

اثرات اسانس برخی از گیاهان دارویی به روش تدخینی بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه کاهو به عنوان شاخص

سمیه میرمصطفائی^۱ - مجید عزیزی^{۲*} - یاشیهارو فوجی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۹

چکیده

امروزه تلاش جهانی در کشاورزی نوین به سمت کاهش هرچه بیشتر استفاده از سموم مضر و معرفی روش‌های جدید برای کنترل علف‌های هرز می‌باشد که یکی از این روش‌ها استفاده از خاصیت آلوپاتی است. این مقاله به منظور شناسایی گونه‌های جدید آلوپات و ترکیبات بازدارنده موجود در آنها بصورت تدخینی انجام شده است. این پژوهش در قالب دو آزمایش مجزا اجرا شد و از گیاه کاهو بعنوان مدل استفاده شد. اثر ۱۱۲ اسانس گیاهی در دو غلظت ۱ و ۳ میکرولیتر در ویال بصورت تدخینی بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه کاهو بررسی شد. صفات مرتبط با جوانه‌زنی (درصد و متوسط زمان جوانه‌زنی، درصد ایجاد رکود در بذر و درصد مرگ جنین) و رشد گیاهچه (رشد هیپوکوتیل، ریشه‌چه، و شاخص قدرت گیاهچه) بررسی شدند. نتایج بیانگر اثرات معنی‌دار بازدارنده اسانس‌ها حتی در غلظت ۱ میکرولیتر بر صفات مورد بررسی بود. بطوری‌که اسانس شمعدانی معطر، انیسون و آویشن‌دناهی بیشترین اثر بازدارندگی بر جوانه‌زنی (۱۰۰٪)؛ اسانس هل‌سیاه، درمنه‌دشتی، بادرشمی و آویشن خزری بیشترین تأثیر ایجاد تأخیر در جوانه‌زنی (بیش از ۲۲٪)؛ اسانس کاکوتی، زینان و شمعدانی معطر بیشترین اثر در ایجاد رکود بذر (بیش از ۲۲٪)؛ و اسانس انیسون و آویشن‌دناهی بیشترین درصد مرگ جنین (۱۰۰٪) را داشتند. اسانس انیسون، پونه‌کوهی، برازمل و آویشن‌دناهی بیشترین بازدارندگی رشد گیاهچه (بیش از ۹۴٪) را موجب شدند. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند موجب شناسایی ترکیبات جدید آلوپات شود که می‌توانند کاربردهای مختلف داشته باشند، از جمله در تولید علف‌کش‌های طبیعی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فرار، دگرآسیبی، سوآب پنبه‌ای، گیاهان دارویی، فیتوتوکسیسیته

مقدمه

۱۰). هر ساله لیست جدیدی از علف‌های هرز مقاوم به سموم منتشر می‌شود، بطوری‌که طبق گزارش سایت بررسی بین‌المللی کمیته کاری مقاومت به علف‌کش‌ها در سال ۲۰۱۷ لیستی از ۳۶ مورد جدید از مقاومت علف‌های هرز به انواع علف‌کش‌ها منتشر شد (۲۱). امروزه تلاش جهانی بشر در کشاورزی نوین به سمت کاهش هر چه بیشتر استفاده از سموم مضر و معرفی روش‌های جدید بیولوژیکی و اکولوژیکی اختصاص یافته است. یکی از این روش‌ها استفاده از عکس‌العمل‌های شیمیایی بین گیاهان است (۲۷). بطور کلی برهم‌کنش‌های بین گیاهان در یک اکوسیستم مشترک اثرات جانبی است که هر گیاه بر روی گیاهان دیگر مجاور خود اعمال می‌نماید، و این اثرات شامل رقابت و آلوپاتی می‌باشد. رقابت شامل جذب فعال منابع محدود توسط یک موجود است که منجر به کاهش عرضه و در نتیجه کاهش رشد سایر موجودات می‌گردد، اما هنگامی که رشد یک گونه توسط مواد شیمیایی آزاد شده توسط گونه‌های دیگر مهار می‌شود، مکانیسم دخالت به عنوان آلوپاتی شناسایی می‌شود (۵۸ و ۵۰). با این حال، برخی محققین در تعریف آلوپاتی اثرات تحریکی رشد را

تداخلات رشدی علف‌های هرز و محصولات کشاورزی منجر به صرف هزینه‌های زیاد در سیستم‌های کشاورزی می‌شود (۹). علف‌کش‌ها همواره نقش اساسی را در سیستم‌های مدیریت علف هرز ایفا می‌کنند و در دسترس بودن انواع ارزان قیمت آنها موجب مصرف رو به افزایش آنها در تمامی کشورها اعم از توسعه یافته و در حال توسعه شده است. این مساله یکی از عوامل اصلی آسیب به محیط زیست و سلامت عمومی است و منجر به آلودگی‌های زیست محیطی، غیر ایمن شدن محصول و مخاطرات سلامتی انسان‌ها می‌گردد (۳۴) و

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: (Email: azizi@um.ac.ir)

۳- استاد گروه علوم محیط زیستی و کشاورزی بین‌المللی، دانشگاه کشاورزی و تکنولوژی توکیو، ژاپن

DOI: 10.22067/jpp.v33i4.83112

استفاده از اسانس‌ها و ترکیبات فرار بصورت تدخینی باقیمانده‌ای بر روی محصول نخواهد داشت این دسته از ترکیبات آلوپاتی می‌توانند بمنظور جلوگیری از رشد علف‌های هرز قبل و پس از کشت محصول بسیار کارآمد باشند. چنانچه مطالعات صورت گرفته نشان داده‌است که برخی اسانس‌ها و یا اجزاء آنها به نحو مؤثری موجب کاهش رشد گیاهان می‌شوند (۳۸). انجام پژوهش‌های جدید در این خصوص می‌تواند زمینه جدیدی برای درک بهتر اثرات آلوپاتی‌ک و دستیابی به علف‌کش‌های طبیعی و مؤثر را فراهم سازد. علی‌رغم پژوهش‌های صورت گرفته در خصوص شناسایی گونه‌های آلوپات، تحقیقات بیشتری لازم است تا گونه‌های جدید مؤثر و ترکیبات بازدارنده موجود در آنها شناسایی و مکانیسم اثر آلوپاتی آنها بررسی شود. در این مقاله به اثرات بازدارندگی اسانس گیاهان مختلف دارویی و معطر مهم ایران بصورت تدخینی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه کاهو پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گونه‌ها: نمونه‌های گیاهی شامل ۱۱۲ نمونه از اندام‌های مختلف گیاهی شامل ریشه، ریزوم، کورم، ساقه، برگ، گل، میوه، پوست میوه، کل اندام هوایی، و یا ترشحاتی مانند اولئوگام^۸ متعلق به ۹۷ گونه معطر از ۱۶ خانواده مختلف گیاهی که از نقاط مختلف ایران (باغ‌های گیاه‌شناسی، مراکز تحقیقاتی و زیستگاه‌های طبیعی) جمع‌آوری شد. به منظور حفظ ترکیبات فرار گیاهان با توجه به نوع بافت حاوی اسانس به روش مناسب خشک شدند (در آون با دمای ۶۰-۳۰°C به مدت ۱ تا ۳ روز). عمل اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب با استفاده از کلونجر صورت گرفت و اسانس‌ها پس از جمع‌آوری در ظروف شیشه‌ای با سولفات سدیم بدون آب آبیگری شدند و در طول مدت آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

این پژوهش در قالب دو آزمایش مجزا اجرا شد و برای این منظور از گیاه کاهو (*Lactuca sativa*) رقم Great Lakes 366 استفاده شد زیرا این گیاه دوره جوانه‌زنی کوتاه و حساسیت بالایی نسبت به فیتوکمیکال‌ها دارد و علاوه بر این کاهو به عنوان یک گیاه مدل برای آزمایشات آلوپاتی در نظر گرفته می‌شود.

آزمایش اول (ارزیابی شدت پتانسیل بازدارندگی جوانه‌زنی)

به منظور بررسی میزان سمیت^۹ ترکیبات فرار بصورت تدخینی، پتانسیل آلوپاتی‌ک ۱۱۲ اسانس در دو مقدار مختلف ۱ و ۳ میکرولیتر در ویال در مقایسه با تیمار شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت و هر واحد

نیز لحاظ می‌کنند (۳۰). همچنین در دیدگاه وسیع‌تر آلوپاتی به عنوان تعاملات شیمیایی بین تمامی موجودات زنده از طریق انتشار ترکیبات شیمیایی به محیط تعریف می‌شود (۲۵). استفاده از خاصیت آلوپاتی موجود در برخی گونه‌های گیاهی برای کنترل جوانه‌زنی بذر علف‌های هرز بسیار مؤثر بوده و مورد توجه می‌باشد. تاکنون پژوهش‌های فراوانی در خصوص آلوپاتی انجام شده و نشان داده این پدیده می‌تواند نقش مهمی در کنترل علف‌های هرز داشته‌باشد (۳، ۶، ۴ و ۸). آلوپاتی از طریق کنترل مؤثر علف‌های هرز در سیستم‌های کشت، می‌تواند نقش مهمی در ایمنی جامعه ایفا کند. تعداد زیادی از ترکیبات آلوکمی‌کال از گیاهان مختلف گزارش شده‌است که مهم‌ترین گروه‌های آنها شامل ترکیبات فنلی، بنزوکسازینوئیدها^۱، سوروگونون^۲، گلوکوزینولات‌ها^۳، ترپن‌ها، آلکالوئیدها و مامی‌لاکتون‌ها^۴ می‌باشند (۲۷). تاکنون تعدادی از ترکیبات طبیعی مانند سینئول، لپتوسپرمون‌ها^۵، بنزوکسازینون‌ها^۶ و کوئینولینیک اسید^۷ به عنوان علف‌کش‌های طبیعی معرفی و وارد بازار شده‌اند. استفاده این دسته از علف‌کش‌های طبیعی در کشاورزی مورد استقبال بوده و نتایج بسیار امیدوارکننده‌ای داشته است. هرچند در علم علف‌های هرز، اغلب توجه به تحقیقات مرتبط با علف‌کش‌های صنعتی صورت می‌گیرد. تحقیق بیشتر برای درک جنبه‌های فیزیولوژیکی و مولکولی روش عمل آلوکمی‌کال‌ها ضروری است و تحقیقات بیشتری لازم است تا گونه‌های مؤثر و ترکیبات بازدارنده موجود در آنها شناسایی شود و مکانیسم اثر آلوپاتی را نشان دهد (۱۸). ترکیبات آلوکمی‌کال گیاهان عالی ممکن است به روش‌های مختلف مانند فراریت (پدیده غالب در شرایط خشک و نیمه خشک)، آبشویی از برگ یا ساقه (از طریق آب باران، شبنم، یا آبیاری اندام هوایی)، ترشحات ریشه (از طریق مکانیسم‌های مختلف نظیر انتشار، انتقال وزیکولی، یا کانال‌های یونی)، و تجزیه توسط میکروارگانیسم‌ها به محیط رهاسازی شوند و سپس از طریق جریان آب یا باد جابجا و منتقل گردند (۲۴). در بین گونه‌های آلوپات، گیاهان دارویی و معطر این قابلیت را دارند که ترکیبات آلوکمی‌کال موجود در اسانس خود را از طریق انتشار به هوا منتقل کنند و از این طریق موجودات اطراف خود را تحت تأثیر قرار دهند. پژوهش‌های بسیار نشان داده است اسانس‌ها نقش مهمی در کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها دارند و بطور مؤثری می‌توانند مانع رشد و جوانه‌زنی اسپور باکتری‌ها و قارچ‌ها شوند (۷ و ۴۴). از آنجا که

