

تأثیر بازدارندگی تخم‌ریزی و کشندگی اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی و اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی، فرموله‌شده به صورت نانو و میکروامولسیون، روی سفیدبالک *Bemisia tabaci* در شرایط گلخانه

علیرضا بلندنظر^{۱,۳*}، محمد قدمیاری^۲، محمدرضا معمارزاده^۳ و جلال جلالی‌سندی^۴

۱- گروه گیاه‌پزشکی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج، کاشان، ایران و ۴- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Bolandnazar@yahoo.com

چکیده

برخی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای خواص حشره‌کشی مطلوبی علیه سفیدبالک پنبه *Bemisia tabaci* Gen. می‌باشند ولی استفاده عملی و تجاری از آنها با توجه به فرار بودن و ناپایداری این مواد، کمتر صورت گرفته است. در این مطالعه اسانس‌های رزماری *Rosmarinus officinalis* L.، نعناع فلفلی *Mentha piperita* L. اکالیپتوس *Eucalyptus globules* L. و عصاره آویشن باغی *Thymus vulgaris* L. به صورت میکرو و نانوامولسیون فرموله شد و کارایی حشره‌کشی و میزان بازدارندگی تخم‌ریزی این ترکیبات در شرایط گلخانه مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا آزمون‌های زیست‌سنجی به روش غوطه‌ورسازی برگ‌های حاوی پوره سن دو و سه انجام و شاخص LC₉₀ تخمین زده شد. سپس آزمون بازدارندگی تخم‌ریزی با روش پروتکل انتخاب آزاد (با اندازه‌گیری شاخص میزان تخم‌گذاری روی بوته‌ها) و همچنین آزمون میزان کشندگی تخم، پوره سنین مختلف و سفیره در غلظت LC₉₀، در مقایسه با صابون گیاهی پالیزین®، آب مقطر و شاهد (بدون هیچ تیماری) انجام شد. تیمار نانوامولسیون محتوی مجموع اسانس‌ها (هرکدام از اسانس‌ها ۲ درصد) با LC₉₀ برابر با ۳/۱۲۰۸ میلی‌گرم بر لیتر، سمیت بالایی نسبت به بقیه تیمارها روی پوره سن دو و سه این آفت داشت. همچنین این تیمار با میانگین ۱۸/۲ درصد تخم روی بوته تیمار شده، کمترین درصد را بین تیمارها داشت که نشان‌دهنده بیشترین میزان بازدارندگی تخم‌ریزی است. این تیمار میانگین مرگ و میر تخم ۲۵/۰ درصد و مرگ و میر پوره و سفیره ۵۱/۶ درصد را نیز نشان داد. تیمار میکروامولسیون محتوی مجموع اسانس‌ها و عصاره (هرکدام از اسانس‌ها ۲ درصد و عصاره ۲۰ درصد) نیز اثرات قابل قبولی داشت (پارامترهای فوق به ترتیب ۳/۴۶۱۷ میلی‌گرم بر لیتر، ۲۳/۳، ۴۲/۳ و ۷۴/۰ درصد). کارایی این دو تیمار از صابون گیاهی پالیزین® و سایر تیمارها (میکروامولسیون) از ۲۰ درصد عصاره، مواد جانبی تیمارها، آب مقطر و شاهد (بدون هیچ تیماری) بیشتر بود و این دو تیمار می‌توانند با انجام آزمون‌های تکمیلی در مدیریت تلفیقی این آفت مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: حشره‌کش گیاهی، سفیدبالک پنبه، سمیت، زیست‌سنجی، بازدارندگی تخم‌ریزی.

Oviposition inhibitory and lethal effect of essential oils of rosemary, peppermint and eucalyptus and thyme extract, formulated as nano- and microemulsions, on *Bemisia tabaci* under greenhouse condition

Alireza Bolandnazar^{1,3,*}, Mohammad Ghadamyari², Mohammadreza Memarzadeh³ & Jalal Jalali sandi⁴

1- Agricultural Entomology. Department of Plant Protection, University Campus-2, University of Guilan, Rasht. Iran, 2- Department of plant protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran, 3- Plants Research Centre, Kashan, Iran & 4- Department of plant protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran

* Corresponding author, E-mail: Bolandnazar@yahoo.com

Abstract

Some essential oils and plant extracts potentially possess insecticidal properties against Sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* Gen.; however, the practical and commercial use of these compounds have not developed due to their volatility and instability. In this study, essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha piperita* L. and *Eucalyptus globules* L. and extract of *Thymus vulgaris* L., were formulated as micro and nano-emulsion, and their insecticide efficiency and oviposition inhibitory effects were tested under greenhouse conditions. First, bioassay tests were done using the leaf dipping method, on 2nd and 3rd nymphal instar and LC₉₀ was estimated. Then, the oviposition inhibitory test with choice test method (by measuring the index of laying on plants), as well as eggs mortality rate, and all nymphal and pupa mortality rate at a concentration of LC₉₀ were calculated, in comparison with herbal soap Palazin[®] distilled water and control (without any treatments). Nano-emulsion treatment containing all essential oils (2% of each) at a concentration of LC₉₀, had a high toxicity of 3.1208 mg/l on 2nd and 3rd nymphal instar in comparison with other treatments. Also, this treatment with an average of 18.2% had the lowest egg percentage per treated plant, indicating the highest oviposition inhibitory activity. Moreover, this treatment showed an average egg mortality of 25.0%, while, in nymphal and pupal satge, average mortality of 51.6% was recored. Micro-emulsion treatment containing essential oils and extracts (2% of each essential oils and 20% of extract) also exhibited acceptable effects (the above parameters were 3.4617 mg/l, 23.3%, 42.3% and 74.0% respectively). The efficacy of these two treatments was higher than herbal soap Palazin[®] and other treatments, thus these two treatments can be used in the Integrated Pest Management, after doing the complementary tests.

Key words: Botanical insecticide, Sweetpotato whitefly, Toxicity, Bioassay.

Received: 30 October 2017, Accepted: 05 March 2018

مقدمه

با توجه به نقش آفت‌کش‌های شیمیایی در کنترل آفات کشاورزی و چالش‌های ناشی از استفاده بی‌رویه از آن‌ها، نیاز به معرفی جایگزین‌هایی که بقایای کم‌خطرتری در محیط باقی گذاشته و در عین حال فعالیت آفت‌کشی قابل‌قبولی در مقایسه با آفت‌کش‌های رایج داشته باشند، ناگزیر به نظر می‌رسد. گرایش به استفاده از ترکیب‌های طبیعی که ضمن سازگاری با محیط‌زیست، دارای ویژگی‌های آفت‌کشی مطلوب نیز باشند، رو به گسترش است و به همین دلیل امروزه حجم وسیعی از پژوهش‌ها روی آفت‌کش‌های زیست‌سازگار (Biocompatible pesticides) متمرکز شده است (Isman *et al.*, 2011). گیاهان یک منبع غنی از مواد شیمیایی دفاعی هستند (Wink *et al.*, 1998) و این مواد ممکن است ویژگی‌های حشره‌کشی، بازدارندگی تخم‌ریزی، جلب‌کنندگی، ضدتغذیه‌ای و تاثیر تنظیم‌کنندگی رشد روی حشرات از خود نشان دهند (Champagne *et al.*, 1998). ترکیبات مورد اشاره در بالا، علاوه بر سمیت روی آفات ممکن است روی دشمنان طبیعی انتخابی عمل کرده و به طور معمول تاثیر سوء اندکی بر موجودات غیرهدف (پارازیتوئیدها و شکارگرها) و محیط‌زیست داشته باشند. با توجه به فرآیند اسانس‌ها، ماندگاری آن‌ها تحت شرایط مزرعه محدود می‌باشد. اگرچه دشمنان طبیعی مستعد مسمومیت از طریق تماس مستقیم هستند اما شکارچیان و پارازیتوئیدهای یک محصول تحت تیمار، بعید است یک یا چند روز پس از تیمار، به وسیله تماس با باقیمانده آن‌چه به صورت معمولی از حشره‌کش‌ها باقی می‌ماند، مسموم شوند. در واقع، ماندگاری کم اسانس‌ها در شرایط مزرعه به حفظ دشمنان طبیعی منجر می‌شود؛ هرچند که این مساله همچنان تحت ارزیابی قرار دارد (Arnason *et al.*, 1989). قدمت استفاده تجاری از گیاهان به عنوان آفت‌کش به سال ۱۸۵۰ برمی‌گردد، که در بین آن‌ها می‌توان به استفاده از نیکوتین، روتون و پایریتروم اشاره کرد. امروزه نیز فرآورده‌هایی

بر پایه عصاره درخت چریش (نیم) و اسانس‌های میخک، رزماری، نعناع فلفلی، دارچین، لیمو و آویشن به منظور مدیریت آفات بهداشتی، زراعی و گلخانه‌ای ساخته شده و به صورت تجاری وارد بازار مصرف شده است (Isman *et al.*, 2010). با توجه به پایداری کم اسانس‌های گیاهی در محیط‌های باز، غالب ترکیبات و اسانس‌های فرموله‌شده قابل توصیه در محیط‌های بسته مانند گلخانه‌ها هستند.

