آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۲، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۳

فرموله کردن نماتد کش استخراج شده از بذر گیاه زیتون تلخ (*Melia azedarach*) برای کنترل نماتد گره ریشه (*Meloidogyne incognita*)

عباس صلاحی اردکانی[1]✉ و بابک حیدری علیزاده[2]

۱- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کهگیلویه و بویراحمد؛ ۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

(تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۳؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۳)

چکیده

بذر گیاه زیتون تلخ (*Melia azedarach*) از استان مازندران جمع‌آوری، در دمای اطاق و سایه خشک و از آن پودر تهیه شد. عصاره‌گیری با حلال متانل در دستگاه سوکسوله انجام و سپس با حلال‌های دی‌کلرومتان-آب (۷۰:۳۰)، ترکیبات آلی از ترکیبات آبی جدا گردید. مواد همراه و امولسیفایر (Tween 85) به عصاره حاصله اضافه و فرمولاسیون ۱۱ درصد تهیه شد. تأثیر غلظت‌های مختلف (۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ درصد) فرمولاسیون، در شرایط آزمایشگاهی و در دو دوره‌ی زمانی (پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت) روی لارو سن دوم نماتد مولد گره ریشه، *Meloidogyne incognita* و غلظت‌های (۰/۱۲۵، ۰/۲۵ ، ۰/۵، ۱، ۲ و۴، درصد) در شرایط گلخانه‌ای (به مدت ۶۰ روز) روی این نماتد و صفات رویشی گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) بررسی شد. غلظت‌های ۰/۱۲۵و ۰/۲۵ در هر دو دوره‌ی زمانی تاثیری در غیر فعال سازی و مرگ و میر لارو سن دوم نماتد نداشت. میزان مرگ و میر نماتد در غلظت‌های ۴، ۸ و ۱۶ درصد، پس از ۲۴ ساعت به ترتیب صفر، ۴۴/۳ و ۷۶ درصد بود، در حالی که پس از ۴۸ ساعت، این غلظت‌ها موجب مرگ ۱۰۰ درصد لاروهای سن دوم نماتد شدند. در شرایط گلخانه‌ای تمام غلظت‌های استفاده شده سبب کاهش معنی دار (P<۰/۰۵) تعداد گال، توده تخم، تخم نماتد روی ریشه، لارو سن دوم در خاک و ریشه و جمعیت نهایی نماتد شد. تیمار ۴ درصد باعث کاهش معنی دار طول و وزن تر ساقه و ریشه گیاه گوجه فرنگی گردید. پایداری فرمولاسیون در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که این فرمولاسیون دارای پایداری مناسب است. استفاده از آفت‌کش‌های طبیعی می‌تواند روشی مناسب برای کنترل طبیعی نماتدهای مولد گره ریشه، کاهش مصرف سموم شیمیایی و تولید محصول سالم باشد.

واژه‌های کلیدی: بذر زیتون تلخ، نماتد گره ریشه، فرمولاسیون، کنترل غیرشیمیایی، گوجه فرنگی.

Preparation of a nematicidal formulation from *Melia azedarach* seed extract for controlling root knot nematodes (*Meloidogyne incognita*)

A. SALAHI ARDAKANI[1]✉ and B. HEYDARI ALIZADEH[2]

1- Agricultural and natural resources research center of Kogyloyeh Va Boyreahmad province, Yasouj, Iran. P. O. Box 351; 2- Iranian Research Institute of Plant Protection

Abstract

Mature seeds of *Melia azedarach* were harvested from north of Iran, Mazandaran province. The seeds were dried in the shade at room temperature (about 25ºC), powdered by blender. Extraction from the seeds powder was done in the Soxhlet extractor. Water soluble and Non-water-soluble components of the seed powder extract were separated by dichloromethane/water. In addition, Tween 85 was added to the extract and an 11% formulation was made from the seed extract in the laboratory. The toxicity of formulation to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, was studied in laboratory and pot experiments. Application rates of formulation were 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16 percent for the laboratory experiment in order to determine their effects on motility and mortality of second-stage juveniles (J2) after two different exposure times (24 and 48 h). In pot experiment, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 percent of the formulation were applied on nematode activity and plant growth components of tomato (*Solanum lycopersicum*). Neither J2 immobility nor mortality was observed in treatments with 0.125 and 0.25% doses. Exposure time was significantly (p<5%) affected J2 mortality. After 24 h, J2 mortality was 0.0, 44.30 and 76 % following treatment with 4, 8 and 16% formulation, respectively, while 100% J2 mortality was recorded for the same concentrations, after 48 h of exposure. In the pot experiment, all of the concentrations significantly reduced the numbers of galls, egg masses and eggs in tomato roots, J2s in soil and tomato roots and overall nematode population. Treatment of 4% of formulation was toxic to tomato plants and significantly reduced tomato root and stem length and fresh weights in comparison to control. Results of the laboratory experiments show good stability of the formulation. In general, 1 and 2% concentrations of the formulation controlled root knot nematode and improved tomato growth parameters under the laboratory conditions as compared with the control. Use of the recommended concentrations of this new formulation, could be a natural and eco friendly way to control root knot nematode and to reduce hazardous effects of chemical pesticides.

Key words: Formulation, Non chemical control, Persian lilac powder, Plant-parasitic nematode, *Solanum lycopersicum*.

✉ **Corresponding author: salahi_abbas@yahoo.com**

مقدمه

نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) دارای گستردگی جهانی بوده و ضمن کاهش شدید محصولات کشاورزی، قادرند طیف وسیعی از گیاهان را مورد حمله قرار دهند (Gill and Jain, 1995). اثرات زیان‌بار مصرف آفت کش‌های شیمیایی مانند بروز مقاومت در جمعیت آفت، آلودگی آب‌های زیرزمینی، ظهور بیماری‌های ناشناخته و ناهنجار در انسان و حیوانات، آلودگی محیط زیست، آلودگی مواد غذایی، از بین رفتن دشمنان طبیعی آفات و ماندگاری طولانی مدت، باعث گردیده که در حال حاضر یکی از اهداف نظام کشاورزی در دنیا و به خصوص ایران، کاهش مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی باشد (Tsay *et al*., 2004; Ntalli *et al*., 2010). در این راستا و برای اولین بار، Linford *et al*. (1938) اثرات نماتد کشی گیاه آناناس (*Annanas comosus* L.) را روی نماتدهای مولد گره ریشه بررسی نمودند.

بسیاری از ترکیباتی که در گیاهان تولید می‌شوند دارای اثرات آفت‌کشی هستند. استفاده از عصاره بسیاری از گیاهان که از آن‌ها می‌توان در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی سود جست، به سادگی قابل تهیه و بی‌خطر بوده، در آلودگی محیط زیست نقشی نداشته و از نظر تعادل اکولوژیکی اختلالی ایجاد نمی‌کنند (Chitwood, 2002; Isman, 2000). استفاده از حلال‌های آلی، یکی از روش‌های استخراج ترکیبات از گیاهان است. در این روش مواد گیاهی در یک حلال آلی برای مدت معین و تحت شرایط مناسب برای ترکیبات موجود در گیاه، قرار داده می‌شود، سپس از روش‌های فیزیکی برای جدا کردن ترکیبات عصاره استفاده می‌شود. ترکیبات موجود در عصاره ممکن است به وسیله تبخیر کردن حلال در روتاری جدا شود و باقیمانده به صورت روغن به دست آید. الکل‌ها مانند متانل، اتانل، هیدروکربون‌ها، به خصوص هگزان، کتون‌ها (استن) و یا هیدروکربن‌های هالوژنه و اتر در این مرحله به کار برده می‌شوند (Erskine, 2007).

