تأثير الكيتوسان في إصابة ثمار التفاح بالفطر *Penicillium fimorum* وتثبيط إنتاج السم أوكراتوكسين A

منار محمود الأحمد[1]*، محمد عامر فياض[1] ولبيد عبد الله السعد[2]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق؛ (2) قسم الأنظمة الطبية الذكية، كلية علوم الحاسوب وتكنولوجيا المعلومات، جامعة البصرة، العراق. *البريد الإلكتروني للباحث المراسل: manar.m.abbas@gmail.com

الملخص

الأحمد، منار محمود، محمد عامر فياض ولبيد عبد الله السعد. 2024. تأثير الكيتوسان في إصابة ثمار التفاح بالفطر *Penicillium fimorum* وتثبيط إنتاج السم أوكراتوكسين A. مجلة وقاية النبات العربية، 42(3): 396–402. https://doi.org/10.22268/AJPP-001261

أجريت هذه الدراسة بهدف اختبار فعالية الكيتوسان (الميكروني والنانوي) في تثبيط نمو الفطر *P. fimorum* وانتاجه لسمّ الأوكراتوكسين A وحماية ثمار التفاح من الإصابة به. أظهرت النتائج أن الكيتوسان الميكروني والنانوي ثبّطا نمو الفطر *P. fimorum* بنسبة 32.33 و 57.91%، على التوالي، كما أدى الكيتوسان إلى خفض قدرة الفطر على إنتاج السم أوكراتوكسين A حيث بلغت نسبة التثبيط 69.16 و 71.14% في معاملة الكيتوسان الميكروني والنانوي، على التوالي. كما انخفض تركيز السم في ثمار التفاح (الأحمر والأصفر والأخضر) من 121.50، 115.80 و 105.60 نانوغرام/غرام في معاملة الشاهد إلى 53.93، 52.60 و 0.00 نانوغرام/غرام في معالة الكيتوسان الميكروني و 0.00، 0.00 و 35.10 نانوغرام/غرام في معاملة الكيتوسان النانوي، على التوالي.

كلمات مفتاحية: الأوكراتوكسين A، *P. fimorum*، ثمار التفاح، كيتوسان.

المقدمة

تتعرض ثمار الفاكهة للإصابة بعدة أمراض أثناء عمليات الجني أو النقل أو الخزن وفي محلات البيع وقد تصاب الثمار وهي لا تزال في الحقل. تنجم أمراض ما بعد الجني أغلب الأحيان عن الإصابة بأنواع مختلفة من الفطور، من أهمها *Penicillium*، *Aspergillus*، *Alternaria*، *Botrytis*، *Rhizopus*، *Fusarium*، *Mucor*، *Colletotrichum* و *Lasiodiplodia* (Droby *et al*., 2011). تسبب امراض ما بعد الجني خسائر كبيرة في إنتاج الفاكهة والخضروات تصل إلى أكثر من 25% من الانتاج الكلي في البلدان المتقدمة و 50% في البلدان النامية (Katiyar *et al*., 2015؛ Betchem *et al*., 2019).

تعتمد إدارة أمراض ما بعد الجني على استخدام المبيدات الجهازية، إلا أن الادراك المتزايد لمخاطر المبيدات الكيميائية المتمثلة في تأثير بقاياها في صحة الإنسان، وظهور سلالات من الفطور مقاومة للمبيدات، وتأثيرها في الكائنات غير المستهدفة، فضلاً عن تنامي اهتمام المنظمات الدولية المعنية بصحة الإنسان وسلامة الغذاء في تحفيز الباحثين ومراكز البحث العلمي على ضرورة التفتيش عن وسائل بديلة للمبيدات الكيميائية تكون ذات تأثيرات منخفضة أو معدومة على صحة الإنسان (Aparicio-García *et al*., 2021؛ Pathak *et al*., 2022). وفي السنوات الأخيرة، ازداد الاهتمام بالمركبين الكايتين والكيتوسان في مجال مكافحة أمراض ما بعد الجني كونهما من المركبات الطبيعية الموجودة في قشور القشريات مثل سرطان البحر والروبيان وجدران خلايا الفطور الحقيقية (No & Meyers, 1995)، وتمتاز بقابليتها للتحلل الحيوي فضلاً عن امتلاكها خصائص مضادة للفطور والبكتيريا وتعمل على تحفيز المقاومة الجهازية في الثمار (Aranaz *et al*., 2021؛ Orzali *et al*., 2017). إنّ الكيتوسان عبارة عن بوليمر polyaminosaccharide مشتق من الكايتين (chitin) منزوع مجموعة الأسيتل ويتكون في الغالب من سلاسل خطية من وحدات β-(1, 4)-linked 2-deoxy-2-amino-d-glucopyranose. يستخدم الكيتوسان كطلاء رقيق يغطي سطح الثمار ويحميها من الاصابات الفطرية فضلا عن كونه صالحاً للأكل (Orzali *et al*., 2017).

