اثر بازدارندگی برخی تیمارهای غیر شیمیایی بر *Penicillium expansum* و دیگر قارچ‌های عامل پوسیدگی در سیب

Inhibitory effects of non-chemical agents on *Penicillium expansum* and other decay fungi in apple

تهمینه نعیم‌آبادی[1]، منصوره کشاورزی[2]، مجید هاشمی[3] و حسین میردهقان[4]

دریافت: 1392/10/16 پذیرش: 1393/2/2

چکیده

یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای میوه سیب در مرحله پس از برداشت، پوسیدگی کپک آبی با عامل *Penicillium expansum* Link. است. در این تحقیق، کارایی مواد غیر سمی کیتوزان و واکس پوششی کارنوبا و قارچ‌کش ایمازالیل در کنترل کپک آبی در میوه ارقام سیب گلدن دلیشز و رد دلیشز در شرایط آزمایشگاه و ارتباط آن‌ها با سطوح پلی‌فنل بررسی شد. همچنین، اثر بازدارندگی *Trichoderma atroviride* و *T.harzianum* بر هفت قارچ عامل پوسیدگی شامل *Rhizopus stolonifer*، *P. expansum*، *Alternaria alternata*، *Ulocladium* sp.، *Aspergilus* sp.، *Monilia* sp. و *Cladosporium fulvum* نیز مطالعه شد. بر اساس نتایج، حساسیت رقم گلدن دلیشز به *P. expansum* بیش از رد دلیشز بود. در هر دو رقم سیب، تیمار کیتوزان موجب مهار *P. expansum* در محیط کشت و میوه شد. تیمارهای ایمازالیل، کیتوزان+ایمازالیل، کیتوزان، کیتوزان+واکس و واکس به ترتیب بیش‌ترین تا کم‌ترین اثر بازدارندگی را داشتند و تیمار کیتوزان پوسیدگی را تا 97% کاهش داد. غلظت پلی‌فنل در میوه رقم رد دلیشز بیش از گلدن دلیشز بود و بیش‌ترین تا کم‌ترین آن به ترتیب در تیمارهای کیتوزان، کیتوزان + ایمازالیل، کیتوزان + واکس، ایمازالیل، واکس و شاهد دیده شد. روابط معکوسی بین غلظت پلی‌فنل با حساسیت رقم به *P. expansum* (R = -0/989) و با تیمار (R = -0/68) وجود داشت. بر این اساس به نظر می‌رسد در سیب، ترکیبات فنلی در مقاومت ساختتاری و در مقاومت القتا شده (با واسطه کیتوزان) به قارچ *P. expansum* دخالت دارند. هر دو گونه تریکودرما به خصوص *T. atroviride* قادر به کنترل کلیه قارچ‌های پوسیدگی بودند. بر اساس نتایج، کیتوزان را می‌توان به عنوان ماده‌ای سالم در کنترل کپک آبی توصیه کرد اما واکس پوششی کارنوبا تاثیری روی سیب نداشت.

واژگان کلیدی: کیتوزان، سیب، تریکودرما، واکس پوششی، کپک آبی.

1 و 4- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار،دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر، رفسنجان

2 و 3- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

نویسنده مسئول مکاتبات: mkeshavarzi@gmail.com

مقدمه

سیب (*Malus domestica* Borkh) از مهم‌ترین درختان میوه دانه‌دار است که به‌طور وسیعی در سراسر جهان کشت می‌شود و ایران با تولید سالیانه 1700000 میلیون تن سیب در مقاوم هفتم جهان قرار دارد (Anonymous, 2013). یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در سیب، پوسیدگی‌های پس از برداشت به خصوص پوسیدگی‌های ناشی از قارچ کپک آبی (*Penicillium expansum* Link.) است که نه تنها موجب کاهش عمر انبارمانی میوه می‌شود، بلکه با ترشح سم جهش‌زا، ایمونوتوکسیک و نوروتوکسیک پاتولین (Patulin) فراورده‌های این محصول را آلوده می‌کند (Buchanan *et al*., 1974; Margosan *et al.*, 1997).

استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی رایج‌ترین روش مبارزه با کپک آبی است. عایت بهداشت باغ و اتاق بسته‌بندی و دفع سریع میوه‌های پوسیده (قبل از این که منشاء پخش اسپور شوند) نیز در کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت موثراست. استفاده از عوامل بیوکنترل نیز در مدیریت تلفیقی موثر بوده و امروزه دو محصول عمده Aspire و Bio-Save 110® در این ارتباط به بازار عرضه شده‌اند. قارچ *Trichoderma* sp. نیز یکی دیگر از گزینه‌های بیوکنترل است که در فرمولاسیون‌های تجاری متنوع برای کنترل بیماری‌های مختلف گیاهی از جمله بیماری‌های پس از برداشت و کپک آبی، تولید می‌شود (Batta, 2004; Conney and Lauren, 1998). از جمله این فرمولاسیون‌ها می‌توان به پودرهای وتابل Bio-Fungus®، Roostshield®، Trichodex® و Mycobac®، فرمولاسیون‌های دانه‌ای T-22 PlanterBox® و Trichoderma 2000®، فرمولاسیون قرصی BinabT® و فرمولاسیون مایع Promote® اشاره کرد. از دیگر روش‌های غیرشیمیایی کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت می‌توان به استفاده از برخی مواد ارگانیک اشاره نمود. کیتوزان نوعی پلیمر خطی از گلوکزآمین (Poly-B-(1-4)N-acetyl-D-glucosamine) است که از پوسته خارجی سخت‌پوستان جداسازی می‌شود. این ماده خاصیت ضدقارچی دارد و با تاثیر بر تعرق و تنفس گیاه/میوه، بالا بردن فعالیت‌های آنزیمی میوه و جلوگیری از جوانه‌زنی اسپورهای قارچ، مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زا را بالا می‌برد (Terry and Joyce, 2004). استفاده از واکس‌های پوششی یکی از روش‌های نوین جهت حفظ میوه‌ها به خصوص سیب و مرکبات در انبار و سردخانه و هنگام حمل و نقل هستند که موجب جلوگیری از تبخیر آب میوه، شفافیت پوست و افزایش بازارپسندی میوه می‌شوند. با این حال چنانچه شرایط انبارداری مناسب نباشد، به دلیل تاثیر واکس بر کاهش تنفس و تبادلات گازی، شرایط غیرهوازی ایجاد می‌شود که موجب طعم و بوی نامطبوع در میوه می‌شود (Hagenmaier, 2002, 2004; Baldwin, 2005). واکس کارنوبا، نوعی پوشش ارگانیک است که از برگ درخت نخل برزیلی (*Copernicia prunifera*) استخراج شده و دارای مجوز مصرف تجاری در اروپا و آمریکا می‌باشد و به طور گسترده‌ای برای سیب و پرتقال به‌کار برده می‌شودبا این وجود از میزان تاثیر این پوشش ارگانیک بر شدت پوسیدگی‌های انباری اطلاع چندانی در دست نیست. با توجه به تمایل روزافزون به حذف سموم شیمیایی از چرخه تولید مواد غذایی، هدف از این تحقیق بررسی تاثیر برخی عوامل ارگانیک و بی‌خطر شامل واکس کارنوبا، کیتوزان و قارچ تریکودرما بر مهار قارچ کپک آبی در میوه سیب بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ارقام سیب مورد استفاده در این تحقیق، ارقام غالب کشت شده در کشور شامل رد دلیشز (Red delicious) و گلدن دلیشز (Golden delicious) بودند. میوه رسیده این ارقام از فروشگاه‌های محلی کرج خریداری شد.

قارچ‌های عامل پوسیدگی و تهیه مایه تلقیح

برای تهیه مایه قارچ عامل بیماری، از یک جدایه بومی *P. expansum* که قبلاً از سیب آلوده جداسازی و شناسایی شده و در لوله حاوی محیط مورب سیب زمینی – دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) در آزمایشگاه بیماری‌شناسی بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

نگـهـداری می‌شـد، استفاده شد (Naeem Abadi *et al*., 2014). سـایر قـارچ‌های عامـل پوسیـدگی شامل *Cladosporium* و *Monilia* sp.، *Aspergilus* sp.، *Ulocladium* sp.، *Rhizopus stolonifer Alternaria alternata* *fulvum* قبـلاً از میوه‌های آلوده جداسازی شده بودند (Naeem-Abadi *et al*., 2011). قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها با مایه‌زنی سالیانه در میوه سیب حفـظ می‌شد. قارچ‌های انتاگونیست *T. atroviride* و *T. harzianum* از کلکسیون قارچ پردیس دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه شد. به‌منظور تهیه مایه تلقیح کپک آبی، از کشت هفت روزه در محیط کشت PDA در دمای ^{o}C 25±1 استفاده شد. مقداری از اسپور توسط اسکالپل استریل جمع‌آوری و در 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی Tween-20 (0/5%) ریخته و پس از یکنواخت‌سازی توسط ورتکس، غلظت آن توسط لام هماسایتومتر به 5000 اسپور در میلی‌لیتر رسانیده شد (Spotts *et al*., 1999).

بررسی تاثیر مواد آلی بر *P. expansum* در *in vitro*

به‌منظور بررسی اثر کیتوزان در مهار بیماری کپک آبی، ابتدا محلول ذخیره کیتوزان 2% (w/v) Ph = 5/4 با حل کردن دو گرم پودر کیتوزان (High Molecular Weight, Merck) در 100 میلی‌لیتر اسید استیک 1% تهیه و با استفاده از آن، محیط‌های PDA حاوی غلظت‌های 1%، 0/5%، 0/1%، 0/05% و 0/01% کیتوزان تهیه شد. یک پلاگ 5 میلی‌متری از کشت دو هفته‌ای جدایه قارچ کپک آبی در هر محیط قرار داده شد و پس از سه روز نگهداری در دمای ^{o}C 1 ± 25 قطر پرگنه‌ها اندازه‌گیری شد (Liu *et al*., 2007).

بررسی تاثیر مواد آلی بر بیماری کپک آبی در میوه سیب

اثر کیتوزان، واکس پوششی و سم ایمازالیل (شاهد) بر مهار کپک آبی در میوه بررسی شد. تیمارها شامل کیتوزان 2%، واکس پوششی ارگانیک کارنوبا M14 (Xeda، فرانسه)، ایمازالیل (0/5 در هزار)، کیتوزان 2% + واکس، کیتوزان 2% + ایمازالیل (0/5 در هزار) و آب مقطر استریل (شاهد) بودند. در تیمارهای کیتوزان 2% + واکس و کیتوزان 2% + ایمازالیل، نسبت مواد متشکله مساوی بود. برای آلوده‌سازی، ابتدا میوه‌ها در جریان آب شیر شست و شو شدند و پس از ضد عفونی سطحی با الکل 70% و خشک کردن، توسط یک میله فلزی، دو چاهک به قطر و عمق 3 میلی‌متر در بخش استوایی هر میوه ایجاد شد. سپس به درون هر چاهک ابتدا 15 میکرولیتر از هر تیمار افزوده و پس از چهار ساعت، 20 میکرولیتر مایه تلقیح قارچ ریخته شد (Liu *et al*., 2007). میوه‌های تیمار شده به درون ظروف شفاف دربدار منتقل و پس از پنج روز در شرایط آزمایشگاه (دمای ^{o}C 22)، قطر پوسیدگی توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. برای حفـظ رطوبت، یک روز در میان میـوه‌ها و درب ظروف با آب مقطر استریل مه‌پاشی شدند. هم‌زمان، ظهور عوارض جانبی ناشی از تیمارهای مختلف بر ظاهر میوه نیز بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی با پانزده تکرار انجام شد.

