

مقایسه دوام اسانس گیاه پونه *Mentha longifolia* (Lamiaceae) و نانوامولسیون آن

علیه شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

مژده لونی^۱، مریم نگهبان^۲✉ و جهانشیر شاکرمی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران؛ ۲- استادیار، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷)

چکیده

در این مطالعه نانوامولسیون حاوی اسانس پونه *Mentha longifolia* به روش هموژنایزر با فشار بالا تولید و سمیت تنفسی آن در مقایسه با اسانس معمولی پونه روی مراحل مختلف شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* بررسی شد. شرایط آزمایشگاهی شامل دمای 27 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و تاریکی بود. غلظت‌های ۱۱۱۱/۱-۱۱۱۱/۱ و ۹۲/۶-۶۲/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا از اسانس به ترتیب برای کنترل مرحله لاروی و تخم به کار رفت. در مورد نانوامولسیون غلظت‌های ۱۱۱۱/۱-۱۲۲/۲ میکرولیتر بر لیتر هوا در آزمایش لاروکنشی و غلظت‌های ۸۱/۴-۱۱۴/۸ میکرولیتر بر لیتر هوا در تخم‌کنشی بررسی شد. مقدار PT₅₀ در غلظت ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا برای نانوامولسیون و اسانس در آزمایش لاروکنشی به ترتیب برابر ۱۵/۱۸ و ۳/۶۹ روز تعیین شد. این مقادیر در غلظت ۹۲/۶ میکرولیتر بر لیتر هوا روی تخم آفت به ترتیب برابر ۱۴/۴۴ و ۲/۵۸ روز بود. میزان سمیت نسبی (RMP) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان مقادیر PT₅₀ اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی هر دو مرحله آفت بود. مطابق یافته‌های حاضر نانوامولسیون حاوی اسانس پونه با خاصیت رهایش تدریجی باعث حفظ سمیت تنفسی اسانس و افزایش دوام آن در طولانی مدت شده و می‌تواند به عنوان یک گروه جدید از آفت‌کش‌های دوست‌دار محیط زیست در برنامه‌های کنترل آفات در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، پونه، دوام، شب‌پره آرد، نانوامولسیون.

Comparison of durability of *Mentha longifolia* (Lamiaceae) essential oil and its nanoemulsion against *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

M. LOUNI¹, M. NEGAHBAN²✉ and J. SHAKARAMI¹

1- Ph.D. Student & Associate Professor, Respevtively; Department of Plant protection, Faculty of Agriculture Science, University of Lorestan, Khorramabad, Iran; 2. Assistant Professor, Pesticide Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (ARREO), Tehran, Iran

Abstract

In this study, the nanoemulsion containing *Mentha longifolia* essential oil was produced by using high-pressure homogenization method and its fumigant toxicity was compared with ordinary *M. longifolia* essential oil on different stages of *Ephestia kuehniella*. Experimental conditions were as follows; 27 ± 1 °C, 70 ± 5 % relative humidity in total darkness. Concentrations of 111.1-1111.1 and 62.9-92.6 μ l/l air of oil have been used to control larva and eggs, respectively. Nanoemulsion concentrations were studied at 122.2-1111.1 μ l/l air for larvicidal experiment and 81.4-114.8 μ l/l air for ovicidal stage. PT₅₀ value at 1111.1 μ l/l air as a larvicidal for nanoemulsion and oil was estimated about 15.18 and 3.69 days, respectively. This value, at 92.6 μ l/l air on egg was 14.44 and 2.58 days, respectively. The relative median potency parameter (RMP) showed that there was significant difference between PT₅₀ values of essential oil and its nanoemulsion on both of the two stages of pest. Results showed that nanoemulsion containing *M. longifolia* oil can release slow properties lead to durability of fumigant toxicity of oil in the long term. Therefore, this new formulation could be considered as a new and ecofriendly biopesticide in pest control.

Key words: *Ephestia kuehniella*, Essential oil, Durability, *Mentha longifolia*, Nanoemulsion.

مقدمه

شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) یکی از آفات مهم و اقتصادی آرد در شرایط آب و هوایی معتدل می‌باشد (Jemaa et al., 2013). علاوه بر آرد و سبوس به عنوان میزبان ترجیحی، لاروهای این آفت با تغذیه و تجمع فضولات لاروی باعث کاهش کمی و کیفی گندم، ذرت، برنج و میوه‌های خشک می‌شود (Hill, 2002). استفاده روز افزون از آفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل آفات انباری منجر به مشکلات متعددی از جمله، آلودگی آب و محیط زیست، آلودگی گیاهان و اثرات سمی روی پستانداران شده است (Boyer et al., 2012). با توجه به معایب آفت‌کش‌های شیمیایی، امروزه نیاز ضروری به توسعه روش‌های ایمن کنترل آفات که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست باشند، می‌باشد (Moharrampour and Negahban, 2014). بسیاری از گونه‌های گیاهی و اسانس‌های آن‌ها تاثیر بسزایی در محافظت از محصولات در مقابل آفات انباری دارند (Isman, 2000).

گیاه پونه *Mentha longifolia* L. متعلق به خانواده نعناعیان در حاشیه رودخانه‌ها و در شرایط آب و هوایی معتدل مرکز و جنوب اروپا، استرالیا و جنوب آسیا رشد می‌کند (Seveg et al., 2012). هم‌چنین این گیاه از گونه‌های فراوان در بسیاری از نقاط ایران می‌باشد که اثرات حشره‌کشی آن توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Shakarami et al., 2008; Akrami et al., 2011). وجود ترکیبات فرار با قدرت تبخیر بالا و تجزیه‌پذیری در مقابل نور خورشید از محدودیت‌های استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌باشد. یکی از راه‌های افزایش ثبات و بهبود عملکرد این ترکیبات گیاهی فرموله کردن آن‌ها است (Majeed et al., 2015). انتخاب نوع فرمولاسیون به عوامل مختلفی از جمله خواص زیستی، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی اسانس، نحوه اثر و نوع محصول بستگی دارد (Negahban et al., 2013a). بسیاری از اسانس‌های گیاهی چربی دوست بوده و انحلال‌پذیری اندکی در آب دارند. بنابراین نیاز

