

تأثیر تراکم‌های مختلف نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* بر پیشرفت بیماری و تولید ترکیب‌های ثانویه در گیاه همیشه بهار، *Calendula officinalis*

Effect of different inoculum densities of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on progress of disease and production of secondary compounds in pot marigold, *Calendula officinalis*

زهرا علی جانی^۱، مجید اولیا^{۱*}، بهرام شریف‌نبی^۲ و کامکار جایمند^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۲۲)

چکیده

گیاه همیشه بهار *Calendula officinalis* به علت داشتن ترکیب‌های دارویی متنوع در صنایع داروسازی حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش، اثر مایه‌زنی نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در هفت سطح مختلف (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۵ تخم و لارو / گرم خاک) روی شاخص‌های رشد این گیاه و تکثیر نماتود ارزیابی گردید. نود روز پس از مایه‌زنی، مقدار ترکیبات شیمیایی کوئرستین، کامپفول و اسید یورسولیک در گیاهان آلوده اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد با افزایش تراکم مایه‌زنی میانگین فاکتورهای رشد گیاه به طور معنی‌داری کاهش یافت. فاکتور تولیدمثل نماتود با سطوح مختلف جمعیت رابطه معکوس داشته و بالاترین فاکتور تولیدمثل در کمترین سطح از جمعیت نماتود یعنی سطح ۰/۵ تخم و لارو مشاهده گردید. سنجش ترکیب‌های فلاونوئیدی و تری‌ترپنوئیدی، کوئرستین و یورسولیک اسید عصاره گل‌های گیاه همیشه بهار حاکی از افزایش این ترکیب‌ها در گیاهان آلوده نسبت به شاهد (بدون نماتود) بود.

کلیدواژه: نماتود ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*)، همیشه بهار، کوئرستین، اسید یورسولیک

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: olia100@yahoo.com

۱ - دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

۲ - دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

۳ - موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، بخش گیاهان دارویی

Effect of different inoculum densities of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on progress of disease and production of secondary compounds in pot marigold, *Calendula officinalis*

Z. ALIJANI², M. OLIA^{1*}, B. SHARIFNABI² and K. JAIMAND³

(Received: 6.2.2013; Accepted: 11.4.2015)

Abstract

Marigold, *Calendula officinalis*, due to having various medicinal compounds is of high importance in pharmaceutical industry. In the present research, the influence of different initial inoculum levels of *Meloidogyne javanica* (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 5.0 eggs and second stage juveniles/g. soil) on growth parameters of pot marigold and nematode reproduction was investigated. 90 days after nematode inoculation, the chemical compounds quercetin, kaempferol and ursolic acid were measured in infected plants. The results showed that with increasing the initial nematode population, the means of plant growth factors significantly decreased. In addition, nematode reproduction factor was inversely related to the levels of population and the highest reproduction factor was observed with the lowest nematode population. Results of analysis and comparison of chemical compounds of infected and healthy plants, showed that flavonoid and triterpenoid compounds namely quercetin and ursolic acid were increased in the nematode infected plants.

Keywords: Flavonoid and triterpenoid compounds, HPLC, Medicinal plants, *Meloidogyne javanica*, Pot marigold

* Corresponding author's E-mail: olia100@yahoo.com

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahrekord University,
2. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology,
3. Department of Medicinal plants, Research Institute of Forests and Rangelands.

مقدمه

در میان عوامل بیماری‌زا، نماتودهای انگل گیاهی توانایی بیماری‌زایی بالایی دارند و سالیانه حدود یک‌صد میلیارد دلار به محصولات کشاورزی خسارت وارد می‌کنند (Oka et al. 2000). با این وجود مطالعه نماتودها به عنوان عوامل مهم ایجاد بیماری در گیاهان دارویی کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (Park et al. 2004). نماتودهای ریشه‌گرهی، *Meloidogyne spp.* انگل اجباری بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی از محصولات باغی، زراعی، صیفی و علف‌های هرز بوده و یکی از مهم‌ترین گروه نماتودهای انگل گیاهی از نظر خسارات اقتصادی می‌باشند. دامنه وسیع میزبانی، تعداد فراوان گونه، انتشار گسترده، توانایی زیاد بیماری‌زایی و برهمکنش با دیگر عوامل بیماری‌زا، آن‌ها را جزء انگل‌های مهم گیاهی قرار داده است (Cenis et al. 1992, Hugall et al. 1999, Hussey 1990). گونه *M. javanica* در تمام نقاط دنیا وجود داشته و در ایران از نظر پراکندگی و فراوانی در درجه اول اهمیت قرار دارد (Akhiani et al. 1986).

بررسی واکنش ۳۸ گونه گیاه دارویی نسبت به دو گونه نماتود *M. incognita* و *M. javanica*، نشان داد که ۲۸ و ۲۴ گونه دارویی به ترتیب نسبت به دو گونه نماتود مذکور حساس و ۱۴ گونه گیاهی به وسیله هر دو گونه نماتود آلوده شدند (Haseeb & Pandey 1987). نتایج حاصل از بررسی اثر سطوح مختلف جمعیت *M. incognita* بر روی رشد و فیزیولوژی دو گونه گیاه بذرالبنج نشان‌دهنده کاهش وزن تر و خشک گیاه، بازده کلی آلکالوئیدها، مقدار کل کلروفیل و میزان فتوسنتز بود (Haseeb et al. 1990, Butool & Haseeb 1998). در سال ۲۰۰۶ اثرات سطوح مختلف جمعیت *M. javanica* روی گیاه *Impatiens balsamina* مورد مطالعه قرار گرفت و علائمی مانند کوتولگی، زردی و پژمردگی برگ‌ها در گیاه آلوده مشاهده

