

مقایسه نانوفرمولاسیون با فرمولاسیون متداول هگزیتیازوکس و دیافنتیوران در کنترل کنه تارتن -

دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch

راضیه حسن زاده^۱، نجمه صاحب زاده^{۲*}، علی علیزاده^۳، سارا رامرودی^۲

۱ و ۲ به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳ استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۲)

چکیده

کنه تارتن دولکه‌ای از مهمترین آفات گلخانه‌ای و زراعی بوده و مبارزه با آن به دلیل مقاومت سریع به آفت‌کش‌ها، دشوار می‌باشد. در این مطالعه، نانوفرمولاسیون برای هگزیتیازوکس و دیافنتیوران تهیه و از طریق زیست‌سنجی روی کنه تارتن دولکه‌ای با فرمولاسیون‌های تجاری هر کدام از آفت‌کش‌ها روی کنه تارتن دولکه‌ای مقایسه شد. براساس نتایج زیست‌سنجی LC_{50} "هگزیتیازوکس و نانو-فرمولاسیون آن" و برای "دیافنتیوران و نانوفرمولاسیون آن" به ترتیب "۱۸۸ و ۸۷" و "۲۵۶ و ۱۳۹" میلی‌گرم بر لیتر بود. بررسی کارایی کنه‌کشی نانوفرمولاسیون‌های سنتزی، حاکی از کاهش معنی‌دار دوز موثر آفت‌کش‌ها جهت ایجاد تلفات کنه بود. با توجه به کارایی نانوفرمولاسیون در کاهش میزان LC_{50} ، خصوصیات فیزیکی آنها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) و طیف‌سنجی-مادون‌قرمز (FTIR) بررسی گردید. نتایج بررسی‌های فیزیکی نشان داد که نانوفرمولاسیون‌ها دارای اندازه تقریبی ۳۰ نانومتر بوده که گروه‌های عاملی اصلی در پیک نانوذرات و آفت‌کش‌ها در پیک نهایی نانوافت‌کش‌ها مشاهده شد. نتایج نشان داد که نانوهگزیتیازوکس و نانودیافنتیوران بطور موثر می‌توانند در کنترل کنه تارتن دولکه‌ای استفاده شوند. نتایج رهاسازی کنترل‌شده نانوفرمولاسیون‌ها، بیانگر عملکرد اختصاصی و قابل کنترل آن‌ها برای جلوگیری از هدررفت ماده مؤثره آفت‌کش و رسیدن به مکان هدف بود. بررسی فعالیت استراز، گلوکاتایوناس ترنسفرز و استیل‌کولین‌استراز بیانگر توانایی نانوافت‌کش‌ها در ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی در کنه تارتن دولکه‌ای بود. پیش‌بینی می‌شود که با کاربرد نانوفرمولاسیون، علاوه بر کاهش اثرات مضر بر موجودات غیرهدف، بتوان از تکرار بیش از حد سمپاشی و آلودگی‌های زیست‌محیطی کاست.

واژه‌های کلیدی: نانوفرمولاسیون، اختلال فیزیولوژیکی، زیست‌سنجی، استیل‌کولین‌استراز، رهایش کنترل‌شده.

Comparison of nanoformulations with conventional formulations of hexythiazox and diafenthiuron in the control of two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch

Razieh Hassanzadeh¹, Najmeh Sahebzadeh^{2*}, Ali Alizadeh³, Sara Ramroodi²

¹ and ², respectively, former master student and assistant professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol; ³, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

(Received: November 8, 2020 - Accepted: January 31, 2021)

ABSTRACT

The two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) is one of important agricultural pests and its control is difficult due to pesticide resistance. Here, nanoformulations of hexythiazox, and diafenthiuron were synthesized, and their bioassays were performed on *T.urticae* comparing with their conventional formulations. According to bioassays, LC_{50} of "hexythiazox and its nanoformulation", and "diafenthiuron and its nanoformulation" were "188, and 87", and "256 and 139" mg L⁻¹, respectively. Evaluation of acaricidal performance of synthetic nanoformulations showed a significant reduction in the effective concentrations of pesticides to cause mite's mortalities. Due to the efficiency of these nanoformulations in drop dwan of LC_{50} , their physical properties were investigated by field-emission-scanning-electron microscope (FESEM), and infrared-spectroscopy (FTIR). Physical results showed that the nanoformulations had the size of 30 nm and the main groups were observed in the peak of nanoparticles and pesticides in the final peak of nanopesticides. Evaluation of the acaricidal effects of nanoformulations showed a significant reduction in the effective dose of pesticides to cause mite mortality. The results showed that nano-hexythiazox and nanodiafenthiuron could be used effectively for controlling *T.urticae*. The results of the release of nanoformulations showed their controllable performance to prevent the loss of the pesticide active ingredient and delivery to the target-site. The activity of esterase, glutathione S-transferase, and acetylcholinesterase indicates the ability of nanopesticides to cause physiological disorders in two-spotted spider mite. Therefore, it is predicted that due to the instantaneous effect of nanopesticide, the harmful effects on non-target organisms, consequence pesticide spraying, and environmental pollution could be reduced.

Keywords: Acetylcholinesterase, Bioassay, Controlled Release, Nanoformulation, Physiological Disorder.

* Corresponding author E-mail: n.sahebzadeh@uoz.ac.ir

مقدمه

کنه‌های گیاهی سبب کاهش عملکرد و زیان جبران‌ناپذیر در محصولات گلخانه‌ای می‌شوند. از جمله مهم‌ترین کنه‌های گلخانه‌ای می‌توان به کنه تارتن دولکه‌ای (*Tetranychus urticae* Koch, Acari: Tetranychidae) اشاره کرد. این آفت دارای انتشار جهانی و دارای بیش از ۱۰۰۰ گونه میزبان گیاهی بوده، و مبارزه شیمیایی با آن اجتناب‌ناپذیر است. این کنه به دلیل سیکل زندگی کوتاه و تولیدمثل زیاد، به سرعت به آفت‌کش‌ها مقاوم می‌شود (Wu et al., 2019)، بنابراین ساخت و معرفی کنه‌کش‌هایی با اثرات ویژه مورد توجه قرار گرفته است. در سالهای اخیر کنه‌کش‌های جدیدی برای مبارزه با کنه‌ها معرفی شده‌اند که نحوه اثر اکثر آنها از طریق اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی بخصوص تنفس و یا اثر روی رشدونمو می‌باشد (Kumari et al., 2017).

نانوآفت‌کش‌ها نوع جدیدی از فرمولاسیون‌ها بوده که باعث افزایش تاثیرپذیری، کاهش غلظت مصرفی، نفوذ بهتر و رهایش کنترل شده^۱ آنها در محل هدف می‌شود. نانوفرمولاسیون‌ها داری خصوصیات مفیدی مانند سختی، نفوذناپذیری، بلورینگی، پایداری حرارتی، انحلالپذیری و امکان تجزیه در شرایط محیطی هستند (Wang et al., 2014).

