بازدارندگی از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی توسط چند اسانس در مقایسه با قارچ آنتاگونیست تریکودرما

The inhibitory growth of *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici*, the causal agent of tomato fusarium wilt by essential oils in comparison of *Trichoderma* antagonist fungus

محیا فتحی اقدام[۱]، داریوش شهریاری[۲*] و مژده ملکی[۳]

دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳

چکیده

پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* از بیماری‌های مهم نواحی گرم و خاک‌های شنی کشور محسوب می‌شود. در این مطالعه اثر اسانس گیاه آویشن، زنیان، رازیانه و قارچ آنتاگونیست *Tricoderma harzianum* کد (Th- va-104) در شرایط آزمایشگاهی روی سرعت رشد کلنی قارچ و بازدارندگی از رشد، در هفت غلظت ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام در محیط کشت PDA بررسی شد. حداقل درصد بازدارندگی از رشد قارچ (غلظت Ec_{50}) اسانس آویشن ۸۳/۹۵ ٪، زنیان ۶۲/۶۸۵ ٪ و رازیانه ۵۹/۹۷ ٪ تعیین شد. قارچ تریکودرما با ۷۸/۵۳ درصد بازدارندگی بعد از اسانس آویشن بیشترین میزان بازدارندگی از رشد مسیلیومی قارچ *F. oxysporum* fsp *lycopersici* داشته است. در آزمایشات گلخانه‌ای تاثیر اسانس آویشن، رازیانه و زنیان با غلظت ۰/۵ و **۱** در هزار، قارچ‌کش (اپیرودیون + کاربندازیم پودر وتابل ۵۲/۵ ٪) با غلظت ۱/۵ در هزار و قارچ تریکودرما روی قارچ عامل بیماری در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. اسانس‌ها هم‌زمان با کاشت گیاهچه‌گوجه‌فرنگی و قارچ تریکودرما سه روز قبل از انتقال نشاء با خاک گلدان مخلوط شد. آماربرداری ازدرصد شاخص شدت بیماری چهار هفته بعداز مایه‌زنی انجام شد. نتایج نشان داد اسانس آویشن و تیمار تریکودرما به ترتیب با شدت شاخص بیماری ۲/۶ و ۲/۰۶درجه نزدیک‌ترین شاخص بیماری به شاهد سالم بودند. در تیمار اسانس آویشن میانگین وزن تر و خشک ریشه (۱/۵۳، ۰/۲۸ گرم) وزن تر وخشک بوته (۱۳/۱۹، ۱/۸۲گرم) و قارچ تریکودرما وزن تر و خشک ریشه (۱/۷۹، ۰/۲۷ گرم) و بوته (۱۲/۷۷، ۱/۶۳گرم) مشابه هم و درگروه آماری شاهد سالم قرار گرفتند.

واژگان کلیدی: *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici*، اسانس، بازدارندگی، تریکودرما، گوجه‌فرنگی

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین –پیشوا، گروه گیاهپزشکی، ورامین، ایران

۲- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: dshahriari37@gmail.com

مقدمه

تولید محصولات کشاورزی به‌خصوص سبزی و صیفی نقش بسیار حیاتی در زندگی مردم از نظر غذایی دارد و بخشی از صادرات غیرنفتی کشور را تشکیل می‌دهد. گوجه فرنگی دارای سطح زیر کشت بالغ بر ۱۵۸ هزار هکتار با تولید ۶۲۴ میلیون تن درسال در کشور می‌باشد (بی‌نام ،۱۳۹۴). یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های خاکزاد که هر سال خسارت چشمگیری به محصولات سبزی و صیفی‌جات در مزارع و گلخانه‌ها وارد می‌کند، پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* می‌باشد. در مزرعه علائم بیماری نخست به‌صورت زردی برگ-های پایین و مرگ آنها مشاهده می‌شود، سپس برگ‌های جوان و یک یا چند شاخه تحت تأثیر بیماری قرار می‌گیرند. در برش ساقه یا دمبرگ دیواره، سلول‌های آوندی بصورت قهوه‌ای مشخص دیده می‌شوند. ممکن است پژمردگی در گیاه آلوده تنها در وسط روز نمایان شود ولی به تدریج و با پیشرفت بیماری به‌صورت دائمی در آمده و مرگ گیاه را به دنبال خواهد داشت (Walker, 1981). این بیماری در اغلب مناطق تحت کشت گوجه‌فرنگی گسترش دارد. عامل بیماری جزء بیمارگرهای خاکزاد بوده و بقای آن در خاک به صورت میسلیوم و انواع اسپور در بقایای گیاهی آلوده و زمستان‌گذرانی آن به‌صورت کلامیدوسپور بوده و هر منطقه پس از یک بار آلودگی با فوزاریوم، برای مدتی طولانی آلوده باقی خواهد ماند. با کاشت گیاهان سالم در خاک‌های آلوده، لوله تندشی اسپورها و یا میسلیوم قارچ به‌طور مستقیم از انتهای ریشه یا از طریق زخم‌های ایجاد شده و یا از محل تشکیل ریشه فرعی وارد ریشه گیاه شده و هیف قارچ به صورت بین سلولی از طریق پوست ریشه، خود را به آوندهای چوبی می‌رساند و از این طریق به قسمت‌های بالاتر یعنی طوقه و ساقه حرکت می‌کند (Agrios, 2005). این بیماری در استان اصفهان و هرمزگان با خسارت زیاد گزارش شده است و در سال‌های ۱۳۶۲-۱۳۶۷ میزان خسارت در شهرستان ورامین بالغ بر ۲۷/۴ درصد برآورد شده است (اعتباریان ،۱۳۸۷). مدیریت این بیماری مبتنی بر اعمال روش‌های زراعی و شیمیایی است. کنترل شیمیایی عوامل بیماری‌زای قارچی و مصرف بیش از حد قارچ‌کش‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهان، به خصوص بیماری‌های خاکزاد سبب عوارضی همچون اختلال در گرده‌افشانی، بیماری‌های ناشی از باقیمانده سموم روی مواد غذایی، آلودگی‌های زیست‌محیطی و پدیده مقاومت در مقابل قارچ‌کش‌ها شده است (Bajpai *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2011;; Bi *et al.*, 2012; Sarpeleh *et al.*, 2009). استفاده از اسانس‌ها و عصاره گیاهی و متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان یکی از روش‌های نوین کنترل بیماری‌های گیاهی، مطرح بوده و بیشتر در سطوح آزمایشگاهی انجام شده است (Sacchetti *et al.*, 2005; Sokovic and Griensven, 2006). این مواد به‌عنوان مواد بیولوژیک سمی علیه آفات و قارچ‌های بیمارگر گیاهی به کار می‌روند (Rasooli *et al.*, 2002). بنابراین با توجه به نقش محافظتی این ترکیبات، شناسایی و بررسی آن‌ها می‌تواند نقش مؤثری در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی داشته باشد (Cowan, 1999). با افزایش آگاهی درباره اهمیت کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در کشاورزی و صنایع دارویی، جداسازی و استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی رو به افزایش است (Amvam zollo *et al.*, 1998). از دلایل این امر می‌توان به منشأ طبیعی این ترکیبات و بر جای نماندن بقایای سمی و بی‌ضرربودن آن‌ها برای محیط زیست اشاره کرد (Yaouba *et al.*, 2010). در نتیجه، این ترکیبات پتانسیل بالایی برای استفاده در برنامه کنترل تلفیقی آفات دارند (Amini *et al.*, 2012) و با توجه به مشکلات موجود در مورد کاربرد قارچ‌کش‌ها، مطالعه و تحقیق در خصوص روش‌های جدید و مطمئن و کم‌هزینه برای کنترل و مدیریت بیماری‌های گیاهی یک ضرورت است (Marandi *et al.*, 2011). یکی از مؤثرترین راهکارهای کنترل بیماری‌های گیاهی، کنترل بیولوژیک و کاربرد میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به عنوان قسمتی از برنامه مدیریت تلفیقی بیماری می‌باشد (Paulitz and Belanger, 2001; Viterbo, 2007) در میان قارچ‌های آنتاگونیست گونه‌های جنس *Trichoderma* پتانسیل قابل توجهی درکنترل بیولوژیکی بیمارگرها دارند (Elad and Misaghi, 1985; Papavizas and Lumsden 1989)؛ لذا کنترل قارچ بیمارگر با استفاده از اسانس‌های طبیعی، قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* هدف اصلی این تحقیق قرار گرفت. در این بررسی، پس از جداسازی و اثبات بیماری‌زایی قارچ عامل

