نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، ص. ۲۲۵-۲۲۰

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 2, Summer 2014, P. 220-225

تاثیر بازدارندگی اسانس‌های موسیر، مریم‌گلی و کرفس‌کوهی روی نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) و استخراج مواد مؤثره آن‌ها

عالیه فیضی‌لایین[1*]- عصمت مهدیخانی‌مقدم[2] - مجید عزیزی[3]- حمید روحانی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۴

چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) گروه مهمی از بیمارگرهای گیاهی هستند که دامنه میزبانی وسیعی داشته و هرساله خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند. روش‌های متعددی برای مبارزه با نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) اعمال می‌گردد، ولی استفاده از گیاهان دارویی یکی از روش‌های بی‌خطر برای مهار نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد. در این تحقیق اثر بازدارندگی اسانس‌های موسیر (*Allium hirtifolium*)، کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima*) و مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. شناسایی ترکیبات اسانس‌های مریم‌گلی و کرفس کوهی با استفاده از روش GC-MS صورت گرفت. نتایج نشان داد اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس کرفس کوهی شامل Z-لیگوستیلید (۱۱/۵۴ درصد) و ۳بوتیلیدین-فتالید (۳۷/۱۴ درصد) و در مریم‌گلی شامل α-توجون (۸/۳۲ درصد) و ۱،۸ سینئول (۸/۱۲ درصد) می‌باشد. میزان آلیسین موجود در سیر به روش HPLC ۵/۱ میکروگرم در میلی‌گرم وزن سوخ بود. درصد مرگ‌ومیر لارو بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری لارو در معرض اسانس و نیز درصد عدم تفریخ تخم بعد از ۷ روز قرارگیری تخم نماتد در معرض اسانس محاسبه شد. از هر اسانس ۶ غلظت در شش تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. اسانس تمام گیاهان مورد آزمایش، به طور مشخصی جمعیت این نماتدها را کاهش دادند. اسانس موسیر در غلظت ۲۰۰۰ppm تقریبا تأثیر بیش از ۹۰ درصد در مرگ و میر لاروها و بیش از ۳۰ درصد در عدم تفریخ تخم (نسبت به شاهد) داشت. اسانس کرفس کوهی و مریم‌گلی نیز در غلظت ۴۰۰۰ppm قادر به کنترل حدود ۵۰ درصد لارو و ۳۰ درصد تخم نماتد ریشه‌گرهی بودند. نتایج این بررسی نشان‌دهنده پتانسیل بالای این اسانس‌ها به خصوص اسانس موسیر در کنترل نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضد نماتدی، اسانس، موسیر، مریم‌گلی، کرفس کوهی، نماتد ریشه‌گرهی

