

مقاله تحقیقی

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره آبی گیاهان رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و گزنه (*Urtica dioica*) و اثر نمادکشی آن‌ها روی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*Meloidogyne incognita*).

مرضیه شازده احمدی

محقق، بخش بیوتکنولوژی - مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران، ایران.

مسئول مکاتبات: مرضیه شازده احمدی، ایمیل: noshinshazdeahmadi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

۱۲(۱) ۱۳-۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne sp.*) به دلیل نحوه خسارت و دامنه میزبانی وسیع از نظر اقتصادی از مهم‌ترین نماتدهای پارازیت گیاهی در سطح جهان می‌باشند و سالیانه خسارات جبران ناپذیری را در سراسر جهان به محصولات مختلف کشاورزی وارد می‌سازند. در سالیان اخیر، تحقیقات بسیاری برای دستیابی به ترکیبات گیاهی مناسب، به منظور جایگزین کردن ترکیبات شیمیایی با ترکیبات طبیعی، جهت کنترل نماتدها انجام گرفته است. به منظور دستیابی به روشی مؤثر، کم‌خطر و اقتصادی برای کنترل نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne incognita*) روی گیاه توتون، در این تحقیق، اثر عصاره‌های آبی دانه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و برگ گزنه (*Urtica dioica*) روی عدم تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌های آبی، به روش خیساندن با آب تهیه شدند. بررسی‌ها در دو قسمت آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام شد. همچنین، ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده عصاره آبی گیاهان رازیانه و گزنه با استفاده از دستگاه GC-MS شناسایی شدند. در بررسی آزمایشگاهی، غلظت‌های مختلف عصاره رازیانه به طور معنی‌داری درصد مرگ و میر لاروهای نماتد را نسبت به شاهد افزایش دادند، به طوری که غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد عصاره رازیانه، پس از ۴۸ ساعت، موجب از بین رفتن ۱۰۰٪ لاروهای سن دو نماتد در آزمایشگاه شدند. بالاترین درصد بازدارندگی تفریخ تخم نماتد نیز در غلظت ۲۰ درصد تیمار عصاره رازیانه به میزان ۷۸/۹ درصد در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شد. در بررسی گلخانه‌ای، یک هفته پس از نشاکاری توتون رقم K326، در اطراف طوقه هر بوته، دو سوراخ به عمق ۵ سانتی‌متر ایجاد و جهت تلقیح و مایه‌زنی، به هر گلدان، ۲۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۲۰۰۰ عدد تخم و لارو سن دوم نماتد *M. incognita* به طور مساوی به سوراخ‌ها اضافه گردید. عصاره‌های آبی گیاهان رازیانه و گزنه در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد، در زمان ۱۰ روز پس از مایه‌زنی با نماتد به خاک گلدان‌ها اضافه شدند. حدود دوماه پس از مایه‌زنی با نماتد، گیاهچه‌ها به آرامی از خاک هر گلدان خارج و صفات شاخص گال، تعداد توده تخم، متوسط تخم در هر توده، فاکتور تولید مثل، جمعیت نماتد در خاک و ریشه و درصد کنترل نماتد بررسی و ثبت گردید. طبق نتایج تجزیه واریانس، تمام شاخص‌های مربوط به نماتد در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P < 0.01$). عصاره آبی رازیانه، تأثیر بهتری نسبت به عصاره گزنه داشت و بهترین تأثیر در کنترل نماتد در عصاره آبی رازیانه با غلظت ۲۰ درصد حاصل شد. در مجموع، نتایج تحقیق حاضر، نشان‌دهنده قدرت بازدارندگی و نمادکشی بالای این عصاره‌ها به خصوص، عصاره رازیانه علیه نماتد ریشه‌گرهی توتون (*M. incognita*) بوده است.

واژه‌های کلیدی: توتون، نماتد ریشه‌گرهی، عصاره گیاهی، رازیانه، گزنه.

مقدمه

توتون با نام علمی (*Nicotiana tabacum* L.)، گیاهی از خانواده *Solanaceae* بوده و از محصولات مهم زراعی و صنعتی در جهان به شمار می‌رود. توتون، از نظر اقتصادی، یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی غیر خوراکی است که در اقتصاد کشورهای تولید کننده، نقش بسیار مهمی داشته و درآمد حاصل از فرآورده‌های مختلف این گیاه، رقم مهمی از درآمد ملی کشورهای تولید کننده را تشکیل می‌دهد. توتون، مانند سایر محصولات کشاورزی، مورد هجوم آفات و بیماری‌های متعددی قرار می‌گیرد (Zamani, 2010). در بین نماتدهای انگل گیاهی، نماتدهای ریشه گرهی جنس *Meloidogyne*، یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های کشت محصولات کشاورزی در سراسر جهان محسوب می‌شوند و سالانه خسارت‌های چشم‌گیری از لحاظ کمی و کیفی به محصولات مختلف کشاورزی وارد می‌کنند (Agrios et al., 2010). این نماتدها، پراکنش جهانی دارند، انگل اجباری هستند و دامنه میزبانی وسیعی دارند که بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی را شامل می‌شوند (Sikora & Fernandez, 2005). تقریباً تمامی محصولات زراعی و باغی و علف‌های هرز، مورد حمله یک یا چند گونه از نماتدهای جنس *Meloidogyne* قرار می‌گیرند (Sasser, 1979). میزان خسارت وارده به محصولات زراعی توسط این نماتدها، حدود ۵۰-۳۰ درصد گزارش شده است. کنترل نماتدهای ریشه گرهی، به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، نرخ تولید مثل زیاد و نیز انگل داخلی بودن، دشوار می‌باشد (Siddiqui & Alam, 2001). نماتدهای ریشه-گرهی، انگل داخلی ساکن بوده و خسارت آن‌ها هم به صورت مستقیم در اثر تغذیه نماتد از بافت‌های گیاهی و هم به صورت غیر مستقیم در اثر تعامل و برهم کنش نماتد در خاک با پاتوژن‌های خاکری در گیاهان می‌باشد (Abbas et al., 2009). 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 طوری که موجب طراحی پروژه بین المللی نماتدهای ریشه گرهی (International Meloidogyne

Project (IMP) گردید. خسارت این نماتد در مزارعی که کاشت مداوم محصولات حساس صورت گیرد، بیشتر خواهد بود و در صورت عدم کنترل مؤثر، موجب از بین رفتن کل محصول می‌گردد (Pakeerathan et al., 2009). نماتدهای بیماری‌زا با روش‌های معمول زراعی و شیمیایی کنترل می‌شوند. استفاده از این روش‌ها، به دلیل هزینه بالا، اثر ناقص و غیر اختصاصی بودن، نسبتاً محدود شده است. روش‌های مدیریتی دیگر، شامل تلفیق گیاهان هم‌ستیز (آلوپاتی)، عوامل کنترل بیولوژیک، کودهای شیمیایی، ترکیبات طبیعی گیاهی و اصلاح کنندگان آلی در خاک می‌باشند (Fujii, 2000). با توجه به این‌که اکثر روش‌های کنترل، کارآیی لازم را نداشته و یا در بعضی موارد نظیر مبارزه شیمیایی برای سلامتی انسان و محیط زیست مضر شناخته شده‌اند. در سالیان اخیر، تحقیقات وسیعی بر روی ترکیبات گیاهی مختلف، به منظور جایگزین کردن ترکیبات شیمیایی با ترکیبات طبیعی جهت کنترل نماتدها انجام گرفته است (Oka, 2001). استفاده از مهار زیستی، از روش‌های نوین برای مدیریت نماتدها می‌باشد که دارای مکانیسم عمل اختصاصی، کاربرد آسان، بدون خطرات آلودگی محیط زیست و توانایی تأثیر مفید در ساختار و مواد مغذی خاک می‌باشد (Jatala, 1986).

