دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال یازدهم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۴۰۱
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 11(2), 2022

Research Article

Impact of raw and pure saponins of six alfalfa ecotypes on *Ditylenchus dipsaci* egg hatching

Farzad Moradi[1], Hojatollah Mazaheri-laghab[1], Leila Kashi[2]✉, Seyed Saeid Moosavi [1]
1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: 05.21.2022 Accepted: 10.03.2022
Moradi F, Mazaheri-laghab H, Kashi L, Moosavi SS (2022) Impact of raw and pure saponins of six alfalfa ecotypes on *Ditylenchus dipsaci* egg hatching. Plant Pathology Science 11(2):61-72. Doi: 10.2982/PPS.11.2.61

Abstract

Introduction: The stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*, is an important and damaging pathogen in a number of agricultural and ornamental plants, including alfalfa. The aim of this study was to investigate the effect of raw and pure saponins of six alfalfa ecotypes on the hatching of this nematode's eggs in order to find a biological method for its management. **Materials and Methods:** The effect of raw and pure saponins of six alfalfa ecotypes on the hatching of stem nematode eggs was investigated in a completely randomized factorial design with two factors of alfalfa ecotypes (six ecotypes) and their saponins (raw and pure) *in vitro*. **Results:** Analysis of variance showed that the interaction effect between two factors, ecotype and saponin, is statistically significant. At concentrations of 50 and 90 microliters of crude saponin from different ecotypes, 30-42% and 33-59% of the nematode eggs did not hatch, respectively. The Nishaburi ecotypes caused the most and the Shiraz and Khrisari polycross caused the least number of egg hatching. Concentrations of 10 and 50 microliters of pure saponin resulted in between 56 and 69% and 61 and 79% of total nematode eggs failing to hatch, respectively. The local ecotypes Miandoab and Nishaburi had the highest and Shiraz Polycross the lowest number of egg hatches. **Conclusion**: Pure saponins of alfalfa ecotypes have a greater effect on nematode egg hatching than raw saponins. Saponins of Shiraz Polycross alfalfa ecotype have a better effect than other ecotypes.

Key words: Alfalfa, *Ditylenchus*, Nematode, Saponin

✉Corresponding author: l.kashi@basu.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر ساپونین‌های خام و خالص شش اکوتیپ یونجه بر تفریخ تخم *Ditylenchus dipsaci*

فرزاد مرادی[۱]، حجت‌اله مظاهری‌لقب [۱]، لیلا کاشی[۲]✉، سید سعید موسوی [۱]
۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۶

مرادی ف، مظاهری‌لقب ح، کاشی ل، موسوی س س (۱۴۰۱) تأثیر ساپونین‌های خام و خالص شش اکوتیپ یونجه بر تفریخ تخم *Ditylenchus dipsaci*. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۱(۲): ۶۱-۷۲. Doi: 10.2982/PPS.11.2.61

چکیده

مقدمه: نماتد ساقه و پیاز *Ditylenchus dipsaci* یک عامل بیماری‌زای مهم و خسارت‌زا در تعدادی از گیاهان زراعی و زینتی از جمله یونجه است. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر ساپونین‌های خام و خالص شش اکوتیپ یونجه بر تفریخ تخم این نماتد بود تا روشی زیستی برای مدیریت آن یافت شود. **مواد و روش‌ها**: تأثیر ساپونین‌های خام و خالص شش اکوتیپ یونجه بر تفریخ تخم این نماتد آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با دو فاکتور اکوتیپ‌های یونجه (شش اکوتیپ) و ساپونینهای (خام و خالص آنها) در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید. **یافته‌ها**: تجزیه واریانس داه‌ها نشان داد که اثرمتقابل بین دو فاکتور اکوتیپ و ساپونین از نظر آماری معنی‌دار است. با غلظتهای ۵۰ و ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام اکوتیپ‌های مختلف، به ترتیب ۳۰ تا ۴۲ درصد و ۳۳ تا ۵۹ درصد تخم‌های نماتد تفریخ نشدند. اکوتیپ‌های نیشابوری بیش‌ترین و پلی‌کراس شیراز و کریساری کم‌ترین تعداد تفریخ تخم را موجب شدند. غلظتهای ۱۰ و ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص به ترتیب بین ۵۶ تا ۶۹ درصد و ۶۱ تا ۷۹ درصد مجموع تخم‌های نماتد تفریخ نشدند. اکوتیپ‌های محلی میاندوآب و نیشابوری بیشترین و پلی‌کراس شیراز کم‌ترین تعداد تفریخ تخم را داشتند. **نتیجه‌گیری:** ساپونینهای خالص اکوتیپهای یونجه نسبت به ساپونینهای خام تاثیر بیشتری برمیزان تفریخ تخم نماتد دارند. ساپونینهای اکوتیپ پلی‌کراس شیراز یونجه تاثیر بهتری نسبت به سایر اکوتیپها دارد.