مقدمه

نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) گروه مهمی از بیمارگرهای گیاهی هستند که دامنه میزبانی وسیعی دارند و هرساله خسارت زیادی به محصولات وارد می کنند. خسارت‌های مستقیم و غیرمستقیمی که توسط این نماتد به گیاه وارد می‌شود به میزان قابل توجهی موجب محدود شدن کیفیت و کمیت تولیدات کشاورزی می‌شود. خسارت نماتد در زمینی که کاشت مداوم محصولات حساس صورت گیرد بیشتر خواهد شد و در صورت عدم کنترل مؤثر، موجب از بین رفتن کل محصول می‌شوند (۷). این نماتد در ایران تقریباً در همه جای کشور و بالاخص در شهرستان‌های مرکزی و حاشیه کویر به حد وفور وجود دارد. از لحاظ میزان خسارت گونه‌های مختلف، جنس *Meloidogyne* در سطح جهان مهم‌ترین جنس در بین نماتدهای گیاهی بوده و یکی از پنج عامل درجه اول بیماری‌زا، در گیاهان به شمار می‌آید (۱۵). دامنه میزبانی وسیع نماتد ریشه‌گرهی، سرعت بالای تکثیر آن، کوتاهی مدت زمان نسل آن‌ها، که بین ۲۰ تا ۳۰ روز در خاک‌های گرمسیری میباشد، انگل داخلی بودن و برهمکنش با سایر بیمارگرهای خاکزی نظیر قارچ‌ها، کنترل این نماتد را نسبت به دیگر نماتدها مهم‌تر ساخته است (۱۱). امروزه نماتدهای انگل گیاهی عمدتاً با استفاده از روش‌های زراعی، نماتدکش‌های شیمیایی و کاشت ارقام مقاوم به نماتد، مهار می‌شوند (۱۳). استفاده از گیاهان و فرآورده‌های آن‌ها یکی از روش‌های بی‌خطر برای مهار نماتد ریشه‌گرهی محسوب می‌شود. این روش‌ها ضمن هزینه کم و کاربرد آسان، توانایی بهبود ساختمان خاک و حاصلخیزی آن را نیز دارند (۱۶). فرآورده‌های گیاهی متنوعی برای مدیریت نماتدهای پارازیت گیاهی، بررسی شده است که از مهمترین آنها گل جعفری (*Tagetes* sp)، چریش (*Azadirachta indica* L.)، زیتون تلخ (*Melia azedarach* L.) (۳) ، درمنه (*Artemisia obsinthium* L.) و

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email:Alfeyzi1391@chmail.ir)
۳- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

آویشن (*Thymus vulgaris* L.) و نعنا (*Mentha viridis* L.) (۹) و اسانس‌های گیاهی زیره (*Carum carva* L.)، سیر (*Allium sativum* L.)، نعنا (*Mentha spicata* L.) (۱۳) می‌باشند. از مهم‌ترین نماتدکش‌های گیاهی که امروزه به صورت تجاری مورد مصرف قرار می‌گیرند می‌توان آزادیراکتین[1] را با نام تجاری نیم[2] نام برد که از برگ گیاه چریش استخراج می‌شود. این ترکیبات دارای خواص دورکنندگی و ضدتغذیه‌ای هستند و به طور تماسی و گوارشی، برحشرات و نماتدها اثر کشندگی دارند. این ترکیبات در پوست‌اندازی نیز اختلال ایجاد می‌کنند (۱۷). در این تحقیق اثرات بازدارندگی اسانس‌های موسیر(*Allium hirtifolium*)، کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima*) و مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه روی نماتد ریشه‌گرهی، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تکثیر نماتد: ریشه‌های آلوده به نماتد ریشه‌گرهی در تابستان ۱۳۹۰ از مزارع گوجه فرنگی استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. با توجه به این‌که دامنه میزبانی نماتدهای ریشه‌گرهی وسیع است، ممکن است بر روی یک ریشه آلوده، بیش از یک گونه نماتد وجود داشته باشد. بنابراین لازم است نمونه خالص از گونه مورد نظر در دسترس باشد. برای بدست آوردن یک جمعیت خالص از هر نمونه، ریشه‌های حاوی گره درون پتری حاوی آب قرار داده شد و زیر بینوکولار از هر نمونه یک کیسه تخم انتخاب گردید. کیسه تخم از ریشه جدا و با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت سه دقیقه ضد عفونی شد. سوسپانسیون تخم نماتد در گلخانه به داخل حفره‌هایی که مجاور یک نشاء گوجه فرنگی حساس به نماتد رقم ارلی اربانا[3] تعبیه شده بود، ریخته شدند. پس از دو ماه ریشه‌های آلوده از خاک خارج و براساس خصوصیات مرفومتریک و مرفولوژیک ماده‌های بالغ، لارو سن دوم و برش انتهای بدن ماده‌ها گونه *Meloydogyne javanica* با استفاده از کلید جپسون شناسایی شد (۸). برای تهیه سوسپانسیون تخم، توده‌های تخم نماتد را از ریشه‌های آلوده دارای گال خارج کرده، سپس با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت سه دقیقه ضدعفونی گردید (۱۲). بعد از آن نمونه‌ها را توسط الک ۳۸ میکرون، سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده و در آب مقطر استریل جمع‌آوری و در دمای ۲۷ °C در انکوباتور نگهداری شدند. برای بدست آوردن لارو سن دو از روش تغییر یافته برمن (۱۸) استفاده گردید و هر۲۴ ساعت لاروها جمع‌آوری شد و فقط لاروهایی که کمتر از ۴۸ ساعت عمر داشتند، جهت انجام آزمایشات استفاده شدند.