از دیرباز گیاهان دارویی دارای اهمیت بوده و مورد استفاده بشر قرار گرفته است. پرورش این گیاهان با پیشرفت روز افزون دانش کشاورزی و امکان تجارت بین‌المللی آن‌ها آغاز گردید و در حال حاضر کاربرد گیاهان دارویی در صنایع داروسازی و آرایشی رو به افزایش است (Park et al. 2005). گل همیشه‌بهار، *Calendula officinalis* L. از خانواده Asteraceae و دارای مصارف دارویی مانند رفع التهاب، زخم معده و مشکلات دستگاه گوارش، التیام‌دهنده زخم‌ها و غیره می‌باشد (Parente et al. 2012). مواد موثره دارویی این گیاه در گل‌ها ساخته و ذخیره می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها را فلاونوئیدهای محلول در آب (۰/۴ تا ۰/۱ درصد) تشکیل می‌دهند. از مواد دیگر می‌توان از کاروتنوئیدها (۳٪) که در آب و چربی محلولند، اسانس (۰/۲ تا ۰/۱ درصد)، مواد موسیلاژی محلول در آب و ویتامین E نام برد (Omidbaigi 2008). ترکیب کامپفرول (Kaempferol) یک آنتی‌اکسیدان قوی است که از تخریب اکسایشی سلول‌ها، چربی‌ها و DNA جلوگیری کرده و با ممانعت از اکسایش لیپوپروتئین‌های کم چگال (LDL) و تشکیل پلاکت‌ها در خون، از تصلب شرایین جلوگیری به عمل می‌آورد (Lopez-Sanchez et al. 2007). کوئرستین (Quercetin)، یک فلاونول مشتق شده از گیاهان می‌باشد که از آن به عنوان مکمل تغذیه‌ای استفاده می‌شود و دارای اثرات کاهش فشار خون بالا، کاهش آلرژی و از انواع سرطان، مانند سرطان روده جلوگیری می‌کند (Park et al. 2006). همچنین اسید یورسولیک (Ursolic acid)، یک اسید تری‌ترپنوئیدی با پنج حلقه می‌باشد و دارای اثرات ضد التهابات و تورم و ضد تومور و ضد سرطان می‌باشد (Samuelsen 2000).

مقایسه با شاهد کاهش یافته و این کاهش رشد با افزایش سطح جمعیت نماتود افزایش می‌یابد. این نسبت کاهش در سطوح ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ با احتمال $p \geq 0.05$ معنی‌دار نبود. هوتاگورا و همکاران (Hutangura et al. 1999) افزایش و تجمع ترکیب‌های داخل سلولی را در گال‌های تشکیل شده روی ریشه (به غیر از سلول‌های غول‌آسا) در ریشه‌های شبدر سفید آلوده به نماتود *M. javanica* گزارش کردند. کندی و همکاران (Kennedy et al. 1999) افزایش دو تا چهار برابری محتوای ترکیب‌های ایزوفلاونوییدی در ریشه سویای آلوده به نماتود *Heterodera glycines* را نسبت به گیاهان سالم گزارش کردند.

هدف از این پژوهش مطالعه بیماری‌زایی، تعیین اثر سطوح مختلف جمعیت اولیه نماتود *M. javanica* بر گیاه دارویی همیشه بهار *C. officinalis* و بررسی نوسان ترکیب‌های شیمیایی کوئرستین، کامپفرول و اسید یورسولیک عصاره گل‌های گیاه همیشه بهار سالم و آلوده به نماتود هدف توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) می‌باشد.

روش بررسی

شناسایی و تهیه جمعیت خالص نماتود ریشه‌گرهی، *M. javanica*

به منظور تهیه جمعیت خالص نماتود، یک کیسه تخم (Egg mass) از گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود ریشه‌گرهی جدا و در مجاورت ریشه گیاهچه چهار برگی گوجه فرنگی رقم روتگرز (Rutgers) درگلدان حاوی ۵۰۰ گرم خاک سترون و شرایط گلخانه با دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از گذشت ۶۰ روز، استخراج نماتود از ریشه‌های آلوده با استفاده از هیپوکلیت سدیم

شد (Khan et al. 2006). اخیان و همکاران (1984) گیاهان دارویی بارهنگ، شاهدانه، جعفری، نعناع و گشنیز را به عنوان میزبان گونه‌های مختلف نماتودهای ریشه‌گرهی (*M. hapla* و *M. incognita*، *M. javanica*) از نقاط مختلف ایران و از جمله استان اصفهان گزارش و معرفی کردند. نصرافهانی و همکاران (2008) با بررسی دامنه میزبانی نماتود ریشه‌گرهی روی گیاهان دارویی در استان اصفهان، تعداد ۲۱ گیاه دارویی از جمله همیشه بهار را به عنوان میزبان برای *M. javanica* شناختند. نتایج آزمایش گلخانه‌های رزاز هاشمی و اکبری‌نیا (2008) نشان داد که شش گونه گیاه دارویی رازیانه، سداب، کرچک، بادرنجبویه، زیره سبز و زیره سیاه با مایه‌زنی ۵۰۰۰ تخم نماتود *M. javanica* حساس هستند. باتول و حسیب (1998) گزارش کردند که کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه بذربالنج مصری نسبت مستقیمی با تعداد نماتودها در هر گلدان دارد. پارک و همکاران (2005) بیماری‌زایی *M. hapla* را روی گیاه دارویی *Paeonia lactiflora* در شرایط گلخانه مطالعه نمودند و متوجه شدند که با افزایش جمعیت اولیه نماتود، وزن، طول و ضخامت ریشه اصلی کاهش می‌یابد. خان و همکاران (2004) کاهش در رشد گیاهان مختلف را با افزایش جمعیت اولیه نماتود گزارش کردند که با نتایج بدست آمده مطابقت دارد. پاندی و حسیب (Pandey & Haseeb 1997) گزارش کردند که نماتود *M. incognita* باعث کاهش رشد گیاه و توقف رشد ریشه سه گیاه *Ammi*، *Solanum indicum* و *Costus speciosus*، *visnaga* می‌گردد. بررسی‌های پارک و همکاران (2005) نشان داد که طول، وزن اندام‌های هوایی و ریشه سه گیاه *Angelica*، *Astragalus* و *Peucedanum japonicum*، *koreana* در همه سطوح جمعیت *M. hapla* در

گیاهان جمع‌آوری و به منظور از بین نرفتن میزان مواد موثره به سرعت در سایه در یک لایه نازک پهن و خشک گردید. سپس گیاهان آلوده به آرامی از گلدان خارج و سپس وزن تر، خشک، طول اندام هوایی و ریشه، تعداد گال، تعداد کیسه تخم، تعداد تخم، تعداد لارو در دو کیلوگرم خاک گلدان و فاکتور تولیدمثل نماتود برای هر تیمار محاسبه و مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج و اندازه‌گیری ترکیب‌های فلاونویدی

کوئرستین و کامپنرول در گل‌های همیشه‌بهار

این بخش از تحقیق در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور انجام گرفت. گل‌های بدست آمده از شاهد و سطح ۲/۵ تخم و لارو/گرم خاک (۵۰۰۰ تخم و لارو سن دو/گلدان دو کیلوگرمی)، که سطح بیماری‌زایی می‌باشد، از هر تکرار به طور جداگانه در کیسه‌های کاغذی قرار داده شد و سپس برای انجام استخراج و اندازه‌گیری و مقایسه این دو ترکیب بین گل‌های سالم و آلوده به نماتود به این موسسه منتقل گردید.

