

## بررسی مقدماتی اثر مهارکنندگی اسانس پنج گونه گیاه بر رشد میسلیمیویم چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در شرایط آزمایشگاهی

جهانشیر شاکرهی<sup>۱</sup>، عیدی بازگیر<sup>۱</sup> و محمد فیضیان<sup>۲</sup>

### چکیده

در جستجو برای کشف مواد ضد قارچ جدید که تجدید شونده و سازگار با محیط زیست باشند، اثر اسانس پنج گونه گیاه شامل: *Artemisia aucheri*، *Thymus daenensis*، *Vitex agnus-castus*، *Mentha aquatica*، *Myrtus communis* بیماری‌زای گیاهی *Rhizoctonia solani*، *Gaeumannomyces graminis*، *Fusarium oxysporum* و *Pythium ultimum* مورد بررسی قرار گرفت. اثر اسانس‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل در سه غلظت و سه تکرار در ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی محیط کشت PDA انجام گردید. نتایج نشان داد که قارچ *R. solani* با ۴۸/۸۳٪ مهار رشد مقاوم‌ترین و *P. ultimum* با ۸۹/۶۲٪ حساس‌ترین گونه در برابر اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش بوده‌اند. همچنین مشخص شد که اسانس *M. aquatica* و *T. daenensis* به ترتیب با ۹۳/۷۰ و ۹۲/۷۴٪ مهار رشد میسلیمیویم قارچ‌های مورد مطالعه، بیشترین اثر و *V. agnus-castus* با ۳۳/۸۸٪ مهار رشد، کمترین تأثیر را داشته‌اند. در غلظت ۲۰ میکرولیتر بر تشتک‌پتری (قطر ۹ سانتی‌متر)، اسانس گیاهان *M. aquatica* و *T. daenensis* باعث ۱۰۰ درصد مهار رشد میسلیمیویم قارچ‌های مورد مطالعه شده‌اند. با توجه به اثر قارچ‌کشی قابل توجه اسانس گیاهان بررسی شده و کم‌خطر بودن آنها برای انسان و محیط زیست به نظر می‌رسد اسانس‌های گیاهی احتمالاً می‌توانند برای کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و یا حداقل به عنوان مدلی برای ساخت قارچ‌کش‌های جدید مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس گیاهی، قارچ کش، مهارکننده رشد، کنترل غیر شیمیایی

### مقدمه

امروزه کاربرد ترکیبات شیمیایی به عنوان ارزان‌ترین و متداول‌ترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی مورد توجه است ولی این مواد معمولاً در طبیعت به کندی تجزیه می‌شود و به همین دلیل باعث ایجاد مسمومیت برای انسان، جانوران اهلی و سایر موجودات زنده می‌شود (۸ و ۱۳).

دانشمندان تلاش می‌کنند که روش‌های جدید افزایش تولید مواد غذایی برای جمعیت همواره در حال رشد بشر را پیدا نمایند ولی متأسفانه خسارت زیاد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به محصولات غذایی هنوز هم انکار ناپذیر است.

۱. به ترتیب استادیاران گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۲. مربی خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری گیاهان

گیاه مورد *Myrtus communis* از پنج کیلومتری شمال شهرستان خرم‌آباد، گیاه پونه *Mentha aquatica* از شهرستان الشتر، گیاه پنج انگشت *Vitex agnus-castus* از ۲۰ کیلومتری شمال شهرستان خرم‌آباد، آویشن *Thymus daenensis* از ارتفاعات کوه گرین الشتر و درمنه کوهی *Artemisi aucheri* از ۲۰ کیلومتری شرق شهرستان دورود در رویشگاه طبیعی آنها جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط سایه و تهویه مناسب خشک شدند.

### تهیه اسانس

برای تهیه اسانس، شاخه‌های چوبی گیاهان خشک شده را حذف کرده و باقی‌مانده گیاه خشک شده با دست به شکل پودر درآمد. هر بار ۵۰ گرم پودر گیاهی با کمک دستگاه اسانس‌گیر (ساخته شده در واحد شیشه‌گری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به روش تقطیر با آب، اسانس‌گیری شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آبگیری و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای به حجم ۲ میلی‌لیتر با روپوش آلومینیومی در یخچال نگهداری شد.

### تهیه قارچ‌ها

قارچ *F. oxysporum*، *G. graminis*، *R. solani* از آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان و گونه *P. ultimum* از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه گردید. قارچ‌ها در داخل تشتک‌های پتری به قطر ۹ سانتی‌متر روی محیط کشت PDA در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد پرورش داده شد.

