

First Report of *Fusarium solani* Causing Root Rot in Lawson Cypress (*Chamaecyparis lawsoniana*) in Guilan Province and Evaluation of Its Suppression by Plant Essential Oils

Pages
05-22

H. Rahanandeh *¹ and F. Shirzad²

¹ & ²) Department of Plant Protection, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran.

*Corresponding author : rahanandeh@iau.ac.ir

Received date: 2025.07.14

Accepted date: 2025.10.20

Abstract

Lawson cypress is a valuable ornamental shrub widely used in landscape design. This study investigated root rot symptoms observed in Guilan Province. The causal agent was isolated and identified as *Fusarium solani* through morphological and molecular analyses, representing the first report of this pathogen on Lawson cypress in Iran (NCBI accession PV077970). To evaluate management strategies, the antifungal effects of twelve plant essential oils were tested in vitro using disk diffusion and medium incorporation methods at multiple concentrations. Five chemical fungicides, including mancozeb, thiophanate-methyl, Bordeaux mixture, copper oxychloride, and Rovral-TS, were applied at 2000 mg l⁻¹ for comparison. Results showed that thyme, ajowan, and ziziphora essential oils exhibited the strongest inhibition in disk diffusion assays, while savory, thyme, and ajowan oils completely suppressed mycelial growth in medium incorporation, comparable to Rovral-TS, thiophanate-methyl, and copper oxychloride. In spore germination tests, Bordeaux mixture achieved 100% inhibition, followed by thyme oil with 67.7%. Evaluation of fungicidal and fungistatic activity revealed that thyme and ajowan oils, along with thiophanate-methyl and Rovral-TS, had fungicidal effects, whereas ziziphora and copper oxychloride were fungistatic. This study provides the first evidence of *F. solani* causing root rot in Lawson cypress in Iran and offers a comprehensive assessment of essential oils as natural antifungal agents. The results highlight thyme and ajowan oils as promising, eco-friendly alternatives to chemical fungicides, supporting safer and sustainable disease management in ornamental plants.

Keywords: Plant essential oils, Plant diseases, Biological fungicides, Lawson cypress, (*Chamaecyparis lawsoniana*) and *Fusarium solani*.

اولین گزارش *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه در درختچه زینتی لاوسون (*Chamaecyparis*

lawsoniana) در استان گیلان و ارزیابی مهار آن با اسانس‌های گیاهی

شماره صفحات

۰۵-۲۲

هادی رهاننده*^۱ و فرشته شیرزاد^۲

۱ و ۲) گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: rahanandeh@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۳

چکیده

لاوسون یکی از درختچه‌های زینتی پر کاربرد در فضای سبز است که در معرض بیماری‌های قارچی قرار دارد. در این تحقیق، عامل پوسیدگی ریشه لاوسون در استان گیلان مورد شناسایی قرار گرفت و با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی، قارچ *Fusarium solani* به‌عنوان عامل بیماری شناسایی شد و توالی آن در پایگاه NCBI با کد PV077970 ثبت گردید. اثر مهارکنندگی ۱۲ اسانس گیاهی شامل آویشن، زنیان، کاکوتی و سایر اسانس‌ها بر رشد این قارچ در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. اثرات اسانس‌ها به دو روش اختلاط با محیط کشت و دیسک کاغذی و در چندین غلظت سنجیده شد و با عملکرد قارچ‌کش‌های شیمیایی شامل مانکوزب، تیوفانات متیل، بردو، اکسی کلرور مس و رورال تی اس مقایسه شد. نتایج نشان داد در آزمون دیسک دیفیوژن، بیشترین مهارت رشد قارچ مربوط به اسانس‌های آویشن (۱۹/۹۶٪)، زنیان (۱۷/۹۶٪) و کاکوتی (۳۵/۷۶٪) بود. در روش اختلاط با محیط کشت، اسانس‌های کاکوتی، آویشن و زنیان همراه با قارچ‌کش‌های رورال، تیوفانات متیل و اکسی کلرور مس در غلظت 2000 mg. l^{-1} رشد ریشه‌ای قارچ را به‌طور کامل مهار کردند. همچنین در آزمون جوانه‌زنی اسپور، بردو و اسانس آویشن بیشترین بازدارندگی را نشان دادند. بر اساس نتایج، اسانس‌های زنیان و آویشن و قارچ‌کش‌های تیوفانات متیل و رورال خاصیت قارچ‌کشی داشتند، در حالی که کاکوتی و اکسی کلرور مس خاصیت قارچ‌ایستایی نشان دادند. این مطالعه نخستین گزارش شناسایی *F. solani* روی لاوسون در ایران و بررسی اثر ۱۲ اسانس گیاهی بر آن است و می‌تواند زمینه استفاده از اسانس‌ها به‌عنوان جایگزین زیست‌محیطی قارچ‌کش‌های شیمیایی را فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: اسانس گیاهی، بیماری‌های گیاهی، قارچ‌کش زیستی، لاوسون و *Fusarium solani*.

مقدمه

درختچه زینتی لاوسون (*Chamaecyparis lawsoniana*)، یکی از گونه‌های سوزنی‌برگ با ارزش در طراحی مناظر شهری و فضای سبز است. این گیاه به دلیل ویژگی‌هایی مانند رنگ برگ‌های سبز مایل به آبی، رشد عمودی و مقاومت نسبی به شرایط محیطی، در مناطق مختلف جهان کشت می‌شود (Farjon, 2010). با این حال، درختچه لاوسون در معرض ابتلا به بیماری‌های قارچی قرار دارد که می‌توانند سلامت و زیبایی آن را تهدید کنند. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی این گیاه، پوسیدگی ریشه و طوقه است که توسط قارچ‌های مختلفی ایجاد می‌شود. این بیماری‌ها می‌توانند موجب زردی برگ‌ها، ریزش برگ، پژمردگی و در نهایت مرگ گیاه شوند (Agrios, 2005). قارچ‌های جنس *Fusarium* از مهم‌ترین پاتوژن‌های خاکزی محسوب می‌شوند که می‌توانند سبب چین‌علائمی در گیاهان مختلف شوند (Singh et al., 2021).

