آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۰، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۱

بررسی تاثیر فرآورده‌های گیاهی میخک هندی (*Eugenia caryophyllata*) در کنترل نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica**

زهرا صادقی✉ و عصمت مهدیخانی مقدم
گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۹، تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰)

چکیده

در میان نماتودهای پارازیت گیاهی، نماتودهای ریشه گرهی .*Meloidogyne* spp از لحاظ خسارت اقتصادی دارای اهمیت بیشتری هستند. در سال‌های اخیر، استفاده از فرآورده‌های گیاهان دارویی به عنوان یکی از روش‌های مؤثر در کنترل آفات و بیماریها توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. در این تحقیق اثر فرآورده های مختلف میخک هندی (اسانس، عصاره آبی و الکلی) روی مراحل تخم و لارو سن دو نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. در شرایط گلدانی اثر حفاظت کنندگی اسانس این گیاه در کنترل نماتود ریشه گرهی ارزیابی شد. عصاره الکلی میخک هندی با LC_{50}=510ppm برای تخم و LC_{50}=646ppm برای لارو نسبت به دیگر فرآورده‌های این گیاه بیشترین سمیت را دارا بود. در بررسی دیگر اسانس میخک بر تحرک و جابجایی لارو تاثیر منفی گذاشته و در غلظت ۵۰۰ppm به میزان ۳۷/۱ درصد اثر بازدارندگی برمهاجرت لارو سن دو نماتود ریشه گرهی داشته است. نتایج آزمایش گلخانه ای نیز نشان داد که گیاهان تیمار شده با اسانس میخک هندی(در غلظت ۲۰۰ppm) در مقایسه با شاهد کاهش چشمگیری را در میزان آلودگی ریشه به نماتود ریشه گرهی داشته است. همچنین از نظر تعداد توده تخم موجود در روی ریشه براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ ٪ بین تیمارها مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: میخک هندی، عصاره آبی، عصاره الکلی، اسانس، نماتود ریشه گرهی

Effects of plant products of clove (*Eugenia caryophyllata*) for controlling root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*

Z. SADEGHI ✉ and E. MAHDIKHANI MOGHADAM
Ferdowsi university of Mashhad, Faculty of Agriculture, Plant Pathology Department, Mashhad, Iran

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) cause major economic damage affecting the quantity and quality of the crop production. In recent years, using of medicinal plants has been considered to many scientists as effective methods for pests and diseases control. In this study effect of different products of clove (essential oils, aqueous extract and ethanol extract) were investigated on second stage juveniles(J_2) and eggs of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, also protective effect of essential oil of clove was evaluated in control of root-knot nematode in pot conditions. Ethanol extracts of clove (LC_{50}=510ppm for egg & LC_{50}=646ppm for second stage of juveniles) had the most toxic effect compared with other products of this plant. In other study, essential oils of clove have negative effect on mobility and movement of J_2s and inhibited (37.1%) migration of J_2s at 500ppm concentration. Results of pot experiment showed that plant treated with essential oil of clove (200 ppm) had noticeable reduction in infection levels compared with the control. Also, regarding to number of egg mass on root, there was significant difference among treatments (LSD test, $P \leq 0.05$)

Key words: *Eugenia caryophyllata,* plan extract, ethanol extract, essential oils, root-knot nematode.

*بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

✉ **Corresponding author:**Zahra.Sadeghi5181@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نماتودهای ریشه گرهی *Meloidogyne spp.* پارازیت‌های داخلی اجباری هستند که دارای اهمیت اقتصادی بالایی می‌باشند. این نماتودها یکی از بزرگترین عوامل محدود کننده تولیدات زراعی و باغی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری هستند (Siddiqui, 2000). گونه *Meloidogyne javanica* (Chitwood, 1994) باعث کاهش محصول گوجه‌فرنگی به میزان ۵۰ درصد می‌گردد (Hosseini negad, 2004). علاوه بر خسارت‌های مستقیم گیاهان آلوده به نماتود به بیماری‌های تشدید پژمردگی ورتیسلیومی و فوزاریومی حساس‌تر می‌گردند. با توجه به اهمیت کنترل این نماتودها، تحقیقات جهت بررسی روشهای مدیریتی مؤثر علیه نماتود مولد گره لازم و ضروری به نظر می رسد. استفاده از گیاهان و فرآورده های گیاهی یکی از روشهای ایمن برای کنترل نماتودها می باشد. با توجه به اینکه نماتودهای پارازیت گیاهی به عنوان آفات مهم اقتصادی شناخته شده اند، در بسیاری از مطالعات، فرآورده‌های گیاهی کشنده یا فرونشاننده نماتود به عنوان یکی از ابزار های مدیریتی بالقوه در سامانه‌های کشتی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Halbrendt, 1996). یکی از این گیاهان میخک هندی (درختی همیشه سبز) با نام علمی .Tunb (=*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) *Eugenia caryophyllata* متعلق به خانواده Myrtaceae می‌باشد. اصل این درختچه از چین و ژاپن است و در باغ‌های شمال کشور کشت می‌شود قسمت‌های مورد استفاده دارویی این گیاه غنچه‌های شبیه میخ است که در حالت خشک شده به رنگ قهوه‌ای می‌باشند. برخی گونه‌های متعلق به جنس *Eugenia* دارای ویژگی‌های دارویی مانند اثر ضدمیکروبی (Nunez *et al*., 2001)، ضدبیماری (Consolini and Sarubbio, 2002)، ضدتشنجی (Pourgholami *et al*., 1999) و حشره‌کشی (Yang *et al*., 2003) می‌باشد. Sangwan *et al*. (1990)، Chitwood (2002) و Cristobal-Alejo *et al*. (2006) فعالیت نماتودکشی میخک هندی را بررسی نموده اند و نتایج موفقیت‌آمیزی از در کنترل عصاره این گیاه علیه نماتود ریشه گرهی گزارش نموده‌اند. Cristobal-Alejo *et al*. (2006) فعالیت عصاره حاصل از ۵۵ گیاه بومی از جمله گیاهان تیره Myrtaceae را علیه لاروهای سن دو نماتود *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره گیاه *Eugenia winzerlingii* در بین گیاهان مورد آزمایش، بهترین اثر را در مرگ و میر لاروها داشت. Zouhar *et al*. (2009) با بررسی اسانس میخک هندی (*E. caryophyllata*) بر روی نماتود ساقه(*Ditylenchus dipsaci*) در شرایط آزمایشگاه نشان دادند که اسانس این گیاه موجب افزایش مرگ و میر نماتود ساقه می‌شود. اثر نماتودکشی اسانس میخک توسط بسیاری از محققین به اثبات رسیده است (Chitwood, 2002; Meyer *et al*., 2008; Pandey and Dwivedi, 2000; Park *et al*., 2005; Salgadoand Campos, 2003; Sangwan *et al*. 1990). با توجه به نتایج سایر تحقیقات درخصوص فعالیت نماتودکشی میخک هندی، تاثیر فرآورده‌های این گیاه دارویی روی نماتود ریشه‌گرهی گونه *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تکثیر نماتود: ریشه های آلوده به نماتود ریشه گرهی در تابستان ۱۳۸٦ از مزارع گوجه فرنگی استان خراسان رضوی (شهرستان مشهد) جمع آوری شد و سپس با استفاده از یک توده تخم، تکثیر در گلخانه انجام شد. پس از دو ماه ریشه‌های آلوده جمع آوری و براساس برش انتهای بدن ماده‌ها گونه *M. javanica* شناسایی شد (Jepson, 1987). توده‌های تخم نماتود از ریشه های آلوده دارای گال خارج نموده، سپس با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت چهار دقیقه جدا سازی و ضد عفونی گردیدند. برای بدست آوردن لارو سن دو از روش اصلاح شده برمن (Southey, 1986) استفاده گردید و هر ۲٤ ساعت لاروها جمع آوری شدند. از لاروهایی که کمتر از ٤۸ ساعت عمر داشتند

Archive of SID

www.SID.ir

جهت انجام آزمایش‌ها استفاده گردید.

تهیه اسانس میخک هندی: ۵۰ گرم پودر بذر میخک همراه با ۵۰۰ میلی لیترآب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس گیر شیشه‌ای کلونجر در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به روش تقطیر با آب، اسانس‌گیری شد. زمان اسانس‌گیری برای هر نمونه سه ساعت بود. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آبگیری شدند. از توئین ۸۰ به عنوان سورفاکتانت استفاده شد.