- 1- Benzoxazinoids
- 2- Sorgoleone
- 3- Glucosinolates
- 4- Momilactones
- 5- Leptospermones
- 6- Benzoxazinones
- 7- Quinolinic Acid

8- Oleogum

9- Phytotoxicity

پایان آزمایش

درصد مرگ جنین (L%) و درصد ایجاد رکود در بذر (D%): برای این منظور در هر تکرار، بذرهایی که بعد از ۵ روز در شرایط آزمایش جوانه نزنده بودند از شرایط آزمایش خارج شده و به مدت سه روز دیگر در شرایط جوانه‌زنی مشابه شاهد (در ویال حاوی آگار اما بدون اسانس) قرار گرفتند. بذرها بعد از سه روز بررسی شده و آنهایی که همچنان جوانه نزنده بودند پس از حذف پوسته در محلول تترازولیوم ۱ درصد (pH=7) قرار داده شد و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خوابانده شدند. سپس وضعیت اندوسپرم و جنین با استفاده از میکروسکوپ بررسی و درصد مرگ جنین تعیین شد. مطابق دستورالعمل ایستا^۴، تنها بذوری که بطور کامل و یکنواخت رنگ گرفته بودند بعنوان بذور زنده در نظر گرفته شد (شکل ۲) (۳۶)، و بدین ترتیب درصد مرگ جنین (L%) مطابق معادله ۳ تعیین شد. با توجه به تعداد بذره‌های جوانه زده و درصد مرگ جنین، همچنان در تعدادی بذور نه علائمی از جوانه‌زنی مشاهده شد و نه علائمی از مرگ جنین نشان دادند که آنها بعنوان بذور دچار رکود تلقی شدند و بدین ترتیب مطابق معادله ۴ درصد القای رکود (D%) تعیین شد.

$$L\% = \frac{n}{S} \times 100 \quad \text{معادله (۳)}$$

L%: درصد مرگ جنین؛ n: بذره‌های رنگ نگرفته؛ S: کل بذور کشت شده

$$D\% = \frac{S - (N + A + L)}{S} \times 100 \quad \text{معادله (۴)}$$

D%: درصد ایجاد رکود در بذر؛ S: کل بذور کشت شده؛ N: کل بذره‌های جوانه زده تا پایان آزمایش؛ A: بذره‌های جوانه زده بعد از حذف اسانس؛ L: بذره‌های دچار مرگ جنین
تمام صفات بصورت نسبی در مقایسه با شاهد گزارش شدند:

$$V\% = \frac{V_T}{V_C} \times 100 \quad \text{معادله (۵)}$$

V%: مقدار نسبی صفت؛ V_T: میانگین صفت در تیمار؛ V_C: میانگین صفت در شاهد

آزمایش دوم (بررسی اثرات بازدارندگی رشد گیاهچه)

این آزمایش نیز بصورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی، در مورد تاثیر ۱۱۲ اسانس با دو غلظت (مشابه مرحله اول) در ۴ تکرار انجام شد. فقط با این تفاوت که در این آزمایش به منظور بررسی تاثیر اسانس‌ها بر رشد گیاهچه، از بذور کاهو که از ۲۴ ساعت قبل در شرایط جوانه‌زنی قرار گرفته و جوانه زده بودند استفاده شد (بذور با ۲ میلی‌متر ریشه‌چه به عنوان جوانه‌زده قلمداد شده و در آزمایش استفاده

آزمایش شامل یک ویال بود. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، در ۴ تکرار انجام شد. اثرات آللوپاتیک ترکیبات فرار به روش سوآب پنبه‌ای (۴۰)، مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). در این آزمایش ویال‌های شیشه‌ای مناسب با حجم ۲۰ میلی‌لیتر پس از شستشو به روش استریل خشک در آون ضدعفونی شدند. سپس محلول آگار ۰/۷۵ درصد (w/v) با استفاده از پودر آگار خریداری شده از شرکت Merck و آب دو بار تقطیر ساخته شد و بوسیله اتوکلاو استریل گردید. به دلیل حساسیت بالای دقت حجم آگار در ویال، مرحله پرکردن ویال‌ها با آگار پس از استریل‌اسیون و زمانی که دمای آگار به حدود ۴۰ درجه رسید، در زیر هود و در شرایط استریل صورت گرفت. بدین صورت که با استفاده از پیپت مدرج در هر ویال ۱۰ میلی‌لیتر آگار (معادل نصف حجم ویال) ریخته شد. پس از سرد و جامد شدن آگار در زیر هود، تعداد ۷ عدد بذر کاهو روی آگار قرار گرفت بطوری که از قسمت نوک به اندازه یک سوم در آگار فرو رفتند. سپس سوآب پنبه‌ای دو طرفه که از وسط برش خورده بود در مرکز ویال حاوی آگار قرار داده شد بطوری که نوک پنبه‌ای آن در وسط فضای خالی ویال قرار گرفت. بلافاصله پس از کشت، اسانس مورد نظر در مقدار مشخص (۱ یا ۳ میکرولیتر) با استفاده از سرنگ موئین همیلتون^۱ بر روی قسمت پنبه‌ای سوآب تزریق شد. سپس بلافاصله درپوش لاستیکی و سیل آلومینیومی روی درب ویال قرار گرفت و به کمک کریمپر^۲ درب ویال پلمپ گردید (شکل ۱). ویال‌های آماده شده به منظور جوانه‌زنی بذور در ژرمیناتور در دمای ۲±۲۱ سانتی‌گراد و شرایط تاریکی قرار گرفتند.

هر واحد آزمایش شامل یک ویال حاوی ۷ بذر بود که وضعیت جوانه‌زنی بطور روزانه به مدت ۵ روز در آنها بررسی شد و صفات مرتبط با جوانه‌زنی اندازه‌گیری شدند. صفات مورد بررسی در این آزمایش عبارت بودند از:

درصد جوانه‌زنی (G%) (۱۶ و ۲۸):

$$G\% = \left(\frac{N}{S}\right) \times 100 \quad \text{معادله (۱)}$$

G%: درصد جوانه‌زنی؛ N: کل بذره‌های جوانه زده تا پایان آزمایش؛ S: کل بذور کشت شده

متوسط زمان جوانه‌زنی (MGT)^۳ (۱۶):

$$MGT = \frac{\sum T_i N_i}{N} \quad \text{معادله (۲)}$$

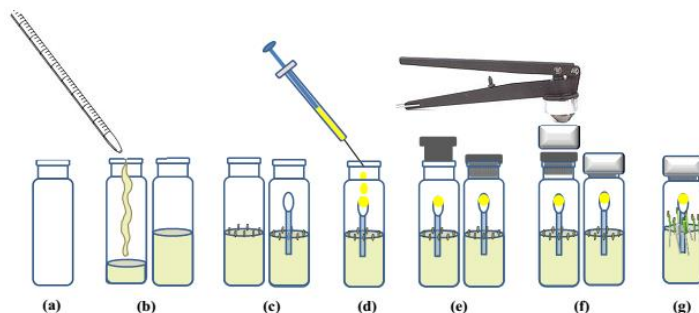
MGT: متوسط زمان جوانه‌زنی؛ N_i: تعداد بذره‌های جوانه زده در هر روز؛ T_i: شماره روز از آغاز آزمایش؛ N: کل بذره‌های جوانه زده تا

- 1- Hamilton
- 2- Crimper
- 3- Mean Germination Time

4- ISTA (International Seed Testing Association)

جوانه زده بود که بلافاصله پس از کشت تیمار اسانس مشابه آزمایش اول بر آن اعمال شد و درپوش ویال پلمپ گردید.

شدند)، شرایط اتاق رشد نیز با دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی تنظیم شد. هر واحد آزمایش شامل یک ویال حاوی ۵ بذر

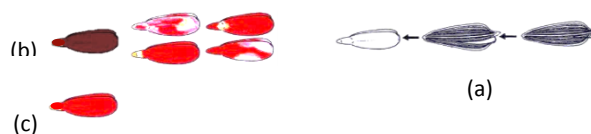


شکل ۱- طرح شماتیک اجرای آزمایش بررسی اثر آلوپاتی اسانس‌ها به روش سوآب پنبه‌ای

(a): ویال با حجم ۲۰ میلی‌لیتر، (b): افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آگار به کمک پیپت مدرج، (c): قرار دادن بذرهای کاهو و سوآب پنبه‌ای پس از سرد و سفت شدن آگار، (d): افزودن اسانس به قسمت پنبه‌ای سوآب به کمک سرنگ همیلتون، (e): قرار دادن درپوش لاستیکی، (f): قرار دادن سیل آلومینیومی و پلمپ کردن درب ویال به کمک کریمپر، (g): جوانه‌زنی و رشد بذرهای پس از انکوباسیون.

Figure 1- Schematic design of cotton swab method to investigate the allelopathic effect of essential oils

(a): 20 ml vial, (b): Add 10 ml agar, (c): Insert lettuce seeds and cotton swabs after agar cooling and solidification, (d): Add EOs to cotton swabs using Hamilton syringe, (e): Rubber cap insertion, (f): Aluminum sealing and crimping, (g): Germination and seed growth after incubation



شکل ۲- روش بررسی مرگ جنین بر اساس ایستا

(a): روش آماده‌سازی بذر و حذف پوسته، (b): انواع لکه‌پذیری غیر قابل قبول که بعنوان بذرهای غیر زنده محسوب می‌شوند، (c): لکه‌پذیری یکنواخت بذر زنده

Figure 2- Embryo death assessment based on ISTA

(a): Seed preparation and coat removal method, (b): Unacceptable staining types that are considered abnormal seeds, (c): Uniform staining of live seed

(VI) محاسبه شد:

$$VI\% = G\% \times S$$

معادله (۸)

VI: شاخص قدرت گیاهچه؛ G%: درصد جوانه‌زنی؛ S: طول گیاهچه (مجموع طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل). این صفت نیز بصورت نسبی در مقایسه با شاهد گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی معنی‌داری اثر تیمارها بر اساس جداول تجزیه واریانس تعیین شد. مقایسه و طبقه‌بندی میزان تأثیر تیمارها در صفات مختلف بر اساس مقدار میانگین و انحراف استاندارد هر صفت صورت گرفت (۳ و ۳۹). با توجه به اینکه تأثیر بازدارندگی تیمار بر جوانه‌زنی و رشد به معنی افزایش برخی صفات (MGT، D%، L%) و کاهش برخی دیگر (G%، R، H، S، VI) می‌باشد، شدت تأثیر بازدارندگی به ترتیب

