

ISSN: 3041-9638

<https://jrpsm.asnrkh.ac.ir/>

Open Access

Research Article

In vitro antifungal activity of plant-derived metabolites against *Curvularia tsudae* isolated from *Lawsonia* roots

M. Moshayedi¹, H. Rahanandeh²  and A. Sharifi Eshkalak³¹ Member of the Agricultural and Natural Resources Engineering Organization of Gilan Province, Rasht, Iran.² Department of Plant protection, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran.³ Member of the Agricultural and Natural Resources Engineering Organization of Gilan Province, Rasht, Iran.

Received: 04 Jun 2026

Accepted: 01 Sep 2026

Published :08 Sep 2026

Corresponding**Author:**

Hadi Rahanandeh

Email:

rahanandeh@iau.ac.ir

Keywords:Essential oils,
Mycelial growth
inhibition, Spore
germination,
Biological control**Citation:**

Moshayedi, M.,
Rahanandeh, H.,
Sharifi Eshkalak, A.
(2026). In vitro
antifungal activity of
plant-derived
metabolites against
Curvularia tsudae
isolated from
Lawsonia
roots. *Journal of*
Research in Plant
Metabolites, 4(2), 9-
21.
Doi:10.22034/jrpsm.2
026.570645.1105

Extended Abstract

Background and Objectives: Ornamental coniferous plants play an essential role in urban green spaces, parks, and landscape design due to their aesthetic value, ecological functions, and adaptability to diverse environmental conditions. Among these plants, Lawson cypress (*Chamaecyparis lawsoniana*) is widely cultivated because of its desirable growth form, foliage color, and ornamental appeal. However, root decline and root-associated disorders represent a major constraint to the sustainability and visual quality of these plants. Such disorders are frequently associated with soil-borne and root-associated fungi, particularly dematiaceous fungi, which may persist as saprophytes or endophytes and become opportunistic pathogens under stress conditions. Species belonging to the genus *Curvularia* have increasingly been reported from the rhizosphere and root tissues of ornamental and woody plants and are often linked to symptoms such as reduced vigor, chlorosis, and progressive decline. Climate change-related stresses, including fluctuations in temperature and soil moisture, can further disturb the balance between host plants and associated microorganisms, facilitating the pathogenic behavior of otherwise latent fungi. Management of root-associated fungal diseases traditionally relies on chemical fungicides. Although effective in the short term, repeated fungicide applications raise concerns regarding the development of resistant fungal populations, environmental contamination, and potential risks to human health. Consequently, there is growing interest in environmentally friendly alternatives, particularly plant-derived metabolites and essential oils, which are rich in bioactive compounds with documented antifungal properties. The present study aimed to isolate and identify a fungal species associated with root decline symptoms in *C. lawsoniana* and to evaluate the in vitro antifungal activity of selected plant essential oils against the identified isolate. In addition, the efficacy of these natural products was compared with commonly used chemical fungicides to assess their potential as sustainable disease management options.

Materials and Methods: Root samples were collected from Lawson cypress plants exhibiting decline and root rot symptoms in Guilan Province, northern Iran. After surface sterilization, root segments were plated on potato dextrose agar (PDA), and the dominant fungal isolate was purified through successive subculturing. Morphological identification was conducted based on colony characteristics and microscopic features of conidiophores and conidia. Molecular identification was performed by amplification and sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA using universal primers ITS5 and ITS4. The obtained sequence was compared with reference sequences in the GenBank database using BLAST analysis. Phylogenetic relationships were inferred using the Neighbor-Joining method, and the evolutionary stability of branches was assessed by bootstrap analysis. Twelve plant essential oils, including thyme (*Thymus vulgaris*), ajwain (*Trachyspermum ammi*), kakuti (*Ziziphora clinopodioides*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), peppermint (*Mentha piperita*), lavender (*Lavandula angustifolia*), fennel (*Foeniculum vulgare*), myrtle (*Myrtus communis*), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), galbanum (*Ferula gummosa*), and Persian hogweed (*Heracleum persicum*), were evaluated for antifungal activity. Antifungal assays were conducted using three complementary in vitro methods: disk diffusion, poisoned food (medium incorporation), and spore germination tests at different concentrations. Five chemical fungicides—mancozeb, thiophanate-methyl, copper oxychloride, iprodione + carbendazim (Rovral-TS), and Bordeaux mixture—were tested at 2000 mg L⁻¹ as chemical controls. All experiments were arranged in a completely randomized factorial design with three replications. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), and mean comparisons were performed using Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

Results: Based on morphological traits and ITS rDNA sequence analysis, the fungal isolate obtained from Lawson cypress roots was identified as *Curvularia tsudae* and deposited in GenBank under accession number PX096193. Phylogenetic analysis confirmed that the isolate clustered within the *Curvularia tsudae* species complex, consistent with previous reports indicating limited species-level resolution of the ITS region within this genus. The disk diffusion assay revealed significant differences among essential oils in their ability to inhibit mycelial growth. Thyme essential oil exhibited the highest inhibitory effect, while several other oils showed limited or no significant activity compared with the control. In the poisoned food assay, a stronger antifungal response was observed. Thyme, ajwain, and lemongrass essential oils completely inhibited mycelial growth of *C. tsudae* at higher concentrations, indicating pronounced antifungal efficacy. Other essential oils displayed moderate to low inhibitory effects, with inhibition generally increasing as concentration increased. Spore germination assays demonstrated that lemongrass and ajwain essential oils were the most effective in suppressing spore germination, whereas thyme essential oil showed a moderate inhibitory effect. In contrast, all tested chemical fungicides completely inhibited spore germination, confirming their high efficacy under laboratory conditions. Evaluation of fungicidal versus fungistatic activity revealed that thyme, ajwain, and lemongrass essential oils exerted true fungicidal effects, as no fungal regrowth occurred after transfer to fresh medium. Kakuti essential oil, however, exhibited a fungistatic effect, allowing fungal regrowth after removal of the treatment. Chemical fungicides varied in their mode of action, with some acting fungicidally and others primarily fungistatically.

Conclusion: This study demonstrated that *Curvularia tsudae* is associated with root decline symptoms in Lawson cypress and highlighted the considerable in vitro antifungal potential of selected plant-derived essential oils against this fungus. In particular, thyme, ajwain, and lemongrass essential oils showed strong inhibitory effects on mycelial growth and spore germination and exhibited fungicidal activity comparable, though not identical, to that of chemical fungicides. Although chemical fungicides achieved complete inhibition of spore germination, the observed efficacy of certain essential oils underscores their potential as environmentally friendly alternatives or complementary tools in integrated disease management strategies. These findings support further investigations under greenhouse and field conditions to evaluate the practical applicability, formulation stability, and phytotoxicity of these natural products. Overall, plant essential oils represent promising candidates for reducing reliance on synthetic fungicides and promoting sustainable management of root-associated fungal diseases in ornamental plants.



اثر ضدقارچی متابولیت‌های گیاهی بر *Curvularia tsudae* جداسازی شده از ریشه لاوسون در شرایط

آزمایشگاهی

مهسا مشیدی^۱، هادی رهاننده^۲ و آرش شریفی اشک^۳

^۱ عضو سازمان نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، رشت، ایران.

^۲ گروه گیاه پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

^۳ عضو سازمان نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، رشت، ایران.

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۴

چکیده

سابقه و هدف: درختچه‌های زینتی سوزنی‌برگ، به‌ویژه سرو لاوسون (*Chamaecyparis lawsoniana*)، نقش مهمی در فضاهای سبز شهری و مناظر زینتی ایفا می‌کنند. با این حال، اختلالات ریشه‌ای و زوال تدریجی این گیاهان که اغلب با حضور قارچ‌های خاکزاد و قارچ‌های تیره‌رنگ همراه است، می‌تواند موجب کاهش کیفیت، دوام و ارزش زیباشناختی آن‌ها شود. در سال‌های اخیر، گونه‌هایی از جنس *Curvularia* به‌عنوان قارچ‌های فرصت‌طلب مرتبط با زوال ریشه در گیاهان زینتی گزارش شده‌اند. هم‌زمان، وابستگی گسترده به قارچ‌کش‌های شیمیایی برای مدیریت این بیماری‌ها با پیامدهایی نظیر بروز مقاومت، آلودگی محیط‌زیست و مخاطرات سلامت انسانی همراه بوده است. در این راستا، متابولیت‌ها و اسانس‌های گیاهی به‌عنوان منابع طبیعی ترکیبات زیست‌فعال، توجه زیادی را به‌عنوان گزینه‌هایی زیست‌سازگار و کم‌خطر جلب کرده‌اند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که برخی اسانس‌های گیاهی قادرند رشد ریشه‌ای و جوانه‌زنی اسپور قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی را مهار کنند، اما اطلاعات مربوط به اثر آن‌ها بر قارچ‌های مرتبط با زوال ریشه سرو لاوسون محدود است. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی یک قارچ همراه با علائم زوال ریشه سرو لاوسون و ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس‌ها و متابولیت‌های گیاهی منتخب علیه جدایه شناسایی شده در شرایط آزمایشگاهی، و مقایسه کارایی آن‌ها با قارچ‌کش‌های شیمیایی متداول بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های ریشه از درختان سرو لاوسون دارای علائم زوال و پوسیدگی ریشه از استان گیلان جمع‌آوری شد. پس از ضدعفونی سطحی، قطعات ریشه روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و جدایه قارچی غالب پس از چند مرحله زیرکشت به‌صورت خالص جداسازی گردید. شناسایی ریخت‌شناسی بر اساس ویژگی‌های کلنی و مشخصات میکروسکوپی انجام شد. شناسایی مولکولی با تکثیر ناحیه ITS rDNA و توالی‌یابی انجام و جایگاه فیلوژنتیکی جدایه با استفاده از روش Neighbor-Joining تعیین گردید. برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی، اسانس ۱۲ گیاه دارویی شامل آویشن، زنیان، کاکوتی، علف لیمو، رزماری، نعنای فلفلی، اسطوخودوس، رازیانه، مورد، اکالیپتوس، باریجه و گلپر تهیه شد. آزمایش‌های ضدقارچی با استفاده از سه روش دیسک دیفیوژن، اختلاط با محیط کشت (poisoned food) و آزمون جوانه‌زنی اسپور در غلظت‌های مختلف انجام گرفت. همچنین، اثر پنج قارچ‌کش شیمیایی متداول شامل مانکوزب، تیوفانات‌متیل، اکسی‌کلوروس، رورال تی‌اس و بردو در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان شاهد شیمیایی بررسی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و فاکتوریل با سه تکرار اجرا گردید. داده‌ها با تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تحلیل شدند.

