اثرات نماتود ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*)روی گیاه دارویی بارهنگ کبیر (*Plantago major*)*

EFFECTS OF ROOT-KNOT NEMATODE (*Meloidogyne javanica*) ON PLANTAIN MEDICINAL PLANT (*Plantago major*)

فاطمه السادات سیدین[۱]، مجید اولیاء[۱]** و کامکار جایمند[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳)

چکیده

گیاهان دارویی همچون گیاه بارهنگ کبیر *Plantago major* به سبب دارا بودن ترکیبات دارویی گوناگون در صنایع داروسازی از اهمیت زیادی برخوردارند. در این پژوهش ضمن ارزیابی بیماری‌زایی نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* بر گیاه بارهنگ کبیر، اثر سطوح مختلف مایه تلقیح اولیه این نماتود روی شاخص‌های رشد گیاه میزبان و تکثیر نماتود بررسی شد. در ادامه، محتوای موسیلاژی بذر، مقدار ترکیبات شیمیایی کوئرستین و اسید یورسولیک و هم‌چنین غلظت عناصر سدیم، پتاسیم، منیزیم و کلسیم بارهنگ کبیر در هنگام آلودگی به نماتود، ۹۰ روز پس از تلقیح با نماتود ریشه‌گرهی بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاکی از حساسیت این گیاه به نماتود هدف است. در گیاهان آلوده به نماتود وزن هزار دانه، میزان موسیلاژ بذر و هم‌چنین مقدار اسید یورسولیک کاهش یافت درحالی‌که غلظت عناصر سدیم و کلسیم ریشه و ترکیب شیمیایی کوئرستین در اندام هوایی افزایش نشان داد. با افزایش سطح جمعیت نماتود، وزن تر اندام هوایی، طول اندام هوایی و ریشه کاهش یافت در صورتی که وزن تر ریشه افزایش نشان داد. رابطه فاکتور تولید مثلی نماتود با سطوح مختلف جمعیت تلقیح شده معکوس بود به عبارت دیگر بالاترین فاکتور تولید مثلی نماتود در گیاهان تلقیح شده با کمترین سطح از جمعیت نماتود (۱۰۰۰ لارو مرحله دوم (J_2) / دو کیلوگرم خاک) دیده شد.

واژه‌های کلیدی: نماتود ریشه‌گرهی، بارهنگ، کوئرستین، اسید یورسولیک

*: قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Olia100@yahoo.com

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲. عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گیاهان دارویی در طول تاریخ همیشه با انسان قرابت خاصی داشته و آثار دارویی و موارد استفاده آن بر هیچ‌کس پوشیده نیست. با پیشرفت کشاورزی و دانش کشت و زرع و دسترسی به بازارهای مختلف و تجارت بین‌المللی، کشت گیاهان دارویی نیز شروع شد ولی در سال‌های اخیر استفاده از این گیاهان برای رفع احتیاجات و نیازهای صنعت داروسازی افزایش یافته است (Park *et al.* 2005). بارهنگ کبیر با نام علمی *Plantago major* L. از خانواده Plantaginaceae، دارای مصارف دارویی از جمله، درمان بیماری‌های پوستی، ناراحتی‌های تنفسی، گوارشی، گردش خون، پیشگیری از سرطان، ممانعت از تشکیل تومور، درمان زخم و عفونت‌ها و غیره است (Chiang *et al.* 2002؛ Samuelsen 2000). این گیاه با داشتن ترکیباتی مانند ترکیبات فنلی (مشتقات اسید کافئیک)، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و ویتامین C، گیاه دارویی مهمی محسوب می‌شود (Galvez *et al.* 2003؛ Samuelsen 2000). ترکیب فلاونوییدی کوئرستین (Quercetin)، به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای استفاده می‌شود (Seong *et al.* 2006) و ترکیب کامپفرول (Kaempferol) یک آنتی اکسیدان قوی است که از تخریب اکسایشی سلول‌ها، چربی‌ها، DNA جلوگیری می‌کند و با ممانعت از اکسایش لیپوپروتئین‌های کم چگال (LDL) و تشکیل پلاکت‌ها در خون، از تصلب شرایین جلوگیری به‌عمل می‌آورد (Lopez-Sanchez 2007). هم‌چنین ترکیب تری ترپنوئیدی اسید یورسولیک (Ursolic acid) اثر مهارکنندگی بر پیشرفت تومور سرطانی دارد (Samuelsen 2000).

با توجه به رویکرد اهمیت و استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهان، توجه به آفات و بیماری‌های این گیاهان به‌عنوان یک قدم مؤثر در افزایش کمی و کیفی تولیدات گیاهان دارویی امری ضروری به نظر می‌رسد. در میان عوامل بیماری‌زای گیاهی، نماتودهای انگل گیاهی توانایی بیماری‌زایی بالایی دارند و سالیانه حدود صد میلیارد دلار خسارت به محصولات کشاورزی وارد می‌نمایند (Oka *et al.* 2000). با این وجود، به مطالعه نماتودها به‌عنوان عوامل مولد بیماری در گیاهان دارویی کمتر توجه شده است (Park *et al.* 2004). نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne* spp. به‌عنوان یکی از انگل‌های مهم ریشه مطرح بوده که در نتیجه فعالیت این نماتود و عکس‌العمل گیاه میزبان، گره یا غده‌هایی روی ریشه ایجاد شده و سبب اختلال در سیستم جذب آب و مواد غذایی گیاه می‌شود. گونه‌های مختلف نماتود ریشه‌گرهی، از نظر بیماری‌زایی مهم‌ترین گونه‌های نماتودهای انگل گیاهی در سراسر دنیا هستند که از لحاظ اقتصادی بسیار مهم بوده و دامنه میزبانی وسیعی دارند (Hirschmann 1985؛ Jepson, 1987؛ Rammah & Hirschmann 1990). گونه *M. javanica* در تمام نقاط دنیا وجود داشته و دومین گونه معمول در جهان است که در ایران از نظر پراکندگی و فراوانی در درجه اول اهمیت قرار دارد (Akhiani *et al.* 1986).

