مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۲ شماره ۴ صفحه های ۴۶۵ تا ۴۸۲ (۱۴۰۰)
مقاله پژوهشی

# کنترل زیستی کپک خاکستری و انگیزش پاسخ‌های دفاعی در گیلاس رقم تک دانه مشهد توسط باکتری *Bacillus subtilis* و اسانس مرزنجوش[1]

# Biological Control of Gray Mold and Induction of Defense Responses in Sweet Cherry (*Prunus avium* L. cv. Takdaneh Mashhad) by *Bacillus Subtilis* and Oregano Essential Oil

چنور حسینی*، محمدرضا اصغری و مریم خضری[2]

## چکیده

کپک خاکستری یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای میوه گیلاس محسوب می‌شود. در پژوهش حاضر، توانایی مهار زیستی قارچ‌های بیمارگر توسط باکتری آنتاگونیست و تأثیر افزودن اسانس مرزنجوش بر رشد قارچ بیمارگر ارزیابی گردید. براساس نتیجه‌ها، با افزایش غلظت اسانس میزان رشد قارچ‌ها کاهش پیدا کرد. در شرایط درون بدنی (*In vivo*)، میوه‌های گیلاس با سوسپانسیون قارچ بیمارگر به غلظت $10^5$ هاگ در میلی‌لیتر آلوده‌سازی شدند، سپس به‌طور جداگانه با سوسپانسیون با غلظت $10^8$ یاخته در میلی‌لیتر سویه منتخب باکتری آنتاگونیست و اسانس مرزنجوش در ۵ سطح تیمار شدند و پارامترهای کیفی در سه زمان صفر، ۱۵ و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه‌ها نشان داد که تیمار باکتری باسیلوس و اسانس مرزنجوش در غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر مؤثرترین تیمار در افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز بودند. میزان فنول کل و محتوای آنتوسیانین در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر بعد از گذشت ۳۰ روز بیشترین مقدار را داشتند. بالاترین میزان آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز بعد از گذشت ۱۵ روز در غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر ثبت شد. براساس نتیجه‌های پژوهش حاضر، سازوکار باکتری *B. subtilis* و اسانس مرزنجوش در کنترل کپک خاکستری گیلاس به احتمال ناشی از انگیزش مقاومت در میوه گیلاس و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی اکسیدان، ترکیب‌های فنولی، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، سیستم دفاعی، مهار زیستی.

## مقدمه

گیلاس از تیره وردسانان و یک درخت میوه هسته‌دار می‌باشد که به‌طور معمول در آب و هوای معتدل رشد می‌کند. این میوه دارای مقادیر قابل توجهی ویتامین‌ها و ترکیب‌های فنولی است که نقش آنتی‌اکسیدانی دارند، با وجود سودمندی‌های فراوان، گیلاس میوه‌ای فسادپذیر است که به سرعت دچار پوسیدگی می‌شود. این امر یکی از عوامل مهم افزایش نابسامانی‌های پس از برداشت است که مدت زمان نگهداری و عمر محصول را می‌کاهد. چنین پوسیدگی‌هایی اغلب ناشی از قارچ‌هایی مانند *Botrytis cinerea*، *Penicilium expansum* و *Monilia* spp. است (۳۱). بیماری کپک خاکستری ناشی از *B. cinerea* به عنوان مشکل مهم پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها در طول نگهداری و حمل و نقل شناخته می‌شود. قارچ بوتریتیس می‌تواند دمای پایین را تحمل کند و از آنجایی که اسپور فراوانی تولید می‌کند، در مدت زمان کوتاه توانا به ایجاد بیماری شدید است و به همین دلیل

---

۱- تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:

۲- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه و استادیار مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (chnoor.hosseini123@gmail.com).

[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای پس از برداشت محصول‌های باغی محسوب می‌شود. در برخی منابع این قارچ به‌عنوان دومین بیمارگر مهم در آسیب‌شناسی گیاهی معرفی شده است (۵۷). گرچه کنترل بیماری‌های پس از برداشت با استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی، که به‌صورت سنتی صورت می‌گیرد، آسان‌ترین و بیشتر موثرترین روش است، اما با توجه به پیدایش شمار چشمگیری از عوامل بیماری‌زای مقاوم به قارچ‌کش‌ها و نگرانی عمومی مصرف‌کنندگان در رابطه با خطرهای احتمالی بقایای ماده‌های شیمیایی در محصولات کشاورزی، نیاز به روش‌های جایگزین وجود دارد. با افزایش آگاهی در مورد سلامت ماده‌های غذایی، محدودیت استفاده از ترکیب‌های شیمیایی و کاهش بارهای کاربرد این ترکیب‌ها نیز افزایش یافته است (۱۳). افزون بر آن، استفاده از روش‌های مدیریتی دیگر که برای مصرف‌کنندگان و محیط زیست خطری نداشته باشد، همواره مورد توجه پژوهشگران و دوستداران محیط زیست بوده است. مهار زیستی بیماری‌های گیاهی یکی از روش‌هایی است که در مقایسه با قارچ‌کش‌های شیمیایی دارای مزایایی چون عاری بودن از بقایای ترکیب‌های سمی، سازگاری با محیط زیست، کاربرد ایمن و آسان می‌باشد (۸). استفاده از آنتاگونیست‌های میکروبی به‌عنوان یک روش جایگزین امیدوارکننده با اثر زیست محیطی کم، به‌تنهایی یا به‌عنوان بخشی از برنامه مدیریت کاهش کاربرد قارچ‌کش‌های مصنوعی شناخته شده است. آنتاگونیست‌های میکروبی موجودات زنده‌ای هستند که حاوی مجموعه‌ای از سازوکارها برای مبارزه با بیمارگرهای قارچی پس از برداشت می‌باشند. مکانیسم اولیه عملکرد آنتاگونیست‌ها، اغلب مربوط به رقابت بر سر ماده‌های غذایی و مکان استقرار با بیمارگرهای قارچی است. همچنین تشکیل زیست لایه[۱] تولید ترکیب‌های آلی فرار، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره یاخته‌ای قارچ‌ها، انگل‌زدایی و تحریک سیستم‌های دفاعی گیاه میزبان از دیگر مکانیسم‌های فعالیت آنتاگونیست‌ها می‌باشد (۱۳). گونه‌های باکتری باسیلوس به سرعت در محیط کشت رشد می‌کند و در شرایط محیطی و تغذیه‌ای دشوار، به راحتی اسپور داخلی تشکیل می‌دهند. این اسپورها مقاومت بالایی به تیمارهای شیمیایی مانند حلال‌های آلی، تیمارهای فیزیکی مانند تغییرهای دمایی شدید، اشعه‌های مضر، کاهش فشار اکسیژن و همچنین کمبود ماده‌های غذایی دارند (۱۱). در مطالعه‌ای توسط Sharma و همکاران (۴۷) با هدف بررسی تأثیر تیمار باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* LY-1 روی ویژگی‌های کیفی و بیوشیمیایی میوه لیچی پس از برداشت، بیان گردید که تیمار باکتری در پایان مدت زمان نگهداری باعث حفظ و افزایش میزان اسیدیته قابل تیتراسیون، ویتامین C و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، کیتیناز و بتا ۱و۳ گلوکاناز شد. بنابراین، باکتری باسیلوس با جلوگیری از ایجاد پوسیدگی و کاهش وزن و همچنین حفظ ویژگی‌های کیفی، ماندگاری میوه لیچی در طول زمان پس از برداشت را افزایش داد (۵۵). در پژوهشی دیگر، قدرت مهار زیستی باکتری *B. amyloliquefaciens strain* BUZ-14 علیه سه مورد از بیمارگرهای مهم پس از برداشت میوه‌های هسته‌دار بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که تیمار باکتری باسیلوس پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از قارچ *Monilinia Fracticola* را به‌طور کامل کنترل نمود، همچنین با اعمال این تیمار میکروبی، بازدارندگی رشد به میزان ۸۰ و ۶۰ درصد به ترتیب در قارچ‌های بیمارگر پس از برداشت *P. expansum* و *B. cinera* مشاهده شد (۱۱).

استفاده از گیاهان حاوی ترکیب‌های بازدارنده از رشد عوامل میکروبی، افزون بر بهبود عمر پس از برداشت محصول‌ها، برخورداری از غذای سالم را هم نوید می‌دهند. اسانس‌های گیاهی به دلیل ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی و تنظیم‌کنندگی زیستی، برای استفاده در صنعت غذا توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۲۲). مرزنجوش (*Origanum vulgar* L/) از تیره نعناسانان است. این گونه گیاهی، علفی و چندساله بوده و در ایران دارای سه زیرگونه *vulgare*، *gracile* و *viride* می‌باشد (۳۴). ترکیب فنولی کارواکرول از مهم‌ترین ترکیب‌های موجود در گیاه مرزنجوش است. اسانس مرزنجوش به عنوان یک مهارکننده رشد گونه‌های قارچی، از جمله عوامل بیماری‌زای پس از برداشت مطرح می‌باشد. همچنین، به دلیل ویژگی ضدمیکروبی از رشد بسیاری از باکتری‌ها جلوگیری می‌نماید که این اثر را به غلظت و نسبت ترکیب‌های فنولی ارتباط داده‌اند. از جمله ویژگی‌های مهم این اسانس می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن اشاره نمود (۴۴). در مطالعه‌ای تأثیر اسانس مرزنجوش به همراه صمغ بذر بابونه روی میوه برداشت شده زردآلو بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که اضافه کردن اسانس مرزنجوش به‌طور قابل توجهی جمعیت میکروبی و نفوذپذیری آب و رطوبت را

---

۱- Biofilm



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

کاهش داد و در تمام تیمارهای دارای اسانس مرزنجوش، میزان ترکیب‌های فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پایان مدت زمان نگهداری نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد (۲۰).

با توجه به اهمیت کنترل و کاهش خسارت ناشی از بیماری پس از برداشت ایجاد شده توسط کپک خاکستری روی میوه گیلاس، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تاثیر کاربرد سویه‌هایی از باکتری باسیلوس سابتیلیس و اسانس مرزنجوش جهت مهار زیستی این بیماری قارچی و همچنین اثر اسانس مرزنجوش جهت افزایش عمر و ماندگاری میوه گیلاس و انگیزش سیستم‌های دفاعی در آن انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه میوه

میوه‌های گیلاس رقم تک دانه مشهد در مرحله رسیدن تجاری (TSS=٪۱۷) در تیر ماه سال ۱۳۹۶ از یکی از باغ‌های شهرستان اشنویه برداشت شد. میوه‌های دارای شکل‌های غیرطبیعی و عوارض فیزیکی حذف شدند و میوه‌های با ویژگی‌های ظاهری و فیزیکی مناسب و نیز سطح رسیدگی و بلوغ یکنواخت انتخاب و جهت انجام تیمارها به آزمایشگاه و سردخانه گروه باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شدند.

### تهیه گیاه مرزنجوش و استخراج اسانس آن

ماده‌های گیاهی شامل پیکره رویشی گیاه مرزنجوش، از دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه شد. پس از خرد کردن ۳۰۰ گرم گیاه، اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت انجام شد. اسانس به‌دست آمده بعد از آب‌گیری در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس درون یخچال تا زمان انجام آزمون‌های زیستی و بررسی ترکیب‌های آن نگه‌داری شد (۳۳).

