نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، ص. ۳۴۵-۳۳۸

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 3, Fall 2014, P. 338-345

بررسی فعالیت نماتدکشی اسانس‌های اکالیپتوس، کما و باریجه روی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه

فاطمه خیاط[۱]- عصمت مهدیخانی مقدم[۲*]- حمید روحانی[۳]- مجید عزیزی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۱

چکیده

نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.)، گروهی از نماتدهای انگل گیاهی هستند که به لحاظ خسارتی که به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند از اهمیت زیادی برخوردارند. طی چند دهه اخیر، تحقیقات زیادی روی ترکیبات گیاهی به منظور دستیابی به جایگزین‌های بی خطر و موثرتر از حشره‌کش‌های شیمیایی برای کنترل نماتدها صورت پذیرفته است. در این تحقیق، قابلیت اسانس اکالیپتوس (*Ecalyptus* spp.)، کما (*Dorema ammoniacum*) و باریجه (*Ferula galbanifula*) در کنترل نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne javanica*) مورد آزمایش قرار گرفت .اسانس‌ها با استفاده از دستگاه کلونجر، به روش تقطیر با آب تهیه شدند. از هر اسانس، پنج غلظت در سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که میزان بازدارندگی از تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دوم، با غلظت اسانس‌ها رابطه مستقیم دارد. اسانس اکالیپتوس با LC_{50} معادل ۸۳۹ پی‌پی‌ام و ۲۱۲۲ پی‌پی‌ام به ترتیب علیه لارو سن دوم و تخم ، موثرتر از سایر اسانس‌های مورد مطالعه بود. در بالاترین غلظت مورد آزمایش (۴۰۰۰ پی‌پی‌ام) ، میزان بازدارندگی از تفریخ تخم در اثر اسانس‌های اکالیپتوس، کما و باریجه به ترتیب ۹۸/۵، ۹۳/۹ و ۹۰/۳ درصد و میزان کشندگی لارو سن دوم به ترتیب ۹۸/۸، ۶۶/۷ و ۵۸/۷ درصد محاسبه گردید. نتایج این بررسی نشان دهنده پتانسیل بالای اسانس اکالیپتوس در کنترل نماتد ریشه گرهی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، اکالیپتوس، باریجه، فعالیت نماتدکشی، کما، نماتد ریشه گرهی

مقدمه

نماتدهای ریشه گرهی یکی از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی بوده که دامنه میزبانی وسیع داشته و بسیاری از گیاهان را در شرایط اکولوژیکی مختلف مورد حمله قرار می‌دهند و محدود کننده کیفیت و میزان قابلیت تولیدات کشاورزی می‌باشند. میزان خسارت وارده به محصولات زراعی توسط این نماتدها حدود ۳۰ درصد گزارش شده است (۲). خسارت این نماتدها هم به طور مستقیم در اثر تغذیه نماتد از بافت‌های گیاهی و هم به صورت غیر مستقیم در اثر برهم کنش نماتد با پاتوژن‌های خاکزی است.

نماتدهای ریشه گرهی، انگل داخلی ساکن بوده و رابطه تغذیه‌ای با میزبان خود برقرار کرده و آن را وادار به تولید ساختارهای تغذیه‌ای تخصص یافته‌ای به نام سلول‌های غول‌آسا[5] می‌کنند که برای تغذیه و رشد نماتد ضروری می‌باشد (۲۱). خسارت‌های مستقیم و غیر مستقیمی که توسط این نماتدها به گیاه وارد می‌شود به میزان قابل توجهی موجب محدود شدن کیفیت و کمیت تولیدات کشاورزی می‌شود به طوریکه موجب طراحی پروژه بین المللی نماتدهای ریشه‌گرهی[6] گردید (۲۴). این نماتدها ممکن است روی گیاه گوجه‌فرنگی ۲۴ تا ۳۸درصد خسارت وارد کنند. خسارت نماتد در زمینی که کاشت مداوم محصولات حساس صورت گیرد بیشتر خواهد بود و در صورت عدم کنترل مؤثر، موجب از بین رفتن کل محصول می‌شوند (۱۴). حسینی نژاد در بررسی‌های انجام شده، میزان خسارت نماتد *Meloidogyne javanica* را به محصول گوجه‌فرنگی ۵۰ درصد اعلام نمود (۱).

