نشریه علمی فناوری و گیاهان دارویی ایران
دوره۶- شماره ۱- پیاپند ۱۰-بهار و تابستان ۱۴۰۲

مقایسه فعالیت نماتدکشی برخی از اسانس‌ها، متابولیت *Pochonia chlamydospora* و متام سدیم روی نماتد *Aphelenchoides besseyi* در شرایط آزمایشگاهی

Comparison of nematicidal activity of some essential oils, *Pochonia chlamydospora* metabolites and metham sodium on *Aphelenchoides besseyi* under laboratory condition

غلامرضا نیکنام[۱]، زهرا قربانی[۲]، سمانه خسروانی[۲*]، رقیه کریم‌زاده[۳]، سعید زهتاب سلماسی[۱،۴]

۱. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران ، (نگارنده مسئول)
۳. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۴. دانشیار و مدیر تحقیقات، مرکز علوم کشاورزی پایدار در آلکالد، گروه علوم گیاهی و محیطی، دانشگاه ایالتی نیومکزیکو، ایالات متحده آمریکا.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲ - شناسانهٔ برنمود رقمی: 10.22092/mpt.2024.366826.1167

چکیده

نیکنام، غ.، قربانی، ز.، خسروانی، س.، کریم‌زاده، ر.، زهتاب‌سلماسی، س.، . مقایسه فعالیت نماتدکشی برخی از اسانس‌ها، متابولیت *Pochonia chlamydospora* و متام سدیم روی نماتد Aphelenchoides besseyi در شرایط آزمایشگاهی
نشریه علمی فناوری وگیاهان دارویی ایران، دوره ۶ - شماره ۱- پیاپند ۱۰-بهار و تابستان ۱۴۰۲ صفحه: ۱۲۹-۱۱۳

نماتد شاخ‌وبرگ و جوانه *Aphelenchoides besseyi* باعث بیماری کوتولگی تابستانه توت‌فرنگی می‌شود و بسیاری از میزبان‌های گیاهی دیگری از جمله برنج، پیاز، سیر، ذرت شیرین، سیب‌زمینی شیرین و سویا و همچنین تعدادی از گیاهان زینتی پیازدار را مبتلا می‌کند. رویکردهای مدیریتی نماتدهای انگل گیاهی بیشتر مبتنی بر تناوب زراعی، ارقام مقاوم، اندام‌های تکثیری و بذر عاری از نماتد و سموم شیمیایی است. با توجه به اثرات نامطلوب و خطرناک نماتدکش‌های شیمیایی برای انسان و محیط‌زیست، جست‌وجو و استفاده از روش‌های جایگزین ایمن ضروری است. در این مطالعه اثر فعالیت نماتدکشی اسانس‌های بذر رازیانه(*Foeniculum vulgare*)، آنیسون(*Pimpinella anisum*)، زنیان(*Carum copticum*) و گیاهان خشک‌شده آویشن(*Thymus vulgaris*) و نعناع(*Mentha spicata*)، متابولیت‌های فرار *Pochonia chlamydospora* مورد بررسی قرار گرفت. متام سدیم به عنوان نماتدکش شیمیایی و شاهد مثبت در برابر نماتد در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، نماتد روی محیط کشت PDA حاوی قارچ*Alternaria alternata* تکثیر شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی در چهار تکرار و با نه تیمار با استفاده از نماتد های ۱۵ روزه انجام شد و مرگ‌ومیر نماتدهای بالغ پس از فواصل ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت شد. پس از ۲۴ ساعت مقادیر LC_{50} برای اسانس‌های رازیانه، آنیسون، زنیان و آویشن به‌ترتیب ۱۸۴۶، ۱۵۱۲، ۳۷۱۵ و ۱۷۵۵۰ و برای متام سدیم ۱۷/۴۲۵ تعیین شد. همچنین مقادیر LC_{90} به‌ترتیب ۲۴۶۶، ۲۸۷۲، ۵۵۸۶، ۳۲۹۹۰ و برای متام سدیم ۳۳/۱۱۴ محاسبه شد. برای شناسایی اجزای بیوشیمیایی اسانس‌ها از کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی(GC-MS) مجهز به ستون DB5 استفاده شد. ترکیبات اصلی اسانس رازیانه و آنیسون، زنیان، آویشن، نعناع به ترتیب Trans-Anethole، Gamma-Terpinene، Thymol، Geraniol بودند که براساس درصد مرگ و میر نماتد پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت اثر نماتدکشی متفاوتی را در برابر *A. besseyi* می‌باشند. اسانس آنیسون با کم‌ترین LC_{50} (1512) پی‌پی‌ام به‌عنوان موثرترین و اسانس آویشن با بیشترین LC_{50} (17550) پی‌پی‌ام به‌عنوان کم تاثیرترین اسانس در بین ترکیبات مورد مطالعه روی مرگ ومیر *A. besseyi* مشخص شد. همچنین اسانس نعناع و متابولیت قارچ در شرایط آزمایشی این مطالعه، تاثیری روی مرگ ومیر *A. besseyi* نداشت.

واژه های کلیدی: اسانس روغنی، مهار زیستی نماتد، نماتد شاخ وبرگ، کروماتوگرافی گازی.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: khosravani.uni76@gmail.com

مقدمه

Aphelenchoides besseyi نماتد انگل گیاهی است که گیاه توت‌فرنگی را مورد حمله قرار داده و بیماری کوتولگی تابستانی یا پیچیدگی شاخ‌وبرگ را ایجاد می‌کند. سایر میزبان‌های این نماتد شامل برنج، پیاز، سیر، ذرت شیرین، سیب‌زمینی شیرین و برخی گیاهان زینتی می‌باشد (Hockland & Eng, 1997).

