

بررسی اثر جفت‌گیری بر سمیت اسانس رزماری (*Rosmarinus officinalis*) علیه سوسک چهار

نقطه‌ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus*).

الناز آبی^۱، علیرضا بندانی^{۲*} و احسان ترابی^۳

۳ و ۱۰۲ به ترتیب، دانشجو کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه

تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳)

چکیده

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، (*Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) از آفات اصلی حبوبات به‌خصوص لوبیا چشم‌بلبلی است و به یک آفت جدی در انبارها تبدیل شده است. در نتیجه، کنترل این آفت توسط آفت‌کش‌های طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش برای نخستین بار اثر جفت‌گیری حشره بر کارایی اسانس رزماری علیه سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی در محدوده غلظت‌های، ۳۵/۰۷ تا ۷۸/۶۳ میکرولیتر بر لیتر هوا برای حشرات نر باکره و ۳۹/۱۷ تا ۱۰۲/۲۲ میکرولیتر بر لیتر هوا برای حشرات ماده باکره و ۵۵/۰۴ تا ۸۶/۴۹ میکرولیتر بر لیتر هوا و ۶۲/۹۰ تا ۹۴/۳۶ میکرولیتر بر لیتر هوا به ترتیب برای حشرات نر و ماده یک‌بار جفت‌گیری کرده و به ترتیب در محدوده غلظت‌های ۶۲/۵۱ تا ۱۲۵/۸۱، ۹۴/۳۶ و ۱۵۷/۲۶ میکرولیتر بر لیتر هوا برای حشرات نر و ماده چندین بار جفت‌گیری کرده، انجام شد. نتایج نشان داد، حشراتی که چندین بار جفت‌گیری کرده بودند، بیشترین مقاومت را نسبت به اسانس رزماری داشته و مقدار LC_{50} به ترتیب برای حشرات نر و ماده ۹۰/۰۳۲ و ۱۱۸/۰۱۵ میکرولیتر بر لیتر هوا محاسبه شد. حشرات باکره نسبت به اسانس رزماری حساس‌تر بودند و مقدار LC_{50} به دست آمده برای نر ۴۸/۱۷۳ میکرولیتر بر لیتر هوا و برای ماده ۵۸/۲۹۸ میکرولیتر بر لیتر هوا است. نتایج پژوهش نشان می‌دهد جفت‌گیری باعث کاهش اثر اسانس رزماری روی حشرات بالغ سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات می‌شود. این نتایج می‌توانند در طراحی راهبردهای مبارزه با آفت سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات توسط اسانس‌های گیاهی و همچنین زمان دقیق به‌کارگیری این ترکیبات جهت دست یافتن به بیشترین اثربخشی مؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی: سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، جفت‌گیری، باکره، اسانس رزماری.

Effect of mating on the toxicity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil against the cowpea seed beetle (*Callosobruchus maculatus*)

Elnaz Abi¹, Alireza Bandani^{2*} and Ehsan Torabi³

1,2 and 3. Graduate student, Professor and Assistant Professor Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

(Received: Jan, 29, 2021 - Accepted: Aug, 08, 2021)

ABSTRACT

The cowpea weevil beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), is a major pest of legumes, especially cowpea, and has become a serious pest in storage crops. Therefore, controlling this insect pest using natural pesticides such as plant essential oils seems necessary. In this research, the effect of insect mating on the toxicity of rosemary essential oil against the cowpea weevil was investigated under laboratory conditions. Bioassay tests were performed in the range concentrations of 35.07 and 78.63 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ for male virgin insects and 39.17 and 102.22 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ for female virgin insects and there were done 55.04 to 86.49 and 62.90 to 94.36 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ for one-time mated insects, respectively. Also, concentrations of 62/51 to 125.81 and 94.36 to 157.26 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ were tested against multiple times mated male and female insects, respectively. Results showed that multiple mated male and female insects had the highest resistance to rosemary essential oil and the LC_{50} values were 90.032 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ and 118.015 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ for male and female insects, respectively. Virgin insects were more sensitive to rosemary essential oil and the amount of LC_{50} obtained was 48.173 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ for male insects and 58.298 $\mu\text{l}/\text{l}_{\text{air}}$ for female insects. These results can be useful in planning pest management strategies for the cowpea weevil beetle by plant essential oils as well as the exact time of application of these compounds to achieve maximum effectiveness.

Keywords: *Callosobruchus maculatus*, mating, virgin, rosemary essential oil

* Corresponding author E-mail: abandani@ut.ac.ir

مقدمه

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera: Chrysomelidae) از جمله آفات مهم بذره‌های گیاهی در انبارهاست و به یک آفت جدی در حبوبات از جمله نخود، ماش و انواع لوبیا خصوصاً لوبیا چشم بلبلی تبدیل شده است. لاروهای این گونه منحصرأ از دانه حبوبات (Fabaceae) تغذیه می‌کنند. حشرات کامل به آب و غذا نیازی ندارند و در طول عمر خود جفت‌گیری کرده و روی حبوبات تخم‌گذاری می‌کنند. خواستگاه اولیه این حشره آفریقا بوده ولی با گسترش تجارت حبوبات و سایر محصولات، به سراسر نقاط دنیا منتقل و تقریباً در سراسر دنیا به جز قطب جنوب یافت می‌شود (Beck and Blumer 2011).