یکی از مطالعات مهم درباره واکنش گیاهان دارویی به نماتودهای ریشه‌گرهی، بررسی واکنش ۳۸ گونه گیاه دارویی در مقابل آلودگی به دو گونه نماتود *M. javanica* و *M. incognita*، می‌باشد که نتایج آن نشان‌دهنده بیماری‌زا بودن *M. javanica* روی ۲۸ گونه و *M. incognita* روی ۲۴ گونه بود. ۱۴ گونه گیاهی به هر دو گونه نماتود آلوده بودند (Haseeb & Pandy 1987). نتایج حاصل از بررسی اثر سطوح مختلف جمعیت *M. incognita* روی رشد و فیزیولوژی دو گونه گیاه

www.SID.ir

بذرالبنج نشان‌دهنده کاهش وزن تر و خشک گیاه، بازده کلی آلکالوئید، مقدار کل کلروفیل، میزان فتوسنتز و غلظت عناصری مانند سدیم، پتاسیم، آهن، منگنز، مس و روی در ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی با افزایش جمعیت نماتود بود درحالی‌که غلظت سدیم و پتاسیم در اندام‌های هوایی افزایش یافته بود (Haseeb *et al*. 1990؛ Butool & Haseeb 1998). *پارک و همکاران* بیماری‌زایی و تولید مثل *M. hapla* روی سه گیاه دارویی *Angelica koreana*، *Peucedanum japonicum*، *Astragalus membranaceus* را در خاک گلدان تحت شرایط گلخانه ارزیابی و نشان دادند که طول و وزن ریشه و ساقه و ضخامت ریشه در هر سه گیاه در همه سطوح مایه تلقیح (۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ لارو سن ۲ در کیلوگرم خاک) در مقایسه با گیاهان سالم کاهش می‌یابد (Park *et al*. 2005).

احیانی و نادری (۱۳۶۳) گیاهان دارویی بارهنگ، شاهدانه، جعفری، نعناع و گشنیز را به‌عنوان میزبان گونه‌های مختلف نماتودهای ریشه‌گرهی (*M. javanica*، *M. incognita* و *M. hapla*) از نقاط مختلف ایران و از جمله استان اصفهان گزارش و معرفی کردند. *نصراصفهانی و همکاران* (۱۳۸۷) با بررسی دامنه میزبانی نماتود ریشه‌گرهی روی گیاهان دارویی در استان اصفهان، گیاهان همیشه بهار، فراسیون، گل گاوزبان ایرانی و خارجی، علف چای، افسنطین، شنگ، بابونه، آویشن، باباآدم، مریم گلی، سیب‌زمینی ترشی، شمعدانی معطر، رزماری، مارتیغال، بادرنجبویه، روناس، بومادران گل سفید، اسطوخودوس، پنتا، کرفس، سداب، قیچ و شاهدانه را به‌عنوان میزبان برای *M. javanica* شناختند. نتایج آزمایش گلخانه‌ای رزاز *هاشمی و اکبری‌نیا* (۱۳۸۷) نشان داد که شش گونه گیاه دارویی رازیانه، سداب، کرچک، بادرنجبویه، زیره سبز و زیره سیاه با تلقیح ۵۰۰۰ عدد تخم نماتود *M. javanica* حساس هستند. هدف از این پژوهش بررسی بیماری‌زایی، تعیین اثر سطوح مختلف مایه تلقیح اولیه نماتود *Meloidogyne javanica* روی رشد گیاه دارویی بارهنگ کبیر *Plantago major* L. و تعیین غلظت دو ترکیب شیمیایی کوئرستین و اسید یورسولیک این گیاه در هنگام بیماری‌زایی نماتود می‌باشد.

روش بررسی

تهیه مایه تلقیح نماتود و شناسایی گونه

تعدادی ریشهٔ گیاهان آلوده به نماتود ریشه‌گرهی (گوجه‌فرنگی، خیار، انار) از استان اصفهان جمع‌آوری شد و پس از شستشوی ریشه‌ها از هر کدام تک کیسه تخمی جدا وروی گوجه‌فرنگی تکثیر گردید. شناسایی مورفولوژیکی نماتود تکثیر یافته با تهیه اسلاید میکروسکوپی از شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتودهای ماده بالغ انجام شد. برای شناسایی مولکولی نماتود، استخراج DNA از تخم به روش *سیلوا و همکاران* (Silva *et al*. 2000) و استخراج DNA از تک لاروهای تکثیر شده توسط تک کیسه تخم مطابق روش اروی (Orui 1996) انجام شد و سپس تکثیر DNA با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه (OPAFjav / OPARjav) معرفی شده توسط *زایلسترا و همکاران* (Zijlstra *et al*. 2000) و *عسکریان و همکاران* (Askarian *et al*. 2009) صورت گرفت. پس از شناسایی گونه مورد نظر، با استفاده از لارو و تخم، جمعیت نماتود *Meloidogyne javanica* روی گیاهان گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) رقم روتگرز (Rutgers) تکثیر شد. برای به‌دست آوردن مایه تلقیح آزمایش، تخم‌های نماتود *M. javanica* از ریشه‌های آلوده گوجه‌فرنگی با استفاده از هیپوکلریت

Archive of SID

www.SID.ir

سدیم استخراج گردیدند (Hussey & Barker 1973).

