

سنتر فرمولاسیون نماتدکش محلول در آب از گیاه بومادران (*Achillea wilhelmsii*) و تأثیر آن در کنترل نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne incognita*) در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه

عباس صلاحی اردکانی<sup>۱</sup> و بابک حیدری علیزاده<sup>۲</sup>

۱- دانشیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کهگیلویه و بویراحمد، یاسوج، ایران؛  
۲- دانشیار بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران  
(تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶)

چکیده

اندام‌های هوایی گیاه بومادران (*Achillea wilhelmsii* C. Koch) در دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه سلسیوس) و سایه خشک، با استفاده از آسیاب برقی، پودر شد. عصاره‌گیری با حلال متانل در دستگاه سوکسوله انجام شد. خالص‌سازی عصاره از ترکیبات کربوهیدراتی، با استفاده از امولسیفایر پلی‌اکسی‌اتیلن سوربیتان منوالئات (Tween 85)، مواد همراه شامل روغن طبیعی (روغن آفتابگردان) و حلال آلی (زایلن) انجام شد و فرمولاسیون ۵٪ محلول در آب (EC) تهیه گردید. تأثیر غلظت‌های مختلف این فرمولاسیون در ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی روی تحرک و مرگ و میر لارو سن دوم نماتد *Meloidogyne incognita* و در شرایط گلخانه‌ای روی نماتد مذکور و صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی بررسی شد. در شرایط گلخانه، تمام تیمارها توانستند باعث کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) تعداد گال، تعداد توده تخم و جمعیت نهایی نماتد شوند. در شرایط آزمایشگاهی بیشترین میزان نماتدکشی (تا ۱۰۰٪)، پس از ۴۸ ساعت، متعلق به تیمارهای ۸ و ۱۶ درصد بود. در تیمار ۴ درصد، میزان مرگ و میر نماتد پس از ۴۸ ساعت معادل ۴۹/۸۶٪ و در سایر غلظت‌ها صفر به ثبت رسید. اثرات انفرادی و متقابل زمان و تیمار روی غیر فعال‌سازی نماتد از نظر آماری غیر معنی‌دار ولی روی مرگ و میر نماتد معنی‌دار بود. بررسی پایداری فرمولاسیون (ضریب تعادل چربی دوستی- آب دوستی) با روش CIPAC, FAO در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که فرمولاسیون داری امولسیفایر Tween 85، پایداری بیشتری نسبت به امولسیفایر Span 85 است.  
واژه‌های کلیدی: پودر مواد گیاهی، فرمولاسیون، گوجه‌فرنگی، نماتد ریشه گرهی.

Preparation of nematicides formulation from *Achillea wilhelmsii* for controlling root knot nematodes (*Meloidogyne incognita*)

A. SALAHİ ARDAKANI<sup>1</sup> and B. HEYDARI ALIZADEH<sup>2</sup>

1- Associate Professor, Agricultural and natural resources research center of Kogyloyeh Va Boyreahmad, Yasouj, Iran; 2- Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

Foliage of *Achillea wilhelmsii* C. Koch. were dried in the shade and room temperature (about 25°C), powdered and extraction was done in the Soxhlet extractor. Water soluble and non-water soluble components of the extract were separated by Dichloromethane/water. In addition, Tween 85 was added to the extract and EC formulation of 5% was made. Results of the laboratory experiments showed good stability of the formulation. 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 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*). Exposure time was significantly ( $p < 5\%$ ) affected J2 mortality. J2 mortality was 49.9% for concentration of 4%. It was 100% for the concentrations of 8% and 16%, after 48 h. In pot experiment, all of the concentrations significantly reduced the nematode parameters and overall population. Treatment of 4% of formulation was toxic to tomato plants in comparison to control. In general, concentrations of the 0.50%, 1% and 2% of the formulation were at par and the bests in controlling root knot nematode and improved tomato growth parameters in the pot condition compare with the control.

**Key words:** Formulation, non-chemical control, Plant material powder, plant parasitic nematode, *Solanum lycopersicum*.