در میان حشرات زیر خانواده Bruchinae، سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *C. maculatus* یکی از آفات مهم دانه و بذور محصولات انباری خصوصاً در گیاهان خانواده Fabaceae محسوب می‌شود، که دارای چندین نسل در سال است. هر لارو سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات فقط در داخل یک بذر رشد کرده و به حشره کامل تبدیل می‌شود. در صورت عدم کنترل این آفت در مزرعه، تا ۷۰ درصد از محصولات انباری را در عرض شش ماه از بین ببرد. در واقع اگر کنترل نشود، جمعیت رشد نمایی داشته و باعث کاهش قابل توجهی در وزن بذور، جوانه‌زنی، و ارزش تغذیه‌ای می‌شود. همچنین، به دلیل وجود مدفوع حشرات باعث خطرات بهداشتی و بروز آفات ثانویه همچون قارچ‌ها در بذور می‌شود و به تبع آن محصول قابلیت عرضه به بازار را نخواهد داشت. این آفت را می‌توان با استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی همچون پیرتروئیدها، فسفره‌های آلی و مواد تدخینی همانند فسفین تاحدودی کنترل کرد و خسارات ناشی از آن‌ها را کاهش داد، ولی استفاده مداوم از آن‌ها منجر به بروز مشکلات عدیده‌ای مانند ایجاد مقاومت، آلودگی محیط‌زیست، تخریب لایه اوزن، از بین رفتن دشمنان طبیعی، به جای گذاشتن باقی مانده سموم خطرناک و نیز افزایش هزینه‌های مدیریتی می‌شود (Kébé, et al. 2020, Vilela, et al. 2020).

این مشکلات باعث می‌شود که دائماً به دنبال ترکیب جدید و مؤثری برای مبارزه با آفات انباری باشیم. امروزه اهداف همه جوامع تولید سموم با منشأ طبیعی و سازگار با محیط‌زیست است. گیاهان منبع اصلی متابولیت‌های

ثانویه هستند، که در دفاع از گیاه در برابر آفات گیاهخوار و نیز عوامل بیمارگر گیاهی نقش دارند. تولیدات طبیعی و حشره‌کش‌های سازگار با محیط‌زیست، جایگزین خوبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی هستند (Kavallieratos, et al. 2007). استفاده از ترکیبات گیاهی با خاصیت حشره‌کشی قدمت طولانی در کنترل آفات کشاورزی دارد. گونه‌های گیاهی که خاصیت حشره‌کشی شناخته‌ای دارند، موتور محرکه تحقیقات برای یافتن منابع جدید در حشره‌کش‌های طبیعی هستند (Tiroesele, et al. 2015). میزان فعالیت بیولوژیکی اسانس به قسمت‌های مختلف گیاهی که از آن استخراج انجام می‌شود، روش‌های استخراج، فنولوژی گیاه، فصل برداشت، سن گیاه، طبیعت خاک و شرایط محیطی بستگی دارد (Said-Al Ahl, et al. 2017, Magierowicz, et al. 2019).

امروزه اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها در محافظت از تولیدات گیاهی در برابر حشرات گیاهخوار به صورت فرموله درآمده و به‌عنوان حشره‌کش‌های تماسی، گوارشی، دورکننده، ضد تغذیه‌ای، ضد رشدی، ضد باروری و تخم‌کشی عمل می‌کنند. اسانس‌های روغنی فرمول‌های پیچیده‌ای از ترپنوئیدها مخصوصاً مونوترپن‌ها^۱، سسکوایترپنس‌ها^۲ و انواعی از فنول‌های معطر، اکسیدها، اترها، الکل‌ها، استرها، آلدئیدها و کتون‌ها هستند که عطر و بوی مشخص گیاه مورد استفاده را تعیین می‌کنند. وجود مونوترپن‌های فرار یا اسانس‌های روغنی در گیاهان، یک استراتژی دفاعی مهم گیاهان در برابر حشرات گیاهخوار و قارچ‌های بیماری‌زا است (Said-Al Ahl, et al. 2017).

بقا و تولیدمثل یک موجود زنده بستگی به توانایی ارگانیزم در مبارزه با عوامل بیماری‌زا و انگل‌ها دارد. همه مهره‌داران و بی‌مهرگان دارای یک سیستم ایمنی قوی و کارآمد هستند. سیستم ایمنی در حشرات به عوامل داخلی (سن، جنس، تولیدمثل و سایر عوامل فیزیولوژیکی) و عوامل خارجی (محیط، دما، تغذیه، میزبان و...) بستگی دارد (Vogelweith, et al. 2017). و وگلویس و همکاران، به بررسی اثر جفت‌گیری، جنس و سن به‌طور هم‌زمان بر هموسیت و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در حشرات کامل *Forficula auricularia* پرداختند. طبق نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها، غلظت هموسیت در این

1 Monoterpenes

2 sesquiterpenes (C15), (C10)