بیماری‌زایی نماتود روی گیاه دارویی بارهنگ کبیر

بذر گیاه دارویی *Plantago major* در مخلوط خاک رسی سیلتی اتوکلاو شده کاشته شد و بعد از چهار هفته از سبز شدن بذرها، گیاهان به یک عدد در هر گلدان تنک و با ۵۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتود *M. javanica* تلقیح شدند. آزمایش به‌صورت طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در گلخانه با متوسط دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ارزیابی نتایج ۶۰ روز پس از تلقیح صورت گرفت. شاخص گال (GI) در سیستم ریشه به‌صورت ۰ تا ۵ براساس سیستم Taylor & Sasser (1978)، تعداد تخم در هر سیستم ریشه، جمعیت لارو سن دوم (J_2) نماتود در ۲۰۰ گرم خاک هر گلدان با استفاده از سانتریفوژ (Caveness & Jensen 1955)اندازه‌گیری شد و فاکتور تولیدمثلی نماتود نیز با استفاده از فرمول $Rf = \frac{Pf}{Pi}$ (Rf= فاکتور تولیدمثلی، Pf= مقدارجمعیت نهایی نماتود که شامل تخم‌ها + لاروهای موجود در خاک و Pi= مقدار جمعیت اولیه نماتود یا همان مایه تلقیح اولیه) محاسبه شد.

سطوح مختلف مایه تلقیح نماتود روی گیاه دارویی بارهنگ کبیر

بذر گیاه دارویی *Plantago major* در دو کیلوگرم مخلوط خاک رسی سیلتی (۴۳/۳٪ رس، ۴۲٪ سیلت و ۱۴/۷٪ شن) اتوکلاو شده هر گلدان کاشته شد و چهار هفته بعد از سبز شدن بذرها، گیاهان به یک عدد در هر گلدان تنک و با تعداد ۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتود *M. javanica* تلقیح شدند. گلدان‌ها در طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار و در گلخانه با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ارزیابی نتایج ۹۰ روز پس از تلقیح صورت گرفت. شاخص‌های رشدی گیاه همچون طول اندام هوایی و ریشه، وزن تر اندام هوایی و ریشه و وزن هزار دانه و شاخص‌های رشد و نموی نماتود مانند شاخص گال در گیاهان آلوده شده، تعداد تخم در هر سیستم ریشه، جمعیت لارو سن دوم (J_2) نماتود در خاک هر گلدان و فاکتور تولیدمثلی نماتود در همه سطوح تلقیحی و مطابق روش‌های ذکر شده محاسبه شد.

برای تعیین میزان تجزیه عناصر در ریشه و اندام‌های هوایی، از روش سوزاندن خشک و ترکیب با اسید کلریدریک استفاده شد. به این منظور ۱ گرم از هر نمونه گیاهی ۵ ساعت در کوره الکتریکی و در دمای ۵۵۰° C خشک و به خاکستر سفید تبدیل گردید و ۱۰mL اسید کلریدریک ۲ مولار به آن اضافه شد. غلظت عناصر سدیم و پتاسیم با فلیم فتومتر (Piper 1942) و منیزیم و کلسیم با روش کمپلکسومتری (Helmke & Sparks 1996) اندازه‌گیری شدند. به منظور بررسی تأثیر نماتود روی ترکیبات ترشحی بذر، محتوای موسیلاژی به روش گرم استخراج شد (Sharma & koul 1986). استخراج ترکیبات شیمیایی کوئرستین، کامپفرول مطابق با روش *دایگل و کانکرتون* (Daigle & conkerton 1982) و اسید یورسولیک بر طبق روش *زاکچینا و همکاران* (Zacchigna *et al*. 2009) و از برگ گیاه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) انجام شد. مقایسه مقدار عناصر غذایی، موسیلاژ و ترکیبات شیمیایی در سطح بیماری‌زایی (۵۰۰۰ تخم و لارو سن دوم) و شاهد انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز واریانس و رگرسیون با استفاده از نرم‌افزار

www.SID.ir

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM 9.1 انجام شد. برای مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید. میانگین داده‌های کلسیم و منیزیم ریشه قبل از تجزیه و تحلیل آماری برای نرمال شدن به Log X تبدیل شدند و سپس با استفاده از آزمون LSD فیشر و در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

شناسایی گونه نماتود ریشه‌گرهی

با بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نماتود ماده و لارو سن دوم (J_2) و استفاده از کلید شناسایی ایسنباک و تریانتافیلو (Eisenback & Triataphyllou 1991) گونه نماتود *M. javanica* شناسایی گردید. هم‌چنین با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی OPAFjav و OPARjav قطعه ۶۷۰ جفت بازی تکثیر گشت، که مشخصه گونه *M. javanica* است.

بیماری‌زایی نماتود ریشه‌گرهی روی گیاه دارویی بارهنگ کبیر

وضعیت میزبانی بارهنگ کبیر نسبت به نماتود ریشه‌گرهی ۶۰ روز بعد از تلقیح، براساس میزان شاخص گال ۰/۵±۳/۲۵ و فاکتور تولیدمثلی ۱/۱ ±۵/۴۸، تعیین شد که با توجه به شاخص گال (GI>۲) و فاکتور تولیدمثلی (RF>۱) گیاه بارهنگ کبیر حساس معرفی می‌شود و نشان می‌دهد که نماتود *M. javanica* توانایی بیمار نمودن گیاه دارویی بارهنگ کبیر را دارد. اخیانی و نادری، ۱۳۶۳ بارهنگ، شاهدانه، جعفری، نعناع و گشنیز را به‌عنوان میزبان‌های گونه‌های مختلف نماتود ریشه‌گرهی از نقاط مختلف ایران گزارش کردند که بررسی ما روی گیاه بارهنگ با نتایج اخیانی و نادری مطابقت دارد.

