Archive of SID

JESI

DOI: 10.22117/JESI.2019.120213.1178

نامه انجمن حشره‌شناسی ایران ۱۶۳- ۱۵۱ ,(۲)۳۹ ,۱۳۹۸

JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2019, 39 (2), 151-163

بررسی خواص حشره‌کشی نانوامولسیون اسانس پونه، *Mentha longifolia* L. (Lamiaceae) علیه سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae)

مژده لونی[۱]، جهانشیر شاکرمی [۱و*] و مریم نگهبان[۲]

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران و ۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shakarami.j@lu.ac.ir

چکیده

امروزه نانو امولسیون‌ها به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی مانند سایز کوچک ذرات، ثبات فیزیکی طولانی مدت و شفافیت مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند. در این تحقیق سمیت تنفسی اسانس پونه *Mentha longifolia* L. و نانوامولسیون آن علیه سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات (Fabricius) *Callosobruchus maculatus* مطالعه شد. آزمایش‌ها در شرایط آزمایشگاهی، دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ و در تاریکی انجام شد. اسانس پونه در ساعات اولیه پس از انجام آزمایش سمیت تنفسی بالاتری نسبت به نانوامولسیون داشت. در مرحله حشره کامل مقدار LC_{50} اسانس و نانوامولسیون به ترتیب برابر با ۱۰/۱ و ۱۶/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا برآورد شد. مقدار LC_{50} در مرحله جنینی برای اسانس برابر با ۴/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا و برای نانو امولسیون ۹/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا تعیین شد. در غلظت ۲۵ میکرولیتر بر لیتر هوا، میزان LT_{50} اسانس و نانوامولسیون به ترتیب برابر با ۲/۲ و ۱۱/۱ روز بود. در غلظت ۱۰/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس معمولی دوامی نداشت، ولی نانوامولسیون دوام خوبی (روز LT_{50}= ۹/۰۴) داشت. در غلظت ۹ میکرولیتر بر لیتر هوا مدت زمانی که طول کشید ۵۰ درصد تخم‌ها در اثر اسانس معمولی دچار مرگ و میر شوند، ۳/۷ روز برآورد شد. میزان LT_{50} نانوامولسیون در این غلظت ۱۷/۰۹ روز بود. در غلظت ۴/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا میزان LT_{50} نانوامولسیون ۱۲/۸ روز بود، در حالیکه اسانس معمولی فاقد دوام بود. میانگین قطر ذرات نانوامولسیون با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (TEM) حدود ۳۶-۱۰ نانومتر تعیین شد. بر اساس نتایج به دست آمده، بکارگیری فرم نانوامولسیون اسانس گیاه پونه می‌تواند باعث افزایش سمیت تنفسی و دوام آن شود.

واژه‌های کلیدی: سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات، اسانس، حشره‌کشی، پونه، نانوامولسیون

Study on insecticidal properties of nanoemulsion *Mentha longifolia* L. (Lamiaceae) essential oil against *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Mojdeh louni[1], Jahanshir Shakarami[1,*] & Maryam Negahban[2]

1. Department of Plant protection, Faculty of Agriculture Science, University of Lorestan, Khorramabad, Iran & 2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

*Corresponding author, E-mail: shakarami.j@lu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۱، پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۵.

دبیر تخصصی : میرجلیل حجازی

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract
Nowadays, nanoemulsions are considered by many researchers because of their unique physiochemical properties such as small particle size, long-term physical stability and transparency. In this research, fumigant toxicity of *Mentha longifolia* L. essential oil and its nanoemulsion against *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) has been studied. The experiments were conducted at laboratory conditions at 27±2°C temperature, 65±5% relative humidity and darkness. Essential oil of *M. longifolia* had higher fumigant toxicity than nanoemulsion, during early hours after treatment. The LC_{50} values of oil and nanoemulsion for the adults of the pest were 10.1 and 16.1 µl/l, respectively. The values of LC_{50} were 4.9 and 9.4 µl/l for oil and nanoemulsion during incubation period, respectively. In concentration of 25 µl/l, LT_{50} of *M. longifolia* essential oil and nanoemulsion were 2.2 and 11.1 days, respectively. In concentration of 10.1 µl/l, essential oil did not have durability, but this parameter of nanoemulsion is good (LT_{50}= 9.04 days). At 9 µl/l of essential oil, the average time for the mortality of 50% eggs was 4.7 days. The LT_{50} of nanoemulsion at this concentration was 17.09 days. At 4.9 µl/l of nanoemulsion, the LT_{50} was 12.8 days, while essential oil did not have durability. The average diameter of nanoemulsion particles has been estimated about 10-36 nm by using transmission electron microscope (TEM). By using laser light scattering (SEMATech), this value was 234 nm. Considering obtained results, using nanoemulsion form of *M. longifolia* essential oil increase its fumigant toxicity and durability.
Key words: *Callosobruchus maculatus*, Essential oil, Insecticidal, *Mentha longifolia*, Nanoemulsion
Received: 11 January 2018, *Accepted:* 6 September 2019.