تهیه اسانس: برای تهیه اسانس مریم‌گلی و کرفس کوهی، برگ گیاهان مریم‌گلی و کرفس کوهی به میزان لازم از عطاری‌ها تهیه شد. در هر نوبت اسانس‌گیری ۵۰ گرم پودر گیاهی همراه با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای کلونجر در ۱۰۰ °C به روش تقطیر با آب، اسانس‌گیری شد. زمان اسانس‌گیری برای هر نمونه سه ساعت بود. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آبگیری شد. اسانس‌ها تا زمان استفاده در ظرف‌های شیشه‌ای تیره ۱۰۰ میلی‌لیتری با درپوش آلومینیومی داخل یخچال در شرایط دمایی ۴°C نگهداری شد.

برای تهیه اسانس موسیر در آزمایشگاه، از روش خیساندن (انکوباسیون) برای جداسازی مواد مؤثره استفاده شد. برای این منظور مخلوط سوخ خرد شده و حلال هگزان (W/V ۲:۱۰) را هم‌زده (در مخلوط‌کن الکتریکی) و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. آن‌گاه مخلوط حاصل توسط کاغذ صافی فیلتر گردید، سپس تا حد خشک شدن با دستگاه حذف حلال در فشار خلا و در درجه حرارت آزمایشگاه حلال اضافی تبخیر و حذف شد. نمونه حاصل برای مراحل بعدی در دمای ۲۰ °C- نگهداری شد.

شناسایی اجزای اسانس گیاهان مریم‌گلی و کرفس کوهی: از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) که شرایط آن در زیر درج شده است، استفاده شد. گاز کروماتوگراف مدل Varian Star 3400cx مجهز به ستون‌های موئینه DB5 با قطر داخلی ستون ۲۵/۰میلی‌متر، ضخامت فیلم ۲۵/۰ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر، گاز حامل هلیوم با سرعت ۲ میلی‌متر در دقیقه است. در هر مورد پس از تزریق مقادیر بسیار جزیی اسانس، کروماتوگرام حاصله و طیف‌های جرمی ترکیبات مختلف موجود در آن بررسی شد. شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری، محاسبه اندیس کواتس، مطالعه طیف های جرمی هر یک از اجزای اسانس و بررسی الگوهای شکست آنها، مقایسه آنها با طیف‌های استاندارد و استفاده از منابع معتبر صورت گرفت. درصد کمی هر ترکیب بر اساس سطح زیر منحنی و توسط برنامه‌ریزی کامپیوتری مشخص گردید (۲).

تعیین میزان آلیسین موسیر توسط روش HPLC

شرایط HPLC: ستون C18 (3.9×150mm,4.5µm) ، دتکتور: LC1150 HPLC pump operation Manual و ۲۴۰ نانومتر، فاز متحرک: متانل–آب(۸۰/۲۰ V/V) ، سرعت حرکت[4]: تغییرات بین ۱–۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه داده می‌شد و ارزیابی می‌گردید. (حجم

1- Azadirachtin
2- Neem
3- Early urbana
4- Flow Rate

تزریق: ۲۰ میکرولیتر، دمای ستون:C°۲۸ ، زمان جریان: ۱۵ دقیقه)

آلیسین بسته به نوع فاز متحرک و سرعت حرکت در زمان‌های متفاوت خارج شد، محلول استاندارد آلیسین نیز، به موازات نوع حلال و موسیر در هر کدام از حلال های متانول، آب، کلرفرم و اتانل آماده شد و به موازات سنجش عصاره، آلیسین استاندارد نیز به دستگاه تزریق گردید و سطح زیر منحنی پیک مقایسه گردید.