اکثر کارهای انجام‌شده روی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به ویژه در ایران، اثر ترکیب خالص و یا حل شده در حلال را روی حشرات مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند و نسبت به فرموله کردن این مواد و تبدیل آن به صورت یک فرآورده تجاری اقدامات محدودی انجام شده است (Yarahmadi *et al.*, 2012; Fahim *et al.*, 2012; Ail-Catzim *et al.*, 2015; Samarefekhri, *et al.*, 2014; Jafarbeighi *et al.*, 2012; مورد روی فرموله کردن و استفاده تجاری از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در دنیا و در کشور ما فعالیت‌هایی صورت گرفته است. خاصیت فرآوردن ماده مؤثره اسانس‌ها و اکسیدشدن سریع آن‌ها باعث شده است تا فناوری‌های جدیدی برای بهبود کارایی سمیت اسانس‌ها با حفظ ماهیت‌شان به کار گرفته شوند. یکی از این روش‌ها، استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف و تغییراتی است که می‌تواند کیفیت و میزان تأثیر آفت‌کشی این ترکیبات را افزایش دهد. انتخاب نوع فرمولاسیون بستگی به فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی، خواص بیولوژیکی اسانس، نحوه اثر، چگونگی کاربرد و نوع محصول دارد. فرموله کردن اسانس‌ها و عصاره‌ها با روش امولسیون (میکرو یا نانوامولسیون) یکی از این روش‌ها محسوب می‌شود (Ziaee, Mirmajidi & Abbasi, 2013; Zare *et al.*, 2011; McClements, 2012; 2014; & Hamzevy,

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 به ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری فعالیت دارد. این آفت به ویژه در شرایط گلخانه‌ای روی گیاهان زینتی و محصولات گلخانه‌ای در جمعیت‌های خیلی بالا دیده می‌شود (Oliveira *et al.*, 2001). تاکنون ۵۹۳ گزارش مقاومت به آفت‌کش‌ها در این گونه گزارش شده است و در حال حاضر به ۵۶ ترکیب مقاوم شده است (Arthropod Pesticide Resistance Database). 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 (Isman, 2006). البته علی‌رغم پتانسیل بالای اسانس‌های گیاهی در کنترل آفات، مشکلاتی مانند فرآوردن اسانس‌های گیاهی، حلالیت کم در آب و ظرفیت اکسیداسیونی بالای آن‌ها سبب شده است که استفاده کاربردی از آنها با محدودیت‌هایی همراه باشد (Moretti *et al.*, 2002).

در حال حاضر معرفی ترکیبات کم‌خطر، موثر و با پتانسیل مقاومت کم‌تر برای کنترل این آفت بیش از پیش احساس می‌شود. اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با منشاء طبیعی در صورت برطرف کردن مشکلات تجاری سازی و فرمولاسیون آن‌ها، می‌توانند در کنترل این آفت در محیط گلخانه موثر باشند. همچنین با توجه به رویکرد سال‌های اخیر جامعه به مصرف مواد غذایی ایمن و حاوی حداقل آفت‌کش سنتزی، نیاز به تولید آفت‌کش‌های زیستی و در عین حال موثر و کم‌خطر برای محیط‌زیست، بیش از پیش وجود دارد.

در این تحقیق پس از جمع‌آوری گیاهان دارویی، اسانس‌گیری از گیاهان رزماری، نعناع فلفلی، اکالپتوس و عصاره‌گیری از گیاه آویشن باغی و سپس شناسایی ترکیبات عمده موجود در آنها؛ با بررسی اثرات اسانس‌ها و عصاره به صورت فرموله‌شده بر پایه میکرو و نانوامولسیون، سعی شده است تا کارایی بازدارندگی تخم‌ریزی و حشره‌کشی ترکیبات گیاهی با کمک فرمولاسیون‌های مختلف افزایش یابد. پس از ساخت ترکیبات فرموله‌شده از

گیاهان دارویی فوق‌الذکر، با انجام آزمون‌های مختلف، خواص فیزیکی و شیمیایی فرمولاسیون‌ها از جمله اندازه ذرات مشخص شد. به منظور انجام آزمون‌های زیست‌سنجی، ابتدا غلظت LC₉₀ این ترکیبات که جهت انجام آزمون‌های گلخانه‌ای مورد نیاز است، با کمک آزمون‌های زیست‌سنجی در محیط آزمایشگاه روی مراحل مختلف زندگی این آفت محاسبه گردید. سپس خاصیت کشندگی و بازدارندگی تخم‌ریزی این ترکیبات فرموله‌شده در مقایسه با کنترل مثبت (صابون گیاهی پالیزین)، منفی (آب مقطر) و شاهد (بدون هیچ تیماری) در محیط گلخانه بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه میزبان و استقرار سفیدبالک پنبه

خيار رقم تجاری سوپر دومینوس PS (محصول کشور ایتالیا) برای کشت انتخاب شد. بوته‌های خیار در گلدان‌های سفالی با قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر کشت شد و برای کاشت بذور از ماسه، خاک و کود دامی به نسبت برابر استفاده شد. کلنی سفیدبالک پنبه از مزارع پنبه منطقه سفیدشهر کاشان (فاقد سابقه سمپاشی) جمع‌آوری و در قفس‌های چوبی (به ابعاد ۱۰۰ × ۷۰ × ۷۰ سانتی‌متر) تحت شرایط کنترل‌شده اتاقک پرورش مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج (وابسته به شرکت داروسازی باریج‌اسانس) پرورش داده شد. از سفیره‌های سفیدبالک‌های جمع‌آوری شده اسلاید تهیه و با استفاده از کلیدهای شناسایی گونه حشره شناسایی شد (Ghahhari & Hatami, 2001). سپس برای تایید، گونه به مرکز تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور ارسال شد. بعد از شناسایی، سفیدبالک‌ها چندین نسل بدون استفاده از هر نوع آفت‌کش پرورش داده شدند.

هم‌سن‌سازی آفت

به منظور ایجاد جمعیتی هم‌سن، حشره کامل سفیدبالک با آرامی توسط آسپیراتور جمع‌آوری و به قفس‌های حاوی گیاهان تازه منتقل و اجازه داده شد تا تخم‌ریزی کنند. سپس گلدان‌ها، از قفس‌های حاوی حشره کامل سفیدبالک به قفس‌های عاری از سفیدبالک منتقل شده و بدین ترتیب جمعیت مناسبی از پوره‌های سنین مختلف ایجاد شد. با استفاده از بینوکولر پوره‌های سن دو و سه (ثابت در پشت برگ) شناسایی شده و باقی ماندند و پوره‌های سن یک (متحرک) و سفیره‌ها (با بدنی ضخیم‌شده و کیسه‌ای‌شکل) با استفاده از قلم‌مو حذف شدند. پوره‌های سن دو و سه بسیار به هم شبیه بودند و در این آزمایش‌ها از هم تفریق نشدند. این کلنی‌ها در شرایط اتاقک پرورش در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس رطوبت نسبی ۶۰±۱۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. (Fahim et al., 2012)

جمع‌آوری گیاهان، استخراج ترکیبات و تجزیه شیمیایی اسانس‌ها و عصاره

اندام هوایی رزماری *Rosmarinus officinalis* L. در مردادماه از منطقه استان البرز، اندام هوایی نعناع فلفلی *Mentha piperita* L. در تیرماه از دزفول، برگ اکالیپتوس *Eucalyptus globules* L. در مردادماه از جیرفت و برگ و سرشاخه گلدار آویشن باغی *Thymus vulgaris* L. در خردادماه از استان تهران (همگی در سال ۱۳۹۵) شناسایی (Mozaffarian, 2013)، جمع‌آوری شده و در سایه خشک گردیدند. اسانس‌های سه گیاه اول با روش تقطیر با آب تهیه شدند؛ به صورتی که تمامی گونه‌های گیاهی خشک و پودر شده و به نسبت ۱ به ۵ وزنی-وزنی

با آب مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در دستگاه کلونجر قرار گرفتند. عصاره آویشن باغی نیز به نسبت ۱ کیلوگرم گیاه خشک و پودر شده به ۴ کیلوگرم حلال (اتانل ۳۵ درصد) و با استفاده از دستگاه پرکولاتور به مدت ۲۴ ساعت استخراج گردیدند. نسبت عصاره به دست آمده، ۲ به ۱ وزنی - وزنی (۲ کیلوگرم عصاره مایع در ازای ۱ کیلوگرم گیاه خشک) بود. جهت تعیین میزان مواد موثره شاخص در عصاره آویشن باغی از دستگاه آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC/UV) ساخت شرکت Knauer آلمان مدل Azura موجود در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج با شرایط زیر آنالیز شد: دکتور مورد استفاده از نوع UV مدل MW 2.1L با ستون Teknokorom C18 (250×4.6 mm, particle size 5 μm)، سرعت جریان فاز متحرک 0.8 میلی لیتر بر دقیقه و دمای آن ۳۰ درجه سانتیگراد بود. روش کار جهت آماده سازی نمونه برای تزریق به دستگاه HPLC به قرار زیر بود: در ابتدا ۵ گرم مواد گیاهی خشک توزین و عصاره آن با متانول استخراج شد. عصاره آویشن باغی تحت شرایط خلاء تبخیر و در دمای اتاق خشک شد. عصاره متانولی خشک شده در متانول حل شد و کروماتوگرافی تحت شرایط گرادیان انجام شد. تزریق حجم، ۵۰ میکرولیتر بود و کروماتوگرام در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد.