یافته‌ها: بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آنالیز توالی ITS rDNA، جدایه قارچی جداسازی شده از ریشه سرو لاوسون به‌عنوان *Curvularia tsudae* شناسایی و توالی آن در پایگاه GenBank ثبت شد. تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه مورد مطالعه درون مجموعه گونه‌ای نزدیک به *C. tsudae* قرار می‌گیرد. نتایج آزمون دیسک دیفیوژن نشان داد که اثر ضدقارچی اسانس‌های گیاهی به‌طور معنی‌داری به نوع اسانس و غلظت وابسته است. اسانس آویشن بیشترین مهارت رشد ریشه‌ای قارچ را در این روش نشان داد، در حالی که برخی اسانس‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند. در روش اختلاط با محیط کشت، اسانس‌های آویشن، زنیان و علف لیمو در غلظت‌های بالا موجب مهار کامل رشد ریشه‌ای *C. tsudae* شدند و بالاترین فعالیت ضدقارچی را نشان دادند. سایر اسانس‌ها اثر مهارتی متوسط تا ضعیف داشتند. افزایش غلظت اسانس‌ها به‌طور کلی با افزایش درصد بازدارندگی رشد قارچ همراه بود. در آزمون جوانه‌زنی اسپور، اسانس‌های زنیان و علف لیمو بیشترین ممانعت از جوانه‌زنی اسپور را ایجاد کردند، در حالی که اسانس آویشن اثر مهارتی متوسطی نشان داد. در مقابل، تمامی قارچ‌کش‌های شیمیایی مورد بررسی به‌طور کامل از جوانه‌زنی اسپور جلوگیری کردند. از نظر نوع اثر، اسانس‌های آویشن، زنیان و علف لیمو دارای خاصیت قارچ‌کشی واقعی بودند، در حالی که اسانس کاکوتی عمده‌تأثیر قارچ‌ایستایی نشان داد. نتایج این پژوهش بیانگر پتانسیل قابل توجه برخی اسانس‌های گیاهی به‌عنوان گزینه‌هایی زیست‌سازگار و مکمل برای مهار قارچ‌های مرتبط با زوال ریشه سرو لاوسون است.

نویسنده مسئول:

هادی رهاننده

ایمیل:

rahanandeh@iau.ac.ir

واژه‌های کلیدی:

اسانس‌های گیاهی، مهار رشد ریشه‌ای، جوانه‌زنی اسپور، کنترل زیستی

نحوه استناد:

جهانبخشی، ف، ابدالی مشهدی، ع، موسوی، س. ا، لطفی، ا. (۱۴۰۵). ارزیابی پرایمینگ بدر بر رفتار جوانه‌زنی گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa* Willd.) و فعالیت‌های آنزیمی در شرایط تنش نیترات سرب. مجله پژوهش در متابولیت‌های گیاهی، دوره ۴، شماره ۱، صفحات: ۹-۲۱. Doi:10.22055/psy.2023.4635.3106

مقدمه

در این میان، اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌عنوان منابع طبیعی ترکیبات زیست‌فعال، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. این ترکیبات دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی از جمله اثرات ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی هستند و توانایی مهار رشد بسیاری از قارچ‌های مرتبط با گیاهان را نشان داده‌اند (Nazzero et al., 2017; Sharifi-Rad et al., 2017). مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که اسانس‌هایی نظیر آویشن، نعنای فلفلی، اکالیپتوس و اسطوخودوس می‌توانند رشد ریشه‌ای و جوانه‌زنی اسپور قارچ‌های مختلف را در شرایط آزمایشگاهی به‌طور معنی‌داری کاهش دهند (Hyldgaard et al., 2015; Bajpai et al., 2020).

علاوه بر اثر مستقیم بر قارچ‌ها، برخی متابولیت‌های گیاهی قادرند پاسخ‌های دفاعی گیاه را از طریق تنظیم مسیرهای مقاومت القایی تقویت کرده و تحمل گیاه نسبت به تنش‌های زیستی را افزایش دهند (Kumar et al., 2020). هم‌زمان، پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های استخراج و فرمولاسیون اسانس‌ها، امکان کاربرد مؤثرتر این مواد طبیعی را فراهم کرده است (Prakash et al., 2018; Sharifi-Rad et al., 2020).

بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی یک قارچ همراه با علائم زوال ریشه در لاوسون و ارزیابی فعالیت ضدقارچی متابولیت‌ها و اسانس‌های گیاهی منتخب علیه این جدایه در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نتایج این مطالعه می‌تواند به توسعه راهکارهای زیست‌سازگار برای مهار قارچ‌های مرتبط با اختلالات ریشه‌ای گیاهان زینتی و کاهش وابستگی به قارچ‌کش‌های شیمیایی کمک نماید.

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد استفاده در آزمایش: در این تحقیق از اسانس ۱۲ گیاه دارویی مختلف شامل اکالیپتوس (*Eucalyptus globules*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*)، نعنای فلفلی (*Mentha piperita*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، مورد (*Myrtus communis*)، باریجه (*Ferula gummosa*)، گلپر (*Heracleum persicum*)، اسطوخودوس (*Lavandulla angustifolia*)، علف لیمو (*Cymbopogon citratus*) و زنیان (*Trachyspermum copticum*) استفاده شد.

جدایه‌ی قارچی و شرایط کشت آن: به‌منظور جداسازی قارچ‌های همراه با علائم زوال ریشه، نمونه‌هایی از درخت‌های سرو لاوسون (*Chamaecyparis lawsoniana*) دارای علائم پوسیدگی ریشه و طوقه از منطقه کلاچای (37.07° N, 50.00° E) در استان گیلان جمع‌آوری شد. قطعاتی به طول ۲-۳ سانتی‌متر از ناحیه حداقل جمع‌آوری سالم و دارای علائم انتخاب و پس از شست‌وشو با آب

درختچه‌های زینتی سوزنی‌برگ نقش مهمی در طراحی فضاهای سبز شهری، پارک‌ها و مناظر تزیینی ایفا می‌کنند و حفظ سلامت آن‌ها از جنبه‌های زیباشناختی و اکولوژیک اهمیت ویژه‌ای دارد. در میان این گیاهان، لاوسون (*Chamaecyparis lawsoniana*) به‌دلیل فرم رشدی مناسب، رنگ متمایز شاخ و برگ و سازگاری نسبی با شرایط محیطی، به‌طور گسترده در طراحی منظر مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، لندام‌های زیرزمینی این گیاه، به‌ویژه ریشه، می‌توانند تحت تأثیر تنش‌های زیستی و حضور قارچ‌های خاکزاد و همراه با ریشه دچار اختلال عملکرد و زوال تدریجی شوند که این موضوع در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Burgess et al., 2016).

قارچ‌های همراه ریشه، به‌ویژه گونه‌های تیره‌رنگ (Dematiaceous fungi)، به‌طور گسترده از ریزوسفر و بافت‌های زیرزمینی گیاهان زینتی و درختان گزارش شده‌اند و برخی از آن‌ها با علائمی نظیر کاهش رشد، زردی شاخ و برگ و ضعف عمومی گیاه همراه هستند. این قارچ‌ها می‌توانند به‌صورت ساپروفیت یا اندوفیت در گیاه حضور داشته باشند، اما در شرایط تنش‌زا نقش آن‌ها به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب برجسته‌تر می‌شود (Hyde et al., 2020).