## مقدمه

استفاده از آفت‌کش‌های گیاهی سابقه طولانی در تاریخ تکاملی زندگی بشر داشته و محدود به زندگی کنونی نیست. مصریان قدیم حدود 1200 سال قبل از میلاد مسیح از عصاره گیاه شوکران و عصاره ریشه تاج الملوک ماده‌ای به نام Aconite تولید و برای مبارزه با آفات استفاده می‌کردند. از نیکوتین برای مبارزه با مگس گیلاس در قرن ۱۷ میلادی، از گرد گل‌های داوودی به‌عنوان حشره کش قبل از قرن ۱۸ میلادی و همچنین از روغن گیاه Citronell از خانواده مرکبات به‌عنوان دورکننده پشه‌ها استفاده می‌شد (Nollet and Rathore, 2015). کنترل بیماری‌های گیاهی با استفاده از آفت‌کش‌های گیاهی، ضمن کاهش خطرات زیست‌محیطی ناشی از مصرف سموم شیمیایی، از محورهای اصلی تولید محصول سالم و اورگانیک است. با عنایت به خطرات زیست‌محیطی، آلودگی‌های شیمیایی، بروز و ظهور گونه‌های مقاوم آفت و از بین رفتن دشمنان طبیعی آن‌ها، استفاده از روش‌های غیر شیمیایی و طبیعی جهت کنترل بیماری‌های گیاهی، ضروری به نظر می‌رسد. به دلیل خاصیت آفت‌کشی عصاره و فراورده‌های بسیاری از گیاهان، می‌توان از آن‌ها در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی بهره برد. این مواد گیاهی 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). این ترکیبات بوسیله روش‌های مختلف عصاره‌گیری از گیاه جدا می‌شوند. به‌طور معمول ترکیبات جدا شده به‌صورت روغن غیر قابل حل در آب درآمده و این روغن بوسیله روشی ساده با دکانتور جدا می‌شود (Erskine, 2007).

نماتدهای مولد ریشه گری (*Meloidogyne spp.*) دارای گستردگی جهانی بوده و ضمن کاهش شدید محصولات کشاورزی، قادرند طیف وسیعی از گیاهان را مورد حمله قرار دهند (Moosavi, 2015). در ایران در سال ۱۳۹۰ به‌عنوان اولین بررسی، اثرات کنترلی گونه بومی گیاه بومادران روی نماتد

ریشه گری آغاز و اثرات شدید نماتدکشی عصاره آبی اجزای مختلف آن به اثبات رسید (Ardakan and Parhizkar, 2012). این تحقیق در راستای تهیه فرمولاسیون از گیاه بومادران و بررسی کارایی آن در کنترل نماتد، تعیین درصد کشندگی آن روی لاروهای سن دوم نماتد *Meloidogyne incognita* در شرایط آزمایشگاهی، بررسی اثر کنترلی فرمولاسیون در شرایط گلخانه‌ای روی نماتد و همچنین صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی و دستیابی به یک روش کنترل غیرشیمیایی به منظور تولید محصول سالم و کاهش مصرف سموم شیمیایی انجام شد.

## روش بررسی

**تهیه مواد گیاهی از گیاه بومادران:** در خرداد و در زمان گل‌دهی، تعداد زیادی بوته گیاه بومادران از مناطق کوهستانی اطراف شهر یاسوج در استان کهگیلویه و بویراحمد با مختصات جغرافیایی  $31^{\circ}51'E$  و  $31^{\circ}30'N$  جمع‌آوری شد. بخش هوایی این گیاهان در دمای اطاق (حدود ۲۵ درجه سلسیوس) و در سایه خشک شدند. با استفاده از آسیاب برقی، از بخش‌های هوایی خشک شده پودر آن تهیه گردید. از این پودر برای تهیه فرمولاسیون استفاده شد.

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

## مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری و استخراج

**مواد مؤثر از گیاه بومادران:** به منظور عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثر از گیاه بومادران، روش‌های مختلف شامل استفاده از حلال‌های هگزان و متانل (Thejavathi et al., 1995)، استخراج با استن در دمای محیط حدود ۲۶ درجه سلسیوس، استخراج با استن در دستگاه سوکسله و استخراج با متانل در دمای محیط (Joymati and Sobita, 2009) مورد مقایسه قرار

گرفتند.

### بررسی تأثیر فرمولاسیون روی لارو سن دو در شرایط

آزمایشگاهی: حدود ۳۰ روز پس از ساخت فرمولاسیون، غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ درصد (۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌لیتر از فرمولاسیون به اضافه آب مورد نیاز تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) 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 این منظور ۲ میلی‌لیتر از هر غلظت با ۲ میلی‌لیتر از آب که حاوی ۲۰۰ عدد لارو سن دوم نماتد بود، در هر ظرف پتری ریخته شد. برای هر کدام از غلظت‌های فوق، ۶ تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی انجام گردید. در این آزمایش از آب مقطر به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت، سه تکرار از هر تیمار و پس از ۴۸ ساعت سه تکرار باقی مانده از هر تیمار با استفاده از میکروسکپ تشریح 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 پتری دیش 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 و از بین رفتن محیط سمی ناشی از فراورده‌های گیاهی، مجدداً فعال و متحرک، اما نماتدهای مرده تحرکی نخواهند داشت.

