

## ارزیابی سمیت تنفسی و اثر رفتاری اسانس نعنا و رزماری در سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات

اعظم امیری<sup>۱\*</sup> و فائزه باقری<sup>۲</sup>

۱. عضو هیات علمی (استادیار) دانشکده جغرافیا و برنامه ریزی محیطی، دانشگاه سیستان و بلوچستان

۲. عضو هیات علمی (استادیار) بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۳)

### چکیده

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات از آفات مهم حبوبات در مزرعه و انبار است که خسارت زیادی وارد می‌کند. اسانس گیاهان جایگزین مناسبی برای بسیاری از سموم در کنترل آفات هستند. در این پژوهش پاسخ رفتاری حشرات کامل تازه ظاهر شده سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات به سمیت تنفسی دو اسانس نعنا و رزماری مقایسه شد و تفاوت نحوه تأثیر آن‌ها با توجه به ترکیبات تشکیل دهنده بررسی شد. تغییرات رفتاری حشرات تحت تأثیر تیمار با اسانس بررسی و مرگ‌ومیر حشرات طی ۲۴ ساعت پس از تیمار، هر دو ساعت یک‌بار، بدون باز کردن درب پتری دیش شمارش شد. نتایج نشان دادند که سمیت هر دو اسانس از لحاظ آماری یکسان بود؛ ولی نوع رفتار حشره قبل از مرگ برای اسانس نعنا و رزماری تفاوت داشت. برخلاف اسانس نعنا، حشراتی که در معرض اسانس رزماری قرار گرفتند، علائم برانگیختگی بیش از حد، باز شدن بال‌های رویی و زیری، لرزش و تشنج منتهی به مرگ مشهود بود. با توجه به نتایج پژوهش، هر دو اسانس خاصیت حشره‌کشی قوی روی سوسک چهار نقطه‌ای داشتند، اما با توجه به علائم مرگ‌ومیر به نظر می‌رسد که اسانس رزماری می‌تواند با تأثیر روی گیرنده‌های گابا از یک‌طرف و مهار آنزیم استیل کولین استراز از طرف دیگر، بر سامانه عصبی اثر گذاشته و سبب مرگ حشره شود، ولی تحت تأثیر اسانس نعنا مرگ حشره بدون علائم خاصی رخ داد که نیاز به پژوهش بیشتر در خصوص نحوه اثر اسانس بر روی این حشره است.

واژه‌های کلیدی: اسانس، رزماری، نعنا، *Callosobruchus maculatus*

## Evaluation of fumigant toxicity and behavioral effect of mint and rosemary essential oils on the cowpea weevil

Azam Amiri<sup>1\*</sup> and Faezeh Bagheri<sup>2</sup>

1. Assistant Professor, College of Geography and Environmental Planning, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

2. Assistant Professor, Faculty member Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

(Received: June 12, 2020 - Accepted: March 6, 2020)

### ABSTRACT

The cowpea weevil is one of the most important pests of legumes in the farms and warehouses, which causes a lot of damage. Plant essential oils are an excellent alternative to many pesticides to control pests. In this study, the behavioral response of newly emerged cowpea weevil was compared against the fumigant toxicity of two essential oils of mint and rosemary, and then, the differences in their mode of action were examined according to the constituents. Insects' behavioral changes under the influence of essential oil treatment were investigated, and the mortality of insects was recorded up to 24 hours after treatment, every two hours, without opening the Petri dish lid. Results showed that the toxicity of both essential oils was statistically similar, but the type of insect behavior before death was different in the mint and rosemary essential oils. Unlike the mint essential oil, insects exposed to rosemary essential oil showed signs of overstimulation, the opening of the upper and lower wings, tremors, and death-related seizures. According to the research results, both essential oils had strong insecticidal properties on the cowpea weevil, but according to the symptoms of death, it seems that rosemary essential oil can affect GABAergic receptors on the one hand and acetylcholinesterase enzyme inhibition on the other hand and affects the nervous system and causes insect death, but under the influence of mint essential oil insect death occurred without specific symptoms, requiring further research about the mode of action of the essential oil in this insect.

**Keywords:** Essential oil, rosemary, mint, *Callosobruchus maculatus*

\* Corresponding author E-mail: azamamiri@eco.usb.ac.ir

### مقدمه

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera: Chrysomelidae) آفات مهم حبوبات در مزرعه و انبار است که با تخم‌گذاری بر روی حبوباتی مانند لوبیا چشم‌بلبلی، لوبیا، عدس و ماش و تغذیه لارو از آن‌ها خسارت زیادی وارد می‌کند (Adebayo and Oke, 2017).

روش‌های مختلفی برای کنترل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات مطالعه شده‌اند؛ از جمله آن‌ها می‌توان کنترل زیستی، اختلال در جفت‌گیری توسط تله‌های فرومونی، عقیم‌سازی، استفاده از حشره‌کش‌ها، اسانس‌های گیاهی و عصاره‌های گیاهی را نام برد (Ibrahim et al., 2017; Malaikozhundan and Vinodhini 2018; Viteri Jumbo et al., 2018; Moura et al., 2019).