در سال‌های اخیر، شواهد علمی نشان داده‌اند که تغییرات اقلیمی، از جمله افزایش دما، بروز تنش خشکی، نوسانات شدید رطوبتی و تغییر الگوهای بارندگی، می‌توانند تعادل میان گیاهان و میکروارگانیسم‌های همراه آن‌ها را بر هم زده و منجر به تشدید بیماری‌های گیاهی شوند. در چنین شرایطی، قارچ‌هایی که پیش‌تر به‌صورت ساپروفیت یا اندوفیت غیرآسیب‌زا در بافت‌های گیاهی حضور داشتند، ممکن است در اثر تضعیف سیستم دفاعی گیاه یا فراهم‌شدن شرایط مناسب برای رشد قارچ، به عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب تبدیل شوند. این پدیده به‌عنوان یکی از پیامدهای مهم تغییر اقلیم، در گیاهان زینتی و درختان فضای سبز که اغلب تحت تنش‌های هم‌زمان محیطی قرار دارند، اهمیت ویژه‌ای یافته است (Bebber & Gurr, 2015; Velásquez et al., 2018).

مدیریت اختلالات قارچی ریشه در گیاهان زینتی معمولاً متکی بر مصرف قارچ‌کش‌های شیمیایی است. اگرچه این ترکیبات در کوتاه‌مدت می‌توانند رشد قارچ‌ها را مهار کنند، اما استفاده مکرر از آن‌ها با پیامدهایی نظیر توسعه مقاومت در جمعیت‌های قارچی، آلودگی محیط‌زیست و نگرانی‌های مرتبط با سلامت انسان همراه است (Lucas et al., 2015; Zhao et al., 2022). این چالش‌ها سبب شده است که پژوهش‌های اخیر بر توسعه راهکارهای جایگزین و کم‌خطرتر برای مدیریت بیماری‌های قارچی تمرکز یابند.

محاسبه گردید. پایداری شاخه ها با آزمون بوت استرپ (۱۰۰۰ تکرار) ارزیابی و تنها مقادیر بالاتر از ۳۰٪ نمایش داده شدند. به منظور ریشه دار کردن درخت، یک گونه خارج گروه (outgroup) از یک جنس نزدیک انتخاب شد. در صورت نیاز، استفاده از نشانگرهای مولکولی مکمل مانند β -tubulin و TEF1- α در مطالعات آینده می تواند دقت تفکیک گونه های نزدیک را افزایش دهد.

تهیه اسانس گیاهان: گیاهان مورد مطالعه شامل ۱۲ گونه اسانس دار بودند که بخشی از آن ها (مانند مورد، گلپر و اکالیپتوس) از طبیعت استان گیلان جمع آوری شدند و سایر گونه ها (از جمله آویشن، زنیان، مرزه و اسطوخودوس) از مزارع کشت شده و فروشگاه های معتبر در شهر رشت تهیه گردیدند. شناسایی علمی تمامی گونه ها در دانشکده کشاورزی تأیید شد و نمونه های شاهد هر گیاه به صورت خشک شده در آزمایشگاه گیاه پزشکی دانشگاه نگهداری شدند. برای تهیه و استخراج اسانس های مورد مطالعه به شرح زیر از دستگاه کلونجر استفاده گردید. بدین صورت که ۵۰ گرم از بافت های خشک شده هر گیاه کاملاً خرد و به صورت جداگانه در بالن یک لیتری کلونجر به همراه مقداری آب ریخته شد و به مدت سه ساعت اسانس آن ها به روش تقطیر جداسازی گردید. از سولفات سدیم برای آب گیری از اسانس استفاده شد و اسانس های استخراج شده تا زمان استفاده، در چهار درجه ی سلسیوس نگهداری شدند (Ranjbar *et al.*, 2008).

قارچ کش های مورد استفاده: به منظور مقایسه فعالیت ضد قارچی اسانس های گیاهی از قارچ کش های شیمیایی مانکوزب (Mancozeb 80% WP)، تیوفانات متیل (Thiophanate-methyl 70% WP)، اکسی کروور مس (Copper oxychloride 35% WP)، اپیری دیون + کاربندازیم (Iprodione + Carbendazim 52.5% WP)، "Rovral"، بردو (Bordeaux mixture 20% SC) در غلظت 1 mg. l^{-1} ۲۰۰۰ ماده موثره به روش اختلاط با محیط کشت از شرکت آریا شیمی استفاده شد.

ارزیابی بازدارندگی از رشد قارچ در روش دیسک: به منظور بررسی اثر بازدارندگی اسانس های گیاهان مورد آزمایش، ابتدا محیط کشت PDA پس از استریل کردن تا دمای حدود ۴۵ سلسیوس سرد شد. سپس درون پتری دیش های ۱۰ سانتی متری ریخته شد و پس از انعقاد کامل محیط کشت، با چوب پنبه سوراخ کن یک دیسک قارچی به قطر شش میلی متر از حاشیه پرگنه کشت یک هفته ای آن تهیه شد و در وسط پتری قرار داده شد و تا زمانی که قطر پرگنه رشد به سه سانتی متر رسید (حدود ۷۲ ساعت) پتری دیش ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباتور نگهداری شدند. سپس دیسک های کاغذی شش میلی متری پادتن طب استریل شده نیز در

جاری، به مدت ۶۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضد عفونی سطحی شدند. سپس نمونه ها سه بار با آب مقطر استریل شسته و روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) کشت داده شدند.

پلیت ها در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس انکوبه شدند و کلنی های رشد یافته به منظور دستیابی به کشت خالص، چندین بار زیر کشت داده شدند. جدایه های خالص در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. شناسایی اولیه جدایه قارچی بر اساس ویژگی های ریخت شناسی کلنی شامل رنگ، بافت میسلیم و مشخصات کنیدی ها انجام شد.

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی جدایه قارچی با تکثیر ناحیه داخلی فاصله گذار رونویسی شده (ITS rDNA) با استفاده از آغازگرهای عمومی (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3' و ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Zhou *et al.*, 2022). استخراج DNA ژنومی از میسلیم تازه رشد یافته قارچ با استفاده از کیت تجاری Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل $12.5 \mu\text{L}$ مستر میکس ۲× (Amplicon, Denmark)، $1 \mu\text{L}$ از هر آغازگر ($10 \mu\text{M}$)، DNA $2 \mu\text{L}$ الگو (تقریباً $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) و آب دیونیزه استریل تا حجم نهایی انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در 95°C به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه دناتوراسیون در 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در 55°C به مدت ۳۰ ثانیه و امتداد در 72°C به مدت ۱ دقیقه، و در نهایت یک مرحله امتداد نهایی در 72°C به مدت ۷ دقیقه بود. واکنش فاقد DNA الگو به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

محصولات PCR پس از بررسی روی ژل آگارز ۱٪، با استفاده از کیت QIAquick PCR Purification Kit خالص سازی و توسط شرکت MacroGen (Korea) به روش توالی یابی Sanger تعیین توالی شدند. توالی های حاصل با استفاده از نرم افزارهای BioEdit v7.2 و Chromas v2.6 ویرایش و سپس با استفاده از الگوریتم BLASTn با توالی های موجود در پایگاه داده GenBank مقایسه شدند.

برای بررسی روابط فیلوژنتیکی، درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی Neighbor-Joining (NJ) ($\approx 536 \text{ bp}$) TS با استفاده از روش نرم افزار MEGA X ترسیم شد. هم تراز توالی ها با الگوریتم ClustalW انجام و فواصل تکاملی بر اساس مدل p-distance

هیچ گونه رشدی در آنها مشاهده نگردیده بود، مجدداً روی محیط کشت PDA فاقد ترکیبات مورد بررسی کشت داده شده و قارچ‌کشی که باعث مرگ ریشه قارچ شده و هیچ رشدی روی محیط کشت PDA مشاهده نگردید، به عنوان MFC گزارش شد (Irkin & Korukluoglu, 2007).

اثر تیمارهای مختلف بر میزان جوانه زنی اسپور: در این آزمایش، همانند روش قبل، پس از بسته شدن محیط کشت PDA حاوی اسانس در غلظت‌های تعیین شده، چند قطره از سوسپانسیون تهیه شده از اسپورهای قارچی در سه منطقه از سطح تشتک پتری ریخته شد و روی هر کدام یک عدد لامل قرار داده شد. به این ترتیب سه تکرار این آزمایش در یک تشتک پتری انجام گردید. تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت از اطراف محل لامل‌ها برش داده شده و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر در میدان دید مختلف برای هر تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تعداد اسپورهای جوانه زده و زده شمارش و در نهایت درصد بازدارگی از جوانه زنی اسپور مشابه درصد بازدارگی از رشد میسلیومی قارچ محاسبه شد. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با مقایسه میانگین به روش Duncan در سطح احتمال ۵ درصد و در ۳ تکرار انجام گرفت. اسپورهایی که طول لوله تندش آن‌ها از قطر اسپور بیشتر بود، به عنوان جوانه زده شمارش شدند (Tatsadjieu et al., 2009). جهت رعایت اصول آزمایش و کاهش خطای یک تشتک شاهد با اضافه نمودن آب مقطر استریل به محیط کشت نیز برای هر قارچ در نظر گرفته شد.

