Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Sensitivity of *Penicillium digitatum* isolates, citrus green mold agent, to imazalil, fludioxonil, pyrimethanil, azoxystrobin and thiabendazole in North of Iran

Ghasem Ghorbani Khatir[1], Mohammad Ali Aghajani[2*], Amir Zolfaghari[1], Hojjatollah Rabbani Nasab[2]

[1] Department of Agriculture, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
[2] Department of Plant Protection Research, Agriculture and Natural Resources Research and Education Center of Golestan Province, Gorgan, Iran, Email: maaghajanina@yahoo.com

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2024/01/16
Revised: 2024/05/06
Accepted: 2024/05/07

Keywords:
orange fruit
Penicillium digitatum
green mold
EC50
resistance monitoring

ABSTRACT

Background and objectives: Green mold is the most common disease after citrus harvest, which is caused by the fungus *Penicillium digitatum*. In Spain, the study of Tost (1988) showed that up to 80% of the waste after citrus harvest is related to contamination by the pathogen *P.digitatum*. 75% of all fruit rot exported from South Africa to London was caused by green mold disease. Post-harvest treatments with chemicals are reasonable because of low cost, easy to use, and because of the therapeutic effect for the created pollution. Among the fruits treated with common fungicides, the damage is 2-4% and without it 15-30%. The problem of resistance to fungicides has been observed in all the important areas of citrus production in the world and causes a considerable amount of fruits to rot. Frequent use of thiabendazole fungicide in Iran has reduced the effectiveness of this fungicide. The results of this research can be a basis for further and continuous research to identify resistance to fungicides and manage the use of fungicides.

Materials and methods: In order to evaluate the efficacy of post-harvest citrus fungicides in terms of inhibition of mycelium growth and conidial germination, 150 samples were randomly collected from the warehouses and gardens of three eastern (Gorgan), central (Sari and Ghaem Shahr) and western (Ramsar and Tenkaben), sampling and 15 isolates were extracted from them. To purify the isolates, single conidial method was used. The most commonly used technique is to determine the toxicity of a fungicide in the laboratory by measuring fungal growth or conidia production. Growth was done in culture medium with different concentrations of fungicides and EC50 values were evaluated to determine the effectiveness of fungicides.

Results: The results of the laboratory studies showed that the lowest to the highest average values of EC50 for the growth of mushroom mycelium correspond to the fungicides Azoxystrobin, Imazalil, Fludioxonil, Pyrimetanil and Thiabendazole with the values of 0.045, 0.065, 0.08, 0.34 and It was 0.55 µg/ml and for the inhibition of conidial germination, from the lowest to the highest average EC50 values, related to the fungicide Azoxystrobin, Imazalil, Fludioxonil, Thiabendazole and Pyrimethanil with the values of 0.072, 0.117, 0.155, 0.731 and 0.774 micrograms per milliliter. All isolates were sensitive to the fungicide Azoxystrobin, but the EC50 values were outside the baseline range. Also, all isolates were sensitive to fludioxonil fungicide and some isolates had EC50 values outside the baseline range. The EC50 values of all the isolates were in the

sensitive range to the fungicide imazalil, and in relation to the fungicide pyrimethanil, all the isolates were sensitive and some isolates were outside the basic range. Four isolates were resistant to thiabendazole fungicide and 11 isolates were in the sensitive range.

Conclusion: The repeated use of thiabendazole fungicide in Iran to control green mold disease has caused the emergence of *P.digitatum* resistant isolates and the new fungicides showed good effectiveness. Even though the fungicide imazalil showed the greatest effectiveness in reducing the percentage of disease occurrence and control of conidiogenesis in this study, the studies of researchers in America, South America, South Africa, China and New Zealand show the emergence of resistant isolates of *P.digitatum* and The severity of the disease has increased; Therefore, it is suggested to use new fungicides that have different effectiveness to control the disease after harvesting citrus green mold, and to manage resistance to fungicides, monitoring EC50 values in the laboratory should be continuously evaluated for new fungicides to identify resistant pathogenic isolates.

Cite this article: Ghorbani Khatir, Gh., Aghajani, M.A., Zolfaghari, A., Rabbani Nasab, H. 2024. Sensitivity of *Penicillium digitatum* isolates, citrus green mold agent, to imazalil, fludioxonil, pyrimethanil, azoxystrobin and thiabendazole in North of Iran. *Food Processing and Preservation Journal*, 15(4), 107-126.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/fppj.2024.22095.1795
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

حساسیت جدایه‌های *Penicillium digitatum*، عامل کپک سبز مرکبات به قارچ‌کش‌های ایمازالیل، فلودیوکسونیل، پیریمتانیل، آزوکسی استروبین و تیابندازول در شمال ایران

قاسم قربانی خطیر[۱]، محمدعلی آقاجانی[۲*]، امیر ذوالفقاری[۱]، حجت‌اله ربانی‌نسب[۲]

[۱] گروه کشاورزی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

[۲] بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران، رایانامه: maaghajanina@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۸

واژه‌های کلیدی:
میوه پرتقال
Penicillium digitatum
کپک سبز
EC50
پایش مقاومت

چکیده

سابقه و هدف: کپک سبز، شایع‌ترین بیماری پس از برداشت مرکبات است که توسط قارچ *Penicillium digitatum* ایجاد می‌گردد. تیمارهای پس از برداشت با مواد شیمیایی به‌علت هزینه کم، استفاده آسان و تاثیر درمانی برای آلودگی‌های ایجاد شده معقول است. خسارت بیماری در میوه‌های تیمار شده با قارچ‌کش‌های معمول، ۲ تا ۴ درصد و بدون آن ۱۵ تا ۳۰ درصد می‌باشد. مشکل مقاومت به قارچ‌کش‌ها در تمام مناطق مهم تولید مرکبات در جهان مشاهده شده و باعث پوسیدگی میزان قابل توجه میوه‌ها می‌شود. استفاده مکرر از قارچ‌کش تیابندازول در ایران سبب کاهش کارایی این قارچ‌کش شده است. هدف از اجرای این تحقیق، تعیین میزان حساسیت جدایه‌های قارچ بیمارگر به قارچ‌کش‌ها و احتمال بروز مقاومت در آن‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها: به منظور ارزیابی کارایی قارچ‌کش‌های پس از برداشت مرکبات از نظر مهار رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدی، ۱۵۰ نمونه به‌صورت تصادفی از انبارها و باغ‌های سه سایت شرقی (گرگان)، مرکزی (ساری و قائم شهر) و غربی (رامسر و تنکابن) استان‌های مازندران و گلستان، نمونه‌برداری و ۱۵ جدایه قارچ از آن‌ها استخراج شد. برای خالص‌سازی جدایه‌ها، ازروش تک کنیدی استفاده شد. روش استفاده شده برای تعیین میزان سمیت قارچ‌کش در آزمایشگاه، بر اساس اندازه‌گیری رشد قارچ یا تولید کنیدی بود. رشد در محیط کشت با غلظت‌های مختلف قارچ‌کش انجام شد و مقادیر EC50 برای تعیین میزان کارایی قارچ‌کش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که کمترین تا بیشترین مقادیر میانگین EC50 برای رشد میسلیوم قارچ به ترتیب مربوط به قارچ‌کش‌های آزوکسی‌استروبین، ایمازالیل، فلودیوکسونیل، پیریمتانیل و تیابندازول با مقادیر ۰/۰۴۵ ، ۰/۰۶۵ ، ۰/۰۸ ، ۰/۳۴ و ۰/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و برای مهار جوانه‌زنی کنیدی، به ترتیب از کمترین تا بیشترین مقادیر

میانگین EC50، مربوط به قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین، ایمازالیل، فلودیوکسونیل، تیابنـدازول و پیری‌متانیل با مقادیر ۰/۰۷۲ ، ۰/۱۱۷ ، ۰/۱۵۵ ، ۰/۷۳۱ و ۰/۷۷۴ میکروگرم بر میلـی‌لیتـر بـود. همه جدایه‌ها به قارچ‌کش آزوکسی اسـتروبین حسـاس بودنـد و امـا مقـادیر EC50 خـارج از محدوده پایه بود. همچنین همه جدایه‌ها به قارچ‌کش فلودیوکسونیل حساس بودند و برخـی از جدایه‌ها دارای مقادیر EC50 خارج از محدوده پایه بود. مقادیر EC50 تمام جدایه‌ها نسبت به قارچ‌کش ایمازالیل در محدوده حساس قرار گرفت و در رابطه با قـارچ‌کـش پیریمتانیـل، همـه جدایه‌ها حساس و برخی از جدایه‌ها خـارج از محـدوده پایـه بـود. چهـار جدایـه نسـبت بـه قارچ‌کش تیابندازول مقاوم و ۱۱ جدایه در محدوده حساس قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: استفاده مکرر از قارچ‌کش تیابندازول در ایران برای کنترل بیماری کپک سبز، سـبب ظهور جدایه‌های مقاوم به *P.digitatum* شده است و قارچ‌کش‌های جدیـد، اثربخشـی خـوبی نشان دادند. با اینکه قارچ‌کش ایمازالیل بیشترین اثرگذاری را در کاهش درصد وقوع بیمـاری و کنترل کنیدی‌زایی در این مطالعه نشان داد، اما با وجود حساسیت جدایه‌های بیمـارگر، پیشـنهاد می‌شود برای کنترل بیماری پس از برداشت کپک سبز مرکبـات از قـارچ‌کـش‌هـایی جدیـد کـه اثربخشی متفاوتی دارند، استفاده گردد و برای مدیریت مقاومت به قارچ‌کش‌هـا، پـایش مقـادیر EC50 در آزمایشگاه، به‌طور مداوم برای قارچ‌کش‌های جدید جهت شناسایی جدایه‌های مقاوم بیمارگر مورد ارزیابی قرار گیرد.