در بین خانواده‌های گیاهی که خاصیت آفت‌کشی دارند، گیاهان خانواده ملیاسه به خصوص گیاهان چریش (*Azadirachta indica* L.) و زیتون تلخ (*Melia azedarach* L.) از اهمیت بسیار زیادی برخوردار هستند. نام‌های مختلف زیتون تلخ در ایران عباتند از زیتون تلخ و سنجد تلخ «در تهران و ساری»، شال پستانه «در نور»، شال زیتون «در لاهیجان»، دیوزیت «در رامسر»، و زبیل آغاجی در آستارا. زیتون تلخ درختی است با رشد سریع و دارای برگ‌های مرکب به رنگ سبز تیره، گل‌های بنفش معطر و میوه کوچک، تخم‌مرغی و سفید مایل به زرد شبیه به میوه کُنار است. بومی هیمالیا است و در شمال ایران می‌روید. در منازل نیز به عنوان درخت زینتی کاشته می‌شود (Sabeti, 1976).

تا کنون تحقیقات مختلفی روی خواص نماتد کشی زیتون تلخ در دنیا انجام شده است (Lee, 1990; Akhtar and Mahmood, 1993, 1994; Abd-Elgawad and Omer, 1995; El-Nagdi and Mansour, 2003; Cristobal-Alejo *et al*., 2006; Ntalli *et al*., 2010; Katooli *et al*., 2010; Ardakani, 2012).

تحقیقات نشان داده که خاصیت آفت کشی مشتقات گیاهان خانواده ملیاسه از جمله گیاه زیتون تلخ، به دلیل وجود ترکیبات ترپنویید خصوصاً لیمونوئیدها (Limonoids) می‌باشد. مهم‌ترین ترکیبات شناخته شده از گروه لیمونوئیدها که خاصیت آفت کشی آن ها به اثبات رسیده عبارتند از: Azadirachtin، Salannin، Nimbin و Meliantriol (Russell *et al*., 1997).

در گیاه چریش بیش از ۱۵۰ نوع ماده موثره وجود دارد. در بین این مواد، آزادیراختین A و B به عنوان حشره کش‌های بسیار قوی و نیمبین به عنوان یک ماده بسیار سمی برای نماتدها گزارش شده‌اند. در حال حاضر فرمولاسیون‌های تجاری مختلفی مانند اوزونیم، آگرونیم (نماتد کش)، نیم آزال، نیم بسیدین (حشره کش) و ... از گیاه چریش ساخته شده و در بازار قابل دسترسی هستند. اغلب این فرمولاسیون‌ها در غلظت‌های کم، بسیار سمی هستند (Kumar *et al*., 2003).

در ایران در سال ۱۳۸۹، به عنوان اولین بررسی، اثرات

کنترلی گونه بومی گیاه زیتون تلخ روی نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood آغاز و اثرات شدید نماتد کشی عصاره آبی اجزای مختلف آن به خصوص بذر این گیاه به اثبات رسید (Ardakani, 2012). گام بعدی پس از حصول این نتیجه، تهیه فرمولاسیون مناسب و تعیین اثر آن روی نماتد جهت معرفی به کشاورزان و مصرف گسترده در شرایط مزرعه بود. اهداف این تحقیق ۱- تهیه فرمولاسیون از گیاه زیتون تلخ و بررسی کارایی آن در کنترل نماتد و سهولت مصرف. ۲-تعیین درصد کشندگی فرمولاسیون روی لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* ۳- بررسی اثر کنترلی فرمولاسیون در شرایط گلخانه‌ای روی نماتد و همچنین صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی و ۴-دست یابی به یک روش کنترل غیر شیمیایی به منظور تولید محصول سالم و کاهش مصرف سموم شیمیایی، بود.

روش بررسی

تهیه مواد شیمیایی: حلال‌های شیمیایی شامل استن، متانل، اتانل، اتیل استات و دی‌کلرومتان با درجه خلوص بالا جهت استخراج عصاره گیاهی و مواد همراه شامل توین ۸۵ (Tween 85) و اسپن ۸۵ (Span 85) از شرکت مرک (Merck) خریداری گردیدند.

تهیه مواد گیاهی: در شهریور ماه، مقدار زیادی بذر گیاه زیتون تلخ ازمناطق استان مازندران جمع آوری و سپس در شرایط طبیعی و در درجه حرارت اطاق (حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک شدند. با استفاده ازآسیاب برقی، از بذور مذکور پودر تهیه گردید. از این پودرها برای عصاره گیری و تهیه فرمولاسیون استفاده شد.

مقایسه روش‌های مختلف عصاره گیری و استخراج مواد موثراز بذر گیاه زیتون تلخ:

الف- استفاده از روش تغییر یافته کلیبرگ (Kleeberg, 1990): ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم از پودر بذر زیتون تلخ داخل یک بطری یک لیتری با درپوش مناسب قرار داده شد. مقدار ۳۰۰ میلی‌لیتر آب معمولی و ۵۰ گرم امولسیفایر توین ۸۵ (Tween 85) به این پودر اضافه گردید و به مدت ۱۲ ساعت به وسیله دستگاه به هم زننده (Shaker) به هم زده شد. پس از این مرحله، مخلوط به مدت ۳ ساعت در وضعیت سکون قرار گرفت و حدود ۳۰ تا۵۰ درصد از کل حجم مخلوط در ته ظرف ته نشین گردید. این عمل با استفاده از اسپن ۸۵ (Span 85) نیز تکرار شد. آب بالای مخلوط با قیف بوخنر و پمپ خلاء جدا و رسوب باقی مانده با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب شستشو گردید. این عمل ۲ بار دیگر تکرار و در نهایت مواد نامحلول در آب، به وسیله رسوب گذاری جدا شد. فازهای آبی حاصله از سه مرحله فوق، داخل دکانتور قرار داده شد و از سه حلال آلی با قطبیت زیاد شامل اتیل استات، دی‌کلرومتان و کلروفرم به منظور استخراج مواد موثر موجود در بذر زیتون تلخ از فاز آبی، استفاده شد. فاز آبی سه مرتبه و هر بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر ازهر یک از حلال‌های آلی به طور جداگانه استخراج گردید. پس از جمع آوری و مخلوط کردن فازهای آبی همسان با یکدیگر، حلال‌ها به وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار تبخیر شدند. سه عصاره حاوی ترکیبات آلی باقیمانده، اتیل استات، دی کلرو متان و کلروفرم در ته ظرف جمع شدندکه با وزن کردن هر یک از این سه ظرف، مقدار مواد آلی موجود در فاز آبی ثبت شد (Kleeberg, 1990).