روش‌های آماری و نرم افزارهای مورد استفاده: آنالیزهای تجزیه واریانس (ANOVA) در این مطالعه براساس طرح آزمایشی فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. مقایسه و گروه‌بندی میانگین‌ها براساس روش چند دامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) انجام گردید. رسم نمودارهای مورد نظر در محیط نرم افزار Microsoft Excel 2021 انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی ریخت‌شناسی، مولکولی و جایگاه فیلوژنتیکی جدایه قارچی

ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه قارچی: جدایه قارچی پس از کشت بر روی محیط PDA در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس، رشد نسبتاً سریعی نشان داد و کلنی‌ها پس از ۷ روز دارای سطحی مخملی تا پنبه‌ای با حاشیه‌های نسبتاً منظم بودند. رنگ کلنی در مراحل اولیه رشد خاکستری روشن بوده و به تدریج با افزایش سن کلنی به

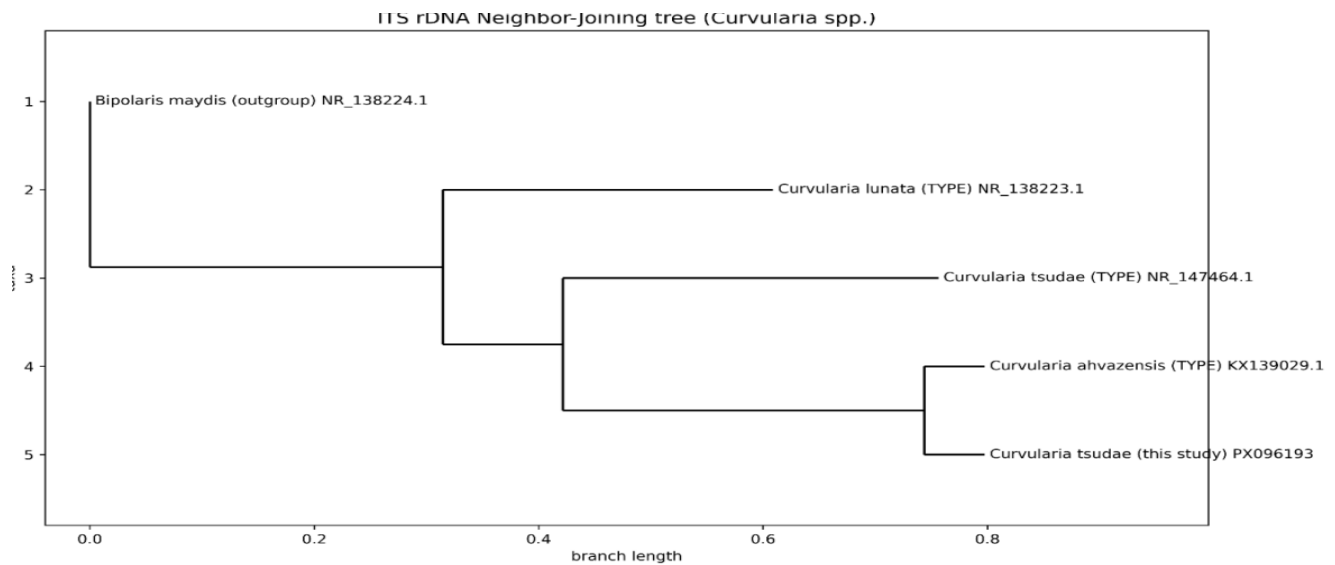
فاصله ۱۰ میلی‌متری حاشیه پرگنه قرار داده شد و از غلظت‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر اسانس توسط سمپلر روی دیسک‌های کاغذی بارگذاری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمایش فاکتوریل انجام شد به طوری که در همه غلظت‌های اسانس (۱، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰۰ پی پی ام) و همه گیاهان با سه تکرار انجام شد فاکتورهای این آزمایش نوع گیاه و غلظت اسانس بود. در نهایت در فواصل زمانی مختلف (تا ۵ روز) میزان رشد پرگنه از روبرو، چپ و راست اندازه گیری شد. همچنین برای کاهش خطای آزمایش آب مقطر استریل به عنوان تیمار شاهد استفاده گردید (Hadian et al., 2006).

ارزیابی بازدارندگی اسانس و قارچ‌کش از رشد قارچ در روش اختلاط با محیط کشت: برای بررسی اثرات بازدارندگی اسانس‌های گیاهان مختلف مورد آزمایش و قارچ‌کش‌ها از روش اختلاط اسانس یا قارچ‌کش با محیط کشت استفاده شد. لذا پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت PDA و سرد شدن آن غلظت‌های مختلف ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام اسانس گیاهان مذکور و غلظت ۲۰۰۰ پی پی ام ماده موثره قارچ‌کش‌ها و اسانس در محیط کشت تهیه و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به تشتک‌های پتری یکبار مصرف سترون منتقل شدند. پس از آن، از حاشیه‌ی پرگنه قارچ بلوک‌های میسلیومی به قطر شش میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن سترون جدا شده و در شرایط سترون زیر هود در مرکز تشتک‌های پتری با رقت‌های متفاوت اسانس گیاهان مختلف مورد آزمایش و قارچ‌کش‌ها قرار داده شدند. تشتک‌های پتری به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به جای اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها استفاده شد (Hadian et al., 2006). درصد بازدارندگی از رشد قارچ توسط غلظت‌های مختلف از فرمول $MGI = (DC - DT) / DC \times 100$ محاسبه شد (Moslem & El-kholie, 2009). در این فرمول به ترتیب MGI = درصد بازدارندگی از رشد، DC = قطر رشد پرگنه تیمار شاهد و DT = قطر رشدی پرگنه تیمار در غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها است.

تعیین میزان غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌های مورد بررسی: برای مشخص نمودن غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس‌های گیاهان و قارچ‌کش‌ها، بدین صورت عمل گردید که اسانس‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت و با محیط کشت مخلوط شد. در پایان کمترین غلظتی که موجب بازدارندگی کامل از رشد قارچ گردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد. همچنین برای بررسی قارچ‌کشی، قارچ‌کش‌ها (MFC) ترکیبات مختلف مورد بررسی، غلظت ۲۰۰۰ پی پی ام از MIC را که

تا ۴ دیواره عرضی (سپتوم) بودند. سلول میانی کنیدی‌ها متورم‌تر از سلول‌های انتهایی مشاهده شد که از ویژگی‌های شاخص جنس *Curvularia* به‌شمار می‌رود. ابعاد کنیدی‌ها در محدوده گزارش‌شده برای گونه‌های نزدیک به *Curvularia tsudae* قرار داشت. مجموعه این ویژگی‌های ریخت‌شناسی، تعلق جدایه به جنس *Curvularia* را تأیید می‌کرد.

قهوه‌ای تیره تا زیتونی متمایل به سیاه تغییر یافت. سطح زیرین کلنی (reverse) به رنگ قهوه‌ای تیره مشاهده شد. تولید رنگدانه‌های تیره در محیط کشت از ویژگی‌های بارز این جدایه بود که با ماهیت قارچ‌های تیره‌رنگ (dematiaceous fungi) مطابقت دارد. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد کنیدیوفورها ساده یا گاهی منشعب، قهوه‌ای‌رنگ و دارای دیواره‌های صاف بودند. کنیدی‌ها خمیده تا اندکی داسی‌شکل، قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف، و دارای ۳



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه ITS rDNA برای ایزوله قارچی به‌دست آمده از ریشه سرو لاوسون (*Chamaecyparis lawsoniana*) و گونه‌های منتخب جنس *Curvularia*. درخت با استفاده از روش Neighbor-Joining و بر اساس فاصله ژنتیکی محاسبه‌شده به روش identity رسم شد. ایزوله این مطالعه (PX096193) درون مجموعه گونه‌ای (*species complex*) مربوط به *Curvularia tsudae* قرار گرفت. با توجه به قدرت تفکیک محدود ناحیه ITS در جنس *Curvularia*، تفکیک دقیق گونه‌ای امکان‌پذیر نبوده و شناسایی در سطح جنس و ارتباط فیلوژنتیکی گزارش شده است. گونه *Bipolaris maydis* به‌عنوان outgroup برای ریشه‌دار کردن درخت استفاده شد.

Figure 1- Neighbor-Joining phylogenetic tree based on the ITS rDNA region of the fungal isolate obtained from roots of *Chamaecyparis lawsoniana* and selected species of the genus *Curvularia*. Genetic distances were calculated using the identity model. The isolate from the present study (PX096193) clustered within the *Curvularia tsudae* species complex. Due to the limited discriminatory power of the ITS region in *Curvularia*, species-level resolution was not achieved, and identification is therefore reported at the genus level with phylogenetic affinity. *Bipolaris maydis* was used as the outgroup to root the tree.