استخراج عصاره: گل‌های خشک شده از هر تکرار

شاهد و سطح ۲/۵ تخم و لارو نماتود/گرم خاک، توسط دستگاه آسیاب برقی مولینکس پودر گردید و ۱ گرم گل پودر شده با الک ۳۵ مش و در کاغذ صافی قرار داده شد، پودر به دست آمده با متانول به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه سوکسله (Soxhlet) قرار داده شده و سپس نمونه صاف و در دستگاه تقطیر در خلاء گردشی به حجم ۳۰ میلی‌متر رسانده شد.

مشخصات و شرایط دستگاه HPLC: دستگاه مورد

استفاده ساخت شرکت Knaure مدل Well Chrom 2000 دارای پمپ مدل Maxi-star K-1000 و

۰/۵٪ به روش هوسی و بارکر (Hussey & Barker 1973) انجام گردید. جهت شناسایی نماتود از روش ریخت‌شناسی استفاده شد. به همین منظور، از انتهای بدن ده عدد نماتود ماده به روش تیلور و نتسچر Taylor & Netscher (1974) برش تهیه و مشخصات آن بررسی گردید. همچنین از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لارو سن دوم نیز استفاده شد. شناسایی گونه با استفاده از روش مولکولی زیلسترا و همکاران (Zijlstra et al. 2000) نیز تایید شد.

پس از تعیین گونه با استفاده از لارو و تخم، جمعیت نماتود بر روی گیاه گوجه‌فرنگی رقم روتگرز تکثیر شد. برای تأمین جمعیت مورد نیاز، تخم‌های نماتود *M. Javanica* از ریشه‌های آلوده گوجه‌فرنگی با استفاده از هیپوکلریت سدیم استخراج گردیدند (Hussey & Barker 1973).

سطوح مختلف جمعیت نماتود روی گیاه دارویی همیشه بهار

به منظور بررسی عکس‌العمل گیاه همیشه‌بهار نسبت به تراکم‌های مختلف نماتود ریشه‌گرهی، بذور این گیاه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در گلدان‌های حاوی دو کیلوگرم مخلوط خاک رسی سیلتی (۳/۴۲٪ رس، ۴۲٪ سیلت و ۱۴/۷٪ شن) سترون کاشته و تحت شرایط گلخانه نگهداری شد. چهار هفته پس از سبز شدن بذرها، گیاهان به یک عدد در هر گلدان تنک و تعداد صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۵ تخم و لارو سن دوم/گرم خاک (صفر، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ تخم و لارو سن دوم/گلدان دو کیلوگرمی) در نزدیکی ریشه هر گیاه مایه‌زنی شد. در طی ۹۰ روز، سه روز یک‌بار گل‌های

استخراج و اندازه‌گیری ترکیب تری‌ترپنوییدی یورسولیک اسید در گل‌های همیشه‌بهار

استخراج عصاره: مقدار ۱ گرم گل همیشه‌بهار از هر تکرار شاهد و سطح ۵۰۰۰ به طور جداگانه پودر گردید. سپس نمونه پودر شده با ۳۰ میلی‌لیتر کلروفرم توسط دستگاه سوکسله به مدت ۸ ساعت استخراج شد. سپس حلال تغییر داده شد و با ۳۰ میلی‌متر متانول توسط دستگاه سوکسله به مدت ۸ ساعت استخراج انجام شد و نمونه از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس ۱ میلی‌متر از نمونه در بالون حجمی ۱۰ میلی‌متری قرار داده شد و با متانول به حجم ۱۰ میلی‌متر رسانده شد. سپس از نمونه با سرنگ نمونه‌برداری فیلتر و به دستگاه HPLC تزریق شد.

شرایط دستگاهی HPLC: دستگاه مدل Well Chrom 2000 مورد استفاده در ۲۵۴ نانومتر تنظیم گردید. به عنوان فاز متحرک از متانول: آب: تترا هیدرو فوران (۱:۵:۹۴) و pH با اسید استیک به پنج رسانده شد. شدت جریان یک میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود و انجام آزمایش ۳۰ دقیقه به طول انجامید و تجزیه طبق روش زاکچینا و همکاران (2009) انجام گرفت.

آماده‌سازی استاندارد: استاندارد مورد استفاده، ترکیب یورسولیک اسید با نام علمی 3-β-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از شرکت Sigma خریداری گردید. میزان این ترکیب با تهیه منحنی استاندارد بررسی شد. برای رسم منحنی خط کالیبراسیون جهت ترکیب یورسولیک اسید با غلظت‌های متفاوتی از پنج نمونه استاندارد با غلظت‌های ۷۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام تهیه و سپس به دستگاه تزریق گردید. سپس میزان این ترکیب در گل‌های همیشه‌بهار سالم و

آشکارساز UV (Detector) مدل K-spectrophotometer 2500 بوده که در ۲۹۰ نانومتر تنظیم گردید. ستون مورد استفاده Erospher 100 C₁₈ به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴ میلی‌متر می‌باشد. به عنوان فاز متحرک از متانول: آب: اسید استیک (۵:۴۵:۵۰) با شدت جریان یک میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. مقدار نمونه تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود و انجام آزمایش ۲۰ دقیقه به طول انجامید و تجزیه طبق روش دایگل و کانکرتون (Daigle & Conkerton 1982) انجام گرفت.

آماده‌سازی استانداردها: استانداردهای مورد استفاده، ترکیب‌های کامپفرول (kaempferol) با نام علمی 3,5,7-Trihydroxy-2[4-hydroxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one با فرمول مولکولی C₁₅H₁₀O₆ و با جرم مولکولی 286.2 به مقدار ۱۰ میلی‌گرم از شرکت Sigma و ترکیب کوئرستین (quercetin dehydrate) با نام علمی 2-(3, 4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one با فرمول مولکولی C₁₅H₁₀O₇·2H₂O، با جرم مولکولی 338.27 M به مقدار ۲۵ گرم از شرکت Fluka تهیه گردید. میزان این دو ترکیب با تهیه منحنی استانداردها بررسی شد. برای رسم منحنی خط کالیبراسیون جهت ترکیب کامپفرول با غلظت‌های متفاوتی از پنج نمونه استاندارد با غلظت‌های ۷۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام تهیه و برای رسم منحنی کالیبراسیون ترکیب کوئرستین با غلظت‌های متفاوتی از شش نمونه استاندارد با غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰، ۷۵۰، ۱۰۵۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام تهیه و سپس به دستگاه تزریق گردید. سپس میزان ترکیب‌های کامپفرول و کوئرستین در گل‌های همیشه‌بهار سالم و آلوده محاسبه گردید.