بادرنجبویه (*Dracocephalum moldavica*) و سیترال (۳،۷-dimethyl-2,6-octadienal) بر روی چرخه تولیدمثل، رفتار جنسی و فعالیت آنزیم‌ها در سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات بررسی شده است. قرار گرفتن در معرض اسانس گیاه بادرنبویه منجر به تغییر رفتار برای هر دو جنس، کاهش میزان تری اسیل گلیسرول در افراد ماده باکره و جفت گیری کرده و کاهش فعالیت‌های استیل کولین استراز در حشرات نر و ماده و β -استراز در ماده‌ها شد. این تغییرات ممکن است بر بقا و انتقال منابع انرژی طی تخم‌گذاری تأثیر بگذارد (de Souza Alves, et al. 2019).

سمیت تنفسی چهار اسانس، برگ اکالیپتوس، گل اکالیپتوس، برگ رزماری و برگ نعنا بر تخم‌های با کمتر از ۲۴ ساعت عمر سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات و تأثیر آن بر درصد تفریح تخم و طول دوره لاروی بررسی شده است. استفاده از این اسانس‌های گیاهی برای کنترل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات در مرحله تخم بسیار کارآمد بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای سموم تدخینی رایج در انبارها شود (Amiri 2020).

در اغلب پژوهش‌های انجام شده روی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات، اثر اسانس‌های مختلف روی حشرات کامل و تخم‌ها و جفت‌گیری بررسی شده است ولی به بررسی اثر جفت‌گیری حشره بر کارایی اسانس رزماری علیه حشرات کامل سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات پرداخته نشده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرکشدگی اسانس رزماری روی حشرات کامل باکره سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات و همچنین روی حشرات بالغ یکبار جفت‌گیری کرده و حشرات دارای چندین بار جفت‌گیری است.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، در شرایط دمایی 28 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 1 درصد و تحت شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی پرورش داده شدند. لوبیا چشم‌بلبلی^۱ به‌عنوان غذا، سطحی برای تخم‌گذاری حشره و محیطی برای رشد لاروها و

حشره با افزایش سن، افزایش می‌یابد و این میزان افزایش در افراد نر بیشتر است. در حشرات نر و ماده باکره، ارتباط مستقیمی بین سن حشره و مقدار آنزیم فنل‌اکسیداز وجود دارد که این موضوع در حشرات ماده جفت‌گیری کرده دیده نمی‌شود (Vogelweith, et al. 2017).

طول عمر حشرات کامل *C. maculatus* ماده در مقایسه با حشرات نر بیشتر است. همچنین حشرات ماده به دلیل فرآیند جفت‌گیری، باروری دارای سیستم ایمنی قوی‌تری هستند؛ زیرا حشرات ماده باید بعد از جفت‌گیری از تخم‌ها و جنین خود مراقبت کنند که این عمل در حشرات نر وجود ندارد و حشرات نر تمام انرژی خود را برای جفت‌گیری می‌گذارند و بعد از جفت‌گیری اکثراً می‌میرند. به‌طور کلی، سیستم ایمنی حشرات ماده *Panorpa vulgarisa* نسبت به حشرات نر قوی‌تر است (Kurtz, et al. 2000). بررسی اثر جفت‌گیری بر سیستم ایمنی حشرات *Scathophaga stercoraria* و سنجش مقدار آنزیم فنل‌اکسیداز در این حشرات نشان می‌دهد که جفت‌گیری باعث تولید آنزیم فنل‌اکسیداز شده و همین عامل باعث افزایش ایمنی حشره در برابر عوامل بیماری‌زا است. همچنین مقدار این آنزیم در حشرات ماده بیشتر از نرها بوده و سن حشره نیز تأثیر زیادی در مقدار این آنزیم و در نتیجه سیستم ایمنی دارد (Schwarzenbach, et al. 2005). برخی تحقیقات اثر سمیت تنفسی اسانس‌های مختلف مثل رزماری، رازیانه، ترخون، اسطوخدوس، کافور و مرزه را روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات بررسی کرده اند که نتایج نشان می‌دهد که سوسک چهار نقطه‌ای نسبت به اسانس‌ها حساس بوده و در بین اسانس‌ها، رزماری بیشترین کشندگی را در جمعیت حشرات داشته است (Tapondjou, et al. 2002, Mirkazemi, et al. 2010). طی تحقیقی به‌منظور کنترل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات از اسانس حاصل از گیاه رزماری به‌جای حشره‌کش‌های شیمیایی استفاده شده است. با استفاده از دستگاه GC-MS، اجزای تشکیل‌دهنده اسانس را مشخص و میزان مرگ‌ومیر، طول عمر و باروری حشره را مورد بررسی قرار داده اند. طبق نتایج به‌دست‌آمده طول عمر و میزان مرگ‌ومیر در حشرات تحت تیمار به‌طور قابل توجهی افزایش ولی میزان باروری کاهش یافته است (Douiri, et al. 2014).