کمپلکس گونه‌ای نزدیک به *Curvularia tsudae* نشان داد. این الگوی خوشه‌بندی با گزارش‌های پیشین در مورد ساختار فیلوژنتیکی جنس *Curvularia* مطابقت دارد؛ به‌گونه‌ای که در مطالعات مختلف نشان داده شده است گونه‌های نزدیک این جنس اغلب در تحلیل‌های مبتنی بر ITS به‌صورت هم‌پوشان یا با تفکیک محدود ظاهر می‌شوند (Manamgoda et al., 2015; Tan et al., 2018). چنین هم‌پوشانی فیلوژنتیکی به‌ویژه در مجموعه‌های گونه‌ای نزدیک (*Curvularia* species complexes) پدیده‌ای شناخته‌شده است و پیش‌تر نیز گزارش شده است. در مطالعات کاربردی مشابه که تمرکز آن‌ها بر بررسی فعالیت‌های زیستی، از جمله ارزیابی اثرات ضدقارچی متابولیت‌های گیاهی بوده است، شناسایی در سطح جنس به‌عنوان چارچوب تاکسونومیک کافی و پذیرفته‌شده برای تفسیر نتایج

شناسایی مولکولی بر اساس ناحیه ITS: تکثیر ناحیه ITS rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 منجر به تولید یک باند واضح با طول تقریبی ۵۳۶ جفت‌باز شد. توالی حاصل پس از ویرایش و حذف نواحی کم‌کیفیت، با استفاده از الگوریتم BLASTn با توالی‌های موجود در پایگاه داده GenBank مقایسه گردید. نتایج مقایسه توالی نشان داد که جدایه مورد مطالعه بیشترین درصد شباهت را با توالی‌های ثبت‌شده متعلق به گونه *Curvularia tsudae* داشت. بر این اساس، جدایه مورد بررسی با کد PX096193 به‌عنوان *C. tsudae* شناسایی شد.

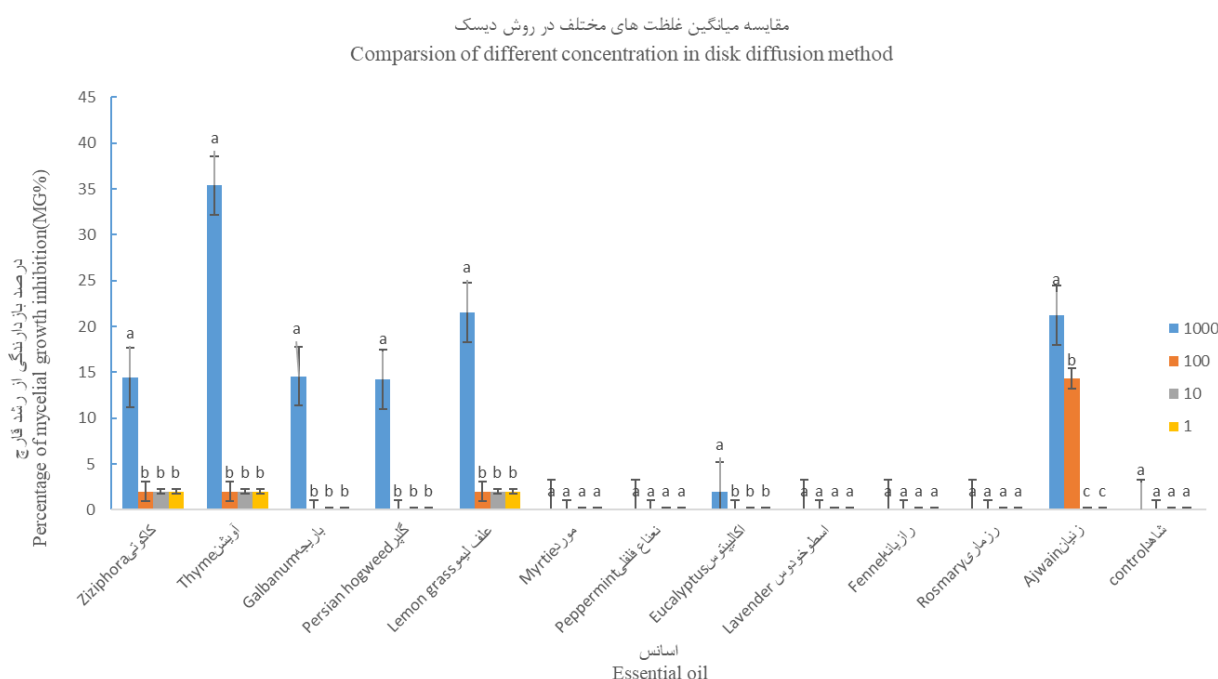
تحلیل فیلوژنتیکی: تحلیل توالی ناحیه ITS rDNA نشان داد که جدایه PX096193 جداشده از ریشه سرو لاوسون در کلاد جنس *Curvularia* قرار گرفت و درخت فیلوژنتیکی قرابت آن را با اعضای

اسطوخودوس، رازیانه و رزماری اثر بازدارندگی ناچیزی داشته و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان ندادند.

تفاوت مشاهده‌شده در کارایی ضدقارچی اسانس‌ها را می‌توان به ماهیت و غلظت ترکیبات فعال زیستی آن‌ها نسبت داد. اسانس آویشن که بالاترین درصد مهار را نشان داد، به‌طور گسترده‌ای به دلیل حضور ترکیبات فنولی غالب مانند تیمول و کارواکرول به‌عنوان یکی از قوی‌ترین اسانس‌های ضدقارچی شناخته می‌شود که با تخریب غشای سلولی و اختلال در تعادل یونی سلول قارچی موجب مهار رشد می‌گردند (Marchese et al., 2016). همچنین گزارش شده است که اسانس علف‌لیمو به‌دلیل وجود ترکیباتی نظیر سیترال می‌تواند رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (Pavela, 2015). اثرات ضدقارچی زنیان نیز در مطالعات مختلف تأیید شده و فعالیت آن به ترکیبات مونوترپنی و فنولی موجود در اسانس نسبت داده شده است (Sharifi-Rad et al., 2017). همخوانی نتایج این پژوهش با مطالعات پیشین نشان می‌دهد که اسانس‌های غنی از ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی می‌توانند به‌عنوان گزینه‌های طبیعی و زیست‌سازگار در مهار قارچ‌های بیماری‌زا، به‌ویژه در شرایط آزمایشگاهی، مورد توجه قرار گیرند.

عملکردی مورد استفاده قرار گرفته است (Marin-Felix et al., 2020). بر این اساس، جایگاه فیلوژنتیکی به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر، مبنای قابل اتکایی برای تحلیل نتایج زیستی مطالعه فراهم می‌کند و هدف اصلی پژوهش که بررسی پتانسیل ضدقارچی متابولیت‌های گیاهی است، بدون نیاز به تفکیک گونه‌ای دقیق‌تر، به‌طور کامل پوشش داده می‌شود (شکل ۱).

تأثیر اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ عامل بیماری در روش دیسک: نتایج آزمون دیسک دیفیوژن نشان داد که اثر بازدارندگی اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ *C. tsudae* به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع اسانس و غلظت مصرفی قرار دارد (شکل ۲). در بالاترین غلظت مورد بررسی، اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) با ۳۵/۳۶٪ بیشترین مهار رشد قارچ را نشان داد و به‌طور معنی‌داری در گروه آماری برتر قرار گرفت. پس از آن، اسانس‌های علف‌لیمو (*Cymbopogon citratus*) با ۲۱/۵۰٪ و زنیان (*Trachyspermum ammi*) با ۲۱/۲۳٪ مهار رشد قابل توجهی ایجاد کردند. اسانس‌های باریجه (*Galbanum*)، کاکوتی (*Ziziphora* sp.) و گلپر (*Heracleum persicum*) به ترتیب با ۱۴/۵۶٪، ۱۴/۴۳٪ و ۱۴/۲۳٪ اثر مهاری متوسطی داشتند. سایر اسانس‌ها از جمله مورد، نعناع فلفلی،



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی روی قارچ *Curvularia tsudae* در روش انتشار از دیسک