اسانس گیاهان به دلیل خاصیت تجزیه‌پذیری سریع، ایمنی برای انسان و محیط‌زیست و به‌ویژه در صورت بروز مقاومت در برابر آفت‌کش‌ها، برای کنترل آفات بندپا به‌عنوان گزینه‌های جایگزین مناسبی برای بسیاری از ترکیبات شیمیایی مطرح هستند. اسانس‌ها به‌عنوان مواد تدخینی که می‌توانند اثر تماسی هم داشته باشند، با اختلال در مسیرهای عمده متابولیکی منجر به مرگ سریع، کاهش طول عمر و تغییر در فیزیولوژی حشرات می‌شوند. با توجه به قابلیت استفاده از اسانس‌ها به‌عنوان آفت‌کش‌های طبیعی، اثرات آن بر رشد و نمو حشرات یا مرگومیر آن‌ها به‌خوبی مطالعه شده‌اند (Deng et al., 2004; Schoonhoven et al., 2005; Plata-Rueda et al., 2017; Pourya et al., 2018; Gaire et al., 2019; Moura et al., 2019).

بسیاری از پژوهش‌ها نشان‌دهنده عملکرد عصبی اسانس‌ها است. به‌طوری‌که در حشرات باعث فلج شدن و به دنبال آن مرگ می‌شوند. سه سازوکار عمده برای عملکرد اسانس‌ها گزارش شده است: مهار آنزیم استیل کولین استراز، تأثیر روی گیرنده‌های گابا (GABA) و اثر روی واسطه شیمیایی سامانه اکتوپامینرژیک (Octopaminergic) (Mossa, 2016; Jankowska et al., 2018).

پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که اسانس‌ها فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را مهار می‌کنند. مهار این آنزیم باعث تجمع استیل کولین در محل سیناپس‌ها شده و در نتیجه آن، غشای پس سیناپسی به‌طور مداوم تحریک می‌شود و این حالت منجر به عدم تعادل در سامانه عصبی و در نهایت مرگ می‌شود (Mossa, 2016; Jankowska et al., 2018).

گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) مهم‌ترین انتقال‌دهنده پیام عصبی در سامانه عصبی و ماهیچه‌ها در پستانداران و حشرات است، اما در برخی موارد می‌تواند نقش انتقال‌دهنده پیام عصبی تحریک‌کننده را داشته باشد. گابا به گیرنده‌های خاص (GABARs) در سیناپس یا خارج از سیناپس متصل می‌شود. گیرنده‌های پیام‌رسان در حقیقت پروتئین‌های پیوندشده به غشا هستند که دارای جایگاه‌های شناسایی با آرایش فضای ویژه برای شناخت پیام‌رسان خود هستند و اغلب در ناحیه پس سیناپس قرار دارند (Mossa, 2016; Jankowska et al., 2018).

گرچه واکنش بین استیل کولین و گیرنده آن باعث باز شدن مستقیم کانال یونی می‌شود، در مورد اکتوپامین عکس‌العمل فیزیولوژیکی به‌طور غیرمستقیم و از طریق یک پیام‌رسان ثانوی، یعنی AMP حلقوی القا و تقویت می‌گردد. اثر این پیام‌رسان روی گیرنده، منجر به فعال شدن پروتئینی به نام آدنیلات سیکلاز می‌شود که این پروتئین ATP را به AMP حلقوی تبدیل می‌کند. بعداً این عمل، پروتئین کیناز هم فعال شده و پروتئین کانال یونی فسفریله می‌شود و در نهایت نفوذپذیری غشا تغییر می‌کند. اکتوپامین می‌تواند سطح کلسیم و AMP حلقوی را در سلول‌های عصبی افزایش دهد؛ علاوه بر این، برخی از ترکیبات موجود در اسانس، با اکتوپامین در اتصال به گیرنده‌های آن رقابت کرده و فعالیت عصبی را تغییر می‌دهند. اکتوپامین دارای نقش کلیدی به‌عنوان ناقل عصبی، تعدیل‌کننده عصبی و نوروهومون در سامانه عصبی حشرات بوده و عملکرد فیزیولوژیکی شبیه به نوراپی‌نفرین در مهره‌داران دارد. در نفوذپذیری یون‌های کلسیم در غشای سلول‌های ماهیچه‌ای اثر

### جمع‌آوری گیاه

برگ‌های رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و نعنا (*Mentha spicata*) از شهرستان زاهدان واقع در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شدند (عرض جغرافیایی: ۲۹.۴۵۱۹، طول جغرافیایی: ۶۰.۸۸۴۲ و ارتفاع از سطح دریا: ۱۳۵۲ متر). نمونه‌های گیاهی به مدت یک هفته در دمای اتاق خشک شده و سپس برای استخراج اسانس استفاده شدند.