نماتدهای بیمارگر گیاهی به روش‌های مختلف فیزیکی، زراعی، استفاده از ارقام مقاوم و نماتدکش‌های شیمیایی کنترل می‌شوند (Elahinia, 2014). نماتدکش‌های شیمیایی نقش مهمی در افزایش محصولات کشاورزی در قرن بیستم داشته‌اند ولی به سلامت انسان و محیط‌زیست آسیب زیادی وارد می‌کنند (Ntalli & Caboni, 2012). باقیمانده نماتدکش‌های شیمیایی چندین ماه در خاک باقی مانده و موجب اثرات سوء روی سایر موجودات خاک‌زی، به‌خصوص ریز موجودات مفید خاک و به هم خوردن اکولوژی خاک می‌شود. علاوه بر آن، برخی از باقیمانده‌های این سموم برای انسان خطرناک هستند (Bar-Eyal *et al*., 2006). در نتیجه یافتن روش‌های جایگزین که برای محیط زیست، موجودات زنده غیرهدف و گیاهان کمترین اثر سوء را داشته باشند، مهم و ضروری است و باید توجه بیشتری روی حفاظت از محیط‌زیست و سلامت انسان و حیوانات گردد. بنابراین لازم است که روش‌های کنترلی و رویکردهای جدید برای حفاظت گیاهان در برابر تهاجم نماتدهای بیمارگر گیاهی معرفی شوند. این راهبردها باید به لحاظ زیست‌محیطی و اقتصادی برای کشاورزی پایدار قابل اجرا باشند (Gamliel *et al*., 2000). در این رابطه پاره‌ای از مطالعات روی فعالیت نماتدکشی عصاره‌های گیاهی و اسانس‌های روغنی متمرکز شده است (Oka *et al*., 2000) که برخی از آنها اثر نماتدکشی نشان داده‌اند (Abbas *et al*., 2009). اسانس‌های روغنی گیاهان مختلف از جمله افسنتین، ترخون، علف لیمو، پونه، مورد، مرزنجوش، مریم گلی و آویشن باغی، قبلا از نظر توانایی نماتدکشی مورد بررسی قرارگرفته‌اند (Park *et al*., 2005).

اسانس گیاه مارچوبه به دلیل داشتن اجزای فعال گلوکوزید و آسپاراگوسیک اسید و سیر به دلیل داشتن آلیسین اثر کنترلی روی *Meloidogyne javanica* نشان داده اند (Zasada *et al*., 2002). براساس مطالعات صورت گرفته کارواکرول، اوژنول، تیمول، ترانس-آنتول، کاروون، پولگون، لیمونن، ژرانیول، بورنئول، کاروئول، سیترال، سیترونلول، آلفا-ترپنئول، آلفا-پینن، بتا پینن، پارا-سیمن، کامفور و کامفن عمده ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها هستند که خاصیت نماتدکشی دارند (Oka *et al*., 2000; Park *et al*., 2007; Echeverrigaray *et al*., 2010).

نماتدها مثل سایر جانوران دارای دشمنان طبیعی از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدهای شکارگر و کنه‌ها می‌باشند. بنابراین، مهار زیستی می‌تواند یک جایگزین مناسب از نظر زیست محیطی برای مدیریت نماتدها باشد (Mhatre *et al*., 2019). برخی از قارچ‌ها

دشمنان طبیعی نماتدهای انگل هستند که با تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه با خاصیت نماتدکشی یکی از راهبردهای جدید مهار زیستی محسوب می‌شوند (Degenkolb & Vilcinskas, 2016). یکی از عوامل موثر در مهار زیستی نماتدها قارچ *Pochonia chlamydospora* می‌باشد (Kerry *et al*., 1984). این قارچ به‌عنوان انگل چندین نماتد مهم اقتصادی از جنس‌های *Meloidogyne*، *Heterodera* و *Globodera* شناخته شده است (Kerry, 1990)، که دارای انتشار جهانی بوده (Zare & Gams, 2004) و در ایران از نماتد سیستی چغندرقند و خاک مزرعه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد ریشه گرهی جدا شده است (Fatemy *et al*., 1999). اولین گزارش از کاهش تعداد نماتدها توسط این قارچ در سال ۱۹۷۴ منتشر شد (Willcox & Tribe, 1974). گونه *P. chlamydospora* آنزیم‌هایی از جمله کیتیناز CHI43 تولید می‌کند که باعث از بین رفتن نماتد و تخم آن می‌شود (Tikhonov *et al*., 2002).

هدف از این پژوهش بررسی اثرات نماتدکشی اسانس گیاهان رازیانه، آنیسون، زنیان، آویشن و نعناع و متابولیت قارچ *P. chlamydospora* و سم متام سدیم روی *A. besseyi* در شرایط آزمایشگاهی و تعیین مقادیر LC_{50} و LC_{90} آنها با استفاده از تجزیه پروبیت می باشد.

مواد و روش‌ها

Aphelenchoides besseyi در سال ۹۸-۹۷ در بازدید از مزارع توت‌فرنگی شهرستان‌های مریوان و سنندج از اندام‌های هوایی گیاهان توت‌فرنگی جمع‌آوری و بعد از استخراج و تهیه اسلایدهای دائمی از نماتدها، براساس صفات ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی و نیز مولکولی در آزمایشگاه نماتدشناسی دانشگاه تبریز مورد شناسایی قرار گرفته بود. جمعیت جداشده، به واسطه داشتن زائده انتهایی ستاره‌ای در دم، دم مخروطی، نزدیک بودن فاصله منفذ ترشحی- دفعی به حلقه عصبی، سطوح جانبی دارای چهار شیار طولی، طول کیسه عقبی رحم ۲/۵ برابر عرض بدن و استایلت به‌طول ۱۱/۳ میکرومتر، به‌عنوان *A. besseyi* تشخیص داده شده بود (Oliveira *et al*., 2019).

برای ایجاد کشت پایه و تکثیر نماتد از کشت قارچ *Alternaria alternata* روی محیط PDA[1] استفاده گردید. برای هر پتری ۲۰ جفت نماتد شامل جنس‌های نر و ماده انتقال داده شد و درب پتری‌ها با پارافیلم مسدود و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و در داخل انکوباتور در کیسه‌های پلاستیکی نگه‌داری گردید. پس از سپری شدن ۱۵ روز از زمان تلقیح، نماتدهای تکثیر یافته جمع‌آوری شدند (Jamali *et al*., 2008).

جهت تهیه اسانس روغنی گیاهان مورد آزمایش، برگ‌های گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) و نعناع (*Mentha spicata*) جمع‌آوری شده و به مدت تقریبا یک هفته در محیط تاریک و خشک نگه‌داری شدند. گیاهان خشک شده و بذور گیاهان موردنظر

1 Potato Dextrose Agar

آسیاب شدند. اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر[2] انجام شد. حدود ۱۰۰ گرم از هر ماده گیاهی به داخل بالن به حجم دو لیتر انتقال یافته و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. عمل اسانس‌گیری به مدت دو ساعت ادامه یافت. اسانس همراه با بخار آب وارد مبرد شده و در مبرد عمل میعان صورت گرفته و قطرات اسانس درون آب به صورت دو فاز مشخص که در قسمت بالای آب قرار داشت در شیشه‌های کوچک جمع‌آوری شد. اسانس‌ها تا زمان استفاده در شیشه‌های کوچک تیره‌رنگ در یخچال (شرایط خنک و تاریک) نگه‌داری شدند (Kazemi, 2014).

جهت شناسایی اجزای اسانس‌های گیاهان مورد بررسی از کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی(GC-MS) مجهز به ستون DB5 استفاده شد(Chauhan *et al.,* 2014).