ونظراً لقلة الدراسات المتعلقة بأمراض التفاح ما بعد الجني، ولأهمية هذه الفاكهة التي تستهلك بكميات كبيرة من قبل أغلب العائلات العراقية، فقد جاء هذا البحث بهدف تقييم فاعلية مركب الكيتوسان في حماية ثمار التفاح من الإصابة بالفطر *P. fimorum* وتثبيط انتاج السمّ أوكراتوكسين A.

https://doi.org/10.22268/AJPP-001261
© 2024 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

مواد البحث وطرائقه

العزلة المنتجة لسم الاوكراتوكسين A

استخدمت في هذه الدراسة عزلة من الفطر *Penicillium fimorum* منتجة للسمّ أوكراتوكسين A، ومشخصة جزيئياً ومسجلة في بنك الجينات تحت الرقم OQ568535.1.

تأثير الكيتوسان في نمو الفطر *P. fimorum* وقابليته على إنتاج سمّ الأوكراتوكسين A

حضر محلول قياسي من كلٍّ من الكيتوسان الميكروني (شركة Cheng Du Micxy Chemical الصينية) والنانوي (شركة Sangherb Company الصينية) بتركيز 20000 جزء بالمليون حسب طريقة Thomas *et al.* (2016)، ثم نقلت مقادير معينة من كل نوع منهما إلى دوارق زجاجية تحوي 100 مل من الوسط PDA قبل تصلبه وذلك للحصول على التراكيز 100، 200، 1000 و 2000 جزء بالمليون من كل منهما، وحسبت التراكيز المطلوبة وفق المعادلة الآتية:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

حيث C_1= التركيز الأول، V_1= الحجم الأول، C_2= التركيز الثاني، V_2= الحجم الثاني.

مزجت تراكيز الكيتوسان الميكروني والنانوي بشكل جيد مع الوسط الغذائي ثم صبّ الوسط في أطباق بتري، ثم لقح كلّ طبق بقرص 0.5 سم أخذ من حافة مستعمرة الفطر *P. fimorum* بعمر 4 أيام. تضمنت معاملة المقارنة تنمية الفطر في وسط PDA فقط ومعاملة حمض الخليك 1% (للتأكد من تأثير حمض الخليك الخالي من الكيتوسان) ومعاملتي الكيتوسان الميكروني والنانوي. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25°س لمدة 7 أيام، وبعدها تمّ قياس قطر المستعمرات للفطر *P. fimorum* وحسبت نسبة التثبيط من المعادلة التالية:

$$\% \text{ التثبيط} = \frac{\text{معدل قطر المعاملة في المستعمرة} - \text{معدل قطر الشاهد في المستعمرة}}{\text{معدل قطر الشاهد في المستعمرة}} \times 100$$

استخلاص سمّ الأوكراتوكسين A من الفطر *P. fimorum*

بهدف التأكد من قابلية الفطر *P. fimorum* على إنتاج السم الأوكراتوكسين A، أخذت أقراص من مستعمرة الفطر *P. fimorum* بواسطة ثاقب فلين من وسط وحافة المستعمرة وما بين المركز والحافة بوزن 2غ لكل عينة ثم هرست القطع ونقلت إلى قناني صغيرة سعة 5 مل، أضيف 2.5 مل من خليط الكلورفورم : حمض الفورمك بنسبة 1:99 لكل عينة، تمّ مزج العينات باستخدام vortex بسرعة متوسطة لمدة 30 دقيقة، سحب 2 مل من كل عينة ونقلت إلى قناني صغيرة جديدة، تمّ تجفيف جميع العينات باستخدام الحمام المائي عند درجة حرارة 80°س، أضيف لكل عينة 2 مل من المذيب (الميثانول)، رشحت العينات باستخدام مرشح بكتيري قطر مساماته 0.22 ميكرومتر (Muñoz *et al.*, 2011).

تأثير الكيتوسان النانوي والميكروني في حماية ثمار التفاح من الإصابة بفطر *P. fimorum*

تمّ الحصول على ثمار تفاح مستورد (تركي المنشأ) (الأحمر، الأخضر والأصفر) بمقدار 1 كغ لكل معاملة وذلك من الأسواق المحلية. نشطت عزلة الفطر *P. fimorum* المستخدمة في التجربة والمنتجة لسمّ الأوكراتوكسين A بتنميتها على وسط PDA، غسلت جميع عينات التفاح بالماء والصابون، وعقّمت لمدة دقيقتين باستخدام محلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 10% من المستحضر التجاري ثم غسلت باستخدام ماء مقطر معقم وجفّفت بورق نشاف. عوملت عينات التفاح بالكيتوسان الميكروني والنانوي مع وجود معاملتين للمقارنة (الشاهد) إحداهما ثمار التفاح غير معاملة والأخرى معاملة بحمض الخليك 1% فقط. تركت العينات لتجفّ تحت درجة حرارة الغرفة.