سطوح مختلف مایه تلقیح اولیه نماتود ریشه‌گرهی روی گیاه دارویی بارهنگ کبیر

داده‌های به‌دست آمده بعد از گذشت ۹۰ روز از زمان تلقیح نشان می‌دهد که طول و وزن اندام هوایی و طول ریشه بارهنگ کبیر در همه سطوح تلقیحی در مقایسه با شاهد کاهش نشان می‌دهد درحالی‌که وزن ریشه افزایش یافته است (جدول ۱). تلقیح با ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتود *M. javanica* ۷/۷٪ تا ۲۷/۲٪ طول اندام هوایی، ۱۲/۱٪ تا ۳۵/۴٪ وزن اندام هوایی، ۱۳/۶٪ تا ۴۱/۳٪ طول ریشه و ۵/۶٪ تا ۲۴/۴٪ وزن هزار دانه را در مقایسه با شاهد کاهش داده است. میانگین وزن تر ریشه با افزایش مایه تلقیح افزایش یافته و بیشترین وزن تر ریشه مربوط به تیمار ۴۰۰۰ می‌باشد. همزمان با ورود جوان مرحله دوم نماتود ریشه‌گرهی، نماتود آنزیم پروتئاز را ترشح می‌کند که باعث شکستن پروتئین‌های گیاه میزبان به اسیدهای آمینه می‌شود. تمرکز اسیدهای آمینه به‌خصوص تریپتوفان که پیش نیاز تولید ایندول استیک اسید است، موجب تجمع اکسین و عدم تعادل هورمونی در محل تغذیه‌ای نماتود می‌گردد. در این مکان‌ها به جای رشد طولی سلول‌های پارانشیمی پوست، رشد عرضی اتفاق می‌افتد و موجب هیپرتروفی شده و ایجاد گال یا غده در محل ورود لارو سن دوم (J_2) می‌شود (Hirschmann 1985). هم‌چنین افزایش ریشه‌های فرعی (واکنش میزبان نسبت به وجود نماتود) توسط نماتود ریشه‌گرهی، عامل اصلی افزایش وزن در ریشه تیمارهای آلوده می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

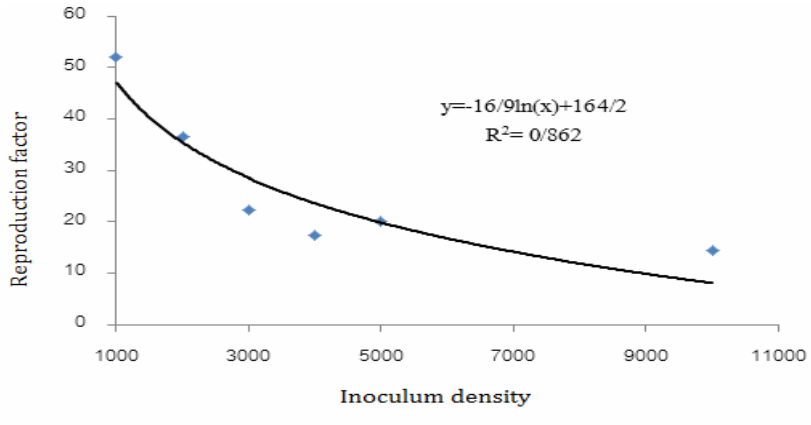
Archive of SID

www.SID.ir

تعداد گال، تعداد کیسه تخم و تعداد تخم در ریشه و تعداد لارو در خاک با افزایش مایه تلقیح افزایش یافت که براساس سیستم (Taylor & Sasser 1978)، شاخص گال و کیسه تخم در همهٔ سطوح ۵ بود. فاکتور تولیدمثلی نماتود (RF) *M. javanica* با افزایش سطوح تلقیح کاهش می‌یابد به‌طوری‌که بیشترین مقدار فاکتور تولیدمثلی برای نماتود ریشه‌گرهی در گلدان‌هایی با کمترین مقدار مایه تلقیح (سطح تلقیح ۱۰۰۰) و کمترین مقدار فاکتور تولیدمثلی در گلدان‌هایی با بیشترین مقدار مایه تلقیح (سطح تلقیح ۱۰۰۰۰) دیده شد (شکل ۱). کاهش تکثیر نماتود در بالاترین سطح جمعیتی شاید به خاطر خرابی سیستم ریشه و رقابت برای غذا و تغذیه در میان نماتودهای در حال رشد در داخل سیستم ریشه و به خاطر ناتوانایی لاروها در یافتن مکان‌های آلودگی جدید باشد(Butool & Haseeb 1998 ؛ Khan *et al*. 2006). تعداد گره در ریشه نخود مایه‌زنی شده با غلظت‌های متفاوت نژاد سه نماتود *M. incognita* با افزایش مایه تلقیح افزایش می‌یابد اما میزان فاکتور تولیدمثلی با افزایش غلظت مایه تلقیح کاهش یافته و بیشترین فاکتور تولیدمثل نماتود در کمترین سطح مایه تلقیح مشاهده شده است (Siddiqui & Mahmood 1992). روند کاهشی در تکثیر با مطالعه نماتودهای ریشه‌گرهی روی برخی گیاهان دارویی دیده شده است (Haseeb,Pandey & 1997 ؛ Butool & Haseeb 1998؛ Park *et al*. 2005؛ Khan *et al*. 2006).