واژگان کلیدی: ساپونین، نماتد، یونجه، *Ditylenchus*

✉نویسنده مسئول: l.kashi@basu.ac.ir

مقدمه Introduction

یونجه (*Medicago sativa* L.) به عنوان یک گیاه علوفه‌ای چند ساله به طور وسیعی برای تأمین علوفه کشت می‌گردد (Xuehui and Brummer, 2012). همچنین این گیاه مرتعی منبع غنی از پروتئین خام و فیبر و عناصر ریزمغذی مختلف بوده و می‌تواند نقش مؤثری در تأمین پروتئین‌های حیوانی داشته باشد (Raju et al. 2018, Radovic et al. 2009). از مهم‌ترین آفات و بیماری‌های کاهنده عملکرد یونجه می‌توان به نماتد ساقه و پیاز(*Ditylenchus dipsaci* Kühn 1857, Filipjev 1936) اشاره نمود. این نماتد با حدود ۳۰ نژاد، به بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی حمله می‌کند (Rosas-Hernandez et al. 2017, Madani et al. 2015). این نماتد بذرزاد، خاکزی غالباً به صورت انگل داخلی در بافتهای طوقه، ساقه و یا قسمت‌های هوایی گیاه زندگی می‌کند (Madani et al. 2015).

گیاهان قادر به تولید سه گروه متفاوت و متنوع از ترکیبات آلی شامل متابولیت‌های اولیه، ثانویه و هورمون‌ها هستند. هورمون‌های گیاهی بیشتر نقش تنظیم کنندگی فعالیت‌های سلولی در گیاه را برعهده دارند (Taiz et al. 2015). متابولیت‌های اولیه در گیاهان (پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک) بیش‌تر در تغذیه و تولید مثل نقش دارند (Saurabh et al. 2015). ساپونین‌ها، اسیدهای آمینه غیرپروتئینی، پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌هایی مانند لکتین‌ها و مهارکننده‌های آنزیمی به عنوان محافظت کننده‌های گیاهی عمل می‌کنند (Francis et al. 2002). ساپونین‌ها، در گیاهانی نظیر یونجه، سویا، لوبیا، سیر و پیاز وجود دارند (Golawska et al. 2006, Oleszek and Stochmal 2002, Mazahery-Laghab et al. 2011). ساپونین‌های یونجه شامل گروه سویا ساپوژنین A-F و آگلی‌کن‌هایی مثل اسید مدیکاژنیک ، هیدراژنین، اسید لوسرنیک ، اسید زنهیک تریدسموساید هستند (Oleszek et al. 1992, Shany et al. 1972). جهت مهار نماتدهای انگل گیاهی از روش‌های مختلفی استفاده می‌گردد. آفتاب‌دهی خاک و تناوب زراعی با محصولات دانه‌ریز از روش‌های مهار فیزیکی بیمارگرهای خاکزاد به‌خصوص نماتد ساقه و پیاز در مزرعه‌های سیر و پیاز است (Lamberti et al. 2001). استفاده از ارقام مقاوم به تنهایی یا در تلفیق با سایر روش‌های مهاری، ممکن است موثرترین روشی باشد که به این طریق می‌توان استفاده از نماتدکش‌های شیمیایی را کاهش داد یا حذف نمود، زیرا این روش از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نبوده و باعث آلودگی محیط‌زیست، آب‌های زیر زمینی، افزایش فشار انتخاب و افزایش نرخ جهش‌های ژنتیکی می‌گردد (Cook and Starr 2006). از جمله روش‌های مهار نماتدهای انگل گیاهی، استفاده از مواد طبیعی مثل ساپونین‌های گیاهی است (D-Addabbo et al. 2011). تاکنون، اثرات زیستی ساپونین‌ها روی حلزون‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، حشرات، پروتوزوآها، سلول‌های غیرطبیعی کبد موش صحرایی،

