مقاله تحقیقی

بررسی میزان مرگ و میر نماتد *Ditylenchus dipsaci* تحت تاثیر ساپونین‌های چند اکوتیپ یونجه (*Medicago sativa*)

حجت‌اله مظاهری‌لقب[۱]، فرزاد مرادی[۲]، لیلا کاشی[۳]، سید سعید موسوی[۴]

۱، ۲، ۴– دانشیار بازنشسته، دانش‌آموخته سابق دکتری، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۳– استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

مسئول مکاتبات: لیلا کاشی، ایمیل: l.kashi@basu.ac.ir .

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۴ ۱۰(۲)۹۵–۱۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۵

چکیده

نماتد ساقه یونجه یکی از عوامل مخرب محصولات اقتصادی از جمله یونجه، سیر، پیاز و لاله محسوب می‌گردد. در پژوهش حاضر، اثر ساپونین‌های اندام‌های هوایی شش اکوتیپ یونجه بر مرگ و میر نماتد ساقه یونجه در شرایط آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که از بین تیمارهای ساپونین خام، غلظت ۹۰ میکرولیتر از اکوتیپ‌های همدانی و فیض با ۹۶ درصد، بیشترین و غلظت ۵۰ میکرولیتر از اکوتیپ محلی میاندوآب با ۴۲ درصد، کمترین تأثیر را بر مرگ و میر نماتد ساقه یونجه داشتند. هم‌چنین در بین ساپونین‌های خالص، غلظت ۵۰ میکرولیتر از اکوتیپ‌های همدانی، پلی‌کراس شیراز و فیض با ۹۹ درصد و غلظت ۱۰ میکرولیتری اکوتیپ نیشابوری با ۶۸ درصد، به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را بر مرگ و میر نماتد نشان دادند. در بیشتر اکوتیپ‌های مورد بررسی، افزایش غلظت ساپونین خام از ۵۰ به ۹۰ میکرولیتر افزایش ۵۴ درصدی مرگ و میر و ساپونین خالص از ۱۰ به ۵۰ میکرولیتر منجر به افزایش ۳۱ درصدی مرگ و میر نماتد شد. بدین معنی که بین میزان مرگ و میر نماتد ساقه یونجه و غلظت ساپونین خام و خالص اکوتیپ‌های یونجه رابطه مستقیمی وجود داشت. بر این اساس اکوتیپ‌های همدانی، فیض و پلی‌کراس شیراز بیشترین و اکوتیپ‌های محلی میاندوآب و نیشابوری کمترین تأثیر را بر مرگ و میر این نماتد داشتند.

واژه‌های کلیدی: نماتد ساقه و پیاز، کنترل، مرگ و میر نماتد

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از گیاهان علوفه‌ای بوده که حاوی فیبر، مواد معدنی، پروتئین و انرژی فراوان جهت تغذیه دام می‌باشد (Kamalak & Canobolat, 2010, Kakaee & Mazahery–Laghab, 2014). به همین دلیل در بسیاری از کشورهای دنیا، یونجه به ملکه گیاهان علوفه‌ای معروف است (Yuksel *et al.*, 2016). همچنین یونجه حاوی متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند ساپونین‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد (Katarzyna *et al.*, 2016). مهم‌ترین عوامل زیستی محدودکننده عملکرد یونجه، سرخرطومی برگ یونجه، نماتد ساقه یونجه، برخی قارچ‌ها و بعضی باکتری‌ها هستند (Douda, 2005, Yavuzaslanoglu *et al.*, 2018). نماتد *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 انگل داخلی بخش هوایی گیاه است (Madani *et al.*, 2015). این نماتد در بذرهای باقلا، یونجه و پیاز نیز زندگی کرده و تکثیر می‌گردد (IPPC, 2016). برای کنترل نماتدهای انگل گیاهی، از روش‌های مختلفی مانندآفتاب‌دهی خاک و استفاده از مواد شیمیایی برای بسیاری از پاتوژن‌های خاک‌زاد به‌خصوص نماتد ساقه یونجه استفاده می‌شود (Lamberti *et al.*, 2001).

بسیاری از ارگانیسم‌ها مثل ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، پروتیست‌ها، آنتاگونیست‌های نماتد و بی‌مهرگان به‌عنوان عوامل بیولوژیکی کنترل‌کننده نماتدهای انگل گیاهی شناخته می‌شوند (Hajihassani 2018, poveda *et al.*, 2020). یکی دیگر از روش‌های کنترل، استفاده از مواد طبیعی مثل ساپونین‌های گیاهی است (D–Addabbo *et al.*, 2011). ساپونین‌ها گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند که عمدتاً در بیش از ۱۰۰ خانواده از گیاهان شامل تری‌ترپنوئیدها، استروئیدها یا گلیکوسایدهای استروئیدی آلکالوئیدی که یک یا چند زنجیره قندی آب‌گریز به آن‌ها متصل است. همبستگی متفاوتی بین تعداد، نوع و طول زنجیره قندی موجود در مولکول‌های ساپونینی یونجه با اثرات آنتی‌میکروبی گزارش شده است (Moses *et al.*, 2014). ساپونین در گیاه حالت متحرک دارد، مقدار آن تحت تأثیر عواملی مثل حملهٔ آفات، تأثیر بیمارگرها، همزیستی با باکتری‌های ریزوبیومی و قارچ‌های میکوریزا متغیر می‌باشد (Mugford & Osbourn, 2012).