در سالیان اخیر، تحقیقات وسیعی بر روی ترکیبات گیاهی مختلف، به منظور جایگزین کردن ترکیبات شیمیایی با ترکیبات طبیعی جهت کنترل نماتدها انجام گرفته است. استفاده از گیاهان و فرآورده‌های گیاهی، یکی از روش‌های نوین برای کنترل نماتدها می‌باشد (Khayat et al., 2013). ترکیبات گیاهی، موجب ایجاد رفتارهای نامتدی نظیر جلب یا دفع از ریشه می‌شوند. استفاده از ترکیبات آلی با منشأ گیاهی، به دلیل عوارض جانبی کم‌تر، عدم مقاومت بیمارگر، پایین بودن نسبی هزینه تولید، تجزیه شدن در خاک و عدم آلودگی زیست‌محیطی، می‌تواند به عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی مطرح شود (Ripoll et al., 2003). گزارش‌های بسیاری، فعالیت نماتدکشی گیاهان، علیه نماتدهای انگل گیاهی را به اثبات رسانیده است. تأثیر اسانس‌های گیاهان خانواده *Asteraceae* در سرکوب

مولد گره ریشه (*Meloidogyne javanica*) در گوجه‌فرنگی بررسی شده و علی رغم مشاهده کاهش معنی‌دار جمعیت نهایی، تعداد گره و توده‌های تخم نماتد در همه تیمارهای چریش، بیشترین افزایش رشد گیاه در مقایسه با شاهد در تیمار پودر مغز دانه چریش گزارش شده است (Hosseinienejad, 2004). در پژوهشی که توسط Fathi et al. (1995) انجام شد، ۵ ترکیب گیاهی شامل گرد ضایعات توتون، گرد ضایعات چای، گرد کنجاله میوه درخت چریش، گیاه گل جعفری در مقابل نماتدکش کربوفوران در خاک آلوده به نماتد مورد بررسی قرار گرفته و اثر ترکیبات با منشأ گیاهی نظیر چریش و توتون را در کاهش خسارت نماتد *Meloidogyne* sp. برتر از نماتدکش شیمیایی فورادان ذکر کرده‌اند. در مطالعه‌ای، تخم‌های نماتد *Meloidogyne incognita* در گیاه سویا، در معرض غلظت‌های عصاره ریشه علف هرز سیام (*Chromolaena odorata*)، چریش (*Azadirachta indica*)، کرچک (*Ricinus communis*) و علف لیمو (*Cymbopogon citratus*) قرار داده شد و نتایج نشان داد که همه گیاهان مطالعه شده دارای خاصیت بازدارندگی می‌باشند (Adegbite & Adesiyun, 2005). اثر بازدارندگی عصاره متانولی سه گیاه دارویی شامل، سداب (*Ruta graveolens*)، پونه (*Mentha pulegium*) و ریشه انار (*Punica granatum*) روی درصد مرگ و میر لارو سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و بین تیمارهای مورد بررسی، اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد مشاهده گردید. در بین گیاهان مورد بررسی، بیشترین درصد مرگ و میر مربوط به گیاه سداب بوده و با افزایش غلظت عصاره، خواص نماتدکشی افزایش یافت (Zarebidaki, 2010). عصاره‌های گیاهی مورد استفاده در تحقیق حاضر، از گیاهان رازیانه و گزنه می‌باشد. گیاه رازیانه با نام علمی (*Foeniculum vulgare* Mill.)، گیاهی است علفی و معطر از خانواده *Umbelliferae* است که خواص دارویی و درمانی زیادی دارد. دانه این گیاه، دارای خواص ضد نفخ، افزایش دهنده قدرت بینایی و درمان بیماری‌های قلبی می‌باشد (Mahdavi et al., 2017). گزنه با نام علمی (*Urtica dioica*) از تیره *Urticaceae*

نماتدهای ریشه‌گرهی به اثبات رسیده است (Perez et al., 2003). اثرات عصاره و اسانس برخی از گیاهان معطر، علیه تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه بررسی گردید. نتایج نشان داد که عصاره گل رازیانه (*F. vulgare*)، میزان تفریخ تخم نماتد را به میزان ۲۵ درصد کاهش داد و علیه مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد، دارای ۸۶ درصد تأثیر بوده است (Ibrahim et al., 2006). در پژوهش دیگری، عصاره آبی گیاهان زیره سبز، زیره سیاه، رازیانه و زنیان علیه نماتد *M. javanica* مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج، عصاره آبی زیره سبز، بهترین اثر را در کاهش تعداد لارو سن دوم نماتد و همچنین، کاهش نرخ تولید مثل نماتد نشان داد (Sadeghi et al., 2010). در تحقیق (Javed et al., 2007)، اثرات حفاظتی و درمانی فرمولاسیون عصاره چریش، علیه نماتد *M. javanica* در ریشه‌های گیاه گوجه‌فرنگی گزارش شده است. در پژوهشی، Oka et al. (2000)، ضمن بررسی اثر نماتدکشی اسانس‌ها و ترکیبات حاصل از ۲۷ گونه گیاهی روی نماتد ریشه‌گرهی گونه *M. javanica*، بالاترین اثر نماتدکشی در شرایط آزمایشگاهی را در اسانس گیاهان رازیانه و زنیان از خانواده چتریان مشاهده کردند. در پژوهش انجام شده توسط Katooli et al. (2012)، فعالیت ضد نماتدی گیاهان کرچک و درمنه علیه نماتد مولد گره-ریشه خیار در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آزمایشگاه، بالاترین فعالیت ضد نماتدی مربوط به عصاره الکلی برگ کرچک با ۶۱/۳۳ درصد و برگ درمنه با ۵۵/۶۷ درصد در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، پس از گذشت ۷۲ ساعت بوده است. همچنین، اضافه کردن عصاره به گلدان‌ها، به خوبی توانست که تعداد گال‌ها و جمعیت نماتد را کاهش دهد. همچنین، در تحقیقی، (Nandal & Bhatti, 1986)، اثر عصاره برگ چهار گیاه مختلف را در سه زمان ۳، ۶ و ۹ روز بر تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* مورد بررسی قرار داده و مشاهده نمودند که با گذشت زمان، از تفریخ تخم و مرگ و میر لاروها کاسته می‌شود. در تحقیق دیگری، اثر مشتقات گیاه چریش (*Azadirachta indica*) علیه نماتد

تهیه گیاهچه های توتون

بذور ضد عفونی شده توتون، رقم K326 (حساس به نماتد)، در بستر مناسب شامل خاک پیت، ماسه و پرلیت (۲:۱:۱) داخل گلدان های یک کیلوگرمی که خاک آن ها قبلا در دمای ۸۵ درجه سلسیوس، به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شده بودند، در سینی های نشا کشت داده شدند. گیاهچه های توتون، در مرحله ۴-۵ برگی به گلدان های یک کیلوگرمی منتقل شدند. یک هفته بعد از انتقال نشاها به گلدان، مایه زنی با تعداد ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد *M. incognita* صورت گرفت و گلدان ها در داخل گلخانه بخش گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، با شرایط محیطی یکسان با (دمای 26 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار داده شدند و آبیاری در صورت نیاز، هر ۴-۳ روز یکبار انجام گرفت.

جمع آوری گیاهان مورد مطالعه و تهیه عصاره آبی

برگ گیاه گزنه (*U. dioica*) از طریق جمع آوری در رویشگاه های طبیعی در استان مازندران و دانه گیاه رازیانه (*F. vulgare*) از عطاری های موجود در بازار محلی شهرستان بهشهر در استان مازندران، تهیه شدند. نمونه های تهیه شده، با آب مقطر شستشو داده شدند و در اتاق با دمای حدود 28 ± 2 درجه سلسیوس، دور از تابش مستقیم نور خورشید و با تهویه مناسب خشک شده و سپس، در کیسه های نایلونی تیره نگهداری شدند. برای عصاره گیری، گیاهان خشک شده توسط آسیاب برقی به پودری با ذرات کاملاً ریز تبدیل شدند. عصاره گیری به روش خیساندن و با استفاده از آب مقطر انجام گرفت. برای تهیه عصاره آبی خام، ۱۰ گرم از پودر خشک شده گیاهان مورد نظر، توزین و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر خیسانده شد و با استفاده از پارافیل، درب ظروف حاوی آن پوشانده شد. سپس، به مدت ۲۴ ساعت در rpm ۱۰۰ روی شیکر تکان داده شدند. برای جدا کردن بقایای گیاهی، سوسپانسیون حاصل از پارچه ململ عبور داده شده و پس از سانتریفیوژ کردن به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰، از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده شد.

