گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٥، شماره۲، تابستان ١٤٠١

doi 10.22055/ppr.2022.17384

اثر سمیت سه اسانس گیاهی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لارو سن چهارم بید غلات، *Sitotroga cerealella* (Oliver)

سمانه محمودوند[۱]، جهانشیر شاکرمی[۲*]، مسعود علیرضایی[۳]، شهریار جعفری[۴] و مژگان مردانی طلایی[۵]

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲- *نویسنده مسوول: استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران (shakarami.j@lu.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
٤- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
٥- دکتری حشره شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۱

چکیده

بید غلات، *Sitotroga cerealella* (Oliver)، یکی از مهم‌ترین آفات با دامنه میزبانی وسیع در ایران و جهان می‌باشد. در این مطالعه تأثیر اسانس‌های گیاهی پونه، *Mentha longifolia* L.، آویشن‌دنایی، *Thymus daenensis* Celak و درمنه‌کوهی، *Artemisia aucheri* Boiss، از تیره‌های مختلف در مقایسه با حشره‌کش ارگانوفسفره دی‌کلروس (DDVP®) به عنوان شاهد مثبت پس از ٢٤ ساعت، روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و میزان پراکسیداسیون لیپید لاروهای سن چهارم شب‌پره بید غلات بررسی گردید. آزمایش‌ها در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ٥±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط آزمایشگاهی و در قالب طرح کاملا تصادفی و سه تکرار انجام شد. میزان LC_{50} برای اسانس پونه، آویشن دنایی و درمنه کوهی به ترتیب ۰/۰٤، ۰/٦٨ و٦/٤٧ میکرولیتر بر لیتر هوا ثبت شد، همچنین بالاترین درصد مرگ‌ومیر با افزایش غلظت اسانس پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی (۰/۰۹، ۳ و ۹ میکرولیتر بر لیتر هوا) به ترتیب ۸٤، ۸۰/٦۷ و ۷۷/۳۳ درصد تعیین شد. با افزایش غلظت اسانس فعالیت آنزیمی افزایش یافت. به‌طوری‌که افزایش فعالیت معنی‌دار CAT، SOD و میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در لاروهای تیمار شده با اسانس‌های پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی مشاهده شد. به نظر می‌رسد اسانس‌های مختلف پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی با اثر بر فعالیت‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان لارو سن چهارم بید غلات از طریق اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و زنده‌مانی بتواند در کنترل این آفت در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفت موثر واقع شوند.

کلیدواژه‌ها: سوپر اکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداسیون لیپید، MDA

دبیر تخصصی: دکتر نجمه صاحب‌زاده

Citation: Mahmoudvand, S., Shakarami, J., Alirezaei, M., Jafari, S. & Mardani- Talaee, M. (2022). Toxicity of plant essential oils three on antioxidant enzymes activity of fourth instar larvae of *Sitotroga cerealella* (Oliver). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(2), 1-16. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17384.

مقدمه

امروزه هدف نهایی کشورهای جهان افزایش تولید محصولات کشاورزی ارگانیک و سالم برای جمعیت رو به رشد می‌باشد (Mirzashahi & Salempour, 2010). با افزایش تولید محصولات کشاورزی استفاده از حشره‌کش‌های سنتزی بیش از گذشته افزایش‌یافته که منجر به اثرات زیان‌باری روی سلامت انسان و محیط زیست و گسترش مقاومت حشرات محصولات انباری می‌شوند (Bhumi et al., 2017). اخیرا در میان روش‌های جایگزین جهت کاهش مصرف سموم شیمیایی، استفاده از سموم گیاهی براساس رابطه گیاه- حشره مورد توجه قرار گرفت به طوری‌که ترکیبات موثره گیاهی در فرآیندهای بیوشیمیایی گیاه نقش مهمی نداشته ولی در روابط اکولوژیکی گیاه به خصوص برهمکنش‌های گیاه و حشره نقش حیاتی داشته و گاهی باعث بروز مقاومت گیاه در مقابل حشره می‌شود (Dey & Gupta, 2016). گیاهان با داشتن ترکیبات آروماتیک دارای منابع غنی از ترکیبات شیمیایی حشره‌کش هستند (Kim et al., 2008). به طور سنتی گیاهان با خواص حشره‌کشی در طول سالیان گذشته در سرتاسر جهان استفاده شده است (Belmain et al., 2001). اسانس‌های گیاهی مهمترین ترکیبات مشتق‌شده از گیاهان آروماتیک هستند (Regnault-Roger et al., 2012). همچنین گیاهان در طول میلیون‌ها سال دوران تکامل خود به ترکیبات گوناگونی مجهز شده‌اند که همچون سلاحی آنها را در برابر آفات گوناگون محافظت می‌کند که این ترکیبات به نام متابولیت‌های ثانویه معروف هستند که نقش عمده‌ای در دفاع گیاهان در مقابل حشرات گیاه‌خوار دارند (Enan, 2001). متابولیت‌های ثانویه شامل مونوترپنوئیدها، سیانوهیدرین‌ها و سیانات‌ها، ترکیبات گوگردی (دی‌متیل دی‌سولفید، دی‌اتیل تری‌سولفید، دی-n-پروپیل دی سولفید، آلیل دی‌سولفید، دی‌آلیل تری‌سولفید، آلیل تیوسولفینات‌ها)، آلکالوئیدها و متیل سالیسیلات، مشتقات بنزن، بورنیل استات، ترپینولن دارای سمیت بالایی برای آفات می‌باشند (Stejskal et al., 2021).

اسانس‌های گیاهی به دلیل داشتن خواص بیولوژیکی مختلف می‌توانند روی بیوشیمی، فیزیولوژی و رفتار حشرات موثر باشند (Dey & Gupta, 2016). بنابراین، بدن حشرات زمانی‌که در معرض حشره‌کش قرار می‌گیرد؛ قبل از بروز علام مسمومیت، تغییرات معنی‌داری در فراسنجه‌های شیمیایی آن ایجاد می‌شود (Kiran et al., 2017). اسانس‌های گیاهی علاوه بر سمیت بالا برای حشرات، نقش کلیدی در غیرفعال کردن آنزیم‌ها و پروتئین‌ها دارند (Ni et al., 2021). حشرات همانند سایر موجودات در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[1]) ایمن نیستند، گونه‌های فعال اکسیژن محصول سمی متابولیسم‌های هوازی بوده که می‌تواند به لیپید، پروتئین و اسیدهای نوکلئوتیک آسیب برساند که یک تهدید واقعی برای همه فرایندهای سلولی می‌باشند (Lohar et al., 2007). استرس اکسیداتیو در اثر عدم تعادل بین میزان اکسیدان‌ها (رادیکال‌های آزاد) و آنتی‌اکسیدان‌ها بوده که موجب پراکسیداسیون لیپید، اکسیداسیون پروتئین و مرگ سلول می‌شود که روی نشوو نما، بقاء، زادآوری، باروری و طول عمر حشره بالغ موثر است (Chintalchere et al., 2021). حشرات دارای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهمی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز(CAT) که نقش مهمی در سم‌زدایی ROS تولید شده توسط سموم دارند و آنزیم SOD رادیکال سوپراکسید ($2O_2^-$) را به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و اکسیژن معمولی (O_2) کاتالیز می‌کند (Chaudhari et al., 2021). آنزیم CAT پراکسیدها را به آب و اکسیژن مولکولی برای حفاظت سلول تبدیل می‌کنند (Wang et al., 2001). پراکسیداسیون لیپید (LPO) یکی