همچنین مطالعه سمیت تنفسی اسانس گیاه

1 *Vigna unguiculata*

باکره تازه خارج شده از لوبیا قبل از جفت‌گیری جدا سازی شدند و تحت تاثیر دزهای مختلف اسانس برای تعیین دزکشدگی و زیرکشدگی قرار گرفتند. همچنین برای تیمار یک بار جفت‌گیری، یک نر و یک ماده را داخل پتری‌ها قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه برای زوج اجازه یک‌بار جفت‌گیری داده شد و بعد از پایان جفت‌گیری، نر و ماده در پتری‌های جداگانه به مدت ۲۴ ساعت تحت اسانس قرار گرفت. گروه سوم حشراتی بودند که به مدت ۲۴ ساعت نر و ماده داخل یک ظرف قرار گرفتند و در طول ۲۴ ساعت چندین بار جفت‌گیری کردند. سپس، حشرات نر و ماده به صورت جداگانه، به مدت ۲۴ ساعت تحت تاثیر اسانس رزماری قرار گرفتند و میزان مرگ‌ومیر در حشرات بررسی شد. تمام آزمایش برای هر تیمار ۴ تکرار و هر تکرار ۱۰ حشره قرار داده شد و برای هر گروه تیمار و تکرار حشرات شاهد وجود داشت که هیچ‌گونه اسانسی دریافت نکردند.

آنالیز داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار PoloPlus نسخه ۲ استفاده شد. ابتدا داده‌ها توسط نوت‌پد وارد نرم‌افزار شد و تجزیه داده‌ها با استفاده از روش پروبیت انجام شد.

نتایج

بررسی اثر سمیت رزماری در حشرات سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات نشان می‌دهد که در تمامی تیمارها، به دلیل عدم هم‌پوشانی مقادیر حدود اطمینان^۳ (۹۵ درصد)، میزان LC_{50} در حشرات نر و ماده دارای تفاوت معنی‌دار هستند و مقدار آن در حشرات نر کمتر از حشرات ماده بود (جدول ۱). نتایج مشابهی نیز در برآوردهای LC_{30} و LC_{70} بدست آمد (به ترتیب جداول ۲ و ۳) که نشان از سمیت معنی‌دار بالاتر اسانس رزماری برای افراد نر بود.

در بین حشرات نر و ماده باکره، در مقدار LC_{50} اختلاف معنی‌دار وجود دارد. به طوری که مقدار فاصله اطمینان^۴ در احتمال ۹۵ درصد باهم هم‌پوشانی ندارند و این مقدار در حشرات ماده عددی بین ۵۶/۰۷۲ - ۶۲/۶۴۸ میکرولیتر در لیتر هوا و این عدد در حشرات نر ۴۵/۹۵۸ - ۵۰/۴۸۲ میکرولیتر در لیتر هوا می‌باشد.

شفیره استفاده شد (Amiri 2020). لوبیاها قبل از استفاده به مدت ۲۴ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده گرفت تا از آلودگی‌های احتمالی آنها جلوگیری شود. حشرات به مدت ۳ نسل روی لوبیا پرورش داده شده و سپس برای آزمایش استفاده شد. بدین شکل که لوبیاهای حاوی تخم جداگانه به پتری دیشه‌های کوچک منتقل شده و حشرات کامل یک‌روزه باکره هر روز جدا شده و برای انجام آزمایش‌ها استفاده شدند. در صورت مشاهده دو حشره با جنس مخالف در یک پتری دیش، به دلیل نامشخص بودن وجود یا عدم وجود جفت‌گیری، از استفاده از آن حشرات امتناع شد.

جمع‌آوری گیاه و استخراج اسانس

برگ‌های گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) از باغ گیاهشناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج تهیه شده و گونه گیاه توسط کارشناسان گیاهشناسی مورد تایید قرار گرفت. برگها پس از خشک کردن در سایه، در آسیاب برقی پودر شدند. از روش هیدرولیزاسیون (تقطیر با آب) برای تهیه اسانس استفاده شد (Aslan, et al. 2004). ابتدا حدود ۳۰۰ گرم از پودر رزماری به مدت ۴ ساعت با آب مقطر (حلال) به‌وسیله دستگاه کلونجر^۱، اسانس‌گیری و جهت آب‌گیری از سدیم‌سولفات بی‌آب (دهیدراته^۲) استفاده شد و اسانس حاصل در ظروف شیشه‌ای تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

زیست‌سنجی

ابتدا آزمون‌های اولیه جهت دستیابی به غلظت کشندگی بین ۱۰-۹۰ درصد انجام شد. برای تعیین اثر حشره‌کشی اسانس استخراج‌شده از طریق تنفسی از روش کاغذ صافی واتمن شماره یک استفاده شد (Nenaah and Ibrahim 2011). ابتدا با استفاده از میکروپیپت مقدار معینی از اسانس را روی کاغذ صافی داخل پتری‌دیش‌ها قرار داده شد. سپس حجم پتری دیشه‌های مورد استفاده را به دست آورده و تبدیل به میکرولیتر در لیتر هوا شد. در درون هر پتری دیش یک عدد دانه لوبیا آلوده به حشره قرار گرفت. پتری دیش هر روز بررسی و حشرات نر و ماده

