

## اثرات فرمولاسیون اسانس نانوکپسوله شده گیاه زیره سبز *Cuminum cyminum* روی کنه قرمز

### مرکبات *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae)

محمد بشیری<sup>۱</sup>، سعید محرمی پور<sup>۱\*</sup>، مریم نگهبان<sup>۲</sup> و شعبانعلی مافی پاشاکولایی<sup>۳</sup>

۱- گروه حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۲- بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران، ۳- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ساری  
\*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moharami@modares.ac.ir

### Effects of nanoencapsulated formulation of *Cuminum cyminum* essential oil on *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae)

M. Bashiri<sup>1</sup>, S. Moharramipour<sup>1&\*</sup>, M. Negahban<sup>2</sup> and SH. Mafi Pashakolaei<sup>3</sup>

1- Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 2- Pesticide Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran, 3- Agricultural and Natural Resources Research Center of Mazandaran, Sari, Iran.

\*Corresponding author, E-mail: moharami@modares.ac.ir

*Journal of Entomological Society of Iran*, 2016, 36 (3): 151-162.

#### چکیده

کنه قرمز مرکبات *Panonychus citri* McGregor، از آفات مهم مرکبات می‌باشد و انتشار جهانی دارد. امروزه به علت مشکلات ناشی از آفت‌کش‌های شیمیایی مانند بروز مقاومت و خطرات زیست محیطی، استفاده از اسانس‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. با این حال، حلالیت کم اسانس‌ها در آب، اکسیداسیون و ناپایداری در حضور نور، رطوبت و حرارت از عمده‌ترین موانع استفاده از اسانس‌ها می‌باشد. یکی از راهکارهای عمده در راستای اصلاح خواص فیزیکی اسانس‌ها و کاربردی کردن مصرف آن در کنترل آفات کشاورزی، فرموله کردن آنها می‌باشد. در این راستا اسانس گیاه زیره سبز *Cuminum cyminum* L. از طریق پلیمریزاسیون همزمان به روش امولسیون روغن در آب (O/W) به صورت نانوکپسول فرموله شد. سپس خواص کنه‌کشی نانوکپسول حاوی اسانس روی کنه قرمز مرکبات مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش سمیت تماسی مشخص شد  $LC_{50}$  نانوکپسول اسانس روی کنه قرمز مرکبات در مدت ۲۴ ساعت برابر با ۷۴۳/۱۷ پی‌پی‌ام می‌باشد. فرمولاسیون نانوکپسول اسانس علاوه بر ایجاد مرگ و میر ایجاد شده، تعداد کل تخم‌های گذاشته شده را نیز به طور معنی‌داری کاهش داد. در ادامه اثر بازدارندگی فرمولاسیون نانوکپسول اسانس در غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ پی‌پی‌ام مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که به جز غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام، در غلظت‌های بالاتر اثرات بازدارندگی دارد. همچنین فرمولاسیون نانوکپسول اسانس اثر بازدارندگی تخم‌ریزی داشت و تعداد تخم‌های گذاشته شده به ازای هر فرد ماده کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. بنابراین می‌توان گفت تکنولوژی پیشرفته فرمولاسیون همانند نانوکپسوله سازی این امکان را به آفت‌کش‌های گیاهی می‌دهد تا بتوانند جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی شوند. کلید واژه: کنه قرمز مرکبات، آفت‌کش گیاهی، مدیریت آفات، فرمولاسیون، نانوکپسول

#### Abstract

Citrus red mite, *Panonychus citri* McGregor is one of the most important pests of citrus orchards in the world. Due to excessive use of chemical pesticides and development of resistance plus their increasing environmental hazards, the use of essential oils has been highly studied. But the low solubility of essential oils in water, oxidation, in addition to their instability in presence of light, humidity and high temperature has diminished their application. Formulation technology is one of the main strategies that can modify the physical properties and the viability of the essential oils in agricultural pest management programs. In this research, the essential oil of *Cuminum cyminum* L. was encapsulated by in situ polymerization of oil/water emulsion in nano scale and then the effects of nanoencapsulated essential oil (NEO) were analyzed against *P. citri*. The results showed that  $LC_{50}$  of NEO's contact toxicity was 743.17 ppm over 24 hours. NEO also affected mortality and decreased oviposition rate in *P. citri*. NEO had deterrence capacity at 300, 500 and 700 ppm. Moreover, NEO had oviposition deterrence, lowering the number of eggs per female compared to the control. Our finding suggests that high-tech formulations including nanoencapsulation technology can be used as botanical pesticides and as alternatives to chemical pesticides.