رهایش کنترل شده روشی است که در آن سرعت آزادسازی موادشیمیایی کنترل می‌شود تا در دوره زمانی مشخصی برای ایجاد اثر بر هدف در دسترس باقی بمانند (Kydonieus, 1980). رهایش کنترل شده زمانی رخ می‌دهد که یک پلیمر با یک عامل فعال، ترکیب شده و سپس از آن جدا شود. هدف رهایش کنترل شده رسیدن به بازدهی بالا با کمترین مصرف موادفعال می‌باشد (Gao et al., 2011). یک ترکیب پلیمری حامل درنانوساختارهای استفاده شده در علوم مختلف، علاوه بر سمیت اندک، باید دارای خاصیت تجزیه پذیری زیستی بوده و کمترین میزان آسیب به زیست بومها را ایجاد نماید. در بین پلیمرهای قابل تجزیه زیستی طبیعی، دو ترکیب کیتوزان و سدیم-

آلژینات باتوجه به فراوانی و سهولت دسترسی، در کاربردهای مختلف مانند تهیه فرمولاسیون رهایش کنترل شده بعنوان حامل موردتوجه قرار گرفته‌اند. کیتوزان (یکی از مشتقات کیتین)، از مهمترین پلیمرهای طبیعی استفاده شده در کشاورزی است که بدلیل قابلیت تجزیه زیستی و توانایی ضد میکروبی در رهایش کودها و آفت‌کش‌ها استفاده می‌شوند. در بین پلیمرهای طبیعی، آلژینات استخراج شده از جلبک قهوه‌ای دریایی، به دلیل اتصال دهنده‌گی قوی برای تهیه فرمولاسیون‌های آهسته‌رها استفاده می‌شود (Pawar and Edgar, 2012). میزان بارگذاری یک ترکیب نانوفرمولاسیونها نقش مهمی در کارایی آن ترکیب دارد. با افزایش میزان بارگذاری ترکیب مدنظر در حامل یک نانوساختار، وزن ملکولی آن افزایش یافته و در نتیجه میزان رهاسازی و اثربخشی بطور مستقیم تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Jana and Jana, 2019).

سموم متنوعی برای مبارزه با کنه تارتن دولکه‌ای استفاده شده است. بعنوان مثال دیافنتیوران حشره-کش و کنه‌کشی از گروه تیوره^۲ است که نحوه تاثیر آن میتوکندریایی بوده و از طریق اختلال در تولید ATP باعث مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌شود (Krishna and Bhaskar, 2016). آفت کش هگزی-تیاژوکس^۳ یک کنه کش غیرسیستمیک، گوارشی و سریع‌الاثرا از گروه تیاژولیدین‌ها^۴ بوده که با اثر تماسی، گوارشی، خاصیت تخم‌کشی و لاروکشی همراه با خاصیت نفوذی در برگ باعث از بین رفتن کنه‌ها می‌شود. هر گاه کنه های بالغ ماده با این سم تماس پیدا کنند، تخم های تولید شدهی آن نابارور می‌شوند (Dekeyser, 2005). استفاده از نانوتکنولوژی برای معرفی نانوآفتکشها در دهه اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. نانوآفتکشها گروهی از نانوذرات هستند که با آفتکشهای مختلف بارگذاری شده و بعنوان فرمولاسیونهای مناسب علاوه بر آهسته رهش بودن، می‌توانند ماده موثره آفتکش را در برابر تجزیه و اکسید شدن محافظت کرده و با ایمن کردن آنها برای

2 Thiourea

3 Hexythiazox

4 Thiazolidine

1 Controlled release

سیستمهای عصبی در جانوران در تیمارهای کیتوزانی توسط مطالعات سایر محققین مشخص شده است اما براساس بررسی منابع، تاکنون این خصوصیات در بندپایان مطالعه نشده است. لذا بعنوان بخشی از مطالعه حاضر به آن پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

آفت‌کش‌های استفاده شده در پژوهش حاضر شامل دیافنتیوران (دربی®؛ فرمولاسیون wp ۵۰٪؛ کریش-راسایان، هند) و هگزی‌تيازوکس (نیسورون®؛ فرمولاسیون EC 10٪؛ نیپون‌سودا، ژاپن) بودند. از فرمولاسیونهای اشاره شده برای تهیه نانوفرمولاسیونها استفاده شد.

تهیه فرمولاسیون نانوآفت‌کش

ابتدا محلول کیتوزان (وزن مولکولی متوسط، درجه استیل‌زدایی ۷۵ درصد (Sigma, Aldrich, Louis (MO, USA) با اسید استیک (۹۹٪، Sigma, A6283) یک مولار تهیه و به مدت ۱۲ ساعت روی شیکر (۲۶۰۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. به‌طور جداگانه محلول سدیم‌آلژینات 0.063 m/v (Sigma, A2033) تهیه و کلرید کلسیم 18 mM (Sigma, C1016) به آن اضافه و یک ساعت روی شیکر قرارداداده و پس از ۹۰ دقیقه، ۲۵ ml محلول کیتوزان اضافه شد. مخلوطی با نسبت ۲:۴:۲ به ترتیب از نانوذرات کیتوزان-سدیم‌آلژینات، آفت‌کشهای تجاری (دیافنتیوران و هگزی‌تيازوکس) و حلال استون (Sigma, 179124) ساخته شد. مخلوط داخل فالكون-های استریل ریخته و ۲۴ ساعت تکان داده تا آفت‌کش وارد منافذ نانوذرات گردد. برای حذف آفت‌کش بارگذاری نشده، محلول حاصله با آب مقطر و اتانول (Merck, 1024282500) ۳۰ درصد، به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شد. فاز زیرین نانوذرات حاوی آفت‌کش بود که درون پتری ریخته و داخل آون (۴۰°C) خشک شدند. پودر حاصله برای آزمایش‌ها استفاده گردید (Dos Santos Silva et al., 2011).

اکوسیستمهای زیستی در محیط، باعث به تاخیر انداختن مقاومت به آفت‌کشها در آفات گیاهی گردند (Kah, 2015). علیرغم اینکه یکی از موثرترین راه‌های مبارزه با آفات گیاهی مبارزه شیمیایی است اما این موجودات قادرند با سازوکارهای مختلفی اثر آفت‌کشها را خنثی نمایند. سازوکارهای مقاومت در حشرات شامل کاهش نفوذ کوتیکولی، غیر حساس شدن محل هدف، منزوی شدن و حذف حشره‌کش یا محصورکردن مکانیزم و افزایش سم‌زدایی متابولیکی است (Talebi Jahromi, 2011). آنزیم‌های سم‌زدایی کننده عمده در حشرات شامل سیتوکروم مونواکسیژنازها، گلوکوتیون‌اس‌ترانسفرازها، کربوکسیل-استرازها و استرازهای عمومی هستند که نقش مهمی در متابولیسم آفت‌کشها و مقاومت دارند.

با توجه به مطالب ارائه شده و بروز مقاومت سریع کنه تارتن‌دولکه‌ای به آفت‌کشهای رایج، لذا کنترل این آفت در گلخانه دشوار است. بنابراین دستیابی به مکانیسم عمل فرمولاسیونهای جدید آفت‌کش‌ها در برابر آنزیم‌های سم‌زدا به عنوان دلیل اصلی مقاومت به آفت‌کشها ضروری بوده لذا در تحقیق حاضر به یافتن پاسخ برای این سوالات که "با نانوفرموله کردن آفت‌کشهای مورد مطالعه (دیافنتیوران، هگزی‌تيازوکس) چه تغییری در میزان کنه‌کشی آنها ایجاد خواهد شد؟" و "پاسخهای بیوشیمیایی فرمولاسیون متداول آفت‌کشهای مورد مطالعه در مقایسه با نانوفرمولاسیونهای آنها روی فعالیت آنزیم‌های سم‌زدای مورد بررسی (استراز، گلوکوتیون‌اس‌ترانسفراز و استیل-کولین‌استراز) در کنه تارتن‌دولکه ای چگونه خواهد بود؟" پرداخته شده است. در این تحقیق نانوفرمولاسیون‌های هگزی‌تيازوکس و دیافنتیوران تهیه و خواص فیزیکی و اثرات کشندگی با فرمولاسیون‌های تجاری مقایسه شدند. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در کنه تارتن‌دولکه‌ای پس از تیمار با نانوفرمولاسیون‌ها و فرمولاسیون‌های تجاری ارزیابی شد. با توجه به اینکه دو آفت‌کش مذکور اثرات ثابت شده روی استیل کولین‌استراز نداشته اند اما اثرات ضدآنتی اکسیدانی و حفاظت کنندگی