ساپونین‌ها در تمام اندام‌های گیاهی یونجه مثل برگ‌ها، گل‌ها، ریشه‌ها، بذرها و جوانه‌ها تولید می‌شود (Tava & Avato, 2006). این مواد دارای اثرات آفت‌کشی به‌صورت ممانعت از تغذیه، رشد و نمو و تخم‌گذاری حشرات هستند. این ویژگی از اثر متقابل بین ساپونین‌ها و چربی‌ها و به‌هم‌خوردن سنتز هورمون‌های جلدی به وجود می‌آید. فعالیت ضدقارچی و ضدنماتدی برای ساپونین‌ها نیز در تحقیقات متعددی گزارش شده است (Hala *et al.*, 2014, Wei *et al.*, 2013, De Geyter *et al.*, 2007). تاکنون، اثرات بیولوژیکی ساپونین‌ها روی حلزون‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، حشرات، پروتوزوآها، سلول‌های غیرطبیعی کبد موش صحرایی، سلول‌های سرطانی، سلول‌های تنفسی ماهی، زاد و ولد حیوانات، غشاءهای سلولی، جذب مواد غذایی، هضم پروتئین، واکنش‌های اکسیداسیونی، متابولیسم کلسترول، سیستم‌های ایمنی و عصبی، خاصیت فیزیکوشیمیایی (سورفکتانت)، آرایشی، داروئی و تغذیه‌ای مورد بررسی قرارگرفته‌اند (Mazahery–Laghab *et al.*, 2011, Ustundag & Mazza, 2007, Francis *et al.*, 2002). در رابطه با تأثیر ساپونین‌های یونجه بر فعالیت‌های زیستی نماتدها، بیشتر تحقیقات در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. به عنوان مثال مخلوطی از بافت‌های یونجه تأثیر مثبتی بر فعالیت زیستی نماتدهای سیب زمینی *Globodera* rostochiensis، نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne incognita* و نماتد حامل ویروس *Xiphinema index* داشته است (D–Addabbo *et al.*, 2011). استفاده از ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه گیاهی به علت داشتن ویژگی‌هایی از قبیل کاربرد اختصاصی، دامنه تأثیر مشخص و محدود و قابلیت تجزیه به متابولیت‌های غیرسمی به‌عنوان راهکاری نوین برای مدیریت و مهار نماتدها مطرح شده است (Nazir *et al.*, 2008). هم‌چنین، استفاده از ارقام مقاوم و متحمل به نماتد ساقه یونجه به تنهایی یا استفاده از صفات و ژن‌های مرتبط با مقاومت یا تلفیقی از سایر روش‌های کنترلی، ممکن است مؤثرترین روش باشد که به این طریق می‌توان استفاده از نماتدکش‌های شیمیایی را کاهش داده یا حذف نموده و درنتیجه محصولی با عملکرد بالا و باکیفیت مطلوبی تولید گردد. در تحقیقی گزارش گردید که با استفاده از ارقام مقاوم یونجه نسبت به نماتد ساقه، می‌توان سرعت اپیدمی و حمله نماتد را کاهش داد، به‌نحوی که عملکرد علوفه تا ۸۳ درصد افزایش می‌یابد و همچنین جمعیت نماتد ساقه را به طور محسوسی کاهش می‌یابد (Jordan, 2018). هم‌چنین، در بررسی واکنش هفت اکوتیپ یونجه نسبت به نماتد ساقه مشخص گردید *D. dipsaci* توانایی تولیدمثل در همهٔ اکوتیپ‌های یونجه مورد مطالعه را داشت، اما میزان تکثیر در آن‌ها متفاوت بود (Moradi *et al.*, 2020). بنابراین، توانایی تولیدمثل نماتد در مطالعه مورد اشاره می‌تواند به غلظت‌های متفاوت ساپونین‌ها در اکوتیپ‌ها مرتبط باشد. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر ساپونین‌های استخراج شده از شش اکوتیپ یونجه بر مرگ و میر لاروها و افراد بالغ نماتد ساقه یونجه در شرایط آزمایشگاه انجام شده است.

مواد و روش‌های پژوهش

کشت و تکثیر اکوتیپ‌های یونجه

بذرهای شش اکوتیپ یونجه شامل همدانی، کریساری، فیض، پلی‌کراس شیراز، محلی میان‌دوآب و محلی نیشابوری از کلکسیون بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه گردید. بذرها پس از ضدعفونی سطحی، درون گلدان‌های پلاستیکی به ابعاد ۱۴×۱۱ سانتی‌متری حاوی خاک لومی شنی سترون کاشته شدند و داخل گلخانه با در دمای ۲۰–۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ روز نگهداری شده و آبیاری بر اساس نیاز گیاه انجام شد. جهت تأمین رطوبت حدود ۸۰ درصدی از دستگاه بخارساز (سرد) استفاده گردید.

تهیه نمونه آلوده و تکثیر نماتد ساقه یونجه

نمونه اولیه از مزرعه آلوده به نماتد ساقه یونجه از شهرستان قهاوند استان همدان برداشته شد. استخراج نماتدها طبق روش وایت‌هد و همینگ انجام شد (Whitehead & Hemming, 1965). برای تکثیر *D. dipsaci*، نماتدها با سولفات استرپتومایسین ۱٪ (Hajihassani *et al*., 2017) به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر استریل شستشو شده و نهایتا درون تشتک‌های پتری حاوی دیسک‌های هویج استریل شده قرار داده شدند. تشتک‌های پتری به مدت شش هفته در دمای ۲۱–۲۰ درجه سلسیوس داخل انکوباتور نگهداری شدند. به منظور استخراج افراد بالغ و لاروها از تخم‌ها از روش سینی (Whitehead & Hemming, 1965) استفاده شد. بدین ترتیب لاروها و افراد بالغ فعال از کاغذ صافی عبور کرده و تخم‌ها که قدرت حرکت نداشتند روی کاغذ صافی باقی ماندند. لاروها و افراد بالغ ابتدا درون تشتک پتری با دمای ۲۰–۲۱ درجه سلسیوس جمع‌آوری شده و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس درون یخچال تا زمان استفاده نگهداری شدند (Kühnhold *et al*., 2006, Fasihi *et al*., 2010, Faulkner *.et al*., 1974)

استخراج ساپونین‌های خام و خالص

برای استخراج ساپونین خام، ۱۰ گرم از بافت ساقه و برگ هر اکوتیپ یونجه با استفاده از نیتروژن مایع درون هاون چینی پودر شد. سپس به ازای هر گرم بافت گیاهی، پنج میلی‌لیتر متانول ۷۰٪ اضافه شده و پس از ۲۰ دقیقه با استفاده از قیف بوخنر در خلاء صاف شد. با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی (روتاری) در خلاء و دمای ۵۵ درجه سلسیوس، باقیمانده الکل تبخیر و حذف گردید. مواد باقیمانده در ته ارلن با متانول ۸۰٪ (پنج میلی‌لیتر به ازای هر گرم بافت گیاهی) شسته شده و با استفاده از روتاری در خلا الکل اضافی حذف شد. مواد جامد حاصل از دومین مرحله روتاری درون آب مقطر حل شده و در یخچال نگهداری گردید (Golawska *et al*., 2012). به منظور دستیابی به ساپونین خالص مراحل یادشده تکرار شده و به محلول به‌دست‌آمده ۱۰ میلی‌لیتر بوتانول اشباع اضافه گردید. محلول به‌دست آمده توسط شیکر به هم زده شده و درون قیف جداکننده ریخته شد تا دو لایه مجزا تشکیل شد. سپس فاز زیرین جدا شده و پنج میلی‌لیتر بوتانول اشباع به آن افزوده شد. به منظور دستیابی به خلوص بیشتر، این مرحله سه مرتبه تکرار شد. لایه فوقانی نیز درون قیف جداکننده ریخته شده و با استفاده از روتاری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. ساپونین نسبتاً خالص به‌دست آمده تا زمان استفاده درون فریزر با دمای ۲۰– درجه سلسیوس قرار داده شد. با توجه به نیاز به مقادیر متفاوت ساپونین خام و خالص برای تیمارهای مختلف، غلظت‌های تهیه شده در بازه ی زمانی دو ماهه مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی تأثیر ساپونین‌های خام و خالص بر فعالیت زیستی نماتد ساقه یونجه

جهت بررسی میزان مرگ و میر نماتد *D. dipsaci* تحت تاثیر سطوح مختلف ساپونین اکوتیپ‌های مختلف یونجه مورد مطالعه پس از ۲۴ ساعت، در شرایط آزمایشگاه، آزمونی در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل شامل دو فاکتور و سه تکرار انجام شد. برای انتخاب غلظت‌های ساپونین ، ابتدا یک تست اولیه در شرایط آزمایشگاه و درون ظروف پتری (با استفاده از

غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرولیتر از ساپونین خام و از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر برای ساپونین خالص) انجام شد. نهایتاً غلظت‌های ۵۰ و ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام، غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص و آب مقطر به عنوان شاهد، تیمارهای این آزمایش در نظر گرفته شدند. فاکتور اول در شش سطح (اکوتیپ‌های مختلف یونجه) و فاکتور دوم در پنج سطح غلظت‌های مختلف ساپونین شامل غلظت‌های ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام، ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام، ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص،۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص و آب مقطر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

برای انجام آزمایش‌های فوق، سوسپانسیونی حاوی میانگین ۱۵۰۰ عدد نماتد (افراد بالغ و لاروهای سنین مختلف) تهیه گردید (Aramideh *et al*., 2005, Kühnhold *et al*., 2006). به منظور حلالیت بیشتر ساپونین و تأثیر بهتر بر نماتدها، به هر میکروتیوب حاوی ساپونین، یک میلی‌لیتر آب استریل دو بار تقطیر اضافه شد. برای اطمینان از مرگ نماتدها، پس از ۲۴ ساعت، آن‌ها به تشتک‌های پتری حاوی آب مقطر سترون منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شده و به دقت زیر استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. سپس درصد مرگ و میر نماتدها (لارو و افراد بالغ) با استفاده از تشتک شمارش در زیر استریومیکروسکوپ محاسبه شد.

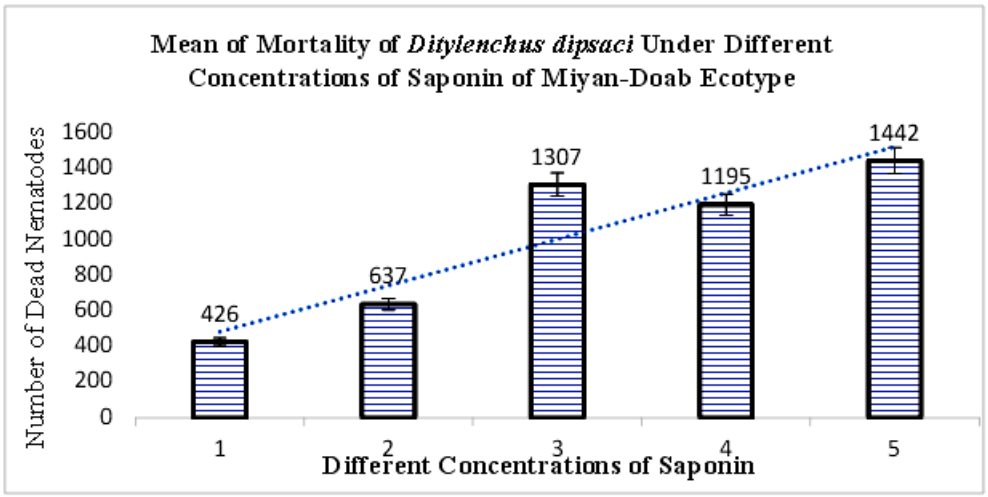
محاسبات آماری

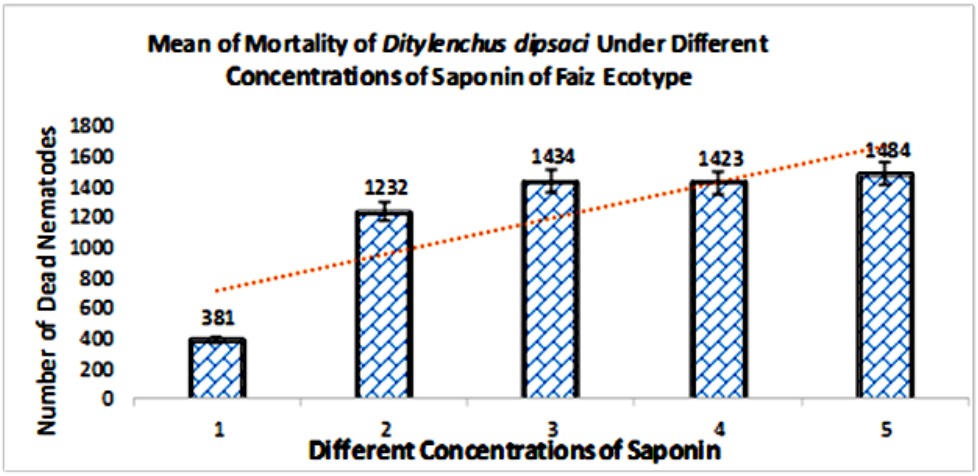
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS 9.0 استفاده شد. جهت مقایسه میانگین‌ها، پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها و آزمون یکنواختی واریانس تیمارها، از آزمون دانکن در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ استفاده شد.

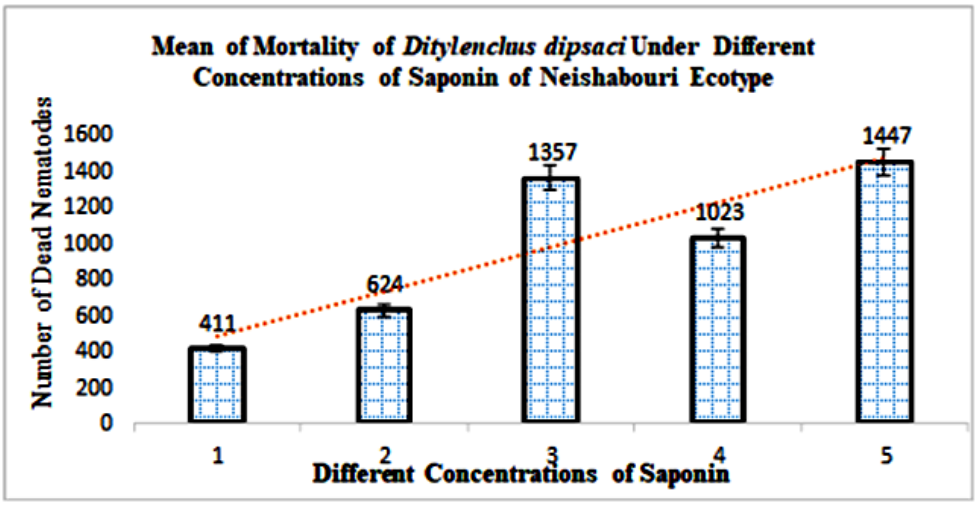
نتایج

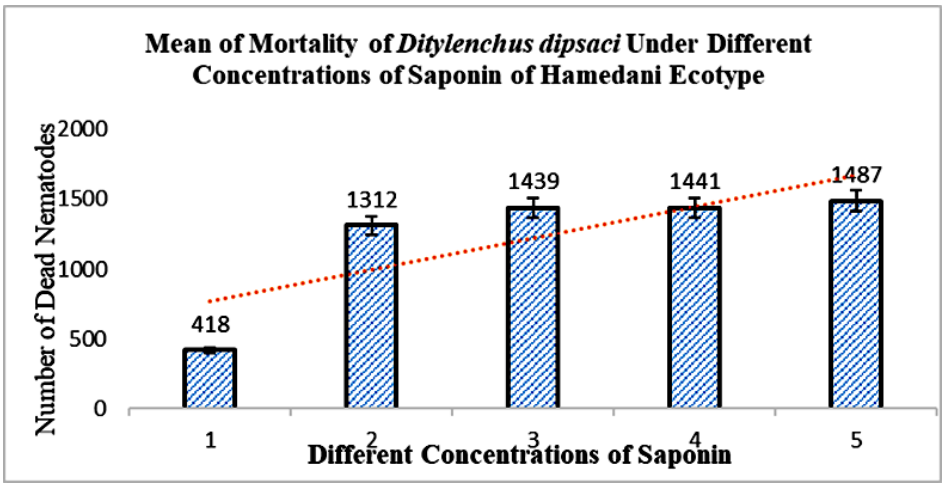
الف– مقایسه میانگین تاثیر سطوح مختلف ساپونین‌های خام و خالص هر یک از اکوتیپ‌های مورد بررسی بر مرگ و میر نماتد ساقه یونجه پس از ۲۴ ساعت (شکل ۱).

