نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران
دوره۴- شماره ۱- پیاپند ۶- بهار و تابستان ۱۴۰۰

نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) و مدیریت آن در مزارع آویشن‌باغی (*Thymus vulgaris*)

Meloidogyne javanica and its management on Thyme (*Thymus vulgaris*) fields

فاطمه آزاد دیسفانی[1*]، سارا قارونی کاردانی[1]، منصور صلاتی[1]

۱. استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران ، (*نگارنده مسئول)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۲ - شناسانهٔ برنمود رقمی:10.22092/mpt.2022.357857.1093

چکیده

آزاد دیسفانی، ف.، قارونی کاردانی، س.، صلاتی، م.، . نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) و مدیریت آن در مزارع آویشن‌باغی (*Thymus vulgaris*)
نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۴ - شماره ۱- پیاپند ۶- بهار و تابستان ۱۴۰۰ صفحه: ۹۸-۸۴

آویشن‌باغی (*Thymus vulgaris* L.) از جمله گیاهان دارویی مهم بوده که علاوه بر مصارف دارویی، در صنایع غذایی، بهداشتی و آرایشی نیز کاربرد دارد. اسانس آویشن به دلیل وجود تیمول و کارواکرول دارای اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی می‌باشد. نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) از تمام نقاط دنیا بر روی بسیاری گیاهان از جمله گیاهان دارویی گزارش شده‌اند. گونه‌های مختلف این جنس در سطح جهان، مهم‌ترین جنس در بین نماتدهای گیاهی بوده و یکی از پنج عامل درجه اول بیماری‌زا در گیاهان به شمار می‌آیند. طی بازدیدهای به عمل آمده در بهار ۱۴۰۰، از مزارع استان خراسان رضوی (اطراف مشهد)، علایمی نظیر پژمردگی، زردی و کم رشدی در بوته‌های آویشن باغی مشاهده گردید. به‌منظور بررسی عامل این عارضه، نمونه‌هایی از خاک و ریشه در این مزارع جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت شناسایی گونه نماتد، از خصوصیات ریخت‌شناسی لارو و نیز شکل برش انتهایی بدن نماتد ماده استفاده شد و در نهایت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آلودگی نمونه‌ها به *Meloidogyne javanica* تایید گردید. درسال‌های اخیر بدلیل افزایش سطح زیرکشت گیاهان دارویی، استفاده فراوان از آنها در تهیه داروها و نیز مطالعات پراکنده‌ای که در کشورهای مختلف از جمله ایران پیرامون نماتدهای انگل گیاهان دارویی وجود دارد، گسترش سیستم‌های جدید شناسایی و پایش می‌تواند نقش حیاتی در مدیریت موثر نماتدهای انگل گیاهان دارویی ایفا کند. هدف از این مقاله، شناسایی و ردیابی عامل بیماری در نمونه‌های دارای علائم مشکوک نماتدی در گیاه آویشن باغی و ارائه راهکارهای مدیریتی آن می‌باشد.

واژه های کلیدی: گیاهان دارویی، مدیریت بیماری، نماتد مولد گره ریشه، شناسایی، PCR.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: (fa.azad@areeo.ac.ir)

مقدمه

آویشن باغی با نام علمی *Thymus vulgaris* گیاهی علفی و چند ساله می‌باشد. این گیاه متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae) بوده و در نواحی مختلف مدیترانه و برخی نواحی آسیا می‌روید و امروزه در مناطق مختلف جهان و از جمله ایران کشت و تولید می‌شود (Naghdi badi and Makkizade, 2004). تعداد گونه‌های جنس آویشن در محدوده فلور ایرانیکا ۲۱ گونه بوده که ۱۸ گونه آن متعلق به کشور ایران است (Rajabi Mazhar *et al*., 2011) که ۱۴ گونه گزارش شده جنس Thymus در ایران بیشترین پراکندگی را در شمال و غرب کشور دارند. سرشاخه‌های آویشن حاوی اسانس، مواد اصلی تلخ، ساپونین‌ها و ضدعفونی‌کننده‌های گیاهی می‌باشند که معمولا شامل یک درصد اسانس بوده و بخش اعظم آن را فنل‌ها (۸۰-۲۰٪)، هیدروکربن‌های مونوترپنی و الکل‌ها تشکیل می‌دهند. اسانس آویشن از جمله ۱۰ اسانس معروف بوده که مهم‌ترین ماده تشکیل‌دهنده آن تیمول نام دارد. آویشن دارای اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی است و این خاصیت به‌دلیل وجود تیمول و کارواکرول در اسانس آویشن است (Garivani *et al*., 2005). آویشن در طب سنتی به‌عنوان آرام‌بخش، محرک جنسی و خلط‌آور، همچنین کمک به درمان مشکلات رماتیسمی و پوستی به‌کار می‌رود و خواص دارویی آن به‌دلیل روغن‌های فرار و ضروری موجود در گیاه است که حدود ۱/۲ تا ۵ میلی‌لیتر روغن فرار به‌ازای هر کیلوگرم از بخش‌های گیاه آویشن استحصال می‌شود (Devansh, 2021).

تاکنون عوامل بیماری‌زای متعددی از آویشن گزارش شده است که شامل *Botrytis cinerea* (عامل کپک خاکستری آویشن)، *Fusarium oxysporum* (عامل بیماری پژمردگی و بوته‌میری فوزاریومی)، *Phytophthora nicotiana* (عامل پوسیدگی طوقه و ریشه)، *Golovinomyces biocellatus* (عامل سفیدک سطحی آویشن)، *Puccinia serpylli* (عامل زنگ آویشن) و *Meloidogyne javanica* (عامل بیماری ریشه‌گرهی) می‌باشد (Rajabi *et al*., 2011; Zhang and Fu, 2016; Martini *et al*., 2006; Hashemi Kheibar *et al*., 2014; Haghighian and Sadeghi, 2015).

