Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

48(2), Summer, 2025

10.22055/ppr.2025.49271.1800

Effect of extract and nano-extract of Bottle brush, *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels and Denak, *Oliveria decumbens* Vent on the control of citrus green mold, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc.

E. Helalipour [1], Sh. Zivdar [2*], M. Rahmati Jonidabad [3], Z. Mirsoleymani [4], M. Taki [5]

1. Ph.D. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (zivdar_s@scu.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
5. Associate Professor, Department of Agricultural Machinery and Mechanization, Faculty of Agricultural Engineering and Rural Development, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received: 18 March 2025 Revised: 21 April 2025 Accepted: 14 May 2025

Abstract

Background and Objectives

Green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., is a major fungal pathogen responsible for post-harvest rot in citrus fruits, leading to substantial economic losses _ sometimes as high as 90% in horticultural crops. The fungus spreads rapidly through asexual spores, and primarily infects fruits through wounds caused by insects, branches, or mechanical damage during handling and transport. Due to the adverse effects and residual toxicity of chemical fungicides, plant-based extracts and nano-extracts have emerged as promising alternatives for disease management. *Callistemon citrinus* an ornamental plant from the Myrtaceae family and *Oliveria decumbens* of the Apiaceae family are known to contain bioactive secondary metabolites, including phenolic compounds with antifungal properties. Additionally, green nanotechnology provides a sustainable strategy to enhance the effectiveness of natural antifungal agents while reducing environmental risks.

Materials and Methods

Two experiments were conducted in 2024 at the agricultural laboratories of Shahid Chamran University of Ahvaz, using a completely randomized design with three replications. The first experiment assessed the antifungal efficacy of ethanolic, methanolic and aqueous extracts of *C. citrinus* and *O. decumbens* at 50% and 100% concentrations against *P. digitatum*, alongside a commercial fungicide (carbendazim) and a control group. Antioxidant activity (DPPH%), total phenol content, and total flavonoid content of both the crude extracts and nano-extract were measured using standard laboratory methods. Tangerine fruits infected with green mold were collected from storage facilities in Ahvaz. The pathogen was isolated, purified and identified morphologically and molecularly. A spore suspension (10^6 spores. mL^{-1}) was prepared for antifungal assays. In the second stage, the most effective extract was selected, and its nano-extract was prepared using the sonication method. The inhibitory effects of the extract and its nano-form were compared against green mold growth. The

morphology, size, and distribution of the nanoparticles were analyzed using Transmission Electron Microscope (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS).

Results

The aqueous extract of *C. citrinus* at 100% concentration exhibited the highest inhibitory effect among the common extracts, with a growth inhibition of 5 mm. In contrast, the methanolic extracts of *C. citrinus* and *O. decumbens* at 50% concentration showed no inhibitory activity, with a growth zone of 32 mm, indicating no suppression of fungal growth. The commercial fungicide carbendazim exhibited a stronger inhibitory effect producing a growth inhibition zone of 28 mm, while the control group showed a zone of 32 mm. Results from the nano-extract synthesis indicated that 100% of the nanoparticles were spherical, had a uniform structure, and a diameter of less than 20 nanometers. The second experiment confirmed the superior efficacy of nano-extracts over conventional extracts. The nano-extract of *C. citrinus* produced the most significant inhibitory effect. In contrast, the weakest effects were observed with the common extracts of *O. decumbens* (49.16 mm). Additionally, the highest antioxidant activity (DPPH) was recorded in the nano-extracts of *O. decumbens* (74.35%) and *C. citrinus* (73.87%) at 100% concentration. The nano-extract of *C. citrinus* also recorded the highest total phenolic (283 mg g^{-1} gallic acid) and flavonoid (198.53 mg g^{-1} quercetin) content at the same concentration. Overall, the nano-extracts of both plants were more effective against *P. digitatum* than their common extract counterparts. Based on these findings, both the aqueous extract and nano-extract of *C. citrinus* demonstrated notable potential for the laboratory-scale control of green mold.

Discussion

In this study, the extract of *C. citrinus* demonstrated greater antifungal efficacy compared to that of *O. decumbens*. Previous research has emphasized that variations in plant genus and species, the nature of active compounds, the type of extract, and the method used for extracting bioactive components all influence the antimicrobial effectiveness of plant-based treatments. The superior performance of aqueous extracts over alcoholic ones extracts may be attributed to the higher sensitivity of certain fungal strains to water-soluble compounds. Furthermore, some antifungal compounds, such as glycosides are more effectively dissolved in water. In contrast, alcohol-based extraction processes may alter or inactivate structurally sensitive compounds. Nano extracts of *C. citrinus* and *O. decumbens* demonstrated significantly enhanced antifungal activity against green mold compared to their common extract forms. One key factor contribution to this improvement is particle size. In nano-extracts, reduced particle size increases the surface area of plant material exposed to the solvent, thereby accelerating mass transfer. In addition, nano-extracts exhibited higher antioxidant activity (DPPH%), as well as greater total phenolic and flavonoid content than common extracts, further contributing to their superior bioactivity.

Keywords: inhibitory effect, citrus rot, carbendazim, plant extract, antioxidant activity

Associate editor: M. Ziaee (Prof.)

Citation: Helalipour, E., Zivdar, Sh., Rahmati Jonidabad, M., Mirsoleymani, Z. & Taki, M (2025). Effect of extract and nano-extract of Bottle brush, *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels and Denak, *Oliveria decumbens* Vent on the control of citrus green mold, *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *48*(2), 75-95. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2025.49271.1800.

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٨، شماره ٢، تابستان ١٤٠٤

10.22055/ppr.2025.49271.1800

اثر عصاره و نانوعصاره شیشه‌شور، *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels و لعل کوهستان، *Oliveria decumbens* Vent بر کنترل بیماری کپک‌سبز مرکبات، *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc.

الهام هلالی پور [۱]، شهره زیودار [۲*]، مصطفی رحمتی جنیدآباد [۳]، زهرا میرسلیمانی [۴]، مرتضی تاکی [۵]

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران

۲-* **نویسنده مسوول**: استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران (zivdar_s@scu.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۴-استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران

۵-دانشیار، گروه مهندسی ماشین‌های کشاورزی و مکانیزاسیون، دانشکده مهندسی زراعی و عمران روستایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۴

چکیده

کپک سبز قارچ بیماری‌زای گیاهی و عامل پوسیدگی انباری میوه‌ها است و تا ۹۰ درصد سبب خسارت اقتصادی می‌شود. کاربرد ترکیباتی بر پایه عصاره و نانوعصاره‌های گیاهی به عنوان راهکاری موثر برای مقابله با آثار منفی کنترل شیمیایی، معرفی شده است. شیشه‌شور و لعل کوهستان گیاهانی حاوی متابولیت‌های ثانویه مؤثر هستند که خاصیت بازدارندگی بر رشد عوامل بیماری‌زای گیاهی دارند. بدین منظور پژوهشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در دانشگاه شهید چمران اهواز طی سال ۱۴۰۳ انجام شد. جدایه قارچ بیماری‌زا از میوه نارنگی آلوده جدا و پس از خالص‌سازی، شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی به‌کار برده شد. آزمایش در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول، اثر عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی شیشه‌شور و لعل کوهستان (با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ درصد) در مقایسه با قارچ‌کش کاربندازیم و شاهد (بدون عصاره) برکنترل کپک سبز بررسی شد. در مرحله دوم، موثرترین عصاره انتخاب شد و نانوعصاره آن به روش سونیکیشن تهیه و اثر بازداری عصاره‌ها در مقایسه با نانوعصاره آنها روی رشد کپک مورد بررسی قرار گرفت. شکل، اندازه و توزیع نانوذرات با روش آنالیز TEM و DLS ارزیابی شد. بیشترین اثر بازدارندگی از رشد کپک در عصاره آبی گیاه شیشه‌شور (غلظت ۱۰۰ درصد) با قطر هاله ۵ میلی‌متر مشاهده گردید و کمترین اثر بازدارندگی به عصاره‌های متانولی شیشه‌شور و لعل کوهستان (غلظت ۵۰ درصد) با قطر هاله ۳۲ میلی‌متر اختصاص داشت. قارچ‌کش کاربندازیم اثر بازدارندگی بیشتری (قطر هاله ۲۸ میلی‌متر) نسبت به شاهد با قطر هاله ۳۲ میلی‌متر نشان داد. نتایج ساخت نانوعصاره نشان داد که ذرات، شکل کروی، ساختار یکنواخت و قطر کمتر از ۲۰ نانومتر دارند. در آزمایش دوم بیشترین تاثیر بازدارنده برای عصاره نانو شیشه‌شور به میزان ۲/۵ میلی‌متر ثبت شد و کمترین تاثیر آن در عصاره معمولی لعل کوهستان (٤٩/١٦ میلی‌متر) بود که تفاوت معنی‌داری با شاهد (۵۰ میلی‌متر) نداشت. بیشترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نانوعصاره لعل کوهستان و شیشه‌شور (به ترتیب ۷٤/۳۵ و۷۳/۸۷ درصد) با غلظت ۱۰۰ درصد و بیشترین محتوای فنل و فلاونویید، به‌ترتیب به میزان ۲۸۳ میلی‌گرم بر گرم اسیدگالیک و ۱۹۸/۵۳ میلی‌گرم بر گرم کوئرسیتین در نانوعصاره شیشه‌شور با غلظت ۱۰۰درصد ثبت شد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، نانوعصاره دو گیاه نسبت به عصاره معمولی، اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد کپک سبز نشان دادند. همچنین عصاره آبی شیشه‌شور و نانوعصاره آن در کنترل کپک سبز در سطح آزمایشگاهی مؤثرتر شناخته شدند.