### شرایط کشت و نگهداری ریزانداموارهها

#### قارچ بیمارگر

یک سویه از قارچ بیماری‌زای *B. cinera* از مجموعه میکروبی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه دریافت شد. این سویه روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA[۱]) کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از رشد کامل پرگنه[۲] قارچ، در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۷).

#### باکتری آنتاگونیست

سویه‌های باکتری *B. subtilis* از کلکسیون میکروبی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه دریافت شدند. برای نگهداری کوتاه مدت، سویه‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار کشت و به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ $^{\circ}$C قرار داده شدند. پس از رشد پرگنه‌های باکتریایی، آن‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. برای نگه‌داری بلند مدت باکتری‌ها، از سوسپانسیون باکتری در گلیسرول ۲۵٪ در دمای ۲۰- درجه سلسیوس استفاده شد (۱).

#### تهیه سوسپانسیون قارچ عامل بیماری

قارچ عامل بیماری، روی محیط کشت PDA کشت شد. پس از هفت روز جهت تهیه سوسپانسیون اسپور، مقداری از اسپور قارچ عامل بیماری برداشت شد و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۸۰ شناور گردید. با استفاده از لام هموسیتومتر غلظت اسپور به میزان $1\times10^{5}$ اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد (۱۹).

#### تهیه سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست

جهت تهیه سوسپانسیون باکتری، یک لوپ از پرگنه باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع نوترینت براث (NB[۳]) افزوده شد و ارلن مایرها روی شیکر با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس یاخته‌های باکتری با سانتریفیوژ ۳۰۰۰×g به مدت ده دقیقه از محیط مایع جدا شده و دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از آن با استفاده از اسپکتروفتومتر، سوسپانسیون باکتری در غلظت $10^{8}$ یاخته در میلی‌لیتر تهیه گردید (۲۴).

---

۱- Potato Dextrose Agar ۲- Colony ۳- Nutrient Broth



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

**سنجش تأثیرهای ضدقارچی اسانس در شرایط آزمایشگاه**

اثر بازدارندگی اسانس مرزنجوش علیه قارچ *B. cinera* با افزودن غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر به محیط کشت و در سه تکرار سنجش شد. به این منظور، ابتدا اسانس‌ها با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر سترون شدند. پس از تهیه و سترون کردن محیط کشت، هنگامی که دمای محیط کشت به حدود ۴۵ درجه سلسیوس رسید، از غلظت‌های مورد نظر اسانس در محلول ۰/۰۵ درصد توئین۸۰، امولسیون تهیه گردید و به محیط کشت اضافه شد. دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه در حال رشد قارچ *B. cinera* در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت قرار داده شد. سپس تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند (۴۹).

به منظور سنجش درصد بازدارندگی اسانس روی رشد میسلیومی قارچ، در فواصل زمانی مشخص شیوه رشد پرگنه قارچ بازبینی شد. زمانی که رشد قارچ بیمارگر در تیمار شاهد به حاشیه تشتک پتری رسید، میزان رشد قارچ در تیمارهای مختلف به عنوان معیار سنجش اثر بازدارندگی اسانس تعیین شد. با اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ در تشتک‌های پتری تیمار و شاهد، درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط ترکیب‌های ضدقارچی موجود در اسانس از رابطه $n=(a-b)/a\times100$ محاسبه گردید که در آن n درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری، a مساحت پرگنه قارچ در پتری شاهد و b مساحت پرگنه قارچ در پتری تیمار می‌باشد (۳۷).

**بررسی اثر باکتری آنتاگونیست بر رشد قارچ در محیط آزمایشگاه**

به منظور ارزیابی اثر جدایه آنتاگونیست بر رشد عامل بیماری، آزمون کشت متقابل بیماری انجام شد. این آزمون‌ها روی محیط کشت PDA در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

**تیمار میوه‌ها با قارچ عامل بیماری و باکتری آنتاگونیست**

میوه‌های گیلاس به روش غوطه‌وری در سوسپانسیون با غلظت $10^5$ اسپور در میلی‌لیتر قارچ بیمارگر آلوده‌سازی شدند. سپس روی میوه‌های آلوده، سوسپانسیون با غلظت $10^8$ یاخته در میلی‌لیتر سویه منتخب باکتری آنتاگونیست محلولپاشی شد. پس از خشک شدن میوه‌های تیمار شده، آن‌ها در ظرف‌های پلی‌استایلن قرار داده شدند و در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰٪ به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. میوه‌های شاهد با آب مقطر سترون تیمار گردیدند.

**تیمار میوه‌ها با عامل بیماری و اسانس مرزنجوش**

آلوده‌سازی میوه‌های گیلاس به روش غوطه‌وری در سوسپانسیون با غلظت $1\times10^5$ اسپور در میلی‌لیتر قارچ بیمارگر صورت گرفت. پس از تهیه امولسیون اسانس در محلول ۰/۰۵ توئین ۸۰، میوه‌های آلوده با پنج سطح (صفر (شاهد)، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر) اسانس مرزنجوش به صورت اسپری تیمار شدند. پس از خشک شدن، میوه‌ها در ظرف پلی‌استایلن قرار داده شدند و در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰٪ به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. میوه‌های شاهد با آب مقطر سترون تیمار شدند.

**آزمایش ویژگی‌های کیفی میوه**

میوه‌ها بعد از خروج از سردخانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس ویژگی‌های زیست‌شیمیایی در روز برداشت (پیش از تیمار)، پس از ۱۵ و ۳۰ روز نگهداری در سردخانه، اندازه‌گیری شدند. ویژگی‌های مورد مطالعه شامل میزان فنول کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم پلی فنول اکسیداز و آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) بود.

**اندازه‌گیری میزان فنول کل**

اندازه‌گیری فنول کل با استفاده از معرف فولین سیوکالچو صورت گرفت. بعد از تهیه ۲ میلی‌لیتر عصاره میوه و سانتریفیوژ با سرعت g ۴۰۰۰، مقدار ۵ میکرولیتر در لیتر از رونشین برداشته و ۱۸۰ میکرولیتر در لیتر آب دیونیزه به آن اضافه شد. سپس مقدار ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر فولین به آمیخته افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه به آن کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه گردید. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شدند و در نهایت میزان جذب نور در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل MODEL: UV2100 PC) اندازه‌گیری شد. آب دیونیزه به‌عنوان شاهد و گالیک اسید به‌عنوان



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. منحنی استاندارد بر اساس گالیک اسید ترسیم و نتیجه‌ها به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن تر میوه گزارش شد (۱۵).

**اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH**

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه‌های گیلاس، به روش DPPH[۱] مقدار ۵ میکرولیتر در لیتر عصاره میوه در یک لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۲۰۰۰ میکرو لیتر از محلول DPPH آماده با غلظت ۰/۰۰۰۴ اضافه گردید. آمیخته حاصل پس از تکان دادن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و سپس میزان جذب نور در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. شاهد (بلانک) نیز به روش بالا تهیه گردید و تنها به جای عصاره میوه، مقدار ۵۰ میکرولیتر در لیتر متانول ۸۰٪ استفاده شد (۳۶).

$$\mathrm{RSA} = \left(\frac{(Abs\ control)t = 30\ min - (Abs\ sample)t = 30\ min}{(Abs\ control)t = 30\ min}\right) \times 100$$

که در رابطه بالا؛ Abs blank میزان جذب بلانک و Abs sample میزان جذب نمونه هستند.

**اندازه‌گیری اسکوربیک اسید (ویتامین C)**

میزان اسکوربیک اسید عصاره میوه براساس کاهش رنگ دی‌کلروفنول ایندوفنول (DCPIP) توسط اسکوربیک اسید اندازه‌گیری شد (۸). در این روش مقدار یک گرم از بافت گوشت و پوست میوه با ۳ میلی‌لیتر متافسفریک‌اسید (۱ درصد) مخلوط شد و پس از گذشت نیم ساعت، آمیخته بالا در دمای ۴ درجه سلسیوس و سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. صد میکرولیتر در لیتر از رونشین برداشته شد و ۲/۵ میلی‌لیتر DCPIP به آن اضافه گردید. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد (blank) دارای ترکیب‌های بالا به جز عصاره میوه بود. منحنی استاندارد اسکوربیک اسید با استفاده از غلظت‌های مختلف اسکوربیک اسید (۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴ و ۰/۰۵ گرم در لیتر) در حضور DCPIP رسم شد.

**آنزیم پلی فنول اکسیداز**

فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز به روش Pizzaocaro و همکاران (۳۹) و بر اساس اکسیداسیون کاتکول اندازه‌گیری شد. تقریباً ۲/۵ میلی‌لیتر ماده بافری (بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (۱۷/۹ گرم فسفات سدیم، ۷/۸ گرم فسفات‌دی‌هیدروژن سدیم، pH=۶/۴) و ۵۰ میلی‌مولار کاتکول) به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی اضافه شد و پس از قرار دادن در بن‌ماری در دمای ۲۵ $^{\circ}$C به مدت ۵ دقیقه منحنی تغییرهای جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی شامل میزان تغییر PPO به مقدار ۰/۰۰۱ در دقیقه در میلی‌لیتر از عصاره آنزیم بود. فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز از رابطه $(\Delta A \times 1000)/(0/001 \times 25)$ محاسبه شد که در آن $\Delta A$ اختلاف جذب و ۲۵ میزان گرم آنزیم به‌کار رفته می‌باشد.

**آنتوسیانین**

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین کل از روش Wagner (۵۲) استفاده شد. حدود ۰/۱ گرم از بافت تازه میوه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) به‌طور کامل ساییده و عصاره خالص به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و برای محاسبه غلظت، ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول در نظر گرفته شد.

**اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)**

برای سنجش فعالیت آنزیم PAL از روش Karthikeyan و همکاران (۲۷) با کمی تغییر استفاده شد. مقدار ۱ گرم از بافت تازه میوه با استفاده از ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر بورات ۰/۱ مولار، ۰/۱ درصد پلی وینیل پیرولیدون و ۱/۴ میلی‌مولار مرکاپتو اتانول، pH=۷) کوبیده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ از رونشین برای سنجش آنزیم استفاده شد. محتوای نمونه برای سنجش آنزیم حاوی

---

۱- Diphenylhydrazyl



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

۳۰ میکرولیتر در لیتر عصاره آنزیمی، ۱ میلی‌لیتر بافر سنجش (بافر بورات ۰/۱ مولار، ۰/۱ درصد پلی وینیل پیرولیدین و ۱/۴ میلی‌مولار مرکاپتواتانول) با pH=۸/۸ و ۱ میلی‌لیتر L- فنیل‌آلانین ۱۲ میلی‌مولار بود که به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۳۰°C قرار داده شد و جذب نور در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. محاسبه فعالیت آنزیم PAL با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی l.cm-µ و برحسب n mol FW min (نانومول در یک گرم وزن تازه در دقیقه) انجام گردید.

**واکاوی آماری داده‌ها**

داده‌های به‌دست آمده در این پژوهش، با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.4)، بر اساس طرح فاکتوریل سه عاملی در قالب طرح به طور کامل تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین ویژگی‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و شکل‌ها با برنامه Excel رسم شدند.