وضعت كلّ عينة (9 ثمار لكل عينة) في صناديق بلاستيك معقمة، وثبت على السطح الداخلي لغطاء الصندوق طبق بتري بقطر 9 سم يحوي مستعمرة الفطر *P. fimorum* بعمر خمسة أيام، رجّت جميع الصناديق لتسمح بانتشار الأبواغ داخل الصندوق، حضنت العينات عند درجة حرارة 18°س لمدة 14 يوم، وحسبت شدة الإصابة بناءً على سلم إصابة مكون من ستّ درجات (0–5) حسب المعادلة التالية (McKinney, 1923):

$$\% \text{ شدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع (عدد الثمار} \times \text{درجة الإصابة)}}{\text{عدد الثمار الكلي} \times \text{أعلى درجة إصابة}} \times 100$$

حيث أن درجة إصابة 0= لا توجد إصابة؛ 1= 1-10% من نسيج الثمرة مصاب؛ 2= 11-20% من نسيج الثمرة مصاب؛ 3= 21-30% من نسيج الثمرة مصاب؛ 4= 31-40% من نسيج الثمرة مصاب؛ 5= نسبة نسيج الثمرة المصاب يزيد عن 40%.

تأثير الكيتوسان في تثبيط إنتاج الأوكراتوكسين A في ثمار التفاح المصابة بالفطر *P. fimorum*

بعد نهاية التجربة (14 يوماً) استخلص سمّ الأوكراتوكسين A من ثمار التفاح باتباع الطريقة الموصوفة سابقاً (Al-Hazmi, 2010). تمّ تحضير 50 مل عصير التفاح لكل عينة، أضيف إليه 25 مل من حمض الفوسفوريك 0.1 عياري و 250 مل من المذيب كلوروفورم ثم خلط المزيج لمدة 5 دقائق. رشّحت العينات باستخدام أوراق ترشيح وجمعت في دوراق سعة 500 مل. فصلت طبقة الكلورفورم السفلى باستخدام قمع فصل سعة 250 مل، ثمّ جمعت العينات في دوراق، ثم نُقلت إلى الحمام المائي

وجففت عند درجة حرارة 80°س. جُمعت العينات في قناني صغيرة سعة 5 مل وغلّفت بورق الألمنيوم وحفظت عند درجة حرارة −20°س، أضيف 1 مل من مذيب الكلورفورم عالي النقاوة لكل عينة ثم مزجت العينات. أخذ 1 مل من المزيج وحمّلت العينة على عمود استخلاص EXtrelut® NT1 glass columns (من شركة Merck الالمانية) وتركت العينة لمدّة عشر دقائق، ثم أضيف 6 مل من خليط مذيبات الاستخلاص المكون من أسيتات الايثيل والميثانول وحمض الخليك بنسب (0.5:5:95). حفظت العينات عند درجة حرارة −20°س. تم تقدير سمّ الأوكراتوكسين في عينات ثمار التفاح باستخدام جهاز الـ HPLC من شركة SYKAM الألمانية مع كاشف التألق للكشف عن سمّ الأوكراتوكسين A. الطور المتحرك مكون من أسيتونيتريل: ماء مقطر: حمض الفورميك بنسب 3:47:50، على التوالي، مع معدل جريان 1 مل/دقيقة. العمود المستخدم C18 – ODS (طول 25 سم × قطر 4.6 مم)، كاشف التألق المستخدم (Em = 445 نانومتر و Ex = 365 نانومتر)، كمية الحقن 100 ميكروليتر، زمن الاحتجاز في الدقيقة 4.15 (Skarkova *et al.*, 2013).

التحليل الاحصائي

نفذت جميع التجارب حسب التصميم العشوائي الكامل واستخدم اختبار أقل فرق معنوي للمقارنة بين المتوسطات الحسابية للمعاملات المستخدمة في التجارب، واستخدم اختبار Kruskal-Wallis Test للمقارنة بين المتوسطات الحسابية لتراكيز سم الأوكراتوكسين A واختبار Mann Whitney للمقارنة بين المتوسطات الحسابية واستخدام برنامج IBM SPSS ver. 24.

النتائج والمناقشة

تأثير الكيتوسان النانوي والميكروني في نمو الفطر *P. fimorum*

أظهرت النتائج (جدول 1) أن لنوع الكيتوسان تأثير في نمو الفطر *P. fimorum* بفارق معنوي بينهما، حيث أعطى الكيتوسان النانوي معدل نسبة تثبيط بلغ 23.87% وقابله 17.50% في الكيتوسان الميكروني. وكذلك أظهرت النتائج أن تأثير الكيتوسان ازداد بزيادة التركيز المستخدم، حيث بلغ أعلى معدل نسبة تثبيط 45.12% عند تركيز 2000 جزء بالمليون وأقل معدل نسبة تثبيط 3.90% عند تركيز 100 جزء بالمليون. كان للتداخل تأثير معنوي حيث أعطى التركيز 2000 جزء بالمليون في الكيتوسان النانوي أعلى نسبة مئوية للتثبيط وبلغت 57.92% مقارنة بـ 32.33% في معاملة الكيتوسان الميكروني. كما لم يكن للمذيب المستخدم في اذابة الكيتوسان (حمض الخليك 1%) تأثير معنوي في نمو الفطر *P. fimorum*، حيث بلغ قطر مستعمرة الفطر 2.32 سم مقارنة مع 2.46 سم في معاملة الشاهد (الفطر منمّى على وسط PDA فقط) (شكل 1).