نماتدهای بیماریزا با روش‌های معمول زراعی و شیمیایی کنترل می‌شوند. استفاده از این روش‌ها به خاطر هزینه بالا، اثر ناقص و غیر

۱، ۲ و۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: Email: mahdikhani-e @ ferdowsi.um.ac.ir)
۴- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

5- Giant cells
6- International Meloidogyne Project(IMP)

اختصاصی بودن نسبتاً محدود شده است (۶). روش‌های مدیریتی دیگر، شامل تلفیق گیاهان هم ستیز[1]، عوامل کنترل بیولوژیک، کودهای شیمیایی، ترکیبات طبیعی گیاهی و اصلاح کننده‌های آلی در خاک می‌باشد. با توجه به این که اغلب روش‌های کنترل، کارآیی لازم را نداشته و یا در بعضی موارد نظیر مبارزه شیمیایی برای سلامتی انسان‌ها و محیط زیست مضر شناخته شده‌اند، استفاده از ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه گیاهی به دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی چون مکانیسم عمل اختصاصی، طیف اثر محدود و قابلیت تجزیه به متابولیت‌های غیر سمی به عنوان بهترین استراتژی جایگزین برای کنترل نماتدها مطرح گردیده است (۱۵). این ترکیبات، تولیدات متابولیکی ثانویه هستند که در متابولیسم اولیه درگیر نمی‌شوند و در پدیده دفاع گیاه شرکت می‌کنند (۲۷). در حالی که نقش دقیق ترکیبات هنوز به درستی مشخص نیست، اما به‌طور کلی برخی از این ترکیبات به تنهایی یا به‌صورت سینرژیکی، نوعی سد دفاعی شیمیایی برای گیاه در برابر آفات و بیماری‌ها ایجاد می‌کنند. این سد دفاعی عموما موجب مرگ فوری پاتوژن‌ها و حشرات نمی‌شود، بلکه روی فعالیت‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آن‌ها تأثیر می‌گذارد (۱۱ و ۱۶). گیاهان خانواده چتریان از جمله گیاهان اسانس داری هستند که خواص نماتدکشی آن‌ها مطالعه شده است (۳، ۴، ۷، ۸ و ۱۸). بر اساس گزارش صادقی و همکاران (۳ و ۴) اسانس گیاهان زیره سیاه (*Bunium persicum*)، زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، زنیان (*Carum copticum*) و رازیانه (*Foeniculum vulgare*) سمیت قابل توجهی روی نماتد ریشه گرهی در شرایط آزمایشگاه داشته اند. طبق گزارش سانگوان و همکاران (۲۳) اسانس دوگونه گیاهی *Callistemon lanceolatus* و میخک هندی *Eugenia caryophyllata* روی لاروهای نماتد ریشه گرهی و نماتد مرکبات *Tylenchulus semipenetrans* اثر کنترل کننده داشتند. اُکا و همکاران (۱۸) ضمن بررسی اثر نماتدکشی اسانسها و ترکیبات حاصل از ۲۷ گونه گیاهی روی نماتد ریشه گرهی گونه *M. javanica* بالاترین اثر نماتدکشی در شرایط آزمایشگاهی را ، در اسانس رازیانه و زنیان از خانواده چتریان مشاهده کردند.

در این تحقیق، اثرات اسانس گیاهان دارویی اکالیپتوس (*Ecalyptus* spp.)، کما (*Dorema ammoniacum*) و باریجه (*Ferula galbanifula*) متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) بر میزان تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تکثیر نماتد

ریشه‌های آلوده به نماتد ریشه گرهی در تابستان ۱۳۸۸ از مزارع گوجه فرنگی استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از تک توده تخم، تکثیر نماتدها در گلخانه انجام شد. جهت تکثیر نماتد، گوجه‌فرنگی رقم Early urbana VF (حساس به نماتد) استفاده شد. نماتدها روی نشای گوجه فرنگی در گلخانه و تحت شرایط دمایی ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ ساعت روشنایی تکثیر یافت. پس از گذشت دو ماه، ریشه‌های آلوده از گلدآن‌ها خارج و براساس الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها و خصوصیات ریخت سنجی و ریخت شناسی ماده‌ها و لاروهای سن دوم و با استفاده از کلید جپسون، گونه مورد مطالعه *M. javanica* شناسایی شد (۱۳). توده‌های تخم نماتد از ریشه‌های آلوده جدا و با استفاده از محلول هیپوکلرید سدیم یک درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی گردید (۱۷). سپس سوسپانسیون به‌دست آمده را روی الک ۴۰۰ مش ریخته و با آب مقطر استریل چند بار شستشو داده و تخم‌های حاصل به داخل آب مقطر استریل انتقال داده شدند. سوسپانسیون تخم در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری و جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد. برای به‌دست آوردن لاروهای سن دوم از روش اصلاح شده برمن استفاده گردید (۲۵). لاروها هر ۲۴ ساعت جمع‌آوری و لاروهای با عمر کم‌تر از ۴۸ ساعت جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