کلید واژه‌ها: اثر بازدارندگی، پوسیدگی مرکبات، کاربندازیم، عصاره گیاهی، فعالیت آنتی اکسیدانی

دبیر تخصصی: دکتر معصومه ضیائی

مقدمه

در مرحله پس از برداشت، از جمله جابجایی و حمل‌ونقل، ذخیره‌سازی و بازاریابی، میوه در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرد. پوسیدگی میوه و خطرات ایمنی غذایی ناشی از بیماری‌های قارچی، از جدی‌ترین مشکلات در این رابطه است. دما و رطوبت کنترل نشده، روند پوسیدگی پس از برداشت توسط میکروارگانیسم‌ها را تسریع می‌کند (Singh & Sharma, 2018). میوه مرکبات مستعد ابتلا به طیف گسترده‌ای از بیماری‌های قارچی پس از برداشت می‌باشند؛ زیرا حاوی سطوح بالایی از آب، قندها و مواد مغذی هستند و pH پایین آن‌ها باعث آسیب‌پذیری در برابر پوسیدگی قارچی می‌شود (Costa et al., 2019).کپک سبز، *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. از جمله بیماری‌های بسیار مهم مرکبات است که می‌تواند از طریق زخم ناشی از عوامل محیطی، مانند باد، تگرگ و حشرات یا در طول فرآیند برداشت وحمل و نقل میوه‌ها را آلوده نماید. این قارچ از طریق منافذ و زخم‌ها روی تعدادی از غدد چربی پوست پخش می‌شود که در آن مواد مغذی برای تحریک جوانه‌زنی هاگ موجود است. آلودگی به صورت یک لکه نرم آبکی روی پوست میوه ظاهر می‌شود و در صورت فراهم بودن دما و شرایط مناسب، به یک میسلیوم سفید تبدیل می‌شود و در ادامه با تولید اسپور به رنگ زیتونی تبدیل می‌شود (Costa et al., 2019).

بر اساس گزارش سازمان غذا و کشاورزی، کاربندازیم به عنوان یک قارچ‌کش پس از برداشت برای پسته، مرکبات، سیب و سایر میوه‌ها معرفی شده است. طبق گزارش‌های علمی، این قارچ‌کش در کنترل کپک‌های مرتبط با مرکبات، سیب، گلابی، هلو و انگور مؤثر بوده است (FAO, 2005) . استفاده از تیمارهای غیرشیمیایی منجر به سنتز متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضدقارچی (مانند پلی‌فنل‌ها، فیتوالکسین‌ها) در سطح میوه می‌شود. متابولیت های ثانویه گیاهی مانند فلاونوئیدها، تانن‌ها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، ترپن‌ها و ساپونین‌ها مسئول اصلی فعالیت ضدقارچی عصاره‌های گیاهی هستند (Jiang et al., 2015). حجم قابل توجهی از پژوهش‌ها در سرتاسر جهان برای بررسی تأثیر عصاره‌های گیاهی جهت کنترل بیماری‌های گیاهی و افزایش کیفیت محصولات باغی انجام شده است (Anjum et al., 2016). علاوه‌بر این، ترکیبات مؤثر گیاهی ممکن است اثرات مستقیمی بر رشد قارچ، اختلال در دیواره سلولی، مهار تنفس متابولیک و اختلال در آنزیم‌های مرتبط با تولید انرژی داشته باشند (Papoutsis et al., 2019). آگاهی نسبت به مشکلات زیست محیطی ناشی از کاربرد مواد شیمیایی به ویژه قارچکش‌ها و همچنین ایجاد مقاومت در بیماری‌زاها نسبت به آنها سبب شده تا روش‌های ایمن و مبتنی بر محیط زیست برای کنترل بیماری‌های گیاهی مورد توجه قرار گیرند. از جمله روش‌های جایگزین مهم، استفاده از ترکیبات طبیعی وگیاهی است. از جمله این روش‌ها، استخراج عصاره و اسانس گیاهان بومی هر منطقه با عوارض جانبی کمتر، خاصیت تجزیه‌پذیری بالا و پتانسیل قوی جهت کاربرد در صنایع پس از برداشت محصولات کشاورزی هستند (Chen et al., 2019). گرچه کنترل کپک سبز در حال حاضر در سطح تجاری با استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی مانند ایمازالیل، کاربندازیم، تیابندازول، فلودیوکسونیل و ... انجام می‌شود (Zhang et al., 2021)، اما استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی در کنترل بیماری‌های مرکبات، تاثیر مخربی روی سلامتی انسان دارد و سبب آسیب به محیط‌زیست به‌دلیل دوره تجزیه‌پذیری طولانی شده و در مقیاس گسترده منجر به ظهور مقاومت به قارچ‌کش در بین جمعیت‌های بیمارگر می‌شود. از سوی دیگر تقاضای مصرف‌کنندگان برای محصولات فاقد مواد شیمیایی افزایش یافته و محصولات حاوی بقایای شیمیایی فاقد بازارپسندی هستند (Sanchez, 2021).

لعل‌کوهستان، *Oliveria decumbens* Vent گیاهی از خانواده چتریان[1]، بومی جنوب و جنوب غرب ایران است (Mozaffarian, 2009). تحقیقات متعدد خواص ضدقارچی لعل کوهستان را بر *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Braga et al., 2007; Mahboubi et

1- Apiaceae

al., 2008) و نیز بر *Penicillium chrysogenum* NCIM-722 (Khajehie et al., 2017) مورد تأیید قرار داده‌اند. یکی دیگر از گیاهانی که دارای خاصیت ضدقارچی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است، گیاه شیشه‌شور، *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels از خانواده مورد[1] می‌باشد که پژوهش‌های پیشین، خواص فیتوشیمی و ترکیبات زیستی فعال در برگ و ساقه این گیاه را گزارش نموده‌اند (Cock, 2012; Shinde et al., 2012; Saad et al., 2017;).

عصاره‌های گیاهی با وجود کاربردهای گسترده در کنترل عوامل بیماری‌زا دارای معایبی نیز هستند که عملکرد و اثرگذاری آنها را محدود می کند. از جمله می‌توان به پایداری کم و ماندگاری محدود، سطح تماس و نفوذپذیری پایین و جذب محدود توسط غشاهای سلولی اشاره کرد. این محدودیت‌ها باعث شده‌اندکه محققان به سمت بهره‌گیری از فناوری نانو برای تهیه نانوعصاره آنها روی آورند. مزیت دیگر تبدیل عصاره‌ها به مقیاس نانو، تغییر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بیولوژیکی و کاتالیزوری آنها است، که به جذب بهتر و قدرت نفوذ بیشتر آنها به غشاهای سلولی کمک می‌کند (Manke et al., 2013). ترکیبات نانو به دلیل کاهش اندازه ذرات و افزایش سطح تماس، نیاز کمتر به سورفکتانت، بهبود جذب، پایداری عصاره‌ها و کاهش دوز مصرفی، توانسته است کارایی این ترکیبات را به طور قابل توجهی ارتقاء دهد (Rahmani et al., 2024). نانوذرات بسته به اندازه، ترکیب شیمیایی، شکل و زاویه انحنا، ساختار شیمیایی و ویژگی‌های سطح آنها، تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و آناتومیکی مختلفی را در گیاهان ایجاد می‌کنند. از دیدگاه سم‌شناسی نیز، اندازه ذرات و مساحت آنها دو ویژگی تاثیرگذار هستند، زیرا کاهش اندازه ذرات باعث افزایش سطح اتم‌ها یا مولکول‌ها بر روی لایه سطحی ذره می‌شود، این ویژگی‌های بر واکنش‌پذیری و توانایی عبور ذرات از موانع فیزیولوژیکی و زیستی تأثیر می‌گذارند (Djanaguiraman et al., 2024).

بر اساس مطالب ذکر شده، این تحقیق با هدف بررسی اثر بازدارندگی عصاره و نانوعصاره دو گیاه شیشه‌شور و لعل‌کوهستان بر رشد کپک سبز طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی جدایه‌های قارچی

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌های قارچی عامل کپک سبز و بررسی اثر عصاره‌ها بر رشد قارچ در آزمایشگاه‌های پس از برداشت گروه باغبانی و آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهیدچمران اهواز طی سال ۱۴۰۳ انجام شد. نمونه‌برداری، از میوه‌های نارنگی آلوده به کپک سبز در میوه فروشی‌های سطح شهرستان اهواز انجام شد. به منظور جداسازی و خالص‌سازی، ابتدا قطعاتی از بافت‌های آلوده به کپک سبز روی محیط کشت‌عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (عصاره ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی خرد شده،۲۰ گرم دکستروز، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) کشت داده و بعد از رشد پرگنه‌های موردنظر به محیط کشت آب‌آگار(۲۰گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) منتقل و پس از آن به روش نوک ریسه خالص‌سازی شد (Delshad &Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2020).

شناسایی ریخت شناسی و ملکولی جدایه‌های قارچی

شناسایی اولیه‌ی جدایه‌های منسوب به گونه *P. digitatum* براساس خصوصیات ماکروسکوپی (رنگ سطح و پشت پرگنه، رشد پرگنه، بافت پرگنه و میزان هاگزایی) و میکروسکوپی (شکل کنیدیوم‌ها، متولا، فیالد و کنیدیوفورها) با استفاده از تهیه اسلاید از محیط کشت عصاره جو آگار (MEA[2] حاوی اسید لاکتیک ۶۰ درصد) انجام شد (Frisvad & Samson 2004). قطعاتی به قطر تقریبی پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی جوان پرگنه‌های جدایه‌های منتخب منسوب به گونه *P. digitatum* به منظور تایید و شناسایی مولکولی در محیط کشت مایع PD (عصاره سیب زمینی) در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از این عصاره کشت داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۱۰-۱۴ روز

1- Myrtaceae

2 - Malt extract agar

پرگنه‌های رشد یافته در این عصاره سرماخشک شده و به منظور استخراج دی‌اِن‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور استخراج دی‌اِن‌ای جدایه منتخب، به پنج میلی‌گرم از میسلیوم سرما خشک شده هر جدایه، ۱۸۰ میکرولیتراز بافر استخراج محتوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر سی-تب[1] (۰/۱۲۱ گرم تریس، ۰/۰۷۴ گرم ای‌دی‌تی‌آ، ۰/۸۱۸ گرم نمک‌طعام، ۰/۲ گرم سی‌تب، آب‌مقطر تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر) حاوی ۰/۲ درصد ۲- مرکاپتواتانول و ۰/۲ درصد پروتئیناز کی (فرمنتاز، بریتانیا) افزوده شده، میسلیوم‌ها با استفاده از هموژنایزر و چند دانه ماسه سترون به خوبی ساییده شدند. عصاره به دست آمده به مدت یک ساعت در۶۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. سپس به مدت ده دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و مایع رویی برداشته شد. در ادامه استخراج دی‌اِن‌ای از ۱۰۰ میکرولیتر عصاره یاخته به دست آمده، با استفاده از کیت DNA™- PLUS (سیناژن، ایران) انجام گرفت. رسوب دی‌اِن‌ای در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. دی‌اِن‌ای حاصل در۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa., 2013). دی‌اِن‌ای به دست آمده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) و ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) انجام شد (White et al., 1990). چرخه‌های دمایی و میزان دما طبق گزارش طراحان آغازگرهای عمومی تنظیم گردید (White et al., 1990). نواحی فزون سازی شده به شرکت کدون ژنتیک تهران ارسال و توالی‌یابی گردید. توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نرم افزار Bioedit (Hall, 1999) با مقایسه نسخه مستقیم و معکوس ویرایش شده، رشته برآیند به دست آمد. رشته برآیند سپس از طریق آزمون بلاست مورد بررسی قرار گرفت و صد در صد همسانی را با سایر جدایه‌های گونه‌ی *P. digitatum* موجود در بانک ژن نشان داد. رشته‌های برآیند پس از ارائه به بانک ژن[2] از طریق وب جهانی با استفاده از نرم‌افزار BanKit[3] بررسی و رَس‌شمار (PV202579) اخذ گردید.