جدول ۱. مقایسه شاخص‌های رشدی گیاه همیشه بهار در سطوح مختلف جمعیت نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*

Table 1. The growth indices of *Calendula officinalis* at different inoculum densities of *Meloidogyne javanica*

جمعیت اولیه نماتود/گلدان دو کیلوگرمی Nematode initial population/pot 2 Kg	اندام هوایی Shoot			ریشه Root		
	طول Length (cm)	وزن تر Fresh Weight (g)	وزن خشک Dry Weight (g)	طول Length (cm)	وزن تر Fresh Weight (g)	وزن خشک Dry Weight (g)
0	25.45 ^a	35.97 ^a	3.86 ^a	17.70 ^a	5.29 ^a	0.82 ^a
1000	25.22 ^a	35.96 ^a	3.85 ^a	17.52 ^a	5.22 ^{ab}	0.81 ^a
2000	25.02 ^a	35.94 ^a	3.82 ^a	17.47 ^a	5.21 ^{ab}	0.79 ^a
3000	24.97 ^a	35.91 ^a	3.80 ^a	17.42 ^a	4.24 ^{ab}	0.79 ^a
4000	23.75 ^a	33.85 ^b	3.67 ^{ab}	17.22 ^a	4.65 ^{ab}	0.72 ^a
5000	23.15 ^a	29.72 ^c	3.47 ^{bc}	15.05 ^b	4.42 ^b	0.69 ^a
10000	19.07 ^b	22.89 ^d	3.24 ^c	12.75 ^c	3.17 ^c	0.59 ^a

آب‌های با حروف مشابه در هر ستون با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند

Values followed by the same letter in each column are not significantly different ($p < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test

ماده‌زنی نشان می‌دهد با افزایش سطح جمعیت اولیه نماتود، طول، وزن تر و خشک اندام هوایی و طول، وزن تر و خشک ریشه به طور کلی در مقایسه با شاهد کاهش می‌یابد (جدول ۱). ماده‌زنی با ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتود *M. javanica* در صفت طول اندام هوایی فقط در سطح ۱۰۰۰۰، در صفت وزن تر اندام هوایی در سطوح ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰، در صفت وزن خشک اندام هوایی در سطوح ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰، در صفت طول ریشه در سطوح ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰، در صفت وزن تر ریشه در سطوح ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ اختلاف معنی‌دار با شاهد نشان می‌دهند و در صفت وزن خشک ریشه هیچ یک از سطوح اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان نمی‌دهند. با افزایش تراکم نماتود در تیمارهای مختلف به طور کلی تعداد گال، کیسه تخم و تخم در ریشه به انضمام تعداد لارو در گرم خاک نیز افزایش یافت که این افزایش در صفت‌های تعداد گال روی ریشه، تعداد کیسه تخم و تعداد تخم در کلیه

آلوده محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS Ver. 9.1 انجام گردید. برای مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال یک درصد استفاده شد.

نتایج

با بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نماتود ماده و لارو سن دوم و استفاده از کلید شناسایی ایسناک و تری آنتافیلو (Eisenback & Triantaphyllou (1991) گونه نماتود، *M. javanica* شناسایی گردید. ضمناً با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این گونه مورد تایید مجدد قرار گرفت (Zijlstra et al. 2000).

اثر سطوح مختلف جمعیت اولیه نماتود ریشه‌گرهی روی گیاه دارویی همیشه بهار و جمعیت نهایی نماتود
داده‌های به دست آمده بعد از گذشت ۹۰ روز از زمان

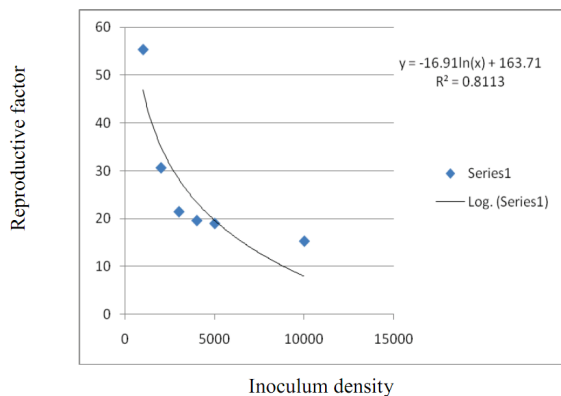
جدول ۲. مقایسه شاخص‌های نماتود *Meloidogyne javanica* بر روی گیاه همیشه بهار در سطوح مختلف جمعیت اولیه

Table 2. Development and multiplication of the nematode, *Meloidogyne javanica* on *Calendula officinalis* at different initial inoculum densities

جمعیت اولیه نماتود/گل‌دان دو کیلوگرمی Nematode initial population/pot 2 Kg	تعداد گال/گیاه Gall number/plant	تعداد کیسه تخم/گیاه Egg mass number/plant	تعداد تخم/گیاه Egg number/plant	تعداد لارو در ۲۰۰۰ گرم خاک Larva number in 2000 grams of soil	فاکتور تولید مثل Reproduction factor
0	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^e	0.00 ^d	0.00 ^d
1000	175.50 ^b	180.75 ^b	54459 ^d	900.0 ^{cd}	55.35 ^a
2000	234.75 ^b	231.75 ^b	60303 ^{cd}	1027.5 ^{cd}	30.66 ^b
3000	266.75 ^b	250.25 ^b	63283 ^{cd}	1240.0 ^c	21.50 ^c
4000	277.00 ^b	258.25 ^b	75289 ^c	3332.5 ^b	19.65 ^c
5000	309.00 ^b	294.25 ^b	91543 ^b	3700.0 ^b	19.04 ^c
10000	504.25 ^a	454.25 ^a	145996 ^a	7432.5 ^a	15.34 ^c

تیمارهای با حروف مشابه در هر ستون با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند

Values followed by the same letter in each column are not significantly different ($p < 0.01$) according to Duncan's multiple-range test.