ویال‌ها در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی به مدت ۳ روز خوابانده شدند. پس از سه روز، طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل به روش عکس‌برداری و با استفاده از نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و رشد گیاهچه در تیمارها در مقایسه با شاهد محاسبه شد:

$$H\% = \frac{H_T}{H_C} \times 100$$

معادله (۶)

H%: درصد طول هیپوکوتیل؛ H_C: طول هیپوکوتیل شاهد؛ H_T: طول هیپوکوتیل تحت تیمار

$$R\% = \frac{R_T}{R_C} \times 100$$

معادله (۷)

R%: درصد طول ریشه‌چه؛ R_C: طول ریشه‌چه شاهد؛ R_T: طول ریشه‌چه تحت تیمار
سپس با توجه به درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه در هر تیمار شاخص قدرت گیاهچه

صفات در هر غلظت به شرح زیر است (جدول ۱):

نتایج آزمایش اول: درصد جوانه‌زنی (G%) تحت تأثیر تیمار اسانس‌ها قرار گرفت به نحوی که عمده تیمارها موجب کاهش این شاخص شدند و برخی بر آن بی‌تأثیر بودند. مقدار این صفت در هر دو غلظت ۱ و ۳ میکرولیتر ۱۰۰-۰ درصد بود، و تیمار شاهد مقدار ۱۰۰ درصد داشت. در غلظت ۱ میکرولیتر ۳۶ اسانس بر این صفت بی‌اثر بود و ۷۶ اسانس موجب کاهش شاخص در مقایسه با تیمار شاهد شدند. در این غلظت بیشترین درجه کاهش (کمتر از ۲۲ درصد در مقایسه با شاهد) مربوط به ۱۲ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۶ اسانس: بادرنجبویه، نعنا ابلق، برگ پونه کوهی، آویشن دنیایی، آویشن خزری، کاکوتی)، Geraniaceae (۲ اسانس: برگ شمعدانی معطر و سرشاخه گلدار شمعدانی معطر)، Apiaceae (۲ اسانس: انیسون و زنیان)، Liliaceae (یک اسانس: موسیر) و Rutaceae (یک اسانس: سداب) بود. در غلظت ۳ میکرولیتر ۸۸ اسانس موجب کاهش این صفت و ۲۳ اسانس بر این شاخص در مقایسه با تیمار شاهد بی‌تأثیر بودند. در این غلظت بیشترین درجه کاهش (کمتر از ۵ درصد در مقایسه با شاهد) مربوط به ۲۱ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۸ اسانس: بادرشی، بادرنجبویه، نعنا ابلق، برگ پونه کوهی، آویشن دنیایی، آویشن خزری، آویشن شیرازی، کاکوتی)، Apiaceae (۵ اسانس: زیره سیاه ایرانی، زیره سبز، صمغ انغوزه، انیسون و زنیان)، Geraniaceae (۲ اسانس: برگ شمعدانی معطر و سرشاخه گلدار شمعدانی معطر)، Asteraceae (۲ اسانس: درمنه دشتی و شاه‌اسپریم)، Rutaceae (۲ اسانس: برگ لیمو شیرین و سداب)، Liliaceae (یک اسانس: موسیر) و Zingiberaceae (یک اسانس: هل سیاه) بود. متوسط زمان جوانه‌زنی (MGT) نیز تحت تأثیر تیمار قرار گرفت. تنها تیمارهایی که جوانه‌زنی در ۳ یا ۴ تکرار رخ داده بود از این نظر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. مقدار این صفت در غلظت ۱ میکرولیتر ۵-۱/۷ روز، و در غلظت ۳ میکرولیتر ۵-۲ روز بود، و تیمار شاهد مقدار ۲/۱ روز را داشت. در غلظت ۱ میکرولیتر ۹۵ اسانس موجب افزایش و ۴ اسانس موجب کاهش شاخص در مقایسه با تیمار شاهد شدند. در این غلظت بیشترین درجه افزایش (بیش از ۲۲۴ درصد نسبت به شاهد) مربوط به ۴ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۲ اسانس: بادرشی و آویشن خزری)، Asteraceae (یک اسانس: درمنه دشتی)، و Zingiberaceae (یک اسانس: هل سیاه) بود. در غلظت ۳ میکرولیتر ۷۰ اسانس موجب افزایش و ۴۰ اسانس موجب کاهش شاخص در مقایسه با تیمار شاهد شدند. در این غلظت بیشترین درجه افزایش (بیش از ۲۰۴ درصد نسبت به شاهد) مربوط به ۹ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۳ اسانس: برازمل، گل و برگ رزماری)، Asteraceae (۳ اسانس: بومادران معمولی، درمنه کوهی، درمنه ایرانی)، Cupressaceae (۲ اسانس: سرو لاسون، توپا آمریکایی)، Apiaceae (یک اسانس: کرفس) بود.

بر اساس میزان افزایش و کاهش این صفات نسبت به میانگین در نظر گرفته شد. میزان شدت تأثیر بازدارندگی در ۵ سطح تعریف شد که به ترتیب از بیشترین به کمترین تأثیر شامل سطح پنج (*****)، Mean \pm 2sd، سطح چهار (****) Mean \pm 1.5sd، سطح سه (***), Mean \pm 1sd، سطح دو (**), Mean \pm 0.5sd، و سطح یک (*) Mean \pm 0.25sd بودند. ضمناً اثرات تحریک‌کننده نیز بصورت (+) نشان داده شد. لازم به ذکر است MGT در برخی تیمارها به علت بازدارندگی ۱۰۰ درصد تعریف نشد و به همین دلیل درخصوص این صفت مقایسه تنها بین اسانس‌هایی که حداقل در ۳ تکرار بازدارندگی کمتر از ۱۰۰ درصد داشتند صورت گرفت. از نرم افزارهای آماری SPSS, Prism, Graphpad و Excel برای آنالیزهای آماری استفاده شد.

کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی فضای بالای ویال (GC-MS Headspace)

اجزای تشکیل‌دهنده قوی‌ترین اسانس‌ها بر اساس نتایج مرحله غربالگری (آزمایش اول و دوم)، به روش کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی مورد بررسی قرار گرفت، بدین منظور مقدار ۱ میکرولیتر (معادل ۱ میلی‌گرم) از اسانس بر روی نوک یک سوآب پنبه‌ای ریخته شد و سوآب در یک ویال با حجم ۲۰ میلی‌لیتر گذاشته و پلمپ شد و سپس در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت خوابانده شد، سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از فضای هر ویال با یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری مدل SGE 5MDR-HSV برداشته شد و به دستگاه کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی مدل GC-MS QP5050^۱ مجهز به Shimadzu GC 17A تزریق شد (اندازه ستون موئین: ۳۰ × ۲۵۰ μm × ۰/۲۵ μm و با استفاده از گاز حامل هلیوم). شرایط عملیاتی GC-MS به شرح زیر بود و برنامه دمایی دستگاه بصورت زیر اجرا شد: درجه حرارت آون GC از ۵۰ تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳ درجه در دقیقه افزایش یافت، پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد، افزایش دما تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰ درجه در دقیقه صورت گرفت. ترکیبات با استفاده از طیف جرمی NIST / NBS شناسایی شدند. طیف جرمی در ۷۰eV با محدوده ۴۰-۵۰ m/z ثبت و با کتابخانه NIST و Wiley مقایسه و در نهایت مطابق با استانداردهای معتبر تایید شد.

نتایج و بحث

آنالیز واریانس نشان داد اثر اسانس، غلظت و اثر متقابل آنها بر تمام صفات مورد بررسی در هر دو آزمایش از نظر آماری معنی‌دار بود. $(p \leq 0/01)$ گروه‌بندی آماری اسانس‌ها از نظر قدرت بازدارندگی