بیماری، تأثیر سه اسانس گیاهی بر میزان بازدارندگی از رشد و سرعت رشد در غلظت‌های مختلف و قدرت رقابت آنتاگونیست *T. harzianum* آزمایش شد و با شناسایی مؤثرترین اسانس‌ها، میزان اثر بخشی آن‌ها در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای در مقایسه با قارچ آنتاگونیست تریکودرما بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس به روش تقطیر آب با کلونجر

طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ گیاه آویشن *Thymus vulgaris* L. از منطقه خجیر (ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران)، گیاه زنیان *Carum copticum* Heirn متعلق به مناطق گرمسیر و رازیانه *Foeniculum vulgare* L. از بازار به‌طور کامل با بخش‌های مختلف شامل ساقه، برگ و گل تهیه گردید و مطابق با کلید-های موجود گیاه‌شناسی (فلور ایران) اقدام به شناسایی گونه شد. سپس گیاهان با آب شرب شهری شسته شدند، اندام‌های میوه و ریشه از آن‌ها جدا گردید و به تفکیک در شرایط آزمایشگاه خشک شدند. مواد گیاهی پس از خشک شدن، آسیاب شده و درون ظروف پلاستیکی نگهداری شدند. برای استخراج اسانس گیاهان از روش تقطیر آب با دستگاه کلونجر مطابق روش فیضی و همکاران (۱۳۹۱) استفاده شد. در مرحله اول آزمایش، پودر آویشن، رازیانه و زنیان به‌طور مستقیم در بالن تقطیر آب قرار گرفت. بعد از ایجاد بخار، بخار آب حاوی مولکول‌های اسانس از مسیر لوله‌های سرد عبورداده شد تا تبدیل به مایع شده و در قسمت گیرنده جمع‌آوری گردند؛ این مرحله تا هنگام ثابت شدن حجم اسانس حدوداً سه تا پنج ساعت به طول انجامید. در مرحله دوم، اسانس‌های حاصل با دقت در بشر ریخته و یک درصد سولفات سدیم (Na_2So_4) جهت جذب رطوبت اسانس اضافه گردید و پس از عبور از صافی با هگزان شستشو داده شد و نهایتاً اسانس حاصل در ظرف شیشه‌ای تیره با درپوش دردمای $^{\circ}C$ ۴-۳ جهت آزمایشات بعدی نگهداری گردید.

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی عامل بیماری

در سال زراعی ۹۴-۹۵ به مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی در استان تهران (شهریار، ورامین و پاکدشت) مراجعه شد و از طوقه و ریشه گیاهچه‌های آلوده با علایم زردی، پژمردگی به همراه تغییر رنگ آوندها (معمولاً به رنگ قهوه‌ای) نمونه‌برداری گردید و درون کیسه‌های نایلونی در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شستشو با آب شرب شهری قطعات کوچک (۳-۱ سانتی‌متری) از میان‌گره بالای طوقه و بندهای اول و دوم ساقه‌های آلوده جدا شد و با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱تا ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند نمونه‌ها سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شده و پس از خشک کردن آن‌ها بر روی کاغذ صافی با استفاده از چاقوی جراحی سترون، پوست رویی ساقه برداشته شد و از بافت‌های آوندی تغییر رنگ داده قطعات ۵ میلی‌متری برش داده شد. از مجموع نمونه‌های تهیه شده از هر اندام آلوده، به‌طور جداگانه چهار قطعه در تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA یا Potato Dextrose Agar (شامل ۲۵۰ گرم عصاره سیب‌زمینی، ۱۶ گرم دکستروز و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) قرار داده شدند. تشتک‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۲ روز توده‌های میسلیومی به یک تشتک پتری جدید حاوی محیط کشت PDA منتقل شد. پس از جداسازی قارچ نسبت به خالص‌سازی آن با استفاده از روش تک اسپور کردن اقدام شد (Banihashemi and Dezeeuw, 1969). شناسایی جدایه قارچ بر اساس مشخصات مورفولوژیکی، از نظر رنگ پرگنه، میکرو و ماکروکنیدی‌ها، فیالید و کلامیدوسپور مطابق کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد (Nelson *et al.*, 1983; Leslie and Summerell, 2006). به منظور تعیین رنگ و شکل پرگنه و فیالیدها از محیط کشت PDA و برای تعیین خصوصیات مورفولوژیکی از جمله ماکرو و میکروکنیدی‌ها و کلامیدوسپور از محیط کشت Carnation Leaf Agar (CLA) استفاده شد (Leslie and Summerell, 2006).