1. Reactive Oxygen Species

از واکنش‌های مهم در تعیین خسارت اکسیداتیو می‌باشد که بوسیله اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدهید (MDA) تعیین می‌شود (Migula et al., 2004). مالون دی‌آلدهید شاخص خوبی برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید می‌باشد که نتیجه نهایی پراکسیداسیون لیپید منجر به تولید مواد مضر آلدهید که مهم‌ترین آنها مالون دی‌آلدهید است (Meagher & Gerald, 2000). رادیکال آزاد باعث شروع پراکسیداسیون لیپید در اثر غلظت کم اکسیژن در غشا می‌شود و رادیکال‌های آزاد تمایل به واکنش با یکدیگر یا با ترکیبات دیگر مثل پروتئین‌ها داشته، بنابراین غلظت اکسیژن در تعیین سرنوشت پراکسیداسیون موثر است (Gönenç et al., 2005). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح مالون دی‌آلدهید در حشرات تحت استرس اکسیداتیو تغییر می‌کنند (Emre et al., 2013). سطح و نوع ROS تعیین کننده فاکتورهایی برای نوعی از پاسخ است؛ همچنین ROS ژن‌های دفاعی را در پایین ترین سطح القا می‌کند و موجب مرگ سلول می‌شود (Ahmad et al., 2011). برخی گزارش‌ها بیان کردند که آفات در معرض حشره‌کش‌های گیاهی مانند اسانس‌ها سبب استرس اکسیداتیو و افزایش بیش از حد ROS در بدن می‌شوند (Mostafalou & Abdollahi, 2013). در مطالعه‌ای اسانس‌ها از طریق متابولیت‌های ثانویه مشابه حشره‌کش‌های سنتزی می‌توانند استرس اکسیداتیو را ایجاد کنند (Zunino & Zygadlo, 2004). سمیت اسانس روی آفات انباری موجب عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین صدمه به سلول می‌شود (Kiran et al., 2017). براساس بررسی‌های انجام شده بیشتر مطالعات مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی در حشرات گیاه‌خوار روی راسته بالپولکداران بوده است (Lukasik, 2007). بررسی اثر ترکیبات گیاهی روی فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در گونه‌های زیادی از راسته بالپولکداران گزارش شده است (Ahmad & Pardini, 1990). در مطالعه‌ای سمیت ترکیبات گیاهی موجب تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD لارو سن پنجم پروانه پشت الماسی شدند (Pritsos et al., 1988).

از میان تیره‌های مهم دارای اسانس، دو تیره بزرگ نعناعیان Lamiaceae و کاسنی Asteraceae کاربرد بیشتری دارند (Enan, 2001). جنس *Mentha* و *Thymus* از مهمترین جنس‌های تیره‌ی Lamiaceae به ترتیب دارای ۴۲ و ۳۱۵ گونه می‌باشد (Mozafarian, 2014). اسانس گونه‌های مختلف جنس‌های مذکور دارای خواص حشره‌کشی، دورکننده قوی حشرات، ضدقارچی، ضدباکتری و ضدسرطانی می‌باشند (WorWood, 1993; Stahl-Biskup & Sáez, 2002). گونه‌های پونه، *Mentha longifolia*، و آویشن دنایی، *Thymus daenensis*، از مهمترین گونه‌های دارویی تیره‌ی Lamiaceae در ایران و جهان هستند (Kumar et al., 2011). مهم‌ترین ترکیبات موثره اسانس پونه و آویشن دنایی مونوترپنوئیدهای منتون، آلفا- ترپینول، سیس‌پیپرینوناپوکسید، تیمول، کارواکرول، ۱ و ۸- سینئول و پولگون است که خواص حشره‌کشی آنها گزارش شده است (Kamkar et al., 2012; Hasani, 2013). ترکیب موثره پلیگون موجود در اسانس پونه برای جانوران مهره‌دار سمی بوده و اکسیداسیون پلیگون به ۹- هیدروکسی پولگون و سپس به منتوفوران و نیز ۸- پولگون آلدهید سبب افزایش رادیکال‌های آزاد شده و شرایط را برای پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی مهیا می‌کند (Kamatou et al., 2013). جنس *Artemisia* یکی از بزرگترین جنس‌های تیره Asteraceae دارای ۴۰۰ گونه در سرتاسر دنیا می‌باشد (Azadbakht, 2000). گونه درمنه‌کوهی، *Artemisia aucheri* Boiss، یکی از گونه‌های دارویی معروف ایران از تیره‌ی کاسنی است (Ghahreman, 2000). مهم‌ترین

مونوترپنوییدهای شناسایی‌شده در اسانس درمنه کوهی شامل آلفاترپینن، آرتمیسیا کتون، لینالول، ژرانیول و ترانس سیترال بوده که خواص حشره‌کشی آنها اثبات شده است (Mirzaeian et al., 2014). درمنه‌کوهی دارای خواص ضد میکروبی و باکتری بوده و همچنین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و حشره‌کشی هستند (Shakarami et al., 2004; Asghari et al., 2012).

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر مهمترین گیاهان دارویی ایران شامل پونه، *M. longifolia*، آویشن‌دنایی، *T. daenensis*، و درمنه‌کوهی، *A. aucheri*، بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لارو سن چهارم بید غلات است. نقش گیاهان دارویی ایران در کنترل آفات انباری می‌تواند گامی موثر در کاهش مصرف آفت‌کش‌های سنتزی و مدیریت آفات گیاهی باشد؛ همچنین درک اثرات بیوشیمیایی اسانس‌های گیاهی روی حشرات قطعا استراتژی کنترل ایمن آفات انباری را نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان سموم ارگانیک با فرمولاسیون جدید را معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

پرورش بید غلات

این آزمایش در آزمایشگاه سم‌شناسی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان در سال ۱۳۹۹ انجام شد. شب‌پره‌ی بید غلات، *Sitotroga cerealella* Olivier (Lep.: Gelechiidae)، از آزمایشگاه حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی لرستان تهیه شد. تخم حشرات کامل در ظروف پلاستیکی به حجم یک لیتر حاوی دانه گندم تکثیر شد. حشرات برای سه نسل در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد و با دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی پرورش داده شدند. تفکیک سنین لاروها بر اساس عرض کپسول سر، اندازه و قطر بدن انجام شد. لاروها تا رسیدن به سن چهارم لاروی پرورش داده شدند و برای آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

جمع‌آوری و استخراج اسانس گیاهان پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی

در این تحقیق گیاهان پونه، *M. longifolia*، از بخش ویسیان شهرستان خرم‌آباد با موقعیت جغرافیایی ۴۸ دقیقه و ۴ درجه شرقی و۳۳ دقیقه و ۲۹ درجه شمالی؛ آویشن‌کوهی، *T. daenensis*، از کوه گرین شهرستان الشتر با موقعیت جغرافیایی۴۳ دقیقه و ۳۷ درجه شرقی و صفر دقیقه و ۲۵ درجه شمالی و درمنه‌کوهی، *A. aucheri*، از کوه اشترانکوه شهرستان دورود با موقعیت جغرافیایی ۸ دقیقه و ۳۷ درجه شرقی و ۴۲ دقیقه و ۳۱ درجه شمالی در مرحله گلدهی جمع‌آوری شدند. براساس منابع بیشترین مقدار اسانس گیاهان در زمان گلدهی می‌باشد (Shakarami et al., 2004). نمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط سایه و تهویه مناسب خشک شدند. جهت تهیه اسانس شاخه‌های چوبی جدا شده و گیاه خشک‌شده به شکل پودر در آمدند. گیاهان پودر شده (نسبت گیاه به آب ۱:۱۰) به کمک دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای کلونجر (ساخت موسسه پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) اسانس‌گیری شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آبگیری شده و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای به حجم دو میلی‌لیتر با روپوش آلومینیومی در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد.

اثر سمیت تنفسی اسانس‌های پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی روی لاروهای سن چهارم بید غلات

براساس آزمایش‌های اولیه روش Chippendale (1970) با اندکی تغییرات اثر سمیت تنفسی اسانس پونه، آویشن دنایی و درمنه‌کوهی روی لارو سن چهارم بید غلات انجام شد. براساس پریتست اولیه غلظت‌های مختلفی از اسانس‌های پونه (۰/۰۱، ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۰۷ و ۰/۰۹میکرولیتر بر لیتر هوا)، آویشن‌دنایی (۰/۰۵، ۰/۰۷، ۰/۸، ۱ و ۳

میکرولیتر بر لیتر هوا) و درمنه‌کوهی (۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ میکرولیتر بر لیتر هوا) و غلظت ۵۰ درصد کشندگی به میزان ۰/۳ میکرولیتر بر لیتر هوا سم دی‌کلروووس به عنوان شاهد مثبت روی لاروهای سن چهارم بید غلات تعیین شد. همچنین در شاهد منفی چیزی ریخته نشد. تعداد ۵۰ عدد لارو سن چهارم بید غلات به همراه پلت رژیم غذایی (حاوی مخمر، آرد گندم و آب) به وزن ۰/۳ گرم درون ظروف شیشه‌ای به حجم ۲۷ میلی‌لیتر قرار داده شد. غلظت‌های مختلفی از اسانس‌های پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی روی کاغذ صافی ریخته شد و اجازه داده شد که اسانس روی کاغذ صافی به مدت ۳۰ ثانیه تبخیر شود. کاغذ صافی درون درپوش ظرف شیشه‌ای قرار داده شد و درپوش با پارافیلم محکم بسته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت در معرض اسانس میزان مرگ‌ومیر لاروها در تیمارها و شاهد شمارش شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

آماده‌سازی نمونه برای بررسی فعالیت‌های آنتی اکسیدانی لاروهای سن چهارم بید غلات

تعداد ۱۲۰ لارو زنده سن چهارم بید غلات تیمارشده با سه اسانس گیاهی پونه، آویشن‌دنایی، درمنه‌کوهی، شاهد مثبت و منفی به طور تصادفی انتخاب و به صورت دستی هموژنیزه شد. پس از آن نمونه‌ها بوسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار (SORVALL RC-2B) در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس جدا گردید. محلول رویی برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم کاتالاز (CAT)، غلظت ترکیب مالون دی‌آلدهید (MDA) استفاده شد(Alirezaei et al., 2011).

سنجش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از کیت ارائه شده توسط شرکت کیاتجهیز (شیراز، ایران) تعیین شد. یک واحد از سوپر اکسید دیسموتاز مقداری از آنزیم است که موجب مهار ۵۰ درصد از واکنش احیاء ۲- ۴- یدوفنیل ۳- ۴ نیتروفنل ۵- فنیل تترازولیوم تحت شرایط آزمایش شد. ارزیابی فعالیت بوسیله اسپکتروفتومتر (Optizen®3220UV) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت و به صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بافت (U/mg protein) بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

کاتالاز بافتی با استفاده از مدل کلیبورن (Claiborne, 1986) که پیش از این توسط Alirezaei et al. (2011) گزارش شده است، ارزیابی شد. مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر حاوی پنج میلی‌مولار فسفات پتاسیم با اسیدیته ۷، میزان ۱۹ میلی‌مولار آب اکسیژنه و ۲۰ تا۵۰ میکرولیتر از نمونه هموژنیزه می‌باشد. واکنش با افزودن اضافه‌شدن آب اکسیژنه شروع شد و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از ضریب خاموشی مولی ۴۳/۶ مول در سانتی‌متر فعالیت آنزیم محاسبه شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بافت (U/mg protein) بیان شد. آزمایش با استفاده از کیت ارائه شده توسط شرکت کیاتجهیز (شیراز، ایران) تعیین شد.

اندازه‌گیری ترکیب آلی مالون دی‌آلدهید (MDA)

میزان پراکسیداسیون چربی کل بدن لارو بوسیله تعیین مقدار مواد واکنش‌دهنده با اسید تیوباربیتوریک براساس روش Subbarao et al. (1990) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ۴۰ میکرولیتر از بافت هموژنیزه به ۴۰ میکرولیتر سدیم کلراید ۰/۹ درصد و ۴۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. با استفاده از ۶۰۰ میکرولیتر اسید هیدروکلریک ۰/۸ مولار که حاوی تری‌کلرواستیک اسید ۱۲/۵ درصد است واکنش متوقف گردید. پس از افزودن ۷۸۰ میکرولیتر تیوباربیتوریک اسید یک درصد، محلول به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد و در دمای چهار درجه سلسیوس سرد شد. محلول سرد به مدت ۲۰ دقیقه با دور

۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید و میزان جذب نور آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بلنک، برای محاسبه مقدار مواد واکنش‌دهنده به اسید تیوباربیتوریک بکار گرفته شد. این میزان به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بافت (nmol/mg protein) بیان گردید.

تجزیه داده ها

آزمایش‌های صورت گرفته براساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد. براساس درصد تلفات در غلظت‌های مختلف، غلظت کشنده ۵۰ درصد یا LC_{50} با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ محاسبه شد (SPSS, 2015). همچنین قبل از تجزیه داده‌های فیزیولوژی لاروهای سن چهارم بید غلات، آزمون نرمال بودن آن‌ها با استفاده از آزمون کلموگوروف- اسمیرنوف بررسی شد. داده‌ها با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه آنالیز و در صورت وجود اختلاف بین میانگین داده‌ها، از آزمون تعقیبی توکی در سطح احتمال پنج درصد برای مقایسه آن‌ها استفاده گردید.تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS IBM نسخه‌ی ۲۳ انجام شد.