جدول 1. تأثير الكيتوسان الميكروني والنانوي في نمو الفطر *P. fimorum*.

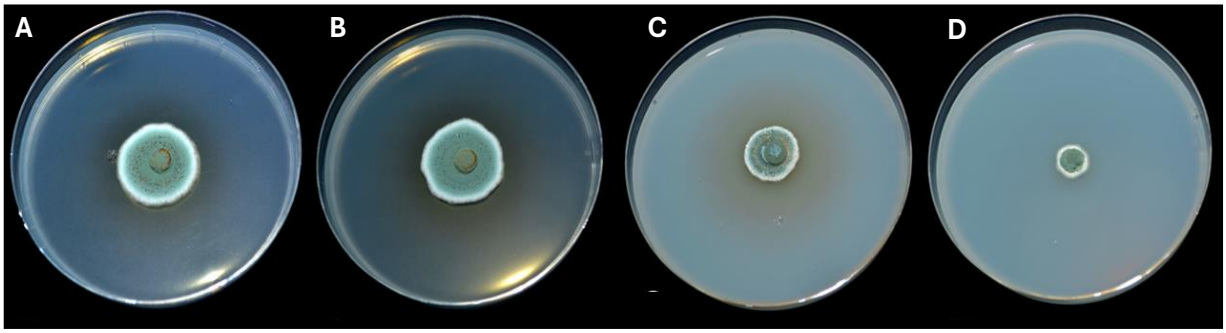
Table 1. Effect of micro and nano chitosan on the growth of *P. fimorum*.

معدل تأثير التراكيز Mean of effect of concentrations	% للتثبيط في نمو الفطر % Fungal growth inhibition: كيتوسان نانوي Nano-chitosan	كيتوسان ميكروني Micro-chitosan	تراكيز الكيتوسان Chitosan concentrations
3.90	3.49	4.31	100
5.80	6.75	4.90	200
27.93	27.32	28.54	1000
45.12	57.92	32.33	2000
20.68	23.87	17.50	معدل تأثير نوع الكيتوسان Average effect of chitosan type

أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% لنوع الكيتوسان = 1.67، للتراكيز = 2.47، للتداخل = 3.35.

$LSD_{0.05}$ for chitosan type=1.67, for concentration= 2.47 and for interaction= 3.35.

اتفقت نتائج هذه التجربة مع دراسات سابقة أشير فيها إلى أن للكيتوسان تاثيراً مثبط لنمو عدة فطور ممرضة للنبات. فقد أشار Abdel-Rahman *et al.* (2021) إلى أن استخدام الكيتوسان الاعتيادي أدى إلى تثبيط نمو الفطر *P. expansum* المسبب لمرض العفن الأزرق في التفاح. في حين أشار Li *et al.* (2020) في دراسة أخرى إلى أن استخدام الكيتوسان قد ثبّط نمو الفطر *P. expansum* وسبب تغيرات شكلية وتركيبية في خيوط وأبواغ الفطر *P. expansum* المعزول من الثمار المتعفنة. إن تأثير الكيتوسان في نمو الفطور الممرضة للنبات قد يعود إلى قدرته على تثبيط التخليق الحيوي للبروتينات عند دخوله إلى داخل الخلايا أو أن نواتج تحلل الكيتوسان المائي في الخلايا يرتبط بشكل مباشر بعد دخوله إلى داخل خلايا المسبب المرضي مع الـ DNA ويمنع تضاعفه او استنساخه إلى mRNA أو من الممكن أن يعمل على تخليب المعادن والعناصر والمواد الغذائية التي يحتاجها الكائن الحيّ الدقيق (Li *et al.*, 2020؛ Cuero *et al.*, 1991؛ Chen & Zhao, 2012).



شكل 1. من اليسار إلى اليمين: مستعمرة الفطر *P. fimorum* بعمر 7 أيام في معاملة الشاهد (A)، حمض الخليك 1% (B) و معاملة الكيتوسان الميكروني (C)، معاملة الكيتوسان النانوي (D) عند تركيز 2000 جزء بالمليون.

Figure 1. From left to right, a 7-day-old colony of *P. fimorum* control (A), 1% acetic acid (B), micro-chitosan treatment (C) and nano-chitosan treatment at 2000 ppm (D).

