DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jaep.2017.107097
آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۴، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۵

تهیه فرمولاسیون امولسیون شونده غلیظ بر پایه عصاره گیاه چریش، *Azadirachta indica* و بررسی کارائی آن روی شته سبز هلو، *Myzus persicae*

بابک حیدری علیزاده[1]✉، احمد حیدری[1] و سید سعید مدرس نجف آبادی[2]

۱- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ ۲- بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، هرمزگان، ایران

(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵)

چکیده

آزادیراکتین ماده موثره‌ای است که دارای خواص آفتکشی است، این ترکیب می‌تواند از دانه‌های درخت چریش(*Azadirachta indica*) استخراج شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد این ترکیب با نحوه عمل متفاوت، روی بسیاری از آفات کشاورزی از جمله حشرات، کنه‌ها، نماتدها و قارچ‌های بیماریزای گیاهی موثر است. در این تحقیق سعی شده است نسبت به تهیه یک فرمولاسیون موثر از عصاره چریش اقدام شود. بدین منظور عصاره چریش با استفاده از حلال استون از دانه‌ای چریش استخراج و با دستگاه NMR وجود مولکول آزادیراختین در آن تائید شد. عصاره خالص چریش برای تهیه فرمولاسیون مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه فرمولاسیون مقدار ۵ گرم روغن طبیعی آفتابگردان با ۱۳۰ میلی‌گرم عصاره آزادیراختین خالص سازی شده به همراه مقادیر مختلف (معادل ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۵ گرم) امولسیون کننده Tween 85 در هر لوله آزمایش ۵۰ میلی لیتری با یکدیگر مخلوط شد. کیفیت امولسیون‌های ساخته شده بر اساس میزان کرمینگ و دو فاز شدن بر اساس روش FAO بررسی شد و نهایتا فرمولاسیون EC 1.28% تهیه گردید. بررسی کارائی غلظت‌های مختلف فرمولاسیون تهیه شده روی شته سبز هلو *Myzus persicae* در مقایسه با پیریمیکارب، دیازینون و دلتامترین در ۱٤ روز بعد از سمپاشی نشان داد فرمولاسیون EC 1.28% چریش با دز ۳ در هزار با میانگین کنترل (۷۱/۴±۲/۵) درصد با پیریمیکارب (۷۴/۵±۳/۷) و دیازینون (۷۶/۹±۲/۶) در یک گروه آماری قرار گرفت. لذا این فرمولاسیون بعد از تائید می‌تواند به عنوان یک جایگزین و یا در تناوب با سایر حشره‌کش‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آزادیراکتین، امولسیون شونده غلیظ، شته هلو، فرمولاسیون.

Preparation of emulsifiable concentrate (EC 1.28%) formulation based on neem seed extract, (*Azadirachta indica*) and investigating its efficacy on green peach aphid (*Myzus persicae)*

B. HEIDARY ALIZADEH[1]✉, A. HEIDARI[1] and S. S. MODARRESNAJAFABADI[2]

1- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran;
2- Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Hormozgan, Iran

Abstract

Azadirachtin is the active ingredient that has pesticidal properties. This compound could be extracted from neem seed trees. Studies show that this compound with a different mode of action can be effective on many agricultural pests like insects, mites, nematodes and pathological fungi. In this study, development of an effective formulation of neem extract was undertaken. Therefore, the neem extract was obtained from neem seed by acetone and the presence of Azadirachtin was confirmed by proton NMR method. The purified neem extract was used to prepare the EC formulation. Hence 5 g of sunflower oil with 130 mg of the purified Azadirachtin extract along with different amounts of Tween 85 as emulsifier (0.5, 1, 2, 3 and 5 gram) were mixed in 50 ml test-tubes. Creaming and phase separation of the prepared emulsion were studied as the quality control factors according to the FAO standards and finally 1.28% EC formulation of neem seed extract was obtained. Evaluation of the efficacy of different concentrations of this formulation compared with pirimicarb, diazinon and deltamethrin on green peach aphid, *Myzus persicae*, after 14 days showed that the neem formulation (EC 1.28%) with the dose of 3 ml/l, pirimicarb and diazinon caused 71.4±2.5, 74.5±3.7 and 76.9±2.6 percent mortality respectively, were placed in the same group statistically. Therefore this formulation, after registration can be used as an alternative or in rotation with other insecticides.

Key words: Azadirachtin, emulsifiable concentrate, formulation, peach aphid.

✉ **Corresponding author: alizadehbh18@gmail.com**

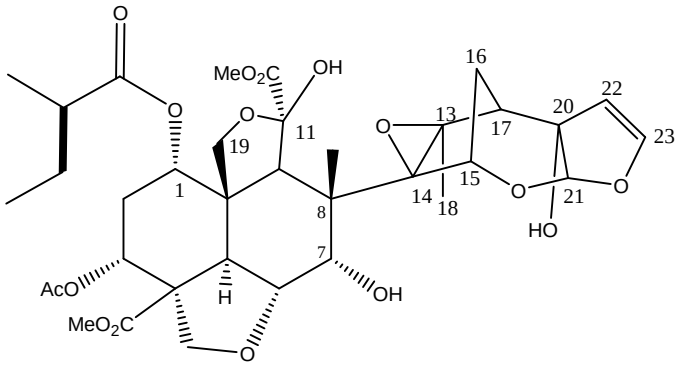
مقدمه

بر اساس گزارشات سازمان حفظ نباتات سالانه بین ۲۰ تا ۲۵ هزار تن انواع آفتکش در کشور مصرف می‌گردد که غالبا از سموم سنتتیک بوده و برای محیط زیست و انسان خطرناک می باشند. این در حالی است که کشور ما با توجه به شرایط خاص آب و هوائی خواستگاه گونه‌های گیاهی مختلف می باشد که دارای خواص آفتکشی می باشند. از جمله این گیاهان می توان به درخت چریش اشاره نمود که در مناطق جنوبی کشور در سطح وسیعی وجود داشته و مستندات علمی فراوانی دال بر خواص آفتکشی آن است (Heidari, 2010). حشره کش‌های با منشا گیاهی عموما برای انسان و سایر پستانداران و همچنین دشمنان طبیعی کم خطر بوده و در طبیعت نیز به سرعت تجزیه می شوند (Tamas, 1990; Isman, 2006). بررسی‌ها نشان می‌دهد که تاکنون تحقیقات زیادی در خصوص کارایی ترکیبات با منشاء گیاهی، عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی روی آفات مختلف انجام شده است. گیاه چریش یکی از گیاهان با خواص آفتکشی است که در طی ۲۵ سال گذشته تحقیقات وسیعی درباره‌ی تاثیر آن به عنوان حشره کش، کنه‌کش، دورکننده حشرات و تنظیم کننده رشد انجام شده و این بررسی‌ها هنوز نیز ادامه دارد. ترکیبات فعال چریش دارای کمترین میزان سمیت برای پستانداران و ماندگاری کم روی گیاهان بوده و همچنین دارای اثرات انتخابی روی دشمنان طبیعی آفات هستند (Caboni *et al.*, 2006; Isman, 2006; Khater, 2012; Lindquist and Casey, 2001). درخت چریش با نام علمی *Azadirachta indica* یا *Azadirachta melia* از خانواده Meliaceae بومی کشورهای هندوستان، برمه، پاکستان، سریلانکا، بنگلادش و مالزی بوده و در آنجا در مناطق کم آب و جنگلی به طور خود رو رشد می‌کند. این گونه احتمالاً از هندوستان وارد ایران شده و هم اکنون در نواحی گرم جنوبی کشور مانند بندرعباس، چابهار و میناب پراکنده است (Sadeghi, 1996). ماده‌ای که بیشترین فعالیت حشره‌کشی را دارد از مغز دانه چریش استخراج می‌شود. آزادیراختین مخلوطی از جزء ایزومریک به نام‌های آزادیراختین A تا آزادیراختین G است که آزادیراختین A بیشتر مورد توجه است. عصاره قطبی و غیر قطبی حدود ۲٤ ترکیب متفاوت در آزادیراختین وجود دارد که مخلوط این اجزاء به طور مشخص، افزایش تحمل یا مقاومت را در هر موجود کاهش می‌دهد (Verkerk and Wright, 1993).