### بررسی تأثیر فرمولاسیون روی نماتد *M. incognita* در

#### شرایط گلخانه‌ای:

۱- تهیه خاک: ابتدا مخلوطی از خاک رس، ماسه بادی و کود حیوانی پوسیده و به ترتیب به نسبت ۵-۲-۱ تهیه و

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

### تهیه فرمولاسیون محلول در آب از عصاره بومادران:

فرمولاسیون محلول در آب از عصاره بومادران با استفاده از عصاره بومادران ۰/۵٪، امولسیفایر توئین ۰/۵٪، آب و مواد همرا (هگزانول به عنوان ضد کف و زایلن به عنوان حلال آلی) ۹۰ درصد تهیه گردید.

### بررسی پایداری فرمولاسیون: برای بررسی تست

پایداری، از آب سخت استفاده شد. ابتدا نسبت ۵ درصد از نمونه فرموله شده را به همراه ۹۵ درصد آب سخت در یک لوله آزمایش ریخته و پایداری فرمولاسیون در زمان‌های ۰/۵، ۲، ۲۴ و ۲۵ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، امولسیون‌های تولید شده در محیط آزمایشگاهی و دمای اطاق قرار داده شد و وضعیت آن‌ها از نظر چربی زدایی (creaming) و رسوب (sediment) بررسی گردید (FAO, 2006).

### خالص‌سازی و تکثیر نماتد: یک توده تخم از نماتد ماده

*M. incognita* که قبلاً شناسایی شده بود انتخاب گردید. این توده تخم را درون ظرف پتری حاوی آب مقطر قرار داده تا نماتدهای سن دوم از آن‌ها خارج شوند. لاروهای سن دوم نماتد به خاک اطراف ریشه ۴ بوته گوجه‌فرنگی رقم اوروباتا که در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشت شده بودند، اضافه گردید. پس از گذشت ۶۰ روز، 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).

### نتیجه و بحث

#### مقایسه روش‌های مختلف عصاره‌گیری و استخراج

مواد موثر از بومادران: در بین روش‌های مورد بررسی، روش استخراج با متانل در دمای محیط بیشترین کارایی را نشان داد. در این روش مقدار عصاره خالص به دست آمده نسبت به سایر روش‌های بررسی شده در این تحقیق بیشتر بود. در این روش ۱۰۰ گرم عصاره خالص شده به دست آمد که نسبت به دو روش قبلی بسیار بیشتر بود.

#### انتخاب امولسیفایر و آزمون پایداری فرمولاسیون

(Breuer, 2006): مقادیر ضریب تعادل چربی دوستی - آب دوستی (Hydrophilic-lipophilic Balance; HLB) از ۳/۶ تا ۱۱ 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 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 نشان داد که بیشتر نمونه‌ها در زمان ۰/۵ ساعت، از نظر ظاهری محلولی شیری رنگ و یکنواخت بودند. نمونه‌های ۱ تا ۳ هیچ گونه نشانه‌ای از چربی‌زدایی (تجمع چربی در سطح نمونه) نداشتند ولی از نمونه ۴ تا ۱۰، در سطح نمونه‌ها مقداری تجمع چربی شکل گرفت. پس از دو ساعت شکل ظاهری نمونه‌ها تغییر کمی داشت اما نمونه‌های ۱ تا ۳ بدون چربی‌زدایی و بقیه دارای چربی‌زدایی بودند. پس از ۲۴ ساعت، در نمونه‌های شماره دو تا ۱۰ چربی‌زدایی و رسوب در ته لوله آزمایش شکل گرفت و تنها نمونه شماره ۱ بدون چربی‌زدایی و رسوب باقی ماند. آزمون بررسی چگونگی ثبات فرمولاسیون ساخته شده (نمونه شماره ۱) در آب سخت، به نسبت ۵ درصد از نمونه فرموله شده به همراه ۹۵ درصد آب سخت، نشان داد که این

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 گوجه‌فرنگی در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۲۰ سانتی‌متر (۱ کیلوگرم خاک در هر گلدان) استفاده گردید.