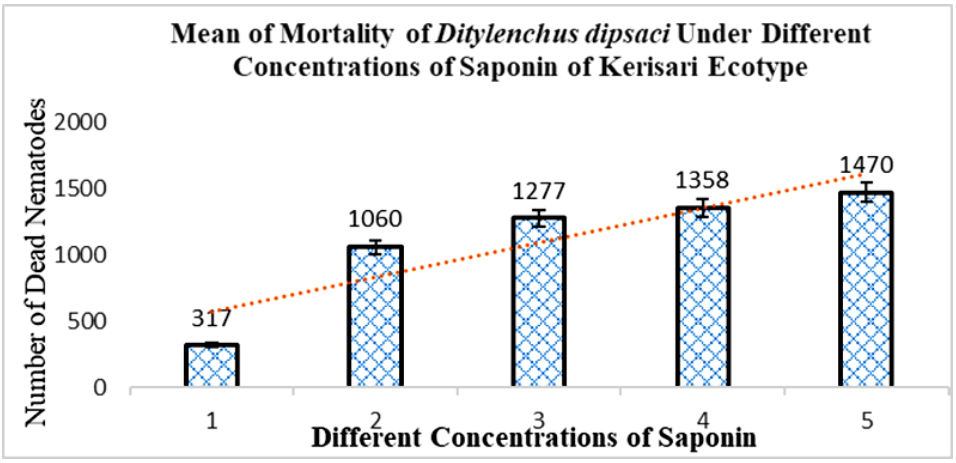
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در اکوتیپ محلی میاندوآب، در غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص نسبت به غلظت مشابه ساپونین خام، بیش از دو برابر افراد بالغ و لاروهای نماتد از بین رفتند. هم‌چنین، تاثیر غلظت ۹۰ میکرولیتر نسبت به غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام بیش از دو برابر بوده و نسبت به غلظت ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص باعث مرگ و میر نماتدهای بالغ و لاروهای بیشتری شد. در اکوتیپ‌های فیض و همدانی غلظت‌های مختلف ساپونین‌های خام و خالص به‌ترتیب منجر به مرگ و میر بیش از ۸۲ و ۸۷ درصد (بیش از ۱۲۰۰ و ۱۳۰۰ عدد) نماتد لارو و بالغ شدند. هرچند غلظت‌های مختلف ساپونین از نظر تاثیر بر مرگ و میر نماتد در هر یک از این دو اکوتیپ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند اما نسبت به شاهد تفاوت بسیار معنی‌دار داشتند. در اکوتیپ کریساری با اعمال غلظت‌های مختلف ساپونین‌های خام وخالص بیش از ۷۰ درصد (۱۰۰۰ عدد) نماتدها از بین رفتند. در اکوتیپ نیشابوری غلظت‌های مختلف ساپونین‌های خام و خالص منجر به مرگ و میر بیش از ۴۰ درصد (۶۰۰ عدد) از نماتدها شدند. به‌طوری‌که با استفاده از غلظت ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام نسبت به غلظت ۵۰ میکرولیتری آن، بیش از دو برابر نماتدهای بالغ و لارو از بین رفتند. در اکوتیپ پلی‌کراس شیراز، با اعمال غلظت‌های مختلف ساپونین‌های خام وخالص بیش از ۷۴ درصد (۱۱۰۰ عدد نماتد) از بین رفتند.

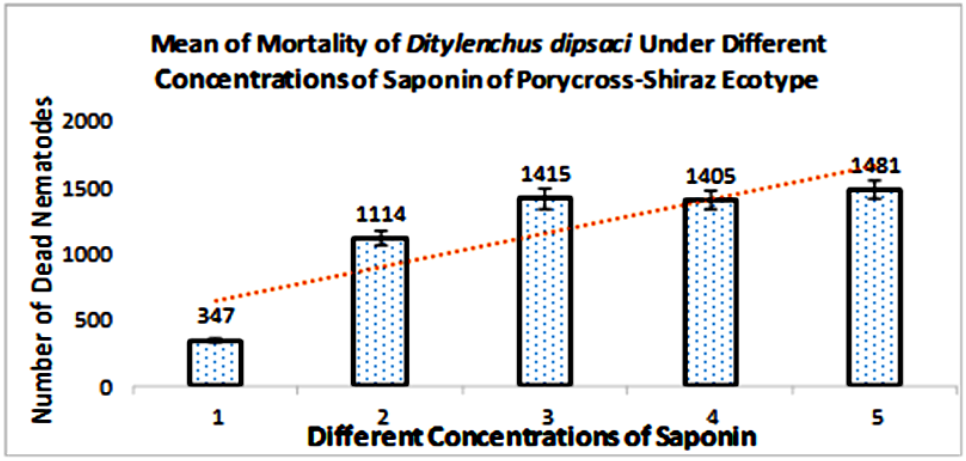

Mean of Mortality of *Ditylenchus dipsaci* Under Different Concentrations of Saponin of Miyan-Doab Ecotype
Number of Dead Nematodes
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
426
637
1307
1195
1442
1
2
3
4
5
Different Concentrations of Saponin


Mean of Mortality of *Ditylenchus dipsaci* Under Different Concentrations of Saponin of Faiz Ecotype
Number of Dead Nematodes
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
381
1232
1434
1423
1484
1
2
3
4
5
Different Concentrations of Saponin


Mean of Mortality of *Ditylenchus dipsaci* Under Different Concentrations of Saponin of Neishabouri Ecotype
Number of Dead Nematodes
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
411
624
1357
1023
1447
1
2
3
4
5
Different Concentrations of Saponin







شکل ۱– مقایسه تاثیر مقادیر مختلف ساپونین‌های خام و خالص هر یک از اکوتیپ‌های میاندوآب ، فیض، همدانی، کریساری، نیشابوری و پلی‌کراس شیراز بر میانگین میزان مرگ و میر نماتد *Ditylenchus dipsaci* پس از ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه، با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری ۵٪. (۱: شاهد، ۲: غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام، ۳: غلظت ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام، ۴: غلظت ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص و ۵: غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص)