محلول بلانک استخراج: آب متانل، آب- کلرفرم یا آب استونیتریل تهیه و جهت خط پایه اولیه[1] استفاده گردید. پس از شستشوی دستگاه، ابتدا تا زمان یکسان شدن خط پایه فرصت داده شد که تا دستگاه تنظیم گردد. تزریق نمونه‌های استاندارد را انجام داده و یک منحنی خطی از سطح زیر منحنی آلیسین استاندارد در مقابل غلظت‌های مختلف آن بر حسب میلی‌لیتر (با حلال‌های مصرفی در روند عصاره‌گیری موسیر) رسم گردید. تزریق نمونه‌های عصاره‌گیری آماده شده انجام و سپس درصد آلیسین را در نمونه‌ها در مقابل استاندارد با استفاده از فرمول زیرمحاسبه گردید.

$$\%W/W\ Allicin = \frac{C \times FV \times D \times 100\%}{W(10=0\mu\ g/mg}$$

C: غلظت آلیسین نمونه برحسب میلی گرم در میلی‌لیتر که از منحنی کالیبراسیون بدست آمده است.

V : حجم نهایی نمونه برحسب میلی‌لیتر ،D: فاکتور رقت نمونه (در صورت لزوم)، W : وزن نمونه بر حسب میلی‌گرم

بررسی اثر اسانس گیاهان دارویی بر روی نماتد ریشه گرهی *M.javanica*

بررسی اثر نماتدکشی اسانس‌ها روی لارو، بر اساس روش عباس و همکاران (۱) صورت گرفت. حدود ۵۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس در میکروتیوب ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتد حاوی ۲۰۰ لارو سن دو نماتد *M. javanica* به هر میکروتیوب اضافه شد. پنج غلظت اسانس علاوه بر شاهد (آب مقطر سترون)، در مقادیر ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppm اعمال گردید. هر تیمار با ۶ تکرار انجام شد. پس از گذشت۴۸ ساعت، درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن دو با استفاده از لام شمارش نماتد و در زیر میکروسکوپ محاسبه گردید. آزمایشات در شرایط دمایی C °۳±۲۸ انجام گرفت. ارتباط بین غلظت‌های مختلف اسانس و مرگ‌ومیر لارو تحت آنالیز پروبیت قرار گرفت و سطح غلظت LC_{50} و LC_{90} بدست آمد (۲۱).

بررسی اثر اسانس‌ها بر تفریخ تخم بر اساس روش اونیفاد (۱۴) انجام شد. حدود ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتد حاوی ۵۰۰ عدد تخم را در میکروتیوب ریخته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی (۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppm) به هر میکروتیوب اضافه شد تا به غلظت‌های موردنظر برسند. آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد. میکروتیوب‌ها در دمای C°۳±۲۸ قرار داده شدند. سپس درصد تفریخ تخم بعد از ۷ روز با شمارش تعداد لاروهایی که در هر میکروتیوب از تخم تفریخ شده بودند، محاسبه گردید. ارتباط بین غلظت‌های اسانس و میزان تفریخ تخم تحت آنالیز پروبیت قرار گرفت تا سطح LC_{50} و LC_{90} بدست آید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها در این پژوهش با استفاده از نرم افزار MSTATCI و SPSS صورت گرفت. آزمایشات بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در قالب فاکتوریل برای بررسی اثرات ساده و متقابل استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفت.