آزادیراکتین نوع A (شکل ۱) یک تترانوتریترپنوئید (tetranotriterpenoid) یا لیمونید(limonid) است که در بذر درخت چریش تولید می‌گردد و مقدار این ماده در بذر بین ۰/۶-۰/۲ درصد می‌باشد. درخت چریش بطور متوسط سالیانه ٤۰-۳۰ کیلوگرم بذر در سال تولید می‌کند و گیاهی است که عمدتاً در جنوب آسیا و البته در تعدادی از مناطق دیگر کره زمین پراکنده است.

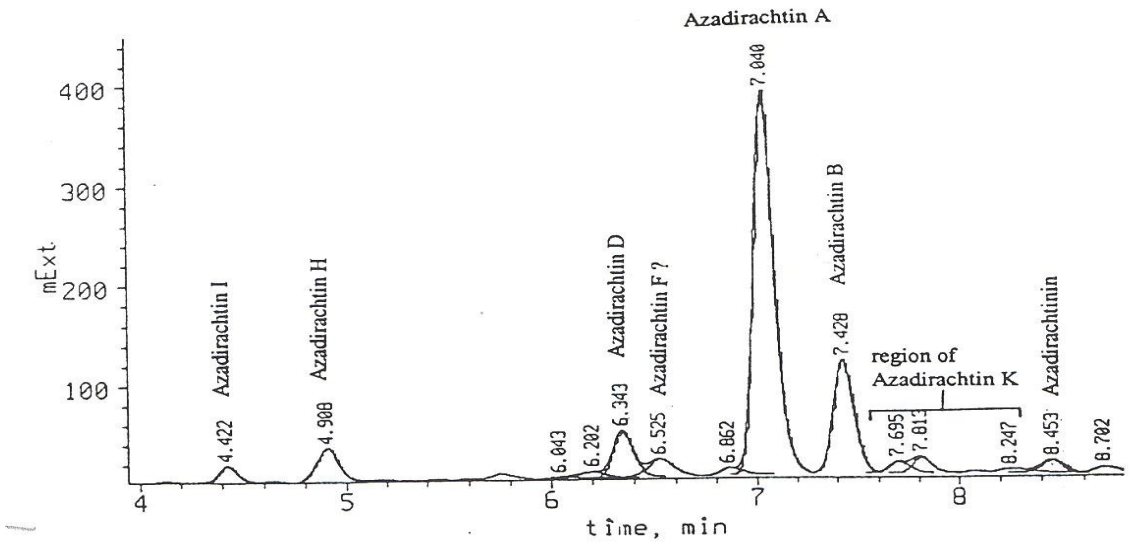
اجزاء اصلی ترکیبات عصاره چریش براساس قطبیت به دو گروه تقسیم می شوند. یک گروه شامل اجزای با قطبیت بیشتر مانند ترکیبات مختلف در گروه آزادیراکتین و آنالوگهای آنها شامل Azadrichtin, Meliacarpins و یک گروه با اجزای با قطبیت کمتر شامل گروه‌های Neembin و Salamin می‌باشد. بر اساس تحقیقات Kleeberg *et al.* (1990)، استخراج اکثر اجزاء ترکیبات آزادیراکتین در طی یک مرحله جداسازی با بکاربردن حلال استن قابل دست یابی است، بطوریکه آنالیز عصاره بدست آمده نشان می دهد ترکیبات مختلف آزادیراکتین در یک محدوده زمانی قابل‌قبول بصورت جدا بوده و در طیف کروماتوگرافی، آزادیراکتینA بعنوان پیک قالب است (شکل۲).

خواص آفتکشی گیاه چریش موجب شده که فرآورده‌های حاصل از آن به شکل‌های مختلف فرموله شده و از آنها برای کنترل آفات استفاده شود. تعدادی از این فرمولاسیون‌ها شامل Neemarin®، NeemAzal®، Neemplus®، Vemidin®، Nimbecidin®، Nemidin®، Ackook®، Azatin®، Repelin® و Neemark® به عنوان آفتکش مورد استفاده قرار می‌گیرند (Abdul Aziz and Henry, 1992; Santon *et al.*, 1997; Soliman and Tewfick, 1999).



شکل ۱- ساختمان مولکولی آزادیراکتین A (Thejavathi *et al.*, 1995)

Fig. 1. Molecular structure of Azadirachtin A (Thejavathi, *et al.*, 1995)



شکل ۲- کروماتوگرام HPLC عصاره نیم اقتباس از (Kleeberg, 1990)

Fig. 2. HPLC chromatogram of neem extract from (Kleeberg, 1990)

مطالعات مختلف نشان داده است که ۱۹۵ گونه حشره که به حشره‌کش‌های سنتتیک مقاوم شده اند با عصاره چریش قابل کنترل هستند (Lindquist and Casey, 2001; Menn, 1990).

در این تحقیق سعی شده تأثیر فرمولاسیون تهیه شده روی شته سبز هلو به عنوان یکی از مهمترین آفات درختان میوه هسته‌دار در ایران بررسی شود. میزبان عمده این آفت درخت هلو می‌باشد که از اواسط بهار به بعد روی گیاهان زراعی مهاجرت کرده و باعث خسارت شدید می‌شود. روی درختان میوه، عمده خسارت آن مربوط به پوره‌ها و حشرات ماده بدون بال در اوایل بهار می‌باشد که موجب ریزش شدید برگ و میوه‌های تازه تشکیل شده می‌گردد. خسارت این آفت با ترشح شدید عسلک همراه می باشد. این شته به عنوان میزبان دوم از انواع گیاهان زراعی و زینتی تغذیه می‌کند (Hak kim and Lander, 2007).