نماتدها موجوداتی با تنوع بالا و پیچیده بوده که ساکن خاک، دریا و آب‌های جاری هستند و از نواحی گرمسیری تا قطب‌ها زندگی می‌کنند(Hassan *et al*., 2013). تا این تاریخ تاکنون نزدیک به ۴۱۰۰ گونه نماتد انگل گیاهی گزارش شده است (Pulavarty *et al*., 2021) که خسارت سالانه آن‌ها به کشاورزی سراسر جهان در حدود ۱۰۰ بیلیون دلار تخمین زده می‌شود (Oka *et al*., 2000).

میزان خسارت به گیاهان دارویی توسط نماتدهای انگل گیاهی حتی تا ۳۰ درصد نیز گزارش شده است (Tien *et al*., 2019). در مطالعه‌ای در زمینه نماتدهای انگل همراه با چند گیاه دارویی در کشور هند، شش جنس نماتد از جمله *Meloidogyne* به‌عنوان نماتدهای شایع گیاهان دارویی مطرح شده و در این میان دو گیاه مریم‌گلی و بادرنجبویه حساس‌ترین گیاهان به نماتد *Meloidogyne incognita* تشخیص داده شدند(Khan and Sharma, 1996). همچنین در بررسی دیگری پیرامون رابطه نماتدهای انگل گیاهی با ریشه گیاهان دارویی در هند، نماتدهای مولد گره به‌همراه نماتد مارپیچی(*Helicotylenchus*) از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهان دارویی تشخیص داده شدند (Sheela *et al*., 1998).

از جمله اولین تحقیقات پیرامون نماتدهای انگل گیاهان دارویی در ایران می‌توان به بررسی‌های صورت گرفته توسط اخیانی (۱۹۷۹) اشاره کرد. وی چندین گیاه دارویی از جمله بارهنگ، شاهدانه، جعفری، زبان‌گنجشک، نعنا و گشنیز را به‌عنوان میزبان‌های گونه‌های مختلف نماتدهای ریشه‌گرهی از نقاط مختلف ایران از جمله اصفهان معرفی نمود. در پژوهشی بر روی ۱۰ گیاه مختلف در شمال ایران از جمله افسنطین، فلفل‌قرمز، گوجه‌فرنگی، ریحان، زیتون، ترشک درختی، انار، رز و بنفشه‌شیرین و بنفشه‌وحشی دو نماتد *M. javanica* و *M. incognita* جداسازی و شناسایی شدند (Davarian *et al*., 2008). در مجموعه گیاهان دارویی و معطر باغ گیاه‌شناسی ایران نماتدهای متعلق به خانواده Tylenchidae از تنوع گونه‌ای بیشتری برخوردار بودند. به‌طوری که *M. hapla* از مجموعه گیاهی زاگرس و گیاهان دارویی، *M. incognita* از مجموعه گیاهان دارویی و *M. javanica* از کرفس وحشی در مجموعه گیاهی زاگرس و گیاهان دارویی گزارش شدند (Sohrabi *et al*., 2018). در تحقیقی بر روی میزان حساسیت برخی گیاهان دارویی به نماتد، گیاهان بابونه، انجدان رومی و خارمریم به‌عنوان گیاهان فوق حساس به *Meloidogyne javanica* و گیاهان رازیانه، آنغوزه‌باغی، خاکشیر، چای‌کوهی، گندنای‌کوهی، عروسک‌پشت‌پرده و بارهنگ انگلیسی جز گیاهان حساس به *Meloidogyne javanica* مشخص شدند (Ansari *et al*., 2019).

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 (Pegard *et al*., 2004).

نماتدهای ریشه‌گرهی، انگل داخلی ساکن بوده و رابطه تغذیه‌ای با میزبان خود برقرار کرده و آن را وادار به تولید ساختارهای تغذیه تخصص یافته‌ای به نام سلول‌های غول آسا[1] می‌کنند که برای تغذیه و رشد نماتد ضروری است (Pegard *et al*., 2004).

کنترل نماتد ریشه‌گرهی به‌دلیل دامنه میزبانی وسیع، سرعت بالای تکثیر، کوتاهی مدت زمان نسل (بین ۲۰ تا ۳۰ روز در خاک‌های گرمسیری)، فعالیت به‌صورت انگل داخلی و نیز برهم‌کنش با سایر بیمارگرهای خاک‌زی نظیر قارچ‌ها نسبت به سایر نماتدها دشوارتر می‌باشد (Natarajan *et al.,* 2006).