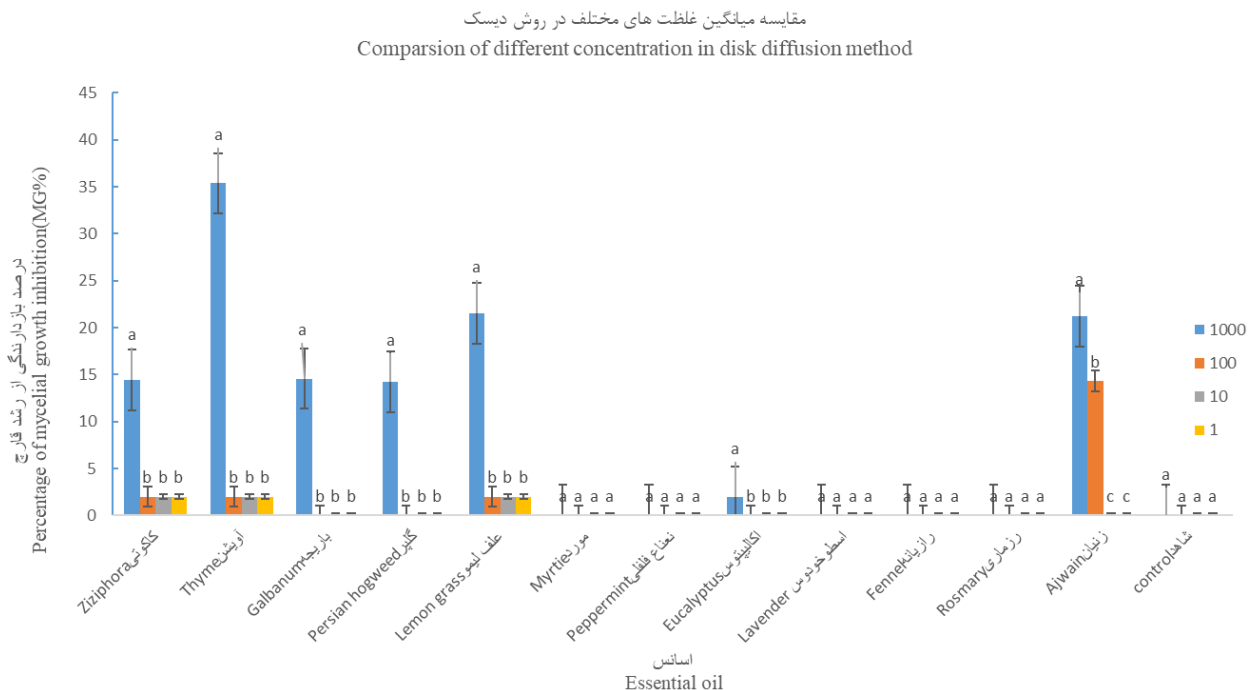
Figure 2- Antifungal Effect of Plant Essential Oils at Various Concentrations against *Curvularia tsudae* by the Disk Diffusion Method

اسانس و غلظت مصرفی قرار داشت. در بالاترین غلظت مورد آزمایش (2000 ppm)، اسانس‌های آویشن (*Thymus vulgaris*)، زنیان (*Cymbopogon citratus*) و علف‌لیمو (*Trachyspermum ammi*) موجب مهار کامل رشد ریشه‌ای قارچ شدند و بالاترین سطح فعالیت ضدقارچی را نشان دادند. در مقابل، اسانس‌های اسطوخودوس،

تأثیر اسانس‌های گیاهی و قارچ‌کش‌ها بر رشد قارچ عامل بیماری در روش اختلاط با محیط کشت: نتایج حاصل از روش اختلاط اسانس‌های گیاهی با محیط کشت نشان داد که تمامی اسانس‌های مورد بررسی قادر به کاهش رشد ریشه‌ای قارچ بودند، هرچند شدت این اثر بازدارندگی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع

در تمامی اسانس‌ها افزایش غلظت منجر به کاهش معنی‌دار رشد ریشه‌ای قارچ شد که بیانگر وابستگی پاسخ قارچ به دوز اسانس است (شکل ۳).

اکالیپتوس و رازیانه اگرچه نتوانستند رشد قارچ را به‌طور کامل متوقف کنند، اما با ایجاد بیش از ۷۵ درصد بازدارندگی، اثر مهاری قابل توجهی از خود نشان دادند. سایر اسانس‌ها کاهش رشد کمتری ایجاد کرده و در گروه‌های آماری پایین‌تر قرار گرفتند. به‌طور کلی،



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی روی قارچ *Curvularia tsudae* در روش اختلاط با محیط کشت

Figure 3-Antifungal Effect of Plant Essential Oils at Different Concentrations on *Curvularia tsudae* by the Culture Medium Incorporation Technique

مثال، اسانس‌های آویشن و زنیان در روش اختلاط با محیط کشت موجب مهار کامل یا قابل توجه رشد *Fusarium solani* و *Fusarium graminearum* شده‌اند (Khalili et al., 2022). همچنین گزارش شده است که برخی اسانس‌های گیاهی می‌توانند رشد *Fusarium oxysporum* را در شرایط آزمایشگاهی به‌طور معنی‌داری کاهش دهند (Davari and Ezazi, 2022). هم‌راستایی این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که مکانیسم اثر ترکیبات فعال اسانس‌ها، به‌ویژه ترکیبات فنولی و ترپنوئیدی، می‌تواند طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی را تحت تأثیر قرار دهد و محدود به یک جنس خاص نباشد.

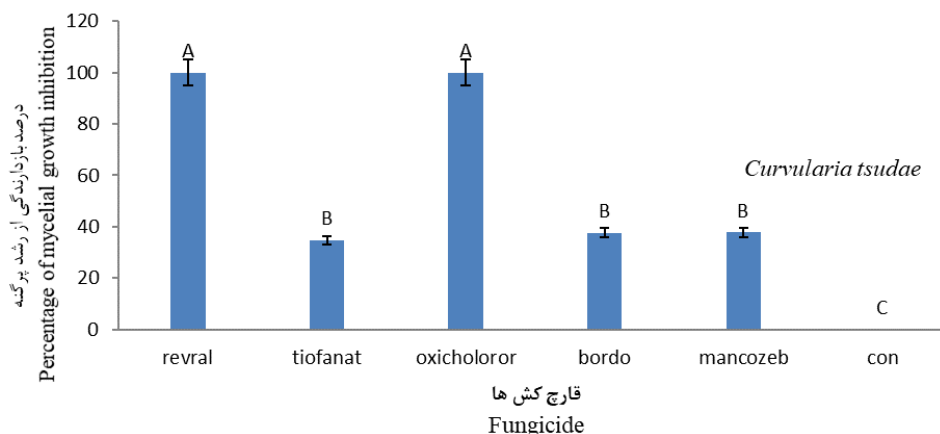
مقایسه نتایج این روش با آزمون دیسک دیفیوژن نشان داد که برخی اسانس‌ها در محیط کشت فعالیت ضدقارچی قوی‌تری از خود بروز می‌دهند. این تفاوت می‌تواند به ویژگی‌های فیزیوشیمیایی اسانس‌ها از جمله فراریت بالا، توزیع یکنواخت‌تر ترکیبات فعال در محیط آگار، تماس مستقیم‌تر ریشه قارچی با اسانس و افزایش غلظت مؤثر واقعی نسبت داده شود (Balouiri et al., 2016). بر این اساس، روش اختلاط با محیط کشت می‌تواند ارزیابی دقیق‌تری از توان واقعی

الگوی گروه‌بندی آماری نشان داد که در اغلب اسانس‌ها، غلظت‌های مختلف در سه گروه آماری مجزا قرار گرفتند، در حالی که در اسانس زنیان، تمامی غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند که این موضوع بیانگر حساسیت بالاتر قارچ نسبت به تغییرات غلظت این اسانس است. نتایج به‌دست‌آمده با گزارش‌های پیشین در زمینه اثر ضدقارچی اسانس‌های گیاهی بر قارچ‌های وابسته به جنس‌های *Curvularia* و *Bipolaris* هم‌راستا است. در مطالعات مختلف، اسانس آویشن به‌عنوان یکی از مؤثرترین اسانس‌ها در مهار رشد گونه‌هایی از *Curvularia* و *Bipolaris* معرفی شده و این اثر عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی فعالی مانند تیمول و کارواکرول نسبت داده شده است (Dubey et al., 2010; Marchese et al., 2016). همچنین گزارش شده است که اسانس علف‌لیمو، قادر به مهار رشد ریشه‌ای گونه‌های وابسته به جنس *Bipolaris* و سایر قارچ‌های لکه‌برگی است (Pawar and Thaker, 2006; Pavela, 2015).

علاوه بر قارچ‌های وابسته به جنس‌های *Curvularia* و *Bipolaris*، اثرات ضدقارچی اسانس‌های گیاهی مشابه بر روی قارچ‌های خاکزاد مهمی نظیر گونه‌های *Fusarium* نیز گزارش شده است. به‌عنوان

مس و رورال تی اس داشتند که به‌طور کامل رشد ریشه‌ای قارچ را مهار کردند. سه قارچکش دیگر در یک گروه آماری و بالاتر از شاهد قرار گرفتند (شکل ۴).

ضدقارچی اسانس‌های گیاهی ارائه دهد و برای بررسی کارایی زیستی این ترکیبات روش مناسب‌تری محسوب شود. براساس نتایج آماری همه قارچکش‌ها در کاهش رشد ریشه‌ای قارچ *C. tsudae* موثر بودند. بیشترین تاثیر را دو قارچکش اکسی کلرور



شکل ۴- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ *Curvularia tsudae* با استفاده از پنج قارچ‌کش (حروف غیر متشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها در سطح ۵٪ است).

Figure 4- Comparison of the mean percentage inhibition of *Curvularia tsudae* mycelial growth using five fungicides (different letters indicate significant differences among treatments at the 5% level).