به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات عمده متشکله اسانس ها از روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی استاندارد (GC-MS) موجود در دانشگاه کاشان استفاده شد (Anonous, 2015) که مشخصات دستگاه GC آن: مدل HP-6890 ساخت شرکت Agilent آمریکا با ستون HP-5MS (5%phenyl di methyl siloxan) با طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرون و مشخصات دستگاه mass آن: مدل HP-5973 ساخت شرکت HEWLETT PACKARD با انرژی یونش ۷۰ الکترون ولت و تجزیه گر جرمی کوادروپل بود.

فرمولاسیون ترکیبات گیاهی

ترکیبات به صورت میکرو و نانوامولسیون شده از اسانس های رزماری، نعناع و اکالیپتوس و عصاره آویشن باغی در واحد فرمولاسیون مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج ساخته شد. انتخاب این اسانس ها و عصاره بر اساس مطالعات قبلی که روی حشرات و آفات دیگر صورت گرفته و خاصیت آفت کشی این ترکیبات را به اثبات رسانده، انجام شد (Azizian et al., 2014; Sarraf moayeri et al., 2015; Riazi et al., 2015; Fahim et al., 2012; Yang et al., 2010; Jafarbeighi et al., 2012).

در این پژوهش مواد به صورت میکرو یا نانوامولسیون فرموله شدند و در این فرمولاسیون ها از ترکیباتی همچون عامل چسباننده (که باعث چسبیدن هر چه بیشتر فرمولاسیون نهایی به سطح برگ می شود) و روغن (که باعث کاهش ظرفیت تبخیر ویژه فرمولاسیون نهایی از سطح برگ می شود) استفاده شد که این حالت چسبناکی و روغنی از لحاظ فیزیکی باعث ماندگاری بیش تر فرآورده در سطح برگ گیاه و به دنبال آن مواجهه بیش تر آن با آفت شده و به اصطلاح ترکیب نهایی را آهسته رهش Slow Release می نمایند (McClements, 2012). البته بررسی میزان این پایداری و آهسته رهشی احتیاج به انجام آزمون های شیمیایی پیشرفته دارد. موادی که در ساخت این فرمولاسیون ها به کار گرفته شد شامل عامل امولسیون کننده (امولسیفایر): تویین ۸۰ (۴/۵ درصد)، عامل چسباننده: پلی ونیل پیرولیدون یا PVPK30 (۵/۲ درصد)، حلال هیدروالکلی ۵۵ درجه: ۲۰ درصد، ماده موثره: انواع اسانس ها و عصاره گیاهی: به درصد ذکر شده در فرمولاسیون ها و پایه روغن گیاهی: روغن آفتابگردان (۱۸/۳ درصد)، در آب مقطر: تا ۱۰۰ درصد بود. روش ساخت به طور خلاصه به این صورت بود که در ابتدا فاز روغنی به صورت زیر تهیه شد. حلال الکی ۵۵ درجه، مخلوط اسانس ها و عصاره، امولسیفایر و روغن آفتابگردان مخلوط شده و

سپس فاز روغنی با فاز آبی حاوی آب مقطر و پلی وینیل پیرولیدون مخلوط شدند تا ترکیب یکنواختی به دست آید. با انتخاب نوع مواد فوق، تغییر درصد مواد بالا در محدوده مشخص و بررسی و محاسبه اثرات شیمیایی آن‌ها و تغییر نسبت این مواد در فرمولاسیون نهایی در هنگام فرموله کردن، میکرو و نانوامولسیون‌های موردنظر با شکل و دوام مناسب ایجاد شد. به خاطر خاصیت ضداکسیدانی اسانس‌ها و عصاره به کاررفته در فرمول، از اکسیدشدن فرمول تهیه شده جلوگیری می‌شود. این موضوع با انجام تست پایداری فرآورده و با قرارداد آن به مدت ۶ ماه در چمبردارویی با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد، ساخت شرکت نورصنعت فردوس ایران مشخص و تایید شد. تمامی مواد شیمیایی از شرکت MERCK آلمان خریداری شد و مورد استفاده قرار گرفت. همچنین آزمونی با دستگاه Dynamic Light Scattering (DLS) برای اندازه‌گیری اندازه ذرات و آزمون تعیین پتانسیل زتا به منظور تعیین این مساله که حشره‌کش گیاهی فرموله شده میکرو یا نانوامولسیون است، انجام شد (Zare *et al.*, 2011; Mirmajidi & Abbasi, 2013). برای انجام این آزمون از دستگاه DLS ساخت شرکت Malvern Instruments انگلستان با مشخصات DTS Ver. 4.20 و شماره سریال: MAL1001767 موجود در آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه تهران استفاده شد.

آزمون‌های زیست سنجی

الف- تعیین غلظت کشنده ۹۰ درصد (LC90) تیمارهای مختلف روی پوره سن دو و سه

آزمون اولیه به روش غوطه‌ورسازی برگ‌های حاوی پوره سن دو و سه در آزمایشگاه انجام شد (Horowitz *et al.*, 2004). غلظت‌های موثر برای آزمون‌های تخمین کشندگی ۹۰ درصد (LC90) برای تیمارهای فرموله شده گیاهی طی آزمون اولیه و اصلی تعیین شد (Robertson *et al.*, 2007). در این آزمایش‌ها پوره های سن دو و سه که بی‌تحرك بودند و با نزدیک کردن قلم‌موی شتر نازک هیچ حرکتی نشان نمی‌دادند، مرده تلقی شدند (Choie *et al.*, 2003). واحدهای آزمایشی شامل برگ‌های نشاندار روی بوته‌های خیار بود که تعداد پوره‌های سن دو و سه روی آن‌ها شمارش می‌شدند؛ به صورتی که با استفاده از بینوکولر پوره‌های سن دو و سه در پشت برگها شناسایی شده و باقی ماندند و پوره‌های سن یک (متحرک) و شفیره‌ها (با بدنی ضخیم شده و کیسه‌ای شکل) با استفاده از قلم‌مو حذف شدند. پوره‌های سن دو و سه بسیار به هم شبیه بودند و در این آزمایش‌ها از هم تفریق نشدند. سپس برگ‌های نشان‌دار به همان صورتی که به بوته اصلی اتصال داشتند به آرامی به مدت ۵ ثانیه در ۵۰۰ میلی‌لیتر از ۵ غلظت متفاوت محلول‌های سمی فرو برده شدند. تیمارها به شرح زیر بودند:

۱. تیمار اول T₁: امولسیون ترکیب شده از سه اسانس رزماری (۲درصد)، نعناع فلفلی (۲درصد) و اکالیپتوس (۲درصد) و عصاره آویشن باغی (۲۰ درصد)
۲. تیمار دوم T₂: امولسیون بر پایه عصاره آویشن باغی (۲۰ درصد)
۳. تیمار سوم T₃: امولسیون ترکیب شده از سه اسانس رزماری (۲درصد)، نعناع فلفلی (۲درصد) و اکالیپتوس (۲درصد).

دامنه غلظت استفاده شده در این آزمون‌ها برای تیمارهای اول T₁ و سوم T₃، ۱-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و برای تیمار دوم T₂ ۱۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. به منظور رقیق‌نمودن فرمولاسیون‌های موردنظر و نیز در تیمار کنترل منفی، تنها از آب مقطر استفاده شد (Christofoli *et al.*, Fahim *et al.*, 2012; Dehghani *et al.*, 2011).