شکل ۱. رابطه بین تراکم‌های مختلف مایه زنی *Meloidogyne javanica* و فاکتور تولیدمثل روی گیاه همیشه بهار ۹۰ روز پس از مایه‌زنی

Fig 1. Relationship between different inoculum densities of *Meloidogyne javanica* and its reproduction on *Calendula officinalis* at 90-days after-inoculation.

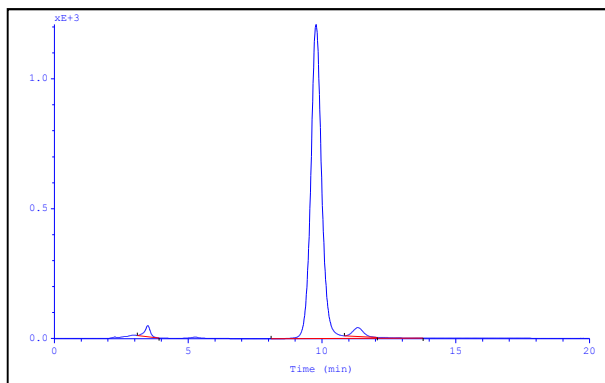
سطوح و در صفت تعداد لارو در ۲۰۰۰ گرم خاک سطوح ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ با شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند (جدول ۲). بر اساس سیستم تیلور و ساسر (۱۹۷۸)، شاخص گال و کیسه تخم در همه سطوح برابر ۵ بود. فاکتور تولیدمثل نماتود *M. javanica* با افزایش سطوح جمعیت کاهش می‌یابد به طوری‌که بالاترین فاکتور تولیدمثل مربوط به گل‌دان‌هایی بود که با کمترین سطح جمعیت مایه‌زنی (۱۰۰۰ تخم و لارو/گل‌دان) و کمترین مقدار فاکتور تولیدمثل در گل‌دان‌هایی با بیشترین سطح جمعیت (سطح مایه‌زنی ۱۰۰۰۰) مشاهده 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 ناتوانی لاروها در یافتن مکان‌های آلودگی جدید باشد و با افزایش تعداد لاروها، گیاه میزبان توانایی لازم برای تغذیه آنان نداشته و این نماتودها سهمی در افزایش جمعیت نهایی ندارند. (Butool & Haseeb 1998).

اثر بیماری‌زایی نماتود ریشه‌گرهی بر ترکیب‌های شیمیایی گیاه داویی همیشه بهار

برای بررسی دو ترکیب فلاونوئیدی کامپفرول و کوئرستین و ترکیب تری‌ترپنوئیدی یورسولیک اسید، استانداردهای تهیه شده با غلظت مشخص از هر سه ترکیب جداگانه به دستگاه HPLC تزریق گردید (شکل‌های ۲، ۴ و ۶). نتایج حاصل از بررسی سه ترکیب کامپفرول، کوئرستین و اسید یورسولیک نشان می‌دهد که بر اساس مقایسه پیک‌های استحصالی در نمونه‌های تیمار و شاهد با پیک استانداردهای مرجع، ترکیب کامپفرول در هیچکدام از تکرارهای تیمار و شاهد وجود نداشت و طیف حاصله فاقد پیک بود. عصاره گل‌های تیمار و شاهد هر دو دارای ترکیب‌های کوئرستین و یورسولیک اسید بوده ولی میانگین غلظت تکرارهای مختلف این ترکیب‌ها در تیمار بیشتر از شاهد بود به طوری که میزان ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین در عصاره گل‌های شاهد، ۷۵/۴ ppm (شکل ۸ و جدول ۳) و در تیمار ۵۰۰۰ نماتود، ۲۵۱/۰۸ ppm (شکل ۹ و جدول ۳) و میزان ترکیب تری‌ترپنوئیدی یورسولیک اسید در عصاره گل‌های شاهد، ۱۲۹/۳ ppm (شکل ۱۰ و جدول ۳) و در عصاره گل‌های تیمار ۵۰۰۰ نماتود، ۲۴۳/۹ ppm (شکل ۱۱ و جدول ۳) ارزیابی گردید.

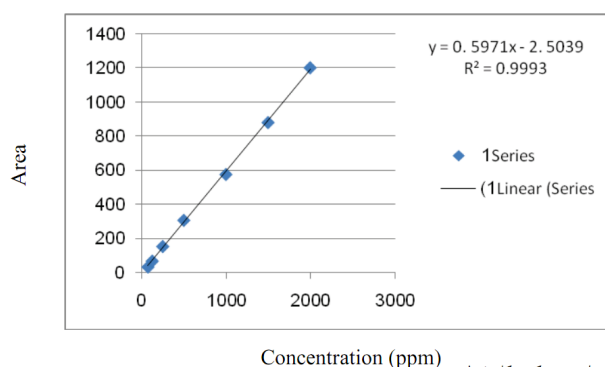
بحث

صدیقی و محمود (Siddiqui & Mahmood 1992) در بررسی خود مشاهده کردند که تعداد گره در ریشه نخود مایه‌زنی شده با غلظت‌های متفاوت نژاد سه نماتود *M. incognita*، با افزایش سطح جمعیت افزایش می‌یابد. اما میزان فاکتور تولیدمثل با افزایش سطح جمعیت کاهش



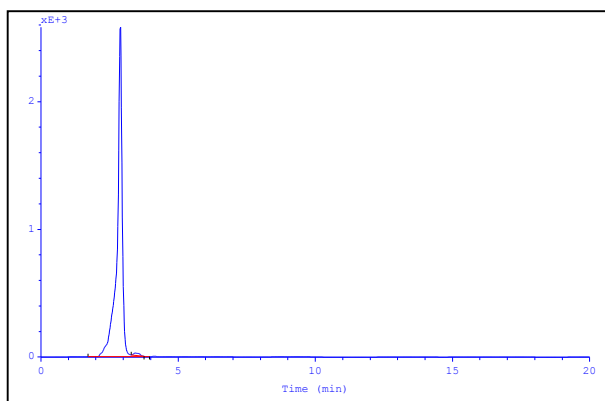
شکل ۲. طیف HPLC حاصل از استاندارد کامپفرول در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام

Fig 2. HPLC spectrum of Kaempferol standard in 1000 ppm concentration



شکل ۳. منحنی کالیبراسیون ترکیب کامپفرول

Fig.3. Kaempferol compound calibration curve



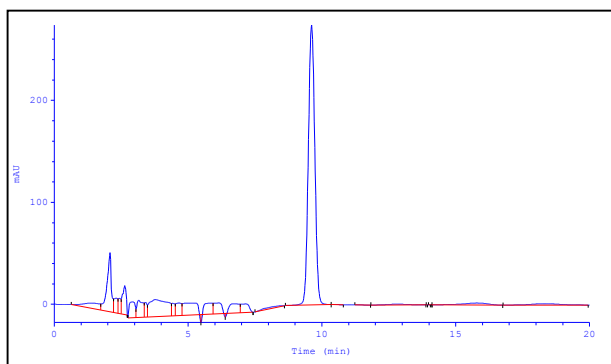
شکل ۴. طیف HPLC حاصل از استاندارد کوئرستین در غلظت ۱۰۵۰ پی‌پی‌ام

Fig 4. HPLC spectrum of Quercetin standard in 1050 ppm concentration

جدول ۳. میزان کوئرستین و اسید یورسولیک همیشه بهار در شاهد و تیمار ۵۰۰۰ نematod

Table3. Quantity of pot marigold quercetin and ursolic acid in control and 5000 nematode treatment

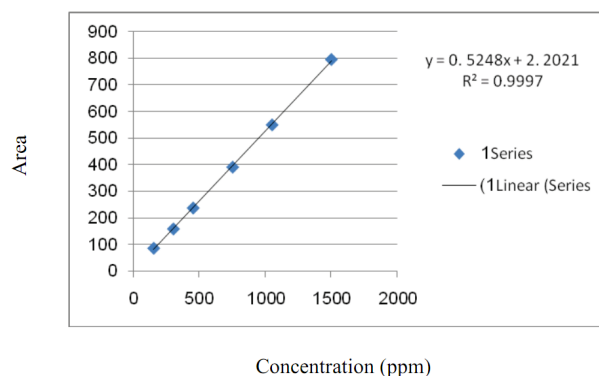
ارتفاع (میکرو میلی‌آمپر) Height (mAU)	سطح (میکرو آمپر در دقیقه) Area(mAU*min)	مقدار (بی‌پی‌ام) Amount (ppm)	ترکیب Compound	زمان پایانی (دقیقه) End (min)	زمان شروع (دقیقه) Start (min)	زمان بازدار (دقیقه) Ret.time (min)	شاهد و تیمار ۵۰۰۰ نematod control and 5000 nematodes treatment
185.782	39.7426	75.405	quercetin	2.75	2.25	2.533	شاهد
272.922	132.333	251.081	quercetin	3.62	2.05	2.567	تیمار ۵۰۰۰ نematod 5000 nematodes treatment
19.443	5.390	129.399	ursolic acid	9.97	8.60	9.75	شاهد
39.179	10.162	243.965	ursolic acid	9.92	8.53	9.70	تیمار ۵۰۰۰ نematod 5000 nematodes treatment



شکل ۶. طیف HPLC حاصل از استاندارد یورسولیک اسید در غلظت ۲۰۰۰ بی‌پی‌ام

Fig 6. HPLC spectrum of Ursolic acid standard in 2000 ppm concentration

گزارش شده است. تولید و تجمع ترکیب‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها، استرول‌ها و دیگر فنول‌ها در ایجاد واکنش‌های دفاعی نسبت به نematodها مطرح می‌باشد. با توجه به اینکه این ترکیب‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی بوده و در گیاهان نقش دفاعی دارند لذا می‌توان افزایش این ترکیب‌ها در تیمار نسبت به شاهد را توجیه کرد (Treutter 2006). در این زمینه، سیدین و همکاران (Sayedain et al. 2012)



شکل ۵. منحنی کالیبراسیون ترکیب کوئرستین

Fig 5. Quercetin compound calibration curve

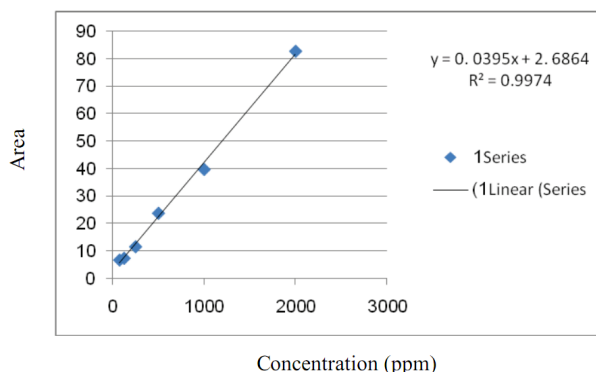
یافته و بیشترین فاکتور تولیدمثل نematod در کمترین سطح جمعیت مشاهده شد. همچنین سینگ و کورما (Singh & Khurma 2007) نشان دادند که میانگین تعداد کیسه تخم با افزایش سطح جمعیت در ریشه گوجه‌فرنگی آلوده به جز در یک رقم به طور منظمی افزایش می‌یابد. نتایج مشابه توسط موهانداس و راماکریشنان (1997)، پاندی و حسیب (1997) و پارک و همکاران (2005) با مطالعه بیماری‌زایی نematod ریشه‌گرهی بر روی تعدادی از گیاهان دارویی

افزایش ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین را در گیاه بارهنگ کبیر آلوده شده با نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica* گزارش کردند. در تحقیقات هوتاگورا و همکاران (1999) افزایش و تجمع ترکیب‌های فلاونوئیدی داخل سلولی را در گال‌های تشکیل شده روی ریشه (به غیر از سلول‌های غول‌آسا) در ریشه‌های شبدر سفید آلوده به نماتود *M. javanica* گزارش کردند. در تحقیقی دیگر، کندی و همکاران (1999) افزایش دو تا چهار برابری محتوای ترکیب‌های ایزو فلاونوئیدی در ریشه سویای آلوده به نماتود *Heterodera glycines* را نسبت به گیاهان سالم گزارش کردند.

بررسی‌های انجام گرفته توسط سوریانوو همکاران (Soriano et al. 2004) نشان داد که ترکیب‌های ایزوفلاونوئیدی *O*-methyl- و *flavone-C*-glycoside و *apigenin-C*-deoxyhexanide-*O*-hexoside در اثر حمله نماتودهای *Heterodera* و *Pratylenchus neglectus* و *avenae* به چاودار در آن القا شده و در واکنش‌های دفاعی گیاه نقش دارند که نتایج حاصل از این چهار بررسی با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد.