در ایران تحقیقات در خصوص بررسی کارایی ترکیبات با منشاء گیاهی عمدتاً با استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های استخراج شده از گیاهان بوده که به دلیل عدم وجود یک فرمولاسیون مشخص، امکان بهره‌برداری تجاری از آنها نبوده

است. نظر به پتانسیل‌های ترکیب چریش در کنترل آفات و همچنین وجود قابل توجه مواد اولیه آن در کشور در این تحقیق سعی شده فرمولاسیون مناسبی از عصاره چریش تهیه و کارائی آن مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

تهیه فرمولاسیون از عصاره خالص شده آزادیراکتین:

به منظور تهیه فرمولاسیون، ابتدا دانه‌های رسیده گیاه چریش در مرداد ماه سال ۱۳۹۲ از پارک های شهر بندرعباس[1] در استان هرمزگان جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. دانه‌های چریش پس از پوست‌گیری و خشک کردن، دریخچال در دمای ٤ درجه سلسیوس تا زمان استخراج و عصاره‌گیری نگهداری شد.

به منظور استخراج عصاره از دانه‌های چریش، ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم پودر دانه چریش داخل بالن ۲ لیتری حاوی ۸۰۰ میلی لیتر استن ریخته شد و در دستگاه روتاری در دمای ۳۰درجه سلسیوس برای مدت ۱۲ ساعت به هم‌زده شد. سپس حلال محتوی عصاره چریش از قیف بوخنر جهت صاف کردن عبور داده شد. عمل استخراج با استون ۲ بار دیگر تکرار شد و در آخر سه عصاره استونی به دست آمده در یک بالن جمع آوری گردید.

برای جداسازی حلال استون از عصاره از دستگاه روتاری استفاده شد که در نهایت عصاره‌ی تغلیظ شده روغنی تیره رنگ بدست آمد. به منظور جداسازی روغن از عصاره تغلیظ شده، عصاره مذکور سه مرتبه با ۵۰ میلی‌لیتر هگزان شستشو داده شد که ماحصل آن مقدار ٤٥ گرم ماده تیره رنگ فاقد روغن بود.

برای جداسازی ترکیبات قندی و پروتئین‌ها از ماده ذکر شده، این مخلوط در ٤۰۰ میلی لیتر اتیل استات در داخل دکانتور حل شد و سپس مقدار۱۰۰ میلی لیتر آب به آن اضافه گردید و این عمل شستشو با آب ۳مرتبه تکرار شد (Uebel *et al.*, 1979).

برای جداسازی حلال اتیل استات از مخلوط باقیمانده مجددا از دستگاه روتاری استفاده شد. سپس مخلوط باقیمانده بر روی قیف سینتر حاوی سیلیکاژل منتقل شد و با ۵۰۰ میلی لیترحلال اتیل استات/هگزان به نسبت (۱:۱) شستشو داده شد. این عمل باعث جدا کردن مواد رنگی از مخلوط میشود. محصول نهائی تولید ٤۳ گرم مخلوط با رنگی روشنتر و خالص تر از عصاره اولیه بود. این ماده مخلوط سپس برای خالص سازی نهایی وارد ستون کروماتوگرافی حاوی سیلیکاژل شد و با فاز حامل اتیل استات به هگزان به میزان ۱ لیتر و نسبت (۱:۱) شستشو داده شد. ماحصل این عملیات مقدار ۱۱ گرم عصاره آزادیراختین خالص شده بود. که طیف پروتون NMR این مخلوط وجود ترکیبات آزادیراختین را تأیید می‌کرد (شکل ٤).

به منظور تهیه فرمولاسیون از عصاره خالص سازی شده آزادیراختین (که بی شکل بود)، این عصاره به همراه روغن طبیعی آفتابگردان و ماده امولسیون کننده Tween 85 به صورت فرمولاسیون EC درآمد. بدین منظور ۵ نوع امولسیون بر اساس مقادیر مختلف ماده امولسیون کننده Tween 85 به شرح ذیل تهیه شد:

مقادیر ۵ گرم روغن طبیعی آفتابگردان با ۱۳۰ میلی‌گرم عصاره آزادیراختین خالص سازی شده به همراه مقادیر مختلف (معادل ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۵ گرم) امولسیون کننده Tween 85 در هر لوله آزمایش ۵۰ میلی لیتری با یکدیگر مخلوط شد. بررسی کیفیت امولسیونهای ساخته شده بر اساس میزان کرمینگ و دو فاز شدن بر اساس روش FAO (2006) انجام شد. بدین منظور مقدار ۵ میلی لیتر از امولسیون بدست آمده در داخل لوله استوانه‌ی مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن مقدار ۹۵ میلی‌لیتر آب استاندارد (با درجه سختی ۳٤۲ ppm) اضافه شد و محلول امولسیون بدست آمده در زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۱، ٦، ۲٤ و ۲۵ ساعت نگهداری و بعد از آن میزان

۱- عرض جغرافیائی N″27.17 و طول جغرافیائی E″56.25

کرمینگ و دو فاز شدن بررسی شد.

آزمایشات کارایی فرمولاسیون تهیه شده از عصاره گیاه چریش: جهت انجام آزمایش از یک باغ هلو، در منطقه خنداب واقع در ۱۵ کیلومتری شهرستان اراک[1] (استان مرکزی) استفاده گردید. تمام درختان مورد تیمار ۳ ساله بوده که بصورت ردیفی کشت شده بودند. آبیاری درختان به روش غرقابی و کرتی انجام می‌شد. فاصله درختان کشت شده از یکدیگر ۳ متر بود. در این آزمایش شته سبز هلو به عنوان آفت هدف مورد آزمایش قرار گرفت. این آفت در اوایل فصل بهار و با باز شدن برگ‌های درخت هلو ظاهر شده و کشاورزان در دهه دوم اردیبهشت اولین سمپاشی علیه این آفت را انجام می‌دهند. سموم مورد آزمایش شامل فرمولاسیون EC چریش تهیه شده در سه غلظت ۱، ۲ و ۳ در هزار، حشره‌کش دیازینون ۱ در هزار، حشره‌کش پریمیکارب ۰/۷ در هزار و حشره‌کش دلتامترین ۰/۵ در هزار بود. پس از کالیبراسیون میزان محلول مصرفی معادل ٤٨٠ لیتر بدست آمد.

این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۶ تیمار به همراه تیمار شاهد (آب پاشی) در ۴ تکرار اجرا شد. هر تکرار شامل یک درخت بود. فاصله بین تیمارها در هر ردیف یک درخت و فاصله بین بلوک‌های آزمایش نیز یک ردیف درخت در نظر گرفته شد.