### اثر مهارکنندگی اسانس بر روی رشد میسلیمی قارچ‌ها

بر اساس روش آلوآراز کاستیلانوس و همکاران (۸) محیط

عوامل بیماری‌زای گیاهی در مقابل مواد شیمیایی آفت‌کش مقاومت نشان می‌دهند و هر روز شاهد افزایش تعداد عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنها هستیم. بنابراین نیاز به پژوهش در راستای کشف مواد جدید ضد قارچی که تجدید شونده، سازگار با محیط زیست و به آسانی قابل تهیه باشد ضروری می‌نماید (۱۷، ۷). گیاهان معمولاً توانایی دفاع از خود را با تولید انواع متابولیت‌های ثانوی شامل آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها و دیگر ترکیبات آروماتیک که احتمالاً برای دشمنان آنها نامطلوب و یا حتی سمی‌اند را به دست آورده‌اند (۳، ۵، ۱۰، ۱۶، ۱۲، ۱۵). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که برخی از این ترکیبات می‌تواند برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و یا حداقل به عنوان مدلی برای ساخت ترکیبات آفت‌کش جدید مورد استفاده قرار گیرند (۴، ۶، ۹، ۱۱، ۱۴ و ۱۸). در سال‌های اخیر شرکت‌های تجاری از نتایج یافته‌های پژوهشی در مورد خواص آفت‌کشی اسانس‌های گیاهی استفاده نموده و ترکیبات آفت‌کشی را به بازار عرضه نموده‌اند. شرکت Mycotech فراورده‌ای را تحت نام *Cinnamite*<sup>TM</sup> را به عنوان یک قارچ‌کش برای استفاده در گلخانه‌ها و فراورده *Valero*<sup>TM</sup> را به عنوان یک ترکیب کنه‌کش و قارچ‌کش برای استفاده در گیاهانی مانند انگور و مرکبات و میوه‌های خشک عرضه نموده است (۱۵). در این پژوهش برای اولین بار در کشور، خاصیت ضد قارچی اسانس ۵ گونه گیاه شامل *Mentha aquatica* L.، *Myrtus communis* L. (Myrtaceae)، *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae)، (Lamiaceae)، *Artemisia* و *Thymus daenensis* Celak (Lamiaceae) *aucheri* Boiss. (Asteraceae) که بومی ایران بوده و در رابطه با شناسایی اسانس آنها تحقیقاتی صورت گرفته (۱ و ۲) بر روی قارچ‌های *Rhizoctonia solani* Kühn، *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx & Olivier، *Pythium ultimum* Trow و *Fusarium oxysporum* Schlecht مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر اسانس پنج گونه گیاه روی چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در غلظت‌های مختلف

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۵۹۱/۱۷**	۶/۰۷	۴	اسانس
۷۸۷/۹۵**	۸/۰۹	۲	غلظت
۳۴۰/۸۶**	۳/۵۰	۳	قارچ
۷۴/۱۷**	۰/۷۶	۸	اسانس × غلظت
۳۲/۱۶**	۰/۳۳	۱۲	اسانس × قارچ
۵۰/۵۱**	۰/۵۱	۶	غلظت × قارچ
۲۶/۳۸**	۰/۲۷	۲۴	اسانس × غلظت × قارچ
	۰/۰۱	۱۲۰	اشتباه

\*\* : اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

میسلوم قارچ در پتری شاهد و T قطر رشد قارچ در تیمار حاوی اسانس و I درصد مهار رشد میسلوم قارچ در تیمار مربوطه را نشان می‌دهد. داده‌های مربوط به درصد مهار رشد قارچ قبل از تجزیه آماری با تبدیل به  $\text{Arcsin} \sqrt{x/100}$  نرمال شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS11 تجزیه و تحلیل و در صورت معنی‌دار بودن با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد، مقایسه میانگین‌ها انجام شد.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین درصد مهار رشد میسلوم قارچ‌ها توسط اسانس گیاهان مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). بر اساس این نتایج اسانس گیاه *M. aquatica* با ۹۳/۷۰ درصد بیشترین و اسانس *V. agnus – castus* با ۳۳/۸۸ درصد، کمترین اثر مهارکنندگی را روی رشد قارچ‌های مورد مطالعه نشان دادند (جدول ۲). در این پژوهش بین اثر مهارکنندگی اسانس گیاهان *M. aquatica* (۹۳/۷۰٪) و *T. daenensis* (۹۲/۷۴٪) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین اسانس گیاهان *M. communis* (۵۲/۶۷٪)