استناد: قربانی خطیر، قاسم؛ آقاجانی، محمدعلی؛ ذوالفقاری، امیر؛ ربـانی‌نسـب، حجـت‌الـه. (۱۴۰۲). حساسـیت جدایـه‌هـای *Penicillium digitatum*، عامل کپک سبز مرکبـات بـه قـارچ‌کـش‌هـای ایمازالیـل، فلودیوکسـونیل، پیریمتانیـل، آزوکسی استروبین و تیابندازول در شمال ایران. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۵(۴)، ۱۲۶-۱۰۷.

DOI: 10.22069/fppj.2024.22095.1795

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

سطح زیر کشت مرکبات ۲۷۶۰۰۰ هکتار است و با تولید سالانه ۴ میلیون تن میوه مرکبات، ایران هشتمین کشور عمده تولید مرکبات در جهان است. کپک سبز شایع‌ترین و شدیدترین بیماری پس از برداشت مرکبات است و عامل آن قارچ بیمارگر *Penicillium digitatum* می‌باشد (۷). در اسپانیا مطالعه توست (۱۹۸۸) نشان داد که تا ۸۰ درصد از ضایعات پس از برداشت مرکبات مربوط آلودگی توسط بیمارگر *P.digitatum* می‌باشد (۳۷). ۷۵ درصد از کل پوسیدگی میوه‌های صادر شده از آفریقای جنوبی به لندن، ناشی از بیماری کپک سبز بود (۲۷). سطح هر میوه مرکبات در زمان برداشت با کنیدی‌های قارچی آلوده می‌شود و آلودگی‌ها از طریق زخم‌ها در طول عملیات برداشت باعث آلوده شدن میوه می‌شوند (۱۴و۳). کنیدی‌ها در باغ، محل بسته‌بندی، انبار، ماشین‌های حمل و بازار وجود دارد (۱۱). در اثر زخم‌های وارد شده طی برداشت، کنیدی‌های هوازاد بیماری‌زا وارد بافت میوه شده و ۱۰-۵۰ درصد خسارت ایجاد می‌کنند (۲). میزان ضایعات پس از برداشت میوه در ایران ۲۰ تا ۳۰ درصد است (۱۸). ظرفیت تکثیر این قارچ فوق العاده زیاد است (۱۳).

قارچ *P.digitatum* نکروتروف است و برای آلودگی نیاز به زخم قبلی بر روی پوست است تا به بافت میوه نفوذ کند (۳۶). پاتیل و همکاران (۲۰۱۷) از بین شش جدایه مورد بررسی، سه جدایه از *P.digitatum* را به‌عنوان جدایه‌های مهاجم معرفی نمودند. حداکثر رشد میسلیوم بیمارگر در محیط جامد CYA در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۹۰ میلی‌متر رشد شعاعی به‌دست آمد و تمام جدایه‌ها پس از ۲ تا ۳ روز پس از مایه‌زنی علایم پوسیدگی را بر روی میوه نشان دادند (۲۶).

تیمارهای پس از برداشت با مواد شیمیایی به‌علت هزینه کم، استفاده آسان و به‌خاطر تاثیر درمانی برای آلودگی‌های ایجاد شده معقول است. در میان میوه‌های تیمار شده با قارچ‌کش‌های معمول، خسارت ۲ تا ۴ درصد و بدون آن ۱۵ تا ۳۰ درصد می‌باشد. کاربرد قارچ‌کش فشار انتخابی سنگینی را بر روی جمعیت قارچ اعمال می‌کند (۱۳،۱۲). در ابتدا قارچ‌کش باعث کنترل سویه‌های حساس می‌شود. مشکل مقاومت به قارچ‌کش‌ها تمام مناطق مهم تولید مرکبات در جهان مشاهده شده و باعث پوسیدگی میزان قابل توجه میوه‌ها می‌شود (۷). متداول‌ترین تکنیک استفاده شده، تعیین میزان سمیت قارچ‌کش در آزمایشگاه، بر اساس اندازه‌گیری رشد قارچ یا تولید کنیدی است. رشد در محیط کشت با غلظت‌های مختلف قارچ‌کش انجام می‌شود و مقادیر EC50 برای تعیین میزان کارایی قارچ‌کش‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در سال ۲۰۰۶ دو قارچ‌کش جدید فلودیوکسونیل و پیریمتانیل برای استفاده پس از برداشت مرکبات در آمریکا ثبت شد و پس از آن قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین ثبت شده است (۲۱). به‌منظور حفظ اثربخشی ترکیبات جدید و پایش مقاومت به قارچ‌کش، باید پس از معرفی قارچ‌کش، مدیریت پایش دوره‌ای از جمعیت قارچ هدف از نظر حساسیت آن به ترکیبات جدید انجام شود (۲۱). بزرگ‌ترین مشکل برای استفاده از تیابندازول، مقاومت آن است. مطالعات مولکولی نشان داد که مقاومت به تیابندازول با جهش در توالی اسیدآمینه در ارتباط است (۳۱). برنت (۱۹۸۸) اصطلاح پایش مقاومت[1] را برای تعیین حساسیت جمعیت مطرح نمود و کانتیس و همکاران (۲۰۰۷) مقایسه مقاومت بین قارچ‌کش‌های قدیمی و جدید را از نظر کارایی کنترل قارچ‌کش‌ها مورد آزمایش قرار دادند (۵ و ۲۱).

[1] Resistance monitoring

به‌طورکلی، استفاده مکرر از قارچ‌کش تیابنـدازول در ایران سبب کاهش کارایی این قارچ‌کش شـده و تـا به حال هیچ تحقیقی در ارتباط بـا میـزان کـارایی ایـن قارچ‌کش در ایران انجام نشده است. نتایج این تحقیـق می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات بیشتر و مداوم جهـت شناسایی مقاومت به قارچ‌کش‌هـا و مـدیریت مصـرف قارچ‌کش‌ها باشد. این تحقیق برای اولین بار در ایـران با هدف ارزیابی قارچ‌کش‌های جدید و اثـر تیمارهـای کنترلی برای کاهش خسارات فراوان پوسیدگی پس از برداشت ناشی از کپک سبز مرکبات انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جدا سازی قـارچ *P.digitatum*: ۱۵۰ نمونه میوه پرتقال به صورت تصادفی از انبارها و باغ‌هـا از سه سایت شرقی (منطقه گرگان) ، مرکزی (سـاری و قائم‌شـهر) و غربـی (رامسـر و تنکـابن)، نمونـه‌بـرداری شدند. در نهایت ۱۵ جدایه از سـه منطقـه شـمال ایـران جهـت ارزیـابی مقـادیر EC50 مهـار رشـد میسـلیوم و جوانه‌زنی کنیدی برای قارچ‌کش‌هـای پـس از برداشـت مرکبات مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- جدایه‌های *Penicilium digitatum* مورد استفاده برای ارزیابی حساسیت به قارچ‌کش‌ها

Table 1- *Penicillium digitatum* isolates used to evaluate Sensitivity to fungicides

No	Code no. کد جدایه‌ها	Source of isolation منابع جدایه‌ها	Location موقعیت مکانی
1	A33	Orchard(باغ)	Ramsar(رامسر)
2	A10	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Tonekabon(تنکابن)
3	A3	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Tonekabon(تنکابن)
4	A11	Orchard(باغ)	Ramsar(رامسر)
5	A5	Orchard(باغ)	Ramsar(رامسر)
6	B1	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Sari(ساری)
7	B5	Orchard(باغ)	Sari(ساری)
8	B25	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Qaem Shahr(قائم‌شهر)
9	B26	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Sari(ساری)
10	B21	Orchard(باغ)	Qaem Shahr(قائم‌شهر)
11	C28	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Gorgan(گرگان)
12	C16	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Gorgan(گرگان)
13	C29	Orchard(باغ)	Gorgan(گرگان)
14	C27	Packinghouse(صنایع بسته بندی)	Gorgan(گرگان)
15	C30	Orchard(باغ)	Gorgan(گرگان)

خالص‌سازی و نگهداری قارچ *P.digitatum*: بـرای خالص‌سازی جدایه‌هـا، ازروش تـک کنیـدی اسـتفاده شد. بدین‌منظور، ابتـدا جدایـه‌هـا روی محـیط کشـت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشـت داده شـدند. پس از گذشت یک هفته، بخش کوچکی از پرگنـه یـا توده‌های کنیدی تشکیل شده درسـطح محـیط کشـت، در ۱۰ میلی‌لیترآب مقطراسـتریل درون لولـه آزمـایش قرارداده شد و به مدت ۱/۵ دقیقه بـاورتکس هـم زده شد تا کنیدی‌ها به‌طورکامل درآب مقطـرپخش شـوند. سپس یک قطـره ازسوسپانسـیون کنیـدی روی سـطح پتری ریخته شد و به وسیله‌ی پیپت پاستور استریل که به وسیله‌ی شعله خم شده بود، در تمام سـطح محـیط به‌طور یکنواخت پخش گردید (۴۱).