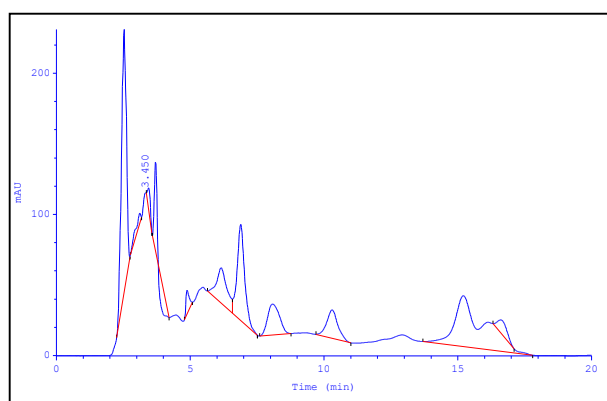
القاء سنتز فلاونوئیدها در گیاهانی که توسط عوامل بیماری‌زای قارچی مورد حمله قرار گرفته‌اند رخ می‌دهد. رستا و همکاران (Rosta et al. 2002) افزایش غلظت آنتوسیانین‌ها را در برگ‌های کلم چینی در واکنش به آلودگی *Alternaria brassicae* گزارش کردند.

اولسن و همکاران (Olsen et al. 2008) نیز گزارش کردند که کامپفرول، کوئرستین و آنتوسیانین‌ها به طور قابل توجهی در نتیجه کاهش نیتروژن در گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) افزایش می‌یابد. تلگبرگ و همکاران (Telgelberg et al. 2004) گزارش کردند که اشعه UV-B باعث کاهش اندازه برگ در *Betulapendula*



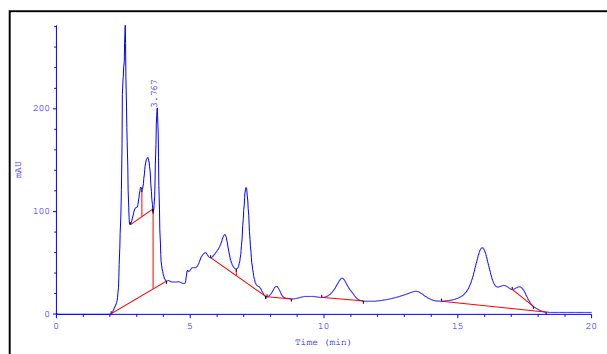
شکل ۷. منحنی کالیبراسیون ترکیب اسید یورسولیک

Fig 7. Ursolic acid compound calibration curve



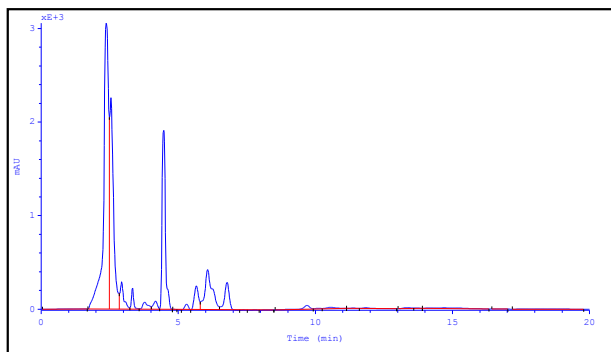
شکل ۸. طیف HPLC مقدار کوئرستین همیشه بهار در تیمار شاهد

Fig 8. HPLC spectrum of marigold quercetin quantity in control treatment



شکل ۹. طیف HPLC مقدار کوئرستین همیشه بهار در تیمار ۵۰۰۰ نماتود

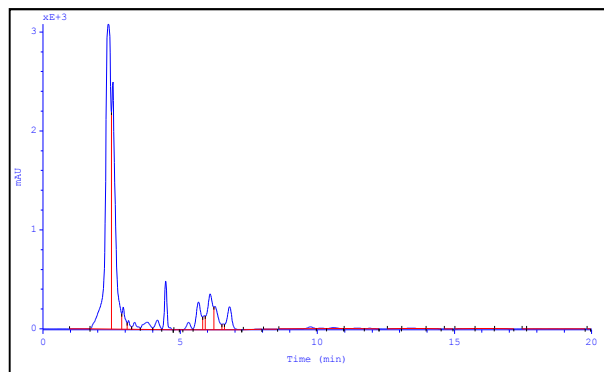
Fig 9. HPLC spectrum of pot marigold quercetin quantity in 5000 nematodes treatment



شکل ۱۱. طیف HPLC مقدار اسید یورسولیک همیشه بهار در تیمار ۵۰۰۰ نماتود

Fig 11. HPLC spectrum of pot marigold ursolic acid quantity in 5000 nematodes treatment

مزرعه‌ای که گیاهان معمولاً با تنش‌های محیطی مواجه می‌شوند، میزان خسارات گیاهی افزایش یابد. از طرفی تغییرات فیزیولوژیک حاصله در گیاه توسط نماتود، باعث تحریک سنتز ترکیب‌های دارویی با اهمیت مانند کوئرستین و یورسولیک اسید می‌شود که این ترکیب‌ها دارای نقش دفاعی در گیاه بوده و از لحاظ دارویی نیز برای انسان دارای اهمیت می‌باشد.



شکل ۱۰. طیف HPLC مقدار اسید یورسولیک همیشه بهار در تیمار شاهد

Fig 10. HPLC spectrum of pot marigold ursolic acid quantity in control treatment

شده ولی تولید کامپفرول، کلروژنیک اسید و کوئرستین را در گیاه القا می‌کند.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد حمله این نماتود به گیاه همیشه بهار به طور کلی باعث کاهش فاکتورهای رشدی گیاه مانند طول، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی، طول، وزن تر و خشک ریشه می‌گردد. کاهش در شاخص‌های ذکر شده گیاهی در شرایط مطلوب محیطی در گلخانه صورت گرفته است و به نظر می‌رسد در شرایط