پس از تهیه قرص مسیلیومی قارچ عامل کپک سبز و غوطه‌ور کردن قرص کاغذی استریل در عصاره گیاهی، اندازه‌گیری قطر رشد پرگنه با روش انتشار قرص استریل انجام شد (Barzegar et al., 2018). بدین منظور پس از محاسبه قطر کلنی‌های قارچ، قطر قرص‌ها کسر و برحسب میلی‌متر گزارش گردید.

مرحله اول آزمایش

در این آزمایش ارزیابی فعالیت ضدقارچی (درصد بازدارندگی رشد پرگنه کپک سبز) عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی شیشه‌شور و لعل‌کوهستان (با غلظت ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد محلول پایه (با غلظت ۲۰ درصد)) در مقایسه با قارچ‌کش شیمیایی کاربندازیم و شاهد (تیمار بدون عصاره گیاهی) در ظروف پتری و براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای مورد استفاده در آزمایش اول در جدول۱ ارائه شده است.

تهیه عصاره گیاهی

جهت تهیه عصاره، برگ درختچه شیشه‌شور در فصل رشد فعال (فروردین) از فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز (31.3033° N, 48.6564° E) و گیاه لعل کوهستان (اردیبهشت) از شهرستان باغملک (31.5260° N, 49.8906° E) جمع آوری شد و پس از شستشوی سطحی و ضدعفونی(با هیپوکلریت دو درصد به مدت یک دقیقه و سپس سه مرتبه شستشو با آب مقطر سترون)، در شرایط آزمایشگاه و دور از نور مستقیم آفتاب خشک گردید (El-Samawaty et al., 2021). برای تهیه عصاره‌ها (آبی، اتانولی و متانولی)، نمونه بافت گیاه به‌طور

1- Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)

2- GenBank, NCBI, USA; [Online] http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3- (GenBank, NCBI, USA; [Online] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/)

کامل پودر و میزان ۲۰ گرم از هر نمونه در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال (۱- آب مقطر (۱۰۰ میلی‌لیتر)، ۲- اتانول۵۰ درصد (۴۸ میلی‌لیتر آب مقطر+ ۵۲ میلی‌لیتر اتانول۹۶درصد) ۳- متانول (آریاطب، USP)۵۰ درصد (۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر+ ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۹۹/۸درصد) خیسانده شد. محلول‌های حاصل به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر (Shaker Rotator RT 405 ساخت شرکت بهسان، ایران) قرار گرفت و در مرحله بعد توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. سپس در سانتریفیوژ با ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه جهت برداشتن محلول رویی قرار گرفت. عصاره حاصل به¬عنوان محلول پایه (استوک) در نظر گرفته شد، سپس از این محلول، ۵۰ سی سی برداشته شد وپس از رساندن به حجم ۱۰۰ سی سی، غلظت ۵۰ درصد حاصل و در یخچال نگه¬داری شد (Ashrafpour et al., 2015). در این آزمایش از قارچ¬کش شیمیایی کاربندازیم (50% WP) محصول شرکت آریاشیمی به میزان ۰/۵ در هزار جهت مقایسه با شاهد و عصاره گیاهی استفاده شد.

مرحله دوم آزمایش

در آزمایش دوم بهترین نوع و غلظت عصاره¬ گیاهی براساس نتایج حاصل از آزمایش اول انتخاب و ترکیب نانوعصاره ¬تهیه شد. این آزمایش براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار شامل تیمارهای (شاهد، عصاره معمولی(آبی) و نانو¬عصاره) از عصاره‌های موردنظر انجام شد (جدول ۲). در این مرحله، اثر بازداری از رشد پرگنه برای عصاره¬های هر دو گیاه، با هدف تشخیص عصاره برتر سنجیده ¬شد (Alizadeh Behbahani et al., 2014).

تهیه و سنجش نانوعصاره

برای تهیه نانو¬عصارهٔ گیاهان مورد نظر، از روش سونیکیشن استفاده شد. حجم پنج میلی¬لیتر از عصاره¬ گیاهی از طریق فیلتر سرنگ ۰/۲۲ میکرومتر به ۱۰ میلی¬لیتر آب مقطر حاوی ۵ درصد توئین ۸۰ اضافه و ترکیب حاصل به مدت ۲۰ دقیقه تحت خنک¬سازی یخ در امواج فراصوت با استفاده از دستگاه آلتراسونیک پروب دار (مدل Parsonic 11S ، پارس نهند، ایران، ۲۸کیلوهرتز) برای تشکیل نانوقطراتی همگن، پراکنده شدند (Ghazy et al., 2021). سنجش شکل و یکنواختی ذرات با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (مدل LEO 906E، آلمان) و اندازه و توزیع ذرات ترکیب حاصل با استفاده از دستگاه DLS (Malvern company: zetasizer nano serie zs ، انگلیس) انجام شد.

جدول ۱- تیمارهای آزمایش اول: عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی شیشه‌شور و لعل‌کوهستان با غلظت ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد، شاهد (آب مقطر) و کاربندازیم

Table 1. Treatments in the first experiment: Aqueous, ethanol and methanol extracts of *Callistemon citrinus* and *Oliveria decumbens* at 50 % and 100 % concentrations, control (distilled water) and carbendazim

Treatments	Abbreviated names
Distilled water	Control
Carbendazim	Carbend
Aqueous extract. *Callistemon citrinus* 50 % concentration	Aq.cal.50
Aqueous extract. *Callistemon citrinus* 100 % concentration	Aq.cal.100
Ethanol extract. *Callistemon citrinus* 50 % concentration	Et.cal.50
Ethanol extract. *Callistemon citrinus* 100 % concentration	Et.cal.100
Methanol extract. *Callistemon citrinus* 50 % concentration	Me.cal.50
Methanol extract. *Callistemon citrinus* 100 % concentration	Me.cal.100
Aqueous extract. *Oliveria decumbens* 50 % concentration	Aq.oli.50
Aqueous extract. *Oliveria decumbens* 100 % concentration	Aq.oli.100
Ethanol extract. *Oliveria decumbens* 50 % concentration	Et.oli.50
Ethanol extract. *Oliveria decumbens* 100 % concentration	Et.oli.100
Methanol extract. *Oliveria decumbens* 50 % concentration	Me.oli.50
Methanol extract. *Oliveria decumbens* 100 % concentration	Me.oli.100

جدول ۲- تیمارهای آزمایش دوم: عصاره‌های معمولی و نانوعصاره شیشه شور و لعل کوهستان با غلظت ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد و شاهد (آب مقطر)

Table 2. Treatments in the second experiment: Common and nano extracts of Callistemon citrinus and Oliveria decumbens at 50 % and 100 % concentrations and control (distilled water)

Treatments	Abbreviated names
Distilled water	Control
Aqueous common extract. *Callistemon citrinus* 50% concentration	Cal.aq.com.50
Aqueous common extract. *Callistemon citrinus* 100% concentration	Cal.aq.com.100
Aqueous nano extract. *Callistemon citrinus* 50% concentration	Cal.aq.na.50
Aqueous nano extract. *Callistemon citrinus* 100% concentration	Cal.aq.na.100
Ethanol common extract. *Oliveria decumbens* 50% concentration	Oli.et.com.50
Ethanol common extract. *Oliveria decumbens* 100% concentration	Oli.et.com.100
Ethanol nano extract. *Oliveria decumbens* 50% concentration	Oli.et.na.50
Ethanol nano extract. *Oliveria decumbens* 100% concentration	Oli.et.na.100

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید و فنل کل عصاره‌ها

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید و فنل کل، از نمونه بافت خشک گیاهی، عصاره الکلی تهیه شد. برای عصاره‌گیری، یک گرم از بافت مورد نظر با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن و به مدت دو ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از آن، نمونه‌ها در شرایط ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)[1]، مخلوطی به نسبت یک به یک از محلول پیکریل هیدرازیل و عصاره تهیه شده از گیاه، آماده شد. درصد بازداری یا درصد از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن (درصد کل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی)، طبق رابطه ۱ محاسبه گردید (Sun et al., 2007).

رابطه ۱:

$$\text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی} = [((A - B)/A) \times 100]$$

A = میزان جذب شاهد

B = میزان جذب عصاره

اندازه‌گیری فلاونوئید کل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu-UV 1201، ژاپن) به روش Chang et al. (2002) انجام شد. برای تهیه منحنی استاندارد فلاونوئید مقادیر ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کوئرسیتین[2] تهیه شد و میزان فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم (وزن خشک) محاسبه شد. اندازه‌گیری فنل کل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، طبق روش (McDonald et al. 2001) انجام شد. تهیه محلول‌های استاندارد بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک[3] بر گرم وزن خشک انجام شد. روش‌های فوق برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید و فنل کل نانوعصاره‌های دو گیاه نیز استفاده شد.

