند.

سپس با استفاده از یک پنس استریل و زیر هود سترون کاغذهای مخصوص سلوفان که همراه با پرگنه‌های رشد کرده باکتری بودند از سطح تشتک‌ها برداشته شد و به جای آنها از سوسپانسیون $۱۰^{۴}$ سلول در میلی‌لیتر جدایه‌های مخمر که با استفاده از لام هماسیتومتر و آب مقطر سترون تهیه شده بود در روی محیط کشت های فوق پخش گردیدند، در تشتک پتری شاهد (بدون متابولیت باکتری) نیز به همان میزان سوسپانسیون هر یک از جدایه های مخمر پخش شد و تشتک‌ها مجدد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. بعد از گذشت این مدت تعداد پرگنه‌های رشدکرده با استفاده از دستگاه پرگنه‌شمار شمارش شد. آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور A و B در ۴ تکرار صورت گرفت. فاکتور A دارای ۳ سطح (مخمر آنتاگونست) و فاکتور B دارای ۳ سطح (باکتری آنتاگونیست) بود.

بررسی جمعیت جدایه‌های مخمر در حضور جدایه‌های باکتری در محیط کشت مایع

این آزمون مطابق روش ژنیسویکس و بور (Janisiewicz and Bors 1995) با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا محیط کشت NYDB تهیه گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر از این محیط درون لوله های ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شد و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شد. پس از سردشدن محیط‌های مذکور سوسپانسیون $۱۰^{۷}$ از هر یک از جدایه های مخمر و باکتری تهیه گردید. در تیمارهایی که شامل آنتاگونیست انفرادی بودند،۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون هر آنتاگونیست به لوله‌ها اضافه گردید و در تیمار مخلوط آنتاگونیست‌ها نیز ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخلوط آنتاگونیست‌ها با همان غلظت ذکر شده اما به نسبت ۵۰ :۵۰ تهیه شد و به لوله‌ها اضافه گردید. لوله ها روی شیکر دورانی ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای اتاق (شرایط آزمایشگاه) نگه داری شدند. سپس در زمان های ۱۵ و ۳۰ ساعت بعد از شروع آزمایش به ترتیب از هر کدام از ویال‌ها نمونه‌های ۱۰۰۰µl از محیط برداشته شد، و برای به‌دست آوردن جمعیت مخمر و باکتری نمونه های برداشته شده مذکور با انجام سری رقت‌سازی در غلظت های $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۴}$ و $۱۰^{۵}$ برای مخمر و غلظت‌های $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ برای باکتری، روی تشتک های پتری حاوی محیط کشت PDA و محیط کشت PDA محتوی ۲۵ mg/lit استرپتومایسن (در این محیط باکتری‌ها قادر به رشد نیستند)، به ترتیب برای رشد پرگنه باکتری و مخمر ریخته شدند. قابل ذکر است پرگنه های باکتری در محیط PDA بدون کاربرد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسن از نظر ظاهری با پرگنه مخمرها در حالت مخلوط قابل تمایز بودند و علاوه بر آن معمولا بعد از ۲۴ ساعت اولین پرگنه هایی که ظاهر می‌شدند پرگنه باکتری بودند که در این صورت جمعیت مخمر و باکتری در حالت مخلوط از یکدیگر قابل تفکیک بودند. پرگنه ها 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 یا انفرادی) بود.

بررسی اثر جدایه های مخمرو باکتری و مخلوط آنها در کنترل کپک خاکستری سیب

در این آزمایش سیب‌های گلدن دلیشز به منظور ضدعفونی 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 $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۷}$ سلول در میلی لیتر به ترتیب برای هر یک از جدایه های باکتری و مخمر تهیه گردید. سپس حجم‌های مساوی از سوسپانسیون هر دو آنتاگونیست به نسبت های مساوی (۵۰:۵۰) در ویال‌های استریل شده مخلوط گردید و در هر زخم ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون انفرادی آنتاگونیست‌ها یا مخلوط دو آنتاگونیست اضافه شد (در تیمار شاهد آلوده به بیمارگر و شاهد سالم از آب مقطر سترون به جای سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها به صورت انفرادی و مخلوط استفاده شد). در ادامه، غلظت $۱۰^{۵}$کنیدی در میلی لیترقارچ عامل بیماری تهیه و بعد از ۲۴ ساعت،۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون عامل بیماری به هر زخم اضافه شد. در این مرحله نیز زخم های مایه‌زنی نشده با بیمارگر، با آب مقطر استریل تیمار شدند اما به‌دلیل 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 سلسیوس نگهداری شدند. لازم به ذکر است که در طول این مدت داخل کیسه ها 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 اندازه‌گیری شدند. این آزمون به صورت فاکتوریل و با دو فاکتور در پایه کاملا تصادفی انجام شد. فاکتور A شامل مخمرهای آنتاگونیست در چهار سطح : شاهد بدون مخمر ، جدایه‌های مخمری A5 , A4 ،A6 و فاکتور B شامل باکتری‌های آنتاگونیست در سه سطح شامل: شاهد بدون باکتری و جدایه‌های باکتریایی B2 و B6 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 سلسیوس به صورت مجزا نیز انجام گرفت، با این تفاوت که قطر لکه‌ها در روز سی ام بعد از مایه‌زنی بیمارگر اندازه گرفته شدند Etebarian et (al.2005).