گیاهی چند ساله، علفی و گل دار است که ارزش غذایی و دارویی بالایی دارد (Babashpourasl et al., 2013). با توجه به اهمیت و خسارت بسیار زیاد نماتد ریشه گرهی (*M. incognita*) در گیاه توتون و همچنین، محدودیت های استفاده از نماتد کش های شیمیایی به دلیل سمیت بالا، میزان بالای مصرف و خطرات زیست محیطی، بروز و ظهور گونه های مقاوم آفت و غیره ناشی از مصرف بی رویه سموم شیمیایی، استفاده از روش های غیر شیمیایی و طبیعی جهت کنترل این نماتد، ضروری به نظر می رسد. لذا، تحقیق حاضر با هدف شناسایی ترکیبات شیمیایی و بررسی اثر غلظت های مختلف عصاره آبی دانه گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و برگ گزنه (*Urtica dioica*) علیه نماتد ریشه گرهی در گیاه توتون انجام شد.

مواد و روش ها

جداسازی، شناسایی و تکثیر نماتد

ریشه های توتون آلوده به نماتد ریشه گرهی به همراه خاک های اطراف آن ها، از مزارع روستاهای اطراف شهرستان گرگان جمع آوری شدند. سپس، با استفاده از تک توده تخم (Single egg mass) جدا شده از ریشه های توتون، تکثیر نماتدها روی گیاه توتون در گلخانه انجام شد. نماتدها روی نشاهای گیاه توتون، رقم K326 (حساس به نماتد) در گلخانه بخش گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، تحت شرایط (دمای 26 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره نوری (۱۴ ساعت: ۸ ساعت) روشنایی به تاریکی) تکثیر شدند. پس از گذشت دو ماه، ریشه های آلوده از گلدان ها خارج و شناسایی گونه نماتد بر اساس برش انتهای بدن و الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده ها و خصوصیات مورفولوژی و شکل شناسی ماده ها و لاروهای سن دوم با استفاده از کلید شناسایی (Jepson, 1987) صورت گرفت، که گونه نماتد مورد مطالعه، *M. incognita* شناسایی شد. پس از چندین دوره تکثیر متوالی نماتد، جمعیت کافی از نماتد ایجاد شد. استخراج تخم و لارو سن دو نماتد با استفاده از روش (Hussey & Barker, 1973) انجام شد.

ظروف کشت با حفره‌های به عمق ۱۹ میلی‌متر و قطر ۱۶ میلی‌متر ریخته شد. سپس، به هر حفره تعداد ۳۰ عدد لارو تازه تفریخ شده نماتد *M. incognita* اضافه شد و سپس، درپوش ظرف روی آن قرار داده شد. مرگ و میر لاروها پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، با استفاده از لام شمارش نماتد و در زیر میکروسکوپ، شمارش و محاسبه گردید. جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاهان رازیانه و گزنه بر تفریخ تخم نماتد، سوسپانسیون حاوی تعداد ۵۰ عدد تخم *M. incognita* در داخل هر کدام از حفره‌های ظروف کشت با حفره‌هایی به عمق ۱۹ میلی‌متر و قطر ۱۶ میلی‌متر قرار داده شد و سپس، به آن یک میلی‌لیتر از عصاره گیاه مورد نظر اضافه شد و سپس، درپوش ظرف روی آن قرار داده شد. تعداد لاروهای سن دوم خارج شده از تخم‌ها، پس از گذشت ۷۲ ساعت ثبت گردید. در این آزمایشات از آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده شد. ارتباط بین غلظت‌های مختلف عصاره آبی و اثر بازدارندگی علیه نماتد، تحت آنالیز پروبیت قرار گرفت و مقادیر LC_{50} برای انتخاب بهترین غلظت‌ها برای ادامه آزمایشات بدست آمد (Naserinasab et al., 2020).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاهان رازیانه و گزنه بر فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در شرایط گلخانه

جهت انجام آزمایشات گلخانه‌ای، نشاکاری با گیاه توتون رقم K326، در گلدان‌های یک کیلوگرمی و حاوی خاک استریل مخلوطی از خاک زراعی، پرلیت و ماسه (۲:۱:۱) صورت گرفت. بعد از گذشت یک هفته از انتقال نشاها به گلدان، در اطراف طوقه هر بوته، دو سوراخ به عمق ۵ سانتی‌متر ایجاد و جهت تلقیح و مایه‌زنی، به هر گلدان حاوی یک بوته توتون، ۲۰۰۰ عدد تخم و لارو سن دوم نماتد *M. incognita* اضافه گردید. عصاره‌های آبی گیاهان رازیانه و گزنه در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد، در زمان ۱۰ روز پس از مایه‌زنی با نماتد به خاک گلدان‌ها اضافه شدند. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام و

(Ferris & Zheng, 1999). عصاره حاصل (۱۰ گرم از پودر گیاه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل) به عنوان محلول پایه ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. برای تهیه سایر غلظت‌های مورد نظر از عصاره، با رقیق کردن آن توسط آب مقطر استریل صورت گرفت. عصاره‌های تهیه شده تا حداکثر یک ماه، درون شیشه‌های تیره رنگ در دمای ۴ درجه سلسیوس داخل یخچال نگهداری شدند.

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره‌ها

به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات عمده تشکیل‌دهنده عصاره آبی گیاهان مورد مطالعه، از روش کروماتوگرافی گازی توأم با طیف سنجی جرمی استاندارد (GC-MS) موجود در بخش شیمی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش استفاده شد. بدین منظور، عصاره‌های گیاهی به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیبات بر اساس شاخص‌های بازدارندگی و مقایسه طیف جرمی آن‌ها با ترکیبات پیشنهادی کتابخانه دستگاه انجام شد. درصد هر ترکیب، با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال‌کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح محاسبه شد. مشخصات دستگاه GC از نوع Shimadzu-GC/MS-SP 2010 مجهز به ستون 1-DB به طول ۶۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، برنامه‌ریزی دمایی ستون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه با افزایش ۴ درجه در دقیقه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، گاز هلیوم و دمای تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس بود.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاهان رازیانه و گزنه بر مرگ و میر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه

برای انجام این آزمایشات، از چهار غلظت (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) از هریک از عصاره آبی برگ گیاه گزنه و دانه گیاه رازیانه در قالب طرح کاملاً تصادفی و با چهار تکرار در دمای اتاق آزمایشگاه ($26 \pm 2^\circ C$) انجام شد. یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مورد نظر به داخل هر کدام از حفره‌های

طبق فرمول $RF = Pf/Pi$ و بر طبق روش (Canto-Saenz, 1983) انجام گرفت که در آن RF فاکتور تولیدمثل، Pf جمعیت نهایی (تخم و لارو سن دوم نماتد)، Pi جمعیت اولیه نماتد (۲۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتد) بوده است. به منظور شمارش نماتدهای داخل بافت ریشه، یک گرم ریشه به کمک محلول اسید فوشین ۰/۱ درصد رنگ آمیزی و با استفاده از استریومیکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفته و جمعیت نهایی در ریشه ثبت شد (Hussey & Barker, 1973). جهت تعیین تعداد نماتدهای موجود در ۱۰۰ گرم خاک، نماتدها با استفاده از روش (Williamson & Hussay, 1996) استخراج و شمارش شدند. شاخص گال به صورت ۰ تا ۱۰ بر طبق روش (Zeck et al., 1971) ارزیابی گردید (جدول ۱).