1- Spectrophotometer

49	<i>Encalpus globatus</i>	L	89.3	100	2.6	3.4	0	0	0	7.2	0	32.2	20.6	46.1	24.2	36.4	22.8
50	<i>Ferula alliacea</i>	Ap	100	96.4	2.6	3.1	0	0	0	0	3.6	43	24	51.9	23.6	48.5	22.9
51	<i>Ferula foetida</i>	O	93	0.0***	3.2	0.0***	3.6	0	0	0	100****	38.5	9.3**	48.1	4.7**	41.3	0.0**
52	<i>Ferula gamsa</i>	O	100	100	2.6	2.6	0	0	0	0	0	76	42.2	88.3	54.8	83.6	50
53	<i>Ferula luensis</i>	L	100	89.3	2.3	2.9	0	0	0	0	3.6	32	17.8*	30.7*	10.9**	31.2	12.1*
54	<i>Foeniculum vulgare</i>	Fr	100	100	2.5	3.2	0	0	0	0	0	29.8*	9.0**	32.2*	1.8**	31.3	4.6**
55	<i>Foeniculum vulgare</i>	L	100	78.6	3.1	3.9**	0	0	0	0	3.6	42.2	25.6	48.4	29.1	46.1	21.8
56	<i>Grindelia robusta</i>	L,F	93	92.9	2.4	2.8	0	3.6	0	0	0	51.7	26.6	72.4	31	59.8	27.2
57	<i>Helianthus annuus</i>	L	100	100	2.4	2.8	0	0	0	0	0	47.5	26.9	63.1	17.4*	57.1	21.1
58	<i>Helichrysum italicum</i>	Ap	96.5	53.6*	3.0**	4.1**	0	0	0	0	3.6	31.1*	19.4	42.4	27.4	36.7	13.0*
59	<i>Helicium persicum</i>	Fr	100	25.0**	2.4	3.3	0	14.3**	0	0	3.6	29.6**	7.5**	30.1*	3.5	29.9*	1.3**
60	<i>Inula pauciflorum</i>	Fr	93	100	1.7	2	0	0	0	0	0	70.7	71.4	74	75.1	67.5	73.7
61	<i>Juniperus chinensis</i>	L	96.5	92.9	2.9	3.3	3.6	0	0	0	0	27.7*	19.4	39.2	23.4	33.5	20.3
62	<i>Juniperus excelsa</i>	L	100	92.9	2.2	2	0	7.2	0	0	0	61.5	42.9	91.9	73.8	80.2	57.5
63	<i>Juniperus horizontalis</i>	Fr	100	96.5	2.6	2.4	0	0	0	0	0	56.5	45.9	69.5	59.7	64.5	52.5
64	<i>Juniperus horizontalis</i>	L	92.8	96.4	2	2.1	3.6	3.6	0	0	0	31.2*	15.6*	53.3	22.7	41.6	19.2
65	<i>Juniperus sp.</i>	L,F	96.5	100	2.4	2.8	3.6	0	0	0	0	38.3	33.3	36.2*	37	35.7	35.6
66	<i>Lamiana camara</i>	L	93	92.9	2.4	2.9	0	3.6	0	0	0	39.1	32.4	47.5	53.7	41.1	42.2
67	<i>Lavanula angustifolia</i>	L,F	93	71.4	3.5*	3.9**	0	0	0	3.6	3.6	27.5*	15.4*	45.6	9.3**	35.9	8.3**
68	<i>Lavanula angustifolia</i>	L	10.8***	0.0***	4.5	4.4**	14.3***	0	0	0	10.7	13.1***	2.0**	4.1**	0.2**	7.3**	0.2**
69	<i>Lippia citriodora</i>	L	85.8	60.7	3.3*	4.4**	0	0	0	0	0	33	7.3**	24.3**	5.8*	26.6*	3.9**
70	<i>Magnolia virginiana</i>	L	96.5	96.4	3.1	2.7	0	3.6	0	10.7	0	62.1	63.6	70.7	70.2	57.8	65.2
71	<i>Melissa officinalis</i>	L	3.5***	0.0***	4	0	0	0	0	21.5**	100****	21.1**	15.0*	18.8**	6.3**	0.7**	0.0**
72	<i>Mentha longifolia</i>	L	96.5	53.6*	3.6**	4.3**	0	0	0	0	0	19.0**	11.8**	14.3**	5.2**	15.5**	4.1**
73	<i>Mentha piperita</i>	L,F	60.5**	32.2*	4.2**	4.4**	3.6	17.9***	3.6	3.6	0	26.8**	9.4**	35.6*	4.7*	19.6**	2.1**
74	<i>Mentha pulegium</i>	L,F	96.5	53.6*	3.7	4.4**	0	7.2	0	0	0	21.3**	7.3**	20.2**	3.3**	19.9**	2.6**
75	<i>Mentha suaveolens</i>	L	10.8***	0.0***	4.5	4.5**	14.3***	0	0	3.6	92.9****	15.8**	12.2*	7.6**	6.5**	1.2**	0.0**
76	<i>Microcephala lamellata</i>	L,F	100	89.3	2.3	2.7	0	0	0	0	3.6	46.4	39.5	75.4	43.5	64.2	37.5
77	<i>Myristica fragrans</i>	Fr	100	96.4	2.5	3.1	0	0	0	0	0	41.8	25.3	54.5	38.2	49.6	32
78	<i>Nepeta hirtoides</i>	Ap	78.5	10.7***	4.6**	5	3.6	3.6	0	0	3.6	57.4	26.9	66.6	38.2	49.5	36**
79	<i>Nepeta cataria</i>	L,F	68.0*	14.3***	4.4**	4.3	3.6	42.9***	0	0	0	55.4	24.8	54.7	10.9**	37.3	2.3*
80	<i>Origanum vulgare subsp. viridi</i>	F	89.5	46.4*	3.3*	4.5**	0	0	0	3.6	7.2	5.0***	5.6**	2.3***	0.1**	3.0**	1.0**
81	<i>Origanum vulgare subsp. vulgare</i>	L	7.0***	0.0***	5	0	0	0	0	85.7***	100****	10.5**	4.6**	8.4**	0.2**	0.7**	0.0**
82	<i>Origanum vulgare subsp. vulgare</i>	F	100	100	2.1	2.2	0	0	0	0	0	45.3	44.1	62.1	61	55.7	54.5
83	<i>Pelargonium graveolens</i>	L	7.0***	3.6**	3.5	5	57.1***	25.0***	0	0	71.4***	19.0**	14.3**	27.8**	26.6	1.7**	0.8**
84	<i>Pelargonium graveolens</i>	L,F	0.0***	0.0***	0	0	32.2***	14.3**	32.2***	0	82.1***	13.7**	16.4*	25.6**	18.4*	0.0**	0.0**
85	<i>Perovskia abrotanoides</i>	F	89.3	53.6*	3.8**	4.8***	0	3.6	0	0	0	6.7***	7.8**	4.3**	1.0*	4.7**	1.9**
86	<i>Perovskia abrotanoides</i>	L	100	89.3	3.3	4.3**	0	0	0	3.6	3.6	35.9	31.8	43.4	24.9	40.5	24.6
87	<i>Petroselinum sativum</i>	Fr	96.5	96.4	2.4	2.5	0	0	0	0	0	32.2	19.4	85	36.5	62	28.8
88	<i>Pimpinella anisum</i>	Fr	0.0***	0.0***	0	0	0	0	0	100****	100****	5.8**	1.9**	4.2**	0.5**	0.0**	0.0**
89	<i>Pinus eldarica</i>	O	100	100	2.3	2	0	0	0	0	0	58.7	23.1	65.7	13.6*	63	17.2
90	<i>Pinus eldarica</i>	L	89.3	100	3	3	7.2*	0	0	0	0	71.8	66.7	79.7	81.4	68.5	75.8
91	<i>Pinus eldarica</i>	L	96.5	96.4	3	3.4	0	0	0	0	0	53.6	44.6	25.6*	53.6	27.1*	48.4
92	<i>Pistacia vera</i>	Fp	100	100	2.4	3	0	0	0	0	0	51	47.3	69.2	60.2	62.2	55.2
93	<i>Rosmarinus officinalis</i>	L	89.3	35.7**	4.5***	5.0***	10.7*	0	0	0	28.1*	8.8**	12.8**	0.8*	12.8**	1.4**	3.2**
94	<i>Rosmarinus officinalis</i>	F	89.5	17.9**	4.1**	5.0***	0	10.7*	0	0	39.2	19.4	14.0**	23.0**	11.2**	38.5	2.6**
95	<i>Ruta graveolens</i>	L	14.5***	3.6***	2.5	4	10.7**	42.9***	10.7	39.3**	18.7**	18.7**	11.7**	11.7**	0.3**	14.4**	3.5**
96	<i>Salvia nemorosa</i>	Ap	100	67.9	3.2	4.1**	0	0	0	0	7.2	14.3**	5.6**	6.7**	0.5**	9.6**	2.4*
97	<i>Salvia officinalis</i>	Ap	100	96.4	3.4*	4.2**	0	0	0	0	0	14.3**	5.6**	6.7**	0.5**	9.6**	2.4*
98	<i>Salvia syriaca</i>	Ap	78.5	67.9	3	4.5**	0	3.6	3.6	3.6	3.6	40.2	26	65.9	44.6	44	25.4
99	<i>Santolina chamaecyparissus</i>	L,F	100	92.9	2.4	3	0	0	0	0	0	31.2*	24.8	38.8	27	35.8	24.3
100	<i>Stygium aromaticum</i>	L	93	46.4*	2.4	2.1	3.6	0	0	0	21.5	20.9**	10.6*	29.5**	16.0*	24.3*	6.5**
101	<i>Tanacetum balsamita</i>	L,F	100	3.6***	3.3	5	0	0	0	0	25.0*	11.0**	3.7**	10.2**	0.0**	10.5**	0.1**
102	<i>Thuja occidentalis</i>	L	92.8	71.4	4.0**	4.7***	0	0	0	3.6	3.6	24.7**	14.3**	26.2**	3.1**	23.8**	5.3**

تولید گیاهچه

مربوط به ۱۱ اسانس از خانواده‌های Apiaceae (۲ اسانس: شوید، انیسون)، Lamiaceae (۶ اسانس: بادرشبی، گل اسطوخودوس، برگ پونه‌کوهی، گل پونه‌کوهی، مریم‌گلی دارویی، آویشن دناایی)، Zingiberaceae (یک اسانس: هل سیاه) و Asteraceae (۲ اسانس: برنجاسف نقره‌ای و شاه‌اسپریم) بود. طول ریشه‌چه (R%) نیز تحت تاثیر تیمار قرار گرفت. مقدار طول ریشه‌چه در شاهد ۲۶/۴۵ میلی‌متر بود و در غلظت ۱ میکرولیتر اسانس‌ها ۲۸/۲۹ - ۰/۱۳ میلی‌متر (۱۰۶/۹ - ۰/۵ درصد نسبت به شاهد)، و در غلظت ۳ میکرولیتر ۲۴/۹ - ۰ میلی‌متر (۱۰۰ - ۵/۷۹ درصد نسبت به شاهد) بود. در غلظت ۱ میکرولیتر بیشترین درجه کاهش رشد (کمتر از ۳/۴ درصد نسبت به شاهد) مربوط به ۲ اسانس از خانواده Lamiaceae (گل پونه‌کوهی، آویشن دناایی) بود، و در درجه بعدی (رشد بین ۳/۴ تا ۱۶/۷ درصد نسبت به شاهد) ۱۳ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۹ اسانس: گل اسطوخودوس، نعنا ابلق، پودنه، برگ پونه‌کوهی، گل برازمیل، برگ رزماری، مریم‌گلی مزرعه‌روی، مریم‌گلی دارویی، آویشن شیرازی)، Asteraceae (۶ اسانس: بومادران خزری، درمنه کوهی، برنجاسف نقره‌ای، سرشاخه گلدار برنجاسف، درمنه دشتی)، خانواده Apiaceae (یک اسانس: انیسون)، خانواده Zingiberaceae (یک اسانس: هل سیاه) و خانواده Liliaceae (یک اسانس: موسیر) قرار داشتند. تنها اسانسی که در این غلظت اثر افزایش بر رشد ریشه‌چه داشت اسانس قهوه بود که موجب افزایش ۶/۹ درصدی در مقایسه با شاهد شد. در غلظت ۳ میکرولیتر بیشترین درجه کاهش رشد (کمتر از ۰/۵ درصد نسبت به شاهد) مربوط به ۸ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۵ اسانس: گل اسطوخودوس، برگ پونه‌کوهی، گل پونه‌کوهی، مریم‌گلی مزرعه‌روی، آویشن دناایی)، و Asteraceae (۳ اسانس: درمنه کوهی، درمنه بیابانی، شاه‌اسپریم) بود. در این غلظت ۴ اسانس درمنه کوهی، درمنه بیابانی، شاه‌اسپریم و آویشن دناایی موجب بازدارندگی ۱۰۰ درصد رشد ریشه‌چه شدند.