بررسی تاثیر مواد آلی بر غلظت مواد پلی فنلی در میوه سیب

به‌منظور بررسی اثر تیمارهای فوق بر غلظت پلی فنل میوه سیب، 10 گرم میوه در 100 میلی‌لیتر استون سرد هموژنیزه و با استفاده از پارچه تنظیف سه لایه عصاره‌گیری شد. سپس عصاره به مدت 10 دقیقه در دور 6000 دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید و فاز رویی آن جمع‌آوری شد. از تفاله باقیمانده دو مرتبه عصاره‌گیری به‌عمل آمد و کلیه عصاره‌ها مخلوط شدند. غلظت پلی‌فنل‌های عصاره بر اساس روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد. بیست میکرولیتر عصاره و 1/58 میلی‌لیتر آب دیونیزه و 100 میکرولیتر معرف Folin-Ciocalteu (Merck) مخلوط و پس از 3 دقیقه، 500 میکرولیتر محلول 20% کربنات سدیم به آن اضافه و پس از 120 دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه، میزان جذب در طول موج 760 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Vieira *et al*., 2009). غلظت پلی فنل‌ها بر اساس منحنی استاندارد اسید گالیک (50، 100، 150، 250 و 500 میکروگرم بر لیتر) تعیین شد (Waterhouse, 2015). آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی با سه تکرار انجام شد.

بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما بر رشد قارچ‌های عامل پوسیدگی در *in vitro*

اثر دو گونه قارچ تریکودرما شامل *T. atroviride* و *T. harzianum* بر رشد قارچ‌های پوسیدگی میوه شامل قارچ‌های کپک آبی و قارچ‌های *R. Stolonifer*، *A. alternate*.، *Ulocladium* sp. ، *Aspergilus* sp. *Monilia* sp. و *C. fulvum* در شرایط *in vitro* بررسی شد. یک دیسک میسلیومی 9 میلی‌متری از کشت پنج روزه جدایه تریکودرما را در فاصله 1 سانتی‌متری از لبه یک تشتک پتری 9 سانتی‌متری حاوی محیط PDA قرار داده و پس از 48 ساعت نگهداری در انکوباتور، دیسکی به همان اندازه از قارچ بیمارگر در نقطه مقابل آن قرار داده شد و 12 روز بعد، درصد مهارکنندگی بر اساس رابطه 100 (C-T/C) که در آن C: قطر پرگنه بیمارگر در محیط بدون آنتاگونیست (شاهد) و T: قطر پرگنه بیمارگر در حضور انتاگونیست می‌باشد، اندازه‌گیری شد.

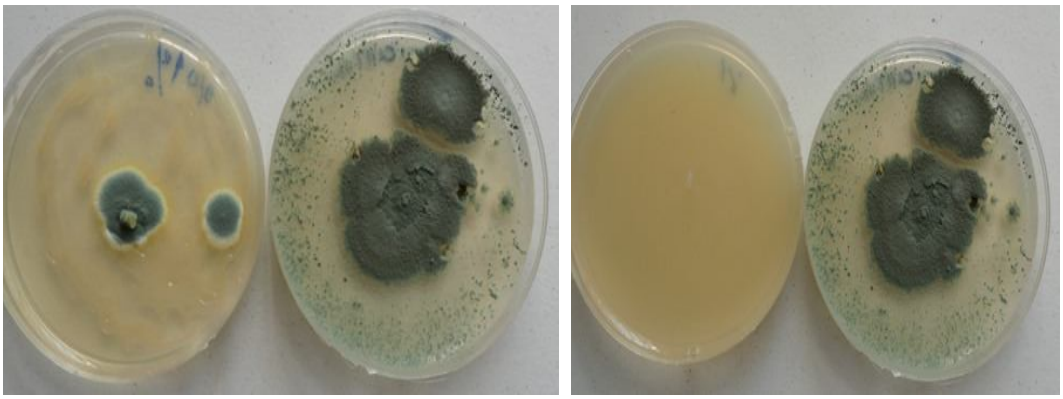
تجزیه و تحلیل آماری

در کلیه موارد آزمایش، میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ی دانکن ($P\leq0/01$) با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 محاسبه و مقایسه شد.

نتایج و بحث

تاثیر مواد آلی بر *P. expansum* در *in vitro*

بررسی اثر کیتوزان بر مهار کپک آبی در محیط کشت نشان داد که این تیمار موجب کاهش قطر پرگنه‌های قارچ کپک آبی شد و غلظت‌های 1 و 0/01 درصد به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تاثیر را داشتند (شکل 1 و جدول 1).



شکل 1- تاثیر کیتوزان بر جلوگیری از رشد میسیلیومی *P. expansum* در محیط کشت PDA. در تصویر راست، اثر کیتوزان 1% (تشتک چپ) در مقایسه با شاهد (تشتک راست) و در تصویر چپ اثر کیتوزان 0/01% (تشتک چپ) در مقایسه با شاهد (تشتک راست) مشاهده می‌شود.

