علوم و تحقیقات بذر ایران
سال هشتم/ شماره چهارم/ ۱۴۰۰ (۳۴۵ - ۳۲۵)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2021.5283

بررسی ترکیبات و اثرات ضدقارچی اسانس‌های توده‌های بذری بومی زیره سبز روی قارچ‌های بذرزاد

نیما خالدی*

تاریخ دریافت: ۹۹/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۶

چکیده

بذر یکی از مهم‌ترین نهاده‌های تولیدات کشاورزی است که کیفیت و سلامت آن می‌تواند تحت تاثیر قارچ‌های بذرزاد قرار بگیرد. هدف از این مطالعه شناسایی قارچ‌های بذرزاد و تاثیر آن‌ها روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه توده‌های بذری بومی زیره سبز و همچنین ارزیابی اثرات اسانس‌ها و ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های این توده‌های بذری روی قارچ‌های بذرزاد جداسازی شده می‌باشد. به‌منظور شناسایی قارچ‌های بذرزاد توده‌های بذری زیره سبز از بذور تولیدی مزارع مشهد، فریمان، کاشمر و قوچان در استان خراسان رضوی بر اساس ضوابط انجمن بین‌المللی آزمون بذر نمونه‌برداری شد. جدایه‌های قارچی پس از جداسازی و خالص‌سازی، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شدند. همچنین پتانسیل بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها روی گیاهچه بررسی شد. در مجموع ۱۲ جدایه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی که متعلق به گونه‌های *Fusarium oxysporum* و *F. solani* شناسایی شدند. نتایج آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که در میان توده‌های بذری مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه وجود دارد. آلودگی بذر به قارچ‌های بذرزاد به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب کاهش کیفیت و سلامت بذور می‌شوند. نتایج نشان داد که بیش‌ترین شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی در توده بذری فریمان و پس از آن به‌ترتیب در توده‌های بذری کاشمر، قوچان و مشهد مشاهده شد. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که حدود ۴۱/۷ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و ۵۸/۳ درصد جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. همچنین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های مختلف گونه‌های *Fusarium* متفاوت بود. در ادامه این پژوهش ضمن اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با آب به‌کمک دستگاه کلونجر، ترکیبات تشکیل‌دهنده این اسانس‌ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی شناسایی شدند. ترکیبات اصلی شناسایی‌شده اسانس شامل بتا-پینن، پی-سیمن، گاما-ترپینن، ترپینن-۴-ال و کومین‌آلدهید بودند. نتایج نشان داد که ترکیبات آلفا-پینن، سابینن، بتا-پینن، میرسن، گاما-ترپینن، بتا-فارنسن و کاروتول دارای اثرات ضد قارچی علیه جدایه‌های *F. oxysporum* بودند. اثرات هم‌افزایی ترکیبات اصلی بازدارنده اسانس‌ها نشان داد که ترکیب ترپینن-۴-ال با بتا-پینن موجب فعالیت سینرژیستی و ترکیب ترپینن-۴-ال با گاما-ترپینن و همچنین ترکیب بتا-پینن و گاما-ترپینن موجب فعالیت افزایشی علیه جدایه‌های *F. oxysporum* شدند. این اولین گزارش در مورد تاثیر ترکیبات اسانس‌های توده‌های بذری بومی زیره سبز روی قارچ‌های بذرزاد جداسازی از همان بذور می‌باشد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که مقدار و حتی نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز متفاوت است و می‌تواند روی فراوانی قارچ‌های بذرزاد و میزان بیماری‌زایی آن‌ها تاثیر بگذارد.

واژه‌های کلیدی: اثرات هم‌افزایی، ترپینن-۴-ال، بیماری‌زایی، بذرزاد، زیره سبز، فوزاریوم

۱- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
*نویسنده مسئول: n_khaledi@areeo.ac.ir

مقدمه

گیاه زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* L. از خانواده چتریان (Apiaceae) است که به‌دلیل خواص دارویی، غذایی و آرایشی دارای ارزش اقتصادی زیادی می‌باشد (Sowbhagya *et al*., 2008). زیره سبز دومین گیاه دارویی اقتصادی و صادراتی ایران بوده و بیش‌تر در مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌ویژه استان‌های خراسان رضوی، سمنان، یزد، آذربایجان شرقی، اصفهان، سیستان و بلوچستان، کرمان و مرکزی به‌صورت دیم و آبی کشت می‌شود (Haghirsadat *et al*., 2011; Hasheminia *et al*., 2010). افزایش جمعیت جهان و نیاز روزافزون به محصولات کشاورزی به‌همراه محدودیت اراضی مستعد و قابل کشت، محققین بخش کشاورزی را با چالش‌های بزرگی روبه‌رو ساخته است. لذا، بخش کشاورزی همواره در جستجوی راه‌هایی برای برطرف‌کردن این مشکل بوده است. به‌طورکلی، میزان تولید محصول کشاورزی بستگی به سطح زیر کشت و مقدار عملکرد محصول در واحد سطح دارد. بر این اساس، در شرایطی که عملاً توسعه اراضی کشاورزی مقدور نیست، بیش‌تر توجه‌ها به افزایش عملکرد در واحد سطح معطوف شده است. بالابردن عملکرد محصول تابع عوامل خاصی است که مهم‌تر از همه، انتخاب و کشت بذر پر محصول می‌باشد که باید در کنار عوامل دیگر از جمله مدیریت بیماری‌ها در نظر گرفته شود. بذر به‌عنوان یکی از مهم‌ترین نهاده‌ها در کشاورزی پایدار نتیجه پژوهش‌های به‌نژادی و به‌زراعی است که دارای نقش غیرقابل انکاری در انتقال صفات ژنتیکی و دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد کمی و کیفی ژنوتیپ گیاهی می‌باشد. کیفیت بذر شامل خلوص گونه و رقم، اندازه بذر، خلوص فیزیکی، جوانه زنی، قدرت بذر، محتوی رطوبتی بذر و سلامت بذر است (Hampton *et al*., 2013; Hampton, 2002). زیره سبز در تمامی مراحل رشد به عوامل بیماری‌زای قارچی بسیار حساس است و تحت تاثیر آن‌ها قرار می‌گیرد. به‌ویژه در طی دوره رشد و تکامل دانه، عوامل بیماری‌زای زیادی ممکن است به گیاه حمله کرده و به نوعی موجب کاهش کمیت و کیفیت آن شوند. اطلاعات اندکی در مورد بیماری‌ها در مناطق مهم کشت در کشور و همچنین وضعیت آن‌ها در سیستم‌های تولید بذر وجود دارد. این موضوع از آن جهت حائز اهمیت است که تا کنون هیچگونه آماری نه تنها در ایران بلکه در جهان از نظر میزان کاهش تولید بذر در اثر بیماری‌های مختلف به‌خصوص بیماری‌های بذرزاد گزارش نشده است. سفیدک پودری، سوختگی، پوسیدگی ریشه و بوته‌میری از مهم‌ترین بیماری‌های زیره سبز که تولید این محصول را به‌طور جدی تحت تاثیر قرار می‌دهند (Divakara Sastry and Anandaraj, 2013; Kishor and Jain, 1999).

قارچ *Fusarium* یکی از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی با دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد که ضمن کاهش کمیت و کیفیت عملکرد محصول موجب خسارات اقتصادی زیادی روی گیاهان زراعی و باغی و دارویی می‌شود و علایمی مختلفی از جمله انسداد آوندها، پوسیدگی و پژمردگی ریشه، لکه‌برگی، پوسیدگی و شانکر ساقه روی گیاهان ایجاد می‌نماید (Steinkellner *et al*., 2008). بیماری پژمردگی، پوسیدگی ریشه و بوته‌میری زیره سبز با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زیره سبز است که در تمامی مراحل رشد، گیاه را تحت تاثیر قرار داده و تهدید جدی در تولید این محصول در ایران و جهان می‌باشد (Özer and Bayraktar, 2015; Ghorbani *et al*., 2010; Fasihiani, 2006). این بیماری در ایران از سبزوار، کاشمر، نیشابور، تربت حیدریه، تربت جام، گناباد و طبس گزارش شده و خسارت ناشی از آن در برخی از مزارع زیره سبز تا بیش از ۸۰ درصد عملکرد محصول گزارش‌شده است (Divakara Sastry and Anandaraj, 2013; Ghorbani *et al*., 2010; Nooras Mofrad *et al*., 2005; Lodha *et al*., 1986). تاکنون قارچ‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* از استان‌های خراسان رضوی و فارس (Fassihiani, 2006; Alavi, 1969; Gerlach and Ershad, 1970) و *F. solani* از خراسان رضوی (Nooras Mofrad *et al*., 2005) روی گیاه زیره سبز گزارش شده است. قارچ‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini*، *F. solani*، *F. acuminatum*، *F. avenaceum*، *F. equiseti*، *F. sambucinum*، *Macrophomina phaseolina*، *Alternaria burnsii*، *A. alternata*، *A. infectoria*، *Embellisia* sp. و *Rhizoctonia solani* به‌عنوان قارچ‌های بذرزاد و همراه بذر زیره سبز در ترکیه شناسایی و گزارش شده است (Özer and Bayraktar, 2015). قارچ‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*،

Erysiphe polygoni، *A. cucumerina*، *Alternaria burnsii* و *Pythium aphanidermatum* به‌عنوان مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا از روی گیاه زیره سبز در هندوستان شناسایی و گزارش شده است (Didwania, 2019; Khare *et al*., 2014).

تاکنون روش‌های مختلفی جهت کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی زیره سبز استفاده شده است، اما مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریومی زیره سبز به‌دلیل محدودبودن ژن‌های مقاومت در برابر پژمردگی در ژرم‌پلاسم موجود در سراسر جهان دشوار است (Lodha and Mawar, 2014). بیش‌تر محققین عقیده دارند که بهترین راه مقابله با این بیماری، استفاده تلفیق روش‌های زراعی، بیولوژیک و شیمیایی است که شامل استفاده از بذور سالم، تنظیم تاریخ کاشت، تناوب زراعی، ضدعفونی بذر با قارچکش‌های شیمیایی و عوامل بیولوژیک می‌باشد. تنوع بیماری‌زایی و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ و عوامل غیر زنده مانند شرایط آب و هوایی از جمله عوامل مختلفی هستند که روی کارآیی روش‌های مدیریتی تأثیر می‌گذارند (Rathore *et al*., 2020; Lodha and Mawar, 2014). با توجه به آن‌که قارچ *Fusarium* به‌عنوان عامل بیماری به‌صورت ساپروفیت اختیاری، بذرزاد و خاک‌زاد بوده و می‌تواند بدون میزبان تا ۶ سال در خاک زنده بماند، استفاده از تناوب زراعی کارایی لازم را نداشته و موجب محدود شدن کشت زیره سبز برای مدت طولانی می‌شود (Israel *et al*., 2005). قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* به‌صورت سطحی و داخلی توسط بذر منتقل شده و موجب کاهش جوانه‌زنی بذر زیره سبز می‌شود (Hajiyani *et al*., 1995). قوه نامیه، بنیه و سلامت بذر نیز نقش مهمی در تعیین کیفیت بذر و به طبع آن تاثیر بسیار زیادی روی استقرار و عملکرد گیاهان دارد. سلامت بذر تحت تأثیر وجود هر گونه عامل بیماری‌زایی قرار می‌گیرد که درون و یا روی سطح پوستهٔ بذر وجود دارد (Abdolrahmani *et al*., 2009). استفاده از بذور سالم و فاقد هر گونه آلودگی نقش مهمی در جلوگیری از انتقال بیماری به مناطق دیگر و فصل زراعی بعد دارد (Mahapatra *et al*., 2019; Singh *et al*., 2011). با توجه به نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان قارچ‌های بذرزاد و همراه بذر موجب کاهش یا از بین‌بردن جوانه‌زنی و بنیه بذر، پوسیدگی و نکروز بذر، پژمردگی و سوختگی گیاهچه زیره سبز می‌شوند (Suthar *et al*., 2014; Kedia *et al*., 2014).