ب- استفاده از حلال‌های هگزان و متانل: به این منظور از روش تغییر یافته Thejavathi *et al.* (1995) استفاده شد. بر اساس این روش، مقدار۵۰ گرم از پودر زیتون تلخ داخل یک ظرف ۱ لیتری ریخته و مقدار ۲۰۰ میلی لیتر متانل به آن اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۲ ساعت بوسیله دستگاه به هم زن، به هم زده شد. پس از اینکه ظرف حاوی نمونه به مدت یک ساعت بی‌حرکت ماند، حلال متانل با قیف بوخنر در فشار کم صاف گردید و رسوبات باقیمانده به ظرف یک لیتری برگردانده شد. این عمل با ۲۰۰ میلی‌لیتر متانل و برای ۳ مرتبه تکرارشد. عصاره متانلی حاصل از چهار بار استخراج، جمع‌آوری و به داخل دکانتور منتقل و با ۵۰ میلی‌لیتر هگزان

(به منظور جداسازی روغن) شستشو داده شد. سپس متانل موجود در آن بوسیله دستگاه روتاری در فشار کم جدا گردید. مقدار مواد آلی باقیمانده در عصاره ثبت شد (Thejavathi *et al*., 1995).

ج- استخراج با متانل در دمای محیط: در این روش عمل استخراج در دمای محیط صورت گرفت که سبب جلوگیری از تخریب مقداری از ترکیباتی که به دمای بالا حساس هستند، می‌شود. در این روش ابتدا مقدار۵۰۰ گرم از پودر بذر زیتون تلخ داخل ظرف ۵ لیتری حاوی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر متانل ریخته شد و برای مدت ٤٨ ساعت در دمای اطاق و در حالت سکون نگهداری شد. پس از جدا سازی متانل از عصاره به کمک دستگاه تبخیر کننده دوار، متانل بازیافتی دوباره به دستگاه اضافه و این عمل دوباره تکرار شد. مقدار عصاره جمع شده نسبتا بهتر از روش‌های قبلی بود. پس از تکمیل شدن عصاره‌گیری با دستگاه تبخیر کننده دوار، عصاره‌های استخراج شده با حلال متانل، با یکدیگر مخلوط شدند و سپس متانل اضافی در دستگاه تبخیر کننده دوار تبخیر گردید. عصاره غلیظ شده را که به صورت روغنی بود در ۱۵۰ میلی‌لیتر حلال اتیل استات حل کرده و به داخل دکانتور یک لیتری انتقال داده شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه کرده و به مدت ۳ دقیقه دو فاز آلی و آبی خوب به هم زده شد. پس از ساکن ماندن دکانتور به مدت کافی، دو فاز از یکدیگر جدا شدند. محلول آبی را از دکانتور جداکرده و برای مرتبه دوم به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه کرده و طبق همین روش فاز آلی را با آب شستشو داده و در انتها فاز آبی از فاز آلی جدا شد. فاز آلی را در داخل ظرف ارلن حاوی ۱ گرم پودر سولفات سدیم ریخته و آن را برای مدت یک شبانه روز در دمای محیط (آزمایشگاه) قرار دادیم. محلول عصاره آب گیری شده را بوسیله سلیت صاف کرده و حلال آن با دستگاه روتاری فلش جدا گردید. ترکیب باقی مانده به وسیله ستون کروماتوگرافی به صورت شستشوی سریع در ستون که حاوی کربن فعال است شستشو داده و مقدار عصاره خالص به دست آمده در این روش، به کمک کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) ثبت گردید (Joymati and Sobita, 2009).

د- انتخاب امولسیفایر: پس از تهیه عصاره، نسبت به انتخاب نوع امولسیفایر اقدام شد (Breuer, 2006). بر اساس اطلاعات ثبت شده در جدول ۱، از مقادیر مختلف دو امولسیفایر (Tween 85 و Span 85) استفاده شد. با آزمایش ۱۰ نمونه از مخلوط دو امولسیفایر، پایدارترین امولسیون کننده مشخص گردید.

تهیه فرمولاسیون از عصاره زیتون تلخ: عصاره حاصله که دارای مخلوطی از ترکیبات مختلف است با مواد همراه زیر فرموله گردید (شکل-۲):

الف) عصاره زیتون تلخ ۱۰٪

ب) مخلوط امولسیفایرها ۵٪ شامل Tween و Span

ج) آب ۸۵ درصد

بررسی پایداری فرمولاسیون: بررسی پایداری فرمولاسیون از لحاظ رنگ، شفافیت و پایداری و سایر تست‌های لازم در آزمایشگاه انجام شد. پایداری فرمولاسیون در زمان‌های ۰/۵، ۲، ٢٤ و ۲۵ ساعت بررسی شد. برای این منظور، امولسیون‌های تولید شده در محیط آزمایشگاهی و درجه حرارت اطاق قرار داده شد و وضعیت آن‌ها از نظر کریمینگ (creaming) و رسوب (sediment) بررسی گردید (FAO. 2006).

خالص سازی وتکثیر نماتد عامل بیماری: یک توده تخم از نماتد ماده و بالغ *Meloidogyne incognita* که قبلاً شناسایی گردیده بود (Eisenback, 1985) انتخاب گردید. این توده تخم را درون پتری دیش حاوی آب مقطر قرار داده تا نماتدهای سن دوم از آن‌ها خارج شوند. این نماتدها را به خاک اطراف ریشه ۴ بوته گوجه فرنگی که در گلدان‌های حاوی خاک استریل کاشت شده بودند، اضافه نمودیم. پس از گذشت ۶۰ روز، این بوته‌ها از خاک خارج و از توده‌های تخم تشکیل شده روی آن‌ها برای انجام آزمایش‌ها استفاده گردید. عمل تکثیر نماتد به دفعات مکرر و روی ریشه تعداد زیادی

از گیاه گوجه‌فرنگی انجام تا جمعیت لازم از نماتد برای انجام آزمایش‌ها وجود داشته باشد (Ardakani, *et al*., 2009).

بررسی تاثیر فرمولاسیون روی نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاهی: غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ ، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ درصد از فرمولاسیون به همراه ۲۰۰ عدد لارو سن دوم نماتد که به تازگی از تخم خارج شده بودند، در ظروف پتری با قطر ۵ سانتی‌متر ریخته شد. برای هر کدام از درصدهای فوق، ۶ تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح آماری کاملا تصادفی انجام گردید.

پس از ۲۴ ساعت، سه تکرار از هر تیمار و پس از ۴۸ ساعت سه تکرار باقی مانده از هر تیمار با استفاده از میکروسکوپ دو چشمی مورد بررسی قرار گرفته و تعداد نماتدهایی که غیر فعال و بی حرکت شده بودند، به تفکیک هر تیمار، شمارش شدند. برای این عمل تعداد ۱۰۰ عدد نماتد در هر ظرف پتری شمارش شده تا بتوان آمار مربوطه را بر حسب درصد ثبت نمود. پس از شمارش نماتدها و ثبت تعداد نماتدهای غیر متحرک در هر تیمار، غلظت و تکرارهای آن، نماتدها را به همان ترتیب به ظروف پتری حاوی آب مقطر منتقل نموده و پس از ۲۴ ساعت در دمای اطاق مجدداً شمارش شدند. عمل انتقال نماتدها به آب مقطر به منظور تفکیک و شمارش نماتدهای غیر فعال از نماتدهای مرده بود. زیرا نماتدهای غیر فعال، پس از قرار گرفتن در آب مقطر واز بین رفتن محیط سمی ناشی از فراورده های گیاهی، مجدداً فعال ومتحرک می‌گردند اما نماتدهای مرده تحرکی نخواهند داشت.