تأثير الكيتوسان في مستويات إنتاج سمّ الأوكراتوكسين A

أظهرت النتائج أن تأثير الكيتوسان الميكروني والنانوي في خفض تركيز سمّ الأوكراتوكسين A ازداد مع زيادة التركيز المستخدم (جدول 2)، إلاّ أن معاملة الكيتوسان عند تركيز 2000 جزء بالمليون في كلا شكليه الميكروني والنانوي أعطى أعلى نسبة تثبيط والتي بلغت 69.16 و 71.14%، على التوالي، ويتوافق هذا مع دراسة سابقة أشارت إلى قدرة للكيتوسان على تثبيط إنتاج سمّ الأفلاتوكسين المنتج من قبل الفطر *A. parasiticus* و *A. flavus* في الوسط الزرعي (Fang *et al.*, 1994)، كما أشار Cota-Arriola *et al.* (2011) إلى أن استخدام الكيتوسان قد خفض تركيز سمّ الأفلاتوكسين B_1 المنتج من قبل الفطر *A. parasiticus* وقد يعود سبب ذلك لقدرة الكيتوسان على تخليب المعادن كالزنك، المغنيسيوم، الحديد والمولبيدينوم التي يمكن أن تلعب دوراً في خفض تركيز السمّ.

جدول 2. تأثير الكيتوسان في نسبة تثبيط سمّ الأوكراتوكسين A المنتج من قبل الفطر *P. fimorum*.

Table 2. The effect of chitosan on the inhibition rate of ochratoxin A produced by *P. fimorum*.

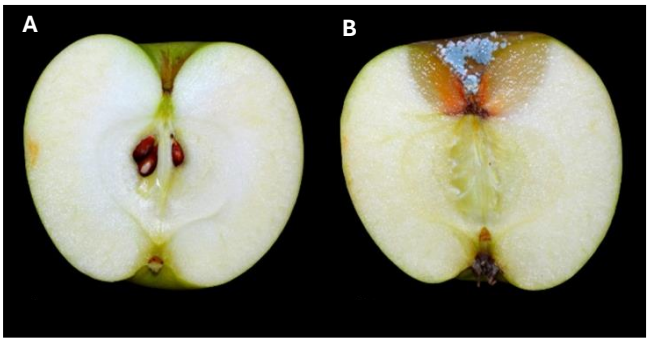
تراكيز الكيتوسان Chitosan's conc.	% تثبيط سم الاوكراتوكسين A % Inhibition of ochratoxin A		المعدل للتراكيز Mean of conc.
	كيتوسان ميكروني Micro-chitosan	كيتوسان نانوي Nano-chitosan	
100	55.90 h	56.34 g	56.12
200	57.95 f	59.12 e	58.53
1000	65.27 d	67.11 c	66.19
2000	69.16 b	71.14 a	70.15
المعدل لنوع الكيتوسان Average of the chitosan type	62.07	63.42	62.74

القيم التي تتبعها الحروف نفسها لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

Values followed by the same letters are not significantly different at P= 0.05.

تأثير الكيتوسان الميكروني والنانوي في حماية ثمار التفاح من الإصابة بالفطر *P. fimorum*

أظهرت النتائج (جدول 3) أن كلاً من الكيتوسان الميكروني والنانوي حققا أفضل النتائج في خفض نسبة شدة إصابة ثمار التفاح بالفطر *P. fimorum* حيث انخفضت شدة الإصابة من 24.44% في معاملة الشاهد إلى 11.11% في معاملة الكيتوسان الميكروني، كما وجد أن التفاح الأحمر والأخضر كانا أقل الأصناف في شدة الإصابة بمرض تعفن ثمار التفاح (16.66 و 21.66%، على التوالي)، مقارنة مع 23.88% في التفاح الأصفر. ظهرت أعراض الإصابة على الثمار بهيئة تعفنات مائية المظهر في أغلب الأحيان قرب عنق الثمرة أو في أحد جوانبها أو في الزهرة (شكل 2).



شكل 2. (A) ثمار تفاح سليمة معاملة بطلاء الكيتوسان، (B) ثمار تفاح مصابة غير مطلية بالكيتوسان (معاملة الشاهد).

Figure 2. (A) uninfected apple fruits coated with chitosan, (B) infected apple fruits un-coated with chitosan (control).

توافقت النتائج مع عدة دراسات سابقة حول فعالية الكيتوسان في خفض الإصابة بالفطور، فقد أشار Assis (2008) على قدرة الكيتوسان في حماية ثمار التفاح صنف Gala من الإصابة بالفطور *Penicillium* spp.، *Alternaria* spp. كما أشار Darolt *et al.* (2016) إلى أن

استخدام الكيتوسان خفض نسبة الإصابة بمرض العفن الأزرق في التفاح المتسبب عن الفطر *P. expansum* بنسبة 78%.

وفي دراسات أخرى وجد أن للكيتوسان القدرة على حماية أنواع أخرى من الفاكهة منها. كما وجد Zhao *et al.* (2018) أن استخدام الكيتوسان أدى إلى خفض الإصابة بمرض الانتراكنوز المتسبب عن الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* الذي يصيب الحمضيات بعد جنيها. وقد وجد Meng *et al.* (2010) في دراسة اخرى أن استخدام الكيتوسان أدى إلى تقليل الإصابة بالفطرين *Alternaria kikuchiana*، *Physalospora piricola* في الكمثرى.

