

ISSN: 3041-9638

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

Open Access

Research Article

In Vitro Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Curvularia tsudae* Isolated from Lawson 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-
22.**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. Ornamental coniferous plants are important components of urban green spaces, parks, and landscape systems because of their aesthetic value, ecological functions, and adaptability to diverse environmental conditions. Lawson cypress (*Chamaecyparis lawsoniana*) is widely cultivated because of its attractive growth habit and foliage characteristics. However, root decline and root rot can seriously affect plant health, longevity, and ornamental quality. Root-associated fungi, particularly dematiaceous fungi, may occur as saprophytes or endophytes but can become opportunistic pathogens under unfavorable environmental conditions. Species of *Curvularia* have increasingly been reported from the rhizosphere and root tissues of ornamental and woody plants and may be associated with reduced vigor, chlorosis, root deterioration, and progressive decline. Environmental stresses, including fluctuations in temperature and soil moisture, may further facilitate disease development. Although chemical fungicides are widely used to manage fungal diseases, their repeated application may contribute to fungicide resistance and environmental contamination. Therefore, plant-derived essential oils have attracted attention as potential environmentally friendly alternatives. This study aimed to isolate and identify the fungal species associated with root decline symptoms in *C. lawsoniana* and evaluate the in vitro antifungal activity of selected plant essential oils in comparison with commonly used chemical fungicides.

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 cultured on potato dextrose agar (PDA), and the dominant fungal isolate was purified through successive subculturing. Morphological identification was performed based on colony characteristics and microscopic features of conidiophores and conidia. Molecular identification was conducted by amplification and sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA using ITS5 and ITS4 primers. The obtained sequence was compared with reference sequences in GenBank using BLAST analysis. Phylogenetic relationships were inferred using the Neighbor-Joining method, and bootstrap analysis was performed to evaluate branch stability. 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 using disk diffusion, poisoned food, and spore germination assays at different concentrations. Five chemical fungicides, including mancozeb, thiophanate-methyl, copper oxychloride, iprodione + carbendazim (Rovral-TS), and Bordeaux mixture, were tested at 2000 mg L⁻¹. Experiments were arranged in a completely randomized factorial design with three replications. Data were analyzed using analysis of variance, and means were compared using Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

Results: Morphological and molecular analyses identified the fungal isolate as *Curvularia tsudae*, and its ITS sequence was deposited in GenBank under accession number PX096193. Phylogenetic analysis placed the isolate within the *C. tsudae* species complex, consistent with the limited discriminatory power of ITS sequences for resolving closely related *Curvularia* species. Significant differences were observed among essential oils in their antifungal activity. Thyme essential oil showed the highest inhibitory effect in the disk diffusion assay. In the poisoned food assay, thyme, ajwain, and lemongrass oils completely inhibited mycelial growth at higher concentrations, whereas the other oils showed moderate to low activity. Lemongrass and ajwain were the most effective oils in suppressing spore germination, while thyme showed a moderate inhibitory effect. In contrast, all tested chemical fungicides completely inhibited spore germination. Fungicidal and fungistatic assessments showed that thyme, ajwain, and lemongrass oils exhibited fungicidal activity, with no fungal regrowth after transfer to fresh medium, whereas kakuti showed a fungistatic effect.

Conclusion: The results demonstrate the association of *C. tsudae* with root decline symptoms in Lawson cypress and reveal considerable in vitro antifungal potential among several plant essential oils. Thyme, ajwain, and lemongrass showed particularly strong inhibitory and fungicidal effects. Although chemical fungicides exhibited high efficacy under laboratory conditions, selected essential oils may serve as environmentally friendly alternatives or complementary components of integrated disease management. Further greenhouse and field studies are required to evaluate their efficacy, formulation stability, persistence, phytotoxicity, and optimal application rates.



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

آزمایشگاهی

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

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

^۲ گروه گیاه‌پزشکی، 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

نویسنده مسئول:

هادی رهاننده

ایمیل:

rahanandeh@iau.ac.ir

واژه‌های کلیدی:

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

نحوه استناد:

مشیدی، م.، رهاننده، ه.، شریفی اشکلک، ا. (۱۴۰۵). اثر ضدقارچی متابولیت‌های گیاهی بر *Curvularia tsudae* جداسازی شده از ریشه لاوسون در شرایط آزمایشگاهی. مجله پژوهش در متابولیت‌های گیاهی، دوره ۴، شماره ۲، صفحات: ۹-۲۲.

Doi:10.22034/jrpsm.2026.570645.1105

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 برای 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، اکسی‌کلور مس، 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 مهار 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 مهاری 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 مانعت از جوانه‌زنی اسپور را ایجاد کردند، در حالی که اسانس آویشن اثر مهاری 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 عمدتاً اثر 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.