آزمون بیماری‌زائی در گلخانه

در این مرحله بذور گوجه‌فرنگی رقم پتوارلی شرکت پتوسید رونده با میوه‌های گرد و از ارقام زودرس بعد از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱ دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون به مدت ۴۸ ساعت لای پارچه ململ مرطوب خیسانده شدند. بذرها پس از جوانه‌زنی به بسترهای کشت مخلوط خاک و پرلیت به نسبت ۱:۱ انتقال داده شدند. پس از ۲۱روز، گیاهچه‌های دو تا چهار برگی برای مایه‌زنی در نظر گرفته شدند (Manafi *et al.*, 2012).

جهت تهیه مایه تلقیح قارچ، کلش خردشده گندم به همراه ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک ارلن‌مایر نیم لیتری ریخته و دو بار در ۱۲۱ درجه سلسیوس ضدعفونی شدند. سپس دیسک پنج میلی‌متری از کشت چهار روزه قارچ به آن اضافه گردید و جهت اسپورزایی، به مدت ۴ روز روی دستگاه شیکر در۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد (Banihashemi, 2010). سپس ریشه گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی به مدت ۵ دقیقه و در سوسپانسیون میکروکنیدی فوزاریوم با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر آب فرو برده شدند (Gale *et al.*, 2003; Reis and Boiteux, 2007). گیاهچه‌ها در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک، کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۱:۳ کشت و در گلخانه در دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده گردید. گیاهچه‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفته و نشانه‌های ظاهری شامل زردی برگ‌ها، پژمردگی و تعداد گیاهچه‌های سالم و بیمار هر گیاهچه یادداشت‌برداری شد. پس از مشاهده علایم بیماری، برای تأیید حضور بیمارگر و تکمیل اصول کخ، گیاهان آلوده از خاک خارج شدند و مجدداً پس از جداسازی قارچ از ریشه و طوقه گیاه، خصوصیات مرفولوژیکی و تاکسونومیکی آن‌ها با صفات جدایه‌های مایه‌زنی شده مطابقت داده شدند.

آزمایشات بررسی تأثیر اسانس‌های گیاهی روی قارچ عامل بیماری (*In Vitro*)

این آزمایشات در آزمایشگاه بیماری‌شناسی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران انجام شد. دراین بررسی‌ها، تیمارها شامل سه اسانس گیاهی آویشن، رازیانه، زنیان، قارچ آنتاگونیست *Tricoderma harzianum* جدایه Th-va-104 (از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌های گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین)، شاهد محیط کشت (آب مقطر)، شاهد قارچ‌کش روال-تی اس (اپیرودیون + کاربندازیم پودر وتابل ۵۲/۵ ٪) و شاهد حلال اسانس‌ها (Tween 20) در پنج غلظت به‌کار گرفته شد. تمام آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار در دمای اتاق ۲۵-۲۴ درجه سلسیوس انجام شدند. داده‌ها با روش تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA در سطح اعتماد ۹۵٪ آنالیز شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن انجام شد.

تعیین سرعت رشد قارچ

به منظور اختلاط اسانس‌ها با محیط کشت PDA ابتدا از توئین ۲۰ درصد (Tween 20) به عنوان حلال استفاده شد. سپس غلظت نهایی در محیط کشت ۱۰۰،۲۰۰، ۳۰۰،۴۰۰، ۵۰۰،۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس‌ها در ارلن‌مایر تهیه و با محیط PDA در دمای ۴۵-۴۰ درجه سلسیوس مخلوط گردید. برای شاهد محیط کشت، از آب مقطر و شاهد توئین از توئین ۲۰ درصد و قارچ‌کش روال-تی اس به غلظت یک در هزار استفاده شد. پس از انتقال تیمارها به تشتک‌های پتری سترون و بسته شدن محیط، دیسک‌های پنج میلی‌متری از حاشیه کلنی قارچ هفت روزه با چوب‌پنبه سوراخ کن تهیه و به مرکز تشتک‌های فوق منتقل شد و تا رشد کامل قارچ در تشتک شاهد آب مقطر در دمای ۲۵°C در انکوباتور نگهداری شد. اندازه‌گیری قطر کلنی قارچ با خط‌کش در روز هفتم و دهم انجام شد و تفاضل آن‌ها به عنوان سرعت رشد کلنی ثبت گردید.

بررسی قدرت رقابت *Trichoderma harzianum* در مقابل قارچ *F. oxysporum* fsp *lycopersici*

قدرت رقابت جدایه‌های تریکودرما در مقابل قارچ با استفاده از روش کشت متقابل بر روی محیط کشت PDA ارزیابی شد. یک حلقه میسلیومی ۵ میلی‌متری از کشت سه روزه قارچ فوزاریوم در یک سمت تشتک پتری (۹ سانتی-متری) و در سمت مقابل حلقه‌ای به همین قطر از کشت چهار روزه جدایه *T .harzianum* کشت داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۷ ± ۲ $^{\circ}C$ نگهداری شدند و رشد خطی پرگنه‌های فوزاریوم و تریکودرما ۷۲ ساعت بعد اندازه‌گیری گردید. در تشتک پتری شاهد فقط دیسک فوزاریوم قرار داده شد (Dennis and Webster, 1971; Khare *et al.*, 2010).

درصد بازدارندگی از رشد پرگنه عامل بیماری توسط تریکودرما براساس رابطه زیر محاسبه شد (Fokkema, 1976):

$$I=\frac{C-T}{C}\times 100$$ (درصد بازدارندگی از رشد پرگنه)

I: درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر توسط آنتاگونیست

C: رشد طولی پرگنه عامل بیماری به سمت مخالف در شاهد

T: رشد طولی پرگنه عامل بیماری به سمت آنتاگونیست در تیمارها

T: رشد طولی پرگنه عامل بیماری به سمت آنتاگونیست در تیمارها

تعیین درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم Mycelium Growth Inhibitor (MGI)

پس از این‌که رشد قارچ در تشتک پتری شاهد کامل شد، نسبت به اندازه‌گیری‌ها میزان رشد قارچ در غلظت‌های مختلف سه اسانس گیاهی اقدام گردید و درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد: (Riccioni *et al.*, 2011)

$$I=\frac{C_2-C_1}{C_2}\times 100$$ (درصد بازدارندگی از رشد)

I: درصد بازدارندگی، C_1: قطر کلنی در تیمار، C_2: قطر کلنی در شاهد

تعیین غلظت مؤثر متوسط (EC_{50}[1]) Median Effective Concentration

برای ارزیابی EC_{50} اسانس‌ها بر روی قارچ *F.oxysporum* fsp *lycopersici* از داده‌های بازدارندگی استفاده شد و از طریق رگرسیون پروبیت خطی بر روی نمودار با نرم افزار SPSS محاسبه گردید (Feen and Coffey, 1984) .

