Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 50, No 2, Autumn & Winter 2019-2020 (143-158)
DOI: 10.22059/ijpps.2019.270778.1006868

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۸ (ص ۱۵۸-۱۴۳)

بررسی تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی فرمولاسیون نانوامولسیون برخی اسانس‌ها و یک عصاره گیاهی در سفیدبالک پنبه *Bemisia tabaci* (Gennadius)

علیرضا بلندنظر[1*]، محمد قدمیاری[2]، محمدرضا معمارزاده[3]، جلال جلالی سندی[4] و مریم ذولفقاری[5]
۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان و پژوهشگر مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج کاشان
۲، ٤ و ٥. دانشیار، استاد و دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۳. پژوهشگر، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج کاشان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۱۲)

چکیده

برخی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای خواص حشره‌کشی مطلوبی علیه سفیدبالک پنبه می‌باشند. در این مطالعه سمیت اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی، اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی فرموله‌شده به‌صورت جداگانه در توین۸۰ و به شکل نانوامولسیون روی پوره‌های سن دو سفیدبالک پنبه بررسی گردید. آزمون‌های زیست‌سنجی به‌روش غوطه‌ورسازی برگ‌های حاوی پوره سن دو انجام و مقادیر LC_{50} تخمین زده شد. مقادیر LC_{50} اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی، اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی در توین۸۰ به‌ترتیب ٤١٩٨، ٣٩٢٥، ٤٣١٢، ٩٦٢٦ و میزان LC_{50} نانوامولسیون این ترکیبات به‌ترتیب ۲۷۵۹، ۲۹۸۷، ۳۱۸۹، ٥٦٥٩ میلی‌لیتر بر لیتر به‌دست آمد. نتایج نشان داد که نانوامولسیون اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی بیشترین سمیت را روی پوره‌های مذکور دارند. همچنین در این تحقیق اثرات مخلوط اسانس‌ها و عصاره گیاهی فرموله‌شده روی برخی تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی سفیدبالک پنبه در حشرات تیمارشده با غلظت LC_{50} تیمار T_1 (امولسیون ترکیب‌شده از سه اسانس و عصاره فوق)، تیمار T_2 (امولسیون بر پایه عصاره آویشن باغی) و تیمار T_3 (امولسیون ترکیب‌شده از سه اسانس فوق) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون‌اس- ترانسفرازی تحت تأثیر تیمارهای T_1، T_2 و T_3 افزایش یافت؛ درصورتی‌که میزان فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز تغییر معنی‌داری را نشان نداد. میزان ذخایر انرژی (چربی، کربوهیدرات و پروتئین کل) در تیمار T_1 و T_3 نسبت به تیمار T_2 و شاهد، کاهش معنی‌داری داشتند؛ هرچند که میزان گلیکوژن کل تغییر معنی‌داری را بین تیمارها و شاهد نشان نداد. بنابراین تیمارهای T_1 و T_3، با القای سم‌زدایی در برخی از آنزیم‌های سم‌زدا و کاهش بعضی از ذخایر انرژی، اثر بیشتری را روی پارامترهای بیوشیمیایی پوره‌های سن دو سفیدبالک پنبه نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، اسانس، نانوامولسیون، حشره‌کش گیاهی، سفیدبالک پنبه.

Investigation of biochemical and enzymatic changes induced by emulsion and nanoemulsion formulations of some essential oils and an herbal extract on *Bemisia tabaci* (Gennadius)

Alireza Bolandnazar[1], Mohammad Ghadamyari[2], Mohammadreza Memarzadeh[3], Jalil Jalali Sandi[4] and Maryam Zolfaghari[4]
1. Ph.D. Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran and Researcher, University Campus and Barij Medicinal Plants Research Centre, Kashan, Iran
2, 4, 5. Associate Professor, Professor and Ph.D. Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran
3. Researcher, Barij Medicinal Plants Research Centre, Kashan, Iran
(Received: Dec. 9, 2018 - Accepted: Jun. 2, 2019)

ABSTRACT

Some essential oils and plant extracts have shown suitable insecticidal properties against the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. In this study, essential oils of rosemary, peppermint and eucalyptus and extract of thyme were formulated separately in Tween 80 as well as formulated in the form of nanoemulsion and bioassyed against 2nd instar nymphs of *B. tabaci*. The bioassay tests were done by leaf dip method on the leaves containing 2nd instar nymphs and LC_{50}s were determined. The LC_{50} of rosemary, peppermint, eucalyptus essential oils and thyme extract prepared in Tween 80 were estimated as 4198, 3925, 4312 and 9626 mL/L and LC_{50} of nanoemulsion of above items were estimated as 2759, 2987, 3189 and 5659 mL/L, respectively. The results showed that nanoemulsion of rosemary and peppermint essential oils have the highest toxicity on the 2nd instar nymphs of *B. tabaci*. Also, effects of combination of essential oils and extract formulation on biochemical and enzymatic changes were investigated with LC_{50} of T_1 (emulsified from essential oils and the extract), T_2 (extract emulsion) and T_3 (emulsification of essential oils). The amount of activities of esterases and glutathione s-transferases were increased in T_1, T_2 and T_3 treatments; while, the cholinesterase activity was not affected. The amount of energy reserves (total lipid, carbohydrate and protein) decreased significantly in T_1 and T_3 treatments; although the amount of total glycogen was not affected significantly by treatments. Therefore, T_1 and T_3 treatments showed a greater effect on the biochemical parameters, by induction of detoxification of some enzymes and reducing some of the energy reserves, in 2nd instar nymphs of sweet potato whitefly.

Keywords: Botanical insecticide, biochemical parameters, essential oil, nanoemulsion, sweet potato whitefly.

* Corresponding author E-mail: bolandnazar@yahoo.com

مقدمه

کاربرد بی‌رویه آفت‌کش‌های شیمیایی طی دهه‌های گذشته علاوه بر آلودگی محصولات، باعث مقاومت در آفات هدف و اثرات زیان‌بار بر سایر موجودات شده است. با توجه به نقش غیرقابل انکار آفت‌کش‌ها در کنترل آفات کشاورزی و چالش‌های ناشی از استفاده بی‌رویه از سموم، نیاز به معرفی ترکیباتی جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی احساس می‌شود. البته این ترکیبات علاوه بر دارابودن بقایای کم‌خطرتر در محیط، بایستی فعالیت آفت‌کشی قابل‌قبولی نیز در مقایسه با آفت‌کش‌های رایج داشته باشند (Isman, 2000). یکی از این ترکیبات جایگزین، مواد آفت‌کش با منشاء طبیعی هستند که می‌توانند در تولید غذای سالم و ارگانیک نقش داشته باشد. همچنین این مواد عموماً دوستدار محیط‌زیست محسوب می‌شوند و باعث صدمات کمتر به سلامت انسان، زیستگاه و اکوسیستم می‌شوند (Nollet & Rathore, 2017).

تاکنون خاصیت آفت‌کشی اسانس‌ها و عصاره گیاهان خانواده Myrtaceae، Lamiaceae، Asteraceae، Apiaceae و Rutaceae روی حشرات خاصی از راسته‌هایی مانند Lepidoptera، Coleoptera، Diptera، Isoptera و Hemiptera مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Tripathi *et al*., 2009). اسانس بسیاری از این گیاهان، طیف گسترده‌ای از فعالیت حشرات آفت و پاتوژن‌های بیماریزای قارچی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و دارای خاصیت حشره‌کشی، ضدتغذیه‌ای، دورکنندگی، ممانعت از تخم‌ریزی، تنظیم‌کنندگی رشد و فعّالیت‌های ضدناقلی هستند. همچنین این روغن‌ها دارای سابقه‌ای طولانی در محافظت از محصولات انباری هستند. برخی از ترکیبات این روغن‌ها نیز در سیستم عصبی اکتوپامینرژیک حشرات مداخله می‌کنند. ازآنجایی‌که این جایگاه هدف با جایگاه هدف پستانداران مشترک نیست، بیشتر ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها در آزمایش‌های سم‌شناسی (توکسیکولوژی) برای پستانداران و ماهی‌ها نسبتاً غیرسمّی هستند و در گروه آفت‌کش‌های با ریسک پایین قرار می‌گیرند. همچنین این مواد ممکن است به دلیل ایمنی‌شان برای موجودات غیرهدف و محیط‌زیست، به‌عنوان بخش جدایی‌ناپذیر مدیریت تلفیقی آفات (IPM) در آینده باشند (Nollet & Rathore, 2017).

علی‌رغم پتانسیل بالای اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی برای کنترل آفات، مشکلاتی در ارتباط با استفاده عملی و کاربردی این ترکیبات وجود دارد. در سال‌های اخیر، تکنیک میکرو و نانوکپسوله‌کردن به عنوان روشی جهت اثربخشی بیشتر و ارائه راهکاری برای رهاسازی کنترل‌شده حشره‌کش‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است. این فن‌آوری‌ها می‌توانند باعث اثربخشی حشره‌کش‌های گیاهی در مدت زمان طولانی‌تری شوند (Agrawal, 2011).