آزمون‌های گلخانه‌ای

آزمون‌های مربوط به بازدارندگی تخم‌ریزی و کشندگی غلظت‌های LC₉₀ ترکیبات فرموله‌شده در محیط گلخانه انجام گرفت. در آزمون‌های بازدارندگی تخم‌ریزی از پروتکل انتخاب آزاد (Choice test) درون قفس‌های بزرگ استفاده شد (Koschier & Sedy, 2003; Yang *et al.*, 2010). در این آزمون‌ها، غلظت LC₉₀ به دست آمده از آزمون آزمایشگاهی روی جمعیت‌های مستقر در گلخانه پاشیده شد. علت استفاده از غلظت LC₉₀ این بود که آزمایش‌ها با غلظتی که مرگ و میر بالای ۹۰ درصد ایجاد می‌کنند انجام شود و بتوان این غلظت را با کنترل مثبت (صابون گیاهی پالیزین®) به نسبت توصیه شده روی بروشور) مقایسه نمود. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. مراحل انجام آزمون‌های گلخانه‌ای به قرار زیر بود:

۱- آزمایش‌های بازدارندگی تخم‌ریزی ترکیبات فرموله‌شده روی بالغین

ابتدا گلدان‌ها روی پالت‌هایی به اندازه ۱×۱ مترمربع قرار گرفت؛ به صورتی که روی پالت‌ها با چوب و تور ۵۰ مش به شکل یک قفس بزرگ به ابعاد ۱×۱×۰/۵ مترمکعب درآمد. در هر گلدان ۱ بوته خیار در مرحله ۵ برگی وجود داشت که تمامی برگ‌های آن برای مدت ۵ ثانیه در غلظت LC₉₀ تیمارها شامل: تیمار اول T₁، تیمار دوم T₂، تیمار سوم T₃، هر یک از سه تیمار بدون اسانس و عصاره هایشان و فقط با مواد جانبی‌شان (یعنی T₆, T₃, T₄)، کنترل مثبت (صابون گیاهی پالیزین®) به نسبت توصیه‌شده روی بروشور)، کنترل منفی (آب مقطر) و شاهد (بدون هیچ تیماری) غوطه‌ور شد. بنابراین در مجموع این آزمون‌ها، با ۸ تیمار مختلف و شاهد انجام شد. گلدان تیمار شده همراه ۱ گلدان دیگر درون قفس‌های چوبی قرار داده شد؛ به صورتی که گلدان تیمار شده، در کنار گلدان تیمار نشده قرار گیرد. تعداد ۵۰ سفیدبالک نر و ماده (بدون توجه به جنسیت) با اسپیراتور به هر قفس منتقل شد. در این وضعیت بالغین سفیدبالک جهت استقرار روی کلیه برگ‌های هر دو گلدان، حق انتخاب خواهند داشت. در حالی که بوته‌های تیمار شده همچنان در کنار بوته تیمار نشده قرار داشت، تعداد تخم‌های تازه گذاشته‌شده سفیدبالک پنبه روی بوته تیمار شده و تیمار نشده تا ۷۲ ساعت شمارش شده و در انتها با هم مقایسه گردید. پارامتر اندازه‌گیری شده تعداد تخم‌ها گذاشته شده روی بوته‌های تیمار شده به کل تخم‌های گذاشته‌شده بود که به صورت درصد به دست آمد. در حال عادی (شاهد) باید این میزان نزدیک به ۵۰ درصد باشد و هرچه این نسبت کمتر از ۵۰ درصد باشد، نشان‌دهنده این مطلب است که تعداد تخم کمتری روی بوته تیمار شده نسبت به تعداد کل تخم‌های گذاشته روی هر دو بوته داشته و این موضوع به خاطر بازدارندگی تخم‌ریزی بیشتر بوته تیمار شده است. (Christofoli *et al.* 2015).

۲- آزمایش‌های میزان کشندگی تخم و مجموع پوره سنین مختلف و شفیره تیمارهای مختلف

در نزدیک‌ترین حالت به شرایط طبیعی، تعداد ۹ گلدان خیار با رقم تجاری ذکرشده قبلی و در مرحله پنج‌برگی در داخل قفس‌های بزرگ قرار گرفت و برگ‌های آلوده به سفیدبالک از آزمایشگاه به گلخانه منتقل و در کنار برگ بوته‌های سالم قرار گرفت تا آلوده‌سازی انجام شود. پس از گذشت دو هفته و با افزایش جمعیت و استقرار کامل سفیدبالک‌ها روی بوته‌های سالم و سپس تخم‌گذاری و ایجاد پوره و شفیره روی گلدان‌ها (نسل دوم)، جمعیت مراحل مختلف زندگی سفیدبالک (تخم، پوره سنین مختلف و شفیره؛ به جزء حشره بالغ که در هنگام تیمار پرواز می‌نماید و از دسترس دور می‌شود)، روی آن‌ها شمارش شد. مجموع پوره‌های سنین مختلف و شفیره به صورت یک شاخص در نظر گرفته شد و بین آنها اختلافی در نظر گرفته نشد. سپس بوته‌ها، با غلظت

LC90 تیمارها (با توجه به آزمونهای آزمایشگاهی) شامل: تمامی ۸ تیمار آزمون قبلی با استفاده از سمپاش دو لیتری روی بوته‌ها اسپری شده (به اندازه‌ای که سطح روپین و زیرین برگ‌ها به صورت یکنواخت خیس شود) و تعداد مراحل مختلف ذکر شده در قبل و بعد با شاهد مقایسه شد. بعد از ۲۴ ساعت از زمان محلول‌پاشی، جمعیت سفیدبالک‌ها مورد بازدید و شمارش قرار گرفت. نمونه‌برداری از برگ‌های علامت‌گذاری شده، انجام شده و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد تا درصد تلفات بعد از ۲۴ ساعت زیر استریومیکروسکوپ (10X) شمارش شوند. طبق نظر وت و همکاران (۱۹۸۰) تخمهای سفیدبالک وقتی تازه گذاشته می‌شوند، زردرنگ هستند اما بعد از یک الی دو روز کدر می‌شوند؛ بنابراین در آزمایش‌های انجام شده شمارش تخمها بعد از ۷۲ ساعت انجام گرفت و تخم‌هایی که تیره‌رنگ بودند مرده تلقی شدند. درصد تلفات سفیدبالک در مراحل مختلف با روش هندرسون-تیلتون $\{100 * ((C_b / T_b) * (C_a / T_a)) - 1\}$ درجه تاثیر به درصد محاسبه شد. در فرمول فوق، T_b : میانگین تعداد حشرات زنده در تیمار قبل از سم‌پاشی T_a : میانگین تعداد حشرات زنده در تیمار بعد از سم‌پاشی C_b : میانگین تعداد حشرات زنده در شاهد قبل از سم‌پاشی C_a : میانگین تعداد حشرات زنده در شاهد بعد از سم‌پاشی با تیمارهای مذکور بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد.

آزمون‌های گلخانه‌ای در گلخانه تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج با میانگین دمای 25 ± 5 رطوبت نسبی 70 ± 20 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (در صورت لزوم با افزودن نور مصنوعی) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد (Jafarbeigi et al, 2012).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه پروبیت داده‌ها با استفاده از نرم افزار POLO-PC انجام شد. همچنین اطلاعات به دست آمده از طریق آزمون تجزیه و تحلیل واریانس ANOVA همراه با مقایسه میانگین‌ها و با استفاده از نرم‌افزار SPSS Version: 22 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

تعیین نوع و میزان ترکیبات شیمیایی عمده در اسانس‌ها و عصاره

تجزیه شیمیایی اسانس‌ها و عصاره، نوع و میزان ترکیبات شیمیایی عمده در آن‌ها به تفکیک گیاهان در جدول ۱ نشان داده شده است.

تعیین اندازه ذرات ترکیبات فرموله شده

به طور کلی، امولسیون‌هایی که قطر ذرات آنها در مقیاس نانومتری حداکثر ۵۰۰ نانومتر باشد، بر اساس نظر اکثر محققین نانوامولسیون خوانده می‌شوند (Gutierrez et al. 2008)؛ هر چند که ستاد توسعه فناوری نانو در ایران، اندازه ذرات حداکثر ۱۰۰ نانومتر را به عنوان فرمولاسیون نانو مورد توجه قرار می‌دهد. نتایج آزمون که با دستگاه Dynamic Light Scattering (DLS) برای اندازه‌گیری اندازه ذرات و همچنین آزمون تعیین پتانسیل زتا به منظور تعیین این مساله که حشره‌کش گیاهی فرموله شده میکرو یا نانوامولسیون است، نشان داد که در تیمار T_1 دو طیف اندازه وجود دارد که هر دو طیف از محدود نانو فراتر می‌باشد و تشکیل نانوامولسیون نمی‌دهد (شکل ۱). در