این قارچ‌ها قادر به تولید میکوتوکسین‌هایی همچون فومونیسین، تریکوتسن و زیارالنون هستند که علاوه بر آسیب به گیاه، برای انسان و حیوان نیز خطرناک‌اند (Moretti et al., 2019). روش‌های سنتی کنترل بیماری‌های قارچی عمدتاً مبتنی بر قارچ‌کش‌های شیمیایی هستند. اگرچه استفاده از این ترکیبات تا حدی در مدیریت بیماری مؤثر است، اما نگرانی‌هایی جدی در خصوص توسعه مقاومت قارچی، باقی‌مانده‌های سمی در محیط و اثرات نامطلوب بر سلامت انسان و اکوسیستم وجود دارد (Zhao et al., 2022). به همین دلیل، در دو دهه اخیر توجه به روش‌های جایگزین، از جمله استفاده از ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی، به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. اسانس‌های گیاهی، به‌عنوان ترکیبات ثانویه معطر، نه تنها از منابع طبیعی و تجدیدپذیر حاصل می‌شوند بلکه دارای خواص زیستی متعددی از جمله فعالیت ضدقارچی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی هستند (Bakkali et al., 2008).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اسانس‌هایی مانند آویشن، اکالیپتوس، نعناع فلفلی و اسطوخودوس می‌توانند رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی را مهار نمایند (Pawar & Thaker, 2006; Hyldgaard et al., 2012). علاوه بر اثر مستقیم بر رشد قارچ، برخی اسانس‌ها قادرند با القای بیان ژن‌های دفاعی نظیر دفسین‌ها و کیتینازها، سیستم ایمنی ذاتی گیاه را فعال کنند و مقاومت آن را در برابر تنش‌های زیستی افزایش دهند (Khaleil et al., 2021).

از سوی دیگر، پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی‌های نوین مانند نانوفرمولاسیون اسانس‌ها، پوشش‌های زیست‌فعال، و روش‌های استخراج پیشرفته نظیر استخراج به کمک مایکروویو و فراصوت، موجب بهبود پایداری، افزایش کارایی و کنترل رهایش ترکیبات فعال گیاهی شده است (Prakash et al., 2018; Sharifi-Rad et al., 2020). این نوآوری‌ها نشان می‌دهند که اسانس‌های گیاهی می‌توانند نه تنها در مقیاس آزمایشگاهی بلکه در مدیریت عملی بیماری‌های گیاهی نیز جایگزینی پایدار و ایمن برای قارچ‌کش‌های شیمیایی باشند. با توجه به اهمیت درختچه لاوسون در فضای سبز و تهدید بیماری‌های قارچی، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیماری‌زای این گیاه و بررسی اثرات ضدقارچی اسانس‌های گیاهی منتخب بر عامل بیماری

انجام شد. نتایج این مطالعه می‌تواند به توسعه روش‌های کنترل زیست‌سازگار، کاهش وابستگی به قارچ‌کش‌های شیمیایی، و طراحی استراتژی‌های نوین مدیریت بیماری در گیاهان زینتی کمک نماید.

روش کار

گیاهان مورد استفاده در آزمایش

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

جدایه‌ی قارچی و شرایط کشت آن

به‌منظور بررسی بیماری‌زایی، نمونه‌هایی از نهال‌های سرو لاوسون (*Chamaecyparis lawsoniana*) دارای علائم پوسیدگی ریشه و طوقه از مناطق فومن (37°13' N, 49°18' E) و رشت (37°16' N, 49°36' E) در استان گیلان جمع‌آوری شد. قطعاتی به طول ۲-۳ سانتی‌متر از مرز بخش‌های آلوده و سالم جدا و به مدت ۶۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها با آب مقطر استریل شسته شده و روی محیط کشت PDA کشت شدند. کلنی‌های رشد یافته چندین بار خالص‌سازی شده و در دمای ۴°C نگهداری شدند. شناسایی قارچ‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی ماکروکنیدی و میکروکنیدی با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی *Fusarium* انجام گرفت (Nelson et al., 1983; Aoki et al., 2012). برای آزمون بیماری‌زایی، گیاهچه‌های سالم ۳ تا ۴ ماهه سرو لاوسون در شرایط گلخانه‌ای (دمای ۲۵±۲°C، رطوبت نسبی ۶۵-۷۰٪ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی) استفاده شدند. ریشه گیاهچه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون کنیدی قارچ با غلظت تقریبی ۱۰^۶ کنیدی در میلی‌لیتر غوطه‌ور و سپس در گلدان‌های حاوی خاک استریل‌شده کشت گردیدند. گروه شاهد شامل گیاهچه‌های تیمار نشده و گیاهچه‌های تیمار شده با آب استریل بود. علائم پوسیدگی ریشه و طوقه شامل قهوه‌ای شدن بافت‌های آوندی و زردی برگ‌ها طی ۱۵-۲۰ روز پس از تلقیح ظاهر شد. برای تکمیل آزمون کخ، قارچ مجدداً از ریشه‌های آلوده جداسازی و ویژگی‌های مورفولوژیک آن با جدایه اولیه مقایسه گردید تا بیماری‌زایی تأیید شود.

شناسایی مولکولی

قارچ‌های انتخاب‌شده از طریق مولکولی با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) و ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG) (Zhou et al., 2022) شناسایی شدند.

استخراج DNA ژنومی از کلنی‌های تازه قارچ با استفاده از کیت تجاری (Qiagen DNeasy Plant Mini Kit, Germany) و بر اساس دستورالعمل سازنده انجام شد. کیفیت و کمیت DNA به وسیله نانودراپ (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific) و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ μL Master Mix 2X ۱۲/۵ μL (Amplicon, Denmark)، ۱ μL از هر پرایمر (10 μM)، ۲ μL DNA قالب (50 ng/μL) و آب دیونیزه تا حجم نهایی بود. برنامه حرارتی شامل یک چرخه اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه، ۵۵°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۱ دقیقه، و در پایان یک مرحله کشش نهایی در ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. برای صحت واکنش PCR، نمونه‌ای از DNA قارچ *Fusarium solani* با شناسایی قبلی به عنوان کنترل مثبت و واکنش فاقد DNA (آب مقطر استریل) به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. محصولات PCR پس از خالص‌سازی با کیت QIAquick PCR Purification Kit توسط شرکت Macrogen, Korea به روش Sanger توالی‌یابی شدند. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit v7.2 و Chromas v2.6 ویرایش شدند. مقایسه توالی‌ها با بانک اطلاعاتی GenBank به وسیله الگوریتم BLASTn انجام شد. برای تعیین روابط فیلوژنتیکی توالی ITS ایزوله (536 bp)، از روش Neighbor-Joining (NJ) در نرم‌افزار MEGA X استفاده شد. هم‌ترازی توالی‌ها با الگوریتم ClustalW انجام گرفت و کیفیت هم‌ترازی به صورت دستی بررسی گردید تا از صحت آن اطمینان حاصل شود. فواصل تکاملی بر اساس مدل p-distance محاسبه شد. برای ارزیابی استحکام شاخه‌های درخت، تحلیل بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد و تنها مقادیر بوت‌استرپ بالاتر از ۳۰٪ بر روی شاخه‌ها نمایش داده شدند. جهت مقایسه، توالی‌های نماینده با بیشترین شباهت به جدایه‌های این پژوهش از بانک ژن (GenBank) انتخاب شدند. به منظور ریشه‌دار کردن درخت نیز گونه *Fusarium oxysporum* کد دسترسی (MK651259) به عنوان outgroup در نظر گرفته شد. اگرچه در این مطالعه تمرکز اصلی بر روی ناحیه ITS بود، استفاده از نشانگرهای مولکولی مکمل مانند β -tubulin و TEF1- α در مطالعات آینده می‌تواند به افزایش دقت شناسایی گونه‌های نزدیک به هم کمک کند.