سلول‌های سرطانی، سلول‌های تنفسی ماهی، زاد و ولد حیوانات، غشاءهای سلولی، جذب مواد غذایی، هضم پروتئین، واکنش‌های اکسیداسیونی، متابولیسم کلسترول، سیستم‌های ایمنی و عصبی، خاصیت فیزیکی‌وشیمیایی، آرایشی، داروئی و تغذیه‌ای مورد بررسی قرارگرفته‌اند (Mazahery-Laghab et al. 2011, Ustundag and Mazza 2007, Francis et al. 2002). در رابطه با تأثیر ساپونین‌های یونجه بر فعالیت‌های زیستی نماتدها، تحقیقات زیادی در شرایط آزمایشگاهی، بعمل آمده است. برای مثال مخلوطی از بافت‌های یونجه تأثیر مثبتی بر فعالیت زیستی نماتدهای سیست طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*)، مولد غده *Meloidogyne incognita* و *Xiphinema index* داشته است (D-Addabbo et al. 2011). بنابراین، هدف از اجرای این آزمایش بررسی تأثیر ساپونین‌های خام و خالص استخراج شده از شش اکوتیپ یونجه بر تفریخ تخم نماتد ساقه یونجه در شرایط آزمایشگاهی، به منظور تعیین اکوتیپ‌های نسبتاً مقاوم و حساس بود.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

تهیه بذر اکوتیپ‌های یونجه

بذرهای شش اکوتیپ یونجه شامل همدانی، کریساری، فیض، پلی‌کراس شیراز، محلی میاندوآب و محلی نیشابوری مورد استفاده در این آزمایش از مجموعه بذرهای دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه گردید. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۴ و ارتفاع ۱۱ سانتی‌متری کشت شدند. هر گلدان حاوی چهار کیلوگرم خاک لومی- شنی بود که توسط اتوکلاو سترون شده بود. مراقبت‌های لازم در مرحله داشت انجام شد. از قسمت‌های هوایی اکوتیپ‌ها (مخلوط برگ و ساقه) برای استخراج ساپونین خام و خالص استفاده گردید.

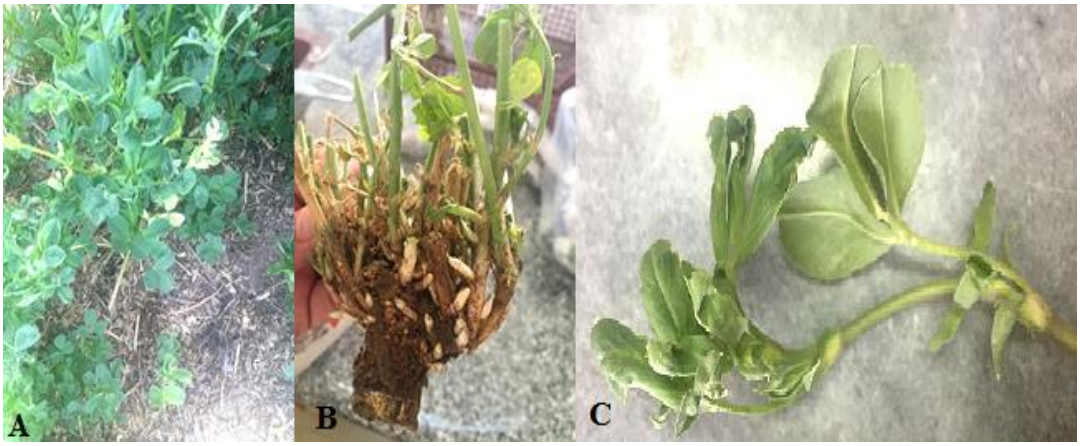
استخراج ساپونین‌های خام و خالص اکوتیپ‌های یونجه