شاخص قدرت (VI)، نیز تحت تاثیر تیمار قرار گرفت. مقدار این صفت در شاهد ۴۲۹۹/۹۵، در غلظت ۱ میکرولیتر اسانس‌ها ۴۳۹۸/۸۵ - ۰ (۱۰۲/۳) - ۰ درصد نسبت به شاهد، و در غلظت ۳ میکرولیتر ۳۴۸۶/۹۹ - ۰ (۸۱/۱) - ۰ درصد نسبت به شاهد) بود. در غلظت ۱ میکرولیتر بیشترین درجه کاهش (کمتر از ۱۲ درصد نسبت به شاهد) مربوط به ۲۵ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۱۲ اسانس: بادرشبی، گل اسطوخودوس، بادرنجبویه، نعنا ابلق، برگ پونه‌کوهی، گل پونه‌کوهی، گل برازمیل، مریم‌گلی دارویی، آویشن دناایی، آویشن خزری، آویشن شیرازی، کاکوتی)، Asteraceae (۴ اسانس: برنجاسف نقره‌ای، سرشاخه گلدار برنجاسف، درمنه دشتی، شاه‌اسپریم)، Apiaceae (۳ اسانس: زیره سیاه ایرانی، انیسون، زنیان)، Geraniaceae (۲ اسانس: برگ شمعدانی معطر، سرشاخه گلدار

درصد ایجاد رکود در بذر (D%)، نیز تحت تاثیر تیمارها قرار گرفت. مقدار این صفت در غلظت ۱ میکرولیتر ۶۷/۸ - ۰ درصد و در غلظت ۳ میکرولیتر ۷۱/۴ - ۰ درصد بود. در غلظت ۱ میکرولیتر تنها ۲۵ اسانس اثرات رکود ایجاد کردند. بیشترین درجه ایجاد رکود (بیش از ۲۲ درصد) در این غلظت مربوط به ۴ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (یک اسانس: کاکوتی)، Apiaceae (یک اسانس: زنیان) و Geraniaceae (۲ اسانس: برگ و گل و برگ شمعدانی معطر) بود. در غلظت ۳ میکرولیتر ۳۵ اسانس اثرات ایجاد رکود نشان دادند، و بیشترین درجه ایجاد رکود (بیش از ۳۰ درصد) در این غلظت مربوط به ۵ اسانس از خانواده‌های Apiaceae (۲ اسانس: شوید و زنیان)، Lamiaceae (۲ اسانس: پونه‌سای گربه‌ای و کاکوتی) و Rutaceae (یک اسانس: سداب) بود. درصد مرگ جنین (L%)، نیز تحت تاثیر تیمار قرار گرفت. مقدار این صفت در هر دو غلظت ۱ و ۳ میکرولیتر ۱۰۰ - ۰ درصد بود. در غلظت ۱ میکرولیتر ۳۲ اسانس اثرات کشندگی نشان دادند، و بیشترین درجه کشندگی (بیش از ۴۵ درصد) مربوط به ۶ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۴ اسانس: برگ پونه‌کوهی، آویشن دناایی، آویشن شیرازی و آویشن خزری)، Apiaceae (یک اسانس: انیسون) و Liliaceae (یک اسانس: موسیر) بود، که در این بین اسانس انیسون و آویشن دناایی موجب کشندگی ۱۰۰ درصد شدند. در غلظت ۳ میکرولیتر ۵۱ اسانس اثرات کشندگی نشان دادند، و بیشترین درجه کشندگی (بیش از ۷۸ درصد) مربوط به ۱۳ اسانس از خانواده‌های Geraniaceae (یک اسانس: گل و برگ شمعدانی معطر)، Apiaceae (۳ اسانس: زیره سیاه ایرانی، صمغ انگوزه، انیسون)، Lamiaceae (۷ اسانس: بادرشبی، بادرنجبویه، نعنا ابلق، برگ پونه‌کوهی، آویشن دناایی، آویشن خزری، آویشن شیرازی)، Liliaceae (یک اسانس: موسیر) و Zingiberaceae (یک اسانس: هل سیاه) بود، که در این میان اسانس انگوزه، انیسون، بادرنجبویه، برگ پونه‌کوهی، آویشن دناایی، آویشن شیرازی و موسیر موجب کشندگی ۱۰۰ درصد شدند.

نتایج آزمایش دوم: صفات مرتبط با رشد گیاهچه نیز بطور

معنی‌دار تحت تاثیر تیمارها قرار گرفتند. طول هیپوکوتیل (H%) تحت تاثیر تیمار قرار گرفت و تمام تیمارها موجب کاهش طول هیپوکوتیل شدند. طول هیپوکوتیل در شاهد ۱۶/۶ میلی‌متر، در غلظت ۱ میکرولیتر ۱۵/۷ - ۰/۸ میلی‌متر (۹۴/۹ - ۵ درصد در مقایسه با شاهد)، و در غلظت ۳ میکرولیتر ۱۴/۱ - ۰/۱۲ میلی‌متر (۸۵/۴ - ۰/۸ درصد نسبت به شاهد) بود. در غلظت ۱ میکرولیتر بیشترین درجه کاهش (کمتر از ۸ درصد نسبت به شاهد) مربوط به ۴ اسانس از خانواده‌های Lamiaceae (۳ اسانس: گل پونه‌کوهی، گل برازمیل، آویشن دناایی)، و Apiaceae (یک اسانس: انیسون) بود. در غلظت ۳ میکرولیتر بیشترین درجه کاهش (کمتر از ۶ درصد نسبت به شاهد)

برنجاسف نقره‌ای، برازمل، برنجاسف، شاه‌اسپریم و آویشن خزری مشاهده شدند. برخی اسانس‌ها مانند شوید، انیسون و آویشن دنايي تنها یک ترکیب فرار غالب داشتند (به ترتیب ۲۱- دی‌ایزو پروپنیل سیکلوتان ۷/۷۴٪، ترانس آنتول ۳/۹۳٪، و کارواکرول ۹/۹۰٪). اثرات آللوپاتیک اکثر این ترکیبات فرار در سایر پژوهش‌ها اثبات شده و بازدارندگی آللوپاتیک اسانس‌ها در این مطالعه را نیز می‌توان در نتیجه وجود هر یک از این ترکیبات و برآیندی از مجموعه ترکیبات غالب فرار در هر اسانس دانست. از آنجا که جایگاه هدف یکسانی برای تمام ترکیبات آلوکمیکال در مسیرهای فیزیولوژیکی مشخص نشده، نمی‌توان نحوه عمل واحدی مشابه آنچه در علف‌کش‌های مصنوعی وجود دارد برای آنها متصور شد. مکانیسم آللوپاتی می‌تواند مجموعه‌ای از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیکی ناشی از این ترکیبات باشد (۱۳).

اسانس‌های انیسون، شمعدانی معطر، آویشن دنايي، پونه کوهی، آویشن شیرازی، برازمل، برنجاسف از جمله قوی‌ترین اسانس‌های بازدارنده در این آزمایش بودند. در سایر مطالعات صورت گرفته اثرات حشره‌کشی انیسون و شمعدانی معطر به ویژه در مورد لاروکشی و تخم‌کشی مشاهده شده‌است (۴۷، ۴۵ و ۱۱). اثرات میکروب‌کشی قوی آویشن دنايي و اثر ضد میکروبی، بازدارندگی یا محرک فعالیت آنزیمی و نیز اثرات سمیت برخی ترکیبات موجود در اسانس انیسون مانند استراگول در تحقیقات پیشین گزارش شده‌است (۳۲، ۳ و ۴۱). همچنین اثرات آفت‌کشی بصورت تدخینی اسانس انیسون نیز گزارش شده‌است (۵۴). در مطالعات آللوپاتی سایر پژوهشگران نیز گزارش‌هایی مبنی بر اثرات سمی اسانس آویشن دنايي وجود دارد. نتایج مطالعه صورت گرفته در خصوص اثرات اسانس آویشن دنايي بر جوانه‌زنی تعدادی گونه علف‌هرز نشان دهنده اثرات قوی بازدارندگی این اسانس بود بطوریکه بازدارندگی کامل جوانه‌زنی در غلظت $1 \mu\text{l l}^{-1}$ در مورد یولاف وحشی^۱، و در غلظت $1 \mu\text{l l}^{-1}$ در مورد تاج خروس وحشی^۲ و تاتوره^۳ اتفاق افتاد (۳۱). کاربرد این اسانس به دو صورت خالص و فرموله شده (نانوامولسیون محلول در آب) اثرات آنتی‌باکتریال بر باکتری *E. coli* داشت، به طوریکه ظرف مدت ۵ دقیقه موجب مرگ کامل باکتری شد (۴۱). در پژوهش انجام شده توسط آزیبراک و کارامان (۵)، از بین ترکیبات موجود در اسانس آویشن دنايي تیمول، کارواکرول و کاروون بالاترین اثرات بازدارندگی را در جوانه‌زنی بذر نشان دادند.

شمعدانی معطر، Liliaceae (یک اسانس: موسیر)، Zingiberaceae (یک اسانس: هل سیاه)، Rutaceae (۲ اسانس: برگ لیمو شیرین، سداب) بود، که از بین آنها سه اسانس موجب کاهش این شاخص درحد صفر شدند (سرشاخه گلدار شمعدانی معطر، انیسون، آویشن دنايي). در غلظت ۳ میکرولیتر بیشترین درجه کاهش (کمتر از ۹/۶۵ درصد نسبت به شاهد) مربوط به ۵۰ اسانس از خانواده‌های Apiaceae (۹ اسانس: شوید، زیره سیاه ایرانی، گشنیز، زیره سبز، صمغ انگوزه، میوه رازیانه، گلپر، انیسون، زنیان)، Lamiaceae (۲۲ اسانس: بادرشی، برگ اسطوخودوس، گل اسطوخودوس، بادرنجبویه، نعنا ابلق، پودنه، نعنا فلفلی، پونه‌سای بینالودی، پونه‌سای گربه‌ای، برگ پونه‌کوهی، گل پونه‌کوهی، گل برازمل، برگ رزماری، گل رزماری، مریم‌گلی مزرعه‌روی، مریم‌گلی دارویی، آویشن دنايي، آویشن خزری، آویشن شیرازی، کاکوتی کوهی، کاکوتی، پونه)، Cupressaceae (یک اسانس: توپا آمریکایی) و Asteraceae (۹ اسانس: بومادران خزری، بومادران معمولی، درمنه کوهی، درمنه بیابانی، برنجاسف نقره‌ای، سرشاخه گلدار برنجاسف، درمنه ایرانی، درمنه دشتی، داودی، شاه‌سپریم)، Zingiberaceae (یک اسانس: هل سیاه)، Geraniaceae (۲ اسانس: برگ شمعدانی معطر، سرشاخه گلدار شمعدانی معطر)، Liliaceae (یک اسانس: موسیر)، Myrtaceae (یک اسانس: میخک)، Verbenaceae (یک اسانس: به‌لیمو)، Rutaceae (۲ اسانس: برگ لیمو شیرین، سداب) بود، و از آن بین ۱۶ اسانس موجب به صفر رسیدن شاخص شدند (سرشاخه گلدار شمعدانی معطر، موسیر، هل سیاه، برگ لیمو شیرین، زیره سیاه ایرانی، صمغ انگوزه، انیسون، درمنه دشتی، بادرشی، بادرنجبویه، نعنا ابلق، برگ پونه‌کوهی، آویشن دنايي، آویشن خزری، آویشن شیرازی، کاکوتی).

کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی فضای بالای ویال اسانس

آنالیز هد اسپیس ترکیبات فرار درخصوص ۱۶ اسانس قوی بازدارنده جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه انجام شد (جدول ۲). نتایج کروماتوگرافی گازی نشان داد ترکیباتی نظیر آلفا و بتا پاینن و لیمونن جزء متداول‌ترین ترکیبات غالب فرار در اسانس‌های مورد بررسی بودند. این ترکیبات در اسانس‌های هل سیاه (آلفا و بتا پاینن)، برنجاسف (لیمونن و بتا پاینن)، لیمو شیرین (بتا پاینن و لیمونن)، بادرشی (لیمونن و آلفا پاینن)، نعنا ابلق (لیمونن، آلفا و بتا پاینن)، سداب (آلفا و بتا پاینن)، شاه‌اسپریم (لیمونن)، آویشن خزری (آلفا پاینن)، آویشن شیرازی (آلفا پاینن) و کاکوتی (لیمونن، آلفا و بتا پاینن) در بین ترکیبات غالب فرار مشاهده شدند. پس از آنها اوکالیپتول، توجون، کمفور و بورتول ترکیبات فراری بودند که در اسانس‌های

1- *Avena fatua*

2- *Amaranthus retroflexus*

3- *Datura stramonium*

جدول ۱- ترکیبات غالب موجود در اسانس‌های مورد مطالعه بر اساس نتایج آنالیز GC-MS^۱

Table 2- The main components of essential oils based on HS- GC analysis

نام علمی Scientific name	قسمت مورد استفاده ^a Part of use	ترکیبات غالب اسانس بر اساس آنالیز HS- GC The main components of essential oils based on GC-MS analysis			
<i>Amomum subulatum</i>	Fr	Dihydrocarveol (32.1%)	β -Pinene (23.1%)	α -Pinene (18.4%)	
<i>Anethum graveolens</i>	Fr	1,2-Diisopropenylcyclobutane (74.7%)			
<i>Artemisia ludoviciana</i>	L	Borneol (44.2%)	Camphor (33.3%)	Eucalyptol (22.4%)	
<i>Artemisia vulgaris</i>	F	D-Limonene (33.7%)	Thujone (22.5%)	β -Pinene (14.9%)	
<i>Citrus aurantifolia</i>	L	β -Pinene (20.8%)	Linalyl anthranilate (20.8%)	Linalol (16.2%)	Limonene (11.2%)
<i>Dracocephalum moldavica</i>	Ap	Orthodene (32.6%)	Limonene (20.3%)	α -Pinene (17.4%)	4-Carene (11.3%)
<i>Mentha suaveolens</i>	L	Limonene (47.9%)	α -Pinene (16.7%)	β -Pinene (14.0%)	
<i>Origanum vulgare</i>	L	Carvacrol (44.4%)	Thymol (23.0%)	o-Cymene (18.8%)	
<i>Perovskia abrotanoides</i>	F	Borneol (30.1%)	Eucalyptol (21.9%)	Camphor (11.1%)	
<i>Pimpinella anisum</i>	Fr	Trans- anethole (93.3%)			
<i>Ruta graveolens</i>	L	β -Terpinyl acetate (40.8%)	β -Pinene (16.5%)	α -Pinene (10.7%)	
<i>Tanacetum balsamita</i>	L, F	Limonene (40.2%)	Thujone (21.0%)		
<i>Thymus daenensis</i>	L	Carvacrol (90.9%)			
<i>Thymus transcaspicus</i>	L	Camphene (23.0%)	α -Pinene (11.0%)		
<i>Zataria multiflora</i>	L,F	o-Cymene (22.7%)	α -Pinene (22.1%)	Thymol (20.4%)	
<i>Ziziphora tenuior</i>	L	β -Pinene (24.2%)	α -Pinene (21.4%)	Limonene (20.6%)	

a: قسمت مورد استفاده گیاه به منظور استخراج اسانس: Ap (کل اندام هوایی)، C (کورم)، F (گل)، Fr (میوه)، Fp (پوست میوه)، L (برگ)، S (ساقه)، O (اولنوگام)، Rh (ریزوم)، R (ریشه)
a: Part of use for extraction of essential oils: Ap (Aerial part), C (Corm), F (Flower), Fr (Fruit), Fp (Fruit peel), L (Leaf), S (Stem), O (Oleogum), Rh (Rhizome), R (Root)

اثرات آللوپاتیک برگ آویشن شیرازی در روش ساندویچ نیز گزارش شده‌است (۴). در مطالعات آللوپاتی سایر پژوهشگران نیز گزارش‌هایی مبنی بر اثرات آللوپاتیک و سمیت گیاه برازمبل وجود دارد. بطوریکه در پژوهش امینی و همکاران (۴)، گل برازمبل در بین گیاهان آللوپات مورد مطالعه یکی از مؤثرترین گیاهان بازدارنده رشد گیاهچه کاهو به روش ساندویچ بود. همچنین آنها دریافته بودند گل برازمبل در روش دیش پک نیز اثر بازدارندگی بیش از ۸۰ درصد بر رشد ریشه‌چه کاهو دارد که بر اساس روش آزمایش، این تاثیر ناشی از ترکیبات فرار موجود در آن می‌باشد (۳). بر اساس نتایج بدست آمده در سایر پژوهش‌ها بسیاری از گونه‌های علفی جنس آرتمیزیا حاوی ترکیبات فعالی هستند که اثرات آللوپاتیک و ضدقارچی دارند. ترکیبات آللوکمیکال موجود در این جنس عمدتاً از نوع ترکیبات فرار اتری و آلکالوئیدها می‌باشد. اثرات آللوپاتیک جنس آرتمیزیا به گونه‌ای است که در غلظت‌های پایین موجب کمی تحریک و افزایش رشد می‌شود و در غلظت‌های بالاتر موجب توقف و کاهش رشد می‌گردد (۲). اثرات

بر اساس سایر پژوهش‌ها انیسون اثر بازدارندگی قابل توجهی بر جلوگیری از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه سوروف^۲ داشت (۴۸) و در مطالعه دیگر تنها در غلظت بالا در جلوگیری از جوانه‌زنی مؤثر بود اما در غلظت‌های کم اثر بازدارندگی بر جوانه‌زنی بذور علف هرز مورد مطالعه نداشت (۵). در خصوص اثرات آللوپاتیک و سمی پونه کوهی، سایر پژوهش‌ها نشان داده‌اند اسانس این گیاه اثرات قوی ضدقارچی بر طیف گسترده‌ای از قارچ‌ها داشت (۵۶). نوعی مرزنگوش وحشی نیز به طور کامل موجب توقف رشد ۱۷ گونه قارچ شد (۳۵). بر اساس سایر پژوهش‌ها آویشن شیرازی موجب کاهش معنی‌دار سرعت جوانه‌زنی، طول گیاهچه، وزن ریشه و ساقه شد. در پژوهش دیگری اثرات ضدقارچی اسانس آویشن شیرازی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده توقف کامل رشد قارچ در اثر این اسانس بود و اثرات قوی تری در مقایسه با نعنا فلفلی و آویشن باغی داشت (۱).

1- Headspace

2- *Echinochloa crus-galli*

بنابر آنچه ذکر شد بطور کلی نتایج این آزمایش در بسیاری از موارد در تایید نتایج سایر پژوهشگران می‌باشد ولی در برخی موارد سایر پژوهش‌ها نتایج متفاوتی در خصوص اثرات بازدارنده اسانس‌ها و یا ترکیبات آنها ارائه داده‌اند. تفاوت‌های موجود در نتایج برخی از سایر پژوهش‌ها با نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، دلایل مختلفی ممکن است داشته باشد. در اغلب موارد گیاهان مورد آزمون در مطالعات متفاوت بودند و غالباً از بذر گونه‌های مختلف علف هرز استفاده شده در حالیکه در این آزمایش از گیاه کاهو برای آزمون زیست‌سنجی استفاده شد که بعنوان گیاهی با حساسیت بسیار بالا در برابر ترکیبات آلوپات نسبت به سایر گیاهان نشان‌گر و معیار دقیق‌تر و بهتری برای تعیین اثرات بازدارندگی به شمار می‌رود. مورد دیگر روش آزمایش است که در مطالعه سایر پژوهشگران عمدتاً از روش‌های رقت‌سازی و خیساندن بذر در محلول استفاده شده و روش این آزمایش کاربرد اسانس بصورت تدخینی بود، که شاید این مساله علت تفاوت در نتایج باشد. در نهایت علت دیگری که می‌تواند باعث اختلاف در نتایج اثرات سمی اسانس یک گیاه باشد عواملی مانند اندام گیاهی مورد استفاده برای اسانس‌گیری، فصل برداشت گیاه و همچنین تنوع تیپ‌های شیمیایی^۵ موجود در یک گیاه است که موجب تفاوت ترکیبات غالب موجود در اسانس آن می‌شود.

در نتایج بدست آمده در خصوص بازدارندگی رشد گیاهچه و قسمت‌های مختلف آن نکته‌ای قابل توجه است و آن اینکه به غیر از اسانس گل پونه‌کوهی و گل برازمل که موجب بازدارندگی رشد هر دو قسمت ریشه‌چه و هیپوکوتیل شدند، سایر اسانس‌ها اثرات بازدارندگی یکسان بر دو قسمت گیاهچه نداشتند. بطوری‌که اسانس‌های موسیر، اسطوخودوس و شمعدانی معطر اثر بیشتری بر کاهش رشد هیپوکوتیل داشتند و اسانس‌های برنجاسف نقره‌ای، مریم‌گلی دارویی و انیسون بر ایجاد اختلال در رشد ریشه‌چه مؤثرتر بودند. مطالعات سایر پژوهشگران نشان داده است که اثرات مونوترپن‌ها بر رشد یا مهار رشد بافت‌های گیاهی بستگی به میزان تمرکز آنها در بافت‌ها دارد. این تفاوت در محل اثر دلایل مختلفی ممکن است داشته باشد از جمله اثرات بیوشیمیایی متفاوت بر سنتز پروتئین‌ها و تغییرات آنزیمی (۲۰ و ۲۹)، و اثرات متفاوت در بازدارندگی میتوز در ریشه و ساقه (۱۵). مکانیسم‌های مختلفی نیز برای انواع ترکیبات فرار گزارش شده است از جمله اینکه آنها مانند ترکیبات سمی اثر می‌گذارند و باعث مهار فتوسنتز تنفس و تنفس می‌شوند (۴۶)، کاهش نفوذپذیری غشاء سلولی (۴۲)، القای لیپید پراکسیداسیون (۵۹)، یا دخالت در عملکرد فیتوهورمون‌ها را موجب شوند (۱۹، ۲۶ و ۴۹). ایجاد اختلال در هورمون‌های گیاهی هر اسانس با توجه به ترکیباتی که دارد ممکن است متفاوت باشد که

آلوپاتی برنجاسف نقره‌ای نیز در پژوهشی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد حدود ۳۰ درصد اثر بازدارندگی بر رشد گیاه گل گندم داشت (۵۵). همچنین اسانس این گیاه اثرات ضدباکتریایی دارد و در غلظت $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ موجب توقف رشد برخی گونه‌های میکروارگانیزم شد (۱).