نتایج

زیست‌سنجی

سمیت تنفسی سه اسانس گیاهی پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی با میزان LC_{50} به ترتیب ۰/۰۴، ۰/۶۸ و ۶/۴۷ میکرولیتر بر لیتر هوا پس از ۲۴ ساعت روی لارو سن چهارم بید غلات محاسبه شد (جدول ۱).

نتایج نشان داد میزان سمیت اسانس پونه ($F=21.89$; $df=5$; $P<0.0001$) نسبت به اسانس‌های آویشن‌دنایی ($F=21.38$, $df=5$; $P<0.0001$) و درمنه‌کوهی ($F=20.45$; $df=5$; $P<0.0001$) بیشتر بود. بالاترین غلظت‌های اسانس گیاهان پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی (۰/۰۹، ۳ و ۹ میکرولیتر بر لیتر هوا) به ترتیب ۸۴، ۸۰/۶۷ و ۷۷/۳۳ درصد فعالیت لاروکشی روی بید غلات نشان داد (جدول ۲).

اثر اسانس‌های پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی روی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و ترکیب آلی مالون دی‌الدهید لاروهای سن چهارم شب‌پره بیدغلات

لاروهای تیمار شده با اسانس‌های گیاهی پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی فعالیت بالایی از آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز را نشان دادند (جدول۳). در مورد اسانس پونه ($F=14.852$; $df=6$; $P<0.0001$)، اسانس آویشن‌دنایی ($F=13.347$; $df=6$; $P<0.0001$) و درمنه‌کوهی ($F=22.381$, $df=6$; $P<0.0001$) بعد از ۲۴ ساعت میزان فعالیت آنزیم بیشتر از شاهد مثبت و منفی است. بیشترین فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز لارو شب‌پره بید غلات بعد از تیمارشدن با بیشترین غلظت اسانس درمنه‌کوهی ۹ میکرولیتر بر لیتر هوا بعد از ۲۴ ساعت نشان داده شد.کمترین آن مربوط به اسانس پونه و آویشن‌دنایی ۲۴ ساعت بعد از تیمار شدن بدست آمد (جدول ۳).

جدول ۱- میزان LC_{50} اسانس گیاهان پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی روی لاروهای سن چهارم بید غلات، *S. cerealella* بعد از ۲٤ ساعت

Table1. LC_{50} values of plant essential oils of *M. longifolia, T. daenensis* and *A. aucheri* against *S. cerealella* 4th larvae after 24 h.

Essential oil	N	X^2 (df)	P value	F value	Slope± SE	LC_{50}(µL/L_{air}) (95 % CL)
M. longifolia	500	31.47 (3)	P<0.0001	8.20	-3.12±0.08	0.04 (0.03-0.05)
T. daenensis	500	25.79 (3)	P<0.0001	8.04	-0.38±0.20	0.68 (0.46-1.05)
A. aucheri	500	21.74 (3)	P<0.0001	7.54	1.86±0.10	6.47 (5.35-8.26)

جدول ۲- درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن چهارم تیمار شده بید غلات با غلظت‌های مختلفی از سه اسانس گیاهی بعد از ٢٤ ساعت

Table 2. Mortality (%) of 4th larvae of *S. cerealella* treated with different concentrations of essential oils of three plant species after 24 h

Essential oils	Concentration ($\mu L/L_{air}$)	Larvae mortality% (Mean ± SE)
M. longifolia	0.01	16.00±1.15d*
	0.03	24.00±3.06cd
	0.05	48.67±6.96bc
	0.07	66.00±8.33ab
	0.09	84.00±5.03a
DDVP	0.3	50.67±4.81b
T. daenensis	0.05	12.67±3.87d
	0.07	22.67±2.40cd
	0.8	40.67±6.36bc
	1	60.67±8.51ab
	3	80.67±5.46a
DDVP	0.3	50.67±4.81b
A. aucheri	1	10.00±1.15d
	3	20.67±2.40cd
	5	37.33±6.36bc
	7	57.33±8.74ab
	9	77.33±5.70a
DDVP	0.3	50.67±4.81b

* Means with different letters were significantly different (Tukey *P<0.001*).

همچنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز لارو سن چهارم بید غلات تیمار شده با بالاترین غلظت اسانس‌های گیاهی ۲۴ ساعت بعد از تیمار شدن در جدول ۳ نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم‌ها بین اسانس‌ها و غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد با شاهد دارد. بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به اسانس پونه (F=65.478; df=6; *P*< 0.0001) و کمترین مربوط به درمنه‌کوهی (F=21.806; df=6; *P*< 0.0001) و آویشن‌دنایی (F= 13.956; df=6; *P*<0.0001) بعد از ۲۴ ساعت بعد از تیمار می‌باشد. میزان فعالیت این آنزیم بعد از ۲۴ ساعت افزایش یافت (جدول ۳).

اثر اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه پونه (F=794.576; df=6; *P*<0.0001)، آویشن‌دنایی(F=305.796; df=6; *P*<0.0001) و درمنه‌کوهی (F=1.118; df=6; *P*<0.0001) میزان پراکسیداسیون لاروهای تیمارشده در مقایسه با شاهد منفی و مثبت را به طور معنی‌داری بعد از ۲۴ ساعت تیمار کردن لارو افزایش داد. اسانس‌های پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی به ترتیب در بالاترین غلظت‌های ۰/۰۹، ۳ و ۹ میکرولیتر بر لیتر مورد مطالعه باعث افزایش میزان غلظت مالون دی‌آلدهید سن چهارم لارو بید غلات شدند (جدول ۳).

بحث

کنترل آفات حشره‌ای با استفاده از اسانس‌های گیاهی در برنامه مدیریت تلفیقی آفات امیدوارکننده است، چون باعث کاهش مصرف سموم شیمیایی می‌شود. همچنین استفاده از ترکیبات گیاهی در مقایسه با حشره‌کش‌های سنتزی دارای کارایی، ارزش اقتصادی و کاربرد در سطح وسیع، جایگاه ویژه‌ای به خود اختصاص داده است (Pavela, 2018). نتایج بدست آمده نشان داد که حشره‌کش‌های زیستی و سنتزی اثرات متفاوتی بر میزان مرگ و میر حشرات دارند.