به‌طورکلی، امولسیون‌هایی که قطر ذرات آن‌ها در مقیاس نانومتری (حداکثر ۵۰۰ نانومتر) باشد، بر اساس نظر اکثر محققان نانوامولسیون خوانده می‌شوند (Gutierrez *et al*., 2008)؛ هرچند که ستاد توسعه فناوری نانو در ایران، اندازه ذرات حداکثر ۱۰۰ نانومتر را به عنوان فرمولاسیون نانو مورد توجه قرار می‌دهد. نانوامولسیون‌های اسانس در آب، حاوی قطرات کوچک اسانس با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند که در میان یک فاز پیوسته آبی پراکنده شده‌اند و هر قطره اسانس توسط مولکول‌های امولسیفایر به‌صورت لایه‌ای نازک احاطه شده است (Zare *et al*., 2011).

یکی از آفات مهم محصولات کشاورزی، باغی و گلخانه‌ای سفیدبالک پنبه *Bemisia tabaci* Gen. می‌باشد. این حشره از آفات مهم و پلی‌فاژ بوده و روی طیف وسیعی از محصولات کشاورزی در بسیاری از نقاط جهان به‌ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری فعالیت دارد. این آفت به‌ویژه در شرایط گلخانه‌ای روی گیاهان زینتی و محصولات گلخانه‌ای در جمعیت‌های خیلی زیاد دیده می‌شود (Oliveira *et al*., 2001). بر اساس تارنمای Arthropod Pesticide Resistance Database، تاکنون ۶۱۵ گزارش مقاومت به آفت‌کش‌ها در این گونه گزارش شده و در حال حاضر این آفت به ۶۵ ترکیب مقاوم شده است (Arthropod Pesticide Resistance Database, 2014). با توجه به پتانسیل بالای مقاومت سفیدبالک پنبه به آفت‌کش‌ها، لزوم معرفی ترکیباتی با پتانسیل مقاومت کم‌تر برای کنترل این آفت

احساس می‌شود که در این بین، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با توجه به داشتن ترکیباتی با شیوه اثر متنوع از اهمیت به‌سزایی در کنترل این آفت برخوردار هستند. معمولاً با توجه به پایداری کم اسانس‌های گیاهی در محیط‌های باز، غالب ترکیبات و اسانس‌های فرموله‌شده، قابل توصیه در محیط‌های بسته مانند گلخانه‌ها هستند (Moretti *et al*., 2002).

در برخی موارد از مخلوط اسانس‌های به‌دست‌آمده از گیاهان برای کنترل آفات استفاده می‌شود. به عنوان مثال EcoExempt™ که مخلوطی از اسانس‌های به‌دست‌آمده از گیاهان مختلف است به صورت تجارتی برای کنترل کک، مورچه، سوسری، گوشخیزک و آفات گیاهان زینتی به فروش می‌رسد و استفاده از مخلوط آن‌ها باعث شده تا کارایی‌شان در مقایسه با کاربرد تکی افزایش یابد (Tripathi *et al*., 2009). در مطالعه پیشین نگارندگان، اثر سه تیمار: T_1 (اسانس رزماری (۲ درصد)، نعناع فلفلی (۲ درصد) و اکالیپتوس (۲ درصد) و عصارهٔ آویشن باغی (۲۰ درصد))، T_2 (امولسیون بر پایه عصارهٔ آویشن باغی ۲۰ درصد) و T_3 (اسانس رزماری (۲ درصد)، نعناع فلفلی (۲ درصد) و اکالیپتوس (۲ درصد)) روی سفیدبالک پنبه بررسی و تیمار T_1 و T_3 به عنوان فراورده کاربردی در کنترل این آفت توصیه شدند (Bolandnazar *et al*., 2017).

به‌طورکلی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌توانند طیف گسترده‌ای از اثرات حاد (سریع) و زیرکشندگی (کند) را روی حشرات و بندپایان داشته باشند. این اثرات به دو دسته عمده رفتاری (دورکنندگی، جذب‌کنندگی (جلب‌کنندگی) و بازدارندگی؛ روی سیستم حس‌گر شیمیایی پیرامونی) و فیزیولوژیکی (سمیت، جلوگیری از رشد و اختلالات رشدی) تقسیم می‌شوند (Nollet & Rathore, 2017). در مطالعه پیشین نگارندگان، فقط به اثر سمیت ترکیبات فوق اشاره‌شده و در مورد اثرات زیرکشندگی و بیوشیمیایی آن‌ها روی این آفت بررسی صورت نگرفته است (Bolandnazar *et al*., 2017). درحالی‌که در برخی از پژوهش‌ها، به شیوه تأثیر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی پرداخته شده و مکانیسم احتمالی تأثیر آن‌ها نیز بررسی شده است (Negahban *et al*., 2013).

در این تحقیق ابتدا با توجه به مطالعات قبلی سه اسانس رزماری، نعناع فلفلی و اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی که دارای اثرات حشره‌کشی ثابت‌شده بودند، جهت مطالعه انتخاب شدند (Aziziyan *et al*., 2014; Sarraf Moayyeri *et al*., 2015; Bolandnazar *et al*., 2017; Riazi *et al*., 2015). سپس با افزودن امولسیفایر و مواد ویژه با روش کم‌انرژی (یکی از روش‌های نانوامولسیون‌کردن مواد)، در شرایط محیطی متعارف و با هموژنایزر در دور معمولی و با دمای کم، مخلوط‌هایی ایجاد شدند که پس از چندین بار تولید و آزمون، بالاخره تشکیل نانوامولسیون را دادند. روش کم‌انرژی یکی از روش‌های تولید نانوامولسیون است که در آن می‌توان با تنظیم تعداد سورفکتانت (عامل کم‌کننده کشش سطحی) یا مجموع سورفکتانت‌ها با حلّال و کمک‌حلّال، به بهترین امولسیون از لحاظ سایز ذرات (میکرو و نانوامولسیون) رسید. علت استفاده از روش کم‌انرژی، سهولت کار و کم‌هزینه‌بودن آن است که باعث می‌شود تولید انبوه و صنعتی این مواد به عنوان یک حشره‌کش گیاهی تجاری، در آینده مقرون به‌صرفه باشد.

همچنین در این مطالعه اثرات زیرکشندگی، غلظت LC_{50} تیمارهای T_1، T_2 و T_3 روی پارامترهای بیوشیمیایی سفیدبالک پنبه شامل میزان فعالیت استرازی، گلوتاتیون‌اس-ترانسفرازی و کولین‌استرازی و میزان ذخایر انرژی اندازه‌گیری شد. هدف از انجام این آزمون‌ها بررسی اثر زیرکشندگی روی حشرات زنده به‌جای‌مانده از اعمال تیمارها و مشخص‌شدن تأثیر این حشره‌کش‌ها روی شاخص‌های بیوشیمیایی بدن حشره (با بررسی امکان القای سم‌زدایی به برخی از آنزیم‌های سم‌زدا و بررسی مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و بررسی میزان ذخایر انرژی) و به دنبال آن اثر روی فیزیولوژی این حشرات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاهان، استخراج ترکیبات و تجزیه شیمیایی اسانس‌ها و عصاره

جمع‌آوری گیاهان

پس از جمع‌آوری چهار گیاه مختلف که خاصیت دارویی

شناخته‌شده‌ای دارند، اسانس‌گیری از گیاهان رزماری، *Rosmarinus officinalis* L.، نعناع فلفلی *Mentha piperita* L. و اکالیپتوس *Eucalyptus globules* L. و عصاره‌گیری از گیاه آویشن باغی *Thymus vulgaris* L. با دستگاه‌های مخصوص انجام و شناسایی ترکیبات موجود در آن‌ها با استفاده از دستگاه‌های آنالیز فیتوشیمیایی انجام شد (Bolandnazar *et al.*, 2017). علت انجام این آزمون‌ها این بود که ممکن است مواد موجود در گیاهان و میزان آن‌ها، در شرایط مختلف آب و هوایی و اقلیم‌های مختلف، متفاوت باشند لذا ترکیبات موجود در اسانس‌ها و عصاره گیاهی و میزان آن‌ها باید کاملاً مشخص شوند.

استخراج ترکیبات و گرفتن اسانس‌ها و عصاره از آن‌ها

اسانس‌های سه گیاه اول با روش تقطیر با آب تهیه شدند؛ به صورتی که تمامی گونه‌های گیاهی خشک و پودرشده و به نسبت ۱ به ۵ وزنی- وزنی با آب مخلوط شده و به‌مدت ۴ ساعت در دستگاه کلونجر قرار گرفتند. عصاره آویشن باغی نیز به نسبت ۱ کیلوگرم گیاه خشک و پودرشده به ۴ کیلوگرم حلّال (اتانل ۳۵ درصد) و با استفاده از دستگاه پرکولاتور به مدت ۲۴ ساعت استخراج گردیدند. نسبت عصاره به‌دست‌آمده، ۱ به ۲ وزنی- وزنی (۱ کیلوگرم گیاه خشک ۲ کیلوگرم عصاره مایع) بود. عصاره به همان صورت مایع در فرمولاسیون‌ها استفاده شد (Bolandnazar *et al.*, 2017).

