DOI: 10.22034/IJPP.2024.2012655.431

بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۱/ سال ۱۴۰۲: ۳۲-۲۰

CC BY

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر نماتدکشی چند اسانس گیاهی و متابولیت قارچی علیه *Ditylenchus dipsaci* در شرایط آزمایشگاهی و شناسایی ترکیبات شیمیایی آن‌ها

سمانه خسروانی[۱*]، غلامرضا نیکنام[۲]، رقیه کریم زاده[۳] و سعید زهتاب سلماسی[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۵ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۷)

چکیده

نماتد ساقه و پیاز (*Ditylenchus dipsaci*) یکی از نماتدهای مهم انگل گیاهی با گسترش جهانی است که بیشتر در مناطق معتدل خسارت می‌زند. پیاز، سیر و یونجه از میزبان‌های اصلی آن محسوب می‌شوند. مدیریت این نماتد با رعایت تناوب زراعی، کاشت ارقام مقاوم، استفاده از اندام‌های تکثیری و بذر عاری از نماتد و سموم نماتدکش صورت می‌گیرد. به دلیل خطرناک بودن کاربرد نماتدکش‌های شیمیایی برای سلامت انسان و محیط‌زیست، به‌کارگیری روش‌های ایمن، مؤثر و کم‌هزینه جایگزین ضرورت پیدا کرده است. در این پژوهش، اثر نماتدکشی اسانس‌های گیاهی آویشن کوهی، پونه، میخک، مریم‌گلی و مرزه، هم‌چنین متابولیت‌های گونه‌ای از قارچ *Scytalidium* در مقایسه با نماتدکش متام‌سدیم در شرایط آزمایشگاهی مطالعه گردید. برای تهیه جمعیت نماتد مورد نیاز، نماتدها از سیرهای آلوده جمع‌آوری شده از منطقه گوگان استان آذربایجان شرقی استخراج و به مدت ۶۰ روز روی دیسک هویج در دمای ۱ ± ۱۸ درجه سلسیوس تکثیر گردید. تأثیر اسانس‌های گیاهی، متابولیت‌های قارچی و متام‌سدیم روی نماتدهای تکثیرشده در آزمایش‌های زیست‌سنجی با چهار تکرار انجام و مرگ‌ومیر نماتدها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت شد. بعد از انجام تجزیه پروبیت داده‌های حاصل، مقادیر LC50 و LC90 برای هر کدام از ترکیبات مورد بررسی محاسبه گردید. مقادیر LC50 اسانس‌های میخک، پونه، مرزه و آویشن پس از ۲۴ ساعت به‌ترتیب ۱۷۴۸، ۷۶۹/۲، ۱۶۶۲ و ۴۹۱۳ پی‌پی‌ام و برای متابولیت قارچی و متام‌سدیم به‌ترتیب ۲۰۷/۶ و ۶/۷ پی‌پی‌ام تعیین گردید. جهت شناسایی اجزای اسانس‌های گیاهی از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مجهز به ستون DB5 استفاده شد و نتایج آن ارائه گردید. بر اساس مقادیر LC50 به‌دست‌آمده، به غیر از مریم‌گلی، ترکیبات مورد آزمایش در غلظت‌های نسبتاً پایین موجب مرگ‌ومیر و کاهش جمعیت نماتد *D. dipsaci* شدند.

کلیدواژه: اسانس گیاهی، متابولیت قارچ، متام‌سدیم، مهار نماتد، نماتد ساقه و پیاز

*مسئول مکاتبه، پست الکترونیکی: Khosravani.uni76@gmail.com

۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲ استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳ دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۴ استاد، گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

DOI: 10.22034/IJPP.2024.2012655.431

Research Article
Comparison of the nematicidal effect of some essential oils and fungal metabolites against Ditylenchus dipsaci under laboratory conditions and identification of their chemical compounds

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

(Received: 07.10.2023; Accepted: 26.02.2024)

Abstract

The stem and bulb nematode *Ditylenchus dipsaci* is one of the most important plant-parasitic nematodes with a worldwide distribution, causing damage mainly in temperate regions. Onion, garlic and alfalfa are its main hosts. The use of nematode-free seeds and plant propagation materials, crop rotation, resistant cultivars and chemical nematicides are common methods of its management. Due to the side effects of nematicides on human health and the environment, the use of safe, cost-effective alternative methods are necessary. In this study, the nematicidal effects of the essential oils of mountain thyme, oregano, clove, sage and savory as well as the metabolites of the fungus *Scytalidium* sp. were studied in comparison to metam sodium under laboratory conditions. To prepare the nematode population, nematodes were extracted from naturally infected garlic from the Gogan region of East Azarbaijan province, reared on carrot discs and incubated at 18 ± 1°C for 60 days. The effects of plant essential oils, fungal metabolites and metam sodium were investigated in bioassays with four replicates, and nematode mortality was recorded after 24 and 48 hours. After a probit analysis, the LC50 and LC90 values were calculated for each of the compounds tested. After 24 hours, the LC50 values for the essential oils clove, oregano, marzeh and thyme were 1748, 769.2, 1662 and 4913 ppm, respectively, and for the fungal metabolite and metam sodium were 207.6 and 6.7 ppm, respectively. Gas chromatography with a mass spectrometer (GC-MS) and a DB5 column was used to identify the components of the essential plant oils and the metabolites, the results of which are presented here. Based on the LC50 values, the compounds tested caused mortality and population decline of *D. dipsaci* at relatively low concentrations, with the exception of sage-flower.