بررسی تاثیر فرمولاسیون روی نماتد *M. incognita* در شرایط گلخانه‌ای:

تهیه خاک: ابتدا مخلوطی از خاک رس، ماسه بادی و کود حیوانی پوسیده و به ترتیب به نسبت ۵-۲-۱ تهیه و سپس با استفاده از اتوکلاو و بخار آب، در فشار ۱۲۰ پوند بر اینچ مربع به مدت ۳۰ دقیقه ، کاملاً ضد عفونی شدند. از این مخلوط برای کاشت گوجه فرنگی در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۲۰ سانتی‌متر استفاده گردید.

تهیه نشاء گوجه فرنگی: بذر گیاه گوجه فرنگی رقم اورباتا از بازار تهیه و در ظروف فیبری و سترون مخصوص تهیه نشا، که حاوی پیت مس ضد عفونی شده بودند، کاشت شدند. زمانی که نشا ها به سن ۲ هفتگی رسیدند، از آن‌ها جهت انجام آزمایش در شرایط گلدانی استفاده شد.

نشاء گوجه، اضافه نمودن مواد گیاهی و نماتد در گلدان ها: مقدار ۱ کیلوگرم خاک سترون در هر گلدان ریخته شد. تحقیق درشرایط گلخانه‌ای، با اضافه نمودن فرمولاسیون گیاهی در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ ، ۰/۵، ۱، ۲ و۴، درصد (میلی‌لیتر فرمولاسیون به ازای هر ۱۰۰ گرم خاک) و تعداد ۳ عدد لارو سن دوم نماتد به ازای هر گرم خاک یک هفته قبل از نشای گوجه فرنگی و سپس نشای گوجه فرنگی انجام شد. این آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت (Duncan, 1955).

آماربرداری و ثبت نتایج: شصت روز پس از نشا گوجه و اضافه نمودن نماتد و درصدهای مختلف فرمولاسیون در گلدان‌ها، بوته‌های گوجه فرنگی از خاک خارج و نسبت به ثبت اطلاعات شامل تعداد گال، تعداد توده تخم، تعداد تخم و تعداد نماتد موجود در هر گرم ریشه، تعداد نماتد موجود در هر گرم خاک، جمعیت نهایی نماتد در خاک و ریشه هر گلدان و صفات رویشی گیاه شامل طول و وزن تر ریشه و ساقه، اقدام گردید. بر اساس روش‌های معرفی شده توسط Southey, (1986) ، جداسازی و شمارش نماتد از خاک به روش تغییر یافته الک و قیف برمن انجام گرفت. برای شمارش جمعیت ماده بالغ و لارو سن دوم نماتد در ریشه، مقدار یک گرم ریشه با محلول رنگی اسید فوشین-لاکتوفنل رنگ‌آمیزی و مستقیما در زیر بینو کولر شمارش شد.

نتیجه و بحث

مقایسه روش‌های مختلف عصاره گیری و استخراج مواد موثراز بذر گیاه زیتون تلخ: با استفاده از روش استخراج

تغییر یافته کلیبرگ، مقدار ناچیزی از مواد آلی در فاز آبی وجود داشت. بنابراین، این روش، روش قابل قبولی برای جداکردن ترکیبات فعال زیتون تلخ از پودر بذر نبود. مواد آلی باقیمانده در عصاره حاصله از به کار گیری روش تجاوتی و همکاران نیز کم بود. در بین سه روش مورد بررسی، بهترین روش، روش استخراج با متانل در دمای محیط بود. در این روش ۱۰۰ گرم عصاره از ۵۰۰ گرم بذر زیتون تلخ به دست آمد که نسبت به دو روش قبلی بسیار بیشتر بود. در روش اول مقدار عصاره ناچیز و در روش دوم حدود ۵ گرم از ۵۰ گرم نمونه بدست آمد. در روش سوم ۱۰۰ گرم از ۵۰۰ گرم نمونه بدست آمد.

انتخاب امولسیفایر و آزمون پایداری فرمولاسیون (Breuer, 2006): مقادیر ضریب تعادل چربی دوستی- آب دوستی (Hydrophilic lipophilic Balance; HLB) از ۳/٦ تا۱۱ متغیر بود (جدول ۱). در نمونه ۱ با بیشترین HLB، تنها از Tween 85 استفاده شد و در نمونه‌های بعدی مقدار امولسیفایر Tween 85 کاهش و در عوض مقدار امولسیفایر Span 85 افزایش یافت. هرچه مقادیر Span 85 اضافه شد، مقدار HLB کاهش پیدا کرد. نتایج آزمایش پایداری امولسیون که در مرحله بعد انجام شد (FAO. 2006)، نشان داد که نمونه امولسیفایر Tween 85 نیز دارای پایداری بیشتری نسبت به Span 85 است. نتایج پایداری امولسیون نمونه‌ها در جدول ۲ ثبت شده است. بیشتر نمونه‌ها در زمان ۳۰ دقیقه، از نظر ظاهری محلولی شیری رنگ و یکنواخت بودند. نمونه‌های ۱ تا ٤ هیچ گونه نشانه‌ای از چربی زدایی (تجمع چربی در سطح نمونه) نداشتند ولی از نمونه ۵ تا ۱۰، در سطح نمونه‌ها مقداری تجمع چربی شکل گرفت. پس از دو ساعت شکل ظاهری نمونه‌ها تغییر کمی داشت اما نمونه‌های ۱ تا ٤ بدون چربی زدایی و بقیه دارای چربی زدایی بودند. پس از ۲٤ ساعت، در نمونه‌های شماره دو تا ۱۰ چربی زدایی شکل گرفت و تنها نمونه شماره ۱ بدون چربی زدایی باقی ماند. در تیمار ۲۵ ساعت، نمونه‌های ۱ تا ۳ داری شکل یکنواخت ولی بقیه نمونه‌ها دارای چربی زدایی بودند.

تأثیر فرمولاسیون روی نماتد در شرایط آزمایشگاهی: در هر دو دوره‌ی زمانی ۲٤ و ٤۸ ساعت، هیچ نوع عدم تحرک و مرگ ومیر لارو سن دوم نماتد در غلظت‌های ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ درصد از فرمولاسیون مشاهده نگردید. هر چند که در دوره‌ی زمانی ۲۴ ساعت، میزان غیر متحرک سازی نماتد در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، و ۱۶ درصد از ۱۶/۵۷ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود، پس از قرار دادن این لاروها در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت، تمام لاروهای تیمار شده با غلظت های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ به حالت طبیعی و تحرک خود برگشته و هیچ نوع مرگ و میری در بین آن ها مشاهده نشد.