تهیه عصاره: عصاره‌های میخک طی عملیات ماسراسیون[1] بدست آمد. ابتدا بذر میخک به میزان لازم تهیه و خشک شده، سپس با استفاده از دستگاه خردکن پودر گردید. مواد گیاهی در ارلن های حاوی آب مقطر خیسانده شد و با استفاده از پارافیلم درب ظروف پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۱۰۰rpm روی شیکر تکان داده شد. سپس در یک پارچه ململ فشرده شد تا عصاره آبی از بقایای گیاهی جدا شود. عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد (Ferris and Zheng, 1999). عصاره آبی ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰°C قرار گرفته و بلافاصله سرد گردید. عصاره الکلی با استفاده از روش اصلاح شده Cristobal-Alejo *et al*. (2006) بدست آمد. بدین صورت که ۲۰ گرم پودر بذر میخک هندی در ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۷۰ درصد ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در ظروف دربسته نگهداری شدند. هر ۱۶ ساعت فیلتراسیون انجام شد و مجدداً ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به ظروف اضافه شد. عصاره الکلی حاصل را در بن‌ماری به مدت ۳ روز و در دمای ۴۵°C گذاشته تا الکل از عصاره حذف شد.

روش برآورد غلظت کشنده (LC_{50} و LC_{90}) برای اسانس و عصاره‌های میخک هندی: آزمایشات مقدماتی جهت تعیین محدوده غلظت‌های لازم برای اسانس‌ها و عصاره‌های میخک جهت تخمین LC_{50} و روابط غلظت–مرگ و میر انجام گردید. ۶ غلظت اسانس (۲۰۰۰،۱۰۰۰،۵۰۰،۲۰۰،۱۰۰،۵۰ppm) و ۴ غلظت عصاره آبی (۱۱۰۰۰،۷۰۰۰،۴۵۰۰،۳۰۰۰ppm) و عصاره الکلی (۷۰۰۰ppm، ۴۵۰۰،۳۰۰۰،۲۰۰۰) علاوه بر شاهد، با فاصله لگاریتمی مساوی اعمال گردید. مقادیر LC_{50} و LC_{90} برای هر اسانس و عصاره با استفاده از برنامه رایانه‌ای پروبیت[2] محاسبه گردید.

بررسی اثر سمیت میخک هندی روی لارو سن دو نماتود ریشه گرهی گونه *M. javanica*: ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس،عصاره آبی و الکلی در میکروتیوب‌های جداگانه ریخته و ۹۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتود حاوی ۲۰۰–۱۵۰ لارو سن دو به هر میکروتیوب اضافه شد تا غلظت‌های مورد نظر با فاصله لگاریتمی مساوی (فاصله لگاریتمی ۰/۳۲برای اسانس، ۰/۱۷ برای عصاره آبی و الکلی) اعمال گردد. آب مقطر استریل به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. هر تیمار چهار تکرار داشت و آزمایش دو بار انجام شد. پس از قرار دادن نماتودها در معرض غلظت‌های مختلف اسانس،عصاره آبی و الکلی به مدت ۲۴ ساعت، میکروتیوب حاوی اسانس و لارو سن دوم به مدت ٤ دقیقه در ۷۵۰g سانتریفیوژ شد. مایع بالایی (Supernatant) را با استفاده از سمپلر برداشته تا اینکه ۳۰۰ میکرولیتر باقی بماند. سپس آب مقطر اضافه کرده تا حجم نهایی به یک میلی‌لیتر برسد. میکروتیوب‌ها مجدداً سانتریفیوژ شدند (٤دقیقه در ۷۵۰g)، سپس مایع بالایی حذف و به محلول باقی مانده در پایین هر میکروتیوب (Pellet) ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. پس از ۲۰ ساعت تعداد لاروهای سن دوم مرده محاسبه گردید (روش اصلاح شده‌ی Ferris and Zheng, 1999). لاروهایی که در زیر میکروسکوپ تحرک نداشتند و بدن آنها تیره و دچار پیچیدگی شده بود، به عنوان لارو مرده تلقی شده و شمارش تعداد آنها با استفاده از لام شمارش نماتود انجام گرفت.

۱– Maceration

۲– Probit

Archive of SID
www.SID.ir

آزمایشات در شرایط دمایی ۳°C ±۲۵ انجام گرفت. ارتباط بین غلظت‌های مختلف (اسانس، عصاره آبی و الکلی) و مرگ و میر لارو تجزیه پروبیت شدند و LC_{50} و LC_{90} بدست آمدند.