درصد مرگ و میر نماتد ریشه گری، نسبت به شاهد منفی (آب مقطر)، در انتهای فصل طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{فاکتور تولیدمثل در بیمار - فاکتور تولیدمثل در شاهد} \times 100 = \text{درصد مرگ و میر} \times \frac{\text{فاکتور تولیدمثل در شاهد}}{\text{فاکتور تولیدمثل در بیمار}}$$

از نماتد کش شیمیایی ولوم پرایم® به عنوان شاهد مثبت و از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. در نهایت، گیاهچه‌های توتون، ۶۰ روز پس از مایه‌زنی با نماتد، برای بررسی گیاهچه‌ها، ریشه‌ها به آرامی از خاک خارج، شستشو و ارزیابی از ریشه‌ها و استخراج نماتد از خاک با استفاده از روش جنکینز (Jenkins, 1964) و ریشه با روش کولن و دهرد (Coolen & D. Hered, 1972) انجام شد. با اسلاید شمارش، تعداد نماتد خاک و ریشه شمارش گردید. ارزیابی تیمارها، براساس صفات شاخص گال، تعداد توده تخم، متوسط تخم در هر توده، تعداد جمعیت نماتد در خاک، تعداد جمعیت نماتد در ریشه، فاکتور تولیدمثل و محاسبه درصد مرگ و میر نماتد در هریک از تیمارها انجام شد. شمارش تعداد توده تخم موجود روی ریشه هر گیاه به طور دقیق، طبق روش (Hussey & Barker, 1973) انجام شد. محاسبه فاکتور تولیدمثل (RF)،

جدول ۱- رتبه‌دهی شاخص گال طبق روش زک، ۱۹۷۱

Table 1. Gall index ranking according to (Zack, 1971) method.

Grade	Type of Symptoms
0	Absence of gall.
1	(1-10)% of root infection with nematode gall.
2	(11-20)% of root infection.
3	(21- 30)% of root infection.
4	(31- 40)% of root infection.
5	(41- 50)% of root infection.
6	(51- 60)% of root infection.
7	(61-70)% of root infection.
8	(71-80)% of root infection.
9	(81-90)% of root infection.
10	More than 90% of root infection.

نتایج

تشخیص گونه نماتد

با بررسی نقوش کوتیکولی ناحیه انتهای بدن نماتد ماده (Perineal pattern)، گونه نماتد مورد مطالعه، (*Meloidogyne incognita* تشخیص داده شد (Jepson, 1987).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS (9.1) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد.

آنالیز ترکیبات شیمیایی عصاره ها

نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره آبی رازیانه و گزنه بر اساس کروماتوگرافی گازی شامل نام ترکیب شیمیایی و درصد آن‌ها در جدول ۹ نشان داده شده است.

اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاهان رازیانه و گزنه بر مرگ و میر لاروهای سن دو و عدم تفریح تخم نماتد (*M. incognita*) در شرایط آزمایشگاه

بررسی اثر کنترل کنندگی عصاره‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی نشان داد که غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد هر کدام از عصاره‌ها، بهترین غلظت با توان بالای کنترل-کنندگی بوده و لذا برای انجام آزمایشات بعدی در شرایط گلخانه‌ای، غلظت‌های برتر انتخاب شدند (جدول ۳). نتایج نشان داد که عصاره آبی رازیانه، دارای تأثیر بیشتری نسبت به عصاره آبی گزنه روی نماتد *M. incognita* بود (جدول ۳). بر طبق آنالیز پروبیت، بیشترین سمیت علیه لارو سن دو و تخم نماتد *M. incognita*، در شرایط آزمایشگاهی، بر اساس میزان LC50، به ترتیب مربوط به عصاره آبی رازیانه با (LC50: 605.42) و کمترین سمیت، مربوط به عصاره آبی

گزنه با (LC50: 9621.4) بود (جدول ۴). آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر مرگ و میر لاروهای نماتد در شرایط آزمایشگاه، نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بر کنترل لاروهای سن دوم نماتد در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین ($P < 0.01$)، بعد از گذشت ۲۴ ساعت، همه غلظت‌های عصاره‌های گزنه و رازیانه، سبب افزایش معنی‌دار مرگ و میر لاروها در مقایسه با شاهد (آب مقطر) شدند و بیشترین میزان مرگ و میر لارو نماتد در غلظت ۲۰ درصد عصاره رازیانه و به میزان ۹۷/۱ درصد مشاهده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، در غلظت ۲۰ درصد عصاره رازیانه، مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده شد و اثر عصاره بر مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد در غلظت‌های مورد مطالعه، دارای اختلاف معنی‌دار بود. در تحقیق حاضر مشاهده شد که میزان مرگ و میر لاروهای نماتد با افزایش غلظت و افزایش مدت زمان قرار گرفتن در معرض عصاره‌های گیاهی، نسبت مستقیم دارد.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی و زمان‌های نمونه برداری بر مرگ و میر لارو نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه.

Table 2. Variance analysis the effect of plant extracts and sampling times on the mortality of *M. incognita* nematode larvae in laboratory conditions.

S. O. V	df	Mean Square (MS)	
		24 h	48 h
Treatment	8	416.71 **	498.08 **
Error	27	5.26	4.33
C. V (%)		3.02	2.79

** : Significant at the 1% probability level.

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی و زمان‌های نمونه‌برداری بر مرگ و میر لارو نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه.

Table 3. Mean comparison the effect of plant extracts and sampling times on the mortality of *M. incognita* nematode larvae in laboratory conditions.

Treatment	Concentration (%)	% Mortality	
		24 h	48 h
<i>U. dioica</i>	5	50 ^h	56 ^h
<i>U. dioica</i>	10	64 ^f	70 ^f
<i>U. dioica</i>	15	80 ^d	84 ^d
<i>U. dioica</i>	20	82 ^c	85.8 ^c
<i>F. vulgare</i>	5	54 ^g	60 ^g
<i>F. vulgare</i>	10	73 ^e	77.2 ^e
<i>F. vulgare</i>	15	90 ^b	96.3 ^b
<i>F. vulgare</i>	20	97.1 ^a	100 ^a
Control (Water)	-	0 ⁱ	0 ⁱ

Means by different letters, have significantly difference at 1% probability level, according to LSD test.

جدول ۴- نتایج آنالیز زیست‌سنجی در شرایط آزمایشگاه، جهت بررسی اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره خام گیاهان گزنه و رازیانه علیه تخم و لارو نماتد *M. javanica*.

Table 4. The probit analysis results in bioassay assessments for studying the inhibitory effect of different concentrations of fennel and stinging nettle weed crude extracts on *M. javanica* eggs and Larva mortality under laboratory conditions.

Treatments	LC50	Chi- Square	df	P
Aquatic extract of fennel (<i>F. vulgare</i>)	605.42	81.6	3	0.204
Aquatic extract of nettle (<i>U. dioica</i>)	9621.4	34.2	3	0.251

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر عصاره‌های گیاهی بر درصد بازدارندگی از تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه.

Table 5. Variance analysis the effect of plant extracts on the inhibition percentage of *M. incognita* egg hatching in laboratory condition.

S. O. V	df	MS
Treatment	8	1609.72 **
Error	27	8.12
C. V (%)		6.15

** : Significant at 1% probability level.

جدول ۶- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی بر تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه.

Table 6. Mean Comparison the inhibition percentage of different concentrations of plant extracts on the egg hatching of *M. incognita* in laboratory condition.