شناسایی قارچ بیمارگر *P.digitatum*: بـرای مطالعـه ویژگی‌های میکروسکوپی (اندازه و شـکل کنیـدی‌هـا، تزیینـات و طـول فیالیـدها و متـولا و نحـوه انشـعاب

کنیدیوفورها)، جدایه‌ها روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و به‌مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شدند. بعد از یک هفته از جدایه‌های رشد کرده اسلاید تهیه شد. به این ترتیب که یک قطره اسید لاکتیک ۲۵ درصد روی لام ریخته شد و سپس قطعه بسیار کوچکی از پرگنه قارچ به آن اضافه گردید و بعد از گذاشتن لامل و تثبیت کردن قارچ با فشار روی لامل، اسلاید به‌دست آمده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعه‌ی قارچ از نظر خصوصیات ظاهری (رنگ پرگنه، رشد شعاعی پرگنه، رنگ و مقدار میسلیوم‌های هوایی و میزان هاگ‌زایی) با استفاده از ویژگی‌های توصیف شده در کتاب شناسایی گونه‌های قارچ پنیسیلیوم، استفاده شده است (۳۲، ۳۰). آزمون بیماری‌زایی قارچ بیمارگر *P. digitatum* : برای این کار پرتقال‌ها پس از برداشت از باغ با آب و صابون شسته شد و با اتانول ۹۵ درصد ضدعفونی سطحی شد و برای حفظ رطوبت بالا درون پلاستیک قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کنیدی با غلظت 5×10^6 کنیدی در میلی‌لیتر از طریق زخمی با ابعاد ۱×۲ میلی‌متر برروی پوست میوه مایه‌زنی شد. برای این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی در ۱۰ تکرار میوه پرتقال سالم آلوده شدو به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و پس از این مدت، میوه‌ها از نظر آلودگی به قارچ بیمارگر *P.digitatum* مورد بررسی قرار گرفت (۲۴، ۸).

تعیین مقادیر EC50 (غلظت موثر ۵۰ درصد) قارچ‌کش‌های پس از برداشت، برای مهار رشد میسلیوم: برای این تحقیق از قارچ‌کش‌های آزوکسی‌استروبین 250SC (شرکت سینجنتا)، فلودیوکسونیل 230SC (شرکت سینجنتا)، ایمازالیل 500EC (شرکت آداما)، پیریمتانیل 300SC (شرکت اگروبست) وتیابندازول 600WP (شرکت گیاه) استفاده شده است. برای تعیین مقادیر EC50 برای مهار رشد میسلیوم، از رقیق‌سازی آگار استفاده شد. غلظت‌های مختلف قارچ‌کش (جدول ۱) پس از خنک شدن محیط کشت به میزان ۴۰ درجه سانتی‌گراد به PDA اضافه شد. قطعه ۵ میلی‌متری از میسلیوم قارچ در مرکز پتری‌های ۹ سانتی‌متری قرار داده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و همه پتری‌ها به‌مدت ۷ روز در انکوباتور در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و رشد شعاعی برای هر تکرار اندازه‌گیری شد. برای غلظت‌های مختلف سه تکرار در نظر گرفته شد. درصد مهار رشد میسلیومی قارچ از طریق فرمول پندی و همکاران (۱۹۸۲) محاسبه شد (۲۵).

$$\text{درصد مهار رشد میسلیوم} = \frac{\text{مقدار رشد شعاعی تیمار} - \text{مقدار رشد شعاعی شاهد}}{\text{مقدار رشد شعاعی شاهد}} \times ۱۰۰$$

تعیین مقادیر EC50 برای مهار جوانه‌زنی کنیدی: به‌منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش در میزان جوانه‌زنی کنیدی، جدایه‌های قارچ *P.digitatum* مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون 10^6 کنیدی قارچ بیمارگر در میلی‌لیتر بر روی محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوت (جدول ۲) قارچ‌کش اسپری شد، سپس پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت نگهداری شد و جوانه‌زنی کنیدی‌ها با میکروسکوپ و با بزرگنمایی × ۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. اگر طول ریسه خارج شده از کنیدی حداقل دو برابر قطر آن بود، کنیدی جوانه زده در نظر گرفته شد. تعداد کنیدی‌های جوانه‌زده شمارش شد و با استفاده از معادله زیر درصد بازدارندگی از جوانه‌زنی کنیدی محاسبه گردید (۱۵).

$$\text{درصد بازدارندگی از جوانه‌زنی کنیدی} = \frac{\text{تعداد کنیدی جوانه زده تیمار} - \text{تعداد کنیدی جوانه زده شاهد}}{\text{تعداد کنیدی جوانه زده شاهد}} \times ۱۰۰$$

همچنین به‌منظور مقایسه قارچ‌کش‌ها از نظر توان بازدارندگی آنها ازشاخص EC50 استفاده شد. به‌طورکلی برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار StatGraphics 18.0 و برای محاسبه شاخص EC50 قارچ‌کش‌ها و ترسیم منحنی‌های پاسخ دوز از نرم‌افزار SigmaPlot 14.0 استفاده گردید.

جدول ۲- غلظت‌های مختلف قارچ‌کش برای تعیین مقادیر EC50 بیمارگر *Penicilium digitatum*.

Table 2. Different concentrations of fungicides to determine EC50 values of *Penicilium digitatum*.

Fungicide قارچ کش	Concentrations (µg/ml) غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)					
Imazalil (ایمازالیل)	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1
Pyrimethanil (پیریمتانیل)	0	0.05	0.1	0.5	1	5
Thiabendazole (تیابندازول)	0	0.05	0.1	0.5	1	5
Azoxystrobin (آزوکسی‌استروبین)	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1
Fludioxonil (فلودیوکسونیل)	0	0.05	0.1	0.5	1	5

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: بر اساس جدول تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری ($P<0.01$) میان قارچ‌کش‌ها از لحاظ مقادیرEC50 بازدارندگی از رشد میسلیومی وجوانه‌زنی کنیدی مشاهده شد؛ اما بین جدایه‌های بیمارگر بر اساس دو متغیر یاد شده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین مقادیر EC50 بازدارندگی از رشد میسلیومی و جوانه‌زنی کنیدی نیز قارچ‌کش‌ها را در سه گروه قرار داد (جدول ۴).

جدول ۳-تجزیه واریانس بر اساس دو متغیر قارچ‌کش‌ها و جدایه‌های قارچ *Penicilium digitatum* جمع‌آوری شده از مناطق شمال ایران.

Table 3. Analysis of variance based on two variables of fungicides and isolates of *Penicilium digitatum* collected from northern regions of Iran.

Source of variance منابع تغییرات	Df درجه آزادی	Mean Square میانگین مربعات	
		EC50 PMI* غلظت موثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد میسلیوم	EC50 PSI غلظت موثر ۵۰ درصد بازدارنده جوانه‌زنی کنیدی
Fungicide (قارچ کش)	4	0.734**	1.848**
Isolate (جدایه)	14	0.034 ns	0.066 ns
Replicate (تکرار)	2	24.43 ns	29.27 ns
Residual (باقیمانده)	56	0.037	0.059
Total (کل)	74		

* PMI و PSI به‌ترتیب به معنی ممانعت از رشد میسلیومی و جوانه‌زنی کنیدی هستند.

* PMI= inhibit mycelial growth. PSI= inhibit conidial germination

جدول۴- مقایسه میانگین‌های مقادیر EC50 بازدارندگی از رشد میسلیوم ومقادیر EC50 بازدارندگی از جوانه‌زنی کنیدی جدایه‌های قارچ *Penicilium digitatum*.