شمارش شته‌ها در یک روز قبل از سمپاشی و ۳، ۷، ١٤ و ۲۱ روز بعد از هر سمپاشی انجام گرفت. واحد نمونه‌برداری جهت شمارش شته‌ها نیز طول ۲۰ سانتی‌متر از سرشاخه تعیین گردید که برای هر درخت تعداد ۳ سرشاخه بطور تصادفی انتخاب و شته‌های موجود در ۲۰ سانتی‌متر آنها شمارش گردید. درجه تأثیر هر تیمار با استفاده از فرمول هندرسون- تیلتون تعیین گردید (Bozsik, 1996). سپس داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین تلفات از طریق آزمون دانکن مقایسه شد.

۱- عرض جغرافیائی N″34.06 و طول جغرافیائی E″49.41

نتیجه و بحث

استخراج و خالص سازی عصاره از بذر چریش: پس از طی چندین مرحله استخراج با حلال های آلی مختلف شامل: استن، اتیل استات و هگزان، مقدار ٤٣ گرم عصاره رنگی مخلوط از مقدار ۲۰۰ گرم پودر دانه چریش بدست آمد. این عصاره مخلوط برای خالص سازی نهایی از ستون کروماتوگرافی حاوی SiO_2 عبور داده شد که نتیجه این عمل جدا شدن اکثر ترکیبات غیر قطبی و قطبی غیر ضروری از مخلوط بود پس از طی این مراحل ۱۱گرم عصاره نیمه جامد آمورفوس خالص برای تهیه فرمولاسیون EC بدست آمد (شکل ۳).

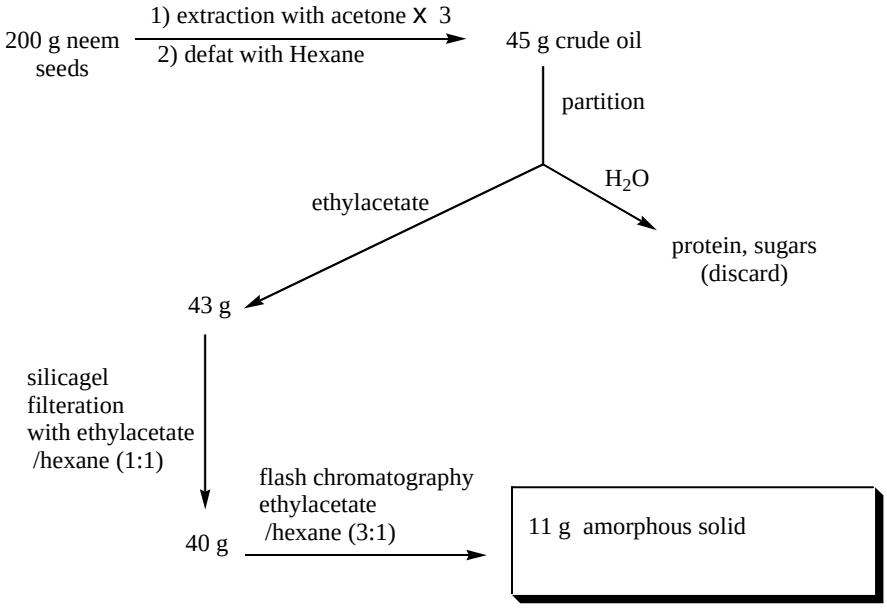
بررسی وجود ترکیبات مختلف آزادیراکتین در عصاره با دستگاه پروتون NMR در مقایسه با طیف Dureja and Johnson (2000) نشان داد عصاره خالص شده دارای آزادیراکتین میباشد. بطوریکه در ناحیه ٥/٦٤ و ٤/٧٦ هیدروژن متصل بین دو گروه اتر و استات و همچنین سایر پروتون‌ها تقریبا یکسان است (شکل ٤).

۱- آنالیز فرمولاسیون: کنترل کیفی ۵ نوع فرمولاسیون تهیه شده از عصاره چریش به لحاظ کرمینگ و دو فاز شدن بر اساس استانداردهای FAO نشان داد که در نمونه اول (تهیه شده با ۰/۵ گرم Tween)، در زمان های مختلف کنترل کیفی، تشکیل کرمینگ و دو فازی می‌دهد، لذا کیفیت فرمولاسیون تهیه شده قابل قبول نبود. این وضعیت تقریباً در نمونه‌های ۲ و ۳ که به ترتیب با یک و دو گرم Tween تهیه شده بود نیز حاکم بود لذا این دو نوع فرمولاسیون نیز به لحاظ کیفیت غیر قابل قبول تشخیص داده شد. در نمونه ٤ و ۵ نتایج تقریبا یکسان بود و دو فازی مشاهده نشد. مقایسه دو نمونه ٤ و ۵ نشان می دهد که در نمونه ۵ به دلیل عدم تشکیل کرمینگ و دو فازی از کیفیت برتری برخوردار است (جدول ۱).

آزمایشات مزرعه‌ای روی شته سبز هلو:

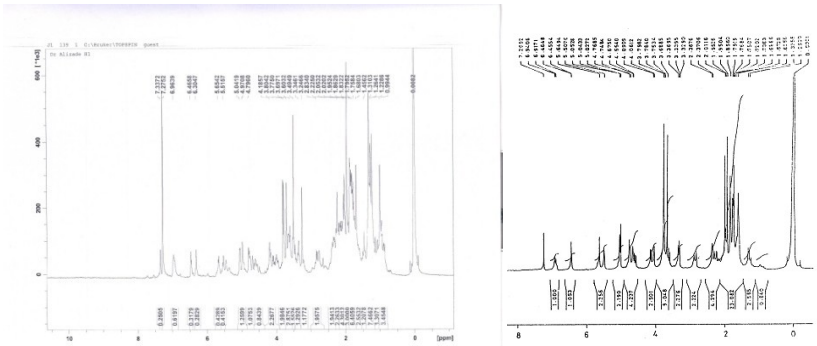
میانگین تلفات شته سبز هلو در ۳ روز بعد از سمپاشی:

نتایج آماری میانگین تلفات شته سبز هلو در ۳ روز بعد از سمپاشی نشان داد که بین تیمارها ($P<0.01$; $F_{(5,15)} = 5.01$) و بلوک ($P<0.05$; $F_{(5,15)} = 4.09$) تفاوت آماری معنی‌دار وجود دارد. میانگین تاثیر در تیمارهای دیازینون، پریمیکارب، دلتامترین و فرمولاسیون EC 1.28% چریش با دز سه، دو و یک در هزار در سه روز بعد از محلول‌پاشی به ترتیب معادل ۸۹/۵±۲/۷، ۹۱/۳±۳/۲، ۹۰/۱±۳/۱، ۸۰/٤±۱/۸، ۷۱/۳±۰/۹ و ٦۲/۸±۰/۹۳ بود که نشان می‌دهد تیمار پریمیکارب بالاترین و چریش ۱ در هزار کمترین تأثیر را در کنترل شته سبز هلو داشته‌اند (جدول ۲). مقایسه میانگین تلفات نشان داد که فرمولاسیون EC 1.28% چریش با دز سه در هزار با کنترل حدود ۸۰ درصد بعد از حشره‌کش‌های شیمیائی (دیازینون، پریمیکارب و دلتامترین)، در رتبه دوم به لحاظ تأثیر قرار دارد.