Treatment	Concentration (%)	% of inhibition of egg hatching
<i>U. dioica</i>	5	30.3 ^h
<i>U. dioica</i>	10	41.5 ^f
<i>U. dioica</i>	15	51.7 ^d
<i>U. dioica</i>	20	62.3 ^c
<i>F. vulgare</i>	5	36.1 ^g
<i>F. vulgare</i>	10	47.4 ^e
<i>F. vulgare</i>	15	68.9 ^b
<i>F. vulgare</i>	20	78.9 ^a
Control (Water)	-	0

Means that are statistically significantly different from each other are marked with different letters, according to LSD test.

مورد صفت شاخص گال، تیمار شاهد مثبت با شاخص گال ریشه (عدد ۱) دارای کمترین درصد گال ریشه بوده و بعد از آن، تیمار عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد با شاخص گال ریشه، عدد ۳ برتر بودند. تیمار شاهد منفی (آب مقطر) دارای بالاترین شاخص گال ریشه (عدد ۱۰) بوده و در بالاترین گروه آماری a قرار گرفت. از نظر صفت تعداد توده تخم، تیمار شاهد مثبت با کمترین تعداد توده تخم روی ریشه، نسبت به سایر تیمارها برتر بوده و پس از آن، عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد برتر بود. تیمار شاهد منفی دارای بیشترین متوسط تخم در هر توده بوده است. از نظر متوسط تعداد تخم در هر توده تخم، تیمار شاهد مثبت دارای کمترین میزان متوسط تعداد توده تخم روی ریشه بوده و پس از آن، عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد برتر بود. تیمار شاهد منفی دارای بیشترین میزان متوسط تعداد توده تخم بوده است. نتایج مرتبط با محاسبه فاکتور تولیدمثلی (RF) نشان داد که تیمار شاهد مثبت، کمترین میزان فاکتور تولیدمثلی را داشته و پس از آن، عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد قرار گرفت. تیمار شاهد منفی با بالاترین میزان فاکتور تولیدمثلی، در بالاترین گروه آماری a قرار گرفت. از نظر درصد مرگ و میر نماتد، تیمار شاهد مثبت با ۸۶ درصد مرگ و میر، دارای بالاترین درصد کنترل بوده و پس از آن، عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد با ۷۸/۲۵ کنترل، دارای بالاترین درصد کنترل بودند. تیمار شاهد منفی، هیچ گونه اثر

برای بررسی اثر عصاره‌های رازیانه و گزنه بر تفریخ تخم نماتد، درصد بازدارندگی از تفریخ تخم نماتد *M. incognita* محاسبه شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد (جدول ۵). مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها، درصد بازدارندگی تفریخ تخم نماتد نیز افزایش یافت. بیشترین درصد بازدارندگی تفریخ تخم نماتد در عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد و به میزان ۷۸/۹ درصد مشاهده شد (جدول ۶).

اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاهان رازیانه و گزنه بر فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد (*M. incognita*) در شرایط گلخانه

نتایج تجزیه واریانس ارزیابی کارآیی عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه روی فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در تحقیق حاضر، نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر صفات شاخص گال، تعداد توده تخم، متوسط تخم توده، فاکتور تولیدمثلی، درصد مرگ و میر، تعداد جمعیت نماتد در خاک و تعداد جمعیت نماتد در ریشه، اختلاف معنی‌داری در سطح آماری یک درصد وجود دارد (جدول ۷). نتایج مقایسه میانگین ارزیابی کارآیی عصاره‌های گیاهی روی فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در شرایط گلخانه‌ای، نشان داد که در

کنترل روی جمعیت نماتد ریشه گرهی توتون نداشته است. از نظر صفت تعداد جمعیت نماتد در خاک، تیمار شاهد مثبت دارای کمترین میزان بوده و پس از آن تیمار عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد قرار داشت. تیمار شاهد منفی دارای بیشترین میزان بوده و در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفت (جدول ۸).

قرار گرفت. از نظر صفت جمعیت نماتد در ریشه، تیمار شاهد مثبت دارای کمترین میزان بوده و پس از آن، عصاره رازیانه با غلظت ۲۰ درصد قرار داشت. تیمار شاهد منفی دارای بیشترین میزان بوده و در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفت (جدول ۸).

جدول ۷- تجزیه واریانس ارزیابی کارآیی عصاره‌های گزنه و رازیانه روی فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در شرایط گلخانه.

Table 7. Variance analysis the evaluation of efficiency of *F. vulgare* and *U. dioica* extracts on the pathogenic factors of the nematode *M. incognita* in greenhouse condition.

S. O. V	df	Mean Square (MS)						
		Gall index	No. of Egg mass	Avr. of Egg in mass.	Reproduction factor (RF)	Mortality (%)	No. of nematode in the soil	No. of nematode in the root
Treatment	5	16.9 **	387.6 **	1579.58 **	52.3 **	1573.75 **	13795833.3 **	123850000 **
Error	18	0.01	2.3	14.58	0.25	12.23	229166.7	541667
C.V		1.5	4.8	0.76	5.02	6.39	11.87	4.54

** : Significant at 1% probability level.

جدول ۸- مقایسه میانگین ارزیابی کارآیی عصاره‌های گیاهی مورد مطالعه روی فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در شرایط گلخانه.

Table 8. Mean Comparison the evaluation of the efficiency of studied plant extracts on pathogenic factors of *M. incognita* in greenhouse condition.

Row	Treatment	Gall index	No. of egg mass	Avr. of egg mass	Reproduction Factor (RF)	Mortality (%)	No. of nematode in the soil	No. of nematode In the root
1	Extract of <i>U. dioica</i> (15%)	5 ^b	44 ^b	527.5 ^b	16 ^b	51.25 ^e	6000 ^b	25000 ^b
2	Extract of <i>U. dioica</i> (20%)	4 ^c	40.75 ^c	512.5 ^c	13.5 ^c	61.5 ^d	6000 ^b	21000 ^c
3	Extract of <i>F. vulgare</i> (15%)	4 ^c	38 ^d	522.5 ^{bc}	13 ^c	65.25 ^c	4000 ^c	18000 ^d
4	Extract of <i>F. vulgare</i> (20%)	3 ^d	35.25 ^e	508.75 ^d	11 ^d	78.25 ^b	2000 ^d	10000 ^e
5	Negative control (Water)	10 ^a	59 ^a	540 ^a	20 ^a	0 ^f	8000 ^a	32000 ^a
6	Positive control (Chemical nematicide)	1 ^e	10.5 ^f	465 ^e	3 ^e	86 ^a	1000 ^e	5000 ^f

Different letters, indicate a significant difference at 1% probability level, according to LSD test.

جدول ۹- ترکیبات اصلی شناسایی شده عصاره‌های گیاهی توسط دستگاه GC-MS.

Table 9. The main compounds the extracts of *F. vulgare* and *U. dioica* identified by GC – MS.

<i>Foeniculum vulgare</i>			<i>U. dioica</i>		
No.	Phytochemical compounds	Percentage (%)	No.	Phytochemical compounds	Percentage (%)
1	6-methyl-5-Heptane-2-one	3.9	1	2, 4- di- t- butylphenol	5.28
2	Eugenol	1.9	2	Phosphoric acid tributyl ester	4.12
3	Isolongifolene	2.2	3	8- methyl heptadecane	1.20
4	1,7- di- epi- a- cedrene	2.7	4	1- Heptadecane	2.15
5	β -carouphyllene	2.5	5	Eicosane	2.83
6	Geranyl Acetone	1.2	6	Neophytadiene	25.21
7	a- Zingiberene	2.3	7	3,7,11, 15- tetramethyl-2-hexadecyl ester	24
8	Candina – 1,4- diene	23.2	8	Phtaleic acid	8.15
9	Germacrene B	1	9	2,6,10,15-tetramethyl heptadecane	1.17
10	10- Epi- Gamma-Eodesmol	3.2	10	Olean – 18- ene	2.25
11	Benzyl- Benzoate	1.7	11	3,5- di- tert- butyl- ortho-benzoquinone	1.28
12	Flourensiadiol	1.7	12	2,6,10,14- tetra methyl pentadecane	1.45
13	Heneicosane	2.5	13	Dibutylphtaleate	7.37
14	1- Docosene	0.6	14	Henicosane	2.26
15	Tricosane	2.2	15	Hexacosane	2.04
16	Tetracosane	7.5	16	Bis (2-ethyl hexyl) maleate	6.32
17	Heptacosane	6.2	17	Noxacosane	2.72
			18	Pentacosane	1.51