Table 4. Comparison of the mean values of EC50 inhibition of mycelium growth and conidial germination of isolates of *Penicilium digitatum.*

Fungicide قارچ کش	EC50 (mycelial growth) غلظت موثر ۵۰ درصد بازدارنده رشد میسیلیوم	EC50 (conidial germination) غلظت موثر ۵۰ درصد بازدارنده جوانه‌زنی کنیدیوم
Azoxystrobin (آزوکسی‌استروبین)	0.046 c	0.071 c
Imazalil (ایمازالیل)	0.065 c	0.117 c
Fludioxonil (فلودیوکسونیل)	0.078 c	0.155 c
Pyrimethanil (پیریمتانیل)	0.338 b	0.774 a
Thiabendazole (تیابندازول)	0.547 a	0.731 b

نتایج تعیین مقادیر EC50 قارچ‌کش‌ها برای مهار رشد میسلیوم

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش ایمازالیل: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش ایمازالیل برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.01$). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌های مورد آزمایش ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد ۰/۰۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های A5، A33، B21 و B26، کمترین میزان رشد میسلیوم را در حضور قارچ‌کش ایمازالیل نشان دادند و در مقابل، جدایه‌های B1 و C16 بیشترین رشد میسلیوم را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش پیریمتانیل: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش پیریمتانیل برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیرEC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.01$). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌های مورد آزمایش ۰/۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های B26، C16، C28 و B21 کمترین میزان رشد میسلیوم را در حضور قارچ‌کش پیریمتانیل نشان دادند و در مقابل، جدایه‌های A5، A10،A33،B1 و B25 بیشترین رشد میسلیوم را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش فلودیوکسونیل: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش فلودیوکسونیل برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.01$). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۹۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌های مورد آزمایش ۰/۰۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه های A5، A33، C28 و B26 کمترین میزان رشد میسلیوم را در حضور قارچ‌کش فلودیوکسونیل نشان دادند و در مقابل، جدایه‌های

A11، A10، B1 ، B21و C30 بیشترین رشد میسلیوم را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش آزوکسی استروبین برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۶۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌های مورد آزمایش ۰/۰۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های A10 وC27 کمترین میزان رشد میسلیوم را در حضور قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین نشان دادند و در مقابل، جدایهC16، بیشترین رشد میسلیوم را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش تیابندازول: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش تیابندازول برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۱۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۱/۱۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌ها مورد آزمایش ۰/۵۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های A3، A5، A10، B5، C16 ، C27 و C30 کمترین میزان رشد میسلیوم را در حضور قارچ‌کش تیابندازول نشان دادند و در مقابل، جدایه‌های A33، B25، B26، C28 و C29 بیشترین رشد میسلیوم را داشتند.

بنابراین به‌ترتیب از کمترین تا بیشترین مقادیر میانگین EC50 برای رشد میسلیوم در شرایط آزمایشگاه برای جدایه‌های بیمارگر *P.digitatum*، مربوط به قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین، ایمازالیل، فلودیوکسونیل، پیریمتانیل و تیابندازول با مقادیر ۰/۰۴۵، ۰/۰۶۵، ۰/۰۸، ۰/۳۴ و ۰/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

تعیین مقادیر EC50 برای مهارجوانه‌زنی کنیدی

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش ایمازالیل: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش ایمازالیل برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). کمترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۱۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌ها مورد آزمایش ۰/۱۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های A5، A10، A33، B5،B21، C27 و C30 کمترین میزان جوانه زنی کنیدی را در حضور قارچ‌کش ایمازالیل داشتند و جدایه‌های B1، B25 و C16 بیشترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش پیریمتانیل: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش پیریمتانیل برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از مقادیرEC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۷۰۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۸۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین ۱۵ جدایه مورد آزمایش۰/۷۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های A3، A5، A10،A33 A11 و B25 کمترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را در حضور

قارچ‌کش پیریمتانیل داشتند و جدایه‌های B1، B5، B21، B26، C16، C27 و C28 بیشترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش فلودیوکسونیل: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش فلودیوکسونیل برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۱۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۱۸۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌های مورد آزمایش ۰/۱۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های A3، A5، B1، B26 و C30 کمترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را در حضور قارچ‌کش فلودیوکسونیل داشتند و جدایه‌های A11، B5، B21، B25، C16 و C28 بیشترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش آزوکسی استروبین برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۰۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌های مورد آزمایش ۰/۰۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه‌های A3 و A5 کمترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را در حضور قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین داشتند و جدایه‌های A33، B1، B21، B25، C27 و C30 بیشترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را داشتند.

نتایج بررسی اثر قارچ‌کش تیابندازول: نتایج به‌دست آمده از تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش تیابندازول برروی جدایه‌های عامل بیماری نشان داد که از لحاظ مقادیر EC50 بین تیمارهای مختلف قارچ‌کش اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0.01). کمترین مقدار غلظت EC50 در بین جدایه‌ها ۰/۱۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقدار EC50 در بین جدایه‌ها ۱/۷۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و مقدار متوسط غلظت موثر ۵۰ درصد در بین جدایه‌های مورد آزمایش ۰/۷۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه های A3، A5 ، B5،A10 ، C27 و C30 کمترین میزان جوانه زنی کنیدی را در حضور قارچ‌کش تیابندازول داشتند و جدایه‌های B25، B26، C28 و C29 بیشترین میزان جوانه‌زنی کنیدی را داشتند.

بنابراین به ترتیب از کمترین تا بیشترین مقادیر میانگین EC50 برای جوانه‌زنی کنیدی در شرایط آزمایشگاه برای جدایه‌های بیمارگر *P. digitatum*، مربوط به قارچ‌کش آزوکسی‌استروبین، ایمازالیل، فلودیوکسونیل، تیابندازول و پیری‌متانیل با مقادیر ۰/۰۷۲، ۰/۱۱۷، ۰/۱۵۵، ۰/۷۳۱ و ۰/۷۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

حساسیت جدایه‌های *P.digitatum*، بر اساس مقادیر EC50 برای مهار رشد میسلیوم به قارچ‌کش‌های پس از برداشت: نتایج حساسیت یا مقاومت جدایه‌های مورد مطالعه با قارچ‌کش‌های ایمازالیل، تیابندازول، پیریمتانیل، آزوکسی استروبین و فلودیوکسونیل بر اساس مقادیر EC50 برای رشد میسلیوم، و محدوده پایه تعیین شده توسط کانتیس و فورستر (۲۰۰۸)، در جدول (۵) نشان داده شده است (۱۹). همه جدایه‌ها به قارچ‌کش آزوکسی استروبین حساس بودند و اما مقادیر EC50 خارج از محدوده پایه بود. همچنین همه جدایه‌ها به قارچ‌کش فلودیوکسونیل حساس بودند و برخی از جدایه‌ها

دارای مقادیر EC50 خارج از محدوده پایه بود. مقادیر EC50 تمام جدایه‌ها نسبت به قارچ‌کش ایمازالیل در محدوده حساس قرار گرفت و در رابطه با قارچ‌کش پیریمتانیل همه جدایه‌ها حساس و برخی از جدایه‌ها خارج از محدوده پایه بود. چهار جدایه نسبت به قارچ‌کش تیابندازول مقاوم و ۱۱ جدایه در محدوده حساس قرار گرفتند.

جدول ۵- حساسیت جدایه‌های *Penicilium digitatum*، جمع آوری شده از شمال ایران بر اساس مقادیر EC50 برای مهار رشد میسلیوم به قارچ‌کش‌های پس از برداشت.

Table 5. Sensitivity of *Penicilium digitatum* isolates, collected from northern Iran based on EC50 values for mycelium growth inhibition, to post-harvest fungicides.

Isolate number شماره جدایه	Azoxystrobin آزوکسی‌استروبین		Fludioxonil فلودیوکسونیل		Imazalil ایمازالیل		Pyrimethanil پیریمتانیل		Tiabendazol تیابندازول	
	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity 1 category **گروه بندی حساسیت**	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	sensitivity category **گروه بندی حساسیت**	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	sensitivity category **گروه بندی حساسیت**	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity category **گروه بندی حساسیت**	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity category **گروه بندی حساسیت**
A10	0.038	S-OBL	0.086	S-OBL	0.067	S	0.499	S-OBL	0.113	S
A11	0.045	S-OBL	0.087	S-OBL	0.067	S	0.224	S	0.562	S
A3	0.047	S-OBL	0.074	S-OBL	0.070	S	0.267	S	0.122	s
A33	0.048	S-OBL	0.056	S	0.056	S	0.532	S-OBL	0.823	S
A5	0.043	S-OBL	0.063	S	0.061	S	0.513	S-OBL	0.220	S
B1	0.044	S-OBL	0.095	S-OBL	0.082	S	0.547	S-OBL	0.656	S
B21	0.044	S-OBL	0.097	S-OBL	0.051	S	0.238	S	0.659	S
B25	0.046	S-OBL	0.092	S-OBL	0.064	S	0.531	S-OBL	0.981	R
B26	0.049	S-OBL	0.062	S	0.055	S	0.233	S	1.114	R
B5	0.048	S-OBL	0.074	S-OBL	0.068	S	0.271	S	0.143	S
C16	0.061	S-OBL	0.083	S-OBL	0.077	S	0.200	S	0.386	S
C27	0.035	S-OBL	0.080	S-OBL	0.063	S	0.326	S	0.118	S
C28	0.043	S-OBL	0.054	S	0.062	S	0.138	S	1.141	R
C29	0.047	S-OBL	0.074	S-OBL	0.066	S	0.273	S	1.053	R
C30	0.046	S-OBL	0.099	S-OBL	0.065	S	0.282	S	0.122	S

۱. حساسیت به صورت‌های زیر تعریف شده است: S = حساس (در محدوده پایه)، S-OBL = حساس ولی خارج از محدوده پایه، R = مقاوم، MR = نیمه مقاوم، و HR = بسیار مقاوم. دامنه حساسیت پایه برای آزوکسی استروبین، فلودیوکسانیل و پیریمتالین به ترتیب عبارتند از ۰.۰۰۷ تا ۰.۰۲۸، ۰.۰۰۹ تا ۰.۰۷۲، و ۰.۲۰۸ تا ۰.۴۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (Kanetis and Förster, 2008). غلظت‌های تمایزی مورد استفاده برای مشخص کردن جدایه به عنوان مقاوم به ایمازالیل و تیابندازول، به ترتیب ۰.۱۵ یا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

[1.] Sensitivity is defined as S = sensitive (within baseline), S-OBL = sensitive but outside baseline, R = resistant, MR = moderately resistant, and HR = highly resistant. Baseline sensitivity ranges for azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil are 0.007 to 0.028, 0.009 to 0.072, and 0.208 to 0.413 µg/ml, respectively (Kanetis and Förster, 2008). Discriminatory concentrations used to characterize an isolate as resistant to imazalil or thiabendazole (TBZ) were 0.15 or 1 µg/ml, respectively (Kanetis*et al.*,2010).