Fig. 1. Inhibitory effects of chitosan on *P. expansum* growth in PDA medium. Right photo: 1% chitosan (left plate) comparing control (right plate); left photo: 0.01% chitosan (right plate) comparing control (right plate);.

جدول 1- قطر پرگنه قارچ *P. expansum* روی محیط کشت PDA در حضور غلظت‌های مختلف کیتوزان

Table 1. Mean colony diameter of *P. expansum* fungus on PDA containing different chitosan concentrations

غلظت کیتوزان Chitosan concentration (%)	قطر پرگنه Colony diameter (mm)
0 (control)	32.03a
0.01	23.23b
0.05	18.33c
0.1	12.31d
0.5	1.63e
1	0.00e

میانگین‌هایی که با حروف مشابه مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1% ندارند.

Means followed by the same letters are not significantly different ($P \leq 0.01$).

تاثیر مواد آلی بر بیماری کپک آبی در میوه سیب

در میوه، میانگین قطر پوسیدگی در ارقام و تیمارهای مختلف متفاوت بود. رقم گلدن دلیشز با قطر پوسیدگی 0/56 سانتی‌متر حساس‌تر از رد دلیشز با قطر پوسیدگی 0/27 سانتی‌متر بود. حساسیت بالاتر سیب رقم گلدن دلیشز نسبت به رد دلیشز به بیماری کپک آبی توسط فینلو (Finolow, 2005) و نعیم‌آبادی و همکاران (2014) نیز گزارش شده است. بیش‌ترین شدت پوسیدگی در تیمارهای واکس و شاهد (مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل قبل از آلوده‌سازی با مایه تلقیح) در رقم گلدن دلیشز و کم‌ترین در تیمار ایمازالیل با/بدون کیتوزان دیده شد. در مجموع دو رقم، تیمارهای ایمازالیل، کیتوزان+ایمازالیل، کیتوزان، کیتوزان+واکس و واکس، به ترتیب بیش‌ترین تا کم‌ترین تاثیر را داشتند (جدول 2 و شکل 2). درصد بازدارندگی تیمارهای ایمازالیل، کیتوزان+ایمازالیل، کیتوزان، کیتوزان+واکس و واکس در رقم گلدن دلیشز به ترتیب 100%، 100%، 97%، 31% و 0% و در رقم رد دلیشز به ترتیب100%، 100%، 96%، 19% و 0% به‌دست آمد. با توجه به این نتایج تیمار کیتوزان شدت پوسیدگی را تا 97% کاهش داد. نتایج برخی تحقیقات دیگر نیتز نشان می‌دهد که تیمار کیتوزان قادر به مهار قارچ‌های بیماری‌زای انباری *A. niger*, *Puccinia arachidis*, *A. alternata* (Sathiyabama and Balasubramanian, 1998; Bautista-Banos *et al*., 2006) و در شرایط باغی، کپک خاکستری (*Botritis cinerea*) و سایر بیماری‌های انباری در توت فرنگی (Reddy *et al*., 2000; Romanazzi *et al*., 2000)، کپک آبی، *P. digitatum*، *Guignardia citricarpa* و پوسیدگی ترش (*Giotrichum candidum*) در مرکبات (Chien *et al*., 2007; Rapussi *et al*., 2009; Faten and El-Latif, 2010) و کپک آبی، کپک خاکستری و پوسیتدگی قهوه‌ای در هلو و در گیلاس (Romanazzi *et al*., 2002; Li and Yu, 2000) را کنترل کرده است. پوشش حاوی کیتوزان در کنترل *R. stolonifer*, *A. niger*، کپک خاکستری و سفیدک پودری در انگور موثر بود (Romanazzi *et al*., 2002; Iriti *et al*., 2011; Dos Santos *et al*., 2012). میزان تاثیر این ماده در شرایط انبار روی *P.digitatum* و *P. expansum* در سیب و مرکبات بالاتر از محرک Benzothiodiazol (BTH) گزارش شده است (El-Ghaught *et al*., 1999).

بر اساس نتایج این تحقیق، تیمار واکس پوششی نه تنها تاثیری در کاهش شدت پوسیدگی نداشت بلکه آن را افزایش داد. در پرتقال نیز مشاهده شده است که تیمار50% امولسیون واکس شدت پوسیدگی کپک آبی را کاهش می‌دهد اما نسبت به سایر تیمارها بیش‌ترین میزان پوسیدگی را نشان داد (صفی‌زاده و راحمی، مذاکرات شخصی). اما نتایج برخی مطالعات در سیب و پرتقال مبین کاهش پوسیدگی در اثر تیمار واکس‌های پوششی (غیر از واکس پوششی مورد استفاده در این تحقیق) بود (El-Anany, 2009; Hassan *et al*., 2014). تاثیر پوشش واکس در کاهش شدت پوسیدگی در سیب را با نقش واکس در تاخیر انداختن پیری و در حفظ ساختار و تمامیت سلول مرتبط