هناك عدة فرضيات لتفسير آلية عمل الكيتوسان في خفض إصابة الثمار بأمراض التعفن، فقد أشار Chien *et al.* (2007) و Kerch (2015) إلى أن الكيتوسان يعمل كحاجز فيزيائي يحافظ على نسبة الرطوبة والغاز وفقدان الوزن والتقليل من معدل التنفس في الثمار وتأخير التلف أو التعفن الذي يمكن أن يصيب الثمار مما يؤدي إلى زيادة عمر الثمار الافتراضي. وقد اشار Gardesh *et al.* (2016) إلى أن استخدام مستحلب الكيتوسان النانوي بتركيز 0.2–0.5% قلل بشكل ملحوظ من فقدان الوزن ومعدل التنفس وإنتاج الاثيلين ونشاط أنزيم peroxidase في ثمار التفاح صنفي Anna و Golab Kohanz. وفي دراسة اخرى أشار Hadwiger (2013) إلى قدرة الكيتوسان على تحفيز مقاومة النبات الذاتية من خلال زيادة انتاج مركبات الأيض الثانوية أو الأنزيمات المتعلقة بالمقاومة.

تأثير الكيتوسان في مستوى سمّ الأوكراتوكسين A في ثمار التفاح

أظهرت نتائج التقدير الكمي لسمّ الأوكراتوكسين A باستخدام تقانة HPLC-FLD أن معاملة ثمار التفاح بالكيتوسان سببت خفضاً في تركيز السم في الثمار (التفاح الأحمر، الأصفر والأخضر) حيث انخفضت من 121.5، 115.8 و 105.6 نانوغرام/غرام في معاملات الشاهد إلى 0.0، 0.0 و 35.10 نانوغرام/غرام، على التوالي، في معاملات الكيتوسان (جدول 3). كما وجد ان الكيتوسان النانوي حقق أفضل النتائج في خفض تلوث ثمار التفاح بسمّ الأوكراتوكسين A، حيث لم يسجل وجود السم في هذه المعاملة. وتتفق هذه النتائج مع دراسات سابقة أظهرت قدرة الكيتوسان في خفض تلوث المنتجات الزراعية بالسموم الفطرية، فقد أشار Pirouz *et al.* (2020) إلى قدرة الكيتوسان على ادمصاص 8 أنواع من السموم الفطرية في أحد أنواع الأعلاف الحيوانية (palm kernel cake, PKC) ومنها سمّ الأوكراتوكسين A حيث بلغت نسبة التثبيط 90.03%. كذلك وجد أن درجة الحموضة 4 ودرجة الحرارة 35°س هي الظروف المثلى لازالة السموم الفطرية.

يمكن أن يكون سبب تأثير الكيتوسان من خلال تفاعل الكيتوسان بوجود مجاميع NH_2 موجبة الشحنة مع المجاميع ذات الشحنة السالبة في الأوكراتوكسين A (Hamaker & Thompson, 1972؛ Shi *et al.*, 2004). حيث أشار Kurtbay *et al.* (2008) في دراسة سابقة إلى فعالية الكيتوسان في إزالة سمّ الأوكراتوكين A من النبيذ باستخدام بعض المواد ومنها الكيتوسان الذي أدى إلى تثبيط السمّ في النبيذ الأحمر بحدود 60–100%.

نستنتج مما سبق أنه يمكن للكيتوسان أن يؤثر على كلٍّ من نمو الفطر *P. fimorum* وإنتاجه لسمّ الأوكراتوكسين A، ولم يكن تأثير الكيتوسان كبيراً على نمو الفطر *P. fimorum* مقارنة مع تأثيره في الأوكراتوكسين A المنتج من قبل الفطر نفسه. كما ازداد تأثير الكيتوسان المثبط للسمّ مع زيادة تركيز الكيتوسان المستخدم. وقد يختلف تأثير الكيتوسان اعتماداً على نوع الثمار وطريقة المعاملة والتركيز المستخدم للحصول على أفضل النتائج في حماية ثمار التفاح من التلف.

جدول 3. تأثير الكيتوسان في شدة إصابة ثمار التفاح بالفطر *P. fimorum*.

Table 3. The effect of chitosan on the severity of infection of apple fruits with *P. fimorum*.