تجزیه‌وتحلیل

در ابتدا منحنی توزیع نرمال برای داده‌های صفات مختلف ترسیم و نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه عامل و سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Statistica نسخه ۸/۱ تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین از آزمون تکمیلی LSD در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

فعالیت ضدقارچی آزمایش اول

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت بازدارندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی شیشه شور و لعل کوهستان بیانگر معنی‌دار بودن اثر نوع عصاره گیاهی و اثر برهمکنش نوع گیاه و غلظت کاربرد عصاره در سطح احتمال پنج درصد است ($P \leq 0.05$). همچنین اثر نوع حلال، غلظت و اثرات برهم‌کنش آنها، اثر برهمکنش نوع گیاه × غلظت کاربرد عصاره و اثرات برهم‌کنش سه‌گانه نوع گیاه × نوع حلال ×

1- Diphenyl picrylhydrazyl (DPPH)
2- Quercetin
3- Gallic acid

غلظت کاربرد عصاره در سطح احتمال $P \leq 0.01$ معنی‌دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین اثرات برهم‌کنش سه‌گانه در رابطه با فعالیت ضدقارچی عصاره‌ها نشان داد، عصاره آبی شیشه‌شور با غلظت ۱۰۰ درصد بیشترین اثر بازدارندگی رشد پرگنه را به میزان ۵ میلی‌متر نشان داد که نسبت به شاهد (آب مقطر) ۲۷ میلی‌متر و در مقایسه با قارچکش (کاربندازیم) ۲۳ میلی‌متر رشد کمتری نشان داد. تمام عصاره‌های متانولی دو گیاه و نیز عصاره‌های اتانولی آنها در غلظت ۵۰ کمترین اثر را بر رشد پرگنه کپک سبز داشتند. کمترین اثر در عصاره متانولی شیشه‌شور و لعل‌کوهستان در غلظت۵۰ درصد به میزان ۳۲ میلی‌متر بود که تفاوت معنی‌دار با شاهد نداشت. عصاره اتانولی لعل‌کوهستان با غلظت ۱۰۰ درصد بیشترین اثر را در میان تیمار عصاره‌های اتانولی (۱۵/۶۷ میلی‌متر) داشت. قارچ‌کش کاربندازیم (۲۸ میلی‌متر) نسبت به شاهد اثر کنترل‌کنندگی بیشتری نشان داد (چهار میلی‌متر کمتر از شاهد). فعالیت ضدقارچی عصاره آبی شیشه‌شور و عصاره اتانولی لعل‌کوهستان در غلظت‌های مختلف به همراه شاهد در شکل ۱ نشان داده شده است (شکل ۱). طبق نتایج آزمایش اول، عصاره آبی شیشه‌شور و عصاره اتانولی لعل‌کوهستان جهت تهیه نانوعصاره به‌همراه تیمار شاهد برای آزمایش دوم انتخاب شدند.

سنجش نانوذرات

با توجه به نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، یکنواختی و کروی بودن ذرات اثبات گردید (شکل ۲). طبق نتایج منحنی DLS ، در نانوعصاره هر دو گیاه لعل‌کوهستان و شیشه‌شور، ۱۰۰ درصد ذرات تشکیل دهنده، قطر کمتر از ۲۰ نانومتر را نشان دادند (شکل ۳).

فعالیت ضدقارچی آزمایش دوم

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از فعالیت بازدارندگی عصاره معمولی و نانوعصاره شیشه شور و لعل کوهستان در جدول ۵ ارائه شده است. اثر نوع گیاه، نوع عصاره، غلظت و اثر برهم‌کنش نوع گیاه × نوع عصاره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$)، در حالی‌که سایر اثرات برهم‌کنش دوگانه و نیز اثرات برهم‌کنش سه‌گانه معنی‌دار نبودند ($P> 0.05$). (جدول ۵). بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثرات برهم‌کنش نوع گیاه و عصاره در رابطه با فعالیت بازدارندگی، عصاره‌های نانو هر دو گیاه بر بازدارندگی رشد پرگنه نسبت‌به نوع معمولی عصاره‌ها، اثر معنی‌دار و بیشتری داشتند ($P \leq 0.01$). همچنین گیاه شیشه‌شور در هر دو نوع عصاره کارایی و اثر بازداری بیشتری نسبت‌به عصاره‌های لعل‌کوهستان نشان داد (جدول ۶). بیشترین اثر کنترل‌کنندگی در عصاره نانو و معمولی شیشه‌شور به ترتیب به میزان ۲/۵ و ۴/۱۶ میلی‌متر ثبت شد. کمترین تاثیر آن در عصاره معمولی لعل‌کوهستان (۴۹/۱۶ میلی‌متر) بود که تفاوت معنی‌داری با شاهد (۵۰ میلی‌متر) نداشت (جدول ۶). فعالیت ضد قارچی عصاره آبی شیشه‌شور و عصاره اتانولی لعل‌کوهستان روی رشد کپک سبز در شکل ۴ نشان داده شده است (شکل ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از فعالیت بازدارندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی شیشه شور و لعل کوهستان روی رشد کپک سبز *Penicillium digitatum*

Table 3. Analysis of variance of data resulted from the inhibitory activity of aqueous, ethanol and methanol extracts of *Callistemon citrinus* and *Oliveria decumbens* on *Penicillium digitatum*

Source of variations	df	Mean squared
Replication	2	1.08
Plant	1	13.44*
Solvent	2	1014.25**
Concentration	1	256.00**
Plant * Solvent	2	171.69**
Plant * Concentration	1	18.78*
Solvent * Concentration	2	54.75**
Plant * Solvent* Concentration	2	44.19**
Error	22	2.45
CV	6.61	

*, **: significant at 5 and 1 % level respectively.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فلاونوئید و فنل عصاره

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فلاونوئید کل و محتوای فنل کل عصاره‌های معمولی و نانوعصاره شیشه شور و لعل کوهستان (جدول۵)، بیانگر تاثیر معنی‌دار نوع گیاه، نوع عصاره، غلظت، اثرات برهم‌کنش دوگانه و سه گانه بین همه فاکتورها معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$)، اما اثر برهم‌کنش نوع گیاه × غلظت بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) . بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به ترتیب برای نانوعصاره لعل-کوهستان با غلظت ۱۰۰درصد (۷۴/۳۵ درصد) و نانو عصاره شیشه‌شور با غلظت ۱۰۰ درصد (۷۳/۸۷ درصد) مشاهده شد، که تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نشان ندادند و کمترین آن در غلظت ۵۰ درصدعصاره معمولی شیشه‌شور بود. بیشترین میزان فلاونوئید در غلظت ۱۰۰ درصد نانوعصاره شیشه‌شور به مقدار ۱۹۸/۵۳ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم و کمترین میزان آن به مقدار ۴۵/۵۳ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم در غلظت ۵۰ درصد عصاره معمولی لعل‌کوهستان مشاهده شد. عصاره‌های نانو نسبت به نوع معمولی میزان بیشتری از فلاونویید نشان دادند به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ درصد نانو عصاره لعل‌کوهستان ۱۸۶ و در نوع معمولی آن ۸۶/۵۷ میلی‌گرم کوئرسیتین برگرم مشاهده شد. بیشترین فنل در نانو عصاره شیشه‌شور با غلظت ۱۰۰ درصد وکمترین در غلظت ۵۰ درصد عصاره معمولی لعل‌کوهستان به‌ترتیب با مقدار ۲۸۳ و۹۶/۲۷ میلی‌گرم گالیک‌اسید برگرم مشاهده شد. عصاره‌های نانو شیشه‌شور نسبت به نوع معمولی میزان بیشتری از فنل نشان دادند (جدول ۶).

بحث

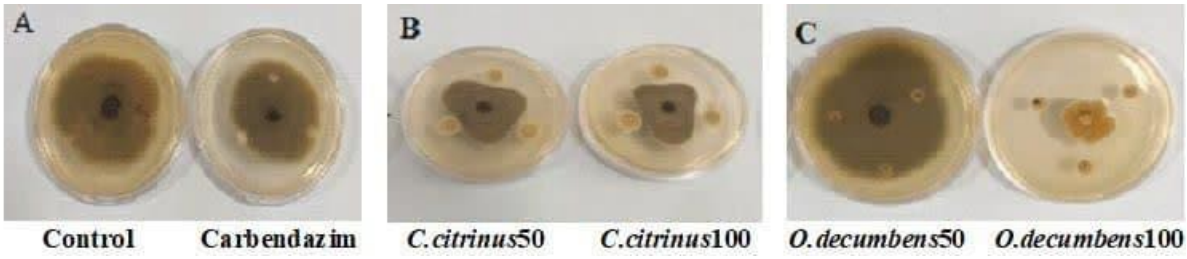
در دنیای امروز افزایش آگاهی نسبت به مشکلات و تهدیدهای زیست محیطی ناشی از استفاده از مواد شیمیایی و قارچکش‌ها و همچنین ایجاد مقاومت نسبت به آنها سبب شده تا پژوهشگران به دنبال روش‌های ایمن و مبتنی بر محیط زیست برای کنترل بیماری‌های گیاهی باشند. در تحقیق حاضر، در شرایط آزمایشگاهی اثرضدقارچی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی دو گیاه شیشه شور و لعل کوهستان در مقایسه با قارچکش کاربندازیم، برای جلوگیری از رشد کپک سبز مرکبات مورد بررسی قرار گرفت، سپس موثرترین عصاره انتخاب و اثر بازداری از رشد کپک، در مقایسه با نانوعصاره آنها مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ٤- مقایسه میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت بازدارندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی شیشه‌شور و لعل‌کوهستان با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ درصد روی رشد کپک سبز

Table 4. Comparison of mean (± standard error) of inhibitory activity of aqueous, ethanol and methanol extracts of *Callistemon citrinus* and *Oliveria decumbens* at 50 % and 100 % concentrations on green mold (*Penicillium digitatum*) growth

		Solvent	Plant	Concentration (%)	Inhibitory activity (mm)
Treatments		Methanol	*Callistemon citrinus*	50	32.00 ± 0.00 [a]
				100	31.67 ± 0.33 [a]
			Oliveria decumbens	50	32.00 ± 0.00 [a]
				100	30.67 ± 0.66 [ab]
		Ethanol	*Callistemon citrinus*	50	30.33 ± 0.33 [ab]
				100	26.67 ± 0.66 [b]
			Oliveria decumbens	50	30.66 ± 0.66 [ab]
				100	15.67 ± 2.60 [d]
		Aqueous	*Callistemon citrinus*	50	12.67 ± 0.66 [d]
				100	5.00 ± 0.57 [e]
			Oliveria decumbens	50	20.33 ± 0.33 [c]
				100	16.33 ± 0.33 [cd]
Controls	Distilled water	-	-	-	32.00 ± 0.00 [a]
	Carbendazim	-	-	-	28.00 ± 0.57 [b]