Keywords: Essential oil, fungal metabolite, metam sodium, nematode control, stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*

[*]Corresponding author's E-mail address: Khosravani.uni76@gmail.com
1. Graduate M. S student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz. Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz. Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz. Iran
4. Professor, Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz. Iran

مقدمه

نماتد *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 با داشتن بیش از ۵۰۰ گونه گیاه میزبان در بین ۱۰ نماتد مهم جهان قرار دارد. این نماتد در مناطق معتدل روی گیاهانی مثل یونجه، پیاز، سیر، توت‌فرنگی، زنبق، سنبل، نرگس و تعدادی از گیاهان ریزوم‌دار دیگر بیماری‌زا می‌باشد. مرحله مقاوم این نماتد لارو سن چهار می‌باشد که به‌راحتی می‌تواند دمای زیر صفر و یا ۵۵ درجه سلسیوس را تحمل کند و با فراهم‌شدن رطوب پس از مدت طولانی دوباره فعال گردد (Sturhan & Brzeski 1991). این نماتد همراه با پیاز و بذرهای باقلا و یونجه انتشار می‌یابد (IPPC 2016). تاکنون این نماتد از مزارع یونجه، پیاز، سیر، توت‌فرنگی و لوبیا در شهرهای تهران، کرج، بندرعباس، استان فارس، اصفهان، زنجان ،خراسان، کردستان، گلستان و مازندران گزارش شده است (Sharafeh 1983, Akhiani *et al*. 1985, Shahcheraghi *et al*. 1989, Ahmadian 2003, Fasihi *et al*., 2010, Mirbabaei Karani & Karegar 2013). اولین گزارش نماتد ساقه و پیاز در مزارع سیر، از استان فارس می‌باشد (Pakniyat & Keshtvarz 2006).

مهار نماتدهای انگل گیاهی به روش‌های مختلف فیزیکی، زراعی، استفاده از ارقام مقاوم و نماتدکش‌های شیمیایی انجام می‌شوند (Elahinia 2014). باقیمانده نماتدکش‌های شیمیایی چندین ماه در خاک باقی مانده و موجب اثرات سوء روی سایر موجودات خاک‌زی، به‌خصوص ریزموجودات مفید خاک و به‌هم 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 محیط‌زیست، موجودات زنده غیرهدف و گیاهان کمترین تأثیر را داشته باشند، مهم و ضروری است.

تعدادی از گیاهان حاوی ترکیبات شیمیایی با خاصیت نماتدکشی هستند که احتمالا برای محیط‌زیست و انسان ایمن و یا کم‌خطر می‌باشند (Oka *et al*. 2006). اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی برای مهار عوامل بیمارگر گیاهی استفاده شده است (Pauli 2001; Burt 2004; Mizubuti *et al*. 2007). ترکیبات فرار گیاهی به‌ویژه اسانس‌ها دارای اثرات ضدمیکروبی، ضدقارچی، حشره‌کشی، لاروکشی، کنه‌کشی و نماتدکشی هستند. اما تنها تعداد کمی از اسانس‌ها و ترکیبات گیاهی فرار دارای اثرات نماتدکشی می‌باشند (Oka *et al*. 2000). در مطالعه صورت گرفته تأثیر مثبت اسانس میخک هندی در میزان کاهش نماتد ساقه و پیاز در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است. اسانس روغنی گیاهان *Thymus vulgaris* و *Origanum vulgare* فعالیت نماتدکشی علیه *D. dipsaci* نشان داده‌اند. هم‌چنین مرگ‌ومیر قابل توجهی از *D. dipsaci* با قرار گرفتن در معرض اسانس‌های روغنی *T. mastichina*، *T. vulgaris*، *O. vulgare*، *O. compactum* و *Eugenia caryophylla* به‌دست آمده است (Zouhar *et al*. 2009). در مطالعه‌ای دیگر اسانس گیاه دارچین چینی (*Cinnamomum cassia*) باعث مرگ‌ومیر ۱۰۰ درصدی نماتد *D. dipsaci* پس از چهار ساعت گردید و اسانس گیاهان کندر (*Boswellia sacra*) و شوید (*Anethum graveolens*) باعث مرگ‌ومیر ۷۵ درصدی پس از ۲۴ ساعت شد (Douda *et al*. 2022).

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 زیست‌محیطی 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). در آزمایشی اثرات نماتدکشی جنس‌های *Arthrobotrys*، *Trichoderma*، *Purpureocillium* و *Clonostachys* علیه لاروهای سن دو نماتدهای *Meloidogyne incognita* و *M. javanica* با مرگ‌ومیر ۹۲/۷ تا ۱۰۰ درصد بعد از ۴۸ ساعت نشان داده شده است (Migunova *et al*.

2018).

هدف از این تحقیق بررسی اثرات نماتدکشی اسانس‌های گیاهی آویشن کوهی، پونه، میخک، مریم‌گلی و مرزه و متابولیت‌های گونه‌ای از قارچ *Scytalidium* و نماتدکش متام‌سدیم روی جمعیت ۶۰ روزه نماتد *D. dipsaci* در شرایط آزمایشگاهی و تعیین مقادیر LC_{50} و LC_{90} اسانس‌ها، متابولیت و متام‌سدیم با استفاده از تجزیه پروبیت بود.

مواد و روش‌ها

۱- جداسازی و شناسایی نماتد

جمعیتی از *Ditylenchus dipsaci* از نمونه‌های سیر آلوده از مزارع آلوده گوگان استان آذربایجان شرقی به روش سینی (Whitehead & Hemming 1956) استخراج شد و پس از تهیه اسلایدهای دائمی از نماتدها، بر اساس صفات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی شناسایی گردید.