بررسی اثر سمیت فرآورده های میخک هندی بر تخم نماتود ریشه گرهی گونه *M. javanica* : ۹۰۰ میکرولیتر مایع (سوسپانسیون) حاوی تخم نماتود شامل ۵۰۰ عدد تخم را در چاهک‌های پلیت ٢٤ خانه‌ای (پلی‌استیرن) ریخته و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس، عصاره آبی و الکلی میخک به هر چاهک اضافه شد. آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. هر تیمار در چهار چاهک تکرار شد و آزمایش دو بار انجام شد. پلیت را پوشانده و در دمای ۳°C ±۲۵ قرار داده شد. سپس تعداد تخمهای مرده بعد از ١٤ روز شمارش گردید. بدین ترتیب که تخم‌هایی که تفریخ نشده و به لارو تبدیل نشده بودند، به عنوان تخم مرده شمارش شدند. سپس ارتباط بین غلظت های اسانس، عصاره آبی و الکلی و میزان مرگ و میر تخم بطور جداگانه تجزیه پروبیت شدند و LC_{50} و LC_{90} ها برآورد شدند.

اثر اسانس میخک هندی بر مهاجرت لاروهای سن دو *M. javanica* : حدود ۱۰۰میکرولیتر اسانس میخک در غلظت‌های ppm ۵۰۰-۲۵۰-۵۰ در میکروتیوپ ریخته و سپس ۹۰۰ میکرولیترسوسپانسیون لارو سن دو تازه تفریخ شده (حاوی۱۵۰لارو) به میکروتیوب‌های حاوی اسانس اضافه شدند. نمونه شاهد شامل آب مقطر و لارو بود. بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری لاروها در معرض اسانس، اسانس با کمک سانتریفیوژ حذف و سوسپانسیون لارو روی ستون شنی که از قسمت پائین با الک ۳۰۰ مش(۵۳ میکرون) بسته شده بود قرار گرفتند (۱/۵cm ارتفاع، قطر ستون شن ۴ cm، قطر ذرات شن ۵۰۰-۲۵۰ میکرومتر). ستون شن بطور عمود بر پتری دیش‌های کوچک حاوی آب مقطر قرار گرفت و در دمای ۳°C ۲۵±۳ نگهداری شدند (روش اصلاح شده Ibrahim *et al.* (2006). بعد از ٢٤ ساعت تعداد لاروهایی که از الک عبور کردند شمارش شد. این آزمایش دوبار انجام شد. برای هر غلظت سه تکرار درنظر گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح ۵٪ صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم افزار آماری SAS (GLM) انجام گرفت.

اثر محافظت کنندگی اسانس میخک هندی در شرایط گلدانی: ابتدا حدود ۱۰۰۰ لارو سن دو تازه تفریخ شده به گلدان‌های حاوی یک کیلوگرم خاک استریل اضافه شد. سپس ریشه نشاء یک ماهه گوجه فرنگی به مدت یک ساعت در ۱۰۰ میلی لیتر اسانس میخک به غلظت‌های ppm ۲۰۰- ۱۰۰- ۵۰ قرار داده شد و بعد در گلدان‌ها کاشته شد. هر تیمار سه تکرار داشت. در تیمار شاهد به جای اسانس میخک از آب استفاده شد. گیاهان در رطوبت ۸۵٪، دما بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۳ ساعت روشنایی و۱۱ ساعت تاریکی رشد کردند. برداشت، ۶۰ روز بعد از کاشت نشاء انجام گرفت. پس از گذشت ۶۰ روز از زمان اعمال تیمارها گلدان‌ها را برگردانده و ریشه‌ها را از محل طوقه از ساقه جدانموده و ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه هر گلدان را در پلاستیک‌های جداگانه ریخته و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. شاخص گال، تعداد لارو سن دو موجود در ۱۰۰ گرم خاک و فاکتورهای رشدی محاسبه گردیدند. شاخص گال بر اساس سیستم پیشنهادی Taylor and Sasser (1987) محاسبه شد. تعداد لاروهای سن دو در ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه در هر گلدان با استفاده از روش کوینس و جنسن (۱۹۵۵) استخراج و شمارش شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام شد. آزمون نرمال بودن داده‌های درصدی با استفاده از MINI TAB 13 انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون LSD در سطح ۵٪ صورت گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS (GLM) انجام گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه و بحث

نتایج زیست‌سنجی اثر سمیت فرآورده های میخک هندی روی تخم و لارو: نتایج حاصل از آنالیز پروبیت نشان داد که عصاره الکلی میخک هندی با LC_{50}=510ppm برای تخم و LC_{50}=646ppm برای لارو نسبت به دیگر فرآورده‌های این گیاه بیشترین سمیت را برای تخم و لارو سن دو داشته است در حالی که عصاره آبی کمترین سمیت را بر مراحل تخم و لارو نماتود ریشه‌گرهی داشته است. سمیت فرآورده‌های میخک (باتوجه به میزانLC_{50}) برای تخم بیشتر از لارو بوده است (جدول ۱).

