تحقیقات آفات گیاهی
۱۹- ۱ :(۲)۱۲- ۱۴۰۱

علمی پژوهشی

اثرات کشندگی و زیرکشندگی اسانس آزاد و نانوکپسوله پونه *Mentha longifolia* روی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

مریم ملک‌محمدی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱)

چکیده

در بررسی قبلی، نانوسیلیکای حاوی اسانس پونه *Mentha longifolia* L. (Lamiaceae) به روش سل- ژل با هدف امکان‌سنجی کاربرد علیه جمعیت‌های آفت ساخته شد. موفقیت روش بر اساس شاخص پراکندگی، راندمان ریزپوشانی، پتانسیل زتا و متوسط اندازه ذرات تایید شد. پژوهش حاضر با هدف بررسی سمیت فرمولاسیون آزاد و نانوکپسول اسانس پونه به دو روش تنفسی روی مراحل تخم، لاروهای سن پنجم و حشرات بالغ در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته و موضعی روی لاروهای سن پنجم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) صورت گرفت. ارزیابی اثرات زیرکشندگی در غلظت زیرکشنده (LC_{25}) به روش تدخینی و از طریق برآورد درصد بازدارندگی از تخم‌گذاری، درصد بارآوری، درصد خروج حشرات بالغ و نرخ جفت‌گیری هدف دیگر این مطالعه بود. نتایج زیست‌سنجی‌ها به روش تنفسی، همسویی سمیت تنفسی و تلفات جمعیت‌ها با غلظت اسانس مصرفی و زمان در معرض قرارگیری را تایید نمود. ساخت نانو سیلیکای اسانس پونه، افزایش ۱/۶۲ برابری سمیت موضعی و کشندگی نانوذرات اسانس در مقایسه با شکل آزاد اسانس علیه مرحله پنجم لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد را به دنبال داشت. یافته‌ها به وضوح اثرات منفی زیرکشندگی اسانس آزاد پونه و نانوذرات آن در مقایسه با شاهد را بر تعداد تخم‌های گذاشته شده به ازای هر حشره ماده (به‌ترتیب ۶۳ و ۴۲ تخم به ازای هر حشره ماده)، درصد تفریخ تخم‌های گذاشته شده (به‌ترتیب ۱۹/۱٪ و ۱۷/۶٪)، درصد خروج حشرات بالغ (به‌ترتیب ۱۶/۴ و ۱۱/۳٪) و نرخ جفت‌گیری (به‌ترتیب ۶/۴۸ و ۳/۶٪) در پایان ۷۲ ساعت تایید نمود. یافته‌های حاصل از زیست‌سنجی، ضمن تایید سمیت تنفسی و موضعی اسانس آزاد و نانوکپسوله پونه، اثرات اختلالی اسانس بر پراسنجه‌های بیولوژیکی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد را نیز گزارش نمود. اثرات کشندگی و زیرکشندگی قوی‌تر نانوذرات اسانس پونه در مقایسه با اسانس آزاد، استفاده از فرمولاسیون نانوی اسانس‌های گیاهی به عنوان گزینه جایگزین یا مکمل حشره-کش‌های مرسوم در مبارزه با آفات انباری را پیشنهاد می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: اثرات کشندگی و زیرکشندگی، اسانس، ریزپوشانی، شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

نویسنده مسئول: m.malekmohamadi@basu.ac.ir

مقدمه

در صورت عدم استفاده از فن‌آوری‌های نوینِ انبارداری، میزان خسارت جمعیت‌های آفت به محصولات انباری بین ۱۰ تا ۴۰ درصد برآورد می‌شود. آلودگی غلات انباری، آرد و مواد غذایی بسته‌بندی شده به شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) علاوه برخسارت مستقیم، افت کیفی محصولات انباری، انسداد و از کار افتادگی تجهیزات ماشینی در نتیجه‌ی فضولات و تارهای تنیده شده در مرحله لاروی آفت را نیز به دنبال دارد (Upadhyay and Ahmad 2011). کنترل آفات انباری با استفاده گسترده از گروه‌های مختلف ترکیبات حشره‌کش همانند ارگانوفسفات‌ها، پایرتروئیدها و فومیگانت‌ها به‌ویژه فسفین و متیل‌برماید همراه بوده است. اثرات مخرب زیست‌محیطی، آسیب گونه‌های غیرهدف، گسترش مقاومت و نرخ بالای نسبت هزینه به سود در صورت مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی مرسوم، تمایل به استفاده از ترکیبات موثر و ایمنِ دوست‌دار محیط زیست را افزایش داده است. اسانس‌های گیاهی در کنار داشتن طیفی از اثرات متابولیسمی، فیزیولوژیکی و رفتاری بر گونه‌های آفت، برای محیط زیست نیز به عنوان ترکیباتی ایمن شناخته می‌شوند. وزن مولکولی پایین اسانس‌های گیاهی آنها را به ترکیباتی بسیار فرار با دوام محیطی اندک و سمیت ناچیز برای موجودات غیرهدف تبدیل نموده است. اثرات سمی، دورکنندگی و ضد تغذیه‌ای اسانس‌های گیاهی علیه گونه‌های مختلف آفات انباری به اثبات رسیده است (Regnault-Roger, 2013; Peixoto *et al*., 2015; Isman, 2020). ماهیت آبگریز اسانس‌های گیاهی، آسیب لایه‌های مومی کوتیکول، انسداد روزنه‌های تنفسی و در نهایت مرگ حشرات در اثر خفگی و یا تنش آبی را در پی دارد. در غالب موارد کارایی اسانس‌های گیاهی به جزء یا اجزاء اصلی سازنده اسانس نسبت داده می‌شود، حال آنکه سایر اجزای سازنده اسانس از طریق کمک به تجمع یا جذب سلولی اجزاء اصلی می‌توانند در نقش سینرژیست، تشدید اثر اسانس را موجب گردند (Regnault-Roger, 2013; Isman, 2020). یافته‌ها فعالیت عصبی برخی از اسانس‌های گیاهی و اجزای سازنده آنها را تأیید نموده است، مهار آنزیمی استیل‌کولین‌استراز، بلوکه کردن سامانه‌های کولینرژیک، اکتوپامینرژیک و گاباارژیک از جمله این موارد است (Re *et al*., 2000; Enan, 2001, 2005; Lopez and Pascual- Villalobos 2010; Rattan, 2010). عدم حلالیت در آب، ناپایداری شیمیایی، فراریت بالا و اثر محافظتی کوتاه مدت به دلیل تبخیر مواد موثره و تجزیه در اثر اکسیداسیون، اشعه ماوراء بنفش و درجه حرارت بالا، استفاده عملی از اسانس‌ها در شرایط طبیعی را با چالش مواجه ساخته است. بررسی‌های گسترده‌ای با هدف پایدارسازی اسانس‌های گیاهی در فرمولاسیون‌های نانوئی دوستدار محیط زیست در حال انجام است. در بیان مزایای نانوفرمولاسیون اسانس‌های گیاهی (با قطر ذرات بین ۱۰۰-۱ نانومتر) به مواردی همچون رهایش کنترل‌شده، سهولت کاربرد، جلوگیری از تجزیه و هدر رفت در اثر تبخیر و امکان استفاده در شرایط طبیعی اشاره می‌شود. سطح مخصوص بزرگ‌تر، حلالیت، تحرک و جذب درون سلولی بیشتر، کارایی موثرتر انواع نانوفرمولاسیون‌ها در مقایسه با حشره‌کش‌های مرسوم را به همراه دارد. کاربرد آفت‌کش‌های مرسوم نیازمند استفاده ازحلال‌های آلی است، حال آنکه به دلیل حلالیت نانوذرات اسانس‌ها در آب و عدم نیاز به استفاده از حلال‌های آلی، اثرات زیان‌بار زیست محیطی گزارش‌شده برای آفت‌کش‌های متداول در نتیجه استفاده از حلال‌های آلی، برای فرمولاسیون‌های نانوئی به صفر رسیده است (Ikawati *et al*., 2020; Menossi *et al*., 2021). یکی از کارامدترین روش‌های حفظ صفات دلخواهِ ترکیبات زیستی جامد، مایع و یا حتی گاز، روش میکرو/ نانوکپسوله کردن است. در این روش لایه‌های محافظتی یا ماتریس‌هایی از یک پلیمر یا ترکیبی از پلیمرهای مختلف در اطراف ماده موثره ترکیبات فعال زیستی شکل می‌گیرد. بررسی‌ها فعالیت حشره‌کشی انواع مختلف نانوذرات بر گونه‌های آفت انباری را تایید نموده است. کارایی نانوآلومینا علیه سوسک کشیش *Rhyzopertha domonica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) و سوسک برنج *Sitophilus oryzae* L. (Copeloptera: Curculionidae) (Stadler *et al*., 2010)، کارایی نانوذرات سیلیکا، آلومینیوم اکسید، اکسید