**Key words:** Citrus red mite, botanical pesticides, pest management, formulation, nanocapsul

## مقدمه

گیاهی صورت گرفته است. در این رابطه Haririmoghadam *et al.* (2011) تاثیر کشندگی و بازدارندگی اسانس چند گونه اکالیپتوس را روی کنه تارتین دولکه‌ای مورد مطالعه قرار داده است. همچنین توسط Arabi *et al.* (2007) تاثیر حشره‌کشی اسانس بذر زیره سبز (*Cuminum cyminum* L. (Apiaceae)) روی برخی آفات انباری گزارش شده است. گیاه زیره سبز گیاهی معطر با مصارف دارویی و غذایی می باشد. این گیاه به دلیل بازدهی تولید اسانس بالا و قابلیت کشت وسیع در مزارع برای انجام این پژوهش انتخاب شد. اسانس‌های گیاهی به دلیل محدودیت‌هایی نظیر حلالیت پایین در آب، فرار بودن و دوام کم ( Pillmoor *et al.*, 1993; Rajendran & Sriranjini, 2008) ماهیت شیمیایی آن‌ها تغییر نکند فرموله شوند و سپس مورد استفاده قرار بگیرد. در همین راستا Negahban, *et al.* (2013) اسانس گیاه درمنه شرقی *Artemisia sieberi* Besser را با استفاده از روش پلی اوره فرمالدهید به صورت نانو کپسول فرموله کرد و روی بید کلم *Plutella xylostella* L. مورد مطالعه قرار داد. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد فرمولاسیون نانو کپسول می‌تواند در کنترل آفات موفقیت آمیز باشد. همچنین Jamal *et al.* (2013) اثر نانو کپسول اسانس گیاه زنیان *Carum copticum* Clarke که با استفاده از روش پلی اوره فرمالدهید بدست آمده بود را روی بید کلم بررسی کرد و نتایج رضایت بخشی بدست آورد. Ziaee *et al.* (2014a) نیز فرمولاسیون نانو ژل اسانس زنیان را موثرتر و با دوام تر از اسانس خالص ارزیابی کرده است. در سایر کشورها نیز پژوهش‌های Sanna Passino & Moretti (2004) روی شب پره هندی *Plodia interpunctella* (Hübner) با فرمولاسیون *Rosmarinus officinalis* L. میکرو کپسول اسانس رزماری و آویشن *Thymus vulgaris* L. نشان داد که با استفاده از

کنه قرمز مرکبات، *Panonychus citri* McGregor (Acari: Tetranychidae) از گیاهان گوناگون تغذیه می‌کند اما مرکبات جزء اصلی‌ترین میزبان‌های آن به شمار می‌آید (Migeon & Dorkeld, 2014). کنه قرمز مرکبات مانند کنه تارتین دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) قدرت تکثیر بالا و چرخه زندگی کوتاهی دارد با این تفاوت که کنه قرمز مرکبات در شرایط خنک و به نسبت مرطوب به حالت طغیانی در می‌آید، به همین دلیل طی فصول بهار و پاییز به یکی از خسارت‌زا ترین آفات مرکبات در استان‌های شمالی مبدل می‌شود. *P. citri* با تغذیه از شیره گیاهی باعث ایجاد زخم در بافت برگ و میوه می‌شود که اگر تراکم‌های بالای آفت همراه با باد پاییزی باشد، برگ‌ها به طور ناگهانی خشک‌شده و روی درخت باقی می‌ماند (Vacante, 2010). کنترل شیمیایی عمده‌ترین روش کنترل کنه قرمز مرکبات می‌باشد. اگر چه دشمنان طبیعی کنه قرمز مرکبات در منطقه حضور دارند اما فشار سموم شیمیایی علیه آفات مرکبات، مانع از توسعه فعالیت آنها می‌شود. همچنین استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی مقاوم شدن آفت به بیشتر کنه‌کش‌های رایج را فراهم کرده است (Liu *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011).

در سال‌های اخیر استفاده از آفت‌کش‌های گیاهی به عنوان جایگزینی مناسب برای آفت‌کش‌های شیمیایی توصیه شده است. در این میان اسانس‌های گیاهی به دلیل دارا بودن سمیت تنفسی، تماسی، اثرات دورکنندگی، ضد تغذیه‌ای و همچنین کم‌خطر بودن آن برای انسان و سایر پستانداران جایگاه ویژه‌ای در کنترل آفات پیدا کرده‌اند (KéiTa *et al.*, 2000; Papachristos & Stamopoulos, 2002). مطالعات اندکی در رابطه با تاثیر اسانس‌های گیاهی روی کنه‌های آفت

گرم بذر گیاه با ۶۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای مدل Clevenger (ساخته شده در واحد شیشه‌گری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. زمان اسانس‌گیری برای هر نمونه ۴ ساعت در نظر گرفته شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آب‌گیری و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای به حجم ۲ میلی‌لیتر با روپوش آلومینیومی در داخل یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Negahban et al., 2006). راندمان اسانس بذر زیره سبز حداقل ۴ و حداکثر ۵ درصد وزنی بود.

#### تهیه فرمولاسیون نانوکپسول اسانس

تمام مراحل فرمولاسیون در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. برای تهیه نانوکپسول‌های حاوی اسانس گیاه زیره سبز از روش پلیمراسیون همزمان (In situ polymerization technique) (افزایشی- تراکمی) به روش امولسیون روغن در آب (O/W) استفاده شد (Negahban et al., 2013). اسانس گیاهان به عنوان هسته نانوکپسول و اوره و فرمالدئید ۳۷ درصد برای تهیه پیش پلیمرهای اوره-فرمالدئید (U-F) که ماده تشکیل دهنده دیواره نانوکپسول‌ها است، انتخاب شدند. به منظور تهیه پیش پلیمر، اوره و فرمالدئید محلول در آب به راکتور مجهز به هموژنایزر منتقل شدند. بعد از این که پیش پلیمر اوره فرمالدئید (U-F) آماده شد دور همزن را بالا برده و امولسی‌فایر به تدریج اضافه شد و سپس اسانس را به صورت قطره قطره اضافه کرده و سپس pH محلول را اسیدی کرده تا دیواره پلی اوره فرمالدئید ذرات اسانس را در برگیرد. بعد از گذشت ۴ ساعت واکنش کامل و نانوکپسول‌های

میکروکپسول اسانس مرگ و میر افزایش قابل توجهی داشته و با گذشت ۲۵ روز میکروکپسول‌ها هنوز حاوی ۷۵ درصد اسانس بودند. لذا در این پژوهش بررسی اثر سمیت تماسی، بازدارندگی و میزان بازدارندگی تخم‌ریزی نانوکپسول اسانس گیاه زیره سبز روی کنه قرمز مرکبات انجام شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه جمعیت کنه قرمز مرکبات