بر اساس مطالعه دودای و همکاران (۱۴) مونوترپن‌ها در غلظت بسیار کم می‌توانند بر بذور اثر بگذارند. پاپین‌ها مونوترپن‌های دو حلقه ای اکسیژن‌دار هستند که در آب نامحلول بوده و بسیار فرار می‌باشند و اثرات آلوپاتیکی آنها در محیط و اثرات دورکنندگی حشرات گزارش شده است (۳۳ و ۱۲). لیمونن نیز از مونوترپن‌های آلیفاتیک و دارای حلقه است که اثرات آفت‌کشی، ضد میکروبی و سمیت آن گزارش شده است (۲۳). اوکالیپتول نیز یکی دیگر از مونوترپن‌های حلقه‌ای اتری است که اثرات حشره‌کشی و دورکننده حشرات دارد و دوز کشندگی آن برای رت ۲۴۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است (۵۱ و ۳۳). بر اساس مطالعات صورت گرفته اوکالیپتول اثرات قوی بازدارندگی رشد بر روی گیاهان دارد که با تاثیر بر فعالیت آنزیم آسپاراژین سینتاز موجب این عمل می‌شود و بدین ترتیب جزء ترکیبات مهم آلوکمیکیل به حساب می‌آید (۵۷). ترانس آنتول ترکیبی از گروه فینیل پروپانئوئیدها است که بر روی برخی حشرات اثرات سمی اثبات شده دارد (۳۷). همچنین این ترکیب فعالیت ضدقارچی قوی نیز در خصوص طیف وسیعی از قارچ‌ها نشان داده‌است اما در غلظت‌های مورد مطالعه بر بازدارندگی جوانه‌زنی بذر برخی گونه‌ها از جمله چچم^۱ و نخود^۲ هیچ اثر معنی‌داری نداشته‌است و اثرات سمی برای آن گزارش نشده‌است (۲۲ و ۵۲). اثرات قوی ضدقارچی پونه کوهی را به وجود ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول نسبت داده‌اند (۵۶). اثرات ضدقارچی تیمول و کارواکرول موجود در اسانس مرزنگوش وحشی بیشتر از بنومیل بود، ولی پارا سایمن اثرات ضدقارچی کمتری داشت. همچنین کارواکرول و تیمول اثرات بازدارندگی جوانه‌زنی بر روی چند گونه گیاهی داشتند، در صورتیکه پاراسایمن هیچ گونه اثر سمی نشان نداد (۳۵). ترکیبات غالب اسانس پونه‌کوهی تأثیر معنی‌داری بر کاهش رشد اختصاصی سلول‌های سرطانی داشتند، همینطور این اسانس اثرات آنتی‌باکتریال قوی و سمیت متوسط نشان داد (۵۵). بورنئول از دسته ترکیبات مونوترپن با ماهیت الکلی است. گزارشاتی مبنی بر تأثیرات بازدارندگی این ترکیب بر جوانه‌زنی (۸٪) و رشد ریشه‌چه (۴۷٪) علف ساقه آبی کوچک^۳ وجود دارد در حالی‌که بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه لپتوکلوا^۴ تأثیری نداشت (۱۷).

- 1- *Lolium multiflorum*
- 2- *Cicer arietinum*
- 3- *Schizachyrium scoparium*
- 4- *Leptochloa dubia*

نتایج این پژوهش نشان داد اسانس گونه‌های دارویی و معطر نسبت به جوانه‌زنی و رشد گیاهچه کاهو دارای سمیت بالایی بودند. علاوه بر بازدارندگی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه، اثراتی مانند ایجاد رکود در بذر، مرگ جنین و یا ایجاد تأخیر در جوانه‌زنی نیز در تیمار با اسانس مشاهده شد. در مطالعات غربالگری آللوپاتی به دلیل تعداد زیاد گیاهان یا ترکیبات آللوپات مورد بررسی معمولاً چنین صفاتی کمتر مورد توجه قرار می‌گیرند، در حالیکه می‌توانند نقش بسیار مهمی در کنترل رشد داشته باشند و صفات ارزشمندی در خصوص مبارزه با علف‌های هرز و استقرار آن به حساب می‌آیند. تحقیقات بیشتری در آینده لازم است صورت گیرد تا ترکیبات مسئول فعالیت آللوپاتی در این گیاهان شناسایی شوند و نقش‌های بیولوژیکی این ترکیبات در اکوسیستم‌های طبیعی بهتر مشخص شود. چنین اطلاعاتی می‌تواند دیدگاه وسیع‌تری برای محققان در مورد تولید مواد شیمیایی جدید زیست فعال از محصولات طبیعی فراهم کند. شناسایی گیاهان و ترکیبات آللوپات و آگاهی از عملکردهای بیولوژیکی آنها برای کنترل بیولوژیکی انواع علف‌های هرز در کشاورزی و نیز گونه‌هایی که می‌توانند بر روی پروژه‌های جنگلداری تأثیر منفی بگذارد بسیار حائز اهمیت است.

منجر به تفاوت در نتیجه می‌شود. نکته دیگر قابل توجه در این آزمایش اثر گاه متفاوت اسانس قسمت‌های مختلف یک گیاه بود. در این آزمایش در خصوص ۱۱ گیاه (برنجاسف، لیمو شیرین، سرو نقره‌ای، رازیانه، ارس خزنده، اسطوخودوس، پونه‌کوهی، شمعدانی معطر، برازمل، کاج تهران و رزماری) اسانس از دو قسمت مختلف تهیه شد که در برخی موارد اثرات متفاوتی داشتند. در خصوص تفاوت بین اسانس گل و برگ، با توجه به نتایج، تأثیر بازدارندگی بر صفات جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در برازمل، برنجاسف و اسطوخودوس در اسانس گل بیشتر از اسانس برگ بود و در شمعدانی معطر و رزماری تفاوتی نداشت و در پونه‌کوهی اثر اسانس برگ بیشتر از گل بود. در خصوص تفاوت بین اسانس برگ و میوه بر بازدارندگی جوانه‌زنی، اثر اسانس برگ در لیمو شیرین، رازیانه و سرو نقره‌ای بیشتر از اثر اسانس میوه بود و در ارس خزنده تفاوتی نداشت؛ و در مورد تفاوت آنها بر بازدارندگی رشد، در ارس خزنده و سرو نقره‌ای اثر اسانس برگ بیشتر از میوه بود، در رازیانه اثر اسانس میوه بیشتر از برگ بود و در لیمو شیرین تفاوتی وجود نداشت. در خصوص تفاوت بین اثر اسانس اولئوگام و برگ در کاج تهران، اسانس برگ در جوانه‌زنی و اسانس اولئوگام در رشد اثرات بازدارندگی بیشتری نشان دادند.

منابع

- 1- Abad M.J., Bedoya L.M., Apaza L., and Bermejo P. 2012. The *Artemisia* L. genus: A review of bioactive essential oils. *Molecules* 17(3): 2542–2566.
- 2- Alonso-Amelot M.E. 2016. Multitargeted Bioactive Materials of Plants in the *Curcuma* Genus and Related Compounds: Recent Advances. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., pp 111–200.
- 3- Amini S., Azizi M., Joharchi M.R., Shafei M.N., Moradinezhad F., and Fujii Y. 2014. Determination of allelopathic potential in some medicinal and wild plant species of Iran by dish pack method. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 26 (3–4): 189–199.
- 4- Amini S., Azizi M., Joharchi M.R., and Moradinezhad F. 2016. Evaluation of allelopathic activity of 68 medicinal and wild plant species of Iran by Sandwich method. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 3(2): 243–253.
- 5- Azirak S., and Karaman S. 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* 58(1): 88–92.
- 6- Azizi M., and Fujii Y. 2006. Allelopathic effect of some medicinal plant substances on seed germination of *Amaranthus retroflexus* and *Portulaca oleraceae*. *Acta Horticulturae* 699: 61–67.
- 7- Azizi M., Farzad S., Jafarpour B., Rastegar M.F., and Jahanbakhsh V. 2008. Inhibitory effect of some medicinal plants' essential oils on postharvest fungal disease of *Citrus* fruits. *Acta Horticulturae* 768: 279–286.
- 8- Azizi M., Amini S., Joharchi M.R., Oroojalian F., and Baghestani Z. 2009. Genetic resources for allelopathic and medicinal plants from traditional Persian experience. MARCO symposium, Tsukuba, Japan, (January): 5–7.
- 9- Batish D.R., Arora K., Singh H.P., and Kohli R.K. 2007. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. *Crop Protection* 26(4): 566–571.
- 10- Batish D.R., Kaur M., Singh H.P., and Kohli R.K. 2007. Phytotoxicity of a medicinal plant, *Anisomeles indica*, against *Phalaris minor* and its potential use as natural herbicide in wheat fields. *Crop Protection* 26(7): 948–952.
- 11- Benelli G., Pavela R., Canale A., Cianfaglione K., Ciaschetti G., Conti F., Nicoletti M., Senthil-Nathan S., Mehlhorn H., and Maggi F. 2017. Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitology International* 66(2): 166–171.
- 12- Chowhan N., Singh H.P., Batish D.R., and Kohli R.K. 2011. Phytotoxic effects of β -pinene on early growth and

- associated biochemical changes in rice. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(6): 2369–2376.
- 13- Cristian B. 2009. Allelopathic aspects in the perennial, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Banat Timisoara. PhD Thesis.
 - 14- Dudai N., Larkov O., Putievsky E., Lerner H.R., Ravid U., Lewinsohn E., and Mayer A.M. 2000. Biotransformation of constituents of essential oils by germinating wheat seed. *Phytochemistry* 55(5): 375–382.
 - 15- Einhellig F.A. 1994. Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy., pp 96–116.
 - 16- Fetouh M.I., and Hassan F.A. 2014. Seed germination criteria and seedling characteristics of *Magnolia grandiflora* L. trees after cold stratification treatments. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(3): 235–241.
 - 17- Fischer N.H., Williamson G.B., Tanrisever N., de la Pena A., Weidenhamer J.D., Jordan E.D., and Richardson D.R. 1989. Allelopathic actions in the Florida scrub community. *Biologia Plantarum* 31(6): 471–478.
 - 18- Foy C.L. 2001. Understanding the Role of Allelopathy in Weed Interference and Declining Plant Diversity 1. *Weed Technology* 15(4): 873–878.
 - 19- Graña E., Sotelo T., Díaz-Tielas C., Araniti F., Krasuska U., Bogatek R., Reigosa M.J., and Sánchez-Moreiras A.M. 2013. Citral Induces Auxin and Ethylene-Mediated Malformations and Arrests Cell Division in *Arabidopsis thaliana* Roots. *Journal of Chemical Ecology* 39(2): 271–282.
 - 20- Grodzinsky A.M. 1989. General and specific mechanisms of biochemical interactions between plants. *Biologia Plantarum* 31(6): 448–457.
 - 21- Heap I., Peterson M., and Horak M. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Available at: <http://www.weedscience.org> (accessed 16 September 2019).
 - 22- Ibáñez M., and Blázquez M. 2018. Phytotoxicity of essential oils on selected weeds: potential hazard on food crops. *Plants* 7(4): 79.
 - 23- Ibrahim M.A., Kainulainen P., Aflatuni A., Tiilikkala K., and Holopainen J.K. 2001. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and Food Science in Finland* 10(3): 243–259.
 - 24- Inderijt. 2005. Soil microorganisms: An important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil* 274: 227–236.
 - 25- Inderijt and Keating K.I. 1999. Allelopathy: Principles, Procedures, Processes, and Promises for Biological Control. *Advances in Agronomy* 67(C): 141–231.
 - 26- Ishii-Iwamoto E.L., Pergo Coelho E.M., Reis B., Moscheta I.S., and Moacir Bonato C. 2012. Effects of Monoterpenes on Physiological Processes During Seed Germination and Seedling Growth. *Current Bioactive Compounds* 8(1): 50–64.
 - 27- Jabran K. 2017. Allelopathy: Introduction and Concepts., Springer, Cham, pp 1–12.
 - 28- Jalaei Z., Fattahi M., and Aramideh S. 2015. Allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. from Iran: A new chemotype with highest limonene-10-al and limonene. *Industrial Crops and Products* 73: 109–117.
 - 29- Jerônimo C., and Borghetti F. Allelopathic effect of *Solanum lycocarpum* leaf extract on protein synthesis in sesame seedlings. *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy*, eds. JDI Harper, M. An, H. Wu and JH Kent, Charles Sturt University, Wagga Wagga, NSW, Australia. 2005., Australia.
 - 30- Journet A.R.P., and Etherington J.R. 2006. *Plant Physiological Ecology*. The Bryologist 82(3): 508.
 - 31- Kashkooli A.B., and Saharkhiz M.J. 2014. Essential Oil Compositions and Natural Herbicide Activity of Four *Denaei* Thyme (*Thymus daenensis* Celak.) Ecotypes. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 17(5): 859–874.
 - 32- Khalil N., Ashour M., Fikry S., Singab A.N., and Salama O. 2018. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected Apiaceous fruits. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(1): 88–92.
 - 33- Klocke J.A., Darlington M.V., and Balandrin M.F. 1987. 1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). *Journal of Chemical Ecology* 13(12): 2131–2141.
 - 34- Kordali S., Cakir A., Akcin T. A., Mete E., Akcin A., Aydin T., and Kilic H. 2009. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products* 29 (2–3): 562–570.
 - 35- Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M., and Mete E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology* 99 (18): 8788–8795.
 - 36- Leist N., Krämer S., and Jonitz A. 2003. ISTA working sheets on tetrazolium testing. *International Seed Testing Association*.
 - 37- Mander L., and Liu H. 2010. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology Development Modification of Bioactivity*. Vol. 1. Elsevier.
 - 38- Mardani H., Maninang J., Appiah K.S., Oikawa Y., Azizi M., and Fujii Y. 2019. Evaluation of biological response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and weeds to safranal allelochemical of saffron (*Crocus sativus*) by using static