تهیه اسانس گیاهان

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

نگهداری شدند (Ranjbar *et al.*, 2008).

قارچ‌کش‌های مورد استفاده

به منظور مقایسه فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی از قارچ‌کش‌های شیمیایی مانکوزب (Mancozeb 80% WP)، تیوفانات متیل (Thiophanate-methyl 70% WP)، اکسی کروور مس (Copper oxychloride 35% WP)، ایپریدیون+کاربندازیم (Iprodione + Carbendazim 52.5% WP, "Rovral")، بردو (Bordeaux mixture 20% SC) در غلظت 2000 mg. l^{-1} ماده موثره به‌روش اختلاط با محیط کشت از شرکت آریا شیمی استفاده شد.

ارزیابی بازدارندگی از رشد قارچ در روش دیسک

به‌منظور بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های گیاهان مورد آزمایش، ابتدا محیط کشت PDA پس از استریل کردن تا دمای حدود ۴۵ سلسیوس سرد شد. سپس درون پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری ریخته شد و پس از انعقاد کامل محیط کشت، با چوب پنبه سوراخ کن یک دیسک قارچی به قطر شش میلی متر از حاشیه پرگنه کشت یک هفته‌ای آن تهیه شد و در وسط پتری قرار داده شد و تا زمانی که قطر پرگنه رشد به سه سانتی متر رسید (حدود ۷۲ ساعت) پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوباتور نگهداری شدند. سپس دیسک‌های کاغذی شش میلی‌متری پادتن طب استریل شده نیز در فاصله ۱۰ میلی-متری حاشیه پرگنه قرار داده شد و از غلظت‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر اسانس توسط سمپلر روی دیسک‌های کاغذی بارگذاری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمایش فاکتوریل انجام شد به طوری که در همه غلظت‌های اسانس (۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام) و همه گیاهان با سه تکرار انجام شد فاکتورهای این آزمایش نوع گیاه و غلظت اسانس بود. در نهایت در فواصل زمانی مختلف (تا ۵ روز) میزان رشد پرگنه از روبرو، چپ و راست اندازه‌گیری شد. همچنین برای کاهش خطای آزمایش آب مقطر استریل به‌عنوان تیمار شاهد استفاده گردید (Hadian *et al.*, 2006).

ارزیابی بازدارندگی اسانس و قارچ‌کش از رشد قارچ در روش اختلاط با محیط کشت

برای بررسی اثرات بازدارندگی اسانس‌های گیاهان مختلف مورد آزمایش و قارچ‌کش‌ها از روش اختلاط اسانس یا قارچ‌کش با محیط کشت استفاده شد. لذا پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت PDA و سرد شدن آن غلظت‌های مختلف ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام اسانس گیاهان مذکور و غلظت ۲۰۰۰ پی پی ام ماده موثره قارچ‌کش‌ها و اسانس در محیط کشت تهیه و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به‌تشتک‌های پتری یکبار مصرف سترون منتقل شدند. پس از آن، از حاشیه‌ی پرگنه قارچ بلوک‌های میسلیمی به قطر شش میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن سترون جدا شده و در شرایط سترون زیر هود در مرکز تشتک‌های پتری با رقت‌های متفاوت اسانس گیاهان مختلف مورد آزمایش و قارچ‌کش‌ها قرار داده شدند. تشتک‌های پتری به‌مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به‌جای اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها استفاده شد (Hadian *et al.*, 2006). درصد بازدارندگی از رشد قارچ توسط غلظت‌های مختلف

از فرمول $MGI = (DC - DT) / DC \times 100$ محاسبه شد (Moslem & El-kholie, 2009). در این فرمول به ترتیب $MGI =$ درصد بازدارندگی از رشد، $DC =$ قطر رشد پرگنه تیمار شاهد و $DT =$ قطر رشدی پرگنه تیمار در غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها است.

تعیین میزان غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌های مورد بررسی

برای مشخص نمودن غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس‌های گیاهان و قارچ‌کش‌ها، بدین صورت عمل گردید که اسانس‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت و با محیط کشت مخلوط شد. در پایان کمترین غلظتی که موجب بازدارندگی کامل از رشد قارچ گردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد. همچنین برای بررسی قارچ‌کشی، قارچ‌کش‌ها (MFC) ترکیبات مختلف مورد بررسی، غلظت ۲۰۰۰ پی پی ام از MIC را که هیچ گونه رشدی در آنها مشاهده نگردیده بود، مجدداً روی محیط کشت PDA فاقد ترکیبات مورد بررسی کشت داده شده و قارچ‌کشی که باعث مرگ ریشه قارچ شده و هیچ رشدی روی محیط کشت PDA مشاهده نگردید، به عنوان MFC گزارش شد (Irkin & Korukluoglu, 2007).