بررسی اسانس گیاهان در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای

جهت تهیه مایه تلقیح قارچ فوزاریوم، ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم گندم به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده به درون ارلن‌مایر ۵۰۰ سی‌سی ریخته و دو بار متوالی به مدت ۲۴ ساعت در ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شدند. سپس یک قطعه پنج میلی‌لیتری از کشت هفت روزه قارچ را به آن اضافه نموده و به مدت ۲۱ روز در دمای اتاق نگهداری شد. گندم‌های آلوده پس از رشد قارچ به نسبت ۱۰ درصد حجمی با نیمه بالایی خاک گلدان سترون (حاوی خاک، کود، ماسه) مخلوط گردید. سپس گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم پتوارلی در مرحله دو تا چهار برگی به آرامی از بستر پیت ماس خارج و در گلدان‌های فوق نشاء زده شد. سپس اسانس‌های آویشن، زنیان و رازیانه هر یک به میزان ۰/۵ و ۱ در هزار و قارچ‌کش روال تی اس به میزان ۱/۵ در هزار به صورت محلول بر روی بستر ریشه ریخته شد.

تیمار قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* (روی بذر گندم استریل در ارلن‌مایر تکثیر گردید) با خاک گلدان حاوی قارچ بیماری‌زا به نسبت ده درصد حجمی سه روز قبل از انتقال نشاء مخلوط گردید. در گلدان‌های شاهد به جای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر سترون استفاده گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا

[1] حداقل غلظتی از اسانس می‌باشد که از ۵۰ درصد رشد مسیلیوم قارچ نسبت به تیمار شاهد جلوگیری به‌عمل می‌آورد.

شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه تحت درجه حرارت ۱±۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شده و هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند. ارزیابی شدت بیماری ۳۰ روز پس از مایه‌زنی با استفاده از معیار نمره‌دهی عددی بهبود یافته (۱-۵) Reis and Boiteux (2007) به‌صورت زیر محاسبه شد(Dordevic *et al*, 2011):

۱ = بدون علائم بیماری

۲= بدون علائم پژمردگی اما با لکه‌های قهوه‌ای آوندی مشخص

۳ = لکه‌های قهوه‌ای آوندی با علائم پژمردگی یا کلروز

۴= پژمردگی شدید همراه با نکروز و کلروز برگی

۵ = مرگ کامل گیاه

شاخص شدت آلودگی از رابطه ذیل محاسبه شد:

$$\text{شاخص شدت آلودگی} = \sum \frac{\text{نمره آلودگی} \times \text{تعداد بوته بیمار}}{\text{تعداد کل بوته}}$$

به منظور ارزیابی همبستگی (مثبت یا منفی) اثر شدت بیماری روی گوجه‌فرنگی در مقایسه با گیاهان شاهد در پایان آزمایش، وزن تر و خشک بوته گوجه‌فرنگی نیز اندازه‌گیری شد (Gilardi *et al*., 2014).

نتایج

اثبات بیماری‌زائی و شناسایی قارچ

جدایه قارچ عامل بیماری روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم پتوارلی که در مرحله دو برگ حقیقی مایه‌زنی گردید و علایم اولیه بیماری پس از ۱۵ روز به‌صورت زردی در برگ‌های قدیمی ظاهر شد. به‌تدریج به سمت برگ‌های بالایی گسترش یافت. در هفته سوم زردی در کل بوته و در پایان هفته چهارم پژمردگی و مرگ کامل بوته مشاهده شد. در برش عرضی از آوندهای چوبی تغییر رنگ به‌سمت قهوه‌ای روشن به وضوح دیده شد. بعد از جداسازی مجدد قارچ از بافت بیمار و تطبیق با قارچ اولیه جدایه و بررسی مشخصات آن بر اساس کلید (Nelson *et al*., 1983) قارچ عامل بیماری *Fusarium oxysporum* fsp *lycopersici* تشخیص داده شد (Leslie and Summerell, 2006).

a **b** **c**

شکل ۱- اثبات بیماری‌زایی *Fusarium oxysporum* روی گوجه‌فرنگی (a):گیاهچه رنگی مایه‌زنی شده با قارچ (سمت چپ) شاهد (سمت راست) (b): قهوه‌ای شدن آوند چوبی (c): پرگنه قارچ روی محیط PDA

Fig. 1. pathogenicity of *Fusarium oxysporum* on tomato (a) Tomato seedlings inoculated with the fungus(left), Check(right) b) Browning the xylem c) Colony on PDA medium

آزمایشات بررسی تأثیر اسانس‌ها وقارچ آنتاگونیست تریکودرما در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*)

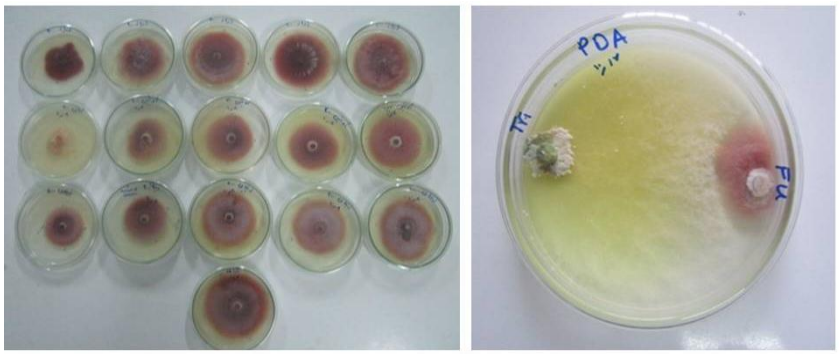
تعیین درصد بازدارندگی اسانس‌ها از رشد قارچ *F. oxysporum* fsp *lycopersici*