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 (Nazarro 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 پژوهش از اسانس ۱۲ گیاه دارویی شامل اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus* Labill)، اسانس برگ، آویشن (*Thymus vulgaris* L)، اسانس سرشاخه‌های گلدار، کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) اسانس سرشاخه‌های گلدار، نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L)، اسانس برگ و سرشاخه‌های هوایی، رزماری (*Salvia rosmarinus* Spenn)، اسانس برگ و سرشاخه‌های گلدار، رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill)، اسانس میوه، مورد (*Myrtus communis* L)، اسانس برگ، باریجه (*Ferula gummosa* Boiss)، اسانس صمغ، گلپر (*Heracleum persicum* Desf. ex *angustifolia* Mill)، اسانس سرشاخه‌های گلدار، علف لیمو (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf)، اسانس برگ و زنیان (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague)، اسانس میوه استفاده شد. این اندام‌ها به‌دلیل دارا بودن بیشترین غلظت ترکیبات

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* (Parl (A. Murray)) 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، اندام‌های 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 برهم 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.

Macrogen (Korea) به روش توالی‌یابی Sanger تعیین توالی نوکلئوتیدی شدند. توالی‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit v7.2 و Chromas v2.6 ویرایش و سپس با استفاده از الگوریتم BLASTn با توالی‌های موجود در پایگاه داده GenBank مقایسه شدند.

برای بررسی روابط فیلوژنتیکی، درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ITS (~536 bp) با استفاده از روش Neighbor-Joining (NJ) در نرم‌افزار MEGA 11 ترسیم شد. هم‌ترازی توالی‌ها با الگوریتم ClustalW انجام و فواصل تکاملی بر اساس مدل p-distance محاسبه گردید. پایداری شاخه‌ها با آزمون بوت‌استرپ (۱۰۰۰ تکرار) ارزیابی و تنها مقادیر بالاتر از ۳۰٪ نمایش داده شدند. به‌منظور ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنتیکی، گونه *Bipolaris maydis* به‌عنوان outgroup انتخاب شد. در صورت نیاز، استفاده از نشانگرهای مولکولی مکمل مانند TEF1- α و β -tubulin در مطالعات آینده می‌تواند دقت تفکیک گونه‌های نزدیک را افزایش دهد.

تهیه اسانس گیاهان: گیاهان مورد مطالعه شامل ۱۲ گونه اسانس‌دار بودند که بخشی از آن‌ها (مانند مورد، گلپر و اکالیپتوس) از طبیعت استان گیلان جمع‌آوری شدند و سایر گونه‌ها (از جمله آویشن، زنیان، مرزه و اسطوخودوس) از مزارع کشت‌شده و فروشگاه‌های معتبر در شهر رشت تهیه گردیدند. شناسایی علمی تمامی گونه‌ها در دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت تأیید شد و نمونه‌های شاهد هر گیاه به‌صورت خشک‌شده در آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشگاه نگهداری شدند. برای تهیه و استخراج اسانس-های مورد مطالعه از اندام هوایی به‌شرح زیر از دستگاه کلونجر استفاده گردید. بدین صورت که ۵۰ گرم از بافت‌های خشک شده هر گیاه کاملاً خرد و به‌صورت جداگانه در بالن یک لیتری کلونجر به همراه مقداری آب ریخته شد و به‌مدت سه ساعت اسانس آن‌ها به روش تقطیر جداسازی گردید. از سولفات سدیم برای آب‌گیری از اسانس استفاده شد و اسانس‌های استخراج شده تا زمان استفاده، در چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Ranjbar et al., 2008).

قارچ‌کش‌های مورد استفاده: به منظور مقایسه فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی از قارچ‌کش‌های شیمیایی مانکوزب (Mancozeb 80% WP)، تیوفانات متیل (Thiophanate-methyl 70% WP)، اکسی‌کروور مس (Copper oxychloride 35% WP)، ایپریدینون+کاربندازیم (Iprodione + Carbendazim 52.5% WP)، "Rovral"، بردو (Bordeaux mixture 20% SC) در غلظت ۱ mg. l⁻¹ ماده موثره به‌روش اختلاط با محیط کشت از شرکت آریا شیمی استفاده شد.

ارزیابی بازدارندگی از رشد قارچ در روش دیسک: به‌منظور

فرار و متابولیت‌های ثانویه، منابع اصلی استخراج اسانس در هر یک از این گونه‌ها محسوب می‌شوند.

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 (N 37.07°, E 50.00°) در استان گیلان جمع‌آوری شد. قطعاتی به طول ۲-۳ سانتی‌متر از ناحیه حفاصل بافت‌های سالم و دارای علائم انتخاب و پس از شست‌وشو با آب جاری، به‌مدت ۶۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی سطحی شدند. سپس نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شسته و روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) کشت داده شدند.

پلیت‌ها در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس انکوبه شدند و کلنی‌های رشدیافته به‌منظور دستیابی به کشت خالص، چندین بار زیرکشت داده شدند. جدایه‌های خالص در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. شناسایی اولیه جدایه قارچی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلنی شامل رنگ، بافت میسلیم و مشخصات کنیدی‌ها انجام شد.