Fig 1. Comparison of the effect of different amounts of crude and pure Saponins of each of Miyan–Doab, Faiz, Hamedani, Kerisari, Neishabouri and Polycross–Shiraz ecotypes on the mean mortality of *Ditylenchus dipsaci* after 24 hours under laboratory conditions, using the Duncan Test (5%), (1: control, 2: 50 microliters of crude Saponin, 3: 90 microliters of crude Saponin, 4: 10 microliters of pure Saponin and 5: 50 microliters of crude Saponin

ب– مقایسه میانگین میزان مرگ و میر نماتد *D. dipsaci* بر اثر کاربرد سطوح مختلف ساپونین‌های خام و خالص اکوتیپ‌های مختلف یونجه مورد مطالعه پس از ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۱) بین دو عامل اصلی (اکوتیپ‌ها و ساپونین‌ها) از نظر تأثیر بر صفت مرگ و میر نماتد *D. dipsaci* تفاوت آماری بسیار معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. هم‌چنین اثر متقابل دو عامل اکوتیپ × ساپونین برای صفت مرگ و میر افراد بالغ و لارو بسیار معنی‌دار ($P<0.01$) شد.

جدول ۱– تجزیه واریانس میزان مرگ و میر لاروها و نماتدهای بالغ *Ditylenchus dipsaci* در اثر استفاده از ساپونین‌های خام و خالص پس از ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه

Table 1. Analysis of variance of mean of mortality of *Ditylenchus dipsaci* (adults and juvinals) by using crude and pure saponine of the alfalfa ecotypes after 24 hours in laboratory conditions.

Source of variation	Degree of freedom	Mean squares
		Mortality of *Ditylenchus dipsaci*
Ecotype	5	153177.03**
Saponine	4	3496814.01**
Saponine × ecotype	20	53599.93**
Error	60	317389.72
٪ Coefficient of variation	–	6.57

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ آزمون دانکن.

** Significantly different at the 1 % level of Dunkan Test.

با توجه به نتایج تجزیه واریانس میزان مرگ و میر نماتد بر اثر سطوح مختلف ساپونین‌های خام و خالص اکوتیپ‌های مورد بررسی (جدول ۱) تیمارهای مربوط به غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص اکوتیپ‌های همدانی، پلی‌کراس شیراز، کریساری و فیض بیش‌ترین تأثیر را بر مرگ و میر افراد بالغ و لارو *D. dipsaci* داشتند. هم‌چنین تیمارهای مربوط به غلظت ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص اکوتیپ‌های فیض و همدانی بیش‌ترین و تیمار نیشابوری کم‌ترین تأثیر را بر مرگ و میر نماتدساقه یونجه نشان دادند. تیمارهای مربوط به غلظت ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام اکوتیپ‌های فیض و همدانی بیش‌ترین و تیمار کریساری کم‌ترین تأثیر را بر مرگ و میر نماتد مورد مطالعه داشتند. هم‌چنین تیمارهای مرتبط با غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام اکوتیپ همدانی بیش‌ترین و تیمار نیشابوری کم‌ترین تأثیر را بر مرگ و میر *D. dipsaci* نشان دادند. لازم به ذکر است در تیمار شاهد نیز حدود ۲۱ تا ۲۸ درصد از افراد بالغ و لاروهای *D. dipsaci* غیرفعال شدند.

استفاده از فرآورده‌های گیاهی نماتدکش به جای ترکیبات شیمیایی در کنترل نماتدها، عوارض جانبی بسیار کم‌تری به دنبال داشته و فواید اقتصادی قابل توجهی نیز به همراه دارد (Oka *et al*., 2000). از سوی دیگر، عصاره‌های گیاهی به دلیل وجود برخی ترکیبات طبیعی مانند استرول‌ها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، الکل‌ها و فلاونوئیدها در کنترل بیماری‌های گیاهی نقش مؤثری دارند (Mousa *et al*., 2011). با توجه به نتایج آزمایش اول می‌توان گفت استفاده از ساپونین تغلیظ شده (نه غلظت طبیعی موجود در گیاه) در کنترل زیستی نماتد ساقه یونجه موثر است.

در بررسی اثر متقابل اکوتیپ* ساپونین (جدول ۲) مشخص شد که اعمال غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص، حدود ۹۶٪–۹۹٪ از نماتدهای بالغ و لاروهای مورد مطالعه *D. dipsaci* مردند.

جدول ۲– مقایسه میانگین میزان مرگ و میر لاروها و بالغین *Ditylenchus dipsaci* پس از ۲۴ ساعت در اثر استفاده از سطوح مختلف ساپونین‌های خام و خالص اکوتیپ‌های مختلف یونجه

Table 2. Comparison of the mean mortality of larvae and adults of *Ditylenchus dipsaci* 24 hours after applying different amounts of crude and pure Saponin of different of alfalfa ecotypes.

Ecotype	Treatment number	Saponin levels	Mortality of *D. dipsaci* after 24 hours (%)	Number of dead nematodes after 24 hours
Miyan–Doab	1	Distilled water	28 i	425.76±29.74
	2	50 µ crude	45 h	637.10±61.80
	3	90 µ crude	87 cde	1307.23±12.71
	4	10 µ pure	80 ef	1195.33±49.40
	5	50 µ pure	96 ab	1442.00±11.37
Faize	6	Distilled water	25 i	380.56±59.00
	7	50 µ crude	82 ef	1231.67±27.72
	8	90 µ crude	96 ab	1434.23±11.28
	9	10 µ pure	95 abc	1423.27±6.67
	10	50 µ pure	99 a	1483.67±3.81
Hamedani	11	Distilled water	28 i	417.76±48.21
	12	50 µ crude	87 cde	1312.23±41.51
	13	90 µ crude	96 ab	1439.23±7.99
	14	10 µ pure	96 ab	1441.33±5.78
	15	50 µ pure	99 a	1487.43±4.18
Kerisari	16	Distilled water	21 i	317.43±89.89
	17	50 µ crude	71 g	1060.23±44.18
	18	90 µ crude	85 ed	1277.00±22.36
	19	10 µ pure	91 bcd	1358.00±11.01
	20	50 µ pure	98 a	1470.33±4.37
Neishabouri	21	Distilled water	27 i	411.23±97.76
	22	50 µ crude	42 h	624.43±56.48
	23	90 µ crude	90 abc	1356.90±11.79
	24	10 µ pure	68 g	1022.67±30.12
	25	50 µ pure	96 ab	1447.33±5.81
Polycross–Shiraz	26	Distilled water	23 i	347.23±103.95
	27	50 µ crude	74 fg	1114.00±37.26
	28	90 µ crude	93 abc	1414.57±6.70
	29	10 µ pure	94 abc	1405.33±10.41
	30	50 µ pure	99 a	1481.33±3.17

داده‌های دارای حروف مشابه، بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن می‌باشد.