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، تیمارها (اسانس‌ها) و سطوح مختلف هر تیمار (غلظت‌ها) درسطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌داری دارند. در مقایسه میانگین‌های مربوط به میزان بازدارندگی از رشد مسیلیومی قارچ توسط اسانس‌ها به ترتیب تیمار آویشن با غلظت۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب با ۵۸/۳۰، ۶۷/۳۵ و ۸۲/۹۵ درصد

درگروه آمار f، c و a، زنیان با غلظت ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به‌ترتیب با ۵۳/۵ و ۶۲/۶۸۵ درصد و رازیانه فقط در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام با ۵۹/۹۷ درصد بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ داشتند. در بین اسانس‌ها، رازیانه با قرارگرفتن در گروه آماری J کمترین بازدارندگی از رشد قارچ را داشت. قارچ‌کش ایپریدیون +کاربندازیم به میزان ۱/۵ در هزار بهترین تیمار در بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ با ۸۳/۵ درصد و هم ردیف آویشن (غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) در گروه آماری مشابه a ثبت شد. در این بررسی قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* کد (Th-va-104) با ۷۸/۵۳ درصد بازدارندگی با قرارگرفتن در گروه آماری b بعد از اسانس‌های آویشن و قارچ‌کش، بیشترین میزان بازدارندگی از رشد مسیلیومی قارچ *F. oxysporum* fsp *lycopersici* را داشته است (جدول-۱).

تعیین سرعت رشد قارچ *F. oxysporum* fsp *lycopersici*

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تفاضل قطر کلنی قارچ در فاصله زمانی ۷و ۱۰ روز بعد از کشت در تشتک‌های پتری حاوی PDA، نشان داد تمام تیمارها در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی‌داری داشتند و طی مقایسه میانگین‌ها، سرعت رشد قارچ‌ها در غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و در مقابل قارچ تریکودرما و همچنین قارچ‌کش و شاهد با هم متفاوت بودند. در این بررسی اسانس آویشن در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام دارای کم‌ترین سرعت رشد (۰/۳۴ میلی‌متر بر روز) و بیشترین سرعت رشد مربوط به تیمار قارچ با رازیانه (۱/۰۳میلی‌متر/روز) بود. در این بررسی رشد قارچ فوزاریوم در برابر تریکودرما در رقابت غذایی روی محیط PDA به میزان ۰/۶۲ میلی‌متر/روز تعیین گردید (شکل ۲) و در تشتک حاوی قارچ‌کش ایپریدیون +کاربندازیم نرخ رشد فوزاریوم ۰/۵۸ میلی‌متر در روز اندازه‌گیری شد.



شکل ۲- مقایسه بازدارندگی از رشد اسانس‌ها و قارچ آنتاگونیست نسبت به *F.oxysporum* fsp *lycopersici*. (a) سه اسانس آویشن، رازیانه و زنیان (b) تریکودرما در کشت متقابل با قارچ

Fig. 1. The comparison of inhibitory growth of essential oils and antagonist fungi to *F. oxysporum* fsp *lycopersici* (a) Three essential oils of *thyme*, *fennel* and *Carum* (b) *Trichoderma* fungus in dual culture

تعیین غلظت مؤثر متوسط Median Effective Concentration (EC50)

نتایج حاصل از مقایسه درصد بازدارندگی اسانس‌ها از رشد میسلیومی قارچ *F. oxysporum* (حداقل غلظتی از اسانس می‌باشد که از۵۰ درصد رشد مسیلیوم قارچ نسبت به تیمار شاهد جلوگیری به‌عمل می‌آورد) نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی (غلظت Ec_{50}) اسانس آویشن ۱۸۰ پی‌پی‌ام، زنیان ۷۵۰ پی‌پی‌ام و رازیانه ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام بوده است، در حالی‌که در بقیه غلظت‌ها میزان بازدارندگی بسیار ناچیز بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد سرعت رشد و بازدارندگی از رشد کلنی قارچ *F. oxysporum* در اسانس‌ها و غلظت‌های مختلف اسانس آویشن، زنیان، رازیانه، قارچ‌کش ایپریدیون +کاربندازیم و تریکودرما در کشت متقابل با قارچ

Table 1. Mean comparison of the percentage of growth rate and growth inhibition of *F. oxysporum* colony in different essential oils and concentrations

اسانس Essential oil	غلظت (پی‌پی‌ام) Concentration (ppm)	بازدارندگی از رشد(درصد) Growth inhibition (percent)	سرعت رشد (میلی‌متر) Growth rate(mm)
آویشن *Thymus*	100	40.22 m	2.09 d
	200	27.95 l	1.89 ef
	300	33.25 k	1.76 g
	400	46.50 h	1.53 h
	500	58.30 f	1.03 j
	750	67.35 c	0.78 k
	1000	82.95 a	0.34 m
زنیان *Carum*	100	8.90 q	2.23 c
	200	18.58 n	1.97 e
	300	27.90 l	1.84 fg
	400	33.55 k	1.75 g
	500	41.17 i	1.61 h
	750	53.50 g	1.08 j
	1000	62.68 d	0.84 k
رازیانه *Fennel*	100	3.50 r	2.66 a
	200	13.00 p	2.44 b
	300	16.85 o	2.17 cd
	400	24.05 m	1.97 e
	500	39.40 j	1.84 fg
	750	46.80 b	1.34 i
	1000	59.97 e	1.03 j
تریکودرما *Trichoderma*		78.53 b	0.62 l
قارچ‌کش Fungicide	1000	83.50 a	0.58 l

*: میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند

* Mean with similar letters are not significantly different at 1% probability level