بررسی تغییرات کمی برخی ترکیبات دفاعی در میوه سیب

به منظور بررسی بیشتر در مکانیسم‌های کنترل بیماری کپک خاکستری سیب توسط مخلوط جدایه مخمر A5، *C. mbranifacien* و جدایه B2 باکتری *B. subtilis* ، میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز و کاتالاز و مقدار فنل کل میوه سیب مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا میوه‌های سیب همانطور که درآزمایش قبل شرح داده شد، ضدعفونی و سپس مایه‌زنی شدند. سپس میوه‌ها در ظروف پلاستیکی قرار داده و سطح آنها با کیسه پلاستیکی پوشانده شد. سیب‌ها به مدت ۱۱ روز در ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در طی این مدت مرتب درون کیسه ها مرطوب نگه داشته می شد. میزان تغییرات آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و نیز میزان فنل کل به ترتیب در روز های ۲ ، ۴ ، ۶ و ۸ اندازه گیری شد. تیمار های این آزمایش شامل : میوه‌های تیمارشده با جدایه مخمر A5، جدایه های B2 باکتری و مخلوط B2+A5، میوه‌های مایه‌زنی شده با آنتاگونیست‌ها یا مخلوط آنها 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 نمونه‌برداری یعنی ۲، ۴، ۶ و ۸ روز بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری) بود.

تهیه عصاره و ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش گنگ و همکاران (Gong *et al.* 2001) انجام شد.

بررسی میزان فعالیت آنزیمی کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش گنگ و همکاران (Gong et al. 2001) ارزیابی شد.

استخراج، تهیه منحنی استاندارد و اندازه‌گیری مقدار کل مواد فنلی

این آزمایش بر اساس روش ارائه‌شده توسط اعتباریان (Etebarian 1988) انجام شد.

محاسبات آماری

به منظور تجزیه تحلیل آماری اعداد برای پارامتر های مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی واریانس از نرم افزار SAS 9.0 استفاده گردید. و میانگین ها با روش چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. داده ها قبل از آنالیز واریانس با فرمول های ($Y = \ln X$ ، $Y = \log X$ و $Y = \sqrt{x}$) نرمال شدند.

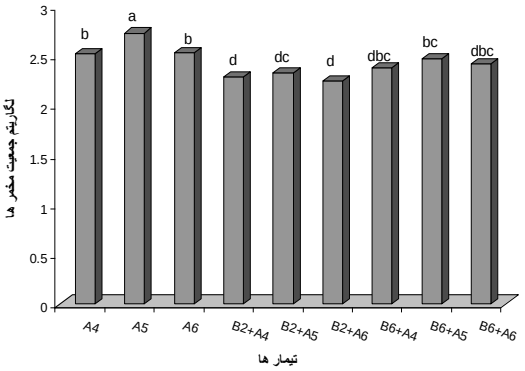
نتایج

ایجاد هاله بازدارندگی در محیط کشت حاوی دو آنتاگونیست

در این مرحله اثرات سوء متابولیت‌های احتمالی مخمر ها بر روی باکتری ها، با ایجاد هاله بازدارندگی در محیط کشت بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که در اطراف هیچ یک از پرگنه های مخمری که در محیط کشت آغشته شده با پرگنه های باکتری بودند، هاله‌ای مبنی بر بازدارنده بودن این مخمر ها بر جدایه‌های باکتری مشاهده نشد.

بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی باکتری باسیلوس روی جمعیت جدایه‌های مخمری با روش سلوفان

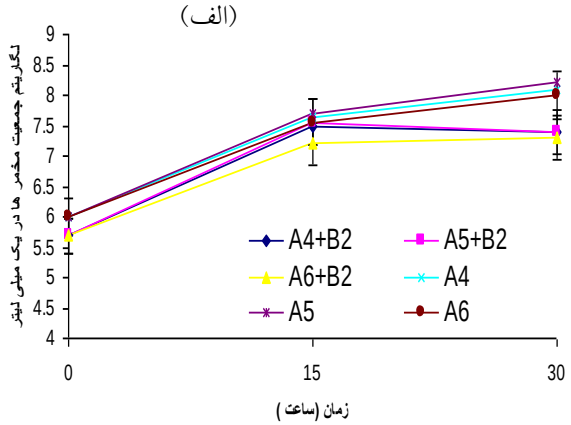
نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که اثر متقابل متابولیت های خارج‌شده از جدایه باکتری *B. subtilis* روی رشد پرگنه‌های مخمر ها دارای تفاوت معنی دار نمی باشد اما بین تیمار ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P \leq 0.01$). مطابق مقایسه میانگین‌های این آزمایش تمام جدایه‌های مخمری آزمایش شده در محیط حاوی متابولیت‌های ترشحی جدایه های B2 و B6 باکتری رشد می‌کنند (شکل ۱).

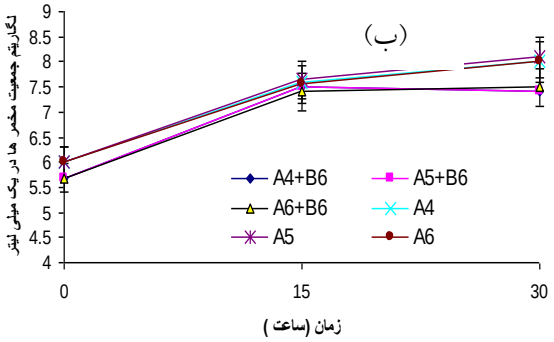


شکل ۱- اثر متابولیت های خارج سلولی جدایه B2 وB6 باکتری *B. subtilis* روی رشد پرگنه جدایه های مخمری در روش سلوفان. هر تیمار دارای چهار تکرار است و تیمارهایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند درآزمون دانکن با هم تفاوت معنی دار ($p<0.05$) ندارند.