کشت PDA تهیه و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت آماده شده در داخل هر تشتک پتری (۹ سانتی‌متری) سترون ریخته شد. پس از انعقاد محیط کشت، نمونه‌های قارچ (به صورت دیسک‌های با قطر ۵ میلی‌متر تهیه شده از حاشیه کشت‌های پرورش یافته قارچ‌ها روی محیط PDA) در شرایط سترون مایه‌زنی شد. با کمک میکروپیپت، مقدار ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر اسانس داخل درب پتری‌های حاوی قارچ ریخته شد و زیر پتری‌ها به صورت وارونه روی آنها گذاشته و در انکوباتور در شرایط ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای جلوگیری از خروج ترکیبات فرار اسانس، با کمک پارافیلیم، اطراف پتری کاملاً مسدود گردید. قطر رشد میسلوم قارچ‌های مورد آزمایش در تیمارهای مختلف پس از پرشدن پتری‌های شاهد هر قارچ برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با آزمایش فاکتوریل شامل نوع اسانس، غلظت و قارچ در سه تکرار (هر تکرار شامل یک تشتک پتری مایه‌زنی شده با قارچ) انجام شد. برای محاسبه درصد مهار رشد میسلوم قارچ‌ها در تیمارهای مختلف از فرمول  $I = [(C-T)/C] \times 100$  استفاده شد که در آن C قطر رشد

جدول ۲. میانگین اثر مهارکنندگی رشد میسلیمی اسانس ۵ گونه گیاه روی چند گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در غلظت‌های مختلف

گونه گیاه	خطای معیار $\pm$ میانگین درصد مهار رشد قارچ
<i>Myrtus communis</i>	۵۲/۶۷ $\pm$ ۲/۴ <sup>b</sup>
<i>Mentha aquatica</i>	۹۳/۷۰ $\pm$ ۴/۸ <sup>a</sup>
<i>Vitex agnus-castus</i>	۳۳/۸۸ $\pm$ ۳/۶ <sup>c</sup>
<i>Thymus daenensis</i>	۹۲/۷۴ $\pm$ ۴/۰ <sup>a</sup>
<i>Artemisia aucheri</i>	۵۳/۹۴ $\pm$ ۴/۰ <sup>b</sup>