ساپونین‌های خام از ۱۰ گرم از بافت قسمت‌های هوایی (ساقه و برگ) اکوتیپ‌های یونجه مورد بررسی، با استفاده از ازت مایع در یک هاون چینی پودر و با متانول ۷۰٪ (پنج میلی‌لیتر به ازای هر گرم بافت گیاهی) مخلوط و پس از ۲۰ دقیقه، با استفاده از قیف بوخنر در خلاء صاف گردید. الکل موجود به وسیله دستگاه تبخیرکننده چرخشی (روتاری) در خلاء و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. مواد جامد باقی‌مانده ته فلاسک با متانول ۸۰٪ (پنج میلی‌لیتر به ازای هر گرم بافت گیاهی) شسته شده و سپس الکل طبق دستور بالا تبخیر گردید. مواد جامد حاصل از روتاری دوم با آب مقطر حل شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید (Golawska et al. 2012). برای تهیه ساپونین خالص مراحل فوق تکرار شده و به محلول حاصل مقدار ۱۰ میلی‌لیتر بوتانول اشباع اضافه گردید. محلول روی شیکر کاملاً به هم زده شد و به قیف جداکننده منتقل شد تا دو لایه تشکیل گردید. لایه

زیرین آن جدا شده و ۵ میلی‌لیتر بوتانول اشباع به آن اضافه شد. سپس مرحله قبل سه مرتبه تکرار گردید. لایه‌های بالایی تشکیل شده در قیف جداکننده طی این سه مرحله جمع آوری و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد توسط روتاری تبخیر گردید. ساپونین نسبتاً خالص جدا شده در دمای ۲۰- سانتی‌گراد، درون فریزر تا زمان استفاده نگهداری گردید.

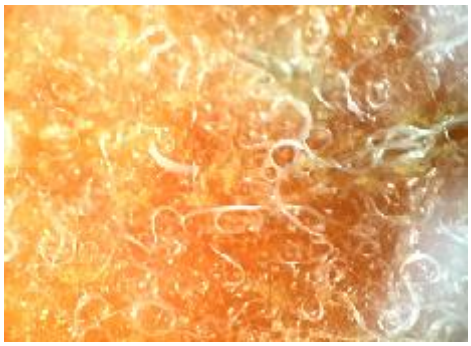
جمع‌آوری و تکثیر نماتد *D. dipsaci*

از یک مزرعه یونجه آلوده به *D. dipsaci* واقع در روستای قرخلر از توابع شهرستان قهاوند استان همدان نمونه‌برداری انجام گرفت (شکل ۱). سپس نماتدها به روش سینی، استخراج شدند (Whitehead and Hemming 1965). جهت تأمین جمعیت نماتد مورد نیاز، پس از استریل نمودن نماتدها با سولفات استرپتومایسین ۱٪ (Hajihassani et al. 2016)، تکثیر آن‌ها روی دیسک‌های هویج انجام شد (شکل ۲). سپس تشتک‌های پتری حاوی نماتد در دمای ۲۱-۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت شش هفته درون انکوباتور و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. جهت تفکیک تخم‌ها از لاروها و نماتدهای بالغ، داخل یک تشتک پتری، کاغذ صافی و روی آن دیسک هویج قرار داده و به آرامی روی آن آب مقطر ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت لاروها و نماتدهای بالغ متحرک از کاغذ صافی عبور کرده و تخم‌ها که در سطح کاغذ صافی باقی مانده بودند، جمع‌آوری شده و به صورت سوسپانسون نگهداری شدند (Kuhnhold et al. 2006, Fasihi et al. 2010, Faulkner et al. 1974).



شکل ۱. نشانه‌های بیماری در مزرعه یونجه آلوده به *Ditylenchus dipsaci* .

Figure 1. Disease symptoms in alfalfa field infected with *Ditylenchus dipsaci*.



شکل ۲. تکثیر نماتد *Ditylenchus dipsaci* روی دیسک هویج.

Figure 2. Reproduction of *Ditylenchus dipsaci* on carrot disc.