بررسی تغییرات جمعیت جدایه‌های مخمر در محیط حاوی جدایه‌های باکتری در شرایط آزمایشگاه

نتایج این آزمایش نشان می دهند که در مورد تاثیر هر دو جدایه B6 و B2 از باکتری *B. subtilis* روی میزان رشد جدایه های مخمر A4، A5 و A6 بین تیمارها اختلاف معنی دار وجود دارد ($P \leq 0.01$) اما بین زمان‌ها و نیز اثر متقابل آنها اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. از طرفی همان طور که از مقایسه میانگین‌ها نیز استنباط می شود، در این آزمایش جمعیت جدایه‌های مخمری A4، A5 وA6 در حضور جدایه‌های B2 وB6 به خوبی تا انتهای آزمایش مشابه کاربرد انفرادی در محیط NYDB رشد می‌کنند (شکل ۲ الف و ب)





شکل۲– لگاریتم جمعیت مخمر های A5 ، A6 و A4 در حالت انفرادی و مخلوط با جدایه های B2 (الف)و B6(ب) از باکتری. اعداد مربوط به نمودار، میانگین سه تکرار می باشد. خطوط روی ستون ها خطای استاندارد (±SE) می باشد.

بررسی اثر کاربرد مخلوط مخمر و باکتری در کنترل کپک خاکستری سیب در دمای ۲۰ و ۴درجه سلسیوس

نتایج در دمای ۲۰ درجه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های مخمر و باکتری و نیز مخلوط آن ها در کنترل پوسیدگی میوه سیب در سطح یک درصد وجود داشت ($P\leq0.01$). نتایج همچنین ثابت می‌کند بین کاربرد مخلوط‌های B2+A5 ، B6+A6 B6+A4 و کاربرد انفرادی آنتاگونیست A4 اختلاف معنی داری وجود ندارد. نتایج در روز پانزدهم بعد از مایه‌زنی بیمارگر نشان داد که مخلوط‌های ذکرشده کمترین قطر لکه را نسبت به کاربرد همان آنتاگونیست‌ها به صورت انفرادی داشتند و میزان قطر لکه در این تیمارها به ترتیب ۵/۲۳ ، ۷/۴۳ و ۱۱/۶۶ میلی‌متر می باشد؛ از طرفی کاربرد مخمر A4 به صورت انفرادی نشان داد این آنتاگونیست قطر لکه برابر با۸/۲۲ میلی متر را سبب می شود، که با کاربرد مخلوط‌های فوق اختلاف چندانی ندارد. از طرفی مخلوط B2+A6 بیشترین قطر لکه بیمارگر را باعث شد که در مقایسه با شاهد هیچ اختلاف معنی داری نداشت. اندازه‌گیری قطر لکه‌های ایجاد شده روی میوه‌های سیب نگهداری‌شده در دمای ۴ درجه نیز نشان داد که مخلوط های B2+A5، B6+A6 و B6+A5 در کنترل پوسیدگی ناشی از قارچ عامل بیماری از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشته و این ترکیبات بیشترین کاهش را در مساحت لکه‌های پوسیدگی ایجاد نمودند، این تیمارها با دیگر تیمارها (کاربرد انفرادی و مخلوط آنتاگونیست‌ها) اختلاف معنی‌داری داشتند. دیگر ترکیبات کنترلی برابر با تیمارهای انفرادی یا کمتر از آنها داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- اثر جدایه‌های مخمر، باکتری و مخلوط آنها جدا شده از سیب در کنترل *B. cinerea* روی میوه سیب . هر تیمار دارای چهار تکرار بوده و تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند ($P\leq0.05$).

	۲۰ C°	۴ C°
تیمار ها	قطر لکه(mm) بعد از ۱۵روز	قطر لکه(mm) بعد از ۳۰روز
B6	۱۵/۲۲b	۱۰/۸۳b
B2	۱۵/۰۵b	۱۳/۲۹b
A4	۸/۲۲dec	۸/۶۷bc
A5	۱۳/۵۷bc	۱۱/۶۷bc
A6	۱۲/۹۹dbc	۱۶/۰۱b
B2+A4	۱۶/۳۳b	۱۲/۴۶b
B2+A5	۵/۲۳e	۳/۴۸d
B2+A6	۲۸/۶۹a	۱۴/۳۶ b
B6+A4	۱۱/۶۶dbec	۱۱/۰۸b
B6+A5	۱۶/۷۴b	۵/۱۶dc
B6+A6	۷/۴۳de	۳/۸۷d
control	۳۷/۲۸a	۳۵/۰۱a

بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز در میوهٔ سیب مایه زنی شده با مخمر *C. membranifaciens* A5 ، باکتری *B. subtilis* B2 و مخلوط آنها در ۲۰ درجه سلسیوس

در مورد تاثیر کاربرد انفرادی و مخلوط مخمر *C. membranifaciens* A5 و باکتری *B.subtilis* B2 روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه سیب بین تیمارها و روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری ($P\leq0.01$) وجود دارد. در بین روزهایی که نمونه برداری صورت گرفت حداکثر میزان فعالیت آنزیم در سیب های آلوده تیمارشده با مخلوط دو جدایه آنتاگونیستB2+A5 در روز دوم بعد از مایه‌زنی عامل بیماری مشاهده شد. فعالیت آنزیم در سیب‌های تیمارشده با تیمار فوق در روز چهارم کاهش معنی داری نسبت به روز دوم داشته و تا روز ششم دارای روند کاهشی می‌باشد اما در روز هشتم مجدد کمی افزایش پیدا می کند. بیشترین میزان