# نتایج و بحث

**نتیجه‌های آزمایش‌های درون شیشه‌ای (*In vitro*)**

نتیجه‌ها نشان می‌دهد که اثر اصلی باکتری باسیلوس، اسانس مرزنجوش و همچنین برهمکنش این دو بر رشد قارچ‌های بوتریتیس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. براساس شکل ۱، باکتری باسیلوس در غلظت ۱۲۵ میکرولیتر در لیتر اسانس به‌میزان ۸۰٪ و در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر ۶۹٪ مانع از رشد قارچ بوتریتیس شد.

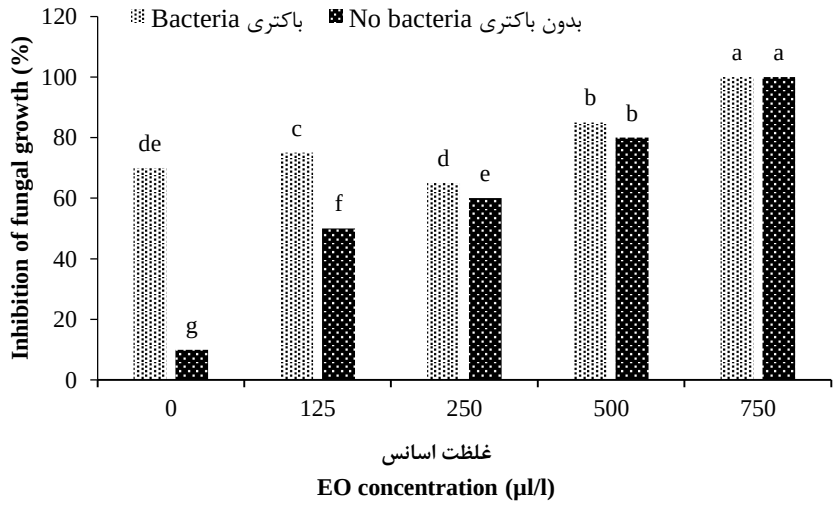


Fig 1. Interaction effects of *Bacillus subtilis* and oregano essential oil on the growth inhibition of *Botrytis cinerea*. Non identical letters indicates a significant difference at 5% probability level among means based on Duncan test.

شکل ۱- اثر برهمکنش باکتری باسیلوس و اسانس مرزنجوش بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ *Botrytis cinerea*. حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد در بین تیمارها می‌باشد.

گونه‌های باکتری باسیلوس دارای ویژگی‌های یاخته‌ای مختلفی از جمله تولید اندوسپور در شرایط نامساعد هستند. تولید آنزیم تجزیه‌کننده، ترکیب‌های آلی فرّار و آنتی‌بیوتیک‌ها از سازوکارهای عمل باکتری باسیلوس می‌باشند. از میان این‌ها، ماده‌های آلی فرّار تولید شده توسط باکتری باسیلوس بیشتر مورد توجه قرار گرفته و نقش مهمی در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی دارد. مشاهده‌های میکروسکوپی نشان داده‌اند که ترکیب‌های آلی فرّار تولید شده توسط باکتری باسیلوس باعث تغییر در ریخت‌شناسی قارچ *Penicillium crustosum* می‌شوند (۱۶). همچنین ترکیب‌های آلی فرّار گونه‌های باسیلوس نه تنها مانع از رشد ریسه قارچ می‌شود بلکه در تندش و طویل شدن اسپور قارچ‌های *B. cinerea*، *Penicillium* spp. و *Fusarium oxyxporum* نیز تأثیرگذار می‌باشد (۱۶). این مشاهده‌ها نشان می‌دهد که از ترکیب‌های آلی فرار باکتری باسیلوس می‌توان به‌عنوان روشی برای کنترل بیمارگرهای قارچی استفاده کرد. قاسمی و همکاران (۱۸) در مطالعه‌ای نشان دادند که باکتری *B. subtilis* توانست به‌ترتیب به میزان ۶۸/۸ و ۸۱/۷ درصد از رشد قارچ‌های *Alternaria alternata* و *Penisilium* spp. جلوگیری کند. همچنین،



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

باکتری *Pseudomonas fluorescens* به ترتیب به میزان ۶۲/۲ و ۲۴/۳ درصد از میزان رشد قارچ‌های *A.alternata* و *Penisilium* spp. جلوگیری کرد. افزون بر این، در پژوهشی تأثیر ده سویه باکتری روی قارچ بیمارگر با استفاده از آزمون کشت متقابل، متابولیت‌های فرّار و تولید مایع خارج از یاخته‌ای در شرایط آزمایشگاه انجام شد. نتیجه‌ها نشان داد که باکتری‌های مورد آزمایش، در هر سه آزمون، رشد قارچ بیمارگر را کاهش دادند، اما میزان کاهش در سویه‌های مختلف متفاوت بود (۲). گزارش‌هایی در مورد کنترل زیستی علیه قارچ بوتریتیس روی گوجه فرنگی وجود دارد که نشان می‌دهد مخمر آنتاگونیست *Cryptococcus laurenti* به‌طور موثری باعث کاهش پوسیدگی گوجه فرنگی پس از برداشت به دنبال فعالیت قارچ بوتریتیس شده است (۱۴).

نتیجه‌های حاصل از پژوهش حاضر نشانگر اثر بازدارندگی اسانس مرزنجوش روی رشد و اسپورزایی قارچ بوتریتیس نیز بود. برخی از اسانس‌های گیاهی از جمله مرزنجوش، آویشن و لیمو در شرایط درون و برون شیشه‌ای در برابر بیمارگرهای مهمی همچون پنی‌سیلیوم و بوتریتیس فعالیت ضدقارچی نشان داده‌اند (۴۳). در پژوهشی مشابه، تأثیر سه اسانس دارچین، لیمو و مرزنجوش بر علیه سه قارچ بیمارگر *Pilidiella granati*، *Botrytis* sp. و *Penicilium* sp. بررسی شد و مشخص گردید که هر سه اسانس ویژگی ضدمیکروبی دارند. تأثیر بازدارندگی از رشد قارچ‌های مورد مطالعه در اسانس مرزنجوش بیشتر از سایر تیمارها بود (مرزنجوش>دارچین>لیمو) و بیشتر بودن تأثیر اسانس مرزنجوش به میزان کارواکرول در ترکیب‌های اسانس برمی‌گردد. نقش کارواکرول به عنوان ترکیب ضدمیکروبی در مطالعه‌های زیادی اثبات شده است (۳۵). ترکیب‌های فنولی به‌عنوان حامل یون‌های تک ظرفیتی به داخل سیتوپلاسم و انتقال پتاسیم و فسفر به خارج از سیتوپلاسم بیمارگر عمل می‌کنند. این ترکیب‌ها به‌عنوان ترکیب‌های آب‌دوست در اسانس‌های گیاهی در قسمت آب‌دوست غشای سیتوپلاسمایی بین زنجیره‌های آسیل لیپید حل شده، غشای بیرونی را تجزیه کرده و نفوذپذیری غشا یاخته‌های بیمارگر را نسبت به آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) افزایش می‌دهند که سرانجام منجر به مرگ آن‌ها می‌شود (۲۳).

## نتیجه‌های آزمون‌های فیزیولوژیکی

### فنول کل

نتیجه‌های این مطالعه نشان می‌دهد که اثر ساده اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری در سطح احتمال ۱ درصد بر محتوای فنول کل معنی‌دار بوده است. همچنین، برهمکنش اسانس مرزنجوش و زمان نگهداری، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری، اسانس مرزنجوش و باکتری باسیلوس در سطح احتمال ۱ درصد بر محتوای فنول کل معنی‌دار بوده است. در این پژوهش، با افزایش زمان نگهداری میوه، تیمار اسانس مرزنجوش باعث افزایش محتوای فنول کل نسبت به روز اول شد (شکل ۲- الف). تمام تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری بودند و با افزایش غلظت اسانس، محتوای فنول کل افزایش یافت. بیشترین محتوای فنول کل در تیمار ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس در روز ۳۰ام مشاهده شد.

شکل ۲- ب نشان‌دهنده برهمکنش باکتری باسیلوس و زمان نگهداری بر محتوای فنول کل می‌باشد. تیمار باکتری در هر دو زمان دارای اختلاف معنی‌داری با میوه‌های تیمار نشده و زمان شاهد می‌باشد و بیشترین میزان فنول در روز ۳۰ام در تیمار باکتری مشاهده شد. در بررسی برهمکنش باکتری باسیلوس و اسانس مرزنجوش بر محتوای فنول کل، در غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر بالاترین میزان محتوای فنول مشاهده شد (شکل ۲- پ). همچنین، در تیمارهای ترکیبی، محتوای فنول کل میوه‌های تیمار شده با باکتری باسیلوس نسبت به میوه‌های تیمار نشده دارای اختلاف معنی‌داری بودند. در تیمار ترکیبی باکتری و اسانس با غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر، محتوای فنول تیمار بدون باکتری بالاتر بود که به احتمال غلظت بالای اسانس، مانع رشد باکتری و تاثیرگذاری آن در سیستم دفاعی میوه شده است.

از آنجایی که ترکیب‌های فنولی در کیفیت تغذیه‌ای[1] و ظاهری میوه (مانند رنگ، سفتی، مزه، طعم) نقش دارند و همچنین به عنوان یک مکانیسم دفاعی یاخته‌ها در برابر عوامل نامساعد عمل می‌کنند، مطالعه‌های زیادی به نقش ترکیب‌های فنولی در مکانیسم‌های دفاعی در جریان پاسخ به آلودگی‌های میکروبی یا آسیب‌ها غیرمیکروبی پرداخته‌اند (۲۱). ماده‌های فنولی مانند مشتق‌های اسید بنزوئیک در خلال آلودگی گیاه به عوامل بیماری‌زا تولید و انباشت می‌یابند. این امر در نتیجه فعال شدن آنزیم کلیدی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) رخ می‌دهد. این آنزیم، فنیل‌آلانین را به ماده‌های فنولی مختلف تبدیل می‌کند.