بسیار مؤثری مهار کند و حتی در برخی غلظت‌ها به مهار کامل منجر شود (Pawar and Thaker, 2006; Pavela, 2015). همچنین گزارش شده است که اسانس زنیان، تولنایی بالایی در اختلال فرآیند جوانه‌زنی اسپور از طریق برهم‌زدن یکپارچگی غشای سلولی، مهار فعالیت آنزیم‌های کلیدی و جلوگیری از تشکیل لوله تندش دارد (Bakkali et al., 2008; Marchese et al., 2016).

در مقابل، اسانس‌هایی که در این مطالعه اثر مهاری ضعیفی نشان دادند یا تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند، احتمالاً فاقد غلبه ترکیبات فنولی یا آلدئیدی فعال بوده یا دارای ترکیباتی با توان نفوذ محدود به دیواره و غشای اسپور هستند. در مطالعات مقایسه‌ای نشان داده شده است که ترکیباتی مانند لیمونن و لینالول در مقایسه با سیترال، تیمول و کارواکرول، اثر ضدقارچی ضعیف‌تری به‌ویژه در مرحله جوانه‌زنی اسپور دارند (Cowan, 1999; Nazzaro et al., 2017). این موضوع می‌تواند توجیه‌کننده کارایی پایین برخی اسانس‌ها در پژوهش حاضر باشد. در مجموع، نتایج این بخش نشان می‌دهد که اگرچه جوانه‌زنی اسپور مرحله‌ای حساس در چرخه زندگی قارچ *C. tsudae* محسوب می‌شود، اما مهار مؤثر آن به ماهیت شیمیایی ترکیبات غلب اسانس وابسته است و تنها اسانس‌هایی با ترکیب مناسب می‌توانند این مرحله را به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر قرار دهند. این یافته‌ها ضرورت انتخاب هدفمند اسانس‌های گیاهی را در راهبردهای مدیریت زیست‌سازگار بیماری‌های قارچی برجسته می‌سازد.

تاثیر اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها بر جوانه‌زنی اسپور قارچ: ارزیابی اثر اسانس‌های گیاهی بر جوانه‌زنی اسپور قارچ *C. tsudae* نشان داد که پاسخ قارچ به تیمارهای مختلف به‌طور معنی‌داری به نوع اسانس وابسته است ($P \leq 0.01$). در غلظت ۲۰۰ ppm، اسانس‌های زنیان و علف‌لیمو با ایجاد ۲۶/۶۷ درصد مهار جوانه‌زنی اسپور بیشترین اثر بازدارندگی را نشان دادند و در بالاترین گروه آماری قرار گرفتند. این یافته بیانگر توان بالای این اسانس‌ها در مهار مرحله آغازین رشد قارچ است؛ مرحله‌ای که نقش تعیین‌کننده‌ای در شروع آلودگی و استقرار پاتوژن دارد. در سطح بعدی، اسانس باریجه با ۱۷/۳۳ درصد بازدارندگی اثر مهاری متوسطی از خود نشان داد، در حالی که اسانس آویشن با ۱۳/۳۳ درصد مهار جوانه‌زنی اسپور در گروه آماری میانی قرار گرفت. همچنین اسانس‌های کاکوتی و رازیانه به‌ترتیب با ۱۰/۶۷ و ۹/۳۳ درصد مهار، کاهش محدود اما قابل اندازه‌گیری در جوانه‌زنی اسپور ایجاد کردند. در مقابل، اسانس‌های گشنیز، اسطوخودوس و رزماری تنها اثر مهاری اندکی نشان دادند و اسانس‌های مورد، نعنای فلفلی و اکالیپتوس اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند که بیانگر کارایی ضعیف آن‌ها در مهار این مرحله از چرخه زندگی قارچ است. برتری مشاهده‌شده برای اسانس‌های زنیان و علف‌لیمو با گزارش‌های پیشین درباره نقش ترکیبات فعال خاص در مهار جوانه‌زنی اسپور هم‌خوانی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که اسانس علف‌لیمو و جزء اصلی آن سیترال (citral) قادر است جوانه‌زنی کنیدی/اسپور قارچ‌های وابسته به جنس *Curvularia* و سایر قارچ‌های لکه‌برگی را به‌طور

تیوفانات متیل در مرحله جوانه زنی اسپور، کارایی بالاتری نسبت به مراحل بعدی رشد ریشه های نشان می دهند، زیرا این مرحله فاقد ساختارهای دفاعی کامل بوده و حساسیت بیشتری به ترکیبات شیمیایی دارد (Brent and Hollomon, 2007). با وجود کارایی بالای قارچ کش ها، مقایسه این نتایج با اثر اسانس های گیاهی مؤثر در پژوهش حاضر نشان می دهد که برخی اسانس ها می توانند بدون ایجاد مهار کامل، کاهش معنی داری در جوانه زنی اسپور ایجاد کنند. این موضوع بیانگر پتانسیل اسانس های گیاهی به عنوان گزینه های مکمل یا جایگزین کم خطرتر در چارچوب راهبردهای مدیریت تلفیقی بیماری ها و کاهش وابستگی به قارچ کش های شیمیایی است (جدول ۱).

در کنار اسانس های گیاهی، بررسی اثر قارچ کش های شیمیایی نشان داد که هر پنج قارچ کش مورد آزمون شامل رورال تی اس، مانکوزب، بردو، اکسی کلرور مس و تیوفانات متیل موجب مهار کامل (۱۰۰ درصدی) جوانه زنی اسپور قارچ *C. tsudae* شدند. مهار کامل جوانه زنی در حضور این قارچ کش ها با گزارش های پیشین همخوانی دارد که نشان می دهند ترکیبات تماسی و سیستمیک، به ویژه قارچ کش های مسی و بنزیمیدازولی، از طریق اختلال در فرآیندهای حیاتی مانند تقسیم سلولی، تنفس میتوکندریایی و عملکرد آنزیم های کلیدی، قادر به توقف کامل جوانه زنی اسپور قارچ های بیماری زای گیاهی هستند (Agrios, 2005; FRAC, 2023). همچنین گزارش شده است که قارچ کش هایی مانند مانکوزب و

جدول ۱- مقایسه میانگین تاثیر غلظت 2000 mg. l^{-1} اسانس های گیاهان و قارچ کش های مورد مطالعه در میزان بازدارندگی از جوانه زنی اسپورهای قارچ

Curvularia tsudae

Table 1- Comparison of the mean effect of 2000 mg. l^{-1} concentrations of plant essential oils and the studied fungicides on the inhibition of spore germination of *Curvularia tsudae*

اسانس Essential oil	درصد بازدارندگی در غلظت 2000 mg. l^{-1} Inhibition percentage at 2000 mg. l^{-1}
زنیان	26.67 ^b
باریجه	17.34 ^c
گلپر	5.34 ^{efg}
آویشن	13.34 ^c
علف لیمو	26.67 ^b
مورد	1.34 ^g
نعناع فلفلی	0 ^g
اکالیپتوس	16 ^c
اسطوخودوس	4 ^{fg}
رازیانه	9.34 ^{def}
رزماری	2.67 ^g
کاکوتی	10.67 ^{de}
شاهد	0 ^g
رورال	100 ^a
متیل تیوفانات	100 ^a
مانکوزب	100 ^a
اکسی کلرور	100 ^a
بردو	100 ^a
	100 ^a

اعداد متن، میانگین درصد بازدارندگی سه تکرار هستند. بر اساس روش چند دامنه ای دانکن (Duncan)، میانگین هایی که در یک ستون با حروف یکسان نشان داده شده اند، از نظر آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

The numbers represent the mean percentage of inhibition from three replications. According to the Least Significant Difference (LSD) test, means within a column followed by the same letters are not significantly different from each other.

پس از انتقال به محیط PDA فاقد اسانس شدند که بیانگر خاصیت قارچ کشی واقعی این تیمارهاست. همچنین قارچ کش شیمیایی رورال تی اس نیز اثر قارچ کشی کامل علیه *C. tsudae* نشان دادند. در مقابل، اسانس کاکوتی و قارچ کش اکسی کلرور مس پس از انتقال دیسک ها به محیط فاقد ماده مؤثره، مجدداً امکان رشد قارچ را فراهم کردند که این موضوع نشان دهنده خاصیت قارچ ایستایی آنهاست. تفاوت در ماهیت قارچ کشی یا قارچ ایستایی اسانس ها و قارچ کش ها

ارزیابی فعالیت قارچ کشی و قارچ ایستایی اسانس های گیاهی و قارچ کش های شیمیایی بر *Curvularia tsudae*: نتایج آزمون بازکشت کشت از تیمارهایی که در آن ها رشد قارچ مشاهده نشد، نشان داد که نوع اثر اسانس ها و قارچ کش ها بر *C. tsudae* متفاوت بوده و می توان آن ها را به دو گروه قارچ کش (Fungicidal) و قارچ ایستا (Fungistatic) طبقه بندی کرد (جدول ۲). در این بررسی، اسانس های زنیان، علف لیمو و آویشن موجب عدم رشد مجدد قارچ

شرایط آزمایش، گونه قارچی و غلظت وابسته است (Mazarei & Rafati, 2019). اکسی کلرور مس نیز که به‌طور گسترده در مدیریت بیماری‌های گیاهان زینتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، عمدتاً با مهار فعالیت آنزیمی و جلوگیری از رشد قارچ عمل می‌کند و در بسیاری از موارد خاصیت قارچ‌ایستایی دارد (Lamichhane et al., 2018). در این آزمایش، به‌دلیل تغییر رنگ شدید محیط کشت در تیمار مانکوزب و تیوفانات متیل و عدم امکان تشخیص دقیق رشد یا جوانه‌زنی اسپور، ارزیابی ماهیت قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی این قارچ‌کش‌ها امکان‌پذیر نبود. در مجموع، نتایج این بخش نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی منتخب، به‌ویژه زنیان، علف لیمو و آویشن، علاوه بر مهار رشد، قادر به ایجاد اثر قارچ‌کشی واقعی علیه *C. tsudae* هستند و می‌توانند به‌عنوان گزینه‌های زیست‌سازگار در مدیریت بیماری‌های قارچی گیاهان زینتی مورد توجه قرار گیرند.