فعالیت آنزیم در شاهد آلوده در روزهایی که نمونه‌برداری صورت گرفت در روزهای چهارم بعد از مایه‌زنی دیده شده و در روزهای ششم و هشتم کاهش یافت ولی این کاهش بین این دو روز معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین تاثیر قارچ عامل بیماری کپک خاکستری، باکتری *B.subtilis* B2 ، مخمر *Candida membranifaciens* A5 و مخلوط آن ها 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.

تیمار ها	روز های بعد از نمونه برداری			
	۲	۴	۶	۸
B	a ۰/۴۳۲F	b ۰/۴۵۷F	b ۰/۴۷E	ab ۰/۴۴۷E
B+P	d ۰/۴۸۷E	b ۰/۶۴۲D	a ۰/۷۰۲B	c ۰/۶۰۲D
Y	a ۰/۶۵۵D	b ۰/۵۵۲E	c ۰/۴۳۲F	d۰/۴۰۷F
Y+P	a ۰/۸B	a ۰/۷۸۳B	b ۰/۶۷۷C	b ۰/۶۶C
Y+B	a ۰/۷۵۲C	b ۰/۷۱۵C	c ۰/۶۴۲D	d ۰/۵۸۲D
Y+B+P	a ۰/۹۴A	b۰/۸۲۲A	c ۰/۶۴۴D	d ۰/۷۳۵B
P	c ۰/۴۹E	a ۰/۸۱۵A	b ۰/۷۷۵A	b ۰/۷۶۵A
Control	a ۰/۴۱۵F	a ۰/۴۲۲G	b ۰/۳۸۱G	a ۰/۴۰۷F

Control : میوه های سالم بدون تیمار آنتاگونیست ها و بیمارگر، P شاهد آلوده با بیمارگر، Y میوه های سالم تیمار شده با مخمر A5 ، B میوه های سالم تیمار شده با باکتری B2 ، Y+P میوه های آلوده تیمار شده با مخمر A5 می باشند ، B+P میوه های آلوده تیمار شده با باکتری B2می باشند ، Y+B میوه های سالم تیمار شده با مخلوط باکتریB2 و مخمرA5 می باشند و Y+B+P میوه های آلوده تیمار شده با مخلوط باکتریB2 و مخمرA5 می باشند. هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ و میانگین هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده اند

بررسی میزان تغییرات آنزیم کاتالاز در میوهٔ سیب مایه زنی شده با مخمر *C.membranifaciens A5*، باکتری *B.subtilis* B2 و مخلوط آنها در ۲۰ درجه سلسیوس

در مورد تاثیر کاربرد انفرادی و مخلوط مخمر *C.membranifaciens* A5 و باکتری *B. subtilis* B2 روی میزان فعالیت کاتالاز در میوه سیب بین تیمارها و روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی دار ($P\leq0.01$) وجود دارد. در بین روز هایی که نمونه برداری صورت گرفته است در روز دوم حداکثر میزان فعالیت آنزیم در سیب‌های آلوده تیمارشده با مخلوط آنتاگونیست‌ها مشاهده شد. فعالیت آنزیم در سیب های تیمارشده با مخلوط فوق در روز چهارم کاهش معنی‌داری نسبت به روز قبل داشته و تا روز ششم و هشتم دارای روند کاهشی می باشد. میزان فعالیت آنزیم در سیب های شاهد آلوده نیز در سه روز اول تفاوت معنی‌داری نداشتند تا در روز هشتم یک کاهش معنی داری مشاهده می‌شود. میزان فعالیت آنزیم در سیب‌های سالم شاهد در طول آزمایش تفاوت معنی‌داری نداشتند. در سیب‌های سالم و آلوده تیمار شده با آنتاگونیست ها حداکثر فعالیت آنزیم در روز دوم بعد از مایه‌زنی عامل بیماری مشاهده شد. فعالیت آنزیم در تیمارهای فوق در روز چهارم کاهش معنی‌داری داشته و این روند کاهشی با روزهای ششم و هشتم در یک سطح قرار داشت .سیب های سالم تیمارشده با مخلوط آنتاگونیست‌ها نیز از این روند پیروی می‌کند (جدول ۳).

بررسی میزان تغییرات فنل کل در میوهٔ سیب مایه‌زنی شده با مخمر *C. membranifaciens* A5، باکتری *B.subtilis* B2 و مخلوط آنها در ۲۰ درجه سلسیوس

در مورد تاثیر کاربرد انفرادی و مخلوط مخمر *C.membranifaciens* A5 و باکتری *B. subtilis* B2 روی میزان فنل در میوه سیب بین تیمارها (روزهای نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها) تفاوت معنی‌دار ($P\leq0.01$) وجود دارد. از مقایسه میانگین داده ها در بین روزهایی که نمونه‌برداری صورت گرفت بر می‌آید که تفاوت میزان فنل کل سیب‌های تیمارشده با مخلوط B2 +A5 و مایه‌کوبی شده با قارچ عامل بیماری از روز چهارم معنی‌دار شد و به حداکثر رسیده و از نظر آماری با روز

ششم در یک سطح معنی دار قرار می گیرد، تا این که در روز هشتم کاهش می یابد (جدول ۴).