جدول ۳- اثر اسانس پونه *M. longifolia*، آویشن‌دنایی *T. daenensis* و درمنه‌کوهی، *A. aucheri*، روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لاروهای سن چهارم بید غلات *S. cereallela* بعد از ۲۴ ساعت

Table 3. Effect of *M. longifolia*, *T. daenensis* and *A. aucheri* essential oils on antioxidant enzymes of the fourth instar larvae of *S. cereallela* after 24 hours

Concentration ($\mu L/L_{air}$)	Catalase (U/mg protein)	Superoxide dismutase (U/mg protein)	Malondialdehyde
M. longifolia			
Neg. Control	0.025±0.003d	0.011±0.004c	0.001±0.0002c
Pos. Control	0.046±0.006c	0.055±0.014ab	0.014±0.0001a
0.01	0.036±0.007cd	0.007±0.004c	0.002±0.0002c
0.03	0.042±0.003cd	0.015±0.004c	0.003±0.0003b
0.05	0.047±0.002c	0.035±0.001bc	0.004±0.0003b
0.07	0.069±0.003b	0.074±0.005a	0.014±0.0002a
0.09	0.119±0.000a	0.080±0.004a	0.014±0.0002a
T. daenensis			
Neg. Control	0.025±0.003d	0.011±0.004bc	0.001±0.0002d
Pos. Control	0.046±0.006b	0.055±0.014a	0.014±0.0008a
0.05	0.031±0.002cd	0.005±0.001c	0.001±0.0001d
0.07	0.034±0.002bcd	0.001±0.003bc	0.001±0.0002d
0.8	0.037±0.004bcd	0.016±0.004bc	0.003±0.0001c
1	0.040±0.003bc	0.038±0.041ab	0.012±0.0005b
3	0.061±0.002a	0.066±0.005a	0.015±0.0008a
A. aucheri			
Neg. Control	0.025±0.003c	0.0109±0.004c	0.001±0.0002d
Pos. Control	0.046±0.006b	0.0553±0.014b	0.014±0.0001a
1	0.026±0.001c	0.00116±0.002c	0.001±0.0001d
3	0.027±0.002c	0.01830±0.008c	0.001±0.0001d
5	0.058±0.002b	0.0327±0.009b	0.002±0.0001c
7	0.068±0.007ab	0.0658±0.005b	0.008±0.0004b
9	0.090±0.0059a	0.107±0.0039a	0.014±0.0001a

* Means with different letters were significantly different (Tukey *P<0.001*)

در این پژوهش با افزایش غلظت ترکیبات گیاهی میزان کشندگی افزایش یافت که اثر سمیت این ترکیبات روی آفت مورد نظر تایید می‌شود. در مطالعه انجام شده میزان کشندگی اسانس‌ها بیشتر بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا ترکیبات موجود در این اسانس‌ها اثرات تشدیدکننده روی یکدیگر داشته‌اند. همچنین اسانس‌های گیاهی و ترکیبات موثره آنها روی زنده‌مانی و فرایندهای فیزولوژیکی شامل هضم، متابولیسم‌های حد واسط، واکنش‌های ایمنی از جمله آپوپتوز و صدمات بافتی نقش مهمی دارند (Tak & Isman, 2016; Zibaee et al., 2011).

مطالعه حاضر نشان داد سه اسانس پونه، آویشن دنایی و درمنه‌کوهی سمیت تنفسی بالایی در مقایسه با سم DDVP روی لارو سن چهارم بید غلات دارند. همچنین با افزایش غلظت اسانس پونه، آویشن دنایی و درمنه کوهی در مقایسه با سم دی کلروووس درصد مرگ ومیر افزایش یافت. بالاترین غلظت‌های اسانس گیاهان پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی (۰/۰۹، ۳ و ۹ میکرولیتر بر لیتر هوا) به ترتیب ۸۴، ۸۰/۶۷ و ۷۷/۳۳ درصد مرگ و میر در مقایسه با غلظت ۰/۳ میکرولیتر بر لیتر هوا سم دی کلروووس به میزان ۵۰/۶۷ درصد مرگ و میر روی لارو سن چهارم بید غلات نشان دادند. همچنین اسانس پونه، آویشن دنایی و درمنه کوهی به ترتیب با مقدار LC_{50} محاسبه شده ۰/۰۴، ۰/۶۸ و ۱/۸۶ میکرولیتر بر لیتر هوا سمیت زیادی روی لارو بید غلات نشان دادند. درحالی‌که محققین گزارش کردند سم DDVP با

LC_{50} محاسبه شده ۱۳/۴۳ میکرولیتر بر لیتر هوا بیشترین سمیت را در بین حشره‌کش‌های سنتزی برای آفات دارد(Kolawole et al., 2014). به نظر می‌رسد اثر بخشی متفاوت اسانس‌های گیاهی به دلیل ترکیبات موثره موجود در آنها می‌باشد. در تحقیق دیگری توسط Momen et al. (2018) آشکار کرد اسانس پونه سمیت تنفسی زیادی روی مراحل زندگی کنه تارتن *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) دارد. میزان LC_{50} محاسبه شده اسانس پونه روی تخم، پوره و ماده‌های بالغ کنه تارتن به ترتیب ۲/۹۵، ۳/۴۷ و ۳/۷۴ میکرولیتر بر لیتر هوا محاسبه شد. در پژوهش دیگری مشخص شد که سمیت تنفسی آویشن دنایی در بالاترین غلظت ۷۲۷۲/۷۲ میکرولیتر بر لیتر حدود ۷۵ درصد مرگ و میر داشته است و مقدار LC_{50} محاسبه شده ۴۴۸۳ میکرولیتر بر لیتر روی لارو سن سوم شب‌پره آرد تعیین شد (Moazeni et al., 2013). در بررسی مشابه‌ای توسط Shakarami et al. (2004) سمیت تنفسی اسانس درمنه‌کوهی را روی حشرات کامل *Callosobruchus maculates* F.(Col.; Bruchidae), *Tribolium castaneum* Herbst (Col.; Tenebrionidae), *Sitophilus oryzae* L., *Sitophilus granarius* L. (Col.; Curculionidae) مورد بررسی قرار دادند. میزان مرگ و میر حشرات کامل با افزایش غلظت اسانس درمنه کوهی افزایش یافت. در بالاترین غلظت ۰/۹۲۶ میکرولیتر بر سانتی‌متر مکعب برای *C. maculates*، *T. castaneum*، *S. oryzae* و *S. granarius* به ترتیب ۸۴/۴۱، ۸۵/۴۱، ۷۰/۸۴ و ۸۳/۰۴ درصد مرگ و میر ثبت شد. نتایج مشابه دیگری میزان LC_{50} اسانس پونه ۴۱۳/۶۹ میکرولیتر بر لیتر روی لارو شب‌پره آرد محاسبه شد (Louni et al., 2018). همچنین در تحقیق مشابه‌ای توسط Mahmoudvand et al. (2014) سمیت تنفسی پونه و آویشن دنایی برای دو آفات انباری، *Tribolium castaneum* (Herbst) و *T. confusum* (Duval, 1868) (Col.: Tenebrionidae) مورد بررسی قرار گرفت. اسانس آویشن دنایی (مقادیر LC_{50} در حدود ۸۹/۲۹ و ۹۲/۷۷ میکرولیتر بر لیتر هوا) و اسانس پونه (میزان LC_{50} در مقادیر ۱۱/۵۹ و ۱۰/۶۷ میکرولیتر بر لیتر هوا) برای دو گونه شپشه آرد *T. castaneum* و *T. confusum* تعیین شد. به نظر می‌رسد اسانس پونه و آویشن دنایی مطالعه حاضر سمیت بیشتری برای لارو بید غلات داشته است. تفاوت در شرایط آزمایشی و گونه حشرات می‌تواند در نتایج موثر باشد. در مطالعه دیگری میزان LC_{50} اسانس *Artemisia khorassanica* و *A. sieberi* به ترتیب به میزان ۷/۳۸ و ۹/۲۶ میکرولیتر بر لیتر هوا روی حشره بالغ بید غلات تعیین شد (Naseri et al., 2017). به نظر می‌رسد اسانس *A. aucheri* نسبت به *Artemisia khorassanica* و *A. sieberi* سمیت بیشتری برای بید غلات داشته است. همچنین نتایج پژوهش ما بیانگر حساسیت بیشتر لارو بید غلات نسبت به حشرات کامل آن به اسانس‌های گیاهی می‌باشد که می‌تواند به علت نفوذپذیری بیشتر کوتیکول لاروها به اسانس‌ها باشد.