3 confidence intervals
4 confidence intervals

1 Clevenger
2 Dehydration

میکرولیتر بر لیتر هوا و در حشرات ماده این گروه ۷۶/۴۸۷ میکرولیتر بر لیتر هوا است. همچنین این مقدار در حشراتی که در طول ۲۴ ساعت چندین بار جفت‌گیری داشتند، ۹۰/۰۳۲ میکرولیتر بر لیتر هوا در حشرات نر و ۱۱۸/۰۱۵ میکرولیتر بر لیتر هوا در حشرات ماده بود (جدول ۱). نتایج مشابهی نیز در برآوردهای LC₃₀ و LC₇₀ بدست آمد (به ترتیب جداول ۲ و ۳) با توجه به عدم همپوشانی میان مقادیر اطمینان ۹۵ درصد، این نتایج نشان می‌دهند که جفت‌گیری باعث کاهش معنی‌دار میزان سمیت اسانس رزماری در حشرات نر و ماده سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات می‌شود.

همچنین مقدار این عدد در احتمال ۹۵ درصد در حشراتی که دارای یک‌بار جفت‌گیری و چندین بار جفت‌گیری بوده اند، در بین حشرات نر و ماده در هرگروه از تیمارها نیز اختلاف معنی‌دار داشت و مقادیر این اعداد به ترتیب در حشرات ماده و نر یک‌بار جفت‌گیری کرده ۷۳/۹۴۶ - ۷۹/۲۳۵ و ۶۲/۸۳۱ - ۷۰/۳۴۵ میکرولیتر در لیتر هوا و در حشراتی که در طول ۲۴ ساعت جفت‌گیری داشتند، این مقدار در حشرات ماده و نر به ترتیب ۱۱۲/۹۴۰ - ۱۲۳/۰۸۴ و ۸۴/۵۸۷ - ۹۵/۳۷۰ میکرولیتر در لیتر هوا است. در حشرات بالغ ۲۴ ساعته که فقط یک بار جفت‌گیری داشتند، مقدار LC₅₀ در حشرات نر ۶۶/۶۸۹

جدول ۱- نتایج LC₅₀ اسانس رزماری روی حشرات بالغ *Callosobruchus maculatus*

Table 1- LC₅₀ Results of Rosemary Essential Oil in *Callosobruchus maculatus* adults

Treatments	Number	LC ₅₀ ($\mu\text{L} / \text{L}_{\text{air}}$) (95% confidence intervals)	Slope \pm se	X ² (df)	Heterogeneity
Female no mating	240	59.298 (56.071-62.648)	10.243 \pm 1.174	15.424(18)	0.857
Male no mating	240	48.173 (45.958-50.482)	12.011 \pm 1.382	7.41(18)	0.412
Female 1 mating	240	76.487 (73.946-79.235)	16.471 \pm 2.311	7.675(13)	0.59
Male 1 mating	240	66.689 (62.831-70.345)	10.836 \pm 1.852	7.565(13)	0.582
Female several mating	240	118.015 (112.940-123.084)	10.972 \pm 1.423	4.751(18)	0.264
Male several mating	240	90.032 (84.587-95.370)	9.316 \pm 1.281	10.156(18)	0.564

جدول ۲- نتایج LC₃₀ اسانس رزماری روی حشرات بالغ *Callosobruchus maculatus*

Table 2- LC₃₀ Results of Rosemary Essential Oil in *Callosobruchus maculatus* adults

Treatments	Number	LC ₃₀ ($\mu\text{L} / \text{L}_{\text{air}}$) (95% confidence intervals)	Slope \pm SE	X ² (df)	Heterogeneity
Female no mating	240	52.704 (49.159-55.757)	10.243 \pm 1.174	15.424(18)	0.857
Male no mating	240	41.094 (41.094-45.680)	12.011 \pm 1.382	7.41(18)	0.412
Female 1 mating	240	71.080 (67.979-73.547)	16.471 \pm 2.311	7.675(13)	0.59
Male 1 mating	240	59.657 (54.362-63.255)	10.836 \pm 1.852	7.565(13)	0.582
Female several mating	240	105.716 (99.261-110.683)	10.972 \pm 1.423	4.751(18)	0.264
Male several mating	240	79.087 (84.587-95.370)	9.316 \pm 1.281	10.156(18)	0.564

جدول ۳- نتایج LC₇₀ اسانس رزماری روی حشرات بالغ *Callosobruchus maculatus*

Treatments	Number	LC ₇₀ ($\mu\text{L}/\text{litre}$) (95% confidence intervals)	Slope \pm se	X ² (df)	Heterogeneity
Female no mating	240	66.717 (63.129-71.326)	10.243 \pm 1.174	15.424(18)	0.857
Male no mating	240	53.267 (50.813-56.432)	12.011 \pm 1.382	7.41(18)	0.412
Female 1 mating	240	82.305 (79.431-86.441)	16.471 \pm 2.311	7.675(13)	0.59
Male 1 mating	240	74.550 (70.655-80.404)	10.836 \pm 1.852	7.565(13)	0.582
Female several mating	240	131.744 (126.129-139.454)	10.972 \pm 1.423	4.751(18)	0.264
Male several mating	240	102.491 (96.697-110.332)	9.316 \pm 1.281	10.156(18)	0.564