تعیین ظرفیت بارگذاری و نرخ رها سازی

برای تعیین ظرفیت بارگذاری کیتوزان و سدیم آلژینات با آفت‌کش‌ها، غلظت مشخصی از نانوافت‌کش داخل کیسه‌دیالیز ریخته و ۳۰ دقیقه در بافر فسفات (با دو pH ۴/۵ و ۷ بطور جداگانه، ۳ تکرار) غوطه‌ور شد (فرمول ۱). برای تعیین نرخ رهاسازی غلظت مشابهی از نانوافت‌کش داخل کیسه‌دیالیز ریخته و میزان انتشار از آن به‌داخل بافر به مدت ۱ تا ۲۴ ساعت بررسی (فرمول ۲) و غلظت آفت‌کش در ۲۷۶ نانومتر اندازه‌گیری شد (Memarizadeh et al., 2014).

$$\text{درصد بارگذاری} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (\text{فرمول ۱})$$

$$\text{درصد رهاسازی} = \frac{B'}{A} \times 100 \quad (\text{فرمول ۲})$$

A: غلظت اولیه آفت‌کش؛ B: غلظت آفت‌کش در بافر فسفات؛ B': غلظت آفت‌کش آزاد شده در هر نمونه

باتوجه به این که pH معده کهنه‌ها بین ۴/۵-۷ است (Erban and Hubert, 2010)، بنابراین نقش pH در میزان بارگذاری و رهاسدن نانوافت‌کش‌ها در pH خنثی و ۴/۵ نیز مطالعه شد.

شناسایی مشخصات نانوذرات بارگذاری شده با

آفت‌کش‌های مورد مطالعه

از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای شکل‌شناسی نانوذرات و از پراش‌سنج پرتو ایکس^۶ برای تعیین اندازه نانوذرات بارگذاری شده با آفت‌کش‌ها استفاده شد. اندازه ذرات در پیک‌های شاخص نانوذرات در طیف‌های XRD با معادله دبای-شرر محاسبه گردید (Suwanboon et al., 2013). نوع گروه عاملی و پیوند-های موجود توسط طیف‌سنج مادون قرمز^۷ در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ثبت گردید.

زیست‌سنجی

برای یافتن غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت (LC₅₀)، ابتدا ۷ غلظت اولیه (بین محدوده غلظتی ۲۵-۴۸۰۰

میلی‌گرم بر لیتر) از آفت‌کش‌ها، نانوفرمولاسیون آنها، کیتوزان به تنهایی، سدیم آلژینات به تنهایی و ترکیب کیتوزان-سدیم آلژینات برای تعیین کشندگی بین ۸۰-۲۰ درصد انتخاب شد. غلظت‌های آزمایش نهایی زیست‌سنجی (بین محدوده غلظتی ۱۱۰۰۰-۴۷ میلی‌گرم بر لیتر) دیسک‌های برگی از گیاه لوبیا رقم اختر تهیه و ۱۵ ثانیه در غلظت‌های آفت‌کش‌ها (جدول ۱) فرو برده شد. پس از خشک شدن باقیمانده آفت‌کش‌ها روی برگ، کنه‌های ماده بالغ همسن یکروزه روی برگ‌ها منتقل و در ظروف پتری گذاشته و در انکوباتور (۲۴±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰±۱۰ درصد) نگهداری شدند. آزمایش‌ها در ۳ تکرار (هر تکرار ۳۰ کنه) و مجموع ۷۲۰ کنه برای این مرحله انجام شدند (Robertson et al., 2017).

استخراج عصاره آنزیمی کنه‌های تیمار شده

قبل از استخراج عصاره آنزیمی، ۵۰ عدد کنه برای هر آفت‌کش بطور جداگانه با LC₅₀ تیمار شدند. ۲۴ ساعت پس از تیمار، کنه‌های زنده‌مانده در بافر فسفات (pH 7) همگن شدند. سانتریفیوژ محلول همگن (۱۰ دقیقه) انجام و روشن‌ترین به‌عنوان منبع آنزیمی در آزمایش‌های بیوشیمیایی استفاده گردید (Alizadeh et al., 2011).

تعیین میزان فعالیت گلوکاتاتیون‌اس ترانسفراز

(GST)

فعالیت گلوکاتاتیون‌اس ترانسفراز با زیرنهشت ۱، کلروآ و ۴ دی‌نیتروبنزن و گلوکاتاتیون احیاء شده (GSH) سنجش شد. ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل زیرنهشت، GSH و ۱۰ میکرولیتر آنزیم، داخل پلیت ریخته و جذب‌نوری در ۳۴۰ نانومتر خوانده و شیب خط رگرسیون رسم شد (Habig et al., 1976).

تعیین میزان فعالیت استراز

سنجش استراز با افزودن ۱۰ میکرولیتر آنزیم به ۴۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۱۰ میکرولیتر زیرنهشت بتانفتیل‌استات آغاز شد. سپس ۵۰ میکرولیتر نمک فاست بلوآر آر به مخلوط اضافه و جذب‌نوری در ۴۰۵

6 X-ray crystallography

7 Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

نانومتر خوانده و شیب خطرگرسیونی رسم شد (Van Asperen, 1962).

جدول ۱. غلظت‌های نهایی تیمارهای مورد مطالعه علیه کنه تارتن دولکه ای
Table 1. Final concentrations of the studied treatments against two-spotted tartar mite

Test Samples	Final concentrations (mg L ⁻¹)				
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th
Chitosan	516	663	1044	1135	1894
Sodium alginate	2400	4225	6990	8004	11000
Chitosan-Sodium alginate	1885	2395	3241	4406	10061
Hexythiazox	83	200	269	360	482
Nano-Hexythiazox	53	75	107	152	216
Diafenthiuron	124	341	427	579	788
Nano-Diafenthiuron	47	132	187	264	373

درصد (روش روبرتسون و پریسلر)، شیب و ثابت معادله‌های خطوط رگرسیون در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمون توکی ($P < 0.05$) انجام شد. آنالیز FTIR و XRD با نرم‌افزار IR Pal 2.0 انجام شد. برای رسم نمودارهای FTIR از نرم‌افزار Origin pro 8.0 و سایر نمودارها با Excel 2013 ترسیم شدند.

یافته‌ها

جدول ۲، نتایج زیست‌سنجی آفت‌کش‌ها و نانوفرمولاسیون آن‌ها را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که غلظت‌های کشندگی‌های مختلف در تیمار نانوفرمولاسیونها نسبت به فرمولاسیونهای تجاری آفتکشهای مورد مطالعه کاهش معنی‌داری نشان داد ($P=0.001$).

جدول ۳ ظرفیت بارگذاری نانوذرات آفتکشها در کیتوزان-سدیم آلژینات را نشان می‌دهد. نتایج ثابت کردند که پس از تهیه نانوفرمولاسیون‌ها در بافر فسفات با pH ۴/۵، درصد بیشتری از آفت‌کش‌ها در نانوذرات بارگذاری شده و نسبت به pH خنثی، افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

تعیین میزان فعالیت استیل کولین استراز

فعالیت استیل کولین استراز با زیرنهشت استیل-تیوکولین آیدواید اندازه‌گیری و جذب آن به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد (Ellman *et al.*, 1961).