تهیه اسانس

در اواخر تابستان ۱۳۸۸ برگ گیاه اکالیپتوس از درختان موجود در فضای سبز بیرجند جمع‌آوری و به مدت یک هفته در محل تاریک و خشک قرار داده شد. دیگر گیاهان مورد مطالعه در این آزمایش (کما و باریجه) به صورت صمغ آماده از بازار محلی مشهد خریداری شد. در هر نوبت اسانس‌گیری، ۵۰ گرم پودر گیاهی یا صمغ گیاه همراه با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای مدل کلونجر در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به روش تقطیر با آب به مدت سه ساعت، اسانس‌گیری شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آبگیری شد. از لستین یک درصد جهت حلالیت بهتر اسانس در آب استفاده شد. اسانس‌ها تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای تیره به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر با درپوش آلومینیومی داخل یخچال و در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها

جهت شناسایی اجزاء متشکله اسانس‌های موجود در گیاهان مورد

1- Allelopatic plant

بررسی، از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی مدل[1] Varian - Star – 3400cx مجهز به ستون DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر، گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. برنامه در دمای بین ۶۰ تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه انجام شد. دمای محوطه تزریق روی ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. طیف‌سنج جرمی مورد استفاده Varian –Satorn با انرژی یونیزاسیون ۷۰ev بود. دستگاه مزبور مجهز به نرم‌افزار رایانه‌ای Saturn 4 بود.

آزمایشات زیست سنجی

بررسی اثر اسانس‌ها بر مرگ و میر لارو نماتد در شرایط آزمایشگاه

بررسی اثر نماتدکشی اسانس‌ها روی لارو سن دوم بر اساس روش عباس و همکاران (۵) صورت گرفت. به این منظور، حدود ۵۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس (اکالیپتوس، کما و باریجه) در میکروتیوب ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتد حاوی ۲۰۰ لارو سن دوم *M. javanica* به هر میکروتیوب اضافه شد. پنج غلظت اسانس، با فاصله لگاریتمی مساوی در مقادیر بین ۵۰۰ تا۴۰۰۰ پی‌پی‌ام (غلظت‌های ۵۰۰ ، ۸۰۰، ۱۴۰۰، ۲۳۰۰ و ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام) مورد استفاده قرار گرفت. آب مقطر استریل به عنوان شاهد بود. برای هر تیمار سه تکرار منظور و آزمایش دو بار انجام شد. پس از قرار دادن نماتدها در معرض غلظت‌های مختلف اسانس، میکروتیوب حاوی اسانس و لارو سن دوم به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفت. شمارش نماتدهای زنده و مرده با استفاده از لام شمارش و میکروسکوپ انجام و درصد مرگ و میر محاسبه شد. آزمایش‌ها در شرایط دمایی ۳±۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. ارتباط بین غلظت‌های مختلف اسانس و مرگ و میر لارو تحت آنالیز پروبیت قرار گرفت و سطح غلظت LC_{50} و LC_{90} به‌دست آمد.

بررسی اثر اسانس‌ها بر تفریخ تخم نماتد در شرایط آزمایشگاه

بررسی اثر اسانس‌ها بر تفریخ تخم بر اساس روش اونیفاد (۲۰) و داس و همکاران (۹) انجام شد. به این منظور حدود ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتد حاوی ۵۰۰ عدد تخم را در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای (پلی استیرن) ریخته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی (پنج غلظت مثل آزمایش بالا) به هر چاهک اضافه شد تا به غلظت‌های مورد نظر برسند. آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. هر تیمار در سه چاهک تکرار شد و آزمایش دو بار انجام شد. سپس پلیت را پوشانده و در دمای ۳ ±۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. درصد تفریخ تخم بعد از ۷ روز با شمارش تعداد لاروهایی که در هر چاهک از تخم تفریخ حاصل شده بودند محاسبه گردید. ارتباط بین غلظت‌های اسانس و میزان تفریخ تخم تحت آنالیز پروبیت قرار گرفت تا سطح LC_{50} و LC_{90} آن به‌دست آید.

طرح آماری

در این آزمایش‌ها، از قالب آزمون فاکتوریل و طرح پایهٔ کاملاً تصادفی برای بررسی اثرات ساده و متقابل اسانس و نماتد استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزارهای آماری MSTATC و SPSS V.16 انجام گرفت. هم‌چنین آنالیز پروبیت داده‌ها به کمک نرم افزار Polo-PC صورت گرفت.

نتایج

نتایج آنالیز شیمیایی اسانس‌ها نشان داد که منوترپن‌ها بخش اصلی ترکیبات اسانس‌های اکالیپتوس، کما و باریجه را تشکیل می‌دهند. اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس کما، بتا-پینن (۲۲/۱۵ درصد) و در باریجه بتا-پینن (۳۲/۵۱ درصد) و ۳-کارن (۱۹/۸۵ درصد) بود (جدول ۱). لیمونن (۱۸/۲۳ درصد) و ۱و۸- سینئول (۴۶/۱۲ درصد) اصلی‌ترین ترکیبات اسانس اکالیپتوس را تشکیل می‌دادند (جدول ۲).