سیستم عصبی حشره تاثیر گذاشته و باعث مرگ حشرات می‌شود (Amiri and Bagheri 2020). به طور کلی طول عمر حشرات ماده نسبت به حشرات نر بیشتر است و ماده‌ها نیاز به انرژی بیشتری جهت تخم‌گذاری و ایجاد نسل‌های بعدی دارند در این مطالعه، در ماده‌ها مقدار فعالیت آنزیم استراز افزایش یافته و در واقع در ماده‌ها به دلیل عدم وجود آنزیم استراز^۴، محرک‌های خارجی^۵ سرکوب می‌شود. در حالی که این ایزوزیم‌ها در نرها تولید می‌شود (Saha, et al. 2012). دیوری و همکاران (Douiri, et al. 2014)، در آزمایشی که به منظور بررسی اثر اسانس رزماری روی بیولوژی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات انجام دادند، مقدار LC₅₀ برای حشرات کامل سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات را برای افراد ماده و نر بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب، ۶/۸۰ (ماده) و ۵/۵۱ (نر) میکرولیتر بر لیتر هوا تعیین کردند. همچنین فکوری و صداقت‌فر (Fakoori and Sedaghatfar 2020)، در بررسی اثر رزماری بر روی حشرات سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، مقدار LC₃₀ و LC₅₀: ۸/۸۳ و ۱۵/۶۳ میکرولیتر بر لیتر هوا به دست آورده‌اند. در این پژوهش مقدار LC₃₀، LC₅₀ و LC₇₀ برای حشرات نر و ماده به صورت جداگانه بررسی شده است و مقدار LC₃₀ برای سه گروه تیمار شامل حشرات باکره، حشرات یکبار جفت‌گیری کرده و حشراتی که در طول ۲۴ ساعت چندین بار جفت‌گیری داشته‌اند،

بحث

ترکیبات طبیعی حاصل از گیاهان، به دلیل سمیت کم برای پستانداران، سازگار با محیط‌زیست، خواص تجزیه‌پذیری سریع، ارزان و دسترسی راحت به این مواد می‌توانند جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی باشند (Stevenson, et al. 2017). جفت‌گیری در حشرات به‌عنوان عامل مؤثر در سیستم ایمنی و مقاومت حشرات در برابر محرک‌ها است و این عامل تأثیر مثبت و مستقیمی با افزایش مقاومت در حشرات دارد (Vogelweith, et al. 2017). نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس رزماری می‌تواند اثر حشره‌کشی خوبی روی حشرات کامل سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات که جزو آفات انباری مهم است، داشته باشد. با توجه به نتایج پژوهش‌های پیشین، ترکیبات عمده اسانس رزماری از آلفا-پینن^۱ و ۸-اوسینول^۲ است. که دلیل حشره‌کشی رزماری است (Amin Afshar, et al. 2016). در پژوهش دیگر، بیان شده است که اگر اسانس رزماری به صورت تدخینی مورد استفاده قرار گیرد، به دلیل ترکیب اصلی ۸-اوسینول و کامفور^۳ موجود در اسانس آن، اثر هم‌افزایی بر حشره‌کشی اسانس خواهد داشت (Tak, et al. 2016). در واقع اسانس رزماری با تأثیر بر روی گیرنده‌های گابا و مهار آنزیم استیل‌کولین استراز، بر

4 General esterase
5 xenobiotics

1 α - pinene
2 1,8- cineole
3 camphor

است. طبق این پژوهش اسانس منجر به تغییر رفتار در حشرات کامل ماده شده و میزان تخمگذاری حشره کاهش می‌یابد. میزان تری‌اسیل‌گلیسرول در افراد ماده باکره نسبت به شاهد کاهش معنی داری داشته ولی مقدار تری‌اسیل‌گلیسرول در افراد ماده جفت‌گیری کرده نسبت به شاهد تفاوت معنی دار نبود. همچنین اسانس باعث کاهش فعالیت استیل‌کولین استراز در حشرات نر و ماده و بتا-استراز در حشرات ماده می‌شود. همه این تغییرات بر بقای حشرات و جفت‌گیری حشره تاثیر می‌گذارد (de Souza Alves, et al. 2019). اسانس حاصل از گیاهان به طور مستقیم بر جفت‌گیری، تخم‌گذاری و ظهور حشرات کامل سوسک‌چهارنقطه‌ای حبوبات تاثیر می‌گذارد (Gueribis, et al. 2019). براساس نتایج ما، حشراتی که جفت‌گیری کنند و هرچه زمان بیشتری برای جفت‌گیری داشته باشند، در برابر اسانس رزماری در غلظت‌های بالاتری می‌میرند. در واقع جفت‌گیری تاثیر منفی بر روی حشره‌کشی اسانس رزماری دارد و احتمالاً باعث تغییر در سیستم آنزیمی حشرات شده و واکنش حشرات در مقابل اسانس تغییر می‌کند.