### استخراج اسانس

برای اسانس‌گیری، حدود ۲۰۰ گرم برگ‌های خشک خردشده نمونه گیاهی به همراه ۶۰۰ میلی‌لیتر آب داخل بالن ریخته شده و سپس به مدت ۳ ساعت توسط دستگاه کلونجر (Clevenger) عمل استخراج و اسانس‌گیری انجام شد. پس از استخراج، آب اسانس‌ها توسط سولفات سدیم حذف شده و اسانس استخراج‌شده در یک شیشه که دور آن فویل آلومینیوم پیچیده شده بود، در جعبه تاریکی در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Heydarzade *et al.*, 2011).

### زیست‌سنجی

از حشرات کامل هم‌سن سازی‌شده با کمتر از ۲۴ ساعت عمر برای تعیین سمیت تنفسی اسانس‌ها استفاده شد. پس از آزمایش زیست‌سنجی اولیه برای تعیین دزهای مناسب، پس از تعیین حد بالا (۹۵ درصد مرگ‌ومیر) و حد پایین (۵ درصد مرگ‌ومیر) فاصله بین حد بالا و پایین مرگ‌ومیر با استفاده از یک معادله دو مجهولی و بر اساس فواصل لگاریتمی به ۵ غلظت (۳۷/۸۵، ۷۵/۷، ۱۱۳/۵۵ و ۱۵۱/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا) اسانس رزماری و نعنا تقسیم گردید. حدود غلظت‌ها برای زیست‌سنجی اصلی در هر دو اسانس یکسان انتخاب شد تا امکان مقایسه بهتری برای سمیت دو اسانس انجام شود. شاهد بدون هیچ تیماری در نظر گرفته شد و آزمایش‌ها در سه تکرار و هر تکرار با ۱۰ حشره انجام شدند. تمامی آزمایش‌ها در پتری دیش‌های درب‌دار به قطر ۶۰ میلی‌متر انجام شدند، بدین شکل که قسمت داخلی درب پتری دیش

گذاشته و موجب انقباضات ماهیچه‌ای می‌شود. اثرات رفتاری حاد و زیرکشنده ترکیبات اسانس روی حشرات و همچنین سمیت کم در پستانداران و دیگر مهره‌داران، نشان‌دهنده جایگاه هدف اکتوپارمیتیک در حشرات است (Enan, 2001; Farooqui, 2012).

پژوهش‌های پیشین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس نعنا و رزماری را مشخص کرده‌اند و سمیت آن‌ها را گزارش داده‌اند (Mirkazemi *et al.*, 2010; Zandi, 2010; Sohani and Ramezani, 2012; Malakootian & Hatami, 2013; Amin Afshar *et al.*, 2016; Azizi, 2019; Tabrizzad *et al.*, 2019; Dadkhah *et al.*, 2019). ولی این پژوهش‌ها رفتار حشره را تحت تأثیر این اسانس‌ها بررسی نکرده‌اند. هدف از پژوهش حاضر مقایسه سمیت تنفسی دو اسانس نعنا و رزماری بر حشرات کامل تازه ظاهرشده سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات و مقایسه چگونگی تغییر رفتار حشره تحت تأثیر تنفس این دو اسانس است. از آنجایی که لاروهای این حشره بلافاصله پس از تفریح تخم، وارد لوبیا شده و تا ظهور حشره کامل داخل لوبیا باقی می‌مانند، حشرات کامل تازه ظاهرشده برای پژوهش انتخاب شدند و نوع رفتار آن‌ها پس از تیمار با اسانس تا زمان مرگ مشاهده و با هم مقایسه شد.

### مواد و روش‌ها

#### پرورش حشرات

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، *C. maculatus* که از کلنی پرورش‌یافته در بخش حشره‌شناسی دانشگاه شیراز به دست آمده بود، روی لوبیای چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata*) در شرایط دمایی  $30 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $50 \pm 5$  درصد و تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شد. لوبیاهای قبل از استفاده، به مدت ۲۴ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا اطمینان حاصل شود که از قبل آلودگی به آفت نداشته باشند. پس از شکل‌گیری کلنی، حشرات کامل تازه ظاهرشده با کمتر از ۲۴ ساعت عمر، برای آزمایش‌ها به کار برده شدند. شرایط همه آزمایش‌ها همان شرایط پرورش حشره بود.

## نتایج

### نحوه تأثیر اسانس‌ها

نتایج نشان دادند که اسانس رزماری و نعنا تأثیر متفاوتی بر رفتار حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات داشتند؛ به طوری که نوع رفتار حشره قبل از مرگ در دو اسانس تفاوت داشت. حشراتی که در معرض ۱۵۱/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس نعنا قرار گرفته بودند، چند ساعت قبل از مرگ، بی حرکت به پشت افتاده و تغییری در وضعیت بال‌هایشان اتفاق نیفتاد؛ ولی حشراتی که در معرض همین غلظت از اسانس رزماری بودند، علاوه بر به پشت افتادن، بال‌پوش‌ها و بال‌های زیریشان باز شده و علایم برانگیختگی بیش از حد، لرزش و تشنج نشان دادند (شکل ۱). همچنین در این حشرات مقدار دفع فضولات به مراتب بیشتر از مقدار آن در حشرات تیمار شده با اسانس نعنا بود که در شکل ۱ به صورت نقاط سیاه قابل مشاهده است.