فرمولاسیون ترکیبات گیاهی و آزمون‌های مختلف آن‌ها

در این مطالعه مواد به سه حالت فرموله شدند و در سه مرحله مورد آزمون قرار گرفتند: در مرحله اول اسانس‌ها و عصاره به‌صورت جداگانه در توین ۸۰ مخلوط شدند و تولید امولسیون معمولی (ماکروامولسیون) نمودند. در این حالت توین ۸۰ نقش امولسیفایر (امولسیون‌کننده) داشت و به نسبت ۴/۵ درصد با مواد مخلوط شد. میزان اسانس‌ها در فرمول‌های این مرحله ۲۰ درصد و میزان عصاره ۱۰۰ درصد بود. در مرحله دوم اسانس‌ها و عصاره به صورت جداگانه و به شکل نانوامولسیون فرموله شدند. میزان اسانس‌ها در فرمول‌های این مرحله نیز ۶ درصد و میزان عصاره ۱۰۰ درصد بود. در مرحله سوم اسانس‌ها و عصاره به شکل ترکیبی و به صورت میکرو و نانوامولسیون فرموله گردیدند. میزان مجموع اسانس‌ها در این مرحله نیز ۶ درصد و میزان عصاره در فرمولاسیون‌های ترکیبی۲۰ درصد بود. موادی که در ساخت فرمولاسیون‌های مرحله دوم و سوم به کار گرفته شد، شامل موارد زیر بود: عامل امولسیون‌کننده (امولسیفایر) یا سورفکتانت: توین۸۰ (۴/۵ درصد)، عامل چسباننده: پلی ونیل پیرولیدون یا PVP-K30 (۵/۲ درصد)، حلّال هیدروالکلی ۵۵ درجه: ۲۰ درصد، ماده مؤثره: انواع اسانس‌ها و عصاره گیاهی: به درصد ذکرشده در فرمولاسیون‌ها، پایه روغن گیاهی: روغن آفتابگردان (۱۸/۳ درصد) و آب مقطر: تا ۱۰۰ درصد (Bolandnazar *et al.*, 2017).

روش ساخت به‌طور خلاصه به این صورت بود: حلّال الکلی ۵۵ درصد، مخلوط اسانس‌ها و عصاره، امولسیفایر و روغن آفتابگردان مخلوط شده و سپس فاز روغنی با فاز آبی حاوی آب مقطر و پلی‌ونیل پیرولیدون مخلوط شدند تا ترکیب یکنواختی به دست آید. با انتخاب نوع مواد فوق، تغییر درصد مواد بالا در محدوده مشخص و بررسی و محاسبهٔ اثرات شیمیایی آن‌ها و تغییر نسبت این مواد در فرمولاسیون نهایی در هنگام فرموله‌کردن، نانوامولسیون‌های موردنظر با شکل و دوام مناسب ایجاد شد. تمامی مواد شیمیایی از شرکت MERCK آلمان خریداری شد و مورد استفاده قرار گرفت. تمام فرمولاسیون‌ها در واحد فرمولاسیون مرکزتحقیقات گیاهان دارویی باریج (وابسته به شرکت داروسازی باریج اسانس) فرموله شدند. پس از فرموله‌کردن مواد، اندازه ذرات با دستگاه Dynamic Light Scattering (DLS) تعیین شدند (Mirmajidi & Abbasi, 2013; Bolandnazar *et al.*, 2017). اندازه‌گیری با دستگاه DLS جهت مشخص‌شدن این مطلب که ذرات فرموله‌شده، تولید نانوامولسیون می‌کنند، انجام می‌شود (Mirmajidi & Abbasi, 2013).

آزمون‌های زیست‌سنجی

آزمون‌های اولیه به‌روش غوطه‌ورسازی برگ‌های حاوی پوره سن دو انجام شد (Horowitz *et al.*, 2004). غلظت‌های مؤثر برای آزمون‌های تخمین کشندگی ۵۰ درصد (LC_{50}) برای تیمارهای فرموله‌شده گیاهی طی

آزمون مقدماتی تعیین شد. در آزمون مقدماتی غلظت‌هایی که تلفاتی در بازهٔ ۲۰ تا ۹۰ درصد ایجاد می‌کردند، مشخص و در آزمون نهایی استفاده شد (Robertson *et al.*, 2007). واحدهای آزمایشی شامل برگ‌های نشاندار روی بوته‌های خیار بود که تعداد پوره‌های سن دو روی آن‌ها شمارش می‌شدند؛ سپس برگ‌های نشان‌دار به همان صورتی‌که به بوته اصلی اتصال داشتند، به آرامی به مدت ۵ ثانیه در ۵ غلظت متفاوت (۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میلی‌لیتر بر لیتر) محلول‌های سمی فرو برده شدند و میزان پوره‌های سن دو مرده بعد از ۲۴ ساعت شمارش گردیدند. در این آزمایش‌ها پوره‌های سن دو که بی‌تحرک بودند و با نزدیک‌کردن قلم‌موی شتر نازک هیچ حرکتی نشان نمی‌دادند، مرده تلقی شدند (Choi *et al.*, 2003).

آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های بیوشیمیایی با مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده: T_1 (امولسیون ترکیب‌شده از سه اسانس رزماری (۲درصد)، نعناع فلفلی (۲درصد) و اکالیپتوس (۲درصد) و عصارهٔ آویشن باغی (۲۰ درصد))، T_2 (امولسیون بر پایه عصارهٔ آویشن باغی (۲۰ درصد)) و T_3 (امولسیون ترکیب‌شده از اسانس رزماری (۲درصد)، نعناع فلفلی (۲درصد) و اکالیپتوس (۲درصد)) روی پوره‌های سن دوم هم‌سن انجام شد. پوره‌های سن دوم این حشره با غلظت LC_{50} و با روش غوطه‌وری برگ در محلول سمی تیمار شدند (Horowitz *et al.*, 2004). حشرات تیمارشده به اتاقک پرورش (دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) منتقل شدند. ۲۴ ساعت بعد از تیمار، نمونه‌های زنده‌مانده برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی استفاده شدند. به منظور رقیق‌کردن فرمولاسیون‌های موردنظر و نیز در شاهد، از آب مقطر استفاده شد.

از پوره‌های سن دومی که در روش فوق، زنده مانده بودند به‌طور تصادفی نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌های جمع‌آوری شده در داخل فریزر ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی نگهداری شدند. نمونه‌ها در زمان مناسب به آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان انتقال داده شد. در این آزمایش‌ها، کل بدن با آب مقطر و با استفاده از هموژنایزر دستی، همگن شده و پس از سانتریفیوژ در شرایط مختلف (بسته به نوع آزمون)، بخش رویی و ته‌نشین حاصل، با توجه به نوع آزمون، مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه نمونه برای اندازه‌گیری آنزیم‌های سم‌زدا

برای تعیین فعالیت آنزیم‌های استراز و استیل کولین استراز، ۱۰۰ پوره سن دو در ۱۵۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH ۷ و حاوی ۰/۰۵ درصد (v/v) ترایتون X-100) با استفاده از هموژنایزر دستی شیشه‌ای، روی یخ همگن شد. سپس نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ با دور g× ۱۲۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول رویی به‌عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس- ترنسفراز، آماده‌سازی نمونه‌ها مشابه آنزیم‌های استراز انجام شد با این تفاوت که در این مورد، از بافر فسفات فاقد ترایتون X-100 استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های استراز

فعالیت آنزیم‌های استراز براساس روش Van Asperen (1962) اندازه‌گیری شد. به این منظور دو سوبسترای آلفا-نفتیل استات (α-NA) و بتا-نفتیل استات (β-NA) مورد استفاده قرار گرفت. ۱۲ میکرولیتر آنزیم به چاهک پلیت الایزا حاوی ۱۱۳ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH ۷) اضافه شد. بعد از ۳ دقیقه با اضافه‌کردن ۵۰ میکرولیتر سوبسترا (۱/۸ mM) واکنش آغاز شد. پس از اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر محلول نمک فاست بلو آرآر (Fast blue RR) (۰/۰۷۵ درصد)، جذب آلفا- نفتول و بتا- نفتول تولیدشده، به‌ترتیب در ۴۵۰ و ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله میکروپلیت ریدر (Awareness Technology Inc., Florida, USA) به صورت سینتیک (هر ۲۰ ثانیه) خوانده شد. فعالیت آنزیم‌های استراز به‌صورت $\mu mol.min^{-1} mg\ protein^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون اس- ترنسفراز

برآورد میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز

مطابق با روش Habig *et al.* (1974) و با استفاده از سوبسترای CDNB (۱-کلرو۲و۴-دی نیترو بنزن) انجام شد. ۱۵ میکرولیتر آنزیم، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا (۱/۲ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر گلوتاتیون GSH (۱۰ میلی‌مولار) در پلیت الایزا ریخته شد. میزان جذب در ۳۴۰ نانومتر به وسیله‌ی میکروپلیت ریدر به‌صورت سینتیک (هر ۲۰ ثانیه) خوانده شد. فعالیت GST به‌صورت $\mu mol.min^{-1} mg\ protein^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت کولین استرازی

فعالیت این آنزیم در حشرات طبق روش Ellman *et al.* (1961) و با استفاده از سوبسترای استیل تیوکولین آیوداید اندازه‌گیری شد. فعالیت این آنزیم به صورت $\mu mol.min^{-1} mg\ protein^{-1}$ محاسبه شد.