تعیین میزان پروتئین

تعیین میزان پروتئین به روش Bradford (1976) انجام گرفت. پس از آماده‌سازی محلول‌های استاندارد و پروتئینی، جذب نمونه‌ها در ۶۳۰ نانومتر مشخص و سپس منحنی استاندارد رسم شده و غلظت پروتئین در نمونه ناشناخته برآورد شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه آماری داده‌های حاصل از زیست‌سنجی با استفاده از تجزیه پروبیت و نرم‌افزار SPSS 16 انجام گرفت. برای نرمال کردن داده‌های حاصل از مطالعه تأثیرات آفتکشهای مورد مطالعه، روی کنه تارتن دولکه‌ای از تبدیل داده‌های لگاریتمی استفاده شد. مقادیر کشندگی مختلف (LC^{50}) و حدود اطمینان ۹۵

جدول ۲. نتایج آنالیز پروبیت آفت کش‌های مورد مطالعه علیه کنه تارتن دولکه ای

Table 2. Results of probit analysis of the studied pesticides against two-spotted spider mite

Test Samples	Total mite numbers	LC ₂₅	LC ₅₀	LC ₇₅	Slope±SE ^b	Chi-Square (df) ^c
		(95% CL) ^a ; mg L ⁻¹	(95% CL); mg L ⁻¹	(95% CL); mg L ⁻¹		
Chitosan	90	507 (448.73-556.06)	693 (642.82-741.33)	948 (886.74-1026.36)	4.96±0.45	0.6(3)
Sodium alginate	90	2328 (1886.49-2713.46)	3778 (3331.8-4191.0)	6132 (5561.73-6849.03)	3.20±0.30	0.4(3)
Chitosan-Sodium alginate	90	1221 (907.63-1488.52)	2273 (1950.92-2570.18)	4232 (3723.36-4998.12)	2.49±0.30	2.01(3)
Hexythiazox	90	78 (20.293-125.911)	188 (110.41-257.84)	451 (320.17-90.74)	1.77±0.25	3.77(3)
Nano-Hexythiazox	90	58 (50.178-66.17)	87 (80.55-98.51)	128 (117.41-142.74)	4.12±0.41	0.49(3)
Diafenthiuron	90	128 (60.985-186.32)	256 (171.77-327.08)	511 (407.77-681.28)	2.24±0.41	0.69(3)
Nano-Diafenthiuron	90	66 (37.14-92.08)	139 (103.07-173.30)	289 (229.41-406.73)	2.11±0.36	0.25(3)

(a) حدود اطمینان ۹۵ درصد (b) شیب خط ± خطای استاندارد (c df: درجه آزادی) (a), 95% confidence limits b), Slope of line ± standard error c), degree of freedom

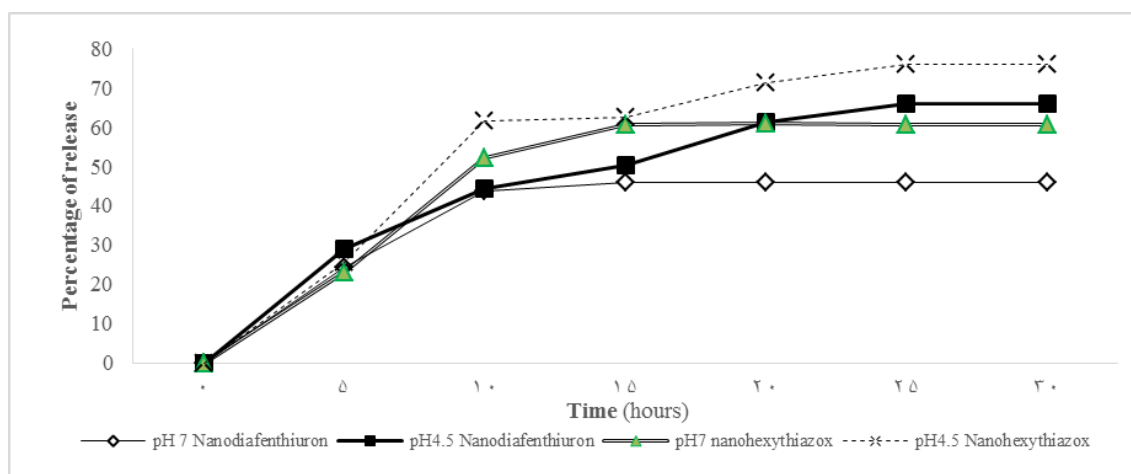
جدول ۳. ظرفیت بارگذاری نانوذرات آفتکشها در کیتوزان-سدیم آلژینات

Table 3. Loading capacity of pesticide nanoparticles in chitosan-sodium alginate

Nanoformulation	Pesticide-Loading Capacity (%)		Calibration curves for detecting nanopesticides	R ²
	pH 4.5	pH 7		
Nano-Hexythiazox	61.19±0.08	88.92±0.19	y= 0.0074x+0.0942	0.9626
Nano-Diafenthiuron	60.08±0.23	87.46±0.17	y=0.0084x+0.2235	0.8676

نانوهگزی تیازوکس و نانودیافنتیوران تا ۲۴ ساعت ادامه یافت که نشان دهنده درصد بالاتر رهاسازی کنه-کش از نانوفرمولاسیون‌ها در pH ۴/۵ نسبت به pH خنثی بود (شکل ۱).

درصد رهاسازی نانوهگزی تیازوکس و نانودیافنتیوران نشان داد که در pH خنثی، میزان رهاسازی تا ۱۰ ساعت پس از شروع افزایش یافته و سپس به مقدار ثابت رسید. درحالی که در pH ۴/۵، نرخ رهاسازی

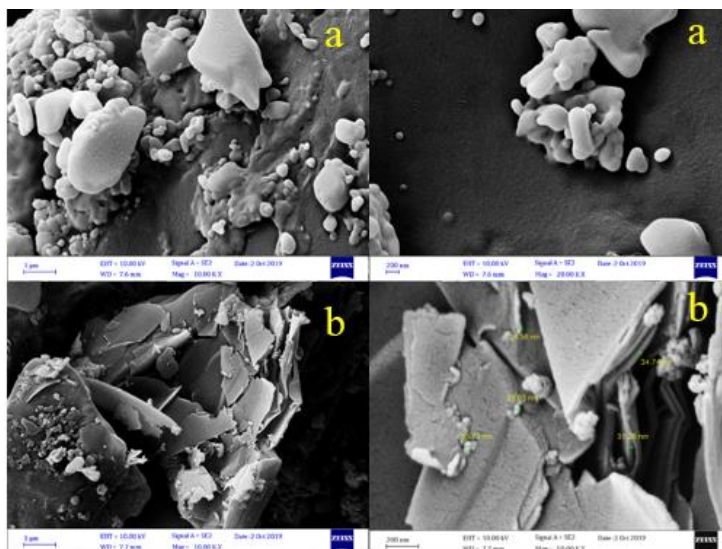


شکل ۱. درصد رهاسازی نانو هگزی تیازوکس و نانودیافنتیوران در pH ۴/۵ و ۷

Figure 1. Release percentage of nanohexythiazox and nanodiafenthiuron at pH 7 and 4.5

تقریبی ۳۰ نانومتر به خوبی توزیع شده‌اند (شکل ۲).

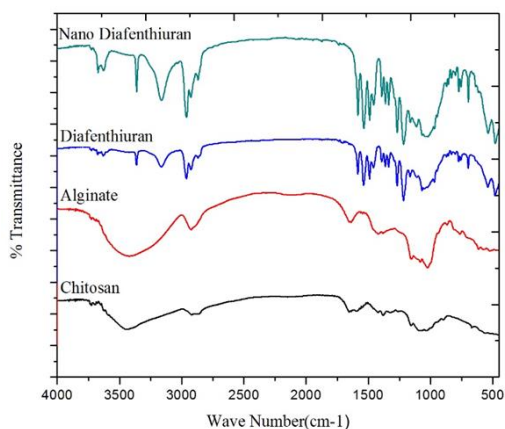
تصاویر نانوهگزی تیازوکس و نانودیافنتیوران نشان داد که نانوذرات با کمترین تراکم و انباشتگی و اندازه



شکل ۲. تصاویر FESEM نانو هگزی تیازوکس (a) و نانودیا فنتیوران (b)
Figure 2. FESEM images of nanoheptythiazox (a) and nanodiafenthiuron (b)

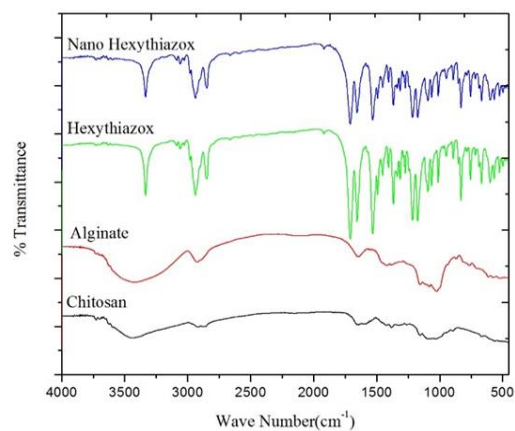
گروه آلکن، $2938/43 \text{ cm}^{-1}$ پیوند C-H گروه آلکان در ساختار کیتوزان و سدیم آلژینات و $1709/36 \text{ cm}^{-1}$ پیوند C=O مربوط به کربوکسیل اسید در ساختار سدیم آلژینات می باشد (شکل ۳-الف).