نتایج اثر اسانس میخک هندی بر مهاجرت لارو سن دو *Meloidogyne javanica* : نتایج تجزیه واریانس (در قالب طرح بلوک کامل تصادفی) حاکی از آن بود که بین غلظت‌های مختلف اسانس میخک از نظر درصد مهاجرت لارو سن دو از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ($F=71.61, df_{error}=8, df_{model}=3$, $P\geq0.01$) وجود دارد. بعد از حذف اسانس از سوسپانسیون حاوی لارو و ریختن این سوسپانسیون بر روی ستون شنی، لاروهایی که حرکت کرده و خود را به پتری حاوی آب رسانیده بودند شمارش شدند. ۸۲/۸۵ درصد لاروها در تیمار شاهد از ستون شنی گذشتند و در پتری حاوی آب مقطر قرار گرفتند در حالی که در لاروهایی که با غلظت ۵۰۰ppm اسانس میخک تیمار شده بودند این مقدار تقریباً به نصف رسیده و ٤٥/٧٢ درصد شد (جدول ۲). با افزایش غلظت اسانس درصد تحرک و مهاجرت لارو کاهش یافته و روند نزولی را طی کرد. این نتایج نشان داد که اسانس میخک بر تحرک و جابجایی لارو تاثیر منفی گذاشته بطوریکه بیش از ۵۰درصد لاروهایی که در معرض اسانس (۵۰۰ppm) قرار گرفته بودند نتوانستند از ستون شنی عبور کرده و خود را به پتری حاوی آب مقطر برسانند.

جدول ۱- نتایج برآورد LC_{50}و LC_{90} فرآورده های مختلف میخک هندی روی لارو سن دو و تخم نماتود ریشه گرهی

Table 1. Analysis of Probit of nematicidal activity of clove products against egg and juvenile of *Meloidogyne javanica*

Plant Products	LC_{50} (ppm)		LC_{90} (ppm)		Standard error of Slope		Chi-square value(Q_2)	
	egg	juvenile	egg	juvenile	egg	juvenile	egg	juvenile
Aqueous extract	4320(3119-5208)*	4930(2300-7053)	8730(7190-12174)	8880(7434-11693)	0.817	0.999	2.03	1.61
Ethanol extract	510(210-760)	646(330-7340)	1820(1070-4427)	1884(1183-4740)	0.597	0.360	0.55	5.9
Essential oil	874(370-2220)	909(370-2246)	8820(6940-13560)	3940(1559-11666)	0.430	0.570	2.1	2.53

*Values in parentheses indicate 95% confidence limit.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان مهاجرت لارو سن دو نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف اسانس میخک هندی

Table 2. Means comparison of migration of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under the different concentrations of essential of clove(*Eugenia caryophyllata)*

Concentration of essential oils (ppm)	Percent of migrated juveniles
500	45.72[d]
250	56.81[c]
50	68.63[b]
Untreated control (0 ppm)	82.85[a]
LSD	6.14

حروف مشابه در مقابل هر میانگین بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Means followed by the same letter (s) are not significantly different at P=%5.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در آزمایش اثر محافظت‌کنندگی غلظت‌های مختلف اسانس میخک جهت کنترل نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط گلخانه

Table 3. Means comparison of evaluated parameters in protective effect of different essential of *Eugenia caryophyllata* on *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions

Stem dry weight	Root dry weight	Stem fresh weight	Root fresh weight	No. of J_2/100g soil	No .of egg mass/ root system	Gall index	Concentration (ppm)
5.6[a]	2.5[a]	37.4[a]	27.8[bc]	156.6[c]	48[c]	1.7[c]	200
5.9[a]	2.3[a]	38.2[a]	34.9[a]	206.6[c]	64.6[c]	3.4[b]	100
3.9[b]	2.9[a]	22[b]	24.6[c]	243.3[b]	89[b]	3.5[b]	50
4.6a[b]	3.5[a]	21.4[b]	34.3[ab]	371.6[a]	115[a]	4.7a	0
1.39	1.37	5.11	7.01	38.04	20.26	0.63	LSD

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Different letters in the same vertical column indicate significant difference (LSD test, P≤0.05)