نتیجه‌گیری

سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات در برابر اسانس رزماری واکنش نشان می‌دهد و اسانس موجب مرگ‌ومیر حشرات می‌شود. هنگامی که حشرات باکره باشند نسبت به اسانس رزماری حساس‌تر هستند و در دزهای پایین‌تری از این اسانس مرگ‌ومیر نشان می‌دهند. حشرات سوسک چهارنقطه‌ای هنگامی که در طول ۲۴ ساعت فقط یک‌بار جفت‌گیری کنند نسبت به حشرات باکره در دزهای بالاتری از اسانس رزماری واکنش می‌دهند. همچنین حشراتی که یک‌بار جفت‌گیری در طول ۲۴ ساعت داشته‌اند نسبت به حشراتی که در طول ۲۴ ساعت چندین بار جفت‌گیری کردند، مقدار LC_{50} کمتری دارند. در واقع هرچه تعداد دفعات جفت‌گیری در حشرات بالاتر رود، ممکن است برخی آنزیم‌های سم‌زدایی و آنتی‌اکسیدانی در حشرات فعال شوند که موجب کاهش حساسیت حشرات جفت‌گیری کرده نسبت به اسانس رزماری شده و حشرات در دزهای بالاتری دارای مرگ‌ومیر بودند. سعی در این است که در پژوهش‌های بعدی به بررسی همزمان اثر جفت‌گیری و اسانس رزماری بر

به ترتیب برای افراد نر (۴۱/۰۹۴، ۵۹/۶۵۷ و ۷۹/۰۸۷) میکرولیتر بر لیتر هوا و برای افراد ماده (۵۲/۷۰۴، ۷۱/۰۸۰ و ۱۰۵/۷۱۶) میکرولیتر بر لیتر هوا است. مقدار LC_{50} به ترتیب برای هر سه گروه تیمار در حشرات نر (۴۸/۱۷۳، ۶۶/۶۸۹ و ۹۰/۰۳۲) میکرولیتر بر لیتر هوا و برای حشرات ماده (۵۹/۲۹۸، ۷۶/۴۸۷ و ۱۱۸/۰۱۵) میکرولیتر بر لیتر هوا به دست آمده است. همچنین مقدار LC_{70} در هر سه گروه به ترتیب برای نر (۵۳/۲۶۷، ۷۴/۵۵۰ و ۱۰۲/۴۹۱) و این مقدار برای حشرات ماده (۶۶/۷۱۷، ۸۲/۳۰۵ و ۱۳۱/۷۴۴) محاسبه شده است. افراد نر و ماده زمانی که جفت‌گیری می‌کنند یک سری مواد^۱ از طرفین به هم دیگر انتقال می‌یابد که باعث تغییرات فیزیولوژی و بیولوژی در این افراد می‌شود (Voigt, et al. 2005). طبق پژوهشی که توسط ملک و همکاران (Matek, et al. 2019) انجام شده است، این مواد باعث افزایش طول عمر و مقاومت افراد ماده و کاهش طول عمر افراد نر بعد از جفت‌گیری می‌شود. در این پژوهش، افراد باکره نسبت به اسانس رزماری حساس‌تر بودند و در دزهای پایین این اسانس واکنش نشان دادند و مقدار LC_{30} ، LC_{50} و LC_{70} برای افراد نر این گروه حشرات به ترتیب (۴۱/۰۹۴، ۴۸/۱۷۳ و ۵۳/۲۶۷) میکرولیتر بر لیتر و برای ماده‌های باکره به ترتیب (۵۲/۷۰۴، ۵۹/۲۹۸ و ۶۶/۷۱۷) میکرولیتر بر لیتر است. در حالی که این مقدار برای افراد نر و ماده‌ای که یک‌بار جفت‌گیری داشتند به ترتیب (۵۹/۶۵۷، ۶۶/۶۸۹ و ۷۴/۵۵۰) و (۷۱/۰۸۰، ۷۶/۴۸۷ و ۸۲/۳۰۵) است. همچنین مقدار این پارامترها برای افرادی که در طول ۲۴ ساعت در حال جفت‌گیری بودند، برای افراد نر (۷۹/۰۸۷، ۹۰/۰۳۲ و ۱۰۲/۴۹۱) و برای افراد ماده (۱۰۵/۷۱۶، ۱۱۸/۰۱۵ و ۱۳۱/۷۴۴) است. با توجه به این نتایج، هنگامی که افراد باهم جفت‌گیری می‌کنند به دلیل تغییرات در فیزیولوژی حشرات، رفتار متفاوتی در برابر محرک‌های بیرونی مثل اسانس رزماری دارند و در دزهای بالاتر از این اسانس واکنش نشان می‌دهند. همچنین اثر اسانس (*Cymbopogon citratus*) در رفتار جنسی و فعالیت آنزیمی در جنس‌های مختلف سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات، در حشرات باکره و جفت‌گیری کرده بررسی شده

سیستم آنزیمی حشرات کامل سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات پرداخته شود.