در این مطالعه از نماتدکش متام سدیم با نام تجاری (Vapam, EC=32.7) استفاده شد.

جهت انجام آزمایشات زیست سنجی ابتدا با استفاده از آزمایش‌های مقدماتی دامنه غلظت‌های آزمایش‌های اصلی تعیین شد. غلظت‌های مورد آزمایش برای رازیانه ۱۰۰۰، ۱۱۲۲، ۱۲۸۸، ۱۴۷۹، ۱۶۹۸، ۱۹۵۰، ۲۲۳۹، ۲۵۷۰ و ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام، آنیسون ۵۰۰، ۶۹۱، ۸۵۱، ۱۰۴۷، ۱۲۸۸، ۱۵۸۴، ۱۹۴۹، ۲۳۹۸ و ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام، زنیان ۲۰۰۰، ۲۲۹۰، ۲۶۳۰، ۳۰۱۹، ۳۴۶۷، ۳۹۸۱، ۴۵۷۰، ۵۲۴۸ و ۶۰۰۰ پی‌پی‌ام، آویشن ۷۴۱۳، ۸۰۰۰، ۸۷۰۹، ۱۰۰۰۰، ۱۳۸۰۳، ۱۵۸۴۸، ۱۸۱۹۷، ۲۰۸۹۲، ۲۴۰۰۰ پی‌پی‌ام، متام سدیم ۵- ۷- ۹- ۱۲- ۱۶- ۲۱- ۲۸- ۳۷- ۵۰ پی‌پی‌ام بود که به داخل میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری ریخته شدند و برای هر غلظت از ۶۰ فرد نماتد استفاده گردید. به این ترتیب که به هر میکروتیوب ۱۰۰۰ میکرولیتر از غلظت موردنظر و ۱۰۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتد اضافه شد. در آزمایش‌های اصلی ۹ غلظت از هر ترکیب با فاصله لگاریتمی انتخاب شدند. از آب مقطر استریل و توئین۲۰ به‌عنوان شاهد استفاده گردید. هر آزمایش چهار بار و در روزهای متفاوت تکرار شد. میکروتیوب‌ها داخل انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و مرگ‌ومیر نماتدها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت گردید. نماتدهای زنده و مرده در زیر دستگاه بینوکولار شمارش و درصد مرگ‌ومیر محاسبه شد. مرگ کامل معیار مرگ‌ومیر بود و نماتدهایی که بدون حرکت بودند، برای اطمینان از مرگ آن‌ها تکانی توسط سوزن در آب مجاور آن‌ها اعمال گردید، در صورت عدم واکنش به‌عنوان نماتد مرده در نظر گرفته شدند (Liang *et al*., 2018).

قارچ *Pochonia chlamydospora* در محیط کشت جامد YMGA[3] کشت و به مدت یک ماه برای تولید متابولیت‌های قارچی در انکوباتور نگه‌داری شد. جهت غربال‌گری، ۴۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم از میسلیوم قارچ به همراه لایه نازکی از محیط کشت خراش داده شد و متابولیت‌های قارچی با استفاده از ۵۰۰ میکرولیتر متانول

2 Clevenger

3 Yeast extract Malt Glucose Agar

در دمای ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد در داخل بن ماری به مدت دو ساعت و سپس با ورتکس کردن استخراج گردید. با استفاده از سانتریفیوژ و فیلتر توری، فاز مایع متانولی از فاز جامد جداسازی و سپس فاز متانولی مایع خشک شد. قارچ موردنظر برای تخمیر در حجم بالا روی محیط کشت برنج به مدت دو تا سه ماه تخمیر شد. عصاره خام به‌دست آمده از تخمیر برای انجام آزمایش‌های زیست سنجی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره خشک به وسیله حلال توئین۲۰ حل گردید و محلول پایه و اصلی به‌دست آمد. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های فرضی محلول متابولیت شامل ۵۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی‌پی‌ام در میکروتیوب‌ها ریخته شده و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتدی حاوی ۶۰ فرد نماتد به هر میکروتیوب اضافه گردید. آب مقطر استریل به همراه حلال توئین۲۰ به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. میکروتیوب حاوی نماتد و متابولیت داخل انکوباتور قرار داده شد و مرگ‌ومیر نماتدها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی گردید. آزمایش در شرایط دمایی ۲±۲۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت (Khan *et al*., 2019).

داده‌های حاصل از آزمایش‌های زیست‌سنجی با استفاده از روش پروبیت تجزیه شدند و مقادیر LC_{50} و LC_{90} ترکیبات مورد آزمایش تخمین زده شد. تجزیه پروبیت با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ صورت گرفت. خطوط دوز- اثر با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند. میزان سمیت ترکیبات مختلف با مقایسه مقادیر LC_{50} به دست آمده تعیین گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه شیمیایی اسانس‌های رازیانه، آنیسون، زنیان، آویشن و نعناع نشان داد که به ترتیب Trans-Anethole (۵۸/۴۴ درصد)، Trans-Anethole (۶۰/۶۱ درصد)، gamma-Terpinen (۴۴/۸۸ درصد)، Thymol (۵۲/۹۰ درصد) و Geraniol (۲۱/۴۲ درصد) بخش اصلی ترکیبات در این اسانس‌ها را شامل می‌شود و سایر ترکیبات و مقادیر مربوط در جدول ۲ مندرج است. تاثیر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها در مرگ‌ومیر نماتدها در مطالعات مختلف اثبات شده است.

ازجمله اثرنماتدکشی چهارترپن کارواکرول، ژرانیول، اوژنول و تیمول را علیه نماتد *Ditylenchus dipsaci* در آزمایشگاه بررسی کردند. فعالیت نماتدکشی بالایی به ترتیب در کارواکرول، اوژنول، ژرانیول و تیمول مشاهده شده است. کارواکرول در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر باعث مرگ ومیر ۱۰۰ درصدی شده است. اما دربررسی‌های مزرعه ای تیمول و سپس کارواکرول بیش ترین فعالیت نماتدکشی را داشته اند. هم چنین آن ها بیان کردند که افزایش دوز هر ترپن سبب افزایش مرگ ومیر می شود (Stavropoulou *et al*., 2021). کارواکرول، تیمول و پاراسیمن موجود در اسانس مرزه اثر هم افزایی بر یکدیگر داشته و سبب ممانعت از رشد میکروب ها می شوند (Gopi *et al*., 2014).