روی، اکسید تیتانیوم و نانوذرات نقره بر *S. oryzae* (Goswami *et al*., 2010; Debnath *et al*., 2011; Abduz Zahir *et al*., 2012) از جمله این موارد هستند. معرفی حامل‌های مناسب برای رهایش کنترل‌شده و پایدار مواد موثره، به یکی از موضوع‌های تحقیقی مهم در حوزه سامانه‌های رهاساز در سال‌های اخیر تبدیل شده است. پژوهش‌های مهمی نیز با هدف امکان‌سنجی استفاده از مواد سیلیکونی، فلزات، پلیمرها و مواد زیستی به عنوان سامانه‌های حامل صورت گرفته است (Xu *et al*., 2005). عمده این بررسی‌ها در زمینه رهایش هوشمند دارو بوده و در خصوص رهایش کنترل‌شده و پایدار ترکیبات آفت‌کش پژوهش‌های محدودی انجام شده است. به رغم کاربرد گسترده فرمولاسیون‌های نانوئی بر پایه ترکیبات پلیمری، رویکرد تعداد زیادی از پژوهشگران در مطالعات اخیر بر استفاده از مواد پوسته‌ای غیرآلی همانند مواد سیلیکایی استوار بوده است. یکی از نویدبخش‌ترین تکنیک‌ها در زمینه کپسوله کردن ترکیبات آلی آروماتیک و معطر، استفاده از نانوذرات سیلیکای متخلخل است (Pagliaro, 2009). ساختار پایدار، غیرسمی بودن، داشتن سطح بالا و منافذ منظم از ویژگی‌های مواد سیلیکایی به شمار می‌رود. در مقایسه با میکروکپسوله کردن با استفاده از پلیمرهای پوششی مرسوم، انکپسولاسیون سل- ژل داخل قفس سیلیکا، پایداری فیزیکی و شیمیایی قابل توجه اسانس‌های گیاهی را به دنبال دارد (Ciriminna and Pagliaro, 2013). از مزایای استفاده از نانوسیلیکای متخلخل توخالی می‌توان به سطح مخصوص بالا، ابعاد قابل تنظیم منافذ، ساختار توخالی و پایداری گرمایی- مکانیکی اشاره نمود (Liu *et al*., 2006). چشم‌انداز استفاده از حامل‌های نانوسیلیکایی متخلخل در طراحی فرمولاسیون‌های جدید ترکیبات آفت‌کش با قابلیت رهایش چند مرحله‌ای و پایدار ماده موثره در بازه‌های زمانی مشخص، روشن به نظر می‌رسد. بارگذاری نانوسیلیکای متخلخل با آفت‌کش روغنی اورمکتین به روش ساده غوطه‌وری، یکی از موارد موفق استفاده از حامل‌های نانوسیلیکایی متخلخل به شمار می‌آید (Wen *et al*., 2005). استفاده از نانوسیلیکای متخلخل توخالی برای رهایش کنترل‌شده یک آفت‌کش قابل حل در آب به نام والیدامیسین با در نظرگرفتن ظرفیت بارگذاری بالا (۳۶ wt.%) و الگوی رهایش چند مرحله‌ای آن نیز نتیجه‌بخش بوده است (Liu *et al*., 2006)، دلیل اصلی چنین رهایش چند مرحله‌ای، امکان جذب و بارگذاری والیدامیسین در موقعیت‌های متفاوت روی نانوذرات سیلیکایی، عنوان شد. از این رو در بررسی قبلی (Malekmohammadi *et al*., 2021)، نانوسیلیکای حاوی اسانس پونه *Mentha longifolia* L. (Lamiaceae) به روش سل- ژل با هدف امکان‌سنجی کاربرد علیه جمعیت‌های آفت ساخته شد. بر اساس نتایج آنالیز GC-Mass (Gas chromatography-mass spectroscopy) از بین ۴۳ جزء سازنده اسانس *M. longifolia*، بالاترین غلظت به‌ترتیب برای پیپریتنون (۳۲٪)، پیپریتنون اکسید (۲۴٪/۰۱) و پولگون (۱۷/۴۴٪) بدست آمد. درصد ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس نانوکپسول پونه در مقایسه با اسانس آزاد با کاهش حدود ۱/۱۳٪ به ۹۸/۱٪ رسید. به‌رغم تغییر در فراوانی برخی از اجزای سازنده اسانس در بازه‌های زمانی ۳۰، ۹۰، ۱۵۰ و ۲۱۰ روزه، در اسانس نانوکپسوله نیز همچنان بیشترین درصد فراوانی به‌ترتیب برای پیپریتنون، پیپریتنون اکسید و پولگون به ثبت رسید. متوسط اندازه ذرات کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر (۸۰- ۶۶ نانومتر)، پتانسیل زتای ۳۷-، شاخص پراکندگی ۰/۲۵۸ و راندمان ریزپوشانی ۷۹/۶۴٪ از ویژگی‌های نانوسیلیکای ساخته‌شده به روش سل- ژل در بررسی قبل بوده است. نظر به کاربرد گسترده اسانس گونه‌های متعلق به خانواده Lamiaceae در تهیه دارو، محصولات بهداشتی و طعم‌دهنده‌های غذایی (Ansari *et al*., 2000)، استفاده از این گروه از آفت‌کش‌های زیستی، برای گونه‌های غیر هدف از جمله انسان ایمن به نظر می‌رسد. از این رو، تحقیق حاضر در ادامه بررسی قبلی و با هدف ارزیابی ۱) سمیت تنفسی و موضعی فرمولاسیون آزاد و نانوکپسول اسانس پونه و ۲) اثرات زیرکشندگی آن (LC_{25}) به روش تدخینی علیه جمعیتی از شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، به عنوان گونه مدل انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس آزاد و نانوکپسوله

پس از جمع‌آوری گیاه پونه *M. longifolia* در مرحله گل‌دهی (فصل تابستان) از نواحی اطراف شهرستان همدان (34° 48´ N, 48° 30´ E)، اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) انجام شد (Aouadi *et al*., 2020). نانوسیلیکای حاوی اسانس پونه نیز به روش سل-ژل و در حضور مقادیر بهینه‌ای از اتانول (درصد خلوص بالای ۹۹/۹ درصد)، ستیل تری متیل آمونیوم برماید (CTAB) (Cetyltrimethylammonium bromide) (درصد خلوص ۹۹ درصد)، تترا اتیل ارتو سیلیکات (TEOS) (Tetraethyl orthosilicate) (درصد خلوص بالای ۹۸ درصد)، آمونیاک (۲۵ ٪) و اسانس ساخته شد (Najafi *et al*., 2012).

جمع‌آوری حشرات و پرورش کلنی

از حشرات بالغ *A. kuehniella* جمع‌آوری‌شده از انبارهای ذخیره گندم (همدان- ایران) به عنوان جمعیت مادر برای تشکیل کلنی اصلی استفاده شد. آزمون‌های زیست-سنجی پس از گذشت حداقل ۳ نسل، روی افراد حاصل از این کلنی آزمایشگاهی انجام شد. پرورش جمعیت‌ها درون اتاقک رشد (شرایط دمایی ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۵ ± ۶۵ درصد و تاریکی مطلق) و روی بستری از مخلوط آرد گندم و آرد سمولینا صورت گرفت (Aouadi *et al*., 2020). به‌منظور حذف هر گونه آلودگی احتمالی به گونه-های دیگر آفات انباری و بقایای ترکیبات حشره‌کش، آرد گندم و سمولینا پس از تهیه، به مدت ۳۰ روز در دمای ۱۰- درجه) نگهداری شد (Oliveira *et al*. 2017).

سمیت موضعی

زیست‌سنجی با اسانس آزاد و نانوفرموله شده به صورت موضعی و در منطقه پیش‌قفس‌سینه هر یک از لاروها (سن پنجم) با استفاده از ریز تیمارگر (Microapplicator) و استون خالص (۹۹٪/۹) به عنوان حلال انجام شد. تیمار جمعیت شاهد نیز با استون خالص صورت گرفت. به هر تیمار (حداقل ۸ نوبت تکرار)، ۶ غلظت و یک جمعیت شاهد با ۲۵ عدد لارو سن پنجم (۲۴ - ۰ ساعته) در هر غلظت اختصاص یافت. براساس نتایج آزمون‌های مقدماتی و با استفاده از مدل فاصله‌ی لگاریتمی، ارزیابی سمیت موضعی در محدوده تلفات ۱۰ و ۹۰ درصد (Robertson *et al*., 2007) انجام شد. دامنه غلظت‌های مورد استفاده، از ۲/۲۸-۳/۷ µg/ L متغیر بود. در ظروف زیست سنجی، ۳۰ گرم غذا به‌منظور تغذیه در دسترس لاروها قرار گرفت. تلفات مرحله لاروی پس از گذشت ۷۲ ساعت ثبت شد (Jesser *et al*., 2020).

سمیت تنفسی

زیست‌سنجی‌ها با هدف بررسی سمیت تنفسی فرمولاسیون آزاد و نانوکپسول اسانس پونه روی مراحل تخم، لاروهای سن پنجم و حشرات بالغ (صرف نظر از جنسیت) (۲۴-۰ ساعته) و در ظروف پلاستیکی شفاف به ابعاد ۱۵/۵×۷ سانتی‌متر و به حجم ۷۷۰ میلی‌لیتر انجام شد. برای این منظور کاغذ صافی (Whatman n° 1 paper disks) (ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر) به قسمت داخلی درپوش ظروف پلاستیکی چسبانده و با غلظت‌های مناسبی از اسانس آزاد و نانوکپسوله شده آغشته شد (Titouhi *et al*., 2017). بر اساس نتایج آزمون‌های مقدماتی و با استفاده از مدل فاصله‌ی لگاریتمی، ارزیابی سمیت تنفسی و میزان کشندگی در محدوده تلفات ۱۰ و ۹۰ درصد (Robertson *et al*., 2007) صورت گرفت. دامنه غلظت‌ها در زیست‌سنجی به روش تنفسی برای اسانس آزاد و نانوفرمولاسیون آن از ۹ تا ۹۸ میکرو لیتر بر لیتر هوا متغیر بود. میزان تلفات هر یک از غلظت‌ها به صورت مستقل (از دیگر غلظت‌ها) و در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته ثبت شد. هر تیمار شامل ۶ غلظت و یک جمعیت شاهد با تعداد ۳۰ – ۲۵ عدد تخم، لارو یا حشره بالغ در هر غلظت بود. برای هر تیمار حداقل ۸ تکرار در نظر گرفته شد. در ظروف زیست‌سنجی به روش تدخینی با لارو، ۳۰ گرم غذا برای تغذیه در دسترس لاروها قرار گرفت (Shafaie *et al*., 2019). به‌منظور جلوگیری از خروج اسانس، درب ظروف مخصوص زیست‌سنجی با سلفون پوشانده شده و در ژرمیناتور با شرایط دمایی ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۵ ± ۶۵ درصد و تاریکی مطلق نگهداری شد. در پایان بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته، تلفات هر مرحله ثبت شد. تخم‌های تفریخ نشده، لاروها و حشرات

بالغی که قادر به حرکت پاها و شکم خود در اثر تحریک با نوک سوزن نبودند، مرده به شمار آمدند.

اثرات زیرکشندگی

اثرات زیرکشندگی اسانس آزاد و نانوفرمولاسیون آن در غلظت زیرکشنده (LC_{25}) به روش تدخینی و از طریق برآورد درصد بازدارندگی از تخم‌گذاری، درصد بارآوری، درصد خروج حشرات بالغ و نرخ جفت‌گیری انجام شد. برای این منظور، اسانس آزاد و نانوفرمولاسیون آن در غلظت زیرکشنده (LC_{25}) روی قطعات فوم پاشیده شد و با رژیم غذایی به نسبت ۲ گرم فوم به ازای هر ۱۰۰ گرم غذا مخلوط شد (Abd El-Aziz, 2001). در تیمار شاهد از افراد بالغ در معرض قرار نگرفته با اسانس استفاده شد. هر آزمایش، حداقل ۱۰ بار تکرار شد. یک جفت پروانه بالغ از هر دو جنس نر و ماده (۲۴ – ۰ ساعته) درون لوله‌های شیشه‌ای (۲۵۰ میلی‌لیتر) حاوی مخلوط فوم و غذای پوشیده‌شده با پارچه ظریف (ماسلین) رهاسازی شد. قیف‌های مخصوص تخم‌گذاری به صورت روزانه بازبینی شده و تعداد تخم‌های گذاشته شده با استفاده از یک برس نرم جمع‌آوری و شمارش شد. شمارش تخم‌ها، تا پایان بازه زمانی تخم‌گذاری حشرات ماده ادامه یافت. نگهداری تخم‌ها تا زمان تفریخ، در شرایط کنترل‌شده صورت گرفت. به‌منظور جلوگیری از خورده شدن تخم‌های تفریخ نشده توسط لاروهای تازه تفریخ، یک گرم آرد به هر ظرف اضافه شد. تعداد تخم‌های گذاشته شده به ازای هر حشره ماده، درصد تفریخ تخم‌های گذاشته شده و درصد خروج حشرات بالغ نسل اول برای هر یک از لوله‌های آزمایش شمارش شد. درصد بارآوری از طریق شمارش تعداد تخم‌های تفریخ‌شده و تعداد تخم‌های تفریخ‌نشده به‌دست آمد. به‌منظور تعیین نرخ جفت‌گیری، لاروهای سن آخر به صورت جداگانه درون ظروف پلاستیکی پرورش یافته و از حشرات ماده نوظهور برای در معرض‌قرارگیری با غلظت زیرکشنده در ادامه بررسی‌ها استفاده شد. کیسه جفت‌گیری (Bursa copulatrix) ماده‌های در معرض‌قرار گرفته با اسانس آزاد و نانوذرات آن در محلول نمکی (10% NaCl) از نظر وجود یا عدم وجود اسپرماتوفور تشریح شدند. حضور اسپرماتوفور به جفت‌گیری موفق حشرات ماده نسبت داده شد (Aouadi *et al*., 2020).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه پروبیت داده‌های حاصل از زیست‌سنجی با استفاده از نرم‌افزار POLO-Plus انجام شد. فواصل اطمینان در سطح احتمال ۹۵٪ برای غلظت و دز کشنده ۵۰ درصد محاسبه شد. عدم هم‌پوشانی محدوده‌های اطمینان ۹۵٪، به مفهوم تایید اختلاف معنی‌دار مقادیر غلظت یا دز کشنده ۵۰ درصد (D_{50} / LC_{50}) برآورد شده در نظر گرفته شد. در صورت بالا بودن میزان تلفات در تیمار شاهد (بیش از ۱۰ درصد) تکرار مربوطه حذف و در صورت وجود تلفات کمتر از ۱۰ درصد در تیمار شاهد، میزان مرگ‌ومیر مشاهده‌شده به کمک فرمول ابوت تصحیح شد (Abbott, 1925).