بررسی تأثیر ساپونین خام و خالص اکوتیپ‌های یونجه بر تفریخ تخم *D. dipsaci*

در این آزمایش، از ساپونین‌های خام و خالص جهت بررسی تأثیر بر تفریخ تخم نماتد ساقه یونجه در شرایط مهار شده آزمایشگاه استفاده گردید. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و با دو فاکتور انجام گرفت. فاکتور اول شامل شش اکوتیپ یونجه و فاکتور دوم شامل پنج سطح ساپونین، به ترتیب سطح اول- آب مقطر استریل (شاهد) سطح دوم- ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام، سطح سوم-۹۰ میکرولیتر ساپونین خام، سطح چهارم- ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص و سطح پنجم- ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص بود. جهت بررسی از پلیت پلی‌استیرن ۲۴ خانه‌ای که درون چاهک‌های آن سوسپانسیونی حاوی میانگین ۱۵۰۰ عدد تخم نماتد ریخته شده بود، استفاده گردید. پلیت‌ها درون انکوباتور و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Kühnhold et al. 2006). برای حلالیت بهتر ساپونین و حصول نتیجه بهتر بر تفریخ تخم، به هر چاهک، یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل دو بار تقطیر اضافه شد. پس از ۱۴ روز پلیت‌ها با استفاده از پتری شمارش و زیر استرئومیکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفته و تعداد تخم‌های تفریخ نشده محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها، پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها و آزمون یکنواختی واریانس تیمارها، از آزمون دانکن استفاده شد.

یافته‌ها Results

براساس تجزیه واریانس داده‌ها، بین فاکتورهای اصلی مورد بررسی (اکوتیپ‌ها و ساپونین‌ها) از نظر تأثیر بر صفت تفریخ تخم نماتد ساقه یونجه، تفاوت معنی‌داری ($P<0.01$) مشاهده گردید. اثر متقابل

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر ساپونین‌های خام و خالص بر تفریخ تخم *Ditylenchus dipsaci* پس از ۱۴ روز.

Table 1. Analysis of variance of the effect crude and pure saponine on hatching of *Ditylenchus dipsaci* after 14 days.

Source of variation	Degree of freedom	Mean squars
		Eggs hatching
Ecotype	5	44913.33**
Saponine	4	2047283.03**
Saponine ×Ecotype	20	21879.27*
Error	60	13306.85
٪Coefficient of variation	-	16.62

**و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد آزمون دانکن.

** and * are Significant at 1 and 5% probability levels of Dunkan Test.

سطوح دو عامل اکوتیپ × ساپونین بر صفت تفریخ تخم نماتد ساقه یونجه نیز معنی‌دار ($P<0.05$) گردید (جدول ۱).

نتیجه بررسی تأثیر سطوح مختلف ساپونین اکوتیپ‌های یونجه بر تفریخ تخم *D. dipsaci* مشخص شد که با اعمال غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام بر یک میلی‌لیتر محلول آب مقطر حاوی ۱۵۰۰ عدد تخم نماتد، به ترتیب اکوتیپ‌های نیشابوری، کریساری، محلی میاندوآب و همدانی بیش‌ترین و فیض و پلی‌کراس شیراز کم‌ترین تعداد تخم تفریخ را موجب شدند. همچنین با اعمال غلظت ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام به ترتیب، در اکوتیپ‌های نیشابوری و محلی میاندوآب بیش‌ترین و کریساری و فیض کم‌ترین میزان تخم تفریخ شده نماتد ساقه یونجه مشاهده گردید (جدول ۲).

با استفاده از غلظت ۱۰ میکرولیتر ساپونین خالص، به ترتیب در اکوتیپ‌های محلی میاندوآب، کریساری و نیشابوری بیش‌ترین و فیض و پلی‌کراس شیراز کم‌ترین تعداد تفریخ تخم نماتد مشاهده شد. همچنین با بررسی تأثیر غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص مشخص شد به ترتیب اکوتیپ‌های نیشابوری و همدانی بیش‌ترین و فیض و پلی‌کراس شیراز کم‌ترین تعداد تفریخ تخم نماتد را داشتند (جدول ۲). در این پژوهش، در تیمار شاهد (اعمال آب مقطر / سطح صفر ساپونین)، بیش از ۸۰ درصد تخم‌های نماتد *D. dipsaci* تفریخ شدند.