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی جدایه قارچی با تکثیر ناحیه داخلی فاصله‌گذار رونویسی‌شده (ITS rDNA) با استفاده از آغازگرهای عمومی (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3' و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') انجام شد (Zhou et al., 2022). استخراج DNA ژنومی از میسلیم تازه رشدیافته قارچ با استفاده از کیت تجاری Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده 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 ۱۲/۵ μL مستر میکس ۲× (Amplicon, Denmark)، ۱ μL از هر آغازگر (10 μM)، DNA ۲ μL الگو (تقریباً ۱۵۰ ng μL⁻¹) و آب دیونیزه استریل تا حجم نهایی انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، به‌دنبال آن ۳۵ چرخه دناتوراسیون در ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه و امتداد در ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه، و در نهایت یک مرحله امتداد نهایی در ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه بود. واکنش فاقد الگو به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

محصولات PCR پس از بررسی روی ژل آگارز ۱٪، با استفاده از کیت QIAquick PCR Purification Kit خالص‌سازی و توسط شرکت

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 به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. همچنین برای بررسی قارچ‌کشی، قارچ‌کش‌ها (MFC) ترکیبات مختلف مورد بررسی، غلظت ۲۰۰۰ پی پی ام از MIC را که 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 سفت شدن محیط کشت PDA حاوی اسانس در غلظت‌های تعیین شده، چند قطره از سوسپانسیون (با غلظت ۱۰^۶) 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 بازداری از جوانه زنی اسپور مشابه درصد بازداری 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 تاندش آن‌ها از قطر اسپور بیشتر بود، به عنوان جوانه زده شمارش شدند (Tatsadjieu *et al.*, 2009). جهت رعایت اصول آزمایش و کاهش خطا 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.

بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های گیاهان مورد آزمایش، ابتدا محیط کشت PDA پس از استریل کردن تا دمای حدود ۴۵ سلسیوس سرد شد. سپس درون پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری 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 هفته‌ای 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) پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباتور نگه‌داری شدند. سپس دیسک‌های کاغذی شش میلی‌متری پادتن طب استریل شده نیز در 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، ۱۰۰۰ و 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 به‌عنوان 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 به‌تشتک‌های پتری یکبار مصرف سترون منتقل شدند. پس از آن، از حاشیه 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 به‌مدت 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 به‌جای 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.

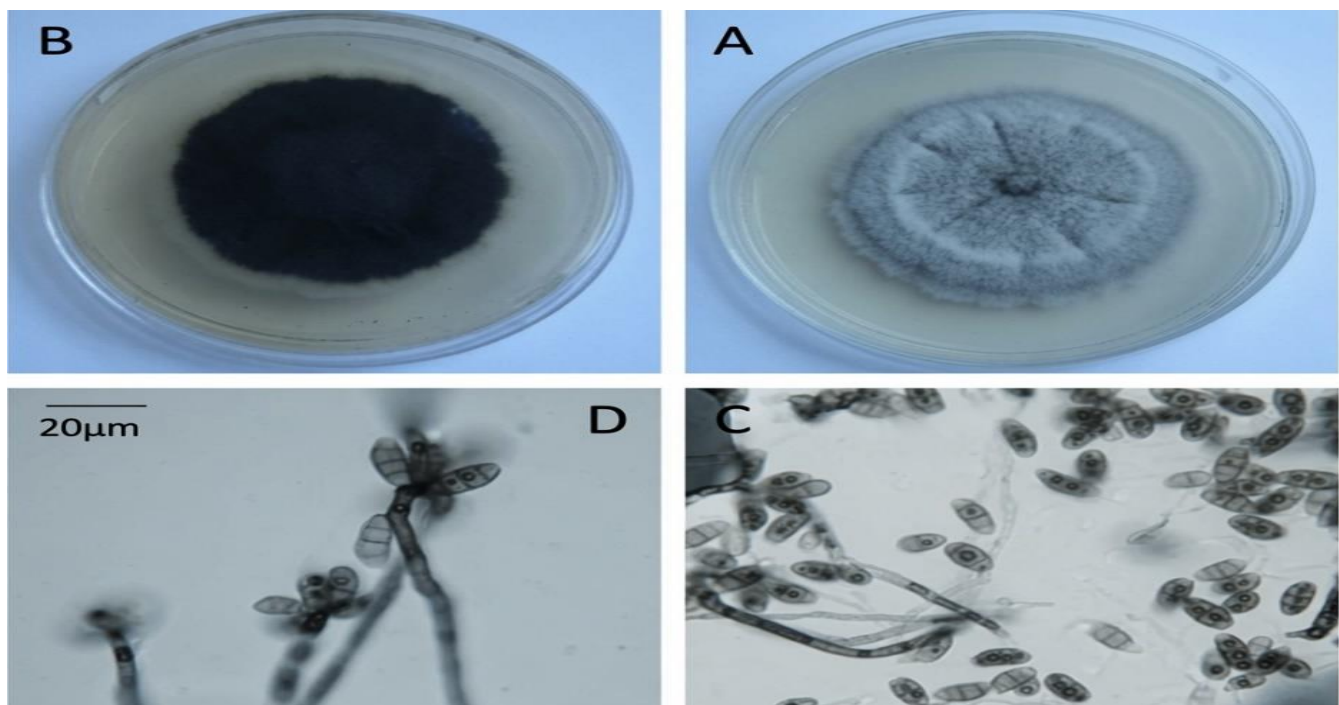
نتایج و بحث

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 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 تیره‌رنگس (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 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 گزارش شده برای گونه‌های نزدیک به *Curvularia tsudae* (Y. Nisik.) Boedijn قرار داشت. مجموعه این ویژگی‌های ریخت‌شناسی، تعلق جدایه به جنس *Curvularia* را تأیید می‌کرد (شکل ۱).