نتایج حاصل از زیست‌سنجی‌ها نشان داد که اسانس‌های رازیانه، آنیسون، زنیان و آویشن در غلظت‌های نسبتا پایین دارای اثر نماتدکشی روی *A. besseyi* می باشند ولی اسانس گیاهان آویشن و نعناع اثر نماتدکشی قابل توجه‌ی بروز ندادند. بر اساس نتایج آزمایش‌های مقدماتی، در آزمایش‌های اصلی غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۱۲۲، ۱۲۸۸، ۱۴۷۹، ۱۶۹۸، ۱۹۵۰، ۲۲۳۹، ۲۵۷۰ و ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس رازیانه، غلظت‌های ۵۰۰، ۶۹۱، ۸۵۱، ۱۰۴۷، ۱۲۸۸، ۱۵۸۴، ۱۹۴۹، ۲۳۹۸ و ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس آنیسون، غلظت‌های ۲۰۰۰، ۲۲۹۰، ۲۶۳۰، ۳۰۱۹، ۳۴۶۷، ۳۹۸۱، ۴۵۷۰، ۵۲۴۸ و ۶۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس زنیان و غلظت‌های ۷۴۱۳، ۸۰۰۰، ۸۷۰۹، ۱۰۰۰۰، ۱۳۸۰۳، ۱۵۸۴۸، ۱۸۱۹۷، ۲۰۸۹۲ و ۲۴۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس آویشن آزمایش شدند. بر اساس نتایج تجزیه پروبیت مقدار LC_{50} اسانس های رازیانه، آنیسون، زنیان و آویشن ۲۴ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۱۸۴۶، ۱۵۱۲، ۳۷۱۵ و ۱۷۵۵۰ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۱۶۷۱، ۱۱۵۶، ۲۹۰۵ و ۱۲۷۲۰ پی پی ام تخمین زده شد (جدول۱). همچنین مقدار LC_{90} اسانس های رازیانه، آنیسون، زنیان و آویشن ۲۴ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۲۴۶۶، ۲۸۷۲، ۵۵۸۶، ۳۲۹۹۰ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۲۳۹۴، ۲۴۴۱، ۴۸۴۱، ۳۴۶۷۰ پی پی ام تخمین زده شد. نتایج حاصل از زیست‌سنجی اسانس نعناع نشان داد که این اسانس فاقد اثر نماتدکشی یا در حد ضعیفی علیه *A. besseyi* می‌باشد. طوری که در آزمایش مقدماتی اثر غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس نعناع روی نماتد بررسی شد اما حتی در بالاترین غلظت به‌کار رفته در آزمایش، مرگ‌ومیر نماتد کمتر از ۱۰ درصد بود. بنابراین آزمایش اصلی در مورد آن انجام نشد. عدم هم‌پوشانی حدود اطمینان LC_{50} در اسانس‌ها نشان داد اثر این ترکیبات باهم اختلاف معنی‌دار دارند. اسانس آنیسون در ۲۴ ساعت بعد از تیمار با کم‌ترین LC_{50} (۱۵۱۲پی‌پی‌ام) به‌عنوان موثرترین و اسانس آویشن با بیشترین LC_{50} (۱۷۵۵۰پی‌پی‌ام) به‌عنوان کم اثرترین اسانس مورد مطالعه روی *A. besseyi* تعیین شدند.

در مورد متابولیت قارچی *Pochonia chlamydospora* نیز آزمایش مقدماتی با غلظت‌های ۵۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی‌پی‌ام روی *A. besseyi* آزمایش شدند اما حتی در بالاترین غلظت متابولیت هم مرگ‌ومیری در نماتد مشاهده نشد. مطالعه حاضر نشان داد متابولیت *P. chlamydospora* در این شرایط آزمایشی تاثیری روی مرگ‌ومیر نماتد *A. besseyi* ندارد.

براساس نتایج آزمایش‌های مقدماتی، در آزمایش‌های اصلی غلظت‌های ۵، ۷، ۹، ۱۲، ۱۶، ۲۱، ۲۸، ۳۷ و ۵۰ پی‌پی‌ام سم متام سدیم انتخاب شدند. براساس نتایج تجزیه پروبیت ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار مقدار LC_{50} به‌ترتیب ۱۷/۴۲۵ و ۴/۷۵۴ و مقدار LC_{90} به ترتیب ۳۳/۱۱۴ و ۱۱/۱۴۱ پی‌پی‌ام تخمین زده شد.

به‌طور کلی می‌توان گفت با افزایش غلظت

اسانس و افزایش زمان در معرض قرارگرفتن نماتد با اسانس گیاهی، درصد مرگ‌ومیر نماتد *A. besseyi* افزایش یافت.

در یک بررسی، مشخص شده که اسانس بذر گیاه رازیانه در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام تاثیری بیش از ۹۰ درصد در مرگ‌ومیر لارو و تخم نماتد *Meloidogyne javanica* دارد (Sadeghi *et al*., 2012)، در حالی‌که در تحقیق حاضر اسانس رازیانه در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام تاثیری بیش از ۷۰ درصد در مرگ‌ومیر *A. besseyi* بروز داد. در تحقیقی اثر نماتدکشی اسانس‌های رازیانه، زنیان، آویشن و نعناع علیه نماتد ریشه گرهی *M. javanica* نشان داد که در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر مرگ‌ومیر ۱۰۰ درصد و در مورد اسانس آویشن مرگ‌ومیر ۶۸/۵ درصدی را سبب می شود. ترکیب موثر رازیانه همچون مطالعه حاضر ترانس-آنتول بود و ترکیب موثر گیاه نعناع و زنیان برخلاف مطالعه حاضر کاروون بود. بر خلاف نتایج آن‌ها، در مطالعه حاضر اسانس نعناع اثر نماتدکشی علیه *A. besseyi* نشان نداد (Oka *et al*., 2000). همچنین در مطالعه (Fayaz *et al*., 2016) اسانس آویشن، بیش ترین بازدارندگی را در مرگ‌ومیر لاروهای *M. javanica* در غلظت ۱۵۰۰ پی پی ام نشان دادند. در مطالعات دودا و همکاران *T. vulgaris* و تیمول خالص حاصل از این اسانس در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام پس از ۲۴ ساعت به‌ترتیب باعث مرگ‌ومیر ۶۶/۳۳ و ۶۲/۴۵ درصدی نماتد *D. dipsaci* شده است (Douda *et al*., 2022).