به یک سیستم انتقال جهت کپسوله کردن، حفاظت و بهبود اثر این ترکیبات به‌وسیله ره‌ایش کنترل شده‌ی آن‌ها وجود خواهد داشت (Donsi et al., 2011). تلاش برای توسعه اسانس‌های گیاهی به عنوان آفت‌کش منجر به ایجاد یک فرمولاسیون محلول در آب مثل نانومولسیون شده است (Nuchuchua et al., 2009). نانومولسیون‌ها شامل ذرات امولسیون‌ی به قطر ۵۰-۱۰۰۰ نانومتر می‌باشند که در آن‌ها معمولاً ذرات روغن به‌وسیله آب احاطه شده است (Gupta et al., 2016). این فرمولاسیون به دلیل اندازه بسیار کوچک ذرات، یک روش موثر در بهبود ثبات فیزیکی مواد زیستی نانوکپسوله شده و افزایش پراکندگی عوامل حشره‌کشی در ماده غذایی است (Topuz et al., 2016). گلیسرول مونواسیتارات (GMS) یکی از انواع رایج مونوگلیسرول‌ها می‌باشد که معمولاً برای تولید نانومولسیون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب به عنوان متعادل کننده، امولسیفایر و عامل ره‌ایش کنترل شده در فرمولاسیون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kavadia et al., 2017). مورتی و همکاران میکروکپسوله کردن را یک تکنیک مناسب جهت محافظت و ره‌ایش تدریجی اسانس *Rosmarinus officinalis* L. علیه ابریشم باف ناجور بیان کردند (Moretti et al., 2002). مطالعه اثر نانوذرات لیپید جامد اسانس *Artemisia arborescence* L. روی سفیدبالک *Bemesia tabaci* G. نشان داد این روش باعث ثبات فیزیکی بالای اسانس در دماهای مختلف (۴-۴۰ درجه سلسیوس) در مدت زمان ۶۰ روز شده است (Lai et al., 2006).

نگهبان و همکاران اثر دورکنندگی اسانس نانوکپسوله شده گیاه *Artemisia sieberi* Besser و هم‌چنین اثر آن بر شاخص‌های تغذیه‌ای شب‌پره پشت‌الماسی (*Plutella xylostella* L.) را بررسی کردند (Negahban et al., 2013a;b). نتایج این تحقیق نشان داد این فرمولاسیون قابلیت بالایی در کنترل این شب‌پره نسبت به اسانس معمولی دارد. ره‌اسازی کنترل شده و تدریجی اسانس بذر زنیان *Carum copitum*

حذف شد و گیاه خشک و پودر شد. در هر نوبت اسانس‌گیری، ۱۰۰ گرم پودر گیاهی همراه با ۱۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای Clevenger در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. زمان اسانس‌گیری برای هر نمونه ۴ ساعت بود. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آب‌گیری شد و درون ظروف شیشه‌ای به حجم ۲ میلی‌لیتر با روکش آلومینیومی و پارافیلیم در یخچال و در شرایط دمایی ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Negahban *et al.*, 2007).

تهیه نانوامولسیون اسانس گیاهی: به منظور تهیه فاز آبی نانوامولسیون حاوی اسانس پونه، ۹۰ میلی‌لیتر آب و ۳ گرم توین ۸۰ (به نسبت ۳۰:۱) (Tween®80, Ph Eur, JP, NF,) (1130 g/M, Merck, GER Hei-TORQUE, Heidolph, Germany) با سرعت ۵۰۰-۱۰۰۰ دور در دقیقه (۱۵ دور در دقیقه در هر ۳ دقیقه) درون ظرفی با حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر در دمای ۵-۱۰ درجه سلسیوس مخلوط شد. سپس ۲ گرم گلیسرول مونواستراتات (GMS) (99%, 358.56 g/M, Merck, GER basic 2, IKA, GER) با سرعت ۲۰۰-۱۰۰ دور در دقیقه (۵۰ دور در دقیقه در هر ثانیه) در دمای ۸۰ درجه سلسیوس تا مرحله ذوب شدن حرارت داده شد. در مرحله بعد ۲ گرم توین ۸۰ به GMS ذوب شده اضافه شد و دما به ۲۰ درجه سلسیوس کاهش داده شد (۱ درجه سلسیوس در هر ۱۵ ثانیه). سپس ۵ گرم اسانس خالص پونه به صورت قطره قطره به ترکیب GMS و توین ۸۰ اضافه شد. ترکیب به دست آمده به صورت قطره قطره به فاز آبی اضافه و با کمک دستگاه هم‌زنایزر (مدل package, IKA, T 18 basic ULTRA-TURRAX, GER) با سرعت ۱۰۰۰-۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد.

بررسی مورفولوژی سطح نانوامولسیون با میکروسکوپ الکترونی: شکل‌شناسی دیواره‌ها و مشاهده سطح نانوامولسیون با استفاده از دستگاه میکروسکوپ

C. B. Clarke و اثرات ضدتغذیه‌ای قوی آن علیه لارو شب‌پره پشت‌الماسی نیز توسط Jamal *et al.* (2012) بیان شده است. در مطالعه‌ی دیگری، اثر قوی نانوزل تهیه شده از اسانس *C. copitum* روی دوگونه آفت انباری گزارش شده است (Ziaee *et al.*, 2014). امام جمعه و همکاران سمیت تماسی و دوام نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Boiss را روی لارو ۱۴-۷ روزه شب‌پره آرد بررسی کردند (Emamjomeh *et al.*, 2017). نتایج این بررسی نشان دهنده افزایش خاصیت سمی اسانس بعد از فرمولاسیون و حفظ سمیت تماسی در طولانی مدت بود. تا کنون مطالعه‌ای روی خواص نانوامولسیون اسانس پونه علیه شب‌پره آرد انجام نشده است، در این پژوهش سمیت تنفسی نانوامولسیون اسانس پونه روی مراحل مختلف زیستی شب‌پره آرد و دوام اسانس در این فرمولاسیون بررسی شد.

روش بررسی

پرورش حشره: شب‌پره آرد از انسکتاریوم واقع در شهرستان خرم‌آباد تهیه شد و درون ظروف پلاستیکی با طول ۳۴ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر روی مخلوط آرد گندم، سبوس گندم و مخمر (۱:۵:۱۰) پرورش یافت. شرایط آزمایشگاهی جهت پرورش این آفت شامل دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد تحت شرایط تاریکی بود. از تخم یک روزه و لارو سن پنجم این آفت برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی استفاده شد.