قارچ‌کش‌های شیمیایی به‌طور گسترده‌ای برای کنترل بیماری‌های ناشی از *Fusarium* استفاده می‌شوند. بهترین راه مقابله با این بیماری استفاده از بذور سالم و گواهی‌شده همراه با تیمار بذر با قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌باشد. با این وجود، استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌تواند اثرات منفی روی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی میزبان داشته و تهدیدی جدی برای محیط زیست و سلامت انسان باشد (Petit *et al*., 2012). بنابراین، روش‌های مبتنی بر استفاده از عوامل کنترل زیستی از جمله استفاده اسانس و عصاره‌های گیاهی به دلیل سازگاری با محیط زیست و پایداری کم‌تر می‌توانند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی قلمداد شوند. خواص دارویی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانت اسانس‌های گیاهی وابسته به ترکیبات شیمیایی آن‌هاست که تحت تأثیر منشأ جغرافیایی، ژنوتیپ گیاه، بخش‌های مختلف گیاه، مرحله رشدی و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Khaledi and Hassani, 2018; Brooks *et al*., 2007). در سال‌های اخیر استفاده از سموم با پایه و منشأ گیاهی جهت کنترل تلفیقی آفات و بیماری‌های گیاهی در سطح جهانی گسترش یافته است. بر اساس گزارشات محققان اسانس زیره سبز دارای فعالیت بالای ضدقارچی علیه گونه‌های مختلف *Fusarium* می‌باشند (Salehi Surmaghi, 2006). اسانس بذر زیره سبز موجب مهار رشد میسلیومی قارچ‌های *F. oxysporum*، *Alternaria alternata*، *Penicillium citrinum*، *P. italicum*، *P. purpurogenum*، *luteum Spondylocladium*، *A. australe*، *Aspergillus flavus*، *A. niger*، *A. fumigatus*، *A. glaucus*، *A. terreus*، *A. unguis*، *Cladosporium cladosporioides*، *Curvularia lunata*، *Absidia ramosa* و *Mucor* sp. شد (Kedia *et al*., 2014).

اگرچه تحقیقات فراوانی در مورد تأثیر اسانس‌های گیاهان مختلف روی رشد قارچ *Fusarium* انجام شده است، اما تاکنون گزارشی در مورد اثرات اسانس‌ها و ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های توده‌های بذری روی قارچ‌های *Fusarium* بذرزاد جداسازی‌شده از آن‌ها انجام نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش جداسازی و

شناسایی گونه‌های *Fusarium* بذرزاد و ترکیبات تشکیل-دهنده اسانس‌ها از توده‌های بذری بومی زیره سبز، تأثیر قارچ‌های بذرزاد روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی و همچنین بررسی تأثیر اسانس‌های و ترکیبات بازدارنده اسانس‌های توده‌های بذری روی رشد میسلیومی جدایه-های *Fusarium* جداسازی‌شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این مطالعه در مجموع چهار نمونه از بذور تولیدی مزارع کشت زیره سبز مشهد، فریمان، کاشمر و قوچان در استان خراسان رضوی در سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷ بر اساس دستورالعمل نمونه‌برداری انجمن بین المللی آزمون بذر (ISTA, 2003) و راهنمای فنی پارت چینی و نمونه-برداری بذر (Abbasian, 2019) جمع‌آوری و همراه ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه سلامت بذر موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل گردید.

جداسازی و شناسایی اندوفیت‌های قارچی

جهت جداسازی اندوفیت‌های قارچی از بذور، ۱۰۰ عدد بذر از هر نمونه پس از ضدعفونی با محلول رقیق‌شده هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به‌مدت یک دقیقه، با آب مقطر استریل ۳ بار شستشو داده شدند. پس‌از خشک‌شدن بذور گیاهی روی کاغذ صافی سترون، نمونه‌ها به محیط غذایی سیب زمینی- دکستروز- آگار منتقل و به‌مدت ۵ تا ۱۰ روز در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. قارچ‌های رشدکرده به تشتک‌های پتری جدید منتقل شدند. روش-های خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریسه و تک اسپورکردن روی محیط کشت آب – آگار دو درصد انجام شد (Booth, 1977; Nelson *et al*., 1983).

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی جداسازی-شده بر اساس شکل ظاهری پرگنه و رنگ آن، ویژگی‌های رشدی، کنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها با استفاده از میکروسکوب نوری و کلیدهای شناسایی معتبر انجام گرفت (Leslie and Summerell, 2006). برای تأیید جدایه‌ها آغازگرهای اختصاصی گونه که در جدول یک ارائه شده اند، استفاده شد. اختصاصی‌بودن هر آغازگر به-وسیله انجام تجزیه و تحلیل BLAST در NCBI مورد تایید قرار گرفت. برای تهیه میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA جدایه‌های قارچی در محیط‌کشت مایع سیب‌زمینی- دکستروز - براث به‌مدت ۱۰ روز در داخل انکوباتور شیکردار با دمای دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس رشد داده شدند. توده میسیلیومی رشدیافته با پمپ خلأ، قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن سترون جمع‌آوری و با آب مقطر سترون شسته شد. پس از آبگیری کامل، توده میسلیومی در برداشت و به درون میکروتیوپ‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و تا مرحله استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج DNA از جدایه‌های قارچ از کیت Genomic DNA isolation kit IV ساخت شرکت DENA Zist Asia (ایران، مشهد) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه شامل ۷/۵ میکرولیتر آب، ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (Pishgam Biotech, Iran)، DNA با غلظت $ng.\mu L^{-1}$ ۵۰ و μL^{-1} ۱ از µM ۲/۵ آغازگر روبه جلو و آغازگر برگشتی بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra (Germany) انجام شد. چرخه دمایی مورد استفاده شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه در مرحله واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله اتصال (برای *F. oxysporum*: ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس، برای *F. solani*: ۶۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس) و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس (برای *F. oxysporum*: ۳۰ ثانیه، برای *F. solani*: ۶۰ ثانیه) و در نهایت مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود (جدول ۱). هر آزمایش شامل کنترل مثبت (اجزای واکنش PCR با DNA جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* عامل بیماری بوته‌میری زیره سبز که از مزارع زیره سبز شهرستان تربت جام جداسازی و شناسایی شده بود، به‌عنوان کنترل مثبت از آزمایشگاه بیماری-شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شد (Ghorbani *et al*., 2010)) و کنترل منفی (اجزای واکنش PCR بدون DNA) بود. در نهایت مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در ژل آگارز یک درصد و از طریق الکتروفورز به‌مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت

عبور داده شد. بر اساس طول قطعات حاصل از تکثیر قطعات DNA روی ژل جدایه‌های مختلف از نظر ژنتیکی تفکیک گردیدند. نشانگر وزن مولکولی Ladder 100 bp (فرمانتاز)، ردیابی باندها DNA با استفاده از رنگ‌آمیزی با و سپس عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه Gel Documentation مدل Bio Syngene GeneFlash (USA) انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرها و اندازه محصول مورد استفاده‌شده برای شناسایی گونه‌های *Fusarium*

Table 1. Primers sequences and product sizes used for identification of *Fusarium* species

گونه‌ها	آغازگر	توالی آغازگر ('۳→'۵)	اندازه قطعه	منبع
Species	**Primer**	**Sequences (5'-3')**	**Product size (bp)**	**Reference**
Fusarium oxysporum	FOF1 FOR1	ACATACCACTTGTTGCCTCG CGCCAATCAATTTGAGGAACG	340	(Mishra *et al*., 2003)
F. solani	Fs4F Fs4R	ATCGGCCACGTCGACTCT GGCGTCTGTTGATTGTTAGC	658	(Arif *et al*., 2012)

استخراج اسانس و شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده آن

در ابتدا ۱۰۰ گرم از بذر هر نمونه توده بذر زیره سبز پس از شستشو و خشک‌کردن، با استفاده از آسیاب خرد گردید، سپس بافت‌های آسیاب‌شده از الک عبور داده شد. اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با آب و به‌کمک دستگاه کلونجر ساخت شرکت اشک شیشه تهران انجام شد. اسانس به‌دست‌آمده به‌وسیله سولفات سدیم خشک، آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس-های توده‌های مختلف بذر زیره سبز از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890 با ستون مویین HP-5MS با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرون استفاده شد. برنامه دمایی آون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت است. گاز حامل هلیوم با سرعت ۰/۹ میلی‌لیتر در دقیقه با حجم تزریق یک میکرولیتر و دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. درصد نسبی هر یک از ترکیبات با توجه به سطح زیر منحنی هر ترکیب در طیف کروماتوگرافی گازی محاسبه گردید. شناسایی اجزا با کمک پارامتر اندیس بازداری و طیف‌های جرمی و مقایسه آن‌ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در بانک اطلاعات صورت گرفت (Adams, 2007).

ارزیابی اثر بازدارندگی اسانس و ترکیبات شیمیایی آن

جهت ارزیابی و تعیین میزان اثر بازدارندگی اسانس-های توده‌های بذری زیره سبز و هر کدام از ترکیبات شیمیایی آن‌ها روی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از بذور از روش اختلاط با محیط کشت بر اساس روش شرح داده‌شده توسط عبدالخیر و ال‌جمال نادیا (Abd-El-Khair and El-Gamal Nadia, 2011) استفاده شد. جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* عامل بیماری بوته‌میری زیره سبز که از مزارع زیره سبز شهرستان تربت جام جداسازی و شناسایی شده بود به-عنوان کنترل مثبت از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شد (Ghorbani *et al*., 2010). آزمایش سه بار تکرار شد. در نهایت درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$GI = \frac{C - P}{C} \times 100$$

(رابطه ۱)

GI، درصد بازدارندگی از رشد قارچ، C، میانگین قطر کلنی قارچ در شاهد و P، میانگین قطر کلنی قارچ در تیمار مورد نظر

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی قارچ‌ها

به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) و حداقل غلظت‌کشندگی (Minimum fungicidal concentration; MFC) با استفاده از روش استاندارد رقیق‌سازی در محیط کشت مایع شرح داده‌شده توسط پلودپای و همکاران (Plodpai *et al*., 2013) ارزیابی شد. همچنین غلظت ممانعت‌کنندگی ۵۰ (Inhibitory concentration 50; IC50) ترکیبات بازدارنده اسانس‌ها تعیین شد. آزمایش دو بار تکرار شد.

ارزیابی خاصیت قارچ‌کشی و یا قارچ‌ایستایی ترکیبات بازدارنده اسانس‌ها

به‌منظور بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ‌ایستایی ترکیبات بازدارنده اسانس‌ها با استفاده از روش شرح

داده‌شده توسط تامپسون (Thompson, 1989)، قرص‌های قارچی تیمارهایی که رشد قارچ در آن‌ها مشاهده نگردید روی محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت جدید بررسی گردید.

مقایسه تأثیر ترکیبات بازدارنده با قارچ‌کش شیمیایی کاربندازیم

مقایسه میزان مهار ترکیبات بازدارنده آن با قارچ‌کش کاربندازیم (Bavistin®) با روش اختلاط با محیط کشت انجام شد (Abd-El-Khair and El-Gamal Nadia, 2011).

شناسایی اثرات هم‌افزایی بین ترکیبات اسانس

به‌منظور تأثیر هم‌افزایی بین ترکیبات اسانس از روش چکربورد رقیق‌سازی در محیط مایع شرح داده‌شده توسط تورگیس و همکاران (Turgis *et al*., 2012) استفاده گردید. در این روش با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۷۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف ترکیبات بازدارنده آن (۲×MIC، ۱×MIC، ۰/۵×MIC، ۰/۲۵×MIC، ۰/۱۲۵×MIC، ۰/۰۶۲×MIC، ۰/۰۳۱۲×MIC و ۰/۰۱۵×MIC) به هر ردیف و سپس ۷۰ میکرولیتر از ترکیبات بازدارنده آن به هر ردیف عمودی بر ترکیبات قبلی در غلظت‌های مختلف افزوده شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هر قارچ در غلظت 1×10^5 اسپور در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. آزمایش سه بار تکرار شد. شاخص غلظت مهارکننده کسری (Fractional Inhibitory Concentration Index; FICI) از ترکیب دوتایی ترکیبات بازدارنده در اسانس بذر زیره سبز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$FICI = FIC\ A + FIC\ B = \frac{\text{MIC A combined}}{\text{MIC A alone}} + \frac{\text{MIC B combined}}{\text{MIC B alone}}$$

بر اساس عدد حاصل از محاسبه شاخص کسری FICI، اثر متقابل بین ترکیب دوتایی بتاالمن، کاریوفیلن و فیتول به‌صورت زیر تفسیر شد (Gutierrez *et al*., 2008).