دانسته‌اند (Patricia *et al*., 2005; El-Anany, 2009). واکس‌های پوششی با کاهش تبادلات گازی، تولید گاز اتیلن را کاهش می‌دهند که موجب تأخیر در پیری و کند شدن سرعت نرم شدن بافت می‌شود. اما از سویی، واکس با ایجاد اتمسفری مرطوب در اطراف میوه، شرایط مساعدی برای رشد قارچ‌ها فراهم می‌کند. به‌عنوان مثال، افزایش پوسیدگی در اثر پوشش‌های پلی‌اتیلنی را نتیجه افزایش رشد قارچ‌ها به دلیل ایجاد اتمسفر اشباع از رطوبت در پیرامون میوه دانسته‌اند (طلایی و همکاران، 1383; Rodov *et al*., 1995; Lingle *et al*., 1987; Ben). خشک بودن پوست میوه می‌تواند مو جب تسریع در التیام زخم‌های کوچک و در نتیجه کاهش پوسیدگی شود (Hassan *et al*., 2014). به همین دلیل است که استفاده از پوشش‌های ضخیم توصیه نمی‌شود و لازم است نوع واکس و ضخامت آن بر اساس گونه و رقم میوه تنظیم گردد. در مجموع تیمارهای مورد بررسی در این تحقیق، هیچ گونه تاثیر سو ناشی از کیتوزان، واکس پوششی یا سم ایمازالیل بر خصوصیات مورفولوژیک و ظاهر میوه دیده نشد.

جدول 2- میانگین قطر پوسیدگی در میوه ارقام مختلف سیب تحت تاثیر تیمارهای مختلف

Table 2. Mean decay diameter in different apple cultivars after different treatments

Treatment	تیمار	قطر پوسیدگی Decay diameter (cm)		
		گلدن دلیشز Golden delicious	رد دلیشز Red delicious	مجموع دو رقم Both cultivars
Coating wax	واکس	1.84a	0.83c	1.33a
Control	شاهد	1.39a	0.63c	1.01a
Wax+Chitosan	واکس + کیتوزان	0.95b	0.50d	0.73b
Chitosan	کیتوزان	0.04cd	0.02c	0.03c
Imizalil	ایمازالیل	0.0e	0.0e	0.0c
Imizalil+chitosan	ایمازالیل + کیتوزان	0.0e	0.0e	0.0c

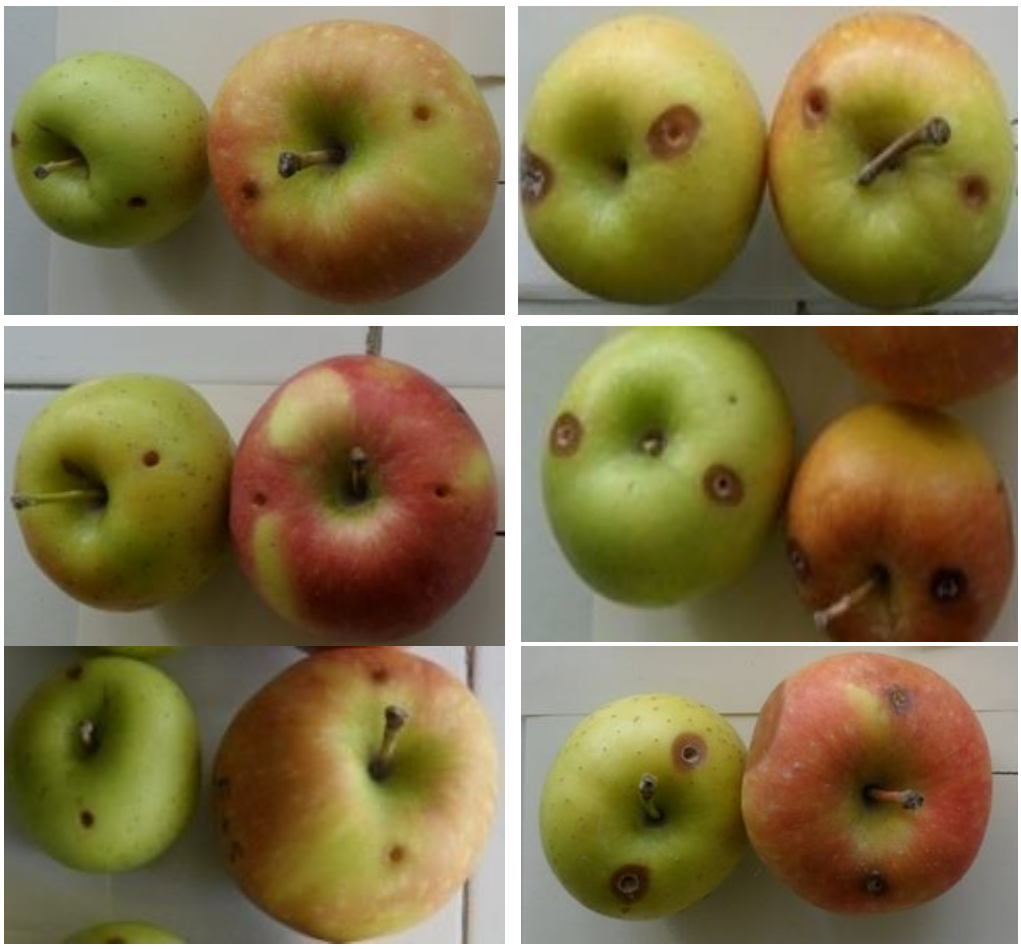
میانگین‌هایی که با حروف مشابه مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1% ندارند.

Means followed by the same letters are not significantly different ($P \leq 0.05$).