Means with the same small letter are not significantly different based on Duncan test (α=0.05)



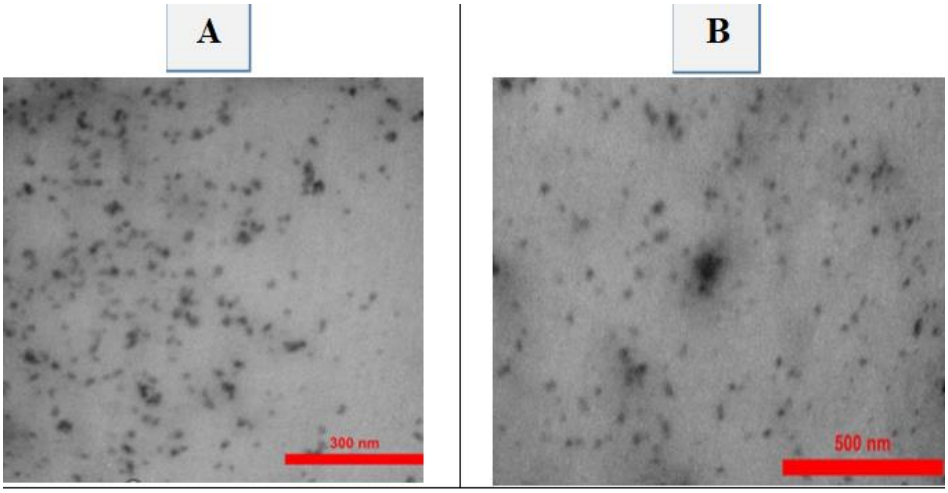
شکل ۱- فعالیت ضد قارچی A) کاربندازیم، B) عصاره آبی *Callistemon citrinus*، C) عصاره اتانولی *Oliveria decumbens* بر *Penicillium digitatum*.

Figure 1. Antifungal activity of A) Carbendazim, B) Aqueous extract of *Callistemon citrinus*, C) Ethanol extract of *Oliveria decumbens* on *Penicillium digitatum*.

با توجه به نتایج، عصاره آبی شیشه‌شور با غلظت ۱۰۰ درصد بیشترین اثر بازدارندگی (قطر هاله ۵ میلی‌متر) را داشت، همچنین هر دو گیاه در غلظت ۱۰۰ درصد بیشترین اثر بازدارندگی را بر رشد پرگنه کپک سبز نسبت به سایر تیمارها داشتند. اگرچه گزارش های زیادی بر مؤثر بودن عصاره‌های الکلی در کنترل قارچ‌ها دلالت دارند، اما تأثیر عصاره‌های آبی در شماری از تحقیقات نیز گزارش شده است. دلایل مؤثر بودن عصاره آبی نسبت به عصاره‌های الکلی را می‌توان به این مسأله مرتبط دانست که برخی سویه‌های قارچ نسبت به ترکیبات محلول در آب حساسیت بیشتری دارند و یا برخی ترکیبات فعال در گیاهان مانند ترکیبات گلیکوزیدی که اثر ضدقارچی دارند در آب بهتر حل می شوند. علاوه بر این ممکن است فرایند استخراج با الکل، ساختار برخی ترکیبات حساس را تغییر دهد یا آن‌ها را غیرفعال کند. در پژوهشی دیگر، عصاره متانولی و کلروفرم حاصل از شیشه‌شور *C. citrinus*، فعالیتی را در برابر سویه‌های قارچی نشان نداد (Shinde et al., 2012). در پژوهشی، اثر عصاره آبی و الکلی اسطوخودوس، رازیانه، پونه آبی، آویشن شیرازی و اکالیپتوس بر کپک خاکستری سیب نشان داد که عصاره آبی اسطوخودوس (با ۲۲ میلی‌متر قطر) سبب ممانعت از قارچ بیماری‌زا و دارای بیشترین اثرکنترل‌کنندگی بود (Gholamnezhad, 2017). نتایج این پژوهش‌ها از دیدگاه اثر بازدارندگی بالاتر عصاره آبی، نسبت به عصاره الکلی، با نتایج پژوهش حاضر همسویی دارد. در گزارشی دیگر نیز عصاره آبی و الکلی سیر با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای بیشترین اثر کنترل‌کنندگی روی کپک سبز پرتقال بود (Gholamnezhad et al., 2019). در هر صورت، ترکیبات اصلی تشکیل دهنده عصاره آبی شیشه‌شور نیاز به شناسایی و تعیین مقدار توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع متصل به طیف‌سنج جرمی دارند. بر اساس نتایج آزمایش اول، در مرحله دوم، عصاره‌های آبی، فقط برای گیاه شیشه‌شور مورد بررسی قرار گرفتند و همانطور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود عصاره آبی گیاه شیشه‌شور حاوی فعالیت آنتی اکسیدانی (۶۸/۷۳ درصد)، فلاونوئید (۱۵۶/۹۹ میلی‌گرم کوئرسیتین برگرم) و فنل بالایی (۲۳۶ میلی‌گرم گالیک‌اسید برگرم) می باشد.

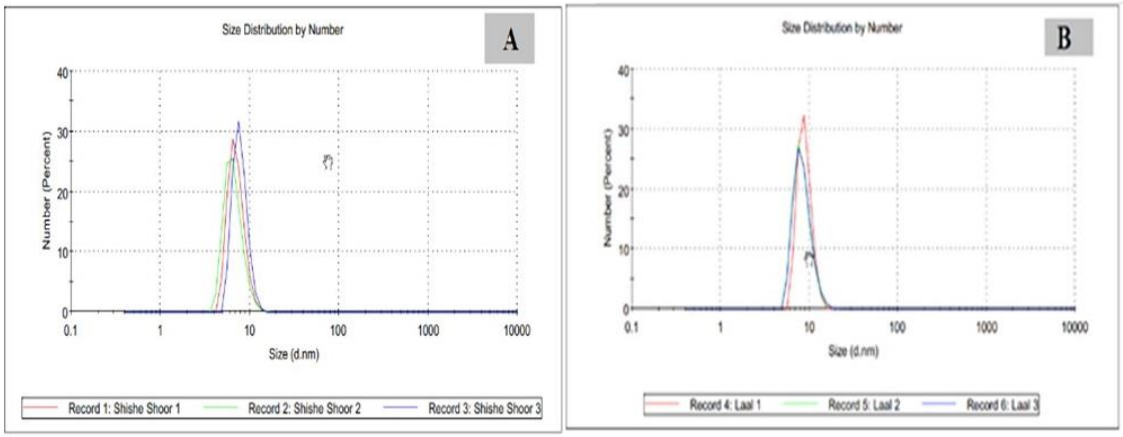
در این پژوهش، عصاره گیاه شیشه‌شور، کارایی بیشتری نسبت به عصاره لعل‌کوهستان نشان داد. در پژوهش‌های مختلف به تفاوت در جنس و گونه گیاهان، ترکیبات موثر آنها، نوع عصاره و روش استخراج مواد مؤثر آنها و اثر همه این عوامل بر فعالیت بیماری‌زاها اشاره شده است. در آزمایشی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف *C. citrinus* در برابر *Candida Albicans* با نواحی بازدارندگی از ۸/۵ تا میلی‌متر ۲۱ متغیر بود (Bleeson et al., 2014). ترکیبات زیستی اثرات ضد میکروبی خود را به روش‌های مختلف اعمال می‌کنند. به عنوان مثال، آلکالوئیدها با DNA ترکیب می‌شوند و توپوایزومراز را مهار می‌کنند، بنابراین از سنتز DNA ممانعت می‌کنند. در پژوهشی دیگر گزارش شده است که آلکالوئیدهای *C. citrinus* اثر بازدارنده را در برابر *S.aureus* و *P. areuginosa* از طریق مهار

پمپ‌های خروجی وابسته به ATP نشان دادند (Mabhiza et al., 2016). اسید تورمنتیک نوعی متابولیت ثانویه است که از گیاهان مختلف از جمله شیشه‌شور جدا شده است و مشخص شده که دارای خواص ضد میکروبی از جمله فعالیت ضد قارچی است (Bvumbi et al , 2021). در پژوهشی اثرات سمیت عصاره پونه کوهی بیشتر از آویشن کوهی گزارش شد و میزان سمیت عصاره با غلظت عصاره رابطه مستقیم داشت (Shazdeahmadi & Sajjadi, 2022). مطالعه اثر اسانس شیشه‌شور، در شرایط آزمایشگاهی‌درکنترل *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan)Shomaker و *Alternaria padwickii* (Ganguly) نشان داد که اسانس با درجات مختلفی از رشد میسلیوم این دو بیمارگر جلوگیری می‌کند (Dongmo, 2023). احتمالا اثر ضدقارچی شیشه‌شور در پژوهش حاضر نیز تحت‌تاثیر اسیدتورمنتیک قرار گرفته باشد که نیازمند انجام آزمایشات تکمیلی و تجزیه دقیق با روش‌های کروماتوگرافی می‌باشد.