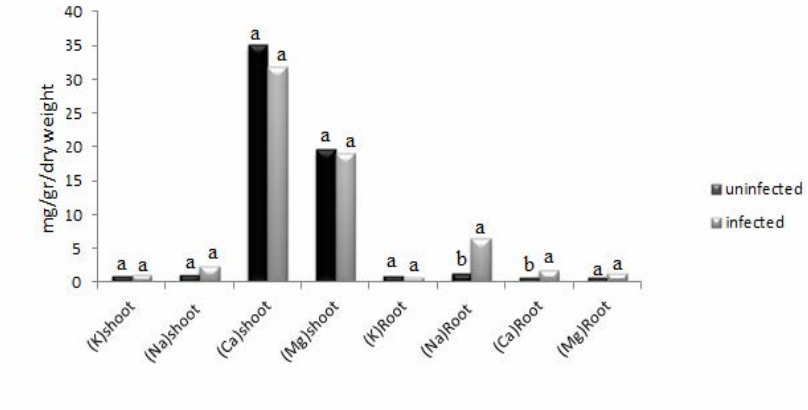
نتایج نشان می‌دهد سدیم و کلسیم ریشه بارهنگ کبیر در دو سطح شاهد و بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند درحالی‌که دیگر عناصر اندازه‌گیری شده در اندام‌های هوایی و ریشه اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند (شکل ۲). یکی از اولین اثرات نماتود روی فیزیولوژی میزبان با تغییر در غلظت عناصر غذایی در گیاه میزبان ظاهر می‌شود. نماتودها جذب آب و مواد معدنی از ریشه و یا توانایی دسترسی این مواد به دیگر بافت‌ها را کاهش می‌دهند. این اختلال باعث کمبود مواد معدنی در بخش‌هایی از گیاه یا تجمع نادرست در اطراف محل آلودگی می‌شود (James & Ellis 1978). طبق نتایج *حسیب و همکاران* (۱۹۹۰)، در گیاه بذر البنج با افزایش سطح تلقیح نماتود غلظت سدیم و پتاسیم در اندام‌های هوایی افزایش می‌یابد و حداکثر افزایش این عناصر در بالاترین سطح تلقیحی نماتود است. این عناصر در ریشه با افزایش سطح تلقیح نماتود تا سطح $۲۵۰J_2$ به آرامی کاهش می‌یابند و با افزایش مایه تلقیح تا سطح J_2 ۵۰۰۰، غلظت این عناصر ثابت می‌ماند (Hasseb *et al*. 1990). اندازه‌گیری موسیلاژ بذر بارهنگ کبیر، کاهشی را در سطح بیماری‌زایی نسبت به شاهد نشان می‌دهد که این کاهش به‌صورت معنی‌دار در سطح ($P<۰/۰۵$) است (شکل ۳). با بررسی‌های به‌عمل آمده مشخص گردید که در مورد اثر نماتودهای انگل گیاهی روی مقدار موسیلاژ در گیاهان دارویی پژوهشی صورت نگرفته است. برای بررسی دو ترکیب فلاونوئیدی کامپفرول و کوئرستین و ترکیب تری‌ترپنوئیدی اسید یورسولیک، استانداردهای تهیه شده با غلظت مشخص از هر سه ترکیب جداگانه به دستگاه HPLC تزریق شد (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). با مقایسه پیک‌های استحصالی در نمونه‌های تیمار و شاهد با پیک استانداردهای مرجع، نتایج حاصل از بررسی سه ترکیب کامپفرول، کوئرستین و اسید یورسولیک در عصاره برگ‌های آلوده با نماتود و سالم بارهنگ کبیر نشان می‌دهدکه از ترکیبات فلاونوئیدی، کامپفرول در نمونه‌های شاهد و تیمار وجود ندارد و کوئرستین در

www.SID.ir



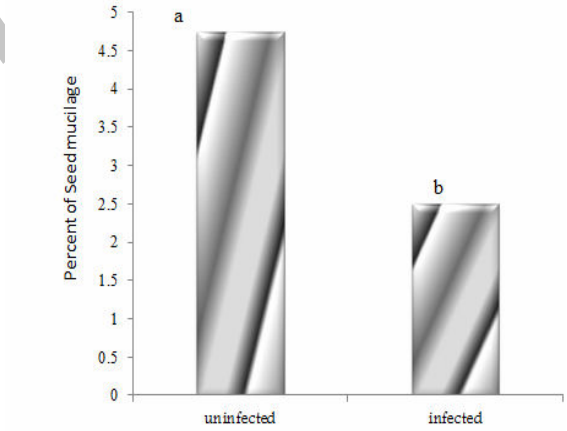
شکل ۱. رابطه بین مقدار مایه تلقیح *Meloidogyne javanica* و تولید مثل آن روی بارهنگ کبیر ۹۰روز پس از تلقیح

Fig. 1. Relationship between inoculum densities of *Meloidogyne javanica* and its reproduction on *Plantago major* at 90-day postinoculation



شکل ۲. مقایسه میانگین غلظت عناصر غذایی اندام هوایی و ریشه در گیاه سالم و آلوده

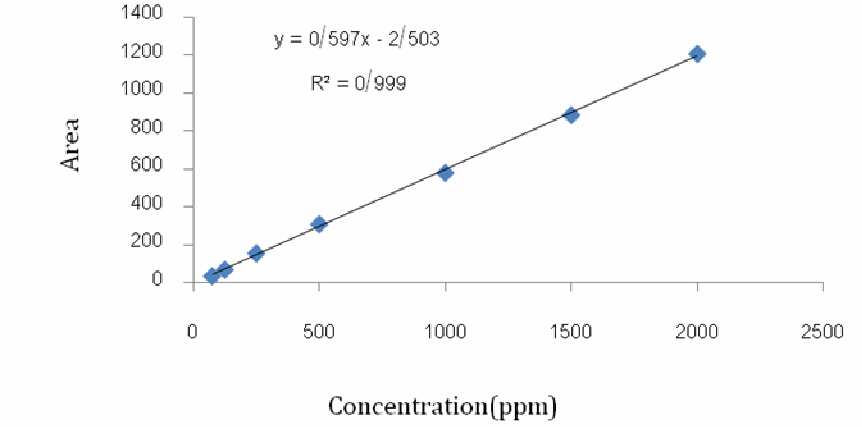
Fig. 2. Means comparison of nutrient elements concentration of shoots & roots in infected and healthy plants