شکل ۱- ویژگی‌های مورفولوژیکی *Curvularia tsudae*. مورفولوژی کلونی روی آگار سیب‌زمینی دکستروز (PDA) پس از ۷-۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (نمای رو و پشت). C-D. کنیدیوفورها، کنیدی‌ها و ساختارهای میکروسکوپی (مقیاس = ۲۰ میکرومتر)

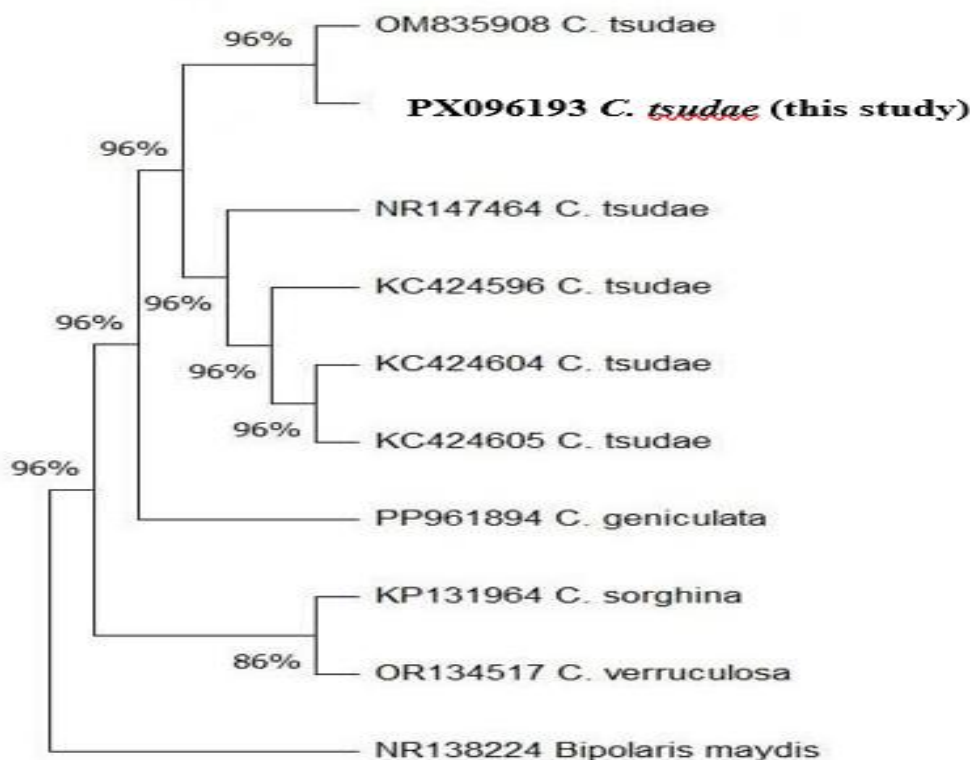
Figure 1- Morphological characteristics of *Curvularia tsudae*. A-B. Colony morphology on potato dextrose agar (PDA) after 7-10 days at 25 °C (obverse and reverse views). C-D. Conidiophores, conidia, and microscopic structures (scale bar = 20 μm).

تحلیل فیلوژنتیکی: تحلیل توالی ناحیه ITS rDNA نشان داد که جدایه PX096193 جدا شده از ریشه سرو لاوسون در کلاس جنس *Curvularia* قرار گرفت و درخت فیلوژنتیکی قرابت آن را با ایزوله‌های مرجع گونه‌ای نزدیک به *Curvularia tsudae* نشان داد. این الگوی خوشه‌بندی با گزارش‌های پیشین در مورد ساختار فیلوژنتیکی جنس *Curvularia* مطابقت دارد؛ به گونه‌ای که در مطالعات مختلف نشان داده شده است گونه‌های نزدیک این جنس اغلب در تحلیل‌های مبتنی بر ITS به صورت هم‌پوشان یا با تفکیک محدود ظاهر می‌شوند (Manamgoda et al., 2015; Tan et al., 2015).

شناسایی مولکولی بر اساس ناحیه ITS: تکثیر ناحیه ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS5 و ITS4 منجر به تولید یک قطعه DNA 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 نشان داد که جدایه مورد مطالعه بیشترین درصد شباهت را با توالی‌های ثبت‌شده متعلق به *Curvularia tsudae* دارد. بر این اساس، جدایه مورد بررسی با شماره دسترسی PX096193 به عنوان *C. tsudae* شناسایی شد.