نتایج

نتایج آنالیز شیمیایی اسانس‌ها نشان داد که سزکوئی‌ترپن‌ها بخش اصلی ترکیبات در اسانس مریم‌گلی و کرفس‌کوهی می‌باشد. اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس کرفس کوهی شامل Z-لیگوستیلید (۱۱/۵۴ درصد) و ۳بوتیلیدین-فتالید (۳۷/۱۴درصد) و در مریم‌گلی شامل α-توجون (۸/۳۲درصد) و ۱،۸ سینئول (۸/۱۲درصد) می‌باشد. این اولین گزارش از آنالیز اسانس کرفس کوهی می‌باشد (جدول ۱و ۲). بر اساس نتایج آنالیز موسیر، مشخص گردید که میزان آلیسین موجود در موسیر مورد بررسی ۵/۱ میکروگرم در میلی‌گرم وزن سوخ بود.

نتایج اثر اسانس بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی: نتایج تجزیه واریانس درصد مرگ و میر لاروها که در جدول ۳ آمده است، حاکی از آن است که تفاوت معنی‌داری در بین غلظت‌های بکاررفته و هم‌چنین بین اسانس‌های گیاهان مختلف وجود دارد ($p\leq0.05$). اما بررسی اثرات متقابل اسانس×غلظت معنی‌دار نمی‌باشد ($p\geq0.05$) (جدول۳). مقایسه میانگین بین تاثیر غلظت‌های اسانس گیاهان (اثر متقابل اسانس گیاه×غلظت) بر درصد مرگ و میر لارو نشان داد، اسانس موسیر در غلظت ppm۴۰۰۰ در میان دیگر غلظت‌های اسانس‌های مورد بررسی، با ۴۹/۹۸ درصد بیشترین تاثیر را در مرگ و میر لارو سن دوم داشته است (جدول۴). در موسیر غلظت ppm ۴۰۰۰ و ۲۰۰۰ تفاوت معنی‌داری نداشتند و می‌توان گفت تاثیر یکسانی بر روی مرگ و میر لاروها داشتند. اسانس مریم‌گلی و کرفس کوهی در همین غلظت (ppm۴۰۰۰) در مقایسه با اسانس موسیر، اثر کشندگی ضعیف‌تری را علیه لارو سن دو نشان دادند. اسانس مریم گلی در غلظت ppm ۲۰۰، با ۲۸/۱۵ درصد کمترین

1- Base line

تاثیر را بر روی مرگ و میر لاروها داشته است (جدول۴). طبـق آنـالیز پروبیت، بیشترین سمیت علیه لارو سن دو بر اسـاس LC_{50} و LC_{90} مربوط به اسانس موسیر می‌باشد (LC_{50}=۵۱۰) (جدول۶).

نتایج اثر اسانس بر تفریخ تخم نماتد ریشه گرهـی: نتـایج تجزیه واریانس روی درصد تخم های تفریخ نشده نشان داد که اثرات اصلی نوع اسانس و غلظـت و اثـر متقابـل اسـانس×غلظـت معنـی‌دار می‌باشد ($p\leq0.05$) (جدول۳).

جدول۱- زمان بازداری و میزان ترکیبات اصلی اسانس کرفس کوهی *Kelussia odoratissima*

No.	نام ترکیب	RI	درصد
۱	(Z)-ligustilide	۱۷۳۸	۱۱/۵۴
۲	(Z)-3-butylidene-phthalide	۱۶۷۲	۳۷/۱۴
۳	limonene +β-phellandrene	۱۰۲۷	۳۶/۶
۴	germacrene B	۱۵۵۶	۸۰/۲
۵	α-muurolene	۱۴۸۰	۸۲/۱

جدول ۲- زمان بازداری و میزان ترکیبات اصلی اسانس مریم‌گلی *Salvia officinallis*

No	نام ترکیب	RI	درصد
۱	α-Thujone	۱۱۱۳	۸/۳۲
۲	1,8-Cineole	۱۰۲۹	۸/۱۲
۳	Borneol	۱۱۵۵	۳/۱۱
۴	Camphor	۱۱۲۶	۷/۱۰
۵	Carvacrol	۱۳۰۰	۳/۸