۲- تکثیر نماتد

برای تکثیر نماتد از دیسک‌های هویج با قطر حدود ۳ سانتی‌متر و ضخامت نیم سانتی‌متر که از هویج‌های سالم و ضدعفونی شده با الکل ۷۰٪ به‌دست آمده بود، استفاده گردید. تشتک‌های حاوی دیسک هویج به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به منظور تولید بافت کالوس و نیز ردیابی آلودگی‌های باکتریایی و قارچی احتمالی و در نهایت حذف دیسک‌های آلوده نگهداری شدند. نماتدهای استخراج شده از سیر به مدت ۱۵ دقیقه درون محلول ۰/۱ درصد سولفات استرپتومایسین قرار گرفتند. سپس توسط آب مقطر سترون شسته شده و حدود ۸۰ الی ۱۰۰ نماتد بالغ نر و ماده به هر دیسک هویج مایه‌زنی شد. درب تشتک‌های پتری حاوی دیسک به وسیله پارافیلم مسدود شده و درون کیسه پلاستیکی تیره داخل انکوباتور با دمای ۱ ± ۱۸ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ روز قرار گرفتند. دیسک‌ها هر دو هفته یک‌بار بررسی شده و موارد آلوده به قارچ یا باکتری حذف گردید (Chitambar & Raski 1985). پس از تکثیر نماتدهای خالص‌سازی شده، یک جمعیت از آن‌ها انتخاب گردید و بعد از افزایش جمعیت، در آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج نماتدها، دیسک‌های هویج داخل آب مقطر سترون به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و نماتدهای استخراج شده تا زمان انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی درون یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس به طور موقت نگهداری شدند.

۳- تهیه اسانس گیاهان مورد آزمایش

قسمت‌های هوایی گیاهان آویشن، پونه، مریم‌گلی و مرزه و غنچه‌های میخک به صورت خشک از عطاری‌های مورد اعتماد خریداری و آسیاب شدند. سپس ۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه درون بالن دو لیتری ریخته و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. با استفاده از دستگاه اسانس‌گیری (Clevenger)، در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به روش تقطیر با آب به مدت دو تا سه ساعت اسانس‌گیری انجام شد. برای جداکردن اسانس از جداره لوله شیشه‌ای از هگزان به عنوان حلال استفاده شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آب‌گیری شدند تا از انجام برخی واکنش‌ها بین آب و اجزای خاصی از اسانس جلوگیری شود. برای کاربردهای بعدی، اسانس‌ها داخل ظروف شیشه‌ای تیره (شرایط تاریکی) در یخچال نگهداری شدند (Kazemi 2014).

۴- شناسایی ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌ها و متابولیت قارچ مورد آزمایش

جهت شناسایی اجزای اسانس‌های گیاهان دارویی و متابولیت قارچ مورد بررسی، از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مجهز به ستون DB5 استفاده شد (Chauhan *et al*. 2014).

۵- متام‌سدیم

در این مطالعه از نماتدکش متام‌سدیم (Vapam, 32.7 EC)

استفاده شد.

۶- تهیه و کشت قارچ و آزمایش زیست‌سنجی متابولیت قارچی

قارچ *Scytalidium* sp. جدا شده از نماتد سیستی غلات (*Heterodera filipjevi*) در محیط‌های کشت جامد YMG (Yeast extract Malt Glucose) با pH = 6.3 کشت و به مدت یک ماه برای تولید متابولیت‌های قارچی در انکوباتور نگهداری شد. سپس میسلیوم قارچی به همراه یک لایه نازک از محیط کشت خراش داده شد و با اضافه کردن حلال متانول در دمای ۴۰ درجه سلسیوس با استفاده از دستگاه همگن‌ساز فراصوتی به مدت نیم ساعت عمل استخراج انجام شد. با استفاده از کاغذ صافی، محلول فوق فیلتر شده و فاز مایع متانولی از فاز جامد جداسازی گردید. فاز متانولی مایع به وسیله دستگاه روتاری تحت خلا خشک شد. سپس با اضافه کردن مخلوط ۱:۱ حلال اتیل استات و آب دیونیزه عصاره مورد نظر استخراج گردید و فاز آلی با استفاده از دستگاه روتاری تحت خلا خشک گردید. عصاره خام حاصل از تخمیر جدایه قارچ روی محیط YMG، برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی این متابولیت مورد استفاده قرار گرفت.

عصاره خشک به وسیله حلال توئین چهار درصد حل شده و یک محلول پایه و اصلی به غلظت ۴۰۰۰۰ پی‌پی‌ام تهیه شد. ابتدا آزمایش‌های مقدماتی با غلظت‌ها اولیه ۱۰۰، ۱۴۱، ۲۰۰، ۲۸۲ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام انجام و محدوده غلظت‌ها آزمایش اصلی تعیین شد. برای این منظور به داخل میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری مقدار مشخصی از سوسپانسیون نماتد حاوی ۶۰ فرد به همراه مقداری از محلول پایه عصاره خام بسته به غلظت مورد نظر اضافه شد. بر اساس نتایج آزمایش‌های مقدماتی، غلظت‌ها نهایی انتخاب و آزمایش اصلی با آن ادامه یافت. در آزمایش اصلی هفت تیمار ۱۲۰، ۱۳۸، ۱۵۸، ۱۸۲، ۲۰۹، ۲۴۰ و ۲۸۰ پی‌پی‌ام با فاصله لگاریتمی آزمایش شد. آب مقطر سترون به همراه توئین چهار درصد به عنوان شاهد استفاده گردید. آزمایش چهار بار در چهار روز متفاوت تکرار شد. پس از قراردادن نماتدها در معرض غلظت‌ها مختلف متابولیت قارچی، میکروتیوب حاوی نماتد و متابولیت داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و مرگ‌ومیر نماتدها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی گردید. نماتدهای زنده و مرده با استفاده از استرئومیکروسکپ شمارش شده 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.