- exposure method. *Molecules* 24(9): 1–14.
- 39- Mardani H., Kazantseva E., Onipchenko V., and Fujii Y. 2016. Evaluation of allelopathic activity of 178 Caucasian plant species. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 5(1): 75.
- 40- Mishyna M., Laman N., Prokhorov V., Maninang J.S., and Fujii Y. 2015. Identification of Octanal as Plant Growth Inhibitory Volatile Compound Released from *Heracleum sosnowskyi* Fruit. *NPC Natural Product Communications* 10(5): 771–774.
- 41- Moghimi R., Ghaderi L., Rafati H., Aliahmadi A., and McClements D.J. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry* 194: 410–415.
- 42- Muller W.H., Lorber P., Haley B., and Johnson K. 1969. Volatile Growth Inhibitors Produced by *Salvia leucophylla*: Effect on Oxygen Uptake by Mitochondrial Suspensions. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 96(1): 89.
- 43- Nerio L.S., Olivero-Verbel J., and Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101(1): 372–378.
- 44- Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M., and Bassami M.R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry* 120(3): 765–770.
- 45- Park I.K., Choi K.S., Kim D.H., Choi I.H., Kim L.S., Bak W.C., Choi J.W., and Shin S.C. 2006. Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science* 62(8): 723–728.
- 46- Pauly G., Douce R., and Carde J.P. 1981. Effects of β -Pinene on Spinach Chloroplast Photosynthesis. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 104(3): 199–206.
- 47- Prajapati V., Tripathi A.K., Aggarwal K.K., and Khanuja S.P.S. 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology* 96(16): 1749–1757.
- 48- Ravlic M., Balicevic R., Nikolic M., and Sarajlic A. 2016. Assessment of allelopathic potential of fennel, rue and sage on weed species hoary cress (*Lepidium draba*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 44(1): 48–52.
- 49- Rentzsch S., Podzimská D., Voegelé A., Imbeck M., Müller K., Linkies A., and Leubner-Metzger G. 2012. Dose- and tissue-specific interaction of monoterpenes with the gibberellin-mediated release of potato tuber bud dormancy, sprout growth and induction of α -amylases and β -amylases. *Planta* 235(1): 137–151.
- 50- Rice E.L. 1984. Allelopathy. Elsevier Science.
- 51- Sfara V., Zerba E.N., and Alzogaray R.A. 2009. Fumigant Insecticidal Activity and Repellent Effect of Five Essential Oils and Seven Monoterpenes on First-Instar Nymphs of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Medical Entomology* 46(3): 511–515.
- 52- Sharma P.K., Raina A.P., and Dureja P. 2009. Evaluation of the antifungal and phytotoxic effects of various essential oils against *Sclerotium rolfsii* (Sacc) and *Rhizoctonia bataticola* (Taub). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42(1): 65–72.
- 53- Sihoglu Tepe A., and Tepe B. 2015. Traditional use, biological activity potential and toxicity of *Pimpinella* species. *Industrial Crops and Products* 69: 153–166.
- 54- Tu X.F., Hu F., Thakur K., Li X.L., Zhang Y.S., and Wei Z.J. 2018. Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. *Industrial Crops and Products* 124: 192–200.
- 55- Vivano J.M., Paschke M.W., and Callaway R. 2010. Allelochemical Control of Non-Indigenous Invasive Plant Species Affecting Military Testing and Training Activities. *Colorado State Univ Fort Collins*.
- 56- Wogiatzi E., Gougoulas N., Papachatzis A., Vagelas I., and Chouliaras N. 2009. Greek oregano essential oils production, phytotoxicity and antifungal activity. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 23(1): 1150–1152.
- 57- Yoneyama K., and Natsume M. 2010. Allelochemicals for Plant–Plant and Plant–Microbe Interactions. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 4 (August): 539–561.
- 58- Zimdahl R.L. 2018. *Fundamentals of Weed Science*. 5th ed. Academic Press.: San Diego.
- 59- Zunino M.P., and Zygadlo J.A. 2004. Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta* 219(2): 303–309.

Effects of Essential Oil of some Medicinal Plants on Seed Germination and Seedling Growth of Lettuce as an Indicator

S. Mirmostafae¹- M. Azizi^{*2}- Y. Fujii³

Received: 25-09-2019

Accepted: 30-12-2019

Introduction: Nowadays, the global effort in modern agriculture is to reduce the use of harmful herbicides and introduce new methods of weed control, one of which is the use of allelopathic properties. Among allelopathic species, aromatic plants have the ability to transmit allelochemical constituents as essential oils through diffusion and thus affect their surrounding organisms. Since the use of essential oils and volatile compounds will not have residues on the crop, these allelopathic compounds can be very effective in preventing weed growth before and after crop cultivation. Studies have shown that some essential oils or their components effectively reduce plant growth. This study was aimed to identify novel allelopathic species and their inhibitory compounds.

Materials and Methods: Plant samples consisting of 112 different plant organs including root, rhizome, corm, stem, leaf, flower, fruit, fruit peel, aerial part, and plant exudate such as oleogum belonging to 97 aromatic species from 16 different plant families were collected from different areas of Iran. The essential oils were extracted by water distillation using Clevenger. The oils were then dehydrated in glass containers with anhydrous sodium sulfate and stored at 4 °C during the experiment. The study was conducted in two separate experiments on germination and seedling growth, and lettuce was used as the test plant. The effect of 112 essential oils at two concentrations of 1 and 3 µL was investigated. The factorial experiments were conducted in completely randomized design with four replicates. Allelopathic effects of volatile compounds were evaluated by cotton swab method. The traits related to germination including Germination percentage (G%), Mean Germination Time (MGT), percentage of seed Dormancy induction (D%), percentage of embryo death as Lethal effect (L%), and seedling growth traits consist of Hypocotyl (H), Radicle (R), and Vigor Index (VI) were studied. The components of the strongest allelopathic essential oils were analyzed by headspace gas chromatography and mass spectrometry.

Result and Discussion: The results showed significant inhibitory effects of essential oils even on 1 µl concentration on the studied traits. The essential oils of *Pelargonium graveolens*, *Pimpinella anisum* and *Thymus daenensis* had the greatest inhibitory effect on G% (100% inhibitory); and the essential oils of *Amomum subulatum*, *Atrémisia sieberi*, *Dracocephalum moldavica* and *Thymus transcaspicus* had the highest effect on MGT (more than 224%). The essential oils of *Ziziphora tenuior*, *Pimpinella anisum*, and *Pelargonium graveolens* caused the highest seed dormancy (more than 22%). The essential oil of *Pimpinella anisum* and *Thymus daenensis* caused the highest percentage of embryo death (100% lethality). According to seedling growth, the essential oils of *Pimpinella anisum*, *Origanum vulgare*, *Perovskia abrotanoides* and *Thymus daenensis* resulted in the highest inhibition of hypocotyl (more than 92%). *Thymus daenensis* and *Origanum vulgare* essential oil exhibited the greatest effect on decreasing radicle growth (more than 97%). Overall, the essential oils of Anise, Oregano, Russian Sage and “Denae” Thyme were the most inhibitors of seedling growth. Finally, with respect to germination and seedling growth percentages, 25 essential oils mainly from the Lamiaceae family (12 essential oils), and some other families e.g. Asteraceae (4 essential oils), Apiaceae (3 essential oils), Rutaceae and Geraniaceae (2 essential oil), Liliaceae and Zingiberaceae (1 essential oil) had the greatest inhibitory effect on the Vigor index. According to the results of the headspace gas chromatography, compounds such as borneol, eucalyptol, limonene, alpha and beta-pinene, carvacrol, and camphene were the dominant compounds in essential oils with severe inhibitory effects. Other studies have also reported phytotoxic, antibacterial, antifungal, and pesticidal effects of some of these compounds, scant literature is, however, available on the allelopathic effects of some other ones.

Conclusion: Our results showed that the essential oils of medicinal and aromatic species were highly toxic to lettuce. In addition to inhibition of germination percentage and seedling growth, traits such as seed dormancy induction, embryo death and delayed germination were also affected by essential oils. In allelopathic researches,

1 and 2- Ph.D. Student of Medicinal Plants and Professor, Department of Horticulture and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.

(*- Corresponding Author Email: azizi@um.ac.ir)

3- Professor, Department of International Environmental and Agricultural Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo, Japan

such traits are often overlooked, while they can play an important role in growth inhibition and are valuable traits for weed control. Further research is needed to identify the compounds responsible for allelopathic activity in these plants essential oils and to understand the biological roles of these compounds in natural ecosystems. Such information could provide a broader perspective for researchers on the production of new bioactive chemicals from natural products. Identification of allelopathic plants and compounds, and their biological functions are important for the biological control of weeds in organic agriculture as well as species that can adversely affect forestry projects.

Keywords: Allelochemical, Cotton swab, Headspace, Medicinal plants, Phytotoxicity, Volatile compound