نتایج اثر محافظت کنندگی اسانس میخک هندی: طبق نتایج تجزیه واریانس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری ($P\geq0.05$) در تمامی صفات مورد بررسی به جز وزن خشک ریشه وجود داشت ($df_{error}=8, df_{model}=3$) . مقایسه میانگین شاخص گال بین تیمارها نشان داد که تیمار شاهد بیشترین شاخص گال را به خود اختصاص داده و کمترین میزان گالزایی مربوط به گیاه تیمار شده با غلظت ۲۰۰ppm اسانس میخک بود. همچنین از نظر تعداد توده تخم موجود در روی ریشه براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ ٪ بین تیمارها مشاهده شد. بر این اساس بیشترین تعداد توده تخم در ریشه شاهد و کمترین تعداد در ریشه گوجه‌فرنگی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ppm میخک دیده شد. در مورد تعداد لاروهای سن دو موجود در ۱۰۰گرم خاک نیز همین امر صادق بود و اسانس میخک موجب کاهش تعداد لاروهای خاک شده بود (جدول۳). وزن تر و خشک ریشه (به جز یک مورد) با افزایش غلظت اسانس نسبت به شاهد روند کاهشی داشته و نمونه شاهد بیشترین وزن را به خود اختصاص داد. در حالی که در مقایسه میانگین وزن تر و خشک ساقه با افزایش غلظت

Archive of SID

www.SID.ir

اسانس، سیر صعودی داشت و در نمونه شاهد به دلیل آلودگی شدید ریشه به نماتود و تاثیر این بیماری در اندام‌های هوایی، وزن خشک و تر ساقه نسبت به دیگر تیمارها کمتر بود.

ترکیبات متعددی از گونه‌های *Eugenia* spp. شناسایی شده است که مهم‌ترین آنها، سسکوترپن لاکتون‌ها، فلاونوئیدهای چند اکسیژنه، آنتوسیانین‌ها و اسانس‌ها می‌باشند (Cristobal-Alejo *et al*., 2006). بطور تخصصی، اوژنول به عنوان یک ترکیب فعال از اسانس گل *E. caryophyllata* توسط Sangwan *et al*. (1990) جدا شد. طبق گزارش Sangwan *et al*. (1990) درباره اثر نماتودکشی اوژنول، بنظر میرسد اثر مطلوب نماتودکشی در عصاره و اسانس میخک هندی در این تحقیق مربوط به وجود ترکیب فعال اوژنول باشد. همچنین Gokte *et al*. (1991) گزارش کردند که کاربرد اوژنول در غلظت ۵۰۰-۱۰۰ppm برای کاهش جمعیت نماتود ریشه گرهی مؤثر می‌باشد. مکانیسم عمل اسانس میخک هنوز به درستی تعیین نشده است اما احتمالاً اسانس این گیاه از طریق تخریب غشای سلولی و تغییرات در قابلیت نفوذپذیری غشاء بر نماتود تاثیر می‌گذارد (Meyer *et al*., 2008). Zasada *et al*. (2002)، غلظت مؤثر EC_{50} و EC_{90} را برای ۱۸ عصاره گیاهی در شرایط آزمایشگاهی علیه لاروهای *M. javanica* تعیین نمودند. از جمله این گیاهان، میخک هندی بود که نتایج غلظت مؤثر را علیه این نماتود در خاک EC_{90} =0.1gr/ml و EC_{50}= 0.04 gr/ml نشان داد. Cristobal-Alejo *et al*. (2006) در بررسی میزان سمیت عصاره میخک هندی بر لارو سن دو *M. incognita* مشخص کردند که عصاره برگ این گیاه در غلظت ED_{50}=133.4ppm برای لاروهای این نماتود سمیت دارند. Meyer *et al*. (2008) میزان غلظت مؤثر (LC_{90}) برای تخم نماتود ریشه گرهی (*M. javanica*) را LC_{90}=1040ppm و برای لارو سن دو LC_{90}=1510ppm و LC_{50}=413ppm گزارش کردند. این نتایج با یافته‌های حاصل از این تحقیق (نتایج موجود در جدول شماره ۱) همخوانی دارد. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که سمیت فرآورده‌های میخک برای تخم بیشتر از لارو بوده است زیرا تخم جزء مقاوم‌ترین مراحل در سیکل زندگی نماتود است و این شاید بخاطر وجود پوسته سه لایه در اطراف تخم می‌باشد. البته مقایسه این تحقیق با بررسی‌های سایر محققین کار درستی نیست زیرا ارگانیسم هدف (نماتود مورد آزمایش) و روش انجام آزمایش متفاوت است. همانطور که در جدول شماره یک آمده است سمیت عصاره الکلی میخک بیشتر از سمیت عصاره آبی می‌باشد. این شاید به خاطر این است که بیشتر مواد فعال میخک ترکیبات عالی پیچیده ای هستند که حلالیت آنها در آب کمتر از الکل است. تعیین سطوح غلظت کشنده علاوه بر مقایسه میزان سمیت ترکیبات مختلف می‌تواند به عنوان اساسی برای انتخاب غلظت در آزمایشات خاکی باشد. در بررسی گلخانه‌ای اسانس میخک، هنگامی که ریشه نشاء گوجه‌فرنگی قبل از کشت یک ساعت در غلظت های مختلف اسانس میخک غوطه‌ور شد، بطور چشمگیری آلودگی به نماتود کاهش یافت و این احتمالاً بخاطر القاء مقاومت توسط اسانس به گیاه گوجه‌فرنگی باشد. John and Hebsy (2000) مشاهده کردند که ریشه‌های فرو برده شده در عصاره برگ چریش به مدت یک ساعت، بطور مشخصی رشد بهتری را نشان دادند و در نهایت گالزایی و تعداد توده‌های تخم در ریشه کاهش یافت. به عقیده Chitwood (2002) احتمالاً برخی مواد شیمیایی توسط ریشه‌ها جذب می‌شوند و در نتیجه واکنش‌های زنجیره‌ای بدلیل وجود برخی فاکتورهای[1] موجود در عصاره‌ها شکل می‌گیرد که منجر به القاء مقاومت در گیاه نسبت به نماتود می‌شود. عصاره برخی گیاهان با فعالیت نماتودکشی ممکن است بر رفتارهای نماتود نظیر قابلیت تشخیص میزبان اثرگذار باشند. مطالعات Zuckerman and Esnard (1994) مؤید این نکته بود. بررسی‌های Meyer *et al*. (2008) نشان داد که کاربرد اسانس میخک در نسبت ۱ درصد ۷ روز قبل از انتقال نشاء، جمعیت نماتود ریشه‌گرهی را به میزان ۳۷ درصد