۷- آزمایش‌های زیست‌سنجی اسانس‌ها و متام‌سدیم

آزمایش‌های مقدماتی با غلظت‌ها اولیه ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس‌ها و ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷ و ۱۰ پی‌پی‌ام متام‌سدیم انجام و محدوده غلظت‌ها آزمایش‌های اصلی تعیین شد. بدین منظور، ابتدا غلظت مورد نظر ترکیب مورد آزمایش تهیه و ۱۰۰۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر به همراه آب و توئین و ۱۰۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۶۰ فرد نماتد به داخل میکروتیوب اضافه شد. بر اساس نتایج آزمایش‌ها محدوده غلظت‌های نهایی یعنی بالاترین و پایین‌ترین غلظتی که به ترتیب باعث ۸۰ و ۲۰ درصد مرگ‌ومیر در جمعیت نماتد شدند تعیین و آزمایش‌های اصلی با آن‌ها ادامه یافت. در آزمایش اصلی هفت تیمار با فاصله لگاریتمی تعیین شد و غلظت‌های ۳۰۰، ۳۸۸، ۵۰۰، ۶۴۶، ۸۳۰، ۱۰۷۰ و ۱۴۰۰ پی‌پی‌ام اسانس پونه، غلظت‌های ۷۰۰، ۸۷۱، ۱۰۷۲، ۱۳۱۸، ۱۶۲۲، ۱۹۹۴ و ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام اسانس مرزه، غلظت‌های ۱۰۰۰، ۱۲۵۹، ۱۵۸۵، ۱۹۹۴، ۲۵۱۲، ۳۱۶۲ و ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس میخک، غلظت‌های ۱۵۰۰، ۱۹۹۵، ۲۶۳۰، ۳۴۶۷، ۴۵۷۱، ۶۰۲۶ و ۸۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس آویشن و غلظت‌های ۱۲۰، ۱۳۸، ۱۵۸، ۱۸۲، ۲۰۹، ۲۴۰ و ۲۸۰

پی‌پی‌ام متابولیت قارچی منظور گردیدند. هم‌چنین بر اساس نتایج آزمایش‌های مقدماتی، در آزمایش‌های اصلی غلظت‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ پی‌پی‌ام متام‌سدیم انتخاب شدند. آب مقطر سترون به همراه توئین به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. آزمایش‌های اصلی مربوط به تمام ترکیبات چهار نوبت در چهار روز مختلف تکرار شدند. میکروتیوب‌های حاوی مواد آزمایشی داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و مرگ‌ومیر نماتدها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی گردید.

۸- تجزیه داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش‌های زیست‌سنجی با استفاده از روش پروبیت مدل رگرسیون خطی تجزیه و مقادیر LC_{50} و LC_{90} ترکیبات مورد آزمایش تخمین زده شدند. تجزیه پروبیت با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 صورت گرفت. خطوط دوز- اثر با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند. میزان سمیت ترکیبات مختلف با مقایسه مقادیر LC_{50} حاصل تعیین گردید.

نتایج

نتایج زیست‌سنجی نشان داد که اسانس‌های پونه، مرزه، میخک، آویشن و متابولیت قارچ *Scytalidium* sp. دارای اثر نماتدکشی روی *D. dipsaci* می‌باشند. بر اساس نتایج تجزیه پروبیت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از تیمار، مقدار LC_{50} اسانس‌های پونه، مرزه، میخک، آویشن به‌ترتیب ۷۶۹/۲ و ۶۱۰/۸، ۱۶۶۲ و ۱۵۰۴، ۱۷۴۸ و ۱۳۹۵، ۴۹۱۳ و ۴۰۸۸ پی‌پی‌ام (جدول ۱) و متابولیت قارچی مقدار ۲۰۷/۶ و ۱۹۹/۵ پی‌پی‌ام تخمین زده شد (جدول ۳). نتایج حاصل از زیست‌سنجی اسانس مریم‌گلی نشان داد که دارای اثر نماتدکشی ضعیفی علیه *D. dipsaci* می‌باشد. در آزمایش‌های مربوط به مریم‌گلی تا غلظت‌های ۲۸۱۸ تا ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام با سه تکرار روی نماتد اعمال شدند. اما حتی در بالاترین غلظت به‌کار رفته تأثیر قابل قبولی در مرگ‌ومیر نماتد نداشت و مرگ‌ومیری حدود ۱۰ تا ۵۰ درصد ثبت شد.

نتایج تجزیه شیمیایی اسانس‌ها نشان داد که ترکیبات تیمول و کارواکرول در چهار اسانس میخک، مرزه، آویشن و مریم‌گلی مشترک می‌باشند. تیمول به‌ترتیب دارای درصد وزنی ۲/۳۷، ۱۰/۹۰، ۳۴/۸۹ و ۱/۸۵ و کارواکرول به‌ترتیب دارای درصد وزنی ۲/۸۷، ۳۱/۰۲، ۲۸/۰۴ و ۱۷/۲۶ می‌باشند. آلفاپینن و بتاپینن نیز با درصد وزنی ۱/۳۸ و ۲/۹۸ در پونه، ۲/۲۵ و ۱/۶۴ در مرزه، ۰/۶ و ۰/۵۴ در آویشن و ۲/۰۱ و ۱/۹۳ در مریم‌گلی وجود دارند (جدول ۲). نتایج تجزیه شیمیایی متابولیت قارچی وجود ترکیبات مختلف با خاصیت نماتدکشی از قبیل کارون، پالمیتیک اسید، اولئیک اسید، اکتادکانوئیک اسید و غیره را مشخص کرد (جدول ۵). بر اساس نتایج تجزیه پروبیت متام‌سدیم ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار مقدار LC_{50} به‌ترتیب ۶/۷ و ۴/۸ پی‌پی‌ام تخمین زده شد (جدول ۴). عدم هم‌پوشانی حدود اطمینان LC_{50} در اسانس‌ها نشان می‌دهد که اثر این ترکیبات باهم اختلاف معنی‌دار دارند. اسانس پونه با کم‌ترین LC_{50} (۷۶۹/۲ پی‌پی‌ام) بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌عنوان مؤثرترین و اسانس آویشن با بیشترین LC_{50} (۴۹۱۳ پی‌پی‌ام) به‌عنوان کم تأثیرترین اسانس مورد مطالعه روی *D. dipsaci* در شرایط آزمایشی حاضر تعیین شدند.