با کاغذ صافی کاملاً پوشانده و با چسب تثبیت شد و سپس غلظت‌های مربوط به هر اسانس، با سمپلر روی کاغذ صافی تعبیه شده در قسمت داخلی درپوش ریخته شد تا از تماس مستقیم اسانس با حشرات جلوگیری شود. سپس اطراف دهانه هر پتری برای اطمینان از عدم نشستی اسانس، با نوارهای پارافیلیم پوشانده شد. تغییرات رفتاری حشرات تحت تأثیر تیمار با اسانس بررسی و مرگ‌ومیر حشرات هر دو ساعت یک‌بار تا ۲۴ ساعت بدون اینکه درب پتری دیش‌ها باز شود، شمارش و میزان تلفات ثبت شد. حشرات بدون حرکت پا یا شاخک پس از ضربه زدن به پتری، به عنوان حشره مرده در نظر گرفته شدند (Robertson *et al.*, 2007). نتایج در محدوده اطمینان ۹۵ درصد بررسی و مقادیر  $LC_{50}$  و  $LT_{50}$  توسط نرم‌افزار پلو-پلاس (Polo-Plus) و تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ در محدوده اطمینان ۹۵ درصد جهت مقایسه مرگ‌ومیر انجام شد.



شکل ۱. تغییرات رفتار *C. maculatus* دو ساعت پس از قرار گرفتن در معرض اسانس‌های رزماری و نعنا با غلظت ۱۵۱/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا.

Figure 1. *C. maculatus* behavior changes 2 h after exposure to rosemary and mint essential oils with the concentration of 151.4  $\mu\text{L}/\text{air}$ .

تیمار، با حدود اطمینان ۹۵ درصد مطابق جدول‌های ۱ و ۲ برآورد شدند. نتایج تجزیه پروبیت داده‌های حاصل از سمیت تنفسی اسانس‌ها نشان دادند که

### آزمون زیست‌سنجی

غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد کشندگی اسانس نعنا و رزماری برای ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت پس از

ترتیب ۱۴۶/۸ و ۶۹/۵ میکرولیتر بر لیتر هوا بود، ولی از لحاظ آماری دو ترکیب با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند و فرضیه‌های برابری خط‌های رگرسیون (یکی بودن عرض از مبدأ و شیب خط‌ها) و موازی بودن (برابری شیب‌ها) رد نشدند (جدول‌های ۱ و ۲).

اسانس نعنا و رزماری هر دو به‌شدت برای سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات سمی بوده و دارای فعالیت حشره‌کشی قوی هستند. باین‌حال، اسانس نعنا به نسبت سمی‌تر بود. برای مثال، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تیمار،  $LC_{50}$  برای اسانس نعنا به ترتیب ۱۲۴/۳ و ۵۸/۶ میکرولیتر بر لیتر هوا و برای اسانس رزماری به

جدول ۱. تعیین میزان مرگ‌ومیر سوسک چهار نقطه‌ای تحت تیمار دوزها و زمان‌های مختلف اسانس رزماری

Table 1. Determination of the cowpea weevil mortality under treatment with different doses and times of the rosemary essential oil

Time (h)	n	Slope±SE	$\chi^2$	$LC_{10}$ ( $\mu\text{l}/\text{lair}$ )	$LC_{50}$ ( $\mu\text{l}/\text{lair}$ )	$LC_{90}$ ( $\mu\text{l}/\text{lair}$ )	P
6	270	2.02±0.66	4.85	50.5 (13.9-71.8)	216.4 (145.8-1009.2)	927.2 (371.4-57966.)	0.005
8	270	2.11±0.61	4.25	36.3 (9.7-54.5)	146.8 (110.8-299.0)	593.5 (294.0-6995.0)	0.002
10	270	2.20±0.57	5.66	29.1 (8.4-44.9)	111.2 (79.5-220.7)	425.0 (242.0-2243.4)	0.001
12	270	1.96±0.54	6.58	21.4 (3.7-36.9)	96.7 (72.2-141.8)	435.9 (236.2-3226.7)	0.004
18	270	3.37±0.60	15.96	29.8 (10.2-44.2)	71.6 (51.1-92.4)	171.8 (124.0-398.1)	<0.0001
24	270	3.56±0.61	15.64	30.3 (11.7-43.9)	69.5 (50.4-88.2)	159.0 (117.8-325.5)	<0.0001

جدول ۲. تعیین میزان مرگ‌ومیر سوسک چهار نقطه‌ای تحت تیمار دوزها و زمان‌های مختلف اسانس نعنا