شکل ۳- مراحل استخراج و خالص سازی عصاره از بذر چریش

Fig. 3. Purification process of neem seed extract



شکل ٤- (a) طیف NMR عصاره خالص شده آزادیراختین از بذر چریش (b) طیف NMR آزادیراکتین A از Dureja & Johnson (2000)

Fig. 4. (a) NMR spectra of pure extract of neem seed; (b) NMR spectra of Azadirachtin A from Dureja & Johnson (2000)

میانگین تلفات شته سبز هلو در ۷ روز بعد از سمپاشی: نتایج آماری میانگین تلفات شته سبز هلو در ۷ روز بعد از سمپاشی، نشان داد که فقط در بین تیمارها ($P<0.05; F_{(5,15)} = 4.01$) تفاوت معنی‌دار مشاهده می‌شود. همچنین میانگین تأثیر در تیمارهای دیازینون، پریمیکارب، دلتامترین، فرمولاسیون 1.28% EC چریش با دز سه، دو و یک در هزار، هفت روز بعد از محلول‌پاشی به ترتیب معادل ۸۲/۷±۰/۳۲۱، ۸۳/٦±۰/٦۲۵، ۷۷/٤±۰/۵۱۵، ۷۸/۱±۱/۲، ۵۹/۲±۰/٦۲۵ و ٤۷/۱±۰/۷٦٤، بود که نشان می‌دهد همچنان تیمار پیریمیکارب بالاترین و فرمولاسیون 1.28% EC چریش با دز ۱ در هزار کمترین تاثیر را در کنترل شته‌سبز هلو داشته‌اند (جدول ۷). مقایسه میانگین تلفات نشان داد که از نظر تاثیر روی شته سبز هلو، تیمار فرمولاسیون 1.28% EC چریش با دز ۳ در هزار بعد از حشره‌کش‌های دیازینون و پریمیکارب در رتبه دوم و هم گروه با حشره‌کش دلتامترین قرار گرفته است (جدول ۲).

میانگین تلفات شته سبز هلو در ۱٤ روز بعد از سمپاشی: نتایج آماری میانگین تلفات شته سبز هلو در ۱٤ روز بعد از سمپاشی، نشان داد که فقط در بین تیمارها ($P<0.05; F_{(5,15)} = 4.32$)تفاوت معنی‌دار مشاهده می‌شود. همچنین میانگین تاثیر در تیمارهای دیازینون، پریمیکارب، دلتامترین، فرمولاسیون 1.28% EC چریش با دز سه، دو و یک در هزار، در چهارده روز بعد از محلول‌پاشی به ترتیب معادل ۷٦/۹±۲/٦، ۷٤/۵±۳/۷، ٤۵/٤±۱/۸، ۷۱/٤±۲/۵، ٤۸/۱±۲/۷ و ٤۰/۳±۲/٦، بود که نشان می‌دهد تیمار دیازینون بالاترین و چریش ۱ در هزار کمترین تاثیر را در کنترل شته سبز هلو داشته‌اند (جدول ۷). مقایسه میانگین تلفات نشان داد که از نظر تاثیر روی شته سبز هلو، تیمار فرمولاسیون 1.28% EC چریش با دز ۳ در هزار بعد از حشره‌کش دیازینون در رتبه دوم و هم گروه با حشره‌کش پریمیکارب و بالاتر از حشره‌کش دلتامترین قرار گرفته است (جدول ۲).

جدول ۱- بررسی وضعیت کرمینگ و پایداری امولسیون‌های تهیه شده از عصاره آزادیراکتین بر اساس روش FAO

Table 1. Creaming and emulsion stability of neem extract formulation according to FAO method

Samples	Tween 85[1]	30 minutes	1 hour	2 hour	6 hour	24 hour	25 hour	Results
1	0.5	C[2]- 2 mm	C- 2 mm 2 Phase	C- 2 mm 2 Phase	C- 4 mm 2 Phase	C- 4 mm[3] 2 Phase	No C	unacceptable
2	1	C- 3 mm	2 Phase	C- 2 mm 2 Phase	C- 3 mm 2 Phase	C- 4 mm 2 Phase	No C	unacceptable
3	2	C- 3 mm	C- 3 mm 2 Phase	C- 4 mm 2 Phase	C- 4 mm 2 Phase	C- 4 mm 2 Phase	No C	unacceptable
4	3	No C	No C	Little C	Little C	Little C	Little C	acceptable
5	5	No C	No C	No C	No C	No C	No C	acceptable

1. gram of Tween with 5.13 g of oil and extract
2. Creaming
3. millimeter

جدول ۲– مقایسه میانگین درصد کارائی تیمارها روی جمعیت شته سبز هلو در روزهای پس از سمپاشی بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن

Table 2. Mean comparison of treatment efficiency (%) on population of peach aphids (*Myzus persicae*) in the various days after spraying according to Multiple Duncan Rang Test method

Treatments	Concentration (ml/L)	After 3 Days (Mean±Se)	After 7 Days (Mean±Se)	After 14 Days (Mean±Se)
Neem* (EC 1.28%)	1	62.8±0.93c	47.1±0.7c	40.3±2.62b
Neem* (EC 1.28%)	2	71.3±0.9bc	59.2±0.6bc	48.1±2.76b
Neem* (EC 1.28%)	3	80.4±1.8b	78.1±1.2b	71.4±2.5 a
Pirimicarb (WP 50%)	0.7	91.3±3.2a	83.6±0.6 a	74.5±3.7 a
Deltamethrin (EC 2.5%)	0.5	90.1±3.1a	77.4±0.5 b	45.4±1.8 b
Diazinon (EC 60%)	1	89.5±2.7 a	82.7±0.3 a	76.9±2.64 a

*: The means of each column has at least one common letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test (p>0.05)

در این تحقیق مشخص شده که حلال استن می‌تواند به عنوان یک حلال مناسب برای استخراج عصاره آزادیراختین از پودر نیم باشد. این موضوع در طیف NMR بدست امده از عصاره خالص سازی شده چریش در مقایسه با طیف نمونه خالص آزادیراکتین مشخص است. در این تحقیق از ۲۰۰ گرم پودر بذر نیم مقدار ۱۱ گرم عصاره خالص بدست آمد. در تحقیقات سایر محققین، مقدار ۸/۷ گرم آزادریکتین از ٤٨ گرم پودر دانه چریش طی چندین مرحله استخراج با حلال استن و متانل بدست امد و آزادیراختین با ۹۰درصد خلوص از طریق جداسازی بوسیله ستون C-18 و فلوروزیل بدست آمد (Uebel *et al.* 1979). مقایسه میزان درصد آزادیراختین در بذر نیم در اکوتیپهای مختلف هندوستان بین ۰/۱ الی ۰/۳ اندازه‌گیری شد. در بعضی از کشورهای آفریقایی بین ۰/۵ الی ۰/٦ و در نقاطی به رقم ۰/۹ درصد نیز میرسد (Devaranavadagi *et al*., 2003; Ascher, 1993). در تحقیقات انجام گرفته توسط Jabbari (2001) در خصوص اندازه‌گیری میزان آزادیراختین در درختان چریش مناطق جنوبی ایران، مقدار آن را بین ۰/۱ تا ۰/۱۸ درصد گزارش کرد.