---

۱- Nutritional quality



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

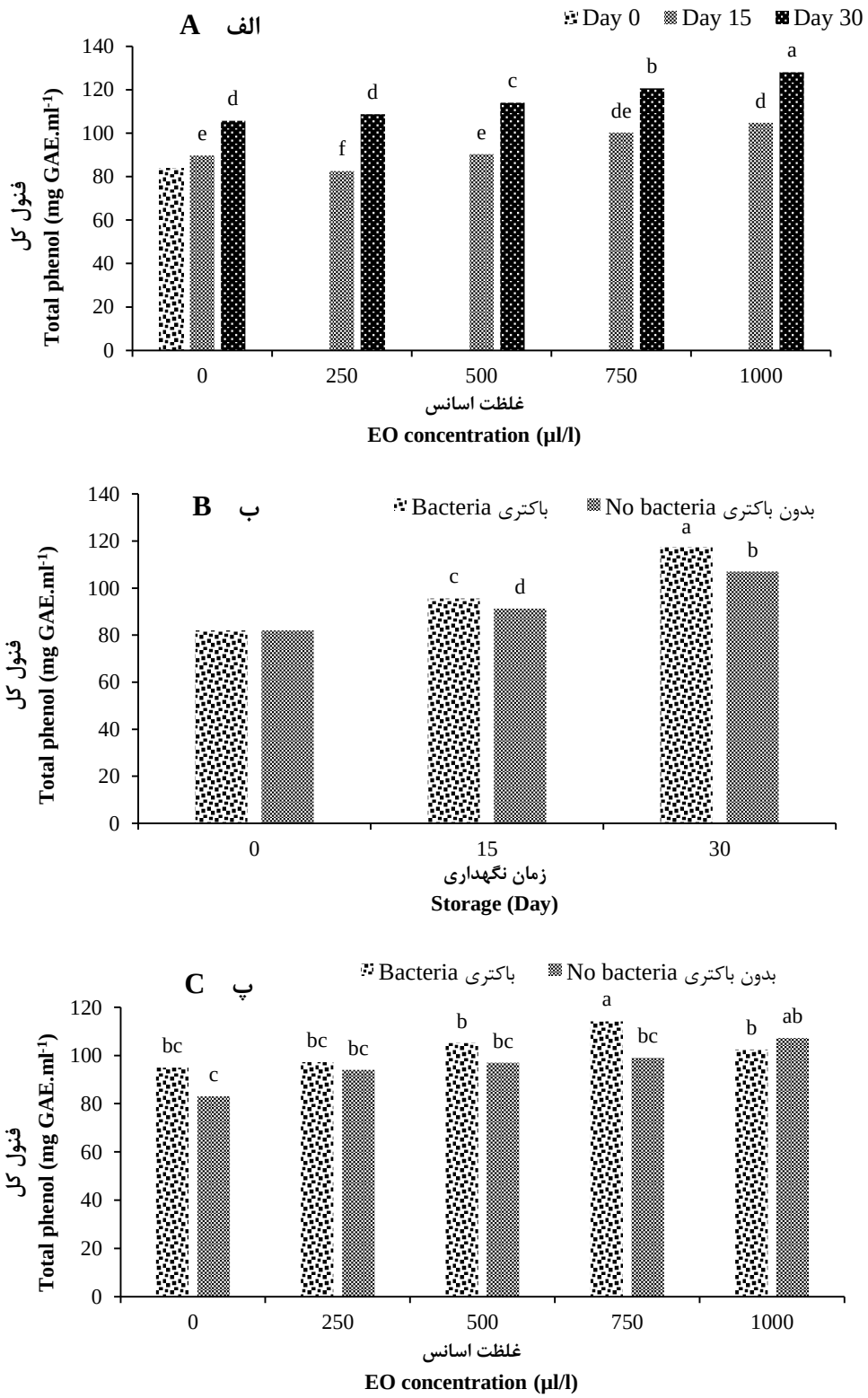


Fig 2. Oreganom essential × storage day (A), *Bacillus subtilis* × storage day (B), and oreganom essential × *Bacillus subtilis* (C) interactions on the total phenol of sweet cherry stored for 30 days at 0±1°C with 90–95% relative humidity. Non identical letters indicate a significant difference at 5% probability level among means with Duncan test.

شکل ۲- برهمکنش اسانس مرزنجوش در زمان نگهداری (الف)، باکتری باسیلوس در زمان نگهداری (ب) و اسانس مرزنجوش در باکتری باسیلوس (پ) بر محتوای فنول کل میوه گیلاس طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ الی ۹۵ درصد. حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد در بین تیمارها می‌باشد.



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

فنیل‌آلانین‌آمونیالاز اولین آنزیم در مسیر فنیل‌پروپانوئید است که در زیست‌ساخت فنول‌ها، فیتوآلکسین‌ها و لیگنین‌ها دخالت دارد. اسانس‌ها با تاثیر بر فعالیت این آنزیم باعث حفظ و افزایش محتوای فنول کل در گیاه شده و در نهایت منجر به فعال شدن سیستم دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها می‌شوند (۳). از طرفی اسانس‌ها با ایجاد اتمسفر تغییریافته در پیرامون میوه و حفظ $CO_2$ در سطحی بالاتر از حالت طبیعی منجر به کاهش تنفس و واکنش‌های اکسیداسیون می‌شوند. با کاهش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز، فنول‌ها در سطح بالاتری حفظ می‌گردند، همچنین در میزبان بروز مقاومت به دو صورت مقاومت القائی موضعی و مقاومت القائی سیستمیک می‌باشد. کاربرد اسانس آویشن در میوه آووکادو سبب تحریک مقاومت‌های القایی می‌شود (۵). نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد، محتوای فنول کل در تمام تیمارهای مورد مطالعه در پایان زمان انبارداری افزایش یافت و تیمار اسانس در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر در هر دو آزمایش بیشترین تاثیر را در حفظ و افزایش فنول کل میوه داشت که بیان‌گر وابسته بودن تاثیر اسانس بر محتوای فنول کل به غلظت اسانس می‌باشد. یافته‌های پژوهش حاضر با نتیجه‌های پژوهش Jin و همکاران (۲۶) همخوانی داشت. به‌طوری‌که طی مشاهده‌های آن‌ها تمشک‌های تیمار شده با اسانس‌های گیاهی سطوح بالای ماده‌های فنولی، محتوای آنتوسیانین و ظرفیت حذف رادیکال‌های اکسیژن قوی‌تری نسبت به تمشک‌های تیمار نشده داشتند. از نتیجه‌های آزمایش مربوط به میزان ترکیب‌های فنول در میوه گیلاس تیمار شده با باکتری باسیلوس و اسانس مرزنجوش، چنین استنباط می‌شود که هر دو تیمار موجب تحریک فعالیت آنزیم PAL شده و تولید فنول را موجب می‌شوند. در پژوهشی روی ارزیابی اثر مخمر آنتاگونیست *Saccharide* در کنترل پوسیدگی قارچ پنیسیلیوم روی میوه هلو، گزارش شد که میزان فنول کل میوه‌های تیمارشده با مخمر آنتاگونیست به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. پژوهشگران دریافتند که مخمر باعث تحریک انباشت فنول در بافت میوه شده است. افزایش محتوای فنول باعث افزایش مقاومت در برابر بیمارگرهای قارچی می‌شود. به‌طور مثال اولین نشانه انگیزش پاسخ‌های دفاعی علیه بلایت ایجاد شده توسط *Quercus infectoria* در گوجه‌فرنگی نیز انباشت محتوای فنول می‌باشد (۵۹).

## فعالیت آنتی اکسیدان

اثر ساده اسانس مرزنجوش و زمان نگهداری در سطح احتمال ۱ درصد و باکتری باسیلوس در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار بود. همچنین، برهمکنش هر سه عامل در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اثر معنی‌داری داشت. در میوه‌های تیمار شده با باکتری و بدون باکتری با افزایش زمان نگهداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا کرد. همچنین، افزایش غلظت اسانس باعث افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. در تیمار ترکیبی اسانس مرزنجوش و باکتری باسیلوس و نیز در تیمارهای بدون باکتری بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر اسانس در روز ۳۰ام می‌باشد (شکل ۳).

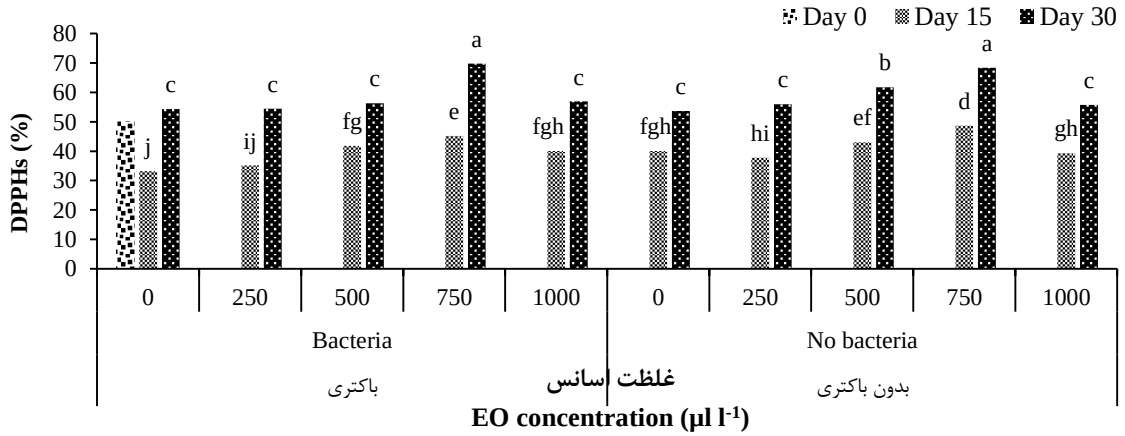


Fig. 3. Interaction effect of oreganom essential oil and *Bacillus subtilis* on the antioxidant activity of sweet cherry stored for 30 days at 0±1°C with 90–95% relative humidity. Non identical letters indicate a significant difference 5% probability level between means with Duncan test.

شکل ۳- برهمکنش اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه گیلاس طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ الی ۹۵ درصد. حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین تیمارها می‌باشد.



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش اکسیداتیو باعث کاهش تخریب فیزیولوژیکی و افزایش مقاومت بافت در برابر تنش‌ها و آلودگی میکروبی می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد باعث تاخیر و یا مانع اکسیداسیون مولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و دکسی ریبونوکلوئیک‌اسیدها توسط مهار آغاز اکسیداسیون واکنش‌های زنجیره‌ای می‌شوند (۱۲). تیمارهایی که باعث کاهش تنفس و تولید اتیلن و در نتیجه کاهش سرعت پیری می‌شوند، موجب کاهش سرعت تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌گردند. کاربرد اسانس تیمول، فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، کیتیناز، بتا ۱و۳ گلوکوناز، پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهد. ترکیب‌های موجود در اسانس مرزنجوش مانند کارواکرول، سینامیک اسید، آنتول و فنول‌ها، باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در میوه می‌شوند که منجر به کاهش سرعت پیری و افزایش مقاومت بافت در برابر حمله میکروبی می‌گردند. از این رو، افزودن اسانس آویشن که دارای تیمول بالایی است به پوشش‌های خوراکی، یک روش موثر برای به کمینه رساندن هدررفت میوه است و همچنین، به‌طور مستقیم باعث بهبود کیفیت میوه می‌شود (۶). نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد که در همه تیمارها با افزایش زمان نگهداری میزان آنتی‌اکسیدان کل افزایش می‌یابد که بالاترین میزان آنتی‌اکسیدان در غلظت اسانس ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر و زمان آخر نمونه‌برداری مشاهده شد. در پژوهش دیگری فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های مرزنجوش، آویشن و ریحان بر اساس ویژگی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و تاثیر بر پراکسیداسیون لیپید مطالعه شد که براساس نتیجه‌ها، قوی‌ترین اثر مربوط به اسانس مرزنجوش بود (۱۰). آنتاگونیست‌های میکروبی به‌عنوان الیستور عمل کرده و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی را تحریک می‌کنند و از این راه باعث کاهش آسیب اکسیداتیو در میزبان می‌شوند. سویه‌های باکتری باسیلوس توانایی تحمل سطح بالایی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند پرواکسیدها، سوپراکسیدها و رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن که در بافت گیاه میزبان تولید می‌شوند را دارند. کاربرد آنتاگونیست‌های میکروبی، منجر به بیان ژن‌های مرتبط با تولید پروتئین‌های دخیل در مقاومت میزبان می‌شوند. مقایسه بیان ژن‌ها در میوه‌های گیلاس و گوجه‌فرنگی در پاسخ به کاربرد مخمر *Cyptococcus laurentii*، نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقاومت میوه نسبت به مخمر بیمارگر بوده است (۲۸). بالاترین میزان افزایش فنول و آنتی اکسیدان کل در تیمار غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر اسانس همراه با باکتری در روز ۳۰ ام مشاهده گردید. به این ترتیب، تیمار بیان شده تا پایان مدت زمان نگهدای باعث حفظ و افزایش ترکیب‌های فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. همچنین، تیمار کاربرد اسانس به تنهایی منجر به حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح پایین‌تری نسبت به تیمارهای ترکیبی بود. از طرفی حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های تیمارشده در زمان نگهداری می‌تواند به دلیل حفظ اسکوربیک اسید و اثر تیمارها برکاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز و واکنش‌های اکسایشی و در نتیجه کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها باشد.