تهیه نمونه برای ارزیابی ذخایر انرژی

برای ارزیابی میزان ذخایر انرژی (چربی، کربوهیدرات و گلیکوژن کل)، ابتدا ۱۰۰ پوره سن دو تیمارشدهٔ زنده در ۵۰ میکرولیتر Na_2SO_4 (۲ درصد) همگن شد. پس از این مرحله، ۱۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم: متانول (به نسبت حجمی ۱:۲) به مخلوط اضافه شد و سپس مخلوط حاصل در دور g × ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. چربی و کربوهیدرات کل در محلول رویی حاصل ارزیابی شد و برای اندازه‌گیری محتوای گلیکوژن از ته‌نشین (رسوب) استفاده شد. برای تعیین مقادیر هر یک از ذخایر انرژی ابتدا مقادیر خالص معرف‌های آن‌ها از شرکت MERCK آلمان خریداری و سپس بر اساس نمودار منحنی استاندارد برای هر کدام از آن‌ها تعیین گردید. واحد اعداد به‌دست‌آمده در مورد تمامی ذخایر انرژی، میلی‌گرم بر گرم وزن پوره سن دو بود.

اندازه‌گیری مقدار چربی کل

برای اندازه‌گیری میزان چربی کل، ۱۲۵ میکرولیتر از محلول رویی تهیه‌شده به میکروتیوپ جدید منتقل و در آون (۴۰ درجه سلسیوس، ۱۰ ساعت) قرار داده شد تا خشک شود. سپس ۱۲۵ میکرولیتر H_2SO_4 به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. پس از این مرحله، ۳۰ میکرولیتر نمونه با ۲۷۰ میکرولیتر معرف وانیلین مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد. سپس جذب توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Yuval *et al.*, 1998).

اندازه‌گیری مقدار کربوهیدرات کل

برای اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات، ۱۵۰ میکرولیتر محلول رویی، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰۰ میکرولیتر معرف آنترون در یک میکروتیوپ ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس جذب توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کربوهیدرات کل در هر لارو از طریق منحنی استاندارد رسم شده با مالتوز محاسبه شد (Yuval *et al.*, 1998).

اندازه‌گیری مقدار گلیکوژن کل

رسوب‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری میزان گلیکوژن، دو مرتبه با ۴۰۰ میکرولیتر متانول (۸۰ درصد) شسته شد و سپس ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. مخلوط حاصل در دور g× ۸۰۰۰ و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله، معرف آنترون به محلول رویی اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سلسیوس حرارت دیدند و پس از سردشدن، جذب توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل

برای تعیین مقدار پروتئین کل، ۱۰ میکرولیتر محلول رویی به ۵۰۰ میکرولیتر معرف بردفورد اضافه شده و میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین از منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف و مشخص آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

آنالیز آماری آزمون‌های بیوشیمیایی

تمامی آزمایش‌های بیوشیمیایی حداقل در سه تکرار

انجام شد و مقایسه بین تیمارها با روش واریانس (ANOVA) انجام شد. آنالیزهای آماری با استفاده از آزمون توکی در سطح ۰/۰۵ درصد و با نرم‌افزار SPSS Version:22 انجام گردید.

نتایج

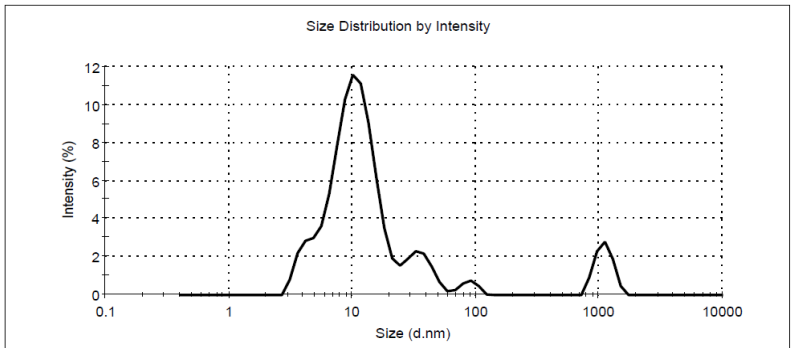
تعیین اندازه ذرات ترکیبات فرموله‌شده

اندازه قطر ذرات با هدف تعیین میکرو یا نانوامولسیون بودن ترکیبات فرموله‌شده تعیین شد. نتایج آزمون DLS در شکل‌های ۱ تا ۴ نشان داده شده است.

نتایج آزمایش‌های زیست سنجی

مقادیر LC_{50} اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی، اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی فرموله‌شده با توین ۸۰ (امولسیون معمولی) و همچنین به صورت نانوامولسیون به صورت میلی‌گرم بر لیتر برآورد شد (جدول ۱). با توجه به این نتایج، سمیت اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی، اکالیپتوس با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند؛ اما سمیت آن‌ها از سمیت عصاره آویشن باغی بیشتر بوده است. همچنین سمیت ترکیبات فرموله‌شده با روش کم‌انرژی (نانوامولسیون) از سمیت اسانس‌های فرموله‌شده با توین ۸۰ (امولسیون معمولی) بیشتر بود.

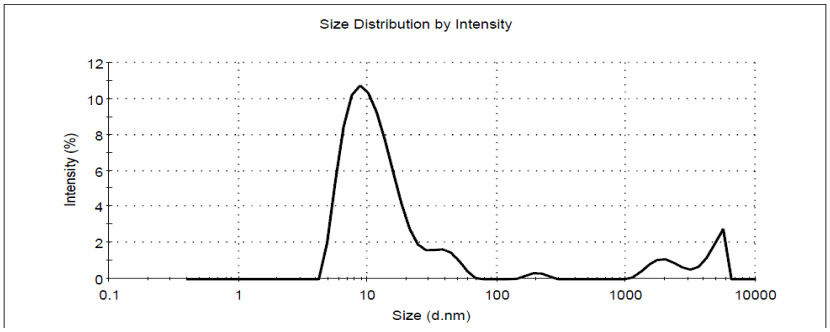
			Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm):	87.3	Peak 1:	10.5	79.3	4.47
PdI:	0.341	Peak 2:	35.0	10.1	8.20
Intercept:	0.857	Peak 3:	1090	8.2	173



شکل ۱. طیف اندازه ذرات اسانس رزماری فرموله‌شده با روش کم‌انرژی که از ۱۰۰ نانومتر کمتر بوده و تشکیل نانوامولسیون داده است.

Figure 1. Size spectrum in rosemary essential oil formulated with low-energy method which particles under 100 nanometer can be found and make nanoemulsion form.

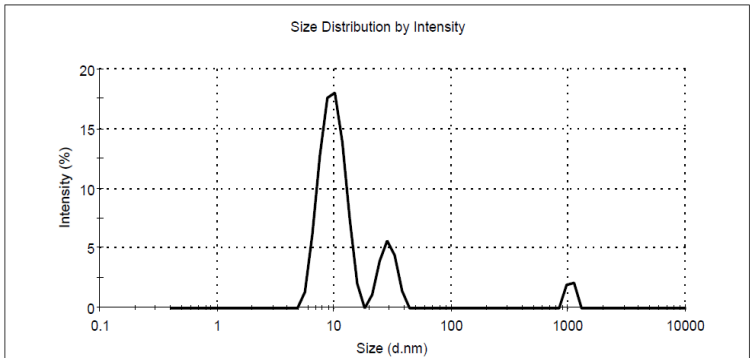
			Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm):	18.1	Peak 1:	11.2	78.8	5.10
PdI:	0.222	Peak 2:	39.0	7.7	9.12
Intercept:	0.859	Peak 3:	4740	7.0	808



شکل ۲. طیف اندازه ذرات اسانس نعناع فلفلی فرموله‌شده با روش کم‌انرژی که از ۱۰۰ نانومتر کمتر بوده و تشکیل نانوامولسیون داده است.

Figure 2. Size spectrum in peppermint essential oil formulated with low-energy method which particles under 100 nanometer can be found and make nanoemulsion form.

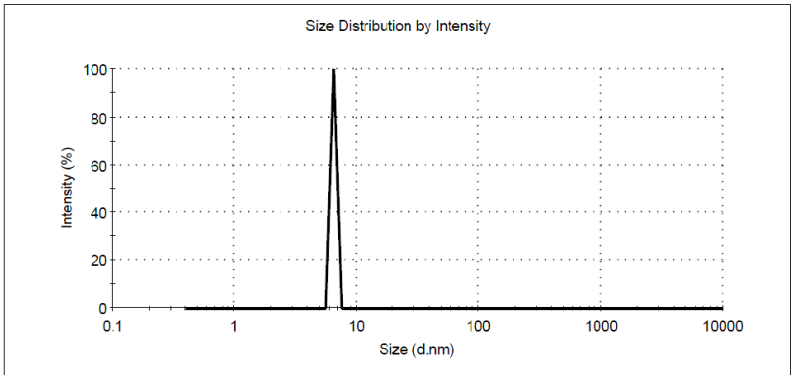
			Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm):	99.8	Peak 1:	9.77	79.3	2.26
PdI:	0.247	Peak 2:	28.8	16.6	4.47
Intercept:	0.795	Peak 3:	1030	4.1	75.4



شکل ۳. طیف اندازه ذرات اسانس اکالیپتوس فرموله‌شده با روش کم‌انرژی که از ۱۰۰ نانومتر کمتر بوده و تشکیل نانوامولسیون داده است.

Figure 3. Size spectrum in eucalyptus essential oil formulated with low-energy method which particles under 100 nanometer can be found and make nanoemulsion form.

			Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm):	1.39e4	Peak 1:	6.50	100.0	8.43e-8
PdI:	0.190	Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Intercept:	0.501	Peak 3:	0.00	0.0	0.00



شکل ۴. طیف اندازه ذرات عصاره آویشن باغی فرموله‌شده با روش کم‌انرژی که از ۱۰۰ نانومتر کمتر بوده و تشکیل نانوامولسیون داده است.

Figure 4. Size spectrum in thyme extract formulated with low-energy method which particles under 100 nanometer can be found and make nanoemulsion form.

جدول ۱. مقایسه نتایج LC_{50} اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی و اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی فرموله‌شده با تویین ۸۰ (امولسیون) و نانوامولسیون

Table 1. Comparison of LC_{50} results of Rosemary, Peppermint and Eucalyptus essential oils and Thyme extract formulated with Tween 80 (emulsion) and nanoemulsion

Treatment	LC_{50} (mL/L) of formulated with Tween 80 (emulsions)	LC_{50} (mL/L) of nanoemulsions
Rosemary essential oil	4198	2759
Peppermint essential oil	3925	2987
Eucalyptus essential oil	4312	3189
Thyme extract	9626	5659

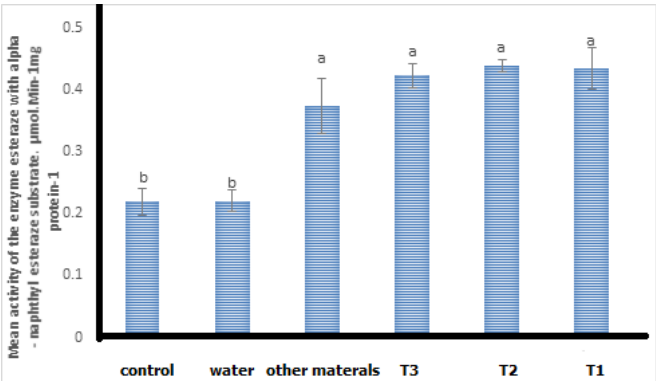
نتایج آزمون بیوشیمیایی اثر مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده روی پوره سن دوم سفیدبالک پنبه

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا

اثر مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده روی فعالیت آنزیم‌های استراز

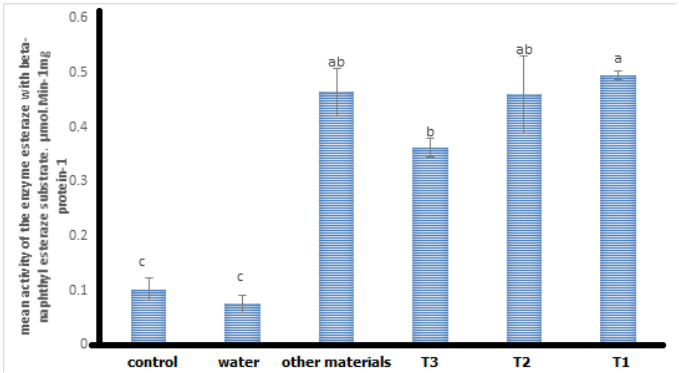
نتایج مقایسه میانگین و تجزیه واریانس داده‌های حاصل از فعالیت آنزیم‌های استراز با سوبسترای آلفا-نفتیل استات α-NA و بتا- نفتیل استات β-NA نتایجی به شرح زیر داشت. سطح فعالیت این آنزیم در تمام تیمارهای انجام‌گرفته نسبت به شاهد و آب اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. نتایج نمودار زیر نشان می‌دهد که تیمارهای اعمال‌شده به‌وسیله عصاره (T_2)، مجموع اسانس و عصاره (T_1)، مواد همراه و مجموع اسانس (T_3) همگی به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد و آب، منجر به افزایش آنزیم آلفا-نفتیل استراز شده و این افزایش در بین تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری ندارد. در کل تیمارهای اعمال‌شده روی فعالیت این آنزیم اثرگذار هستند (شکل ۵).

نمودار زیر اثر تیمارهای اعمال‌شده روی آنزیم بتا نفتیل استراز را روی پوره‌های سن دوم سفیدبالک پنبه نشان می‌دهد. نتایج بیان‌گر این مطلب است که بیشترین تأثیر روی این آنزیم مرتبط با تیمار مجموعه اسانس و عصاره (T_3) است و این تیمار با تیمارهای عصاره (T_2) و مواد همراه که به ترتیب در رتبه‌های بعدی فعالیت این آنزیم قرار گرفته‌اند، اختلاف معنی‌داری دارد. تیمار مرتبط با آب و شاهد نیز به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها قرار داشته وکمترین فعالیت آنزیم بتا نفیل استراز را از خود نشان دادند. در کل تیمارهای اعمال‌شده روی فعالیت این آنزیم نیز اثرگذار هستند.



شکل ۵. میانگین فعالیت ویژه آنزیم استراز با سوبسترای آلفا- نفتیل استات روی پوره‌های سن دوم سفیدبالک پنبه تیمارشده. تیمارهای دارای حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد در آزمون توکی هستند.

Figure 5. Mean activity of the enzyme esterase with α-naphthyl esterase substrate on treated 2th nymphs of sweet potato whitefly. Treatments with different letters have a significant difference in 0.05% level in the Tukey test.



شکل ۶. میانگین فعالیت ویژه آنزیم استراز با سوبسترای بتا- نفتیل استراز روی پوره‌هاس سن دوم سفیدبالک پنبه تیمارشده. تیمارهای دارای حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد در آزمون توکی هستند.

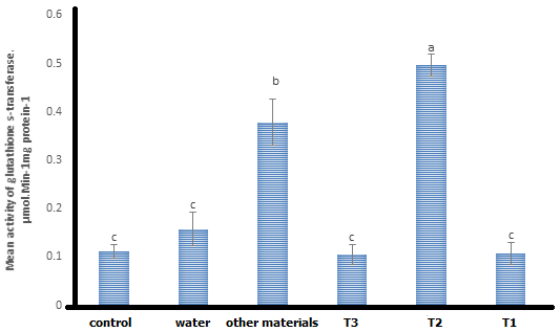
Figure 6. Mean activity of the enzyme esterase with β-naphthyl esterase substrate on treated 2th nymphs of Sweet potato whitefly. Treatments with different letters have a significant difference in 0.05% level in the Tukey test.

اثر مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده روی فعالیت گلوتاتیون اس- ترنسفراز

نتایج مقایسه میانگین‌ها در مورد فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز نیز نتایج مشابه با آنزیم‌های استراز نشان داد. به‌طوری‌که سطح فعالیت این آنزیم در تیمار عصاره به تنهایی (T_2) به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها منجر به افزایش فعالیت این آنزیم شده، همچنین تیمار مواد همراه نیز در رتبه بعدی فعالیت این آنزیم قرار داشته و افزایش معنی‌دار آن را به همراه داشته است. نکته جالب توجه در مورد این آنزیم عدم تغییر فعالیت آن در زمانی است که تیمار مجموع اسانس‌ها (T_1) و مجموع اسانس و عصاره (T_3) به کار گرفته شده است و فعالیت آنزیم در این حالت تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و آب از خود نشان نمی‌دهد (شکل ۷).

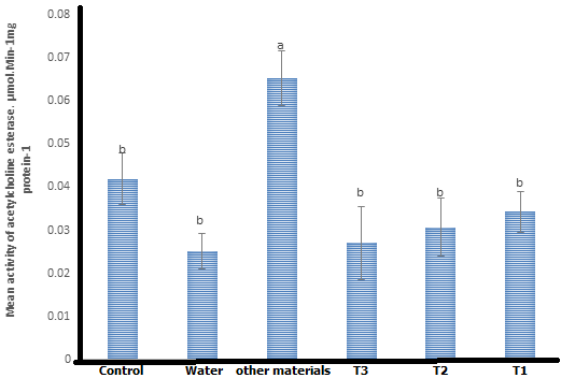
اثر مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در مورد فعالیت آنزیم استیل کولین استرازی بین شاهد و تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و فقط سطح فعالیت آنزیم استیل کولین استرازی در تیمار مواد همراه به طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت آنزیم شده و در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با شاهد و آب مقطر در میزان فعالیت این آنزیم مشاهده نشد (شکل ۸). نمودار پایین نشان‌می‌دهد که ترکیبات مورد استفاده در این تیمارها نقش اساسی و مهمی در مهار آنزیم استیل کولین استراز نداشته است. علت این که سطح فعالیت این آنزیم در تیمار مواد همراه، به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت آنزیم شده مشخص نیست و احتیاج به بررسی‌های بیشتر دارد.



شکل ۷. میانگین فعالیت ویژه آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز روی پوره‌هاس سن دوم سفیدبالک پنبه تیمارشده. تیمارهای دارای حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد در آزمون توکی هستند.

Figure 7. Mean activity of glutathione S-transferase on treated 2th nymphs Sweet potato of whitefly. Treatments with different letters have a significant difference in 0.05% level in the Tukey test.



شکل ۸. مقایسه میانگین فعالیت ویژه آنزیم استیل کولین استرازی روی پوره‌های سن دوم سفید بالک پنبه تیمار شده. تیمارهای دارای حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد در آزمون توکی هستند.

Figure 8. Mean activity of Acetylcholine esterase enzyme on treated 2th nymphs of Sweet potato whitefly. Treatments with different letters have a significant difference in 0.05% level in the Tukey test.