نتایج

سمیت موضعی

مقدار دز کشنده ۵۰ درصد اسانس آزاد پونه و نانوذرات آن به روش موضعی علیه مرحله پنجم لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به‌ترتیب ۴/۳۹ و ۲/۷ میکروگرم بر لارو برآورد شد (جدول ۱)، به عبارتی ساخت نانو سیلیکای حاوی اسانس پونه به روش سل- ژل، افزایش ۱/۶۲ برابری سمیت و قدرت کشندگی اسانس را در پی داشته است.

جدول۱- سمیت موضعی فرمولاسیون آزاد و نانوکپسول اسانس پونه روی لاروهای سن پنجم *Anagasta kuehniella* پس از ۷۲ ساعت در معرض قرارگیری.

Table 1. Topical toxicity of *Mentha longifolia* free (M. EO) and nanoencapsulated essential oil (M. NP) against fifth instar larvae of *Anagasta kuehniella* (mortality data obtained after 72 h exposure).

Treatment	Period (h)	n [a]	df [b]	Slop (SE)	χ^{2c}	LD_{50} (95% CL[d]) (µg/L)
M. EO	72	300	5	1.46 (0.09)	1.47	4.39 (3.84-4.94)
M. NP	72	300	5	1.32 (0.16)	4.73	2.7 (1.23-4.02)

[a] The number of larvae used in each bioassay
[b] Degree of freedom
[c] χ^2 represents Chi-square goodness-of-fit test
[d] CL, confidence interval limit

سمیت تنفسی

مقادیر غلظت کشنده ۵۰٪ حاصل از تیمار مراحل لاروی، بالغ و تخم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *A. kuehniella* با اسانس آزاد پونه *M. longifolia* و نانوذرات آن به روش تدخینی در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در جدول ۲ آمده است. در بازه زمانی ۲۴ ساعته و به‌رغم عدم وجود تفاوت معنی‌دار، اسانس آزاد پونه در مقایسه با نانوذرات اسانس از سمیت تنفسی بیشتری برای هر یک از سه مرحله لاروی، بالغ و تخم برخوردار بود. این وضعیت برای بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعته معکوس بود. کشندگی برآورد شده برای نانوذرات اسانس پونه برای هر یک از سه مرحله مورد بررسی در مقایسه با اسانس آزاد بیشتر بود، البته تفاوت در تلفات مشاهده‌شده در تیمار با اسانس آزاد پونه و نانوذرات آن در مرحله لاروی برای دوره‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعته و در مرحله تخم تنها در دوره زمانی ۷۲ ساعته معنی‌دار بود. تفاوت در تلفات شب‌پره-های بالغ تیمار شده با اسانس آزاد پونه و نانوذرات آن در هیچ یک از فواصل زمانی مورد بررسی معنی‌دار نبود. در فاصله زمانی ۲۴ ساعته، بیشترین سمیت تنفسی به تفکیک مراحل رشدی، به‌ترتیب برای بالغ، لارو و تخم در تیمار با اسانس آزاد و نانوذرات آن و کمترین مرگ‌ومیر نیز برای مرحله تخم در تیمار با هر دو شکل اسانس به ثبت رسید. در بازه زمانی ۴۸ ساعته، مرحله بالغ در تیمار با نانوذرات اسانس و تخم در تیمار با اسانس آزاد به‌ترتیب بیشترین و کمترین تلفات را متحمل شدند. در پایان ۷۲ ساعت، نیز بیشترین و کمترین سمیت تنفسی به‌ترتیب برای جمعیت‌های لاروی در تیمار با نانوذره و تخم در تیمار با اسانس آزاد مشاهده شد.

اثرات زیرکشندگی

کاهش معنی‌دار نرخ جفت‌گیری (F= ۲۵/۶۱;P< ۰/۰۵)، تعداد تخم‌های گذاشته شده به ازای هر حشره ماده (F = ۱۸/۹۳; P <۰/۰۵)، درصد ظهور حشرات بالغ (F = ۲۱/۷۶;P <۰/۰۵)، بارآوری (F = ۶/۰۲; P < ۰/۰۵) و در نتیجه، ظهور بسیار اندک نتاج در نسل بعد (F1) از پیامدهای تیمار حشرات بالغ با اسانس آزاد پونه و نانوذرات آن بود (جدول ۳). تفاوت جمعیت شاهد با جمعیت‌های تیمار شده با اسانس، از نظر تمام متغیرهای مورد بررسی و در تمام بازهای زمانی، معنی‌دار گزارش شد. بیشترین و کمترین تعداد تخم گذاشته شده در مقایسه با تیمار شاهد برای نانوذرات اسانس و به‌ترتیب با زمان در معرض‌قرارگیری ۲۴ و ۷۲ ساعته به ثبت رسید. متوسط تعداد تخم گذاشته شده به ازای هر حشره ماده در جمعیت شاهد با گذشت زمان افزایش یافت، البته این افزایش تنها در بازه زمانی ۷۲ ساعت در مقایسه با بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعته برای تیمار شاهد معنی‌دار بود. بسته به مدت زمان در معرض قرارگیری و نوع تیمار، میزان تغییر در هر یک از پراسنجه‌ها متفاوت بود. در معرض‌قرارگیری با تیمار آزاد به مدت ۲۴ ساعت و نانوذرات اسانس به مدت ۷۲ ساعت به ترتیب بیشترین و کمترین درصد بارآوری را به دنبال داشت. در هر دو تیمار مورد بررسی (اسانس آزاد و نانوکپسوله) کاهش درصد خروج حشرات بالغ (F1) مشاهده شد. این کاهش برای تیمار با اسانس آزاد در بازه زمانی ۲۴ ساعته و نانوفرمولاسیون آن در دوره زمانی ۷۲ ساعته با مقادیر عددی ۸۱/۹ و ۸۸/۷ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان بوده است. بیشترین و کمترین نرخ جفت‌گیری نیز برای نانوذرات اسانس و به‌ترتیب پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت درمعرض قرارگیری به ثبت رسید.

جدول۲- سمیت تنفسی فرمولاسیون آزاد و نانوکپسول اسانس پونه روی مراحل تخم، لاروهای سن پنجم و حشرات بالغ *Anagasta kuehniella* پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض‌قرارگیری.

Table 2. Fumigant toxicity of *Mentha longifolia* free (M. EO) and nanoencapsulated essential oil (M. NP) against eggs, fifth instar larvae and adults of *Anagasta kuehniella* after 24, 48, and 72 h of exposure.

Stage	Treatment	Period (h)	n [a]	df [b]	Slop (SE)	χ^{2c}	LC_{50} (95% CL[d]) (mL/L air)
5th Instar Larvae	M. EO	24	350	5	3.7 (0.24)	12.43	18.87 (15.39-21.46)
		48	350	5	3.08 (0.2)	5.53	25.42 (23.83-26.89)
		72	350	5	2.39 (0.19)	3.58	27.49 (25.47-29.38)
	M. NP	24	350	5	3.38 (0.21)	10.19	24.50 (20.86-27.52)
		48	350	5	2.02 (0.19)	0.79	20.94 (18.32-23.16)
		72	350	5	2.88 (0.18)	10.31	12.12 (10.02-13.89)
Egg	M. EO	24	350	5	3.69 (0.23)	10.05	21.01 (18.16-23.36)
		48	350	5	3.71 (0.52)	3.86	27.41 (19.34-33.58)
		72	350	5	3.20 (0.21)	17.78	31.57 (23.45-37.47)
	M. NP	24	350	5	2.77 (0.18)	7.06	24.66 (21.69- 29.45)
		48	350	5	3.70 (0.24)	27.36	19.47 (13.74-23.20)
		72	350	5	3.74 (0.21)	1.86	16.91 (16.21-17.65)
Adult	M. EO	24	350	5	4.35 (0.31)	10.76	15.93 (12.72-18.19)
		48	350	5	3.59 (0.25)	18.72	17.11 (12.02-20.39)
		72	350	5	3.48 (0.24)	33.16	18.78 (11.42-23.08)
	M. NP	24	350	5	3.58 (0.24)	7.53	17.50 (14.67-19.67)
		48	350	5	3.52 (0.25)	19.74	16.86 (11.39-20.29)
		72	350	5	2.94 (0.19)	6.31	14.07 (13.04-15.03)

[a] The number of larvae used in each bioassay
[b] Degree of freedom
[c] χ^2 represents Chi-square goodness-of-fit test
[d] CL, confidence interval limit

جدول ۳- تخم‌گذاری، بارآوری، نرخ جفت‌گیری و خروج حشرات بالغ *Anagasta kuehniella* پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض قرارگیری با غلظت زیر کشنده فرمولاسیون آزاد و نانوکپسول اسانس پونه.

Table 3. Lifetime fecundity, %fertility, copulation rate and %adult emergence of adults *Anagasta kuehniella* exposed to LC_{25} of *Mentha longifolia* free and nanoencapsulated essential oil for 24, 48, and 72 h.