مقدمه

سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Col.: Chrysomelidae) از آفات مهم و مخرب غلات و حبوبات به شمار می‌رود (Devi & Devi, 2014). کنترل این آفت یکی از موضوعات مهم در حفاظت محصولات انباری می‌باشد. استفاده روزافزون از سموم شیمیایی برای کنترل آفات انباری می‌تواند باعث افزایش ظهور مقاومت در حشرات و هم‌چنین افزایش بقایای سموم در محصولات کشاورزی و محیط‌زیست شود (Dent, 2000). بنابراین، نیاز ضروری به توسعه روش‌های ایمن و دوست‌دار محیط زیست با صرف هزینه کم و سهولت در مصرف وجود دارد. خواص حشره‌کشی بسیاری از مشتقات گیاهان آروماتیک مانند اسانس‌های گیاهی تا کنون بررسی شده است (Negahban *et al*., 2007; Liu *et al*., 2014). این ترکیبات می‌توانند به عنوان سموم زیستی با خاصیت تنفسی، تماسی و دورکنندگی به منظور کنترل آفات انباری مورد استفاده قرار گیرند (Gusmao *et al*., 2013). گیاه پونه *Mentha longifolia* L. (Lamiaceae) از گیاهان معطر مهم و رایج در نقاط مختلف ایران است، که اثرات حشره‌کشی آن روی آفات مختلف تاکنون تأیید شده است (Shakarami *et al*., 2008; Shahmirzaei *et al*. 2016). این گیاه به صورت گسترده در روسیه، استرالیا و جنوب و شمال آفریقا در حاشیه رودخانه‌ها رشد می‌کند(Sharapov, 2012). به تازگی علاقه زیادی به سمت استفاده از خـــواص زیستی اسانس‌های گیاهی به‌وجود آمده است. از آنجایی‌که اسانس‌ها نسبت به عوامل مختلف محیطی (نور، اکسیژن و دما) حساس و تجزیه‌پذیر می‌باشند، روش‌های مختلفی برای محافظت این ترکیبات توسعه پیدا کرده است. یکی از بهترین روش‌ها کپسوله کردن آن‌ها در سیستم‌های کلوییدی مختلف مثل نانوامولسیون‌ها است. کپسوله کردن یکی از روش‌های مؤثر در بهبود ثبات فیزیکی اسانس‌های گیاهی بوده و به دلیل ایجاد خاصیت رهایش تدریجی باعث حفاظت از تبخیر و افزایش فعالیت زیستی آن‌ها می‌شود (Moharramipour & Negahban; 2014; Majeed *et al*., 2015). نانوامولسیون‌ها از یک فاز چربی که در یک فاز آبی پراکنده شده‌اند تشکیل شده است. در این ترکیبات هر قطره روغن توسط یک لایه نازک از مولکول‌های امولسیفایر احاطه می‌شود (Ranjan *et al*., 2016). نانوامولسیون‌ها به دلیل سایز بسیار کوچک ذرات روش مناسبی برای افزایش ثبات فیزیکی مواد مؤثر برای کپسوله شده بوده و توزیع عوامل حشره‌کشی این ترکیبات را روی محصول هدف بالا می‌برند (Topuz *et al*., 2016). تاکنون مطالعات مختلفی روی فرمولاسیون‌های مختلف اسانس‌های گیاهی انجام شده است. برای مثال، Morreti *et al*. (2002) بیان کردند روش میکروکپسوله کردن یک تکنیک مناسب به منظور حفاظت و رهایش تدریجی

www.SID.ir

Archive of SID

اسانس *Rosmarinus officinalis* L. می‌باشد. هم‌چنین میکروکپسوله کردن این اسانس و اسانس *Thymus vulgaris* L. باعث افزایش دوام و سمیت گوارشی بالای اسانس روی شب‌پره هندی شد (Passino *et al*., 2004). Nuchuchua *et al*. (2009) نیز ثبات فیزیکی بهتر و دوام طولانی‌تر نانوامولسیون سه اسانس گیاهی مختلف روی *Aedes aegypti* L. را نشان دادند. در مطالعه دیگری، اثر قوی اسانس کپسوله شده درمنه *Artemisia arborescens* L. روی پارامترهای تغذیه‌ای و دورکنندگی شب‌پره پشت‌الماسی *Plutella xylostella* L. گزارش شده است (Negahban *et al*., 2013a&b). Jamal *et al*., (2013) رهایش تدریجی و اثرات ضدتغذیه‌ای اسانس بذر زنیان *Carum copitum* C. B. Clark را علیه لارو شب‌پره پشت‌الماسی بررسی کردند. این محققین بیان کردند نانوکپسول حاوی اسانس زنیان به‌طور معنی‌داری نرخ نسبی مصرف غذا، نرخ رشد نسبی، بازده تبدیل غذای خورده شده و بازده تبدیل غذای هضم شده را کاهش می‌دهد. همچنین، در مطالعه دیگری اثر قوی نانوژل اسانس *C. cpitum* روی دو گونه آفت انباری مطالعه شده است (Ziaee *et al*., 2014). این فرمولاسیون توانست اثر سمی اسانس را روی آفات مورد نظر در طولانی مدت حفظ نماید. در بررسی Emamjomeh *et al*. (2017) مشخص شد، نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Boiss سمیت تماسی و دوام سمیت تماسی اسانس را علیه لاروهای ۱٤-۷ روزه شب‌پره آرد به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. تاکنون مطالعه‌ای روی خواص نانوامولسیون تهیه شده از گیاه پونه انجام نشده است، بنابراین در این مطالعه سمیت تنفسی نانوامولسیون اسانس پونه و تأثیر آن روی دوام اسانس علیه سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه

در مرداد ماه ۱۳۹۵ بخش‌های هوایی (برگ، گل و ساقه‌های نازک) گیاه پونه در مرحله گل‌دهی از اطراف شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. گیاهان جمع‌آوری شده در اتاق‌های تاریک با تهویه مناسب خشک شدند. نمونه‌های خشک شده تا زمان تهیه اسانس در دمای ۲٤- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

پرورش حشرات

سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات در آزمایشگاه سم‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، روی دانه‌های لوبیا چشم‌بلبلی پرورش داده شد. برای به‌دست آوردن حشرات هم‌سن و تازه متولد شده، تعداد ۳۰ عدد حشره بالغ روی ۲۵۰ گرم دانه لوبیا چشم‌بلبلی در ظروف پلاستیکی رهاسازی شد. درب ظروف جهت تهویه سوراخ شد و با توری‌های نازک پوشانده شد. پس از چهار هفته حشرات ظاهر شده به منظور انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. در طول پرورش، کلنی حشرات در دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ٥±٦٥ درصد و تاریکی نگهداری شدند.