عمدتاً به ترکیبات شیمیایی غالب، غلظت مواد مؤثره و حساسیت جدایه قارچی نسبت داده می‌شود (Reedy et al., 2008; Bakkali et al., 2008).

بررسی‌های شیمیایی پیشین نشان داده‌اند که اسانس‌های زنیان و آویشن، منجر به مرگ سلول قارچی می‌شوند و به همین دلیل اغلب اثر قارچ‌کشی ایجاد می‌کنند (Purkait et al., 2020; Sharifi-Rad et al., 2017). مشاهده اثر قارچ‌کشی این اسانس‌ها بر *C. tsudae* با گزارش‌های پیشین درباره اثر آن‌ها بر قارچ‌های بیماری‌زای دیگر از جنس‌های *Bipolaris*، *Alternaria* و *Fusarium* همخوانی داشت (Kedia et al., 2015; Nazzaro et al., 2017).

در مقابل، اسانس کاکوتی با وجود داشتن ترکیبات فنلی فعال، در این مطالعه تنها خاصیت قارچ‌ایستایی نشان داد. این الگو پیش‌تر نیز در برخی قارچ‌های بیماری‌زا از جنس‌های *Aspergillus* و *Sclerotinia* گزارش شده و بیانگر آن است که اثر این اسانس به

جدول ۲- اثر قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها در غلظت 2000 mg. l^{-1} روی قارچ عامل بیماری

Table 2- Fungicidal or fungistatic effects of essential oils and fungicides at 2000 mg. l^{-1} concentration on *Curvularia tsudae*

<i>Curvularia tsudae</i>	اسانس Essential oil
FC	زنیان Ajwain
FC	علف لیمو Lemon grass
FC	آویشن Thyme
FS	کاکوتی Ziziphora
-	تیوفانات متیل Thiophanate-methyl
-	مانکوزب Mancozeb
FS	اکسی کلرور مس Copper Oxychloride
FC	رورال تی اس Revral-TS

FS:Fungistat, FC:Fungicide

نشان دادند. همچنین، قارچ‌کش‌های شیمیایی مورد بررسی موجب مهار کامل جوانه‌زنی اسپور شدند که بیانگر کارایی بالای آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است. به‌طور کلی، یافته‌های این تحقیق حاکی از پتانسیل قابل توجه برخی اسانس‌های گیاهی به‌عنوان گزینه‌هایی زیست‌سازگار و مکمل در مدیریت بیماری‌های قارچی گیاهان زینتی بوده و ضرورت انجام مطالعات تکمیلی به‌منظور ارزیابی کارایی عملی آن‌ها در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای را نشان می‌دهد.

منابع

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Academic Press.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2): 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، یک جدایه قارچی متعلق به جنس *Curvularia* از ریشه‌های سرو لاوسون جداسازی شد و جایگاه گونه‌ای آن با استفاده از ناحیه ITS rDNA مورد تأیید قرار گرفت. نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی نشان داد که اسانس‌های گیاهی از نوع اثر ضدقارچی تفاوت معنی‌داری دارند؛ به‌طوری‌که اسانس‌های زنیان، آویشن و علف لیمو بیشترین میزان مهار رشد رویشی و جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور را نشان داده و واجد خاصیت قارچ‌کشی بودند، در حالی که برخی اسانس‌ها مانند کاکوتی عمدتاً اثر قارچ‌ایستایی از خود

- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): 71–79.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564–582.
- Davari, M., and Ezazi, R. (2022). Mycelial inhibitory effects of antagonistic fungi, plant essential oils and propolis

against five phytopathogenic *Fusarium* species. *Archives of Microbiology* 204(8): 480.

Hadian, J., Fakhr, T. S., Ghorbanpour, M., Salehi, P., and Haji, E. B. (2006). A phytochemical study of *Cymbopogon parkeri* Stapf essential oil, and its biological activity against some phytopathogenic fungi. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 37: 425–443.

Irkin, R., and Korukluoglu, M. (2007). Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. *African Journal of Biotechnology* 6(4): 384–387.

Khalil, M., Serale, N., Diab, F., Baldini, F., Portincasa, P., Lupidi, G., and Vergani, L. (2022). Beneficial effects of carvacrol on in vitro models of metabolically-associated liver steatosis and endothelial dysfunction: A role for fatty acids in interfering with carvacrol binding to serum albumin. *Current Medicinal Chemistry* 29(30): 5113–5129.

Mazarei, Z., and Rafati, H. (2019). Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. *LWT* 100: 328–334.

Moslem, M. A., and El-Kholie, E. M. (2009). Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12(14): 1045.

Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P., and Dubey, N. K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, 89, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.018>

Pawar, V. C., and Thaker, V. S. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 49(4): 316–324. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01241.x>

Purkait, S., Bhattacharya, A., Bag, A., and Chattopadhyay, R. R. (2020). Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. *Archives of Microbiology* 202: 1439–1448.

Ranjbar, H., Farzaneh, H., Hadian, J., Mirjalili, M. H., and Sharifi, R. (2008). Antifungal effects of some plant essential oils on postharvest diseases in strawberry fruit. *Journal of Research and Reconstruction in Agriculture and Horticulture* 81: 54–60. (in Persian with English summary).

Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M. (2020). Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*, 25(21), 4877. <https://doi.org/10.3390/molecules25214877>

Tatsadjieu, N. L., Dongmo, P. J., Ngassoum, M. B., Etoa, F. X., and Mbofung, C. M. F. (2009). Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control* 20: 161–166.

Zhao, P., Cao, L., Wang, C., Zheng, L., Li, Y., Cao, C., and Huang, Q. (2022). Metabolic pathways reveal the effect of fungicide-loaded metal-organic frameworks on the growth of wheat seedlings. *Chemosphere* 307: 135702.

Bajpai, V. K., Sharma, A., and Baek, K. H. (2020). Antifungal efficacy of plant essential oils and their constituents against phytopathogenic fungi. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 1–15.

Bebber, D. P., and Gurr, S. J. (2015). Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 62–64.

Burgess, T. I., Scott, J. K., McDougall, K. L., Stukely, M. J., Crane, C., Dunstan, W. A., and Hardy, G. E. S. J. (2017). Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Global Change Biology*, 23(4), 1661–1674..

Hongsanan, S., Hyde, K. D., Phookamsak, R., Wanasinghe, D. N., McKenzie, E. H. C., Sarma, V. V., and Xie, N. (2020). Refined families of Dothideomycetes: Orders and families incertae sets in Dothideomycetidae. *Mycosphere: Journal of Fungal Biology*, 11. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2015). Essential oils and their antimicrobial mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–24.

Kumar, P., Dubey, R. C., and Maheshwari, D. K. (2020). Induced systemic resistance mediated by natural compounds. *Plant Growth Regulation*, 90, 1–15.

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., and Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29–92.

Velásquez, A. C., Castroverde, C. D. M., and He, S. Y. (2018). Plant–pathogen interactions under climate change. *Current Biology*, 28, R619–R634.

Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2015). A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa*, 212(3), 175–198. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.212.3.1>

Tan, Y. P., Crous, P. W., and Shivas, R. G. (2018). Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. *MycKeys*, 35, 1–25. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25665>

Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., and Crous, P. W. (2020). Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*, 19, 559–588. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01576-6>

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., and Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry*, 210, 402–414.

Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly pest management strategies: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187.

Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., and Daglia, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), 70.

Dubey, N. K., Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., and Prakash, B. (2010). Prospects of botanical pesticides in sustainable agriculture. *Current Science*, 98(4), 479–480.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., and De Feo, V. (2017). Effect of essential oils on pathogenic microorganisms. *Pharmaceuticals*, 10(4), 86.

Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Singh, P., & Dubey, N. K. (2015). Antifungal and antiaflatoxinigenic properties of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Food Control*, 55, 59–65.

Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., and Aubertot, J. N. (2018). Thirteen decades of

antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*, 38(3), 28.

Reedy, J. L., Filler, S. G., and Heitman, J. (2008). Elucidating the antifungal mechanism of action. *Trends in Microbiology*, 16, 276–283.