Table 2. Determination of the cowpea weevil mortality under treatment of different doses and times of the mint essential oil

Time (h)	n	Slope±SE	$\chi^2$	$LC_{10}$ ( $\mu\text{l}/\text{lair}$ )	$LC_{50}$ ( $\mu\text{l}/\text{lair}$ )	$LC_{90}$ ( $\mu\text{l}/\text{lair}$ )	P
8	270	2.97±0.69	10.70	46.1 (17.1- 63.9)	124.3 (96.0- 218.5)	335.1 (199.6- 2014.1)	<0.0001
10	270	3.38±0.68	9.65	42.6 (20.6- 57.4)	102.0 (82.2- 137.6)	244.1 (168.2- 644.7)	<0.0001
12	270	2.57±0.60	12.47	26.6 (3.9- 43.6)	83.8 (57.9- 125.5)	263.7 (158.2- 1959.0)	<0.0001
18	270	3.20±0.63	13.57	25.8 (6.6- 40.0)	64.9 (43.5- 85.3)	163.4 (115.1- 447.8)	<0.0001
24	270	3.63±0.66	15.59	26.0 (7.3- 39.5)	58.6 (38.0- 76.3)	132.1 (132.1- 298.6)	<0.0001

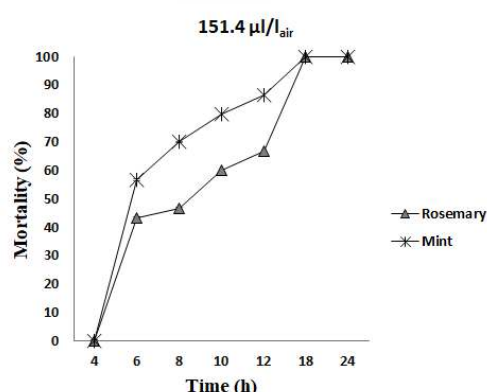
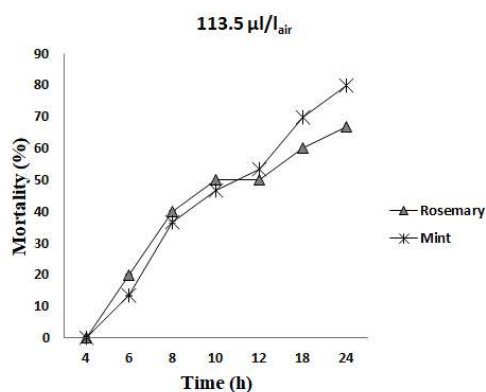
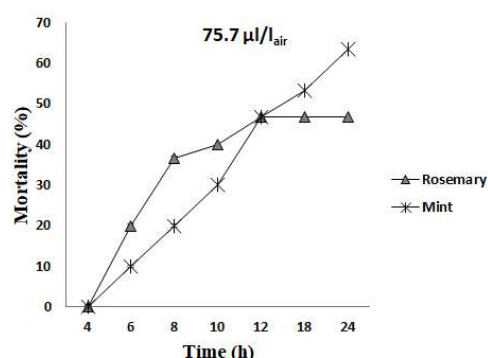
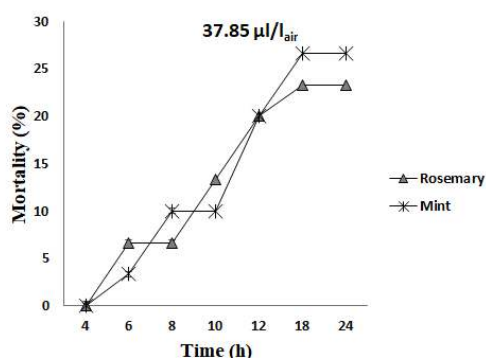
۹۰ درصد کشندگی اسانس نعنا و رزماری برای غلظت‌های ۱۱۳/۵۵، ۷۵/۷، ۳۷/۸۵ و ۱۵۱/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا با حدود اطمینان ۹۵ درصد مطابق جدول ۳ اندازه‌گیری شدند. برای مثال در بالاترین غلظت (۱۵۱/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا) اسانس نعنا در کوتاه‌ترین زمان (ساعت ۵/۸  $LT_{50}$ ) در مقایسه با اسانس رزماری (ساعت ۷/۸  $LT_{50}$ ) توانست ۵۰ درصد مرگ‌ومیر ایجاد کند (جدول ۳).

سمیت تنفسی اسانس‌ها با افزایش غلظت اسانس و زمان قرار گرفتن در معرض اسانس متفاوت و وابسته به دوز بود و با افزایش دوز مقدار مرگ‌ومیر به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده و در زمان کمتری به ۵۰ درصد مرگ‌ومیر رسید.