جدول ۱- مقایسه اثر مقادیر مختلف دو امولسیفایر (Tween 85 و Span 85) روی پایداری فرمولاسیون ساخته شده از بذر گیاه زیتون تلخ

Table 1. Comparison between the effects of different amounts of two emulsifiers (Tween 85 and Span 85) on stability of *Melia azedarach* formulation

شماره نمونه No.	نوع امولسیفایر Types of emulsifiers		مقادیر ضریب تعادل چربی دوستی- آب دوستی (HLB) Hydrophilic lipophilic Balance (from Atlas Chemie)
	توین ۸۵ (گرم) Tween 85 (g)	اسپن ۸۵ (گرم) Span 85 (g)	
1	100	-	11
2	87	13	9.8
3	68	32	8.1
4	50	50	6.4
5	45	55	5.9
6	40	60	5.5
7	35	65	5.0
8	30	70	4.6
9	25	75	4.1
10	20	80	3.6

جدول ۲- نتایج بررسی وضعیت پایداری امولسیون‌های ساخته شده از بذر گیاه زیتون تلخ در زمان های مختلف

Table 2. Stability of *Melia azedarach* formulation at different times

شماره نمونه No.	زمان Time (h) 0.5	2	24	25	نتیجه Results
1	nc	nc	nc	nc**	Accepted
2	nc	nc	nc	nc	Accepted
3	nc	nc	c*	nc	Non accepted
4	nc	nc	c	c	Non accepted
5	c	c	c	c	Non accepted
6	c	c	c	c	Non accepted
7	c	c	c	c	Non accepted
8	c	c	c	c	Non accepted
9	c	c	c	c	Non accepted
10	c	c	c	c	Non accepted

کریمینگ =c*؛ عدم کریمینگ: =nc**

*c=creaming, **nc= no creaming

در دوره زمانی ۲۴ ساعت، فقط ۴۴/۰۳ و ۷۵/۸۸ درصد مرگ لاروهای سن دوم نماتد به ترتیب در تیمارهای ۸ و ۱۶ درصد با اختلاف معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) به ثبت رسید. بیشترین میزان نماتدکشی (۱۰۰ درصد)، پس از ٤۸ ساعت، متعلق به تیمارهای ۴، ۸ و ۱۶ درصد بود. در تیمار ۲ درصد، میزان مرگ و میر نماتد پس از ٤۸ ساعت معادل ۳۹/۵۷ درصد و در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد، صفر به ثبت رسید (جدول ۳).

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین دوره‌های زمانی استفاده شده روی مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد در این تحقیق است. اما اثر زمان روی غیر فعال سازی نماتد معنی دار نبود. مقایسه اثرات انفرادی و متقابل زمان‌ها و تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که اثرات متقابل زمان و تیمار روی غیر فعال سازی نماتد از نظر آماری غیر معنی‌دار ولی روی مرگ و میر نماتد معنی‌دار بود.

تأثیر فرمولاسیون روی نماتد و صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای: بر اساس نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون زیتون تلخ روی نماتد *M. incognita* و صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی، از نظر آماری (P<۰/۰۵) معنی‌دار بوده است.

نتایج ثبت شده در جدول ٤ نشان دهنده اثر معنی‌دار (P<۰/۰۵) و مثبت تیمار ۲ درصد از فرمولاسیون، روی رشد طولی ریشه گیاه گوجه فرنگی (۳٤ سانتی‌متر) در مقایسه با سایر تیمارها و تیمار شاهد بدون نماتد و فرمولاسیون (۲۵ سانتی‌متر) بود. طول ریشه در تیمار شاهدی که فقط از نماتد استفاده شده بود، ۲۳ سانتی‌متر به ثبت رسید. در خصوص سایر صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی (طول ساقه و وزن تر ریشه و ساقه)، این نتایج نشان دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای استفاده شده از فرمولاسیون (به جز تیمار ٤ درصد)، روی این صفات بود. تیمار ٤ درصد فرمولاسیون باعث کاهش معنی‌دار کلیه صفات رویشی مورد بررسی در گیاه گوجه فرنگی در مقایسه با شاهد (تیمار بدون نماتد و فرمولاسیون) گردید. اثر این تیمار با تیمار شاهد (فقط نماتد) روی صفات مذکور، مشابه بود و در یک سطح آماری قرار گرفتند.

به طور کلی، با افزایش غلظت فرمولاسیون، مقدار کنترل نماتد و اثرات منفی آن روی صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی افزایش یافت. تمام تیمارهای استفاده شده از فرمولاسیون زیتون تلخ باعث کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) تعداد گال، تعداد توده تخم، تعداد تخم و تعداد لارو نماتد در ۱ گرم ریشه، تعداد لارو نماتد در ۱۰۰ گرم خاک و جمعیت نهایی نماتد در مقایسه با شاهد آلوده به نماتد شدند. تیمار ٤ درصد بیشترین تأثیر را روی کاهش این صفات داشت و اختلاف آن با سایر تیمارها از نظر آماری معنی دار بود. در حالی که همین تیمار باعث کاهش معنی‌دار صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی گردید. تاثیر تیمارهای ۱ و ۲ درصد از فرمولاسیون روی صفات مربوط به نماتد مشابه و بین آن‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید، اما این دو تیمار تاثیر معنی داری روی افزایش صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی در

مقایسه با شاهد (فقط نماتد) و سایر تیمارها از خود نشان دادند. مقایسه بین دو تیمار شاهد بدون نماتد و شاهد با نماتد، نشان داد که نماتد مولد گره ریشه (*M. incognita*) قادر است ۸ درصد طول ریشه، ۲۴/۰۵ درصد طول ساقه، ۲۳/۲۵ درصد وزن تر ریشه و ۲۶/۲۰ درصد وزن تر ساقه در گیاه گوجه فرنگی را کاهش دهد.

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون زیتون تلخ و زمان روی مرگ ومیر و غیر فعال سازی نماتد گره ریشه (*M .incognita*) در شرایط آزمایشگاهی

Table 3. Effects of different concentrations of *Melia azedarach* formulation and different time intervals on the immobility and mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*

تیمار Treatment	غیرمتحرک سازی Immobility		مرگ و میر Mortality	
	24 h	48 h	24 h	48 h
شاهد (آب مقطر) Control (Distilled water)	0.00d	0.00d	0.00c	0.00c
0.125 %	0.00d	0.00d	0.00c	0.00c
0.25%	0.00d	0.00d	0.00c	0.00c
0.50%	16.57c	19.97c	0.00c	0.00c
1%	54.61b	63.66b	0.00c	0.00c
2%	90.70a	99.33a	0.00c	39.57b
4%	100.00a	100.00a	0.00c	100.00a
8%	100.00a	100.00a	44.03b	100.00a
16%	100.00a	100.00a	75.88a	100.00a

اعداد ثبت شده در جدول، میانگین ۳ تکرار بوده و حروف مشابه در هرستون نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار از نظر آماری و در سطح ۵٪ می‌باشد.

*Data are means of 3 replicates. Data followed in each column by the same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05).