#### ۲- تهیه نشاء گوجه‌فرنگی: بذر گیاه گوجه‌فرنگی رقم

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

#### ۳- کاشت گیاهچه، اضافه نمودن مواد گیاهی و نماتد:

مقدار ۱ کیلوگرم خاک سترون در هر گلدان ریخته شد. تحقیق در شرایط گلخانه‌ای، با اضافه نمودن فرمولاسیون گیاهی در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴، درصد (سانتی‌متر مکعب فرمولاسیون به ازای هر ۱۰۰ گرم خاک) و تعداد ۳ عدد لارو سن دوم نماتد به ازای گرم خاک، به طور همزمان با خاک گلدان مخلوط و یک هفته بعد، نشای گوجه‌فرنگی در دمای  $25 \pm 1$  انجام شد. این آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت (Duncan, 1955).

#### برداشت و ثبت شاخص‌ها: شصت روز پس از نشای

گوجه‌فرنگی در گلدان‌ها، بوته‌های گوجه‌فرنگی از خاک خارج و نسبت به ثبت اطلاعات شامل تعداد گال، تعداد توده تخم، تعداد تخم در گرم ریشه، تعداد نماتد موجود در خاک، جمعیت نهایی نماتد در خاک و ریشه و صفات رویشی گیاه شامل طول و وزن تر ریشه و ساقه، اقدام گردید. بر اساس روش‌های معرفی شده توسط سوتی (Southey, 1986)، جداسازی و شمارش نماتد از خاک به روش تغییر یافته الک و قیف برمن انجام گرفت. برای شمارش جمعیت ماده بالغ در ریشه، مقدار یک گرم ریشه با محلول رنگی اسید فوشین - لاکتوفنل رنگ‌آمیزی و مستقیماً با استرئوسکوپ شمارش شد.

روی مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد در این تحقیق است. اما اثر زمان روی غیر فعال‌سازی نماتد معنی‌دار نبود. مقایسه اثرات انفرادی و متقابل زمان‌ها و تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که اثرات متقابل زمان و تیمار روی غیر فعال‌سازی نماتد از نظر آماری غیر معنی‌دار ولی روی مرگ و میر نماتد معنی‌دار بود (جدول ۲).

**تأثیر فرمولاسیون روی نماتد و صفات رویشی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای:** بر اساس نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون بومادران روی نماتد *M. incognita* و صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی، از نظر آماری ( $P < 0/05$ ) معنی‌دار بوده است. نتایج حاصله از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون روی صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی نشان دهنده اثر معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) و مثبت تیمار ۲ درصد از فرمولاسیون، روی رشد طولی ریشه گیاه گوجه‌فرنگی بود. این طول در تیمار ۲ درصد، ۳۰ سانتی‌متر و در تیمار شاهد (بدون نماتد و فرمولاسیون)، ۲۵ سانتی‌متر بود. کمترین طول ریشه (۲۳ سانتی‌متر) در شاهد شماره ۲ که فقط از نماتد استفاده شده بود، به ثبت رسید. بیشترین طول ساقه (۷۳ سانتی‌متر) در تیمار ۱٪ و کمترین آن (۴۶/۳۳ سانتی‌متر) در تیمار شاهد با نماتد مشاهده شد.

فرمولاسیون در آب پایدار مانده و در لوله‌های آزمایشی، رسوب (sediment) تشکیل نشد.

#### تأثیر فرمولاسیون روی نماتد در شرایط آزمایشگاهی:

در هر دو دوره زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، هیچ نوع مرگ و میر لارو سن دوم نماتد در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵۰ درصد از فرمولاسیون مشاهده نگردید. هر چند که در دوره زمانی ۲۴ ساعت، میزان تحرک نماتد در غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ درصد از ۸/۱۶ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود، پس از قرار دادن این لاروها در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت، تمام لاروهای تیمار شده با غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ به حالت طبیعی و تحرک خود برگشته و هیچ نوع مرگ و میری در بین آن‌ها مشاهده نشد. در دوره زمانی ۲۴ ساعت، فقط ۲۸/۲۸ و ۴۵/۱۹ درصد مرگ لاروهای سن دوم نماتد به ترتیب در تیمارهای ۸ و ۱۶ درصد با اختلاف معنی‌دار آماری ( $P < 0/05$ ) به ثبت رسید. بیشترین میزان نماتدکشی (۱۰۰ درصد)، پس از ۴۸ ساعت، متعلق به تیمارهای ۸ و ۱۶ درصد بود. در تیمار ۴ درصد، میزان مرگ و میر نماتد پس از ۴۸ ساعت معادل ۴۹/۸۶ درصد و در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد، صفر به ثبت رسید.