اثر تیمارهای مختلف بر میزان جوانه زنی اسپور

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

روش‌های آماری و نرم افزارهای مورد استفاده

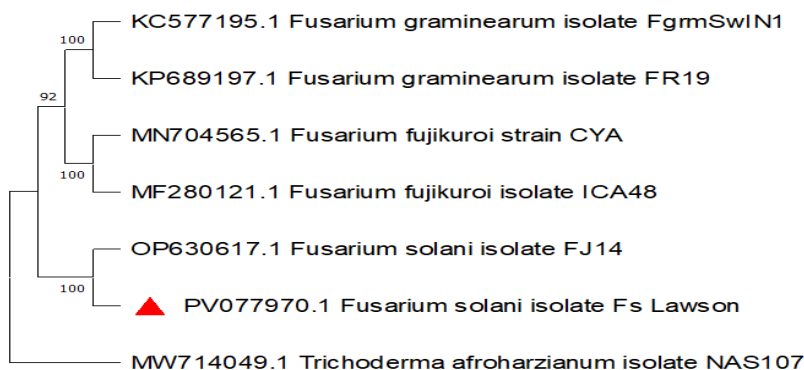
آنالیزهای تجزیه واریانس (ANOVA) در این مطالعه براساس طرح آزمایشی فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. مقایسه و گروه‌بندی میانگین‌ها براساس روش چند دامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) انجام گردید. رسم نمودارهای مورد نظر در محیط نرم افزار Microsoft Excel 2021 انجام شد.

نتایج و بحث

بیماری‌زایی و شناسایی فیلوژنی قارچ *Fusarium solani*

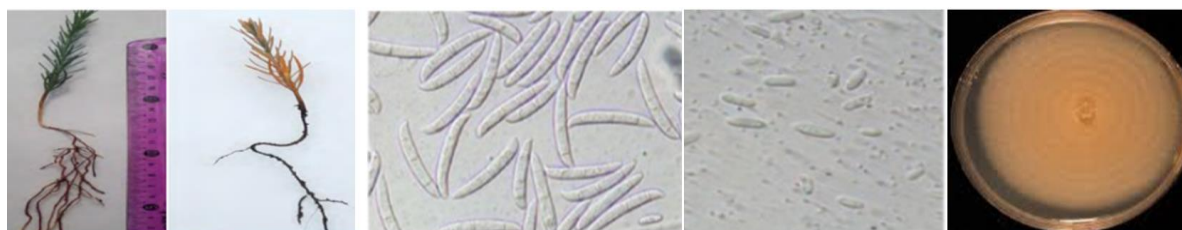
از میان جدایه‌های متعددی که از ریشه‌های آلوده لاسون به‌دست آمدند، ۱۲ جدایه برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند که در میان آن‌ها دو جدایه (LR1 و LR2) بیشترین فراوانی را داشتند. کلنی‌ها روی محیط PDA پس از ۷ روز رشد، سفید پنبه‌ای تا کرم با حاشیه نامنظم بودند و در برخی جدایه‌ها رنگدانه‌های قهوه‌ای تا بنفش در سطح یا پشت کلنی تولید شد. میکروکنیدی‌ها بیضوی تا استوانه‌ای، تک تا دو سلولی و شفاف بوده و روی کنیدیوفورهای کوتاه تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها فراوان، خمیده تا داسی‌شکل، با دیواره نازک و معمولاً دارای ۳ تا ۵ دیواره عرضی مشاهده شدند. همچنین کلامیدوسپورهای منفرد یا جفتی، کروی تا بیضوی با دیواره ضخیم و رنگ قهوه‌ای روشن تشکیل شدند (شکل ۲). این ویژگی‌ها با توصیفات کمپلکس گونه‌ای *Fusarium solani* مطابقت داشت. برای تأیید شناسایی، آنالیز مولکولی ناحیه ITS-rDNA انجام شد. درخت فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining در نرم‌افزار MEGA11 بازسازی گردید. فواصل تکاملی با مدل Maximum Composite Likelihood (MCL) محاسبه شدند و تمامی موقعیت‌های مبهم با روش pairwise deletion حذف گردید. در مجموع ۶۸۱ جایگاه نوکلئوتیدی در تجزیه استفاده شد و مقادیر بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار محاسبه شدند. جدایه این مطالعه (PV077970.1) در خوشه *F. solani* با پشتیبانی بالا (۱۰۰) قرار گرفت. برای ریشه‌گذاری، *Trichoderma afroharzianum* (MW714049.1) به‌عنوان outgroup استفاده شد (شکل ۱). این نتایج تأییدکننده تعلق جدایه‌های مورد بررسی به کمپلکس *F. solani* بودند، هرچند مقادیر بوت‌استرپ در شاخه‌های عمیق‌تر متوسط (۳۰-۴۵) بود که بیانگر محدودیت ITS در تفکیک زیرخوشه‌ها محسوب می‌شود. آزمون بیماری‌زایی روی ۱۰ نهال سه‌ماهه نشان داد که پس از گذشت ۲۰ روز از تلقیح، علائم پوسیدگی ریشه و طوقه ظاهر شدند و جدایه‌ها از بافت‌های آلوده مجدداً جدا گردیدند که معیار تحقق کخ را تأیید کرد. این یافته‌ها نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی به کمپلکس *F. solani* تعلق دارند و بیماری‌زایی آن‌ها روی نهال‌های لاسون تأیید شد. این اولین گزارش از حضور *F. solani* به‌عنوان عامل پوسیدگی ریشه در *Chamaecyparis lawsoniana* در ایران است. یافته‌های ما با گزارش‌های پیشین از حضور این گونه روی گیاهان زینتی در ایران و سایر کشورها همخوانی دارد؛ به‌عنوان نمونه، پوسیدگی ساقه در *Dracaena sanderiana* (Abedi-Tizaki et al., 2016)، پوسیدگی ریشه و طوقه در *Dodonaea viscosa* (Anonymous, 2011) و پژمردگی و پوسیدگی در *Dianthus caryophyllus* (Anonymous, 2012) پیش‌تر گزارش شده است. این شواهد نشان می‌دهد که *F. solani* پاتوژنی گسترده با دامنه میزبانی وسیع است که علاوه بر گونه‌های زراعی، می‌تواند تهدیدی جدی برای گیاهان زینتی به‌ویژه در خانواده Cupressaceae باشد. با توجه به محدودیت نشانگر ITS در تفکیک گونه‌ها، استفاده از ژن‌های مکمل مانند TEF1- α یا RPB2 در مطالعات آینده توصیه می‌شود. همچنین بررسی دامنه میزبانی و توسعه راهکارهای مدیریتی زیست‌سازگار مانند استفاده از اسانس‌های گیاهی

یا عوامل آنتاگونیست می‌تواند به کاهش خسارت ناشی از این پاتوژن کمک نماید.