در یک تحقیق دیگر اسانس حاصل از بذر گیاه رازیانه و اسانس نعناع و سه گونه آویشن را روی *Bursaphelenchus xylophilus* Nickle 1970 بررسی کردند. در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام بعد از ۲۴ ساعت اسانس رازیانه و نعناع به ترتیب مرگ‌ومیری حدود ۲۰ و ۶۹ و ۱۰۰-۵۶ درصدی نماتد شدند. همچنین در آزمایش اثر اسانس سه گونه آویشن روی *B. xylophilus* با غلظت دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت، مرگ‌ومیر ۱۰۰ درصد ناشی از اسانس *Thymus caespititius* و مرگ‌ومیر ۵۶ درصد ناشی از *T. matschiana* و مرگ‌ومیر حدود ۹۰ درصد ناشی از *T. zygis* را نشان دادند (Barbosa *et al*., 2010). اثر نماتدکشی اسانس رازیانه و آنیسون روی *M. incognita* مقدار LC_{50} را برای رازیانه ۲۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای آنیسون ۲۶۹ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد. ترکیب موثر هر دو اسانس همچون مطالعه حاضر ترانس-آنتول بود. مقدار LC_{50} اسانس رازیانه در آزمایش حاضر برابر ۱۸۴۶ پی‌پی‌ام و اسانس آنیسون برابر ۱۵۱۲ پی‌پی‌ام بود، اما اسانس پژوهش فوق از شاخ‌وبرگ گیاهان رازیانه و آنیسون و اسانس در مطالعه حاضر از بذر این گیاهان به‌دست آمده بود (Ntalli *et al*., 2011). در مطالعه دیگری اثر نماتدکشی اسانس آنیسون روی *M. incognita* و *M. javanica* در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب مرگ‌ومیر ۳۰ و ۲۸ درصدی را ثبت کردند، در حالی‌که مقدار LC_{50} در تحقیق حاضر برابر ۱۵۱۲پی‌پی‌ام بود. اسانس آن‌ها از میوه آنیسون ولی اسانس در مطالعه حاضر

از بذر آنیسون به‌دست آمده بود، که یکی از دلایل احتمالی اختلاف نتایج می‌باشد. دلیل دیگر می‌تواند مربوط به تفاوت گونه نماتد مورد مطالعه باشد (Luma *et al.*, 2003). در یک بررسی دیگر اثر نماتدکشی اسانس آویشن را روی *M. incognita* مطالعه کردند و مقدار LC_{50} بعد از ۲۴ ساعت برابر ۲۰۰۰ پی پی ام محاسبه گردید. ترکیب موثر اسانس همانند مطالعه حاضر تیمول بود ولی مقدار LC_{50} در آزمایش حاضر برابر ۱۷۵۵۰ پی‌پی‌ام به‌دست آمد که دلیل این اختلاف چند برابری در نتایج ممکن است مرتبط با تفاوت در گونه نماتد و شرایط آزمایش باشد(Kudjo *et al.*, 2020).

در تحقیقی اسانس حاصل از بذر زنیان روی *B. xylophilus* بررسی و بعد از ۲۴ ساعت مقدار LC_{50} ۴۳۱ پی‌پی ام تعیین شد (Park *et al.,* 2007) . در بررسی حاضر مقدار آن معادل ۳۷۱۵ پی‌پی‌ام به‌دست آمد

تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با دیگر مطالعات می تواند به دلیل تفاوت گونه گیاهی، نماتد، شرایط جغرافیایی گیاه و تفاوت شرایط آزمایشی و نحوه تهیه اسانس‌ها داشته باشد همچنین برهمکنش ترکیبات تشکیل دهنده اسانس برنتایج تاثیر خواهد داشت. در بررسی های صورت گرفته توسط (Hyldgaard *et al.*, 2012) بیان شده است فعالیت ذاتی اسانس ها ممکن است به طور انحصاری به اجزای اصلی فعال متکی نباشد، بلکه به تعامل بین این مواد و ترکیبات جزئی در اسانس ها نیز بستگی دارد. ترکیبات مختلف اسانس در کنار هم اثر هم‌افزایی خواهند داشت. اثرات هم افزایی می‌تواند به این صورت باشد که مثلا هر یک از ترکیبات داخل اسانس، حالت‌های مختلفی از عملکرد را داشته باشند. در نتیجه به دو مکان مختلف در سلول حمله می‌کنند و به طور غیرمستقیم به یکدیگر وابسته هستند. که همین موضوع می تواند سبب اختلاف نتایج مطالعه حاضر با مطالعات دیگر باشد. نحوه عمل اسانس‌ها علیه نماتدها به درستی مشخص نیست. به‌نظر می‌رسد که تاثیر اسانس‌ها بر نماتدها همانند حشرات بوده و بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز تاثیر می‌گذارند (Oka *et al.*, 2000., Isman & Machial, 2006)

نحوه دخالت ترکیبات گیاهی موجود در اسانس روی سیستم عصبی نماتدها و فرایند انتقال پیام عصبی روشن نیست. برخی محققین گمان دارند که اسانس‌ها با تخریب پوست نماتد و یا ایجاد اختلال در غشای سلولی نماتدها و تغییر نفوذپذیری آن موجب مرگ نماتدها می‌شوند (Oka, 2001). در برخی تحقیقات با استفاده از حشره مدل، نحوه عمل اسانس‌های گیاهی را مشخص کرده‌اند. شواهدی مبتنی بر تداخل این اسانس‌ها و گیرنده عصبی اکتوپامین وجود دارد. ترکیبات اسانس، آنتاگونیست گیرنده‌های اکتوپامین هستند. اکتوپامین یک انتقال دهنده عصبی در حشرات می‌باشد. بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهند که این ترکیبات در حشرات با مهار انتقال دهنده‌های عصبی از جمله اکتوپامین موجب توقف انتقال پیام عصبی و فلج شدن و مرگ حشره می‌شوند (Isman & Machial, 2006). با توجه به شباهت سیستم عصبی در

جانوران می‌توان گفت این نحوه عمل می‌تواند در مورد نماتدها هم صادق باشد.

مقایسه مقادیر LC_{50} اسانس‌ها با مقدار LC_{50} متام سدیم نشان داد این ترکیبات در مقایسه با نماتدکش شیمیایی مذکور اثر نماتدکشی ضعیف‌تری دارند. گذشت زمان در همه موارد آزمایش موجب افزایش تاثیر شد به‌طوری که مقادیر LC_{50} بعد از ۴۸ ساعت در تمام موارد کمتر از LC_{50} بعد از ۲۴ ساعت بود.