جدول ۲. میانگین تفریخ تخم *Ditylenchus dipsaci* ۱۴ روز پس از قرارگیری در معرض سطوح مختلف ساپونین اکوتیپ‌های مختلف یونجه

Table 2. Mean hatch of *Ditylenchus dipsaci* 14 days after exposure to different saponin levels of different ecotypes of alfalfa

Ecotype	Treatment number	Saponin levels	Hatching (%)
Miandoab	1	Distilled water	84 p
	2	50 µ crude	63 klm
	3	90 µ crude	63 klm
	4	10 µ pure	44 fgh
	5	50 µ pure	29 a-d
Feyze	6	Distilled water	86 p
	7	50 µ crude	59 i-m
	8	90 µ crude	48 ghi
	9	10 µ pure	34 b-f
	10	50 µ pure	23 ab
Hamedani	11	Distilled water	91 p
	12	50 µ crude	61 j-m
	31	90 µ crude	49 g-j
	14	10 µ pure	35 b-f
	15	50 µ pure	33 abc
Kerisari	16	Distilled water	81 opn
	17	50 µ crude	69 lmn
	18	90 µ crude	42 d-h
	19	10 µ pure	43 e-h
	20	50 µ pure	31 a-e
Neyshabouri	21	Distilled water	83 op
	22	50 µ crude	70 mno
	23	90 µ crude	67 lm
	24	10 µ pure	39 c-g
	25	50 µ pure	37 c-g
Polycros-Shiraz	26	Distilled water	90 p
	27	50 µ crude	58 i-l
	28	90 µ crude	52 h-k
	29	10 µ pure	31 a-e
	30	50 µ pure	21 a

داده‌های دارای حروف مشابه، بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن می‌باشد.

Data with similar letters indicate no significant difference in the 5% probability level of Duncan test

بحث Discussion

با توجه به معنی‌دار شدن اثرات اصلی اکوتیپ، ساپونین و اثرات متقابل ساپونین × اکوتیپ، از تنوع موجود بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه و ساپونین‌های خام و خالص استخراج شده و اعمال غلظتهای مختلف از آن‌ها می‌توان در انتخاب اکوتیپ‌های مناسب در برنامه‌های اصلاحی و مهار نماتد ساقه یونجه استفاده کرد. براساس مقایسه میانگین انجام شده، با اعمال غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خام، حدود ۵۸ تا ۷۰ درصد از تخم‌های نماتد ساقه یونجه تفریخ شدند و به ترتیب اکوتیپ‌های نیشابوری، کریساری، فیض، همدانی و پلی کراس شیراز منجر به تفریخ تخم نماتد از بیش‌ترین تا کم‌ترین تعداد گردیدند؛ به عبارت دیگر در بین اکوتیپ‌های مذکور، نیشابوری حساس‌ترین و پلی‌کراس شیراز مقاوم‌ترین اکوتیپ نسبت به نماتد ساقه یونجه بودند.

با اعمال غلظت ۹۰ میکرولیتر ساپونین خام، بین ۴۱ تا ۶۷ درصد از تخم‌های نماتد ساقه یونجه تفریخ شدند. اکوتیپ نیشابوری باعث بیشترین و همدانی و کریساری منجر به کم‌ترین میزان تفریخ تخم نماتد شدند. بدین‌ترتیب می‌توان گفت در غلظت مورد استفاده از ساپونین خام، اکوتیپ‌های همدانی و فیض نسبت به سایر اکوتیپ‌های مورد مطالعه نسبت به نماتد ساقه یونجه مقاوم‌تر بوده و بیشتر از سایرین مانع از تفریخ تخم شدند. با افزایش ۴۰ میکرولیتری ساپونین خام از ۵۰ به ۹۰ میکرولیتر، افزایشی بین ۳ تا ۱۷ درصد، عدم تفریخ تخم‌نماتد ساقه یونجه مشاهده گردید. در گیاهان، متابولیت‌های ثانویه و از جمله ساپونین‌ها به مقدار بسیار کم تولید شده و مقدار و نوع آن‌ها به مرحله فیزیولوژیکی و نمو گیاه و شرایط محیطی بستگی دارد (Akula and Ravishankar 2011). از طرفی، فعالیت بیولوژیکی ساپونین‌ها به تعداد زنجیره‌های قندی آب‌دوست متصل به به ساختار آگلیکون (ساپوژنین) و نیز به ماهیت خود ساپوژنین بستگی دارد (Tava and Avato 2006). براساس مطالعات قبلی، فعالیت نماتدکشی ساپونین‌های یونجه (*M. sativa*) به مقدار زیادی مربوط به ساپونین مدیکاژنیک اسید می‌باشد. بنابراین، تأثیر متفاوت مخلوط ساپونین خام اکوتیپ‌های مورد بررسی بر تفریخ تخم نماتد ساقه، حکایت از وجود ساپونین‌های مختلف در اندام‌های هوایی (ساقه و برگ) اکوتیپ‌ها دارد.