ساخت فرمولاسیون: از بین سه روش به کار گرفته شده برای عصاره‌گیری و استخراج مواد موثر از بذر گیاه زیتون تلخ (روش‌های تغییر یافته کلیبرگ، تجاواتی و همکاران و استخراج با متانل در دمای محیط)، روش استخراج با متانل در دمای محیط به عنوان بهترین روش در این تحقیق شناخته شد.

در استخراج ماده فعال عصاره زیتون تلخ با آب و به روش کلیبرگ، حداقل باید یکی از مواد کمکی شامل: *p*-t-octylphenol-7,5-glycolether; *p*-t-octylphenol-8,10-glycolether; oleicacidamide-heptaglycolether; dodecanol heptaglycolether; *p*-iso-nonylphenoldecaglycolether

قابل دسترسی باشد، اما به دلیل عدم دسترسی به این مواد شیمیایی در داخل کشور، تهیه فرمولاسیون عصاره آبی زیتون تلخ ممکن نشد. چنانچه امکان تهیه یکی از این مواد همراه، در کشور وجود داشته باشد، تهیه فرمولاسیون آبی بسیار اقتصادی خواهد بود. زیرا درصد حلالیت آزادیراختین در آب، که ماده موثر شناخته شده در گیاهان خانواده ملیاسه به خصوص زیتون تلخ و چریش است، بسیار زیاد بوده و بنابراین آب می‌تواند حلال مناسبی برای استخراج آن باشد.

استفاده از سیستم مخلوط حلال هگزان/ متانل، تنها برای ترکیباتی که دارای درصد روغن بالا باشند، مانند استخراج مواد قطبی و غیر قطبی از دانه چریش، می تواند مورد استفاده قرار گیرد (Thejavathi *et al.*, 1995).

در روش استفاده از حلال متانل برای عصاره گیری از پودر بذر زیتون تلخ، متانل به عنوان حلال استخراج دارای قدرت مؤثرتری نسبت به سایر حلال‌های آلی از قبیل دی کلرومتان یا استن است و به‌کار بردن آن در دستگاه سوکسله همراه با رفلاکس حلال و یا روتاری، قدرت عصاره‌گیری موثرتری دارد. در این روش، پس از قرار دادن پودر بذر زیتون تلخ در متانل (به مدت ٤٨ ساعت)، باقیمانده آن کاملاً خشک و عاری از هرگونه بوی زیتون تلخ بود. بنابراین این سیستم حلال بسیار موثر است. Joymati and Sobita (2009) در سال ۲۰۰۹ تاثیر مثبت عصاره کلروفورمی- متانلی گیاه *M. azedarach* را بر مرگ و میر لارو سن دوم و تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاهی گزارش نموده‌اند. صلاحی اردکانی نیز گزارش نموده که در بین اجزای مختلف گیاه زیتون تلخ، عصاره آبی بذر زیتون تلخ بیشترین تاثیر را روی کنترل نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای دارد (Ardakani, 2012).

جدول ۴- نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون زیتون تلخ روی نماتد *Meloidogyne incognita* و صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی ۶۰ روز پس از مایه زنی

Table 4. Effects of different concentrations of *Meli azedarach* formulation on *Meloidogyne incognita* and growth components of tomato plants, 60 days after inoculation

تیمار Treatments	طول ریشه (سانتی‌متر) Tomato root length (cm)	طول ساقه (سانتی‌متر) Tomato stem length (cm)	وزن تر ریشه (گرم) Tomato root fresh weight (g)	وزن ترساقه (گرم) Tomato shoot fresh weight (g)	تعداد گال/ ۱g ریشه Galls/g of root	تعداد توده تخم/g۱ریشه Egg masses/g of root	تعداد تخم ۱g/ ریشه Eggs/g of root	تعداد لارو در ۱ گرم ریشه J2/g of root	تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک J2/ 100 g of soil	جمعیت نهایی نماتد Total nematode population
Control (no nematode no formulation)	25.00b*	61.00a	18.50a	71.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
Control (only nematode)	23.00bc	46.33c	13.83bc	52.40b	57.00f	31.00e	12170e	192.66d	233.66e	182000c
0.125 %	23.33bc	55.00ab	16.90ab	69.43a	33.00e	14.00d	5047d	36.33c	106.00d	87320b
0.25%	21.00c	51.00bc	13.00c	68.90a	27.00de	10.00cd	3403cd	25.33bc	90.33cd	45690ab
0.50%	23.00bc	51.66bc	13.70bc	69.00a	22.00d	8.00bc	2843bc	19.66bc	77.66c	40110ab
1%	24.00b	51.00bc	16.26abc	68.20a	11.00c	4.00ab	1527ab	8.66ab	44.00b	25280000ab
2%	34.00a	53.00bc	17.50ab	66.66a	10.00bc	4.00ab	1257ab	8.33ab	43.33b	22740ab
4%	21.00c	47.00c	4.70d	24.60b	4.00ab	1.00a	323.33a	1.33a	2.33a	1556a

*Data are means of 3 replicates. Data followed in each column by the same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05).

با توجه به این که در دستگاه سوکسله از حرارت استفاده می‌شود و این حرارت سبب از بین رفتن مقداری از ترکیبات موثر خواهد شد، استفاده از سیستم روتاری که در آن از حرارت استفاده نمی‌شود و ترکیبات موثر در معرض دما آزمایشگاه هستند، بسیار مفید بوده و باعث افزایش طول عمر مواد موثر می‌شود.

استفاده از حرارت در جداسازی ترکیبات با حلال‌ها در روش‌های تقطیر با بخار و عصاره‌گیری با حلال بسیار مهم است. برای مثال ترکیبات polygodial در اثر حرارت به ایزومر غیر فعال تبدیل می‌شود. همچنین این ترکیب می‌تواند در دمای بالا با سایر ترکیبات واکنش دهد. این محدودیت در عدم استفاده از حرارت در این دو روش استخراج گیاهی، از معایب آن است. استفاده از حلال‌هایی که دارای نقطه جوش پائین هستند، مثل هیدروکربون‌های فلئور، برای استخراج ترکیبات گیاهی در حداقل حرارت ممکن، مناسب باشد. هر چند که این حلال‌ها اغلب با محیط زیست سازگار نیستند. به علاوه بسیاری از حلال‌های هیدروکربون‌های فلئور برای لایه اوزون نیز مضر و یا دارای اثر قوی گازهای گلخانه‌ای هستند. استفاده از حلال‌های دیگر مانند پلی‌اتیلن گلیکول، سورفکتنت‌های هیدروفیلیک، الکل و آب بسیار موثر است (Erskin, 2007).

یکی دیگر از مشکلات موجود در فرآیند خالص سازی عصاره، خارج کردن مواد رنگی از پودر بذر زیتون تلخ است. بر اساس روش Thejavathi *et al.* (1995)، استفاده از حلال غیر قطبی هگزان برای این منظور مناسب نبود. در تحقیق حاضر، عصاره‌ی غلیظ قهوه‌ای رنگ به دست آمده از پودر بذر زیتون تلخ، سه مرتبه با هگزان شستشو داده شد، اما اکثر مواد در این فاز غیر قطبی، نیز محلول بوده و از ترکیب عصاره جدا شدند.