باغ‌های پرتقال رقم تامسون در نزدیکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ساری واقع در روستای پهناب که آلوده به کنه قرمز مرکبات بودند برای نمونه‌برداری انتخاب شدند. برگ‌های آلوده به نهال‌های نارنج منتقل شده و کلنی آزمایشگاهی تشکیل شد. برای هم‌سن سازی کنه قرمز مرکبات، برگ‌های آلوده به این کنه، جمع‌آوری شده و مرحله استراحت آخر کنه‌های ماده زیر استریومیکروسکوپ با استفاده از قلم موی ظریفی جمع‌آوری و روی برگ قرار گرفته در پتری دارای پنبه خیس، منتقل شدند. کنه‌های نر نیز به نسبت  $\frac{1}{4}$  تعداد ماده‌ها به برگ حاوی مرحله استراحت کنه‌های ماده اضافه شدند تا بلافاصله پس از ظهور ماده‌های بالغ، جفت‌گیری انجام گیرد. حداکثر ۲۴ ساعت بعد تمام کنه‌هایی که در مرحله استراحت بودند تبدیل به کنه بالغ می‌شوند و سه روز پس از آن کنه‌های ماده‌ای که هم سن هستند و جفت‌گیری نیز کرده‌اند، آماده انجام آزمایشات می‌باشند.

##### استخراج اسانس

جهت تهیه اسانس، ابتدا بذور گیاه زیره سبز تهیه شده از جهاد دانشگاهی مشهد، با کمک خردکن برقی به صورت پودر درآمدند. در هر نوبت اسانس‌گیری ۴۰

و برگ را به دو ناحیه مربعی شکل تقسیم کند. برای جلوگیری از خشک شدن، سطح پایینی برگ‌ها روی پنبه خیس درون پتری قرارگرفتند زیرا این کنه بر خلاف کنه تارتین دولکه‌ای عمدتاً در سطح بالایی برگ فعالیت بیشتری دارند. غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ پی‌پی‌ام از فرمولاسیون تهیه شد و ۳۰ میکرولیتر از هر غلظت با سمپلر روی نیمه تیمار برگ‌ها قرار داده شد و با کناره سرسمپلر به طور یکنواخت در سطح مورد نظر پخش شد و ۳۰ میکرولیتر آب مقطر نیز به عنوان شاهد در نیمه دیگر برگ پخش شد. پس از خشک شدن سطح برگ‌ها، تعداد ۱۰ کنه ماده بالغ روی رگبرگ اصلی رهاسازی شدند و پس از ۶ و ۱۲ ساعت تعداد کنه‌ها در هر نیمه برگ شمارش شدند.

برای محاسبه درصد بازدارندگی (PD=Percent Deterrency) غلظت‌های مختلف فرمولاسیون نانو کپسول اسانس از فرمول زیر استفاده شد (Liu et al., 2006):

$$PD = \left[ \frac{C-E}{T} \right] \times 100$$

C = تعداد کنه‌ها در نیمه شاهد برگ

E = تعداد کنه‌ها در نیمه تیمار برگ

T = تعداد کل کنه‌ها

همچنین شاخص بازدارندگی (Deterrency Index) غلظت‌های مختلف فرمولاسیون نانو کپسول اسانس زیره سبز از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$DI = \frac{2G}{(G+P)}$$

G = تعداد کنه‌های موجود در سمت تیمار برگ

P = تعداد کنه‌های موجود در سمت شاهد برگ

برای هر DI محاسبه شده، میانگین (Mean) و

انحراف معیار (Standard deviation) تعیین شد.

اگر میانگین کمتر از ۱-SD بود، ترکیب دارای خاصیت بازدارندگی می‌باشد.

پایدار تشکیل شدند (Negahban et al., 2012 a,b). مقدار اسانس زیره سبز متناسب با مقدار مواد به کار رفته در فرمولاسیون انتخاب شد به طوری که فرمولاسیون حاوی ۲ درصد ماده موثره اسانس باشد.

### تعیین سمیت تماسی

پس از انجام آزمایش مقدماتی، غلظت‌های ۵۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۳۰۰ و ۲۰۰۰ برای انجام آزمایش اصلی جهت تعیین LC<sub>50</sub> فرمولاسیون نانو کپسول حاوی اسانس گیاه زیره سبز تعیین شد. دیسک‌های برگ‌ها به قطر ۲ سانتی‌متر از برگ‌های پرتقال رقم تامسون تهیه و درون پتری‌های ۶ سانتی‌متری روی پنبه خیس قرار داده شد. تعداد ۱۰ کنه ماده بالغ به هر کدام منتقل شد. به مدت نیم ساعت کنه‌ها به حال خود رها شدند تا روی دیسک برگ‌ها استقرار پیدا کنند. سپس یک میلی لیتر از هر غلظت توسط دستگاه اسپری متصل به کپسول گاز نیتروژن ساخت شرکت پلیکان روی دیسک‌های برگ‌ها پاشیده شد. یک میلی لیتر آب مقطر نیز روی تکرارهای شاهد پاشیده شد. پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد (دمای ۲۵±۱ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵±۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شدند و پس از آن تعداد کنه‌های مرده و زنده و همچنین تعداد تخم گذاشته شده شمارش شدند. کنه‌ها در صورت عدم حرکت ضامن بدن در اثر تحریک با قلم‌مو، مرده محسوب می‌شدند. مقدار LC<sub>50</sub> با نرم افزار SPSS 18 محاسبه شد.