استخراج اسانس

گیاهان خشک شده پس از حذف شاخه‌های چوبی به صورت پودر درآورده شد و اسانس‌گیری با کمک دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای Clevenger در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به روش تقطیر با آب و در مدت زمان ٤ ساعت انجام شد. در هر نوبت اسانس‌گیری ۱۰۰ گرم پودر گیاهی همراه با ۱۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آب‌گیری شد و درون ظروف شیشه‌ای به حجم ۲ میلی‌لیتر با

www.SID.ir

Archive of SID

روکش آلومینیومی و پارافیلم در یخچال و درشرایط دمایی ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد (Negahban *et al.*, 2007).

تهیه نانوامولسیون اسانس گیاهی

به منظور تهیه فاز آبی نانوامولسیون حاوی اسانس *M. longifolia*، مقادیر تعیین شده ای از آب، توین ۸۰ درصد و گلیسرول به‌وسیله هم‌زن دستی آزمایشگاهی با سرعت ۲۰۰۰–٦۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۳۰ دقیقه در داخل ظرفی با حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر در دمای ۲۲–۱۸ درجه سلسیوس مخلوط شدند. سپس گلیسرول مونواستارات (GMS) در مقدار تعیین شده روی دستگاه مگنت استریرر (مدل RH basic 2, IKA, GER) در دمای ۸۰ درجه سلسیوس تا مرحله ذوب شدن حرارت داده شد. به منظور تشکیل فاز روغنی نانوامولسیون، میزان معینی از روغن کرچک به همراه اسانس خالص *M. longifolia* به GMS ذوب شده اضافه شد. ترکیب به‌دست آمده به صورت قطره قطره به فاز آبی اضافه شد و با کمک دستگاه هموژنایزر (مدل T 18 basic ULTRA-TURRAX package, IKA, GER) با سرعت ۲۰۰۰۰–۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۱۸ درجه سلسیوس برای مدت یک ساعت مخلوط شد. در نهایت به منظور مشاهده تشکیل نانو ذرات اسانس، دما به آرامی تا ۵ درجه سلسیوس کاهش یافت.

بررسی مورفولوژی سطح نانوامولسیون با میکروسکوپ الکترونی

جهت مشاهده سطح نانوامولسیون و شکل‌شناسی دیواره‌ها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM (Transmission electron microscope), (Philips, Model CM 120) استفاده شد. مشاهده توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون با کمک دستگاه Laser light scattering (SEMATech) انجام شد.

آزمایشات زیست‌سنجی

بررسی سمیت تنفسی نانوامولسیون و اسانس پونه روی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات

برای تعیین سمیت تنفسی اسانس پونه، پس از به دست آوردن محدوده غلظت‌ها توسط آزمایش‌های مقدماتی، غلظت‌های ۲/۵– ۰/۵ میکرولیتر (معادل ۲۵– ۵ میکرولیتر بر لیتر هوا) از اسانس با کمک میکروپیپت روی کاغذهای صافی به قطر ۲ سانتی‌متر ریخته شد. غلظت‌های مورد استفاده از نانوامولسیون ۵ درصد برابر با ۳–۰/۵ میکرولیتر (۳۰–۵ میکرولیتر بر لیتر هوا) بود. به منظور پخش یکنواخت اسانس، کاغذهای صافی در مرکز درب ظروف شیشه‌ای به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر قرار داده شد. سپس تعداد ۱۰ عدد حشره ۱–۳ روزه سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات به درون ظروف شیشه‌ای منتقل شد و درب ظروف محکم بسته شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت از زمان آزمایش تعداد حشرات مرده شمارش و درصد مرگ و میر طبق فرمول Abbott (1925) محاسبه شد. در آزمایش تخم‌کشی، ابتدا ۵۰ عدد حشره ۱–۳ روزه آفت روی ۵۰ گرم دانه لوبیا چشم‌بلبلی ریخته و اجازه داده شد حشرات به مدت ۲٤ ساعت تخم‌گذاری کنند. سپس تعداد ۱۰ عدد لوبیا چشم‌بلبلی که هر کدام حاوی یک عدد تخم یک روزه بود با کمک دستگاه استریومیکروسکوپ جدا و به ظروف شیشه‌ای مشابه آزمایش قبل منتقل شد. غلظت‌های مختلف اسانس به میزان ۰/۲– ۰/۹ میکرولیتر (۹–۲ میکرولیتر بر لیتر هوا) و نانوامولسیون به میزان ۰/۷ و ۱/۵۹ میکرولیتر (۷ و ۱۵/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا) روی کاغذهای صافی درون درپوش ظروف ریخته شد. درب ظروف پس از انتقال تخم‌ها بسته شد و پس از گذشت هفت روز تعداد تخم‌های تفریخ نشده شمارش و درصد مرگ و میر مشابه روش قبل محاسبه گردید. شرایط آزمایش شامل دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±٦۵ درصد تحت شرایط تاریکی بود. آزمایش‌ها در هر غلظت در ۵ تکرار انجام شد.

بررسی دوام سمیت تنفسی نانوامولسیون و اسانس پونه روی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات

www.SID.ir

Archive of SID

براساس روش Negahban (2012)، دو غلظت LC_{50} و LC_{80} به‌دست آمده از آزمایش‌های سمیت تنفسی اسانس پونه جهت تعیین دوام نانوامولسیون و اسانس پونه در نظر گرفته شد. غلظت‌های تعیین شده از اسانس معمولی و نانوامولسیون حاوی اسانس با کمک میکروپیپت روی کاغذ صافی به قطر دو سانتی‌متر ریخته شد و پس از قرارگیری درون درپوش ظروف شیشه‌ای، درب ظروف محکم بسته شد. پس از یک روز از تاریخ اسانس-دهی تعداد ۱۰ عدد حشره ۱-۳ روزه سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات درون ظروف قرار داده شد و پس از ۲٤ ساعت تعداد حشرات مرده شمارش گردید. همین روند برای ۳، ۵، ۷، ۹ ، ۱۱ و تا هر دو روز یکبار تا حداکثر زمانی که پس از اسانس‌دهی هیچ مرگ و میری مشاهده نشود ادامه یافت. در آزمایش مربوط به مرحله تخم آفت نیز مشابه روش بالا دو غلظت مورد نظر (LC_{80} و LC_{50}) تعیین شد و یک روز پس از تاریخ اسانس‌دهی تعداد ۱۰ عدد لوبیا چشم بلبلی حاوی یک عدد تخم یک روزه آفت به درون ظروف منتقل شد. سپس هفت روز بعد تعداد تخم‌های تفریخ نشده شمارش و درصد مرگ‌ومیر محاسبه شد. بررسی روند دوام در مرحله تخم آفت نیز مانند مرحله بالغ بود. درب ظروف قبل از انتقال مراحل مختلف آفت کاملاً بسته بوده و پس از اینکه نمونه‌ها به داخل ظروف ریخته شد درب ظروف مجدداً بسته شد و در تمام طول این مدت مسدود باقی ماند. کلیه آزمایش‌ها در ۵ تکرار انجام شد.