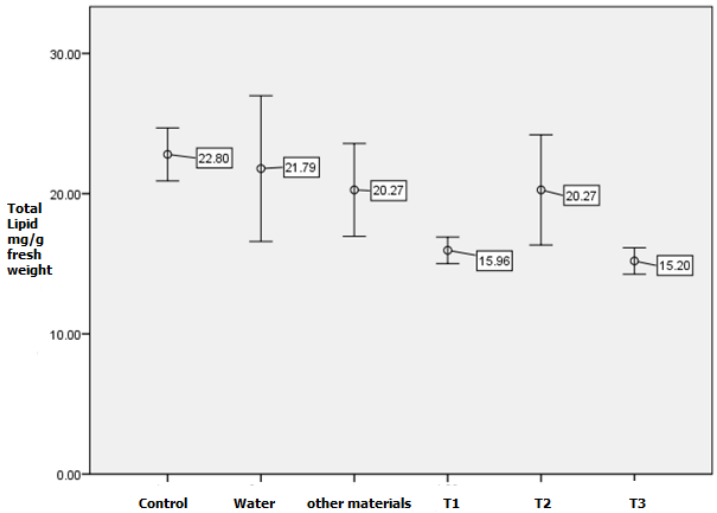
نتایج ارزیابی اثر مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده روی ذخایر انرژی پوره‌هاس سن دوم سفیدبالک پنبه

مقدار چربی کل

در تیمارهای T_1 (مجموع اسانس‌ها) و T_3 (مجموع اسانس‌ها و عصاره)، برخلاف شاهد (بدون هیچ تیماری)، آب مقطر، مواد جانبی بدون اسانس و عصاره و تیمار T_2 (فقط عصاره)، کاهش معنی‌داری در میزان چربی کل در حشرات تیمارشده در سطح ۰/۰۵ درصد ایجاد می‌شود ($p=0.000, df_{BG}=5, df_{WG}=12, F=18.218$) (شکل ۹).

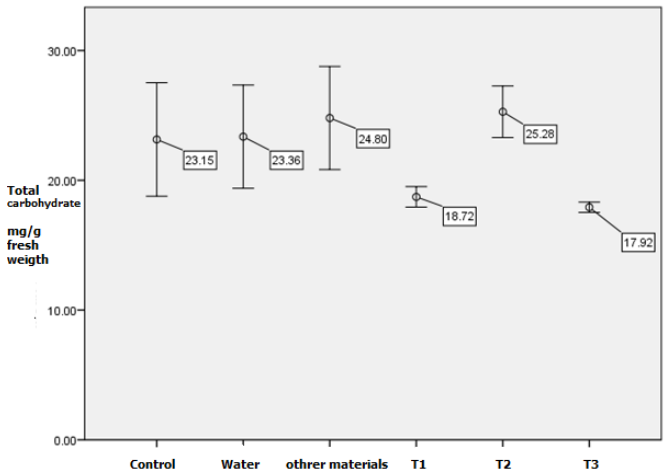
مقدار کربوهیدرات کل

اندازه‌گیری میزان محتوای کربوهیدرات کل نیز نشان داد که در تیمارهای T_1 (مجموع اسانس‌ها) و T_3 (مجموع اسانس‌ها و عصاره)، برخلاف شاهد (بدون هیچ تیماری)، آب مقطر، مواد جانبی بدون اسانس و عصاره و تیمار T_2 (فقط عصاره)، کاهش معنی‌داری در میزان کربوهیدرات کل در حشرات تیمارشده در سطح ۰/۰۵ درصد ایجاد می‌شود ($p=0.000, df_{BG}=5, df_{WG}=12, F=19.580$) (شکل ۱۰).



شکل ۹. میانگین میزان چربی کل با فاصله اطمینان ۹۵ درصد در شاهد و پوره‌های سن دوم سفیدبالک پنبه تیمار شده با مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده. واحد اعداد میلی‌گرم بر گرم پوره سن دو می‌باشد.

Figure 9. Mean total lipid concentration with 95% confidence interval in control and treated 2th instar nymphs of Sweet potato whitefly with formulated mixture of essential oils and extract. Number unit is Mean mg/g 2th instar nymph.



شکل ۱۰. میزان کربوهیدرات کل با فاصله اطمینان ۹۵ درصد در شاهد و پوره‌هاس سن دوم سفیدبالک پنبه تیمار شده با مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده. واحد اعداد میلی‌گرم بر گرم پوره سن دو می‌باشد.

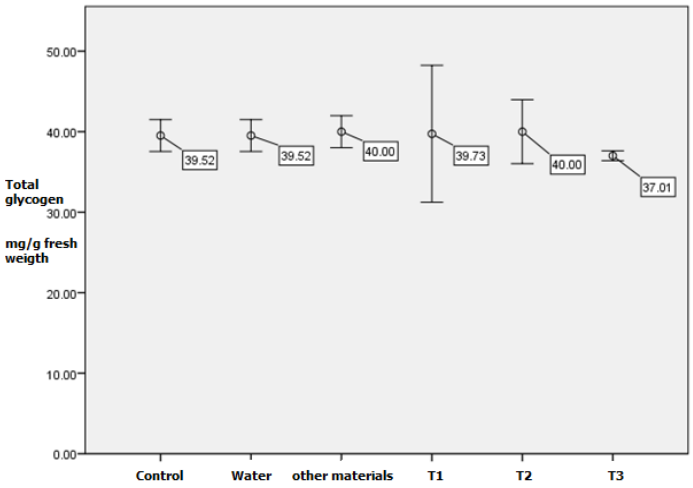
Figure 10. Mean total carbohydrate concentration with 95% confidence interval in control and treated 2th instar nymphs of Sweet potato whitefly with formulated mixture of essential oils and extract. Number unit is Mean mg/g 2th instar nymph.

مقدار گلیکوژن کل

محتوای گلیکوژن حشرات تیمارشده و شاهد در سطح ۰/۰۵ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p=0.280$, $df_{BG}=5$, $df_{WG}=12$, $F=1.439$) (شکل ۱۱).

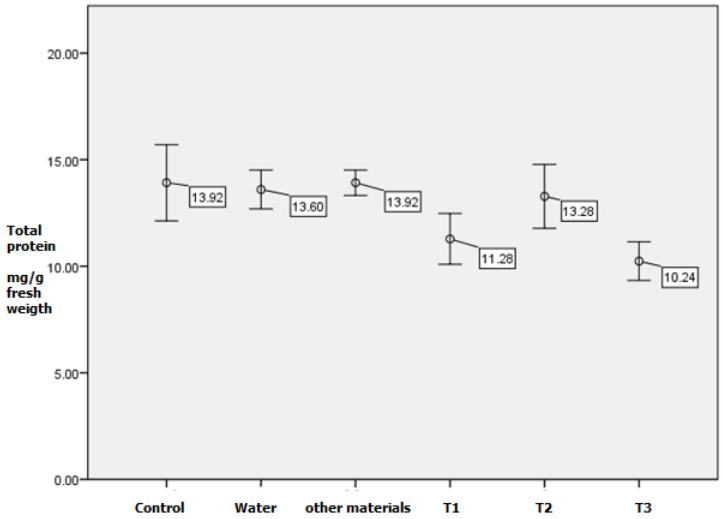
مقدار پروتئین کل

تیمارهای T_1 (مجموع اسانس‌ها) و T_3 (مجموع اسانس‌ها و عصاره)، کاهش معنی‌داری در میزان پروتئین کل در حشرات تیمارشده در سطح ۰/۰۵ درصد را برخلاف شاهد (بدون هیچ تیماری)، آب مقطر، مواد جانبی بدون اسانس و عصاره و تیمار T_2 (فقط عصاره) نشان دادند ($p=0.000$, $df_{BG}=5$, $df_{WG}=12$, $F=30.477$) (شکل۱۲).



شکل ۱۱. میزان گلیکوژن کل با فاصله اطمینان ۹۵ درصد در شاهد و پوره‌هاس سن دوم سفیدبالک پنبه تیمار شده با مخلوط اسانس‌ها و عصاره فرموله‌شده. واحد اعداد میلی‌گرم بر گرم پوره سن دو می‌باشد.

Figure 10. Mean total glycogen concentration with 95% confidence interval in control and treated 2th instar nymphs of Sweet potato whitefly with formulated mixture of essential oils and extract. Number unit is Mean mg/g 2th instar nymph.



شکل ۱۲. میزان پروتئین کل با فاصله اطمینان ۹۵ درصد (۱: شاهد ۲: آب مقطر ۳: مواد جانبی بدون اسانس و عصاره ۴: تیمار T_1 (مجموع اسانس‌ها) ۵: تیمارT_2 (فقط عصاره) ۶: تیمارT_3 (مجموع اسانس‌ها و عصاره). واحد اعداد میلی‌گرم بر گرم پوره سن دو می‌باشد.

Figure 10. Mean total protein concentration with 95% confidence interval in control and treated 2th instar nymphs of Sweet potato whitefly with formulated mixture of essential oils and extract. (1: control 2: distilled water 3: other material without essential oils & extract 4: T_1 (essential oils) 5: T_2 (extract) 6: T_3 (essential oils & extract). Number unit is Mean mg/g 2th instar nymph.