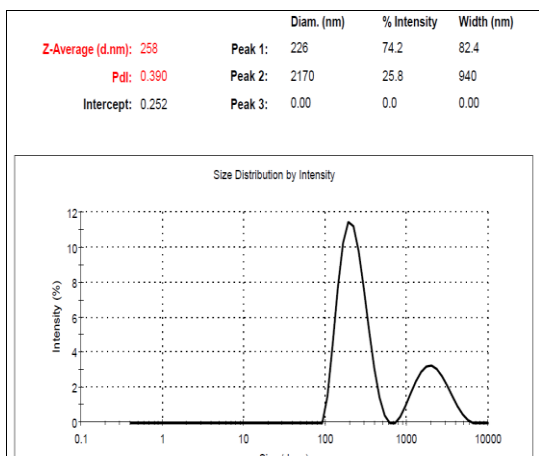
تیمار T₂ فقط یک طیف اندازه وجود دارد که این طیف هم از محدود نانو فراتر است و تشکیل نانوامولسیون نخواهد داد (شکل ۲) ولی تیمار T₃ دو دسته ذرات نانومتری تشکیل شده است که ذرات کمتر از ۵۰ نانومتری نیز در آن وجود دارد (شکل ۳). بنابراین تیمار T₃ تنها تیماری است که تشکیل نانوامولسیون داده است و دو تیمار دیگر تشکیل میکروامولسیون می‌دهند. در ضمن هر سه تیمار هیچ بار الکتریکی مثبت یا منفی نشان ندادند.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی عمده (درصد از کل) مشخص شده در اسانس‌های رزماری، نعناع فلفلی و

اکالیپتوس به‌وسیله دستگاه GCMS و عصاره آویشن باغی به‌وسیله دستگاه HPLC

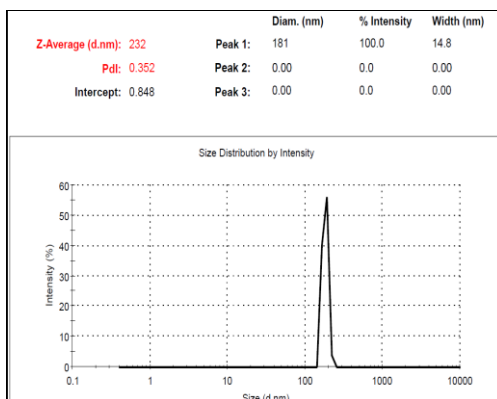
Table 2. Major compounds (% of total) identified in rosemary, peppermint and Eucalyptus essential oils by GC MS and Thyme extract by HPLC.

No	Components (Rosemary)	Percentage (Rosemary)	Components (Peppermint)	Percentage (Peppermint)	Components (Eucalyptus)	Percentage (Eucalyptus)	Components (Thyme)	Percentage (Thyme)
1	tricyclene	2.36	Alpha-pinene	0.66	α -pinene	3.61	Caffeic acid	1.4
2	α -pinene	14.22	Sabinene	0.36	Sabinene	1.01	Quinic acid	1.84
3	camphene	4.21	Beta-pinene	0.92	p-Cymene	10.45	p-Coumaric acid	0.96
4	borneol L	4.14	Alpha-terpinene	0.48	1,8-cineole	58.71	Caffeoylquinic acid derivative	3.41
5	2- β -pinene	2.21	Limonene	1.12	α -campholene	0.84	Quercetin-7-o-glucoside	1.72
6	3-octanone	2.44	1,8-Cineole	5.81	(E)-inocarveol	1.13	Ferulic acid	3.66
7	β -myrcene	2.37	Gamma-terpinene	0.83	Verbenol	0.29	Carnosic acid	7.57
8	L-phellandrene	2.64	Cis-sabinene hydrate	0.57	(Z)-sabinene hydrate	1.91	Cinnamic acid	28.54
9	α -terpinene	1.3	Terpinolene	0.16	Muurolol	0.10	Rosmarenic acid	7.32
10	1,8-cineol	17.24	Linalool	0.27	Pinocarvone	0.34	Methyl rosmarenate	6.65
11	gamma-terpinene	1.78	Mentone	19.55	(E)-inocarvoel	0.34	Apigenin	8.88
12	caryophyllene Oxid	2.31	Neomenthol	8.83	Terpinen-4-ol	4.53	Naringnin	4.14
13	α -terpinolene	2.3	Menthol	39.81	Cryptone	4.54	Luteolin-7-o-rutinoside	7.65
14	filifolone	2.72	Isomenthol	0.96	α -terpineole	0.89	Ferulic acid derivative	5.21
15	linalool L	4.62	Neo iso menthol	0.48	Myrtenal	0.63	-	-
16	chrysathenone	3.22	Piperitone	0.61	(E)-carveol	0.42	-	-
17	camphor	3.73	Neo menthyl acetate	0.55	Carvone	0.23	-	-
18	6,6-dimethyl-2-methylene bicyclo	2.6	Menthyl acetate	8.64	Cuminal	1.72	-	-
19	1,5-dimethyl bicyclo [3.2.1] octan	2.37	Iso menthyl acetate	0.33	Allo-aromadendrene	0.43	-	-
20	bicyclo [3.1.1] hepta-3-en-2-one	6.44	Beta-bourbonene	0.82	Spatulenol	2.91	-	-
21	tricyclo [4.2.1.1(2,5)] decane	2.04	Trance-beta-caryophyllene	2.76	Elemol	1.9	-	-
22	1,6-octadien-3-ol	3.24	(z)-beta-farnesen	0.48	Isospathulenol	0.45	-	-
23	bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol	3.70	Germacone-d	2.73	Viridiforol	0.10	-	-
Total	-	94.2	-	97.73	-	97.48	-	88.95



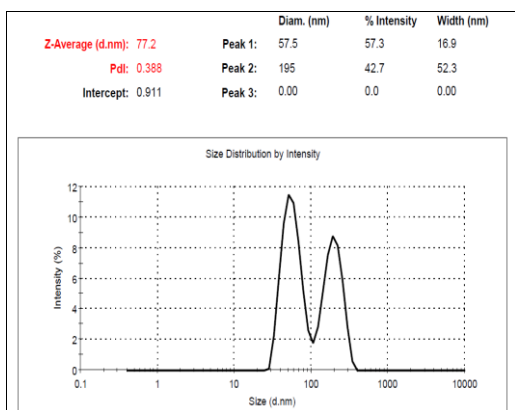
شکل ۱- طیف اندازه ذرات در تیمار T₁ : دو طیف اندازه در این تیمار وجود دارد که هر دو طیف از محدود نانو فراتر می‌باشد و تشکیل نانوامولسیون نداده بلکه تشکیل میکروامولسیون می‌دهد

Fig 1. Size spectrum in treatment (T₁): There are two size spectrum in this treatment which both of them are beyond nano range and don't make nanoemulsion form, but make microemulsion form.



شکل ۲- طیف اندازه ذرات در تیمار دوم T₂: فقط یک طیف اندازه در این تیمار وجود دارد که این طیف از محدود نانو فراتر است و تشکیل نانوامولسیون نداده بلکه تشکیل میکروامولسیون می‌دهد

Fig. 2. Size spectrum in treatment (T₂): There is only one size spectrum in this treatment which is beyond nano range and doesn't make nanoemulsion form, but make microemulsion.



شکل ۳- طیف اندازه در تیمار T₃: در این تیمار دو دسته ذرات نانومتری تشکیل شده است که ذرات کمتر از ۵۰ نانومتری در آن وجود دارد و تشکیل نانوامولسیون می‌دهد.

Fig. 3. Size spectrum in treatment (T₃): There are two spectrums of nanometric particle in this treatment which particles under 50 nanometer can be found and make nanoemulsion form.

نتایج آزمایش‌های زیستی

نتایج آنالیز پروبیت در جدول ۲ خلاصه شده است. در مورد تیمار T₁ میزان LC₉₀ در سطح اطمینان ۹۰ درصد برابر با ۳/۴۰۵۸ میلی‌گرم بر لیتر برآورد شد. در تیمار T₂ این میزان در همین سطح ۱۳/۰۰۶۲ میلی‌گرم بر لیتر و در تیمار T₃ برابر با ۳/۰۷۱۶ میلی‌گرم بر لیتر برآورد گردید بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین سمیت مربوط به تیمار T₁ و T₃ می‌باشد که تیمار T₁ یعنی میکروامولسیون از سه اسانس رزماری (۲درصد)، نعنای فلفلی (۲درصد) و اکالیپتوس (۲درصد) و عصاره آویشن باغی (۲۰ درصد) و تیمار T₃ یعنی نانوامولسیون از سه اسانس رزماری (۲درصد)، نعنای فلفلی (۲درصد) و اکالیپتوس (۲درصد) بود و تیمار T₂ یعنی میکروامولسیون بر پایه عصاره آویشن باغی (۲۰ درصد) کمترین سمیت را در بین تیمارهای موردآزمایش داشتند (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج آنالیز پروبیت تیمارهای T₁، T₂ و T₃ روی پوره‌های سن دو و سه سفیدبالک پنبه در شرایط آزمایشگاه

Table 2 - Results of probit analysis of T₁, T₂ and T₃ treatments on 2nd and 3rd nymphal instar Sweetpotato whites in laboratory condition.