نتایج جدول تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین دوره‌های زمانی استفاده شده

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

Table 1. Comparison effects of different amounts of two emulsifiers (Tween 85 and Span 85) on stability of *Achillea wilhelmsii* 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	
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
8	30	70	4.6
9	25	75	4.1
10	20	80	3.6

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون بومادران و زمان‌های بکار رفته روی مرگ و میر و غیرفعال سازی نماتد گره ریشه (*M. incognita*) در شرایط آزمایشگاهی

**Table 2.** Effects of different concentrations of *Achillea wilhelmsii* formulation and different times on the immobility and mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*

مرگ و میر Mortality		غیر متحرک‌سازی Immobility		تیمار Treatment
بعد از ۴۸ ساعت 48 h	بعد از ۲۴ ساعت 24 h	بعد از ۴۸ ساعت 48 h	بعد از ۲۴ ساعت 24 h	
0c	0c	0d	0d	Control (Distilled water)
0c	0c	0d	0d	0.125%
0c	0c	0d	0d	0.25%
0c	0c	0d	0d	0.50%
0c	0c	8c	8c	1%
0c	0c	82b	78b	2%
49b	0c	100a	100a	4%
100a	28b	100a	100a	8%
100a	45a	100a	100a	16%

\* اعداد ثبت شده در جدول، میانگین ۳ تکرار بوده و حروف مشابه در هر ستون، نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار از نظر آماری و در سطح ۵٪ می‌باشد.

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 ( $P = 0.05$ ).

حالی بود که تیمار ۱ درصد تأثیر معنی‌داری روی افزایش صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی در مقایسه با شاهد (فقط نماتد) و سایر تیمارها از خود نشان دادند (جدول ۳). در فرآیند خالص‌سازی عصاره پودر بومادران، یکی از مشکلات، خارج کردن کلروفیل از پودر اولیه بود. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از حلال غیر قطبی هگزان برای این منظور مناسب نمی‌باشد. در این تحقیق، عصاره‌ی غلیظ سبز رنگ به دست آمده از پودر گیاه بومادران، سه مرتبه با هگزان شستشو داده شد، اما اکثر مواد در این فاز غیر قطبی، محلول بوده و از ترکیب عصاره جدا شد. تجاوتی و همکاران نیز گزارش نموده‌اند که استفاده از فرمولاسیون سبز رنگ در عصاره فرموله شده، برای مصرف در خاک اشکالی ایجاد نمی‌کند اما در مصرف روی گیاه، می‌تواند ایجاد گیاه‌سوزی نماید. آن‌ها گزارش نمودند که 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، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Thejavathi et al., 1995).

از نظر وزن تر ریشه، اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۱ و ۲ درصد مشاهده نگردید. بیشترین وزن‌تر ریشه و ساقه، مربوط به تیمار ۲ درصد بود. تیمار ۴ درصد فرمولاسیون باعث کاهش معنی‌دار کلیه صفات رویشی مورد بررسی در گیاه گوجه‌فرنگی در مقایسه با شاهد (تیمار بدون نماتد و فرمولاسیون) گردید. به‌طور کلی، با افزایش غلظت فرمولاسیون، مقدار کنترل نماتد و اثرات منفی آن روی صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی افزایش یافت. تمام تیمارهای استفاده شده از فرمولاسیون باعث کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) 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. تیمارهای ۲ و ۴ درصد به‌طور کامل نماتد را کنترل نمودند. اما تیمار ۴ درصد باعث کاهش معنی‌دار صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی گردید. از نظر آماری، تأثیر تیمار ۱ درصد از فرمولاسیون روی صفات مربوط به نماتد، اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۲ و ۴ درصد نداشت و همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند. این در

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون بومادران روی نماتد *M. incognita* و صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی ۶۰ روز پس از مایه‌زنی

**Table 3.** Effects of different concentrations of *Achillea wilhelmsii* formulation on *Meloidogyne incognita* and growth components of tomato plants, 60 days after inoculation