نتایج تجزیه واریانس درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم نشان دهنده اختلاف معنی‌داری ($P\leq0/001$) بین اسانس‌های مورد مطالعه بود. بین غلظت های مختلف اسانس نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P\leq0/001$). مقایسه میانگین‌ها بین گیاهان مورد بررسی نشان داد که اسانس اکالیپتوس بیش‌ترین درصد مرگ و میر را ایجاد کرده است و اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.05$) با اسانس سایر گیاهان مورد آزمایش داشت. به طوری‌که میانگین اثر نماتدکشی اسانس اکالیپتوس، کما و باریجه بر مرگ و میر لارو سن دوم به ترتیب ۵۶/۱۴ ، ۳۲/۹۱ و ۳۳/۱۴ درصد و اثر بازدارندگی از تفریخ تخم نماتد به ترتیب ۸۷/۳۶ ، ۸۱/۵۰ و ۷۷/۴۳ در صد بوده است. میزان مرگ و میر لارو سن دوم در اثر اسانس‌های کما و باریجه به ترتیب ۳۲/۹۱ و ۳۳/۱۴ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشته و در یک گروه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نشان دهنده بیش‌ترین درصد مرگ و میر لارو در غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام بعد از ۴۸ ساعت بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان مرگ و میر لارو به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام با ۷۴/۷۹ درصد وغلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام با ۲۰/۶۶ درصد بود (جدول۳).

1- Gas Chromotography-Mass Spectrometry

نتایج نشان داد که در هر سه گیاه مورد مطالعه با افزایش غلظت اسانس، میزان مرگ و میر لارو سن دوم نماتد افزایش یافت. مقایسه میانگین‌ها بین غلظت‌ها (اثر متقابل اسانس گیاه × غلظت) نشان داد که اسانس گیاه اکالیپتوس در غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام در میان دیگر غلظت‌های اسانس‌های مورد بررسی با ۹۸/۸۳ درصد بیش‌ترین تأثیر را در مرگ و میر لارو سن دوم داشته است (جدول۴). اسانس گیاهان کما و باریجه کشندگی کم‌تری نسبت به اسانس اکالیپتوس نشان دادند. مرگ و میر ناشی از اسانس‌های مذکور در غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب برابر ۶۶/۷۳ و ۵۸/۷۶ درصد بود (جدول۴). طبق آنالیز پروبیت، شاخص‌های LC_{50} و LC_{90}، اسانس‌ها نشان دهنده کشندگی بالاتر اسانس‌های اکالیپتوس در مقایسه با کما و باریجه علیه لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* بود (میزان LC_{50} اسانس‌های اکالیپتوس، کما و باریجه روی لاروهای سن دوم نماتد ریشه گرهی به ترتیب برابر ۸۳۹، ۲۱۲۶ و ۲۴۱۴پی‌پی‌ام بود). (جدول۶).

نتایج تجزیه واریانس روی درصد جلوگیری از تفریخ تخم نشان داد که بین اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری ($P\leq0/001$) وجود دارد. هم‌چنین بین غلظت های مختلف اسانس اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P\leq0/001$). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اسانس اکالیپتوس و باریجه به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تأثیر را بر عدم تفریخ تخم نماتد داشته‌اند. مقایسه میانگین بین غلظت‌های مورد بررسی نشان داد که غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام با ۹۴/۳۵ درصد بیش‌ترین اثر را بر عدم تفریخ تخم نماتد داشته است و اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.05$) با سایر غلظت‌های مورد آزمایش داشت .

نتایج حاصل از زیست‌سنجی نشان داد که در اسانس هر سه گیاه با افزایش غلظت، درصد تفریخ تخم کاهش یافته است. مقایسه میانگین‌ها بین غلظت‌های اسانس گیاهان (اثر متقابل اسانس گیاه × غلظت) نشان داد که اسانس گیاه اکالیپتوس در غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام با ایجاد ۹۸/۸۰ درصد عدم تفریخ تخم و اسانس باریجه در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام با ایجاد ۷۴/۶۶ درصد عدم تفریخ تخم به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تأثیر را روی تخم نماتد ریشه گرهی داشتند (جدول۵). طبق آنالیز پروبیت بر اساس شاخص‌های LC_{50} و LC_{90}، اسانس اکالیپتوس در مقایسه با اسانس‌های کما و باریجه دارای بازدارندگی بالاتری روی تفریخ تخم‌های نماتد *M. javanica* بودند. میزان LC_{50} اسانس‌های اکالیپتوس، کما و باریجه روی تخم نماتد ریشه گرهی به ترتیب برابر ۱۷۷، ۴۶۰ و ۶۹۳ پی‌پی‌ام بود (جدول۶).