جدول ۱. غلظت‌های کشنده اسانس میخک (*Syzygium hortensis*)، پونه (*Mentha pulegium*)، مرزه (*Saturea aromaticum*) و آویشن (*Thymus kosschyanus*) روی *Ditylenchus dipsaci*، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار.

Table1. Lethal concentrations of clove (*Syzygium aromaticum*), oregano (*Mentha pulegium*), marze (*Saturea hortensis*) and thyme (*Thymus kotschyanus*) essential oils on *Ditylenchus dipsaci*, 24 and 48 hours after treatment..

Essential oil	Hours after treatment	LC_{50} (ppm) (Confidence limits)	LC_{90} (ppm) (Confidence limits)	Slope	χ^2 (df)
Mentha pulegium	24	769 (701-841)	1298 (1178-1471)	4.01	0.006 (5) ns
	48	610 (532-687)	1062 (946 -1246)	4.40	0.011 (5) ns
Saturea hortensis	24	1662 (1533-1810)	2731 (2471-3128)	3.98	0.01 (5) ns
	48	1504 (1354-1666)	2680 (2383-3170)	3.59	0.02 (5) ns
Syzygium aromaticum	24	1748 (1276-2110)	3468 (2936-4618)	3.69	0.016 (5) ns
	48	1395 (912-1708)	2972 (2556-3801)	3.79	0.012 (5) ns
Thymus kotschyanus	24	4913 (4254-5749)	9579 (8146 -12223)	2.61	0.003 (5) ns
	48	4088 (3166-5083)	8910 (7249-12791)	2.50	0.02 (5) ns

ns: غیرمعنی‌دار

جدول ۲. ترکیبات اصلی اسانس‌های مورد استفاده در آزمایش.

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

Mentha pulegium		*Saturea hortensis*		*Syzygium aromaticum*		*Thymus kotschyanus*		*Salvia officinalis*	
Name of the compound	(%)	Name of the compound	(%)	Name of the compound	(%)	Name of the compound	(%)	Name of the compound	(%)
Pulegone	34.34	Gamma-Terpinen	33.15	Eugenol	72.55	Thymol	34.89	Beta-Thujone	18.77
Piperitenone oxide	22.1	Carvacrol	31.02	Caryophyllene	15.94	Carvacrol	28.04	Carvacrol	17.26
Menthone	20.66	Thymol	10.90	m-Eugenol	5.94	Gamma-Terpinene	8.77	Camphor	14.27
1,8-Cineole	6.81	o-Cymene	8.69	Carvacrol	2.87	o-Cymene	6.51	1,8-Cineole	9.94
trans-Caryophyllene	5.24	Carvacryl asetate	3.02	Thymol	2.37	Geraniol	5.66	Borneol	9.55
Eugenol	3.77	Alpha-pinene	2.25			Caryophyllene Oxid	3.09	Gamma-Therpinene	6.23
Beta-pinene	2.98	Methylcarbam	2.22			Verdiflorol	3.02	Camphene	2.37
Alpha-pinene	1.38	Pulegone	2.11			Borneol	2.88	Alpha-pinene	2.01
		Alpha-Terpinene	1.80			Carvacrol Methyl Ether	1.26	Beta-pinene	1.93
		Alpha-Thujene	1.67			Delta-cadinene	1.10	Thymol	1.85
		Beta-pinen	1.64			Camphor	1.02	Diethylphenol	1.67
								Cis-Decalin	1.63
								Caryophyllene	1.53
								Piperitenone oxide	1.53
								Pyridinium	1.36
								Naphtalene	1.22

جدول ۳. غلظت‌های کشنده متابولیت‌های *Scytalidium sp.* روی *Ditylenchus dipsaci*، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار.

Table3. Lethal concentrations of *Scytalidium sp*. Metabolites on *Ditylenchus dipsaci*, 24 and 48 hours after treatment.

Hours after treatment	LC_{50} (ppm) (Confidence limits)	LC_{90} (ppm) (Confidence limits)	Slope ± SE	χ^2 (df)
24	207 (194-222)	291 (267-330)	6.46± 0.001	0.1 (5) ns
48	199	268	8.30 ± 0.001	0.06 (5) ns

	(189-210)	(251-293)

ns: غیرمعنی‌دار

جدول ۴. غلظت‌های کشنده متام‌سدیم روی *Ditylenchus dipsaci*، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار. .

Table 4. Lethal concentrations of metam sodium on *Ditylenchus dipsaci*, 24 and 48 hours after treatment.

Hours after treatment	LC_{50} (ppm) (Confidence limits)	LC_{90} (ppm) (Confidence limits)	Slope ± SE	χ^2 (df)
24	6.7 (6.4-7.1)	9.5 (8.9-10.4)	6.4 ± 0.02	0.01 (5) ^{ns}
48	4.8 (4.5-5)	6.9 (6.5-7.4)	6.8 ± 0.02	0.7 (5) ^{ns}

ns: غیرمعنی‌دار

جدول ۵. ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده متابولیت‌های قارچ *Scytalidium* sp. مورد استفاده در آزمایش.