شناسایی نماتد مولد گره‌ریشه براساس خصوصیات ریخت‌شناسی لاروهای سن دو، گره استایلت نر، خصوصیت الگوی انتهای بدن ماده‌ها[2] و نیز موقعیت قرارگیری منفذ ترشحی می‌باشد. مشخصه‌های مورفولوژیکی جنس ماده، نر و لارو سن دو نماتد ریشه‌گرهی به طور گسترده مطالعه شده و هنوز به‌طور وسیع جهت تایید شناسایی گونه‌ها به کار می‌رود. الگوی انتهای بدن ماده‌ها یکی از مهم‌ترین مشخصه‌های مورفولوژیکی جنس ماده بوده و در تشخیص گونه‌ها به کار می‌رود. به دلیل تنوع وسیع درون گونه‌ای *Meloidogyne*، این مشخصه‌ها تقریبی بوده و می‌تواند منجر به ایجاد تردید در شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* گردد (Bhau *et al*., 2016). به همین جهت برای تفکیک گونه‌ها و نژادهای جنس *Meloidogyne*، علاوه بر خصوصیات ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی، سیتولوژیک، اکولوژیک و بیماری‌زایی بر روی میزبان‌های افتراقی، از

1 Giant cell

2 Perineal Pattern

روش‌های ملکولی بر پایه DNA کروموزومی، DNA میتوکندریایی و DNA ریبوزومی نیز استفاده می‌شود (Zijlstra *et al*., 2000).

در بازدیدهایی که از مزارع آویشن‌باغی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی صورت گرفت علائـمی شبیه علائم بیماری‌های نماتدی شامل مشاهده لکه‌ای بوته‌های پژمرده، کم‌رشد و حتی خشکیدگی بوته‌های آویشن مشاهده گردید. با توجه به اهمیت بیماری و ارزش بالای این گیاه در صنایع مختلف در کشور و شناسایی عوامل مختلف محدودکننده کشت این محصول، هدف از انجام این تحقیق، شناسایی و ردیابی عامل بیماری در نمونه‌های دارای علائم نماتدی و ارائه راه‌کارهایی جهت مدیریت بیماری در مزارع آلوده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در نمونه‌برداری‌های انجام شده از مزارع آویشن‌باغی کشت شده در مجموعه گیاهان دارویی ایستگاه تحقیقاتی طرق (مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی) در بهار ۱۴۰۰، گیاهانی با علائم مشکوک نماتدی شامل کم‌رشدی و توقف رشد، ضعف عمومی، پژمردگی و خشک‌شدن بوته‌ها به‌صورت پراکنده و لکه‌ای مشاهده گردید (شکل۱). نمونه‌هایی از ریشه و خاک اطراف ریشه گیاهان دارای علائم مشکوک به عمق ۳۰-۵ سانتی‌متر تهیه و پس از مخلوط کردن زیرنمونه‌ها، یک نمونه دو کیلویی از هر خاک آماده شد و در کیسه‌های پلاستیکی جداگانه با ثبت مشخصات نمونه به آزمایشگاه منتقل گردید. شستشو و استخراج نماتدها از خاک با استفاده از روش تکمیلی الک و سانتریفوژ صورت گرفت (Jenkins, 1964). شناسایی گونه نماتد جدا شده از ریشه براساس مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لاروهای سن دو و ماده‌های بالغ، همچنین خصوصیات نقوش کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها صورت گرفت (Hartman and Sasser, 1985). پس از تفریخ تخم‌ها، جهت کشتن و تثبیت لاروهای سن دو از روش اصلاح شده دگریسه (De Grisse, 1969) استفاده شد. نماتدهای بالغ با تیغ جراحی از داخل گره‌ها در زیر بینوکولر جداسازی شده و از شبکه کوتیکولی انتهایی بدن ماده‌ها و همچنین لاروهای سن دوم با استفاده از حلقه پارافین اسلاید دائمی تهیه گردید و با استفاده از میکروسکوپ اولیمپوس مورد بررسی قرار گرفت.

در شناسایی مولکولی نماتد، با استفاده از کیت استخراج DNA از مخلوط لاروهای سن دوم و تخم هر نمونه، DNA استخراج گردید. غلظت DNA استخراج شده در چگالی نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ تعیین شده و مناسب‌ترین نسبت جذب نور جهت انجام PCR اعداد ۱/۷ تا ۱/۹ در نظر گرفته شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمر از با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fjav (5'-GGTGCGCGATTGAACAGAGC-3') و Rjav (5'-CATATCAAGGTGACTTCCCGGAC-3') (Karajeh *et al*., 2010) و با استفاده از کیت لیوفیلیزه PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با برنامه حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشت‌سازی ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه شامل دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک مرحله بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، صورت گرفت. جهت انجام الکتروفورز افقی، از ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی دو میکرولیتر

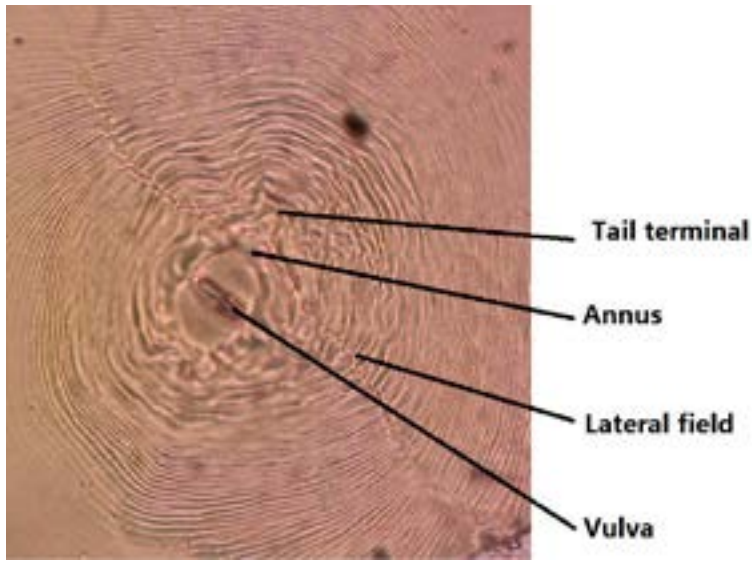
شکل۱- ظهور لکه ای علائم زردی، پژمردگی و توقف رشد بوته های آویشن باغی آلوده به نماتد مولد گره ریشه (جمع آوری شده از استان خراسان رضوی)