هیستوگرام فراوانی غلظت موثر ۵۰ درصد برای مهار رشد میسلیوم بیمارگر *P. digitatum* برای ایمازالیل و تیابندازول نشان داد که تعداد ۷ جدایه در محدوده EC50 معادل ۰/۰۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار دارند. این مقادیر برای پیریمتانیل ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ۷ جدایه بود و برای قارچ‌کش آزوکسی استروبین، ۱۱ جدایه در محدوده ۰/۰۴۵ قرار گرفتند و برای قارچ‌کش تیابندازول پراکندگی جدایه‌ها در محدوده EC50 برابر با

۰/۲ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر با ۴ جدایه بود و برای قارچ‌کش فلودیوکسونیل جدایه‌ها در دو محدوده غلظت ۰/۰۷۵ و ۰/۰۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین فراوانی برابر با ۴ جدایه بود شکل (۱).

حساسیت جدایه‌های *P.digitatum*، بر اساس مقادیر EC50 برای مهار جوانه‌زنی کنیدی، به قارچ‌کش‌های پس از برداشت: نتایج حساسیت یا مقاومت جدایه‌های مورد مطالعه با قارچ‌کش‌های ایمازالیل، تیابندازول، پیریمتانیل، آزوکسی‌استروبین و فلودیوکسونیل بر اساس مقادیر EC50 برای جوانه‌زنی کنیدی و محدوده پایه تعیین شده توسط کانتیس و همکاران (۲۰۰۸) در جدول ۶ نشان داده شده است (۱۹). همه جدایه‌ها به قارچ‌کش آزوکسی استروبین حساس بودند و اما مقادیر EC50 خارج از محدوده پایه بود. همچنین همه جدایه‌ها به قارچ‌کش فلودیوکسونیل در محدوده نسبتا مقاوم (MR) قرار گرفتند. مقادیر EC50 تمام جدایه‌ها به جز جدایه C16 نسبت به قارچ‌کش ایمازالیل در محدوده حساس قرار گرفت و در رابطه با قارچ‌کش پیریمتانیل همه جدایه‌ها حساس و خارج از محدوده پایه بود. ۵ جدایه نسبت به قارچ‌کش تیابندازول مقاوم و ۱۰ جدایه در محدوده حساس قرار گرفتند.

جدول ۶- حساسیت جدایه‌های *Penicilium digitatum*، جمع‌آوری شده از شمال ایران بر اساس مقادیر EC50 برای مهار جوانه‌زنی کنیدی، به قارچ‌کش‌های پس از برداشت.

Table 6. Sensitivity of *Penicilium digitatum* isolates, collected from northern Iran based on EC50 values for spore germination inhibition, to post-harvest fungicides

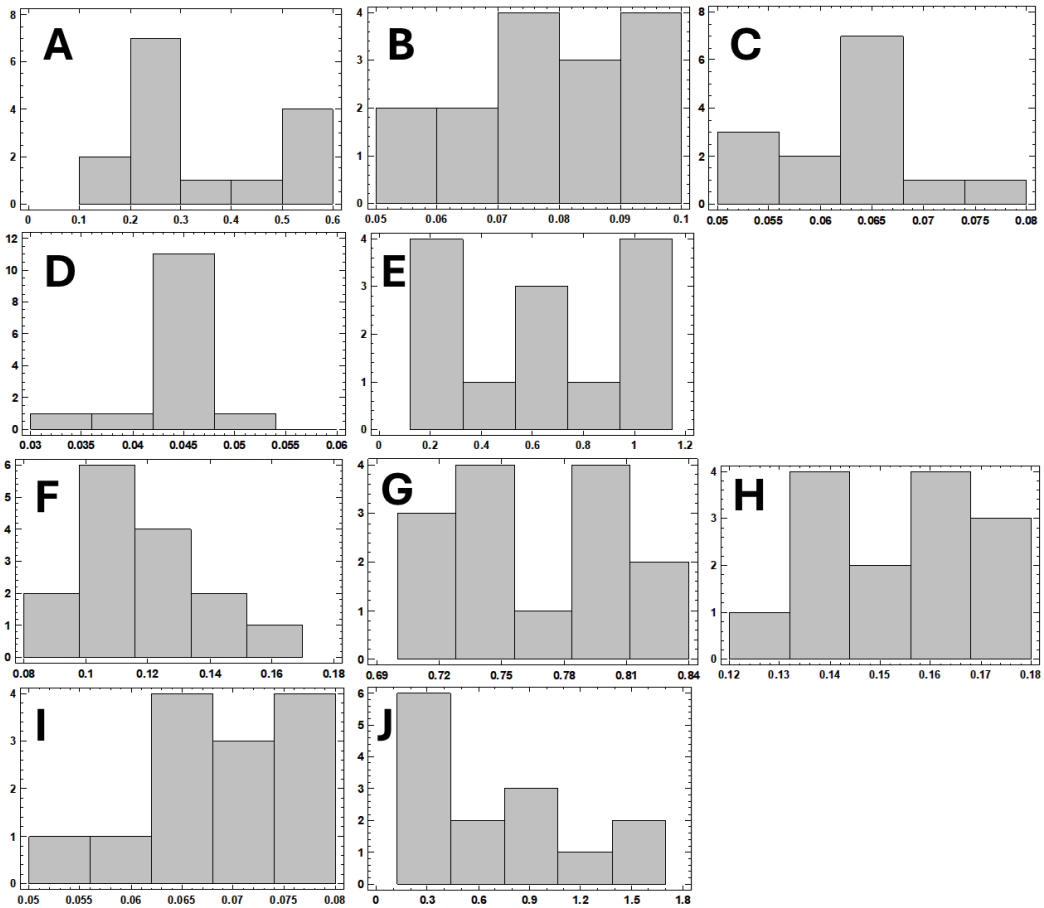
Isolates Number شماره جدایه	Azoxystrobin آزوکسی‌استروبین		Fludioxonil فلودیوکسونیل		Imazalil ایمازالیل		Pyrimethanil پیریمتانیل		Tiabendazol تیابندازول	
	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity 1 category گروه بندی حساسیت	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity category گروه بندی حساسیت	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity category گروه بندی حساسیت	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity category گروه بندی حساسیت	EC50 (µg/ml) غلظت موثر ۵۰ درصد	Sensitivity category گروه بندی حساسیت
A10	0.068	S-OBL	0.162	MR	0.101	S	0.737	S-OBL	0.195	S
A11	0.067	S-OBL	0.167	MR	0.117	S	0.724	S-OBL	0.654	S
A3	0.052	S-OBL	0.122	MR	0.125	S	0.726	S-OBL	0.140	S
A33	0.076	S-OBL	0.150	MR	0.101	S	0.743	S-OBL	1.013	R
A5	0.057	S-OBL	0.135	MR	0.108	S	0.703	S-OBL	0.121	S
B1	0.087	S-OBL	0.135	MR	0.146	S	0.836	S-OBL	0.831	S
B21	0.077	S-OBL	0.170	MR	0.093	S	0.801	S-OBL	0.943	S
B25	0.082	S-OBL	0.165	MR	0.145	S	0.748	S-OBL	1.273	R
B26	0.073	S-OBL	0.140	MR	0.113	S	0.801	S-OBL	1.434	R
B5	0.072	S-OBL	0.177	MR	0.109	S	0.847	S-OBL	0.208	S
C16	0.068	S-OBL	0.172	MR	0.165	S-OBL	0.811	S-OBL	0.679	S
C27	0.076	S-OBL	0.154	MR	0.085	S	0.812	S-OBL	0.204	S
C28	0.072	S-OBL	0.182	MR	0.122	S	0.811	S-OBL	1.702	R
C29	0.067	S-OBL	0.160	MR	0.119	S	0.755	S-OBL	1.390	R
C30	0.079	S-OBL	0.142	MR	0.110	S	0.760	S-OBL	0.181	S

۱. حساسیت به صورت‌های زیر تعریف شده است: S = حساس (در محدوده پایه)، S-OBL = حساس ولی خارج از محدوده پایه، R = مقاوم، MR = نیمه مقاوم، و HR = بسیار مقاوم. دامنه حساسیت پایه برای آزوکسی استروبین، فلودیوکسانیل و پیریمتالین به ترتیب عبارتند از ۰.۰۰۷ تا ۰.۰۲۸، ۰.۰۰۹ تا ۰.۰۷۲، و ۰.۲۰۸ تا ۰.۴۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (Kanetis and Förster, 2008). غلظت‌های تمایزی مورد استفاده برای مشخص کردن جدایه به عنوان مقاوم به ایمازالیل و تیابندازول، به ترتیب ۰.۱۵ یا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

1. Sensitivity is defined as S = sensitive (within baseline), S-OBL = sensitive but outside baseline, R = resistant, MR = moderately resistant, and HR = highly resistant (see text for details).Baseline sensitivity ranges for azoxystrobin,

fludioxonil, and pyrimethanil are 0.007 to 0.028, 0.009 to 0.072, and 0.208 to 0.413 µg/ml, respectively (Kanetisand Förster, 2008). Discriminatory concentrations used to characterize an isolate as resistant to imazalil or thiabendazole (TBZ) were 0.15 or 1 µg/ml, respectively (Kanetis*et al.*,2010).