Treatments	Slope	Chi-square	Degrees of Freedom	Standard Error	T-ratio	Index of significance for potency estimation
T ₁	2.0225	64.045	3	0.1409	14.3508	g(0.90)=0.5741 g(0.95)=1.0499 g(0.99)=3.5365
T ₂	1.0933	4.3328	3	0.1537	7.11052	g(0.90)=0.1582 g(0.95)=0.2893 g(0.99)=0.9745
T ₃	3.0862	14.093	3	0.1777	17.3674	g(0.90)=0.0862 g(0.95)=0.1577 g(0.99)=0.5313

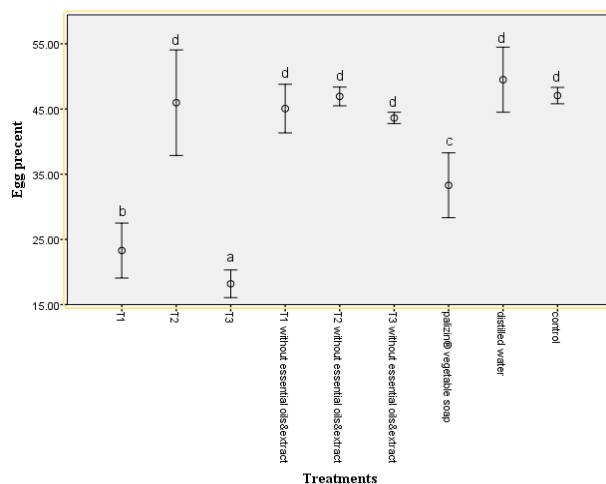
تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد میانگین میزان تخم سفیدبالک‌ها روی بوته تیمار شده به کل تخم‌ها (روی هر ۲ بوته)، اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بین کلیه تیمارها نشان داد (p<0.001, df_{BG}=8, df_{WG}=18, F=141.25). همچنین آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که تیمار T₃ با میانگین ۱۸/۲ درصد کمترین میزان تخم و سپس تیمار T₁ با میانگین ۲۳/۳ درصد، اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد با هم داشته و کمترین درصد میزان تخم روی بوته تیمار شده را داشتند که نشان‌دهنده بازدارندگی تخم‌ریزی بیشتر است. بعد از آن کنترل مثبت (صابون گیاهی پالیزین®) با ۳۳/۳ درصد قرار داشت و سایر تیمارها یعنی تیمار T₂ با میانگین ۴۵/۹ درصد، سه تیمار از مواد جانبی (بدون اسانس و عصاره) با میانگین ۴۵/۰، ۴۶/۹ و ۴۳/۶ درصد، کنترل منفی (آب مقطر) با میانگین ۴۹/۵ درصد و شاهد با میانگین ۴۷/۰ درصد از نظر آماری باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند. (شکل ۴).

جدول ۳- تعیین شاخص اندازه‌گیری شده LC₉₀ برای تیمارهای T₁، T₂ و T₃ با دوز

میلی‌گرم بر لیتر و با درجه اطمینان ۹۰ درصد

Table 3 - Determination of LC₉₀ formulated treatments of T₁, T₂, T₃ with dosage (mg/l) and 90% confidence limit

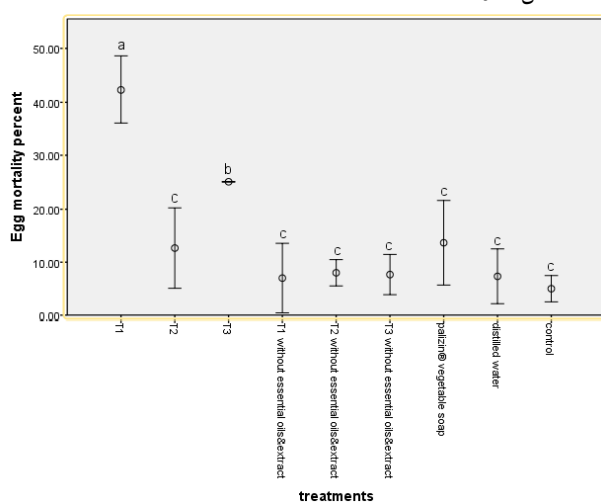
Measured parametrs	Dose (mg/l)	Variation range (max-min)
LC ₉₀ -T ₁	3.4058	2.1706-6.8263
LC ₉₀ -T ₂	13.0062	7.4015-40.3801
LC ₉₀ -T ₃	3.0716	1.9356-6.1888



شکل ۴- میانگین تعداد تخم سفیدبالک‌ها روی بوته تیمار شده (به ترتیب: T1:1، T2:2، T3:3، T4:4 بدون اسانس و عصاره، T5:5 بدون اسانس و عصاره، T6:6 بدون اسانس و عصاره، T7:7 صابون گیاهی پالیزین®، T8:8 آب مقطر و T9:9 شاهد) به تعداد کل تخم‌ها

Fig. 4. Percentage of number of whitefly eggs on treated bushes (1:T1, 2:T2, 3:T3, 4: T1 without essential oils & extracts, 5: T2 without essential oils & extracts, 6: T3 without essential oils & extracts, 7:palizim® vegetable soap, 8:distilled water, 9:control) per total eggs

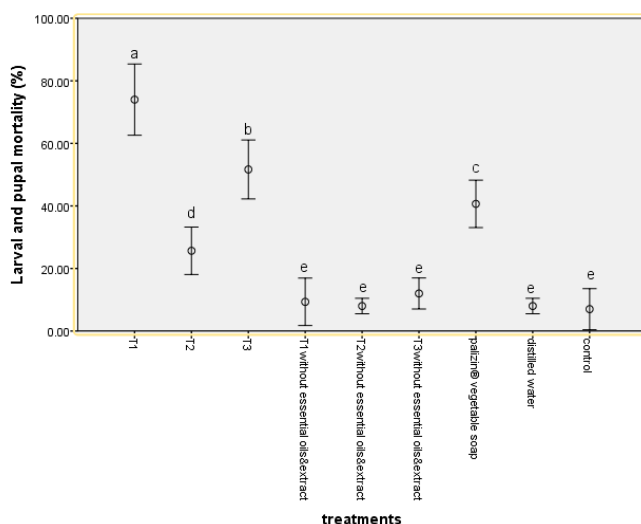
تجزیه واریانس داده‌ها در مورد درصد میانگین مرگ و میر تخم سفیدبالک‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها ($p < 0.001$, $df_{BG}=8$, $df_{WG}=18$, $F=95.210$) و در مورد درصد میانگین مرگ و میر مجموع پوره و شفیره (که با هم در نظر گرفته شدند) اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها ($p < 0.001$, $df_{BG}=8$, $df_{WG}=18$, $F=206.045$) نشان داد. همچنین آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌های این دو شاخص، مشخص کرد که تیمار T1 با میانگین مرگ و میر تخم ۴۲/۳ درصد و میانگین مرگ و میر پوره و شفیره ۷۴/۰ درصد بیشترین کارایی را داشته و بعد از آن تیمار T3 با میانگین مرگ و میر تخم ۲۵/۰ درصد و میانگین درصد مرگ و میر پوره و شفیره ۵۱/۶ درصد قرار داشت که این دو تیمار با هم و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد نشان دادند. (شکل ۵ و ۶)



شکل ۵- درصد مرگ و میر تخم سفیدبالک در تیمارهای مختلف (به ترتیب: T1:1، T2:2، T3:3، T4:4 بدون اسانس و عصاره، T5:5 بدون اسانس و عصاره، T6:6 بدون اسانس و عصاره، T7:7 صابون گیاهی پالیزین®، T8:8 آب مقطر و T9:9 شاهد)

Fig. 5. Egg mortality percent in different treatments. (1:T1, 2:T2, 3:T3, 4: T1 without essential oils & extracts, 5: T2 without essential oils & extracts, 6: T3 without essential oils & extracts, 7:palizim® vegetable soap 8:distilled water, 9:control)

در مورد پارامتر درصد میانگین مرگ و میر تخم هرچند بین سایر تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ ولی این اختلاف بسیار به هم نزدیک بود و در اکثر موارد تیمارها و شاهد با هم همپوشانی داشتند. در مورد پارامتر درصد میانگین مرگ و میر پوره و سفیره بعد از تیمار T₁ و T₃، کنترل مثبت (صابون گیاهی پالیزین®) با ۴۰/۶ و پس از آن تیمار T₂ با ۲۵/۶ درصد قرار داشت و سایر تیمارها و شاهد با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۶).