همچنین در بررسی تأثیر غلظت ۱۰ میکرولیتری ساپونین خالص اکوتیپ‌های مختلف بر تفریخ تخم، اکوتیپ محلی میاندوآب با ۴۴ درصد، بیش‌ترین و پلی‌کراس شیراز با ۳۱ درصد کم‌ترین تعداد تفریخ تخم نماتد ساقه یونجه را به خود اختصاص دادند. بنابراین، بین ۵۶ تا ۶۹ درصد مجموع تخم‌های نماتد ساقه یونجه تفریخ نشدند و تأثیر این غلظت، بیش از تأثیر غلظتهای ۵۰ و ۹۰ میکرولیتری ساپونین خام استخراج شده از اکوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. در نهایت، با بررسی

غلظت ۵۰ میکرولیتر ساپونین خالص (جدول ۲)، به ترتیب اکوتیپ‌های نیشابوری با ۳۷ درصد بیش‌ترین و پلی‌کراس شیراز با ۲۱ درصد، کم‌ترین تعداد تفریخ تخم نماتد ساقه را داشتند. بدین‌ترتیب که با استفاده از غلظت یادشده بین ۶۳ تا ۷۹ درصد تخم‌های نماتد ساقه تفریخ نشدند. با افزایش ۴۰ میکرولیتری ساپونین خالص از ۱۰ به ۵۰ میکرولیتر، بین هفت تا هشت درصد به تخم‌های تفریخ نشده نماتد ساقه یونجه افزوده شده است.

به ساختار ساپونین‌ها، یک یا چند زنجیره قندی آب‌دوست متصل است که در مرحله خالص سازی با دی اتیل اتر و عمل سانتریفوژ و رسوب انحصاری ساپونین‌ها، این ساختارهای قندی و غیرساپونینی مثل فنل‌ها در آب حل شده و از ساپونین خام جدا شده و ترکیب حاصل به صورت ساپونین خالص تبدیل می‌گردد (Mazahery-Laghab et al. 2011) و به احتمال زیاد تأثیر غلظتهای خالص ساپونین بر روی نماتد ساقه نسبت به غلظت خام ساپونین مورد استفاده در این پژوهش به دلیل کاهش و یا حذف مواد اضافی همراه با استخراج ساپونین بوده باشد.

گیاهان به‌عنوان منبع بزرگی از ترکیبات زیست‌کش محسوب می‌شوند که به‌طور بالقوه قابلیت فرموله شدن به صورت سموم جدید و به صورت بالفعل قابلیت استفاده در مدیریت پایدار عوامل بیماری‌زا و آفات گیاهی از جمله نماتدهای بیماری‌زای گیاهی را دارا می‌باشند (Benelli 2018). با این وجود، شناسایی ترکیبات مؤثر موجود در اکوتیپ‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر که دارای خاصیت نماتدکشی هستند، ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری Conclusion

یافته‌های این پژوهش نشان داد که با افزایش ۴۰ میکرولیتری غلظت ساپونین خام از ۵۰ به ۹۰ میکرولیتر و غلظت ساپونین خالص از ۱۰ به ۵۰ میکرولیتر، میزان تفریخ تخم نماتد کاهش می‌یابد. اکوتیپ‌های همدانی، فیض و پلی‌کراس شیراز بیش‌ترین تأثیر را بر کاهش تفریخ تخم نماتد ساقه داشتند و به نوعی نسبت به این نماتد حساسیت کم‌تر و دارای مقاومت بیش‌تری دارند. ساپونینهای خالص اکوتیپهای یونجه نسبت به ساپونینهای خام تاثیر بیشتری برمیزان تفریخ تخم نماتد دارند. ساپونینهای اکوتیپ پلی‌کراس شیراز یونجه تاثیر بهتری نسبت به سایر اکوتیپها دارد.

منابع Reference

Akula R, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior 6:1720-1731.

Benelli G (2018) Plant-borne compounds and nanoparticles: Challenges for medicine, parasitology and entomology. Environmental and Science and Pollution Research. 25:10149-10150.

Cook R, Starr JL (2006) Resistant cultivars. In Plant Nematology, pp. 370-389. In: RN Perry and M Moens (eds.). Plant Nematology. Wallingford, CABI International.