Data with similar letters indicate no significant difference byDuncan's test (p=0.05)

می‌توان پیشنهاد نمود غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص هر کدام از اکوتیپ‌های مورد بررسی بر مرگ و میر این نماتد موثر بوده و از این نظر تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین آن‌ها وجود ندارد. در غلظت ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص اکوتیپ‌های محلی میاندوآب با ۸۰ درصد و نیشابوری با ۶۸ درصد کم‌ترین تأثیر را بر فعالیت زیستی *D. dipsaci* نشان دادند و در مجموع میزان تاثیر این غلظت در اکوتیپ‌های مختلف ۶۸ تا ۹۶ درصد بود. هم‌چنین در مجموع تیمارهای اکوتیپ‌های مختلف، با اعمال غلظت ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام ۸۵٪–۹۶٪ و در اثر کاربرد غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام ۴۲٪–۸۷٪ جمعیت بالغ و لاروهای نماتد ساقه غیرفعال شدند. در سه اکوتیپ همدانی، فیض و کریساری تفاوت چندانی بین اعمال تیمار ساپونین خالص در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰ میکرولیتر در میزان مرگ و میر نماتد مشاهده نگردید و بیش از ۹۰ درصد جمعیت بالغ و لارو نماتد غیرفعال شدند. بنابراین می‌توان به‌جای غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص اکوتیپ‌های مذکور از غلظت ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص استفاده نمود. در اکوتیپ‌های محلی میاندوآب و نیشابوری، در اعمال تیمار مربوط به غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص نسبت به غلظت ۱۰ میکرولیتری آن، به ترتیب ۱۶ و ۲۸ درصد تفاوت در غیرفعال کردن جمعیت نماتد مشاهده گردید که دامنه این تأثیر بین ۲۴۷ تا ۴۲۵ عدد نماتد است. بنابراین، پیشنهاد می گردد برای اکوتیپ‌های مورد اشاره از غلظت ۵۰ میکرولیتری ساپونین خالص آن‌ها در کنترل نماتد مورد مطالعه استفاده شود.

حسن و همکاران (Hassan *et al.*, 2015) گزارش کردند که اثرات نماتدکشی عصاره حاصل از برگ گیاه زنجبیل شامی (*Inula viscosa*)، میوه‌های خشک زیتون تلخ (*Melia azedarach*)، تمام قسمت‌های گیاه جعفری گل‌درشت (*Tagetes patula*) و برگ‌های اکالیپتوس کامالدول بر روی فعالیت زیستی نماتد ساقه یونجه در مقایسه با آفت‌کش‌های سنتتیک که شامل کربوفوران، متومیل، کرباریل و دیمتوات می‌باشد، دارای اثرات سمی به‌مراتب بیش‌تری بوده‌اند. در این آزمایش، متانول استخراج شده از برگ زنجبیل شامی دارای بیش‌ترین اثر بر روی لارو سن چهار نماتد بود. درصد مرگ و میر لارو بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۷۸ درصد و ۸۲ درصد بوده و برای زیتون تلخ این اعداد به ترتیب برابر با ۷۳ درصد و ۷۷ درصد گزارش گردید.

نتایج تحقیق حاضر با نتایج بررسی شده توسط کاکائی و مظاهری‌لقب (Kakaee & Mzahery–Laghab, 2016) همسویی دارد به نحوی، غلظت یک میلی‌گرم ساپونین استخراج شده از برگ ژنوتیپ‌های چغندرقند بر یک میلی‌لیتر جیره غذایی شته خالدار یونجه، مانع از فعالیت زیستی شته شده و غلظت‌های متوسط باعث کاهش ۵۰ درصدی باروری شته خالدار یونجه گردید. با این حال، Pederson *et al.* (1976) میزان تأثیر شش اکوتیپ یونجه را بر اساس غلظت کم و زیاد ساپونین بر روی شش بیماری، پنج حشره و دو نوع نماتد ریشه‌گرهی و نماتد ساقه مورد ارزیابی قرار داده و گزارش کردند که غلظت بالای ساپونین با مقاومت به شته نخودی، همبستگی دارد، اما با نماتد ریشه‌گرهی و نماتد ساقه یونجه همبستگی محسوسی نداشتند به این معنی که افزایش غلظت ساپونین سبب نشد که گیاه یونجه نسبت به نماتد ساقه یونجه و نماتد ریشه گرهی مقاومت ایجاد کند، اما نسبت به شته نخود سبب ایجاد مقاومت گردید. حال اینکه، از Golawska *et al.* (2006) گزارش شده است که بین ساپونین و مقاومت به شته نخود رابطه معکوس وجود دارد. برخی از مواد شیمیایی (مثل ساپونین‌ها) در بدن نماتد نفوذ کرده و از فعالیت آنزیم استیل کولین‌استراز و استرازهای شبیه کولین‌استراز جلوگیری می‌کنند. بر همین اساس، بازدارنده‌های استیل کولین استراز موجب جلوگیری از فعالیت‌های نماتد، عدم تحرک نماتد و نیز سبب تأخیر در مراحل جلداندازی نماتد می‌شوند (Nelmes, 1970).

با وجود اینکه یونجه حاوی ساپونین‌های تری ترپنوئید است که در برابر حمله آفات و عوامل بیمارگر گیاهی، نقش مهمی دارند احتمالا به دلیل کافی نبودن غلظت آن به‌طور طبیعی در گیاه، نماتد ساقه یونجه می‌تواند در این گیاه ایجاد خسارت نماید. هم‌چنین برخی ارقام و اکوتیپ‌های یونجه

نسبت به *D. dipsaci* مقاوم‌تر هستند که می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع و یا غلظت ساپونین‌های موجود باشد. چنانچه در پژوهش حاضر ساپونین خالص اکوتیپ‌های همدانی، فیض و کریساری نسبت به میاندواب، نیشابوری تاثیر بیشتری بر فعالیت زیستی نماتد ساقه یونجه نشان دادند. نتایج بخش دیگری از این پژوهش نشان داد که واکنش اکوتیپ‌های مختلف یونجه در برابر *D. dipsaci* یکسان نبوده و اکوتیپ‌هایی که ساپونین آن‌ها بر مرگ و میر نماتد تاثیر بیشتری داشتند، میزبان‌های ضعیف‌تری برای این نماتد بودند (Moradi *et al*., 2020).