تاثیر مواد آلی بر غلظت مواد پلی‌فنلی میوه سیب

بررسی سطوح پلی فنلی میوه نشان داد که غلظت پلی فنل در ارقام و تیمارهای مختلف متفاوت بود. در مجموع، غلظت پلی فنل در رقم رددلیشز بیش از گلدن دلیشز بود (جدول 3). بررسی همبستگی بیانگر وجود رابطه معکوس بین سطوح پلی‌فنلی و شدت پوسیدگی در دو رقم رد دلیشز و گلدن دلیشز بود، بدین معنی که سطوح فنلی در رقم حساس‌تر گلدن دلیشز کم‌تر از رقم رد دلیشز بود ($R=-0/989$, $P<0/05$) که این نتایج به طور ضمنی بر نقش مواد فنلی از پیش ساخته در مقاومت سیب علیه کپک آبی دلالت می‌کند. در میوه هر دو رقم، بیش‌ترین تا کم‌ترین غلظت پلی‌فنل به‌ترتیب در تیمارهای کیتوزان، کیتوزان + ایمازالیل، کیتوزان + واکس، ایمازالیل، واکس و شاهد دیده شد. بررسی همبستگی بین سطوح پلی‌فنلی و شدت پوسیدگی در تیمارهای مختلف نیز نشان داد که این دو صفت همبستگی معکوس ($R=-0.68$, $P<0.01$) دارند. بر این اساس به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های کنترل پوسیدگی کپک آبی میوه سیب توسط کیتوزان بر پایه القای سنتز ترکیبات فنلی است. نتایج بررسی‌های آنجام شده در مقاوم‌سازی گوجه فرنگی به کپک آبی و کپک خاکستری و انگور به کپک خاکستری و سفیدک پودری نیز نشان‌دهنده افزایش سطوح مواد پلی فنلی در اثر تیمار کیتوزان بوده است (Liu *et al*., 2007; Wang *et al*., 2009; Romanazzi *et al*., 2002; Iriti, 2011; Mazaro *et al*., 2012). مواد محرک دفاعی از جمله کیتوزان برای اولین بار برای افزایش مقاومت به بیماری‌ها به کار برده شدند اما به زودی مشخص شد که یکی از مکانیسم‌های القای مقاومت توسط این متواد، افزایش سطح مواد فنلی است (Ruiz-García and Gomez-Plaza, 2013). مقاومت گیاهان بر پایه مکانیسم‌های پیش‌ساخته (مانند ضخامت دیواره و فراوانی تانن و لیگنین در دیواره) یا القاشونده است. مکانیسم‌های القاشونده متعاقب شناسایی بیمارگر فعال

می‌شوند اما در غیاب جمله بیمارگر نیز می‌توان آن‌ها را با محرک‌های فیزیکی مانند دمای پائین/بالا، امواج گاما، اشعه ماورا بنفش و محرک‌های شیمیایی مانند BTH، کیتوزان، هارپین و غیره فعال نمود (Ruiz-García and Gomez-Plaza, 2013; Beckers and Spoel, 2006). مقاومت‌های القا شده توسط مواد محرک در بسیاری از موارد توام با افزایش سطوح مواد پلی‌فنلی بوده است (Gozzo, 2003; Pan and Liu, 2011; Liu *et al*., 2005). بر همین اساس، مواد محرک می‌توانند نقش عمده‌ای در مقاوم‌سازی گیاهان و افزایش سطوح مواد پلی‌فنلی داشته باشند (Ruiz-García and Gomez-Plaza, 2013). مواد پلی‌فنلی به دلایل زیر می‌توانند برای گیاه و انسان مهم باشند، گیاه را از تنتش زنده و غیرزنده محافظت می‌کنند، در خواص چشایی و کیفی میوه تاثیر دارند، منشا مواد صنعتی به‌عنوان افزودنی‌های خوراکی و دارویی هستند و به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانتی، در سلامت مصرف‌کننده اهمیت دارند. استفاده از مواد محرک دفاعی می‌تواند مواد فنلی میوه را افزایش دهد که علاوه بر کاهش مصرف سموم، در سلامت انسان و سلامت محیط زیست موثر است (Ruiz-García and Gomez-Plaza, 2013).



شکل 2- شدت پوسیدگی کپک آبی در میوه سیب رقم رد دلیشز (میوه‌های سمت راست در هر تصویر) و گلدن دلیشز (میوه‌های سمت چپ در هر تصویر) پنج روز پس از مایه‌زنی در تیمار های: شاهد (مایه‌زنی شده با اسپور قارچ) (راست - بالا)، کیتوزان (چپ - بالا)، واکس (راست - وسط)، ایمازالیل (چپ - وسط)، کیتوزان+ واکس (راست - پائین)، کیتوزان + ایمازالیل (چپ - پائین).

Fig. 2. Blue mold decay in Red delicious (right fruits) and Golden delicious (left fruits) five days after inoculation in: control (up, right); Chitosan (up, left); Wax (middle, right); Imizalil (middle, left); Chitosan+wax (bottom, right) and Chitosan+imizalil (bottom, left).

جدول 3- مقایسه میانگین غلظت پلی فنل در ارقام سیب و تیمارهای مختلف

Table 3. Mean comparison of polyphenol concentration in apple cultivars and different treatments

Treatment	تیمار	غلظت پلی‌فنل Polyphenol level (mg/g fruit) گلدن دلیشز Golden delicious	رد دلیشز Red delicious	مجموع دو رقم Both cultivars
Chitosan	کیتوزان	0.58b	0.64a	0.61a
Chitosan+imizalil	کیتوزان+ ایمازالیل	0.49e	0.57c	0.53b
Chitosan+wax	کیتوزان + واکس	0.41h	0.50d	0.45c
Imizalil	ایمازالیل	0.39i	0.47f	0.43d
Wax	واکس	0.35j	0.43j	0.39e
Control	شاهد	0.30k	0.41h	0.35f

میانگین‌هایی که با حروف مشابه مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌دار ی ندارند ($P\leq0.01$).