D-addabbo T, Carbonara T, Leonetti P, Tava A, Avato P (2011) Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. Photochemistry Reviews 10:503–519.

Fasihi M, Tanha Maafi Z, Kargar Bideh A, 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 Plant Pathology 46:179-187. (In Persian with English Summary).

Faulkner LR, Bower DB, Evans DW, Elgin JH (1974) Mass culturing of *Ditylenchus dipsaci* to yield large quantities of inoculum. Journal of Nematology 6:126–129.

Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K (2002) The biological action of saponins in animal systems: A Review. British Journal of Nutrition 88:587–605.

Golawska S, Leszczynski B, Oleszek W (2006) Effect of low and high-saponin lines of alfalfa on pea aphid. Journal of Insect Physiology 52:737–743.

Golawska S, Lukasik I, Wojcicka A, Sytykiewicz H (2012) Relationship between saponin content in alfalfa and aphid development. Acta Biological Cracoviensia Series Botanica 54:39-46.

Hajihassani A, Tenuta M. Gulden RH (2016) Host preference and seed borne transmission of *Ditylenchus wiescheri* and *D. dipsaci* on select pulse and non-pulse crops grown in the *Canadian prairies*. Plant Disease 100:1087-1092.

IPPC (2016) Diagnostic protocols for regulated pests, *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*, Diagnostic protocols for regulated pests. International Plant Production Convention 1-34.

Kuhnhold V, Kiewnick S, Sikora RA (2006) Development of an in vivo bioassay to identify sugar beet resistance to the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. Nematology 8:641-645.

Lamberti F, Sasnelli N, D-addabbo T, D-aloisio V, DE-cosmus P (2001) Chemical treatments and soil solarization for the control of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) on onions. Nematologia Mediterranea 29:149-152.

Madani M, Tenuta M, Chizhov VN, Subbotin SA (2015) Diagnostics of stem and bulb nematodes, *Ditylenchus weischer*i and *D. dipsaci* (Nematoda: Anguinidae), using PCR with species-specific primers. Canadian Journal of Plant Pathology 37:212–220.

Mazahery-laghab H, Yazdi-samadi B (2004) Study of the resistance of alfalfa cultivars (*Medicago sativa*) to alfalfa weevil (*Hypera postic*a Gyll.) attack under water stress conditions. Pajouhesh and Sazandegi 17:8-15. (In Persian with English Summary).

Navarro P, Giner RM, Recio M C, Manez S, Nicolas MC, Rios JL (2001) In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. Life Science 68:1199–1206.

Oleszek W, Stochmal A (2002) Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. Phytochemistry 61:165–170.

Oleszek W, Jurzsta M, Ploszyvski M, Cplquhoun IA, Price KR, Fenwick GR (1992) Zahnic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40:191–196.

Radovic J, Sokolovic D, Markovic J (2009) Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. Biotechnology in Animal Husbandry 25:465-475.

Raju K, Jagadeewary MK, Satyanarayan K, Veeranna KC, Rajeshwari YB, Nagaraj CS, Shilpa SJ (2018) Intensive cultivation of *Medicago sativa* for sustainable milk production an action oriented approach. International Journal of Livestock Research. 8:101-108.

Rosas-Hernandez L, Ramirez-Suarez A, Alcasio-Rangel S, Lopez-Buenfil JA, Mediva-Gomez E (2017) Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda: Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology. 35:377-396.

Saurabh P, Manila B, Tripathi N, Bansal YK (2015) Secondary metabolites of plants and their role: Overview. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 9:293-304.

Shany S, Gestener B, Brik Y, Bondi A, Kirson I (1972) Isolation of hederagenin and its saponin from alfalfa (*Medicago Sativa*). Israel Journal of Chemistry 10:881-884.

Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A (2015) Plant physiology and development. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland, CT.

Tava A, Avato P (2006) Chemical and biological activity of triterpene saponins from *Medicago* species. Natural Product Communication 1:1159–1180.

Ustundag O, Mazza G (2007) Saponins: Properties, applications and processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 47:231–258.

Vincken JP, Heng L, Degrot A, Gruppen H (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry 68:275–297.

Whitehead AG, Hemming JR (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology 55:25-38.

Xuehui L, Brumme EC (2012) Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. Agronomy 2:40-61.