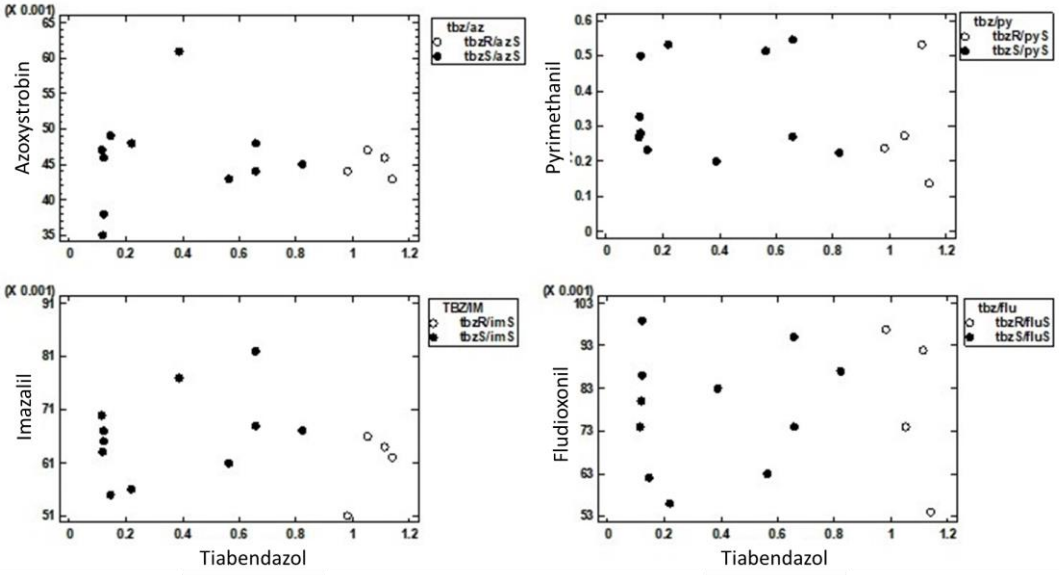
هیستوگرام فراوانی غلظت موثر ۵۰ درصد برای مهار جوانه‌زنی کنیدی بیمارگر *P.digitatum* برای ایمازالیل و تیابندازول نشان داد که تعداد۶ جدایه از ۱۵ جدایه مورد مطالعه در محدوده EC50 معادل ۰/۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار دارند. این مقادیر برای پیریمتانیل ۰/۷ و ۰/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای ۴ جدایه بود و برای قارچ‌کش آزوکسی استروبین ۴ جدایه در محدوده EC50 معادل ۰/۰۶۵ و ۰/۰۷۸ قرارگرفتند و برای قارچ‌کش تیابندازول، پراکندگی جدایه‌ها در محدوده EC50 برابر با ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برابر با ۶ جدایه بود و برای قارچ‌کش فلودیوکسونیل جدایه‌ها در دو محدوده غلظت ۰/۰۱۴ و ۰/۰۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین فراوانی برابر با ۴ جدایه بود.



شکل۱- هیستوگرام فراوانی EC50 برای مهار رشد میسلیوم، (A تا E) و هیستوگرام فراوانی EC50 برای مهار جوانه‌زنی کنیدی (F تا J) برای جدایه‌های بیمارگر *Penicilium digitatum* جمع آوری شده از شمال ایران، ایمازالیل (A و F)، پیریمتانیل (B و G)، فلودیوکسانیل (C و H)، آزوکسی استروبین (D و I) و تیابندازول (E و J).

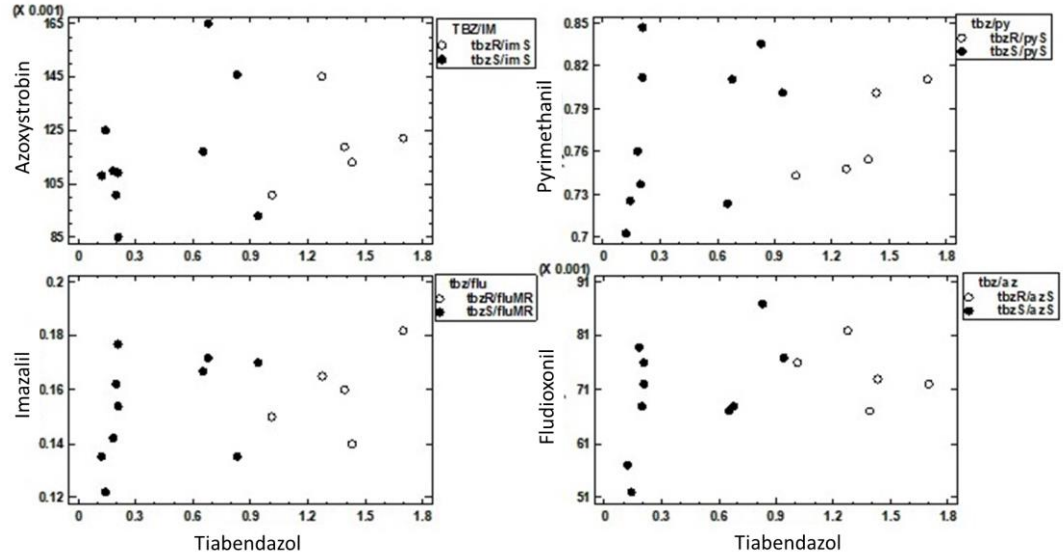
Figure 1. EC50 frequency histogram for mycelium growth inhibition (A - E) and EC50 frequency histogram for conidial germination inhibition (F - J) for pathogenic isolates of *Penicilium digitatum* collected from northern Iran, Imazalil (A and F), Pyrimethanil (B and G), Fludioxonil (C and H), Azoxystrobin (D and I), Tiabendazol (E and J).

ارزیابی مقاومت چندگانه: در مطالعات مقاومت چندگانه، ۱۵جدایه از *P.digitatum* در مقایسه‌های زوجی، میانگین مقادیرEC50 تیابندازول برای هر جدایه بر روی مقادیر متوسط EC50 هر یک از قارچ‌کش‌های جدید مورد مقایسه قرار گرفت. در شکل‌های ۲ و۳، جدایه‌های حساس و مقاوم نسبت به قارچ‌کش تیابندازول و مقایسه آن با قارچ‌کش‌های مورد مطالعه انجام شد و هیچ ارتباط معنی‌داری بین حساسیت به تیابندازول و مقادیر متوسط EC50 قارچ‌کش‌های دیگر مشاهده نشد؛ با این حال طیف حساسیت‌های پایه برای جدایه‌های مقاوم به تیابندازول و قارچ‌کش‌های مورد مطالعه مشخص شد.



شکل ۲- نمودار پراکندگی مقادیر EC50 برای مهار رشد میسلیومی قارچ *Penicilium digitatum* در برابر قارچ‌کش تیابندازول و قارچ‌کش‌های ایمازالیل، آزوکسی استروبین، پیریمتانیل و فلودیوکسونیل.

Figure 2. Scatter plot of EC50 values for the inhibition of mycelium growth of *Penicilium digitatum*, against fungicide thiabendazole and fungicidesimazalil, azoxystrobin, pyrimethanil and fludioxonil.



شکل۳- نمودار پراکندگی مقادیر EC50 برای مهار جوانه‌زنی کنیدی قارچ *Penicilium digitatum* در برابر قارچ‌کش تیابندازول و قارچ‌کش‌های ایمازالیل، آزوکسی استروبین، پیریمتانیل و فلودیوکسونیل.

Figure 3. Scatter plot of EC50 values for the inhibition of conidial germinationof *Penicilium digitatum*, against fungicide thiabendazole and fungicidesimazalil, azoxystrobin, pyrimethanil and fludioxonil.