قارچ‌ها می‌توانند نماتدها را مستقیماً پارازیته کنند یا این که متابولیت‌ها و آنزیم‌هایی ترشح کنند که بر آن‌ها تأثیر بگذارند. این ترکیبات فعال قابلیت بروز تاثیر نماتدکشی را دارند (Ghayedi & Abdollahi, 2013). موسوی و همکاران (۲۰۱۰) چند جدایه از *P. chlamydospora* را علیه *M. javanica* به‌کار گرفتند و اثر مهار زیستی آن‌ها را در گلخانه مورد بررسی قرار دادند. از هفت جدایه مورد بررسی در آزمایش‌های گلخانه‌ای سه جدایه از این قارچ نتایج امیدوارکننده‌ای در کنترل تخم این نماتد داشت و میزان تخریب در تخم، ۳۹ تا ۹۵ درصد محاسبه گردیده است. قارچ *P.chlamydospora* آنزیم‌هایی تولید می‌کند که باعث از بین رفتن نماتد و تخم آن می‌شود. بر اساس مطالعات عده‌ای از محققان در مورد این قارچ، شواهدی مبنی بر تولید آنزیم کیتیناز CHI43 توسط قارچ *P. chlamydospora* مشاهده شده است و این آنزیم به‌عنوان فاکتور نماتدکش معرفی گردیده است (Tikhonov *et al.*, 2002). در تحقیقی پنج متابولیت جدا شده از محیط کشت *Chaetomium globosum* YSC5 روی لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* به طور قابل توجه‌ی تولید مثل نماتد را کاهش داده و تاثیر مثبتی بر رشد گیاه داشته است (Khan *et al.,* 2019). در تحقیق دیگری اثر چند قارچ نماتدکش روی جمعیت *Heterodera schachtii* در بررسی آزمایشگاهی مطالعه و مشخص شد قارچ *Stropharia rugosoannulata* بیش ترین تاثیر را در پارازیته کردن تخم‌های *H. schachtii* داشت. در حالی که قارچ *Dactylella oviparasitica* کم‌ترین تاثیر را بعد از ۷۲ ساعت از خود نشان داد. آن ها بیان داشتند که قارچ‌ها آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند پروتئازها، کلاژناز و کیتیناز تولید می‌کنند که ممکن است در نفوذ به کوتیکول نماتد و تخریب سلول میزبان نقش داشته باشند(Hussain *et al*.,2017).

در مطالعه حاضر متابولیت قارچ *P. chlamydospora*، حتی در بالاترین غلظت به‌کار رفته تاثیری بر مرگ‌ومیر نماتد نداشت که این تناقض در نتایج احتمالا به‌دلیل تفاوت در شرایط آزمایش و نحوه تهیه متابولیت قارچی می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس سه گیاه دارویی آنیسون، زنیان و رازیانه مورد آزمایش می‌توانند به‌عنوان ترکیب نماتدکش جهت کنترل نماتد *A. besseyi* مفید واقع شوند ولی نتایج حاصل از زیست سنجی متابولیت قارچ *P. chlamydospora* علیه نماتد *A. besseyi* نشان داد که این متابولیت در شرایط آزمایشگاهی بررسی حاضر اثر نماتدکشی علیه این نماتد ندارد.

توجه به این نکته ضروری است که توسعه تجاری یک ترکیب ضد نماتدی نظیر نماتدکش یا دورکننده تنها به میزان تاثیر آن بستگی ندارد بلکه به هزینه تولید یا فرآوری و اثرات زیست‌محیطی کاربرد آن نیز وابسته است (Taba *et al.,* 2008). لذا پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های بیش‌تر جهت ارائه روش‌های ارزان قیمت و مناسب جهت اسانس‌گیری، تولید صنعتی اسانس‌ها و فرمولاسیون‌های تجاری مناسب جهت کنترل نماتدها صورت گیرد تا بتوان توجیه اقتصادی به‌کارگیری ترکیبات گیاهی را افزایش داد.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از زیست‌سنجی‌ها اثر نماتدکشی نسبتا خوب اسانس‌های رازیانه، آنیسون و زنیان، تاثیر ضعیف اسانس‌های آویشن و نعناع و همچنین عدم اثر نماتدکشی متابولیت قارچ *Pochonia chlamydospora* را نشان داد. اسانس آنیسون با کم‌ترین LC_{50} به‌عنوان موثرترین و اسانس آویشن با بیش‌ترین LC_{50} به‌عنوان کم تاثیرترین اسانس مورد مطالعه روی نماتد *A. besseyi* می باشد. عدم هم‌پوشانی حدود اطمینان LC_{50} در اسانس‌ها نشان داد اثر این ترکیبات با هم اختلاف معنی‌دار دارد. درصد مرگ‌ومیر با زمان و غلظت رابطه مستقیم داشته و با افزایش غلظت و گذشت زمان درصد مرگ و میر افزایش می‌یابد. اثر نماتدکشی اسانس‌ها در مقایسه با نماتدکش شیمیایی ضعیف تر بوده و آنیسون ۸۷ برابر، رازیانه ۱۰۶ برابر، زنیان ۲۱۳ برابر و آویشن ۱۰۰۰ برابر سمیت کمتر از سم دارند.

سپاسگزاری

از کارشناس آزمایشگاه شیمی دانشگاه تبریز آقای مهندس کنعانی بابت همکاری در تشخیص اجزای اسانس‌ها و متابولیت‌ها قدردانی می‌شود. این پژوهش مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده دوم می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه تبریز انجام شده است.

جدول ۱. غلظت‌های کشنده اسانس رازیانه (***Foeniculum vulgare***)، آنیسون (***Pimpinella anisum***)، زنیان (***Carum copticum***)، آویشن (***Thymus vulgaris***) و متام سدیم روی ***Aphelenchoides bessei***، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار (تعداد نماتد مورد آزمایش: ۲۱۶۰ فرد)

Table 1. Lethal concentrations of fennel, anise, zenian, thyme essential oils and

Treatment	Hours after treatment	LC_{50} (ppm) (Confidence limits)	LC_{90} (ppm) (Confidence limits)	Slope	χ^2 (df)
Foeniculum vulgare	24	1846 (1675.6-2019.9)	2466 (2255.7-2814.1)	7.39±0.002	1.29^{ns}*(7)
	48	1671 (1489.6-1845.4)	2394 (2171.3-2764.7)	6.33±0.002	1.03^{ns}(7)
Pimpinella anisum	24	1512 (1383.0-1648.0)	2872 (2617.0-3226.7)	3.12±0.001	0.48^{ns}(7)
	48	1156 (1039.9-1216.4)	2441 (2327.3-2573.8)	3.12±0.001	0.84^{ns}(7)
Carum copticum	24	3715 (3500.3-3936.1)	5586 (5218.8-6095.4)	5.71±0.001	0.93^{ns}(7)
	48	2905 (2729.3-3062.7)	4841 (4592.9-5157.9)	5.30±0.001	0.23^{ns}(7)
Thymus vulgaris	24	17550 (16060.0-19465.3)	32990 (29017.5-39534.8)	2.65±0	2.57^{ns}(7)
	48	12720 (11009.5-14241.3)	34670 (30045.8-42574.9)	1.85±0	1.62^{ns}(7)
Metam sodium	24	17425 (13.5-20.7)	33.114 (26.1-41.2)	3.31±0.004	1.64^{ns}(7)
	48	4.754 (4.01-5.3)	11.141 (10.53-11.9)	6.31±0.016	2.62^{ns}(7)

ns: معنی‌دار نیست

جدول ۲. ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانسهای گیاهان مورد استفاده در آزمایش