۱-elicitor/activator

Archive of SID
www.SID.ir

کاهش می‌دهد. آزمایش گلخانه‌ای این تحقیق نیز نشان داد اسانس میخک هندی اثر حفاظتی برای ریشه داشته بطوریکه جمعیت نماتود ریشه گرهی را تقریباً به نصف جمعیت اولیه رسانید. اثرات گیاهسوزی اسانس میخک برای نشای بسیاری از گیاهان گزارش شده است. در آزمایشات اولیه اثر محافظت کنندگی اسانس میخک، در غلظتهای بالا اثرات گیاهسوزی مشاهده گردید که با رقیق کردن اسانس و کاهش مدت زمان قرارگیری ریشه نشاء در معرض اسانس، از بروز اثرات گیاهسوزی ممانعت بعمل آمد. میزان گیاهسوز بودن اسانس میخک با توجه به نوع گونه میخک، غلظت اسانس حاصل از این گیاه و سن گیاه مورد آزمایش (گیاه تیمار شده) متفاوت است. کاربرد اسانس میخک نسبت به اوژنول ارجحیت دارد، زیرا ترکیبات دیگری نیز در اسانس میخک وجود دارد که تاثیر نماتودکشی دارند. اسانس برگ میخک بیش از ۳۰ ترکیب دارد. Meyer *et al*. (2008) ترکیبات اسانس میخک را شامل ۸۲–۷۰ درصد اوژنول، ۱۹/۵–۷/۲ درصد بتاکاریوفیلین، ۱۲/۱–۱/۲ درصد اوژنول استات، ۲/۱–۰/۸ درصد آلفا هومولن و ۰/٤–۰/۳ درصد کاریوفیلن اکسید اعلام کردند. البته فاکتورهایی نظیر اندام گیاهی بکار رفته در اسانس‌گیری و منطقه جغرافیایی در میزان این ترکیبات مؤثر است. تفاوت در نحوه عمل اسانس میخک علیه نماتودها در نتیجه تفاوت درصد ترکیبات موجود در اسانس این گیاه دارد. بنابراین ترکیبات اصلی موجود در اسانس میخک باید تعیین شود زیرا نتایج مربوط به اثرات نماتودکشی، با میزان ترکیبات اصلی موجود در اسانس این گیاه مرتبط است.

نتایج این پژوهش نشان داد که فرآورده‌های میخک دارای پتانسیل بالایی برای کاربرد در کنترل نماتود ریشه گرهی می‌باشند. پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری جهت شناسایی ویژگی‌های اسانس یا عصاره میخک هندی و نحوه‌ی عمل آن بر نماتود انجام گیرد.

References

CAVENESS, F. E. and H. J. JENSEN, 1995. Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and pant tissue Proceeding of the helminthological society of Washington. 22: 87-89.