جمعیت نهایی نماتد Total nematode population	تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک J2/ 100 g of soil	تعداد لارو در ۱ گرم ریشه J2/g of root	تعداد تخم روی ۱ گرم ریشه Eggs/g of root	تعداد توده تخم روی ۱ گرم ریشه Egg asses/g of root	تعداد گال روی ۱ گرم ریشه Galls/g of root	وزن تر ساقه (گرم) Tomato shoot fresh weight (g)	وزن تر ریشه (گرم) Tomato root fresh weight (g)	طول ساقه (سانتی‌متر) Tomato stem length (cm)	طول ریشه (سانتی‌متر) Tomato root length (cm)	تیمار Treatments
0a	0a	0a	0a	0a	0a	71c	18a	61bc	25bc	Control (no nematode no formulation)
181950b	233d	192c	12167d	31c	57d	52f	13b	46d	23c	Control (only nematode)
56945a	82c	23b	2847c	7b	23c	56e	19a	60bc	25bc	0.125%
41351a	78c	24b	2033bc	7b	17bc	66dc	20a	60bc	26b	0.25%
31068a	44b	17ab	1566abc	4ab	11b	68dc	19a	68a	25bc	0.50%
6859a	12a	4a	371ab	1a	4a	88a	18a	73a	29a	1%
0a	0a	0a	0a	0a	2a	78b	19a	67ab	30a	2%
0a	0a	0a	0a	0a	0a	62de	17b	54c	26b	4%

\* اعداد جدول، میانگین ۳ تکرار بوده و حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده 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).

عمر مواد مؤثر می‌شود. استفاده از حرارت در جداسازی ترکیبات با حلال‌ها در روش‌های Steam distillation و عصاره‌گیری با حلال بسیار مهم است. برای مثال ترکیبات پولی‌گودیل (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 است. هر چند که این حلال‌ها اغلب بسیار طبیعت دوست نیستند. به علاوه بسیاری از حلال‌های هیدروکربون‌های فلئور برای لایه اوزون نیز مضر و یا دارای اثر قوی گازهای گلخانه‌ای هستند. استفاده از

در روش عصاره‌گیری به کمک حلال متانل و استفاده از دستگاه سوکسله، متانل دارای قدرت مؤثرتری نسبت به سایر حلال‌های آلی از قبیل دی‌کلرومتان یا استن بوده و به‌کار بردن آن در دستگاه سوکسله همراه با رفلاکس حلال و یا روتاری، قدرت عصاره‌گیری مؤثرتری داشت. در این روش، پس از قرار دادن پودر بومادران در متانل (به مدت ۴۸ ساعت)، باقیمانده آن کاملاً خشک و عاری از هرگونه بوی بومادران بود. بنابراین، این سیستم حلال بسیار مؤثر است. با توجه به این‌که در این روش از دستگاه سوکسله و حرارت استفاده می‌شود، این حرارت سبب از بین رفتن مقداری از ترکیبات مؤثر خواهد شد. استفاده از سیستم روتاری که در آن حرارت استفاده نمی‌شود و ترکیبات مؤثر در معرض درجه حرارت معمولی هستند، بسیار مفید بوده و باعث افزایش طول

به طور کلی، تأثیر فرمولاسیون ساخته شده از گیاه بومادران روی نماتد ریشه گری در شرایط آزمایشگاهی، کمتر از شرایط گلدانی بود. در شرایط گلدانی، این امر می تواند به دلیل تماس مداوم و طولانی مدت فرمولاسیون با نماتدهایی که به تدریج از تخم خارج می شوند، باشد. این نتایج با یافته های قبلی (Ardakani and Parhizkar, 2012) مطابقت دارد.

نتایج بررسی تأثیرات فرمولاسیون گیاه بومادران روی غیر فعال سازی و مرگ و میر نماتد مولدگره ریشه در شرایط آزمایشگاهی بیانگر تأثیر زیاد ترکیبات گیاه بومادران بر غیر فعال کردن نماتد است، که صرف نظر از تأثیر کشندگی آن ها، اثر بسیار زیادی در کنترل نماتد و در نتیجه کاهش خسارت ناشی از حمله نماتد خواهد داشت. به هر حال، رابطه مستقیم بین افزایش معنی دار میزان مرگ و میر لارو سن دوم نماتد در شرایط آزمایشگاهی با افزایش زمان تماس نماتد با فرمولاسیون (۴۸ ساعت)، تأیید کننده این واقعیت بود که هر چه مدت زمان تماس نماتد با فرمولاسیون افزایش یابد، اثر کشندگی فرمولاسیون نسبت به اثر غیر فعال سازی آن روی نماتد بسیار بیشتر خواهد بود. نتایج گزارش شده سایر محققین نیز مؤید افزایش میزان مرگ و میر نماتدهای انگل گیاهی، با افزایش مدت زمان تماس آن ها با ترکیبات نماتدکش گیاهی است (Echeverrigaray *et al.*, 2010).