Means followed by the same letters are not significantly different ($P\leq0.01$).

تاثیر تریکودرما بر کپک آبی در محیط کشت

گونه‌های *T. atroviride* و *T. harzianum* بر روی کلیه بیمارگرها اثر بازدارندگی داشتند و در مجموع بیمارگرها، قدرت بازدارندگی *T. atroviride* بیش از *T. harzianum* بود (به ترتیب 65% و 52%). بیش‌ترین و کم‌ترین اثر بازدارندگی *T. atroviride* به ترتیب روی بیمارگرهای *C. fulvum* و *R. stolonifer* و بیش‌ترین و کم‌ترین اثر *T. harzianum* به ترتیب در *C. fulvum* و *A. alternata* مشاهده شد (جدول 4). بر این اساس، هر دو گونه تریکودرما، *C. fulvum* را بیش از دیگر بیمارگرها کنترل کردند. نتایج برخی تحقیقات دیگر نیز نشان می‌دهد که برخی فرمولاسیون‌های قارچ تریکودرما پوسیدگی‌های میوه در اثر *P. expansum*، *B.cinerea* و *R. stolonifer* و پوسیدگی حلقه‌ای (*Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*) را در سیب و توت فرنگی کنترل کرده‌اند (Batta, 2004; Kexiang *et al*., 2002; Conney and Lauren, 1998). در مجموع، بر اساس نتایج این تحقیق، ماده کیتوزان تاثیر بسیار بالایی در کنترل بیماری کپک آبی در میوه سیب نشان داد و به عنوان ماده‌ای غیرسمی و ارگانیک در مراحل شستشوی محصول و نگهداری در سردخانه توصیه می‌شود. واکس پوششی کارنوبا گرچه می‌تواند در حفظ و نگهداری کیفیت محصول موثر باشد، تاثیر مثبتی بر پوسیدگی کپک آبی سیب ندارد.

جدول 4- مقایسه میانگین قدرت بازدارندگی دو گونه تریکودرما روی برخی عوامل پوسیدگی‌های انباری میوه سیب

Table 4. Mean comparion of inhibitory effects of two *Trichoderma* species on some decay agents

عامل پوسیدگی Decay agent	درصد بازدارندگی Inhibitory effect (%) *T. atroviride*	*T. harzianum*
Cladosporium fulvum	91a	72a
Aspergillus sp.	75b	56b
Penicillium expansum	73c	54c
Ulocladium sp.	72c	51d
Alternaria alternata	60d	35f
Monilia sp.	54e	45e
Rhizopus stolonifer	53e	50d

میانگین‌هایی که با حروف متفاوت مشخص شده‌اند، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 1% دارند.

Means followed by the same letters are not significantly different ($P\leq0.01$).

References **منابع**

طلایی، ع.، عسگری سرچشمه م.ع.، بهادران، ف و شرافتیان، د 1383. مطالعه آثار تیمارهای آب گرم و پوشش پلی‌اتیلن بر روی عمر انبارمانی و کیفیت میوه انار (رقم ملس ساوه). مجله علوم کشاورزی ایران 35: 373-369

Anonymous, 2013. FAO Statistics of Agricultural Crops in the World. available at: http://www.fao.org

Baldwin, E.A., 2005. Edible coatings. pp. 301-304, In: Benyeoshua, S. (ed.) Environmentally Friendly Technologies for Agricultural Produce Quality. Bota, Raton., Fl CRC. Taylor & Francis Group, Florida, USA.

Batta, Y.A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue mold. Food Microbiology 96: 281-288.

Bautista-Ba˜nos, S., Hern´andez-Lauzardo, A.N., Vel´azquez-del, Valle M.G., Hern´andez-L´opez, M., Ait Barka, E. and Bosquez-Molina, E. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre- and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection 25: 108-118.

Beckers, G.J.M. and Spoel, S.H. 2006. Fine-tuning plant defense signalling: salicylate versus jasmonate. Plant Biology 8: 1–10.

Ben-Yehoshua, S.H. 1985. Individual seal packaging of fruits and vegetables in plastic film, a new postharvest technique. Journal of Horticultural Sciences 20: 32-37.

Buchanan, J.R., Sommer, N.F., Fortlage, R.J., Maxie, E.C., Mitchell, F.G. and Hsieh, D.P.H. 1974. Patulin from *P. expansum* in stone fruits and pears. Journal of American Society for Horticultural Sciences 45: 429-430.

Chien, J., Sheu, F. and Lin, H.R. 2007. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. Food Chemistry 100: 1160-1164.

Cooney, J.M. and Lauren, D.R. 1998. *Trichoderma*/pathogen interaction measurement of antagonistic chemicals produced at antagonist/pathogen interface tubule bioassay. Letters in Applied Microbiology 27: 283-286.

Dos Santos, N.S.T., Athayde Aguiar, A.J.A., de Oliveira, C.E.V., Verissimo de Sales, C., de Melo E Silva, S., Sousa da Silva, R., Stamford, T.C.M. and de Souza, E.L. 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). Food Microbiology 32: 345-353.

El-Anany, A.M., Hassan, G.F.A. and Rehab Ali, F.M. 2009. Effects of edible coatings on the shelf-life and quality of Anna (*Malus domestica* Borkh) apple during cold storage. Journal of Food Technology 7: 5-11.

El-Ghaouth, A., Smilanick, J.L., Eldon Brown, G., Ippolito, A., Wisniewski, M. and Wilson, C.L. 1999. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. Plant Disease 84: 243-248.

Faten, M. and El-Latif A. 2010. Combination between citral and chitosan for controlling sour rot disease of lime fruits. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 6: 744-749.