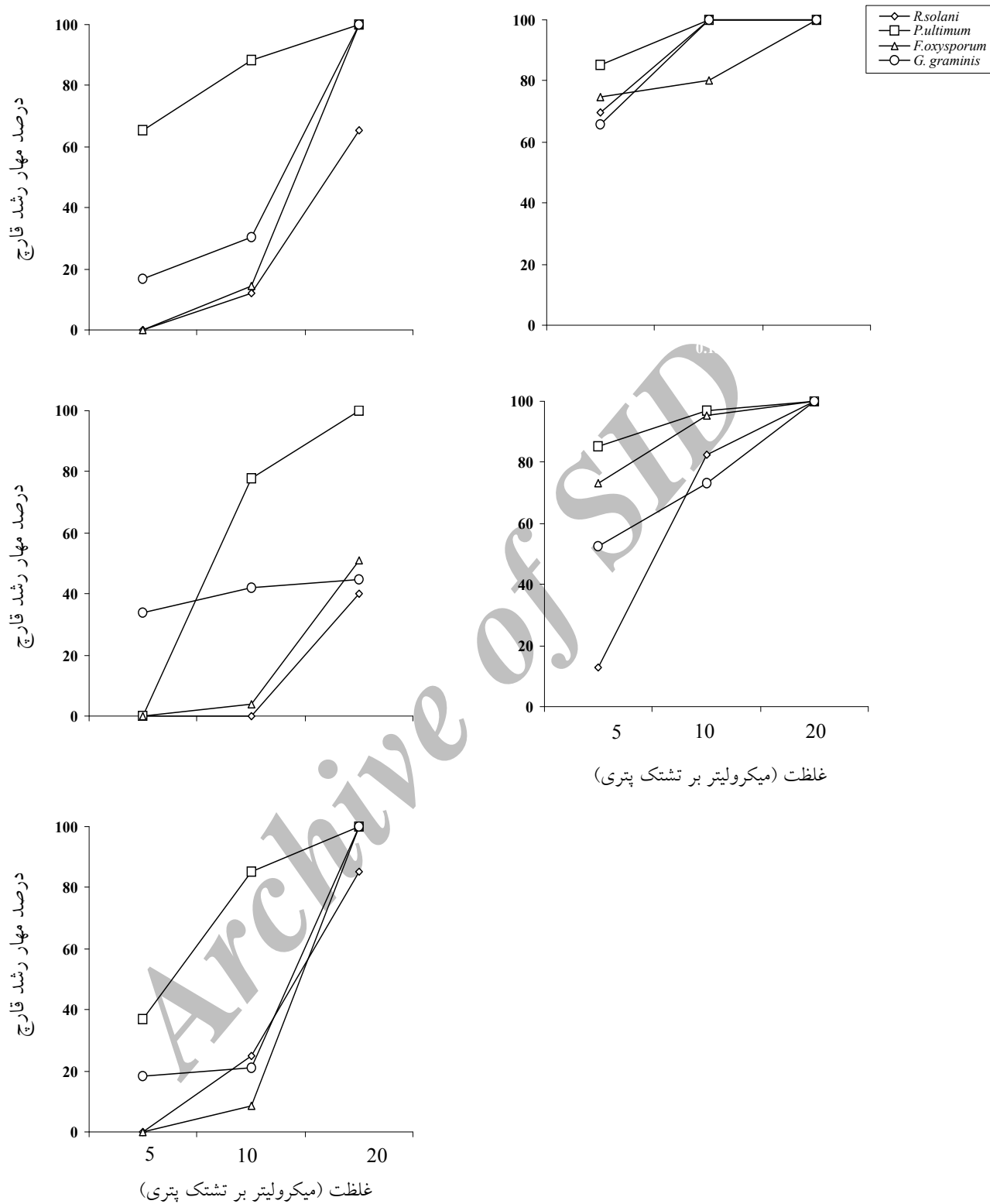
- اعداد دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

(شکل ۱).

قارچ‌های مورد مطالعه، حساسیت یکسانی در برابر اسانس‌های گیاهی نداشته و با هم اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد نشان می‌دهند (جدول ۱). در بین چهار گونه قارچ مورد مطالعه *R. solani* با میانگین ۴۸/۸۳ درصد مهار رشد میسلیم مقاوم‌ترین و گونه *P. ultimum* با ۸۲/۶۲ درصد مهار رشد، حساس‌ترین گونه بوده است. گونه‌های *F. oxysporum* و *G. graminis* به ترتیب ۵۴/۵۴ و ۶۸/۵۵ درصد مهار رشد حساسیت متوسطی در برابر اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه از خود نشان دادند (جدول ۳). این نتایج با یافته‌های لیو و همکاران (۱۵) که قارچ *Rhizoctonia cerealis* را یکی از حساس‌ترین گونه‌های قارچی مورد آزمایش در برابر اسانس *Artemisia annua* ذکر نمودند، مغایرت دارد. البته گونه قارچ و اسانس مورد استفاده در پژوهش حاضر با پژوهشگران یاد شده یکسان نبودند. هم‌چنین در گزارش این پژوهشگران در غلظت ۳/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر، اسانس *A. annua* رشد قارچ *G. graminis* را به طور کامل متوقف نمود ولی مشاهده می‌شود (شکل ۱) که در پژوهش حاضر در غلظت ۰/۲۶ میکرولیتر بر میلی لیتر غیر از اسانس گونه *V. agnus-castus* سایر اسانس‌های مورد بررسی رشد این گونه قارچ را به طور ۱۰۰ درصد مهار نموده‌اند (شکل ۱). نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج آلوارز کاستیلانوس و همکاران (۸) که گونه قارچ *P. ultimum* را حساس‌ترین گونه در برابر اسانس *C. coronarium* معرفی نموده‌اند؛ مطابقت دارد. بر اساس گزارش آلوارز کاستیلانوس و همکاران (۸)

و *A. aucheri* (۵۳/۹۴٪) از نظر مهارکنندگی رشد قارچ‌های مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (جدول ۲). مشخص شد که اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه، خاصیت ضد قارچی دارد، همان طوری که قبلاً نیز گزارش‌هایی از خواص ضد قارچی اسانس گیاهان *Eucalyptus citriodora* (۱۷)، *Vitex trifolia* (۱۱)، *Thymus revolutus* (۱۳)، *T. pubesens* و *T. serpyllum* (۱۸) و *Chrysanthemum coronarium* (۸) و عصاره گیاه *Piper aduncum* (۱۴) ارائه شده است.