در تحقیقات انجام شده توسط Sundaramand and Curry (1993) فرمولاسیون امولسیون EC عصاره آزادیراکتین با استفاده از حلال متانول بدست آمد. در این روش با عبور عصاره متانولی از ستون حاوی سیلیکاژل و شستشو با فاز حامل اتردوپترول/اتیل استات (به نسبت ۹ به ۱)، عصاره خالص شده بدست آمد. در نمونه دیگر خالص تهیه شده بوسیله yamazaki *et al*. (1986) جداسازی و خالص سازی آزادریکتین از نمونه‌های تهیه شده از آمریکا با ۳ مرتبه شستشو با حلال هگزان برای جداکردن مواد غیر قطبی بسیار مناسب بوده بطوریکه از یک کیلو گرم پودر بذر نیم حدود ۱۸ گرم ماده جامد بی شکل بدست آمد. در تحقیق ما از استن بجای متانل برای استخراج استفاده و از ۲۰۰ گرم پودر مقدار ۱۱ گرم عصاره خالص بدست آمد. در همین راستا Suresh *et al.* (1997) از برگ درخت نیم دو ترکیب لیمونوئید بوسیله دو بار استخراج با هگزان بدست آورد که این دو ترکیب دارای ساختار مشابه با آزادیریکتین و اثر بیولوژیک مناسب بر علیه زنگ غلات بود.

استن به عنوان حلال استخراج دارای قدرت مؤثرتری نسبت به سایر حلال‌های قطبی مانند متانل است و به‌کار بردن آن در دستگاه روتاری قدرت عصاره‌گیری موثرتری دارد. بطوریکه پس از خارج کردن عصاره از پودر اولیه هیچ گونه ماده آزادیراکتین باقی نمی‌ماند و تمام ترکیبات فعال با استن جدا می‌شود. همچنین حلال هگزان نیز برای مرحله روغن زدائی بسیار مناسب است زیرا یکی از مشکلات درفرآیند خالص سازی پودر آزادیراکتین از دانه چریش خارج کردن روغن از پودر اولیه است و چنانچه در این مرحله دقت کافی در روش جداسازی با حلال غیر قطبی صورت نگیرد مقدار زیادی از ماده آزادیراکتین همراه روغن در زمان استخراج از دسترس خارج می شود که سبب کاهش راندمان استخراج می‌گردد. بنابراین با ۳ مرحله شستشو عصاره با مقدار لازم از

هگزان تقریباً تمام روغن خارج می‌گردد (Yamazaki *et al.* 1986). سایر شرایطی مهمی که در مرحله استخراج باید رعایت شوند عبارتند از: مراحل تصفیه و جداسازی بایستی پی درپی و بدون وقفه بوده و از نگهداری عصاره ی خام برای مدت طولانی در دمای محیط خودداری گردد. استفاده از حرارت بالا در آون (۶۰-۷۰ درجه سلسیوس) برای مراحل تبخیر حلال و استخراج توصیه نمی‌گردد و دمای ٤٠ درجه سلسیوس برای تبخیر حلال و مراحل استخراج مناسب می‌باشد. در هنگام جداسازی آزادیراکتین به وسیله ستون کروماتوگرافی از شستن عصاره با حلال‌های بسیار قطبی باید خوداری نمود و نسبت مناسبی از حلال‌های قطبی و غیر قطبی در نظر گرفته شود (اتیل استات/هگزان).

نتایج آزمایشات مزرعه‌ای روی شته سبز هلو نیز نشان داد فرمولاسیون EC 1.28% چریش با دز ۳ در هزار در سه روز بعد از سمپاشی آفت را در حد قابل قبولی کنترل می‌کند. این کنترل توانسته تا ۷ و ۱۴ روز بعد از سمپاشی نیز وجود داشته بطوریکه در ۱۴ روز بعد از سمپاشی با حشره‌کش‌های پیریمیکارب و دیازینون نیز رقابت کند. لذا میتواند به عنوان یک جایگزین و یا در تناوب با سایر حشره‌کش‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

بررسی‌های صورت گرفته توسط سایر محققین نیز موید خاصیت آفت‌کشی قابل قبول فرمولاسیون‌های مشتق شده از چریش است. کاربرد حشره کش‌های انتخابی و حشره کش‌های حاصل از عصاره بذر چریش روی جمعیت دو گونه شته بنام شته سبز هلو و شته مومی کلم (*Brericoryne brassicae*) و تاثیر آن‌ها روی لاروهای زنبور پارازیتوئید *Aphidioletes aphidiomyza* نشان داد که کاربرد حشره کش پریمیکارب و حشره کش فرموله شده از عصاره بذر چریش (NeemAzal-T/S) بیشترین تاثیر را در کاهش جمعیت شته و افزایش جمعیت زنبور پارازیتوئید دارند. بطوریکه حشره‌کش حاصل از عصاره بذر چریش هیچگونه تاثیر سوء روی لاروهای زنبور پارازیتوئید نداشته و هیچگونه آلودگی باقیمانده سموم در کلم نیز از خود بجا نگذاشته است (Verkerk *et al*., 1998).

بررسی تاثیر غلظت‌های پایین آزادیراختین حاصل از گیاه چریش در میزان مرگ و میر، طول دوره رشد و نمو و طول عمر شته مومی کلم نشان داد که میزان مرگ و میر در پوره های شته مومی کلم با افزایش غلظت آزادیراختین افزایش می‌یابد. این بررسی همچنین نشان داد که طول عمر شته‌های مومی کلم، میزان تغذیه آنها از گیاه میزبان و همچنین میزان باروری شته‌های مومی با افزایش غلظت آزادیراختین کاهش می‌یابد. (Pavela *et al.* 2004).