محاسبات آماری

داده‌های آزمایشات تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) شد و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون توکی برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. همینطور به منظور محاسبه مقادیر LC_{50} و LT_{50} نرم‌افزار SAS 9.4 (SAS Institute, 1996) مورد استفاده قرار گرفت.

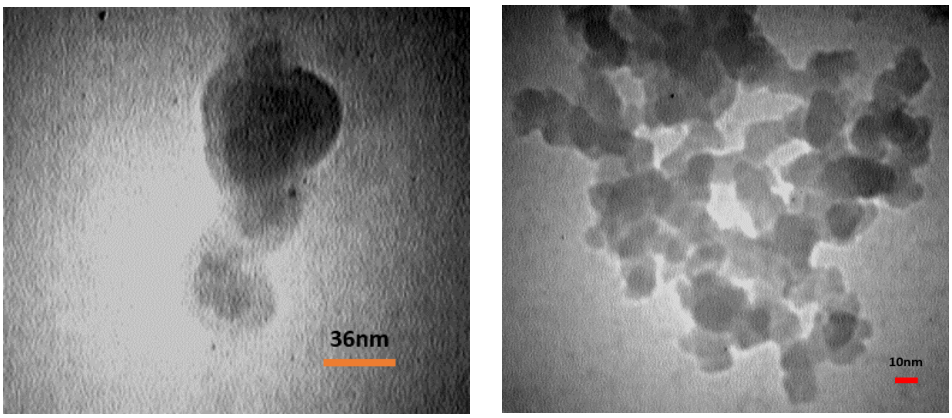
نتایج

مورفولوژی سطح نانو امولسیون با میکروسکوپ الکترونی

میانگین سایز ذرات نانوامولسیون توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) حدود ۳٦-۱۰ نانومتر برآورد شد. هم‌چنین ساختار دیواره‌ها و مرفولوژی سطح ذرات نانوامولسیون با کمک این دستگاه بررسی شد (شکل ۱). میانگین سایز ذرات نانوامولسیون با استفاده از Laser light scattering (SEMATech) حدود ۲۳٤ نانومتر تخمین زده شد (شکل ۲).

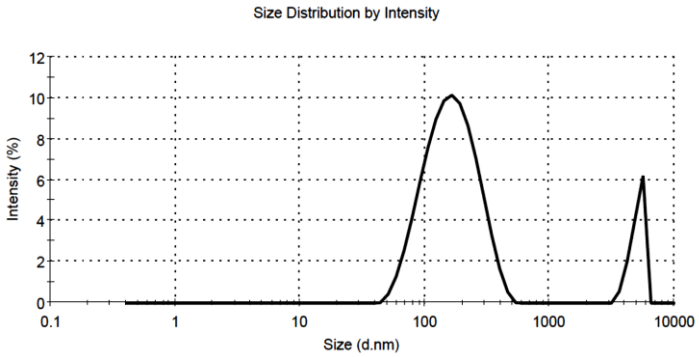
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از ساختار هسته نانوامولسیون اسانس پونه

Fig. 1. Transmission microscope images of nanoemulsion core structure from *Mentha longifolia* oil



شکل ۲- میانگین سایز ذرات نانوامولسیون حاوی اسانس پونه

Fig. 2. Size distribution of nanoemulsion from *Mentha longifolia* oil

سمیت تنفسی نانو امولسیون و اسانس پونه روی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات

مطابق با جدول ۱، در هر دو مرحله آفت میزان سمیت اسانس در مدت زمان کوتاه پس از آزمایش (۲٤ ساعت برای بالغ‌کشی و هفت روز برای تخم‌کشی) بیش‌تر از نانوامولسیون بود میزان LC_{50} به دست آمده برای اسانس پونه و نانوامولسیون ۵ درصد آن بر حسب ماده مؤثره در آزمایش حشرات کامل به ترتیب برابر با ۱/۰۱ و ۱/٦۱ میکرولیتر (۱۰/۱ و ۱٦/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا) تخمین زده شد. این مقدار در مرحله تخم‌کشی به ترتیب برابر با ۰/٤۹ و ۰/۹٤ میکرولیتر (٤/۹ و ۹/٤ میکرولیتر بر لیتر هوا) برآورد شد.