شکل ۱. روابط فیلوژنتیکی با روش همسایه‌پیوستن (NJ) بازسازی شد (Saitou & Nei, 1987). پایداری گره‌ها با ۱۰۰۰ بوت‌استرپ ارزیابی گردید و درخت اجماعی ۵۰٪ نمایش داده می‌شود؛ شاخه‌های با پشتیبانی کمتر از ۵۰٪ حذف شده‌اند. درصد پشتیبانی بوت‌استرپ در کنار هر شاخه آمده است (Felsenstein, 1985). فاصله‌های تکاملی با مدل درست‌نمایی مرکب بیشینه (MCL) محاسبه و به صورت «تعداد جانشینی به‌ازای هر جایگاه» گزارش شد (Tamura et al., 2004). مجموعه داده شامل ۷ توالی نوکلئوتیدی بود؛ جایگاه‌های مبهم با گزینه‌ی حذف دوتایی کنار گذاشته شد و در نهایت ۶۷۲ جایگاه در تحلیل باقی ماند. همه‌ی تحلیل‌ها در MEGA11 انجام شد (Tamura et al., 2021).

Figure 1. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates (Felsenstein, 1985) is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed (Felsenstein, 1985). Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 7 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 672 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 (Tamura et al., 2021).



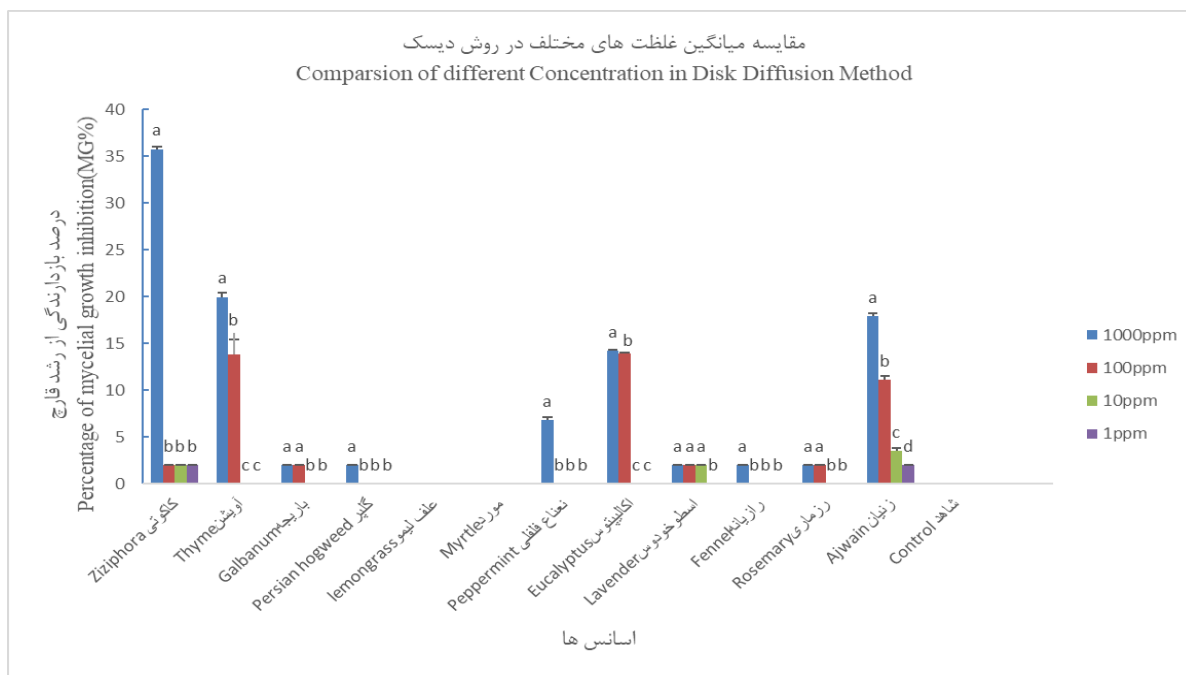
شکل ۲- از راست به چپ کلنی قارچ، میکرو و ماکروکنیدی و ریشه‌های آلوده شده با قارچ *Fusarium solani* در مقایسه با ریشه‌های سالم لاوسون

تأثیر اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ عامل بیماری در روش دیسک

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های گیاهی نشان داد که بین انواع اسانس‌ها و غلظت‌های مختلف، از نظر میزان مهار رشد قارچ *F. solani* تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۳). به‌جز دو اسانس حاصل از گیاه مورد و علف‌لیمو که حتی در بیشترین غلظت نیز تأثیر قابل توجهی نداشتند، سایر اسانس‌ها توانستند رشد قارچ را مهار کنند. در بالاترین غلظت، اسانس‌های

کاکوتی، آویشن، زنیان و اکالیپتوس به ترتیب با ۳۵/۷۶، ۱۹/۹۶، ۱۷/۹۳ و ۱۴/۱۶ درصد بیشترین بازدارندگی را از رشد ریشه‌ای قارچ نشان دادند. تفاوت در قابلیت بیوکنترلی اسانس‌های گیاهی به ترکیبات شیمیایی اصلی و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها بستگی دارد. بر این اساس، به نظر می‌رسد اثرات ضدقارچی مشاهده شده تحت تأثیر وجود ترکیبات غالب مانند تیمول باشد که در اسانس کاکوتی، آویشن و زنیان حضور دارد. مقایسه نتایج این پژوهش با مطالعات پیشین نشان می‌دهد که یافته‌های حاضر با گزارش‌های قبلی همخوانی دارد. به عنوان مثال، در تحقیقی استفاده از اسانس آویشن، زنیان و کاکوتی موجب بازدارندگی قابل توجه رشد ریشه‌ای *F. oxysporum* شد (Lotfi et al., 2015).

همچنین در بررسی دیگری اسانس آویشن به عنوان یکی از مؤثرترین اسانس‌ها در کنترل قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی معرفی شده است (Mohammadpour et al., 2015). تأثیرات ضدقارچی زنیان نیز در مطالعات مختلف تأیید شده و نتایج نشان داده است که این گیاه می‌تواند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی مانند *Alternaria solani* در گوجه‌فرنگی باشد (Abdolahi et al., 2010). علاوه بر این، گزارش‌های دیگر نشان داده‌اند که اسانس‌های گیاهی متعددی مانند آویشن، اسطوخودوس و مرزه می‌توانند رشد قارچ‌های آلوده‌کننده محصولات غذایی و زراعی را مهار کنند و جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی رایج باشند (Rasooli et al., 2009). هرچند استفاده مستقیم اسانس‌ها به دلیل هزینه بالای تولید و غلظت پایین مواد مؤثره محدودیت دارد، اما با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه، پتانسیل بالایی برای استفاده آن‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهی وجود دارد (Rahman et al., 2016; Plotto et al., 2003).