### بررسی اثر بازدارندگی

در این آزمایش برگ‌های پرتقال به شکل مستطیلی و در ابعاد ۲×۴ سانتی‌متر طوری بریده شدند که رگبرگ اصلی برگ در وسط این مستطیل قرارگرفته

کنه قرمز مرکبات در مدت ۲۴ ساعت برابر با ۷۴۳/۱۷ پی‌پی‌ام می‌باشد (جدول ۱). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که افزایش غلظت به طور معنی‌داری موجب افزایش درصد مرگ و میر کنه قرمز مرکبات می‌شود. به عنوان مثال در غلظت ۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب موجب مرگ و میر حدود ۳۲ و ۹۳ درصد از کنه‌ها شده که مقادیر این تلفات با یکدیگر دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند. به علاوه در این آزمایش کاهش معنی‌داری در مجموع تخم‌ریزی توسط کل ماده‌ها دیده می‌شود (جدول ۲).

#### بررسی اثر بازدارندگی فرمولاسیون نانوکپسول

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت نانوکپسول حاوی اسانس، درصد بازدارندگی افزایش یافته و شاخص بازدارندگی از خشتی بودن به طرف وجود بازدارندگی تغییر می‌یابد به طوری که در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام بر اساس شاخص بازدارندگی هیچ‌گونه اثر بازدارندگی در هیچ‌کدام از زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار مشاهده نمی‌شود ولی در غلظت ۷۰۰ پی‌پی‌ام درصد بازدارندگی بعد از ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار به ترتیب ۸۰ و ۶۷ درصد می‌باشد و شاخص بازدارندگی نشان‌دهنده وجود اثر بازدارندگی می‌باشد (شکل ۲ و جدول ۳).

اگر میانگین بیشتر از ۱+SD بود، ترکیب دارای خاصیت جلب‌کنندگی می‌باشد. اگر میانگین بین ۱-SD و ۱+SD بود، ترکیب بی‌اثر می‌باشد.

#### بررسی اثر بازدارندگی تخم‌ریزی فرمولاسیون نانوکپسول اسانس گیاه زیره سبز روی کنه قرمز مرکبات

برای این منظور غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام تهیه شد. از آب مقطر نیز به عنوان شاهد استفاده شد. دیسک‌های برگی پرتقال رقم تامسون به قطر ۲ سانتی‌متر به مدت ۱۰ ثانیه درون هرکدام از غلظت‌های مورد مطالعه غوطه‌ور شدند. پس از خشک‌شدن، داخل پتری دارای پنبه خیس منتقل شدند. تعداد ۵ کنه ماده بالغ کنه قرمز مرکبات روی هرکدام از دیسک‌های برگی قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت تعداد تخم‌های گذاشته شده روی هر دیسک برگی شمارش شدند و تعداد تخم گذاشته شده به ازای هر کنه ماده محاسبه شد. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS 18 تجزیه آماری شدند.

#### نتایج

##### بررسی سمیت تماسی

براساس نتایج مشخص شد که مقدار LC<sub>50</sub> برای فرمولاسیون نانوکپسول حاوی اسانس روی ماده بالغ

جدول ۱- مقادیر LC<sub>50</sub> محاسبه شده در بررسی سمیت تماسی فرمولاسیون نانوکپسول حاوی اسانس گیاه زیره سبز روی کنه قرمز مرکبات پس از ۲۴ ساعت

**Table 1.** LC<sub>50</sub> valus of the nanoencapsulated essential oil of *Cuminum cyminum* on *Panonychus citri* adult female after 24 hour.

Treatment	N	$\chi^2$ (df)	P - Value	Slope $\pm$ SE	LC <sub>50</sub> (ppm)	95% CL (ppm) <sup>1</sup>
Nanocapsule	178	1.13 (3)	0.77	3.63 $\pm$ 0.59	743.17	617.58 - 850.55

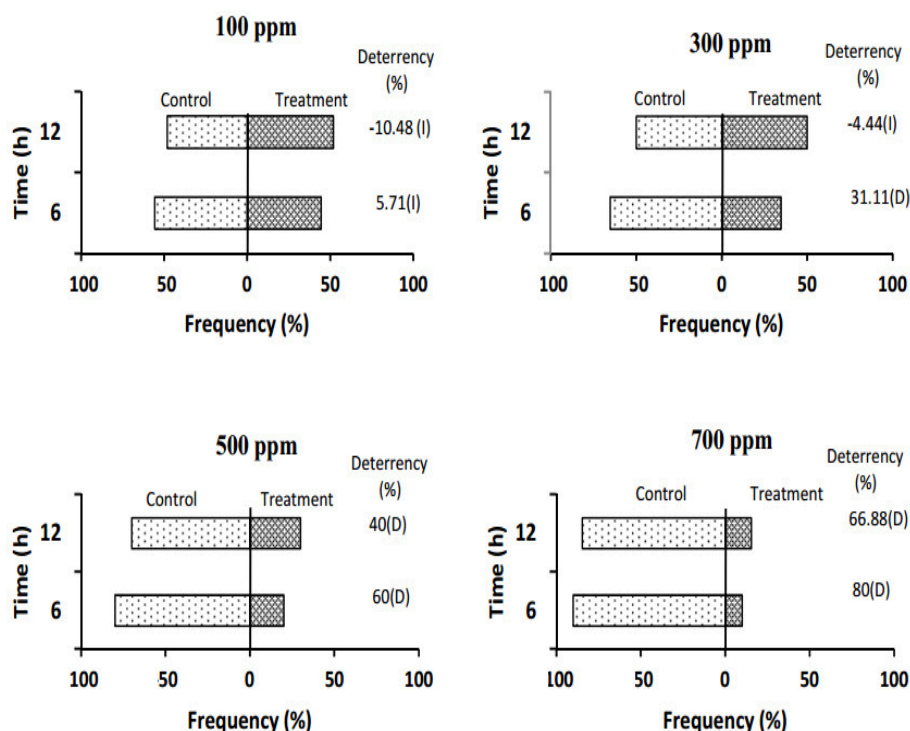
<sup>1</sup> CL= Confidence Limits

جدول ۲ - بررسی سمیت تماسی فرمولاسیون نانوکپسول اسانس گیاه زیره سبز روی مرگ و میر و میزان تخم‌ریزی کنه‌های بالغ کنه قرمز مرکبات پس از ۲۴ ساعت