شکل۲- تصویرمیکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانو ذرات سنتز شده از A: عصاره آبی برگ شیشه‌شور و B: عصاره اتانولی لعل کوهستان به ترتیب با بزرگنمایی ۳۰۰ و ۵۰۰ نانومتر

Figure 2. TEM image of the synthesized nano particles from Aqueous extract of *Callistemon citrinus* leaf and B: Ethanol extract of *Oliveria decumbens*, with magnification of 300 and 500 nm



شکل ۳- تصویر DLS از نانوذرات سنتز شده A: عصاره آبی برگ شیشه‌شور و B: عصاره اتانولی لعل کوهستان

Figure 3. DLS images of synthesized nanoparticles A: Aqueous extract of *Callistemon citrinus* leaf and B: Ethanol extract of *Oliveria decumbent*

نتایج این آزمایش نشان داد که عصاره اتانولی لعل-کوهستان در غلظت ۱۰۰ درصد بیشترین اثر بازدارندگی (قطر هاله ۱۵/۶۶ میلی‌متر) را در میان عصاره‌های اتانولی ایجاد می‌کند. به طوریکه در جدول ۷ نیز مشاهده می‌شود، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوای فنل در عصاره اتانولی لعل‌کوهستان با غلظت ۱۰۰ درصد از سطح بالایی برخوردار می‌باشد. خواص محافظ گیاه اسانس لعل‌کوهستان حاکی از اثرات ضدقارچی و حشره‌کشی آن در کنترل آفات محصولات کشاورزی است (Bahraminejad et al., 2016; Moghadam et al., 2018). از جمله مهم‌ترین ترکیبات ثانویه شناخته شده در گیاه لعل‌کوهستان می‌توان به‌وجود اسانس، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و تانن‌ها اشاره نمود (Khosravinezhad et al., 2017). خواص و ماهیت شیمیایی ترکیبات تشکیل‌دهنده مواد مؤثره، خواص بیولوژیکی آنها را تعیین می‌کنند. با وجود کاربردهای سنتی عصاره و اثرات بیولوژیکی گزارش شده در تحقیقات اخیر، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه شناخت ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره گیاه لعل‌کوهستان صورت نگرفته است.

در پژوهش حاضر قارچ¬کش کاربندازیم نسبت به شاهد اثر یازدارندگی بیشتری نشان داد، اما نسبت به عصاره آبی هر دو گیاه، بازدارندگی کمتری نشان داد. دلیل کم اثر بودن کلی این قارچ¬کش را می¬توان به مقاومت جدایه قارچ مورد بررسی به این قار¬چ¬کش پیوند داد. پژوهش¬های متعددی در خصوص مقاومت جدایه¬های کپک سبز به هم¬خانواده شیمیایی کاربندازیم (بنزیمیدازول¬ها) از جمله تیابندازول انجام شده است (El-goorani et al., 1984). همچنین مقایسه اسانس رازیانه، کاربندازیم و تیابندازول بر میزان پوسیدگی ناشی از Penicillum sp بر میوه سیب رقم گلدن دلیشز نشان داد که تیمار اسانس رازیانه با غلظت ۱۲۰۰ میلی¬گرم بر لیتر کمترین میزان پوسیدگی را نسبت به دو قارچ¬کش شیمیایی نشان داد (Sami et al., 2012). پژوهش دیگری اثر کاربندازیم را در مقایسه با دی تیوکاربامات، پلی¬رام، دیتان و تیابندازول برای کنترل P. expansum گلابی در ظروف پتری¬ بررسی و نتایج نشان داد، درصد کارایی کنترل کاربندازیم بر سویه قارچی مورد مطالعه کمتر از سایر قارچ¬کش¬های نامبرده بود (Baviskar & Dekate, 2016). در پژوهشی اثر چندین قارچ¬کش شیمیایی ازگروه بنزیمیدازول بر کنترل P. digitatum، نیز ایجاد مقاومت به تیابندازول را تایید کرد (Khatir et al., 2024).

جدول ۵- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از فعالیت بازدارندگی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فلاونوئیدکل و محتوای فنل کل عصاره‌های معمولی و نانوعصاره شیشه شور و لعل کوهستان

Table 5. Analysis of variance of data resulted from the inhibitory activity, antioxidant activity, total flavonoid and total phenol of common and nano extracts of *Callistemon citrinus* and *Oliveria decumbens*

Source of variations	df	Mean squared			
		Inhibitory activity	Antioxidant activity	Total flavonoid	Total Phenol
Replication	2	3.79	0.51	1.5	3.2
Plant	1	6337.50**	10.11**	7743.3**	38897.6**
Extract	1	1204.17**	483.66**	15444.7**	4.0**
Concentration	1	54.00**	8009.57**	32379.0**	40854.0**
Plant * Extract	1	937.50**	1402.09**	28.59.9**	15.697**
Plant * Concentration	1	16.66^{ns}	0.63^{ns}	336.98**	1201.3**
Extract * Concentration	1	1.589^{ns}	112.93**	2340.6**	4653.7**
Plant * Extract * Concentration	1	0.66^{ns}	1313.06**	304.0**	3606.4**
Error	14	4.83	0.59	0.5	2.6
CV		11.23	1.43	0.62	0.94

ns: no significant, **: significant at 1 % level

جدول ٦- مقایسه میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت بازدارندگی عصاره معمولی و نانوعصاره شیشه شور و لعل کوهستان و شاهد روی رشد کپک سبز

Table 6. Comparison of mean (± standard error) of inhibitory activity (mm) of common and nano extracts of Callistemon citrinus and Oliveria decumbens and control on green mold (Penicillium digitatum) growth

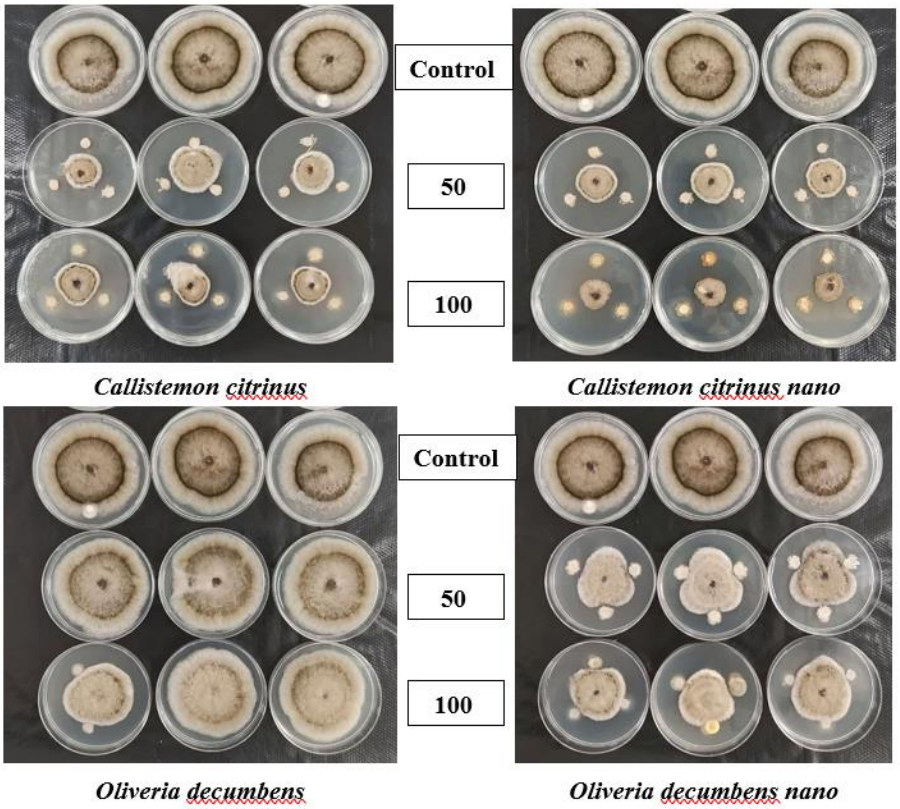
Treatments	Extract	Plant	Inhibitory activity (mm)
	Common	*Callistemon citrinus*	4.16 ± 0.98[c]
		Oliveria decumbens	49.16 ± 0.40[a]
	Nano	*Callistemon citrinus*	2.50 ± 1.35 [c]
		Oliveria decumbens	22.50 ± 1.38 [b]
Control	Distilled water		50 ± 0.57 [a]

Means with the same small letter are not significantly different based on Duncan test (α=0.05)

نتایج آزمایش دوم نشان داد که نانوعصاره دو گیاه اثر بازدارندگی معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بر رشد پرگنه نسبت به نوع معمولی آنها داشتند. بیشترین اثر بازدارندگی در عصاره نانو شیشه‌شور با غلظت ۱۰۰ درصد به میزان ۲/۵ میلی‌متر و کمترین تاثیر آن در عصاره معمولی لعل-کوهستان، ۴۹/۱۶ میلی‌متر ثبت شد و تفاوت معنی‌داری با شاهد (۵۰ میلی‌متر) نداشت. در پژوهش‌های دیگر نیز اثر بازدارندگی ترکیبات و عصاره‌های نانو بر بازدارندگی رشد بیماری‌زاها گزارش شده است. به طوری که نانوعصاره مریم گلی (*Salvia rhytidea* Benth) نسبت به عصاره معمولی، اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و پنی‌سیلیوم اکسپانسوم داشت و اختلاف قطر هاله عدم رشد در ترکیب نانو نسبت به عصاره آبی به ترتیب ۸ و ۶ میلی‌متربود (Azizian-Shermeh et al., 2020). در پژوهشی دیگر نانوعصاره لعل‌کوهستان به‌طور قابل توجهی درصد برخی مواد مؤثر مانند تیمول را افزایش داد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کشندگی بیشتری نسبت به نوع معمولی عصاره نشان داده شد (Mollaei et al., 2021). نتایج آزمایشی دیگر نشان داد، نانوذرات حاصل از عصاره برگ کنار (*Zizyphus spina-christi* (L.) Desf.) کاهش قابل توجهی در بیماری پوسیدگی ریشه فوزاریوم (*Fusarium solani*) بین ۷۲ تا ۸۸/۶ درصد در مقایسه با شدت بیماری در شاهد(۸۰/۵ درصد) نشان دادند (El-Abeid et al., 2023). کاربرد نانوتکنولوژی برای تهیه نانوعصاره‌های گیاهی جهت کنترل بیماری‌های گیاهی در حال توسعه است. همانطور که در نتایج ذکر شد. اندازه ذرات یکی از فاکتورهای بسیار مهم است که بر استخراج ترکیبات موثره گیاهی تاثیر می‌گذارد. در این پژوهش یکنواختی، کروی بودن و قطر کمتر از ۲۰ نانومتر ذرات در نانوعصاره هر دو گیاه لعل‌کوهستان و شیشه‌شور، حاصل شد. کاهش اندازه ذرات باعث افزایش سطح ماده گیاهی در تماس با حلال و در نتیجه سرعت انتقال جرم می‌شود، علت این امر را می-توان به شکستن دیواره سلولی گیاه در اثر نفوذ بیشتر ذرات نانو به درون سلول‌های گیاه نسبت داد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنل و فلاونوئید عصاره‌های گیاهی نشان داد عصاره‌های با غلظت بالاتر (۱۰۰درصد)، و عمدتا عصاره‌های نانو میزان بیشتری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید را نشان دادند،که دلیل آن را می‌توان به بالاتر بودن ترکیبات فنلی در غلظت‌های بیشتر نسبت داد. در پژوهشی، محتوای فنل کل عصاره اتانولی برگ‌های سه گونه شیشه‌شور، شامل *C. lanceolatus*، *C. comboynensis* و *C. viridiflorous* به‌ترتیب ۱۰۴، ۹۵. و ۷۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید برگرم وزن خشک گزارش شد. سمیت ترکیبات فنلی شامل مهار آنزیم توسط ترکیبات اکسید شده، احتمالاً از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل یا از طریق برهمکنش‌های غیر اختصاصی‌تر با پروتئین‌ها است. ساختار شیمیایی ترکیبات

فنلی به‌دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل با حلقه‌های آروماتیک برای رفع رادیکال‌های آزاد متناسب است. اتم هیدروژن یا یک الکترون از گروه هیدروکسیل به راحتی به یک رادیکال آزاد پیوند برقرار کرده و بنابراین رادیکال‌های فنوکسی را ایجاد می‌کند که به‌دلیل تشکیل رزونانس در حلقه بنزن نسبتاً پایدار، از رادیکال‌های آزاد هستند (Rice et al., 1996; Abdelhady et al, 2011). همچنین گزارش شده است که فنل‌ها و فلاونوئیدها دارای توانایی تشکیل کمپلکس با پروتئین‌های خارج سلولی، محلول و دیواره سلولی هستند (Salem et al., 2013).