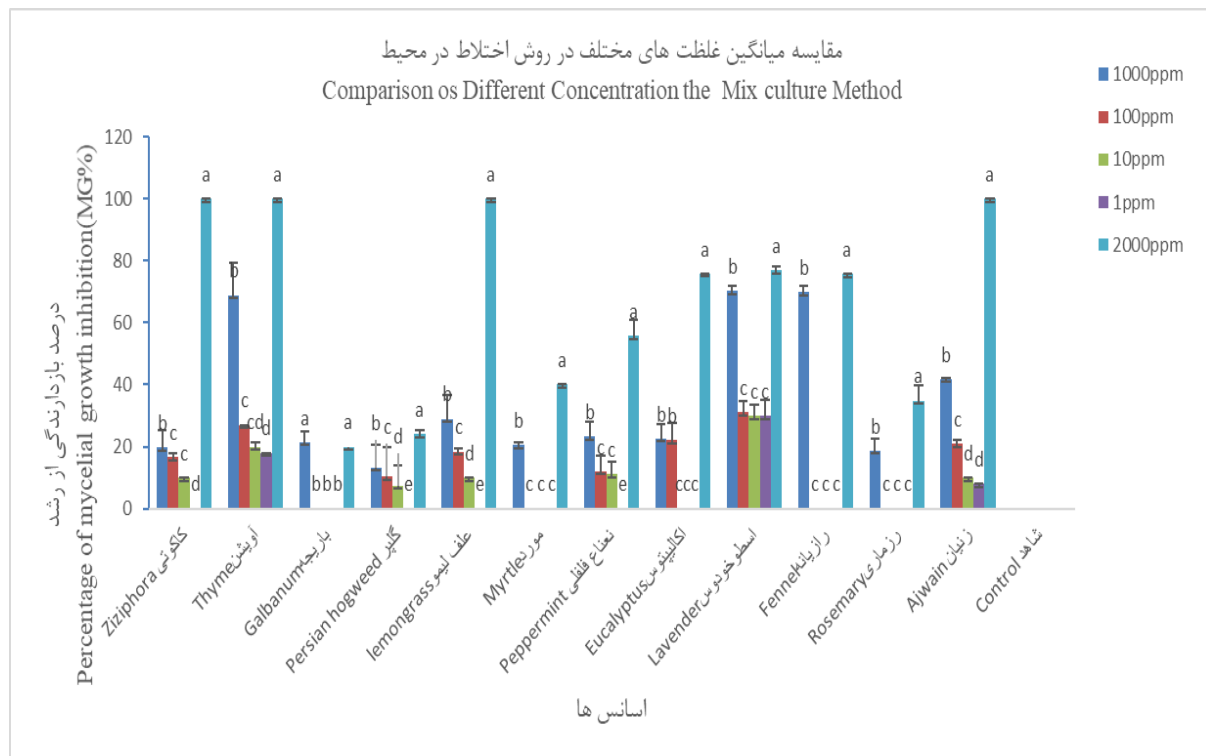


شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی روی قارچ *F. solani* در روش انتشار از دیسک

Figure 2. Antifungal Effect of Plant Essential Oils at Various Concentrations against *F. solani* by the Disk Diffusion Method

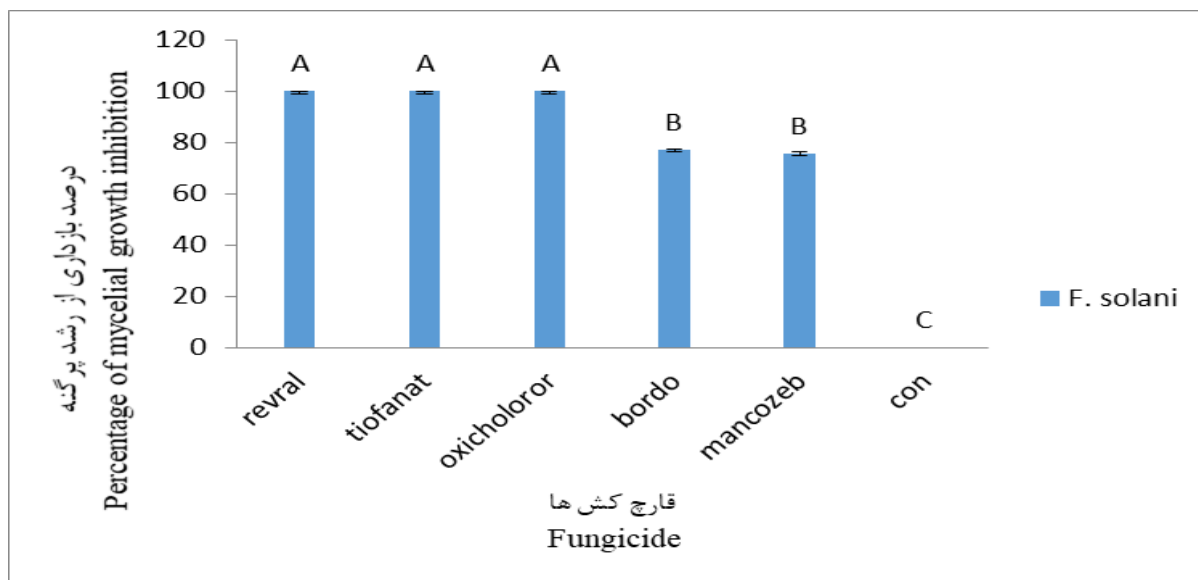
تاثیر اسانس‌های گیاهی و قارچ‌کش‌ها بر رشد قارچ عامل بیماری در روش اختلاط با محیط کشت