مطالعه حاضر نشان داد با افزایش غلظت‌های بکار برده شده اسانس‌های گیاهی در مقایسه با سم DDVP فعالیت SOD و CAT لارو سن چهارم بید غلات بعد از ۲۴ ساعت افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بستگی به نوع شرایط استرس، فشار و زمان تغییر می‌کند. در نتایج مشابه تأثیر نعناع فلفلی *Mentha piperita*، روی حشرات بالغ *T. castaneum* و *S. oryzae* آشکار شد که با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی فعالیت SOD و CAT افزایش یافته است (Rajkumar et al., 2019). در مطالعه‌ای مشابه دیگری تأثیر چهار گیاه *Jatropha curcas*، *Tithonia diversifolia*، *Cyperus rotundus* و *Hyptis suaveolens* در مقایسه با سه

آفت‌کش سنتزی دی‌کلروووس، لامبادا سای‌هالوترین و سایپرمترین روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد با افزایش غلظت در همه حشره‌کش‌های سنتزی و اسانس میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT افزایش یافت. اما سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی سوسک چهارنقطه‌ای نتوانسته موجب حذف حشره‌کش‌های سنتزی و زیستی درنتیجه از مرگ حشره جلوگیری کند (Kolawole et al., 2014). همچنین در تحقیقی مشابه مشخص شد اثر آللوکمیکال‌های گیاهی مانند اسانس‌ها روی حشرات باعث تولید کنترل‌نشده گونه‌های اکسیژن فعال درون سلول موجب اکسید شدن مولکول‌های زیستی و تغییر اطلاعات ژنتیکی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی غیرفعال می‌شوند؛ درنتیجه اختلال غشاهای زیستی تولید فشار (استرس) اکسایشی در حشره موجب مسمومیت و مرگ می‌شوند (Ahmad & Pardini, 1990). در مطالعه دیگری با افزایش غلظت اسانس سلمه‌تره معطر، *Chenopodium ambrosioides* L.، فعالیت زیادی از آنزیم CAT (۰/۲۸۲ واحد بر میلی گرم پروتئین) لارو شب‌پره پشت‌الماسی، *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758)، تعیین شد (Wei et al., 2015). مطالعه حاضر آشکار کرد با افزایش غلظت اسانس‌ها در لاروهای بید غلات تیمار شده سنتز SOD تحریک شده است که باعث تغییر شکل بالای آنیون سوپر اکسید می‌شود بنابراین از تولید رادیکال هیدروکسیل یک گونه واکنش پذیر جلوگیری می کند. فعالیت SOD اولین خط دفاعی در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند. آنزیم CAT توانایی بالایی در تغییر و تبدیل پراکسیداسیون اکسیژن دارد و غلظت آن توسط H_2O_2 تنظیم می‌شود (Fornazier et al., 2002). فعالیت بالاتر CAT با افزایش تأثیر اسانس‌های مورد مطالعه ممکن است به معنای افزایش حذف H_2O_2 و در نتیجه جلوگیری از آسیب اکسیداتیو باشد. در نتیجه خطر تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل را از طریق واکنش فنتون کاهش می‌دهد (Fridovich, 1999). اما مطالعه ما نشان داد استرس اکسیداتیو آنقدر زیاد بود که می‌تواند مبنای اثر بخشی اسانس و سم فسفره DDVP باشد و مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی حشره برای از بین بردن حشره‌کش زیستی و سنتزی کافی نبوده است.

مطالعه ما غلظت بالایی از MDA در لاروهای تیمار شده بید غلات با سه اسانس پونه، آویشن دنایی و درمنه کوهی در مقایسه با DDVP را نشان داد. با افزایش غلظت اسانس‌های گیاهی غلظت MDA افزایش یافت. مطالعه ما آشکار کرد اگر چه حشره‌کش‌های زیستی و سنتزی دارای ساختار متفاوتی هستند. اما به عنوان برهم زننده هموستازی سلولی موجب تولید رادیکال آزاد و در نتیجه پراکسیداسون لیپید می‌شوند (Leelaja and Rajini 2012). همچنین MDA به عنوان نشانگر در پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو نقش دارد (Orčić et al., 2017). پراکسیداسیون لیپید نشان‌دهنده خسارت گونه‌های فعال اکسیژن‌زا به غشاهای زیستی سلولی است (Janero, 1990). در بررسی مشابه دیگری دو اسانس اکالیپتوس، *Eucalyptus globulus* Labill.، و سیر، *Allium sativum* L.، موجب افزایش MDA روی لاروهای تیمارشده شب‌پره آرد شدند (Shahriari et al., 2018).

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد اسانس گیاهان پونه، آویشن‌دنایی و درمنه‌کوهی اثر لاروکشی معنی‌داری روی لارو سن چهارم بید غلات داشتند؛ همچنین با افزایش غلظت اسانس‌ها میزان مرگ و میر افزایش یافت. اسانس‌های مذکور موجب تغییرات معنی‌داری در برخی سیستم‌های فیزیولوژیکی لارو سن چهارم بیدغلات شدند. اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه روی فعالیت کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی

آلدهید اثر گذاشتند. اسانس‌های گیاهی استرس اکسیداتیو را در لارو بید غلات افزایش دادند. به طور کلی اسانس گیاهان پونه، آویشن دنایی و درمنه کوهی می‌توانند در تولید حشره‌کش‌های ارگانیک مورد استفاده قرار گیرند.

سپاس‌گزاری

از حمایت‌های مالی و امکانات فراهم شده توسط دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان جهت اجرای این پژوهش تشکر و قدرانی می‌شود.

REFRERENCES

Ahmad, P., Nabi, G., Jeleel, C. A., & Umar, S. (2011). Free radical production, oxidative damage and antioxidant defense mechanisms in plants under abiotic stress. In: Ahmad P, Umar S (eds) Oxidative stress: role of antioxidats in plants. Studium Press, New Delhi, pp 19–53.

Ahmad, S., & Pardini, R. S. (1990). Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(4), 401-413. https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90107-T

Alirezaei, M., Jelodar, G., Niknam, P., Ghayemi, Z., & Nazifi, S. (2011). Betain prevent ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cere bellum. *Journal Physiology Biochemstry*, 67, 605-612. https://doi.org/ 10.1007/s13105-011-0107-1

Asghari, G., Jalali, M., & Sadoughi, E. (2012). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from the seeds of *Artemisia aucheri* Boiss, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 7*(1), 11-15. https://doi.org/ 10.17795/jjnpp-3530

Azadbakht, M. (2000). *Classifivation of Medicinal Plants, Tabib Publisher*. Tehran. 298p.