این اولین مطالعه آزمایشگاهی است که مقادیر EC50 را برای مهار رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدی قارچ بیمارگر *P.digitatum* در ایران برای قارچ‌کش‌های ایمازالیل، تیابندازول، پیریمتانیل، آزوکسی استروبین و فلودیوکسونیل مورد ارزیابی قرار می‌دهد. با پایش تغییرات حساسیت به قارچ‌کش در جمعیت‌های بیمارگر، تغییرات تدریجی یا ناگهانی درسطوح حساسیت، برای ارزیابی مقاومت کمی یا کیفی قارچ‌کش‌ها، استفاده می‌شود (۱۰، ۲۲ و ۳۹). مقادیر EC50 دقیق‌ترین معیارهای حساسیت برای اقدامات متقابل قارچ-قارچ‌کش هستند (۵). در تحقیق باس (۱۹۹۲)، حساسیت پایه گزارش شده برای جدایه‌های *P.digitatum* به ایمازالیل از۰/۰۲۳ تا ۰/۱۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود؛ در حالی که برای تیابندازول از ۰/۰۵ تا ۰/۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر است (۶). این درحالی است که در مطالعه کانتیس و همکاران (۲۰۱۰)، مشخص شد که مقادیر EC50برای جدایه‌های مقاوم به ایمازالیل و تیابندازول به ترتیب ۰/۱۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۲۰). بر اساس نتایج به‌دست آمده توسط کانتیس وهمکاران (۲۰۰۸)، مقادیر EC50 برای رشد میسلیوم، ۰/۰۱۴ و ۰/۰۲۵ و ۰/۳۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر EC50 برای جوانه‌زنی کنیدی ۰/۰۷۴، ۰/۱۶۳ و ۱/۱۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب برای آزوکسی‌استروبین، فلودیوکسونیل و پیری‌متانیل بود و این مطابق بود با مقادیر EC50 برای رشد میسلیوم در این تحقیق که برای قارچ‌کش‌های آزوکسی استروبین، فلودیوکسونیل و پیری‌متانیل به‌ترتیب ۰/۰۴۵، ۰/۰۸، ۰/۳۴ و مقادیر EC50 برای جوانه‌زنی کنیدی به‌ترتیب ۰/۰۷۲، ۰/۱۵۵، ۰/۷۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۱۹). در تحقیقی ارامپلی (۲۰۰۳)، مقادیرEC50 برای هفت جدایه *P.expansum* برای رشد میسلیوم ۰/۰۱۸ و برای جوانه‌زنی کنیدی ۰/۰۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای قارچ‌کش فلودیوکسونیل تعیین شد (۱۷). شولبرگ و همکاران (۲۰۰۵)، مقادیر Ec50، ۰/۳۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای رشد میسلیوم برای ۱۷جدایه *P.expansum* در مقابل قارچ‌کش پیریمتانیل تعیین کرد (۳۳). سمیلانیک وهمکاران (a,b۲۰۰۶)، با استفاده از تک جدایه *P. digitatum* مقادیر Ec50 را برای جوانه‌زنی کنیدی، بین ۰/۲ و ۰/۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین کرد (۳۴ و ۳۶).

نتایج این تحقیق برای مقادیر میانگین EC50 برای مهار رشد میسلیوم برای ایمازالیل ۰/۰۶۵ و این مقادیر برای تیابندازول ۰/۰۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این در حالی است که در تحقیق کانتیس و همکاران (۲۰۱۰) برای قارچ‌کش ایمازالیل مقادیر EC50 کوچکتر از ۰/۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر درمحدوده حساس و مقادیر بالاتر در محدوده مقاوم به قارچ‌کش تعریف شده است و همچنین برای قارچ‌کش تیابندازول مقادیر EC50 کوچکتر از ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده حساس و مقادیر بزرگتر از آن در محدوده مقاوم به قارچ‌کش در نظر گرفته شد (۲۰). در تحقیق اراسموس و همکاران (۲۰۱۵)، برای قارچ‌کش ایمازالیل مقادیر EC50 برای مهار رشد میسلیوم کمتر از ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را در محدوده حساس (Sensitive)، مقادیر ۰/۶۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را در محدوده مقاومت کم (Low resistant)، مقادیر ۱/۰۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را در محدوده نسبتاً مقاوم (Moderately resistant)، مقادیر ۱/۶۱۸ تا ۱/۸۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را در محدوده مقاوم (Resistant) و مقادیر

۲/۲۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده بسیار مقاوم (Highly resistant) قرار گرفت (۱۶).

از ۱۵ جدایه *P.digitatum* مورد مطالعه در این تحقیق ۵ جدایه به تیابندازول مقاوم و ۱۰ جدایه نسبت به آن حساس بودند. همه جدایه‌ها نسبت به قارچ‌کش پیریمتانیل حساس و مقادیر EC50 خارج از مقادیر پایه بود. همه جدایه‌ها به قارچ‌کش آزوکسی استروبین حساس بودند و اما مقادیر EC50 خارج از محدوده پایه بود. همچنین همه جدایه‌ها به قارچ‌کش فلودیوکسونیل در محدوده نسبتا مقاوم (MR) قرار گرفتند. مقادیر EC50 تمام جدایه‌ها به جز جدایه C16 (حساس و خارج از محدوده پایه) نسبت به قارچ‌کش ایمازالیل در محدوده حساس قرار گرفت. بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که قارچ‌کش تیابندازول که سال‌ها در ایران مورد استفاده قرار گرفته، سبب ظهور جدایه‌های *P.digitatum* مقاوم شده است و این اولین گزارش از مقاومت به قارچ‌کش تیابندازول در ایران است. مطابق با تحقیق سانچز و توست (۲۰۱۱)، بزرگ‌ترین مشکل برای استفاده از تیابندازول مقاومت است. مطالعات مولکولی نشان داد که مقاومت به تیابندازول با جهش در توالی اسیدآمینه در ارتباط است (۳۱).

همچنین شاهد اثر پذیری ضعیف‌تر قارچ‌کش فلودیوکسونیل در مهار جوانه زنی کنیدی نسبت به مهار رشد میسلیوم بودیم که این نتایج مطابق است با نظر سمیلانیک و همکاران (۲۰۰۸)، فلودیوکسونیل با غلظت معمول ۵۰۰ تا ۱۲۰۰ پی پی ام نسبت به ایمازالیل برای کنترل کپک سبز کمتر موثر بود، به‌ویژه فعالیت ضد کنیدی آن کمتر بود (۳۵). طبق تحقیقات اکوینو و همکاران (۲۰۰۸)، ترکیب فلودیوکسونیل با تیابندازول فعالیت سینرژیک را نشان داد آزوکسی استروبین در شرایط آزمایشگاهی عملکرد نسبتا خوبی برای کنترل کپک سبز در مهار رشد میسلیوم و مهار جوانه‌زنی کنیدی نشان داد، اما طبق تحقیقات اکوینو و همکاران (۲۰۰۸)، اثربخشی ضعیفی بر روی پرتقال زخمی آلوده احتمالا به‌دلیل فعالیت سیستمیک ضعیف نشان داد (۱).

عملکرد قارچ‌کش پیریمتانیل در این تحقیق در مهار رشد میسلیوم بهتر از مهار جوانه‌زنی کنیدی بود و مطابق با نظر سمیلانیک و همکاران (۲۰۰۶)، سه قارچ‌کش جدید پیریمتانیل و فلودیوکسونیل و آزوکسی‌استروبین برای کاهش خطر قارچ‌کش‌ها و کنترل کپک سبز پس از برداشت مرکبات در ایالات متحده امریکا و کشورهای دیگر استفاده می‌شود. میوه‌هایی که ۲۴ ساعت قبل از تیمار با پیریمتانیل با *P.digitatum* آلوده شده‌اند، کاهش ۹۰ درصدی خسارت را نشان دادند (۳۶).

به‌طورکلی، بهترین کنترل هم در قسمت مهار رشد میسلیوم و هم در قسمت مهار رشد کنیدی در این تحقیق، مربوط به قارچ‌کش ایمازالیل بود و تمام جدایه‌های مورد مطالعه در کلاس حساس قرار گرفتند و تنها جدایه C16 در کلاس حساس، اما خارج از محدوده پایه بود. در تحقیق بوبکر وهمکاران (۲۰۰۹)، از ۲۹۰ جدایه *P.digitatum* مورد بررسی، ۱۹ درصد جدایه‌ها در برابر ایمازالیل و ۳۷ درصد در برابر تیابندازول مقاوم بودند (۴). استفاده مداوم و گاه نادرست از ایمازالیل در صنایع بسته‌بندی مرکبات منجر به گسترش گونه‌های مقاوم از *P.digitatum* در سراسر جهان شده است. این در حالی است که به‌علت محدودیت استفاده از قارچ‌کش ایمازالیل در صنایع پس از برداشت مرکبات در ایران، این قارچ‌کش نتایج بسیار خوبی از کنترل را در این مطالعه نشان داده است (۲۳ و۲۸). مطالعاتی که به این موضوع می‌پردازند، اطلاعاتی در مورد پتانسیل مقاومت برای این قارچ‌کش‌ها ارائه می‌دهند. چهار جدایه

P.digitatum کمتر حساس به آزوکسی‌استروبین نشان دهنده یک زیرجمعیت مجزا است. با ارائه توزیع فرکانس برای جدایه‌های حساس جمعیت در هیستوگرام با دسته‌های متعدد و با مستند سازی زیرجمعیت مقاوم در مقادیر پایه، هر دو نوع مقاومت در آینده قابل پایش است (۱۹).