شکل ٤ - فعالیت ضد قارچی عصاره آبی شیشه‌شور و عصاره اتانولی لعل کوهستان روی *Penicillium digitatum* در مقایسه با شاهد (آب مقطر)

Figure 4. Antifungal activity of aqueous extract of *Callistemon citrinus* and ethanol extract of *Oliveria decumbens* on *Penicillium digitatum* compared to control (distilled water)

جدول ۷- مقایسه میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فلاونوئیدکل و محتوای فنل کل عصاره‌های معمولی و نانوعصاره شیشه شور و لعل کوهستان

Table 7. Comparison of mean (± standard error) of the antioxidant activity, total flavonoid and total phenol of common and nano extracts of Callistemon citrinus and Oliveria decumbens

Extract	Plant	Concentration (%)	Antioxidant activity (DPPH %)	Total flavonoid (mg g^{-1})	Total phenol (mg g^{-1})
Common	*Callistemon citrinus*	50	12.74 ± 0.33 ^{g}	90.62 ± 0.57 ^{e}	136.00 ± 0.57 ^{e}
		100	68.73 ± 0.31 ^{c}	156.99 ± 0.33 ^{c}	236.00 ± 0.57 ^{b}
	Oliveria decumbens	50	44.44 ± 0.29 ^{e}	45.53 ± 0.33 ^{g}	96.27 ± 0.63 ^{g}
		100	70.20 ± 0.76 ^{b}	86.57 ± 0.33 ^{f}	217.00 ± 1.15 ^{c}
Nano	*Callistemon citrinus*	50	56.14 ± 0.46 ^{d}	106.89 ± 0.57 ^{d}	189.67 ± 0.33 ^{d}
		100	73.87 ± 0.59 ^{a}	198.53 ± 0.57 ^{a}	283.00 ± 1.73 ^{a}
	Oliveria decumbens	50	27.68 ± 0.31 ^{f}	91.23 ± 0.33 ^{e}	96.67 ± 0.88 ^{g}
		100	74.35 ± 0.32 ^{a}	186.01 ± 0.57 ^{b}	112.67 ± 0.88 ^{f}

Means with the same small letter are not significantly different based on Duncan test (α=0.05)

در پژوهشی، توسط Puranik et al. (2014) ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی شیشه‌شور از طریق سنجش پیکریل هیدرازیل، مهار رادیکال آزاد را با ۵۶ درصد در کمترین غلظت (۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۸۹/۷۵ درصد در بالاترین غلظت (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان داد. نتایج این پژوهش مبنی بر اثر غلظت عصاره در ارتباط با میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با نتایج پژوهش حاضر منطبق است. همچنین، Jamzad et al. (2014) فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گل، برگ و ساقه شیشه‌شور را با استفاده از روش پیکریل هیدرازیل مورد بررسی قرار دادند و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را برای گل‌ها (۹۳/۳۲ درصد) و بعد از آن در برگ‌ها (۶۴/۱۱ درصد) و ساقه (۴۴/۱۷ درصد) مشاهده کردند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره هیدرومتانولی گل‌ها، برگ‌ها و ساقه‌ها می‌تواند ناشی از مقادیر بالای فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی باشد. در پژوهشی دیگر عصاره آبی برگ *C. citrinus* مقدار قابل توجه بالایی از میزان فنل (۳۰۸/۲ میکروگرم تانیک اسید در میلی‌گرم وزن خشک) و فلاونوییدها (۵۱۶/۷ میکروگرم کوئرسیتین در میلی‌گرم وزن خشک) را نسبت به سایر نوع عصاره‌ها نشان داد، که با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن مرتبط است (Ghosh et al., 2021). در پژوهش‌های دیگر سنتز نانوعصاره‌ها به‌طور قابل توجهی میزان مواد مؤثر گیاهی و متابولیت‌های ثانویه را افزایش داده است. به‌طوری که نانوعصاره لعل‌کوهستان درصد تیمول را به طور معناداری افزایش داد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره معمولی ثبت شد (Mollaei et al., 2021). در غلظت بالاتر به‌دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال پیوند هیدروژن ترکیبات فنلی به رادیکال آزاد و پیرو آن قدرت مهارکنندگی افزایش می‌یابد (Askari et al., 2021).

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد، به طور کلی گیاه شیشه‌شور دارای اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد کپک سبز می‌باشد. عصاره آبی شیشه‌شور و سپس لعل کوهستان به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ درصد بیشترین اثر بازدارندگی و عصاره‌های متانولی کمترین اثر را بر رشد پرگنه کپک سبز داشتند. عصاره اتانولی لعل‌کوهستان در غلظت ۱۰۰ درصد در مقایسه با قارچ‌کش شیمیایی تاثیر بهتری در کنترل قارچ را در میان عصاره‌های اتانولی نشان داد. قارچ‌کش کاربندازیم نسبت به شاهد اثر کنترل‌کنندگی بیشتری نشان داد. نتایج ساخت نانوعصاره برای هر دو گیاه موفقیت‌آمیز بود و ذرات با شکل کروی، ساختار یکنواخت و قطر کمتر از ۲۰ نانومتر سنتز شدند. در آزمایش دوم بیشترین تاثیر بازدارنده برای نانوعصاره شیشه‌شور و کمترین آن در عصاره‌های معمولی لعل‌کوهستان مشاهده شد. بیشترین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نانوعصاره لعل-کوهستان و شیشه‌شور و بیشترین محتوای فنل و فلاونویید در نانوعصاره شیشه‌شور با غلظت ۱۰۰ درصد به دست آمد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، نانوعصاره دو گیاه نسبت به عصاره معمولی، اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد کپک سبز نشان دادند و عصاره آبی شیشه‌شور و نانوعصاره آن در کنترل کپک سبز مؤثرتر شناخته شدند.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای حمایت مالی تحت پژوهانه شماره SCU.AH1403.348 اعلام می‌دارند. همچنین از کارشناسان آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی و گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز و گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به پاس همکاری‌هایشان در انجام پژوهش حاضر، تقدیر و سپاس‌گزاری می‌گردد.

References

Abdelhady, M. I., Motaal, A. A., & Beerhues, L. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of standardized extracts from leaves and cell cultures of three Callistemon species. *American Journal of Plant Science*, *2*(6), 847- 850. https://doi.org/10.4236/ajps.2011.26100

Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Mohebbi, M. (2014). Antifungal effect of aqueous and methanolic *Avicennia marina* leaves extracts on *Alternaria alternata* and *Penicillium citrinum*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, *12*, 1015-1024. https://doi.org/20.1001.1.17353165.1392.12.12.5.1

Anjum Malik, A., Ahmed, N., Babita, C. H., & Gupta, P. (2016). Plant extracts in post-harvest disease management of fruits and vegetables-a review. *Journal of Food Processing& Technology*, *7*(592), 2. http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.1000592

Ashrafpour, M., Rezaei, H., Sefidgar A, Baradaran, M., & Sharifi, H. (2015). Survey of the antibacterial properties of aqueous ethanolic and methanolic extraction of *Artemisia Annua* around the city of Babol. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *23*(6), 129-141.URL: http://sjimu.medilam.ac.ir/article-1-2492-en.html [In Persian].

Askari kafrani, A., Fazilati, M., & Nazem, H. A. (2021). Investigating the effect of solvent and extraction method on the phytochemical content and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*. *18*(114), 133 p. https://doi.org/10.29252/fsct.18.05.12 [In Persian].