جدول ۱- مقادیر LC_{50} اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی مراحل مختلف سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات

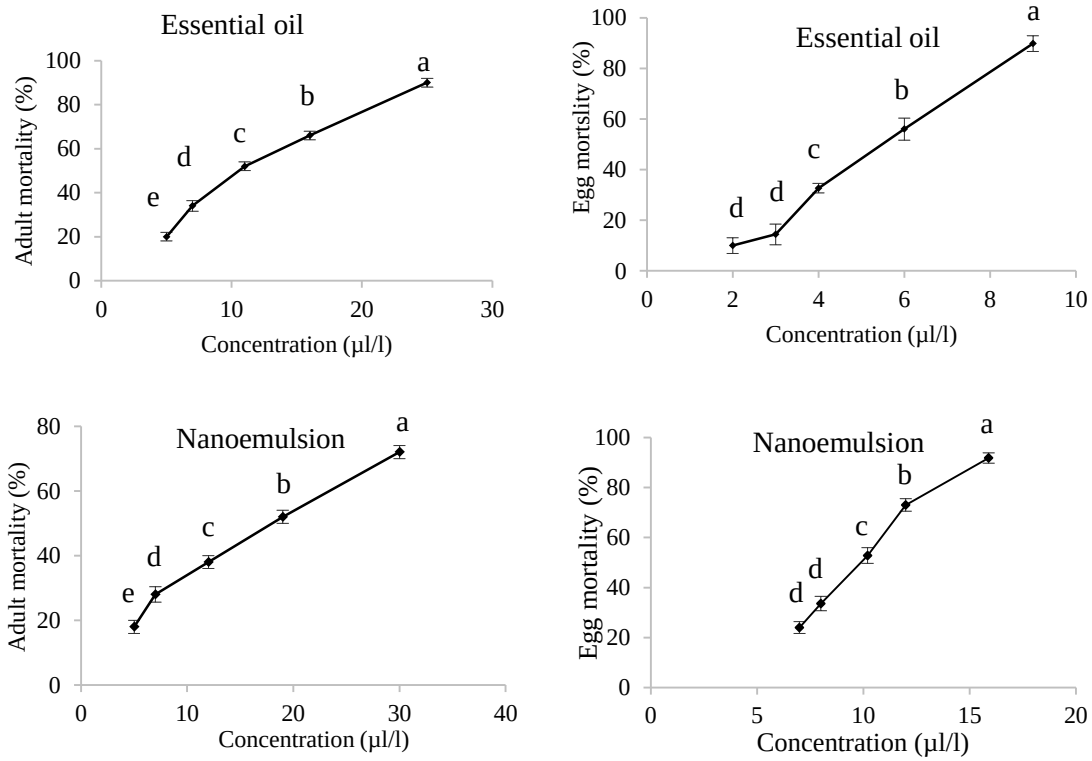
Table 1. LC_{50} values of oil and its nanoemulsion from *Mentha longifolia* against different stages of *Callosobruchus maculatus*

Compound	stage	LC50 (µl/L)	Chi-square	a	df	Slope±SE	P-value	Confidence limit 95%	
								Lower	Upper
Essential oil	adult	10.1	1.32	-2.8±0.39	3	2.8±0.37	0.72	8.8	11.7
	egg	4.9	2.19	-2.8±0.35	3	4.07±0.50	0.53	4.4	5.5
Nanoemulsion	adult	16.1	0.76	-2.1±0.34	3	1.8±0.30	0.85	13.06	21.11
	egg	9.4	0.71	-5.6±0.78	3	5.8±0.78	0.87	8.74	10.10

www.SID.ir

Archive of SID

بالاترین غلظت به دست آمده از اسانس که باعث ۹۰ درصد مرگ‌ومیر حشرات بالغ سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات شد برابر با ۲۵ میکرولیتر بر لیتر هوا بود. پایین‌ترین میزان مرگ‌ومیر (۲۰ درصد) این مرحله از آفت نیز در غلظت ۵ میکرولیتر بر لیتر هوا به‌دست آمد. در غلظت‌های ۹ و ۲ میکرولیتر بر لیتر هوا از اسانس به ترتیب بیش‌ترین (۸۹/۸ درصد) و کم‌ترین (۱۰ درصد) میزان مرگ‌ومیر تخم‌های آفت به‌دست آمد. در رابطه با نانوامولسیون ۵ درصد بالاترین (۷۲ درصد) و پایین‌ترین (۱۸ درصد) میزان مرگ‌ومیر حشرات بالغ به ترتیب در غلظت‌های ۵ و ۳۰ میکرولیتر بر لیتر هوا تخمین زده شد. در آزمایش تخم‌کشی نیز غلظت‌های ۷ و ۱۵/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا از نانوامولسیون ۵ درصد به ترتیب باعث بالاترین (۹۱/۸ درصد) و پایین‌ترین (۲٤ درصد) میزان مرگ‌ومیر در تخم‌های آفت شدند (شکل ۳).



شکل ۳- درصد مرگ‌ومیر مراحل مختلف سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات در غلظت‌های مختلف اسانس پونه و نانوامولسیون آن.

Fig. 3. Mortality percentage of different stages of *Callosobruchus maculatus* exposed to different concentrations of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion.

دوام سمیت تنفسی نانوامولسیون و اسانس پونه روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات

در کلیه آزمایش‌ها دوام سمیت تنفسی نانوامولسیون به میزان قابل توجهی بالاتر از اسانس معمولی بود. مطابق با جدول ۲ و ۳، در غلظت ۲۵ میکرولیتر بر لیتر هوا (LC_{80}) دوام اسانس معمولی پونه (LT_{50}) روی مرحله بالغ سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات ۲/۲ روز بود. در غلظت مذکور میزان LT_{50} نانوامولسیون ۱۱/۱ روز تعیین شد. در غلظت ۱۰/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا (LC_{50}) اسانس دوامی نداشت و مرگ‌ومیر حشرات بعد از سه روز به صفر رسید ولی نانوامولسیون دوام خوبی داشت و میزان LT_{50} آن ۹/۰٤ روز برآورد شد. در غلظت ۹ میکرولیتر بر لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

میزان LT_{50} به‌دست آمده از اسانس معمولی و نانومولسیون روی تخم سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات به ترتیب برابر با ۳/۷ و ۱۷/۰۹روز بود. در LC_{50} (٤/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا) اسانس پونه فاقد دوام بود، در حالی‌که میزان LT_{50} به‌دست آمده برای نانومولسیون در این غلظت برابر با ۱۲/۸ روز بود.