همه اسانس‌ها در کاهش رشد ریشه‌ای قارچ *F. solani* موثر بودند، کاکوتی، آویشن و زنیان در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام با مهار کامل رشد ریشه‌ای قارچ بیشترین تاثیر را داشتند. به میزان کمتری اسطوخودوس، اکالیپتوس و رازیانه به ترتیب با ۷۵/۹ و ۷۵ باعث بازدارندگی از رشد ریشه‌ای قارچ *F. solani* شدند (شکل ۴). در گونه *F. oxysporum* این اسانس‌ها تاثیر متوسطی در مهار این قارچ داشتند (Davari and Ezazi, 2022). در تمامی اسانس‌ها تفاوت از غلظت اول و دوم تفاوت معنی داری مشاهده شد. از نظر گروه بندی آماری بجز زنیان که چهار غلظت در چهار گروه قرار گرفت، در دیگر اسانس‌ها غلظت‌های مختلف هر اسانس در سه گروه قرار گرفتند. در تحقیقات دیگر اسانس آویشن و زنیان به ترتیب روی دو گونه *F. graminearum* و *F. solani* در اختلاط با محیط کشت به میزان ۱۰۰٪ باعث جلوگیری از رشد این قارچ‌ها شدند (Khalili et al., 2022). در ارزیابی اثر ضدقارچی اسانس‌ها مشاهده شد که برخی اسانس‌ها در روش دیسک دیفیوژن اثر محدودی نشان دادند، در حالی که در محیط کشت فعالیت ضدقارچی قابل توجهی داشتند. این تفاوت عمدتاً به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اسانس‌ها مانند فرار بودن، حلالیت محدود در محیط آبی و قابلیت نفوذ به آگار، غلظت واقعی موثر در محیط آزمایش و نحوه تماس مستقیم قارچ با اسانس مرتبط است (Bakkali et al., 2008; Balouiri et al., 2016). بنابراین، نتایج دیسک دیفیوژن ممکن است اثر واقعی مهارتی اسانس‌ها را به طور کامل نشان ندهد و باید با احتیاط تفسیر شود (Cowan, 1999).



شکل ۴- تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی روی قارچ *F. solani* در روش اختلاط با محیط کشت
Figure 3-Antifungal Effect of Plant Essential Oils at Different Concentrations on *Fusarium solani* by the Culture Medium Incorporation Technique

براساس نتایج آماری همه قارچ‌کش‌ها در کاهش رشد ریشه‌ای قارچ *F. solani* موثر بودند. بیشترین تاثیر را سه قارچ‌کش اکسی کلرور مس و رورال تی اس و تیوفانات متیل داشتند که به‌طور کامل رشد ریشه‌ای قارچ را مهار کردند. کمترین تاثیر را دو قارچ‌کش بردو و مانکوزب نشان دادند (شکل ۵).



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

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

تاثیر اسانس‌ها و قارچ‌کش‌ها بر جوانه‌زنی اسپور قارچ

نتایج تجزیه واریانس مربوط به اثر اسانس‌ها بر جوانه‌زنی اسپور قارچ *F. solani* نشان داد که تاثیر نوع اسانس بر درصد مهار جوانه زنی اسپور قارچ‌های مورد آزمایش معنی‌دار (در سطح احتمال آماری ۱ درصد) بوده است. بیشترین میزان ممانعت‌کنندگی مربوط به اسانس آویشن بود، این اسانس به میزان ۷۰/۶۷٪ از جوانه زنی اسپورهای این قارچ جلوگیری نمود. اسانس‌های کاکوتی و زنیان به ترتیب با ۶۶/۶۵ و ۵۰/۶۷ درصد بازداری در گروه بعدی قرار گرفتند. اسانس‌های باریجه، علف لیمو، رازیانه و مورد بدون هیچ بازداری در یک گروه آماری با شاهد قرار گرفتند (جدول ۱). اسانس گیاهان زنیان، آویشن، کاکوتی و مرزه بیشترین تاثیر را در بازداری از رشد پرگنه قارچ و جوانه زنی اسپورهای قارچ *B. cinerea* داشتند. این اسانس‌ها حاوی ترکیباتی مانند کارواکرول، تیمول، ترانس انتول، گاما ترپینن و پارا-سیمن هستند. به نظر می‌رسد خاصیت قارچ‌کشی این اسانس‌ها با این ترکیبات مرتبط باشند (Siripornvisal et al., 2009).

بیشترین میزان ممانعت‌کنندگی از جوانه زنی اسپور قارچ *F. solani* توسط قارچ‌کش بردو مشاهده شد. اکسی کلرور مس و شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۲).

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

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

درصد بازدارندگی در غلظت 2000 mg. l^{-1}	اسانس	
Inhibition percentage at 2000 mg. l^{-1}	Essential oil	
50.67 ^c	Ajwain	زنیان
0 ^f	Galbanum	باریجه
12 ^c	Persian Hogweed	گلبر
70.67 ^b	Thyme	آویشن
0 ^{f, f}	Lemongrass	علف لیمو
0 ^{f, f}	Myrtle	مورد
24 ^{d, f, d}	Peppermint	نعناع فلفلی
22.67 ^d	Eucalyptus	اکالیپتوس
20 ^d	Lavender	اسطوخودوس
0 ^f	Fennel	رازیانه
22.34 ^d	Rosemary	رزماری
66.65 ^c	Ziziphora	کاکوتی
0 ^f	Control	شاهد
84 ^b	Revrat-TS	رورال
52 ^b	Thiophanate-methyl	متیل تیوفانات
The results were not observable	Mancozeb	مانکوزب
5.33 ^c	Copper Oxchloride	اکسی کلرور
100 ^a	Bordeaux mixture	بردو

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

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

ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی اسانس‌های گیاهی و قارچ‌کش‌های شیمیایی بر *F. solani*

تفاوت گزارش شده در خواص ضد میکروبی اسانس‌ها را به تفاوت در ترکیبات شیمیایی و جدایه‌های قارچی نسبت می‌دهند) (Reedy *et al.*, 2008). تیماری که رشد قارچ در آن مشاهده نشد، روی محیط کشت PDA فاقد اسانس مجدداً کشت و پس از ۷ روز نتایج (رشد یا عدم رشد قارچ) در جدول دو ثبت شد. بر اساس نتایج حاصل اسانس‌های زنیان، آویشن و قارچ‌کش‌های تیوفانات متیل و رورال باعث قارچ‌کشی شدند، دو ترکیب کارواکول و تیمول که در بازداری از رشد ریشه ای قارچ موثر هستند در این دو گیاه به میزان بسیار بالایی وجود دارد (Purkait *et al.*, 2020)، این درحالی است که کاکوتی و اکسی کلرور مس دارای خاصیت ایستایی بودند، که به‌طور وسیع از این قارچ‌کش در پرورش گیاهان زینتی استان گیلان استفاده می‌شود. در قارچ‌های جنس‌های مختلف همانند اسپریژیلوس و اسکروتینیا کاکوتی باعث قارچ‌ایستایی و قارچ‌کشی شده است (Mazarei & Rafati, 2019). در این آزمایش به‌دلیل آن‌که در اثر اضافه کردن مانکوزب سطح محیط کشت کاملاً زرد شد و اسپورهای قارچ قابل مشاهده نبودند نتایج قابل بررسی نبود.