جدول ۱- ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس باریجه و کما مورد استفاده در تحقیق

ترکیبات	RI*	اجزاء ترکیب درصد	
		کما	باریجه
α-pinene	۹۳۶	۰/۰۸	۳/۲۱
Sabienne	۹۷۵	–	۰/۳۱
β-pinene	۹۷۹	۲۲/۱۵	۳۲/۵۱
Myrcene	۹۹۰	۰/۰۶	–
3-carene	۱۰۰۲	۰/۳۸	۱۹/۸۵
Limonene	۱۰۲۶	–	۸/۱۵
β-phellandrene	۱۰۳۱	–	۲/۸
Ocimene-Cis- β	۱۰۳۷	–	۱/۳۵
Ocimene-trans- β	۱۰۴۳	–	۰/۴۳
(Z)-1-propenyl-sec-butyldisulfide	۱۲۰۳	۴/۵۱	–
(E)-1-propenyl-sec-butyldisulfide	۱۲۰۸	۸/۴۵	–
α-copaene	۱۳۷۷	–	۰/۰۸
β-elemene	۱۳۹۱	–	۰/۳۴
β-caryophyllene	۱۴۱۸	–	۰/۶۸
Germacrene-B	۱۴۸۵	۴/۴۶	۳/۶
Cadinene	۱۵۱۸	۰/۵۳	۰/۵۶
(E)-sec-butyl-butane-2-disulfide Guaiol	۱۶۰۳	۱/۲۵	–
Guaiol	۱۶۰۵	۰/۸	۱/۱۷
10-Epi-eudesmole	۱۶۰۹	۱/۷۳	–

*: Retention Index

جدول ۲- ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس اکالیپتوس مورد استفاده در تحقیق

ترکیبات	RI*	اجزاء ترکیب درصد
α-pinene	۱۰۳۸	۵/۱
β -myrcene	۱۱۵۹	۱/۳
β-phellandrene	۱۱۷۸	۱/۵
α-terpinene	۱۱۹۰	۰/۳
Limonene	۱۲۰۸	۱۸/۲۳
1,8-cineole	۱۲۳۵	۴۶/۱۲
β -ocimene	۱۲۴۱	۱/۲
γ-terpinene	۱۲۴۹	۷/۱
ρ-cymene	۱۲۷۱	۸/۷
Linalool oxide	۱۴۲۸	۰/۲
Linalool	۱۵۰۹	۰/۷
Terpinene-4-ol	۱۶۰۱	۱/۲
α-Humulene	۱۶۰۷	۰/۱
Menthol	۱۶۱۵	۰/۲
α-terpineol	۱۷۳۵	۳/۸
Borneol	۱۷۳۵	۰/۱
Guaiol	۱۷۸۰	۰/۱

*: Retention Index

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر نماتدکشی غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان دارویی بر عدم تفریخ تخم و مرگ و میر لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی گونه *M. javanica*

غلظت اسانس مورد آزمایش(پی‌پی‌ام)	درصد مرگ و میر لارو	درصد عدم تفریخ تخم
۴۰۰۰	۷۴/۷۹^{a}	۹۴/۳۵^{a}
۲۳۰۰	۶۴/۹۶^{b}	۹۱/۳۳^{ab}
۱۴۰۰	۵۱/۴۲^{c}	۸۸/۴۴^{b}
۸۰۰	۳۲/۵۶^{d}	۸۳/۸۳^{c}
۵۰۰	۲۰/۶۶^{e}	۸۰/۰۹^{d}
شاهد	۰^{f}	۵۴/۵۶^{e}

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

جدول ٤- مقایسه میانگین اثرمتقابل غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان دارویی بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی گونه *M. javanica*

غلظت (پی‌پی‌ام)	اکالیپتوس	کما	باریجه
۴۰۰۰	۹۸/۸۳^{a}	۶۶/۷۳^{bc}	۵۸/۷۶^{cd}
۲۳۰۰	۹۲/۸۳^{a}	۵۲/۸۰^{de}	۴۹/۲۵^{def}
۱۴۰۰	۷۳/۵۰^{b}	۳۹/۰۹^{f}	۴۱/۶۶^{ef}
۸۰۰	۴۶/۳۵^{ef}	۲۳/۵۲^{gh}	۲۷/۸۳^{g}
۵۰۰	۲۵/۳۳^{gh}	۱۵/۲۹^{h}	۲۱/۳۷^{gh}
شاهد	۰^{i}	۰^{i}	۰^{i}

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان دارویی بر عدم تفریخ تخم نماتد ریشه گرهی گونه *M. javanica*