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

در این آزمایش همانند مرحله اثبات بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری، علایم از هفته دوم بعد از شروع آزمایش در تیمار شاهد آلوده ظاهر شد و در طی چهار هفته بوته‌های گوجه‌فرنگی کاملاً پژمرده شدند. تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده براساس شاخص شدت بیماری، وزن تر و خشک بوته و ریشه گوجه‌فرنگی نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. نتایج مقایسه میانگین‌های شدت شاخص بیماری مشخص کرد که اسانس آویشن به‌ترتیب با شدت شاخص بیماری ۲/۶ و ۲/۷۸ درجه در گروه آماری e و de نزدیک‌ترین شاخص بیماری با تیمارهای تریکودرما و قارچ‌کش روال تی اس (با شاخص شدت بیماری ۲/۰۶ و۱/۷۸) با گروه آماری f و شاهد سالم با شاخص شدت بیماری برابر با ۱ و گروه آماری g قرار گرفتند. در این آزمایش اسانس زنیان با شاخص شدت بیماری ۲/۹۹ و ۳/۳۴ و سپس رازیانه با شاخص شدت بیماری ۳/۳۲ و ۳/۴۷ بیشترین بازدارندگی از رشد بیماری را داشتند. در این بررسی شاخص شدت بیماری در شاهد آلوده ۴/۵۹ بوده است. بررسی‌های مربوط به مقایسه میانگین وزن تر وخشک قسمت هوایی بوته و ریشه گوجه‌فرنگی حاکی از تغییرات در زیست‌توده گیاه بود. نتایج این بخش از محاسبات نشان داد وزن تر قسمت هوایی و ریشه به ترتیب در تیمار با اسانس آویشن ۱۲/۶۴ و ۱/۳۹گرم، در تیمار با قارچ آنتاگونیست تریکودرما ۱۲/۷۷ و۱/۷۹ گرم و در تیمار با قارچکش رورال تی اس ۱۴/۲۳ و ۱/۶۹ گرم در گروه‌های آماری مشابه b و bc نزدیک‌ترین گروه آماری به شاهد سالم (a) با میزان ۱۸/۷۱ و ۲/۳۴ گرم قرار داشتند. مقایسه میانگین وزن خشک

قسمت هوایی و ریشه نشان داد در بین تیمارها اگرچه اختلاف معنی‌داری وجود دارد، ولی تفاوت‌ها اندک بود؛ به‌طوری‌که وزن خشک قسمت هوایی و ریشه گوجه‌فرنگی در تیمار آویشن به ترتیب ۱/۶۹ و ۰/۲۲۵گرم، در تیمار با قارچ آنتاگونیست تریکودرما ۱/۶۳ و۰/۲۷ گرم و در تیمار با قارچ‌کش رورال تی اس ۱/۸۴ و ۰/۲۵ گرم در گروه‌های آماری مشابه نزدیک‌ترین گروه آماری به شاهد سالم با میزان ۱/۹۴ و ۰/۳۱ گرم قرار گرفتند (جدول۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد شاخص شدت بیماری، وزن تر و خشک بوته و ریشه گوجه‌فرنگی تیمار شده با اسانس‌ها، قارچ تریکودرما و قارچ‌کش

Table 2. Mean Comparison of percentage of disease severity index, fresh and dry weight of shoot and root area of tomato treated with essential oils, *Trichoderma* and fungicide

تیمارها Treatments	شاخص شدت بیماری Disease severity index	وزن تر بوته (گرم) Shoot fresh weight (gr)	وزن خشک بوته (گرم) Shoot Dry weight (gr)	وزن تر ریشه (گرم) Root fresh weight (gr)	وزن خشک ریشه (گرم) Root dry weight (gr)
آویشن (۰/۵ در هزار) *Thymus* (0.5/1000)	2.78 de	12.10 bc	1.56 bcd	1.25 cd	0.23 bcde
آویشن (۱ در هزار) *Thymus* (1/1000)	2.60 e	13.19 b	1.82 abc	1.53 bc	0.28 ab
زنیان (۰/۵ در هزار) *Carum* (0.5/1000)	3.34 bc	7.72 de	1.62 abcd	1.02 d	0.19 de
زنیان (۱ در هزار) *Carum* (1/1000)	2.99 cd	8.48 de	1.76 abc	1.05 d	0.24 bcde
رازیانه (۰/۵ در هزار) (0. 5/1000) *Fennel*	0.47 b	7.37 e	1.31 d	0.94 d	0.18 de
رازیانه (۱ در هزار) (1/1000) *Fennel*	3.22 bc	10.23 cd	1.46 cd	0.98 d	0.20 cde
تریکودرما *Trichoderma*	2.06 f	12.77 bc	1.63 abcd	1.79 b	0.27 abc
قارچ‌کش (۱/۵ در هزار) Fungicide(1.5/1000)	1.78 f	14.23 b	1.84 ab	1.68 b	0.25 bcd
شاهد سالم Healthy control	1 g	18.71 a	1.94 a	2.34 a	0.31 a
شاهد آلوده Infected control	4.59 a	7.53 e	1.58 bcd	0.89 d	0.17 e

*: میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند

* Mean with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level

بحث

امروزه جامعه بشری برای تولید فرآورده‌های کشاورزی با دشواری و بحران روبه‌رو است. از یک سو، افزایش جمعیت نیاز به تولید مواد غذایی را افزایش داده و از سوی دیگر، عوامل مختلف بیماری‌زا ازجمله قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* به عنوان فاکتور مهم خسارت‌زا در تمام مراحل رشد گیاه محسوب می‌شود. از جمله روش‌های سالم و بی‌خطر برای کنترل بیماری‌ها استفاده از ترکیبات طبیعی تحت عنوان عصاره یا اسانس‌های گیاهی است. اسانس‌های گیاهی گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را شامل می‌شوند که

در بیشتر حالات دارای اثرات ضد میکروبی، آللوپاتی و آنتی‌اکسیدانی و زیست تنظیمی هستند که انواع مختلف مواد شیمیایی شامل هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدئیدها و غیره در ترکیب آن‌ها وجود دارد (Sefidkon *et al.*, 2005). عصاره یا اسانس گیاهان دارویی به دلیل عدم مقاومت پاتوژنی، پایین بودن هزینه تولید، تجزیه شدن در خاک و عدم آلودگی محیط زیست می‌توانند به عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی مطرح شوند.