(ب)



پیک های شاخص در طیف نانو هگزی تیازوکس $3333/94 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند N-H گروه آمید، پیک های $1300-1200 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند N-O در هگزی تیازوکس، $3058/15 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-H

(الف)



شکل ۳. طیف آفتکشها (الف: هگزی تیازوکس؛ ب: دیا فنتیوران)، کیتوزان و سدیم آلژینات
Figure 3. FTIR spectra of pesticides (A: Hexythiazox; B: Diafenthiuran), chitosan and sodium alginate

باشد (شکل ۳-ب).

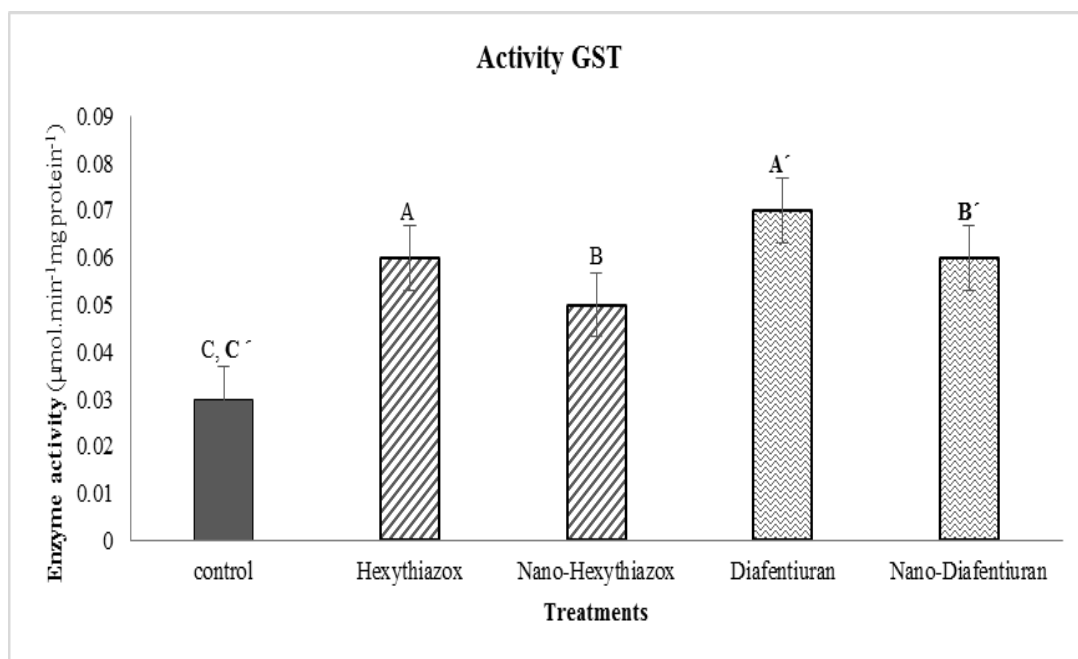
در این مطالعه پیک شاخص در XRD نانوذرات بارگذاری شده با هگزی تیازوکس و دیا فنتیوران در زاویه 2θ به ترتیب در $19/339$ و $21/450$ ظاهر شد. اندازه ذرات نانو هگزی تیازوکس و نانودیا فنتیوران به-

طیف FTIR نانودیا فنتیوران شامل پیک های اصلی $3673/68-3630/66 \text{ cm}^{-1}$ ، O-H پیوند به پیوند $2869/99 \text{ cm}^{-1}$ پیوند C-H در ساختار کیتوزان و سدیم- آلژینات، $1610-1550 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوند C-O و $1500-1400 \text{ cm}^{-1}$ پیوند C-C در دیا فنتیوران می-

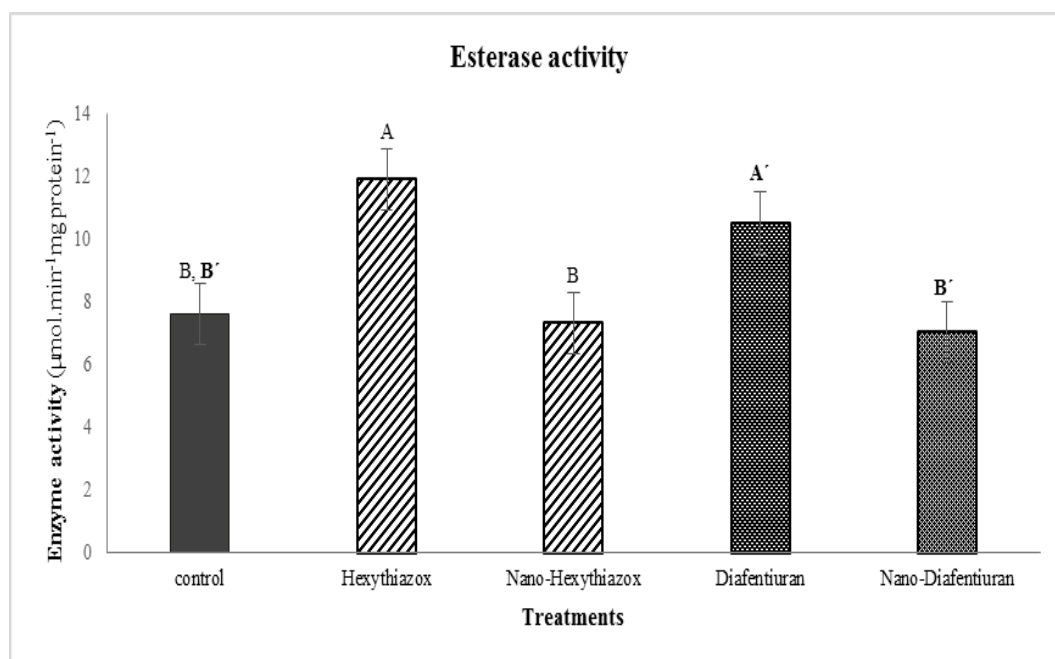
داشت ($P=0.002$) درحالی که فعالیت GST در تیمارهای نانو هگزی تیازوکس و نانودیافنتیوران نسبت به فرمولاسیون های تجاری کمتر بود ($P=0.03$).