نتایج عملکردی مورد استفاده قرار گرفته است (Marin-Felix *et al.*, 2020). بر این اساس، جایگاه فیلوژنتیکی به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر، مبنای قابل‌اتکایی 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 ۲).

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



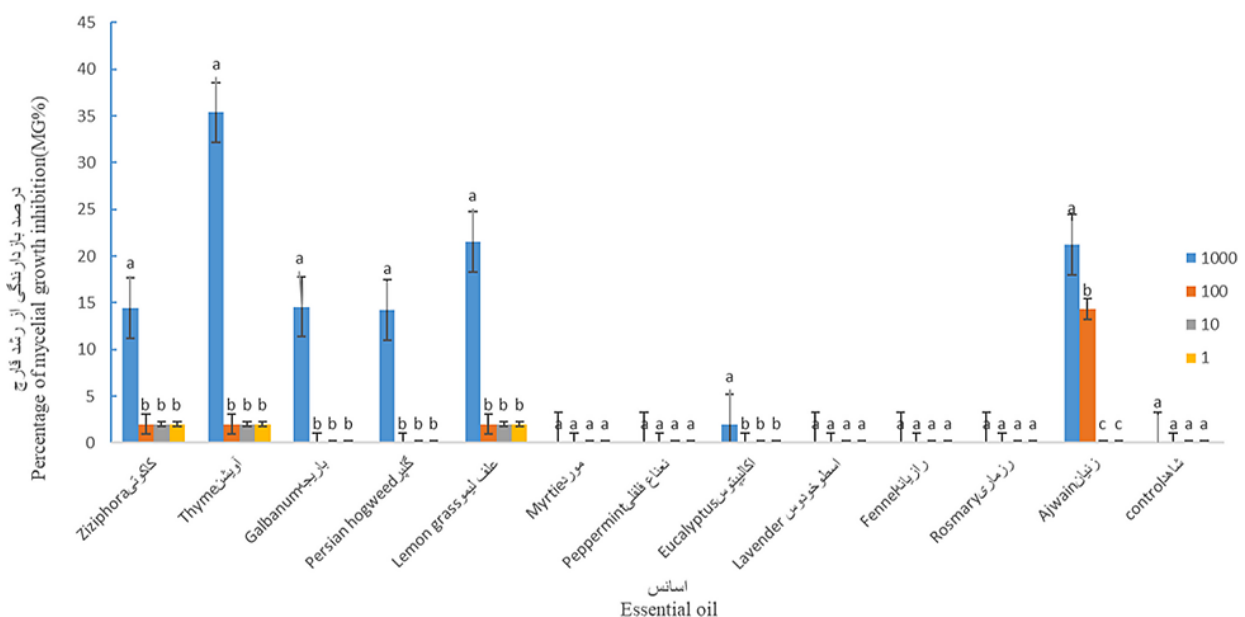
شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه ITS rDNA برای ایزوله قارچی به‌دست‌آمده از ریشه سرو لاوسون (*Chamaecyparis lawsoniana*) و گونه‌های منتخب جنس *Curvularia*. درخت با استفاده از روش Neighbor-Joining و بر اساس فاصله ژنتیکی محاسبه‌شده به روش identity رسم شد. اعتبار شاخه‌ها با آزمون Bootstrap در ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد و مقادیر Bootstrap (بیش از ۵۰٪) در محل گره‌ها نمایش داده شده‌اند. 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* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker (NR_138244.1) به‌عنوان outgroup برای ریشه‌دار کردن درخت استفاده شد.

Figure 2. Phylogenetic tree based on the ITS rDNA region showing the fungal isolate obtained from the roots of *Chamaecyparis lawsoniana* and selected species of the genus *Curvularia*. The tree was constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method based on genetic distances calculated with the Identity model. Branch support was assessed by bootstrap analysis with 1,000 replicates, and bootstrap values greater than 50% are shown at the corresponding nodes. The isolate examined in the present study (PX096193) clustered within the *Curvularia tsudae* species complex. Due to the limited discriminatory power of the ITS region within the genus *Curvularia*, precise species-level identification was not possible; therefore, the isolate was identified at the genus level and its phylogenetic relationship was inferred accordingly. *Bipolaris maydis* (NR_138224.1) was used as the outgroup to root the phylogenetic tree.

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

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

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 به دلیل وجود ترکیباتی نظیر سیترال می‌تواند رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی را به طور 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 به عنوان گزینه‌های طبیعی و زیست‌سازگار در مهار قارچ‌های بیماری‌زا، به ویژه در شرایط آزمایشگاهی، مورد توجه قرار گیرند.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ *Curvularia tsudae* در روش انتشار از دیسک. میله‌های خطا نشان‌دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد (SE) حاصل از سه تکرار هستند. ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Figure 3. Antifungal effect of plant essential oils at various concentrations against *Curvularia tsudae* by the disk diffusion method. Error bars represent the mean $\pm$ standard error (SE) of three replicates. Columns sharing at least one common letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the 5% probability level ($P \leq 0.05$).