جمع‌آوری گیاه مورد مطالعه: در اوایل مرداد ماه هم‌زمان با گلدهی، گیاه پونه *M. longifolia* از اطراف شهرستان خرم‌آباد (در ۲۱ دقیقه و ۴۸ درجه طول جغرافیایی و ۴۳ دقیقه و ۳۰ دقیقه عرض جغرافیایی) جمع‌آوری شد. اندام‌های هوایی گیاه شامل گل، برگ و ساقه‌های نازک در شرایط سایه و تهویه مناسب خشکانده شدند. سپس داخل پاک‌های کاغذی در فریزر و در دمای ۲۴- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج اسانس: جهت تهیه اسانس شاخه‌های چوبی

۱۰ عدد تخم یک‌روزه شب‌پره آرد قرار داده شد. سپس غلظت‌های مختلف اسانس معمولی و نانومولسیون ۵ درصد آن در تکرارهای جداگانه مشابه روش قبل روی کاغذهای صافی درون درپوش ظروف ریخته شد و درپوش ظروف محکم بسته شد. غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش تخم‌کشی برابر با ۱/۷، ۱/۸۷، ۲/۰۶، ۲/۲۶ و ۲/۵ میکرولیتر (معادل ۶۲/۹، ۶۹/۲، ۷۶/۲، ۸۳/۷ و ۹۲/۶ میکرولیتر بر لیتر هوا) برای اسانس معمولی و ۲/۲، ۲/۳، ۲/۶، ۲/۸ و ۳/۱ میکرولیتر (معادل ۸۱/۴، ۸۵/۱، ۹۶/۲، ۱۰۳/۷ و ۱۱۴/۸ میکرولیتر بر لیتر هوا) برای نانومولسیون ۵ درصد بر حسب میزان ماده موثره تخمین زده شد. بعد از ۲۴ ساعت و پنج روز به ترتیب تعداد لاروها و تخم‌های مرده شمارش و درصد مرگ و میر از طریق فرمول (Abbott 1925) محاسبه شد. کلیه آزمایش‌ها برای هر تیمار در ۵ تکرار انجام شد. برای هر تیمار، شاهد تکرار مشابه منظور شد. آب مقطر و نانومولسیون بدون اسانس به عنوان شاهد نانومولسیون در نظر گرفته شدند.

بررسی دوام سمیت تنفسی نانومولسیون و اسانس پونه

روی شب‌پره آرد: دوام سمیت تنفسی نانومولسیون ۵ درصد و اسانس پونه براساس روش (Negahban 2012) در دو غلظت (LC₅₀ و LC₈₀) به دست آمده از سمیت تنفسی اسانس پونه انجام شد. با کمک میکروبیپیت غلظت‌های تعیین شده از اسانس معمولی و نانومولسیون حاوی اسانس روی کاغذ صافی به قطر دو سانتی‌متر ریخته شد و پس از قرارگیری درون درپوش ظروف، درپوش ظروف شیشه‌ای محکم بسته شد. پس از یک روز از تاریخ اسانس‌دهی تعداد ۱۰ عدد لارو سن پنجم شب‌پره آرد درون ظروف ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت تعداد لاروهای مرده شمارش شد. 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. به عنوان مثال برای آزمایش سه روزه نیز پس از آغشته نمودن کاغذ صافی به غلظت معینی از نانومولسیون و اسانس

الکترونی عبوری (TEM (Transmission electron microscope)، Philips, Model CM 120) انجام شد. جهت مشاهده توزیع اندازه ذرات از دستگاه Laser light scattering (SEMATech) استفاده شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی: کلیه آزمایشات زیست‌سنجی

در آزمایشگاه سم‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. شرایط آزمایشگاهی شامل دمای 27 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و شرایط تاریکی بود. هم‌چنین، کلیه مراحل مربوط به تهیه فرمولاسیون در آزمایشگاه تحقیقات فرمولاسیون و کنترل کیفی آفت‌کش‌ها واقع در موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور انجام شد.

بررسی سمیت تنفسی نانومولسیون و اسانس پونه روی

شب‌پره آرد: برای به دست آوردن سمیت تنفسی اسانس پونه و نانومولسیون ۵ درصد حاوی اسانس پونه روی لارو و تخم شب‌پره آرد ابتدا محدوده غلظت‌ها با انجام آزمایشات مقدماتی تعیین شد. روش آزمایش برای هر دو تیمار (اسانس پونه و نانومولسیون حاوی اسانس) روی مراحل مختلف زیستی آفت مشابه بود. پس از تعیین غلظت‌ها، براساس روش (Negahban *et al.* (2007) کاغذهای صافی به قطر دو سانتی‌متر به عنوان محل آغشته کردن به اسانس در نظر گرفته شد. کاغذهای صافی درون درپوش ظروف شیشه‌ای به حجم ۲۷ میلی‌لیتر قرار داده شد. سپس، تعداد ۱۰ عدد لارو سن پنجم شب‌پره آرد (یک روزه) به درون ظروف منتقل شد. با کمک میکروبیپیت غلظت‌های مختلف اسانس شامل ۳، ۵/۲، ۹/۳، ۱۶/۶ و ۳۰ میکرولیتر (معادل ۱۱۱/۱، ۱۹۲/۶، ۳۴۴/۴، ۶۱۴/۸ و ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا) روی کاغذ صافی ریخته شد. غلظت‌های نانومولسیون ۵ درصد در آزمایش لاروکشی نیز برابر با ۳/۳، ۵/۷، ۹/۹، ۱۷/۲ و ۳۰ میکرولیتر (معادل ۱۲۲/۲، ۲۱۱/۱، ۳۶۶/۶، ۶۳۷ و ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا) بر حسب میزان ماده موثره (اسانس) نانومولسیون تخمین زده شد. سپس درپوش ظروف شیشه‌ای پس از انتقال لاروهای آفت محکم بسته شد. در آزمایش بعدی، در ظروف جداگانه