**آنتوسیانین**

اثر اصلی باکتری باسیلوس بر محتوای آنتوسیانین کل معنی‌دار نبود، اما اثر متقابل هر سه عامل در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد. مشخص شد مقدار آنتوسیانین با افزایش زمان و غلظت اسانس افزایش پیدا کرد که این افزایش در تیمارها بیشتر از شاهد بود (شکل۴). کاهش میزان آنتوسیانین در نمونه‌های مربوط به شاهد به احتمال به دلیل افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز می‌باشد. طبیعی است میوه‌های تیمار نشده در مقایسه با میوه‌های تیمار شده با اسانس به دلیل دارا بودن پوشش، تبادل‌های گازی با هوا نداشته و در نتیجه اکسیژن به‌راحتی در اختیار آنزیم‌هایی مانند پلی‌فنول‌اکسیداز قرار نگرفته و مانع از فعالیت این آنزیم شده است (۵۰).

ترکیب‌های فنولی شامل فنول، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در طی مسیر شیکیمات - فنیل پروپانوئید- فلاونوئید[۱]تولید می‌شوند. آنتوسیانین‌ها در کیفیت میوه بسیار حائز اهمیت هستند؛ به‌طوریکه میزان آن در رنگ و ظاهر میوه تاثیرگذار است. نتیجه‌ها نشان داد که در میوه‌های تیمار شده میزان آنتوسیانین نسبت به تیمار شاهد در حد بالایی حفظ شده است که به احتمال زیاد به دلیل کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز و نیز به دلیل افزایش فعالیت آنزیم PAL و نیز حفظ ساختار یاخته‌ای به دلیل کاهش سرعت پیری می‌باشد. مهم‌ترین نوع آنتوسیانین‌های موجود در گیلاس سیانیدین- ۳- روتینوزاید می‌باشد که در

۱- Shikimate-phenylpropanoid-flavonoid



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

طول رسیدن با تخریب کلروفیل انباشت آنتوسیانین‌ها و کارتنوئیدها اتفاق می‌افتد (۵۰). در مطالعه‌ای، Tian و همکاران (۴۸) بیان کردند که در زمان برداشت میوه‌های گیلاس با افزایش زمان نگهداری میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز افزایش پیدا می‌کند و میزان آنتوسیانین کل کاهش پیدا می‌کند که علت آن می‌تواند تجزیه آنتوسیانین توسط آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز باشد. اسانس‌های گیاهی به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی از اکسید شدن آنتوسیانین در طول دوره نگهداری جلوگیری می‌کنند. گزارش شده است که برخی اسانس‌های گیاهی در حفظ میزان آنتوسیانین در میوه هلو در زمان نگهداری موثر بوده‌اند (۳۲). همچنین، پژوهشگران با بررسی اثر اسانس آویشن روی میوه هلو به نتیجه‌های مشابهی دست یافتند. اسانس آویشن باعث فعال شدن ساخت پروتئین‌های عامل مقاومت به بیمارگرها می‌شود. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) نشانگرهای لازم برای استقرار مقاومت القایی سیستمیک را فراهم می‌کنند. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به کیتیناز، پراکسیداز و بتاگلوکاناز اشاره کرد که با حمله به قارچ‌های بیماری‌زا آن‌ها را از بین می‌برند (۴۱). در پژوهشی، Wang و همکاران (۵۳) گزارش کردند که توت فرنگی‌های تیمار شده با تیمول و اژنول سطوح بالاتری از محتوای آنتی‌اکسیدانی شامل آنتوسیانین‌ها و ترکیب‌های فنولی را نسبت به میوه‌های تیمار نشده داشتند. کاربرد خارجی آنتاگونیست‌های میکروبی منجر به فعال شدن ژن‌های عامل تولید پروتئین‌های سیستم دفاعی و افزایش مقاومت گیاه در مقابل بیماری‌ها می‌شود.

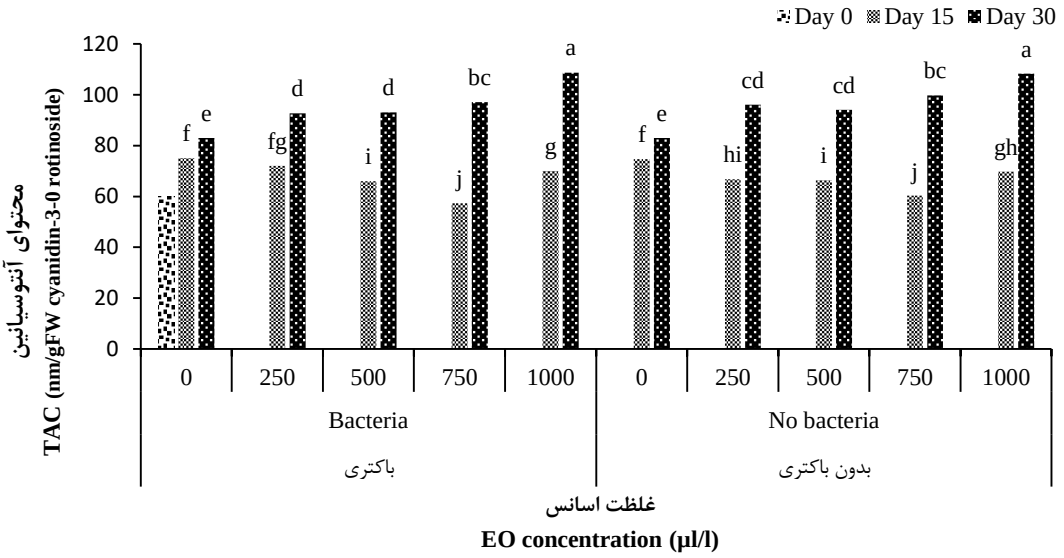


Fig. 4. Interaction effect of oreganom essential oil and *Bacillus subtilis* on the anthocyanin of sweet cherry stored for 30 days at 0±1°C with 90–95% relative humidity. Non identical letters indicate a significant difference 5% probability level between means with Duncan test.

شکل ۴- برهمکنش اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری بر میزان محتوای آنتوسیانین میوه گیلاس طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ الی ۹۵ درصد. حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین تیمارها می‌باشد.

## آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)

بر اساس نتیجه‌های پژوهش حاضر، اثر ساده اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری و همچنین برهمکنش بین هر سه عامل در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان فعالیت آنزیم PAL معنی‌دار بود. با افزایش زمان نگهداری میوه، میزان فعالیت آنزیم PAL افزایش پیدا کرد. در تیمارهای بدون باکتری بالاترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر و روز۳۰ام می‌باشد و کمترین میزان آن نیز مربوط به تیمار شاهد در روز ۱۵ام می‌باشد. در تیمارهای ترکیبی اسانس و باکتری نیز بالاترین میزان فعالیت آنزیم PAL مربوط به تیمار ۵۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر در روز۳۰ام بوده است و کمترین میزان آن هم مربوط به تیمار شاهد در روز ۱۵ام می‌باشد (شکل ۵).

۱- Pathogenesis-related proteins



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]
[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

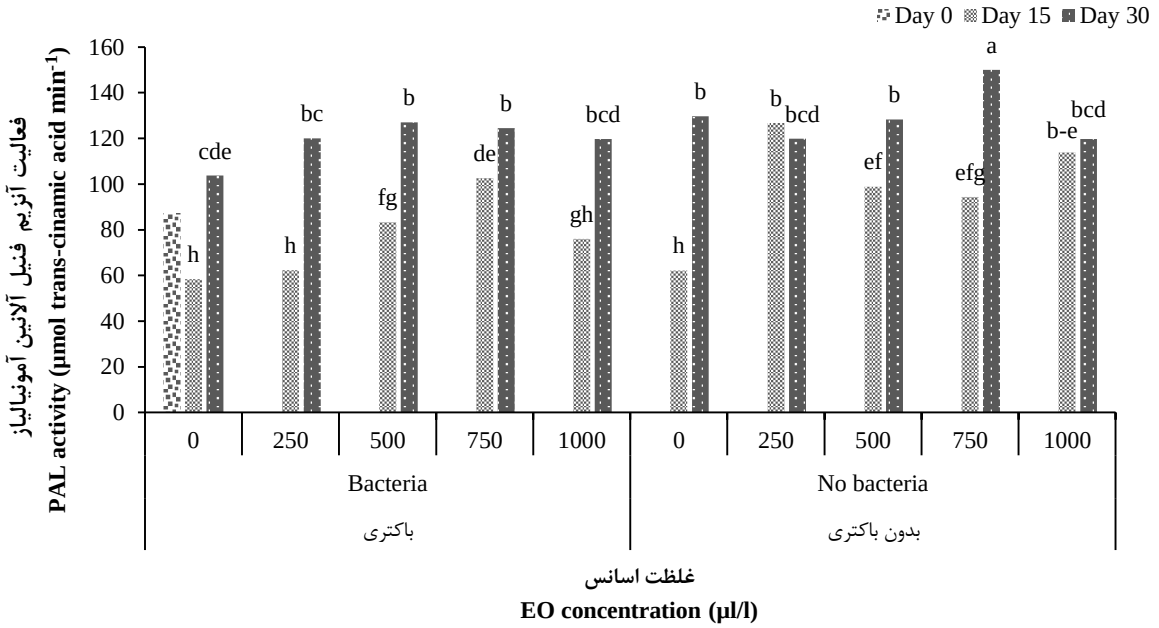


Fig. 5. Interaction effect of oreganom essential oil and *Bacillus subtilis* on the PAL enzyme activity of sweet cherry stored for 30 days at 0±1°C with 90–95% relative humidity. Non identical letters indicate a significant difference 5% probability level between means with Duncan test.

شکل ۵- برهمکنش اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری بر میزان فعالیت آنزیم PAL میوه گیلاس طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ الی ۹۵ درصد. حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین تیمارها می‌باشند.