غلظت (پی‌پی‌ام)	اکالیپتوس	کما	باریجه
۴۰۰۰	۹۸/۸۰^{a}	۹۳/۹۳^{abc}	۹۰/۳۳^{bcd}
۲۳۰۰	۹۶/۷۳^{ab}	۹۱/۵۳^{bcd}	۸۵/۷۳^{de}
۱۴۰۰	۹۴/۶۶^{abc}	۸۷/۷۳^{cde}	۸۲/۹۳^{ef}
۸۰۰	۹۱/۲۳^{bcd}	۸۲/۹۳^{ef}	۷۷/۳۳^{fg}
۵۰۰	۸۷/۸۰^{cde}	۷۷/۸۰^{fg}	۷۴/۶۶^{g}
شاهد	۵۴/۹۵^{h}	۵۵/۱۲^{h}	۵۳/۶۰^{h}

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

جدول ٦- نتایج آنالیز پروبیت مرگ و میر- غلظت در آزمایش زیست‌سنجی جهت بررسی اثر کشندگی اسانس‌های اکالیپتوس، کما و باریجه علیه لارو سن دوم و تخم نماتد ریشه گرهی گونه *M. javanica*

مرحله سنی	منبع اسانس	فاکتور χ^2	هتروژنیتی	غلظت کشنده (پی‌پی‌ام) (حدود اطمینان ۹۵ درصد)	
				LC_{50}	LC_{90}
تخم	اکالیپتوس	۰/۳۹	۰/۱۳	۱۷۷ ۱۲۵-۲۳۲	۱۶۲۸/۴۵ (۱۴۴۰-۱۸۶۹
	کما	۱/۰۹	۰/۳۶	۴۶۰ ۳۶۱-۵۵۹	۵۱۹۲ ۴۲۷۲-۶۶۱۹
	باریجه	۱/۳۹	۰/۴۷	۶۹۳ ۵۳۹-۵۴۸	۱۲۰۴۶ ۸۸۴۶-۱۸۱۷۹
لارو سن دوم	اکالیپتوس	۴/۶۱	۱/۵۳	۸۳۹ ۷۶۷-۹۱۱	۲۱۲۲ ۱۸۹۰-۲۴۴۸
	کما	۰/۶۴	۰/۲۱	۲۱۲۶ ۱۹۷۸-۲۳۰۰	۱۲۹۳۹ ۱۰۶۲۵-۱۶۳۸۳
	باریجه	۲/۲۳	۰/۷۴	۲۴۱۴ ۲۱۷۱-۲۷۳۰	۳۱۵۰۰ ۲۱۹۵۸-۵۰۱۱۴

بحث

استفاده از فرآورده‌های گیاهی نماتدکش به جای ترکیبات شیمیایی درکنترل نماتدها عوارض جانبی بسیار کم‌تری به دنبال خواهد داشت و می‌تواند فواید اقتصادی نیز به‌همراه داشته باشد. در این تحقیق، اسانس گیاهان دارویی اکالیپتوس، کما و باریجه اثر نماتدکشی مطلوبی را در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند. به طوری‌که در بالاترین غلظت بکار رفته (۴۰۰۰ پی‌پی‌ام)، تأثیری بیش از ۷۵ درصد در مرگ و میر لارو سن دوم و بیش از ۹۴ در صد عدم تفریخ تخم داشتند. با توجه به این‌که عدم تفریخ تخم در شاهد ۵۴ درصد بوده، استفاده از اسانس گیاهان دارویی باعث شده که عدم تفریخ تخم نسبت به شاهد ۴۰ در صد افزایش یابد (جدول ۴ و ۵). بررسی‌های صادقی و همکاران (۳ و ۴) نشان داد که اسانس گیاهان زیره سیاه، زیره سبز، رازیانه و میخک در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام تأثیری بیش از ۹۰ درصد در مرگ و میر لارو و عدم تفریخ تخم نماتد ریشه گرهی داشتند. پریز و همکاران (۲۲) نیز گزارش کردند که اسانس برخی از گیاهان خانواده چتریان در غلظت‌های بالاتر از ۴۰۰۰ میکرولیتر در لیتر منجر به افزایش مرگ و میر لاروهای نماتد *M. javanica* شدند.

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز پروبیت بررسی‌های آزمایشگاهی، LC_{50} اسانس گیاهان کما، باریجه و اکالیپتوس روی تخم به ترتیب برابر ۴۶۰، ۶۹۳ و ۱۷۷ پی‌پی‌ام و روی لارو سن دوم به ترتیب برابر ۲۱۲۶، ۲۴۱۴و ۸۳۹ پی‌پی‌ام می‌باشد. اما به نظر نمی‌رسد که این نتایج حاکی از مقاوم‌تر بودن لارو نسبت به تخم باشد زیرا تخم نماتد ، مقاوم‌ترین مرحله در چرخه زندگی نماتد است (۲۸). به نظر می‌رسد که تفاوت مقادیر LC_{50} در تخم و لارو به روش انجام آزمایش و مدت زمان قرار گیری تخم و لارو در معرض اسانس مربوط می‌شود. به طوری که در بررسی اثر اسانس بر مرگ و میر لارو، بعد از ۴۸

ساعت، اسانس یا عصاره از میکروتیوب‌های حاوی لارو حذف و آب اضافه شد، درصورتی که درصد تفریخ تخم، بعد از ۷ روز و بدون حذف اسانس محاسبه شد.