جدول ۲- مقادیر LT_{50} اسانس پونه روی مراحل مختلف سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات

Table 2. LT_{50} values of *Mentha longifolia* oil against different stages of *Callosobruchus maculatus*

Compound	stage	Concentration (µl)	LT50 (days)	Chi-square	a	df	slope±SE	p-value	Confidence limite 95%	
									Lower	Upper
Essential oil	adult	25	2.21	0.01	0.9±0.19	1	-2.6±0.40	0.91	1.7	2.7
	egg	9	3.72	0.12	1.9±0.31	2	-3.4±0.48	0.93	3.1	4.3

جدول ۳- مقادیر LT_{50} نانومولسیون اسانس پونه روی مراحل مختلف سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات

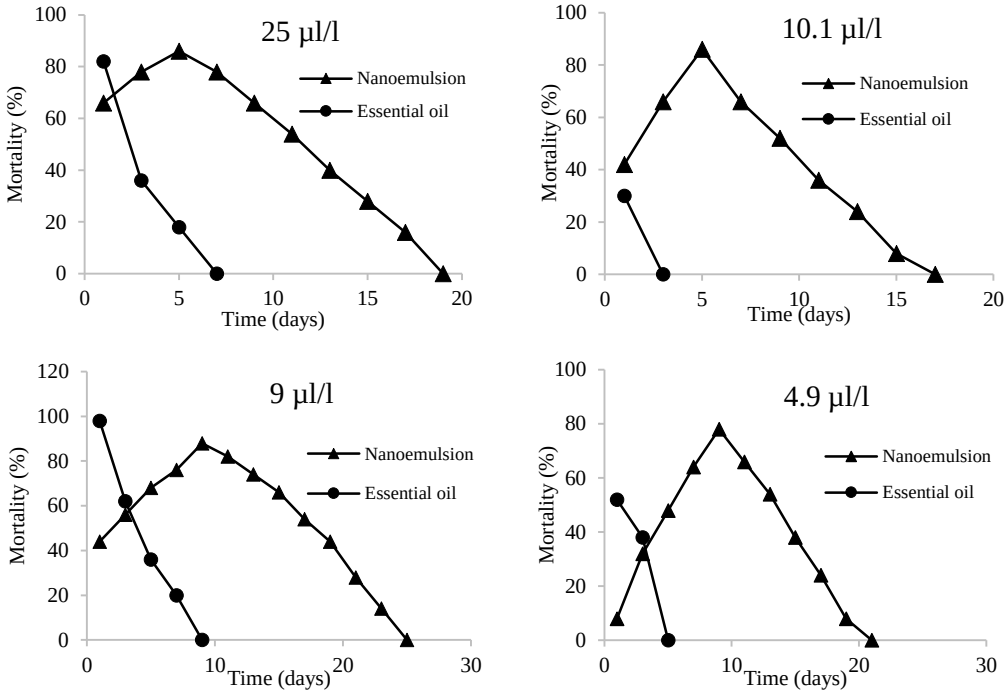
Table 3. LT_{50} values of nanoemulsion from *Mentha longifolia* oil against different stages of *Callosobruchus maculatus*

Compound	stage	Concentration (µl/l)	LT_{50} (day)	Chi-square	a	df	Slope ± SE	p-value	Confidence limit 95%	
									Lower	Upper
Nanoemulsion	adult	25	11.1	1.4	3.7±0.51	4	-3.5±0.51	0.84	10.07	12.5
		10.1	9.04	0.27	3.9±0.59	3	-4.1±0.61	0.96	8.2	9.9
	egg	9	17.09	1.4	6.4±1.02	4	-5.2±0.84	0.84	15.9	18.5
		0.49	12.8	0.76	5.9±1.0	3	-5.3±0.90	0.85	11.9	13.8

در غلظت‌های بالا مرگ و میر حشرات بالغ و تخم‌های آفت در هر دو تیمار (اسانس و نانومولسیون) روند نزولی داشت. در رابطه با اسانس این روند سریع بود و پس از مدت زمان کوتاهی مرگ‌ومیر به صفر رسید. اما دوام نانومولسیون به صورت تدریجی کاهش یافت و پس از مدت زمان طولانی‌تری نسبت به اسانس به صفر رسید. در غلظت‌های ۱۰/۱ و ٤/۹ میکرولیتر بر لیتر اسانس دوامی نداشت، اما نانومولسیون دوام قابل توجهی از خود نشان داد. به این صورت که روند مرگ و میر حشرات بالغ و تخم‌های سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات ابتدا صعودی بود و پس از رسیدن به بیش‌ترین میزان خود دچار سیر نزولی شد و در نهایت به صفر رسید (شکل ٤).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- دوام اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی مراحل مختلف سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات در دو غلظت LC_{80} و LC_{50}.

Fig 4. Durability of *Mentha longifolia* essential oil and its nanoemulsion on different stages of *Callosobruchus maculatus* at LC_{80} and LC_{50}.