**Table 2.** Effects of contact toxicity of nanoencapsulated essential oil of *Cuminum cyminum* on mortality and oviposition rate of *Panonychus citri* adults after 24 hour.

Concentrations (ppm)	% mortality $\pm$ SE <sup>1</sup>	No. of eggs/ adult $\pm$ SE <sup>1</sup>
0	0 <sup>c</sup>	1.52 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
500	31.99 $\pm$ 11.86 <sup>bc</sup>	0.99 $\pm$ 0.51 <sup>ab</sup>
800	78.96 $\pm$ 16.35 <sup>abc</sup>	0.50 $\pm$ 0.50 <sup>ab</sup>
1000	74.44 $\pm$ 12.52 <sup>ab</sup>	0.41 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>
1300	82.50 $\pm$ 11.81 <sup>ab</sup>	0.13 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
2000	92.86 $\pm$ 7.14 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
F <sub>5, 18</sub>	9.467	3.248
P	<0.001	0.029

<sup>1</sup> Means followed by the same letters in each column do not differ significantly (Tukey's test,  $p < 0.05$ ).



شکل ۱- درصد بازدارندگی و نمودار فراوانی کنه قرمز مرکبات در دو نیمه برگ مرکبات تیمار شده (اسانس نانوکپسوله) و شاهد (آب مقطر) در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف. علائم I و D به ترتیب بیانگر بازدارندگی و بی‌اثر می‌باشند.

**Fig. 1.** Percent deterrence and frequency of *Panonychus citri* on both treated (nanoencapsulated essential oil) and control (distilled water) side of citrus leaf disks. "D" and "I" indicate deterrent and indifferent, respectively.

**جدول ۳ -** شاخص بازدارندگی اسانس نانوکپسوله شده گیاه زیره سبز روی کنه قرمز مرکبات در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف

**Table 3.** Deterrence index of nanoencapsulated essential oil of *Cuminum cyminum* on *Panonychus citri* at different concentrations and times.

Concentration (ppm)	Time of exposure (h)	Deterrence index	1-SD, 1+SD	Effect
100	6	0.94	0.57 - 1.43	Indifferent
	12	1.10	0.04 - 1.96	Indifferent
300	6	0.69	0.90 - 1.10	Deterrent
	12	1.04	0.73 - 1.27	Indifferent
500	6	0.4	0.80 - 1.20	Deterrent
	12	0.6	0.65 - 1.35	Deterrent
700	6	0.2	0.80 - 1.20	Deterrent
	12	0.33	0.79 - 1.21	Deterrent

#### بررسی اثر بازدارندگی تخم‌ریزی

ازای هر ماده در شاهد به طور معنی‌داری از تیمارها کمتر بود ( $F = 5.671, df = 7, 24, P = 0.001$ ). به عنوان مثال در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام از نانوکپسول حاوی اسانس، به طور متوسط ۱/۰۵ تخم توسط هر ماده در روز گذاشته شد، در حالی که در شاهد تخم‌ریزی هر ماده ۳/۲ تخم در روز بود (جدول ۴).

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که غلظت‌های مختلف فرمولاسیون نانوکپسول اسانس زیره سبز در میزان تخم‌ریزی ماده‌های بالغ کنه قرمز مرکبات موثر می‌باشند. به طوری که میانگین تعداد تخم گذاشته شده در غلظت‌های ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام معادل ۱/۴۵، ۱/۵۵ و ۱/۰۵ بود که تعداد تخم گذاشته شده به

**جدول ۴ -** میانگین تخم‌ریزی کنه قرمز مرکبات در غلظت‌های مختلف فرمولاسیون نانوکپسول اسانس زیره سبز طی ۲۴ ساعت

**Table 4.** Average oviposition of *Panonychus citri* at different concentrations of nanoencapsulated essential oil of *Cuminum cyminum* during 24 hour.

Treatment	Concentration (ppm)	No. of eggs / female/day (Mean ± SE) <sup>1</sup>
NEO	1000	1.05 ± 0.33 <sup>b</sup>
NEO	500	1.55 ± 0.38 <sup>b</sup>
NEO	300	1.45 ± 0.38 <sup>b</sup>
NEO	100	1.75 ± 0.6 <sup>ab</sup>
Distilled water	0	3.2 ± 0.18 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Means followed by the same letters in a column do not significantly different (Tukey's test,  $p < 0.05$ ).  
NEO : Nanoencapsulated essential oil