ترتیب ۵۴/۱۸ و ۴۹/۹۴ نانومتر بود. فعالیت گلو تاتیون اس ترانسفراز در تیمارهای مختلف اختلاف معنی دار نشان داد (شکل ۴-الف). ۲۴ ساعت پس از تیمار، فعالیت GST با فرمولاسیونها نسبت به شاهد افزایش

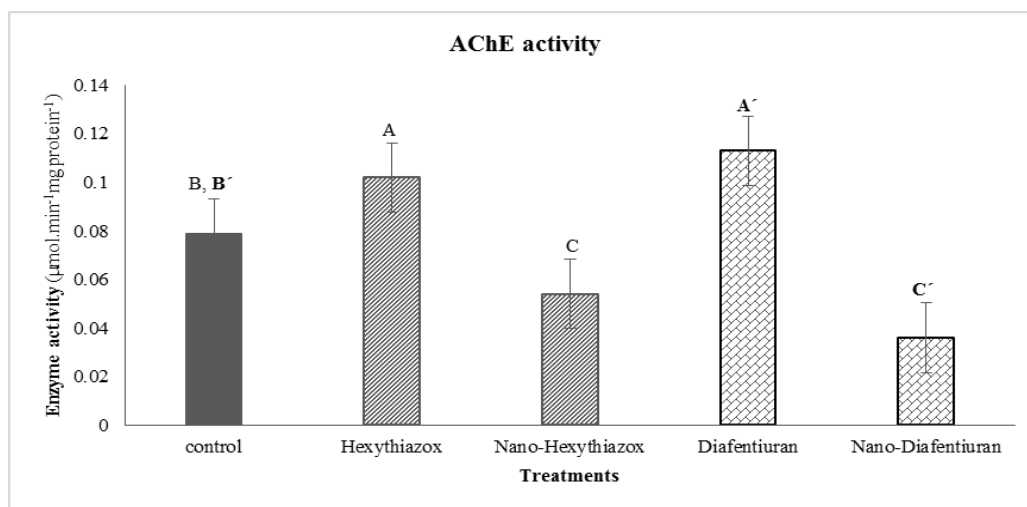
(الف)



(ب)



(پ)



شکل ۴. فعالیت GST (الف)، استراز (ب) و AChE (پ) در کنه تارتن دولکه‌ای تیمارشده با آفت‌کش‌های مورد مطالعه (میله‌های عمودی نشان‌دهنده حدود پایین خطای معیار (SE) هستند. حروف مختلف در داخل یا در بین تیمارها، تفاوت‌های معنی‌داری را نشان می‌دهند (Tukey's HSD؛ $P > 0.05$))

Figure 4. GST (A), Esterase (B), and AChE (C) activity in two-spotted spider mite treated with the studied pesticides

(Vertical bars represent lower limits of standard error bars (SE). The different letters within or among treatments show significant differences (Tukey's HSD, $P > 0.05$))

ایمیداکلوپراید و کلرپیرفوس و نانوفرمولاسیون آن‌ها روی سوسک‌حنایی خرما انجام و نتیجه مشابهی بدست آمد (Abd El-Fattah *et al.*, 2019). همچنین در بررسی اثر نانوکپسول پیریمیکارب و پایمتروزین، نتایج نشان‌دهنده مقدار LC_{50} کم در نانوفرمولاسیون‌های نسبت به فرمولاسیون تجاری و بروز کارایی مناسب‌تر آنها بود (Maroofpour *et al.*, 2019).

وجود کیتوزان می‌تواند دلیلی بر افزایش سمیت نانوفرمولاسیون‌های بارگذاری شده با آفت‌کش‌ها در مطالعه حاضر باشد، هرچند که اثرات کنه‌کشی قابل-توجهی نشان نداد (جدول ۲) که احتمالاً به دلیل اثر هم‌افزایی کیتوزان و آفتکشها و تشکیل ساختارهای شیمیایی پایدار با قابلیت نفوذ بیشتر به بدن کنه در مقایسه با حالات خالص ترکیبات می‌باشد که نیاز به مطالعه تکمیلی برای اثبات دارد. در زیست‌سنجی کیتوزان و نانوکیتوزان علیه شمشک سیاه زیتون، LC_{50} به ترتیب ۱۲۸ و ۳۷ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که فعالیت حشره‌کشی کیتوزان و افزایش سمیت نانوفرمولاسیون آن‌را تایید کرد (Sabbour, 2019).

فعالیت استراز در کنه تارتن دولکه‌ای تیمارشده با فرمولاسیون تجاری آفت‌کش‌ها نسبت به شاهد (شکل ۴-ب)، افزایش داشت ($P=0.03$)، اما فعالیت این آنزیم در تیمارهای نانوفرمولاسیونی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0.975$) ولی نسبت به فرمولاسیون‌های تجاری کاهش یافت ($P=0.023$).

نتایج پژوهش نشان داد که فعالیت AChE در کنه‌های تیمار شده با فرمولاسیون‌های تجاری در مقایسه با شاهد افزایش یافت ($P=0.02$) در حالی‌که در نانوفرمولاسیون‌ها، فعالیت آن نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P=0.001$). نانودیافنتیوران در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها، باعث کاهش AChE شد (شکل ۴-پ).

بحث

براساس نتایج زیست‌سنجی این پژوهش، نانو‌هگزیز-تيازوکس و نانودیافنتیوران نسبت به فرمولاسیون‌های تجاری خود سمیت بیشتری روی کنه تارتن دولکه‌ای داشتند. در بررسی مشابهی زیست‌سنجی

باعث آزادسازی آرام و پیوسته آفت‌کش‌ها و رسیدن بهتر آفت‌کش به محل هدف (در خاک) می‌شود (Grillo *et al.*, 2014). در مطالعه کارایی لوریل-گلیکول کیتوزان به‌عنوان حامل تیمول، رهاسازی کامل از کیسه دیالیز ۳۸ ساعت ادامه داشت (Yusoff *et al.*, 2019). اطلاع از اندازه نانوذرات به‌ویژه از نظر شناخت نحوه رفتار و عملکرد آنها در شرایط مختلف دارای اهمیت است. اندازه ذره روی ترکیب و ماندگاری زیستی نانوذره نیز موثر است. مشخص شده که جذب سلولی و خصوصیات سمی نانوذرات، به اندازه آنها بستگی دارد. همچنین اندازه و شکل نانوذرات می‌تواند عملکردهای متفاوت سلولی را در پی داشته و حتی مهاجرت سلولی روی سطوح را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (Parveen *et al.*, 2016).

نتایج نشان داد که پیوندهای موجود در طیف نانوذرات کیتوزان-سدیم‌آلژینات و هگزی‌تیاژوکس و دیپانتیوران به‌طور مشترک ظاهر شده‌اند که نشان‌دهنده بارگذاری آفت‌کش‌ها با نانوذرات می‌باشد. اندازه‌گیری‌های XRD جهت تعیین اندازه و ساختار نانوذرات استفاده می‌شود. معمولاً اصطلاح نانو به ذراتی با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر اطلاق می‌شود (Khan *et al.*, 2019). اندازه نانوذرات سنتز شده در این پژوهش نیز در این محدوده قرار داشته و احتمال داده می‌شود که نانواقت‌کش‌ها، نفوذ بهتری به بدن حشره دارند. GSTs، آنزیم‌های چندکاری درگیر در متابولیسم ترکیبات ناگوار هستند که قادرند ترکیبات بیگانه و متابولیت‌های آنها را به گلوکوتایون سه‌پیتیدی متصل و آنها را برای سهولت دفع، قابل‌حل سازند (Oakley, 2011). در بررسی تأثیر نانوایندوکساکارب و نانوایمیداکلوپیرید روی پروانه برگ‌خوار توت مشخص شد که با افزایش غلظت نانوذرات پس از ۲۴ ساعت، فعالیت GST کاهش معنی‌داری داشت اما با گذشت زمان، فعالیت GST افزایش یافت که نشان‌گر اثر متقابل غلظت و زمان برای افزایش ترکیب گلوکوتایون احیاشده با نانوذرات بود (Memarizadeh *et al.*, 2014). براساس بررسی منابع انجام شده، به اثرات اختصاصی ساختارهای نانوفرموله آفت‌کش‌های تجاری