Barbehenn, R. V., Bumgarner, S. L., Roosen, E. F., & Martin, M. M. (2001). Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology*, 47(4-5), 349-357. https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00125-6

Belmain, S. R., Neal, G. E., Ray, D. E., & Golop, P. (2001). Insecticidal and vertebrate toxicity associated with ethnobotanicals used as postharvest protectants in Ghana. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 287-291. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00134-4

Bhumi, T., Urvi, C. H., & Pragna, P. (2017). Biopesticidal potential of some plant derived essential oils against the stored grain pests. *International Journal of Zoological Investigations*, 3(2), 188-197.

Chaudhari, A. K., Singh, V. K., Kedia, A., Das, S., & Dubey, N. K. (2021). Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: prospects and retrospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(15), 18918-18940. https://doi.org/10.1007/s11356-021-12841-w

Chintalchere, J. M., Dar, M. A., Shaha, C., & Pandit, R. S. (2021). Impact of essential oils on *Musca domestica* larvae: Oxidative stress and antioxidant responses. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(1), 821-830. https://doi.org/10.1007/s42690-020-00272-y

Chippendale, G. M. (1970). Development of artificial diets for rearing the Angoumois Grain Moth, *Journal of Economic Entomology*, 63(3), 844-848. https://doi.org/10.1093/jee/63.3.844

Claiborne, A. (1986). Catalase activity. *In: Greenwald RA (ed) CRC handbook of methods for oxygen radical research*. Vol 1. CRCPress, Boca Raton, Florida, USA.

Dey, D., & Gupta, M. K. (2016). Use of essential oils for insect pest management. *Innovative Farming*, 1, 21-29. http://www.innovativefarming.in/index.php/IF/article/view/8

Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., & Cogun, H. Y. (2013). Changes in antioxidative enyzme activity, glycogen, lipid, protein, and melondialdehyde content in cadmiumtreated *Galleria mellonella* larvae. *Annals of the Entomological Society America*, 106, 371–377. https://doi.org/10.1603/AN12137

Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(3), 325-337. https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00255-1

Fornazier, R. F., Ferreira, R. R., Pereira, G. J., Molina, S. M., Smith, R. J., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2002). Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(2), 125-131. https://doi.org/10.1023/A:1019917705111

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 13-18. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x

Ghahreman, A. (2000). *The colorful flora of Iran*. vols. 14-17. Research institute of forests and rangelands, Tehran (In Farsi).

Gönenç, A., Tokgöz, D., Aslan, S., & Torun, M. (2005). Oxidative stress in relation to lipid profiles in different stages of breast cancer. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, *42*(3), 190-4. http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/3519

Hasani, J. (2013). Comparison of the quantity and quality of essential oils of *Thymus fedtschenkoi* Ronniger and *Thymus daenensis* Celak. In natural habitats of Kurdistan. *Journal Ecophytochemical of Medicinal Plants*, 1(1), 25-35.

Janero, D.R. (1990). Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 515-540. https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2

Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Photochemistry*, 96, 15-25. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005

Kamkar, A., Shariatifar, N., Jamshidi, A., Jebelli Javan, A., Sadeghi, T., & Zeagham Monfared, M. (2012). In vitro evaluation of antioxidant activity of Iranian *Mentha longifolia* essential oil and extracts. *Journal of Medicinal Plants*, 1(41), 185- 194.

Mozafarian, V. (Ed). 2014. *A dictionary of Iranian Plant Names.* Farhang Moaser.

Kim, J., Seo, S. M., Lee, S. G., Shin, S. C., & Park, I. K. (2008). Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Agricaltural Food Chemistry*, 56 (16), 7316-7320. https://doi.org/10.1021/jf800780f

Kiran, S., Kujur. A., Patel, L. K., Ramalakshmi, K., & Prakash, B. (2017). Assessment of toxicity and biochemical mechanisms underlying the insecticidal activity of chemically characterized *Boswellia carterii* essential oils against insect pest of legume seeds. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 139, 17-23. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.04.004

Kolawole, A. O., Olajuyigbe, F. M., Ajele, J. O., & Adedire, C. O. (2014). Activity of the antioxidant defense system in a typical bioinsecticide-and synthetic insecticide-treated cowpea storage beetle *Callosobrochus maculatus* F. (Coleoptera: Chrysomelidae). *International Journal of Insect Science*, 6, IJIS-S19434. https://doi.org/10.4137/IJIS.S19434

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2011). Repellency, larvicidal and pupicidal activity of essential oils and their formulation against house fly (*Musca domestica* L.). *Medical and Veterinary Entomology*, 25, 302-310. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00945.x

Leelaja, B. C., & Rajini, P. S. (2012). Impact of phosphine exposure on development in Caenorhabditis elegans: Involvement of oxidative stress and the role of glutathione. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(1), 38-43. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.06.007

Lohar, D. P., Haridas, S., & Gantt, J. S. (2007). A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytologist*, 173(1), 39-49. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01901.x

Louni, M., Shakarami, J., & Negahban, M. (2018). Insecticidal efficacy of nanoemulsion containing *Mentha longifolia* essential oil against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Crop Protection*, 7(2), 171-182.

Lozinskaya, Y. L., Slepneva, I. A., Khramtsov, V. V., & Glupov, V. V. (2004). Changes of the antioxidant status and system of generation of free radicals in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae at microsporidiosis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 40, 119-125. https://doi.org/10.1023/B:JOEY.0000033802.97996.65

Lukasik, I. (2007). Changes in activity of superoxide dismutase and catalase within cereal aphids in response to plant odihydroxyphenols. *Journal of applied entomology*, 131(3), 209-214. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01136.x

Mahmoudvand, S., & Shakermi, J., and Vafaei Shoushtari, R. (2014). Fumigant toxicity of four plant essential oils on adult flies insects. *Journal of Entomological Research*, 6 (4), 367-378. (In Farsi)

Meagher, E. A., & Fitz Gerald, G. A. (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 1745-1750. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00232-X

Migula, P., Laszczyca, P., Augustyniak, M., Wilczek, G., Rozpedek, K., Kafel, A., & Woloszyn, M. (2004). Antioxidative defense enzymes in beetles from a metal pollution gradient. *Biologia (Bratislava)*, 59, 645–654.

Mirzaeian, S., Oraie, M., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2014). Phytochemistry of essential oil from different parts of *Artemisia aucheri* Boiss collected from Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran. *Journal of Medicinal Herbs*, 4(4), 189-192. (In Persian)

Mirzashahi, K., & Salimpour, S. (2010). What is safe product? *Journal of products safe Gateway of organic farming*, 340(1): 1-12. (In Farsi).