سایر شرایطی مهمی که در مرحله استخراج باید رعایت شوند عبارتند از:

۱- مراحل تصفیه و جداسازی بایستی پی در پی و بدون وقفه بوده و از نگهداری عصاره‌ی خام برای مدت طولانی در دمای محیط خودداری گردد.

۲- استفاده از دمای بالا در آون (۶۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد) برای مراحل تبخیر حلال و استخراج توصیه نمی‌گردد و بهترین روش برای تبخیر، استفاده از دستگاه تبخیر کننده دوار در دمای ۴۰ درجه سلسیوس است.

۳- در تهیه عصاره پودر زیتون تلخ، از ستون کروماتوگرافی برای خالص سازی استفاده نشد ولی ممکن است با استفاده از این روش بتوان عصاره خالص‌تر بدون

رنگدانه بدست آورد که می تواند در تهیه فرمولاسیون پایدار از عصاره تغلیظ شده بسیار مؤثر باشد.

نتایج آزمایش‌های صورت گرفته برای بررسی پایداری فرمولاسیون با استفاده از امولسیون کننده‌های Tween 85 و Span 85 نشان داد که Tween 85 مناسبتر از Span 85 است. برای ایجاد پایداری و تهیه فرمولاسیون مناسب جهت محلول پاشی، ترکیباتی از قبیل روغن های طبیعی و مواد همراه (Tween 85 و Span 85) به عصاره‌ها اضافه می‌گردد. برای مثال روغن فرار عصاره گیاهی *Foeniculun vulgare* به صورت امولسیون ۰/۰۱ با امولسیوفایر Tween با پایه آب تهیه شد و این محلول در مبارزه با حشرات اثر خوبی از خود نشان داد (Tripathi, 2003). در تحقیقات دیگری فرمولاسیونی از عصاره قارچ *Sacchromyces cervisiae*، کلسیم، گلوکوهیتونیت و سایر مواد همراه مانندکائولین تولید شد (Brower, 2007). همچنین Hughes (2009)، یک نمونه حشره کش طبیعی را فرموله نمود که دارای نسبت معین از روغن نارگیل و روغن فرار بود. نتایج نشان داد که این فرمولاسیون دارای توانایی مناسب در دفع حشرات به نسبت ۱/۳٦٪ – ۱/۷٤٪ روغن است.

کارآیی فرمولاسیون در کنترل نماتد مولد گره ریشه: به طور کلی، تأثیر فرمولاسیون ساخته شده از بذر گیاه زیتون تلخ روی نماتد مولد گره ریشه در شرایط آزمایشگاهی، کمتر از شرایط گلدانی بود. در شرایط گلدانی، این امر می‌تواند به دلیل تماس مداوم و طولانی مدت فرمولاسیون با نماتدهایی که به تدریج از تخم خارج می‌شوند، باشد.

نتایج حاصله از بررسی تأثیرات فرمولاسیون بذر گیاه زیتون تلخ روی غیر فعال سازی و مرگ و میر نماتد مولد گره ریشه در شرایط آزمایشگاهی و پس از ۲٤ ساعت، نشان داد که اغلب نماتدهایی که در اثر تماس با فرمولاسیون گیاهی غیرمتحرک شده بودند، پس از انتقال به آب تازه و خارج کردن آن‌ها از محیط سمی ناشی از فرمولاسیون، مجدداً فعال و متحرک شدند. این نتیجه بیانگر تأثیر شدید ترکیبات درون بذر گیاه زیتون تلخ روی غیرفعال کردن نماتد است، که صرف نظر از تاثیر کشندگی آن‌ها، اثر بسیار زیادی در کنترل نماتد و در نتیجه کاهش خسارت ناشی از حمله نماتد خواهد داشت. به هر حال، رابطه مستقیم بین افزایش معنی‌دار میزان مرگ و میر لارو سن دوم نماتد در شرایط آزمایشگاهی، با افزایش زمان تماس نماتد با فرمولاسیون (٤۸ ساعت)، نیز تأیید کننده این واقعییت بود که هر چه مدت زمان تماس نماتد با فرمولاسیون افزایش یابد، اثر کشندگی فرمولاسیون نسبت به اثر غیر فعال‌سازی آن روی نماتد بسیار بیشتر خواهد بود.

در بررسی حاضر، با افزایش میزان در صد فرمولاسیون مصرفی، میزان مرگ و میر نماتد به شدت افزایش و علایم بیماری روی گیاه گوجه فرنگی کاهش یافت. این نتایج با نتایجی که توسط سایر محققین (Lee,1990; Hosseininejad, 2004; Cristobal-Alejo *et al*., 2006; Katooli *et al*., 2010; Ardakani, 2012) به دست آمده مطابقت دارد.

نتالی و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که غلظت‌های بیشتر از ۰/۰۸ ٪ از عصاره متانلی زیتون تلخ، خاصیت نماتد کشی داشتند. اما غلظت‌های کمتر آن باعث غیرفعال سازی نماتد شدند. آن‌ها همچنین اعلام کردند که در شرایط گلخانه‌ای، غلظت‌های بالاتر از ۲/۵ ٪، نماتد *M. incognita* را به طور کامل کنترل کرد (Ntalli *et al*., 2010).

نتایج تحقیق حاضر و در شرایط گلخانه‌ای نشان داد که بیشترین تاثیر نماتد کشی مربوط به غلظت ٤ درصد از فرمولاسیون زیتون تلخ بود. اما به دلیل بروز اثرات منفی و بازدارندگی این غلظت روی صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی، استفاده از این غلظت در شرایط مزرعه توصیه نمی‌شود. با توجه به تأثیر مثبت و معنی‌دار تیمارهای ۱ و ۲ درصد از فرمولاسیون، روی کنترل نماتد و همچنین افزایش صفات رویشی گیاه گوجه فرنگی در مقایسه با شاهد (فقط نماتد) و سایر تیمارها و از طرف دیگر، عدم وجود اختلاف معنی بین این دو تیمار، استفاده از غلظت ۱ درصد فرمولاسیون در شرایط مزرعه توصیه می‌شود.