بحث

کاهش کیفی و کمی محصولات انباری توسط سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات باعث شده است کنترل این آفت مورد توجه بسیاری از محققین قرار گیرد. در این مطالعه یک فرمولاسیون دوست‌دار محیط زیست طبق روشی جدید تولید شد که می‌تواند بسیاری از محدودیت‌های کاربرد اسانس‌های گیاهی جهت کنترل آفات را از بین ببرد. گیاه پونه دارای پراکندگی زیادی در نواحی مختلف ایران بوده و اثرات قوی حشره‌کشی آن روی آفات مختلف انباری گزارش شده است، مانند سمیت تنفسی و دورکنندگی آن علیه *Tribolium confusum* H. (Saeidi & Moharramipour, 2013) و سمیت تماسی آن روی *Sitophilus oryzae* L. (Motamedi *et al*., 2011). ولی تاکنون اثرات حشره‌کشی نانوامولسیون تهیه شده از این اسانس بررسی نشده است. مطابق با یافته‌های حاضر، نانوامولسیون ۵ درصد تهیه شده از اسانس پونه توانست علاوه بر حفظ ماهیت سمی اسانس دوام و ماندگاری آن را در طولانی مدت افزایش دهد. در آزمایش بالغ‌کشی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات ابتدا و بعد از گذشت ٢٤ ساعت از زمان آزمایش، سمیت تنفسی اسانس پونه (LC_{50}=10.1 µl/l) بیش‌تر از نانوامولسیون (LC_{50}=16.1 µl/l) بود. در آزمایش تخم‌کشی این آفت نیز در زمان اولیه پس از انجام آزمایش اسانس پونه سمیت تنفسی (LC_{50}= 4.9 µl/l) بیش‌تری نسبت به نانوامولسیون (LC50=9.4 µl/l) داشت. سایر محقیقن مانند Khademi *et al*. (2014) نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. آن‌ها بیان کردند در ٢٤ ساعت اولیه پس از انجام آزمایش اسانس *Carum copitum* L. سمیت تنفسی بیش‌تری روی *Tribolium castaneum* (H.) نسبت به فرمولاسیون لیپیدی جامد اسانس از خود نشان داد. همینطور طبق گزارش Negahban (2012) میزان LC_{50} به‌دست آمده از سمیت تنفسی اسانس درمنه روی شب‌پره پشت‌الماسی برابر با ۳/۷۸ پی‌پی‌ام بود، در حالیکه این مقدار برای اسانس نانوکپسوله شده ۱۱ پی‌پی‌ام بود. مقایسه

www.SID.ir

Archive of SID

دوام اسانس پونه و نانوامولسیون آن در دو غلظت LC_{80}=25 µl/l و LC_{50}=10.1 µl/l نشان داد استفاده از تکنیک نانوکپسوله کردن باعث افزایش دوام اسانس در طولانی مدت می‌شود. در غلظت ۲۵ میکرولیتر بر لیتر هوا دوام اسانس ۷ روز به طول انجامید، به این صورت که پس از ۸۲ درصد مرگ‌ومیر حشرات بالغ بعد از یک روز از تاریخ اسانس‌دهی، این مقدار در روز هفتم به صفر رسید. در مقابل نانوامولسیون اسانس پونه دوام طولانی‌تری (۱۹ روز) داشت. در روز اول پس از انجام آزمایش درصد مرگ و میر سوسک‌های بالغ ٦٦ درصد بود، این میزان به تدریج افزایش یافت و در روز پنجم به ۸٦ درصد رسید. سپس طی یک روند نزولی در روز نوزدهم درصد مرگ‌ومیر حشرات آفت به صفر رسید. در غلظت ۱۰/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس فاقد دوام بود و بعد از گذشت سه روز از زمان اسانس‌دهی هیچ گونه مرگ‌ومیری در حشرات بالغ مشاهده نشد. ولی در رابطه با نانوامولسیون در غلظت ذکر شده روند مرگ‌ومیر حشرات ابتدا صعودی و سپس نزولی بود. به این ترتیب که پس از یک روز از زمان اسانس‌دهی نرخ مرگ‌ومیر ٤۲ درصد تخمین زده شد، پس از آن و طی یک روند صعودی و تدریجی این میزان در روز پنجم به ۸٦ درصد رسید. سپس درصد مرگ‌ومیر به آهستگی و پس از رسیدن به ۲٤ درصد در روز سیزدهم، در روز هفدهم به صفر رسید. در آزمایش تخم‌کش سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد. در غلظت ۹ میکرولیتر بر لیتر هوا درصد مرگ‌ومیر حشرات در اثر اسانس پس از یک روز ۹۸ درصد تعیین شد. سپس طی یک روند سریع در روز نهم این میزان به صفر رسید. در اثر نانوامولسیون در این غلظت درصد مرگ‌ومیر پس از یک روز از اسانس‌دهی ٤٤ درصد بود. این میزان در روز نهم به ۸۸ درصد رسید. سپس به تدریج کاهش یافته و در نهایت تا روز ۲۵ که هیچ مرگ‌ومیری در تخم‌ها مشاهده نشد ادامه یافت. در غلظت ٤/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس دوامی نداشت و در روز پنجم اسانس‌دهی کلیه تخم‌های آفت تفریخ شد. اما دوام نانوامولسیون در این غلظت ۲۱ روز به طول انجامید. یک روز پس از اسانس‌دهی نرخ مرگ‌ومیر تخم‌ها ۸ درصد بود. طی یک روند تدریجی این میزان افزایش یافت و در روز نهم به ۷۸ درصد رسید. پس از آن نرخ تفریخ تخم‌های آفت به صورت نزولی درآمد و در نهایت در روز ۲۱ کلیه تخم‌ها تفریخ شد و مرگ‌ومیری مشاهده نشد. محققین مختلفی اثر نانوکپسوله کردن روی افزایش دوام اسانس را تایید کرده‌اند. برای مثال، Passino *et al*. (2004)، بیان کردند میکروکپسوله کردن اسانس *R. officinalis* باعث افزایش دوام آن شده و حدود ۷۵ درصد از میزان رهایش اسانس در طول ۲۵ روز انجام شده است. ماندگاری طولانی نانوامولسیون اسانس سه گیاه *Citronella nardus* (L.), *Ocimum americanum* (L.) و *Zizanioides* Vetiveria (L.) روی *A. aegypti* نیز گزارش شده است (Nuchuchua *et al*., 2009). در مطالعه دیگری Negahban (2012) نشان داد اسانس نانوکپسوله شده درمنه در غلظت بالا (LC_{80}) به‌دست آمده از اسانس دارای روند نزولی، تدریجی و طولانی‌تری نسبت به اسانس معمولی بود. هم‌چنین فرمولاسیون نانوکپسول اسانس زنیان موجب رهاسازی کنترل شده و تدریجی اسانس و افزایش اثرات ضد تغذیه‌ای آن روی شب‌پره پشت‌الماسی شد (Jamal *et al*., 2013). بر اساس یافته‌های Allahvaisi *et al*. (2017) سمیت تنفسی بیونافیبر اسانس *Mentha piperita* L. دوام طولانی‌تری (LT_{50}= 22.7 days) نسبت به اسانس معمولی (LT_{50}= 2.2 days) روی *Plodia interpunctella* Hübner داشت. بـر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، نانوامولسیون اسانس پونه می‌تواند نقش کلیدی و مهمی در کنترل سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات داشته و به عنوان گزینه مناسبی به منظور تولید در سطح تجاری در نظر گرفته شود. بنابراین تولید آفت‌کش‌های گیاهی دوست‌دار محیط‌زیست بر مبنای علم نانوتکنولوژی به عنوان جایگزینی برای آفت‌کش‌های شیمیایی می‌تواند در جهت رسیدن به کشاورزی ارگانیک نقش قابل توجهی داشته باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Abbott, W. S. (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265–267.