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین اثر غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان مورد مطالعه روی مهارکنندگی رشد قارچ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). با افزایش غلظت اسانس، درصد مهارکنندگی رشد میسلیم قارچ‌ها افزایش می‌یابد. بیشترین تأثیر مربوط به بالاترین غلظت (۲۰ میکرولیتر در پتری‌دیش) اسانس بود (شکل ۱) به طوری که در این غلظت اثر مهارکنندگی اسانس *M. communis* روی قارچ‌های *F. oxysporum*، *P. ultimum*، *R. solani* و *G. graminis* به ترتیب ۸۵/۱۸، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد بود (شکل ۱). در این غلظت درصد مهار رشد قارچ‌های ذکر شده توسط اسانس *V. agnus-castus* به ترتیب ۴۰، ۱۰۰، ۵۱/۱۱ و ۴۴/۶۴ درصد و دو اسانس *M. aquatica* و *T. daenensis* در این غلظت به طور کامل رشد هر چهار گونه قارچ مورد مطالعه را متوقف نمودند و اسانس گیاه *A. aucheri* نیز غیر از قارچ *R. solani*، رشد سایر قارچ‌ها را به طور کامل مهار نمود



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف اسانس پنج گونه گیاه بر روی رشد میسلیومی چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی

جدول ۳. میانگین مهار رشد چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در کاربرد اسانس پنج گونه گیاه

خطای معیار $\pm$ میانگین درصد مهار رشد قارچ	قارچ
۴۸/۸۳ $\pm$ ۲/۴۱ <sup>d</sup>	<i>Rhizoctonia solani</i>
۶۸/۵۵ $\pm$ ۴/۸۶ <sup>b</sup>	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
۵۴/۵۴ $\pm$ ۳/۶۵ <sup>c</sup>	<i>Fusarium oxysporum</i>
۸۹/۶۲ $\pm$ ۴/۰۸ <sup>a</sup>	<i>Pythium ultimum</i>

۱. اعداد دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

رشد شده و در همین غلظت این اسانس گیاهی روی قارچ‌های *R. solani* و *F. oxysporum* هیچ‌گونه اثر مهارکنندگی نداشته است (شکل ۱).

بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها اثر متقابل بین غلظت و قارچ نیز معنی‌دار بوده است (جدول ۱). این وضعیت نشان می‌دهد که صرف‌نظر از نوع اسانس، حساسیت قارچ‌های مورد بررسی در برابر غلظت‌های اسانس یکسان نبوده و حداقل در بعضی از گونه‌های قارچ با افزایش غلظت درصد مهار رشد میسلیم از شدت کمتری برخوردار بوده است.

با توجه به اثرات قارچ‌کشی قابل توجه اسانس‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش و نتایج به دست آمده توسط سایر پژوهشگران، هم‌چنین کم‌خطر بودن ترکیبات گیاهی برای انسان و دوام کم آنها در محیط زیست به نظر می‌رسد که پژوهش روی ترکیبات گیاهی شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به منظور دسترسی به ترکیبات قارچ‌کش برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و یا به عنوان مدلی برای ساخت ترکیبات قارچ‌کش جدید ضروری می‌باشد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان که تمام هزینه‌های این طرح را تأمین نموده‌اند، هم‌چنین خانم‌ها مهندس آرزو نقوی و کبری سپهوند کارشناسان دانشکده کشاورزی، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

اسانس *C. coronarium* در غلظت ۲۰ میکرولیتر در تشتک‌پتری رشد قارچ *P. ultimum* را ۹۵/۵ درصد مهار نمود که مشاهده می‌شود در غلظت مشابه هر چهار گونه گیاه مورد بررسی، رشد این قارچ را به طور ۱۰۰ درصد مهار نموده‌اند و حتی در غلظت ۱۰ میکرولیتر در تشتک‌پتری، اسانس گیاه *M. aquatica* و *T. daenensis* به ترتیب ۱۰۰ و ۹۶/۸۸ درصد مهار رشد این قارچ را موجب شده‌اند (شکل ۱) به طوری که اثر بیشتری از اسانس *C. coronarium* مورد پژوهش توسط محققین فوق داشته‌اند.

تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که اثر متقابل اسانس و غلظت معنی‌دار است (جدول ۱). با افزایش غلظت در اسانس‌های مورد بررسی، درصد مهار رشد میسلیم قارچ‌ها افزایش مشابهی نداشته و حداقل در بعضی از اسانس‌ها با افزایش غلظت درصد مهار رشد قارچ از شدت کمتری برخوردار بوده است. مثلاً افزایش غلظت از ۵ به ۱۰ میکرولیتر بر تشتک‌پتری در اسانس *T. daenensis* باعث ۶۹/۶۷ درصد افزایش در مهار رشد قارچ *R. solani* شده است ولی این افزایش غلظت در اسانس گیاه *V. agnus-castus* هیچ‌گونه افزایشی بر درصد مهار رشد این گونه قارچ نداشته است (شکل ۱).

در این آزمایش اثرات متقابل اسانس و قارچ نیز معنی‌دار بوده است (جدول ۱) به طوری که قارچ‌های مورد بررسی در برابر اسانس‌های گیاهی، حساسیت یکسانی نداشته‌اند (جدول ۳). مثلاً اسانس *A. aucheri* در غلظت ۵ میکرولیتر بر تشتک‌پتری روی قارچ *P. ultimum* باعث ۶۵/۳۵ درصد مهار

## منابع مورد استفاده

۱. احمدی، ا.، م. میرزا و ف. سفیدکن. ۱۳۷۷. شناسایی و مقایسه ترکیبات موجود در اسانس برگ و میوه گیاه دارویی پنج انگشت *Vitex agnus-castus* L. پژوهش و سازندگی ۳۸: ۸۰-۸۳.
۲. برازنده، م. م. ۱۳۷۷. شناسایی ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده روغن اسانسی سوسنمبر آبی (پونه آبی) *Mentha aquatica* پژوهش و سازندگی ۳۸: ۳۵-۳۷.
۳. بقالیان، ک. و ح. نقدی بادی. ۱۳۷۹. گیاهان اسانس دار. نشر اندز، شرکت تعاونی اندیشه نگار پویا، تهران.
۴. رضایی، م. و ن. حسن زاده. ۱۳۷۶. ارزیابی تأثیر عصاره گیاهان بر باکتری عامل بیماری آتشک درختان دانه دار. پژوهش و سازندگی ۳۷: ۳۴-۳۷.
۵. زرگری، ع. ۱۳۷۱. گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران.
۶. وند یوسفی، ج.، س. مرادی بیده‌ندی، ا. نصیر احمدی و ا. جاسبی. ۱۳۷۴. فعالیت بیولوژیکی اسانس گیاه *Artemisia hausskenchtii* پژوهش و سازندگی ۲۹: ۲۸-۳۰.
7. Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4<sup>th</sup> ed., Academic press, New York.
8. Alvarez-Castellanos, P. P., C. D. Bishop and M. J. Pascual-Villaobos. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland Chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochem. 57: 99-102.
9. Amadioha, A. C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protec. 19: 287-290.
10. Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci. 161: 839-851.
11. Hernandez, M. M., C. Heraso, M. L. Villarreal, I. Vargas-Arispou and E. Aranda. 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). J. Ethnopharmacol. 67: 37-44.
12. Hossain, M. M., N. Paul., M. H. Sohrab, E. Rahman and M. A. Rashid. 2001. Antibacterial activity of *Vitex trifolia*. Fitotrapia 72: 695-697.
13. Karaman, S., M. Digrak, U. Ravid and A. Ilcim. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymus revolutus* Celak from Thrkey. J. Ethnopharmacol. 76: 183-186.
14. Lentz, D. L., A. M. Clark, C. D. Hufford, B. Grimes, C. M. Passreiter, J. Cordero, O. Ibrahimi and A. Okunade. 1998. Antimicrobial properties of Hunduran medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 63: 253-263.
15. Liu, C. H., W. X. Zou, H. Lu and R. X. Tan. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. J. Biotechnol. 88: 277-282.
16. Panda, N. and C. S. Kush. 1995. Host Plant Resistance to Insect. CAB Interntional, Pub., USA.
17. Ramezani, H., H. P. Singh, D. R. Batish, R. K. Kohli and J. S. Dargan. 2002. Fungicidal effect of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* and its major constituent Citronellal. Arable Entomol. and Pathol. 55: 327-330.
18. Rasooli, I. and S. A. Mirmostafa. 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. Fitotrapia 73: 244-250.