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر قارچ عامل بیماری کپک خاکستری، ،باکتری B2 *B.subtilis*، مخمر *Candida membranifaciens* A5 و مخلوط آن ها روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه سیب. فعالیت آنزیم به صورت میلی مول H2O2 در دقیقه در میلی گرم پروتئین تام (mM H2O2/min/mg Protein) نشان داده شده است.

تیمار ها	روز های بعد از نمونه برداری			
	۲	۴	۶	۸
B	B ۳/۲۶a	C ۱/۳۲b	A ۱/۵۴b	AB ۱/۷۴b
B+P	A ۴/۴۱a	C ۲/۲۱b	A ۲/۵۵b	AB ۲/۰۸b
Y	A۴/۸۲ a	C ۲/۵۴b	A ۲/۰۶b	AB ۲/۳۰b
Y+P	A ۵/۰۱a	C ۲/۲۱b	A ۲/۰۲b	AB ۱/۸۹b
Y+B	A۴/۹۲ a	C۲/۲۱b	A۲/۴۳ b	A ۲/۷۶b
Y+B+P	A ۵/۰۲a	A ۳/۷۹b	A ۲/۸۲c	AB ۱/۳۴d
P	AB۴/۱۶ a	AB ۳/۵۶a	A ۲/۸۲ab	B ۱/۱۲b
Control	C۱/۳۱a	C ۱/۶۹a	A۱/۸۳a	AB ۲/۱۰a

Control : میوه های سالم بدون تیمار آنتاگونیست ها و بیمارگر، P شاهد آلوده با بیمارگر، Y میوه های سالم تیمار شده با مخمر A5 ، B میوه های سالم تیمار شده با باکتری B2 ، Y+P میوه های آلوده تیمار شده با مخمر A5 می باشند ، B+P میوه های آلوده تیمار شده با باکتری B2می باشند ، Y+B میوه های سالم تیمار شده با مخلوط باکتریB2 و مخمرA5 می باشند و Y+B+P میوه های آلوده تیمار شده با مخلوط باکتریB2 و مخمرA5 می باشند. هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ و میانگین هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده است.

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر قارچ عامل بیماری کپک خاکستری، ،باکتری B2 *B. subtilis* ، مخمر *Candida membranifaciens* A5 و مخلوط آنها روی میزان فنل کل (میلی گرم در یک گرم بافت میوه) در میوه سیب .

تیمار ها	روز های بعد از نمونه برداری			
	۲	۴	۶	۸
B	D ۰/۵۵۷c	D ۰/۷۵a	D ۰/۶۵b	D ۰/۶۵۶b
B+P	D ۰/۵۱۷b	E۰/۶۳۲ a	D۰/۶۲۵ a	D۰/۶۲۷ a
Y	B ۰/۶۹۵b	BC۰/۸۴۷ a	BC ۰/۸a	B ۰/۷۹۸a
Y+P	B ۰/۷۲۵b	B ۰/۸۸a	BC ۰/۸۲۲a	A ۰/۸۶۸a
Y+B	A ۰/۷۹۴cb	AB ۰/۹۰۷a	B ۰/۸۴۵ab	C ۰/۷۳۲c
Y+B+P	A ۰/۷۹۷c	A ۰/۹۵۲a	A ۰/۹۳a	AB ۰/۸۶۲b
P	B ۰/۷۲۹b	CD۰/۷۹۱ab	C ۰/۷۵۹b	AB ۰/۸۵a
Control	C ۰/۶۳۰a	E ۰/۶۷۷a	D ۰/۶۵۷a	D ۰/۶۴۶a

Control : میوه‌های سالم بدون تیمار آنتاگونیست ها و بیمارگر، P شاهد آلوده با بیمارگر، Y میوه های سالم تیمار شده با مخمر A5 ، B میوه های سالم تیمار شده با باکتری B2 ، Y+P میوه های آلوده تیمار شده با مخمر A5 می باشند ، B+P میوه های آلوده تیمار شده با باکتری B2می باشند ، Y+B میوه های سالم تیمار شده با مخلوط باکتریB2 و مخمرA5 می باشند و Y+B+P میوه های آلوده تیمار شده با مخلوط باکتریB2 و مخمرA5 می باشند. هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ و میانگین هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P\leq0.05$) ارائه شده است.

بحث

در پژوهش‌های انجام شده تاکنون تعداد زیادی از عوامل بیوکنترل به صورت مخلوط بر علیه بیمارگرها استفاده شده‌اند (Leibinger et al.1997). محققان بر این عقیده هستند که مواد بیوکنترلی که به صورت مخلوط به کار می روند باید با یکدیگر سازگاری داشته باشند (Thilagavathi *et al.* 2007). بررسی‌های انجام شده در این پژوهش در شرایط آزمایشگاه ازجمله نتایج کشت همزمان دو آنتاگونیست در محیط کشت PDA و آزمون تولید ترکیبات خارج سلولی به روش سلوفان