Allahvaisi, S., Talebi Jahromi, K., Imani, S. & Khanjani, M. (2017) Efficacy of electrospun bionanofibers as fumigant pesticides in foodstuff storage. *Journal of Plant Protection Research* 57, 72-80.

Dent, D. (2000) Insect pest management. Second edition. CABI Publishing, Ascot, UK.

Devi, M.B. & Devi, N.V. (2014) Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2, 74-76.

Emamjomeh, L., Imani, S., Talebi, Kh., Moharramipour, S. & K. Larijani, K. (2017) Preparation of nanoemulsion formulation of essential oil of *Zataria multiflora* and comparison of contact toxicity with pure essential oil on *Ephestia kuehniella*. *Entomology and Phytopathology* 85, 181-190.

Gusmao, N. M. S., Oliveira, J. V., Navarro, D. M. A. F., Dutra, K. A., Silva, W. A. & Wanderley, A. J. A. (2013) Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. Essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). *Journal of Stored Products Research* 54, 41-47.

Jamal, M., Moharramipour, S., Zandi, M. & Negahban, M. (2013) Efficacy of nanoencapsulated formulation of essential oil from *Carum copticum* seeds on feeding behavior of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 33, 23-31.

Khademi, N., Moharramipour, S. & Negahban, M. (2014) Insecticidal properties of essential oils of *Carum copitum* and *Cuminum cyminum* and their formulations on *Sitophilus oryzae* and Tribolium castaneum. M. Sc. thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. 108 pp.

Liu, X. C., Lu, X. N., Liu, Q. Z. & Liu, Z. L. (2014) Evaluation of insecticidal activity of the essential oil of Allium chinense G. Don and its major constituents against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17, 853-856.

Majeed, H., Bian, Y.Y., Ali, B., Jamil, A., Majeed, U., Farid, Q., Iqbal, K.J., Shoemaker, C.F. & Fang, ZH. (2015) Essential Oil Encapsulations: Uses, Procedures, and Trends. *The Royal Society of Chemistry* 5, 58449-58463.

Moharramipour, S. & Negahban, M. (2014) Basic and applied aspects of biopesticides. *Plant Essential Oil and Pest Management* 129-155.

www.SID.ir

Archive of SID

Moretti, M.D.L., Sanna-Passino, G., Demontis, S. & Bazzoni, E. (2002) Essential oil formulations useful as a new tool for the insect pest control. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 3, 1-11.

Motamedi, Y., Fallahzadeh, M. & Roshan V. (2011) Contact toxicity of three plant essential oils on adult insects of *Sithophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Plant Protection Journal* 3, 135-144.

Negahban, M., Moharramipour, S. & Sefidkon, F. (2007) Fumigant toxicity of essential oil from Artemisia sieberi Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43, 123-128.

Negahban, M. (2012) Insecticidal propertises of nanocapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on *Plutella xylostella and Tribolium castaneum.* Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. 173 pp.

Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. & Hashemi S. A. (2013a) Efficiency of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on nutritional indices of *Plutella xylostella. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 29, 692-708.

Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. & Hashemi S. A. (2013b) Repellent activity of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on *Plutella xylostella* L. larvae. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 29, 909-924.

Nuchuchua, O., Usawadee, S., Uawongyart, N., Puttipipatkhachorn, S., Soottitantawat, A. & Ruktanonchai U. (2009) In Vitro Characterization and Mosquito (*Aedes aegypti*) Repellent Activity of Essential-Oils-Loaded Nanoemulsions. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 10, 1234-1242.

Passino, G.S., Bazzoni, E. & Moretti, M. D. L. (2004) Microcapsulated essential oils active against Indian meal moth. *Boletin de Sanidad Vegetal Plagas* 30, 125-132.

Ranjan, S., Dasgupta, N. & Lichtfouse, E. (2016) Nanoscience in Food and Agriculture. *Sustainable Agriculture Reviews* 20, 1-341.

Saeidi, M. & Moharramipour S. (2013) Insecticidal and repellent activities of *Artemisia khorassanica*, *Rosmarinus officinalis* and *Mentha longifolia* essential oils on *Tribolium confusum*. *Journal of crop protection* 2, 23-31.

SAS Institute, (1996). SAS/STAT user's guide. Release 6.12 edition. Cary, NC.

Shahmirzaei, Z., Izadi, H. & Imani, S. (2016) Study on the contact and fumigant toxicity of *Mentha longifolia* L. against the confused flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 32, 556-559.

Shakarami, J., Pourhosseini, L., Vafaei-Shoushtari, R. & Goldasteh, S. (2008) Ovicidal effect of three plant essential oils on *Callosobruchus maculatus* F. (Col., Bruchidae). *Journal of Entomological Research* 3, 221-228.

Sharopov, F. S. (2012). Essential oil composition of *Mentha longifolia* from wild populations growing in Tajikistan. *Journal of Medicinally Active Plants* 1, 76-84.

www.SID.ir

Archive of SID

Topuz, O. K., Ozvural, E. B., Zhao, Q., Huang, Q., Chikindas, M. & Gulukcu, M. (2016) Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food Chemistry* 203, 117-123.

Ziaee, M., Moharramipour, S., & Mohsenifar, A. (2014) Toxicity of *Carum copitum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. *Journal of Applied Entomology* 138, 763-771.

www.SID.ir