شکل ۶- درصد میانگین مرگ‌ومیر پوره و سفیره در تیمارهای مختلف (به ترتیب: T₁:T₄، T₃:T₂:T₁ بدون اسانس و عصاره، T₅:T₂ بدون اسانس و عصاره، T₆:T₃ بدون اسانس و عصاره، صابون گیاهی پالیزین®، آب مقطر و شاهد)
Fig. 6. Larval & pupal mortality percent in different treatments (1:T₁, 2:T₂, 3:T₃, 4: T₁ without essential oils & extracts, 5: T₂ without essential oils & extracts T₆: T₃ without essential oils & extracts, 7:palizin® vegetable soap 8:distilled water, 9:control)

بحث

در سال‌های اخیر فناوری نانو در عرصه‌های مختلف سهم بزرگی از تجارت جهانی را به خود اختصاص داده است. در همین زمینه، تولید نانوامولسیون برای ریز پوشینه‌سازی Encapsulation و کنترل رهایش ترکیبات سودمند مانند انواع داروها، رنگ‌ها، اسانس‌ها و ویتامین‌ها یکی از زمینه‌های کاربردی فناوری نانو در صنایع است. نانوامولسیون‌ها با افزایش قابلیت حلالیت آفت‌کش‌های غیرمحلول در آب، در فرمولاسیون مواد شیمیایی کشاورزی نیز کاربرد دارند. در این تحقیق هم از این خواص در فرمولاسیون ترکیبات استفاده شد و مخصوصاً سعی شد تا با ساخت ترکیبات به شکل نانوامولسیون از اثربخشی بیشتر و رهایش کندتر آنها استفاده شده و این موارد حتی‌الامکان مورد آزمون قرار گیرد؛ هرچند که آزمون رهایش، احتیاج به آنالیزهای شیمیایی پیشرفته دارد که در این مطالعه انجام نشده است. (Zare et al., 2011; Mirmajidi & Abbasi, 2013; McClements, 2012).

کمترین میزان LC₉₀ برابر با ۳/۱۲۰۸ میلی‌گرم بر لیتر یعنی تقریباً معادل ۳ در هزار مربوط به تیمار T₃ و بعد از آن به فاصله کمی تیمار T₁ با LC₉₀ برابر با ۳/۶۱۷ میلی‌گرم بر لیتر تقریباً معادل ۳/۵ در هزار قرار داشت که این دو تیمار اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند؛ البته در این مورد چگالی محلول معادل چگالی آب در نظر گرفته شده است. این نتایج نشان داد این دو تیمار در غلظت حدود ۳-۳/۵ در هزار می‌توانند ۹۰ درصد پوره‌های سن دو و سه سفیدبالک پنبه را از بین ببرند که نشان‌دهنده سمیت قابل‌قبول این دو ترکیب است. میزان LC₉₀ تیمار T₂ که میکروامولسیونی ساخته‌شده از عصاره آویشن باغی به تنهایی است، بسیار زیاد و تقریباً معادل ۱۳/۵

در هزار بود و در آزمون‌های بعدی نیز خاصیت بازدارندگی تخم‌ریزی و کشندگی این تیمار در مقایسه با کنترل منفی (آب مقطر) و شاهد (بدون هیچ تیماری) در اکثر موارد اختلاف معنی‌داری نداشت که اثربخشی کم این تیمار را نشان می‌دهد. به طور کلی اثربخشی میکرومولسیون عصاره آویشن باغی علی‌رغم این که درصد بالایی در فرمول داشت (۲۰ درصد) از اثربخشی ترکیبات دارای اسانس که در مجموع ۶ درصد فرمول را تشکیل می‌دادند، بسیار کمتر بود که نشان‌دهنده کارایی بیشتر اسانس‌های به‌کاررفته در برابر عصاره آویشن باغی می‌باشد. نتایج در مورد آزمون بازدارندگی تخم‌ریزی ترکیبات که با شاخص درصد میانگین میزان تخم سفیدبالک‌ها روی بوته تیمار شده به کل تخم‌ها (روی هر ۲ بوته) مورد بررسی قرار گرفت مشخص کرد که تیمار T₃ (نانوامولسیون مجموع اسانس‌ها) و سپس تیمار T₁ (میکرومولسیون مجموع اسانس‌ها و عصاره) با اختلاف معنی‌داری، کمترین درصد میزان تخم روی بوته تیمار شده را داشتند که نشان‌دهنده بازدارندگی تخم‌ریزی بیشتر است. این نتایج، بازدارندگی تخم‌ریزی بیشتر این دو تیمار را نسبت به کنترل مثبت (صابون گیاهی پالیزین®) نشان داد. این شاخص در حالتی که بازدارندگی تخم‌ریزی خاصی وجود ندارد باید حدود ۵۰ درصد باشد (یعنی اختلافی بین میزان تخم‌گذاری روی دو بوته وجود ندارد). تیمار T₂، سایر تیمارها و شاهد با میانگین حدود ۵۰ درصد، اثر بازدارندگی تخم‌ریزی معنی‌داری را نشان ندادند. (شکل ۴)

در زمینه اثرات بازدارندگی تخم‌ریزی و ضد تخم‌گذاری برخی اسانس‌های گیاهی روی برخی آفات گلخانه‌ای مطالعات محدودی صورت گرفته است. اثرات قطعی اسانس گیاهان رزماری *Rosmarinus officinalis* L.، نعناع فلفلی *Mentha piperita* L.، مرزنگوش *Organum majorana* L. و اسطوخودوس *Lavandula stoechas* L. روی رفتار عدم انتخاب و پذیرش میزبان توسط تریپس پیاز گزارش شده است (Koschier, EH. & Sedy, KA., 2003). همچنین نتایج این مطالعه با تحقیقات صورت گرفته در مورد اسانس گیاهان آویشن، نعناع هندی و لیمو (Yang et al, 2010) و اثرات اسانس گیاه زنجبیل *Zingiber Officinale* L. (Bakkali et al, 2008) روی سفیدبالک *Bemisia argentifolii* Bellows انطباق داشت.

نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقی که با همین روش و با استفاده از اسانس نانوامولسیون شده گیاه *Zanthoxylum rhoifolium* انجام شد نیز همخوانی داشت و ترکیبات فرموله شده در هر دو تحقیق، میزان تخم‌گذاری (شاخص بازدارندگی تخم‌ریزی) را تغییر داده و باعث بازدارندگی تخم‌ریزی قابل توجه روی سطح برگ بوته‌های تیمار شده شدند (Christofoli et al. 2015). در تحقیقی مشابه دیگری اثرات بازدارندگی تخم‌ریزی اسانس گیاهان شمعدانی عطری *Pelargonium roseum* Andrews، باریجه *Ferula gumosa* Boiss و درمنه *Artemisia sieberi* Besser با همین روش روی حشرات بالغ سفیدبالک پنبه در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. هر سه اسانس در غلظت ۱۲ ppm بکار گرفته و مشخص شد که میزان استقرار و تخم‌ریزی این آفت روی برگ‌های تیمار شده به طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (Yarahmadi et al., 2003). علت این که در تحقیق یاراحمدی و همکاران میزان غلظت، بسیار بیشتر از میزان غلظت به کار رفته در این تحقیق است، کارایی کمتر و کاربرد خالص و فرموله‌نشده اسانس‌ها می‌باشد. کاربرد اسانس‌ها به صورت خالص و فرموله‌نشده، مشکلاتی همچون فرآیند بالا، گرانی، سختی تهیه و احتمال گیاه‌سوزی می‌باشد.

چنانچه بیان شد تیمار T₃ کمترین میزان تخم روی بوته تیمار شده را که نشان‌دهنده بیشترین میزان بازدارندگی تخم‌ریزی است را داشت. این موارد نشان می‌دهد که نانوامولسیون کردن ترکیبات (آنچنان که در تیمار T₃ انجام شد)، می‌تواند اثربخشی آن را بیشتر نموده و باعث شود که در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها (مخصوصاً تیمار T₁ که تقریباً همان ترکیبات را دارد و تشکیل میکرومولسیون داده) موثرتر عمل کند. این مطلب با مطالعات قبلی که توسط ضیایی و حمزه‌وی (Ziaee, M. & Hamzevy, F. 2014) انجام شد همخوانی دارد که نتایج پژوهش اخیر

نشان داد که نانوامولسیون کردن اسانس باعث افزایش بیش از ۶ برابری سمیت نانوژل بارگذاری شده در مقایسه با اسانس خالص می‌شود. نگهبان و همکاران (۱۳۹۲ و ۱۳۹۵) نیز کارایی اسانس نانوامولسیون شده گیاه درمنه *Artemisia sieberi* B. را روی شاخص‌های تغذیه شب‌پره پشته‌ماسی *Plutella xylostella* L. و اسانس نانوامولسیون شده 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 غیرکپسوله ثابت کردند (Negahban et al., 2013). لازم به ذکر است تحقیق ضیایی و حمزه‌وی که با استفاده از نانوژل کیتوزان-میربستیک اسید انجام شد و پژوهش نگهبان و همکاران (۱۳۹۲ و ۱۳۹۵) که با استفاده از نانوکپسول اوره-فرمالدهید صورت گرفت، با این تحقیق در نوع اسانس، شکل فرمولاسیون، نوع آفت و روش کاربرد متفاوت می‌باشند.