مشخص گردید که آنتاگونیست‌ها در محیط کشت جامد متابولیت بازدارنده‌ای بر علیه یکدیگر تولید نمی‌کنند. که این نتایج مشابه دیگر یافته‌ها در این زمینه می‌باشد (Wilson and Lindow 1994، Etebarian2006، Georgakopoulos 2002). در آزمایش کشت همزمان جدایه های *Bacillus* به همراه مخمر در محیط PDB در پژوهش حاضر انتظار می رود جدایه های باکتری با تولید آنتی بیوتیک جمعیت مخمرها را در محیط کاهش دهند اما نتایج نشان داد جمعیت مخمرها تحت تاثیر حضور باکتری قرار ندارند. قابل ذکر است که نتایج تحقیقات مشابه بیان می کنند که رقابت بر سر مواد غذایی در محیط کشت غنی PDB مهمترین نقش در تقابل بین دو میکروارگانیسم بازی می‌کند و آنتی بیوتیک‌ها نقش کمتر را در این بین ایفا می‌کنند (Janisiewicz and Bors 1995). تیمارهای مخلوط مخمر و باکتری که در شرایط آزمایشگاه سازگاری آنها ثابت شده بود در شرایط انبار نشان دادند که ترکیب‌های A5+B2 و A6+B6 سبب بهبود کنترل بیمارگر در مقایسه با دیگر تیمارها به صورت انفرادی و مخلوط می‌شوند. نتایج به دست آمده در این تحقیق مشابه با نتایج سایر محققان می‌باشد که نشان دادند استفاده از مخلوط آنتاگونیست‌ها سبب بهبود کنترل بیماری های بعد از برداشت می‌شود (Calvo Leibinger *et al*. 1997 *et al*. 2003,). ژینسویکس و بور نشان دادند (Jainsiewicz and Bore 1995) مخلوط جدایه‌های باکتری*Pseudomonas syringae* و مخمر گونه *Candida oleophila* نتایج مطلوبی در کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت دارند. علاوه بر آن ژینسویکس (Jainsiewicz 1996) با استفاده از مخلوط دو جدایه مخمر بر علیه کپک آبی سیب ثابت کرد یکی از جدایه های مخمر از هر سه منبع کربن موجود در سطح سیب (گلوکز، فروکتوز و ساکاروز) استفاده می‌کند اما جدایه دیگر در استفاده از ساکاروز ناتوان است او نتیجه گرفت که تفاوت در جایگاه‌های اکولوژیکی و استفاده از مواد قندی در دو آنتاگونیست به آنها اجازه می‌دهد در کنار یکدیگر رشد کنند و سبب بهبود کنترل بیمارگر شوند. گویتسکی و همکاران Guetsky et al (2002.) در بررسی انواع مکانیسم‌های کنترل قارچ *B. cinerea* در روی توت فرنگی با استفاده از مخلوط مخمر گونه *P.guilliermondi* و باکتری *Bacillus mycoides* توسط اسکن میکروسکوپ الکترونی به این نتیجه رسیدند که در حضور سلول‌های مخمر، کنیدی *B.cinerea* جوانه نمی‌زند و یا لوله های تندش کوتاهی ایجاد می‌کند، در مورد *B. mycoides* نیز مشخص شد که نیمی از کنیدی‌های قارچ به طور کامل تجزیه می-گردند، این مشاهدات ممکن است مربوط به حضور آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی باشد اما در حالتی که مخلوط هر دو عامل بیوکنترل استفاده شده بود، کاهش شدیدتری از جوانه‌زنی قارچ و تجزیه کنیدی نسبت به کاربرد انفرادی آنتاگونیست‌ها مشاهده کردند. البته لازم به ذکر است که مخلوط آنتاگونیست‌ها الزاما همیشه موفقیت‌آمیز نیست، در تحقیق حاضر مخلوط B2+A6 دارای کمترین کنترل‌کنندگی حتی نسبت به آنتاگونیست‌های انفرادی بود؛ دلیل آن بیشتر مربوط به ناسازگاری بین آنتاگونیست‌ها است که اساس این ناسازگاری شناخته شده نیست (Schisler *et al*. 1997 ، Leibinger *et al.* 1997). نتایج آزمایشات مربوط به انبار همچنین نشان داد که توانایی تطبیق مخمرها و باکتری *B.subtilis*با دامنه وسیع دمایی باعث می شود که انها بتوانند در مکان های مختلف اعم از سردخانه، حمل و نقل و همچنین مغازه‌ها دوام داشته و با حفظ ویژگی سازگاری با یکدیگر در حالت مخلوط سبب کاهش پوسیدگی و جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری شوند. گزارش شده است که کنترل کپک ها در سوراخ‌های ایجاد شده روی میوه به مراتب سخت تر از کنترل آنها در بریدگی های سطحی ایجاد شده روی میوه است، هرچند غلظت بالاتری از آنتاگونیست در سوراخ‌ها استفاده می شود ولی محیط سوراخ برای رشد پاتوژن در مقایسه با آنتاگونیست مناسب‌تر است (Guetsky *et al.* 2002). علاوه بر آن ثابت شده است که مکانیسم کنترل بیماری‌ها توسط عوامل بیوکنترل بیشتر شامل آنتی بیوز، رقابت برای فضا، مواد غذایی و پارازیتیسم می‌باشد و با توجه به تاثیر آنتاگونیست‌ها در القای فاکتورهای دفاعی گیاه به نظر می‌رسد که روش کنترل آنها علاوه بر موارد ذکرشده، القای واکنش‌های دفاعی گیاه نیز می‌باشد (Agrios 1988). چنین پیش‌زمینه‌ای موجب