شکل۳. مقایسه میانگین درصد موسیلاژ بذر در گیاه سالم و آلوده

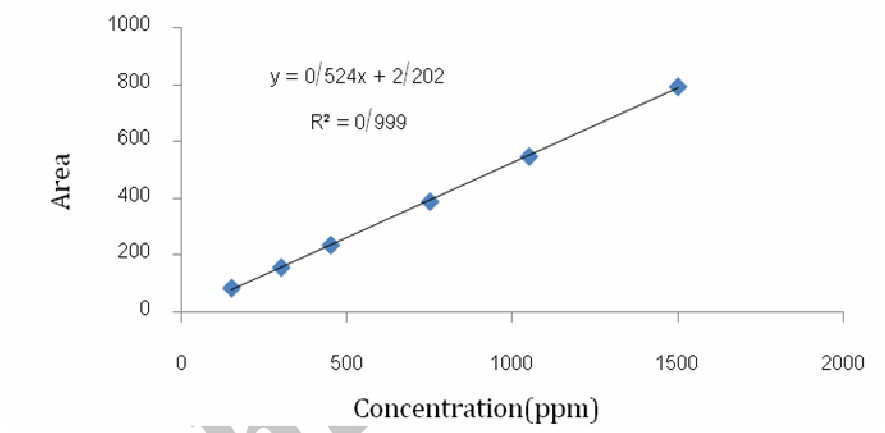
Fig. 3. Means comparison of Percent of Seed mucilage in infected and healthy plants

www.SID.ir



شکل۴. منحنی کالیبراسیون ترکیب کامفرول

Fig. 4. Kaemferol compound calibration curve



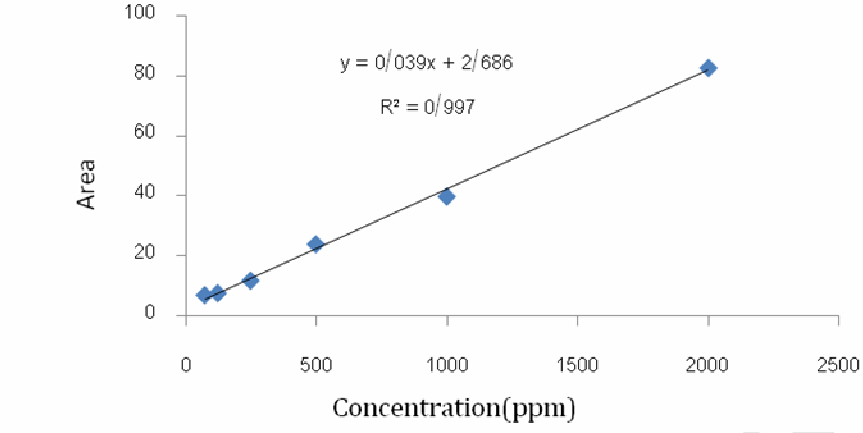
شکل۵. منحنی کالیبراسیون ترکیب کوئرستین

Fig. 5. Quercetin compound calibration curve

۸برگ‌های شاهد ppm ۴۱۵/ (شکل ۷ و جدول ۲) و در تیمار ۵۰۰۰ نماتود، ppm ۸۹۲/۶ (شکل ۸ و جدول ۳) می‌باشد درحالی‌که ترکیب تری‌ترپنوئیدی یورسولیک اسید در شاهد ۲۹۵/۸ppm (شکل ۹ و جدول ۴) و در برگ‌های تیمار ۵۰۰۰ نماتود، ppm ۸۶/۸ (شکل ۱۰ و جدول ۵) بود. با توجه به این‌که ترکیبات فلاونوئیدی و تری‌ترپنوئیدی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی بوده و در گیاهان نقش‌های دفاعی دارند بنابراین می‌توان افزایش ترکیب فلاونوئیدی را در تیمار نسبت به شاهد توجیه کرد.

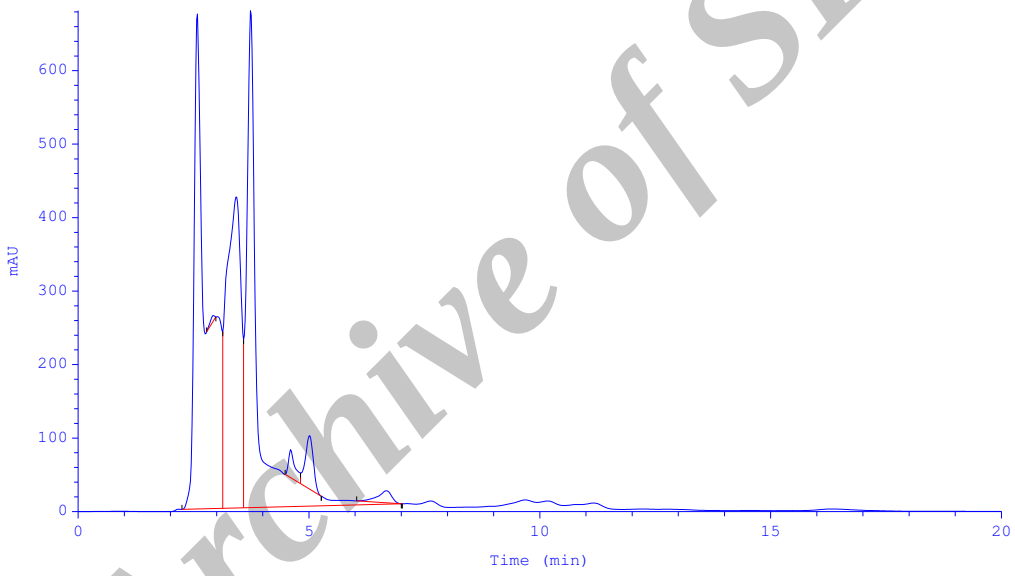
تولید و تجمع ترکیب‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها، استرول‌ها و دیگر فنول‌ها در ایجاد واکنش‌های دفاعی نسبت به نماتودها مطرح می‌باشد. بررسی‌های صورت گرفته، افزایش ۲ تا ۴ برابری ترکیب‌های ایزوفلاونوئیدی را در ریشه سویای آلوده به نماتود *Heterodera glycines* نسبت به گیاهان سالم نشان داد (Kennedy *et al*. 1999). افزایش و تجمع ترکیب‌های فلاونوئیدی داخل سلولی را در گال‌های ریشه شبدر سفید آلوده به نماتود *M. javanica* گزارش شده است