جدول۳- تجزیه واریانس (سطح احتمال) درصد تخم تفریخ نشده و مرگ و میر لارو سن دو نماتد *Meloidogyne javanica* در معرض اسانس گیاهان مختلف و غلظت‌های مختلف (در شرایط آزمایشگاه)

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد مرگ‌ومیر لارو		درصد تخم تفریخ نشده	
		F value (F محاسبه شده)	P value	Fvalue (F محاسبه شده)	Pvalue
اسانس	۲	۶۸/۱۱	<۰۰۱/۰	۳۲/۹۰	<۰۰۱/۰
غلظت	۵	۷۸/۳۳	<۰۰۱/۰	۲۲/۲۶	<۰۰۱/۰
اسانس گیاه×غلظت (اثر متقابل)	۱۰	۵۹/۱	۲۸/۰	۱۲/۶	<۰۰۱/۰

-در صورتی‌که $p\leq0.05$ باشد تفاوت، معنی‌دار می‌باشد. -در صورتی‌که $p\geq0.05$ باشد تفاوت، معنی‌دار نمی‌باشد

جدول٤- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان دارویی بر مرگ و میر لارو سن دو نماتد*Meloidogyne javanica*

غلظت(ppm)	موسیر	مریم‌گلی	کرفس
شاهد	۰^{i}	۰^{i}	۰^{i}
۲۰۰	۲۹/۲۵^{gh}	۲۸/۱۵^{h}	۳۸/۲۱^{gh}
۵۰۰	۳۴/۴۶^{ef}	۵۱/۲۳^{gh}	۸۲/۲۷^{g}
۱۰۰۰	۵۱/۷۳^{b}	۰۸/۳۹^{f}	۶۷/۴۱e^{f}
۲۰۰۰	۸۳/۹۲^{a}	۸۱/۵۲^{de}	۵۶/۴۹^{def}
۴۰۰۰	۴۹/۹۸^{a}	۷۲/۶۶^{bc}	۷۷/۵۸^{cd}

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪)

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف اسانس گیاهان دارویی بر عدم تفریخ تخم نماتد *Meloidogyne javanica*

غلظت (ppm)	موسیر	مریم‌گلی	کرفس
شاهد	۲۹/۶۴^{g}	۴۲/۶۵^{g}	۳۸/۶۰^{h}
۲۰۰	۷۴/۷۱^{f}	۰۵/۷۱^{f}	۰۵/۷۱^{f}
۵۰۰	۵۷/۸۵^{c}	۸۱/۷۴^{e}	۴۹/۷۶^{e}
۱۰۰۰	۸۳/۹۱^{b}	۳۳/۷۶^{e}	۲۹/۸۱^{d}
۲۰۰۰	۷۳/۹۶^{a}	۴۴/۸۴^{b}	۵۵/۸۶^{b}
۴۰۰۰	۷۴/۹۸^{a}	۵۵/۹۰^{b}	۹۲/۸۹^{b}

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪)

جدول٦- نتایج آنالیز پروبیت مرگ و میر-غلظت در آزمایش زیست‌سنجی جهت بررسی اثر بازدارندگی اسانس گیاهان دارویی علیه تخم و لارو نماتد *Meloidogyne javanica*

اسانس	LC_{50}(ppm)		LC_{90}(ppm)	
	تخم	لارو سن دو	تخم	لاروسن دو
موسیر	۴۲۳	۵۱۰	۱۹۰۵	۱۸۱۷
مریم‌گلی	۱۶۰۹	۱۷۵۵	۱۳۹۵۲	۱۱۶۲۵
کرفس کوهی	۸۳۵	۲۱۰۴	۱۵۹۸۶	۲۲۲۶۰

مقایسه میانگین بین غلظت های اسانس گیاهان (گیاه×غلظت) نشان داد که اسانس موسیر در غلظت ppm ۴۰۰۰ و۲۰۰۰ نسبت به شاهد (غلظت صفر ppm) به ترتیب با ۴۵/۳۴ درصد و۴۴/۳۲ درصد در عدم تفریخ تخم تاثیر داشته‌اند و با سایر اسانس‌های مورد بررسی در این آزمایش، تفاوت معنی‌دار داشته است ($p\leq0.05$). کمترین تاثیر عدم تفریخ تخم، مربوط به اسانس مریم‌گلی در غلظت ppm ۲۰۰بود (جدول۵).