نتیجه و بحث

مورفولوژی سطح نانوامولسیون با میکروسکوپ

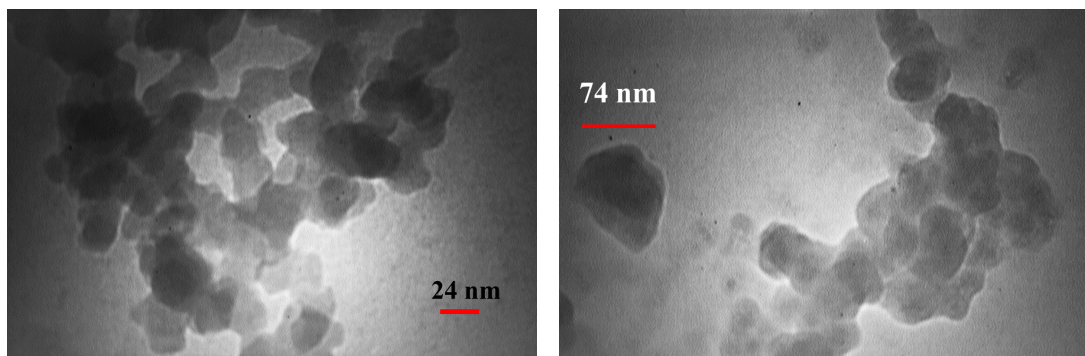
الکترونی: ساختار دیواره‌ها و مورفولوژی سطح ذرات نانوامولسیون در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون توسط میکروسکوپ الکترونی حدود ۴۹ نانومتر برآورد شد. در حالی که این مقدار با استفاده از دستگاه Laser light scattering (SEMATEch) حدود ۲۳۴ نانومتر تخمین زده شد. هم‌چنین توزیع اندازه ذرات توسط این دستگاه تعیین شد (شکل ۲).

سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی

اسانس روی شب‌پره آرد: نتایج حاصل از آزمایش‌ها، نشان دهنده سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی مراحل مختلف شب‌پره آرد می‌باشد. مطابق با شکل‌های ۳ و ۴، لگاریتم غلظت و پروبیت درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن پنجم و تخم شب‌پره آرد نشان می‌دهد که تلفات مراحل مختلف آفت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه و نانوامولسیون آن روند افزایشی یکنواختی داشته است. میزان LC_{50} اسانس معمولی و نانوامولسیون ۵ درصد تهیه شده از آن روی لارو سن پنجم و تخم شب‌پره آرد با تجزیه پروبیت داده‌های مربوط به هر مرحله تخمین زده شد (جدول‌های ۱ و ۲).

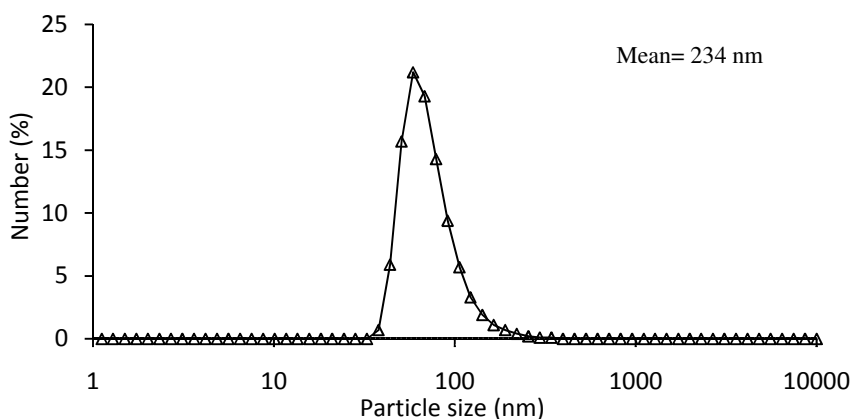
درپوش ظروف محکم بسته شد به مدت سه روز بسته باقی ماند و پس از این مدت لاروهای آفت اضافه شدند و درپوش ظروف مجدداً بسته شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعداد لاروهای مرده شمارش و درصد مرگ و میر محاسبه شد. همین روند برای همه فاصله‌های زمانی آزمایش دوام انجام شد. در مرحله تخم این آفت نیز شرایط و روش آزمایش مشابه بالا بود. به این ترتیب که پس از تعیین دو غلظت مورد نظر و یک روز پس از اسانس‌دهی تعداد ۱۰ عدد تخم یک روزه شب‌پره آرد به داخل ظروف منتقل شد و پنج روز بعد (Brindley, 1930) تعداد تخم‌های تفریخ نشده شمارش و درصد مرگ و میر محاسبه شد. روند هر دو روز یکبار برای تخم آفت نیز جهت بررسی دوام اسانس و نانوامولسیون به طور جداگانه انجام شد. درپوش ظروف قبل از انتقال مراحل مختلف آفت کاملاً بسته بوده و پس از اینکه نمونه‌ها به داخل ظروف ریخته شد درپوش ظروف مجدداً بسته شد و در تمام طول این مدت مسدود باقی ماند. آزمایش‌ها برای هر تیمار (اسانس و نانوامولسیون) به همراه شاهد‌ها برای هر روز به طور جداگانه در ۵ تکرار انجام شد.

محاسبات آماری: محاسبه مقادیر LC_{50} و PT_{50} مربوط به هر یک از مراحل آزمایش به روش پروبیت صورت گرفت و هم‌چنین مقایسه این مقادیر با استفاده از محاسبه پارامتر سمیت نسبی (Relative median potency) از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد (SPSS, 2007).



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

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



شکل ۲- میانگین اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون حاوی اسانس پونه
Fig. 2. Mean of particle size and distribution of *Mentha longifolia* oil nanoemulsion

جدول ۱- مقادیر LC₅₀ سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی لارو سن پنجم شب‌پره آرد

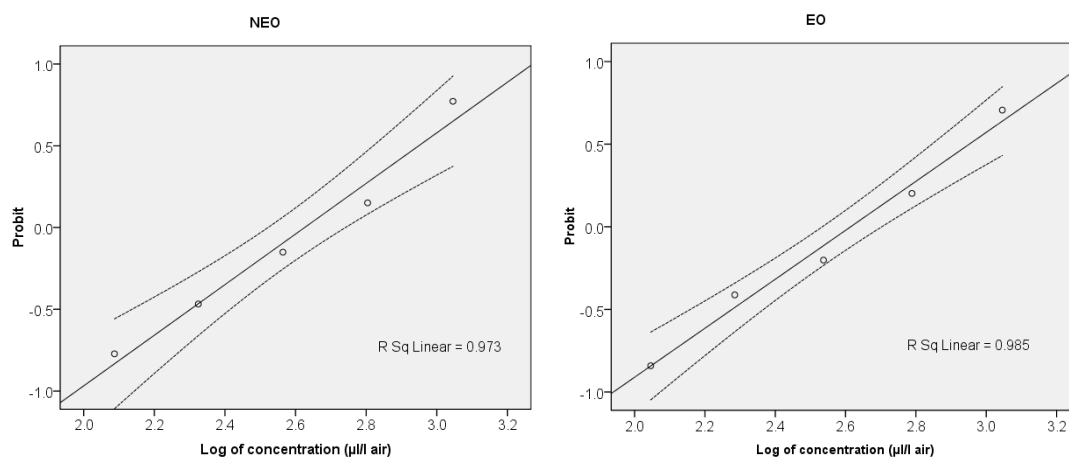
Table 1. LC₅₀ values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia kuehniella* 5th instar larva