در بررسی حاضر، با افزایش میزان دوز فرمولاسیون مصرفی، میزان مرگ و میر نماتد به شدت افزایش و علائم بیماری کاهش یافت. این نتایج با نتایجی که توسط سایر محققین (Lee, 1990; Cristobal-Alejo *et al.*, 2006; Katooli *et al.*, 2010; Ardakani and Parhizkar, 2012) به دست آمده مطابقت دارد. نتایج تحقیق حاضر و در شرایط گلخانه ای نشان داد که بیشترین تأثیر نماتدکشی مربوط به غلظت ۴ درصد از فرمولاسیون گیاه بومادران بود. اما به دلیل بروز اثرات منفی و بازدارندگی این غلظت روی فاکتورهای رویشی گیاه گوجه فرنگی، استفاده از این غلظت در شرایط مزرعه توصیه نمی شود. در تحقیقات (Cristobal-Alejo *et al.*, 2006) نیز

حلال های دیگر مانند پلی اتیلن گلیکول، سورفکتانت های هیدروفیلیک، الکل و آب بسیار مؤثر است (Erskin, 2007). بنابر دلایل ذکر شده فوق، از بین روش های به کار گرفته شده برای عصاره گیری و استخراج مواد مؤثر از گیاه بومادران، روش استخراج با متانل در دمای محیط به عنوان بهترین روش در این تحقیق شناخته شد. نتایج تحقیقات (Afrazez *et al.*, 2014) نشان داد که نوع حلال بر راندمان استخراج تأثیر می گذارد و راندمان عصاره گیری با افزایش قطبیت حلال افزایش می یابد.

بر اساس نتایج این تحقیق دمای ۴۰ درجه سلسیوس برای تبخیر حلال و مراحل استخراج مناسب است. استفاده از حرارت بالا در آن (۶۰-۷۰ درجه سلسیوس) برای مراحل تبخیر حلال و استخراج توصیه نمی گردد. لازم به ذکر است که در تهیه عصاره پودر بومادران، از ستون کروماتوگرافی برای خالص سازی استفاده نشد ولی ممکن است با استفاده از این روش بتوان عصاره خالص تر بدون رنگدانه به دست آورد که می تواند در تهیه فرمولاسیون پایدار از عصاره تغلیظ شده مؤثرتر باشد.

لی و همکاران سهولت، سادگی، تماس مداوم حلال با پودر گیاهی، افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای پایین و عدم نیاز به فیلتراسیون را از محاسن روش سوکسله ذکر نموده اند (Li *et al.*, 2004).

نتایج آزمایش های صورت گرفته به منظور بررسی پایداری فرمولاسیون با استفاده از امولسیون کننده های Tween 85 و Span 85 نشان داد که Tween 85 مناسب تر 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 عصاره ها اضافه می گردد. برای مثال روغن فرار عصاره گیاهی *Foeniculum 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 داده است (Tripathi, 2003).



چریش، زیتون تلخ و گل جعفری را در آزمایشگاه و گلخانه علیه نماتد ریشه گرهی بررسی کرده‌اند، مطابقت دارد و با کاهش تعداد گال ریشه موجب افزایش قابل توجه فاکتورهای رشدی در گیاه گوجه‌فرنگی می‌شوند.

## References

- AFRAZEH, Z., M. BOLANDI, M. KHORSHIDI and A. MOHAMMADI NAFCHI, 2014. Evaluation of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts (Methanol, Ethanol) Saffron petals. *Agronomy and Technology*, 2(3): 231-236.
- AKHTAR, M. and I. MAHMOOD, 1994. Prophylactic and therapeutic use of oil cakes and leaves of neem and castor extract for control of root-knot nematode on chili. *Nematology Mediterranean*, 22: 127-129.
- ARDAKANI, A. S. and S. PARHIZKAR, 2012. Inhibitory effects of three medicinal plants, *Teucrium polium* L., *Artemisia sieberi* Besser., and *Achillea wilhelmsii* C. Koch on *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) chitwood (in vitro and under greenhouse conditions). *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4): 596-602.
- 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.
- AZHAR, R. M. and M. SEDDIQU, 2007. Nematicidal effect of some botanical against root-knot nematode, (*Meloidogyne javanica*) on tomato. *International Journal of Plant Sciences*, 2 (2): 49-52.
- BREUER, H. 2006. Dtv-atlas chemie: Grundlagen und ergebnisse der modernen chemie inkl. Mw St. Versandkostenfrei BRD, A, CH.
- 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 and N. MABANA-MENDOZA, 2006. In vitro sensitivity of *Meloidogyne incognita* to

عصاره الکلی برگ و ریشه *Calea urticifolia* متعلق به خانواده کاسنی و عصاره ساقه *Tephrosia cinerea* از خانواده لگومینوز در بالاترین غلظت، بیشترین خاصیت نماتدکشی را نشان داد که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد.