بر طبق آنالیز پروبیت، بیشترین سمیت علیه تخم نماتد بر اساس LC_{50} مربوط به اسانس موسیر می‌باشد (LC_{50}=۴۲۳). به طور کلی می‌توان گفت که با افزایش غلظت اسانس، درصد مرگ و میر لاروها افزایش و درصد تفریخ تخم‌ها نیز کاهش می‌یابد (جدول۶).

بحث

بررسی آنالیز اسانس گیاهان دارویی مورد استفاده در این تحقیق، حاکی از آن است که اسانس گیاه موسیر، در غلظت ppm۲۰۰۰ اثر نماتدکشی مطلوبی را نشان می‌دهد. به طوریکه تقریبا تاثیر بیش از ۹۰ درصد در مرگ و میر لارو و بیش از ۳۰ درصد در عدم تفریخ تخم (نسبت به شاهد) دارد (جدول ۴ و ۵). اسانس کرفس کوهی و مریم‌گلی نیز، در غلظت ppm۴۰۰۰ قادر به کنترل حدود ۵۰ درصد لارو و ۳۰ درصد تخم نماتد ریشه‌گرهی (نسبت به شاهد) هستند.

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی به خاطر اجزای سازنده‌شان که عمدتاً مونوترپن‌ها و سزکویی‌ترپن‌ها می‌باشند، سمیت قابل توجهی روی آفات و بیماری‌ها دارند (۱۰). در آنالیز اسانس‌های مورد بررسی، مشخص شد اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس کرفس کوهی شامل لیگوستیلید، بوتیلیدین فتالید و لیمونن و در اسانس مریم‌گلی شامل آلفا توجون، سینؤل، کارواکرول و کامفور و در موسیر نیز آلیسین می‌باشد. اثرات بیولوژیکی متنوع برخی از این ترکیبات روی نماتدهای پارازیت توسط محققین مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. آلبوکوئرکو و همکاران (۴) اسانس دوگونه از جنس *Pectis* را در دستگاه گاز کروماتوگرافی قرار دادند و ترکیبات مونوترپن را استخراج و اثرات این ترکیبات را بر بقای لاروهای گونه *M.incognita* بررسی کردند. بر اساس مطالعات صورت گرفته کارواکرول، اوژنول، تیمول، ترانس-انتول، کاروون، پولگون، لیمونن، ژرانیول، بورنئول، کاروئول، سیترال، سیترونلول، آلفا- ترپنئول، آلفا-پینن، بتا پینن، پارا-سیمن، کامفور، کامفن عمده ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها هستند که خاصیت نماتدکشی دارند (۵ و ۱۳). کنترل نماتد به وسیله گیاهان مارچوبه و سیر نیز به علت وجود اجزای فعال گلوکوزید و آسپاراگوزیک اسید در گیاه مارچوبه و آلیسین در سیر مربوط است (۲۰).

در برخی تحقیقات با استفاده از حشره مدل، نحوه عمل اسانس‌های گیاهی را مشخص کرده‌اند. مدارکی مبتنی بر تداخل این اسانس‌ها و تعدیل‌کننده عصبی اکتوپامین وجود دارد. ترکیبات اسانس، آنتاگونیست گیرنده‌های اکتوپامین هستند. اکتوپامین یک انتقال‌دهنده عصبی در حشرات می‌باشد. بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که این ترکیبات در حشرات با مهار انتقال دهنده‌های عصبی از جمله اکتوپامین موجب توقف انتقال پیام عصبی و فلج شدن و مرگ حشره می‌شوند (۶). نتایج این بررسی نشان می‌دهد که تمامی گیاهان مورد آزمایش می‌توانند به عنوان نماتدکش جهت استفاده علیه نماتد