نتیجه‌گیری

به طور کلی با استفاده نتایج به‌دست آمده از مقادیر EC50 می‌توان نتیجه گرفت که استفاده مکرر از قارچ‌کش تیابندازول در ایران برای کنترل بیماری کپک سبز، سبب ظهور جدایه‌های مقاوم به *P.digitatum* شده است و قارچ‌کش‌های جدید که قبلا مورد استفاده قرار نگرفته‌اند، اثربخشی خوبی نشان دادند. با اینکه قارچ‌کش ایمازالیل بیشترین اثرگذاری را در کاهش درصد وقوع بیماری و کنترل کنیدی‌زایی در این مطالعه نشان داد، مطالعات محققین در امریکا، ارامپلی (۲۰۰۳)، باس (۱۹۹۲)، شولبرگ (۲۰۰۵)، کانتیس و همکاران (۲۰۰۷ و ۲۰۰۸)، در امریکای جنوبی ، پرز (۲۰۱۱) و در افریقای جنوبی، اراسموس و همکاران (۲۰۱۳ و ۲۰۱۵) و در چین، ژو و همکاران (۲۰۰۶) ، ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) و دن و همکاران (۲۰۱۱) و در نیوزلند، ویلد (۱۹۹۴) نشان از ظهور جدایه‌های مقاوم *P.digitatum* و افزایش شدت بیماری شده است (۱۶، ۴۰، ۴۱، ۹، ۳۸، ۲۹، ۱۷، ۶، ۳۲، ۱۹، ۲۱، ۲۸، ۱)؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود برای کنترل بیماری پس از برداشت کپک سبز مرکبات از قارچ‌کش‌هایی جدید که اثربخشی متفاوتی دارند، استفاده گردد و برای مدیریت مقاومت به قارچ‌کش‌ها، پایش مقادیر EC50 در آزمایشگاه، به‌طور مداوم برای قارچ‌کش‌های جدید جهت شناسایی جدایه‌های مقاوم بیمارگر مورد ارزیابی قرار گیرد.

References

1. Aquino, S., Schirra, M., Palma, A., & Liguori, R. (2008, November). Effectiveness of fludioxonil against Penicillium decay in citrus fruit. In III International Conference Postharvest Unlimited 2008 858 (pp. 357-362).
2. Arras, G. (1996). Mode of action of an isolate of Candida famata in biological control of Penicillium digitatum in orange fruits. Postharvest Biology and Technology, 8(3): 191-198.
3. Ballester, A. R., Lafuente, M. T., & González-Candelas, L. (2006). Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–Penicillium digitatum interaction. Postharvest Biology and Technology, 39(2), 115-124.
4. Boubaker.H, Saadi.B, Boudyach.E and Benaoumar.A, 2009. Sensitivity of Penicillium digitatum and P. italicum to Imazalil and Thiabendazole in Morocco. Plant Pathology Journal, 8: 152-158.
5. Brent, K. J. 1988. Monitoring for fungicide resistance. Pages 9-11 in: Fungicide resistance in North America. C. J. Delp, ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
6. Bus, V. G. 1992. ED50 levels of Penicillium digitatum and P. italicum with reduced sensitivity to thiabendazole, benomyl, and imazalil. Postharv. Biol. Technol. 1:305-315
7. California Agricultural Resource Directory, 2005. California Department of Food and Agriculture. Pages 179 (online publication: http://www.cdfa.ca.gov/card/pdfs/ agresdirentire05 .pdf).
8. Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V and Stegehuis G, 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. Studies in Mycology 50: 19-22.
9. Dan, F. E. N. G., Xue-peng, S. U. N., Li-ying, J. I. A. N. G., Jian-min, C. H. E. N., & Hong-ye, L. I. (2011). Resistance level and mechanism of Penicillium digitatum to imazalil and carbendazim in Quzhou, Zhejiang. Chinese Journal of Pesticide Science, 13(4), 341-346.

10. Del Río, J.A., Arcas, M.C., Benavente-García, O., & Ortuño, A. (1998). Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against Phytophthora citrophthora, Penicillium digitatum, and Geotrichum species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10), 4423-4428.
11. Eckert, J. W., & Wild, B. L. (1983). Problems of fungicide resistance in Penicillium rot of citrus fruits. In Pest Resistance to Pesticides (pp. 525-556). Boston, MA: Springer US.
12. Eckert, J.W., Brown, G.E., 1986. Evaluation of postharvest fungicide treatments for citrusfruits. In: Hickey, K.D. (Ed.), Methods for Evaluating Pesticides for Control of PlantPathogens. APS Press, St Paul, MN, USA, pp. 92–97.
13. Eckert, J.W., Eaks, I.L., 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.), The Citrus Industry. DANR. University of California Press, Berkeley, CA, USA, pp. 179–260.
14. Eckert, J.W., Ratnayake, M., 1994. Role of volatile compounds from wounded oranges ininduction of germination of Penicillium digitatum conidia. Phytopathology, 84: 746–750.
15. Erasmus, A., Lennox, C.L., Jordaan, H., Smilanick, J.L., Lesar, K., and Fourie, P.H. 2011. Imazalil residue loading and green mould control in citrus packhouses. Postharvest Biology and Technology, 62: 193–2
16. Erasmus, A., Lennox, C.L., Korsten, L., Lesar, K., Fourie, P.H., 2015. Imazalil resistance in Penicillium digitatum and P. italicum causing citrus postharvest green and blue mould: impact and options. Postharvest Biology and Technology, 107: 66–76.
17. Errampalli, D. 2003. Effect of fludioxonil on germination and growth of Penicillium expansum and decay in apple cvs. Empire and Gala. Crop Prot. 23:822-827.
18. Fatahi Moghadam J., Golmohammadi M. 2012. A review of the effective activities in reducing the waste of citrus fruit harvest and after harvest. Citrus and Subtropical Fruits Research Institute, Iran. Extension booklet.
19. Kanetis, L., Förster, H. and Adaskaveg, J.E. 2008. Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against Penicillium spp. on citrus and multiple resistance evaluations in Penicillium digitatum. Plant Disease, 92: 301–310.
20. Kanetis, L., Förster, H. and Adaskaveg, J.E. 2010. Determination of natural resistance frequencies in Penicillium digitatum using a new air-sampling method and characterization of fludioxonil- and pyrimethanil-resistant isolates. Phytopathology 100: 738–746.
21. Kanetis, L., Förster, H., Adaskaveg, J.E., 2007. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides Azoxystrobin, Fludioxonil, and Pyrimethanil for managing citrus green mold. Plant Disease 91: 1502–1511
22. Kendall Brent, & Hollomon, D. W. (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk (Vol. 2). Brussels, Belgium: Global Crop Protection Federation.
23. Kinay, P., Mansour, M.F., Mlikota-Gabler, F., Margosan, D.A., Smilanick, J.L. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of Penicillium digitatum collected in California. Crop Protection 26: 647–656.
24. Louw, J. P. & Korsten, L. 2015. Pathogenicity and host susceptibility of Penicillium spp. on citrus. Plant Disease 99(1): 21–30.
25. Pandey, D. K., Tripathi, N. N., Tripathi, R. D., and Dixit, S. N. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of Hyptissuaveolens/Fungitoxische und phytotoxischeEigenschaften des ätherischenÖis von Hyptissuaveolens. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection: 344-349.
26. Patil,S. R., Parthiban, V.K., Sekar, G. R., and Baviskar, S. 2017: Epidemiology and cultural characteristics ofPenicillium digitatum causing green mould of citrus. Ecology, Environment and Conservation Paper 23 (4): 2148-2155.
27. Pelser, P., du, T., 1977. Postharvest handling of South African citrus fruit. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 244–249.
28. Pérez, E., Blanco, O., Berreta, C., Dol, I., Lado, J., 2011. Imazalil concentration for in vitro monitoring of imazalil resistant isolates of Penicillium digitatumin citrus packinghouses. Postharvest Biology and Technology 60, 258–262.

29. Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.
30. Ramirez, C. 1982. Manual and Atlas of the Penicillia. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 482 pp.
31. Sánchez-Torres, P., Tuset, J., 2011. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant Penicillium digitatumstrains infecting citrus. Postharvest Biology and Technology59: 159–165.
32. Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
33. Sholberg, P. L., Bedford, K., and Stokes, S. 2005. Sensitivity of Penicillium spp. and Botrytis cinerea to pyrimethanil and its control of blue and gray mold of stored apples. CropProtection 24:127-134.
34. Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Mlikota Gabler, F., and Goodwine, W. R. Erasmus, A., Lennox. 2006 The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of Penicillium digitatum and to control citrus green mold after harvest. Postharvest Biology and Technology42:75-85.
35. Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Gabler, F.M., Sorenson, D., 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. Postharvest Biology and Technology 47: 226–238
36. Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Mlikota-Gabler, F., andGoodwine, W.R. 2006. The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of Penicillium digitatumand to control citrus green mold after harvest. Postharvest Biology and Technology 42: 75–85.
37. Tuset, J. J. (1987). Podredumbres de los frutos cítricos. Conselleria d'Agricultura i Pesca/IVIA.
38. Wild, B.L. 1994. Differential sensitivity of citrus green mould isolates (Penicillium digitatumSacc.) to the fungicide imazalil. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 22: 167–171.
39. Wolfe, M. S. (1982). Dynamics of the pathogen population in relation to fungicide resistance. Fungicide resistance in crop protection, 139-148.
40. Zhang, Z., Zhu, Z., andMa, Z., Li, H. 2009. Molecular mechanism of azoxystrobin resistance in Penicillium digitatumUV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant strains in packing- or store-house isolates. Int. J. Food Microbiol. 131, 157–161.
41. Zhu, J. W., Xie, Q. Y., and Li, H. Y. 2006. Occurrence of imazalil-resistant biotype of Penicillium digitatum in China and the resistant molecular mechanism. Journal of Zhejiang University-Science 7(Suppl 2): 362-365.