معدل تأثير المعاملة The average treatment effect	تركيز سمّ الأوكراتوكسين A في ثمار ثلاثة أصناف من التفاح (نانوغرام/غرام) Ochratoxin A concentration in fruits of different apple varieties (ng/g)			معدل تأثير المعاملة The average treatment effect	% شدة الإصابة في أصناف ثمار التفاح % Infection severity in fruits of different apple varieties			المعاملة Treatment	
	الأخضر Green	الأصفر Yellow	الأحمر Red		الأخضر Green	الأصفر Yellow	الأحمر Red		
114.3	105.60 a	115.80 a	121.50 a	22.22	20.00 b	22.22 b	24.44 a	Control	الشاهد
85.3	81.20 b	85.90 b	88.90 b	25.92	22.22 a	33.33 a	22.22 b	Acetic acid 1%	حمض الخليك 1%
35.5	0.00 d	52.60 c	53.93 c	17.03	11.11 c	20.00 c	20.00 c	Micro-chitosan	كيتوسان ميكروني
11.7	35.10 c	0.00 d	0.00 d	17.77	13.33 c	20.00 c	20.00 c	Nano-chitosan	كيتوسان نانوي
61.7	55.47	63.57	66.07	20.73	16.66 b	23.88 a	21.66 b	Average type	معدل الصنف

القيم التي تتبعها الحروف نفسها لا يوجد بينها فرق معنوي عند مستوى احتمال 5%.

Values followed by the same letters are not significantly different at P= 0.05.

Abstract

Al-Ahmad, M.M., M.A. Fayyadh and L.A. Al-Saad. 2024. The Effect of Chitosan on the Infection of Apple Fruits with *Penicillium fimorum* and on the Inhibition of Ochratoxin A Production. Arab Journal of Plant Protection, 42(3): 396-402. https://doi.org/10.22268/AJPP-001261

This study was conducted to test the ability of chitosan micro- and nano-chitosan to inhibit the growth of *P. fimorum* and its production of Ochratoxin A, and to protect apple fruits from infection. The results obtained showed that the micro- and nano-chitosan inhibited the growth of *P. fimorum* by 32.33 and 57.91%, respectively. The chitosan treatment reduced the ability of *P. fimorum* to produce ochratoxin A to 69.16 and 71.14% with micro- and nano-chitosan, respectively. In addition, the concentration of Ochratoxin A decreased in apple fruits (red, yellow, and green) from 121.50, 115.80, and 105.60 ng/g in the control treatment to 53.93, 52.60, and 0.00 ng/g in the micro-chitosan treatment, and to 0.00, 0.00 and 35.10 ng/g in nano-chitosan treatment, respectively.

Keywords: Ochratoxin A, *P. fimorum*, apple fruits, chitosan.

Affiliation of authors: *M. M. Al-Ahmed[1*], M.A. Fayyadh[1] and W.A. Al-Saad[2]. (1) Department of Plant Protection, College of Agriculture, Basrah University, Iraq; (2) Department of Intelligent Medical Systems, College of Computer Science and Information Technology, University of Basrah, Iraq. [*]Email address of the corresponding author: manar.m.abbas@gmail.com*

References

Abdel-Rahman, F.A., G.A. Monir, M.S.S. Hassan, Y. Ahmed, M.H. Refaat, I.A. Ismail and H.A.S. El-Garhy. 2021. Exogenously applied chitosan and chitosan nanoparticles improved apple fruit resistance to blue mold, upregulated defense-related genes expression, and maintained fruit quality. Horticulturae, 7(8):224-257. https://doi.org/10.3390/horticulturae7080224

Al-Hazmi, N.A. 2010. Determination of Patulin and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, 17(4):353-359. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.06.006

Aparicio-García, P.F., R.I. Ventura-Aguilar, J.C. Del Río-García, M. Hernández-López, D. Guillén-Sánchez, D.A. Salazar-Piña, M. de L. Ramos-García and S. Bautista-Baños. 2021. Edible chitosan/propolis coatings and their effect on ripening, development of aspergillus flavus, and sensory quality in fig fruit, during controlled storage. Plants, 10(1):112. https://doi.org/10.3390/plants10010112

Aranaz, I., A.R. Alcántara, M.C. Civera, C. Arias, B. Elorza, A.H. Caballero and N. Acosta. 2021. Chitosan: An overview of its properties and applications. Polymers 13(19):3256. https://doi.org/10.3390/polym13193256

Assis, O.B.G. 2008. The effect of Chitosan as a fungistatic agent on cut apples. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 9(2):148-15.

Betchem, G., N.A.N. Johnson and Y. Wang. 2019. The application of chitosan in the control of post-harvest diseases: a review. Journal of Plant Diseases and Protection, 126(6):495-507 . https://doi.org/10.1007/s41348-019-00248-2

Chen, J.L. and Y. Zhao. 2012. Effect of molecular weight, acid, and plasticizer on the physicochemical and antibacterial properties of β-Chitosan based films. Journal of Food Science 77(5):E127-E136. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02686.x

Chien, P.-J., F. Sheu and F.-H. Yang. 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. Journal of Food Engineering, 78(1):225-229. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022

Cota-Arriola, O., M.O. Cortez-Rocha, E.C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, Y.L. López-Franco and M. Plascencia-Jatomea. 2011. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. Polymer International, 60(6):937-944. https://doi.org/10.1002/pi.3054