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

<i>F. solani</i>	اسانس Essential oil
FC	Ajwain زنیان
FC	Thyme آویشن
FS	Ziziphora کاکوتی
FC	Thiophanate-methyl تیوفانات متیل
-	Mancozeb مانکوزب
FS	Copper Oxychloride اکسی کلور مس
FC	Revral-TS رورال تی اس

FS:Fungistat , FC:Fungicide

نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس‌های آویشن، زنیان و کاکوتی بیشترین اثر بازدارندگی را بر قارچ عامل بیماری‌زای درختچه لاوسون دارند و می‌توانند به‌عنوان مکملی زیست‌سازگار در کنار قارچ‌کش‌های شیمیایی برای مدیریت بیماری‌های فضای سبز به‌ویژه در منازل مورد استفاده قرار گیرند. سایر اسانس‌های بررسی شده کارایی کمتری داشتند و برای بهبود عملکرد نیازمند بهینه‌سازی یا ترکیب با سایر عوامل ضدقارچ هستند. نقطه قوت این تحقیق شناسایی مؤثرترین اسانس‌ها در کنترل مستقیم قارچ بود، در حالی که محدودیت اصلی به پایداری و اثربخشی آن‌ها در شرایط محیطی واقعی مربوط می‌شود. بنابراین بررسی روش‌های فرمولاسیون پایدار و رهایش کنترل شده می‌تواند زمینه‌ساز استفاده عملی‌تر از این ترکیبات در مدیریت زیست‌سازگار بیماری‌های گیاهی باشد.

منابع

- Admas, A. M., & Kebede, L. (2024). Effects of Fusarium Diseases on Forest Nursery and Its Controlling Mechanisms. *In Fusarium-Recent Studies. IntechOpen.*
- Abedi-Tizaki, M., Zafari, D., and Sadeghi, J. (2016). First report of *Fusarium solani* causing stem rot of *Dracaena sanderiana* in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 56(1): 100–103. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0015>
- Abdolahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y., Bernousi, I., and Meshkatalasadat, M. H. (2010). Essential oils as control agents of postharvest *Alternaria* and *Penicillium* rots on tomato fruits. *Journal of Food Safety* 30(2): 341–352. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00205.x>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Academic Press.
- Anonymous. (2011). Identification of *Fusarium solani* as the main causal agent of root and crown rot of *Dodonaea viscosa* in Khuzestan province, Iran. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 42(2): 85–93. https://plantprotection.scu.ac.ir/article_10431.html
- Anonymous. (2012). Morphological and molecular identification of *Fusarium* species associated with carnation crown and root rot in Mahallat, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48(1): 13–22. <https://doaj.org/article/d39f4bdec86846a0ae4717112cb96aad>
- Aoki, T., Ward, T. J., Kistler, H. C., and O'Donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *JSM Mycotoxins* 62(2): 91–102.

Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2): 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): 71–79.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564–582.

Davari, M., and Ezazi, R. (2022). Mycelial inhibitory effects of antagonistic fungi, plant essential oils and propolis against five phytopathogenic *Fusarium* species. *Archives of Microbiology* 204(8): 480.

Farjon, A. (2010). *A handbook of the world's conifers*. Brill.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

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

Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3: 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

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

Khaleil, M. M., Alnoman, M. M., Elrazik, E. S. A., Zagloul, H., and Khalil, A. M. A. (2021). Essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill. as a green fungicide and defense-inducing agent against fusarium root rot disease in *Vicia faba* L. *Biology* 10(8): 696.

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

Konstantinidou-Doltsinis, S., Markellou, E., Kasselaki, A. M., Fanouraki, M. N., Koumaki, C. M., Schmitt, A., & Malathrakis, N. E. (2006). Efficacy of Milsana®, a formulated plant extract from *Reynoutria sachalinensis*, against powdery mildew of tomato (*Leveillula taurica*). *Biocontrol*, 51(3), 375-392.

Lotfi, P., Yaghmaei, P., and Ebrahim-Habibi, A. (2015). Cymene and metformin treatment effect on biochemical parameters of male NMRI mice fed with high fat diet. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 14: 1–5.

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

Mohammadpour, V. R., Galavi, M., Ramroudi, M., and Fakheri, B. A. (2015). Effects of drought stress and biofertilizers inoculation on growth, essential oil yield and constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.).

Moretti, A., Pascale, M., and Logrieco, A. F. (2019). Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology* 84: 38–40.

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

Nelson, J. D., Mindrup, E. A., Chung, C. K., Lindstrom, R. L., and Doughman, D. J. (1983). Fungal contamination in organ culture. *Archives of Ophthalmology* 101(2): 280–283.

Ocamb, C. M., and Juzwik, J. (1995). *Fusarium* species associated with rhizosphere soil and diseased roots of eastern white pine seedlings and associated nursery soil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17(3): 325–330.

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

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

Pitaroki, D., Tzakou, O., Loukis, A., and Harvala, C. (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soil-borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3249–[pages not clear in source].

Plotto, A., Roberts, D., and Roberts, R. G. (2003). Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato. *Acta Horticulturae* 628: 737–745.

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

Rahman, S., Biswas, S. K., Barman, N. C., and Ferdous, T. (2016). Plant extract as selective pesticide for integrated pest management. *Biotechnological Research* 2(1): 6–10.

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

Rasooli, I., Shayegh, S., and Astaneh, S. D. A. (2009). The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *International Journal of Dental Hygiene* 7(3): 196–203.

Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., ... and Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319(5863): 611–613.

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425.

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

Singh, A., Kumar, J., Sharma, V. K., Singh, D. K., Kumari, P., Nishad, J. H., ... and Kharwar, R. N. (2021). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of an endophytic *Fusarium proliferatum* (ACQR8), isolated from a folk medicinal plant *Cissus quadrangularis* L. *South African Journal of Botany* 140: 87–94.

Siripornvisal, S., Rungprom, W., and Sawatdikarn, S. (2009). Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2: S229–S233.

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

Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030–11035.

Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Wu, Q., Chen, Y., Dou, X., Liao, D., Li, K., An, C., ... and Dong, Z. (2024). Microbial fertilizers improve soil quality and crop yield in coastal saline soils by regulating soil bacterial and fungal community structure. *Science of The Total Environment* 949: 175127.

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