نتایج یک پژوهش در مورد تاثیر ساپونین‌های یونجه بر نماتدهای مولد غده (*Meloidogyne incognita*) روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی نشان داد که ساپونین‌های استخراجی به طور قابل ملاحظه‌ای منجر به کاهش جمعیت لاروهای سن دو نماتد در خاک و ریشه گوجه‌فرنگی شدند. به‌طوریکه با اعمال ۱۰۰ درصد ساپونین خام، بیش‌ترین میزان کنترل به دست آمد. هم‌چنین، با اعمال ساپونین خام استخراج شده از یونجه، میزان کلسترول موجود در لارو در این نماتدها کاهش پیدا کرد. بنابراین می‌توان گفت حتی ساپونین خام استخراج شده از یونجه، بدون اینکه هزینه بیش‌تری برای خالص‌سازی آن صورت گیرد، می‌تواند جمعیت این نماتد را کنترل کند و از کاهش کیفیت و کمیت محصول یونجه جلوگیری نماید Mervat & Srour, (2013). در مطالعه حاضر، بر اساس جدول ۲، تیمارهای مربوط به اثر متقابل آب مقطر (شاهد)*اکوتیپ، کم‌ترین تأثیر را در مرگ و میر افراد بالغ و لارو *D. dipsaci* داشتند. البته این انتظار وجود داشت که به دلیل نبود ساپونین در تیمار شاهد، نباید نماتدی غیرفعال شود، با این وجود، مشاهده شد که تعداد ۳۱۵ تا ۴۲۰ نماتد و لارو (۲۱ تا ۲۸ درصد) غیرفعال شدند. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که با توجه به اینکه آب مقطر فاقد ساپونین بوده، اما محیط مناسبی برای رشد و فعالیت و تکثیر نماتد مورد مطالعه نبوده و در این مطالعه دارای حداکثر تأثیر ۲۸ درصدی در غیرفعال کردن نماتد و لارو می باشد. پس هرچند آب مقطر به تنهایی عامل کنترل کننده نماتد به حساب نمی‌آید، اما بدون تأثیر هم نمی‌باشد. در پژوهش دیگری مشخص شد میانگین مرگ و میر لارو سن دو نماتد ریشه گرهی با استفاده از تیمار شاهد (آب مقطر) برابر با ۲/۷۵درصد می‌باشد (Kiani & Abdollahi, 2015).

با توجه به معنی‌دار شدن اثرات اصلی اکوتیپ، ساپونین و اثرات متقابل ساپونین*اکوتیپ (جدول ۲)، از تنوع موجود بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه و ساپونین‌های خام و خالص استخراج شده و اعمال دزهای مختلف از آن‌ها می‌توان در انتخاب اکوتیپ‌های مناسب (از جهت اینکه میزبان مناسبی جهت تکثیر نماتد نیستند) در برنامه‌های اصلاحی و کنترل نماتد ساقه یونجه استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد ساپونین تغلیظ شده (نه غلظت طبیعی موجود در اکوتیپ‌های یونجه مورد بررسی، در همه غلظت‌های مورد استفاده منجر به مردن نماتد ساقه یونجه گردید. هرچند بهترین تیمار موثر بر فعالیت *D. dipsaci* از نظر تعداد نماتد غیرفعال شده در غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص مشاهده گردید اما این غلظت با تیمار ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام در اکثر اکوتیپ‌ها تفاوت معنی‌دار نداشت. از آنجاکه خالص‌سازی ساپونین هم زمان‌بر بوده و هم نیاز به هزینه بیشتری دارد، می‌توان گفت بهترین تیمار موثر بر فعالیت زیستی نماتد ساقه یونجه در پژوهش حاضر، غلظت ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام در بیشتر اکوتیپ‌ها به‌ویژه همدانی، پلی‌کراس شیراز، فیض و نیشابوری می‌باشد.

پیشنهادات

پیشنهاد می‌گردد، پژوهش‌هایی با موضوع نحوه تأثیر و مکانیسم اثر ساپونین‌های استخراج شده از در مراحل مختلف رشد یونجه، بر نماتد ساقه یونجه طراحی و انجام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه بوعلی‌سینا بابت تامین امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ی تحقیقاتی که در مدت انجام این

پژوهش در اختیار پژوهشگران قرار گرفت، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Aramideh, SH., Safaralizadeh, M.H., Pourmirza, A.A. & Parvizi, R. 2005. Study on the susceptibility of different larval, prepupa and pupa stages of beet armyworm (*spodopetra exigua* H.) to *steinernema carpocapsae* on sugar beet under laboratory conditions. Journal of Agriculture Sciences and Natural Resources, 12(5):159–166.

D–addabbo, T., Carbonara, T., Leonetti, P., Tava, A. & Avato, P. 2011. Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago* sativa. Photochemistry Reviews, 10:503–519.

De Geyter, E., Lambert, E., Geelen, D. & Smagghe, G. 2007. Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects. Pest Technology, 1(2):96–105.

Douda, O., 2005. Host range and growth of stem and bulb nematode (*Ditylenchus dipsaci*) populations isolated from garlic and chicory. Plant Protection Science, 41(3): 104–108.

Fasihi, M., Tanha–Maafi, Z., Kargar–Bideh, A. & Eskandari, A. 2010. Host ranges variability, multiplication and seed–borne ability of some population of stem and bulb nematode (*Ditylenchus dipsaci*) in IRAN. Iranian Journal Plant Pathology, 46(2): 179–187. (In Persian with English Summary)

Faulkner, L.R., Bower, D.B., Evans, D. & Welgine, J.H. 1974. Mass culturing of *Ditylenchus dipsaci* to yield large quantities of inoculum. Journal of Nematology, 6(3): 126–129.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: A review. British Journal of Nutrition, 88: 587–605.

Golawska, S. Leszczynski, B. & Oleszek, W. 2006. Effect of low and high–saponin lines of alfalfa on pea aphid. Journal of Insect Physiology, 52(7): 737–743.

Golawska, S., Lukasik, I., Wojcicka, A. & Sytykiewicz, H. 2012. Relationship between saponin content in alfalfa and aphid development. Acta Biological Cracoviensia Series Botanica, 54(2):39–46.

Hajihassani, A. 2018. Chemical nematicides for control of plant–parasitic nematodes in georgia vegetable crops. UGA Cooperative Extension Bulletin, 1502.

Hajihassani, A., Tenuta, M. & Robert, H.G. 2017. Monoxenic rearing of *Ditylenchus weischeri* and *D. dipsaci* and microplot examination of the host suitability of yellow pea to *D. weischeri*. Plant protection science, 53(4): 254–264.

Hala, S.I., Hamounda, S.E.S., El–Kady, A.M.A. & Abd–Alla, H.I. 2014. Study the nematicidal efficiency of *Corchorus olitorius*, *Cinnamomum Camphora*, Portulace and *Lantana camara* Extracted saponins and their formulations on root–knot nematodes *Meloidogyne* Spp. Nature and Science, 12(11): 40–45.

Hassan, A., AL–Naser, Z.A. & AL–Asaas, K. 2015. Effect of some plant extracts on larval mortality against the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) and compared with synthetic pesticides. International Journal of Chemistry Technique Reseaech, 7(4): 1943–1950.

IPPC. 2016. International standards for phytosanitary measures. ISPM 27 diagnostic protocols, DP 8: *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*. International Plant Production Convention, 34 p.

Jordan, S.G. 2018. Modeling the spread of alfalfa stem nematodes: Insights into their dynamics and control. https://digitalcommons.usu.edu/etd/7055.

Kakaee, M. & Mazaheri–Laghab, H. 2016. Biological effects of saponin components extracted from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaf on spotted alfalfa aphid (*Therioaphis maculate* Buckten). Journal of Sugar Beet, 31(2): 189–199. (In Persian with English Summary).

Kakaee, M. & Mazahery–Laghab, H. 2014. Evaluation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) germplasm using multivariate statistical analysis. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 22 (1):125–132. (In Persian with English Summary).

Kamalak, A. & Canobolat, O. 2010. Determination of nutritive value of wild narrow–leaved clover (*Trifolium angustifolium*) hay harvested at three maturity stages using chemical composition and in vitro gas production. Tropical Grasslands, 44(2): 128–133.