منابع

- Akhiani, A., Mojtahedi, H. and Naderi, A. 1986. The hosts of root-knot nematode in Iran. Proc. 8th Plant Protection Congress. Iran. Isfahan, Iran.134 (Abst.).
- Akhayani, A., Mojtahedi, H. and Naderi, A. 1984. Species and physiological races of root-knot nematodes in Iran. Iran. Journal of Plant Pathology 20: 15-17. In Persian with English abstract.
- Butool, F. and Haseeb, A. 1998. Effect of *Meloidogyne incognita* on *Hyoscyamus muticus*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 5:13-19.
- Cenis, J. L., Opperman, C. H. and Triantaphyllou, A. C. 1992. Cytogenetic, enzymatic and restriction fragment length polymorphism variation of *Meloidogyne* spp. from Spain. Phytopathology 82: 527-531.
- Daigle, D. J. and Conkerton, E. J. 1982. High-performance liquid chromatography of 34 selected flavonoids. Journal of Chromatography 240: 202-205.
- Eisenback, J. D. and Triantaphyllou, H. H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Pp. 191-274. In: W. R. Nickle, (Ed.). Manual of Agricultural Nematology. New York, USA. Marcel Dekker.
- Haseeb, A. and Pandey, R. 1987. Incidence of root-knot nematodes in medicinal and aromatic plant- new host records. Nematropica 2: 209-212.
- Haseeb, A., Srivastava, N. K. and Pandey, R. 1990. The influence of *Meloidogyne incognita* on growth, physiology, nutrient concentration and alkaloid yield of *Hyoscyamus niger*. Nematologia Mediterranea 18: 127-129.

- Hugall, A., Stanton, J. and Moritz, C. 1999. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. *Molecular Biology and Evolution* 16: 157-164.
- Hussey, R. S. 1990. Biochemical and molecular methods of identifying *Meloidogyne* species: symposium introduction. *Journal of Nematology* 22: 8-9.
- Hussey, R. S. and Barker, K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report* 57: 1025-1028.
- Hutangura, P., Mathesius, U., Jones, M. G. K. and Rolfe, B. G. 1999. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 221-231.
- Kennedy, M. J., Niblack, T. L. and Krishnan, H. B. 1999. Infection by *Heterodera glycines* elevates isoflavonoid production and influences soybean nodulation. *Journal of Nematology* 3: 341-347.
- Khan, T. A., Nisar, S. and Ashraf, M. S. 2004. Effect of population levels of *Meloidogyne javanica* on plant growth and nematode multiplication on cucurbits. *Pakistan Journal of Nematology* 22: 83-89.
- Khan, T. A., Ashraf, M. S. and Hasan, S. 2006. Pathogenicity and life cycle of *Meloidogyne javanica* on balsam (*Impatiens balsamina*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 39:45-48.
- Lopez-Sanchez, C., Martin-Romero, F.J., Sun, F., Luis, L., Samhan-Arias, A. K., Garcia-Martinez, V. and Cutierrez-Merino, C. 2007. Blood micromolar concentrations of kaempferol afford, protection against ischemia/reperfusion-induced damage in rat brain. *Brain Research* 1182: 123-137.
- Mohandas, C. and Ramakrishnan, S. 1997. Pathogenic effect of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* on African white yam, *Dioscorea rotundata*. *Indian Journal of Nematology* 27: 921-924.
- Nasresfahani, M., Karimpourfard, H. and Ahmadi, A. R. 2008. Studies on the infection of medicinal plants to root-knot nematodes in Esfahan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 44: 99-101 (In Persian with English abstract).
- Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I. and Spiegel, Y. 2000. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science* 56: 983-988.
- Olsen, K. M., Lea, U. S., Slimestad, R., Verheul, M. and Lillo, C. 2008. Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *Journal of Plant Physiology* 165: 1491-1499.
- Oomidbaigi, R. 2008. Production and processing of medicinal plants. Vol. I. AstanQuds Razavi. 397 p.
- Pandey, R. and Haseeb, A. 1997. Plant parasitic nematodes associated with three medicinal plants and the pathogenicity of root-knot nematode. *Indian Journal of Nematology* 27: 53-57.
- Park, J. S., Rho, H.S., Kim, D. H. and Chang, I. S. 2006. Enzymatic Preparation of Kaempferol from Green Tea Seed and Its Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2951-2956.
- Park, S. D., Khan, Z., Ryu, G. J., Seo, Y. J. and Yoon, J. T. 2005. Effect of initial density of *Meloidogyne hapla* on its pathogenic potential and reproduction in three species of medicinal plants. *Phytopathology* 153: 250-253.
- Park, S. D., Kim, J. C. and Khan, Z. 2004. Host status of medicinal plant for *Meloidogyne hapla*. *Nematoropica* 34: 39-43.
- Parente, L. M. L., Junior, R. D. S. L., Tresvenzol, L. M. F., Vinaud, M. C. Paula, J. R. D. and Paulo, N. M. 2012. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, doi:10.1155/2012/375671, 7 p.
- Razzaz Hashemi, S. R. and Akbarinia, A. 2008. Responses of some medicinal plants to root-knot nematode *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions. Proc. 18th Iranian Plant Protection Congress., Hamedan, Iran 561 (Abst.).
- Rosta, M., Bennett, S. R. and Hilker, M. 2002. Comparative physiological responses in Chinese cabbage induced by herbivory and fungal infection. *Journal of Chemical Ecology* 28: 2448-2463.
- Samuelsen, A. B. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 1-21.
- Sayedain, F. S., Olia, M. and Jaimand, K. 2012. Effects of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on plantain medicinal plant (*Plantago major*). *Iranian Journal of Plant Pathology* 48: 367-379. In Persian with English abstract.
- Siddiqui, Z. A. and Mahmood, I. 1992. Effect of different inoculum levels of *Meloidogyne incognita* race 3 on the

- growth of chickpea. *Nematologia Mediterranea* 20:189-191.
- Singh, S. K. and Khurma, U. R. 2007. Susceptibility of six tomato cultivars to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 13:73-77.
- Soriano, I. R. Asenstorfer, R. E. Schmidt, O. and Riley, I. T. 2004. Inducible flavones in Oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. *Phytopathology* 94: 1027-1214.
- Taylor, A. L. and Sasser, J. N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes, (*Meloidogyne* species). North Carolina State University Graphics. 111 p.
- Taylor, D. P. and Netscher, C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20: 268-269.
- Tegelberg, R. Julkuntten-Titto, R. and Aphalo, P. J. 2004. Red: far-red light ratio and UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. *Plant Cell Environment*. 27: 1005-1013.
- Treutter, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters* 4: 147-157.
- Zacchigna, M., Cateni, F., Faudale, M., Sosa, S. and Della Loggia, R. 2009. Rapid HPLC analysis for quantitative determination of the two isomeric triterpenic acids, Oleanolic acid and Ursolic acid, in *Plantago major*. *Scientia Pharmaceutica* 77:79-86.
- Zijlstra, C., Donkers-Venne, D. T. H. M. and Fargette, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-853.