Green viewer به‌همراه بافر TBE 1X الکتروفورز استفاده گردید و در نهایت عکس‌برداری از باندهای تشکیل شده در ژل توسط دستگاه ژل داک انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس مطالعات ریخت‌سنجی و مشخصات لارو سن دو و نقوش انتهای بدن نماتد ماده بالغ، گونه مورد بررسی *M. javanica* تشخیص داده شد که مشخصات آن با توصیف گونه (Jepson, 1987) مطابقت داشت. شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها، دارای دو خط موازی یکدیگر در سطوح جانبی بدن بود، به‌طوری‌که این خطوط، شبکه کوتیکولی انتهای بدن را به‌صورت واضحی به دو بخش پشتی و شکمی تقسیم می‌کند (شکل ۲). نماتدهای ماده بالغ گلابی‌شکل و شیری‌رنگ با گردنی نسبتا بلند و خمیده و به‌طول ۷۱۰-۵۵۰ میکرومتر و قطر ۴۱۰-۳۵۰ میکرومتر بودند (شکل ۳). لاروهای سن دو کرمی شکل، باریک و دارای دم کم و بیش نوک‌دار، سر نسبت به بدن کمی فرورفته، استایلت قوی با گره‌های استایلت گرد و متمایل به طرف عقب و بطول ۴۵۰-۴۲۰ میکرومتر و قطر ۳۲-۳۰ میکرومتر بودند (شکل ۴). تخم‌ها نیز در درون کیسه بزرگی که بوسیله سلول‌های اطراف راست روده ترشح می‌شوند، قرار دارند.

بوته‌های آویشن آلوده به *M. javanica*، دارای علایم کم‌رشدی، زردی، پژمردگی و به‌ندرت



شکل۲- نقوش انتهای بدن (perineal pattern) نماتد ماده بالغ

Meloidogyne javanica

شکل۳- نماتد ماده بالغ *Meloidogyne javanica*

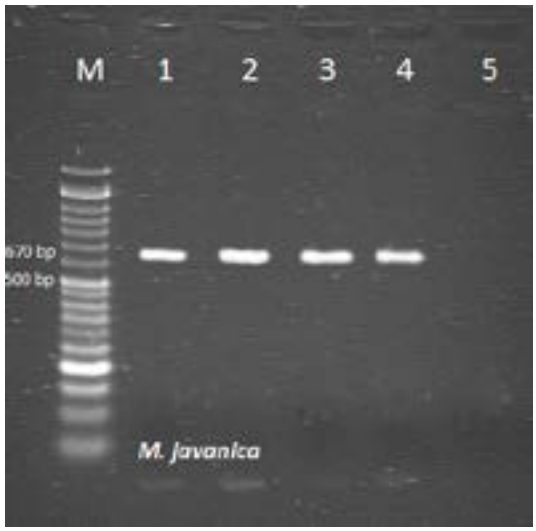
شکل۴- لارو سن دوم نماتد *Meloidogyne javanica*

خشکیدگی بودند و از آنجا که این نماتد به‌تنهایی باعث خشکیدگی بوته نمی‌شود، احتمال همراهی سایر عوامل بیماری‌زا در این خصوص می‌باشد. کیسه‌ی تخم نماتد بر روی ریشه‌های آلوده آویشن در زیر بینوکولر نیز قابل رویت بود. این اولین گزارش از آلودگی گیاه آویشن به نماتد ریشه گرهی در استان خراسان‌رضوی می‌باشد.

این نماتد پیشتر از ریشه گیاه آویشن در اصفهان جداسازی و گزارش گردیده است (Nasresfahani *et al*., 2006). گزارش دیگر *M. javanica* بر روی ریشه آویشن‌باغی در استان چهارمحال و بختیاری به ثبت رسیده است (Haghighian and Sadeghi, 2014). در بررسی نصر اصفهانی و همکاران (۲۰۰۶) از ۲۵ گیاه دارویی مورد بررسی، ۲۱ نوع گیاه شامل همیشه بهار، فراسیون، گل گاوزبان ایرانی و خارجی، علف‌چای، افسنطین، شنگ، بابونه، آویشن، باباآدم، مریم‌گلی، سیب‌زمینی‌ترشی، شمعدانی‌معطر، رزماری، مارتیغال، بادرنجبویه، روناس، بومادران گل‌سفید، اسطوخودوس و کرفس میزبان *Meloidogyne javanica* شناخته شدند و از بین آنها همیشه‌بهار، علف‌چای، افسنطین، بابونه، آویشن، مریم‌گلی، رزماری، بادرنجبویه و کرفس با تعداد بیش از ۱۰۰ گال و شاخص گال پنج به‌عنوان حساس‌ترین گیاهان به نماتد گره‌ریشه در بین گیاهان دارویی مورد کشت در ایستگاه شناخته شدند (Nasresfahani *et al*., 2009 a). از ۲۶ نوع گیاه دارویی کشت شده در ایستگاه نجف‌آباد، پنج نوع گیاه شامل سداب، قیچ، باباآدم، همیشه بهار و شاهدانه به‌عنوان میزبان *Meloidogyne javanica* شناسایی شدند. از ۱۴ نوع گیاه دارویی کاشته شده در ایستگاه تحقیقات بیابان‌زدایی کاشان شش نوع گیاه شامل اسطوخودوس، بومادران، گل‌زرد، درمنه‌کوهی، رنگین‌زرد و آگاو به‌عنوان میزبان *Meloidogyne incognita* شناسایی شدند (Nasresfahani *et al*., 2009 b).