FICI ≤ ۰/۵ فعالیت سینرژیستی، ۰/۵ < FICI < ۱ فعالیت افزایشی، ۱ < FICI ≤ ۴ بی‌تفاوت و FICI > ۴ فعالیت آنتاگونیسمی

آزمون‌های اثبات بیماری‌زایی و سنجش قدرت تهاجم

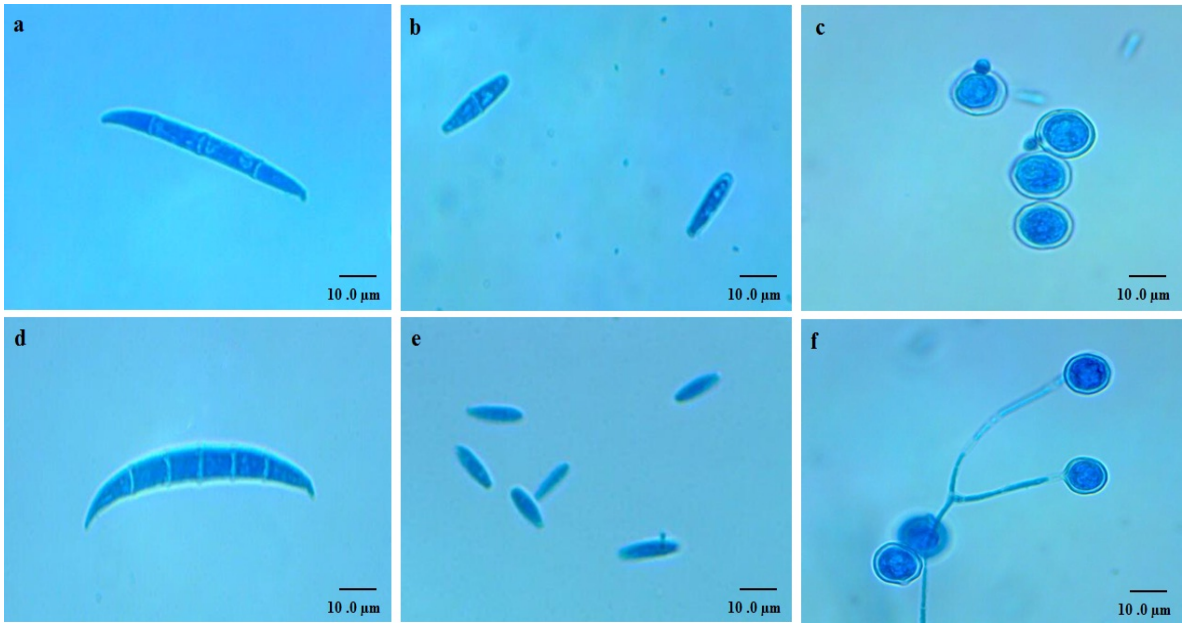
برای این منظور بذر زیره سبز فاقد هرگونه آلودگی و بیماری از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال در کرج تهیه شد. پس از ضدعفونی سطحی بذرها، ده بذر در لوله‌های آزمایش (یک بذر در هر لوله آزمایش) حاوی محیط کشت گیاهی B5 (شرکت زیست کاوش ایرانیان، البرز) کشت داده شد. پس از جوانه‌زنی، هر گیاهچه با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور هر جدایه (1×10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر) مایه‌زنی شد. همچنین از آب مقطر به‌عنوان شاهد استفاده شد. لوله های آزمایش در اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۸۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. علایم پژمردگی فوزاریومی، کلروز، کوتولگی و قهوه‌ای‌شدن ریشه پس از ۱۰ روز به‌روش شرح‌داده شده توسط کانانی و شوکلا (Kanani and Shukla, 2020) ارزیابی شد. آزمون شامل چهار تکرار برای هر جدایه بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

آنالیز آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال‌سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی با استفاده از روش آنالیز واریانس و با کاربرد نرم‌افزار (version 9.1) SAS انجام شد و میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ($p \leq 0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 انجام شد.

نتایج

بر اساس مشاهدات ریخت‌شناسی در مجموع ۱۲ جدایه از توده‌های بذری بومی زیره سبز در استان خراسان رضوی جداسازی شدند که متعلق به جنس *Fusarium* بودند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی به‌ترتیب با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر و آغازگرهای اختصاصی، ۱۰ جدایه متعلق به *F. oxysporum* و ۲ جدایه متعلق به *F. solani* شناسایی شدند (جدول ۲). مشخصات گونه *F. oxysporum* منطبق بر مشخصات ذکرشده توسط لزلی و سومرل (Leslie and Summerell, 2006) بود. رنگ پرگنه قارچ از سفید تا بنفش کمرنگ متغیر بوده و اسپوردوکیوم‌ها به‌رنگ نارنجی

کمرنگ به فراوانی تشکیل گردیدند. ماکروکنیدیوم‌ها به ابعاد ۵/۷-۳/۱ × ۵۶-۳۲ میکرومتر، معمولاً با سه دیواره عرضی بوده که سلول انتهایی به‌صورت منحنی و سلول پایه به شکل پا یا پاشنه بود. میکروکنیدیوم‌ها معمولاً یک سلولی تخم‌مرغی و بر روی مونوفیالیدهای کوتاه در سرهای دروغین تشکیل شدند. کلامیدوسپورها به فراوانی در هیف‌ها معمولاً به‌صورت تکی یا جفتی تشکیل شدند (شکل ۱).



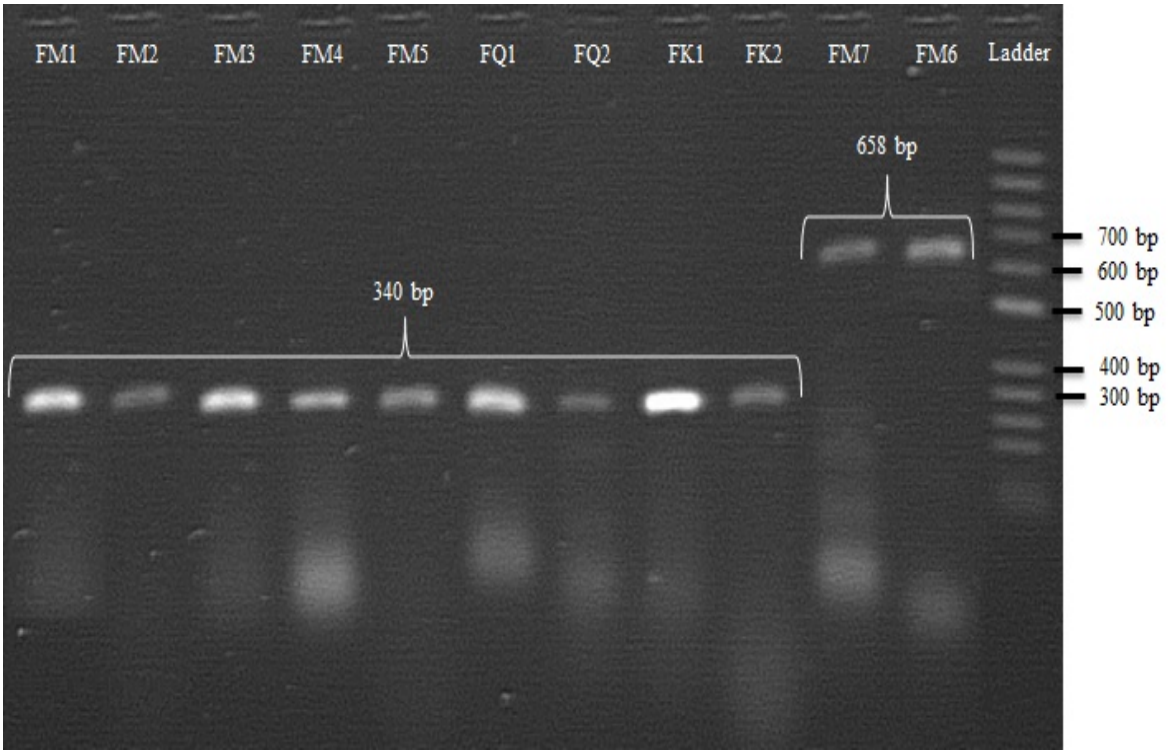
شکل ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناسی کنیدیوم‌های *Fusarium oxysporum* و *Fusarium solani* جداسازی‌شده از نمونه‌های بذری زیره سبز

ماکروکنیدیوم (a)، میکروکنیدیوم (b) و کلامیدوسپور (c) جدایه FM3 قارچ *F. oxysporum*، ماکروکنیدیوم (d)، میکروکنیدیوم (e) و کلامیدوسپور (f) جدایه FM6 قارچ *F. solani*، رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو، تصاویر به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus BX51) با بزرگنمایی ۴۰۰ × گرفته شد.

Figure 1. Morphological characteristics of conidia of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* isolated from cumin seed samples.

Macroconidium (a), microconidia (b) and chlamydospores (c) isolate FM3 of *F. oxysporum*; macroconidium (d), microconidia (e) and chlamydospores (f) isolate FM6 of *F. solani*; Staining with lactophenol cotton blue; Photographs were taken under a microscope (Olympus BX51) at 400× magnification.

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از آغازگرهای FOF/FOR نشان داد که ۱۰ جدایه جداسازی و شناسایی‌شده به‌روش ریخت‌شناسی از بذر زیره سبز به‌عنوان *F. oxysporum* مورد تأیید است (شکل ۲). مشخصات گونه *F. solani* منطبق بر مشخصات ذکرشده توسط لزلی و سومرل (Leslie and Summerell, 2006) بود. رنگ پرگنه قارچ از صورتی کمرنگ تا زرد متغیر بوده و اسپوردوکیوم‌ها به‌رنگ کرم تا زرد رنگ تشکیل گردیدند. ماکروکنیدیوم‌ها به ابعاد ۵-۳ × ۵۰-۳۲ میکرومتر، عریض، کشیده و کمی خمیده با سه تا هفت دیواره عرضی (غالبا سه تا چهار دیواره) با انتهای گرد بودند که سلول انتهایی گرد و کند و سلول پایه پاشنه‌ای بود. میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی یا قلوه‌ای بدون دیواره تا یک دیواره عرضی که در سرهای دروغی گرد با مونوفیالیدهای بلند تشکیل شدند. کلامیدوسپورها معمولاً به‌صورت جفتی و یا تکی در وسط هیف یا به‌صورت انتهایی و دارای دیواره صاف یا زبر بودند (شکل ۱). نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از آغازگرهای Fs4F/Fs4R نشان داد که دو جدایه جداسازی و شناسایی‌شده به‌روش ریخت‌شناسی از بذر زیره سبز به‌عنوان *F. solani* مورد تأیید است (شکل ۲). بذور آلوده به قارچ در تمامی نمونه‌های بذری زیره سبز نمونه‌برداری‌شده از مناطق مختلف به‌جز فریمان مشاهده شد. گونه *F. oxysporum* شایع‌ترین گونه شناسایی‌شده در نمونه‌های بذری مزارع زیره سبز بوده و در تمام توده‌های بذری نمونه‌برداری‌شده به‌جز فریمان جداسازی شد. جدایه‌های گونه *F. solani* فقط در توده‌ی بذری مشهد مشاهده شدند.