Table 5. The main components of *Scytalidium* sp. metabolites used in the experiment.

peak	Inhibition time	Chemical name of the component※	Molecular formula	Molecular Weight	area under the curve %
1	9.50	D-Carvone Carvone	$C_{10}H_{14}O$	150	1.62
2	9.57	(-)-Carvone D-Carvone	$C_{10}H_{14}O$	150	0.42
3	9.62	(-)-Carvone Carvone	$C_{10}H_{14O}$	150	1.52
4	10.12	(-)-carvone Carvone D-Carvone	$C_{10}H_{14}O$	150	3.31

5	11.51	Carvacrol	$C_{10}H_{14}O$	150	0.66
		T-Cadinol	$C_{15}H_{26}O$	222	
6	18.14	Bicyclo(4.4.0)dec-1-ene,2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	$C_{15}H_{24}$	204	0.34
		α-Cadinol	$C_{15}H_{26O}$	222	
7	23.23	2-phenyl-3-ethyl-6-methoxy-; 1H-Inden-1-one	$C_{18}H_{16}O_2$	264	0.31
		7,12a-Dimethyl-1,2,3,4,4a,11,12,12a-octahydrochrysene	$C_{20}H_{24}$	264	
8	23.53	Tetradecanoic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	228	5.67
		n-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	
9	23.70	Cyclopentadecanone,2-hydroxy-	$C_{15}H_{28}O_2$	240	1.29
		n-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	
10	23.91	9,17-Octadecadienal	$C_{18}H_{32}O$	264	0.44
		Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	
11	24.66	Palmitic acid,TMS derivative	$C_{19}H_{40}O_2si$	328	2.21
12	25.35	Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	0.65
		9,12-Octadecadienoic acid(z,z)-	$C_{19}H_{34}O_2$	294	
		Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	
13	25.40	9,12-Octadecadienoic acid(z,z)-	$C_{18}H_{32}O_2$	280	0.35
		9,17-Octadecadienal,(z)-	$C_{18}H_{32}O$	264	
14	25.63	Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	1.22
		9,12-Octadecadienoic acid(z,z)-	$C_{18}H_{32}O_2$	280	
15	25.74	1-Nonadecene	$C_{19}H_{38}$	266	0.9
		Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	
		9-Octadecenoic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	
16	26.09	Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	28.24
		9,12-Octadecadienoic acid(z,z)-	$C_{18}H_{32}O_2$	280	
		Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	
17	26.13	8-Heptadecenoic acid	$C_{17}H_{32}O_2$	268	13.73
		9-Octadecenoic acid, (E)-	$C_{18}H_{34}O_2$	282	
18	26.33	Octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	284	5.63
		Oleic acid	$C_{18}H_{34}O_2$	282	
		9,17-Octadecadienal,(z)-	$C_{18}H_{32}O$	264	
19	27.36	9,12-Octadecadienoic acid(z,z)-	$C_{19}H_{34}O_2$	294	0.31
		Cyclohexane,1-(1,5-dimethylhexyl)-4-(4-methylpentyl)-	$C_{20}H_{40}$	280	
		Octadecane,1-(ethenyloxy)-	$C_{20}H_{40}O$	296	
20	30.97	Elicosane	$C_{20}H_{42}$	282	0.23
		undecane	$C_{11}H_{24}$	156	
21	30.07	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	$C_{24}H_{38}O_4$	390	10.47
		Mono(2-ethylhexyl)phthalate	$C_{16}H_{22}O_4$	278	

* با توجه به عدم قطعیت نتایج GC.MS در این ستون ۱-۳ ترکیب برای هر پیک کروماتوگرام به ترتیب با درصد احتمال بالا آورده شده است که ترکیب اول درصد احتمال بالاتری دارد.

* Due to the uncertainty of GC.MS results, in this column, 1-3 components are given for each chromatogram peak in order of high probability percentage, the first component has a higher probability percentage.

بحث

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی تأثیر اسانس‌های گیاهان میخک، پونه، مرزه و آویشن، هم‌چنین متابولیت قارچ *Scytalidium* sp. را در مهار نماتد *D. dipsaci* نشان داد. ولی اسانس گیاه مریم‌گلی تأثیر بالایی در مرگ‌ومیر نماتد نداشت. در تحقیقی فعالیت نماتدکشی قوی اسانس پونه گزارش شده است و مقدار EC_{50} پس از ۹۶ ساعت برابر ۳/۱۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بیان شده است. در این مورد، فعالیت کشندگی قوی به وجود غلظت بالای پولگون در اسانس نسبت داده شده است (Ntalli *et al*. 2010). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز وجود درصد بالای ترکیب پولگون در اسانس پونه را تایید کرد. مرزه دومین اسانس با فعالیت نماتدکشی بالا در این تحقیق بود که می‌توان آن را ناشی از مقادیر بالای کارواکرول و ترکیبات فنلی در اسانس مرزه دانست. کارواکرول، تیمول و پاراسیمن موجود در اسانس مرزه اثر هم‌افزایی بر یکدیگر داشته و سبب ممانعت از