درآزمایشات مولکولی، جفت آغازگر Fjav/Rjav یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی در نمونه‌های آلوده و شاهد مثبت تکثیر کرد، حال آن‌که در شاهد منفی (آب) این قطعه تکثیر نگردید (شکل ۵). این بررسی با نتایج (Zijlstra *et al*., 2000) مطابقت دارد. آنها طی استخراج DNA از توده تخم و لارو سن دوم و ماده‌های بالغ با استفاده از جفت آغازگر OPQFjav/OPARjav و تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت بازی، گونه *M. javanica* را از دیگر گونه‌ها متمایز نمودند و اثبات کردند که این روش به سن و مرحله رشدی نماتد بستگی نداشته و روشی سریع، قابل اعتماد و همیشگی برای تایید گونه می‌باشد.

همچنین طی بررسی دیگری که برای شناسایی جمعیت‌های مختلف نماتد گره ریشه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Mjavf/Mjavr انجام گرفت، با تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت بازی و همچنین بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و فنوتیپ آنزیمی گونه *M. javanica* شناسایی گردید (Dong *et al*., 2001). سایر مطالعات در دنیا با استفاده از همین پرایمراختصاصی در تایید گونه *M. javanica* با نتایج تحقیق حاضر منطبق می‌باشد (Mostafa *et al*., 2021; Carrillo-Fasio *et al*., 2020; Zeng *et al*., 2018). این در حالی است که استفاده از پرایمر عمومی D2A/D3B اگرچه شاید در ۹۹ درصد موارد گونه *M. javanica* را شناسایی نماید ولی به‌عبارتی برای تشخیص بین گونه‌های نزدیک و مرتبط باهم مانند نماتدهای ریشه‌گرهی گرمسیری کافی به‌نظر نمی‌رسد (Riascos *et al*., 2019). اگرچه توالی تعدادی از



شکل۵- الکتروفورز محصول PCR بوته های آویشن آلوده
به نماتد با استفاده از جفت آغازگر Fjav/Rjav و تکثیر
قطعه ۶۷۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، ستون M:
مارکر ۱۰۰ جفت باز، ستون ۱: شاهد مثبت، ستون ۲-۴: نمونه های
آویشن آلوده به نماتد *M.javanica*، ستون ۵: شاهد منفی (آب).

ژن‌ها نظیر SSU 18S, LSU 28S, ITS مربوط به نماتد مولد گره بسیار حفاظت شده‌اند، اما شناسایی و تشخیص نماتدهای گره‌ریشه در سطح گونه خصوصا برای سه گونه گرمسیری این نماتد (*M. javanica, M. arenaria, M. incognita*) بسیار دشوار است و این مسئله شاید دلالت بر اشتقاق هر سه گونه از یک گونه و یا به‌دلیل کمپلکسی از گونه‌ها باشد. حال آن‌که با استفاده از آنالیز SCAR این سه گونه از یکدیگر قابل تمایز هستند (Zeng *et al*., 2018).

سایر پژوهش‌های انجام گرفته در ایران با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت بازی در مورد *M. javanica* نیز موید نتایج این تحقیق می‌باشد (Katooli *et al*, 2021; Askarian *et al*., 2009; Ghaderi *et al*., 2020; Mireki *et al*., 2015). بطور کلی جهت شناسایی گونه *M. javanica* استفاده از روش‌های ملکولی بر پایه مارکرهای SCAR در مقایسه با ریخت‌شناسی (که روشی مشکل، زمان‌بر و نیازمند مهارت بوده) و روش‌های بیوشیمیایی (که تحت تاثیر شرایط محیطی و نیازمند مرحله خاصی از سیکل نماتد هستند)، روشی بسیار سریع، دقیق و قابل اعتماد است و لیکن بهتر است از این مارکرها به‌عنوان مکملی در کنار بررسی‌های ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی بهره برد. ضمن این‌که این مارکرها برای شناسایی گونه‌های جنس مناسب بوده ولی از آن‌جا که قطعات تکثیری توسط این آغازگر در مناطق جغرافیایی مختلف، تفاوتی نشان نمی‌دهند، لذا در بررسی تنوع درون گونه‌ای مناسب نمی‌باشد.

نماتد ریشه گرهی باعث کاهش وزن خشک پونه، شوید، نعنا فلفلی، دکمه‌طلایی (تانسی) و آویشن در آزمایشات مکرر شد. اما وزن خشک برخی گیاهان نظیر ریحان، گشنیز، مرزنجوش، مریم‌گلی و افسنطین کاهش پیدا نکرد و جالب این‌که در این میان رزماری تنها گیاهی بود که وزن خشک نمونه آلوده بیشتر از

گیاه شاهد بود. همچنین این آزمایشات نشان داد که گیاه آویشن حتی در بالاترین سطح از آلودگی تا حدی به نماتد گره‌ریشه متحمل می‌باشد. این درحالی است که نعنا فلفلی، مرزنجوش و پونه‌کوهی به‌عنوان گونه‌های متحمل یا مقاوم به نماتد تعیین شدند. (Walker, 1995)