آنزیم PAL به عنوان آنزیمی کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئید شناسایی شده است و به‌طور ویژه در زیست‌ساخت ترکیب‌های دفاعی در بافت‌های گیاهی دخالت دارد. بنابراین، می‌توان از فعالیت این آنزیم به‌عنوان شاخصی جهت سنجش میزان مقاومت بافت‌های گیاهی در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا استفاده کرد. مطالعه‌های متعددی نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین مقاومت گیاه به بیماری با افزایش فعالیت آنزیم PAL بوده است. زمانی که میوه‌ها و سبزی‌ها در اثر عوامل بیماریزای عفونی و غیرعفونی دچار آسیب بافتی می‌شوند، آنزیم PAL با شروع مسیر زیست‌ساخت ترکیب‌های فنولی و برخی فیتوآلکسین‌ها باعث استقرار سیستم دفاعی در یاخته‌ها می‌شود. آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز نیز با اکسیداسیون فنول‌ها و تولید پلی‌فنول‌ها، سد دفاعی محکمی در مقابل عوامل بیماری‌زا، به ویژه قارچ‌ها، ایجاد می‌کند (۴۰). گزارش شده است که تاثیر اسانس آویشن بر فعالیت آنزیم PAL در میوه انبه در غلظت ۶۶/۷ میکرولیتر در لیتر در مقایسه با شاهد معنی‌دار بوده است (۳۸). همچنین، در میوه‌های آوکادو تیمار شده با اسانس آویشن بیان ژن های آنزیم PAL در طول دوره نگهداری در تمام تیمارها و همچنین میوه‌های شاهد افزایش پیدا کرد. بعد از ۲۱ روز نگهداری میزان بیان ژن‌های آنزیم PAL در میوه‌های تیمار شده با اسانس به به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (۷). در پژوهشی، ثابت شد که باکتری باسیلوس باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL در میوه لیچی می‌شود. فعالیت این آنزیم در میوه‌های تیمار شده با باکتری در روز اول نگه‌داری کاهش پیدا کرد، اما در روز دوم به بعد فعالیت آنزیم روند افزایشی داشت. در حالی که در میوه‌های شاهد افزایش فعالیت آنزیم تنها در روز دوم مشاهده شد (۵۶). به نظر می‌رسد که باکتری باسیلوس با افزایش بیان ژن‌های آنزیم PAL، باعث تحریک فعالیت آنزیم PAL در اثر انباشت ترکیب‌های فنولی در میوه‌های گیلاس شده باشد. نتیجه مشابهی با به کارگیری مخمر آنتاگونیست Saccharide علیه قارچ پنی‌سیلیوم روی میوه هلو به دست آمده است (۵۹). در مطالعه‌ای، Zhang و همکاران (۶۰) اثر مهار زیستی دو سویه مخمر *Pichia membranaefaciens* و *Kloeckera apiculate* علیه قارچ بیمارگر *Monilinia fructicola*، عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میوه‌های هسته‌دار و قابلیت آن‌ها در تحریک مسیر پروپانوئید در میوه آلو را بررسی نمودند. مخمرها فعالیت ضدقارچی معنی‌داری را در غلظت $10^8$ یاخته در میلی‌لیتر نشان دادند. کلونیزاسیون موثر و جمعیت زیاد آنتاگونیست برای رقابت بر سر تغذیه و مکان با بیمارگر به کاهش



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

آلودگی کمک می‌کند. افزون بر این، سویه‌های مخمر فعالیت‌های آنزیم‌های دفاعی مانند فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، سینامیک اسید ۴ هیدروکسیلاز، لیگاز و پراکسیداز را به میزان قابل توجهی افزایش دادند. همچنین در پژوهش بیان‌شده، فعالیت این آنزیم‌ها باعث فعال شدن مسیر پروپانوئید گردید. در پژوهشی دیگر تیمار هلو با مخمر و متیل‌جاسمونیک اسید فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، B-1، ۳- گلوکاناز، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و پراکسیداز در مقایسه با کاربرد مخمر یا متیل‌جاسمونیک اسید به تنهایی، بالاتر بود. میزان رشد قارچ‌های *P. expansum* و *M. fructicola* روی میوه‌های تیمار شده کمتر می‌باشد که این به افزایش فعالیت آنزیم‌های بیان‌شده و شروع مقاومت سیستمیک برمی‌گردد (۵۸). وجود همبستگی مثبت بین فعالیت آنزیم PAL و میزان ترکیب‌های فنول و آنتی‌اکسیدان تأیید می‌کند که آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز یک آنزیم کلیدی در زیست‌ساخت ترکیب‌های فنولی می‌باشد. در پژوهش Wang و همکاران (۵۵) ارتباط مثبتی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با ترکیب‌های فنولی گزارش شد. در پژوهش حاضر نیز افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با بیشتر شدن ترکیب‌های فنولی، آنتوسیانین و ویتامین C همراه بود، زیرا بین این ویژگی‌ها همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده گردید.

**اسکوربیک اسید (ویتامین C)**

اثر ساده باکتری باسیلوس، اسانس مرزنجوش و زمان نگهداری و همچنین برهمکنش این سه عامل در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان اسکوربیک اسید معنی‌دار بوده است. شکل ۶ نشان‌دهنده برهمکنش اسانس، زمان و باکتری بر مقدار اسکوربیک اسید می‌باشد که بر اساس این نمودار با افزایش زمان از میزان اسکوربیک اسید کاسته شده است. تیمار اسانس مرزنجوش در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر بیشترین میزان اسکوربیک اسید را در روز ۱۵ام نشان داده و کمترین میزان آن مربوط به شاهد بوده است. در تیمار باکتری باسیلوس و اسانس مرزنجوش نیز بیشترین میزان مربوط به تیمار ترکیبی اسانس ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر در روز ۱۵ام می‌باشد و برخلاف انتظار در تیمار ترکیبی غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر اسانس در روز ۳۰ام نسبت به غلظت‌های دیگر در همین زمان بالاترین میزان اسکوربیک اسید را نشان داد. به نظر می‌رسد فعالیت باکتری در این غلظت باعث افزایش اسکوربیک اسید شده باشد.

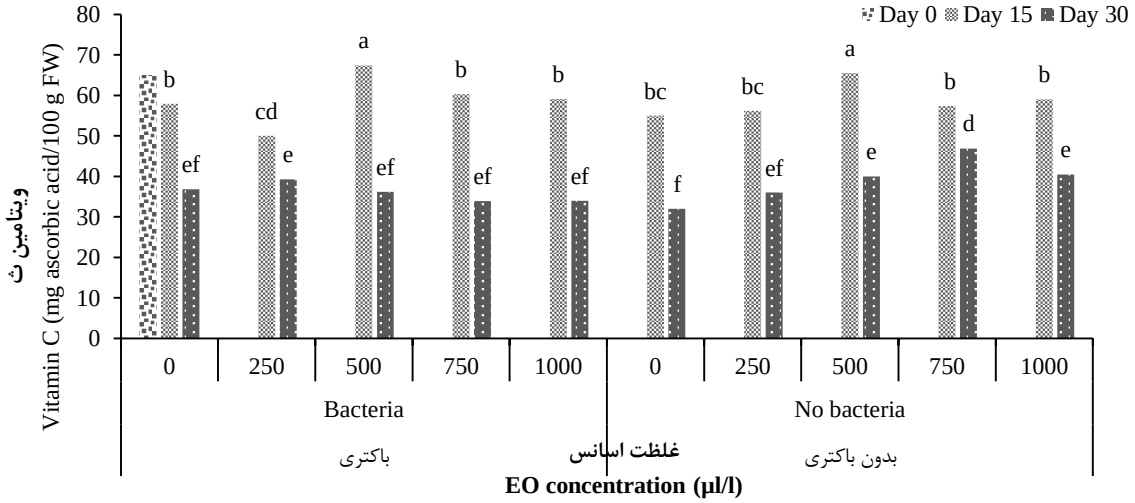


Fig. 6. Interaction effect of oreganom essential oil and *Bacillus subtilis* on the ascorbic acid of sweet cherry stored for 30 days at 0±1°C with 90–95% relative humidity. Non identical letters indicate a significant difference 5% probability level between means with Duncan test.

شکل ۶- برهمکنش اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری بر میزان اسکوربیک اسید میوه گیلاس طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ الی ۹۵ درصد. حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها می‌باشد.

نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد که مقادیر اسکوربیک اسید در میوه‌های تیمار شده با اسانس مرزنجوش و باکتری باسیلوس در طول زمان نگهداری کاهش یافت. میزان کاهش اسکوربیک اسید با افزایش مدت زمان نگهداری، افزایش دما، پایین آمدن رطوبت نسبی، آسیب‌های فیزیکی و سرمازدگی افزایش می‌یابد و به‌طور کلی میزان آن در دوره پس از برداشت کاهش



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

می‌یابد. میزان ویتامین C در طول رسیدن و با پیشرفت پیری به دلیل مشارکت در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد کاهش پیدا می‌کند، لذا حفظ آن در جریان کاهش فعالیت‌های تخریبی حائز اهمیت است. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در میوه، بافت میوه را در مقابل تنش‌ها و بیماری‌ها محافظت می‌کنند. با افزایش متابولیسم اکسیداتیو، گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابند که می‌توانند موجب تخریب غشاهای زیستی گردند و برای جلوگیری از خسارت گونه‌های فعال اکسیژن، گیاهان سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی خود را فعال می‌کنند که از جمله آن‌ها آنزیم‌هایی مثل آسکوربات پراکسیداز و یا سیستم‌های غیرآنزیمی مانند اسکوربیک اسید (ویتامین C) و یا آلفا توکوفرول (ویتامین E) را می‌توان نام برد. اسکوربیک اسید در اثر فعالیت آنزیم آسکوربیک اسید اکسیداز تجزیه و آنگاه هیدرولیز می‌شود، کاهش این ویتامین در هنگام رسیدن تسریع می‌شود و تا زمان پیری ادامه دارد (۲۹).

اسکوربیک اسید همچنین باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز شد. اسکوربیک اسید با کاهش اکسیژن سطحی از واکنش اتواکسیداسیون جلوگیری می‌کند، زیرا همان‌طور که بیان شد نقش مهم اسکوربیک اسید، حذف مسمومیت ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال موجود در کلروپلاست، سیتوزول و پراکسی‌زوم به وسیله آنزیم آسکوربات پراکسیداز می‌باشد که در نتیجه مانع از اکسیداسیون گروه تیول آنزیم‌ها و پروتئین‌ها می‌گردد. کاربرد اسانس با کاهش تنفس و در نتیجه کاهش سرعت رسیدن و پیری میوه سبب جلوگیری از تخریب و در نتیجه حفظ ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی مانند آسکوربیک اسید در میوه می‌شوند (۲۶). همچنین، با کنترل افزایش ماده‌های جامد محلول و حفظ اسیدیته قابل تیتراسیون میوه، با توجه به اینکه فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنول‌اکسیداز در شرایط قلیایی افزایش می‌یابد از مصرف اسکوربیک اسید در زمان نگهداری جلوگیری می‌کند (۴). در مطالعه‌ای اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر ویژگی‌های زیست‌شیمیایی میوه گیلاس رقم تک دانه مشهد مورد بررسی قرار گرفت. بعد از پایان مدت زمان نگهداری مشاهده شد که در میوه‌های تیمار شده با اسانس آویشن میزان کاهش وزن و کاهش ویتامین C کمتر مشاهده شد (۳۰). گزارش شده است که استفاده از اسانس‌های سه گونه گیاهی (گل راعی، مورخوش و سالویا) در جلوگیری از رشد قارچ *Botrytis cinerea* در دو رقم میوه توت فرنگی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول‌های برداشت شده به وسیله حفظ و افزایش ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی مانند اسکوربیک اسید افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان اسکوربیک اسید در تیمار ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس گل راعی گزارش شد. نتیجه‌های این پژوهش با نتیجه‌های پژوهش حاضر همخوانی داشت (۴۲). پژوهشگران نشان دادند که در میوه‌های لیچی تیمار شده با باکتری باسیلوس به مدت ۶ روز، محتوای آسکوربیک اسید در همه میوه‌ها کاهش پیدا کرد اما در میوه‌های تیمار شده با باکتری تا روز دوم تغییری در میزان اسکوربیک اسید مشاهده نشد و از روز دوم به‌طور آهسته شروع به کاهش کرد و این کاهش خیلی کمتر از تیمار شاهد بود. باکتری باسیلوس با تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن سیستم‌های مقاومتی میزبان را فعال کرده و با مصرف اسکوربیک اسید به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی، باعث کاهش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (۵۶).