شکل ۲- شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی *Fusarium oxysporum* و *Fusarium solani* جداسازی‌شده از نمونه‌های بذری زیره سبز

باندها به‌ترتیب FM1، FM2، FM3، FM4، FM5، FQ1، FQ2، FK1 و FK2 متعلق به *F. oxysporum* با آغازگر FOF/FOR؛ FM7 و FM6 متعلق به *F. solani* با آغازگر Fs4F/Fs4R؛ (Ladder 100 bp فرمنتاز)

Figure 2. Molecular identification of fungal isolates *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* isolated from cumin seed samples.

The bands FM1, FM2, FM3, FM4, FM5, FQ1, FQ2, FK1 and FK2 belonging to *F. oxysporum* with FOF/FOR primers, respectively; FM7 and FM6 belonging to *F. solani* with Fs4F/Fs4R primers; (Ladder 100 bp Fermentas)

تراکم نسبی گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* شناسایی‌شده در نمونه‌های بذری زیره سبز به‌ترتیب ۶۰/۶ و ۳۹/۴ درصد بود. نتایج درصد جوانه‌زنی بذور تحت تأثیر قارچ‌های بذرزاد در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذور در نمونه‌ها از ۴۶/۵۰ تا ۸۱/۷۵ درصد متغیر بود (جدول ۲). میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی تغییر شکل‌یافته و بیمار در نمونه‌ها به‌ترتیب کم‌تر از ۳/۷۵ درصد و ۲ درصد است. نتایج حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه از جمله شاخص طولی بنیه از ۳۱۱/۵ تا ۱۱۳۲/۹۰ و شاخص وزنی بنیه از ۱/۹۹ تا ۶/۲۸ متغیر بود (جدول ۲). بالاترین و کم‌ترین شاخص بنیه گیاهچه به‌ترتیب متعلق به نمونه‌های بذر مشهد و فریمان بود. در میان توده‌های بذری مختلف مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه مورد ارزیابی مشاهده شد. میانگین طول ساقه‌چه از ۲/۹۰ تا ۶/۲۲ سانتی‌متر و طول ریشه‌چه از ۳/۸۲ تا ۷/۶۴ سانتی‌متر متغیر بود. همچنین وزن‌تر گیاهچه از ۰/۱۰ تا ۰/۳۴ گرم و وزن خشک از ۰/۰۴ تا ۰/۰۷ گرم متغیر بود (جدول ۲). مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Fusarium* روی گیاهچه در جدول ۳ ارائه شده است. تمامی جدایه‌های *Fusarium* شناسایی‌شده قادر به بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های زیره سبز نبودند. نتایج حاصل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Fusarium* نشان داد که حدود ۴۱/۷ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و ۵۸/۳ درصد جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. جدایه‌های مورد بررسی به گروه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند.

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در توده‌های بذری زیره سبز تحت تأثیر آلودگی طبیعی قارچی

Table 2. Means comparison of germination and vigor indices as affected by natural fungal infection in in cumin seed populations

محل نمونه برداری Sample site	NFI		GP	DS	SD	SL	RL	FW	DW	SLVI	SWVI
	FO	FS									
Mashhad	5	2	46.50 d	3.75 a	2 a	2.90 d	3.82 d	0.10 d	0.04 d	311.50	1.99
Quchan	3	0	65.75 c	1.00 b	0.50 b	4.78 c	5.85 c	0.19 c	0.05 c	698.40	3.47
Kashmar	2	0	73.00 b	0.50 b	0 b	5.65 b	7.17 b	0.24 b	0.06 b	935.65	4.74
Fariman	0	0	81.75 a	0 b	0 b	6.22 a	7.64 a	0.34 a	0.07 a	1132.90	6.28
LSD (0.05)		-	3.84	1.06	0.77	0.34	0.29	0.004	0.002	-	-

NFI = number of *Fusarium* isolates, FO = *Fusarium oxysporum*, FS = *Fusarium solani*, GP = Germination percent, DS = deformed seedling, SD = seedling disease, SL = shoot length, RL = root length, FW = fresh weight, DW = dry weight, SLVI = seedling length vigor index and SWVI = seedling weight vigor index. Different letters indicate significant differences according to Duncan's test analysis using SAS software (p = 0.05). Each experiment was repeated two times with similar results.

آزمون بیماری‌زایی نشان داد که شاخص بیماری برای جدایه‌های بیماری‌زا گونه *F. oxysporum* از ۵۲/۵۰±۱/۵۵ تا ۸۵/۲۵±۱/۳۱ متغیر بود. همچنین تمامی جدایه‌های *F. solani* جداسازی‌شده بیماری‌زا نبودند. بیش‌ترین شاخص بیماری مربوط به جدایه FM3 و همچنین کم‌ترین میزان آن مربوط به جدایه FK1 بود (جدول ۳). قدرت تهاجم جدایه‌های *Fusarium* مورد مطالعه متفاوت بود (جدول ۳). نتایج آزمون قدرت تهاجم روی گیاهچه‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان قدرت تهاجم مربوط به جدایه FM3 بود که اولین علایم بیماری را ۸۴ ساعت پس از مایه‌زنی به‌صورت کلروز برگی و پوسیدگی قهوه‌ای در ساقه ظاهر کردند. کم‌ترین قدرت تهاجم مربوط به جدایه FK1 بود که علایم بیماری را ۱۴۴ ساعت پس از مایه‌زنی بروز نمودند (جدول ۳).

جدول ۳- مشخصات قارچ‌های بذرزاد جداسازی‌شده از نمونه‌های بذری زیره سبز بر اساس محل نمونه‌برداری، میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم

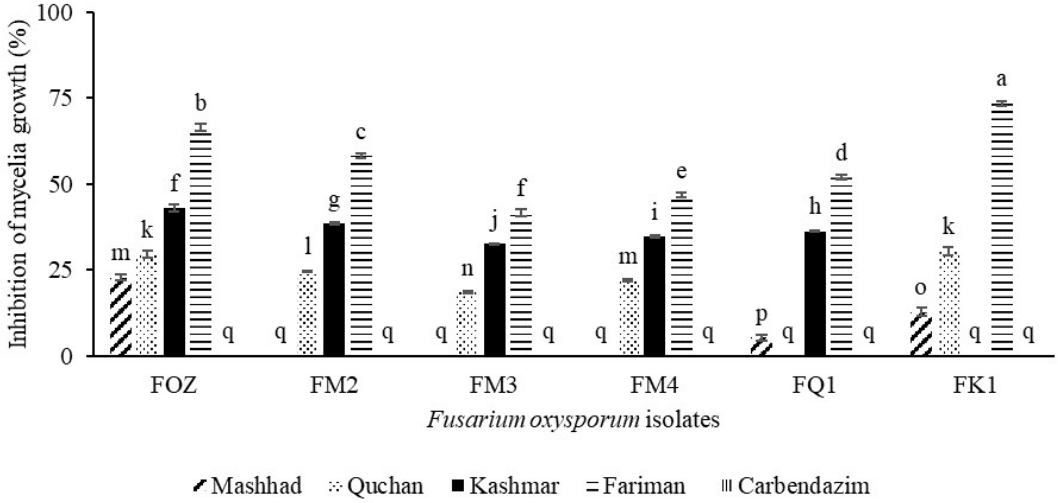
Table 3. Characteristics of seed-borne fungi isolated from cumin seed samples based on sampling site, pathogenicity and aggressiveness

کد جدایه Isolate code	قارچ Fungi	محل نمونه برداری Sample site	بیماریزایی Pathogenicity (DI)	قدرت تهاجم Aggressiveness (hpi)
FM1	*Fusarium oxysporum*	Mashhad	0 ± 0.0 f	0
FM2	*Fusarium oxysporum*	Mashhad	61.75 ± 1.49 d	132
FM3	*Fusarium oxysporum*	Mashhad	85.25 ± 1.31 a	84
FM4	*Fusarium oxysporum*	Mashhad	76.75 ± 0.85 b	108
FM5	*Fusarium oxysporum*	Mashhad	0 ± 0.0 f	0
FM6	*Fusarium solani*	Mashhad	0 ± 0.0 f	0
FM7	*Fusarium solani*	Mashhad	0 ± 0.0 f	0
FQ1	*Fusarium oxysporum*	Quchan	68.00 ± 0.41 c	120
FQ2	*Fusarium oxysporum*	Quchan	0 ± 0.0 f	0
FQ3	*Fusarium oxysporum*	Quchan	0 ± 0.0 f	0
FK1	*Fusarium oxysporum*	Kashmar	52.50 ± 1.55 e	144
FK2	*Fusarium oxysporum*	Kashmar	0 ± 0.0 f	0
LSD (0.05)			2.23	-

FO = *Fusarium oxysporum*, FS = *Fusarium solani*, M =, Q = Quchan, K = Kashmar, DI = disease index, hpi = hours post inoculation, hpc = hours post-culturing, Average ± standard error, Different letters indicate significant differences according to Duncan's test analysis using SAS software (p = 0.05). Each experiment was repeated two times with similar results.

نتایج حاصل ارزیابی تاثیر تیمار اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز نمونه‌برداری‌شده از مشهد، قوچان، کاشمر و فریمان و همچنین قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ppm ۲۰۰۰ روی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی جداسازی

شده از بذور زیره سبز در این پژوهش و جدایه *F. oxysporum* به‌عنوان شاهد مثبت (Ghorbani *et al.*, 2010) در شکل ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز روی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از همان توده بذری فاقد تأثیر بازدارندگی بودند، درحالی‌که موجب کاهش رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از توده‌های بذری دیگر می‌شوند (شکل ۲). همچنین قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ppm ۲۰۰۰ موجب عدم رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* شدند. اسانس توده بذری زیره سبز استخراج‌شده از فریمان موجب کاهش ۴۱/۵ تا ۷۳/۵ درصدی رشد میسلیومی تمامی جدایه‌های قارچی شد. همچنین تمامی اسانس‌های مورد بررسی در این پژوهش و قارچ‌کش موجب کاهش رشد میسلیومی جدایه *F. oxysporum* شاهد شدند (شکل ۲).



شکل ۳- تأثیر اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز و قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ppm ۲۰۰۰ روی درصد بازدارندگی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی *Fusarium oxysporum*

Figure 3. Effect of essential oils of cumin seed populations and carbendazim fungicide in concentration of 2000 ppm on the percentage inhibition of mycelia growth of fungal isolates *Fusarium oxysporum*

با توجه به نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی اسانس-های توده‌های مختلف بذر زیره سبز، اندیس‌های بازداری و طیف‌های جرمی اجسام ردیابی‌شده و مقایسه آن‌ها با مراجع و ترکیبات استاندارد، ۱۵ تا ۱۷ ترکیب شناسایی گردید که مجموعاً ۷۲/۴ تا ۸۵/۶ درصد از اجزای اسانس-های توده‌های مختلف بذر زیره سبز را تشکیل می‌دهند. ترکیبات شناسایی‌شده به‌همراه اندیس‌های بازداری و درصد نسبی هر جز در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بتا-پینن، پی-سیمن، گاما-ترپینن و کومین‌آلدهید ترکیبات اصلی شناسایی‌شده اسانس‌های توده‌های مختلف بذر زیره سبز بودند. سایر ترکیبات به-میزان کم‌تر از یک درصد بودند (جدول ۴). نتایج حاصل ارزیابی تاثیر تیمار ترکیبات اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز نمونه‌برداری‌شده از مشهد، قوچان، کاشمر و فریمان و قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ppm ۲۰۰۰ روی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج نشان داد که ترکیب ترپینن-۴-ال و قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ppm ۲۰۰۰ موجب عدم رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی شدند. ترکیبات آلفا-پینن به‌میزان ۱۰/۵-۲/۷۵ درصد، سابینن به‌میزان ۸/۵-۰/۷۵ درصد، بتا-پینن به‌میزان ۷۱/۵-۲۸/۷۵ درصد، میرسن به‌میزان ۱۶/۵-۲/۷۵ درصد، گاما-ترپینن به‌میزان ۳۵/۷۵-۱۶/۵ درصد، درصد، بتا-فارنسن به‌میزان ۵/۲۵-۰/۵ درصد و کاروتول به‌میزان ۵/۷۵-۰/۵ موجب کاهش رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* شدند (جدول ۵). با توجه به نتایج این آزمایش ترکیبات ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن که دارای بیش‌ترین توانایی بازدارندگی از رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی بودند انتخاب و جهت آزمایش‌های تکمیلی مورد استفاده قرار گرفتند. مقادیر IC50 و MIC ترکیبات ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن در مقایسه با قارچ‌کش شیمیایی کاربندازیم در

جدول ۶ ارائه شده است. مقادیر مختلفی از MIC و IC50 برای تیمارهای مختلف در برابر رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی مشاهده شد.