Table 2. The main components of the essential oils used in the experiment

Foeniculum vulgare		*Pimpinella anisum*		*Carum copticum*		*Thymus vulgaris*		*Mentha spicata*	
Name of the compound	amount in essential oil (%)	Name of the compound	amount in essentia oil (%)	Name of the compound	amount in essential oil (%)	Name of the compound	amount in essential oil (%)	Name of the compound	amount in essential oil (%)
Trans-Anethole	58.44	Trans-Anethole	60.61	Gamma-Terpinen	44.88	Thymol	52.90	Geraniol	30.92
Norbornanone	17.56	Cyclohexen-1-one-2-methyl-5-..	7.72	P- Cymene	25.78	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethy)	22.75	P-Menthatriene	20.03
Benzene, 1methoxy-4-(2-propenyl)	7.72	Benzen, 1-methoxy-4-(2-propenyl)	7.11	phenol, 5-methyl-2-(1-methylethy)	23	Benzen-1-methyl-4-(1-methyleth)	10.14	Geranyl acetate	14
Limonene	3.70	Dl-Limonene	6.37	Beta-pinene	4.42	Gamma-Terpinene	8.54	Cyclohexene-1-menthanol	13
Carene	3.08	Gamma-Terpinene	2.08	Alpha-Thujen	0.9	Naphthalene	2.40	Linalool	5.32
Cyclohexen-1-oe, 2-methyl-5	2.2	Estragol	1.58	Alpha-pinene	0.4			Alpha-Terpinene	4.73
Alpha- pinen	1.48	Zingiberene	1.25	Estragol	0.24			1,5-Cineole	2.74
Camphor	1.31	Alpha-phellandrene	0.54					Carene	1.75
Estragole	1.11	Linalool	0.48					Beta-Pinene	0.82
Sabinene	0.7	Beta-sesquiphellandrene	0.37					Eucalyptol	0.77
Camphene	0.66	Germacrene	0.23					Alpha-Pinene	0.64
								Camphene	0.21
								Trans-Anethole	0.2

References:

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

Barbosa, P., Lima, A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., and Mota, M. 2010. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Journal of Nematology, 42(1): 8- 16.

Bar-Eyal M., Sharon E. and Spiegel Y. 2006. Nematicidal activity of *Chrysanthemum coronarium*. European Journal of Plant Pathology 114(4): 427-433.

Chauhan A., Goyal M. K. and Chauhan P. 2014. GC-MS technique and its analytical applications in science and technology. Journal Analytical and Bioanalytical Techniques 5(6): 222.

Degenkolb T. and Vilcinskas A. 2016. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. Applied Microbiology and Biotechnology 100(9): 3799-3812.

Douda O., Zouhar M. and Maňasová M. 2022. Effect of plant essential oils on the mortality of *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) nematode under *in vitro* conditions. Plant, Soil and Environment 68(9):410-414.

Echeverrigaray, S., Zacaria, J., and Beltrão, R. 2010. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Phytopathology, 100(2): 199-203.

Elahinia S. A. 2014. Diseases of agricultural plants and methods of combating them. Gilan University Publications (In Persian).

Fatemy, S., Ahmadian-Yazdi, A., Parvizy, R., Ahmadi, A., Pakniat, M., Barooti, M., Askari, M., and Ershad, J. 1999. Fungal parasites of *Heterodera schachtii* in Iran. Pakistan Journal of Nematology, 7(1): 61-66.

Fayaz M., Fadaei Tehrani A., Mohammadkhani A. and Tedin M. 2016. Investigating the effect of three medicinal plants of the mint family on pathogenicity and damage caused by root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato.

Plant protection 30(4): 547–552 (In Persian).

Gamliel, A., Austerweil, M., and Kritzman, G. 2000. Non-chemical approach to soilborne pest management–organic amendments. Crop Protection, 19(8-10): 847-853.

Ghayedi, S., and Abdollahi, M. 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the Boyer-Ahmad region, Iran, against J2s of *Heterodera avenae*. Journal of Plant Protection Research, 53(2): 166-170.

Gopi, M., Karthik, K., Manjunathachar, H.V., Tamilmahan, P., Kesavan, M., Dashprakash, M., Balaraju, B.L. and Purushothaman, M.R. 2014. Essential oils as a feed additive in poultry nutrition. Advances Animal and Veterinary Scinesc, 2(1)1-7: .

Hockland, S., and Eng, L. 1997. *Capsicum annuum* v. *longum*- a new host record for the rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. International Journal of Nematology: 7(2), 229.

Hussain, M. Zouhar, M., and Rysanek, P. 2017. Effect of some nematophagous fungi on reproduction of a nematode pest, *Heterodera schachtii* and growth of sugar beet. Pakistan Journal of Zoology: 49(1), 197-205.

Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in microbiology, 3: 1-24.

Isman, M. B., and Machial, C. M. 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Advances in Phytomedicine, 3: 29-44.

Jamali, S., Pourjam, E., ALI, Z.A. and ALI, N.F., 2008. Reproduction of the white tip nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942) in different monoxenic cultures, 10: 165-171.

Kazemi M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant andanti-inflammatory activity of *Carum copticum*. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, 17(5): 1040-1045.

Kerry, B. R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-

parasitic nematodes. Journal of Nematology, 22: 621-631.

Kerry, B. R., Simon, A., and Rovira, A. D. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cystnematode *Heterodera avenae*. Annals of Applied Biology, 105(3): 509-516.

Khan, B., Yan, W., Wei, S., Wang, Z., Zhao, S., Cao, L., Rajput, N.A. and Ye, Y. 2019. Nematicidal metabolites from endophytic fungus *Chaetomium globosum* YSC5. FEMS Microbiology Letters, 366(14), 169.

Kudjo, E., Kpegba, K., Sasanelli, N., Koumaglo, H. K., and Caboni, P. 2020. Nematicidal activity of some essential plant oils from tropical West Africa. International Journal of Pest Management, 66(2): 131-141.

Liang, J.Y., Liu, Y., Zhang, X.X., Zhang, L.J., Chen, Y., Li, Y., Zhang, H., Kong, W.B. and Du, S.S. 2018. Antagonistic activity of essential oils and their main constituents extracted from Ajania fruticulosa and A. potaninii against Ditylenchus destructor. Nematology, 20(10)911-916: .

Luma, A., Aburjai, T., and Darwish, R. M. 2003. Effect of plant extracts and essential oils on root-knot nematode. Phytopathologia Mediterranea, 42(2): 123–128.