می‌شود که میزان ترکیبات دفاعی گیاه و نقش آنها در بهبود بیوکنترل مخلوط آنتاگونیست‌ها در این پژوهش مورد بررسی قرار گیرد. نتایج آزمایشات مربوط به فعالیت پراکسیداز در روز دوم در سیب های تیمارشده با آنتاگونیست مخمری و باکتریایی به صورت انفرادی بیان کننده افزایش معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به سیب‌های شاهد سالم بود. بررسی های بیشتر نشان می‌دهند که 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 زیادی میزان آنزیم‌های پراکسیداز وکیتیناز در اثر القا با مخمر در گیاه افزایش یافت (Ramamoorthy and Samiyappan 2001) . در تحقیقی دیگر، ویسنیسکی و همکاران نشان دادند میزان آنزیم‌های دفاعی از جمله پراکسیداز هنگام بکار بردن مخمر *Pichia guilliemondii* در میوه ها افزایش می‌یابد (Wisniewski *et al.* 1991) . همچنین نتایج آزمایش نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در میوه‌های سیب الوده تیمارشده با آنتاگونیست ها به صورت مخلوط در روز دوم می‌باشد، که این نتایج منطبق با نتایج تیلاگاواتی و همکاران است که در تحقیقی برای کنترل پوسیدگی ریشه با عامل *Macrophomina phaseolina* از مخلوط *Trichoderma viride*، *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* استفاده کردند و نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز با مخلوط آنتاگونیست‌ها در ریشه به‌واسطه اثر سینرژیسم هر دو آنتاگونیست در کنار یکدیگر افزایش چشمگیری در مقایسه با کاربرد انفرادی آنتاگونیست‌ها می یابد(Thilagavathi *et al.* 2007). در روز چهارم آزمایش کاهش در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده می‌شود و علاوه بر آن سیب-های آلوده تیمارشده با مخلوط آنتاگونیست‌ها با شاهد آلوده در یک سطح قرار داشتند که این نتایج نیز منطبق با تحقیقات وانگ و همکاران می‌باشد که نشان دادند قارچ بیماریزای *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 اکسیژن های فعال (Active Oxigen Species) یک محصول طبیعی در تقابل (Interaction) میان گیاه و بیمارگر می‌باشند (Mayer et al..2001) و از سوی دیگر یک‌سری فرایندهای آنتی اکسیدانی با حضور آنزیم کاتالاز برای کاهش صدمات در سلول گیاهی ایجاد شده‌اند. طبق نتایج تحقیقات مختلف تولید AOS به قارچ‌های نکروتروف مانند *Botrytis* در کلنیزاسیون بافت گیاهی کمک می‌کنند و قارچ *B .cinerea* با فرو تنظیم‌کردن ژن مربوط به آنزیم‌های گیاهی و به طور خاص آنزیم کاتالاز مانع تجزیه طبیعی AOS در گیاه می‌گردد و در واقع با به استثمارکشیدن سیستم دفاعی گیاه سبب از هم پاشیدگی بیشتر بافت و در نتیجه سبب کلنیزه کردن بیشتر بافت گیاهی می گردد(Mayer *et al.*2001, Elad *et al.* 2004). از نتایج آزمایش مربوط به میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در میوهٔ سیب مشخص شد که مخلوط B2+A5 در روز دوم فعالیت کاتالاز را افزایش داده ولی در روز های 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 که تیمار میوه گیلاس با مخمر *Pichia membranifaciens* فعالیت CAT کاهش می‌یابد (Chan and Tian 2005). از نتایج آزمایش مربوط به میزان ترکیبات فنل در میوهٔ سیب مایه‌زنی شده با مخلوط آنتاگونیست‌ها مقدار مواد فنلی موجود در میوه‌های سیب روز دوم بعد از مایه‌زنی افزایش یافته و در روزهای متوالی نمونه‌برداری شده به تدریج افزایش می‌یابد. این نتایج بیانگر این مطلب است که میکروارگانیسم ا از جمله قارچ ا و باکتری‌ها زمانی که به صورت مخلوط به کار برده می‌شوند سبب بروز واکنش بیشتر دفاعی و نهایتا افزایش دادن میزان ترکیبات دفاعی بافت گیاه از جمله فنل کل خواهند شد (Ashraf *et al.* 1994). به طور کلی نتیجه این پژوهش بیان می کند که استفاده از آنتاگونیست ها به صورت مخلوط با یکدیگر به‌دلیل القای

بیشتر مقاومت در بافت میوه سیب، سبب بهبود کنترل بیولوژیک می شوند. همچنین استفاده از آنتاگونیست‌ها به‌صورت مخلوط برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت دستاورد امیدوارکننده‌ای است که این مواد بیولوژیک سطح کنترل قابل ملاحظه‌ای را نسبت به قارچ‌کش‌های شیمیایی به وجود آورند.

REFERENCES

Agrios GN (1988) Plant Pathology, 3rd edition. Academic Press, Inc: San Diego. 803 pp

Alavifar F (2007).Study of the possibility of biological control of gray mold on apple by of some yeast.M.S.c.dissertation , university of Tehran,Tehran,Iran (in Persian)

Ashraf MY, Azmy A H, Khan SA (1994) Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chrolophyll content in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Physiol. Plant. 16: 185–191

Bradford M M (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*,. **72**: 248-254.

Calvo J, Calvente V, Deorellano M , Benazzi D, De Tosetti M S (2003) Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apple with the use of yeast mixture . Biocontrol. 48: 579–593

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

Chen C, Belanger RR, Benhamou N and Paullitz TC (2000).Defence enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant- growth promting rhizobactria (PGPR). Physiiology and Molecular Plant Pathology 56:13-23.