www.SID.ir



شکل۶. منحنی کالیبراسیون ترکیب اسید یورسولیک

Fig. 6. Ursolic acid compound calibration curve



شکل۷. طیف HPLC مقدار کوئرستین بارهنگ در تیمار شاهد

Fig. 7. HPLC spectrum of plantain quercitin quantity in control treatment

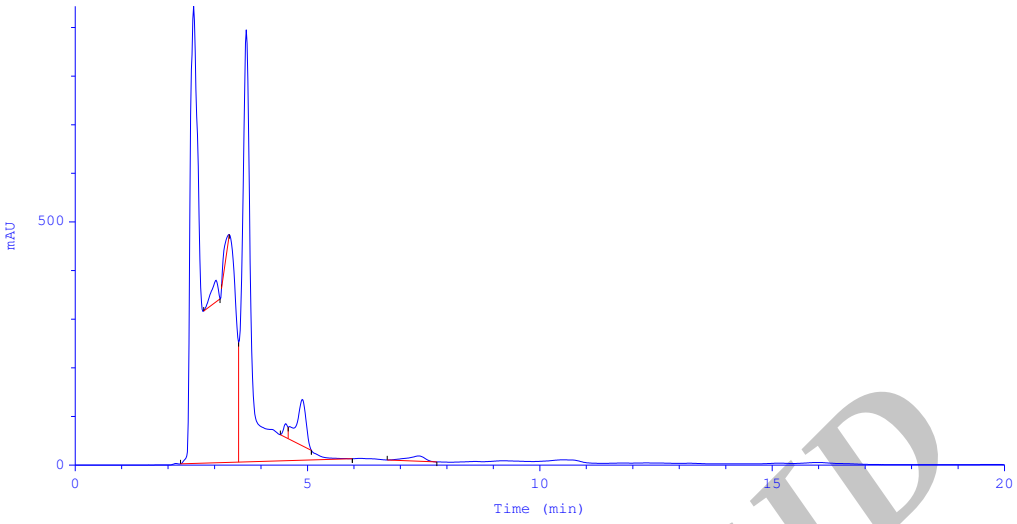
Archive of SID

جدول ۲. میزان کوئرستین بارهنگ در تیمار شاهد

Table 2. Quantity of plantain quercitin in control treatment

زمان بازداری (دقیقه) Ret.time (min)	زمان شروع (دقیقه) Start (min)	زمان پایانی (دقیقه) End (min)	ترکیب Compound	مقدار (پی پی ام) Amount (ppm)	سطح (میکرو آمپر در دقیقه) Area(mAU*min)	ارتفاع (میکرو میلی‌آمپر) Height (mAU)
2.58	2.25	3.13	quercetin	415.87	219.18	673.83

www.SID.ir



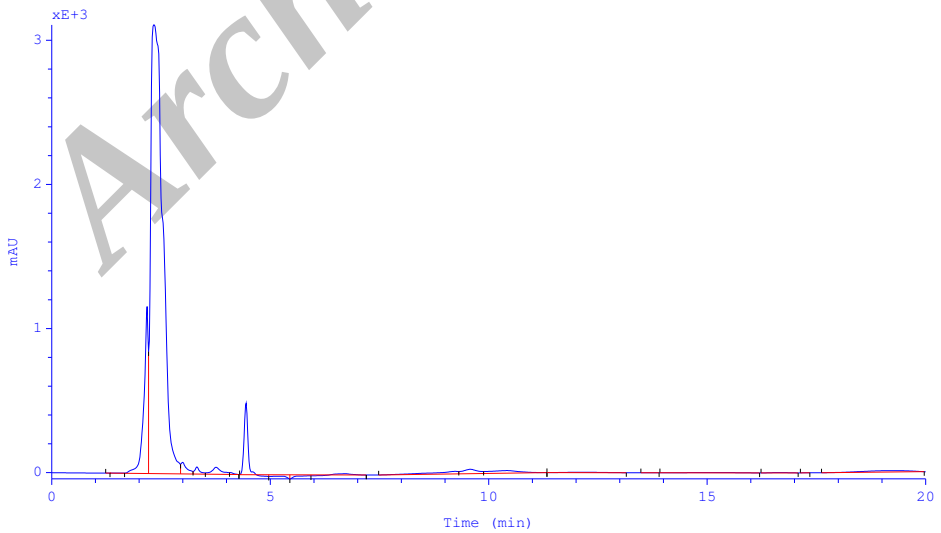
شکل۸. طیف HPLC مقدار کوئرستین بارهنگ در تیمار۵۰۰۰ نماتود

Fig. 8. HPLC spectrum of plantain quercitin quantity in 5000 nematodes treatment

جدول ۳. میزان کوئرستین بارهنگ در تیمار ۵۰۰۰ نماتود

Table 3. Quantity of plantain quercitin in 5000 nematodes treatment

زمان بازداری (دقیقه) Ret.time (min)	زمان شروع (دقیقه) Start (min)	زمان پایانی (دقیقه) End (min)	ترکیب Compound	مقدار (پی پی ام) Amount (ppm)	سطح (میکرو آمپر در دقیقه) Area(mAU*min)	ارتفاع (میکرو میلی‌آمپر) Height (mAU)
2.55	2.27	3.52	quercetin	892.69	470.49	940.41