Cuero, R.G., G. Osuji and A. Washington. 1991. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: Role of zinc. Biotechnology Letters, 13(6):441-444. https://doi.org/10.1007/BF01030998

Darolt, J.C., A.C. da. Rocha Neto and R.M. Di Piero. 2016. Effects of the protective, curative, and eradicative applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. Brazilian Journal of Microbiology, 47(4):1014-1019. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.007

Droby, S., M. Wisniewski and N. Benkeblia. 2011. Postharvest pathology of tropical and subtropical fruit and strategies for decay control. Pp. 194-224e. In: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. M.Y. Elhadi (ed.). Woodhead Publishing, Elsevier, UK. https://doi.org/10.1533/9780857093622.194

Fang, S.W., C.F. Li and D.Y.C. Shih. 1994. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. Journal of Food Protection, 57(2):136-140. https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.2.136

Gardesh, A.S.K., F. Badii, M. Hashemi, A.Y. Ardakani, N. Maftoonazad and A.M. Gorji. 2016. Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest shelf-life extension of apple cv. Golab Kohanz. LWT, 70:33-40. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.002

Hadwiger, L.A. 2013. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. Plant Science, 208: 42-49. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.007

Hamaker, J.W. and J.M. Thompson. 1972. Adsorption. Pp. 49-143. *In:* Organic Chemicals in the Soil Environment. C.A.I. Goring and J.W. Hamaker (eds.). Marcel Dekker Publishers, New York, USA.

Katiyar, D., A. Hemantaranjan and B. Singh. 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. Indian Journal of Plant Physiology, 20:1-9. https://doi.org/10.1007/s40502-015-0139-6

Kerch, G. 2015. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. Trends in Food Science and Technology, 46(2):159-166. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.010

Kurtbay, M.H., Z. Bekçi, M. Merdivan and K. Yurdakoç. 2008. Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(7):2541-2545. https://doi.org/10.1021/jf073419i

Li, M., C. Chen, X. Xia, B. Garba, L. Shang and Y. Wang. 2020. Proteomic analysis of the inhibitory effect of chitosan on *Penicillium expansum*. Food Science and Technology, 40(1):250-257. https://doi.org/10.1590/fst.40418

McKinney, H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum.* Journal of Agricultural Research, 26(5):195-217.

Meng, X., L. Yang, J.F. Kennedy and S. Tian. 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. Carbohydrate Polymers, 81(1):70-75. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.057

Muñoz, K., M. Vega, G. Rios, R. Geisen and G.H. Degen. 2011. Mycotoxin production by different ochratoxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species on coffee- and wheat-based media. Mycotoxin Research, 27(4):239-247. https://doi.org/10.1007/s12550-011-0100-0

No, H.K. and S.P. Meyers. 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan-A review. Journal of Aquatic Food Product Technology, 4(2):27-52. https://doi.org/10.1300/J030v04n02_03

Orzali, L., B. Corsi, C. Forni and L. Riccioni. 2017. Chitosan in Agriculture: A New Challenge for Managing Plant Disease. Pp. 17-36. *In:* Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides. E.A. Shalaby (ed.). InTech, UK. https://doi.org/10.5772/66840

Pathak, V.M., V.K. Verma, B.S. Rawat, B. Kaur, N. Babu, A. Sharma, S. Dewali, M. Yadav, R. Kumari, S. Singh, A. Mohapatra, V. Pandey, N. Rana and J.M. Cunill. 2022. Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. Frontiers in Microbiology, 13:962619. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619

Pirouz, A.A., J. Selamat, S.Z. Iqbal and N.I.P. Samsudin. 2020. Efficient and simultaneous chitosan-mediated removal of 11 mycotoxins from palm kernel cake. Toxins, 12(2):115-129. https://doi.org/10.3390/toxins12020115

Shi, L., L. Yang, J. Chen, Y. Pei, M. Chen, B. Hui and J. Li. 2004. Preparation and characterization of pH-sensitive hydrogel of chitosan/poly (acrylic acid) co-polymer. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 15(4):465-474. https://doi.org/10.1163/156856204323005316

Skarkova, J., V. Ostry, F. Malir and T. Roubal. 2013. Determination of ochratoxin a in food by high performance liquid chromatography. Analytical Letters, 46(10):1495-1504. https://doi.org/10.1080/00032719.2013.771266

Thomas, S., P.A. Soloman and V.O. Rejini. 2016. Preparation of Chitosan- CMC blends and studies on thermal properties. Procedia Technology, 24:721-726. https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.201

Zhao, Y., L. Deng, Y. Zhou, J. Ming, S. Yao and K. Zeng. 2018. Wound healing in citrus fruit is promoted by chitosan and *Pichia membranaefaciens* as a resistance mechanism against *Colletotrichum gloeosporioides*. Postharvest Biology and Technology, 145:134-143. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.07.007

Received: July 5, 2023; Accepted: September 8, 2023

تاريخ الاستلام: 2023/7/5؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2023/9/8