Azizian-Shermeh, O., Mollashahi, E. & Taherizadeh, M. (2020). Phytosynthesis of stable silver nanoparticles using aqueous extract of *Salvia rhytidea* Benth. and comparison of its antimicrobial Activities with natural plant extract. *Ecophytochemical of Medicinal plants*, *30* (2), 89-112.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & 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

Bahraminejad, S., Seifolahpour, B., & Amiri, R. (2016). Antifungal effects of some medicinal and aromatic plant essential oils against *Alternaria solani*. *Journal of Crop Protection*, *5*(4), 603-616. https://doi.org/20.1001.1.22519041.2016.5.4.14.9

Barzegar, H., Mehrnia, M.A., & Alizadeh Behbahani, B. (2018). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, *4*(4), 15-28. URL: http://fsct.modares.ac.ir/article-7-33602-en.html

Baviskar, R.N. & Dekate, H.M. (2016). Control of *penicillium expansum* link causing blue mold of pear using some fungicides. *International Journal of Life Sciences*, *4*(3), 427-431. http://www.ijlsci.in

Blesson, J., Sebastian, J., Ar, C., Saji, C. V., Pillai, D. V., & Manohar, G. (2014). South Indian plants *Lawsonia inermis* L., *Ocimum sanctum* L., *Ficus religiosa* L. and *Callistemon citrinus* L. exhibit antibiotic resistance modifying effect on native strain of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Engineering Sciences & Research Technology*, *3*, 869-878. https://doi.org/10.6088/ijaser.030400011

Braga, P.C., Alfieri, M., Culici, M., & Dal Sasso, M. (2007). Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses*, *50*(6), 502-506. http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01412.x

Bvumbi, C., Chi, G. F., Stevens, M. Y., Mombeshora, M., & Mukanganyama, S. (2021). The effects of tormentic acid and extracts from *Callistemon Citrinus* on *Candida Albicans* and *Candida Tropicalis* growth and inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida Albicans*. *The Scientific World Journal*, 1-13. http://doi.org/10.1155/2021/8856147

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, *10*(3), 178-182. http://doi.org/10.38212/2224-6614.2748

Chen, J., Shen, Y., Chen, C., & Wan, C. (2019). Inhibition of key citrus postharvest fungal strains by plant extracts in vitro and in vivo: A review. *Plants*, *8*(2), 26. https://doi.org/10.3390/plants8020026

Cock, I. E. (2012). Antimicrobial activity of *Callistemon citrinus* and *Callistemon salignus* methanolic extracts. *Pharmacognosy Communications*, *2*(3), 50-57. https://doi.org/10.5530/pc.2012.3.11

Costa, J. H., Bazioli, J. M., de Moraes Pontes, J. G., & Fill, T. P. (2019). *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biology*, *123*(8), 584-593. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.004

Delshad, D. & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. (2020). Identification of *Penicillium* species from citrus fruits and various bread types in Shiraz (Iran). *Rostaniha* , *2*1(1), 65–78. http://doi.org/10.22092/BOTANY.2020.341742.1188 [In Persian]

Djanaguiraman, M., Anbazhagan, V., Dhankher, O. P., & Prasad, P. V. (2024). Uptake, translocation, toxicity, and impact of nanoparticles on plant physiological processes. *Plants*, *13*(22), 3137. https://doi.org/10.3390/plants13223137

Dongmo Lekagne, J. B., Fouelefack, F. R., Dakole Daboy, C., Galani, Y. J. H., Fotio, D., & Nguefack, J. (2023). Chemical composition, antifungal properties and seed treatment potential of essential oil fractions of *Callistemon citrinus* against two seed-borne fungi of rice: *Alternaria padwickii* and *Bipolaris oryzae*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *130*, 833-841. http://doi.org/10.1007/s41348-023-00756-2

El-Abeid, S.E., Mosa, M.A., El-Tabakh, M.A.M., Saleh, A.M.& Haridy, M.S.A. (2023). Antifungal activity of copper oxide nanoparticles derived from *Zizyphus spina* leaf extract against Fusarium root rot disease in tomato plants. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 28. https://doi.org/10.1186/s12951-023-02281-8

El-Samawaty, A.E.R.M., El-Wakil, D.A., Alamery, S., & Mahmoud, M.M. (2021). Potency of plant extracts against *Penicillium* species isolated from different seeds and fruits in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(6), 3294-3302. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.074

El-Goorani, M.A., El-Kasheir, H.M., Kabeel, M.T., & Shoeib, A.A. (1984). Resistance to benzimidazole fungicides of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* isolated from packinghouses and orchards in Egypt. *Plant Disease*, *68*(2), 100-102. https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents

FAOSTAT.(2005).fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation94/carbend.pdf

Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, *49*(1), 1-174.

Ghazy, O. A., Fouad, M. T., Saleh, H. H., Kholif, A. E., & Morsy, T. A. (2021). Ultrasound-assisted preparation of anise extract nanoemulsion and its bioactivity against different pathogenic bacteria. *Food Chemistry*, 341(128259), 1-7. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128259

Gholamnezhad, J. (2017). Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology in Food Industries*, (*3*)1, 53-66.

Gholamnezhad, J., Arsalani, Sh., & Maleki, M. (2019). The investigation of the effect of garlic and thyme extracts on orange green mold (Penicillium digitatum), defense enzymes and genes expression. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 42*(1), 91-118.

Ghosh, P., Goswami, S., Roy, S., Das, R., Chakraborty, T., & Ray, S. (2021). Comparative in vitro antioxidant and antibacterial activities of leaf extract fractions of Crimson bottlebrush, *Callistemon citrinus* (Curtis.) Skeels. *BioRxiv*, *3*, 1-22. http://doi.org/10.1101/2021.03.26.436274

Hall, T.A. (1999). *BioEdit*: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT".Nucleic Acids Symposium Series, *41*, 95-98.

Jamzad M., Kazembakloo A., Dadkhah-Tehrani A., & Rostami F. (2014). Essential oil composition and antioxidant activity of hydromethanolic extract from the flowers, leaves and stems of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, *5*(4), 308-312. https://doi.org/10.56042/ijnpr. v5i4.3370

Jiang, X., Feng, K., & Yang, X. (2015). In vitro antifungal activity and mechanism of action of tea polyphenols and tea saponin against *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *25*(4), 269-276. https://doi.org/10.1159/000430866

Khajehie, N., Golmakani, M.T., Eblaghi, M., & Eskandari, M.H. (2017). Evaluating the effects of microwave-assisted hydrodistillation on antifungal and radical scavenging activities of *Oliveria decumbens* and *Chaerophyllum macropodum* essential oils. *Journal of Food Protection*, *80*(5), 783-791. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-428

Khatir Ghorbani, G., Aghajani, M.A. & Zolfaghari1Nasab, A. (2024) Sensitivity of *Penicillium digitatum* isolates, citrus green mold agent, to imazalil, fludioxonil, pyrimethanil, azoxystrobin and thiabendazole in north of Iran. *Food Processing and Preservation Journal*, *15*(4), 107-126. https://doi.org/10.22069/fppj.2024.22095.1795

Khosravinezhad, M., Talebi, E., Shivakumar, Z. N., & Nasrollahi, I. (2017). Essential oil composition and antimicrobial, antioxidant activities of *Oliveria decumbens* Vent. *International Journal of Herbal Medicine*, *5*(2), 102-106.

Mahboubi, M., Feizabadi, MM., Haghi, G., & Hosseini, H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *24*(1), 56-65. URL: http://www.rifr-ac.ir

Mabhiza, D., Chitemerere, T., & Mukanganyama, S. (2016). Antibacterial properties of alkaloid extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medicinal Chemistry*, *2016*(1), 6304163. http://doi.org/10.1155/2016/6304163

Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, (1), 1-15. http://doi.org/10.1155/2013/942916

McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., & Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, *73*(1), 73-84. http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0

Mirsoleimani Z. & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis, based on host range, morphology, and ribosomal genome. *Phytopathologia Mediterranea*, *53*(3), 501-506. https://www.jstor.org/stable/42685429

Moghadam, A., Saidi, M., Abdossi, V., Mirab-Balou, M., & Tahmasebi, Z. (2018). Insecticidal effect of extracts from six native plants on *Bemisia tabaci* and some physiological effects on cucumber as host plant. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, *55*(3), 563-568. https://doi.org/10.21162/PAKJAS/18.5988

Mollaei, S., Mamizadeh, Z., Hazrati, S., & Hashempour, H. (2021). The effect of ultrasonic pre-treatment on the yield, chemical composition and biological activity of essential oil in *Oliveria decumbens* flowers. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 24, 100313. http://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100313

Mozaffarian, V. (2009). Flora of Iran, Umblifrae family. *Publications of the Research Institute of Forests and Pastures of the Country*, 644. https://www.sid.ir/paper/535415 [In Persian].

Papoutsis, K., Mathioudakis, M.M., Hasperue, J. H., & Ziogas, V. (2019). Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Trends in Food Science and Technology*, *86*, 479-491. http://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.053

Puranik, N., Sohani, S., & Bakshi, G. (2014). *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potential of ethanolic extract *of Callistemon citrinus* flower. *International Journal Biology & Pharmacology Research*, *5*(11), 824-829.

Rahmani, Z., Karimi, M., Saffari, I., Mirzaei, H., Nejati, M., & Sharafati Chaleshtori, R. (2024). Nanoemulsion and nanoencapsulation of a hydroethanolic extract of nettle (*Urtica dioica*) and wormwood (*Artemisia absinthium*): Comparison of antibacterial and anticancer activity. *Frontiers in Chemistry*, *12*, 1266573. https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1266573

Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933-956. http://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9

Saad, A.M., Abdel-Aleem, A.A.H., Ghareeb, M.A., Hamed, M.M., Abdel-Aziz, M.S., & Hadad, A.H. (2017). In vitro antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities and green biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Callistemon citrinus* leaf extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *7*(6), 141-149. https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70620

Sami, A., Aboutalebi, A.& Mohamadi, A., (2012). Comparison with fennel essential oil. carbendazim and thiabendazole on postharvest characteristics of golden delicious apple. *Postharvest Physiology and Technology of Horticultural Crops, 2*, 11-19.

Sanchez-Torres, P. (2021). Molecular mechanisms underlying fungicide resistance in citrus postharvest green mold. *Journal of Fungi*, *7*(9), 783. https://doi.org/10.3390/jof7090783

Salem, M.Z., Ali, H.M., El-Shanhorey, N.A., & Abdel-Megeed, A. (2013). Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *6*(10), 785-791.

http://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60139-X

Shazdeahmadi, M. & Sajjadi, S. A. (2022). Identification of chemical compounds of methanolic extract of (*Mentha longifolia* L.) and (*Thymus pubescens* Boiss.) plants and their insecticidal and

repellent effects on *Trialeurodes vaporarium*. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 45*(3), 27-42. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17656

Shinde, P.R., Patil, P.S., & Bairagi, V.A. (2012). Pharmacognostic, phytochemical properties and antibacterial activity of *Callistemon citrinus* viminalis leaves and stems. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *4*(4), 406-408.

Singh, D., & Sharma, R. R. (2018). Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. In Postharvest disinfection of fruits and vegetables. Academic Press, pp, 1-52. http://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00001-7

Sun, T., Xu, Z., Wu, C.T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W., & No, H.K. (2007). Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*, *72*, 98-102. http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genesfor phylogenetics. *PCR Protocols Guide Methods*. 18, 315–322.

Zhang, Y., Zhang, B., Luo, C., Fu, Y., & Zhu, F. (2021). Fungicidal actions and resistance mechanisms of prochloraz to *Penicillium digitatum*. *Plant Disease*, *105*(2), 408-415. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1128-RE

© 2025 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.