منابع زیادی در دنیا و ایران وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس روغنی، پودربرگ و عصاره گیاه آویشن دارای اثرات کشندگی روی نماتد ریشه‌گرهی است (Fayaz *et al*., 2017; Ntalli *et al*., 2020; Ozdemir and Gozel, 2017) ولی گزارشی از اثرات آلودگی آویشن به نماتد گره و تاثیر بر خاصیت دارویی و یا میزان اسانس استحصالی از آن در دسترس نمی‌باشد. نماتد مولد گره در مرحله تخم چنان‌چه شرایط مساعد باشد، باعث تفریخ تخم و ظهور لارو سن دوم می‌شود و چنان‌چه شرایط نامساعد باشد در همان مرحله تخم زمستان‌گذرانی می‌کند. این نماتد از طرق مختلف نظیر عدم رعایت بهداشت زراعی، جابه‌جایی قلمه، نشا و خاک آلوده، چسبیدن خاک آلوده به ماشین‌آلات کشاورزی، پای دام هنگام چرا و کارگران در مزرعه و نیز آب آبیاری آلوده گسترش می‌یابد. از آن‌جا که دامنه میزبانی این نماتد بسیار وسیع می‌باشد، رعایت بهداشت زراعی و حذف علف‌های هرز میزبان نماتد از اهمیت زیادی در پیشگیری و کنترل برخوردار است. از طرفی به‌دلیل استفاده فراوان از گیاهان دارویی در تهیه داروها، لازم است بیشترین میزان مراقبت در مورد بیماری در این دسته از گیاهان به عمل آید.

یافته‌های ترویجی

با توجه به چرخه‌های زندگی متعدد و بقای طولانی نماتد در خاک، توصیه جدی به پیشگیری از ورود عامل بیماری شامل بازرسی اندام‌های گیاهی قبل از ورود به منطقه، استفاده از قلمه و نشا غیرآلوده و گواهی‌شده، تعیین سالم بودن خاک قبل از کشت در مزرعه جدید، استفاده از خاک سالم در خزانه، گلدان و سطوح کوچک، ارسال مواد مشکوک به آزمایشگاه، جلوگیری از چرای حیوانات در مزرعه و شستن ماشین‌آلات قبل و بعد از استفاده می‌باشد. لذا پایش مداوم مزارع آویشن توسط کارشناسان نقش مهمی در این رابطه دارد.

بهترین روش کنترل نماتدها، استفاده از مدیریت تلفیقی نماتدها[3] (INMP) می‌باشد، بدین معنا که کنترل موثر و عملی یک بیماری نماتدی حاصل ترکیبی از چندین روش یا تلفیقی از روش‌های کنترل است. از جمله روش‌های مورد استفاده در مدیریت تلفیقی نماتدها روش‌های فیزیکی از جمله گرمادهی می‌باشد. روش گرمادهی شامل ضدعفونی خاک با بخارآب در دمای معین و نیز آفتاب‌دهی می‌باشد. خاک بستر نشا آویشن را می‌توان با استفاده از دستگاه‌های سترون‌کننده خاک و از طریق حرارت سالم‌سازی کرد. در روش آفتاب‌دهی که روشی بسیار مناسب در کشور ما در فصل تابستان می‌باشد، از طریق کشیدن پلاستیک‌های روشن بر سطح خاک، باعث بالا بردن دمای خاک و کنترل انواع بیماری‌های خاک‌زاد ازجمله نماتدها می‌شود. در این روش می‌توان از کودهای حیوانی، آلی و شیمیایی نیز استفاده نمود. تناوب زراعی روش دیگری در مدیریت تلفیقی نماتدها است. اگرچه در مورد نماتد گره ریشه به‌دلیل داشتن دامنه میزبانی وسیع که شامل علف‌های‌هرز نیز می‌باشد تناوب زراعی مناسب را با مشکل روبرو می‌کند و لذا در این موارد توصیه به آیش گذاشتن زمین است.

3Integrated Nematodes Management Programs

کنترل شیمیایی و استفاده از نماتدکش‌ها علاوه بر هزینه بالا، به‌دلیل سمیت بالا، بقایای سموم و مخاطرات زیست محیطی خصوصاً برای گیاهان دارویی توصیه نمی‌شود و امروزه تلاش‌ها به سمت استفاده از عوامل میکروبی برای کاهش جمعیت نماتد و ایجاد خاصیت مهارکنندگی بیشتر خاک جهت مقابله با بیماری‌های نماتدی است. لذا استفاده از روش کنترل بیولوژیک و استفاده از پتانسیل آنتاگونیستی خصوصا عوامل قارچی و باکتریایی در کنترل نماتد مولد گره‌ریشه موفقیت آمیز بوده است. یکی دیگر از روش‌های موثر و مقرون به‌صرفه استفاده از ارقام مقاوم به نماتد است. به‌طوری که استفاده از این ارقام خصوصا در تلفیق با برنامه‌های دیگر کنترل یکی ازموثرترین روش‌ها می‌باشد. در سال‌های اخیر با توجه افزایش سطح زیرکشت گیاهان دارویی، نیاز به مطالعات گسترده‌تر پیرامون مدیریت نماتدهای بیماری‌زای گیاهان دارویی می‌باشد، لذا شایسته است بررسی آلودگی گیاهان دارویی نسبت به سایر نماتدها، برآورد خسارت آنها و نیز راهکارهای مدیریتی مقابله با آن در اولویت طرح‌های تحقیقاتی در کشور قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از جناب آقای مهندس براتعلی غلامی و جناب آقای دکترمجید دشتی، ریاست محترم بخش تحقیقات جنگل و مرتع مرکزتحقیقات و آموزش کشاورزی ومنابع طبیعی خراسان رضوی، به‌خاطر هماهنگی و فراهم نمودن امکانات لازم جهت بازدید

و نمونه‌برداری صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

References

Akhiani**,** A. 1979. Final report of project, Investigation of harmful nematodes, weeds and fruit trees in Isfahan province. Research Institute of Forests and Rangelands, 190 p.