Dennis C, Webster J (1971) Antagonist properties of species – groups of *Trichoderma* , .Hyphal interaction. Trans. Br . Mycol .Sco .57:363 -369

Droby S, Chalutz E, Wilson C L (1991) Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. Postharvest News Inf. 2: 169–173

Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt E E, Porat R (2002) Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Phytopathol. 92: 393-399.

EL Ghaouth A, Wilson C, Wisnnieewski M (1998) Ultrastructure and cytochemical aspect of biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in appl fruit . Phytopathol . 88 : 282- 291.

Elad Y,Williamson B, Tudzynski P, Delen N(2004) Botrytis :Biology ,Pathology and Control.Kluwer Academic Publishers.London.428pp

Etebarian H R (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.Iran .j .Plant path.24:61-62(25-28) (in Persian)

Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell K C, Sayler R J (2005) Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Microbiol. 51: 591-598.

Etebarian H R (2006) Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoat stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. J. of Agricultural Science and Technology. 8: 243-250.

Franceschi V R , Krekling A A , Berryman E (1998) Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce (*Pinaceae*) are a primary site of defense reactions. Am. J. Bot. 85:601–615.

Georgakopoulos D G , Fiddaman C, Leifert N , Malathrakis E (2002) Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. J. of Applied Microbiology. 92(6):1078–1086

Gong Y, Toivonen M A, Lau O L, Wiersma A (2001) Antioxidant system level in Braeburn apple is related to its browing disorder. Bot. Boll. Acad.Sin..259-64.

Guetsky R , Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinoor A (2002) Improvement biological control by combining biocontrol Agents Each with several Mechanisms of Diseade suppression .Phytopathology 92:976-985

Ippolito A , ELGhaouth A, Wilson C L , Wisniewski M (2000) Control postharvest decay of apple fruit by *Areubasidium pullulans* and induction of defense responses. Postharvest Boil. Technol.19: 265-272.

Janisiewicz W J (1988) Biocontrol of post harvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathol .78**:**194–198.

Janisiewicz W J , and Bors B (1995) Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. Appl. Environ. Microbiol. 61:3261-3267.

Janisiewicz W (1996) Ecological diversity, nich overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixture for biocontrol of postharvest disease of apple . phytopathology 86 :473-479

Leibinger W, Breuker B, Hahn M, Mendgen K (1997) Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface antagonistic microorganisms in the field. Phytopathol .87:1103- 1110.

Mayer A M, Staples R C, Gil-ad N L (2001) Mechanisms of the reduction of pathogens in hosts expressing the hypersensitive respone. Phytopathol .58 : 33 – 41

Ramamoorthy V and Samiyappan R (2001).Induction of defense relate gene in *Pseudomonase fluorescens* treat chilli plant in response to infection by *Colletotrichum capsici*.Journal of Mycology and plant pathology 31:146-155

Schisler D A , Slininger P J, Bothast R J (1997) Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. Phytopathology 87:177-183.

Thilagavathi R ,Saravanakumar S, Ragupathi N, Samiyappan R (2007)A combination of biocontrol agents improves the management of dry root (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. Phytopathol . 46: 157–167.

Toure Y, M Ongena P, Jacques A, Guiro, Thonart P (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol. 96: 1151–1160

Wang YS, Tian S,Xu Y,Qin G Z,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 Biol. Technol. 34: 21–28.

Wilson M Lindow S L (1994) Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice+) *Pseudomonas syringa*e strains and non-icenucleating (Ice-) biological control agent. Appl. Environ. Microbiol . 60: 3128–137.

Wisniewski M, Biles C, Droby S, MC Laughlin R ,Wilson C and Chalutz E (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast *Pichia guilliemondii* characterization of attachment to *Botrytis cinerea* .Physiological and Molecular Plant Pathology.39:245-258

Biological control of gray mold on apple by combining of some yeast and *Bacillus subtilis* isolates and induction of defense responses

ZANGOEI E.[1*], ETEBARIAN H.R. [2] AND SAHEBANI N.[3]
1, 2, 3, Plant protection Dep. of Abourayhan Campus, University of Tehran

ABSTRACT

The biocontrol agents *Candida membranifuciens* (isolates A4 and A5), *Pichia guilliermondi* (A6) and *Bacillus subtilis* (B2 and B6) were tested both individually and in combination for biological control of the grey mold in fruit apple caused by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. Regarding the compatibility of the biocontrol agents, it showed that antagonists were compatible with each other according to in vitro antibiosis and cell-free metabolite by applying cellophane test. The interaction of the antagonists in liquid media showed that the growth of yeast isolates was not affected by the presence of *B. subtilis* isolates, and then the yeast population increased until the end of the experiment. Results of storage experiments of yeast, bacteria and their mixture indicated that the lesion diameters caused by the biocontrol agents combinations of B2+A5 and B6+A6 treated fruit were 5.23 and7.43mm, respectively, at 20 C° and 3.48 and 3.87 mm for 4 °C respectively, that provided better control than the antagonist alone. The combination of B2+A5 caused an increase in peroxidase activity and phenolic accumulation showing a maximum level 2 day after pathogen inoculation. This combination decreased catalase activities 4 day after pathogen inoculation. These results indicated that by using antagonist mixtures, it is possible to further of induction of resistance in apple fruits and improving biological control.

Keywords: *Botrytis cinerea* , mixture antagonists, gray mold ,peroxidase, catalase and Phenol

* Correspounding author: E. Zangoei E-mail: zanguei@hotmail.com