Mhatre, P.H., Karthik, C., Kadirvelu, K., Divya, K.L., Venkatasalam, E.P., Srinivasan, S., Ramkumar, G., Saranya, C., and Shanmuganathan, R. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 17, 119-128.

Moosavi, M. R., Zare, R., Zamanizadeh, H. R., and Fatemy, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. Journal of Invertebrate Pathology, 104(2): 125-133.

Ntalli, N. G., and Caboni, P. 2012. Botanical nematicides: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(40): 9929-9940.

Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., and Menkissoglu□Spiroudi, U. 2011. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants

indigenous to Greece. Pest Management Science, 67(3): 341-351.

Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., and Spiegel, Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*, 90(7): 710-715.

Oka, Y. 2001. Nematicidal activity of essential oil components against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Nematology, 3(2): 159-164.

Oliveira, C. J.; Subbotin, S. A.; Álvarez-Ortega, S.; Desaeger, J.; Brito, J. A.; Xavier, K. V.; Freitas, L. G.; Vau, S.; Inserra, R. N. 2019. Morphological and Molecular Identification of Two Florida Populations of Foliar Nematodes (*Aphelenchoides*spp.) Isolated from Strawberry with the Description of *Aphelenchoides pseudogoodeyi*sp. n. (Nematoda: Aphelenchoididae) and Notes on Their Bionomics. Plant Disease. 103(11): 2825-2842.

Park, I. K., Park, J. Y., Kim, K. H., Choi, K. S., Choi, I. H., Kim, C. S., and Shin, S. C. 2005. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Nematology, 7(5): 767-774.

Park, I. K., Kim, J., Lee, S. G., & Shin, S. C. 2007. Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Journal of Nematology, 39(3): 275-279.

Sadeghi Z, Mahdikhani Moghadam A, and Azizi M.2012. Evaluation of plant products to control root knot nematode Meloidogyne javanica on tomato. *Iranian* Journal of Plant Pathology,48(2): 155-163. (In Persian)

Stavropoulou, E., Nasiou, E., Skiada, P., and Giannakou, I.O. 2021. Effects of four terpenes on the mortality of *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev. European Journal of Plant Pathology, 160(1)137-146 :.

Stiles, C. L., Sams, C. E., Robinson, D. K., Coffey, D. L., and Mueller, T. C. 2000. Influence of metam sodium on the dissipation and residual biological activity of the herbicides EPTC and pebulate in surface soil under black plastic

mulch. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(10): 4681-4686.

Taba, S., Sawada, J., and Moromizato, Z. I. 2008. Nematicidal activity of Okinawa Island plants on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. Plant and Soil, 303(1): 207-216.

Tikhonov, V. E., Lopez-Llorca, L. V., Salinas, J., and Jansson, H. B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genetics and Biology, 35(1): 67-78.

Willcox, J., and Tribe, H. T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*: I. Preliminary investigations. Transactions of the British Mycological Society, 62(3): 585-594.

Zare, R., and Gams, W. 2004. A monograph of *Verticillium* section Prostrata. *Rostaniha*, 5, 1-192.

Zasada, I. A., Ferris, H., and Zheng, L. 2002. Plant sources of Chinese herbal remedies: Laboratory efficacy, suppression of *Meloidogyne javanica* in soil, and phytotoxicity assays. Journal of Nematology, 34(2): 124-129.

Comparison of nematicidal activity of some essential oils, *Pochonia chlamydospora* metabolites and metham sodium on *Aphelenchoides besseyi* under laboratory condition

Gholamreza Niknam [1], Zahra Ghorbani [2], Samaneh Khosravani [2*], Rogaye Karimzadeh[3], Saeid Zehtab Salmasi [1,4]

1. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Former MSc student in Plant Pathology, Department of Plant Protection, University of Tabriz, Tabriz, Iran, (Corresponding author).
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4. Present address: Associate Professor and Research Director, Sustainable Agricultural Sciences Center at Alcalde, Department of Plant and Environmental Sciences, New Mexico State University, NM, USA

Received: September 2024 Accepted: November 2024 - DOI: 10.22092/mpt.2024.366826.1167

Abstract

Niknam, GH., Ghorbani, Z., Khosravani, S., Karimzadeh, R., Zehtab Salmasi, S., . Comparison of nematicidal activity of some essential oils, *Pochonia chlamydospora* metabolites and metham sodium on *Aphelenchoides besseyi* under laboratory condition

Iranian Medicinal Plants and Technology, Vol 6, No. 1, 2023 19-20: 113-129 (in Persian)

Abstract

Foliage and bud nematode *Aphelenchoides besseyi* cause strawberry summer dwarf disease and infects many plant hosts including rice, onion, garlic, sweet corn, sweet potato and soybean, as well as a number of bulbous ornamental plants. Management approaches of plant parasitic nematodes are mostly based on crop rotation, resistant cultivars, nematode free propagating materials and nematicidal compounds. Due to the adverse and hazardous effects of chemical nematicides for humans and the environment, it is necessary to search and use the safe alternative methods. In this study, the effect of nematicidal activities of essential oils of fennel seed (*Foeniculum vulgare*), (*Pimpinella anisum*), (*Carum copticum*) and dried plants of thyme (*Thymus vulgaris*) and mint (*Mentha spicata*), volatile metabolites of *Pochonia chlamydospora* and metam sodium as a nematicide and positive control against the nematode were studied under laboratory conditions. For this purpose, the nematode was propagated on PDA culture medium containing the fungus *Alternaria alternata*. The bioassays were arranged in four replications

Email address of the corresponding author: khosravani.uni76@gmail.com

and with nine treatments using 15 days reared nematodes and data of nematode mortality were recorded after 24- and 48-hours intervals. After 24 hours, the LC50 values for fennel, anise, zenian and thyme essential oils were determined as 1846, 1512, 3715 and 17550, respectively and 17.425 for metam sodium. Also, the LC90 values were calculated as 2466, 2872, 5586, and 32990, respectively and 114/33 for metam sodium. Gas chromatography (GC) and gas chromatography connected to a mass spectrometer (GC-MS) equipped with a DB5 column were used to identify the biochemical components of the essential oils. The main components of fennel and anise, ajowan, thyme, mint essential oils were Trans-Anethole, Gamma-Terpinene, Thymol and Geraniol, respectively, which showed different nematicidal efficacy against *A. besseyi* based on the percent of the nematode mortality after 24- and 48-hours intervals. Anise essential oil with the lowest LC50 (1512 ppm) was revealed as the most effective and thyme essential oil with the highest LC50 (17550 ppm) identified as the least effective essential oil among the studied compounds on mortality of *A. besseyi*. Also, mint essential oil and the fungus metabolite had no mortality effect on *A. besseyi* under the experimental conditions of this study.

Keywords: essential oil, nematode biocontrol, leaf nematode, gas chromatography.