در این بررسی، پس از جداسازی قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی از بوته‌های آلوده گوجه‌فرنگی و شناسایی عامل بیماری‌زا بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici*، اثبات بیماری‌زایی بر اساس اصول کخ (Koch) انجام گرفت. نتایج این مرحله از آزمایشات با نتایج تحقیقات میشرا (Mishra *et al.*, 2014) مطابقت دارد. بر اساس تحقیقات انجام شده، اثبات بیماری‌زایی قارچ *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* و علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی با ایجاد لکه‌های زرد رنگ روی برگ‌های مسن‌تر آغاز و با گسترش تدریجی بیماری به شاخ و برگ‌های گیاه، پژمردگی کامل و مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی گزارش گردید (Mishra *et al.*, 2014). ارزیابی فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی سه گونه بر علیه قارچ فوزاریوم با استفاده از تکنیک مواد غذایی مسموم در شرایط آزمایشگاهی انجام شد، در این بررسی اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*)، با بیش‌ترین بازدارندگی از رشد قارچ (۸۳/۹۵ درصد) شناخته شد. در تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) مشخص شد در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، آویشن با بیش از ۸۳ درصد، از رشد مسیلیوم قارچ جلوگیری به‌عمل آورد. نتایج حاصل با کارهای رامایها و گارامپالی (Ramaiah and Garampalli, 2015) مشابهت دارد. در تحقیقات رامایها و گارامپالی، درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* با ۱۵ عصاره گیاهی در چهار غلظت متفاوت (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد) مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد سه عصاره گیاهی تاجریزی (*Solanum indicum*) با ۷۸/۳۳٪، شبدر ترشک باغچه (*Oxalis latifolia*) با ۷۰/۳۳٪ و چریش (*Azadirachta indica*) با ۷۰/۰۰٪ به ترتیب بیش‌ترین درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی در برابر بیمارگر *FOL* را داشتند. عصاره سایر گیاهان درصد کمتری از بازدارندگی در غلظت‌های مربوطه را از خود نشان دادند (Ramaiah and Garampalli, 2015).

تحقیقات مشابهی از اثربخشی عصاره‌های سایر گیاهان بر علیه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* گزارش شده است. نتایج این تحقیق با مطالعات بگ و همکاران (Beg *et al.*, 2011) در ارتباط با بررسی میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* توسط عصاره آبی گیاه *Blumenta lacera*، از تیره کاسنیان (Asteraceae)و نتایج حاصل از آن به میزان ۸۷/۹ درصد مطابقت دارد. هادیان (Hadian, 2012) میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی توسط عصاره دانه چریش (*Azadirachta indica*) را برابر با ۹۸٪ گزارش کرد. رینز و همکاران (Rinez *et al.*, 2013) اثر ضد قارچی عصاره آبی داتوره (Datura metel) با مهار رشد مسیلیومی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* را برابر با ۶۹٪ گزارش کردند. بر اساس یافته‌های آدیکونل و انواگوآلا (Adekunle and Nwaoguala, 2010)، عصاره گیاه معطر ریحان مقدس (*Ocimum gratissimum*) مؤثرترین ترکیب در کنترل قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* شناخته شد.

در بخش دوم تحقیقات انجام شده در شرایط گلخانه‌ای، به‌ترتیب اسانس آویشن با شاخص شدت بیماری ۲/۶ درجه، زنیان ۲/۹۹درجه، رازیانه با ۳/۳۲ درجه، قارچ آنتاگونیست *T.harzianum* با ۲/۰۶ درجه و رورال تی اس با ۱/۷۸ درجه درکاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی موفق بودند.

در این تحقیق بازدارندگی از رشد عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه و کنترل آن در گلخانه توسط جدایه *T. harzianum* کد (Th-va-104) به‌دست آمده از مزارع شهرستان ورامین به اثبات رسید. براساس نتایج به‌دست آمده بازدارندگی مطلوبی از رشد در کشت متقابل در آزمایشگاه و شرایط گلخانه‌ای با بیمارگر نشان داده شد که با نتایج تقابل بین آنتاگونیست و عامل بیماری و وقوع بازدارندگی در محیط آگار به عنوان نتیجه معمول رقابت برای کسب مواد غذایی و فضا در محیط‌های آزمایشگاهی قابل مقایسه است (Upadhyay and Rais, 1987). تولید

متابولیت‌های سمی و نیز تعدادی آنتی‌بیوتیک توسط *Trichoderma* spp. به اثبات رسیده است (Papavizas and Lumsden 1989). برخی محققین آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره و یا آنتی بیوتیک‌ها را در تقابل تریکودرما با بیمارگرهای قارچی دخیل می‌دانند (Elad and Misaghi, 1985; Papavizas and Lumsden 1989)). تولید سطوح مختلفی از آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و توانایی کاربرد آن‌ها در مکان‌های تماس فیزیکی توسط آنتاگونیست‌ها و همچنین تأثیرات بازدارنده سیکلوهگزیمید بر روی هایپرپارازیتیسم آن‌ها دلالت بر دخالت آنزیم‌ها دارد (Sreenivasaprasad and Manibhushanrao, 1990). بنابراین با استفاده از این عصاره‌های گیاهی و یا ترکیب بیولوژیک می‌توان از رشد قارچ بیماری‌زای تا حد مناسبی جلوگیری نمود و به تولید محصول سالم و عاری از سموم قارچ‌کش کمک کرد.

منابع Refrences

اعتباریان، ح. ر. ۱۳۸۷. بیماری¬های سبزی و صیفی و روش¬های مبارزه با آنها. چاپ چهارم. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۰۰ صفحه.

بی‌نام، ۱۳۹۴. آمارنامه کشاورزی. وزارت جهاد کشاورزی. معاونت برنامه ریزی و اقتصادی دفتر آمار و فناوری اطلاعات، تهران.

فیضی، پ.، کمالی، ح.، یزدانی، ا. و هاشمی مقدم، ح. ۱۳۹۱. مقایسه روش استخراج کلونجر (تقطیر با آب) و استخراج با حلال برای استخراج اسانس روغنی گیاه آدمک و آنالیز ترکیب مواد با گاز کروماتوگرافی-اسپکتروسکوپی جرمی. مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، ویژه نامه فرآورده‌های طبیعی و گیاهان داوریی ۴: ۴۱-۳۵.

Adekunle, A. T. and Nwaoguala, C. N. C. 2010. Response of morphological traits of tomato to treatment in spice based formulations in the control for *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Bioscience Research Communications 22(4): 183-188.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press, USA. 952pp.

Amini, M., Safaie, N., Salmani, M. J. and Shams-Bakhsh, M. 2012. Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. Anniversary Edition Trakia Journal of Science 10 (1): 1-8.

Amvam zollo, P. H., Biyti, L., Tchoumbougnang, F., Menut, C., Lamaty, G. and Bouchet, P. 1998. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. Flavour Fragrance Journal 13: 107-114.

Bajpai, V. K., Rahman, A., Dung, N. T., Huh, M. K. and Kang, S. C. 2008. *In vitro* inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of Magnolia liliflora Desr. Journal of Food Science 73(6): 314-320.

Banihashmi, Z. 2010. Reaction of Cucumis melo cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* the cause of melon vascular wilt. Journal of Plant Diseases 46: 5-7.