جدول ۴- ترکیب‌های شناسایی‌شده در اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز

Table 4. Identified compounds in essential oils of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed populations

ردیف Row	نام ترکیب Compound name	شاخص بازداری Retention index*	فراوانی (درصد) ترکیبات موجود در اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز Abundance (%) of compounds in essential oil of cumin seed populations			
			مشهد Mashhad	قوچان Quchan	کاشمر Kashmar	فریمان Fariman
1	α-thujene	930	0.2	0.3	0.2	0.2
2	α-pinene	935	0.3	0.3	0.5	0.5
3	sabinene	954	0.2	0.5	0.7	0.9
4	β-pinene	979	7.4	9.1	10.1	11.7
5	Myrcene	990	0.5	0.4	0.5	0.6
6	α-phellandrene	995	0.1	0.1	0	0.1
7	α-terpinene	1020	0	0	0	0.1
8	ρ-cymene	1024	16.4	16.8	17.9	18.3
9	limonene	1030	0.3	0.4	0.4	0.5
10	γ-terpinene	1060	13.9	15.2	15.9	16.8
11	linalool	1089	0	0.1	0.8	0.9
12	terpinen-4-ol	1169	0.1	0.2	0.4	0.6
13	α-terpineol	1180	0.2	0.2	0.3	0.2
14	cuminic aldehyde	1253	32.2	32.7	32.5	32.7
15	cuminic alcohol	1283	0.2	0.3	0.5	0.5
16	β-farnesene	1443	0.1	0.2	0.3	0.4
17	carotol	1574	0.3	0.4	0.5	0.6
-	Total	-	72.4	77.2	81.5	85.6

*Compounds are listed in order of elution from a DB-35 column and based on retention indices. Data are means ± standard error. Different letters indicate significant differences according to Duncan's test at the level $p < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.

مقادیر MIC برای ترکیبات ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن بین ۸۳۸ تا ۱۵۱۳ ppm متغیر بود. همچنین مقادیر IC50 برای ترکیبات بازدارنده بین ۳۸۵ تا ۷۹۵ ppm متغیر بود. در میان تمام تیمارهای مورد آزمایش قرار گرفته علیه جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* کم-ترین میزان MIC و IC50 مربوط به ترکیب ترپینن-۴-ال بود (جدول ۶). مقادیرIC50 و MIC قارچ‌کش شیمیایی کاربندازیم برای مهار رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* جداسازی‌شده از توده‌های بذری زیره سبز متفاوت بود. همچنین به‌منظور بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی ترکیبات ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن، قرص‌های قارچی که رشد قارچ در آن‌ها مشاهده نگردید روی محیط سیب‌زمینی- دکستروز- آگار واکشت شد و نتایج نشان داد که این ترکیبات علیه جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* دارای خاصیت قارچ ایستایی بودند. به‌منظور بررسی اثرات متقابل ترکیبات بازدارنده بذر زیره سبز در شرایط آزمایشگاهی از روش چکربورد رقیق‌سازی در محیط مایع استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، اثرات هم‌افزایی بین ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن مشاهده شد و هیچ اثر آنتاگونیستی بین ترکیبات اسانس مورد آزمایش مشاهده نشد. بالاترین سطح سینرژیستی به ترکیبی از ترپینن-۴-ال و بتا-پینن از ۰/۲۵۷ تا ۰/۲۹۶ بود (جدول ۷). ترکیب ترپینن-۴-ال با بتا-پینن دارای فعالیت سینرژیستی و ترکیب ترپینن-۴-ال با گاما-ترپینن و همچنین ترکیب بتا-پینن و گاما-ترپینن دارای فعالیت افزایشی علیه جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* بودند (جدول ۷).

بحث

در این پژوهش، در مجموع ۱۲ جدایه‌های قارچ بذرزاد از توده‌های بذری بومی از مزارع زیره سبز شهرستان‌های مشهد، فریمان، کاشمر و قوچان جداسازی و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شدند. این اولین گزارش در مورد شناسایی مولکولی گونه‌های قارچی بذرزاد در توده‌های بذری بومی زیره سبز در ایران است.

جدول ۵- تأثیر ترکیبات شناسایی‌شده و قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ppm ۲۰۰۰ روی درصد بازدارندگی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی *Fusarium oxysporum*

Table 5. Effect of the identified compounds and carbendazim fungicide in concentration of 2000 ppm on the percentage inhibition of mycelia growth of fungal isolates *Fusarium oxysporum*

تیمارها Treatments	درصد بازدارندگی رشد میسلیومی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* The percentage inhibition of isolates *Fusarium oxysporum* mycelia growth					
	FM3	FM4	FQ1	FM2	FK1	FOZ
Compound name						
α-thujene	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
α-pinene	5.75 ± 0.0 e	6.5 ± 0.0 e	3.75 ± 0.0 e	8.75 ± 0.0 e	2.75 ± 0.0 e	10.5 ± 0.0 e
Sabinene	3.75 ± 0.0 f	5.25 ± 0.0 f	2.0 ± 0.0 f	6.25 ± 0.0 f	0.75 ± 0.0 f	8.5 ± 0.0 f
β-pinene	56.5 ± 0.0 b	59.0 ± 0.0 b	40 ± 0.0 b	63.75 ± 0.0 b	28.75 ± 0.0 b	71.5 ± 0.0 b
Myrcene	8.5 ± 0.0 d	10.75 ± 0.0 d	6.25 ± 0.0 d	14.0 ± 0.0 d	2.75 ± 0.0 d	16.5 ± 0.0 d
α-Phellandrene	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
α-terpinene	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
ρ-cymene	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
Limonene	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
γ-Terpinene	25.25 ± 0.0 c	27.75 ± 0.0 c	20.75 ± 0.0 c	30.75 ± 0.0 c	16.5 ± 0.0 c	35.75 ± 0.0 c
Linalool	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
Terpinen-4-ol	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a
α-Terpineol	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
Cuminic aldehyde	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
Cuminic alcohol	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i	0 ± 0.0 i
β-Farnesene	0.75 ± 0.0 h	2.25 ± 0.0 h	1.5 ± 0.0 h	4.25 ± 0.0 h	0.5 ± 0.0 h	5.25 ± 0.0 h
Carotol	2.25 ± 0.0 g	3.25 ± 0.0 g	0.75 ± 0.0 g	4.5 ± 0.0 g	0.5 ± 0.0 g	5.75 ± 0.0 g
Fungicide						
Carbendazim	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a	100 ± 0.0 a

*Data are means ± standard error. Different letters indicate significant differences according to Duncan's test at the level $p < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.

جدول ۶- فعالیت ضدقارچی ترکیبات بازدارنده اسانس زیره سبز در مقایسه با قارچ‌کش شیمیایی در برابر رشد میسلیومی جدایه‌های *Fusarium oxysporum*

Table 6. Antifungal activity of inhibitory compounds of essential oil of cumin compared to synthetic fungicides against mycelial growth of isolates *Fusarium oxysporum*

Treatments	*Fusarium oxysporum* isolates											
	FM3				FM4		FQ1		FM2		FK1		FOZ	
	IC50*	MIC*	IC50*	MIC*	IC50*	MIC*	IC50*	MIC*	IC50*	MIC*	IC50*	MIC*
Compounds												
Terpinen-4-ol	385 a	838 a	371 a	824 a	365 a	813 a	315 a	808 a	309 a	795 a	406 a	899 a
β-pinene	458 c	865 c	453 c	856 c	442 c	841 c	433 c	829 c	427 c	818 c	467 c	927 c
γ-Terpinene	788 d	1438 d	762 d	1405 d	759 d	1389 d	751 d	1381 d	744 d	1357 d	795 d	1513 d
Fungicide												
Carbendazim	472 b	895 b	468 b	886 b	454 b	871 b	422 b	836 b	416 b	823 b	475 b	901 b

MIC − minimum inhibitory concentration; IC50 − inhibitory concentration 50; * ppm - one part per million. Means within a column indicated by the same letter were not significantly different according to Duncan's test at the level $p < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.

جدول ۷- شاخص غلظت مهارکننده کسری اجزای اسانس بذر زیره سبز علیه جدایه‌های *Fusarium oxysporum*

Table 7. The fractional inhibitory concentration index (FICI) of constituents of essential oil of cumin seed against isolates *Fusarium oxysporum*

جدایه‌های *Fusarium oxysporum* isolates	ترکیبات Compounds	شاخص غلظت مهارکننده کسری Fractional inhibitory concentration index	فعالیت Activity
FM3	Terpinen-4-ol × β-pinene	0.257	synergistic
	Terpinen-4-ol × γ-Terpinene	0.621	additive
	β-pinene × γ-Terpinene	0.918	additive
FM4	Terpinen-4-ol × β-pinene	0.285	synergistic
	Terpinen-4-ol × γ-Terpinene	0.633	additive
	β-pinene × γ-Terpinene	0.979	additive
FQ1	Terpinen-4-ol × β-pinene	0.288	synergistic
	Terpinen-4-ol × γ-Terpinene	0.641	additive
	β-pinene × γ-Terpinene	0.983	additive
FM2	Terpinen-4-ol × β-pinene	0.293	synergistic
	Terpinen-4-ol × γ-Terpinene	0.644	additive
	β-pinene × γ-Terpinene	0.989	additive
FK1	Terpinen-4-ol × β-pinene	0.296	synergistic
	Terpinen-4-ol × γ-Terpinene	0.675	additive
	β-pinene × γ-Terpinene	0.998	additive
FOZ	Terpinen-4-ol × β-pinene	0.289	synergistic
	Terpinen-4-ol × γ-Terpinene	0.638	additive
	β-pinene × γ-Terpinene	0.985	additive

بر اساس مشاهدات ریخت‌شناسی و بررسی‌های مولکولی جدایه‌های شناسایی‌شده به گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* تعلق داشتند که این مشاهدات با گزارش‌های سایر محققان در ترکیه (Kanani and Shukla, 2020; Özer and Bayraktar, 2015; Sumanth *et al*., 2010)، هند (Khare *et al*., 2014)، مصر (El-Shoraky and Rashed, 2012) و پاکستان (Chohan *et al*., 2001) مطابقت دارند. مشاهدات حاصل از این پژوهش نشان داد که توده بذری مشهد آلوده به قارچ‌های *F. oxysporum* و *F. solani* بوده درحالی‌که توده‌های بذری قوچان و کاشمر فقط آلوده به قارچ *F. oxysporum* می‌باشند. قارچ *F. solani* فقط در توده بذری مشهد وجود دارد، درحالی‌که قارچ *F. oxysporum* در توده‌های بذری زیره سبز مشهد، کاشمر و قوچان ردیابی و شناسایی شد. قارچ‌های *F. oxysporum* و *F. solani* از مزارع زیره سبز در استان‌های خراسان رضوی و فارس شناسایی و گزارش شده است (Ghorbani *et al*., 2010; Fassihiani, 2006; Hajiyani *et al*., 1995).