رشد میکروب‌ها می‌شوند (Gopi *et al*. 2014). در مطالعه‌ای اسانس مرزه و آویشن، به‌ترتیب بیش‌ترین بازدارندگی را در تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* و مرگ‌ومیر لاروها در غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام نشان دادند (Fayaz *et al*. 2016). در مطالعه دیگر، سه گونه آویشن *Thymus caespititius*، *T. capitate* و *T. zygis* با غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس پس از ۲۴ ساعت به‌ترتیب مرگ‌ومیر ۱۰۰، ۹۰ و ۵۶ درصدی افراد بالغ نماتد *Bursaphelenchus xylophilus* را نشان دادند (Barbosa *et al*. 2010). ترکیب مؤثر اسانس در مطالعات آن‌ها، کارواکرول بود در حالی‌که در مطالعه حاضر تیمول می‌باشد. اثر نماتدکشی اسانس آویشن (*T. vulgaris*) روی لاروهای سن دو *M. incognita* مطالعه شده و مقدار LC_{50} پس از ۲۴ ساعت برابر ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام محاسبه گردیده است (Kudjo *et al*. 2020). ترکیب مؤثر اسانس در این مطالعه نیز تیمول بود. گونه *T. vulgaris* در بررسی‌های زهار و همکاران (Zouhar *et al*. 2009) در محدوده غلظت‌های ۱۵۰۰ تا ۷۵۰۰ پی‌پی‌ام پس از شش ساعت، مرگ‌ومیر حدود ۹۰ درصدی و در مطالعات دودا و همکاران (Douda *et al*. 2022) *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. نتایج بررسی اثر اسانس میخک روی *D. dipsaci* نشان داده است که در غلظت ۷۵۰۰ پی‌پی‌ام بعد از شش ساعت باعث مرگ‌ومیر ۹۲ درصدی افراد بالغ نماتد شده است (Zouhar *et al*. 2009). در مطالعه‌ای دیگر، اسانس‌های پونه و میخک در غلظت ۱۲۵ پی‌پی‌ام پس از ۲۴ ساعت، به‌ترتیب باعث مرگ‌ومیر ۳/۴ و ۹/۴ درصدی لاروهای سن دو نماتد ریشه‌گرهی *M. hapla* شده است (Jeon *et al*. 2016). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس مریم‌گلی تاثیر قابل قبولی در مرگ‌ومیر *D. dipsaci* ندارد. اما اسانس مریم‌گلی در غلظت ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام باعث مرگ‌و میر ۷۸ درصدی لارو سن دو و کاهش ۶۰ درصدی تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی شده است (Faizilain *et al*. 2013). ترکیبات اصلی اسانس مریم‌گلی همانند مطالعه حاضر شامل آلفا توجون، کارواکرول، ۱ و ۸ سینئول و کامفور بوده است. در بررسی دیگری اسانس مریم‌گلی باعث کاهش ۳۱/۴ درصدی تفریخ تخم نماتد *M. hapla* شده است و توجون با درصد وزنی ۲۷/۸ ترکیب اصلی اسانس آن بوده است (Felek *et al*. 2019).

تفاوت نتایج در تحقیق حاضر با مطالعات پیشین را می‌توان به تفاوت در گونه نماتد، گونه و رقم گیاهان، تفاوت محل رشد گیاهان، نحوه تهیه اسانس و شرایط آزمایش دانست. هم‌چنین نتایج تجزیه شیمیایی اسانس‌ها وجود ترکیبات مختلف با درصد کم و زیاد را نشان داد. احتمالاً تفاوت نوع ترکیبات، مقدار و برهم‌کنش هر کدام از ترکیبات با یکدیگر، موجب تفاوت در نتایج و تأثیرپذیری یا عدم تأثیرپذیری اسانس‌ها در مرگ‌ومیر نماتدها می‌شود.

مقایسه مقادیر LC_{50} اسانس‌ها و متام‌سدیم نشان داد که این ترکیبات در مقایسه با متام‌سدیم اثر نماتدکشی ضعیف‌تری دارند. گذشت زمان در همه موارد آزمایش موجب افزایش تأثیر 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 مستقیما پارازیته کرده و یا با تولید آنزیم و متابولیت‌ها بر آن‌ها تأثیر بگذارند. این ترکیبات فعال، خاصیت نماتدکشی دارند (Ghayedi & Abdollahi 2013). تا کنون مطالعه‌ای در مورد ظرفیت بازدارندگی یا کشندگی متابولیت‌های قارچ *Scytalidium* sp. بر نماتدها انجام نشده است. اما گونه‌ای از این قارچ از نماتد سیستی سویا (*Heterodera glycines*) جداسازی شده است که می‌تواند دلیل نقش احتمالی آن در مهار زیستی نماتدها باشد (Morgan-Jones *et al*. 1984). با توجه به نتایج تجزیه شیمیایی متابولیت‌های قارچ *Scytalidium* sp. و اثر آن‌ها در مرگ‌ومیر نماتد، می‌توان تأثیر آن‌ها را به وجود ترکیباتی با خاصیت نماتدکشی از قبیل کارون، پالمیتیک، اولئیک، اکتادکانوئیک، تترادکانوئیک و هگزادکانوئیک‌اسید و Bis(2-ethylhexyl) phthalate موجود در آن

نسبت داد. با توجه به مطالعات قبلی، از جمله ترکیبات دارای فعالیت نماتدکشی قوی می‌توان به ترپن‌هایی مانند کارون اشاره کرد. تأثیر نماتدکشی کارون خالص بر روی نماتدهای انگل گیاهی قبلا اثبات شده است. کارون خالص باعث مرگ‌ومیر ۱۰۰ درصدی نماتد *B. xylophilus* و *M. javanica* در غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام شده است (Martins *et al.* 2015). نشان داده شده است که ترکیبات (S)- Carvon و (R)- Carvon از جمله ترکیبات عالی فراری هستند که برای نماتدها سمی است و نحوه تأثیر (R)-carvone توقف استیل‌کولین استرازها در نماتدها است (Pacule *et al*. 2022).

ترکیب Bis(2-ethylhexyl) phthalat یکی دیگر از مواد موجود در متابولیت‌های مورد مطالعه است که قبلاً سمیت آن روی نماتد *Caenorhabditis elegans* آزمایش شده است (Roh *et al.* 2007). این ترکیب در بررسی‌های جاود و همکاران (۲۰۲۲) به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی و لاروکش حشرات نیز شناخته شده است. اسیدهای چرب خاصیت نماتدکشی دارند و بوتیریک اسید و پروپیونیک اسید منجر به مرگ گونه‌هایی از *Tylenchorhynchus* شده‌اند (McElderry *et al*. 2005). اثرات متضاد بالقوه نه اسید چرب بر *M. incognita* نشان داده است که اسیدهای بوتیریک، کاپریلیک، کاپریک، لوریک، میریستیک، هم‌چنین اسیدهای پالمیتیک و اولئیک که در ترکیبات متابولیت‌های مطالعه حاضر نیز وجود داشتند، به طور قابل توجهی تولیدمثل *M. incognita* را کاهش داده‌اند (Zhang *et al*. 2012).