یکی از مهم‌ترین مزایای استفاده از فرمولاسیون‌های

محلول در آب، بـه خصـوص در کشـت‌هـایی کـه از مخـازن بزرگ آبی و یا سیستم‌هـای آبیـاری تحـت فشـار در گلخانـه استفاده می‌کنند، این است که بـه راحتـی و بـر اسـاس حجـم مخزن آب، می‌توان مقدار توصیه شده از آن را وارد مخزن آب نمود. در این صورت، مواد کنترل کننده نماتـد بـه تـدریج در اختیار گیاه قرار خواهد گرفت. اما در سیستم های زراعـی بـاز مانند مزارع سیب زمینی و ... مصرف این نوع فرمولاسـیون در خاک برای کنترل نماتد مشکل بـوده و تـلاش بـرای سـاختن فرمولاسیون گرانوله از بذر این گیاه می بایست در دستور کـار قرار بگیرد. شـرایط اقلیمـی کشـور مـا مناسـب کشـت انـواع درختان از جمله درخت زیتون تلخ اسـت و در حـال حاضـر این گیاه در اکثر شهرهای کشور به عنوان فضـای سـبز توسـط شهرداری‌ها کاشت شده و سازگاری خوبی نیز از خـود نشـان داده است (مشاهدات نگارنـده). در سـال ۱۳۹۱ تعـداد ۳۰۰۰ اصله نهال زیتون تلخ در ایستگاه‌هـای تحقیقـات کشـاورزی و منابع طبیعی یاسوج (سردسیری) و امـامزاده جعفـر گچسـاران (گرمسیری) در استان کهگیلویه و بویراحمد کاشت شدند. این گیاه سازگاری و رویش بسیار خوبی در هر دو شرایط مـذکور از خود نشان داد. در صورت افزایش سـطح زیـر کشـت ایـن درخت در کشور، می‌توان با تهیه فرمولاسیون، سموم طبیعی با منشاء گیاهی تولید نمود و از آن برای کنترل نماتد گره ریشـه و جایگزین شدن روش غیر شیمیایی کنترل به جای روش‌های خطرناک شیمیایی استفاده نمود. هرچند که این گیـاه در حـال حاضر در استان‌های شمالی و حاشیه دریای خزر بـه فراوانـی وجود دارد و از بذر آن استفاده ای نمی‌شود. نیاز آبـی کـم در این گیاه، سازگاری با شرایط اقلیمی متفاوت، سـهولت تهیـه و مصرف فرمولاسیون و کاهش هزینه و زمـان کنتـرل نماتـد، از دیگر مزایای استفاده از این گیاه اسـت. بـه هـر حـال احتمـال امکان کنترل سایر عوامل زنـده خسـارت‌زا در گیاهـان، ماننـد قارچ‌ها و باکتری‌های مضر گیاهی با ایـن فرمولاسـیون وجـود داشته و در این زمینه نیاز به تحقیقات گسترده‌ای می‌باشد.

References

ABD-ELGAWAD, M. M. and E. A. OMER, 1995. Effect of essential oils of some medicinal plants on phytonematodes. Anzeiger Schadlingskunde, 68: 82-84.

AKHTAR, M. and I. MAHMOOD, 1994. Prophylactic and therapeutic use of oil cakes and leaves of neem and castor extracts for control of root-knot nematode on chilli. Nematolgica Mediteranea, 22:127-129.

ARDAKANI, A. S. 2012. Effects of *melia azedarach* on *Meloidogyne incognita in vitro* and *in vivo* conditions. Nematlogia Mediterranea, 40: 55-60.

ARDAKANI, A. S., H. S. GAUR, A. KAMRA and S. MOHAN, 2009. Impact of *Azadirachta indica* (neem) seed and kernel extracts on *Meloidogyne incognita*, *Cephalobus persegnis* and *Heterorhabditis indica in vitro*. International Journal of Nematology. 19(1): 87-95.

BREUER, H. 2006. dtv-Atlas Chemie: Grundlagen und ergebnisse der modernen chemie inkl. Mw St. versandkostenfrei BRD, A, CH.

BROWER, W. 2007. Formulation and method for treating plants to control or suppress a plant pathogen, available at:: www.google.pl/patents/US20070110725.

CHITWOOD, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review. of Phytopathology, 40: 221- 249.

CRISTOBAL-ALEJO, J., J. M. TUN-SUAREZ, S. MOGUEL-CATZIN, N. MABANA-MENDOZA and L. MEDINA-BAIZABAL, 2006. *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yuccatecan plants. Nematropica. 36: 89-98.

DUNCAN, D. B. 1955. Multiple Range and Multiple F. Tests. Biometrics. 11: 1-42.

EISENBACK, J. D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: An advance treatise on Meloidogyne. Vol. 1: Biology and Control, (Eds.) Sasser, J.N. and Carter, C.C. North Carolina State University Graphics. pp. 422.

EL-NAGDI, W. M. A. and A. F. A. MANSOUR, 2003. Management of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting sugar-beet by certain medicinal plant oil products. Egyptian Journal of Agricultural Research, 28: 361-367.

ERSKINE, C. 2007. Extraction process. US: 0128236.

FAO. 2006. Guidelines on efficacy evaluation for the registration of plant protection products. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy.

GILL, J. S. and R. K. JAIN, 1995. Nematode problems of vegetable crop in India. *In*: Gopal Swarup, D. R., Dasgupta, and Gill, J. S. (Eds.). Nematode Pest Management–An Appraisal of Eco-friendly Approaches. Nematological Society of India, New Delhi. pp. 166-178.

HOSSEININEJAD, S. A. 2004. Effect of neem, *Azadirachta indica*, on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, infesting tomato. Applied Entomology and Phytopathology, 71: 69-89.

HUGHES, C. C. 2009. Topical insect repellent. Available at: http://www.patentbuddy.com/Patent/7575765.

ISMAN, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection., 19: 603 – 608.

JOYMATI, L. and S. SOBITA, 2009. Effect of chloroform methanol extracts of different medicinal plants on egg hatching and larval mortality of M. incognita. Annals. Of Plant. Protection. Science. 17(2): 434-436

KATOOLI, N., M. E. MAHDIKHANI, A. TAHERI and S. NASROLLAHNEJAD, 2010. Management of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on cucumber with the extract and oil of nematicidal plants. International Journal of Agricultural Research, 5: 582-586.

KLEEBERG, H. 1990. Process for the preparation of storage stable Azadirachtin-rich extract from components of the neem tree particularly neem seed kernels. India Patent: 173989.

KUMAR, A. R. V., H. C. JAYADEVI, H. J. ASHOKA and K. CHANDRASHEKARA, 2003. Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. Current Science, 84: 1459-1464.

LEE, M. J. 1990. The effect of extracts of *Melia azedarach* on *Meloidogyne incognita*. Quarterly Journal of Chinese Forestry, 20: 1-7.

LINFORD, M. B., F. YAP and J. M. OLIVEIRA, 1938. Reduction of soil population of root knot nematode during decomposition of organic matter. Soil Science, 45: 127-142.

NTALLI, N., U. MENKISSOGLU-SPIROUDI and I. GIANNAKOU, 2010. Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. Annals of Applied Biology, 156: 309-317.

RUSSELL, A. B., J. W. HARDIN and L. GRAND, 1997. *Melia azedarach*. *In:* Poisonous Plants of North Carolina. Available at: http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/consumer/poison/Meliaaz.htm.

SABETI, H. 1976. Iranian forest, trees and shrubs. Iranian agricultural research organization. pp. 4-467. (In Persian).

SOUTHEY, J. F. 1986. Laboratory methods for work with plant parasitic nematodes. Ministry of Agriculture, Fisher and Food, Sixth edition. pp.202.

TRIPATHI, A. K. 2003. Process for insecticidal formulation effective in controlling malarial vector, mosquitoes. US: 6623766.

TSAY, T. T., T. S. WU and Y. Y. LIN, 2004. Evaluation of asteraceae plant for control of *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 36: 36-41.

THEJAVATHI, R., R. SHIRISH, B. YAKKUNDI and B. RAVINDRANATH, 1995. Determination of azadrichtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. Journal of Chromathopraphy, 705: 374-379.