توده‌های بذری زیره سبز مشهد، کاشمر و قوچان تحت تأثیر آلودگی قارچی بودند، درحالی‌که توده بذری فریمان فاقد هر گونه آلودگی طبیعی به قارچ‌های بذرزاد بود. مشاهدات نشان داد که بیش‌ترین میزان آلودگی طبیعی به قارچ‌های بذرزاد در توده‌های بذری در منطقه مشهد و پس از آن در مناطق قوچان و کاشمر مشاهده شد. وجود آلودگی بالا در توده‌های بذری مشهد به قارچ‌های بذرزاد را می‌توان به حساسیت بالای توده بذری زیره سبز، شرایط محیطی، تناوب زراعی با گیاهان حساس و همچنین عدم ضدعفونی بذر نسبت داد. بیگ طاش شیویاری (Beygtash Shiviary, 2013) گزارش داد که منطقه مشهد بیش‌ترین درصد نمونه‌های آلوده به قارچ‌های بذرزاد را دارد که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد.

نتایج آزمون جوانه‌زنی نشان داد که آلودگی بذر به قارچ‌های بذرزاد به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب کاهش کیفیت بذر به‌ویژه سلامت بذر می‌شوند. هاشم و همکاران (Hashem *et al*., 2010) گزارش کردند که شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی با افزایش آلودگی بذور به قارچ‌های بذرزاد کاهش یافته است که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی در میان توده‌های بذری زیره

سبز مورد بررسی وجود دارد. نتایج این پژوهش با مشاهدات فاطیما و خوت (Fatima and Khot, 2015) مطابقت داد. آن‌ها گزارش کردند که قارچ‌های همراه بذر زیره سبز به‌طور قابل توجهی روی جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه تأثیر می‌گذارند. حاجیان و همکاران (Hajiyani *et al*., 1995) گزارش کردند که قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* موجب کاهش جوانه‌زنی بذر زیره سبز می‌شوند.

سوتار و همکاران (Suthar *et al*., 2014) گزارش کردند که شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی زیره سبز تحت تأثیر *F. equiseti* قرار گرفته و کاهش می‌یابد. با افزایش میزان آلودگی به قارچ‌های بذرزاد، تعداد گیاهچه‌های غیرطبیعی (تغییر شکل و بیمار) در توده‌های بذری افزایش یافت. مانگوند و همکاران (Mangwende *et al*., 2018) مشاهده کردند که بین میزان وقوع آلودگی به قارچ‌های بذرزاد و درصد گیاهچه‌های غیر طبیعی همبستگی مثبت وجود دارد. همچنین، کومار (Kumar, 2005) گزارش داد که آلودگی بذور زیره سبز به قارچ‌های بذرزاد ضمن کاهش درصد جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه‌های عادی موجب شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی می‌شوند. شاخص بنیه یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تعیین‌کننده کیفیت بذر می‌باشد که وجود گیاهچه‌های ضعیف و غیرعادی، نشان‌دهنده ضعیف‌بودن بنیه بذر می‌باشد. از سوی دیگر بذرهایی که دارای بنیه قوی‌تری باشند، ضمن توانایی بالایی در تحمل تنش‌های زنده و غیر زنده دارند، می‌توانند گیاهچه های قوی و عادی تولید نمایند.

نتایج حاصل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *F. oxysporum* نشان داد که حدود ۵۰ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و ۵۰ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا نبودند. درحالی‌که که هیچکدام از جدایه‌های *F. solani* بیماری‌زا نبودند. نتایج نشان داد که جدایه‌های گونه‌های مختلف و همچنین جدایه‌های متفاوت از یک گونه، بیماری‌زایی و قدرت تهاجم متفاوتی دارند. نتایج این پژوهش مطابق با مشاهدات شارما و همکاران (Sharma *et al*., 2013) و هاشم و همکاران (Hashem *et al*., 2010) بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، در میان تمام جدایه‌های *Fusarium*، بیش‌ترین پیشرفت بیماری و قدرت تهاجم مربوط به جدایه FM3 به‌میزان ۱/۳۱±۸۵/۲۵ بود که اولین علایم بیماری ۸۴ ساعت پس از مایه‌زنی به‌صورت کلروز برگی و پوسیدگی قهوه‌ای در ساقه مشاهده شد. خالدی و حسنی (Khaledi and Hassani, 2018) گزارش کردند که تفاوت قابل توجهی در میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های قارچی بذرزاد جداسازی شده از بذرو لوبیا روی گیاهچه وجود دارد.

نتایج کروماتوگرافی گازی اسانس‌های توده‌های مختلف بذر زیره سبز نشان داد که بتا-پینن، پی-سیمن، گاما-ترپینن و کومین آلدهید ترکیبات اصلی شناسایی شده اسانس‌های توده‌های مختلف بذر زیره سبز بودند. این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط درخشانی و همکاران (Derakhshan *et al*., 2010) است. آن‌ها گزارش کردند که عمده‌ترین ترکیبات اسانس بذر زیره سبز جمع‌آوری‌شده از استان تهران شامل کومین‌آلدهید، گاما-ترپینن، پی-منتا- ۱، ۴-دین-۷-آل، پی-منتا- ۱، ۳ -دین- ۷-آل، بتا-پینن و پی-سیمن بود. بتا-پینن، پی-سیمن و گاماترپینن عمده‌ترین ترکیبات اسانس گیاه زیره سبز جمع‌آوری‌شده از کشورهای ایران، مصر، پاکستان، چین و ترکیه بود (Tavakoli *et al*., 2015; Esmaeili, 2015; Wanner *et al*., 2010; Li and Jiang, 2004; Beis *et al*., 2000; Eikani *et al*., 1999). میزان و نوع ترکیب اسانس بذر زیره سبز در زمان‌های مختلف برداشت متفاوت است. نمونه‌های اسانس زیره سبز جمع‌آوری‌شده از کشورهای ایران و پاکستان به‌ترتیب حدود ۳۲/۴ و ۲۰ کومین‌آلدهید بود که موجب تفاوت‌های معناداری در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اسانس شد (Behera *et al*., 2004; Peter, 2003).

نتایج حاصل ارزیابی تاثیر تیمار اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز روی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از بذور نشان داد که اسانس‌ها روی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از همان توده بذری فاقد تأثیر بازدارندگی بودند، درحالی‌که موجب کاهش رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از توده‌های بذری دیگر می‌شوند. همچنین نتایج حاصل از تاثیر ترکیبات ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن روی رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی نشان داد که جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از توده‌های بذری در غلظت‌های بالاتر از مقدار این ترکیبات در اسانس‌های گیاهی که جدایه‌های قارچی جداسازی شدند، مانع رشد میسلیومی جدایه قارچی می‌شوند. این نتایج حاکی از آن است نوعی

مقاومت و سازگاری بین مقدار و نوع ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی و ترکیبات بازدارنده موجود در آن‌ها و جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از گیاه میزبان وجود دارد که با گزارش حاصل از تحقیقات والادرس و همکاران (Valadares *et al*., 2012) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند که میان قارچ‌های همراه بذر با بذور سازگاری وجود دارد. سوسا و همکاران (Sosa *et al*., 2020) گزارش کردند که با گذشت زمان این امکان وجود دارد قارچ‌های بیماری‌زا با اسانس‌های گیاهی سازگاری‌شده و اسانس‌های گیاهی نه تنها موجب کاهش فعالیت آن‌ها نشده بلکه موجب افزایش رشد میسلیومی و اسپورزایی این قارچ‌های بیماری‌زاشده و همچنین مقاوت آن‌ها را در مقابل سموم شیمیایی افزایش دهند.

اسانس بذر زیره سبز و برخی از ترکیبات آن از جمله ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن دارای فعالیت ضدقارچی بودند. این نتایج با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان در مورد فعالیت ضدقارچی اسانس بذر زیره سبز (El-Said and Goder, 2014; Naeini *et al*., 2014; Mohammadpour *et al*., 2012)، ترپینن-۴-ال (Brilhante *et al*., 2016; Terzi *et al*., 2007)، بتا-پینن (Silva *et al*., 2012) و گاما-ترپینن (Giweli *et al*., 2012) مطابقت دارد. نائینی و همکاران (Naeini *et al*., 2010) گزارش کردند که اسانس زیره سبز موجب مهار رشد جدایه‌های غیرتوکسین‌زای *F. oxysporum* و *F. solani* و جدایه‌های توکسین‌زای *F. equiseti*، *F. poae* و *F. verticillioides* شد. مورسیا و همکاران (Morcia *et al*., 2012) گزارش کردند که ترکیب ترپینن-۴-ال موجب مهار رشد قارچ‌های*F. oxysporum*، *F. proliferatum*، *F. cerealis*، *F. sporotrichioides* و *F. culmorum*، *F. subglutinans* شد. همچنین یو و همکاران (Yu *et al*., 2015) گزارش کردند که ترکیب ترپینن-۴-ال موجب مهار رشد میسلیومی قارچ *Botrytis cinerea* شد. فنگ و همکاران (Feng *et al*., 2020) گزارش کردند که ترکیب بتا-پینن موجب مهار رشد میسلیومی قارچ‌های *F. proliferatum*، *Colletotrichum gloeosporioides*، *Alternaria kikuchiana*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Ceratosphaeria phyllostachydis*، *Phytophthora capsici*، *Sphaeropsis sapinea*، *Glomerella cingulate* و *Fusicoccum aesculi* شد. شی و همکاران (Shi *et al*., 2019) گزارش کردند که ترکیب بتا-پینن موجب مهار رشد قارچ‌های *F. proliferatum*، *A. kikuchiana*، *P. capsici*، *C. gloeosporioides* و *Phomopsis* sp. شد. پوجیارتی و همکاران (Pujiarti *et al*., 2018) گزارش کردند که ترکیب گاما-ترپینن موجب مهار رشد میسلیومی قارچ‌های *Aspergillus niger* و *F. oxysporum* شد. نتایج حاصل از طیف‌های جرمی گاز کروماتوگرافی اسانس زیره سبز نشان داد که اکثر ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس حاوی هیدروکربن‌های ترپنی، ترکیبات آلدئیدها، کتون‌ها و الکل‌ها بودند که این ترکیبات از نظر شیمیایی و بیولوژیک دارای اهمیت هستند (Sahana *et al*., 2011). ترپنوئیدها از جمله ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن دارای فعالیت ضدقارچی می‌باشند. نتایج این پژوهش با گزارشات ساکیر و همکاران (Cakir *et al*., 2004) مطابقت داد. آن‌ها گزارش کردند که مونوترپنوئیدها موجب مهار رشد میسلیومی قارچ‌های *F. oxysporum* و *Rhizoctonia solani* می‌شوند.

مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی به‌دست‌آمده برای ترکیب ترپینن-۴-ال و بتا-پینن به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از مقادیر به‌دست‌آمده برای قارچ‌کش‌های شیمیایی کاربندازیم بود. فعالیت ضدقارچی اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز و ترکیبات بازدارنده آن با افزایش غلظت آن‌ها افزایش یافته است (نتایج ارائه نشده است). حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌های توده‌های بذری زیره سبز و ترکیبات ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن برای مهار رشد میسلیومی جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* جداسازی‌شده از توده‌های بذری زیره سبز متفاوت بود. مقادیر IC50 و MIC به‌دست‌آمده برای ترکیب ترپینن-۴-ال و بتا-پینن به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از مقادیر به‌دست‌آمده برای گاما-ترپینن و کاربندازیم بود. نتایج حاصل از بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی ترکیبات ترپینن-۴-ال، بتا-پینن و گاما-ترپینن نشان داد که این ترکیبات علیه جدایه‌های قارچی *F. oxysporum* دارای خاصیت قارچ ایستایی بودند. مقادیر MIC قارچ‌کش شیمیایی کاربندازیم بین ۸۲۳ تا ۹۰۱ ppm متغیر بود که مقدار آن بیش‌تر از ترپینن-۴-ال و بتا-پینن ولی کم‌تر از گاما-ترپینن بود.