Ansari, S., Charegani, H. and Ghaderi, R. 2019. Resistance of ten common medicinal plants to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Hellenic Plant Protection, 12: 6-11.

Askarian, H., Sharifnabi, B., Olia, M., Mahdikhani Moghadam, E. and Akhavan, A. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* using morphological and morphometerical characters and species specific primers. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science, 13(47): 279-289.

Bhau, B. S., Borah, B., Ahmed, R., Phukon, P., Gogoi, B., Sarmah, D. K., Lal, D. K. and Wann, S. B. 2016. Influence of root-knot nematode infestation on antioxidant enzymes, chlorophyll content and growth in *Pogostemon cablin* (Blanco) benth. Indian Journal of Experimental Biology, 54: 254-261.

Carrillo-Fasio, J. A., Angúlo-Castro, A., Martínez-Gallardo, J. A., Ayala-Tafoya, F.,Yáñez-Juárez, M. G. and Retes-Manjarrez, J. E. 2020. Distribution and incidence of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on pepper in Sinaloa, Mexico. Tropical Plant Pathology, Springer: 1-6.

Davarian, T., Taheri, A., Pourjam, E. and Hemmati, K. 2008. Identification of medicinal hosts for root-knot nematodes in the north of Iran. 5th International congress of Nematology. Australia, 202 p.

De Grisse, A. T. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques utilissisedans letude des namatodes phytoparasutaires. Meded rijksfaculteit der landbouwetenscheppen. Gent, 34: 351-359.

Devansh, M. 2021**.** Objective Review of *Thymus vulgaris*: A Review with Latest Updates on Pharmacological Properties and Phytoconstituents. Planta Activita, 1: 1-3.

Dong, K., Dean, R. A., Fortnum, B. A. and Lewis, S. A. 2001. Development of

PCR primers to identify species of root-knot nematodes*: Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica.* Nematropica, 31: 271-280.

Fayaz, M., Fadaei Tehrani, A., Mohammadkhani, A. and Tadayon, M. 2017. Investigation of the effect of three medicinal plants of the mint family on pathogenicity and damage *Meloidogyne javanica* on tomato. Plant Protection, 30(4): 547-552.

Garivani, G., Sharifi Ashorabadi, E., Safari, S. and Mirza, M. 2005. Final report of project, effects of cultivation and domestication on a number of thymus apecies in different climatic condition –Khorasan. Research Institute of Forests and Ranelands. 166 p.

Ghaderi, R., Dehghan, A., Mokaram Hesar, A. and Karegar, A. 2020. Genetic intraspecific diversity of *Meloidogyne javanica* parasitizing vegetables in southern Iran. Journal of Nematology, 52:1-13.

Haghighian, F. and sadeghi, E. 2014. Investigation of pests, diseases and weeds of different *Thyme* spp. in Chaharmahal va Bakhtiari province. Iranian Journal of Forest and Range Protection, 12 (2): 130-136.

Hartman, K.M. and J.N. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. PP. 69-77. *In:* Barker, K.R., C.C. Carter and J.N. Sasser (Eds.), An Advanced Tretise on *Meloidogyne*, Methodology, NCSU.

Hashemi Kheibar, Z., Sadeghi, E., Hanifeh, S. and Larti, M. 2014. Investigation of pests, diseases and weeds of different *Thyme* spp. In West Azerbaijan province. 2th national conference on climate change and its impact on agriculture and the environment, 8 p.

Hassan, M. A., Pham, T. H., Shi, H. and Zheng, J. 2013. Nematodes threats to global food security. Acta Agriculturae Scandinavica, 63 (5): 420–425.

Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant diseases, 48: 692.

Jepson, S.B. 1987. Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). CAB International, Wallingford, UK.

Karajeh, M. R., Abu-Gharbieh, W. I. and Masoud, S. A. 2010. DNA extraction and

PCR-based diagnosis of the Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species and Races) of Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 6(3): 342-352.

Katooli, N., Moghadam, E. M. and Aghnum, R. 2021. Identification and distribution of root-knot nematode species in pomegranate orchards of eastern Iran. Pakistan Journal of Phytopathology, 33(2): 293-297.

Khan, M. L. and Sharma. G. C. 1996. Plant parasitic nematodes associated with medicinal plant in Himachal Pradesh. Pest Management and Economic Zoology, 4(1, 2): 77-80.

Martini, P., Cassicola, S. O., Savona, S. and Bozzano, G. 2006. Root and basal stem rot caused by *Phytophthora nicotianae* on Thyme in Liguria. Acta Horticulturae, 723: 477-480.

Mireki, K., Abdollahi, M., Mohaghegh Dovlat Abadi, M. and Ghazalbash, N. 2015. Application of morphological characters and PCR- SCAR markers for identification of dominant species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in glasshouses of cold region of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Iran. Biotechnology in Agriculture, 13(1): 1-8.

Mostafa, R. G., El-Zawahry, A. M., Khalil, E. M., Elfarash, A. E. and Allam, D. A. 2021. Morphological, morphometrical and molecular identification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infecting banana in assiut governorate, Egypt. Journal of Phytopathology and Pest Management, 8(1):71-78.

Naghdi Badi, H. and Makkizade, M. 2003. Review of common thymus (*Thymus vulgaris* L.). Journal of Medicinal Plants, 7:1-12.