بنابر گزارش تاپونجو و همکاران (۲۶) کشندگی اسانس‌های گیاهی ناشی از عملکرد بیولوژیک ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها روی حشرات می‌باشد. در حقیقت اسانس‌های گیاهی به خاطر اجزاء سازنده‌شان که عمدتاً مونوترپن‌ها هستند، سمیت قابل توجهی روی بسیاری از آفات، از جمله نماتدها دارند. آنالیز شیمیایی اسانس‌های اکالیپتوس، کما و باریجه با استفاده از دستگاه کروماتوگراف نشان داد که اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس اکالیپتوس لیمونن (۱۸/۲۳ درصد) و ۱و۸-سینئول (۴۶/۱۲ درصد)، در اسانس کما بتا-پینن (۲۲/۱۵ درصد) و در اسانس باریجه بتا-پینن (۳۲/۵۱ درصد) و ۳-کارن (۱۹/۸۵ درصد) می‌باشد (جدول ۱ و ۲). اثرات بیولوژیکی متنوع برخی از این ترکیبات روی حشرات توسط محققین مختلف بررسی و مورد تایید قرار گرفته است (۱۸، ۱۲، ۱۰). بر اساس گزارش اکا و همکاران (۱۸) اسانس گیاه زیره سیاه اروپایی *Carum carvi* که حاوی ۴۸ درصد لیمونن می‌باشد، در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام تأثیری بیش از ۹۰ درصد در مرگ و میر لارو سن دوم و عدم تفریخ تخم‌های نماتد ریشه گرهی داشته است. بر اساس گزارش اچوریگاری و همکاران (۱۰) مونوترپن‌های لیمونن، ۱ و ۸- سینئول و بتا-پینن تأثیر معنی‌داری در افزایش مرگ و میر و کاهش عدم تفریخ تخم‌های نماتد *Meloidogyne incognita* داشتند. بنابراین به‌طور کلی می‌توان اذعان داشت که عناصر عمده تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی می‌تواند نقش بسیار موثری در توجیه قابلیت کنترلی اسانس‌ها بر نماتد داشته باشد.

نحوهٔ عمل اسانس‌ها علیه نماتدها به درستی مشخص نیست. بنظر می‌رسد که اسانس در مورد نماتدها همانند حشرات عمل کرده و بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز تأثیر می‌گذارند (۱۸). دخالت ترکیبات گیاهی موجود در اسانس روی سیستم عصبی نماتدها و فرایند انتقال پیام عصبی روشن نیست. برخی محققین گمان دارند که اسانس‌ها با تخریب پوست نماتد و یا ایجاد اختلال در غشای سلولی نماتدها و تغییر نفوذپذیری آن موجب مرگ نماتدها می‌شوند (۱۹).

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس سه گیاه دارویی مورد آزمایش می توانند به عنوان ترکیب نماتدکش جهت کنترل نماتد ریشه گرهی مفید واقع شود. توجه به این نکته ضروری است که توسعه تجارتی یک ترکیب ضدنماتدی نظیر نماتدکش یا دورکننده تنها به میزان تاثیر آن بستگی ندارد بلکه به هزینه تولید یا فرآوری و اثرات زیست محیطی کاربرد آن نیز وابسته است (۲۷). لذا پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های بیش‌تر جهت ارائه روش‌های ارزان قیمت و مناسب جهت اسانس‌گیری، تولید صنعتی اسانس‌ها و فرمولاسیون‌های تجاری مناسب جهت کنترل نماتدها صورت گیرد تا بتوان توجیه اقتصادی بکارگیری ترکیبات گیاهی را افزایش داد.

منابع

۱- حسینی‌نژاد ع. ۱۳۸۳. اثر مشتقات چریش، *Azadirachta indica*، بر نماتدریشه گرهی، *Meloidogyne javanica*، در گوجه‌فرنگی. مجله آفات و بیماری‌های گیاهی۷۲ (۱): ۶۹ تا ۸۹ .

۲- فتحی ق.، خیری ا.، و شریفی تهرانی ع. ۱۳۸۳. ارزیابی ترشحات ریشه‌ای، عصاره و کنجاله برخی از گیاهان دارویی در کنترل نماتد ریشه گرهی. دومین همایش گیاهان دارویی ، تهران، دانشگاه شاهد.

۳- صادقی ز.، مهدیخانی مقدم ع.، و عزیزی م. ۱۳۸۹. بررسی اثرنماتدکشی تعدادی گیاهان دارویی خانواده چتریان بر نماتود ریشه گرهی (*Meloidogyne javanica*) در شرایط آزمایشگاه. نشریه حفاظت گیاهان ۲۴ (۱): ۶۲ تا ۶۸ .