بحث

استفاده از سموم شیمیایی، مؤثرترین روش جهت مدیریت کنترل و مبارزه با نماتد ریشه‌گرهی در جهان می‌باشد. در سالیان اخیر، با توجه به مخاطرات بسیار زیاد ترکیبات شیمیایی، ترکیبات و عصاره‌های گیاهی، جایگزین مناسبی می‌باشند. استفاده از فرآورده‌های گیاهی نماتدکش، به جای ترکیبات شیمیایی در کنترل نماتدها، عوارض جانبی بسیار کمتری به دنبال خواهد داشت و می‌تواند فواید اقتصادی نیز به همراه داشته باشد. نماتدهای ریشه‌گرهی، با نفوذ به داخل ریشه و با ترشح برخی آنزیم‌ها از جمله پروتئاز، متابولیسم میزبان را به نفع خود تغییر می‌دهند (Naserinasab et al., 2020). گیاهان میزبان نیز با ایجاد سلول‌های بزرگ و ازدیاد سلول‌ها در نسوج ریشه، با سنتز اکسین و سایر مواد یا هورمون‌های رشدی به مقابله برخاسته و از حالت طبیعی

خارج می‌شوند. اطراف نماتدهای مهاجم را سلول‌های زیادی احاطه می‌کنند که منجر به تشکیل غده بر روی ریشه می‌شوند. در نتیجه، گیاه میزبان نمی‌تواند وظایف اصلی خود، یعنی تأمین مواد غذایی از طریق جذب مواد در خاک را به خوبی انجام دهد (Vats et al., 1995). در تحقیق حاضر، عصاره گیاهان دارویی رازیانه و گزنه، اثر نماتدکشی مطلوبی را در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند. به طوری که در بالاترین غلظت بکار رفته (۲۰ درصد)، دارای ۱۰۰ درصد تأثیر در مرگ و میر لارو سن دوم و ۷۸/۹ درصد تأثیر در عدم تفریح تخم نماتد *M. incognita* داشتند. در شرایط گلخانه‌ای نیز پس از تیمار نماتدکش شیمیایی با نام تجاری ولوم پرایم که دارای ۸۶ درصد کشندگی بود، عصاره رازیانه ۲۰ درصد، دارای ۷۸/۲۵ درصد کشندگی علیه نماتد *M. incognita* بوده است.

میزان مرگ و میر لاروهای نماتد با افزایش غلظت و افزایش مدت زمان قرار گرفتن لاروها در معرض عصاره، نسبت مستقیم دارد. آنها، همچنین بیان نمودند که با افزایش غلظت عصاره آبی پوست سبز میوه گردو، درصد بازدارندگی از تفریخ تخم نماتد *M. javanica* نیز افزایش یافت (Naseri nasab et al., 2020). محققان زیادی، اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی را روی نماتدها مطالعه کرده‌اند و به این نتیجه رسیده‌اند که غلظت بالاتر عصاره در برابر لارو سن دوم نماتد و تفریخ تخم نماتد مولد گره ریشه، دارای اثر بازدارندگی بیشتری می‌باشد (Sharma & Trivedi, 2002). در پژوهش دیگری، Perez et al. (2003) 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، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

بررسی‌های Sadeghi et al. (2012) نشان داد که اسانس برخی از گیاهان خانواده چتریان، از جمله اسانس گیاهان زیره سیاه (*Bunium persicum*)، زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، زنیان (*Carum copticum*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، سمیت قابل توجهی روی نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاه داشته‌اند. بر اساس گزارش Oka et al. (2001)، 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 ریشه‌گرهی داشته است. اثر بازدارندگی عصاره گیاهان آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و چویل (*Ferulago angulate*) علیه نماتد ریشه‌گرهی (*M. javanica*) در گیاه گوجه‌فرنگی به اثبات رسیده است (Ghezelbash & Abdullahi, 2012). تأثیر بازدارندگی قسمت‌های مختلف درخت چریش (*Azadirachta indica*) و زیتون تلخ (*Melia azadirach*) بر روی نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) در گیاه گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Siddique & Alam, 2001). نتایج تحقیق Shahcheraghi (1980) نشان داد که اضافه کردن غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم عصاره گیاه

رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، گیاهی است که از دانه آن، در طب سنتی به عنوان نیرو دهنده، مقوی معده، اشتهاآور، ضد اسپاسم، آرام کننده، زیاد کننده ترشحات شیر و بادشکن به کار می‌رود. این گیاه، سرشار از فیتواستروژن‌ها از جمله لیگنان است. دانه رازیانه، علاوه بر داشتن ۱۰ تا ۱۲ درصد ماده روغنی، کمی هم ماده قندی موسیلاژ، عصاره و اسانس داشته و دارای اثرات فنی است که عامل اصلی خاصیت دارویی آن محسوب می‌شود. دانه رازیانه، همچنین، دارای فلاونوئیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. عصاره رازیانه دارای ترکیباتی نظیر آنتول، استراگل، متیل اوژنول، آلدئید، کامفن، آلفا فلاندرن، فنون و فنچون استو می‌باشد. مهم‌ترین ترکیب عصاره گیاه رازیانه را آنتول استراگل تشکیل می‌دهد که اهمیت زیادی در صنایع دارویی و عطر سازی دارد (Ghobadi et al., 2017)، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تا حدودی مطابقت داشت.

برگ‌های تازه گزنه، حاوی سکرترین و دارای ۱/۵ درصد کلروفیل خالص، عناصری مانند ازت، گوگرد، فسفر، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، آهن، روی، مولیبدن و مس بوده و برگ خشک گزنه، مقدار ۷/۵ درصد کلروفیل دارد. تری‌ترین‌ها، استرول‌ها شامل بتاسیتوسترول و مواد فنی نیز در گیاه گزنه وجود دارند که شامل کافنیک اسید، فرولیک اسید، سیناپیک اسید، اسکولتین، کافتوتیل مالیک اسید و کلروژنیک اسید می‌باشند (Babashporasl et al., 2013).

که با نتایج تحقیق حاضر، تا حدودی مطابقت داشت. فرآورده‌های گیاهی مختلف، اثرات بازدارندگی متفاوتی بر روی نماتدها دارند. از آن جمله، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. اثر عصاره آبی پوست سبز میوه گردو بر کنترل نماتد ریشه‌گرهی (*M. javanica*) و صفات رشدی در گوجه فرنگی، توسط (Naserinasab et al., 2020) ثابت شده است. نتایج آن‌ها نشان داد که بیشترین میزان مرگ و میر علیه لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica*، بعد از گذشت ۴۸ ساعت، در غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ درصد عصاره آبی پوست سبز گردو به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده شد. بیشترین درصد بازدارندگی از تفریخ تخم نماتد نیز در غلظت ۲۵٪ عصاره به میزان ۷۵/۵٪ مشاهده شد. آن‌ها گزارش کردند که

نیز لخته شدن سیتوپلاسم، مرگ سلول‌های آسیب دیده اتفاق می‌افتد (Ghezalbash & Abdullahi, 2012). اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی، ممکن است به دلیل وجود مواد شیمیایی موجود در عصاره باشد که دارای خواص کشندگی برای جنین و تخم باشد. این مواد شیمیایی، روی رشد جنین، تأثیر گذاشته یا موجب کشته شدن جنین موجود در تخم‌ها شده و یا حتی توده تخم‌ها را در خود حل می‌کنند. احتمالاً برخی مواد شیمیایی موجود در ترکیبات گیاهی، توسط ریشه‌ها جذب می‌شوند و در نتیجه، واکنش‌های زنجیره‌ای به دلیل وجود برخی فاکتورهای موجود در عصاره‌ها (Elicitor/Activator) شروع می‌شود که منجر به القا مقاومت در گیاه نسبت به نماتد می‌شود (Adegbite & Adesiyun, 2005).