همچنین در آزمایشات زیست‌سنجی کیتوزان و نانوکیتوزان روی سوسک‌برگ‌خوار (Coleoptera: *Cassida vittata* (Chrysomelidae) به‌ترتیب LC₅₀، ۱۵۰ و ۱۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد (Sabbour and Abdel-Hakim, 2018). نتایج نشان داد که کیتوزان-سدیم‌آلژینات می‌تواند به‌عنوان حامل در نانوهگزی‌تیاژوکس و نانودیپانتیوران استفاده شود بدون اینکه به تنهایی اثرات کنه‌کشی قابل توجهی داشته‌باشند (جدول ۲) که این اثر هم-افزایی حاملها نیاز به بررسی بیشتر دارد. اخیراً، استفاده از میسل‌های پلیمری به‌ویژه مشتقات کیتوزان به‌عنوان حامل در فرمولاسیون آفت‌کش‌های آبگریز موردتوجه قرار گرفته است (Zhao *et al.*, 2017). حاملین در نانوفرمولاسیونها باید قابلیت پیوند سریع و پایدار با ترکیب موردنظر بسته به هدف مطالعه مانند تحویل دارو، آفتکش یا حتی ژن داشته باشند (Zhao *et al.*, 2017). با اتصال بخش‌های آب‌دوست و آبگریز، حامل پلیمری خواص آمفی‌فیلیک نشان داده که می‌تواند خود را در محلول آبی جمع کند. مشتقات کیتوزان نیز به‌عنوان حامل برای آفت‌کش‌های گیاهی بررسی شده و نتایج امکان استفاده از آنها به‌عنوان حامل جدید محلول در آب برای فرمولاسیون سموم را نشان داد (Kamari *et al.*, 2016). در مطالعه دیگری، مشخص شد که لوریل‌گلیکول کیتوزان می‌تواند به‌عنوان حامل در نانواقت‌کش‌ها استفاده شود (Yusoff *et al.*, 2019). نتایج عملکرد اختصاصی نانوهگزی-تیاژوکس و نانودیپانتیوران در pH اپتیمم معده کنه تارتن‌دولکه‌ای نشان داد که نانوفرمولاسیونها می‌تواند به‌عنوان فرمولاسیونی سازگار با اهداف کشاورزی دقیق استفاده شود. درصد رهاسازی نانوفرمولاسیونها در پژوهش‌های مختلف ارزیابی شده‌است. به‌عنوان مثال رهاسازی پاراکوات بارگذاری شده با کیتوزان-آلژینات در pH ۷ تا ۶ ساعت پس از شروع آزمایش افزایش یافت و پس از آن ثابت باقی ماند (Dos Santos Silva *et al.*, 2011). در بررسی دیگری، نتایج رهاسازی پاراکوات بارگذاری شده در کیتوزان تری‌پلی‌فسفات در pH ۴/۵ ابتدا صعودی بوده و پس از ۵ ساعت به-مقدار ثابت رسید که نشان می‌دهد استفاده از نانوذرات

می‌شوند (Pang, 2014) اما برخی از سموم دیگر مانند سموم گیاهی نیز توانسته‌اند در مهار این آنزیم نقش ایفا نمایند. مهار AChE توسط سموم مختلف از طریق برهمکنش گروه‌های عامل شیمیایی فعال در آنها با گروه هیدروکسیل سرین در جایگاه فعال AChE بوده که باعث غیرفعال شدن این آنزیم در بدن موجود زنده می‌شود (De Menezes *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر، افزایش و کاهش فعالیت استیل کولین استراز در کنه‌های تیمار شده با فرمولاسیون‌های تجاری و نانوافت‌کشاها بیانگر این است که نانوفرمولاسیون‌ها با بازدارندگی فعالیت این آنزیم که مسئول هیدرولیز کردن استیل کولین است، قادرند اثرات حادی در فیزیولوژی کنه تیمار شده ایجاد نموده، بنابراین می‌تواند در مدیریت این آفت کارایی داشته باشند.

نتایج نانوفرمولاسیون‌ها در مطالعه حاضر با نتایج سایر محققین مطابقت دارد هرچند که مطالعات منحصر به بررسی اثر نانوذرات فلزی روی آفات بوده و نشان داد که فعالیت این آنزیم به طور قابل توجهی کاهش یافت (Tuncsoy *et al.*, 2019). مشخص شده که AChE بعنوان شاخص اساسی سمیت عصبی در حشرات عمل می‌نماید (Mishra *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که حامل کیتوزان-سدیم آلژینات بخصوص در pH ۴/۵ (pH تغذیه‌ای کنه) بطور موثری می‌تواند باعث بارگذاری و رهاسازی مطلوب نانوهگزی-تيازوکس و نانودیافتیوران و در نتیجه سمیت بالاتر آنها در مقایسه با فرمولاسیون‌های تجاری علیه کنه تارتندولکه‌ای گردد. افزایش فعالیت GST نشان‌دهنده افزایش ترکیب گلوپروتئین احیاشده با آفت‌کش‌ها و نانوفرمولاسیون‌ها بود. فعالیت استراز در تیمارهای نانوفرمولاسیون‌ها کمتر فرمولاسیون‌های تجاری بود. استراز و GST نقش مهمی در تجزیه و خنثی سازی سموم وارده به بدن موجودات داشته و با کاهش فعالیت آنها، سم‌زدایی کاسته، محدود و یا متوقف می‌شود. علیرغم اینکه هگزی تيازوکس و دیافتیوران دارای اثرات تایید شده روی سیستم عصبی نمی‌باشند

بطور متمرکز روی آفات مختلف پرداخته نشده و در مطالعات تاکنون فقط اثرات نانوذرات فلزی ارزیابی گردیده است. در این مطالعات مشخص شده که بطور کلی نانوذرات باعث افزایش فعالیت GST در حشرات شده است (Tuncsoy *et al.*, 2019). بطور کلی یافته‌های پژوهش، حاکی از نقش موثر گلوپروتئین‌اس-ترانسفراز در سم‌زدایی نانوذرات می‌باشد. احتمالاً کاهش فعالیت GST در کنه‌های تیمار شده با نانوهگزی تيازوکس و نانودیافتیوران بدلیل بلوکه شدن این آنزیم توسط ساختارهای نانوفرمولاسیون‌ها است.

به خاطر اهمیت استرازهای عمومی در فیزیولوژی حشرات، متابولیسم و سم‌زدایی ترکیبات ناگوار، در این مطالعه نقش این آنزیم به عنوان زیست‌نشانگر تعیین سمیت فرمولاسیون تجاری و نانوهگزی-تيازوکس و نانودیافتیوران بررسی شد. کاهش فعالیت استرازی در نانوفرمولاسیون‌ها در مقایسه با فرمولاسیون‌های تجاری بیانگر این است که این گروه از سموم توانسته‌اند با مهار فعالیت استراز، باعث ایجاد مسمومیت بیشتری در مقایسه با فرمولاسیون‌های تجاری در کنه‌های تیمار شده گردند. مشخص شده که استراز یکی از آنزیم‌های موثر در مقاومت کنه تارتندولکه‌ای به سموم است (Farahani *et al.*, 2018). مشخص شده که با افزایش غلظت نانوذرات، فعالیت استراز کاهش می‌یابد، بنابراین این آنزیم می‌تواند یک شاخص خوب برای تشخیص میزان سمیت این نانوذره باشد (Memarizadeh *et al.*, 2014).

استیل کولین استراز که در سامانه‌های عصبی موجودات به فراوانی یافت می‌شود، می‌تواند یکی از ملاک‌های سنجش مقاومت به آفت‌کش‌ها باشد. تغییر ساختاری در مکان هدف استیل کولین استراز، بعنوان مکانیسم عمده ایجاد مقاومت به آفت‌کش‌ها در حشرات شناخته شده است (Pang, 2014). استیل-کولین بعنوان یکی از اصلی‌ترین ناقلین عصبی بوده که در فضای سیناپسی توسط AchE به کولین و اسیداستیک تجزیه شده و در فرایند انتقال پیام اختلال ایجاد می‌شود. هرچند که سموم فسفره و کارباماته بعنوان مهارکننده‌های قوی AchE شناخته

مهیا ساختن اجرای این طرح سپاسگزاری می‌گردد. این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده اول است. طرح حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل و پژوهانه نویسنده دوم (UOZ-GR-) اجرا شده‌است.