با توجه به آن‌که برخی از ترپنوئیدها رابطه سینرژیستی و هم‌افزایی قابل توجهی نشان می‌دهند (Pavela, 2014)، درک عمیق این روابط میتواند نقش مهمی در فعالیت ضدقارچی اسانس‌های گیاهی و همچنین ترکیبات تشکیل دهنده‌ی آنها جهت ایجاد قارچ‌کش‌های جدید با منشا گیاهی داشته باشد. مانکارز و همکاران (Mancarz *et al*., 2019) گزارش کردند که بین ترکیبات ترپینن-۴-ال و بتا-پینن دارای اثر هم‌افزایی به‌صورت فعالیت سینرژیست وجود دارد که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. ترکیب ترپینن-۴-ال و گاما-ترپینن دارای اثر هم‌افزایی به‌صورت فعالیت افزایشی بودند که با گزارش حاصل از تحقیقات آباسی و همکاران (Abbassy *et al*., 2009) مطابقت دارد. ترکیب اسانس‌های گیاهی و یا ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها که دارای خاصیت قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی می‌باشند استراتژی جدید و امیدوارکننده برای غلبه بر مکانیسم مقاومت قارچ می‌باشند. این ترکیبات می‌توانند با گسترش طیف فعالیت ضدقارچی موجب گسترش نحوه اثر و عملکرد آن‌ها شده و ضمن کاهش حداقل غلظت مهارکنندگی باعث کاهش عوارض جانبی احتمالی ناشی از سموم شیمیایی روی محیط زیست و سلامت انسان می‌شوند (Dra *et al*., 2017; Yap *et al*., 2014; Aleksica *et al*., 2014).

این مطالعه نشان می‌دهد که قارچ‌های بیماری‌زا بذرزاد باعث کاهش شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی می‌شوند. با توجه به آن‌که بیش‌ترین میزان آلودگی به قارچ‌های بذرزاد در توده بذری مشهد مشاهده شد و همچنین جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از این توده بذری نسبت به توده‌های بذری سایر مناطق نمونه‌برداری‌شده میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم بیش‌تری داشتند، توده بذری مشهد جهت کشت در آن منطقه و سایر مناطق توصیه نمی‌گردد. همچنین با توجه به مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در توده‌های بذری مورد بررسی و میزان آلودگی به قارچ‌های بذرزاد، پیشنهاد می‌گردد از توده بذری فریمان جهت کشت در سایر مناطق استفاده شود. همچنین توده‌های بذری هر منطقه مورد بررسی و با توجه به اصالت و خلوص ژنتیکی، خلوص فیزیکی، کیفیت‌های فیزیولوژیک و سلامت بذر تصمیم‌گیری مناسب اتخاذ گردد. استفاده از بذور سالم ضمن حفظ ارزش زراعی و تنوع ژنتیکی توده‌های بومی بذر زیره سبز، موجب کاهش آلودگی محصول در مزرعه به بیماری‌های قارچی ناشی از بذر می‌شوند. در نتیجه شناخت قارچ‌های بذرزاد و بررسی تأثیر آن‌ها روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی می‌تواند در انتخاب راهکارهای مؤثر مدیریتی جهت کاهش اثرات مخرب بیماری‌های ناشی از بذر و افزایش میزان تولید و کیفیت محصول موثر باشد. علاوه بر این، ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌ها و عوامل مؤثر بر آن می‌تواند به پرورش‌دهندگان گیاهان در انتخاب توده‌های بومی زیره سبز در کشف منابع مقاومت در برابر تنش‌های ناشی از عوامل زنده مؤثر باشد. ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها و فعالیت بیولوژیک آن‌ها تحت تاثیر ژنوتیپ گیاه و به‌میزان زیادی تحت تأثیر منشأ جغرافیایی و شرایط محیطی قرار می‌گیرد. نتایج نشان داد که ممکن است بتوان از ترکیبات ترپینن-۴-ال و بتا-پینن به‌عنوان عوامل بیولوژیک قوی، به جای قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کاهش و یا کنترل قارچ *F. oxysporum* استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نگارنده از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره پروژه ۱۲۴-۰۸-۰۸-۰۲۱-۹۸۰۲۴-۹۸۰۸۹۲ تشکر و قدرانی می‌نمایند.

منابع

Abbasian, A. 2019. Seed Lot and Seed Sampling Guideline. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Agricultural Research, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Technical Publication Series, 20 pp. (In Persian) **(Book)**

Abbassy, M.A., Abdelgaleil, S.A.M. and Rabie, R.Y.A. 2009. Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. Entomologia Experimentalis et Applicata, 131: 225-232. **(Journal)**

Abd-El-Khair, H. and El-Gamal Nadia, G. 2011. Effects of aqueous extracts of some plant species against *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(1): 1-16. **(Journal)**

Abdolrahmani, B., Ghassemi-Golezani, K., Valizadeh, M., Feizi Asl, V. and Tavakoli, A. 2009. Effects of seed priming on seed vigor and grain yield of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. abidar) in rain fed condition. Iranian Journal of Crop Sciences, 11: 337-353. **(Journal)**

Adams, R.P. 2007. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4 th Edition. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, USA, 804 pp. **(Book)**

Alavi, A. 1969. Wilt of cumin plant (*Cuminum cyminum*) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* Prasad and Patel. Iranian Journal of Plant Pathology, 5: 92-98. **(Journal)**

Aleksica, V., Mimica-Dukicb, N., Siminb, N., Nedeljkovicc, N.S. and Knezevica, P. 2014. Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. Phytomedicine, 21: 1666-1674. **(Journal)**

Arif, M., Chawla, S., Zaidi, N.W., Rayar, J.K., Variar, M. and Singh, U.S. 2012. Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1a) gene. African Journal of Biotechnology, 11: 444-447. **(Journal)**

Behera, S., Nagarajan, S. and Rao L.J.M. 2004. Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. Food Chemistry, 87: 25-29. **(Journal)**

Beis, S.H., Azcan, T.N., Ozek, I.T., Kara, I.M. and Baser, K.H.C. 2000. Production of essential oil from cumin seeds. Chemistry of Natural Compounds, 36: 265-268. **(Journal)**

Beygtash Shiviary, S. 2013. Identification of seedborne fungal pathogenes of cumin and caraway and biological control of dominant pathogens. Masters thesis, University of Zabol. **(Thesis)**

Booth, C. 1977. Fusarium Laboratory Guide to Identification of Major Species. Common wealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 55 pp. **(Book)**

Brilhante, R.S.N., Caetano, E.P., De Lima, R.A.C., Marques, F.J.F., Castelo-Branco, D.S.C.M., De Melo, C.V.S., Guedes, G.M.M., De Oliveira, J.S., De Camargo, Z.P., Bezerra Moreira, J.L., Jalles Monteiro, A., Gomes Bandeira, T.D.P., De Aguiar De Cordeiro, R., Gadelha Rocha, M.F. and Costa Sidrima, J.J. 2016. Terpinen-4-ol, tyrosol, and b-lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. Brazilian Journal of Microbiology, l47: 917-924. **(Journal)**

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. and Morse, S.A. 2007. Medical Microbiology; 24th ed. New York: McGraw-Hill, 818 pp. **(Book)**

Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S. and Hirata, T. 2004. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flavour and Fragrance Journal, 19, 62-68. **(Journal)**

Chohan, M.A., Agil, T. and Khan, H. 2001. Fungi associated with seed of cumin (*Cuminum cyminum* L.) collected from different areas of Balochistan. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 2: 42-44. **(Journal)**

Derakhshan, S., Sattari, M. and Bigdeli, M. 2010. Effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid integrity of *Klebsiella pneumoniae*. Pharmacognosy Magazine, 6: 57-61. **(Journal)**

Didwania, N. 2019. Diseases of Cumin and its management. In book: Diseases of Medicinal and Aromatic Plants Aromatic and their Management (Eds: Rakesh Pandey, A.K. Misra, H.B. Singh, Alok Kalra and Dinesh Singh). Publisher: Indian Phytopathological Society, New Delhi. 339-352. **(Book)**

Divakara Sastry, E.V. and Anandara, J.M. 2013. Cumin, Fennel and Fenugreek. Soils, Plant Growth and Crop Production. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).

Dra, L.A., Brahim, M.A.S., Boualy, B., Aghraz, A., Barakate, M., Oubaassine, S., Markouk, M. and Larhsini, M. 2017. Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. Industrial Crops and Products, 109: 746-752. **(Journal)**

Eikani, M.H., Goodarznia, I. and Mirza, M. 1999. Supercritical carbon dioxide extraction of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.). Flavour and Fragrance Journal, 14: 29-31. **(Journal)**

El-Said, A.H.M. and Goder, E. 2014. Antifungal activities of *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* essential oils. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3: 937-944. **(Journal)**

El-Shoraky, F.S. and Rashed, N.M.M. 2012. Antimicrobial and pesticidal potentiality of essential oils of some medicinal plants against deterioration of cumin seeds. Journal of Plant Protection and Pathology, 3: 1253-1268. **(Journal)**

Esmaeili, F. 2015. Composition of essential oil of *Cuminum cyminum*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18: 507-509. **(Journal)**

Fassihiani, A. 2006. Occurrence of cumin wilt in Fars province. Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress, vol. II, 2-5 September, Karaj, Iran. pp: 263. **(Conference)**

Fatima, S. and Khot, Y.C. 2015. Studies on fungal population of cumin (*Nigella sativa* L.) from different parts of Marathwada. International Journal of Multidisciplinary Research, 2: 25-31. **(Journal)**

Feng, X.Z., Xiao, Z., Zhang, L., Liao, S., Chen, S., Luo, H., He, L., Fan, G. and Wang, Z. 2020. Antifungal activity of β-Pinene- based hydronopyl quaternary ammonium salts against phytopathogenic fungi. Natural Product Communications. 5: 1-6. **(Journal)**

Gerlach, W. and Ershad, D. 1970. Beitrag zur Kenntnis der Fusarium und Cylindrocarpon-Arten in Iran. Nova Hedwigia, 20: 725-784. **(Journal)**

Ghorbany, M., Jafarpour, B. and Rastegar, M.F. 2010. Application of some plant products to control of Fusarium oxysporum f.sp cumini causing cumin wilt. Journal of plant protection (Agricultural science and technology), 24:1-7. **(Journal)**

Giweli, A., Dzamic, A.M., Sokovic, M., Ristic, M.S. and Marin, P.D. 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra*, growing wild in Libya. Molecules, 17: 4836-4850. **(Journal)**

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology, 124: 91-97. **(Journal)**

Haghirsadat, B.B.F., Vahidi, A., Sabor, M.H. Azimzade, M., Kalantar, S.M. and Sharafdini, M. 2011. Evaluation of active components and antioxidant properties of essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.) native Yazd province. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 19: 472-481. **(Journal)**

Hajiyani, M., Zad G., Hedjarood. G., Sharifi Tehrani, A. and Falahati, M. 1995. Role of seed infection in transmission and dispersal of cumin wilt. Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress, 28 August - 2 September, Karaj, Iran. pp: 183. **(Conference)**

Hampton J.G. 2002. What is seed quality? Seed Science and Technology, 30 1-10. **(Journal)**

Hampton, J.G., Boelt, B., Rolston, M.P. and Chastain, T.G. 2013. Effects of elevated CO2 and temperature on seed quality. Journal of Agricultural Science, 151, 154-162. **(Journal)**

Hashem, M., Moharam, A.M. and Zaied, A.A. 2010. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. Crop Protection, 29: 1111-1117. **(Journal)**

Hasheminia, S.M., Nasiri Mahalati, M. and Keshavarzi, A. 2010. Determination of salinity threshold and proper temperature, and their interaction on germination of cumin. Iranian Journal of Agricultural Research, 7: 305-312. **(Journal)**

Israel, S., Mawar, R. and Lodha, S. 2005. Soil solarisation, amendments and bio-control agents for the control of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* in aridisols. Annals of Applied Biology, 146: 481-491. **(Journal)**

ISTA (International Seed Testing Association). 2003. International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Zurich, 333 pp. **(Book)**

Kanani, P. and Shukla, Y.M. 2020. Genetic variability: physiological characteristics, pathogenicity and molecular diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* infecting *Cumin cyminum* L. in India. Vegetos, 33: 265-276. **(Journal)**

Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P.K., Chanotiya, C.S. and Dubey, N.K. 2014. Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. International Biodeterioration and Biodegradation, 89: 29-36. **(Journal)**

Khaledi, N. and Hassani, F. 2018. Antifungal activity of *Bunium persicum* essential oil and its constituents on growth and pathogenesis of *Colletotrichum lindemuthianum*. Journal of Plant Protection Research, 58: 431-441. **(Journal)**

Khare, M.N., Tiwari, S.P. and Sharma, Y.K. 2014. Disease problems in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and fenugreek (*Trigonella foenum* graceum L.) cultivation and their management for production of quality pathogen free seeds. International Journal of Seed Spices, 4: 11-17. **(Journal)**

Kishor, C. and Jain, M.P. 1999. Effect of fungal spore load on cumin seed infection. Annals of Agri Bio Research, 4: 103-105. **(Journal)**

Kumar, S. 2005. Seed Mycoflora of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) and their Management. Masters thesis, Maharana Pratap University of Agriculture and Technology, Udaipur. **(Thesis)**

Leslie, J.F. and Summerell, A.B. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Ames: Blackwell Publishing Professional. 388 pp. **(Book)**

Li, R. and Jiang, Z. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. Flavour and Fragrance Journal, 19: 311-313. **(Journal)**

Lodha, S. and Mawar, R. 2014. Cumin wilt management: a review. Journal of spices and aromatic crops, 23:145-155. **(Journal)**

Lodha, S., Gupta, G.K. and Singh, S. 1986. Crop disease situation and some new records in Indian arid zone. Annals of Arid Zone, 25: 311-320. **(Journal)**

Mahapatra, S.S., Arya, A., Kesarwani, A. and Verma, O. 2019. Influence on oilseeds and legume seed physiology under insect pest and pathogenic infestation. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8: 671-676. **(Journal)**

Mancarz, G.F.F., Laressa, C.L., Thaís, A.M.S., Melina de S.P., Daianyde, S., Maria, R.M.P., Lauro, M.S., Tomoe, N. and Rosiane, G.M. 2019. Chemical composition and biological activity of *Liquidambar styraciflua* L. leaf essential oil. Industrial Crops and Products, 138: 1-8. **(Journal)**

Mangwende, E., Kritzinger, Q. and Aveling, A.S.T. 2018. Control of Alternaria leaf spot of coriander in organic farming. European Journal of Plant Pathology, 152:409-416. **(Journal)**

Mishra, P.K., Fox, R.T.V. and Culham, A. 2003. Intersimple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. Annals of Applied Biology, 143: 291-301. **(Journal)**

Mohammadpour H., Moghimipour, E., Rasooli, I., Fakoor, M.H., Astaneh, S.A., Moosaie, S.S. and Jalili, Z. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum* L. essential oil from Alborz Mountain against *Aspergillus* species. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 7: 50-55. **(Journal)**

Morcia, C., Malnati, M. and Terzi, V. 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. Food Additives and Contaminants Part A, 29: 415-422. **(Journal)**

Naeini, A., Jalayer Naderi, N. and Shokri, H. 2014. Analysis and in vitro anti-Candida antifungal activity of *Cuminum cyminum* and *Salvadora persica* herbs extracts against pathogenic *Candida* strains. Journal of Medical Mycology, 24: 13-18. **(Journal)**

Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H. and Khosravi, A.R. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. Journal of Medical Mycology, 20: 174-178. **(Journal)**

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, An Illustrated Mannual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. **(Thesis)**

Nooras Mofrad, N., Farrokhi Nejad, R. and Alizadeh, A. 2005. Genetic diversity in populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, the causal agent of cumin wilts in Khorasan using vegetative compatibility groups. Iranian Journal of Plant Pathology, 41: 437-453. **(Journal)**

Özer, G. and Bayraktar, H. 2015. Determination of fungal pathogens associated with *Cuminum cyminum* in Turkey. Plant Protection Science, 51: 74-79. **(Journal)**

Pavela, R. 2014. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. Industrial Crops and Products, 60: 247-258. **(Journal)**

Peter, K.V. 2003. Handbook of Herbs and Spices, Vol. 1, pp.164e167. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. **(Book)**

Petit, A.N., Fontaine, F., Vatsa, P., Clément, C. and Vaillant-Gaveau, N. 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. Photosynthesis Research, 111: 315-326. **(Journal)**

Plodpai P., Chuenchitt S., Petcharat V., Chakthong S. and Voravuthikunchai, S.P. 2013. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. Crop Protection, 43: 65-71. **(Journal)**

Pujiarti, R., Nurjanto, H.H. and Sunarta, S. 2018. Antifungal activity of *Eucalyptus urophylla* oil against *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. Journal of Agricultural Science, 40: 55-62. **(Journal)**

Rathore, R., Vakharia, D.N. and Rathore, D.S. 2020. *In vitro* screening of different *Pseudomonas fluorescens* isolates to study lytic enzyme production and growth inhibition during antagonism of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, wilt causing pathogen of cumin. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30: 571-578. **(Journal)**

Sahana, K., Nagarajan, S. and Rao, L.J.M. 2011. Cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed volatile oil: Chemistry and role in health and disease prevention In: Preedy VR, editor; Watson RR, editor; Patel VB, editor. Editors. Nuts & seeds in health and disease prevention. New York: Elsevier; pp. 417-427.

Salehi Surmaghi, H. 2006. Medicinal plants and phytotherapy. Tehran, Iran: Donyaee Taghazie; 2006. pp. 55-58.

Sharma, Y.K., Choudappa, P.C. and Anwer, M.M. 2013. Efficacy of fungicides for the management of Alternaria blight of cumin. International Journal of Seed Spices, 3: 48-49. **(Journal)**

Shi, Y., Si, H., Wang, P., Chen, S., Shang, S., Song, Z., Wang, Z. and Liao, S. 2019. Derivatization of natural compound -pinene enhances its in vitro antifungal activity against plant pathogens. Molecules, 24: 1-15. **(Journal)**

Silva, A.C.R., Lopes, P.M., Azevedo, M.M.B., Costa, D.C.M., Alviano, C.S. and Alviano, D.S. 2012. Biological activities of α-pinene and β-pinene enantiomers. Molecules, 17: 6305-6316. **(Journal)**

Singh, J., Shikha, S.S., Sinha, A. and Bose, B. 2011. Studies on seed mycoflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with potassium nitrate and its effect on germination during storage. Research Journal of Seed Science, 4: 148-156. **(Journal)**

Sosa, A.L., Girardi, N.S., Rosso, L.C., Salusso, F., Etcheverry, M.G. and Passone, M.A. 2020. *In vitro* compatibility of *Pimpinella anisum* and *Origanum vulgare* essential oils with nematophagous fungi and their effects against *Nacobbus aberrans*. Journal of Pest Science, 93: 1381-1395. **(Journal)**

Sowbhagya, H.B., Sathyendra Rao, B.V. and Krishnamurthy, N. 2008. Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*Cuminum cyminum*) seed oil. Journal of Food Engineering, 84: 595-600. **(Journal)**

Steinkellner, S., Mammerler, R. and Vierheilig, H. 2008. Germination of *Fusarium oxysporum* strains in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. European Journal of Plant Pathology, 122: 395-401. **(Journal)**

Sumanth, G.T., Waghmare, B.M. and Shinde, S.R. 2010. Incidence of mycoflora from the seeds of Indian main spices. African Journal of Agricultural Research, 5: 3122-3125. **(Journal)**

Suthar, R.S., Bhatt, D.P. and Bhatt, P.N. 2014. Effect of culture filtrate of *Fusarium equiseti* on seed germination and seedling growth of cumin (*Cuminum cyminum*). Indian Phytopathol, 67: 193-194. **(Journal)**

Tavakoli, H.R., Mashak, Z., Moradi, B. and Sodagari H.R. 2015. Antimicrobial activities of the combined use of *Cuminum Cyminum* L. essential oil, Nisin and storage temperature against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus in vitro*. Jundishapur Journal of Microbiology, 8: 1-7. **(Journal)**

Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Vale, G., Tacconi, G. and Malnati, M. 2007. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. Letters in Applied Microbiology, l44: 613-618. **(Journal)**

Thompson, D.P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. Mycologia, 81: 151-153. **(Journal)**

Turgis, M., Vu, K.D., Dupont, C. and Lacroix, M. 2012. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. Food Research International, 48: 696-702. **(Journal)**

Valadares, R.B., Pereira, M.C., Otero, J.T. and Cardoso E.J. 2012. Narrow Fungal Mycorrhizal Diversity in a Population of the Orchid *Coppensia doniana*. Biotropica, 44: 114-122. **(Journal)**

Wanner, J., Bail, S., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Gochev, V., Girova, T., Atanasova, T. and Stoyanova, A., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of cumin oil (*Cuminum cyminum*, Apiaceae). Natural Product Communications, 5: 1355-1358. **(Journal)**

Yap, P.S., Yiap, B.C. Ping, H.C. and Lim, S.H. 2014. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. The Open Microbiology Journal, 8: 6-14. **(Journal)**

Yu, D., Wang, J., Shao, X., Xu, F. and Wang, H. 2015. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. Journal of Applied Microbiology, 119: 1253-1262. **(Journal)**

Investigation of constituents and antifungal effects of essential oils of native cumin seed populations on seed-borne fungi

Nima Khaledi*

Received: October 18, 2020 Accepted: April 5, 2021

Abstract

The seed is one of the most important inputs of agricultural products that its quality and health can be affected by seed-borne fungi. The aim of this study was to identify the seed-borne fungi and their effect on germination and vigor indices of native cumin seed populations and also to evaluate the effects of essential oils and constituents of essential oils these seed populations on seed-borne fungi isolated. In order to identify of seed-borne fungi of cumin seed populations from seeds produced in fields of Mashhad, Fariman, Kashmar and Quchan in Khorasan Razavi province were sampled according to the International Rules for Seed Testing (ISTA). After isolation and purification, fungal isolates were identified based on morphological and molecular characteristics. Also, pathogenicity potential and the aggressiveness of isolates on seedlings were investigated. A total of 12 isolates were identified based on morphological and molecular characteristics that belonging to *Fusarium oxysporum* and *F. solani* species. The results of the standard germination test showed that there was a significant difference among the seed populations studied in the germination and vigor indices. Seed infected by seed-borne fungi significantly affects germination and vigor indices and reduces seed quality and health. The results showed that the highest vigor and germination indices were observed in Fariman seed population followed by Kashmar, Quchan and Mashhad seed populations. The results of pathogenicity test showed that about 41.7% of the isolates were pathogenic and 58.3% of the isolates were non-pathogenic. Also, different levels of pathogenicity and aggressiveness were observed for various isolates of *Fusarium* species. In the continuation of this research, the essential oil was extracted by hydrodistillation using a Clevenger apparatus and its major constituents were identified by gas chromatography-mass spectrometry. The main compounds identified essential oils included β-pinene, ρ-cymene, γ-terpinene and cuminic aldehyde. The results showed that the compounds of α-pinene, sabinene, β-pinene, myrcene, γ-terpinene, terpinen-4-ol, β-farnesene and carotol had antifungal effects against *F. oxysporum* isolates. Synergistic effects of the main constituents of essential oils showed that combing terpinen-4-ol with β-pinene induced a synergistic activity and combing terpinen-4-ol with γ-terpinene and also β-elemene with γ-terpinene caused an additive effect against were *F. oxysporum* isolates. This is the first report on the effect of essential oil compositions of native cumin seed populations on seed-borne fungi isolated from the same seeds. The findings of this research showed that amount and the type of constituents of essential oils of cumin seed populations are different and it can affect the abundance of seed-borne fungi and their level of pathogenicity.

Keywords: Cumin; Fusarium; Pathogenicity; Seed-borne; Synergistic effects; Terpinen-4-ol

How to cite this article

Khaledi, N. 2022. Investigation of constituents and antifungal effects of essential oils of native cumin seed populations on seed-borne fungi. Iranian Journal of Seed Science and Research, 8(4): 325-345. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2021.5283

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

*Corresponding author: n_khaledi@areeo.ac.ir