نتیجه‌گیری نهایی و پیشنهاد

نتایج تحقیق حاضر بیانگر قابلیت بالای عصاره‌های گیاهی مورد استفاده در کاهش بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*M. incognita*) و نیز خاصیت نماتدکشی آن می‌باشد. با توجه به اینکه عصاره آبی رازیانه در غلظت ۲۰ درصد، بیشترین تأثیر را روی نرخ تفریح تخم و همچنین مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. incognita* روی گیاه توتون در گلخانه داشتند، به عنوان تیمار برتر در این تحقیق معرفی می‌گردد. در نتیجه، عصاره گیاه رازیانه به عنوان گزینه‌ای مناسب جهت کنترل نماتد ریشه‌گرهی توتون، برای انجام تحقیقات بعدی معرفی می‌گردد. پیشنهاد می‌شود که عصاره رازیانه در غلظت‌های مختلف و برای گیاهان هدف مختلف، در جهت دستیابی به مناسب‌ترین غلظت عصاره مورد مطالعه قرار گیرد. این تحقیق، می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای انجام تحقیقات بیشتر در زمینه تولید و معرفی فرمولاسیون‌های مناسب نماتدکش با منشأ طبیعی و دوستدار محیط زیست، قلمداد شود.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از کلیه همکارانی که در انجام این تحقیق، بنده را یاری نمودند، به ویژه از آقای مهندس سید افشین سجادی، به جهت همکاری در انجام کارهای زیست‌سنجی

درمنه (*Artemisia cina*) به هر ۵۰۰ گرم خاک آلوده به نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) می‌تواند تا ۹۹ درصد، این نماتد را کنترل کرده و از بروز این بیماری در گیاه گوجه‌فرنگی، ممانعت به عمل آورد. در تحقیق Hosseini (2004) nejad گزارش شد که مشتقات چریش، در کاهش نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* و افزایش رشد در گیاه خیار نسبت به شاهد، نقش مؤثری داشته است. همچنین، نقش مؤثر عصاره برگ درمنه و کرچک در کاهش جمعیت نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) در خیار، ثابت شده است (Katooli et al., 2010). نتایج تحقیق Ghobadi et al. (2017) حاکی از آن بود که عصاره آبی گیاهان رازیانه و گزنه دارای توان کنترل‌کنندگی بالایی علیه نماتد ریشه-گرهی (*M. javanica*) در گیاه خیار، به ترتیب به میزان ۹۳٪ و ۸۹٪ لارو نماتد و ۷۴٪ و ۶۸٪ گره ریشه در مقایسه با شاهد تیمار شده با آب بودند و عصاره آبی رازیانه، دارای بیشترین اثر در کنترل نماتد (*M. javanica*) و بهبود شاخص‌های رشدی در گیاه خیار داشته است، که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. نتایج تحقیق Sadeghi et al. (2010) نیز اثر کنترل‌کنندگی اسانس خام رازیانه را علیه نماتد ریشه‌گرهی اثبات نمود. نتایج آن‌ها نشان داد که اسانس روغنی رازیانه از توان ۹۳٪ جلوگیری از تفریح توده تخم و ۹۸/۳٪ مرگ و میر لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی در شرایط گلخانه‌ای برخوردار بوده است که با نتایج تحقیق حاضر، مبنی بر عملکرد مؤثرتر عصاره رازیانه روی کنترل نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) در گیاه توتون مطابقت داشت. فعالیت ضد نماتدی پودر خشک گزنه و افزودن مستقیم آن در خاک در زراعت‌های لویا و گوجه فرنگی علیه نماتدهای *Paratylenchus* و *Aphelenchoides* نیز اثبات شده است (Nasiri et al., 2013). باتوجه به تنوع ترکیبات ضد میکروبی موجود در عصاره‌های گیاهی، مکانیسم‌های متفاوتی نیز برای این ترکیبات وجود دارد. این ترکیبات، در اثر فعالیت مشترک و همپوشانی ترکیبات گوناگون دیواره و غشای سلولی بیمارگرها را تخریب و نفوذپذیری و نشت یونی سلول را افزایش می‌دهند. در پی تجزیه لیپیدهای دیواره سلولی، میتوکندری‌ها و پروتئین‌های سلول‌های غشا و

و آقای دکتر غلامرضا مرادی رباطی، به جهت استخراج و تهیه عصاره‌های گیاهی، تقدیر و سپاس‌گزاری می‌گردد.

References

- Abbas, S., Dawar S., Tariq M. & Javed-Zaki M. 2009. Nematicidal activity of spices against *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Pakistan Journal Botany, 41: 2625-2632.
- Adegbite, A. A. & Adesiyun, S. O. 2005. Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible soybean. World Journal of Agricultural Sciences, 1: 18-21.
- Agrios, J. A., Izadpanah, K., Ashkan, S. M., Bani Hashemi, Z., Rahimian, H. & Minasian. 2010. Plant Pathology. Aizh Publications, 3(5): 929.
- Babashpour asl, M., Baghgi, M., Sajjadi, P. & Golalipour, M. C. 2013. A review of various aspects of the medicinal plant nettle (*Urtica dioica* L.) and new research findings. Journal of Babol University of Medical Sciences, 16(1): 54-47.
- Canto-saenz, M. 1983. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. In: C.C. Carter (Ed.). In: Proceedings of the third research & planning conference on root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. International *Meloidogyne* Project. Lima, Peru, pp. 160-165.
- Coolen, W. A. & D'Herde, C. J. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Nematology and Entomology Research. Ghent, Belgium.
- Dropkin, V. H. 1989. Introduction to plant nematology (No. Ed 2nd). John Wiley and Sons Inc. Pub., New York.
- Ghezelbash, N. & Abdullahi, M. 2012. Inhibitory effect of *Zataria multiflora* and *Ferulago angulata* plant extracts on tomato root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in greenhouse conditions. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research Chapter, 29(4): 853-842.
- Fathi, Q., Eshtiaghi, H., Rasouljan, G. & Urumchi, S. 1995. Investigating the effect of several plant products in controlling root-knot nematode at the same time. Articles of the 12th Iranian Herbal-Medicine Congress, P.: 386.
- Ferris, H. & Zheng, L. 1999. Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology, 31: 241-263.
- Fujii Y. 2000. Allelopathy in the Action and Utilization of Allelopathy Substance. Noubunkyo, Tokyo.
- Ghaderi, 2013. Studies on the nematicidal activity of stinging nettle (*Urtica dioica*) on plant parasitic nematodes. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47: 591-599.
- Ghobadi, N., Rakhshande Ro, F. & Saidizadeh, A. 2017. Investigating the controlling effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) and nettle (*Urtica dioica*) leaf extracts on root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in cucumber plants. Journal of Plant Pests and Diseases, 85(2): 167-179.
- Hosseini-najad, S. A. 2004. Effect of neem derivatives (*Azadirachta indica*) on root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato. Journal of Plant Pests and Diseases, 72 (1), p.: 69-89.
- Hussey, R. S. & K. R. Barker, 1973. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp. Including A New Technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.
- Ibrahim, S. K., A. F. Traboulsi & El-Haj, S. 2006. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. Phytopathologia Mediterranea. 45: 238-246.
- Jatala, P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology, 24: 453-489.
- Javed, N. Gowen, S. R., Inam-ul-Haq, M. & Anvar, 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. Journal of Crop protection, 26: 530-534.
- Jepson, S. B. 1987. Identification of Root-Knot Nematode (*Meloidogyne*) Species. CAB International, Wallingford, UK, 265pp.
- Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Report, 48: 6999.
- Katooli, N., Mahdikhani Moghadam, A. & Maqsoodlou, R. 2010. Investigating the effect of the extract of fennel and castor leaves in reducing the population of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber. Journal of Agricultural Ecology, 2(4): 592-587.
- Khayat, F., Mahdikhani Moghadam, A., Rouhani, H. & Azizi, M. 2013. Investigating the nematicidal efficacy of eucalyptus, clove and barijeh essential oils on the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in laboratory conditions. Journal of Plant Protection (Agricultural Sciences and Industries), 28(3). P: 345-338.
- Mahdavi, S., Alizad, M., Sajjadi, P. & Baghegi, M. 2017. Study of antioxidant and antibacterial effects of ethanol extract of fennel seed (*Foeniculum vulgare* Mill.). Journal of Babol University of Medical Sciences, 19(5): 32-38.
- Naserinasab, F., Heydari, R., Sanjarian, F. & Rakhshande Ro, F. 2020. Investigating the effect of aqueous extract of the green peel of walnut fruit on the control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and growth traits in tomato plants. The biannual journal of plant disease research, 6(1): 1-16.