Katarzyna, R., Paweł, P.P., Olga, W., Bogusław, B. & Ryszard, G. 2016. *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. Phytochemistry Letters, 20: 520–539.

Kiani, G.H. & Abdolahi, M. 2015. Inhibitory effect of aqueous extracts of *capparis spinosa* flower and *ficus carica* leaf on *meloidogyne incognita*, under laboratory condition. Research in plant pathology, 3(1): 37–46 (In Persian with English summary).

Kühnhold, V., Kiewnick, S. & Sikora, R.A. 2006. Development of an in vivo bioassay to identify sugar beet resistance to the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. Nematology, 8: 641–645.

Lamberti, F., Sasanelli, N., D–Addabbo, T., D–Aloisio, V. & De Cosmus, P. 2001. Chemical treatments and soil solarization for the control of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) on onions. Nematologia Mediterranea, 29: 149–152.

Madani, M., Tenuta, M., Chizhov, V.N. & Subbotin, S.A. 2015. Diagnostics of stem and bulb nematodes, *Ditylenchus weischer*i and *D. dipsaci* (Nematoda: Anguinidae), using PCR with species–specific primers. Canadian Journal of Plant Pathology, 37(2): 212–220.

Mazahery–Laghab, H., Yazdi–Samadi, B., Bagheri M. & Bagheri, A.R. 2011. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) shoot saponins: Identification and bio–activity by the assessment of aphid feeding. British Journal of Nutrition, 105: 62–70.

Mervat, I.A.R. & Srour, H.A.M. 2013. Saponins suppress nematode cholesterol biosynthesis and inhibit root knot nematode development in tomato seedlings. Natural Products Chemistry and Research, 2(1): http://dx.doi.org/10.4172/2329–6836.1000123.

Moradi, F., Mazaheri–Laghab, H., Kashi, L. & Moosavi, S.S. 2020. Evaluation of alfalfa ecotypes reactions (*Medicago sativa* L.) to the stem and bulb nematode (*Ditylenchus dipsaci*). Iranian Journal of Plant Pathology. 56(2): 153–162. https://doi.org/10.22034/ijpp.2020.46900. (In Persian with English Summary).

Moses, T., Papadopoulou, K.K. & Osbourn, A. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi–synthetic derivatives. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 49(6): 439–462.

Mousa, E.M., Mahdy, M.E. & Younis, D.M. 2011. Evaluation of some plant extracts to control root–knot nematode *Meloidogyne* spp. on tomato plants. Egyptian Journal of Agro Nematology, 10(1): 1–4.

Mugford, S.T. & Osbourn, A. 2012. Saponin synthesis and function. Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms. pp. 405– 24.https://doi.org/10.1007/978–1–4614–4063–5.

Nazir, j., Gowen, S.R., El–Hasssan, S.A. & Inam–ul–Haq, M. 2008. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root–knot ematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. Crop Protection, 27(1): 36–43.

Nelmes, A.J. 1970. Behavioral responses of *Heterodera rostochiensis* larvae to aldicarb and its sulfoxide and sulfone. Journal of Nematology, 2: 223–227.

Oka, Y., Koltai, H. & Bar–Eyal, M. 2000. New strategies for the control of plant parasitic nematodes. Pest Management Science, 56: 983–988.

Pederson, M.W., Barnes, D.K., Sorensen, E.L., Griffin, G.D., Nielson, M.W., Hill, J.R.R.R., Frosheiser, F.I., Sonoda, R.M., Hanson, C.H., Hunt, O.J., Peaden, R.N., Elgin, J.R.J.J.H., Anderson, M.J., Goplen, B.P., Elling, L.J. & Howarth, R.E. 1976. Effects of low and high saponin selection in alfalfa on agronomic and pest resistance traits and the inter relationship of these traits. Crop Science, 16(2): 193–199.

Poveda, j., Abril–Urias, P. & Escobar, C. 2020. Biological control of plant parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. Froentiers of Microbiology, 11:992. Doi: 10.3389/fmicb.2020.00992.

Tava, A. & Avato, P. 2006. Chemical and biological activity of triterpene saponins from *Medicago* species. Natural Product Communication, 1(12): 1159–1180.

Ustundag, O. & Mazza, G. 2007. Saponins: Properties, applications and processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47: 231–258.

Wei, L. Ya, N.S., Xi, T.Y., Seo, Y.Y., Suk, J.L., Hyo, J.B., Chang, S.M., Byung, S.H. & Young, H.K. 2013. Isolation of nematicidal triterpenoid saponins from *pulsatilla koreana* root and their activities against *meloidogyne incognita*. Molecules, 18: 5306–5316.

Whitehead, A.G. & Hemming, J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology, 55: 25–38.

Yavuzaslanoglu, E., Ates Sonmezoglu, O., & Genc, N. 2018. Molecular characterization of *Ditylenchus dipsaci* on onion in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 151(1):195–200.

Yuksel, O., Albayrak, S., Turk, M. & Sevimay, C.S. 2016. Dry matter yields and some quality features of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Cultivars under two different locations of Turkey. Journal of Natural and Applied Sciences, 20(2): 155–160. https://doi/10.19113/sdufbed.25487.

Investigation of mortality rate of alfalfa stem nematode *Ditylenchus dipsaci* under the influence of saponins of some alfalfa ecotypes (*Medicago sativa*)

Hojatallah Mazaheri Laghab[1], Farzad Moradi[2], Leila Kashi[3], Seyed Saeed Moosavi[4]

1., 2., 4. Associated Professor (Retired), Former Ph.D. Graduated, Associated Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu–Ali Sina University, Hamedan, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu–Ali Sina University, Hamedan, Iran.
Corresponding author: Leila Kashi, email: l.kashi@basu.ac.ir

Received: Sep., 15, 2023 10(2) 95–107 Accepted: Nov., 06, 2023

Abstract
Alfalfa stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) is one of the most important and destructive pests of economic crops such as alfalfa, garlic, onion and tulip. The effects of Saponins from the aerial parts of six alfalfa ecotypes on the mortality of alfalfa stem nematode was investigated under laboratory conditions. In this study. The results showed that among the crude Saponin treatments, the amount of 90 microliters from the Hamedani and Faiz ecotypes had the highest effect with 96% and the amount of 50 microliters from the local Miandoab ecotype 42% had the least effect on the nematode mortality. Also, among the pure Saponins, the amount of 50 microliters of Hamedani, Shiraz–Plycross and Faiz ecotypes with 99%, and the amount of 10 microliters of Nishaburi ecotype with 68% had the highest and lowest effect, respectively, on the mortality of the nematode. In most ecotypes, increasing the concentrations of crude Saponin from 50 to 90 microliters and pure Saponin from 10 to 50 microliters causing 54% and 31% mortalities led to an increase in nematode mortality. It means there is a positive correlation between alfalfa stem nematode mortality and the raw and pure Saponin concentration of alfalfa ecotypes. Subsequently, Hamedani, Faiz and Polycross Shiraz ecotypes showed the highest effect and Miandoab and Nishaburi local ecotypes showed the least effect on the mortality of this nematode.

Keywords: Stem and bulb nematode, control, nematodes mortality