بحث

نتایج آزمون‌های DLS نشان داد که اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی، اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی فرموله‌شده با روش کم‌انرژی، ذراتی کمتر ۱۰۰ نانومتر ایجاد نموده و تشکیل نانوامولسیون داده‌اند. این در حالی است که تحقیق قبلی نگارندگان که از مخلوط این اسانس‌ها و عصاره برای کنترل سفیدبالک پنبه استفاده شده بود، نشان داد که تیمار T_3 (مجموع اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی، اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی) تنها تیماری بود که تشکیل نانوامولسیون داد و تیمار T_1 (مجموع اسانس‌ها) و T_2 (عصاره آویشن باغی) تشکیل میکروامولسیون دادند. لازم به ذکر است که در تحقیق قبلی، روش کم‌انرژی در مورد اسانس‌ها و عصاره به صورت جداگانه انجام نشده بود و جهت مقایسه لازم بود که این کار صورت پذیرد (Bolandnazar *et al*., 2017). با مقایسه میزان مقادیر LC_{50} تیمارها به‌صورت جداگانه و ترکیبی (که LC_{50} در مورد تیمارهای T_1، T_2 و T_3 به‌ترتیب ۳۰۷۱، ۱۳۰۰۶ و ۳۴۰۵ میلی‌گرم بر گرم تخمین زده شده بود (Bolandnazar *et al*., 2017)) مشخص گردید که وقتی اسانس‌های مذکور به صورت جداگانه به شکل نانوامولسیون فرموله می‌شوند اثربخشی بیشتری از زمانی دارند که این مواد با هم مخلوط شده‌اند اما تشکیل نانوامولسیون نداده‌اند. این مورد بیشترشدن اثربخشی در فرم نانوامولسیون را حتی وقتی که اسانس‌ها یا عصاره مذکور به‌صورت ترکیبی هستند ولی تشکیل نانوامولسیون نمی‌دهند، را نشان می‌دهد.

مقایسه داده‌های مربوط به تخمین مقادیر LC_{50} در حالت ترکیب با توین۸۰ و نانوامولسیون‌شده نیز نشان داد که سمیت در حالت نانوامولسیون‌شده در مورد هر یک از اسانس‌ها و عصاره بیشتر از حالت امولسیون معمولی (در توین ۸۰) است. این یافته نیز نشان می‌دهد که نانوامولسیون‌کردن ترکیبات، اثربخشی آن‌ها را بیشتر نموده و باعث شده در مقایسه با فرمولاسیون معمولی، مؤثرتر عمل کنند. این مطالب با نتایج پژوهش دیگری که نشان می‌داد فرموله‌کردن اسانس به صورت نانوامولسیون باعث افزایش بیش از ۶ برابری سمیت نانوژل بارگذاری‌شده در مقایسه با اسانس معمولی می‌شود، همخوانی دارد (Ziaee & Hamzevy, 2014). در تحقیقی دیگر نیز کارایی اسانس نانوامولسیون‌شده گیاه درمنه *Artemisia sieberi* B. را روی شاخص‌های تغذیهٔ شب‌پره پشت‌الماسی *Plutella xylostella* L. و اسانس نانوامولسیون‌شده گیاه زیره سبز *Cuminum cyminum* L. را در مدیریت کنترل بید کلم بررسی کردند و افزایش سمیت و دوام این فرمولاسیون‌ها را در مقایسه با فرم معمولی ثابت کردند (Negahban *et al*., 2013). لازم به ذکر است تحقیقی که با استفاده از نانوژل کیتوزان- میریستیک اسید انجام شد و پژوهشی که با استفاده از نانوکپسول اوره- فرمالدهید صورت گرفت، با این تحقیق در نوع اسانس، جزئیات فرمولاسیون، نوع آفت و روش کاربرد متفاوت می‌باشند.

همچنین نتایج نشان داد از بین اسانس‌ها و عصاره، نانوامولسیون اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی بیشترین سمیت را روی پوره‌های سن دوم این آفت دارند. اثربخشی این اسانس‌ها روی آفات گیاهی مختلف در مطالعات قبلی صورت‌گرفته نیز اثبات شده بود (Azizian *et al*., 2014; Riazi *et al*., 2015; Sarraf Moayyeri *et al*., 2015; Bolandnazar *et al*., 2017).

چنانچه مقایسه میانگین‌ها در مورد آنزیم‌های سم‌زدا نشان داد، ترکیبات فرموله‌شده که از مجموع اسانس‌ها (T_1)، عصاره به تنهایی (T_2) و مجموع اسانس‌ها و عصاره (T_3) بودند، میزان این آنزیم‌ها (به جز آنزیم استیل کولین استراز که آنزیم سم‌زدا محسوب نمی‌شود) را در بدن پوره‌های سن دو این حشره در مقایسه با تیمار مواد جانبی به تنهایی، آب مقطر و شاهد افزایش دادند. که این نتیجه نشان می‌دهد که مجموع اسانس‌ها و عصاره گیاهی به‌کاررفته در فرمولاسیون T_1، T_2 و T_3 باعث فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها به منظور سم‌زدایی شده‌اند.

به‌طورکلی، مطالعات نشان می‌دهد که آنزیم‌های متابولیکی نقش شایان‌توجهی در سم‌زادیی و از بین ترکیبات ناگوارد و متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارند (Hayes & Pulford, 1995). این آنزیم‌ها نقش متابولیزه‌کردن ترکیبات سمی را بر عهده دارند. استرازها و گلوتاتیون اس- ترانسفراز از جمله خانواده‌های بزرگ آنزیم‌های سم‌زدا در اغلب موجودات

زنده هستند. این آنزم‌ها نقش مهمی در مقاومت به حشره‌کش‌ها دارند. آن‌ها به حفاظت سلول‌ها در برابر استرس‌های اکسیداتیو و ترکیبات شیمیایی با کمک به دفع ترکیبات الکتروفیلیک و لیپوفیلیک از سلول‌ها کمک می‌کنند (Hayes & Pulford, 1995). با توجه به پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه، اجزای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس و عصاره‌های گیاهی از عوامل تعیین‌کننده در نحوه تأثیر آن‌ها بر حشرات تیمارشده می‌باشند. در مطالعه انجام‌شده روی لارو سن چهارم آفت *Glyphodes pyloalis* تیمارشده با اسانس رزماری انجام شده بود، فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز نسبت به شاهد افزایش یافت. هم‌چنین، اسانس رزماری موجب افزایش فعالیت استرازهای عمومی در این حشره گردید و این افزایش سطح فعالیت استرازها، وابسته به دوز مصرفی بود و با افزایش دوز، افزایش می‌یافت (Yazdani *et al.*, 2014). همچنین تیمار این حشره با اسانس‌های آویشن باغی و مرزنجوش سبب افزایش میزان فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز و استرازها شد (Yazdani *et al.*, 2014). در مطالعه دیگری سمیت عصاره گندواش *Artemisia annua* روی سن گندم بررسی و نتایج مشابهی در مورد افزایش میزان استرازها و گلوتاتیون اس- ترانسفراز مشاهده شد (Zibaee & bandani, 2010). همین نتایج در مطالعه دیگری که با استفاده از اسانس اسطوخدوس *Lavandula angustifelia* روی شب‌پره پشت الماسی *Plutella xylustella* انجام شد نیز به‌دست آمد (Nasr *et al.*, 2014). نتایج این تحقیق نیز با تایید مطلب فوق، نشان می‌دهد که تیمارهای مختلف اعمال‌شده، منجر به افزایش معنی‌دار آنزیم‌های سم‌زا در پوره سن دوم سفید بالک پنبه می‌شوند. نتایج این پژوهش نشان‌دهنده نقش اساسی این فرمولاسیون‌های گیاهی در القای سم‌زدایی به برخی آنزیم‌های سم‌زدا مورد استفاده در پوره‌های سن دو سفیدبالک پنبه می‌باشد.

چندین گزارش متفاوت نشان داده است که اسانس‌ها و مونوترپنیدهای آن‌ها باعث مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در حشرات می‌شوند. به‌عنوان مثال، پیشنهاد شد که ممکن است اثرات سمی اسانس‌ها به‌علت مهار برگشت‌پذیر استیل کولین استراز به‌وسیله اشغال جایگاه‌های هیدروفوبیک مرکز فعال آنزیم نسبت داده شود (Ryan & Byrne, 1988). محققان دیگر نیز فعالیت دو جزء اسانس خالص را بررسی و یک فعالیت مهاری بر استیل کولین استراز، اما تنها در دوز بالای دارویی را نشان دادند و مشخص کردند که استیل کولین استراز جایگاه اصلی عمل برای این اسانس‌ها نیست (Kostyukovsky *et al.*, 2002). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، فعالیت آنزیم‌ها کولین‌استرازی تغییر معنی‌داری را بین شاهد و تیمارها و بین خود تیمارها نشان نداد. یعنی تیمارهای حاوی اسانس و عصاره گیاهی، فعالیت مهارکنندگی که با کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز همراه است را نشان ندادند. امکان دارد طبق مطالعه مذکور غلظت استفاده‌شده تیمارها برای ایجاد مهارکنندگی و کاهش فعالیت استیل کولین استراز کافی نبوده باشد (با توجه به این که در تحقیق مذکور از اسانس خالص استفاده شده است) و یا این آنزیم جایگاه اصلی عمل برای این اسانس‌ها نبوده باشد که مشخص کردن این مسأله، احتیاج به مطالعات بعدی دارد.