REFERENCES

1. Amin Afshar, M., P. Mahasti and Z. Emam Jomeh (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)
2. Amiri, A. (2020). Effect of four essential oils, including eucalyptus leaf, eucalyptus flower, rosemary leaf, and mint leaf on hatching and larval duration of the cowpea weevil. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 51(1): 121-128. (In Farsi)
3. Amiri, A. and F. Bagheri (2020). Evaluation of fumigant toxicity and behavioral effect of mint and rosemary essential oils in the cowpea weevil. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 51(2): 161-169. (In Farsi)
4. Aslan, İ., H. Özbek, Ö. Çalmaşur and F. Şahin (2004). Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Industrial Crops and Products*, 19(2): 167-173.
5. Beck, C. W. and L. S. Blumer (2011). A handbook on bean beetles, *Callosobruchus maculatus*. *National Science Foundation*, 2: 1-10.
6. de Souza Alves, M., I. M. Campos, D. d. M. C. de Brito, C. M. Cardoso, E. G. Pontes and M. A. A. de Souza (2019). Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. *Crop protection*, 119: 191-196.
7. Douiri, L. F., A. Boughdad, M. H. Alaoui and M. Moumni (2014). Biological activity of *Rosmarinus officinalis* essential oils against *Callosobruchus maculatus*, (Coleoptera, Bruchinae). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(2): 5-14.
8. Fakoori, H. and E. Sedaghatfar (2020). Insecticide Effect of Rosmary and Lavander Essential Oils on Adult Stage of *Callosobruchus maculatus*. *Bioagricra*, 1(1): 1-9.
9. Gueribis, F., N. Zermane, O. Khalfi-Habess, A. Siafa, A. Cimmino, A. Boari and A. Evidente (2019). Bioefficacy of compounds from *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) as protectant of chickpea seeds against the cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(5): 437-446.
10. Kavallieratos, N. G., C. G. Athanassiou, C. J. Saitanis, D. C. Kontodimas, A. N. Roussos, M. S. Tsoutsou and U. A. Anastassopoulou (2007). Effect of two azadirachtin formulations against adults of *Sitophilus oryzae* and *Tribolium confusum* on different grain commodities. *Journal of food protection*, 70(7): 1627-1632.
11. Kébé, K., N. Alvarez and A. Espíndola (2020). Oviposition choice and larval development of the seed beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) on three cowpea varieties. *Journal of Stored Products Research* 86: 101578.
12. Kurtz, J., A. Wiesner, P. Götz and K. P. Sauer (2000). Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Developmental & Comparative Immunology*, 24(1): 1-12.
13. Magierowicz, K., E. Górska-Drabik and C. Sempruch (2019). The insecticidal activity of *Satureja hortensis* essential oil and its active ingredient-carvacrol against *Acrobasis advenella* (Zinck.) (Lepidoptera, Pyralidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 153: 122-128.
14. Małek, D. K., M. J. Dańko and M. Czarnoleski (2019). Does seed size mediate sex-specific reproduction costs in the *Callosobruchus maculatus* bean beetle? *PloS one*, 14(12): e0225967.
15. Mirkazemi, F., A. Bandani and G. A. SABAHI (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* (Herbst). *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 32(2): 37-53. (In Farsi)
16. Nenaah, G. E. and S. I. Ibrahim (2011). Chemical composition and the insecticidal activity of certain plants applied as powders and essential oils against two stored-products coleopteran beetles. *Journal of Pest Science*, 84(3): 393-402.
17. Saha, D., A. Mukhopadhyay and M. Bahadur (2012). Effect of host plants on fitness traits and detoxifying enzymes activity of *Helopeltis theivora*, a major sucking insect pest of tea. *Phytoparasitica*, 40(5): 433-444.
18. Said-Al Ahl, H., W. M. Hikal and K. G. Tkachenko (2017). Essential oils with potential as insecticidal agents: A review. *International Journal of Environmental Planning and Management*, 34: 23-33.
19. Schwarzenbach, G., D. Hosken and P. Ward (2005). Sex and immunity in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(2): 455-463.
20. Stevenson, P. C., M. B. Isman and S. R. Belmain (2017). Pesticidal plants in Africa: a global vision of new biological control products from local uses. *Industrial Crops and Products*, 110: 2-9.

21. Tak, J. H., E. Jovel and M. B. Isman (2016). Comparative and synergistic activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper,
22. *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest management science*, 72(3): 474-480.
23. Tapondjou, L., C. Adler, H. Bouda and D. Fontem (2002). Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *Journal of stored products research*, 38(4): 395-402.
24. Tiroesele, B., K. Thomas and S. Seketeme (2015). Control of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), using natural plant products. *Insects*, 6(1): 77-84.
25. Vilela, A. d. O., L. R. Faroni, A. H. Sousa, M. A. Pimentel and J. L. Gomes (2020). Toxicological and physiological effects of allyl isothiocyanate upon *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Stored Products Research*, 87: 101625.
26. Vogelweith, F., S. Foitzik and J. Meunier (2017). Age, sex, mating status, but not social isolation interact to shape basal immunity in a group-living insect. *Journal of insect physiology*, 103: 64-70.
27. Voigt, C. C., R. Michener and T. H. Kunz (2005). The energetics of trading nuptial gifts for copulations in katydids. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(3): 417-423.