با توجه به تأثیر مثبت و معنی‌دار تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ درصد از فرمولاسیون، روی کنترل نماتد و همچنین افزایش پارامترهای رویشی گیاه گوجه‌فرنگی در مقایسه با شاهد (فقط نماتد) و سایر تیمارها و از طرف دیگر، عدم وجود اختلاف معنی بین این تیمارها در اکثر صفات مورد بررسی، به نظر می‌رسد استفاده از غلظت ۱ درصد فرمولاسیون تهیه شده در شرایط آلودگی شدید و استفاده از غلظت ۰/۵ درصد در شرایط آلودگی کم می‌تواند مؤثر باشد.

نتایج Katooli et al. (2010) بالاترین فعالیت ضدنماتدی را در عصاره‌های الکلی برگ کرچک با ۶۱/۳۳ درصد و برگ درمنه با ۵۵/۶۷ درصد در غلظت ۱۰۰۰ppm نشان داده است. آن‌ها مشاهده کردند که اضافه کردن عصاره به گلدان‌ها، موجب کاهش فعالیت لارو و تفریح تخم نماتد شده است.

یکی از مهم‌ترین مزایای استفاده از فرمولاسیون‌های محلول در آب، به‌خصوص در کشت‌هایی که از مخازن بزرگ آبی و یا سیستم‌های آبیاری تحت فشار استفاده می‌کنند، این است که به‌راحتی و بر اساس حجم مخزن آب، می‌توان مقدار توصیه شده از آن را وارد مخزن آب نمود. در این صورت، مواد کنترل‌کننده نماتد به‌تدریج در اختیار گیاه قرار خواهد گرفت. اما در سیستم‌های زراعی باز مانند مزارع سیب زمینی و ... مصرف این نوع فرمولاسیون در خاک برای کنترل نماتد مشکل بوده و تلاش برای ساختن فرمولاسیون گرانوله از این گیاه می‌بایست در دستور کار قرار بگیرد. نتایج به دست آمده از آزمایشات گلخانه با نتایج تحقیقات سایر محققین ( Akhtar and Mahmood, 1994; Lashein, 2002; Azhar and Seddiq, 2007) که اثر نماتدکشی عصاره آبی قسمت‌های مختلف

- extracts from native yucatecan plants. *Nematropica*, 36 (1): 553-558.
- DUNCAN, D. B. 1955. Multiple range and multiple f. Tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
- ECHEVERRIGARAY, S., J. ZACARIA and R. BELTRAO, 2010. Nematicidal activity of monoterpenoids against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 100: 199-203.
- 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.
- 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 sciences* 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.
- LASHEIN, A. M. S. A. 2002. Biological control of root-knot nematode in some vegetable. M.Sc thesis Facultative Agricultural Cairo University, 107 pp.
- LEE, M. J. 1990. The effect of extracts of melia azedarach on *Meloidogyne incognita*. *Quarterly Journal of Chinese Forestry*, 20: 1-7.
- LI, H., L. PORDESIMO and J. WEISS, 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37: 731-738.
- MOOSAVI, M. R. 2015. Damage of the root-knot nematode *Meloidogyne javanicato* bell pepper, *Capsicum annum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, (5/6), 244–249.
- NOLLET, L. M. L. and H. S. RATHORE, 2015. *Biopesticides handbook*. Crc press, Taylor & Francis Group, llc.
- SOUTHEY, J. F. 1986. *Laboratory methods for work with plant parasitic nematodes*. Ministry of Agriculture, fisheries and food, sixth edition. Pp. 202.
- THEJAVATHI, R., R. SHIRISH, B. YAKKUNDI and B. RAVINDRANATH, 1995. Determination of azadirachtin by reversed-phased high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard. *Journal of Chromathography*, 705: 374-379.
- TRIPATHI, A. K. 2003. Process for insecticidal formulation effective in controlling malarial vector, Mosquitoes. Us: 6623766.