**آنزیم پلی فنول اکسیداز**

نتیجه‌های آزمایش نشان می‌دهد که اثر ساده اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری و همچنین برهمکنش بین این سه عامل در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز معنی‌دار بود. شکل ۷ مقایسه میانگین برهمکنش اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری را نشان می‌دهد. با افزایش زمان نگهداری میزان فعالیت آنزیم افزایش پیدا کرده است و در هر دو حالت تیمار باکتری و بدون آن، پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر اسانس می‌باشد و بیشترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به شاهد در روز ۳۰ام می‌باشد.



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

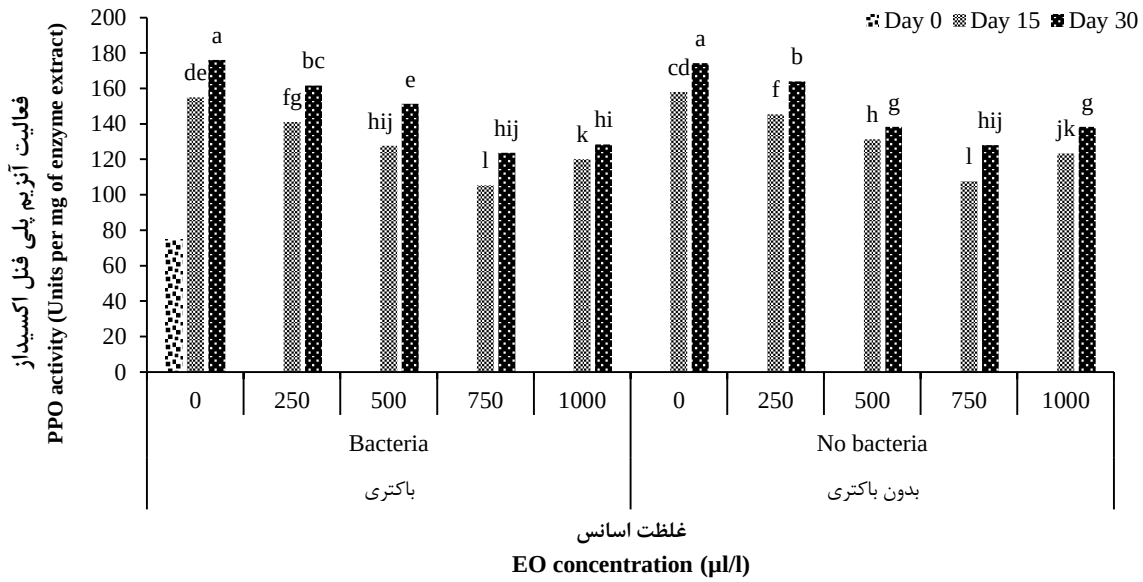


Fig. 7. Interaction effect of oreganom essential oil and *Bacillus subtilis* on the PPO enzyme activity of sweet cherry stored for 30 days at 0±1°C with 90–95% relative humidity. Non identical letters indicate a significant difference 5% probability level between means with Duncan test

شکل ۷- برهمکنش اسانس مرزنجوش، باکتری باسیلوس و زمان نگهداری بر میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز میوه گیلاس طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ۱±۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ الی ۹۵ درصد. حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها با آزمون دانکن می‌باشد.

پلی‌فنول‌اکسیدازها آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند ترکیب‌های فنولی را به اورتوکوئینون‌ها اکسید کنند. پلی‌فنول‌اکسیداز توانا به کاتالیز فرایند هیدروکسیلاسیون مونوفنول‌ها به اورتودی‌فنول‌ها و اکسیداسیون اورتودی‌فنول‌ها به اورتودی‌کینون‌ها است. ساخت کوئینون از نخستین نشانه‌های پاسخ به حمله قارچی و یا زخمی شدن است که این ترکیب‌ها دارای ویژگی ضد میکروبی هستند. آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز موجب تبدیل ترکیب‌های فنولی به کوینون شده و باعث قهوه‌ای شدن بافت می‌شود. پلی‌فنول‌اکسیداز و پراکسیداز همانند آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در مسیر فنیل‌پروپانوئید (مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی) که در تولید انواع ترکیب‌های فنولی با ساختار دفاعی نقش دارند درگیر هستند. ترکیبهای پلی‌فنلی در اثر واکنش با جایگاه فعال آنزیم موجب مهار آنزیم پلی‌فنل اکسیداز می‌شوند. بدین صورت که این ترکیب‌ها از گروه هیدروکسیل خود به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شوند و یا توسط گروه آلدهیدی خود، باعث کمپلکس کردن فلز مس (کوفاکتور آنزیم پلی‌فنل اکسیداز) می‌شوند. پژوهش‌های انجام شده حاکی از آن است که ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها باعث کاهش آسیب‌های فیزیولوژیکی مانند قهوه‌ای شدن آنزیمی و افزایش زمان ماندگاری میوه‌ها و سبزی‌ها همراه با حفظ کیفیت آن می‌شوند (۴۶). در این پژوهش نیز اسانس باعث کاهش فعالیت این آنزیم شده و در نتیجه کیفیت محصول برای مدت زمان بیشتری حفظ شده است. اسانس‌های گیاهی همانند پوشش خوراکی و با کاهش تبادل گازها، میزان ورود $O_2$ به داخل بافت را کاهش می‌دهند که نتیجه آن کاهش فعالیت‌های اکسیژن‌خواه مانند فعالیت PPO و ACC اکسیداز و تنفس است. در سایر پژوهش‌ها نیز اثر معنی‌دار اسانس‌های دو گونه آویشن علیه فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در توت فرنگی گزارش شده است (۲۵). در تحقیقی مشابه، مهار زیستی باکتری *Bacillus cereus AR156* روی پوسیدگی آبی ناشی از قارچ پنیسیلیوم در میوه گیلاس و شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که تیمار باکتری باسیلوس به طور معنی‌داری باعث کاهش پیشرفت رشد قارچ شد. تیمار باکتری به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و بتا ۱و۳ گلوکاناز و فعالیت آنزیم PPO را در میوه افزایش داده و همچنین فعالیت باکتری در محیط درون شیشه‌ای با از بین بردن انسجام غشای پلاسمایی قارچ باعث نشت پروتئین و قند میسیلیوم بیمارگر می‌شود (۵۴) که نتیجه‌های پژوهش حاضر با این گزارش همخوانی دارد. همچنین تاثیر باکتری *P. fluorescens Pf1* و *Bacillus subtilis EPCO16* علیه قارچ بوتریتیس روی میوه انبه بررسی شد و نتیجه‌ها نشان داد که در



[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

میوه‌های تیمار شده میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی همانند پلی‌فنول‌اکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و PAL نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد (۴۵).

## نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتیجه‌های پژوهش حاضر، گویای توانایی کنترل زیستی باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* و اسانس مرزنجوش در کنترل قارچ بیماری‌زای *B. cinerea* می‌باشد. این عوامل زیستی به صورت مستقیم و غیرمستقیم روی عامل بیماری در زمان پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها تاثیرگذار هستند. از این رو، می‌توان انتظار داشت که این ترکیب‌ها سطح کنترل قابل مقایسه‌ای با کنترل بیمارگرها توسط ترکیب‌های شیمیایی به وجود می‌آورند و می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب و ایمن در برنامه مدیریت تلفیقی بیماری‌های پس از برداشت مورد استفاده قرار داد تا افزون بر کنترل بیماری، از خطرهای ناشی از استفاده بی‌رویه سم‌های شیمیایی در بخش کشاورزی نیز کاسته شود.

## منابع References


1. Ahmadzadeh, M. and S. Ghasemi. 2015. Introduction of *Pseudomonas fluorescens* as a new biocontrol agent in Iran. Biol. Control Pests and Plant Dis. 1(1): 49-60. (In Persian)
2. Amini, J., S. Faizi and S. Mirzaei. 2016. Biological control of gray mold of three cultivar of strawberry using *Bacillus* strains. Biol. Control Pests and Plant Dis. 5(1): 13-23. (In Persian)
3. Asghari, M.R. 2015. Novel (Non-classic) plant hormones and growth regulators. Urmia University Press. 352 p. (In Persian)
4. Atress, A.S.H., E.M. Aboul-Anean and B.W. Alsanius. 2010. Improving strawberry fruit storability by edible coating as a carrier of thymol or calcium chloride. Hort. Sci. Orn. Plant. 2(3): 88-97.
5. Banani, H., L. Olivieri, K. Santoro, A. Garibaldi, M.L. Gullino and D. Spadero. 2018. Thyme and savory essential oil efficacy and induction of resistance against *Botrytis cinerea* through priming of defense responses in apple. Foods, 7(2): 11.
6. Bill, M., D. Sivakumar, L. Korsten and A.K. Thompson. 2014. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Perseca americana* Mill) against anthracnose during post-harvest storage. Crop Prot. 64: 159-167.
7. Bill, M., L. Koresten, F. Remize, M. Glovacz and D. Sivakumar. 2017. Effect of thyme oil vapours exposureonphenylalanine ammonia-lyase (PAL) and lipoxygenase (LOX) genes expression, and control of anthracnose in 'Hass' and 'Ryan' avocado fruit. Sci. Hort. 224: 232-237.
8. Bonaterra, A., E. Badosa, J. Cabrefiga, J. Frances and E. Montesinos. 2012. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pome fruit tree diseases. Trees. 26 (1): 215-226.
9. Bor, J.Y., H.Y. Chen and G.C. Yen. 2006. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. J. Agr. Food. Chem. 54(5): 1680-1686.
10. Bozin, B., N. Mimica Dukik, N. Simin and G. Anackov. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant active of the entire oil. J. Agr. Food. Chem. 54:1822-1828.
11. Calvo, H., P. Marco, D. Blanco, R. Oria and M.E. Venturini. 2016. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases, Food Microbiol. 63:101-110.
12. Dar, T.A., M. Uddin, M. Masroor, A. Khan, K.R. Hakeem and H. Jaleel. 2015. Jasmonates counter plant stress: a review. Environ. Exp. Bot. 115: 49-57.
13. Droby, S., M. Wisniewski, N. Teixido, D. Spadaro and M.H. Jijakli. 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. Postharvest Biol. Technol. 122: 22-29.
14. Dukare, A.S., R. Prasanna, S.C. Dubey, V. Chaudhary, L. Nain, R. Singh and A.K. Saxena. 2011. Evaluating novel microbe amended composts as biocontrol agents in tomato. Crop Prot. 30: 436-442.
15. Ebrahimzadeh, M.A., S.J. Hosseinimehr, A. Hamidinia and M. Jafari. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sallowiana fruits peel and leaves. Pharmacology, 1: 7-14.
16. El-Sekelly, W., R. Dobry, T. Abdoun and J.H. Steidl. 2016. Centrifuge modeling of the effect of preshaking on the liquefaction resistance of silty sand deposits. J. Geotech. Geoenviron. 142(6): 04016012.
17. Etebarian, H.R., P.L. Sholberg, K.C. Eastwell and R.J. Sayler. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonase fluorescens.* Can. J. Microbiol. 51: 591-598.
18. Ghasemi, S., M. Ahmadzadeh and S. Torabi. 2014. Biological control of alternaria rot of tomato by two bacterial strains, *Pseudomonas fluorescens* UTPf68, and *Bacillus subtilis* UTB96. Iran. J. Plant. Prot. Sci. 44(2): 299-305. (In Persian)