Filonow, A.B. 2005. Wound type in apple fruits affects wound resistance to decay-causing fungi. Journal of Plant Pathology 87: 233-238.

Gozzo, F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: From nature to a chemical approach. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51: 4487-4503.

Hagenmaier, R. D. 2002. The flavor of mandarin hybrids with different coatings. Postharvest Biology and Technology 24: 79-87.

Hagenmaier, R.D. 2004. Fruit coatings containing ammonia instead of morphine. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 117: 396-402.

Hagenmaier, R.D. 2005. A comparison of ethane, ethylene and CO_2 peel performance for fruit with different coatings. Postharvest Biology and Technology 37: 56-64.

Hassan, Z. H., Lesmayati, S., Qomariah, R. and Hasbianto, A. 2014. Effects of wax coating applications and storage temperatures on the quality of tangerine citrus (*Citrus reticulata*) var. Siam Banjar. International Food Research Journal 21: 641-648.

Iriti, M., Vitalini, S., Di Tommaso, G., D'Amico, S., Borgo, M. and Faoro, F. 2011. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. Australian Journal of Grape Wine Research 17: 263-269.

Kexiang, G., Xiaoguang, L., Ynghong, L., Tianbo, Z. and Shuliang, W. 2002. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. Journal of Phytopathology 150: 271-276.

Li, H. and Yu, T. 2000. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. Journal of Science, Food and Agriculture 81: 269-274.

Lingle, S.E., Lester, G.E. and Dunlap, J.R. 1987. Effect of postharvest heat treatment and storage on sugar metabolism in polyethylene wrapped muskmelon fruit. Journal of Horticultural Sciences 22: 917-919.

Liu, H.X., Jiang, W.B., Bi, Y. and Luo, Y.B. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. Postharvest Biology and Technology 35: 263-269.

Liu, J., Tian S., Meng, X. and Yong, Xu. 2007. Effect of chitosan on control postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 44: 300-306.

Margosan, D.A., Smilanick, J.L., Simmons, G.F. and Henson, D.J. 1997. Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. Plant Disease 81: 1405-1409.

Mazaro, S.M., Deschamps, C., de Mio, L.L., Biasi, L.A., de Gouvea, A. and Sautter, C.K. 2012. Postharvest behavior of strawberry fruits after preharvest treatment with chitosan and acibenzolar-S-methyl. Revista Brasileira de Fruticultura 30: 185-190.

Naeem Abadi, T., Keshavarzi, M., Alaee, H., Hajnajari, H. and Hoseinava, S. 2014. Blue mold (*Penicillium expansum*) decay resistance in apple cultivars, and its association with fruit physicochemical traits. Journal of Agricultural Sciences and Technology 16: 635-644.

Naeem Abadi, T., Keshavarzi, M., Alaee, H. and Hashemi, M. 2011. Inhibitory effects of *Trichoderma atroviride* and *T. harzianum* on postharvest decay agents. Proceedings of the International Scientific Conference on the Role of Fruit Growing Industry in Ensuring Food Safety and Stable Economic Growth. Belarus. pp. 119-121**.**

Pan, Y.G. and Liu, X.H. 2011. Effect of benzo-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) treatment on the resistant substance in postharvest mango fruits of different varieties. African Journal of Biotechnology 10: 15521-15528.

Patricia, S.T., Palmu, C.O. and Grosso, C.R.F. 2005. Effect of edible wheat gluten-based films and coatings on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. Postharvest Biology and Technology 36: 199-208.

Rappussi, M.S.C., Pascholati, S.F., Benato, E.A. and Cia, P. 2009. Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest 'Valencia' oranges. Brazilian Archives of Biology and Technology 52: 513-521.

Reddy, M.V.B., Angers, P., Castaigne, F. and Arul, J. 2000. Chitosan effects on black mold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes. Journal of American Society for Horticultural Sciences 125: 742-747.

Rodov, V., Ben-Yehoshua, S.H., Fierman T. and Fang, D. 1995. Humidity packaging reduces decay of harvested red bell pepper. Horticultural Sciences 30: 299-302.

Romanazzi, G., Nigro, F. and Ippolito, A. 2000. Effectiveness of pre and postharvest chitosan treatments on storage decay of strawberries. Revista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura 62: 71-75.

Romanazzi, G., Nigro, E., Ippolito, A. and Di Venere, D. 2002. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. Journal of Food Sciences 67: 1862-1867.

Ruiz-García, Y. and Gómez-Plaza, E. 2013. Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content. Agriculture 3: 33-52

Sathyabama, M. and Balasubramanian, R. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. Crop Protection 17: 307-313.

Spotts, R.A., Cervantes, L.A., and Mielke, E.A. 1999. Variability in postharvest decay among apple cultivars. Plant Disease 83: 1051-1054.

Terry, L.A. and Joyce, D.C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. Postharvest Biology and Technology 32: 1-13.

Vieira, F.G., Borges, G.da S., Copetti, C., Gonzaga, L.V., Nunes, E.da C. and Fett R. 2009. Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars. Organo Official de la Nutricion 59: 101-106.

Wang, F.D., Feng, G.H. and Chen, K.S. 2009. Defense responses of harvested tomato fruit to burdock fructooligosaccharide, a novel potential elicitor. Postharvest Biology and Technology 52: 110-116.

Waterhouse, A. 2015. Folin-Ciocalteau micro method for total phenolic in wine. Department of Viticulture and Ecology, Universoty of California, Davis. Available at: http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/folin-ciocalteau-micro-method-for-total-phenol-in-wine