مطالعات آزمایشگاهی به منظور بررسی اثرات بیولوژیکی چریش بعنوان یک آفت کش طبیعی علیه پسیل آسیایی مرکبات نشان داد که غلظت ۲۲/۵ پی پی ام این ترکیب باعث مرگ و میرتمام پوره‌های این آفت ظرف مدت ۷ روز می شود. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد در مدت ٤ روز پس از تیمار پوره ها هیچ گونه تغییر جلدی در آن‌ها مشاهده نمی‌شود (Weathersbee and McKenzie, 2001).

تأثیر پودر مغز دانه چریش در کنترل لمبه گندم به نسبت ۱/۲۵و ۲/۵و ۵ گرم در هر ۱۰۰ گرم ماده غذایی نشان از تأثیر آن روی لاروهای آفت است. تحت تاثیر مواد مؤثر چریش، لاروهای موجود در تیمارهای آزمایشی، عوارضی از قبیل شکل غیر طبیعی، ناتوانی در تعویض جلد و نرسیدن به مرحله سن بعدی، بی تحرکی و متوقف شدن رشد را از خود نشان داده اند ومیانگین مرگ ومیر آنها به ترتیب ۱۰۰، ۹۸ و ۹۸ درصد برآورده شده است (Oroomchi, 1995). تاثیر عصاره‌های مختلف بذر چریش شامل عصاره آبی، عصاره اتانولی، عصاره هگزانی و عصاره استونی آن در جلوگیری از تخمگذاری مگس خربزه (*Bactrocera cucurbitae*) و مگس میوه شرقی (*Bactrocera dorsalis*) نشان داد تمام عصاره های بکار رفته از تخمگذاری هر دو گونه مگس روی میزبان خود جلوگیری می کنند (Singh and Singh, 1998).

در تحقیقاتی که توسط Namvar (2011) پیرامون تاثیر

فرمولاسیون تجاری عصاره چریش (NeemAzal-T/S) در مقایسه با سموم متداول علیه مگس مینوز برگ سبزی مورد آزمایش قرارگرفت، نشان داد که میزان تاثیر دو غلظت ترکیب تجاری چریش با حشره‌کش‌های کلرپایریفوس و آبامکتین هیچ تفاوت آماری معنی داری ندارد. نتایج مشابه از بررسی کارائی سه فرمولاسیون مختلف مشتق شده از چریش شامل NeemPro (81.0 and 71.6 mg a.i./l)، Natuneem (31.1 and 20.4 mg ai/l) و Organic Neem (39.1 and 30.4 mg a.i./l) روی کنه تارتن *Tetranychus evansi* روی بوته‌های گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای نشان داد دوزهای بالاتر کنترل بیشتری روی جمعیت کنه داشته و با گذشت زمان تاثیر آنها روند نزولی به خود می‌گیرد (Soto *et al.*, 2010).

همچنین در تحقیق دیگر مشاهده شد که آزادیراختین خاصیت تخم‌کشی شدید روی تخم‌های پشه مالاریا[1] دارد بطوری که در مواردی ۱۰۰ درصد خاصیت تخم‌کشی از خود نشان داده است (Soliman and Tewfick, 1999). بر اساس تحقیقات Rossner and Zebitz (1986) روی ترکیب مشتق شده از گیاه چریش به نام Parker Oil Neem (WS)، این ترکیب علیه تمام مراحل زندگی آفات قابل استفاده است. مکانیسم تاثیر این ترکیب در دوره لاروی به صورت ضد تغذیه، دور کنندگی، اختلال در رشد، بازدارنده تشکیل کیتین و پوست اندازی و سمیت لاروی بوده و در مرحله شفیرگی به صورت بازدارنده رشد، جلوگیری از پوست اندازی، سمیت مستقیم و در مرحله بالغ نیز به صورت کشندگی فوری، ضدتغذیه ، دورکننده و بازدارنده تخمگذاری می باشد.

زمانی که این ترکیب اثر ضدتغذیه‌ای دارد، اجزای فعال آن، گیرنده‌های حسی قطعات دهانی را اشغال کرده که باعث کاهش و در نهایت متوقف شدن رفتار جستجوگری برای غذا، تغذیه و جذب مواد غذایی در حشرات آفت و کنه‌ها می‌شود و زمانی که مانع از مستقر شدن و تغذیه حشره آفت یا کنه روی گیاهان تحت تیمار می‌شود نشان دهنده اثر دورکنندگی این ترکیب روی آفات می‌باشد به این ترتیب که این حشرات آفت به محض اینکه درک می‌کنند که بو ومزه غذا نامطلوب است از گیاه تیمار شده با عصاره چریش دوری کرده و از تغذیه از این گیاه اجتناب می‌کنند. عمده‌ترین و مهم‌ترین مکانیسم‌های تاثیر چریش روی آفات جلوگیری از تخمگذاری و رشد این آفات است که از طریق تاثیر این ترکیب روی هورمون‌های جوانی میسر می‌گردد. به این صورت که لارو با تغذیه از گیاه رشد و پوست‌اندازی می‌کند که این عمل پوست اندازی توسط هورمون اکدایسون پیش برده می‌شود. حال زمانی که ترکیبات چریش خصوصاً آزادیراختین وارد بدن لارو می‌شود، فعالیت اکدایسون متوقف شده، لارو در همان مقطع باقی می‌ماند و در نهایت می میرد. اگر میزان آزادیراختین به حدکافی نباشد، لارو موفق به ورود به مرحله شفیرگی شده ولی در این مرحله می‌میرد و اگر میزان این ترکیب از این مقدار هم کمتر بود و به مرحله بالغ رسید صد در صد با نقص و عقیم بودن آفت همراه است (Rossner and Zebitz, 1986).

در مطالعه‌ای دیگر در مورد چریش و مکانیسم اثر آن مشخص گردید که عناصر بدست آمده از درخت چریش فرم و ساختاری نزدیک و مشابه به هورمون های حیاتی حشرات دارند. بدن حشرات آفت، این عناصر را به عنوان هورمون‌های واقعی جذب می‌کنند درحالی که این ترکیبات باعث بسته و مسدود شدن سیستم اندوکرین در آنها می‌شود. در نتیجه باعث ناهنجاری‌های رفتاری و فیزیولوژیکی و به دنبال آن باعث گیج و مغشوش شدن حشره از لحاظ مغزی و بدنی شده به طوری که قادر به تولید مثل نبوده و به همین ترتیب باعث کاهش جمعیت و از بین رفتن آنها می‌شود. در برخی موارد نیز حشرات پس از خوردن برگ‌ها یا دیگر قسمت‌های گیاه آغشته به ترکیبات چریش دچار مسمومیت فوری شده و از بین می روند (Deshpande *et al*. 1980).

به هرحال با توجه به خواص آفتکشی قابل قبول چریش

۱- *Culexpipiens*

تا کنون فرمولاسیون‌های مختلفی با نام تجاری مختلف شامل Vemidin، Nimbecidin، Nemidin، Ackook،Azatin، Repelin و Neemark به بازار عرضه شده (Prakash and Rao, 1999) که امید است با تاثیر قابل قبولی که این فرمولاسیون تولید داخل از خود نشان داده به تدریج زمینه تولید و کاربرد آن در کشور فراهم گردد.