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. به طور کلی، در تمامی اسانس‌ها افزایش غلظت منجر به کاهش معنی‌دار رشد ریشه‌ای قارچ شد که بیانگر وابستگی پاسخ قارچ به دوز اسانس است (شکل ۴).

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 به دست آمده با گزارش‌های پیشین در زمینه اثر

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٪، ۴/۴۳٪ و ۱۴/۲۳٪ اثر مهاری متوسطی داشتند. سایر اسانس‌ها از جمله مورد، نعناع فلفلی، اسطوخودوس، رازیانه و رزماری اثر بازدارندگی ناچیزی داشته و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان ندادند (شکل ۳).

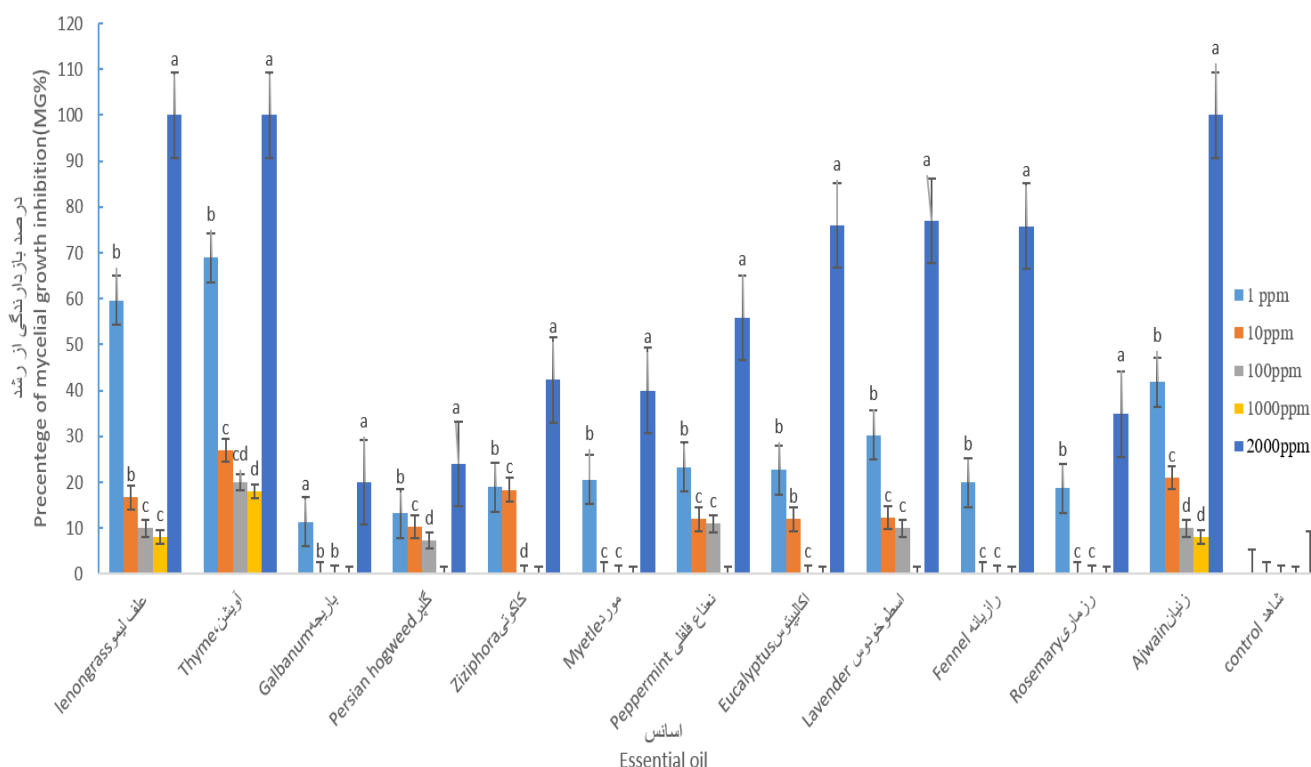
تفاوت مشاهده شده در کارایی ضدقارچی اسانس‌ها را می‌توان به ماهیت و غلظت ترکیبات فعال زیستی آن‌ها نسبت داد. اسانس آویشن که بالاترین درصد مهار را نشان داد، به طور گسترده‌ای به دلیل حضور ترکیبات فنولی غالب مانند تیمول و کارواکرول به عنوان یکی از قوی‌ترین اسانس‌های ضدقارچی شناخته می‌شود که با

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

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 فیزیکوشیمیایی 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 ضدقارچی اسانس‌های گیاهی ارائه دهد و برای بررسی کارایی زیستی این ترکیبات روش مناسب‌تری محسوب شود.