در بالاترین غلظت (۱۵۱/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا) هر دو اسانس پس از ۱۸ ساعت ۱۰۰ درصد مرگ‌ومیر ایجاد کردند (شکل ۲). همچنین زمان‌های ۱۰، ۵۰ و

جدول ۳. زمان‌های کشنده برای قرار گرفتن *C. maculatus* در معرض غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و نعنا

Essential oil	Concentration ( $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ )	Slope $\pm$ SE	$\chi^2$	LT <sub>10</sub> (h)	LT <sub>50</sub> (h)	LT <sub>90</sub> (h)	P
rosemary	113.55	1.83 $\pm$ 0.48	8.47	2.5 (0.4-4.3)	12.5 (9.7- 16.9)	62.7 (34.3- 383.3)	<0.0001
rosemary	151.4	4.22 $\pm$ 0.70	9.9	3.9 (2.4- 4.9)	7.8 (6.6- 8.8)	15.8 (13.4- 20.9)	<0.0001
mint	37.85	1.83 $\pm$ 0.63	9.34	8.7 (3.4- 11.8)	43.7 (25.2- 621.2)	218.5 (67.6- 88240.)	0.002
mint	75.7	3.17 $\pm$ 0.57	13.5	5.8 (3.7- 7.2)	14.7 (12.6- 18.2)	37.3 (26.9- 72.0)	<0.0001
mint	113.55	2.79 $\pm$ 0.54	13.03	4.0 (2.1- 5.6)	11.7 (9.9- 14.1)	33.8 (24.1- 69.5)	<0.0001
mint	151.4	4.06 $\pm$ 0.87	14.2	2.8 (1.1- 4.0)	5.8 (4.1- 6.8)	12.0 (10.3- 16.1)	<0.0001



شکل ۲. درصد مرگ‌ومیر *C. maculatus* قرار گرفته در معرض غلظت‌های مختلف اسانس‌های رزماری و نعنا  
Figure 2. Mortality rate of *C. maculatus* exposed to different concentrations of rosemary and mint essential oils

سمیت تنفسی اسانس‌های مختلفی از قبیل رازیانه، کلپوره، اکلیل کوهی، اسطوخودوس، ترخون، نعنا، پونه و مرزه روی حشرات کامل یک تا پنج‌روزه سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات مطالعه شده و نتایج، سمیت بالا و وابسته به دوز بودن این اسانس‌ها را نشان داده‌اند (Mirkazemi *et al.*, 2010; Heydarzade *et al.*, 2011; Zandi Sohani and Ramezani, 2012).

## بحث

مقایسه سمیت تنفسی اسانس نعنا و رزماری بر حشرات کامل یک‌روزه سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات نشان داد که هر دو اسانس نسبت به تیمار شاهد تفاوت معناداری داشتند و اسانس نعنا سمیت بیشتری نسبت به اسانس رزماری بر این آفت داشت، اگرچه از لحاظ آماری سمیت هر دو اسانس یکسان بود.

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات شده است. فعالیت حشره‌کشی اسانس رزماری در نتیجه اثر هم‌افزایی دو ترکیب آن یعنی ۸،۱-سینئول و کامفور گزارش شده است (Tak *et al.*, 2016). از طرفی دیگر، اثر ترکیبات مختلف اسانس‌ها در مهار آنزیم استیل کولین استراز بررسی شده است. آلفا پینن و ۸،۱-سینئول (عمده‌ترین ترکیبات اسانس رزماری) به‌عنوان مهارکننده‌های قوی استیل کولین استراز شناسایی شده‌اند ولی اثر مهارکنندگی ضعیفی برای کامفور و لینالول (دیگر ترکیبات اسانس رزماری) گزارش شده است؛ به‌طوری‌که این ترکیبات فقط در غلظت‌های بالا اثر مهارکنندگی دارند (Houghton *et al.*, 2006; Orhan *et al.*, 2008; López and Pascual-Villalobos, 2010; López and Pascual-Villalobos, 2015). پژوهش دیگری نیز ۸،۱-سینئول را به‌عنوان قوی‌ترین مهارکننده استیل کولین استراز حشره معرفی کرده است (López and Pascual-Villalobos, 2008; Picollo *et al.*, 2010). برخی پژوهش‌ها نیز تأیید کرده‌اند که ترکیبات مختلف مثل آلفا پینن و ۸،۱-سینئول در کنار هم اثر هم‌افزایی داشته و می‌توانند درصد مهارکنندگی را نسبت به کاربرد آن ترکیب به‌تنهایی افزایش دهند (Savalev *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2008). در واقع بیشتر اسانس‌ها نسبت به هر کدام از ترکیباتشان به‌تنهایی، فعالیت بیشتری نشان می‌دهند. طبیعت گیاهان به‌گونه‌ای است که خودبه‌خود در آن‌ها اثر هم‌افزایی دیده می‌شود، زیرا معمولاً گیاهان به‌جای تولید یک ترکیب منفرد، مخلوط‌های پیچیده‌ای از ترکیبات را تولید می‌کنند (Jankowska *et al.*, 2018). ترکیب لیمونن که در هر دو اسانس موجود است نیز خاصیت حشره‌کشی قوی دارد (López and Pascual-Villalobos, 2010). ترکیب کاروون (ترکیب اصلی اسانس نعنا) و لیمونن به‌عنوان ترکیبی با فعالیت حشره‌کشی قوی، ولی مهارکننده ضعیف استیل کولین استراز گزارش شده است (López and Pascual-Villalobos, 2010). با توجه به نتایج این پژوهش و نتایج کارهای انجام‌شده پیشین می‌توان چنین نتیجه گرفت که با توجه به ترکیبات موجود در هر کدام از