ریشه‌گرهی مفید واقع شوند. البته هدف اصلی از استخراج مواد مؤثره اسانس‌های گیاهان مورد بررسی، شناسایی ترکیبات مؤثر گیاهان دارویی مورد تحقیق بود که به واسطه شناسایی مواد مؤثره، می‌توان از مواد مؤثره گیاهان دارویی در مقیاس وسیع علیه نماتدهای بیماری‌زای گیاهی استفاده نمود.

در پایان پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری جهت تهیه فرمولاسیون‌های مناسب انجام گیرد تا این فرمولاسیون‌ها بتوانند موجب افزایش پایداری و بهبود قابلیت تأثیر ترکیبات گیاهی بر نماتد شوند و هزینه‌ها را نیز کاهش دهند. هم‌چنین کاربرد آنها در خاک و شرایط طبیعی نیز مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین لازم است تحقیقات بیشتری جهت شناسایی ویژگی‌های هر اسانس و نحوه‌ی عمل آن بر نماتد و نیز اثر ترکیبی اسانس‌های مختلف انجام گیرد.

منابع

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

2- Adams R.P. 2001. Identification of essential oil components by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Allured: Carol Stream IL.

3- Akhtar M. and Alm M.M. 1991. Integrated control of plant parasitic nematode on potato with organic amendments, nematicide and mixed cropping with mustard. Nematology Medit., 19:169-171.

4- Albuquerque M.R.J.R., Costa S.M.O., Bandeir P.N., Santiago G.M.P., Andrade-Neto M., Silveira E.R., and Pessoa O.D.L. 2007. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. An Acad. Bras. Science., 7(2): 209-213.

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

6- Isman M.B. and Machial C.M. 2006. Pesticides based on essential oils: from traditional practice to commercialization, In: Naturally Occuring Bioactive Compounds. Elsevier, Amsterdam.

7- 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.

8- Jepson S.B. 1987. Identification of Root-knot Nematode (*Meloidogyne* species). CAB International, Wallingford, UK, 265 pp.

9- Korayem A.M., Hasabo S.A. and Ameen H.H. 1993. Effects and mode of action of some plant extracts on certain plant parasitic nematodes. Anz Schadlingskde Pflanzenschutz Umweltschutz, 66:32-36.

10- Lee B.H., Choi W.S., Lee S.E. and Park B.S. 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). Crop Protection, 20, 317-320.

11- Natarajan N., Cork A., Boomathi N., Pandi R., Velavan S. and Dahkshnamoorthy G. 2006. Cold aqueous extracts of African marigold, *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode,*Meloidogyne incognita*. Crop Protection., 25: 1210-1213.

12- 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.

13- 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.

14- Onifade A.K. 2007. Effect of essential oils from five *Ocimum* species On the pathogenicity of *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) in tomato. Agricultural Journal, 2:185-191.

15- Pegard A., Brizzard G., Fazari A., Soicaze 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.

16- Qamar F., Begum S., Wahab A. and Siddiqui B.S. 2005. Nematicidal natural products from the aerial parts of *Lantana camara* Linn. Natu. Prod. Res., 19(6): 609-613.

17- Rakhshani A. and Taheri A.H. 2006. Principles of Agriculture Toxicology. Publisher, Farhange Jame 446 p. (In Persian)

18- Southey J.F. 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Technical bulletin. Naff/Adas. HMSO, London, 202 pp.

19- 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.

20- 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.

21- Zasada I.N., Klassen W., Meyer S., Codallo M. and Abdul-Baki A.A. 2006. Velvetbean (*Mucuna pruriens*) extracts: impact on *Meloidogyne incognita* survival and on *Lycopersicon esculentum* and *Lactuca sativa* germination and growth. Pest Managment Science., 62:1122-1127.