- Nasiri, M., K. Azizi, H. Hamzehzarghani & Ghaderi, R. 2013. Studies on the nematocidal activity of stinging nettle (*Urtica dioica*) on plant parasitic nematodes. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47: 591-599.
- Nandal, S. N. & Bhatti, D. S. 1986. Influence of four plant extracts on the hatching of *Meloidogyne javanica* and invasion of host roots. Journal of Nematology, 14: 291- 294.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Zohara, Y. & Spiegel, Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. Phytopathology, 90: 710-715.
- Oka, Y. 2001. Nematicidal activity of essential oil components against the root-knot nematode *M. javanica*. Nematology, 3: 159-164.
- Pakeerathan, K., Mikunthuan, G. & Tharshani, N. 2009. Eco-Friendly Management of Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofid and White) Chitwood Using Different Green Leaf Manures on Tomato under Field Conditions. American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences, 6: 494-497.
- Perez, M.P., Navas -Cortes, J.A., Pascual-Villalobos, M.J. & Castillo, P. 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. Plant Pathology, 52: 395-401.
- Ripoll, C., Favery, B., Lecomte, P., Van Damme, E., Peumans, W., Abad, P. & Jouanin, L. 2003. Evaluation of the ability of lectin from Snowdrop (*Galanthus invalid*) to protect plants against root- knot nematodes. Plant Science, 164: 517-523.
- Sadeghi, Z., Mahdikhani Moghadam, A. & Azizi, M. 2010. Investigating the nematocidal effect of the essential oil of a number of medicinal plants of the *Apiaceae* family on the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in laboratory conditions. Journal of Plant Protection (Agricultural Sciences and Industries), 24(1): 62-68.
- Sadeghi, Z., Mahdikhani Moghadam, A. & Azizi, M. 2012. Evaluation of herbal products to control the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato. Journal of Plant Diseases, 48(2): 155-163.
- Sasser, J.N., 1979. Economic importance of *Meloidogyne* to tropical countries: 359-374. In: Lamberti, F. and Taylor, C.E., (Eds.). Root-knot Nematodes (*Meloidogyne spp.*) Systematics Biology and Control. Academic Press, New York, London, San Francisco, 477p.
- Sharma, N. & Trivedi, P.C. 2002. Screening of leaf extract of some plants for their nematocidal and fungicidal properties against *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporium*. Asian Journal of Experience Science, 16 (1): 21-28.
- Siddiqui, M.A. & Alam, M.M., 2001. Screening of tomato varieties/lines for resistance against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). The IPM Practitioner, 23: 9-11.
- Sikora, R.A. & Fernandez, E., 2005. Nematode parasites of vegetables: 319-392. Sikora, R.A. and Bridge, J., (Eds.). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, UK, 896p.
- Shahcheraghi, M. 1980. Evaluation of the nematocidal effect of *Artemisia cina* to fight against root tuber nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plant. Master's thesis in the field of plant pathology. Faculty of Agriculture, Shiraz University.
- Vats, R., Nandal, S.N. & Dalal, M.R. 1995. Efficacy of different plant extracts for managing root knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. Haryana Agricultural University Journal of Research, 25(3): 113-116.
- Williamson, V.M. & Hussay, R.S. 1996. Nematode Pathogenesis and Resistance in Plant. The Plant Cell, 8: 1735-1745.
- Zare Bidaki, A. 2010. Inhibitory effects of extracts of several medicinal plants in controlling root-knot nematode in tomato. Master's thesis in the field of plant pathology. Faculty of Agriculture, Zabol University, 183 pages.
- Zamani, P. 2010. Cultivation and processing of tobacco. Publications of Iran Tobacco Company, 1(3): 160 pages.
- Zeck, W.M. 1971. A rating scheme for field evaluation of root knot nematode infestations. Pflanzenschutz-Nachrichten. Bayer AG, 24: 141-144.

Identification of chemical compounds of aqueous extracts of fennel (*Foeniculum vulgare*) and nettle (*Urtica dioica*) plants and their nematicidal effect on tobacco root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*).

Marziyeh Shazdehahmadi

Researcher, Biotechnology research department, Tirtash Tobacco Research and Education center, Behshahr, Mazandaran, Iran.

Corresponding author: Marziyeh Shazdehahmadi, email: noshinshazdeahmadi@yahoo.com

Received: Oct., 21, 2024

12(1) 13–28

Accepted: Nov., 23, 2024

Abstract

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) are one of the most important plant parasitic nematodes in the world, due to the way of damage and the wide range of hosts, which attack many plants and annually cause irreparable damage to crops all over the world. In recent years, numerous studies have been conducted to identify suitable plant compounds to replace chemical agents with natural alternatives for nematode control. This research aimed to develop an effective, low-risk, and economical method for managing root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tobacco plants by investigating the effects of aqueous extracts from fennel seed (*F. vulgare*) and nettle leaf (*U. dioica*) on the non-hatching of eggs and the mortality of second instar larvae of *M. incognita*. Aqueous extracts were prepared by soaking them with water. Investigations were carried out in two parts: laboratory and the greenhouse. Also, the chemical compounds of the aqueous extracts of *F. vulgare* and *U. dioica* plants were identified using GC-MS. In a laboratory study, different concentrations of the extract significantly increased the mortality rate of nematode larvae, so that the concentrations of 15% and 20% of *F. vulgare* extract, after 48 hours, caused the destruction of 100% of the old larvae. Two became nematodes. The highest inhibition percentage of nematode egg hatching was also observed in the treatment of *F. vulgare* extract with a concentration of 20% and 78.9% in laboratory conditions. In a greenhouse survey, one week after transplanting with K326 tobacco, two holes with a depth of 5 cm were made around the crown of each plant, and for inoculation and seeding, 2000 eggs and second instar larvae were placed in each pot. The nematode *M. incognita* was added. Aqueous extracts of *F. vulgare* and *U. dioica* plants in concentrations of 15 and 20% were added to the soil of the pots 10 days after inoculation with nematodes. About two months after inoculation with nematodes, the seedlings gradually emerged from the soil of each pot, and the characteristics of Gall index, the number of egg mass, average egg per mass, reproduction factor, nematode population in the soil and roots and the percentage of nematode control were investigated. and notes were taken. According to the results of analysis of variance, all the indicators related to nematodes showed a significant difference at the level of 1% ($P < 0.01$). Aqueous extract of *F. vulgare* had a better effect than *U. dioica* extract, and the best effect in nematode control was obtained in aqueous extract of *F. vulgare* with a concentration of 20%. In total, the results of research have shown the high inhibitory and nematicidal power of these extracts, especially *F. vulgare* against *M. incognita*.

Keywords: tobacco, root-knot nematode, plant extract, fennel, nettle.