اسانس‌ها می‌توانند عملکرد فیزیولوژی حشرات را به روش‌های مختلف مختل کنند. به‌منظور بررسی اثرات سمی عصبی اسانس‌ها، آنزیم‌های استیل کولین استراز، گیرنده‌های GABA و گیرنده‌های اکتوپامین به‌عنوان اهداف مولکولی آن‌ها مطالعه شده است (Mossa, 2016; Jankowska *et al.*, 2018). بر اساس پژوهش‌های پیشین، از میان ترکیبات عمده اسانس رزماری آلفا پینن ( $\alpha$ -pinene)، ۸،۱-سینئول (1,8-cineole)، لینالول (linalool)، کامفور (camphor)، کامفن (camphene)، وربنون (Verbenone)، ائو-کالیپتول (Eo-calyptol)، برنئو (borneo) و لیمونن (limonene) آلفا پینن و ۸،۱-سینئول بیشترین درصد را داشتند (Malakootian and Hatami, 2013; Amin, 2016; Afshar *et al.*, 2016). بر اساس پژوهش‌های انجام‌شده از میان ترکیبات عمده اسانس نعنا (کاروون (carvone)، لیمونن (limonene)، ایـزو-دی هیدروکاروون (Iso-dihydrocarvone) و اس سینئون (S cineone)) کاروون بیشترین درصد (۵۰ تا ۶۰ درصد) را داشتند (Azizi Tabrizad *et al.*, 2019; Dadkhah *et al.*, 2019). اسانس‌های رزماری و نعنا از نظر رفتاری تأثیر متفاوتی بر سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات داشتند. با توجه به برانگیختگی بیش‌از‌حد، باز شدن بال‌ها، لرزش و تشنج حشره تحت تأثیر اسانس رزماری می‌توان گفت این اسانس بر سامانه عصبی حشره تأثیر گذاشته است. اثبات شده است که کانال‌های کلرید دارای لیگاند گابا در خاصیت حشره‌کشی اسانس‌ها نقش دارند. انسداد کانال‌های کلرید مهار عصبی را کاهش داده و منجر به برانگیختگی بیش‌از‌حد سامانه عصبی مرکز شده که باعث تشنج و مرگ می‌شود. مطالعه اثر ترکیبات اسانس بر گیرنده گابای مگس‌خانگی نشان داد که ۸،۱-سینئول و کامفور در اتصال به این گیرنده و مهار آن نقش دارند (Tong and Coats, 2012). با توجه به وجود این ترکیبات با درصد بالا در اسانس رزماری می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اسانس رزماری با مهار کانال دارای گیرنده گابا در حشره باعث تشنج و در نتیجه باز شدن بال‌پوش‌ها و بال‌های زیری در

اثر گذاشته و باعث برانگیختگی بیش از حد، باز شدن بال‌ها، لرزش و تشنج منتهی به مرگ آن شود؛ ولی تحت تأثیر اسانس نعنا مرگ بدون ایجاد این علائم اتفاق می‌افتد. پژوهش‌های دیگر اثر اسانس بر رفتار حشره را مقایسه نکرده‌اند.

اسانس‌ها و خواص و نحوه عمل آن‌ها، هر دو اسانس خاصیت حشره‌کشی قوی داشته، ولی اسانس رزماری با توجه به ترکیبات تشکیل‌دهنده‌اش می‌تواند با تأثیر روی گیرنده‌های گابا از یک طرف و مهار آنزیم استیل کولین استراز از طرف دیگر، بر سامانه عصبی حشره