مشابه نتایج تحقیقی که روی عصاره گیاه شاه‌تره گل‌ریز *Fumaria parviflora* Lam. انجام شده است و در آن اثربخشی بالای عصاره این گیاه بر مرگ و میر مراحل مختلف زندگی سفیدبالک گزارش شده است (Sharifi et al., 2011)، در این تحقیق نیز در نزدیکترین حالت به شرایط طبیعی پس از اسپری کردن تیمارهای مختلف، میانگین مرگ و میر تخم و مرگ و میر مجموع پوره و سفیره (که با هم در نظر گرفته شدند) بررسی شد و نشان داد که تیمار T₁ بیشترین کارایی را داشته و بعد از آن تیمار T₃ قرار دارد. این موارد اثربخشی بالای دو تیمار T₁ و T₃ نسبت به سایر تیمارها را نشان می‌دهد.

جهت اطمینان از صحت نتایج به دست آمده و این که اثربخشی تنها مربوط به مواد گیاهی است و نه مواد همراه که جهت فرموله کردن آنها استفاده می‌شود، سه تیمار موردآزمون (T₁, T₂, T₃) به همراه ترکیبات فرموله شده آنها بدون اسانس و عصاره (فقط مواد همراه) به ترتیب به صورت تیمارهای (T₄, T₅, T₆) جهت بررسی احتمالی اثر این مواد در آزمونهای مقایسه‌ای بازدارندگی تخم‌ریزی و کشندگی به کار رفتند که نتایج در کلیه آزمون‌ها نشان داد که تیمارهای مربوط به مواد جانبی اختلاف معنی‌داری با کنترل منفی و شاهد (بدون هیچ تیماری) نداشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اثربخشی تیمارهای اصلی مربوط به اسانس و عصاره به کار رفته در آنهاست و مربوط به مواد جانبی موجود در آنها نمی‌باشد.

به طور کلی نتایج نشان داد که تیمار T₁ و T₃ با اثربخشی بیشتر (LC₉₀ کمتر و شاخص بازدارندگی تخم‌ریزی و کشندگی مراحل نابالغ بیشتر) که از صابون گیاهی پالیزین (کنترل مثبت) هم اثربخش‌تر بود، به عنوان ترکیبات امیدبخش شناخته شده و با انجام آزمونهای تکمیلی بعدی (در گلخانه و مزرعه) می‌توانند در مدیریت تلفیقی این آفت مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

به این وسیله از شرکت داروسازی باریج اسانس و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج به دلیل پشتیبانی مالی و امکاناتی این تحقیق قدردانی می‌گردد.

References

- Ail-Catzim, C. E., García-López, A., Troncoso-Rojas, R., González-Rodríguez, R.E., & Sánchez-Segura, Y. (2015). Insecticidal and repellent effect of extracts of *Pluchea sericea* (Nutt.) on adults of *Bemisia tabaci* (Genn.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* Vol. XXI, núm. 1, enero-abril. 33-41.

- Anonumous.** (2015). *British Pharmacopoeia*. Volume IV. London: The Stationery Office
- Arnason, J. T., Philogene B. J. R., & Morand, P.** (1989). Insecticides of Plant Origin. American Chemical Society Symposium Series Washington DC, EUA. *Aromatic Plants research of Iran* Vol 31. No: 1. 102-114. [In Persian with English summary]
- Arthropod Pesticide Resistance Database. (2016). Available at: <http://www.pesticideresistance.org/> (Retrieved 2016 June 10)
- 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 Persian with English summary]
- Azizyan, 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)* Volume 28, Number 3. 393-399. [In Persian with English summary]
- Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., and Idaomar., M.** (2008). Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.
- Champagne, D. E., Koul, O., Isman, M. B., Scudder, G. E., & Towers, G. H. N.** (1992). Biological activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry* 31, 377-394.
- Christofoli, M., Candida Costa, E. C., & Bicalho, K. U.** (2015). Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. *Industrial Crops and Products*. 70. 301–308.
- Dehghani, M. KH., & Ahmadi, K.** (2011). The effect of *botanical* extracts on duration of immature and puparium *Trialeurodes vaporariorum*. *Herbal medicines* Issue 4. 239-244. [In Persian with English summary]
- Fahim, M., Safaralizadeh, M., & safavi, S.A.** (2012). Evaluation of the sensitivity of the egg, nymph and adult greenhouse whitefly against of essential oils of mint and cumin in laboratory conditions. *Journal of Agricultural acknowledge and sustainable production* Vol: 22. No: 3. 27-35. [In Persian with English summary]
- Ghahhari, H. & Hatami, B.** (2001). Taxonomic studies of whitefly in Isfahan previous. *Plant Pest and Disease* Volume 69 No.1.
- Gutierrez J. M., González C., Maestro A. & Nolla J.** (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* Volume 13, Issue 4, August 2008, Pages 245-251
- Heidari, A. S., Moharramipour, S., Pourmirza, A., & Talebi, A.** (2005). The effects of proxyfan, buprofzin and Fenpiropatrin on indices of population growth on *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hom: Aleyrodidae). *Journal of Agricultural Science* Volume 36, Issue 2. 95-101. [In Persian with English summary]
- Hosseini nove, F., Poormirza, A. F., & Safaralizadeh, A. M.** (2010). Effects of lethal insecticide pirimicarb, oil and mixed Sytovet of the *Trialeurodes vaporariorum* and *Myzus persica* under greenhouse conditions. *Iranian Journal of Plant Protection* number 1. 353-361. [In Persian with English summary]
- Horowitz, AR., 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.
- Isman, M. B.** (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51:45–66.
- Isman, M. B.** (2010). Botanical insecticides, deterrents, repellents and oils, in B.P. Singh (ed.), in: Industrial crops and uses. *CAP International* pp: 433-445.
- Isman, M. B., Miresmailli, S., & Machial, C.** (2011). Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews* 10:197–204.

- Jafarbeigi, F., Samih, M., Zarabi, M., & Esmaily, S.** (2012). The effect of some herbal extracts and pesticides on the biological parameters of *Bemisia tabaci* pertaining to tomato grown under controlled conditions. *Journal of plant protection research* vol. 52, no. 4. 375-380.
- Koschier, EH. & Sedy, KA.** (2003). Labiat essential oils affecting host selection and acceptance of *Thrips tabaci* Lindeman. *Crop Protection* 22: 929-934.
- McClements, D.J.** (2012). *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities* Soft Matter 8, 1719–1729.
- Mirmajidi, A., & Abbasi, S.** (2013). Nanoemulsions; introduction, production, Application. *Nanotechnology monthly* The 10th year. 8: 45-49.
- 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 (<http://www.aapspharmscitech.org>).
- Mozaffarian, V.** (2013). Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Farhange Moaser press. pp: 1350.
- 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.
- Negahban, M. Moharramipour, S., Zandi, M., & Hashemi, S.A.** (2016). The application of nano-encapsulated pesticide of cumin against cabbage moth control management. *Proceedings of the 22th Iranian Plant Protection Congress* Tehran University, Karaj 832 p.
- 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.
- Riazi, M., Khajeali, J., Poorjavadi, 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 Persian with English summary]
- Robertson, J. L., Russell, R. M., Preisler, H. K. & Savin, N. E.** (2007). Bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL, p.199.
- Samarefkhri, M., Samie, M., Sahoozehi, B., Imani, S., & Zarrabi, M.** (2014). The effect of *F. parviflora* and *Teucrium* extract and pymetrozin on mortality and changes esterase enzyme *Bemisia tabaci* on tomato varieties resistant and susceptible. *Iranian Plant Protection Science* Volume 45 Number 2. autumn and winter. 357-369. [In Persian with English summary]
- Sarraf moayeri, 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.
- Sharifi, H., Haghani, M., & Samih, M. A.** (2012). Toxicity of two plant extracts of *Fumaria parviflora* Lam. and *Teucrium polium* L. in comparison with pymetrozin on *Bemisia tabaci* (Genn.) in controlled greenhouse condition. *20th Iranian Plant Protection Congress*, 25–28 August.
- Wink, M., Schmeller, T., & Latz-Bruning B.** (1998). Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA and other molecular targets. *Journal of Chemical Ecology* 24(11), 1881-1937.
- Yang, NW., Li, AL., Wan, FH., Liu, WX., & Johnson, D.** (2010). Effects of on essential oils on immature and adult sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop protection* 29: 1200-1207.
- Yarhamadi F., Rajabpour A., Zandi Sohani N., & Ramezani, L.** (2013). Investigating contact toxicity of Geranium and *Artemisia* essential oils on *Bemisia tabaci* Gen. *Avicenna J Phytomed*. Spring; 3(2): 106–111.
- Zare., Z., Divsalar, A., & Nabyoni, M.** (2011). A review of Nanoemulsions and medical applications. *Magazine Nanotechnology Monthly* No: 9. 30-33. [In Persian with English summary]
- Ziaee, M., & Hamzevy., F.** (2014). Nanoparticles applications in the pest prevention and control. *Nanotechnology monthly* 13th year. 10 (207). [In Persian with English summary]