Compound	LC ₅₀ (µl/l)	Chi-square	n	df	Intercept	Slope±SE	P-value	Confidence limit 95%	
								Lower	Upper
Essential oil	413.69	0.63	250	3	-3.86±0.62	1.47±0.24	0.88	319.7	554.1
Nanoemulsion	427.05	1.06	250	3	-4.04±0.66	1.53±0.25	0.78	334.4	563.7

جدول ۲- مقادیر LC₅₀ سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی تخم شب‌پره آرد

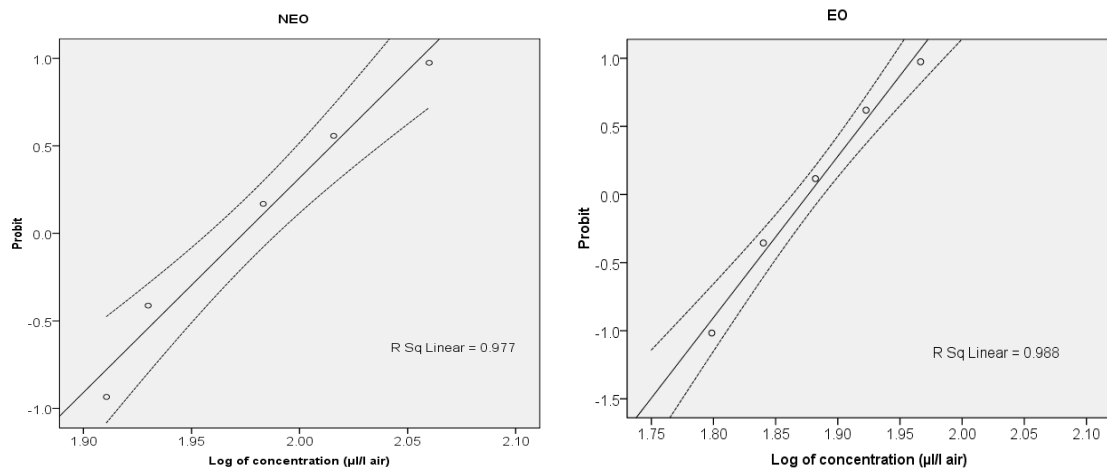
Table 2. LC₅₀ values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia Kuhniella* egg

Compound	LC ₅₀ (µl/l)	Chi-square	n	df	Intercept	Slope±SE	P-value	Confidence limit 95%	
								Lower	Upper
Essential oil	75.03	0.69	250	3	-22.08±3.05	11.77±1.62	0.87	72.2	77.6
Nanoemulsion	93.98	1.21	250	3	-24.02±3.38	12.17±1.71	0.74	90.6	97.1



شکل ۳- پروبیت مرگ و میر اثر اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی لارو سن پنجم شب‌پره آرد

Fig. 3. Probit of mortality of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion effects on *Ephestia Kuhniella* 5th instar larva



شکل ۴- پروبیت مرگ و میر اثر اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی تخم شب‌پره آرد

Fig. 4. Probit of mortality of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion effects on *Ephestia Kuhnii* egg

جدول ۳- مقایسه LC_{50} محاسبه شده در بررسی سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی مراحل مختلف شب‌پره آرد در غلظت‌های مختلف

Table 3. Comparison of estimated LC_{50} for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion on different stages of *Ephestia kuehniella* at different concentrations

Stages	Exposure time (day)	LC_{50} (μ l/l) (NEO ²)	LC_{50} (μ l/l) (EO ³)	RMP ¹	95% Confidence limits
Larva	1	427.05	413.69	1.03	0.72-1.50
Egg	5	93.98	75.03	1.25	1.15-1.40

1- RMP= Relative Median Potency

2- Nanoemulsion

3- Essential oil

نانوامولسیون به میزان قابل توجهی از اسانس بالاتر بود. رهایش اسانس به عنوان ماده موثره نانوامولسیون در هر دو غلظت تدریجی و طولانی بود. اما در رابطه با اسانس این روند سریع و کوتاه بود (شکل ۵). در غلظت بالا (LC_{80})، دوام سمیت تنفسی نانوامولسیون علیه لاروهای سن پنجم شب‌پره آرد ۳۱ روز به طول انجامید در حالیکه این مقدار برای اسانس ۹ روز بود. در غلظت ۴۱۳/۷ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس برخلاف نانوامولسیون دوامی نداشت. میان آب و نانوامولسیون بدون اسانس به عنوان شاهد‌های نانوامولسیون هیچ تفاوتی مشاهده نشد. میزان PT_{50} برای نانوامولسیون و اسانس معمولی در جدول ۴ آمده است.

بر اساس محاسبه سمیت نسبی (RMP)، بین LC_{50} به دست آمده از اسانس معمولی و نانوامولسیون روی لارو آفت بعد از گذشت ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما این میزان در آزمایش تخم‌کشی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین مقادیر LC_{50} به دست آمده از این دو ترکیب پس از ۵ روز از زمان آزمایش بود و اسانس کشندگی بیش‌تری نسبت به نانوامولسیون داشت (جدول ۳).

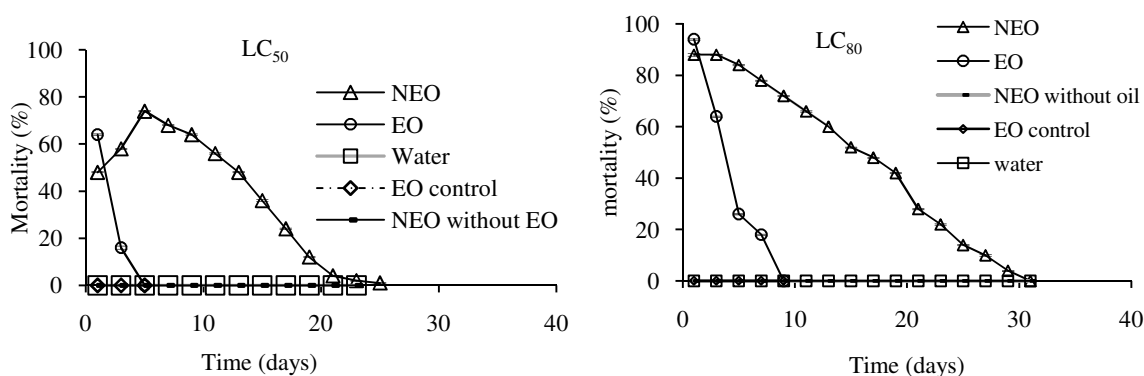
دوام سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی

اسانس روی شب‌پره آرد: دوام اسانس معمولی و نانوامولسیون حاوی اسانس روی لاروهای سن پنجم در دو غلظت $LC_{80}=1111/1$ میکرولیتر بر لیتر هوا و $LC_{50}=413/7$ میکرولیتر بر لیتر هوا انجام شد. نتایج نشان داد که در هر دو غلظت دوام

جدول ۴- مقادیر PT_{50} سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس علیه لارو سن پنجم شب‌پره آرد

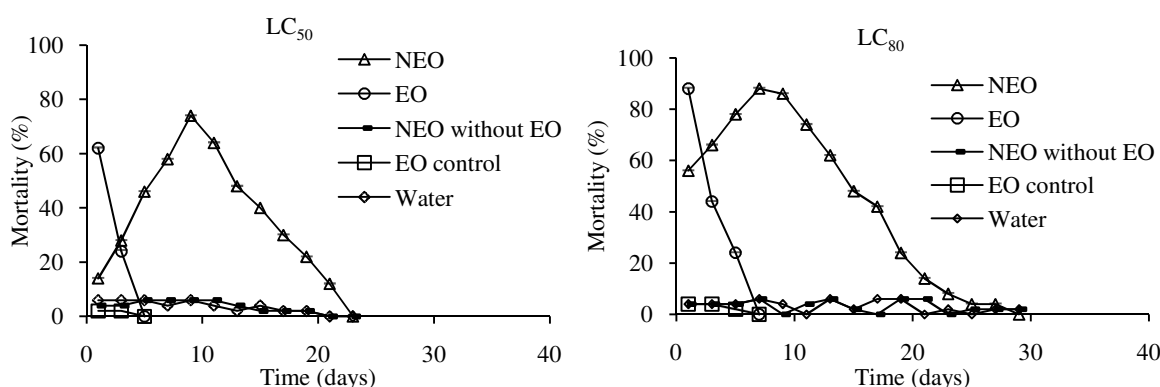
Table 4. PT_{50} values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia kuehniella* 5th instar larva

Concentration (μl/l)	compounds	PT_{50} (day)	Chi-square	n	df	Intercept	slope±SE	P-value	Confidence limit 95%	
									Lower	Upper
1111.1	Nanoemulsion	15.18	3.00	450	7	2.79±0.37	-2.36±0.33	0.88	13.46	17.70
413.7		11.45	2.86	350	5	2.31±0.41	-2.18±0.40	0.72	9.92	13.62
1111.1	Essential oil	3.69	0.7	200	2	1.65±0.25	-2.94±0.40	0.71	3.13	4.33



شکل ۵- دوام سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس به همراه تیمارهای شاهد علیه لارو شب‌پره آرد در دو غلظت LC_{50} و LC_{80}

Fig. 5. Durability for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* essential oil and its nanoemulsion of oil with controls on *Ephestia kuehniella* larva at LC_{50} and LC_{80}



شکل ۶- دوام سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس به همراه شاهد روی تخم شب‌پره آرد در دو غلظت LC_{50} و LC_{80}

Fig. 6. Durability for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* essential oil and its nanoemulsion with controls on *Ephestia kuehniella* egg at LC_{50} and LC_{80}

جدول ۵- مقدار PT_{50} سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی تخم شب‌پره آرد

Table 5. PT_{50} values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia Kuhlmei* egg

Concentration (μ l/l)	compounds	PT_{50} (day)	Chi-square	n	df	Intercept	slope \pm SE	P-value	Confidence limit 95%	
									Lower	Upper
92.6	Nanoemulsion	14.44	1.04	300	4	6.19 \pm 0.87	-5.34 \pm 0.76	0.90	13.49	15.57
75.03		12.60	0.28	300	4	5.03 \pm 0.81	-4.55 \pm 0.73	0.99	11.49	13.63
92.6	Essential oil	2.58	0.01	150	1	1.14 \pm 0.22	-2.78 \pm 0.44	0.91	2.10	3.16

جدول ۶- مقایسه PT_{50} محاسبه شده در بررسی سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی مراحل مختلف شب‌پره آرد

Table 6. Comparison of PT_{50} of fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and nanoemulsion of oil on different stages of *Ephestia kuehniella*

Stages	PT_{50} (day) (EO ²)	PT_{50} (day) (NEO ³)	RMP ¹	95% Confidence limits
Larva	3.69	15.18	4.04	2.56-7.74
egg	2.58	14.44	5.10	2.82-12.73

1- RMP= Relative Median Potency

2- Essential oil

3- Nanoemulsion

در سال‌های اخیر گرایش رو به افزایشی برای کاربرد تکنیک‌های نانوکپسوله کردن به عنوان روش‌های جدید فرمولاسیون در جهت بهبود عملکرد اسانس‌های گیاهی و دیگر ترکیبات ایجاد شده است (Majeed et al., 2015). در این مطالعه نانوامولسیون ۵ درصد حاوی اسانس پونه با استفاده از یک روش جدید تولید شد و اثرات آن روی سمیت و دوام اسانس پونه بررسی شد. اسانس پونه به عنوان ماده موثره فرمولاسیون، GMS و مواد همراه به کار رفته در تولید این ترکیب همگی با محیط زیست سازگار بوده و برای پستانداران بی‌خطر می‌باشند (Anandharamakrishnan, 2014). با توجه به رهایش تدریجی ماده موثره نانوامولسیون، ترکیب تولید شده سمیت تنفسی قابل قبولی روی لاروها و تخم‌های شب‌پره آرد از خود نشان داد. میزان LC_{50} برآورد شده در مرحله لاروکشی با استفاده از اسانس معمولی و نانوامولسیون حاوی اسانس بسیار به یکدیگر نزدیک و به ترتیب برابر با ۴۱۳/۶۹ و ۴۲۷/۰۵ میکرولیتر بر لیتر هوا بود. بالاترین غلظت به کار رفته در این مرحله برای هر دو ترکیب مشابه و معادل ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا تخمین زده شد. از نتایج فوق چنین