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس گیاهان پونه، مرزه، میخک و آویشن و متابولیت قارچ *Scytalidium* sp. با داشتن ترکیباتی با خواص نماتدکشی می‌توانند به‌عنوان ماده مؤثر در تولید نماتدکش‌ها جهت مهار نماتدها، ازجمله نماتد ساقه و پیاز *D. dipsaci* مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

سپاسگزاری

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

منابع

References

Ahmadian Yazdi A. 2003. Survey of alfalfa stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) in Khorasan province. In Proceeding of the 15th Iranian Plant Protection Congress. Volume II: Plant Diseases and Weeds, p 85 Razi University of Kermanshah. (In Persian).

Akhiani A., Damadzadeh M. and Mohdian R. 1985. Investigation of alfalfa stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) in Isfahan province. Summary of the papers of the 8th Iran Medicinal Plant Congress. P 129 (In Persian).

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.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 94(3): 223-253.

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.

Chitambar J. J. and Raski D. J. 1985. Life history of *Pratylenchus vulnus* on carrot discs. Journal of Nematology 17(2): 235.

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.

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

Faizilain A., Mahdikhani Moghadam A., Azizi M. and Rouhani H. 2013. The inhibitory effect of essential oils of shallot, sage and celery on the root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and extraction of their effective substances. Plant protection 28(2): 220-225 (In Persian).

Fasihi, M., Tanha Maafi, Z., Karegar, A. and Eskandari, A. 2010. Host ranges, variability, multiplication and seed borne ability of some population of stem and bulb nematode, Ditylenchus dipsaci in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 46 (2): 179-185 (In Persian with abstract in English).

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).

Felek A. F., Ozcan M. M. and Akyazi F. 2019. Effects of essential oils distilled from some medicinal and aromatic plants against root knot nematode (*Meloidogyne hapla*). Journal of Applied Sciences and Environmental Management 23(8): 1425-1430.

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 Science* 2(1): 1-7.

IPPC. 2016. International standards for phytosanitary measures. ISPM 27 diagnostic protocols, DP 8: *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*. International Plant Production Convention, 34 p.

Jeon J. H., Ko H. R., Kim S. J. and Lee J. K. 2016. Chemical compositions and nematicidal activities of essential oils on *Meloidogyne hapla* (Nematoda: Tylenchida) under laboratory conditions. The Korean Journal of Pesticide Science 20(1): 30-34.

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

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.

Martins F., Costa M. and Galhano C. I. 2015. On the way for a new bionematicide. Agriculture and Food 3: 130-137.

McElderry C. F., Browning M. and Amador J. A. 2005. Effect of short-chain fatty acids and soil atmosphere on *Tylenchorhynchus spp*. Journal of Nematology 37(1): 71-77.

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.

Migunova V., Sasanelli N. and Kurakov A. 2018. Effect of microscopic fungi on larval mortality of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. Biological and Integrated Control of Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin 133: 27-31.

Mirbabaei Karani, S.H and Karegar, A. 2013. First report of the stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*, on strawberry in northern Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 49(2): 275-276 (In Persian with English summary).

Mizubuti E. S., Junior V. L. and Forbes G. A. 2007. Management of late blight with alternative products. Pest Technology 1(2): 106-116.

Morgan-Jones G., Gintis B. O. and Rodriguez-Kabana R. 1984. New species of Chalara and Scytalidium isolated from cysts of *Heterodera glycines*. Mycologia 76(2): 211-217.

Ntalli N. G., Ferrari F., Giannakou I. and Menkissoglu-Spiroudi U. 2010. Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(13): 7856-7863.

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., Ben-Daniel B. H. and Cohen Y. 2006. Control of *Meloidogyne javanica* by formulations of *Inula viscosa* leaf extracts. Journal of Nematology 38(1): 46-51.

Pacule H. B., Vanegas J. A., Terra W. C., Campos V. P. and Oliveira D. F. 2022. (R)-Carvone is a potential soil fumigant against *Meloidogyne incognita* whose likely enzymatic target in the nematode is acetylcholinesterase. Experimental Parasitology 241: 108359.

Pakniyat M. and Keshtvarz M. 2006. The first report of stem and onion nematode (*Ditylenchus dipsaci)* on garlic (*Allium sativum*) from Fars province. Summary of papers of the 17th Congress of Medicinal Plants Iran. Volume II: Plant diseases and weeds, p 191 (In Persian).

Pauli A. 2001. Antimicrobial properties of essential oil constituents. International Journal Aromater 11: 126 -133.

Roh J. Y., Jung I. H., Lee J. Y. and Choi J. 2007. Toxic effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. Toxicology 237(1-3): 126-133.

Shahcheraghi M., Kheiri, A. and Jamshidi Kh. 1989. Investigation of alfalfa stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) and how it is distributed in fodder fields of Zanjan province. Summary of the articles of the 10th Congress Herbal medicine of Iran. P 199 (In Persian).

Sharafeh M. 1983. Distribution areas of alfalfa stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) in Fars province. Summary Papers of the 7th Iranian Herbal Medicine Congress. P 15 (In Persian).

Sturhan D. and Brzeski M. W. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. pp. 423-464. In: Nickle, W. R. (Ed.), Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker Inc., New York.

Whitehead A. G. and Hemming J. R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology 55(1): 25-38.

Zhang W. P., Ruan W. B., Deng Y. Y. and Gao Y. B. 2012. Potential antagonistic effects of nine natural fatty acids against *Meloidogyne incognita*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(46): 11631-11637.

Zouhar M., Douda O., Lhotský D. and Pavela R. 2009. Effect of plant essential oils on mortality of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*).