References

ABDUL AZIZ, S. A. and S. B. HENRY, 1992. Pest management and the environment in 2000. C.A.B. International Agriculture Institute, Malaysia, 401p.

ASCHER, K. R. S. 1993. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 22: 433-449.

BOZSIK, A. 1996**.** Studies on aphicidal efficiency of different stinging nettle extracts. Anz. Schdlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz. 69: 21-22. [In Germany with English Summary].

CABONI, P., G. SARAIS, A. ANGIONI, A. J. GARCIA, F. LAI, F. DEDOLA and P. CABRAS, 2006. Residues and persistence of neem formulations on strawberry after field treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 10026-10032.

DESHPANDE, V. Y., K. N. MENDUKAR and N. L. SADRE, 1980. Male antifertility activity of *Azadirachta indica* in mice. Journal of Postgraduate Medicine, 26: 167-170.

DEVARANAVADAGI, S. B., S. A. SAJJAN, V. N. KULAKARANI, S.Y. WALI and M. B. JAMABAGI, 2003. Comparison of the oil and azadirachtin content of neem seed kernel from different ecotypes. Karnataka Journal Agricultural Science. 16(4): 624-625.

DUREJA, P. and S. JOHNSON, 2000. Photo degradation of azadirachtin-A: A neem-based pesticide. Current Science, 79 (12): 1700-1703.

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

HAK KIM, J. and G. Lander, 2007. *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on Arabidopsis induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. The Plant Journal. 49(6): 1008-1019.

HEIDARI, H. 2010. Research strategic plan for pesticides. Iranian Research Institute of Plant Protection Press, 271 p.

ISMAN, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology. 51: 45-66.

JABBARI, L. 2001. Determination of azadirachtin percentage in neem seed in different area in south of Iran. Project Final Report of Iranian Research Institute of Plant Protection.

KHATER, H. F. 2012. Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. Pharmacologia. 3(12): 641-656.

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.

LINDQUIST, R. K. and M. L. CASEY, 2001. Evaluation of oil, soap and natural product derivative for leaf miner, Foxglove aphid, Western flower thrips, and greenhouse whitefly control. Ohio Florists Assosiation Bulletin, 727: 3-5.

MENN, J. J. 1990. USDA interest in neem research. In: Locke, J. C., and Lawson, R. H. (eds.) Proceedings of a workshop on neem's potential in pest management programs. USDA-ARS, Beltsville, MD. ARS-86, pp. 1-3.

NAMVAR, P. 2011. Effectiveness of commercial compound of neem on *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) control and comparing it with common chemical pesticides. Greenhouse Farming Educations and Technologies, 7: 89-101.

OROOMCHI, S. 1995. To investigate the effects of neem seed powder on controlling of stored products pest, *Trogoderma granarium*. 12th Plant Protection

Congress, Karaj. Iran.

PAVELA, R., M. BAMNET and F. KOCOUREK, 2004. Effect of Azadirachtin applied systematically through roots of plants on the mortality, development and fecundity of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*). Journal of Phytoparasitica , 32 (3), 286-294.

PRAKASH, A. and J. RAO, 1999. Botanical pesticide in agriculture. Lewis Publisher, CRC. 461 pp.

ROSSNER, J. and C. P. W. ZEBITZ, 1986. Effect of soil treatment with neem products on earthworms (Lumbricidae). 3rd International Neem Conference, Nairobi, 627-632.

SADEGHI, A. 1996. Studying of *Bemisia tabaci* susceptibility to chemical pesticides and neem and examination of its behavioral characteristics and reactions to neem and light traps. M.Sc. thesis, Oroumiyeh University.

SANTON, J. P., H. T. PRATES, J. M. WAQUIL and A. B. OLYERA, 1997. Evaluation of plant origin substance on the control of stored product pests. Sete lagoas, Brazil; centro Nation de milho e Sorgo (CNPMS), Journal of Agricultural Entomology, 86(10): 185-194.

SATO, A., M. VENZON, R. OLIVEIRA, H. G. OLIVEIRA and A. PALLINI, 2010. Alternative Control of *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae) on tomato plants grown in greenhouses. Neotropical Entomology 39(4):638-644.

SINGH, S. and R. P. SINGH, 1998. Neem (*Azadirachta indica*) Seed Kernel extract and Azadirachtin as oviposition deterrents against the Melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). Journal of Phytoparasitica , *26* (3), 148-156.

SOLIMAN, B. A. and M. K. TEWFICK, 1999. Activity and efficacy of azadirachtin (Neem production) on the eggs of the filarial vector, *Culex pipiens* (Dip: Cuicidae). Journal of Union Arab Biology, 12(A): 33-41.

SOLIMAN, B. A. and M. K. TEWFICK, 1999. Activity and efficacy of Azadirachtin (Neem production) on the eggs of the filarial vector, *Culex pipiens* (Dip: Cuicidae). Journal of Union Arab Biology. 12(A): 33-41.

SUNDARAMAND K. M. S. and J. CURRY. 1993. High performance liquid chromatographic method for the analysis of Azadirachtin in two commercial formulations and neem oil. Journal of Environmental Science Health. 28(2): 221-241.

SURESSH, G., N. S. NARASIMHAN and S. MASILAMANI, 1997. Antifungal fractions and compounds from uncrushed green leaves of *Azadirachta indica*, Phytoparasitica. 25-1:33-39.

TAMAS, K. T. 1990. Study on the production possibilities of botanical pesticides in developing African countries. Unido Press, 98p.

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

UEBEL, E. C., J. D. WARTHEN, J. JACOBSON and M. JACOBSON, 1979. Preparative reversed-phase liquid chromatographic isolation of azadirachtin from neem kernals (1). Journal of Liquid Chromathopraphy. 2(6): 875-882.

VERKERK, R. H. and D. J. WRIGHT, 1993. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larve of *Plutella xylostella*. Pesticide Science. 37: 83-89.

VERKERK, R. H., K. R. NEVGEBAUER, P. R. ELLIS and D. J. WRIGHT, 1998. Aphids on cabbage: tritrophic and selective insecticide interaction. Bulletin of Entomological Research , *88*, 343-349.

WEATHERSBEE, A. A. and C. L. MC KENZIE, 2001. Effect of a neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition and development of *Diaphorina citri* (Homoptera:Psyllidae). USDA-ARS,U.S. Horticultural Research Laboratory. South roch road. Fort Pierce, F1 34945.

YAMAZAKI, R. B., A. J. KLOCKEl, M. LEE, A. G. STONE and M. V. DARLINGTON, 1986. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromathopraphy.356: 220-226.