غلظت‌های مورد استفاده از اسانس پونه و نانوامولسیون تهیه شده از آن برای مرحله تخم آفت معادل $LC_{50}=75/03$ و $LC_{80}=92/6$ میکرولیتر بر لیتر هوا بود. مطابق با شکل ۶، در آزمایش تخم‌کشی نیز مانند آزمایش قبل در هر دو غلظت روند مرگ‌ومیر تخم‌ها بعد از استفاده از نانوامولسیون تدریجی و رهایش اسانس کنترل شده بود. مدت زمانی که طول کشید تخم‌ها بر اثر نانوامولسیون به ۵۰ درصد مرگ و میر در غلظت ۹۲/۶ میکرولیتر بر لیتر هوا برسند، ۱۴/۴۴ روز تعیین شد. برای اسانس معمولی این پارامتر برابر با ۲/۵۸ روز بود. در این مرحله نیز تفاوتی میان مرگ‌ومیر حاصل از آب و نانوامولسیون بدون اسانس مشاهده نشد. میزان PT_{50} نانوامولسیون در غلظت ۷۵/۰۳ میکرولیتر بر لیتر هوا، ۱۲/۶۰ روز برآورد شد. برخلاف نانوامولسیون اسانس معمولی در این غلظت فاقد دوام بود و پس از گذشت پنج روز میزان تلفات تخم‌های شب‌پره آرد به صفر رسید (جدول ۵). محاسبه میزان سمیت نسبی نشان داد میان مقادیر PT_{50} اسانس و نانوامولسیون حاوی اسانس پونه در هر دو مراحل لاروکشی و تخم‌کشی آفت اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۶).

درصد) ره‌ایش اسانس میکروکپسوله شده *R. officinalis* در طول ۲۵ روز رخ داده است (Passino et al., 2004). دوام بالای نانومولسیون اسانس سه گیاه (*Ocimum americanum* (L.)، *Citronella nardus* (L.) و *Zizanioides Vetiveria* (L.) علیه پشه *Aedes aegypti* L. (Nuchuchua et al., 2009)، نانوژل اسانس *C. copitum* روی شیشه گندم *Sitophilus granarius* L. و شیشه آرد *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Ziaee et al., 2014) و ماندگاری طولانی بیونانوفیبر اسانس زنیان علیه شب‌پره هندی، *Plodia interpunctella* (Hübner) (Allahvaisi et al., 2017) مشخص شده است. فرمولاسیون نانومولسیون باعث افزایش دوام سمیت تماسی اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* علیه لاروهای ۱۴-۷ روزه شب‌پره آرد شده است (Emamjomeh et al., 2017). این محققین بیان کردند نانوکپسوله کردن اسانس گیاهی باعث می‌شود ماده موثره به صورت کنترل شده آزاد شده و اثر آن در طولانی مدت حفظ می‌شود که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد. چوپانیان و همکاران نیز نشان دادند نانومولسیون اسانس گیاه چریش (neem oil) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس دارای ثبات فیزیکی بالایی بود و به مدت ۹۰ روز بدون هیچ گونه تغییری باقی ماند (Choupanian et al., 2017). اسانس نانوکپسوله شده *Rosmarinus officinalis* نیز باعث ره‌ایش تدریجی و حفظ خاصیت تنفسی اسانس علیه شیشه آرد *T. castaneum* در طولانی مدت شد (Khoobdeli et al., 2017). گیاه پونه دارای پراکنش زیاد در نواحی مختلف ایران می‌باشد. اثرات حشره‌کشی اسانس این گیاه مانند تخم‌کشی، دورکنندگی، بازدارندگی تخم‌ریزی و سمیت تنفسی تاکنون روی آفات مختلفی گزارش شده است (Shakarami et al., 2010; Akrami et al., 2011; Saeidi and Moharramipour, 2013). تا کنون هیچ مطالعه‌ای روی تهیه فرمولاسیون اسانس پونه و اثر آن روی شب‌پره آرد انجام نشده است. اثر قابل قبول این نانومولسیون روی کنترل مراحل مختلف شب‌پره آرد می‌تواند امکان تولید انبوه این فرمولاسیون را فراهم نماید. به طور کلی با توجه به

برمی‌آید که اسانس بعد از فرمولاسیون توانست خاصیت حشره‌کشی خود را حفظ کند. در مرحله تخم‌کشی میزان ۵۰ درصد از تلفات تخم هنگام استفاده از اسانس در غلظت پایین‌تری (۷۵/۰۳ میکرولیتر بر لیتر هوا) نسبت به نانومولسیون (۹۳/۹۸ میکرولیتر بر لیتر هوا) به دست آمد. در این رابطه مطالعات مشابهی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس نانوکپسوله شده نسبت به اسانس معمولی سمیت تنفسی کم‌تری در زمان اولیه پس از آزمایش از خود نشان می‌دهد. نگهبان و همکاران سمیت تنفسی بالاتر (LC₅₀= 3.78 ppm) اسانس درمنه را در مدت زمان ۲۴ ساعت پس از انجام آزمایش نسبت به اسانس نانوکپسوله شده (LC₅₀= 11 ppm)، علیه شب‌پره پشت الماسی گزارش کردند (Negahban, 2012). در مطالعات دیگری نیز مانند بررسی اثر اسانس نانوکپسوله شده *Carum copitum* روی آفت شیشه برنج، *Sitophilus oryzae* (L.) (Jamal et al., 2012) و فرمولاسیون لیپیدی جامد اسانس زنیان روی شیشه آرد، *Tribolium castaneum* (H.) (Khademi, 2012) یافته‌های مشابهی به دست آمد. براساس یافته‌های حاضر اگرچه در مدت زمان کوتاه اسانس معمولی نسبت به نانومولسیون حاوی اسانس دارای سمیت بیش‌تری بود، اما با گذشت زمان میزان کشندگی اسانس معمولی نسبت به اسانس فرموله شده کاهش چشم‌گیری یافت. بنابراین تکنیک نانومولسیون علاوه بر حفظ ماهیت سمی اسانس در مدت زمان کوتاه، باعث افزایش قابل توجه ماندگاری و دوام آن شد. نانومولسیون تولید شده طبق روش مطالعه حاضر می‌تواند باعث بهبود عملکرد و حفظ خواص اسانس در طولانی مدت شود. مطابق با یافته‌های حاضر، (Negahban 2012) روند نزولی و تدریجی کاهش نرخ مرگ‌ومیر شب‌پره پشت الماسی را تحت تاثیر غلظت بالای اسانس نانوکپسوله شده درمنه (۱۰ پی‌پی‌ام) تایید کردند. در این غلظت دوام اسانس معمولی درمنه و اسانس نانوکپسوله شده به ترتیب برابر با ۱۳ و ۵۱ روز تعیین شد. همچنین، پاسیون و همکاران نشان دادند بیش‌ترین میزان (۷۵

دهد. بنابراین می‌توان در طرح‌های آینده با استفاده از تکنیک نانو و همچنین استفاده از اسانس‌هایی با اثرات کشندگی بالاتر در جهت کنترل سایر آفات اقدام نمود و بر بسیاری از محدودیت‌های استفاده از اسانس در کنترل آفات غلبه کرد.