## REFERENCES

1. Adebayo, R. A. & Oke, T. F. (2017). Effects of honey and glucose solutions feeding and larval competition on the development of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 1270-1273.
2. Amin Afshar, M. H., Mahasti, P. & Emam Jomeh, Z. (2016). Identification of constituents, minimum concentration of inhibition of growth and microtubule of rosemary essential oil cultivated in Shiraz. *Journal of Medicinal Plants*, 4 (60), 112-122. (In Farsi)
3. Azizi Tabrizad, N., Seyedin Ardebili, S. M. & Hojjati, M. (2019). Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of pennyroyal, mint and thyme essential oils. *Food Science and Technology*, 15(12), 447 – 457. (In Farsi)
4. Dadkhah, A., Fatemi, F., Mohammadi Malayeri, M. R., Rasooli, A. & Karvin Ashtiani, M.H. (2019). The effects of *Mentha Spicata* on oxidative stress and COX-2 gene expression in prevention of sepsis. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(4), 567-581. (In Farsi)
5. Deng, J. et al. (2004). Enhancement of attraction to sex pheromones of *Spodoptera exigua* by volatile compounds produced by host plants. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 2037-2045.
6. Enan, E.E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 130, 325–337.
7. Farooqui, T. (2012). Review of octopamine in insect nervous systems. *Insect Physiology*, 4, 1–17.
8. Gaire, S., Scharf, M. E. & Gondhalekar, A. D. (2019). Toxicity and neurophysiological impacts of plant essential oil components on bed bugs (Cimicidae: Hemiptera). *Scientific Reports*, 9(1), 3961.
9. Heydarzade, A., Moravej, G., Hatefi, S. & Shabahang, J. (2011). Fumigant Toxicity of Essential Oils Extracted from Three Medicinal Plants against *Callosobruchus maculatus* Adults (Coleoptera: Bruchidae). *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 42(2), 275-284. (In Farsi)
10. Houghton, P. J., Ren, Y. & Howes, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23(2), 181-99.
11. Ibrahim Hatem, A., Fawki, Sh., Abd El-Bar Marah, M., Abdou Mohamed, A., Mahmoud Dalia, M. & El-Gohary, E. E. (2017). Inherited influence of low dose gamma radiation on the reproductive potential and spermiogenesis of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 10, 338-347.
12. Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J. & Stankiewicz, M. (2018). Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. *Molecules*, 23-34.
13. López, M. D. & Pascual-Villalobos, M. J. (2010). Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, 31, 284–288.
14. Lopez, M. & Pascual-Villalobos, M. J. (2015). Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains? *Flavour and Fragrance Journal*, 30 (1), 108–112.
15. Malaikozhundan, B. & Vinodhini, J. (2018). Biological control of the Pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* in stored grains using the entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*. *Microbial Pathogenesis*, 114, 139-146.
16. Malakootian, M. & Hatami, B. (2013). Survey of chemical composition and antibacterial activity of *Rosmarinus Officinalis* essential oils on *Escherichia coli* and its kinetic. *Tolue Behdasht*, 12 (1), 1-13. (In Farsi)
17. Mirkazemi, F., Bandani, A. R. & Sabahi, GH. A. (2010). Fumigant toxicity of essential oils from five officinal plants against two stored product insects: cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (fabricius) and red flour beetle, *Tribolium castaneum* (herbest). *Plant protection (Scientific journal of agriculture)*, 32(2), 37-53. (In Farsi)



18. Mossa, A. T. H. (2016). Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9, 354-378.
19. Moura, E. D. S., Faroni, L. R. A., Zanuncio, J. C., Heleno, F. F. & Prates, L. H. F. (2019). Insecticidal activity of *Vanillosmopsis arborea* essential oil and of its major constituent  $\alpha$ -bisabolol against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Scientific Reports*, 9, 3723.
20. Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y. & Sener, B. (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 63(7-8), 547-53.
21. Picollo, M. I., Toloza, A. C., Cueto, G. M., Zygadlo, J. & Zerba, E. (2008). Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. *Fitoterapia*, 79, 271-278.
22. Plata-Rueda, A. *et al.* (2017). Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Reports*, 7, 46406.
23. Pourya, M., Sadeghi, A., Ghobari, H., Nji Tizi Taning, C. & Smagghe, G. (2018). Bioactivity of *Pistacia atlantica* desf. Subsp. *Kurdica* (Zohary) Rech. F. and *Pistacia khinjuk* stocks essential oils against *Callosobruchus maculatus* (F, 1775) (Coleoptera: Bruchidae) under laboratory conditions. *Journal of Stored Product Research*, 77, 96-105.
24. Robertson, J. L., Savin, N. E., Preisler, H. K. & Russell, R. M. (2007). *Bioassays with Arthropods*. CRC press.
25. Savelev, S. U., Okello, E., Perry, N. S. L., Wilkins, R. M. & Perry, E. K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75, 661-668.
26. Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A. & Dicke, M. (2005). *Insect-plant biology*. Oxford University Press.
27. Tak, J. H., Jovel, E. & 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(3), 474-80.
28. Tong, F. & Coats, J. R. (2012). Quantitative structure-activity relationships of monoterpene binding activities to the housefly GABA receptor. *Pest Management Science*, 68(8), 1122-1129.
29. Viteri Jumbo, L. O., Haddi, K., Faroni, L. R. D., Heleno, F. F., Pinto, F. G. & Oliveira, E. E. (2018). Toxicity to, oviposition and population growth impairments of *Callosobruchus maculatus* exposed to clove and cinnamon essential oils. *PLoS ONE*, 13, e0207618.
30. Zandi Sohani, N. & Ramezani, L. (2012). Investigation into Insecticidal Activity of *Mentha arvensis* and *Mentha pulegium* Essential Oils on *Callosobruchus maculatus*. *Plant protection*, 35(2), 1-11. (In Farsi)