Nasresfahani, M., Ahmadi, A., Karimipoor-fard, H. and Almasi, H. 2009 a. Medicinal plant parasitic nematodes in Isfahan province. Iranian Journal of Forest and Range Protection, 6 (2) : 142-152.

Nasresfahani, M., Bagheri, R., Jalali, S., Ahmadi, A., Tabatabaei, R. and Ansaripoor, B., 2006. Phonetic study of pests, diseases and weeds of medicinal plants in Isfahan. National Conference on Sustainable Development of Medicinal Plants, Mashhad, 383 p.

Nasresfahani, M., Karimipoorfard, H. and Ahmadi, A. 2009 b. Evaluation of infection status of medicinal plants with root-knot nematodes in Isfahan

province. Plant Disease, 44: 99-101.

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

Ntalli, N. G., Ozalexandridou, E. X., Kasiotis, K. M., Samara, M. and Golfinopoulos, S. K. 2020. Nematicidal activity and phytochemistry of Greek Lamiaceae species. Agronomy, 10: 1-11.

Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M. and Sharon, E., 2000. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. Pest Management Science, 56: 983-988.

Ozdemir, E. and Gozel, U. 2017. Efficiency of some plant essential oils on root-knot nematode *Meloidogyne incognita.* Journal of Agricultural Science and Technology, 7:178-183.

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.

Pulavarty, A., Egan, A., Karpinska, A., Horgan, K. and Kakouli-Duarte, T. 2021. Plant Parasitic Nematodes: A Review on their behaviour, host interaction, management approaches and their occurrence in two sites in the republic of Ireland. Plants, 10: 1-16.

Rajabi Mazhar, N. A., Sadeghi, S. E. and Adel, F. 2011. Pest and disease associated with *Thymus* in Hamedan province. Iranian Journal of Forest and Range Protection, 9(1): 26-36.

Riascos, D. H., Mosquera-Espinosa, A. T., Agudelo, F. v., Rosa, J. M. O., Oliveira, C. M. G. and Muñoz, J. E. 2019. Morphological, Biochemical, and molecular diagnostics of *Meloidogyne* spp. associated with *Musa* spp. In Colombia. Nematropica, 49(2): 229-245.

Sheela, M. S., Rajani, T. S. and Mehtra, V. K. 1998. Status of phytonematodes as a part of medicinal plants in Kerala: Proceeding of the third international

symposium of Afro-Asian society of nematologist. Coimbatore.India, 2-5.

Sohrabi, E., Tanha Maafi, Z., Panahi, P. and Barooti, S. 2018. Plant parasitic nematodes associated with some of forest and medicinal species of National Botanical Garden of Iran. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 16(1): 72-87.

Tien, N. H., Duyen, N. T., Huy, L. D., Neriza, N. and Phap, T. Q. 2019. Diversity of plant-parasitic nematodes on medicinal plant in Melinh station for biodiversity, Vinh Phuc province, Vietnam. Academia Journal of Biology, 41 (3): 19-24.

Walker, J. T. 1995. Garden herbs as hosts for southern root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Hortiscience, 30(2): 292-293.

Zeng, J., Zhang, Z., Li, M., Wu, X., Zeng, Y. and Li, Y. 2018. Distribution and Molecular Identification of *Meloidogyne* spp. parasitising Flue-cured Tobacco in Yunnan, China. Plant Protection, 54(3): 183-189.

Zhang, S. and Fu, Y., 2016. First report of gray mold of German thyme (*Thymus vulgaris*) caused by *Botrytis cinerea* in Florida. Plant Diseases, 100(5):1-2.

Zijlstra, C., Donkers-venne, D. and Fargette, M., 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology, 2: 847-853.

Meloidogyne javanica and its management on Thyme *(Thymus vulgaris)* fields

Fatemeh Azad Disfani [1*], Sara Gharouni-Kardani[1], Mansour Salati[1]

1. Assisant Professor, Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Mashhad, Iran . (Corresponding author)

Received: February 2022 Accepted: May 2022 - DOI: 10.22092/mpt.2022.357857.1093

Abstract

Azad Disfani, F., Gharouni-Kardani, S., Salati, M., *Meloidogyne javanica* and its management on Thyme *(Thymus vulgaris) fields*
Iranian Medicinal Plants Technology, Vol 4, No. 1, 2020-21 13-14: 84-98(in Persian)

Abstract:

Thymus vulgaris (L.) is one of the most important medicinal plants that in addition to medicinal uses, is also used in food, health and cosmetic industries. Due to Thymol and Carvacrol, its essential oil has antifungal and antibacterial effects. *Meloidogyne* spp. have been reported from all over the world on medicinal plants. They are the most important genus among plant parasitic nematodes and one of the five major pathogens in the world. During a survey in the Spring of 2021, thyme plants with withering, foliage yellowing, and stunting symptoms and plant death were observed in some regions of Khorasan-Razavi province (Iran). Root and soil samples were collected from areas of thyme fields. Morphological diagnosis was conducted on larvae and perineal pattern of females and Finally, the species identification of *M. javanica* was confirmed using Polymerase Chain Reaction (PCR). In recent years, due to the increase in the area under cultivation of medicinal plants, the extensive use of them in production of medicine and few studies in this field on medicinal plants in Iran, development of new systems for

Email address of the corresponding author: fa.azad@areeo.ac.ir)

detection, identification and monitoring can play a vital role in effective management of plant parasitic nematodes in medicinal plants. The aim of this study is detection and identification of the nematode disease agent, affecting thyme plants and and providing management solutions.

Keywords: Disease management, Medicinal Plants, Root Knot Nematode, Identification, PCR