Treatment	Period (h)	LC_{25} (95% CL[d]) (mL/L air)	Lifetime Fecundity (eggs/female)	%Fertility	Copulation rate	%Adult emergence
M.longifoliae EO	24	11.15 (7.64-13.67)	69± 8.51^{c}	27.30± 4.50^{c}	8.91 ± 3.70^{d}	18.10± 4.81^{c}
	48	11.11 (5.82-14.67)	64± 6.11^{c}	22.60± 5.71^{c}	7.60 ± 5.81^{d}	17.60± 6.20^{c}
	72	12.03 (4.42-16.55)	63± 8.33^{c}	19.10± 8.61^{d}	6.48 ± 9.62^{d}	16.40 ± 9.31^{c}
M.longifoliae NP	24	11.33 (8.26-13.72)	72± 9.72^{c}	25.70± 9.30^{c}	12.60 ± 9.71^{c}	17.10± 7.94^{c}
	48	10.84 (5.28-14.55)	57± 10.24^{d}	21.40± 6.72^{c}	6.30 ± 10.43^{d}	13.20± 7.93^{d}
	72	8.29 (7.23-9.26)	42± 9.51^{e}	17.60 ± 7.90^{d}	3.60 ± 9.17^{e}	11.30± 7.71^{d}
Control	24-	-	169± 3.55^{b}	83.20 ± 6.42^{b}	79.80 ± 3.15^{b}	78.70 ± 2.73^{b}
	48	-	176± 5.45^{b}	91.40 ± 3.51^{a}	86.70 ± 3.50^{b}	92.40 ± 4.10^{a}
	72	-	197± 2.83^{a}	98.90 ± 1.52^{a}	99.30 ± 2.40^{a}	99.70± 1.80^{a}

The results represent the mean ± standard error from at least ten separate experiments. Means in each column/ treatment followed by the same superscript are not significantly different at P = 0.05 in LSD multiple range test

بحث

سمیت موضعی

کوتیکول حشرات توسط یک لایه از سلول‌های اپیدرمی ترشح شده که تمام سطح بدن، سیستم تراشه‌ای، قسمت‌های جلویی و عقبی دستگاه گوارش و قسمت‌هایی از دستگاه تناسلی را می‌پوشاند (Vincent and Wegst, 2004). اجزای اسانس از طریق کوتیکول حشرات و به شیوه‌ای همانند حشره‌کش‌های مرسوم به درون بدن نفوذ می‌کنند، البته به دلیل چربی‌دوستی بالا، ورود آنها به درون همولنف ممکن است کند و محدود باشد (Veal 1996). نفوذ و پخش اسانس‌های گیاهی در کوتیکول حشرات با ترکیبی از مواد غیرقطبی و موادی با قطبیت بسیار پایین به صورت افقی،

عمودی و یا افقی- عمودی صورت می‌گیرد. در نفوذ افقی، اسانس از طریق سیستم تراشه‌ای به بافت‌های مختلف بدن و در نهایت، به جایگاه (های) هدف رسیده و اثرات بیولوژیکی خود در گونه‌های هدف را آشکار می‌سازد. در نفوذ عمودی نیز اسانس پیش از رسیدن به قسمت‌های درونی بدن و محل تاثیر اختصاصی، عبور از عرض کوتیکول و اپیدرم را پیش رو دارد (Sfara *et al*., 2009; Tarelli *et al*., 2009). ساخت نانو سیلیکای حاوی اسانس پونه به روش سل- ژل، افزایش ۱/۶۲ برابری سمیت موضعی و کشندگی نانوذرات اسانس پونه را در مقایسه با شکل آزاد اسانس علیه *A. kuehniella* به دنبال داشت. دسترسی زیستی بالای نانوذرات، الگوی نفوذ و سازوکار سم‌زدایی متفاوت اسانس و نانوذرات آن می‌تواند از دلایل احتمالی چنین افزایشی در بررسی حاضر باشد (Nel *et al*., 2006; 2009). بالا بودن نسبت سطح به حجم در نانوذرات، چسبندگی بیشتر و موثرتر آنها به بدن حشرات و افزایش زمان در معرض قرارگیری با این مولکول‌های فعال زیستی را به دنبال دارد. نرخ نفوذ در کوتیکول گونه‌های هدف به عنوان یک ویژگی کلیدی برای تمام ترکیبات حشره‌کش، در نانوذرات اسانس در مقایسه با اسانس آزاد به مراتب بزرگتر است. نفوذ سریع‌تر از طریق تماس مستقیم با کوتیکول حشرات و یا از طریق تماس با دیواره گوارش پس از بلعیده شدن از دلایل اصلی افزایش سمیت و عملکرد زیستی نانوذرات اسانس شناخته می‌شود (Margulis-Goshen and Magdassi, 2012). بر اساس یک مطالعه (Hashem *et al*., 2018) اثرات تخریبی نانوذرات اسانس بر کوتیکول حشرات، زمینه‌ساز آسیب بافتی در گونه‌های هدف شناخته شده است. این آسیب بافتی می‌تواند افزایش کشندگی و سمیت نانوفرمولاسیون اسانس‌های گیاهی را به دنبال داشته باشند. به‌منظور درک چگونگی افزایش فعالیت زیستی و اثرگذاری بالای نانوفرمولاسیون اسانس‌های گیاهی در مقایسه با اشکال آزاد اسانس، علاوه بر الگوی نفوذ و نحوه دسترسی زیستی نانوذرات به جایگاه (های) هدف، توجه به سازوکار سم‌زدایی متفاوت نانوذرات در مقایسه با ذرات مشابه غیرنانویی آنها، بسیار روشن‌گر خواهد بود. اسانس‌های گیاهی دارای نقش دفاعی در گیاهان بوده و در زمان حمله گیاهخواران توسط گیاه ترشح می‌شوند. حشرات نیز در مقابل از طریق متابولیسم و با استفاده از سامانه‌های سم‌زدا همانند سامانه آنزیمی اکسیداز پی-۴۵۰، سعی در شکستن این سد دفاعی و خنثی‌سازی آن دارند. تولید ترکیبات آبدوست‌تر با امکان دفع بیشتر از طریق مسیرهای متعدد بیوشیمیایی درون سلولی برای سم‌زدایی اجزای ترپنی اسانس‌های گیاهی به اثبات رسیده است (Rossi *et al*., 2012; Rossi and Palacios, 2013). ترپن‌ها به عنوان مهم‌ترین جزء ساختاری شکل آزاد اسانس‌های گیاهی شناخته می‌شوند. نرخ سم‌زدایی نانوذرات اسانس‌های گیاهی در مقایسه با نرخ سم‌زدایی ترپن‌ها، به دلیل حضور خارج سلولی نانوذرات و عدم دسترسی سامانه‌های سم‌زدا به آنها به مراتب کمتر است. بنابراین، با رسیدن مولکول‌های فعال زیستی بیشتری به جایگاه (های) هدف در بدن جمعیت‌های آفت، اثرات بیولوژیکی و سمی نانوذرات اسانس نیز به همین نسبت افزایش می‌یابد (Regnault-Roger, 2013; Isman, 2020). همسو با نتایج پژوهش حاضر، در بررسی خصوصیات فیزیکی- شیمیایی و فعالیت زیستی نانوذرات تولیدی اسانس ژرانیوم به روش فراصوت و با استفاده از ماده امولسیون‌کننده توئین ۸۰ (Jesser *et al*., 2020)، افزایش ۱/۶۷ و ۲/۱۷ برابری فعالیت زیستی اسانس به‌ترتیب علیه لارو گونه‌های *Culex pipiens pipiens Say* و *Plodia interpunctella* (Hübner) در زیست‌سنجی به روش موضعی تایید شد. در این پژوهش، تغییر احتمالی کشندگی و فعالیت زیستی بتا- سیپرمترین (β-cypermethrin) در استفاده ترکیبی با اسانس آزاد ژرانیوم و نانوذرات آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. استفاده ترکیبی اسانس آزاد و نانوامولسیون آن با حشره‌کش بتا- سیپرمترین در زیست‌سنجی به روش موضعی روی لاروهای سن چهارم شب‌پره هندی، افزایش فعالیت حشره‌کشی بتا- سیپرمترین را به دنبال داشت. بیشترین افزایش در استفاده ترکیبی بتا- سیپرمترین با نانوامولسیون اسانس مشاهده شد (LD_{50}=۰/۰۷ µg/ L) در مقابل (LD_{50}=۰/۸۹ µg/ L). افزایش سمیت ترکیبات حشره‌کش در ترکیب با اسانس‌های گیاهی در برخی دیگر از بررسی‌ها نیز به ثبت رسیده است. سازوکارهای مختلفی

همچون تأثیر متفاوت عصبی، افزایش نفوذ ترکیبات حشره-کش و مهار آنزیم‌های سم‌زدا از دلایل چنین هم‌افزایی به شمار می‌روند (Joffe *et al*., 2012; Gross *et al*., 2017)، افزایش عملکرد زیستی ترکیبات پایرتروئیدی در استفاده ترکیبی با اسانس ژرانیوم به روش موضعی، در نتیجه مداخله اسانس ژرانیوم در مراحل سم‌زدایی این گروه از حشره‌کش‌ها تایید شده است (Norris *et al*., 2019). در پژوهشی دیگر (Werdin Gonzalez *et al*., 2014) در خصوص اثرات کشندگی و زیرکشندگی نانوذرات اسانس ژرانیوم و برگاموت بر پایه پلی‌اتیلن گلایکول، علیه دو گونه آفت انباری *Tribolium Castaneum* (Herbst) و *Rhizopertha dominica* (Fabricius)، رهایش تدریجی و پایدار ترپن‌های سازنده اسانس، تغییر در فیزیولوژی تغذیه-ای، سمیت پس‌گوارشی و افزایش قابل ملاحظه سمیت تماسی باقی‌مانده نانوذرات از طریق جلد کوتیکولی و لوله گوارش تایید شد (Werdin Gonzalez *et al*., 2014). ترپن‌های شناسایی‌شده در ترکیب اسانس آزاد ژرانیوم و برگاموت ماهیت غیرقطبی دارند، از این‌رو وجود لایه مومی خارجی به رغم تسهیل انتشار افقی، برای انتشار عمودی ترپن‌ها در عرض اندوکوتیکوتیکول سخت و آبدوست نوعی مانع به شمار آید. حال آنکه، نفوذ نانوذرات اسانس به علت وجود ماتریسی از پلی‌اتیلن گلایکول، به هر دو صورت افقی و عمودی امکان‌پذیر است. نتیجه این شرایط افزایش سمیت نانوذرات اسانس هر دو گونه گیاهی بوده است. پلی‌اتیلن گلایکول، به عنوان پلی‌مری دوگانه دوست با الگویی خاص از حلالیت شناخته می‌شود که در آب و برخی از حلال‌های آلی غیر قطبی حل می‌شود. در تحقیقی مشابه (Werdin Gonzalez *et al*., 2015) با هدف ارزیابی رهایش تدریجی و پایدار ترپن‌های فعال در نانوفرمولاسیون اسانس ژرانیوم و برگاموت، افزایش قابل توجه سمیت تماسی باقی-مانده علیه پوره‌های سن اول و بالغین *Blatella germanica* Linnaeus گزارش شد. در بررسی مقایسه‌ای سمیت تنفسی و تماسی اسانس پونه *M. longifolia*، نرخ مرگ و میر حشرات بالغ *Tribolium castaneum* در زیست‌سنجی به روش تنفسی شدیدتر ارزیابی شد (Shahmirzaei *et al*., 2016). رهایش تدریجی مواد موثره اسانس در طول زمان سمیت تماسی بیشتر فرمولاسیون نانوی اسانس‌های گیاهی را به دنبال دارد (Sabbour and Abd-El-Aziz, 2019). سمیت تماسی قوی‌تر نانوامولسیون اسانس *M. longifolia* در مقایسه با اسانس آزاد (ppm LC_{50}=۲۱۳۵۲ در مقابل ppm۱۴۰۶۸ =LC_{50}) روی لارو-های سن پنجم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد یکی از همین موارد است (Louni *et al*., 2018).