همچنین نتایج ارزیابی ذخایر انرژی نشان داد که مجموع اسانس‌های گیاهی به‌کاررفته در فرمولاسیون T_1 و T_3 باعث کاهش معنی‌دار در میزان چربی کل، کربوهیدرات کل و پروتئین کل در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها شد؛ هرچند که میزان گلیکوژن کل تغییر معنی‌داری را بین تیمارها و شاهد نشان ندادند. این کاهش می‌تواند بیانگر این واقعیت باشد که وقتی حشرات در معرض ترکیبات مختلف و شرایط نامساعد قرار می‌گیرند، چربی در آنها به‌عنوان اولین منبع، مصرف می‌شود (De Coen & Janssen, 1997; Amorim *et al.*, 2012). علاوه بر این، کاهش در میزان چربی می‌تواند ناشی از آسیب اکسیداتیو غشاهای سلولی و هم‌چنین افزایش سطوح پراکسیداسیون چربی باشد (Novais *et al.*, 2013). به‌طورکلی بسته به شرایط فیزیولوژیکی، چربی وکربوهیدرات در بدن حشره ذخیره می‌شوند و یا می‌توانند به‌عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار گیرند (Miranda *et al.*, 2003). بنابراین این احتمال وجود

دارد که کاهش در محتوای چربی و کربوهیدرات در این مطالعه، نشان‌دهنده هزینه لازم برای سم‌زدایی اسانس‌های فرموله‌شده باشد.

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که نانوامولسیون‌کردن اسانس‌ها و عصاره مذکور، باعث افزایش سمیت در حالت جداگانه شده و اسانس‌های رزماری و نعناع فلفلی در حالت نانوامولسیون، بیشترین سمیت را روی پوره‌های سن دوم این آفت دارند. همچنین فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا (آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون‌اس-ترانسفرازی) در پوره‌های سن دو سفیدبالک پنبه تحت تأثیر تیمارهای T_1، T_2 و T_3 افزایش می‌یابد که این مساله نشان‌دهنده نقش اساسی این تیمارها در القای سم‌زدایی به برخی آنزیم‌های سم‌زدا مورداستفاده می‌باشد. عدم مهار فعالیت آنزیم کولین‌استراز نیز توسط این تیمارها و در غلظت به‌کاررفته نیز ثابت شد. میزان ذخایر انرژی (چربی، کربوهیدرات و پروتئین کل) نیز در تیمار T_1 و T_3 نسبت به تیمار T_2 و شاهد، کاهش معنی‌داری داشتند که می‌تواند نشان‌دهنده هزینه لازم برای سم‌زدایی تیمارهای مذکور باشد. بنابراین تیمارهای T_1 و T_3، اثر بیشتری را روی شاخص‌های زیرکشندگی و پارامترهای بیوشیمیایی با القای سم‌زدایی به برخی از آنزیم‌های سم‌زدا و کاهش بعضی از ذخایر انرژی پوره‌های سن دو سفیدبالک پنبه نشان می‌دهند که با انجام آزمون‌های تکمیلی می‌توان از این نتایج جهت کنترل تلفیقی این آفت استفاده کرد.

سپاسگزاری

از شرکت داروسازی باریج‌اسانس و مرکزتحقیقات گیاهان دارویی باریج به‌دلیل پشتیبانی مالی و امکاناتی این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Agrawal, A., Pandey, R. S. & Sharma, B. (2011). Water pollution with special reference to pesticide contamination in India. *Journal of Water Resource and Protection*, 2(5), 432-448.
2. Amorim, M. J. B., Gomes, S. I. L., Soares, A. M. V. M. & Scott-Fordsmand, J. J. (2012). Energy basal levels and allocation among lipids, proteins, and carbohydrates in *Enchytraeus albidus*: changes related to exposure to Cu salt and Cu nanoparticles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 477-482.
3. Arthropod Pesticide Resistance Database. (2016). avail; able at: *http://www.pesticideresistance.org/*. Retrieved 2018 June 10.
4. Ashtari, S., Poormirza, A. & Safaralizadeh, M. (2011). Investigation of susceptibility to various stages of life *Bemisia tabaci* agaist pyriproxyfen and sytovet oil. *Journal of Entomology Research*, 3(4), 267-276. (in Farsi)
5. Aziziyan, N., Sarrafmoayyeri, H. & Bolandnazar, A. (2014). Effect of contact formulations prepared of plant extracts and essential oils on two-spotted spider mites. *Journal of Plant Protection (Agricultural Sciences and Technology).* 28, Number 3. 393-399. (in Farsi)
6. Bolandnazar, A., Ghadamyari, M., Memarzadeh M. & Jalali Sandi, J. (2017). Effect of some micro and nanoemulsified essential oils and plant extract on sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius), under laboratory condition. *Plant Pest Research*, 7(3), 23-37. (in Farsi)
7. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
8. Choi, W. I., Lee, E. H., Choi, B. R., Parkand, H. M. & Ahn, Y. J. (2003). Toxicity of Plant Essential Oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(5), 1479-1484.
9. De Coen, W. & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity esting. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia populations. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 43-55.
10. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. & Featherstone, R. M. (1961), A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
11. Gutierrez, J. M., González, C., Maestro, A. & Nolla, J. (2008). *Current Opinions in Colloid & Interface Science*, 13, 245-251.
12. Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
13. Hayes, J. D. & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 445-600.

14. Horowitz, A. R., Kontsedalov, S. & Ishaaya, I. (2004). Dynamics of resistance to the neonicotinoids actamiprid and thiamethoxam in *Bemisia tabaci*. *Insecticides Resistance and Resistance Management*, 97(6), 2051-2056.
15. Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. 19. 603-608.
16. Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world, *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66.
17. Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N. & Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 58, 1101-1106.
18. McClements D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8, 1719-1729.
19. Moretti, M. D. L., Sanna-Passino, G., Demontis, S. & Bazzoni, E. (2002). Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest Control. *AAPS PharmSciTech.* 3 (2) article 13.
20. Miranda, J. E., Bortoli, S. A., Takahashi, R. & Silva, A. F. (2003). Nutritional indexes of silkworm (*Bombyx mori* L.) treated with juvenile hormone analogues. *Revista Cientifica Rural*, 8, 32-38.
21. Mirmajidi, A. & abbasi, S. (2013). Nanoemulsions; introduction, production, Application. *Nanotechnology monthly.* The 10th year. 8. 45-49.
22. Nasr, M., Jalali Sendi, J., Moharramipour, S. & Zibaee, A. (2014). Efficacy of essential oil of *Lavandula angustifolia* on mortality and physiological parameters of diamondback moth, *Plutella xylustella* (Lep.: Pyralidae). *Plant Pest Research*, 7(3), 23-37. (in Farsi)
23. Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. & Hashemi, S. A. (2013). Nanocapsulated essential oil efficiency of Artemisia (*Artemisia sieberi* Besser) on nutritional indices *Plutella xylostella*. Journal of *Medicinal and Aromatic Plants Research*, 29(3), 692-708.
24. Nollet Leo, M. L. & Rathore, H. S. (2017). *Green Pesticides Handbook Essential Oils for Pest Control.* CRC Press Taylor & Francis Group. 570 pp.
25. Novais, S. C., Amadeu, M. V. M. S., De Coen, W. & Amorim, M. J. B. (2013). Exposure of *Enchytraeus albidus* to Cd and Zn-changes in cellular energy allocation (CEA) and linkage to transcriptional, enzymatic and reproductive effects. *Chemosphere*, 90, 1305-1309.
26. Oliveira, M. R. V., Henneberryb, T. J. & Andersonc, P. (2001). History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 20, 709-723.
27. Ryan, M. F. & Byrne, O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14(10), 1965-1975.
28. Riazi, M., Khajeali, J., Poorjavad, N. & bolandnazar, A. (2015). Mortality and repellency effect of formulation of mint essential oil on *Aphis gossypii* in greenhouse conditions. *Science and technology greenhouse.* Sixth year. 169- 179. (in Farsi)
29. Robertson, J. L., Russell, R. M., Preisler, H. K. & Savin, N. E. (2007). Bioassays with arthropods. *CRC, Boca Raton, FL.* p.199.
30. Sarraf moayyeri, H., Pirayeshfar, F. & Bolandnazar, A. (2015). The effect of acaricidal of formulated extracts and essential oils of *Melia azadirachta* on two-spotted spider mites. *Bimonthly Journal of Medicinal Plant*. 211-219.
31. Tripathi, A. K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. & Bhattacharya, P. R. (2009). A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 15, 52-61.
32. Van Asperen, K. (1962). A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8, 401-416.
33. Yazdani, E., Jalali Sendi, J. & Hajizadeh, J. (2014). Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection Research*. 54.1.
34. Yuval, B., Kaspi, R. O. Y., Shloush, S. & Warburg, M. S. (1998). Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecological Entomology*, *23*(2), 211-215.
35. Zare. Z. Divsalar, A. & Nabyoni, M. (2011). A review of Nanoemulsions and medical applications. *Magazine Nanotechnology Monthly*, 9, 30-33. (in Farsi)
36. Ziaee, M. & Hamzevy, F. (2014). Nanoparticles applications in the pest prevention and control. *Nanotechnology*. Monthly13th year. 10. 207. (In Farsi)
37. Zibaee, A. & Bandani A. R. (2010). Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the sun pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauvaria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*. 100(2), 185-196.