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 مثال، اسانس‌های آویشن و زنبان در روش اختلاط با محیط کشت موجب مهار کامل یا قابل‌توجه رشد *Fusarium solani* و همچنین گزارش شده است که برخی اسانس‌های گیاهی می‌توانند

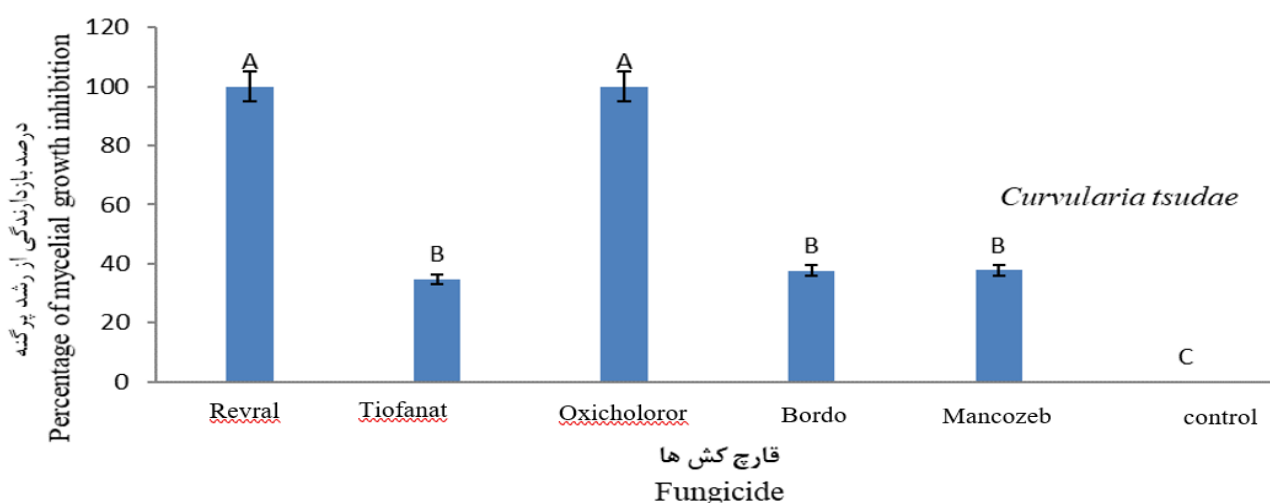


شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ *Curvularia tsudae* در روش اختلاط با محیط کشت. میله‌های خطا نشان‌دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد (SE) سه تکرار هستند. ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Figure 4. Antifungal effect of plant essential oils at different concentrations against *Curvularia tsudae* by the culture medium incorporation technique. Error bars represent the mean $\pm$ standard error (SE) of three replicates. Columns sharing at least one common letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the 5% probability level ($P \leq 0.05$)

مهار کردند. سه قارچ‌کش دیگر در یک گروه آماری و بالاتر از شاهد قرار گرفتند (شکل ۵).

براساس نتایج آماری همه قارچ‌کش‌ها در کاهش رشد ریشه ای قارچ *C. tsudae* موثر بودند. بیشترین تأثیر را دو قارچ‌کش اکسی کلرور مس و رورال تی اس داشتند که به‌طور کامل رشد ریشه‌ای قارچ را



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

Figure 5. 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).

به‌طور 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، توانایی 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 لیمون 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 غالب 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.

تأثیر 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

تیوفانات‌متیل در مرحله جوانه‌زنی اسپور، کارایی بالاتری نسبت به مراحل بعدی رشد ریشه‌ای نشان می‌دهند، زیرا این مرحله فاقد ساختارهای دفاعی کامل بوده و حساسیت بیشتری به ترکیبات شیمیایی دارد (Brent and Hollomon, 2007). با وجود کارایی بالای قارچ‌کش‌ها، مقایسه این نتایج با اثر اسانس‌های گیاهی مؤثر در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که برخی اسانس‌ها می‌توانند بدون ایجاد مهار کامل، کاهش معنی‌داری در جوانه‌زنی اسپور ایجاد کنند. این موضوع بیانگر پتانسیل اسانس‌های گیاهی به‌عنوان گزینه‌های مکمل یا جایگزین کم‌خطرتر در چارچوب راهبردهای مدیریت تلفیقی بیماری‌ها و کاهش وابستگی به قارچ‌کش‌های شیمیایی است (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین تاثیر غلظت 2000 mg. l^{-1} اسانس‌های گیاهان و قارچ‌کش‌های مورد مطالعه در میزان بازدارندگی از جوانه‌زنی 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*

درصد بازدارندگی در غلظت 2000 mg. l^{-1}	اسانس	
Inhibition percentage at 2000 mg. l^{-1}	Essential oil	
26.67 ^b	Ajwain	زنیان
17.34 ^c	Galbanum	باریجه
5.34 ^{efg}	Persian Hogweed	گلپر
13.34 ^c	Thyme	آویشن
26.67 ^b	Lemongrass	علف لیمو
1.34 ^g	Myrtle	مورد
0 ^g	Peppermint	نعناع فلفلی
16 ^c	Eucalyptus	اکالیپتوس
4 ^{fg}	Lavender	اسطوخودوس
9.34 ^{def}	Fennel	رازیانه
2.67 ^g	Rosemary	رزماری
10.67 ^{de}	Ziziphora	کاکوتی
0 ^g	Control	شاهد
100 ^a	Reval-TS	رورال
100 ^a	Thiophanate-methyl	متیل تیوفانات
100 ^a	Mancozeb	مانکوزب
100 ^a	Copper Oxychloride	اکسی کلرور
100 ^a	Bordeaux mixture	بردو

اعداد متن، میانگین درصد بازدارندگی سه تکرار هستند. بر اساس روش چند دامنه‌ای دانکن (Duncan)، میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری 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.