سمیت تنفسی

بررسی امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی به عنوان روش جایگزین آفت‌کش‌های مرسوم در مبارزه با آفات انباری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. فراریت بالای منوترپنوئیدها به عنوان جزء اصلی سازنده اسانس‌های گیاهی، سمیت تدخینی و کارایی این گروه از ترکیبات علیه جمعیت-های آفت را به دنبال دارد (Sabbour and Abd-El-Aziz, 2016; 2019). محدودیت اصلی در استفاده از اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات آفت‌کش، ناپایداری آنهاست. به گونه‌ای که به‌منظور کنترل موثر جمعیت‌های آفت دو یا چندین نوبت کاربرد اسانس ضروری به نظر می-رسد (Isman, 2020). در حقیقت، هدف از نانوفرمولاسیون آفت‌کش‌ها، رهایش تدریجی مقادیر ضروری و کافی آفت-کش در طی زمان، به‌منظور حداکثر کارایی بیولوژیکی است. ممانعت از تبخیر و تجزیه سریع، افزایش دوام، استفاده از دزها یا غلظت‌های کمتر و دفعات کاربرد محدودتر از مزایای استفاده از فرمولاسیون نانوی اسانس‌های گیاهی عنوان شده است (Menossi *et al*., 2021). رهایش مواد فعال از نانوذرات به روش‌های متنوعی انجام می‌شود. خروج مستقیم ماده موثره پیوند شده به سطح نانوذره، انتشار از طریق پوشش دیواره پلیمر، سایش ماتریس نانوذره و فرایند ترکیبی سایش – انتشار از جمله این روش‌ها می‌باشد (Kumari *et al*., 2010). سازوکار رهایش اسانس از نانوذرات، توانایی تعلیق نانوذرات پس از رقیق‌سازی، اندازه، شاخص پراکندگی و تعامل متقابل نانوذرات با سامانه‌های بیولوژیکی، از جمله متغیرهایی هستند که می‌توانند شاخص‌های رفتاری نانوسامانه‌ها در محیط‌های واکنش و در نتیجه، نمایه سمیت

باقی‌مانده آنها را تحت تأثیر قرار دهند (Vishwakarma *et al.*, 2016). مواد در ابعاد نانوذره دارای ویژگی‌های خاصی هستند که یکی از مهم‌ترین این ویژگی‌ها سمیت بیشتر است. افزایش کارایی نانوفرمولاسیون یک حشره‌کش از جمله حشره‌کش‌های گیاهی به مجموعه‌ای از سازوکارها بستگی دارد. تغییر در فرایند تاکسیکوکینتیکی ماده فعال (تغییر در الگوی نفوذ، میزان دسترسی زیستی ترکیب و سازوکارهای سم‌زدایی)، شیوه رهایش ماده فعال (تدریجی یا کنترل‌شده) و جلوگیری از تجزیه یا تبخیر زود هنگام مواد موثره از مهم‌ترین این سازوکارها به شمار می‌آیند (Werdin Gonzalez *et al.*, 2015; 2016). سمیت و اثرات زیستی اسانس‌های گیاهی به عوامل مختلفی همچون ترکیب شیمیایی اسانس، زمان در معرض قرارگیری، اثرات متقابل اجزای فعال اسانس با عوامل محیطی، توانایی نفوذ کوتیکولی و سازوکار اختصاصی تأثیر اسانس‌ها بستگی دارد (Rattan, 2010; Werdin Gonzalez *et al.*, 2017; Aouadi *et al.*, 2020). به‌رغم ناآگاهی از روش دقیق تاثیر اسانس‌های گیاهی، نفوذ اجزاء فرار از سیستم تراشه‌ای، می‌تواند علت سمیت اسانس‌ها باشد (Veal 1996). در تحقیق پیش‌رو، سمیت تدخینی اسانس آزاد پونه *M. longifolia* و نانوذرات آن روی جمعیتی از *A. kuehniella* مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر پژوهش حاضر، همسویی غلظت اسانس مصرفی با شدت سمیت تنفسی و تلفات جمعیت‌ها در پژوهش‌های قبلی نیز گزارش شده است (Aouadi *et al.*, 2020; Zallaghi and Ahmadi, 2020). کوچکتر بودن مقدار غلظت کشنده به‌دست آمده برای نانوذرات اسانس در مقایسه با غلظت کشنده برآوردی برای اسانس آزاد، در بررسی‌های پیشین نیز به اثبات رسیده است (Werdin Gonzales *et al.*, 2014; 2015; 2016)، البته از نظر عددی، افزایش کارایی نانوذرات در بررسی حاضر در مقایسه با پژوهش‌های قبلی کمتر بوده است. به عنوان مثال، در بررسی انجام شده توسط وردین گونزالس و همکاران (Werdin Gonzalez *et al.*, 2015)، نسبت غلظت کشنده ۵۰ درصد اسانس آزاد به غلظت کشنده ۵۰ درصد نانوذرات اسانس پس از ۷۲ ساعت در معرض قرارگیری برای اسانس‌های ژرانیوم *Geranium maculatum* L. و برگاموت *Citrus bergamia* Risso به‌ترتیب ۱۰/۵۷ و ۱۶/۱۱ بوده است. در بررسی حاضر این نسبت برای اسانس پونه، پس از ۷۲ ساعت در معرض قرارگیری و به تفکیک مراحل رشدی تخم، لارو و بالغ به‌ترتیب ۱/۸۷، ۲/۲۷ و ۱/۳۳ برآورد شد. اسانس‌ها ترکیب پیچیده‌ای از اجزائی هستند که این اجزاء می‌توانند نسبت به هم دارای طیفی از اثرات سینرژیستی، تجمعی و آنتاگونیستی باشند. از طرف دیگر، اسانس‌ها می‌توانند بیش از یک جایگاه هدف را در گونه‌های آفت مورد حمله قرار دهند. با در نظر گرفتن تعدد جایگاه‌های هدف و تنوع در ماهیت شیمیایی و ساختاری اسانس‌های گیاهی می‌توان تفاوت در مقدار عددی نسبت فوق را درک نمود (Isman 2015; Tak and Isman, 2015; Tak *et al.*, 2016). به عقیده پاولا (Pavela, 2015) اسانس‌های گیاهی در صورتی به عنوان عوامل لاروکش بالقوه در نظر گرفته می‌شوند که بتوانند در تست‌های لاروکشی استاندارد، تلفات کافی در جمعیت‌های آفت را موجب شوند (LC_{50} کمتر- مساوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام). در بررسی حاضر چنین شرطی در زیست‌سنجی لاروها با اسانس آزاد پونه و نانوذرات آن تایید شد. بر این اساس سمیت وابسته به زمان بوده و در تیمار با اسانس آزاد و نانوذرات حاوی اسانس، در طی زمان آزمایش به‌ترتیب روند کاهشی و افزایشی داشته است. این ارتباط وابسته به زمان سمیت اسانس‌های گیاهی پیش از این نیز گزارش شده است. در بررسی سمیت تنفسی‌نانوذرات اسانس ژرانیوم و برگاموت بر پایه پلی‌اتیلن گلایکول، علیه دو گونه آفت انباری *Tribolium Castaneum* (Herbst) و *Rhizopertha dominica* (Fabricius) (Werdin Gonzales *et al.*, 2014)، نتیجه ۲۴ ساعت در معرض‌قرارگیری با اسانس هر دو گونه گیاهی، تلفات ۱۰۰ درصدی بوده است، حال آنکه ۱۲۰ ساعت در معرض‌قرارگیری جمعیت‌ها با نانوذرات اسانس، هیچ گونه تلفاتی را در پی نداشت. دلیل احتمالی این عدم کارایی، کاهش فراریت ترپن‌ها در فرمولاسیون نانوی اسانس‌های گیاهی و جذب اندک نانوذرات اسانس توسط سیستم تنفسی عنوان شد. بررسی اثرات لاروکشی و تماسی نانوذرات پلیمری اسانس گونه‌های گیاهی ژرانیوم و

برگاموت علیه پشه‌های *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) (Werdin Gonzales *et al*., 2017) نیز نتایج مشابهی به همراه داشت. یافته‌های تحقیق حاضر، رهایش تدریجی و سمیت تنفسی بیشتر نانوذرات سیلیکای اسانس در بازه زمانی ۷۲ ساعت را تایید نمود. رهایش تدریجی و پایدار مواد موثره در فرمولاسیون نانوی اسانس‌های گیاهی پیشتر نیز گزارش شده است (Yang *et al*., 2009). در تحقیقی مشابه (Lai *et al*., 2006) رهایش کنترل‌شده و کاهش تبخیر مواد موثره نانوذرات جامد چربی اسانس *Artemisia arborrescens* (Vaill.) (۲۰۰-۲۹۴ نانومتر) گزارش شد. سمیت اسانس تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی علیه مراحل تخم، لارو و بالغ شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به اثبات رسیده است. در همین ارتباط می‌توان به نتایج یک بررسی (Ulukanli *et al*., 2014) در خصوص کارایی تخم‌کشی اسانس‌های استخراج شده از پوسته گونه‌های *Pinus pinea* L. و *P. brutia* Ten. علیه مرحله تخم شب-پره مدیترانه‌ای آرد اشاره نمود. اسانس هر دو گونه *P. pinea* و *P. brutia* به‌ترتیب با غلظت کشنده ۵۰ درصد معادل ۳۴۳/۵۷ و ۲۹۹/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا، از کارایی تخم‌کشی مناسبی برخوردار بوده‌اند. تلفات ۱۰۰ درصدی تخم‌های *A. kuehniella* در تیمار با اسانس زیره و رازیانه نیز تایید شده است (Tunc *et al*., 2000). در تحقیقی مشابه (KarabOrkulu *et al*., 2011) با هدف غربالگری سمیت تنفسی اسانس ۸ گونه گیاهی بومی ترکیه علیه شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، سمیت تنفسی اسانس *Myrtus communis* L. متوسط (LC_{50} معادل ۱۵/۱۵ ماکرولیتر بر لیتر هوا) ارزیابی شد. در دو بررسی جداگانه به روش تدخینی، غلظت کشنده ۵۰ درصد اسانس *Zataria multiflora Boiss* علیه مراحل بالغ و لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به‌ترتیب ۰/۹۸ و ۲۰/۶۷ میکرولیتر بر لیتر هوا (Emamjomeh *et al*. 2014) و غلظت کشنده ۵۰ درصد اسانس *Mentha spicata* L.، ۰/۵ میکرولیتر بر لیتر (Eliopoulos *et al*., 2015) برای حشرات بالغ برآورد شد. غلظت ۰/۵ میکرولیتر بر لیتر اسانس *M. spicata* نیز تلفات ۶۰-۵۰ درصدی مرحله تخم شب‌پره را در پی داشته است. در پژوهشی دیگر (Maedeh *et al*., 2011) تلفات ۱۰۰ درصدی مرحله لاروی *A. kuhniella* پس از ۱۲ ساعت در معرض قرارگیری با غلظت ۲۲۸/۵ میکرولیتر بر لیتر هوای اسانس *Satureja hortensis* L. به ثبت رسید. یافته‌های یک بررسی (Kheirkhah *et al*., 2015)، ضمن برآورد LC_{50} مراحل بالغ و لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در گازدهی با اسانس *Ziziphora clinopodioides* Lam. (به‌ترتیب معادل ۱/۳۹ و ۴۲/۱۷ میکرولیتر بر لیتر هوا)، حساسیت تنفسی بیشتر مرحله بالغ در مقایسه با مرحله لاروی را نیز تایید نمود. حساسیت متفاوت مراحل مختلف رشدی *A. kuehniella* به اسانس‌های گیاهی در برخی دیگر از بررسی‌ها نیز گزارش شده است. در همین راستا، سمیت بیشتر اسانس *Prangos ferulacea* Lindl برای مرحله بالغ (LC_{50} معادل ۱ میکرولیتر بر لیتر هوا) در مقایسه با مرحله تخم (LC_{50} معادل ۳۲۰/۳۷ میکرولیتر بر لیتر هوا) به ثبت رسیده است (Ecran *et al*., 2013). تاثیر موقعیت جغرافیایی بر اثرات بیولوژیکی و کشندگی اسانس گونه‌های گیاهی تایید شده است. در بررسی حساسیت تنفسی مرحله بالغ *A. kuehniella* به اسانس گیاه *Laurus nobilis* L. جمع-آوری شده از مناطقی در کشورهای الجزایر و تونس، کشندگی بیشتر حشرات بالغ در گازدهی با اسانس گونه گیاهی بومی الجزایر گزارش شد (غلظت کشنده ۵۰ درصد ۲۰/۷۷ در مقایسه با LC_{50} معادل ۳۳/۷۵ میکرولیتر بر لیتر هوا) (Mediouni Ben Jemma *et al*., 2013). علاوه بر کارایی تنفسی اسانس *Mentha pulegium* L. علیه حشرات بالغ شب‌پره مدیترانه‌ای آرد (LC_{50} معادل ۰/۳ میکرولیتر بر لیتر هوا) (Ben Chaaban *et al*., 2019)، اثرات بیولوژیکی اسانس گیاهان پاپریکا، ریحان، نعنا و رزماری علیه مراحل تخم، لارو و بالغ آفت نیز بررسی شده است (Pandir and Bas, 2016). در پژوهشی دیگر (Louni *et al*., 2018) عملکرد موثرتر نانوامولسیون اسانس *M. longifolia* در مقایسه با اسانس آزاد علیه *A. kuhniella* به تایید رسید. یافته‌های یک تحقیق در خصوص سمیت تماسی و تدخینی اسانس *M. longifolia* علیه حشرات بالغ *T.castaneum* (Shahmirzaei *et al*.