اما کاهش میزان فعالیت AChE معرف مکانیسم تاثیر نانوفرمولاسیون‌های هگزی تیازوکس و دیافنتیوران بر سیستم‌عصبی کنه تارتن‌دولکه‌ای بوده که تایید قطعی آن نیازمند مطالعات تکمیلی آینده و بخصوص مولکولی می‌باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

سپاسگزاری

از دانشگاه زابل و دبیر فست‌فود جهت

REFERENCES

1. Abd El-Fattah, A.Y., El-Shafei, W.K.M., El-Helaly, A.A. & AbdEl-Wahab, A.S. (2019). Testing nano-pesticides toxicity against red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) in Egypt. *Plant Archives*, 19, 1559-1568.
2. Alizadeh, A., Talebi, K., Hosseinaveh, V. & Ghadamyari, M. (2011). Metabolic resistance mechanisms to phosalone in the common pistachio psyllid, *Agonoscaena pistaciae* (Hem.: Psyllidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 59-64.
3. 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.
4. De Menezes, C.G., Carvalho, G., Alves, D.S., de Carvalho, A.A., Aazza, S., de Oliveira Ramos, V., Pereira Pinto J.E.B. & Bertolucci, S.K.V. (2020). Biocontrol potential of methyl chavicol for managing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), an important corn pest. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 5030-5041
5. Dekeyser, M.A. (2005). Acaricide mode of action. *Pest Management Science*, 61, 103-110.
6. Dos Santos Silva, M., Cocenza, D.S., Grillo, R., de Melo, N.F.S., Tonello, P.S., de Oliveira, L.C., Cassimiro, D.L., Rosa, A.H. & Fraceto, L.F. (2011). Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of Hazardous Materials*, 190, 366-374.
7. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V. & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
8. Erban, T. & Hubert, J. (2010). Determination of pH in regions of the midguts of acaridid mites. *Journal of Insect Science*, 10, 1-3.
9. Farahani, S., Bandani, A. & Eslami, S. (2018). Comparison of susceptibility of two Iranian populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to spirodiclofen. *Persian Journal of Acarology*, 7, 279-287.
10. Gao, P., Nie, X., Zou, M., Shi, Y. & Cheng, G. (2011). Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. *The Journal of Antibiotics*, 64, 625-634.
11. Grillo, R., Pereira, A.E., Nishisaka, C. S., de Lima, R., Oehlke, K., Greiner, R. & Fraceto, L.F. (2014). Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 163-171.
12. Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1976). Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 175, 710-716.
13. Jana, S. & Jana, S. (2019). Functional chitosan drug delivery and biomedical applications (Drug delivery and biomedical applications). Springer, India. 494 pages.
14. Kah, M. (2015). Nanopesticides and nanofertilizers: Emerging contaminants or opportunities for risk mitigation?. *Frontiers in Chemistry*, 3, 1-6.
15. Kamari, A., Aljafree, N.F.A. & Yusoff, S.N.M. (2016). Oleoyl-carboxymethyl chitosan as a new carrier agent for the rotenone pesticide. *Environmental Chemistry Letters*, 14, 417-422.
16. Khan, I., Saeed, K., and Khan I. 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 908-931.
17. Krishna, R.A. & Bhaskar, H. (2016). Evaluation of selected acaropathogenic fungi, botanicals and new acaricide molecules against *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae) on okra. *Journal of Tropical Agriculture*, 54, 21-26.
18. Kumari, S., Chauhan, U., Kumari, A. & Nadda, G. (2017). Comparative toxicities of novel and conventional acaricides against different stages of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16, 191-196.
19. Kydonieus, A.F. (1980.) Fundamental concepts of controlled release. *Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications*. CRC Press.
20. Maroofpour, N., Hejazi, J., Hamishe-Kar, H. & Iranipour, S. (2019). Evaluation of the effect of premitarb and pimeproline nanocapsules on the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer and the life table parameters of *Chrysoperla carnea* (Stephens). PhD Thesis. Department of Plant Protection, University of Tabriz. 112 pp.

21. Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Adeli, M. & Talebi, K. (2014). Biochemical biomarkers of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) in exposure to TiO₂ nanoparticles. *Invertebrate Survival Journal*, 11, 47-53.
22. Mishra, P., Balaji, A.P.B., Dhal, P.K., Kumar, R.S., Magdassi, S., Margulis, K., Tyagi, B.K., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N. (2017). Stability of nano-sized permethrin in its colloidal state and its effect on the physiological and biochemical profile of *Culex tritaeniorhynchus* larvae. *Bulletin of Entomological Research*, 107, 676-688.
23. Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: A structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 43,138-151.
24. Pang, Y.P. (2014). Insect acetylcholinesterase as a target for effective and environmentally safe insecticides. *Advances in Insect Physiology*, 46,435-494.
25. Parveen, K., Rafique, U., Safi, S.Z. & Ashraf, M.A. (2016). A novel method for synthesis of functionalized hybrids and their application for wastewater treatment. *Desalination and Water Treatment*, 57,161-170.
26. Pawar, S.N. & Edgar, K.J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33,3279-3305.
27. Robertson, J.L., Jones, M.M., Olguin, E. & Alberts B. (2017). *Bioassays with Arthropods*. 3rd ed. CRC Press. 194 pp.
28. Sabbour, M.M. & Abdel-Hakim, E.A. (2018). Control of *Cassida vittata* Vill (Coleoptera: Chrysomelidae) using chitosan and nano chitosan. *Sciences*, 8,141-144.
29. Sabbour, M.M. (2019). Effect of chitosan and nano-chitosan on *Saissetia oleae* (Hemiptera: Coccidae). *Journal of Applied Sciences*, 19,128-132.
30. Suwanboon, S., Amornpitoksuk, P., Sukolrat, A. & Muensit, N. (2013). Optical and photocatalytic properties of La-doped ZnO nanoparticles prepared via precipitation and mechanical milling method. *Ceramics International*, 39,2811-2819.
31. Talebi Jahromi, K. (2011). Toxicology of pesticides, insecticides, acaricides and redenticides. University of Tehran Press, 508 pages.
32. Tuncsoy, B.S., Tuncsoy, M., Gomes, T., Sousa, V., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J. & Ozalp, P. (2019). Effects of copper oxide nanoparticles on tissue accumulation and antioxidant enzymes of *Galleria mellonella* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102,341-346.
33. Van Asperen, K. (1962). A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8,401-416.
34. Wang, Y., Cui, H., Sun, C., Zhao, X. & Cui, B. (2014). Construction and evaluation of controlled-release delivery system of Abamectin using porous silica nanoparticles as carriers. *Nanoscale Research Letters*, 9,655-660.
35. Wu, M., Adesanya, A.W., Morales, M.A., Walsh, D.B., Lavine, L.C., Lavine, M.D. & Zhu, F. (2019). Multiple acaricide resistance and underlying mechanisms in *Tetranychus urticae* on hops. *Journal of Pest Science*, 92,543-555.
36. Yusoff, S.N.M., Kamari, A., Ishak, S., Jumadi, J., Abdulasool, M.M., Kumaran, S. & Wong, S.T.S. (2019). Synthesis and characterization of thymol-loaded lauryl glycol chitosan for pesticide formulation. *Journal of Physics*, 1397,1-9.
37. Zhao, X., Cui, H., Wang, Y., Sun, C., Cui, B. & Zeng, Z. (2017). Development strategies and prospects of nano-based smart pesticide formulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66,6504-6512.