## بحث

تا قبل از این مطالعه گزارشی مبنی بر اثر سمیت تماسی اسانس گیاه زیره سبز روی کنه قرمز مرکبات ارائه نشده بود. اما با این حال پژوهش‌های مختلفی روی سمیت تنفسی و تماسی اسانس‌های گیاهی دیگر روی کنه‌های نباتی از جمله کنه تارتن دولکه‌ای انجام گرفته است. (LC<sub>50</sub> Haririmoghadam *et al.* (2011). دو گونه اکالیپتوس *E. kingsmillii* و *E. salmonophloia* را روی کنه تارتن دولکه‌ای به ترتیب ۳/۴۲ و ۳/۱۰ میکرولیتر بر لیتر هوا گزارش کرده است. همچنین El-Moneim *et al.* (2012). LC<sub>50</sub> تماسی اسانس‌های گیاهان *Chamomile recutita* (L.)، *Marjorana hortensis* (L.) و *Eucalyptus* sp. را روی کنه تارتن دولکه‌ای به ترتیب ۶۵۰۰، ۱۸۴۰۰ و ۲۱۸۰۰ پی‌پی‌ام به دست آوردند. همچنین LC<sub>50</sub> تماسی اسانس خالص زیره سبز روی کنه تارتن دولکه‌ای ۶۳۴۰/۵ پی‌پی‌ام محاسبه شده است (Bashiri *et al.*, 2014). بنابراین مشخص می‌شود که سمیت تنفسی اسانس‌های گیاهی بسیار بیشتر از سمیت تماسی آنها می‌باشد. از آنجا که اسانس‌های گیاهی دارای مکانیسم اثر عصبی در مرگ و میر بند پایان می‌باشند (Enan, 2001)، بالا بودن سمیت تنفسی نسبت به تماسی می‌تواند به این دلیل باشد که در سمیت تنفسی ترکیبات اسانس به راحتی از طریق روزنه‌های تنفسی وارد بدن حشرات و کنه‌ها می‌شود و به طور مستقیم روی سلول‌های عصبی اثر می‌کنند ولی در حالت تماسی می‌بایست مسیر جلد و همولف را طی کرده و سپس به سلول‌های عصبی برسد که در طی این مسیر مقدار کمی از اسانس وارد بدن بندپا می‌شود و همچنین مقداری از اسانس متابولیزه شده و اثر کشندگی خود را از دست می‌دهد. با این حال با توجه به این که در اکوسیستم‌های مزرعه‌ای فضای بسته‌ای وجود ندارد و در صورت مصرف اسانس‌های گیاهی به عنوان

آفت‌کش هیچ‌وقت فشار بخار آن به اندازه‌ای نمی‌رسد که سمیت تنفسی ایجاد کند، بنابراین با وجود مصرف غلظت بالای اسانس در سمیت تماسی، پژوهش‌ها روی اثرات تماسی اسانس‌ها کاربردی‌تر از سمیت تنفسی می‌باشد. از این رو باید به دنبال راهکارهایی بود تا اثرات آفت‌کشی اسانس‌های گیاهی را بالا برد و دز مصرفی آن را پایین آورد. می‌توان از پژوهش حاضر نتیجه‌گیری کرد که اسانس‌ها از طریق نانو کپسوله شدن، مرگ و میر کنه‌ها را افزایش می‌دهند. اسانس با نانو کپسوله شدن می‌تواند پس از اسپری شدن، روی سطح بدن کنه و سطح غذا (سطح برگ) استقرار خود را افزایش دهد و در نتیجه موجب افزایش سمیت اسانس نانو کپسول شده می‌شود. هنگامی که اسانس نانو کپسول شده توسط دستگاه سم‌پاش روی کنه پاش می‌شود به دلیل دارا بودن قابلیت پخش شونده و تعلیق در آب، همه اندام‌های کنه را به طور کامل پوشش می‌دهد و ذرات نانو کپسول در برابر کشش سطحی دارای پایداری بیشتری شده و یسکوزیته آنها کم‌تر و موجب یکنواختی بیشتر پوشش می‌شوند. در نتیجه پس از تبخیر آب موجود در فرمولاسیون، کل اندام حشره به‌طور یکنواخت آلوده به نانو کپسول می‌شود (Negahban, 2012a). بنا به گزارش (Moretti *et al.* (2002). بیشترین مرگ و میر لاروهای ابریشم باف ناجور *Lymantria dispar* L. مربوط به زمانی است که ذرات میکرو کپسول به ساختارهای موی بدن لارو چسبیده باشد. (Negahban *et al.* (2010). نشان داد که سمیت تماسی فرمولاسیون نانو کپسول اسانس درمنه به مراتب بیشتر از سمیت تماسی اسانس فرموله نشده می‌باشد. در مطالعات (Ziaee (2014a, b) نیز ثابت شد که اثر سمیت فرمولاسیون نانوژل اسانس گیاهان زیره سبز و زنیان بیشتر از سمیت اسانس خالص می‌باشد. پژوهش‌های (Sanna Passino & Moretti (2004) روی



نیز بازدارندگی داشت. نانوکپسوله کردن اسانس موجب کاهش تبخیر سریع ترکیبات منوترپنی شده و به دلیل پخش یکنواخت‌تر و قدرت مواجهه بیشتر با سطح بدن حشره، قدرت بازدارندگی اسانس را بالا می‌برد. بنابراین نانوکپسول کردن اسانس‌ها نقش عمده و بسزایی در کارامدی و موثرتر واقع شدن آنها در کنترل آفات دارد.