۴- صادقی ز.، مهدیخانی مقدم ع. و عزیزی م.۱۳۹۱ . ارزیابی فرآورده‌های گیاهی جهت کنترل نماتدریشه گرهی *Meloidogyne javanica* روی گوجه فرنگی. نشریه بیماری‌های گیاهی ۴۸ (۲) : ۱۵۵ تا ۱۶۳ .

5- Abbas S., Dawar S., Tariq M., and Javed-Zaki M. 2009. Nematicidal activity of spices against *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Pakistan Journal Botany, 41: 2625-2632.

6- Bar-Eyal M., Sharon E., and Spiegel Y. 2006. Nematicidal activity of *Chrysanthemum coronarium*. European Journal of Plant Pathology, 114: 427-433.

7- Chitwood D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review of Phytopathology, 40: 221-249.

8- Choi I.H., Park J.Y., Shin S.C., Kim J., and Park I.K. 2007. Nematicidal activity of medicinal plant essential oils against the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Applied Entomology and Zoology, 42: 397-401.

9- Dos S.S., Costa R., De M.S.N., Santos A., and Ryan M.F. 2003. Effect of *Artemisia vulgaris* rhizome extracts on hatching, mortality and plant infectivity of *Meloidogyne megadora*. Journal of Nematology, 35: 437-424.

10- Echeverrigaray S., Zacaria J., and Beltrao R. 2010. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Nematology, 100: 199-203.

11- Fujii Y. 2000. Allelopathy in the Action and Utilization of Allelopathy Substance. Noubunkyo, Tokyo.

12- Ibrahim S.K., Trabulsi A.F., and S. El-haj. 2006. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. Phytopathologia Mediterranea, 45: 238-246.
13- Jepson S.B. 1987. Identification of Root-Knot Nematode*(Meloidogyne)* Species. CAB International, Wallingford, UK, 265pp.
14- Javed N., Gowen S.R., Inam-ul-Haq M., and Anwar, S.A. 2007. Protective and curative effect of Neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. Crop Protection, 26: 530-534.
15- Javed N., Gowen S.R., El-Hassan S.A., Inam-ul-haq M., Shahina F., and Pembroke B. 2008. Efficacy of Neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knit nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. Crop Protection, 27: 39-43.
16- Kim S.I., Park C., Ohh M.H., Cho H.C., and Ahn Y.J. 2003. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). Journal of Stored Products Research, 39: 11-19.
17- Nico A.I., Jimenez-Diaz R.M., and Castillo P. 2004. Control of root-knot nematodes by composed agro-industrial wastes in potting mixtures. Crop Protection, 23: 581-587.
18- Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Zohara Y., and Spiegel Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. Phytopathology, 90: 710-715.
19- Oka Y. 2001. Nematicidal activity of essential oil components against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Nematology, 3: 159-164.
20- Onifade A.K. 2007. Effect of essential oils from five *Ocimum* sp. On the pathogenicity of *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) in Tomato. Agricultural Journal, 2: 185-191.
21- Pegard A., Brizzard G., Fazari A., Soucaze O., Abad P., and Djian-Caporalino C. 2004. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsium annuum*. Phytopathology, 95: 158-165.
22- Perez M.P., Navas-Cortes J.A., Pascual-Villalobos M.J. and Castillo P. 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. Plant Pathology, 52: 395-401.
23- Sangwan N.K., Verma B.S., Verma K.K., and Dhindsa K.S. 1990. Nematicidal activity of some essential oils. Pestic. Sci., 28: 331-335.
24- Sasser J.N., and Carter C.C. 1985. Overview of the international *Meloidogyne* project 1975-1984. In: Sasser J.N., and Carter C.C.(eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. 1, Raleigh, USA, North Carolina State University Graphics, 19-24.
25- Southey J.F. 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Technical bulletin. Naff/Adas. HMSO, London, 202 pp.
26- Tapondjou A.L., Adler C., Bouda H., and Fontem D.A. 2003. Bioefficacy of powders and essential oils from leaves of *Chenopodium ambrosioides* and *Eucalyptus saligna* to the cowpea weevil bruchid, *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera: Bruchidae). Cahiers detudes et de recherches francophones Agricultures, 12: 401-407.
27- Taba S., Sawada J., and Moromizato Z.I. 2007. Nematicidal activity of Okinawa island plants on the root-knot nematode (Kofoid and White) Chitwood. Plant and Soil, 303: 207-216.
28- Zasada I.A., Ferris H., and Zheng L. 2002. Plant sources of Chinese herbal remedies: Laboratory efficacy, suppression of *Meloidogyne javanica* in soil, and phytotoxicity assays. Journal of Nematology. 34: 124-129.