2016)، سمیت تنفسی کمتر شکل آزاد اسانس در مقایسه با فرمولاسیون نانوی آن را تایید نمود. در زیست‌سنجی به روش تماسی نیز کشندگی بیشتر حشرات بالغ *T. castaneum* در تیمار با نانوذرات اسانس *M. longifolia* به رهایش تدریجی و پیوسته مواد موثره در طول زمان نسبت داده شد. شیب رابطه پروبیت لگاریتم- غلظت برای هر یک از آنالیزهای پروبیت (جدول ۱) بزرگتر از ۲ و فاقد تفاوت معنی‌داری آماری بوده است. شیب‌های بالا (بیشتر از ۲) و پایین (کمتر از ۲) به‌ترتیب به عنوان معیاری از یکدستی و ناهمگنی جمعیت‌های مورد بررسی محسوب می‌شود (Simon, 2015). در بررسی حاضر، شیب‌های به‌دست آمده بزرگتر از ۲ و فاقد تفاوت معنی‌داری آماری بوده است.

اثرات زیرکشندگی

در بسیاری از موارد، ارزیابی سمیت نانوحشره‌کش‌ها روی گونه‌های آفت منحصر به سمیت حاد تنفسی، تماسی و گوارشی بوده است (Shafaie *et al*., 2019; Ikawata *et al*., 2020; Jesser *et al*., 2020). حال آنکه به‌منظور ارزیابی دقیق اثرات نانوحشره‌کش‌ها بر جمعیت‌های هدف، ارزیابی اثرات زیرکشندگی آنها بر فیزیولوژی و رفتار بندپایان در کنار بررسی سمیت حاد و تلفات ناشی از آن ضروری است. به اثرات آفت‌کش بر افراد زنده مانده از در معرض قرارگیری با ترکیبات آفت‌کش، اثرات زیرکشندگی گفته می‌شود. اثرات زیرکشندگی منفی آفت‌کش‌ها بر بسیاری از توانایی‌های فیزیولوژیکی و رفتاری موجودات زنده نظیر تولیدمثل، طول عمر، فعالیت تغذیه‌ای، شاخص‌های غذایی و جهت‌یابی (اعم از جلب کنندگی و دورکنندگی) به اثبات رسیده است (Biondi *et al*., 2013; Planes *et al*., 2013; Werdin Gonzalez *et al*., 2013). استفاده از اسانس‌های گیاهی در مقابله با حشرات آفت به‌ویژه به عنوان دورکننده به زمان‌های خیلی دور برمی‌گردد و مصری-ها در استفاده از این شیوه مبارزه دارای قدمتی طولانی هستند. می‌توان از طیف گسترده‌ای از گیاهان به عنوان دورکننده و ضد تغذیه علیه گونه‌های آفت استفاده کرد (Gokce *et al*., 2010; Peixoto *et al*., 2015; Werdin Gonzalez *et al*., 2016). رفتار حشرات تابعی از محرک‌های بویایی است، از این رو استفاده از نانوفرمولاسیون‌ها به دلیل اثرات دورکنندگی طولانی مدت در حذف پناهگاه‌های گونه‌های آفت و دور نگاه داشتن آنها از منابع غذایی می‌تواند بسیار موثر باشد. افزودن نانوفرمولاسیون‌ها به مواد مورد استفاده در بسته‌بندی غذا، دور نگه‌داشتن حشرات از مواد و فراورده‌های غذایی را موجب می‌شود (Licciardello *et al*., 2013; Werdin Gonzalez *et al*., 2016). وجود مجموعه‌ای از گیرنده‌های دور کننده با سطوح متفاوتی از حساسیت شیمیایی، به عنوان عامل اجتناب رفتاری در حشرات معرفی شده و سازگاری به اثرات پس هضمی اسانس‌های گیاهی تاثیری در پیدایش چنین رفتار اجتنابی ندارد (Koul, 2005). برخی از اسانس‌های گیاهی همانند اسانس نعنائیان به عنوان عوامل هیجانی شناخته شده و از کارایی مطلوبی در ممانعت از استقرار سوسری‌ها، مورچه‌ها و موریانه‌ها در محیط برخوردار هستند (Alzogaray *et al*., 2013). از این رو، در تحقیق حاضر اثرات زیرکشندگی نانوفرمولاسیون اسانس پونه روی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به عنوان یک آفت انباری مهم و حشره مدل مورد بررسی قرار گرفت. اسانس‌های گیاهی به دلیل فراریت بالا، از اثرات زیرکشندگی کمتری در مقایسه با آفت‌کش‌های مرسوم برخوردار هستند. منوترپن‌ها به عنوان جزء اصلی تشکیل‌دهنده بسیاری از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی شناخته می‌شوند. منوترپنوئیدها ترکیباتی عمدتاً فرار و به‌نسبت چربی‌دوست هستند که ضمن نفوذ سریع به درون بدن حشرات، اختلال در عملکرد فیزیولوژیکی طبیعیِ گونه‌های هدف را نیز موجب می‌شوند. بهره‌گرفتن از اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات بازدارنده از تخم‌گذاری گونه‌های آفت، می‌تواند در جهت کاهش آفت‌زدگی محصولات انباری و کنترل خسارت آنها تاثیرگذار باشد. ماهیت روغنی و لغزنده اسانس‌های گیاهی، از چسبندگی تخم‌های حشرات آفت به سطح دانه‌های انباری جلوگیری می‌کند. روند کاهشی معنی‌دار تعداد تخم‌های گذاشته شده به ازای هر حشره ماده، درصد تفریخ تخم‌های گذاشته شده و درصد ظهور حشرات بالغ، در مجموع کارایی اسانس‌های گیاهی بر آفات انباری را رضایت‌بخش و موثر معرفی نموده است (Bachrouch *et al*., 2010; Taibi *et al*., 2018;