شکل۹. طیف HPLC مقداراسید یورسولیک بارهنگ در تیمار شاهد

Fig. 9. HPLC spectrum of plantain ursolic acid quantity in control treatment

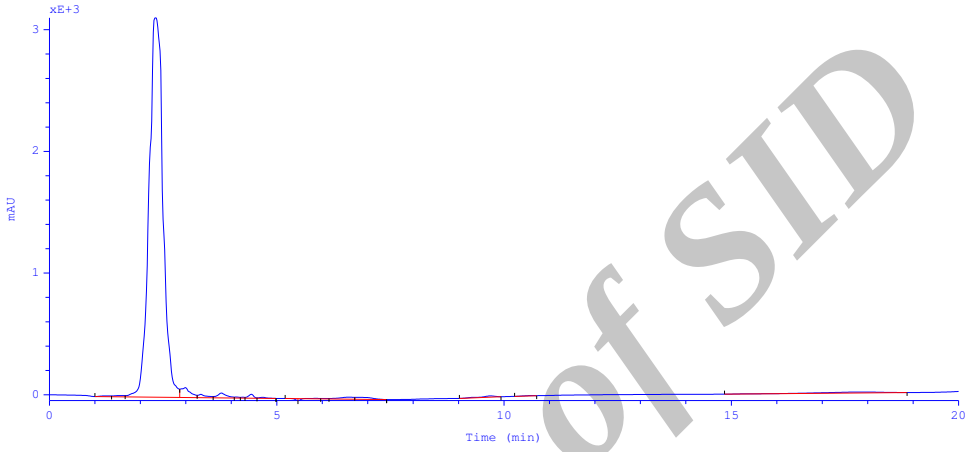
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. میزان اسید یورسولیک بارهنگ در تیمار شاهد

Table 4. Quantity of plantain ursolic acid in control treatment

زمان بازداری (دقیقه) Ret.time (min)	زمان شروع (دقیقه) Start (min)	زمان پایانی (دقیقه) End (min)	ترکیب Compound	مقدار (پی پی ام) Amount (ppm)	سطح (میکرو آمپر در دقیقه) Area(mAU*min)	ارتفاع (میکرو میلی‌آمپر) Height (mAU)
9.58	9.32	9.88	ursolic acid	295.89	12.32	30.25



شکل ۱۰. طیف HPLC مقداراسید یورسولیک بارهنگ در تیمار۵۰۰۰ نماتود

Fig. 10. HPLC spectrum ofplantain ursolic acid quantity in 5000 nematodes treatment

جدول۵. میزان اسید یورسولیک بارهنگ در تیمار ۵۰۰۰ نماتود

Table 5. Quantity of plantain ursolic acid in 5000 nematodes treatment

زمان بازداری (دقیقه) Ret.time (min)	زمان شروع (دقیقه) Start (min)	زمان پایانی (دقیقه) End (min)	ترکیب Compound	مقدار (پی پی ام) Amount (ppm)	سطح (میکرو آمپر در دقیقه) Area(mAU*min)	ارتفاع (میکرو میلی‌آمپر) Height (mAU)
9.70	9.02	9.93	ursolic acid	86.84	3.61	9.96

flavones-*C*-glycoside .(Hutangura*et al.* 1999) و *O*-methyl-apigenin-C-deoxyhexanide-O-hexoside در اثر حمله نماتودهای *Pratylenchus neglectus* و *Heterodera avenae* به چاودار القا شده و در واکنش‌های دفاعی گیاه نقش دارند (Soriano *et al.* 2004). مطالعات نشان می‌دهد ساپونین تری‌ترپنوئیدی ضد قارچی در گیاه *Barbarea vulgaris* سبب مقاومت در برابر بالپولکدار *Plutella xylostella* می‌شود. نقش ساپونین‌های تولید شده در جو و گوجه برای دفاع گیاه در برابر قارچ‌های پاتوژن گیاهی مطالعه شده است (Christou*et al.* 2008).نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که با حمله نماتود *M. javanica* به گیاه بارهنگ کبیر

Archive of SID
www.SID.ir

به‌طورکلی شاخص‌های رشدی گیاه مانند طول، وزن انـدام هوایی، طول ریشه و وزن هزار دانه کاهش می‌یابـد امـا در نهایت باعث تحریک سنتز ترکیب فلاونوئیـدی کوئرسـتین می‌شود که این ترکیـب در گیـاه نقـش دفـاعی داشـته و از لحاظ دارویـی نیـز بـرای انـسان دارای اهمیـت مـی‌باشـد. ترکیـب اسـید یورسـولیک هـم از جملـه سـاپونین‌هـای تری‌ترپنوئیدی است که در تعیین مقاومـت بـه بیمـاری‌هـا نقش دارد. در این پژوهش مقدار این ترکیب کـاهش یافتـه که احتمالاً با حمله نماتود این گروه از ترکیبات دفـاعی در بارهنگ فعال نشده‌انـد و نقـشی در مقاومـت و دفـاع ایفـا نمی‌نمایند و شاید فعال شدن و افزایش مقدار آنها در گیـاه بارهنـــگ کبیـــر در هنگـــام ورود گروهـــی دیگـــر از پـاتوژن‌هاسـت. البتـه برخـی پـاتوژن‌هـا بـسته بـه دامنـه میزبانی‌شان می‌توانند سمیت ترکیبات دفاعی ساپونینی را از بین ببرند.

منابع

جهت ملاحظه به صـفحات (125- 123) مـتن انگلیـسی مراجعـه شود.

Archive of SID

www.SID.ir