بازکشت کشت از تیمارهایی که در آن‌ها رشد قارچ مشاهده نشد، نشان داد که نوع اثر اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها بر *C. tsudae* متفاوت

ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی اسانس‌های گیاهی و قارچ‌کش‌های شیمیایی بر *Curvularia tsudae*: نتایج آزمون

جنس های *Fusarium* و *Alternaria Bipolaris* 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 قارچ ایستایی نشان داد. این الگو پیش تر نیز در برخی قارچ های بیماری زا از جنس های *Aspergillus* و *Sclerotinia* گزارش شده و بیانگر آن است که اثر این اسانس به شرایط آزمایش، گونه قارچی و غلظت وابسته است (Mazarei & Rafati, 2019). اکسی کلور مس نیز که به طور گسترده در مدیریت بیماری های گیاهان زینتی مورد استفاده قرار می گیرد، عمدتاً با مهار فعالیت آنزیمی و جلوگیری از رشد قارچ عمل می کند و در بسیاری از موارد خاصیت قارچ ایستایی دارد (Lamichhane et al., 2018). در این آزمایش، به دلیل تغییر رنگ شدید محیط کشت در تیمار مانکوزب و تیوفانات متیل و عدم امکان تشخیص دقیق رشد یا جوانه زنی اسپور، ارزیابی ماهیت قارچ کشی یا قارچ ایستایی این قارچ کش ها امکان پذیر نبود. در مجموع، نتایج این بخش نشان می دهد که اسانس های گیاهی منتخب، به ویژه زنیان، علف لیمو و آویشن، علاوه بر مهار رشد، قادر به ایجاد اثر قارچ کشی واقعی علیه *C. tsudae* هستند و می توانند به عنوان گزینه های زیست سازگار در مدیریت بیماری های قارچی گیاهان زینتی مورد توجه قرار گیرند.

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 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 کلور 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 آن ها است. تفاوت در ماهیت قارچ کشی یا قارچ ایستایی اسانس ها و قارچ کش ها عمدتاً به ترکیبات شیمیایی غالب، غلظت مواد مؤثره و حساسیت جدایه قارچی نسبت داده می شود (Reedy et al., 2008; Bakkali et al., 2008).

بررسی های شیمیایی پیشین نشان داده اند که اسانس های زنیان و آویشن، منجر به مرگ سلول قارچی می شوند و به همین دلیل اغلب اثر قارچ کشی ایجاد می کنند (Purkait et al., 2020; Sharifi-Rad et al., 2017). مشاهده اثر قارچ کشی این اسانس ها بر *C. tsudae* با گزارش های پیشین درباره اثر آن ها بر قارچ های بیماری زا دیگر از

جدول ۲- اثر قارچ کشی یا قارچ ایستایی اسانس ها و قارچ کش ها در غلظت 2000 mg. l^{-1} روی قارچ عامل بیماریTable 2- Fungicidal or fungistatic effects of essential oils and fungicides at 2000 mg. l^{-1} concentration on *Curvularia tsudae*

Curvularia tsudae	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 کلور مس Copper Oxychloride
FC	Revral-TS تی اس رورال

FS:Fungistat, FC:Fungicide

حالی که برخی اسانس ها مانند کاکوتی عمدتاً اثر قارچ ایستایی از خود نشان دادند. همچنین، قارچ کش های شیمیایی مورد بررسی موجب مهار کامل جوانه زنی اسپور شدند که بیانگر کارایی بالای آن ها در شرایط آزمایشگاهی است. به طور کلی، یافته های این تحقیق حاکی از پتانسیل قابل توجه برخی اسانس های گیاهی به عنوان گزینه هایی زیست سازگار و مکمل در مدیریت بیماری های قارچی گیاهان زینتی بوده و ضرورت انجام مطالعات تکمیلی به منظور ارزیابی کارایی عملی آن ها در شرایط گلخانه ای و مزرعه ای را نشان می دهد.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش، یک جدایه قارچی متعلق به جنس *Curvularia* از ریشه های سرو لاوسون جداسازی شد و جایگاه گونه ای آن با استفاده از ناحیه ITS rDNA مورد تأیید قرار گرفت. نتایج آزمون های آزمایشگاهی نشان داد که اسانس های گیاهی از نظر شدت و نوع اثر ضدقارچی تفاوت معنی داری دارند؛ به طوری که اسانس های زنیان، آویشن و علف لیمو بیشترین میزان مهار رشد رویشی و جلوگیری از جوانه زنی اسپور را نشان داده و واجد خاصیت قارچ کشی بودند، در

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>
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, 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. *Mycoskeys*, 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 antiaflatoxigenic 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.