Aouadi *et al*., 2020). در بررسی حاضر، اثرات زیرکشندگی اسانس آزاد پونه و نانوفرمولاسیون آن در غلظت زیرکشنده (LC_{25}) به روش تدخینی و از طریق برآورد درصد بازدارندگی از تخم‌گذاری، درصد بارآوری، درصد خروج حشرات بالغ و نرخ جفت‌گیری انجام شد (Aouadi *et al*., 2020). یافته‌ها به وضوح اثرات زیرکشندگی نانوذرات اسانس (تأثیر منفی بر تعداد تخم‌های گذاشته شده به ازای هر حشره ماده، درصد تفریخ تخم‌های گذاشته شده، درصد خروج حشرات بالغ و نرخ جفت‌گیری شب‌پره مدیترانه‌ای آرد) را تایید نمودند. تاثیر منفی اسانس بر نرخ تفریخ تخم‌ها، کاهش بارآوری در طول زمان را به همراه دارد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، اثرات دورکنندگی نانوذرات اسانس پونه روی جمعیت شب‌پره‌ها همچنان مطلوب و موثر گزارش شد. نتایج تحقیقی مشابه (Sabbour and Abd-El-Aziz, 2019) در خصوص اثرات کشندگی و محافظتی نانوکپسول‌های پلیمری اسانس گیاهان رزماری، اکالیپتوس، سیر و انیسون روی لاروهای سن ۳ و شب‌پره‌های بالغ *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera; Pyralidae) و *A. kuehniella* مثبت ارزیابی شد. در این مطالعه، به‌منظور سنجش میزان بازدارندگی از تخم‌ریزی، نانوفرمولاسیون اسانس‌های مورد بررسی روی قطعات فوم پاشیده شد و با گندم به نسبت ۲ گرم فوم به ازای هر ۱۰۰ گرم گندم مخلوط شد. علاوه بر آن، در یک بازه زمانی ۹۰ روزه نیز اثرات محافظتی اسانس‌ها مورد بررسی قرار گرفت. دوام مطلوب نانوذرات اسانس روی فوم و کیسه‌های حاوی دانه‌های انباری، کاهش تعداد تخم، عدم ظهور نتاج در نسل اول، بد شکلی‌های شدید در حشرات بالغ، ثبات وزنی دانه‌های گندم برای بازه زمانی ۹۰ روزه و کارایی موثرتر نانوفرمولاسیون اسانس رزماری و اکالیپتوس در جلوگیری از آلودگی دانه‌های انباری به جمعیت‌های آفت در مقایسه با دیگر اسانس‌های مورد بررسی از نتایج این تحقیق عنوان شد. در پژوهشی دیگر (Bachrouch *et al*., 2010) در خصوص اثرات حشره‌کشی اسانس پسته *Pistacia lentiscus* L. بر شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، ضمن تایید سمیت اسانس، کاهش پراسنجه‌هایی همچون طول عمر، باروری، نرخ تخم‌ریزی و نرخ جفت‌گیری حشرات بالغ نیز به اثبات رساند. در همین راستا، زیست‌سنجی موضعی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد با اسانس *Artemisia herba-alba* Asso. و *Origanum vulgaris* L. اختلال دوره لاروی، اختلال تولیدمثلی، کاهش طول عمر حشرات ماده و در نتیجه، کاهش باروری آنها را به دنبال داشت (Taibi *et al*., 2018). یافته‌های یک مطالعه (Aouadi *et al*., 2020) در خصوص اثرات بیولوژیکی اسانس دو گونه بومی الجزایر به نام‌های *Mentha rotundifolia* L. و *Myrtus communis* L.، ضمن گزارش سمیت تماسی و تنفسی هر دو اسانس علیه شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، کارایی بیشتر و موثرتر اسانس *M. rotundifolia* به لحاظ بزرگی تلفات تحمیلی بر حشرات کامل و تاثیر بر پراسنجه‌های بیولوژیکی را نیز تایید نمود. اثرگذاری اسانس این گونه گیاهی بر باروری، بازدارندگی از تخم‌گذاری، بارآوری، نرخ تفریخ تخم و نرخ جفت‌گیری شب‌پره مدیترانه‌ای آرد نیز معنی‌دار توصیف شد. تیمار جمعیت‌ها با اسانس *M. rotundifolia*، عدم تفریخ کامل تخم‌های آفت و نرخ جفت‌گیری نزدیک به صفر را به دنبال داشت. در بررسی تاثیر اسانس گیاهان خرفه، خردل و کرچک (Sabbour and Abd-El-Aziz, 2017) روی شب‌پره‌های *Ephestia cautella*، ممانعت موثر از ظهور حشرات کامل، عقیمی شب‌پره‌های بالغ و سمیت بالای اسانس آزاد و نانوفرموله خرفه بر مرحله تخم در بازه زمانی ۱۲۵ روزه به ثبت رسید. اسپری گیاه پنبه با اسانس ۲٪ خردل سفید، کاهش تخم‌گذاری حشرات بالغ *Spodoptera littoralis* (Boisd.) به میزان ۷٪ ظرفیت اصلی و دورکنندگی ۸۹/۴٪ آنها را در پی داشت (Abd El-Aziz and Sharaby, 1997). در پژوهشی دیگر کارایی ۱۰۰ درصدی اسانس خرفه در جلوگیری از خروج شب‌پره‌های بالغ *A. kuehniella* در مقایسه با تیمار شاهد (۶۶٪) تایید شد (Sabbour and Abd-El- Aziz, 2017).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج بررسی حاضر ضمن تایید سمیت تنفسی و موضعی اسانس آزاد و نانوکپسوله پونه، اثرات اختلالی اسانس بر پراسنجه‌های بیولوژیکی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد را نیز مورد بررسی قرار داد. یافته‌ها به وضوح اثرات منفیِ زیرکشندگی اسانس آزاد پونه و نانوذرات آن بر تعداد تخم‌های گذاشته شده به ازای هر حشره ماده، درصد تفریخ تخم‌های گذاشته شده، درصد خروج حشرات بالغ و نرخ جفت‌گیری در پایان ۷۲ ساعت را به اثبات رساند. تحقیق پیش‌رو می‌تواند پایه مناسبی برای بررسی‌های تکمیلی در شرایط شبیه‌سازی شده انبارداری در عمل باشد. اثرات اسانس‌های گیاهی بر متابولیسم، شاخص‌های تغذیه‌ای، رفتار اجتنابی حشرات از تغذیه و چگونگی تعامل آنها با غذای مصرفی، با استناد به شاخص‌های تغذیه‌ای قابل درک بوده و به اثبات رسیده است. از این رو، ارزیابی اثرات تغذیه‌ای اسانس پونه بر شاخص‌های تغذیه‌ای *A. kuehniella* با هدف روش شدن جنبه‌های دیگر اثرگذاری اسانس پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی‌سینا، به جهت حمایت مالی بررسی حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

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

Abd El-Aziz, S. E. and Sharaby, A. M. 1997. Some biological effects of white mustard oil, *Brassica alba* against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd). **Anz Schadlingskde Pflanzenschutz Umweltschutz** 70: 62–64.

Abd El-Aziz, S. E. 2001. Persistence of some plant oils against the Bruchid beetle, *Callosobruchus maculates* (Col.: Bruchidae) during storage. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences** 9: 423–432.

Abduz Zahir, A., Bagavan, A., Kamaraj, C., Elangi, G. and Abdul Rahuman, A. 2012. Efficacy of plant-mediated silver nanoparticles against *Sitophilus oryzae*. **Journal of Biopesticides** 52: 95–102.

Alzogaray, R. A., Sfara, V., Moretti, A. N. and Zerba, E. N. 2013. Behavioural and toxicological responses of *B. germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) to monoterpenes**. European Journal of Entomology** 110: 247–252.

Ansari, M. A., Vasudevan, P., Tandon, M. and Razdan, R. K. 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. **Bioresource Technology** 71: 267-271.

Aouadi, G., Haouel, S., Soltani, A., Abada, M. B., Boushih, E., Elkahoui, S., Taibi, F., Ben Jemaa, J. M. and Bennadja, S. 2020. Screening for insecticidal efficacy of two Algerian essential oils with special concern to their impact on biological parameters of *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Diseases and Protection** 127: 471–482.

Bachrouch, O., Mediouni-Ben Jemaa, J., Aidi Waness, W., Talou, T., Marzouk, B. and Abderraba, M. 2010. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research** 46: 242–247.

Ben Chaaban, S., Haouel Hamdi, S., Mahjoubi, K. and Mediouni Ben Jemaa, J. 2019. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Ruta graveolens*, *Mentha pulegium* and *Ocimum basilicum* against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Diseases and Protection** 126: 237–246.

Biondi, A., Zappala, L., Stark, J. D. and Desneux, N. 2013. Do biopesticides affect the demographic traits of a parasitoid wasp and its biocontrol services through sublethal effects? **PLoS One** 8: e76548.

Ciriminna, R. and Pagliaro, M. 2013. Sol–gel microencapsulation of odorants and flavors: opening the route to sustainable fragrances and aromas. **Chemical Society Reviews** 42: 9243-9250.

Debnath, N., Das, S., Seth, S., Chandra, R., Bhattacharya, S. and Goswami, A. 2011. Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.) **Journal of Pest Science** 84: 99–105.

Ecran, F., Bas, H., Koc, M., Pandir, D. and Oztemiz, S. 2013. Insecticidal activity of essential oil of *Prangos ferulace* (Umbrelliferar) against *E. kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Trichogramma embryophagum* (Hym.: Trichogrammatidae). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 37: 719–725.

Eliopoulos, P., Hassiotis, C., Andreadis, S. and Porichi, A. 2015. Fumigant toxicity of essential oils from basil and spearmint against two major pyralid pests of stored products. **Journal of Economic Entomology** 108: 805–810.

Emamjomeh, L., Imani, S., Talebi, K., Moharramipour, S. and Larijani, K. 2014. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss (Lamiaceae) against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Pelagia Research Library** 4: 253–257.

Enan, E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology** 130: 325–337.

Enan, E. 2005. Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 59: 161–171.

Gokce, A., Stelinski, L. L., Whalon, M. E. and Gut, L. J. 2010. Toxicity and antifeedant activity of selected plant extracts against larval oblique banded Leaf roller, *Choristoneura rosaceana* (Harris). **Open Entomology Journal** 4: 18–24.

Goswami, A., Roy, I., Sengupta, S. and Debnath, N. 2010. Novel applications of solid and liquid formulations of nanoparticles against insect pests and pathogens. **Thin Solid Films** 519: 1252–57.

Gross, A. D., Norris, E. J., Kimber, M. J., Bartholomay, L. C. and Coats, J. R. 2017. Essential oils enhance the toxicity of permethrin against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology** 55: 55–62.

Hashem, A. S., Awadalla, S. S., Zayed, G. M., Maggi, F. and Benelli, G. 2018. *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*-insecticidal activity and mode of action. **Environmental Science and Pollution Research** 25: 18802–18812.

Ikawati, S., Himawan, T., Abadi, A. L. and Tarno, H. 2020. Toxicity nanoinsecticide based on clove essential oil against *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Pesticide Science** 20: 1-7.

Isman, M. B. 2020. Botanical Insecticides in the Twenty-First Century-Fulfilling Their Promise? **Annual Review of Entomology** 65: 233-249.

Jesser, E., Lorenzetti, A. S., Yeguerman, C., Murray, A. P., Domini, C. and Werdin-Gonzalez, J. O. 2020. Ultrasound assisted formation of essential oil nanoemulsions: emerging alternative for *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) management. **Ultrasonics Sonochemistry** 61: 104832.

Joffe, T., Gunning, R. V. and Allen, G. R. 2012. Investigating the potential of selected natural compounds to increase the potency of pyrethrum against houseflies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Pest Management Science** 68: 178–184.

KarabOrkulu, S., Ayvaz, A., Yilmaz, S. & Akbulut, M. 2011. Chemical composition of some essential oils against *Ephestia kuehniella*. **Journal of Economic Entomology** 104: 1212–1219.

Kheirkhah, M., Ghasemi, V., Yazdi, A. and Rahban, S. 2015. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from *Ziziphora clinopodioides* Lam used against the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. **Journal of Plant Protection Research** 55: 260–265.

Koul, O. 2005. Insects Antifeedants. CRC Press, Boca Raton.

Kumari, A., Yadav, S. K. and Yadav, S. C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B** 75: 1–18.

Lai, F., Wissing, S. A., Muller, R. H. and Fadda, A. M. 2006. *Artemisia arborescens* L. essential oil–loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. **American Association of Pharmaceutical Scientists** 7: 1–9.

Licciardello, F., Muratore, G., Suma, P., Russo, A. and Nerin, C. 2013. Effectiveness of a novel insect-repellent food packaging in corporating essential oils against the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 19: 173–180.

Liu, F., Wen, L. X., Li, Z. Z., Yu, W., Sun, H. Y. and Chen J. F. 2006. Porous hollow silica nanoparticles as controlled delivery system for water-soluble pesticide. **Materials Research Bulletin** 41: 2268-2275.

Lopez, M. D. and Pascual-Villalobos, M. J. 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications. **Industrial Crops *and Products*** 31: 284–288.

Louni, M., Shakarami, J. and Negahban, M. 2018. Insecticidal efficacy of nanoemulsion containing *Mentha longifolia* essential oil against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Crop Protection** 7:171–182.

Maedeh, M., Hamzeh, I., Hossein, D., Majid, A. and Reza, R. 2011. Bioactivity of essential oil from *Satureja hortensis* (Lamiaceae) against three stored-product insect species. **African Journal of Biotechnology** 10: 6620–6627.

Malekmohammadi, M., Jafaripoordaragahi, M. and Rafati, A. A. 2022. *Mentha longifolia* nanoencapsulated essential oil: Its synthesis and physico-chemical properties. **Iranian Journal of Plant Protection Science** 52: 41-58. (In Farsi).