CHITWOOD, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control, Annu. Rev. Phytopathol. 40: 221-249.

CONSOLINI, A. E. and M. G. SARUBBIO, 2002. Pharmaco-logical effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart, J. Ethnopharmacol. 81:57-63.

CRISTOBAL-ALEJO, J., J. M. TUN-SUAREZ, S. MOGUEL-CATZIN and N. MARBAN-MENDOZA, 2006. In vitro sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants, Nematropica. 36(1): 89-96.

FERRIS, H. and L. ZHENG, 1999. Plant sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*, J. Nematol. 31:241–263.

GOKTE, N., M. L. MAHESHWARI and V. K. MATHUR, 1991. Nematicidal activity of few essential oils against root-knot and cyst nematode species, Indian J. Nematol. 21:123–127.

HALBRENDT, J. M. 1996. Allelopathy in the management of plant-parasitic nematodes, J. Nematol. 28(1): 8-14.

HOSSEINI NEGAD, S. A. 2004. Effect of neem, Azadirachta indica, on root-knot nematode, Meloidogyne javanica, infesting tomato. Applied Entomology and Phytopathology, 72 (1): 69-89

IBRAHIM, S. K., A. F. TRABULSI and S. EL-HAJ, 2006. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*, Phytopathol. Mediterr. 45: 238-246.

JEPSON, S. B. 1987. Identification of Root-Knot Nematode (*Meloidogyne*) Species, CAB International, Wallingford, UK. 265pp.

JOHN, A. and B. HEBSY, 2000. Bare-root dip treatment of brinjal seedlings in phytochemicals for the management of root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*), J. Trop. Agric. 38 (1–2), 69–72.

Archive of SID

www.SID.ir

MEYER, S. L. F., D. K. LAKSHMAN, I. A. ZASADA, B. T. VINYARD and D. J. CHITWOOD, 2008. Dose-response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root knot nematode *Meloidogyne incognita*, Pest Mgt. Sci. 64: 223–229.

NUÑEZ, L., M. D. AQUINO and J. CHERIFE, 2001. Anti-fungal properties of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in sugar solution, Brazilian J. Microbiol. 32:123-126.

PANDEY, R. C. and B. K. DWIVEDI, 2000. Comparative study of different plant extracts for their nematicidal potential, Curr. ematol. 11:39–43.

PARK, I. K., J. Y. PARK, K. H. KIM, K. S. CHOI, I. H. CHOI, C. S. KIM and S. C. SHIN, 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*), Nematol. 7: 767–774.

PHOURGHOLAMI, M. H., M. KAMALINEJAD, M. JAVADI, S. MAJZOOB and M. SAYYAH, 1999. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice, J. Ethnopharmacol. 64: 167-171.

SALGADO, S. M. L. and V. P. CAMPOS, 2003. Hatching and mortality of *Meloidogyne exigua* in extracts and in natural products, Fitopatol. Bras. 28:166–170.

SANGWAN, N. K., B. S. VERMA, K. K. VERMA and K. S. DHINDSA, 1990. Nematicidal activity of some essential oils, Pestic. Sci. 28: 331-335.

SIDDIQUI, M. R. 2000. Thylenchida. CAB international. Wallingford, Oxon.U.K.833p.

SOUTHEY, J. F. 1986. Laboratory ethods for work with plant and soil nematodes, Technical bulletin. Naff/Adas. HMSO. London. 202 pp.

TYLOR, A. L. and J. N., SASSER, 1978. Biology, identification and control of root-knot nematode, *Meloidogyne* species, North Carolina State University Graphics. Raleigh. NC. 111pp.

YANG, Y., S. LEE, W. LEE, D. CHOI, and Y. AHN, 2003. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*, J. Agric. & Food Chem. 51:4884-4888.

ZASADA, I. A., H. FERRIS and L. ZHENG, 2002. Plant sources of Chinese herbal remedies: Laboratory efficacy, suppression of *Meloidogyne javanica* in soil, and phytotoxicity assays, J. Nematol. 34(2): 124-129.

ZOUHAR, M., O. DOUDA, D. LHOTSKY and R. PAVELA, 2009. Effect of plant essential oils and mortality of the stem nematode (Ditylenchus dipsaci). Plant Protec. Sci. 45(2): 66-73.

ZUCKERMAN, B. M. and J. ESNARD, 1994. Biological control of plant nematodes-current status and hypothesis, Jpn. J. Nematol. 24:1 –13.

Archive of SID

www.SID.ir