Banihashemi, Z, and Dezeeuw, D. J. 1969. Two improved methods for selectively isolating *Fusarium oxysporum* from soil and plant roots. Plant Disease Reporter 53: 589-591.

Beg, A., Aphajal, M. and Jaish. 2011. Antifungal assay of some angiospermic plant extracts against *Fusarium lycopersici*. Indian Journal Applied and Pure Biology 26(1): 71-74.

Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K. and Hao, J. J. 2012. Inhibitory effect of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. Plant Disease 96: 797-803.

Cowan, M. M. 1999. Plant products antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review 12: 564-582.

Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II, production of volatile antibiotics**.** Transaction of the British Mycological Society 57: 41-48.

Dordevic, M., Damnjanovic, J., Ugrinovic, M., Zecevic, B. and Djordjevic, R. 2011. In vitro biocontrol of tomato fusarium wilt using some soil bacteria. ISHS Acta Hort 914: 311-316.

Elad, Y. and Misaghi, Z. J. 1985. Biochemical aspects of plant-microb and microb-microb interaction in soil. Pp. 21-46. In: Cooper Driver, G. A. and Swain, T. (eds.). Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms. Plenum Press. New York, USA.

Feen, M. A. and Coffey, M. D. 1984. Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of foset VL-AL and phosphorous acid. Phytopathology 74: 606-611.

Fokkema, N. J. 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. Pp. 487-505. In: Dickinson, C. H. and Preece, T. F. (eds.). Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Academic Press, London, UK.

Gale, L. R., Katan, T. and Kistler, H. C. 2003. The probable center of origin of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* VCG 0033. Plant Disease 87(12): 1433-1440**.**

Gilardi, G., Demarchi, S., Gullino, M. L. and Garibaldi, A. 2014. Managing *Phytophthora* crown and root rot on tomato by pre-plant treatments with biocontrol agents, resistance inducers, organic and mineral fertilizers under nursery conditions. Phytopathologia Mediterranea 53(2): 205-215.

Hadian, S. 2012. Antifungal activity of some plant extracts against some plant pathogenic fungi in Iran. Asian Journal of Experimental Biological Sciences 3(4): 714-718.

Khan, M. A., Zhihui, C., Xuemi, X., Khan, A. R. and Ahmed, S. S. 2011. Ultrastructural studies of inhibition effect against *Phytophthora capsici* of root exudates collected from two garlic cultivars along with their qualitative analysis. Crop Protection 30: 1149-1155.

Khare, A., Singh, B. K. and Upadhyay, R. S. 2010. Biological control of *Pythium aphanidermatum* causing damping-off of mustard by mutants of *Trichoderma viride* 1433. Journal of Agricultural Technology 6(2): 231-243.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, New York, USA. 380 pp.

Marandi, R. J., Hassani, A., Abdollahi, A. and Hanafi, S. 2011. Improvement of the vase life of cut gladiolus flowers by essential oils, salicylic acid and silver thiosulfate. Journal of Medicinal Plants Research 5(20): 5039-5043.

Manafi, D. R., Babai, A. A., Arzanlou, M. and Valizadeh, M. 2012. Assessment of resistance in tomato varieties under greenhouse conditions against *Fusarium* wilt, and biological control of the disease. Quarterly Journal of Agricultural Science 22: 145-158.

Mishra, P., Singh, P. and Tripathi, N. N. 2014. Evaluation of plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *lycopersici*, wilt pathogen of tomato. **I**nternational Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences 4(2): 163-167.

Nelson, P. E, Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University, USA. 193pp.

Papavizas, G. C. and Lumsden, R. D. 1989. Biological control of soilborne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology 18: 389-413.

Paulitz, T. C. and Belanger R. R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 91: 103-133.

Ramaiah, A. K. and Garampalli, R. K. H. 2015. *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Asian Journal of Plant Science and Research 5(1): 22-27.

Rasooli, I., Moosavi, M. L., Reazee, M. B. and Jaimand, K. 2002. Suceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. Agriculture Science Technology 4: 127-133.

Reis, A. and Boiteux, L. S. 2007. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. Horticultura Brasilaria 25(3): 451-454.

Rinez, A., Daami-Remadi, M., Ladhari, A., Omezzine, F., Rinez, I. and Haouala, R. 2013. Antifungal activity of *Datura metel* L. organic and aqueous extracts on some pathogenic and antagonistic fungi. African Journal of Microbiology Research 7(16):1605-1612.

Riccioni, L. and Orzali, L. 2011. Activity of tee tree (*Melaleuca alternifolia*, Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris*, Linnaeus.) essential oils against some pathogenic seed borne fungi. Journal of Essential Oil Research 23: 43-47.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S. and Radica, M. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. Food Chemistry 91: 621-632.

Sarpeleh, A., Sharifi, K. and Sonbolkar, A. 2009. Evidence of antifungal activity of wild rue (*Peganum harmala* L.) on phytopathogenic fungi. Journal of Plant Diseases and Protection 116(5): 208-213.

Sefidkon, F., Jamzad, Z. and Barazandeh, M. M. 2005. Essential oil of *Satureja bachtiarica* bunge, a potential source of carvacrol. Iran Journal Medical and Aromatic Plants 20(4): 425-439.

Sokovic, M. and Griensven, L. J. L. D. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button *mushroom Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology 116: 211-224.

Sreenivasaprasad, S. and Manibhushanrao, K. 1990. Antagonistic potential of *Trichoderma virens* and *Trichoderma longibrachiatum* to phytopathogenic fungi. Mycopathologia 109: 19-26.

Upadhyay, R. S. and Rais, B. 1987. Studies on antagonism between *F. udum* Butler and root region microflora of pigeonpea. Plant and Soil 101: 79-93.

Viterbo, A., Inbar, J., Hadar, Y. and Chet, I. 2007. Plant disease biocontrol and induced resistance via fungal mycoparasites. The Mycota 4: 127-146.

Walker, J. C. 1981. *Fusarium* wilt of tomato. Monograph. No 6. APS press. 56 pp.

Yaouba. A., Tatsadjieu, N. L., Jazet Dongmo, P. M., Francois Xavier, E. and Mbofung, C. M. 2010. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen**.** Journal of Yeast and Fungal Research 1: 1-8.

Zhang, J. W., Li, S. K. and Wu, W. J. 2009. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* L. var. *pilosum* (Willd.) Benth. Molecules 14: 273-278.