Margulis-Goshen, K. and Magdassi, S. 2012. Nanotechnology: an advanced approach to the development of potent insecticides. In: Ishaaya, I., Reddy, P.S. & Rami, H. A. (Eds.), Advanced Technologies for Managing Insect Pests. Springer Science and Business Media, New York.

Mediouni Ben Jemaa, J., Tersim, N., Boushih, E., Taleb-Toudert, K. and Khouja, M. 2013. Fumigant control of the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* with the Nobel Laurel *Laurus nobilis* essential oils. **Tunisian Journal of Plant Protection** 8: 33–44.

Menossi, M., Ollier, R. P., Casalongue, C. A. and Alvarez, V. A. (2021) Essential oil-loaded bio-nanomaterials for sustainable agricultural applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 96: 2109-2122.

Najafi, M., Yousefi, Y. and Rafati, A. A. 2012. Synthesis, characterization and adsorption studies of several heavy metal ions on amino-functionalized silica nano hollow sphere and silica gel. **Separation and Purification Technology** 85: 193-205.

Nel, A. E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V. and Thompson, M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials** 8: 543–557.

Nel, A. E., Xia, T., Madler, L. and Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel**. Science** 311: 622–627.

Norris, E. J., Gross, A. D. Bartholomay, L. C. and Coats, J. R. 2019. Plant essential oils synergize various pyrethroid insecticides and antagonize malathion in *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology** 33: 453-466.

Oliveira, A. P., Santana, A. S., Santana, E. D. R., Lima, A. P. S., Faro, R. R. N., Nunes, R. S., Limab, A. D., Blanka, A. F., Araujoc, A. P. A., Cristaldoa, P. F. and Baccia, L. 2017. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Col.: Curculionidae). **Industrial Crops and Products** 107: 198–205.

Pagliaro, M. 2009. Silica-Based Materials for Advanced Chemical Applications. RSC Publishing, Cambridge.

Pandir, D. and Bas, H. 2016. Compositional analysis and toxicity of four plant essential oils to different stages of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Turkiye Entomoloji Dergisi** 40: 185–195.

Pavela, R. 2015. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial Crops and Products** 76: 174–187.

Peixoto, M. G., Bacci, L., Blank, A. F., Araujo, A. P. A., Alves, P. B., Silva, J. H. S., Santos, A. A., Oliveira, A. P., Costa, A. S. and Blank, M. F. A. 2015. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. **Industrial Crops and Products** 71: 31–36.

Planes, L., Catalan, J., Tena, A., Porcuna, J. L., Jacas, J. A., Izquierdo, J. and Urbaneja, A. 2013. Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. **Journal of Pest Science** 86: 321–332.

Rattan, R. S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection** 29: 913–920.

Re, L., Barocci, S., Sonnino, S., Mencarelli, A. and Vivani, C. 2000. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. **Pharmacological Research** 42: 177–182.

Regnault-Roger, C. 2013. Essential oils in insects control. In: Ramawat, K. G. & Merillon, J. M. (eds) Handbook of natural products. Springer-Verlag, Berlin.

Robertson, J. L., Russel, R. M., Preisler, H. K. and Savin, N. E. 2007. Bioassays with Arthropods. 2 nd ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.

Rossi, Y. E., Canavoso, L. and Palacios, S. M. 2012. Molecular response of *Musca domestica* L. to *Mintostachys verticillata* essential oil, (4R) (?) -pulegone and menthone. **Fitoterapia** 83: 336–342.

Rossi, Y. E. and Palacios, S. M. 2013. Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. **Acta Tropica** 172: 33–37.

Sabbour, M. M. and Abd-El-Aziz, S. E. 2016. Roll of three essential oils and their Nano against *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory and store conditions. **International Journal of PharmTech Research** 9:194–200.

Sabbour, M. M. and Abd-El-Aziz, S.E. 2017. Screening effects of three natural oils andtheir nano against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) in laboratory and store. **Bioscience Research** 14: 408–416.

Sabbour, M. M. and Abd El-Aziz, S. E. 2019. Impact of certain nano oils against *Ephestia kuehniella* and *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory and store conditions. **Bulletin of the National Research Centre** 43: 80- 86.

Sfara, V., Zerba, E. N. and Alzogaray, A. 2009. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Medical Entomology** 46: 511–515.

Shafaie, F., Aramideh, S. H., Valizadegan, O. and Safaralizadeh, M. H. 2019. Bioactivity of essential oils, extracts and powders of *Cupressus arizonica* Greene, *Juniperus communis* L. and *Mentha longifolia* L. on three Stored product pests. **Thai Journal of Agricultural Science** 52: 205−219.

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

Simon, J. Y. 2015. The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Press, Boca Raton.

Stadler, T., Buteler, M. and Weaver, D. K. 2010. Novel use of nanostructured alumina as an insecticide. **Pest Management Science** 66: 577–579.

Taibi, F., Boumendjel, M., Moncef, Z., Omar, S., Khaldi, T., Delimi, A., Abdessmad, S., Rebani, H., Chnouga. H., Siakhene, N., Boumendjel, A. and Messarah, M. 2018. Conservation of stored food using plant's extracts. Effect of Oregano (*Oreganum vulgaris*) essential oils on the reproduction and development of flour moth (*Ephestia kuehniella*). **Cellular and Molecular Biology** 64: 5–11.

Tak, J. H. and Isman, M. B. 2015. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. **Scientific Reports** 5: 474–480.

Tak, J. H., Jovel, E. and Isman, M. B. 2016. Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science** 72: 474–480.

Tarelli, G., Zerba, E. N. and Alzogaray, A. 2009. Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology** 102: 1383–1388.

Titouhi, F., Amri, M., Messaoud, C., Haouel, S., Youssfi, S., Cherif, A. and Mediouni Ben Jemaa, J. 2017. Protective effects of three Artemisia essential oils against *Callosobruchus maculatus* and *Bruchus rufimanus* (Coleoptera: Chrysomelidae) and the extended side-effects on their natural enemies**. Journal of Stored Products Research** 72: 11–20.

Tunc, I., Berger, B., Erler, F. and Dagli, F. 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. **Journal of Stored Products Research** 36: 161–168.

Rattan, R.S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin, **Crop Protection** 29: 913–920.

Ulukanli, Z., Karaborklu, S., Bozok, F., Ates, B., Erdogan, S., Cenet, M. and Karaaslan, M. G. 2014. Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. **Chinese Journal of Natural Medicines** 12: 901–910.

Upadhyay, R. K. and Ahmad, S. 2011. Management strategies for control of stored grain insect pests in farmer stores and public warehouses. **World Journal of Agricultural Sciences** 7: 527–549.

Veal, L. 1996. The potential effectiveness of essential oils as a treatment for headlice, *Pediculus humanus capitis*. **Complementary Therapies in Nursing and Midwifery** 2: 97–101.

Vincent, J. F. V. and Wegst, U. G. K. 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. **Arthropod Structure and Development** 33: 187–199.

Vishwakarma, G. S., Gautam, N., Babu, J. N., Mittal, S. and Jaitak, V. 2016. Polymeric encapsulates of essential oils and their constituents: a review of preparation techniques, characterization and sustainable release mechanisms. **Polymer Reviews** 56: 668–701.

Werdin Gonzalez, J. O., Gutierrez, M. M., Ferrero, A. A. and Band, B. F. 2014. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control- characterization and biological properties. **Chemosphere** 100: 130–138.

Werdin Gonzalez, J. O., Jesser, E. N., Yeguerman, C. A., Ferrero, A. A. and Band, B. F. 2017. Polymer nanoparticles containing essential oils: new options for mosquito control. **Environmental Science and Pollution Research** 24: 17006–17015.

Werdin Gonzalez, J. O., Laumann, R. A., daSilveira, S., Moraes, M. C. B., Borges, M. and Ferrero, A. A. 2013. Lethal and sublethal effects of four essential oils on the egg parasitoids *Trissolcus basalis.* **Chemosphere** 92: 608–615.

Werdin Gonzalez, J. O., Stefanazzi, N., Murray, A. P., Ferrero, A. A. and Band, B. F. 2015. Novel nanoinsecticides based on essential oils to control the German cockroach. **Journal of Pest Science** 88: 393–404.

Werdin Gonzalez, J. O., Yeguerman, C., Marcovecchio, D., Delrieux, C., Ferrero, A. A. and Band, F. B. 2016. Evaluation of sublethal effects of polymer-based essential oils nanoformulation on the German cockroach, *Blatella germanica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 130: 11–18.

Wen, L.X., Li, Z. Z., Zou, H. K., Liu, A.Q. and Chen, J. F. 2005. Controlled release of avermectin from porous hollow silica nanoparticles. **Pest Management Science** 61: 583–590.

Xu, H., Song, T., Bao, X. Q. and Hu, L. L. 2005. Site-directed research of magnetic nanoparticles in magnetic drug targeting. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 293: 514–519.

Yang, F. L., Li, X. G. and Lei, C. L. 2009. Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oils and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57: 10156–10162.

Zallaghi, N. and Ahmadi, M. 2020. Combined action of *Lavandula angustifolia* Miller essential oil and gamma irradiation treatment on some biological aspects of the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Zeller). **International Journal of Pest Management** 67: 203–215.

Plant Pest Research
2022- 12 (2): 1-19

Research paper

Lethal and sublethal effects of *Mentha longifolia* free and nanoencapsulated essential oils on *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

M. Malekmohammadi
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: April 7, 2022- Accepted: June 22, 2022)

Abstract

In previous study, nano hollow silica spheres have been synthesized by sol-gel method as a *Mentha longifolia* essential oil carrier and the success of essential oil encapsulation has been characterized based on particle size, polydispersity index, zeta potential, and encapsulation efficiency. The present research has been carried out on the findings of the previous study with the aim of evaluating 1) fumigant toxicity of *Mentha longifolia* free (M. EO) and nanoencapsulated (M. NP) essential oil against eggs, fifth instar larvae and adults of *Anagasta kuehniella* after 24, 48 and 72 h of exposure 2) topical toxicity of M. EO and M. NP against fifth instar larvae (mortality data obtained after 72 h exposure) 3) lifetime fecundity, %fertility, %adult emergence and copulation rate of *A. kuehniella* exposed to LC_{25} of M. EO and M. NP for 72 h. Fumigant toxicity was positively affected by the essential oil concentration and exposure time. Findings indicated that nanoencapsulation was associated with a 1.62-fold increase in the topical toxicity of *M. longifolia* essential oil to fifth instar larvae. Moreover, exposure to LC_{25} of M. EO and M. NP significantly decreased biological parameters (lifetime fecundity: 63 and 42 egg/female, percentage of fertility: 19.1 and 17.6%, percentage of adult emergence: 16.4 and 11.3%, copulation rate: 6.18 and 3.6% respectively). It is clear from the toxicological tests that nanoencapsulated essential oil produced stronger lethal and sublethal effects on *A. kuehniella* than free essential oil, thus can be regarded as potentially complementary or alternative to conventional insecticides in stored commodities.

Key words: *Anagasta kuehniella*, Encapsulation, Essential oil, Lethal and Sublethal effects

* Corresponding author: m.malekmohamadi@basu.ac.ir