تخم‌ریزی بالا در کنه‌های آفت گیاهی از عوامل اصلی طغیان سریع آنها می‌باشد از این رو سموم شیمیایی که دارای اثر تخم‌کشی نیز باشند موثرتر واقع می‌شوند. از طرفی برخی اسانس‌های گیاهی دارای اثر بازدارندگی تخم‌ریزی می‌باشند که می‌توانند جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی باشند. در همین راستا در این پژوهش مشخص شد که تمامی غلظت‌های فرمولاسیون نانوکپسول اسانس موجب کاهش معنی‌داری در تخم‌ریزی کنه‌های ماده کنه قرمز مرکبات می‌شوند. همچنین در پژوهشی که Attia et al. (2011) روی ترکیبات اصلی اسانس گیاه *Deverra scoparia* Coss. & Dur انجام دادند، مشخص شد که ۳ ترکیب اصلی Myrcene، Eugenol و  $\Delta$ -3-Carene به شدت باعث کاهش باروری کنه تارتن دولکه‌ای می‌شوند. از آنجایی که Myrcene نیز یکی از ترکیبات اصلی اسانس زیره سبز می‌باشد، کاهش تخم‌ریزی به وجود آمده در این پژوهش را نیز می‌توان به وجود آن نسبت داد.

در کل می‌توان نتیجه گرفت که فرمولاسیون نانوکپسول اسانس روشی کارآمد می‌باشد که مشکل فراریت و اکسیداسیون سریع اسانس‌ها را با ایجاد پوششی پلیمری پیرامون ذرات بسیار ریز اسانس حل می‌کند، همچنین با ایجاد حالت امولسیون به راحتی در آب حل می‌شود و مشکل عدم حلالیت اسانس‌ها در آب نیز رفع می‌شود. اسانس خالص در غلظت‌هایی که موجب مرگ و میر آفت می‌شود، به خود گیاه نیز به

شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* (Hübner) با فرمولاسیون میکروکپسول اسانس رزماری *Rosmarinus officinalis* L. و آویشن *Thymus vulgaris* L. نشان داد که با استفاده از میکروکپسول اسانس مرگ و میر افزایش قابل توجهی داشته و با گذشت ۲۵ روز میکروکپسول‌ها هنوز حاوی ۷۵ درصد اسانس بودند. در این پژوهش با افزایش غلظت فرمولاسیون نانوکپسول، مرگ و میر کنه قرمز مرکبات افزایش یافته و در نتیجه میانگین تخم‌ریزی کل نیز کاهش معنی‌داری پیدا کرد. (Roh et al., 2011) نیز در مطالعه اثر اسانس گیاه *Santalum austrocaledonicum* Vieill روی کنه تارتن دو لکه‌ای کاهش معنی‌داری در تعداد کل تخم‌های گذاشته شده توسط ماده‌ها را مشاهده کرد.

مطالعات رفتاری ثابت کرده است که کنه تارتن دولکه‌ای از رایحه گیاه برای میزبان‌یابی استفاده می‌کند (Boom et al., 2003). همچنین رایحه‌ای که برگ‌های لوبیا شدیداً آلوده به کنه تارتن دولکه‌ای تولید می‌کنند باعث دور شدن کنه‌ها می‌شود (Horiuchi et al., 2003). اسانس‌های گیاهی نیز ترکیبات فراری هستند و به نظر می‌رسد که روی سیستم بویایی کنه‌ها اثر گذاشته و موجب دورکنندگی یا بازدارندگی کنه‌ها می‌شوند. در آزمایش بازدارندگی مشاهده شد که با افزایش غلظت شاخص بازدارندگی از بی‌اثر بودن به سمت وجود اثر بازدارندگی تغییر می‌کند، هرچند که در این پژوهش اثر اسانس خالص مورد ارزیابی قرار نگرفت ولی در آزمایش مشابه دیگری (Pontes et al., 2007) اثر بازدارندگی اسانس گیاه *Protium heptaphyllum* (Aubl) را در غلظت‌های ۲۵۰۰، ۵۰۰۰، ۷۵۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام روی کنه تارتن دولکه‌ای مورد بررسی قراردادند که در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵۰۰ پی‌پی‌ام اثر بازدارندگی داشت. در حالی که اسانس فرموله شده در پژوهش حاضر در غلظت‌های پایین‌تر از ۷۰۰ پی‌پی‌ام

قیمت بالای اسانس‌های گیاهی از عوامل محدود کننده تجاری‌سازی این ترکیبات می‌باشد. به همین دلیل ما در این پژوهش از اسانس گیاه زیره سبز که راندمان بالایی در اسانس‌گیری داشته و قابلیت کشت وسیع را دارا می‌باشد استفاده کردیم. از این رو دور از ذهن نیست که در آینده‌ای نزدیک تولیدات تجاری این فرمولاسیون علیه آفات مختلف روانه بازار گردد و کشور را قدری از بلای سموم شیمیایی در امان نگاه دارد.

شدت خسارت وارد می‌کند ولی در این فرمولاسیون با پخش یکنواخت اسانس، غلظت پایین‌تری در تماس با گیاه قرار می‌گیرد و اثر گیاهسوزی به وجود نمی‌آورد. سمیت تماسی اسانس خالص به قدری کم هست که هیچ‌وقت امیدی به استفاده تجاری از آن در سطح وسیع وجود نداشت اما تکنولوژی نانو کپسوله سازی اسانس‌ها امیدها را برای جایگزین کردن اسانس‌های گیاهی با سموم شیمیایی زنده نگاه می‌دارد. با این حال همچنان