نتایج فوق می‌توان گفت اگر چه اسانس معمولی پونه در غلظت تقریباً بالایی توانست خاصیت کشندگی روی شب پره آرد داشته باشد؛ اما فرموله کردن آن به صورت نانوامولسیون توانست با حفظ اثرات کشندگی اسانس دوام آن را نیز افزایش

References

- ABBOTT, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- AKRAMI, H., S. MOHARRAMIPOUR and S. IMANI, 2011. Comparative effect of *Thymus kotschyanus* and *Mentha longifolia* essential oils on oviposition deterrence and repellency of *Callosobruchus maculatus* F. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27: 2-10.
- ALLAHVAISI, S., K. TALEBI JAHROMI, S. IMANI and M. KHANJANI, 2017. Efficacy of electrospun bionanofibers as fumigant pesticides in foodstuff storage. *Journal of Plant Protection Research*, 57: 72-80.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. 2014. Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients. *Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition* pp. 1-69.
- BOYER, S., H. ZHANG and G. LEMPERIERE, 2012. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of Entomological Research*, 102: 212-229.
- BRINDLEY, T. A. 1930. The growth and development of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera) and *Tribolium confusum* Duval (Coleoptera) under controlled conditions of temperature and relative humidity. *Annals of Entomological Society of America*, 23: 741-757.
- CHOUPIANIAN, M., D. OMAR, M. BASRI and N. ASIB, 2017. Preparation and characterization of neem oil nanoemulsion formulations against *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum* adults. *Journal of Pesticide Science*, 42: 158-165.
- DONSI, F., M. SESSA, H. MEDIOUNI, A. MGAIDI and G. FERRARI, 2011. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion based delivery systems. *Procedia Food Science*, 1: 1666-1671.
- EMAMJOMEH, L., S. IMANI, KH. TALEBI, S. MOHARRAMIPOUR and K. LARIJANI, 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.
- GUPTA, A., H. B. ERAL, T. A. HATTON and P. S. DOYLE, 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Royal Society of Chemistry*, 12: 2826-2841.
- HILL, D. S. 2002. Pests: class insecta. p. 135-316. In: "Pests of Stored Foodstuffs and Their Control". Kluwer Academic Publishers, Springer, Malaysia, 453 pp.
- ISMAN, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19 (8-10): 603-608.
- JAMAL, M., S. MOHARRAMIPOUR, M. ZANDI and M. NEGAHBAN, 2012. 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.
- JEMAA, J. M., N. TERSIM and E. BOUSHIH, 2013. Fumigant control of the mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* with the noble laurel *Laurus nobilis* essential oils. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 8: 33-44.
- KAVADIA, M. R., M. G. YADAV, A. A. ODANETH and A. M. LALI, 2017. Production of glycerol monostearate by immobilized *Candida antarctica* B lipase in organic media. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 2: 1-7.
- KHOODELI, M., M. AHSAEI and M. FARZANEH, 2017. Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with *Rosmarinus officinalis* essential oil in

- Tribolium castaneum* (Herbst): Insecticidal activity of nanocapsules. *Entomological Research*, 47: 175-184.
- LAI, F., S. A. WISSING, R. H. MULLER and A. M. FODDA, 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.
- MAJEED, H., Y. Y. BIAN, B. ALI, A. JAMIL, U. MAJEED, Q. FARID, K. J. IQBAL, C. F. SHOEMAKER and ZH. FANG, 2015. *Essential Oil Encapsulations: Uses, Procedures, and Trends*. The Royal Society of Chemistry, 5: 58449-58463.
- MOHARRAMIPOUR, S. and M. NEGAHBAN, 2014. Basic and applied aspects of biopesticides. *Plant Essential Oil and Pest Management*. In: Sahayaraj, K. (eds) *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. Springer, New Delhi, India, 384 pp.
- MORETTI, M. D. L., G. SANNA-PASSINO, S. DEMONTIS and E. BAZZONI, 2002. Essential oil formulations useful as a new tool for the insect pest control. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 3: 1-11.
- NEGAHBAN, M. 2012. Insecticidal properties 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., S. MOHARRAMIPOUR and F. SEFIDKON, 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., S. MOHARRAMIPOUR, M. ZANDI and S. A. HASHEMI 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., S. MOHARRAMIPOUR, M. ZANDI and S. A. HASHEMI 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., S. USAWADEE, N. UAWONGYART, S. PUTTIPIATKHACHORN, A. SOOTTITANTAWAT and U. RUKTANONCHAI, 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., E. BAZZONI and M. D. L. MORETTI, 2004. Microcapsulated essential oils active against Indian meal moth. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 30: 125-132.
- SAEIDI, M. and S. MOHARRAMIPOUR, 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.
- SEVEG, D., N. NITZAN, D. CHAIMOVITSH, A. ESHEL, and N. DUDAI, 2012. Chemical and morphological diversity in wild populations of *Mentha longifolia* in Israel. *Chemistry and Biodiversity*, 9: 577-587.
- SHAKARAMI, J., M. FALAHZADEH and S. ALMASI, 2010. Fumigation toxicity and oviposition deterrence of four plant essential oils on cowpea beetle. *Plant Protection Journal*, 2: 265-276.
- SHAKARAMI, J., L. POURHOSSEINI, R. VAFAEI-SHOUSHTARI and S. GOLDASTEHEH, 2008. Ovicidal effect of three plant essential oils on *Callosobruchus maculatus* F. (Col., Bruchidae). *Journal of Entomological Research*, 3: 221-228.
- SPSS, 2007. *SPSS 16 for Windows User's Guide Release*, Spss Inc, Chicago.
- TOPUZ, O. K., E. B. OZVURAL, Q. ZHAO, Q. HUANG, M. CHIKINDAS and M. GULUKCU, 2016. Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food Chemistry*, 203: 117-123.
- ZIAEE, M., S. MOHARRAMIPOUR and A. MOHSENI FAR, 2014. Toxicity of *Carum copitum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. *Journal of Applied Entomology*, 138, 763:771.