[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

19. Gullino, M.L., Q. Migheli and M. Mezzalama. 1995. Risk analysis in the release of biological control agents: antagonistic *Fusarium oxysporum* as a case study. Plant Dis. 79: 1193-201.
20. Hashemi, M.B., A. Musavi Khaaneghah, M. Ghahfarrokhi and I. Es. 2017. Basil-seed gum containing Origanum vulgare subsp. viride essential oil as edible coating for fresh cut apricots. Postharvest Biol. Technol. 125: 26-34.
21. Hassanpour, H. Y. Hamidogli, J. Hajilo and M. Adlipour. 2011. Antioxidant capacity and phytochmical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes in Iran. Sci. Hort. 129: 459-463.
22. Holley, R.A and D. Patel. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22(4): 273-292.
23. Hyldgaard, M., T. Mygind and R.L. Meyer. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front. Microbiol. 3: 1-24.
24. Janisiewicz, W.J. and A. Marchi. 1992. Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain *Pseudomonas syringae*. Plant Dis. 76: 550-60.
25. Jannati, M., V. Abdossi and M. Mashhadi Akbar Boujar. 2014. Effect of calcium chloride and thyme essential oils application on some postharvest characteristics of strawberry fruit cv. Selva. Modern Sci. Sustain. Agric. J. 2(2): 25-32.
26. Jin, P., S.Y. Wang, H. Gao, H. Chen, Y. Zheng and C.Y. Wang. 2012. Effect of cultural system and essential oil treatment on antioxidant capacity in raspberries. Food Chem. 132: 399-405.
27. Karthikeyan, M., K. Radhika, S. Mathiyazhagan, R. Bhaskaran, R. Samiyappan and R. Velazhahan. 2006. Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. Braz. J. Plant Physiol. 18(3): 367-377.
28. Liu, J., M. Wisniewski, T. Artlip, Y. Sui, S. Droby and J. Norelli. 2013. The potential role of PR-8 gene of apple fruit in the mode of action of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, in postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. Postharvest Biol. Technol. 85: 203-209.
29. Lounds-Singlton, A.J. 2003. Influence of thermal postharvest stress on mango (*Mangifera indica*) polyphenolics during ripening. University of Florida, U.S.A. 68 P.
30. Maghenzani, M., V. Chiabrando, K. Santoro, D. Spadaro and G. Giacalone. 2018. Effects of treatment by vapour of essential oil from Thymus vulgaris and Satureja montana on postharvest quality of sweet cherry (cv. Ferrovia). J. Food. Nutr. Res. 57(2): 161-169.
31. Mari, M., S. Bautista-Banos and D. Selvakumar. 2016. Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. Postharvest Biol. Technol. 122: 70-81.
32. MG, A.E.G., and T.F.A. El-Moghazy. 2018. Extracting some essential oils and studying their effects on extending storage life and improving quality of "Florida Prince" peach fruits. Middle East J. *7*(4): 1545-1560.
33. Moradi, M., A. Hassani, F. Sefidkon and H. Maroofi. 2015. Chemical composition of leaves and flowers essential oil of Origanum vulgare ssp. gracile growing wild in Iran. J. Essent. Oil-Bear Plants. 18(1): 242-247.
34. Mozaffarian, V. 1997. A dictionary of Iranin plant, Names. Latin, English, Persian. Farhang Moaser Publishers. Tehran. (In Persian)
35. Munhuweyi, K., J.O. Caleb, L. Lennox, J.A. Van Reenen and U. Linus Opara. 2017. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of chitosan- essential oils against pomegranate fruit pathogens. Postharvest Biol. Technol. 129: 9-22.
36. Nakajima, J.I., I. Tanaka, S. Seo, M. Yamazaki and K. Saito. 2004. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. Biomed. Res. Int. 5: 241-247.
37. Nunes, C., J. Usall, N. Teixido and I. Vinas. 2001. Biological control of postharvest pear diseases using bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA–2. Int. J. Food. Microbiol. 70: 53- 61.
38. Perumal, A.B., P.S. Sellamuthu, R.B. Nambiar and E.R. Sadiku. 2017. Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defense responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. Food Bioprocess. Tech. 10(6): 1131-1141.
39. Pizzaocaro, F., D. Torreggiani and G. Gilardi. 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. J. Food Process. Preserv. 17: 21-30.
40. Qin, X., H. Xiao, C. Xue, Z. Yu, R. Yang, Z. Cai and L. Si. 2015. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. Postharvest Biol. Technol. 100: 160-167.
41. Rahimi, R., B. Valizadeh Kaji, A. Khadiri and I. Shahrijerdi. 2019. Effect of chitosan and thymol essential oil on quality maintenance and shelf life extension of peach fruits cv. Zaferani. J. Hort. Postharvest Res. 2(2): 143-156.

[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

42. Rastegari, S. and S. Tahmasebi. 2018. Use of *zhumeria majdae*, *hypericum perforatum* and *salvia officinalis* essential oils to prevent the growth of *Botrytis cinerea* in two strawberry fruit cultivars. J. Innov. Food Sci. Technol. 10(3): 85-96. (In Persian)
43. Regnier, T., S. Combrinck, W. Veldman and W. Du-Plooy. 2014. Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citriaurantii* and other postharvest pathogens of citrus. Ind. Crops Prod. 61:151-159.
44. Santos, N.T.S., A.J. Athayde, C.E.V. Oliveiram, C.V. Sales, S.M. Silva, R.S. Silva, T.C.M. Stamford and E.L. Sousa. 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare L*. essential oil to control *Rhizopus stolonifera* and *Aspergillus nigra* in grapes (*Vitis laburusca* L.). Food Microbiol. 32(2): 345-353.
45. Seethapathy, P., T. Gurudevan, K.S. Subramanian and P. Kuppusamy. 2016. Bacterial antagonists and hexanal-induced systemic resistance of mango fruits against Lasiodiplodia theobromae causing stem-end rot. J. Plant Interact. 11(1): 158-166.
46. Shao, X., H. Wang, F. Xu and S. Cheng. 2013. Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. Postharvest Biol. Technol. 77: 94-101.
47. Sharma, R.R., D. Singh and R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biol. Control. 50: 205-221.
48. Tian, S., A. Jiang, Y. Xu and Y. Wang. 2004. Responses of physiology and quality of sweet cherry fruit to different atmospheres in storage. Food Chem. 87: 43-49.
49. Tripathi, P., N. Dubey and A. Shukla. 2008 Use of some essential oils as Post- harvest botanical fungicides in the management of grey mold of grapes caused by *Botrytis cinera*. World J. Microbiol. Biotechnol. 24(1): 39-46.
50. Varasteh, F., K. Arzani, B. Barzegar and Z. Zamani. 2012. Changes in anthocyanins in arils ofchitosan-coated pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Rabbab-e-Neyriz) fruit during cold storage. Food Chem. 130: 267-272.
51. Vargas, R.C., B.G. Deflilippi, G.H. Valdes, M. Robledo and E.H. Prieto. 2008. Effect of harvest time and cysteine as antioxidant on flesh browing of fresh-cut cherimoya (*Annona cherimola Mill*). Agric. Res. 68: 217-227.
52. Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant physiol. 64(1): 88-93.
53. Wang, C.Y., J.J. Yin, J. Parry and L.L. Yu. 2007. Enhancing antioxidant, antiproliferation, and free radical scavenging activities in strawberries with essential oil. J. Agr. Food. Chem. 55: 6527-6532.
54. Wang, L., P. Jin, J. Wang, L. Jiang, S. Zhang, H. Gong, H. Liu and Y. Zheng. 2015. In vitro inhibition and in vivo induction of defense response against *Penicillium expansum* in sweet cherry fruit by postharvest applications of *Bacillus cereus* AR156. Postharvest Biol. Technol. 101: 15-17.
55. Wang, S.Y and H.S. Yin. 2000. Antioxidant activity in fruits and levels of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and development stage. J. Agr. Food Chem. 48:140-146.
56. Wu, Y., H. lin, Y. Lin, J. Shi, S. Xue, Y. Hung, Y. Chena and H. Wang. 2017. Effects of biocontrol bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* LY-1 culture broth on quality attributes and storability of harvested litchi fruit. Postharvest Biol. Technol. 132: 81-87.
57. Xiao, X., J. Cheng, J. Tang, Y. Fu, D. Jiang, T.S. Baker and J. Xie. 2014. A novel partitivirus that confers hypo-virulence on plant pathogenic fungi. J. Virol. 88(17): 10120-1033.
58. Yao, H.J and S.P. Tian. 2005. Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. J Appl Microbiol. 98: 941–950.
59. Yu, Q., Q. Chen, Z. Chen, H. Xu, M. Fu, S. Li, H. Wang and M. Xu. 2012. Activating defense responses and reducing postharvest blue mold decay caused by *Penicilium expancum* by yeast saccharide. Postharvest Biol. Technol. 74: 100-107.
60. Zhang, J., J. Liu, J. Xie, L. Deng, S. Yao and K. Zeng. 2018. Biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* and *Kloeckera apiculata* against *Monilinia fructicola* and their ability to induce phenylpropanoid pathway in plum fruit. Biol. Control. 129: 83-91.

[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 22 (4): 465-482 (2021)
Research article

# Biological Control of Gray Mold and Induction of Defense Responses in Sweet Cherry (*Prunus avium* L. cv. Takdaneh Mashhad) by *Bacillus Subtilis* and Oregano Essential Oil

**Ch. Hosseini[1*], M. Asghari and M. Khezri[1]**

Gray mold is one of the most important pathogens of cherry fruit. In the present study, the ability of bioinhibition of *Botrytis cinerea* by antagonist bacteria and the effects of adding marjoram essential oil on the growth of pathogenic fungi was evaluated. According to the results, with increasing in the concentration of essential oil, the growth rate of fungi decreased. *In vivo*, cherry fruits were infected with a suspension of $10^5$ hg/ml of pathogenic fungus, then separately treated with a suspension of $10^8$ cells/ml of selected strains of antagonist bacteria and marjoram essential oil at 5 levels. The qualitative parameters were examined at three times of zero, 15 and 30 days. The results showed that the treatment of *Bacillus* bacterium and marjoram essential oil at a concentration of 750 µl/l were the most effective treatment to increase the level of antioxidant activity and phenylalanine-ammonialyase enzyme activity. Total phenol content and anthocyanin content at the concentration of 1000 µl/l were the highest after 30 days. The highest amount of polyphenol oxidase enzyme was recorded after 15 days at the concentration of 750 µl/l. According to the results of this study, the mechanism of *B. subtilis* and marjoram essential oil in the control of gray mold of cherries is probably due to the induction of resistance in cherry fruit and increased antioxidant activity.

**Keywords:** Antioxidant, Bio-inhibition, Defense system, Phenolic compounds, Phenylalanine ammonia lysis.

1. Former M.Sc. Student, Professor of Horticultural Science, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, respectively.
* Corresponding Author, Email: (chnoor.hosseini123@gmail.com).

[ Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.16807154.1400.22.4.3.0 ]