#### منابع

- Arabi, F., Moharramipour, S. and Sefidkon, F.** (2007) Insecticidal effects of essential oils from *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae) and *Perovskia abrotanoides* Karel (Lamiaceae) on some stored-product insects. *MSc Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran*. 121 pp.
- Attia, S., Grissa, K. L., Lognay, G., Heuskin, S., Mailleux, A.-C. & Hance, T.** (2011) Chemical composition and acaricidal properties of *Deverra scoparia* essential oil (Araliales: Apiaceae) and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 104(4), 1220-1228.
- Bashiri, M., Moharramipour, S., Negahban, M. & Mafi Pashakolaei, Sh.** (2014) Acaricidal activity of nano-encapsulated essential oil of *Cuminum cyminum* on two spotted spider mite. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Iranian Seminar of Organic Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran*.
- Boom, C. V. D., Beek, T. V. & Dicke, M.** (2003) Differences among plant species in acceptance by the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology*, 127(3): 177-183.
- El-Moneim, M. a. A., Fatma, S. A. & Turky, A.** (2012) Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of chamomile, marjoram and eucalyptus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), 24.
- Enan, E.** (2001) Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 325-337.
- Haririmoghadam, F., Moharramipour, S. & Sefidkon, F.** (2011) Repellent activity and persistence of essential oil from *Eucalyptus salmonophloia* F. Muell and *Eucalyptus kingsmillii* (Mauden) Maiden & Blakely on two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 27(3), 375-383.
- Horiuchi, J. I., Arimura, G. I., Ozawa, R., Shimoda, T., Takabayashi, J. & Nishioka, T.** (2003) A comparison of the responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38(1), 109-116.
- Jamal, M., Moharramipour, S., Zandi, M. & Negahban, M.** (2013) Efficacy of nanoencapsulated formulation of essential oil from *Carum copticum* seeds on feeding behavior of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 33, 23-31. [In Persian with English summary].
- KéiTa, S. M., Vincent, C., Schmit, J. P., Ramaswamy, S. & Bélanger, A.** (2000) Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 36(4), 355-364.

- Liu, C., Mishra, A., Tan, R., Tang, C., Yang, H. & Shen, Y.** (2006) Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource Technology*, 97(15), 1969-1973.
- Liu, Y., Jiang, H., Yuan, M., Fan, Y., Yang, L., Chen, J. & Wang, J.** (2010) Resistance monitoring and synergism on four acaricides against *Panonychus citri*. *Journal of Fruit Science*, 27, 323-327.
- Migeon, A. & Dorkeld, F.** (2014) Spider Mites Web. Available on: <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>
- Moretti, M. D., Sanna-Passino, G., Demontis, S. & Bazzoni, E.** (2002) Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPs Pharmaceutical Science and Technology*, 3(2), 64-74.
- Negahban, M., Moharramipour, S. & Sefidkon, F.** (2006) Chemical composition and insecticidal activity of *Artemisia scoparia* essential oil against three coleopteran stored-product insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 9(4), 381-388.
- Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. & Hashemi, S. A.** (2012a) Fumigant properties of nano-encapsulated essential oil from *Artemisia sieberi* on *Tribolium castaneum*. In: Navarro, S., Banks, H. J., Jayas, D. S., Bell, C. H., Noyes, R. T., Ferizli, A. G., Emekci, M., Isikber, A. A. & Alagu-sunda-ram, K. [Eds.] *Proceedings of the 9th. International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, Antalya, Turkey. 15 -19 October 2012, ARBER Professional Congress Services, Turkey pp: 101-105.
- Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M., Hashemi, S. A. & Ziaee, F.** (2012b) Nano-insecticidal activity of essential oil from *Cuminum cyminum* on *Tribolium castaneum*. In: Navarro, S., Banks, H. J., Jayas, D. S., Bell, C. H., Noyes, R. T., Ferizli, A. G., Emekci, M., Isikber, A. A. & Alagu-sunda-ram, K. [Eds.] *Proceedings of the 9th. International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, Antalya, Turkey. 15 -19 October 2012, ARBER Professional Congress Services, Turkey pp: 63-68.
- Negahban, M., Moharramipour, S. & Zandi, M.** (2010) Insecticidal activity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser on *Tribolium castaneum* and *Plutella xylostella*. *PhD Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran.*
- Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. & Hashemi, S. A.** (2013) Efficiency of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on nutritional indices of *Plutella xylostella*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 29(3), 692-708.
- Papachristos, D. & Stamopoulos, D.** (2002) Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 38(4), 365-373.
- Pillmoor, J. B., Wright, K. & Terry, A. S.** (1993) Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science*, 39(2), 131-140.
- Pontes, W. J. T., Oliveira, J. C. G. D., Câmara, C. a. G. D., Lopes, A. C., Júnior, G., Correia, M. G., Oliveira, J. V. D., Barros, R. & Schwartz, M. O. E.** (2007) Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Bursaceae). *Acta Amazonica*, 37(1), 103-109.
- Rajendran, S. & Sriranjini, V.** (2008) Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, 44(2), 126-135.
- Roh, H. S., Lim, E. G., Kim, J. & Park, C. G.** (2011) Acaricidal and oviposition deterring effects of santalol identified in sandalwood oil against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Journal of Pest Science*, 84(4), 495-501.
- Sanna Passino, G. & Moretti, M.** (2004) Microencapsulated essential oils active against indianmeal moth. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 30.
- Vacante, V.** (2010) *Citrus Mites: Identification, Bionomy and Control*. 378 pp. CABI.

- Yu, D. Y., Wang, C. F., Yu, Y., Huang, Y. Q., Yao, J. A. & Hu, J. F.** (2011). Laboratory selection for spiroticlofen resistance and cross-resistance in *Panonychus citri*. *African Journal of Biotechnology*, 10(17), 3424-3429.
- Ziaee, M., Moharramipour, S. & Mohsenifar, A.** (2014a) Toxicity of *Carum copticum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. *Journal of Applied Entomology* 138(10), 763-771.
- Ziaee, M., Moharramipour, S., & Mohsenifar, A.** (2014b) MA-chitosan nanogel loaded with *Cuminum cyminum* essential oil for efficient management of two stored product beetle pests. *Journal of Pest Science*, 87(4), 691-699.