Moazeni, N., Khajeali, J., Izadi, H., & Mahdian, K. (2013). Chemicalcomposition and bioactivity of *Thymus daenensis* Celak (Lamiaceae) essential oil against two lepidopteran stored- productinsects, *Journal of Essential Oil Research*, https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860412

Momen, F. M., Abdelkader, M. M., & Fahim, S. F. (2018). Composition, repellent and fumigant toxicity of *Mentha longifolia* essential oil on *Tetranychus urticae* and three predatory mites of the family phytoseiidae (Acari: Tetranychidae: Phytoseiidae). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 53(2), 221-232. https://doi.org/10.1556/038.53.2018.007

Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157-77. https://doi.org 10.1016/j.taap.2013.01.025.

Naseri, B., Abedi, Z., Abdolmaleki, A., Jafary-Jahed, M., Borzoui, E., & Mozaffar Mansouri, S. (2017). Fumigant Toxicity and Sublethal Effects of Artemisia khorassanica and Artemisia sieberi on Sitotroga cerealella (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of insect science (Online)*, 17(5), 100. https://doi.org/10.1093/jisesa/iex073

Ni, Z. J., Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., & Wei, Z. J. (2021). Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 78-89. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.070

Orčić, S., Nikolić, T., Purać, J., Šikoparija, B., Blagojević, D. P., Vukašinović, E., & Kojić, D. (2017). Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165(2-3), 120-128. https://doi.org/10.1111/eea.12633

Pavela, R. (2018). Essential oils from *Foeniculum vulgare* Miller as a safe environmental insecticide against the aphid *Myzus persicae* Sulzer. *Environmental science and pollution research*, *25* (11), 10904-10910. https://doi.org/ 10.1007/s11356-018-1398-3

Pritsos, C. A., Ahmad, S., Bowen, S. M., Elliott, A. J., Blomquist, G. J., & Pardini, R. S. (1988). Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Pupitio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, l8, 101. https://doi.org/10.1002/arch.940080204

Rajkumar, V., Gunasekaran, C., Christy, I. K., Dharmaraj, J., Chinnaraj, P., & Paul, C. A. (2019). Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of Mentha piperita L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. *Pesticide biochemistry and physiology*, 156, 138-144. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.016

Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes World. *Annual Review Entomology*, 57, 405–424. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554

Shahriari, M., Zibaee, A., Sahebzadeh, N., & Shamakhi, L. (2018). Effects of α-pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 150, 40-47. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.06.015

Shakarami, J., Kamali, K., Moharramipour, S., & Meshkatassadat, M. H. (2004). Effects of three plant essential oils on biological activity of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *Iranian Agricultural Sciences Journal*, 35(4), 965-972 (In Persian with English Summary).

Shakarmi, J., Kamali, K., Moharramipour, S., & Meshkat alsadat, M. H. (2003). Fumigant toxicity and repulsion of *Artemisia aucheri* Boiss essential oil on four species of storage pests. *Journal of Plant Pests and Diseases*, 71 (2), 61-75. (In Farsi)

SPSS Inc. (2015). IBM Corp. IBM SPSS statistics 23.0. Chicago, IL.

Stahl-Biskup, E., & Saez, F. (2002). *Thyme, the Genus Thymus, Taylor and Francis*, London, New York. p. 268. https://doi.org/10.4324/9780203216859

Stejskal, V., Vendl, T., Aulicky, R., & Athanassiou, C. (2021). Synthetic and natural insecticides: Gas, liquid, gel and solid formulations for stored-product and food-industry pest control. *Insects*, 12(7), 590. https://doi.org/10.3390/insects12070590

Subbarao, K. V., Richardson, J. S., & Ang, L. C. (1990). Autopsy samples of Alzheimer's cotrex show increased peroxidation in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 55, 342-345. https://doi.org/ 10.1111/j.1471-4159.1990.tb08858.x

Tak, J. H., & Isman, M. B. (2016). Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism. *Pesticide biochemistry and physiology*, 133, 20-25. https://doi.org/ 10.1016/j.pestbp.2016.03.009

Wang, Y., Oberley, L. W., & Murhammer, D. W. (2001). Antioxidant defense system of two Lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*, 1254-1262. https://doi.org/ 10.1016/s0891-5849(01)00520-2

Wei, H., Liu, J., Li, B., Zhan, Z., Chen, Y., Tian, H., Lin, S., & Gu, X. (2015). The toxicity and physiological effect of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop protection*, 76, 68-74. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.06.013

WorWood (1993). The Complete Book of Essential Oils and Aromatherapy: Over 600 Natural, Non-Toxic and Fragrant Recipes to Create Health Beauty a Safe Home Environment. New World Library; 1st (first) edition. 488.

Zibaee, A., Zibaee, I., & Sendi, J. J. (2011). A juvenile hormone analog, pyriproxifen, affects some biochemical components in the hemolymph and fat bodies of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 100 (3), 289-298. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.002

Zunino, M. P., & Zygadlo, J. A. (2004). Effect of monoterpenes on lipid oxidation of maize. *Planta*, 219, 303-309. https://doi.org/ 10.1007/s00425-004-1216-7

© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)
45(2), Summer, 2022

doi 10.22055/ppr.2022.17384

Toxicity of plant essential oils three on antioxidant enzymes activity of fourth instar larvae of *Sitotroga cerealella* (Oliver)

S. Mahmoudvand1, J. Shakarami[2*], M. Alirezaei[3], S. Jafari[4], M. Mardani- Talaee[5]

1. PhD Student, Agricultural of entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Khorramabad-Lorestan University, Lorestan, Iran
2. ***Corresponding Author:** Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Khorramabad-Lorestan University, Lorestan, Iran (shakarami.j@lu.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Khorramabad-Lorestan University, Lorestan, Iran
4. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Khorramabad- Lorestan University, Lorestan, Iran
5. PhD, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Khorramabad-Lorestan University, Lorestan, Iran

Received: 20 December 2021 Accepted: 2 March 2022

Abstract

Background and Objectives

Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella*, is one of the most critical storage pests with a wide range from the hosts in Iran and worldwide. Excessive consumption of chemical insecticides leads to developing the resistance to chemical insecticides, environmental pollution, and the emergence of new pests. Therefore, we have decided to reduce the risk of the environment in pest's control via plant essential oils.

Material and Methods

In the current study, to examine the environment- friendly pesticides, effects of three plant essential oils from the families *Mentha longifolia* L., *Thymus daenensis* Celak (Lamiaceae), and *Artemisia aucheri* Boiss (Asteraceae) compared to dichlorvos (DDVP®, as a positive control) an organophosphate insecticide were studied. Antioxidant enzymes, including: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and lipid peroxidation marker on the fourth instar larvae of *S. cerealella* after 24 hours were examined. The essential oils were prepared using the water distillation method. Essential oils were used in five concentrations and three replications. The concentration was selected based on the primary experiment for each essential oil. Insects were exposed to fumigant toxicity of the essential oils and insecticide in laboratory conditions (25±1 °C, 70±5% in 12 hr light/12 hr dark).

Results

The results showed that LC_{50} for the essential oils of *M. longifolia*, *T. daenensis*, and *A. aucheri* were recorded 0.04, 0.68 and 6.47 $\mu L/L_{air}$, respectively. The highest mortality rate increased with high concentrations (0.09, 3 and 9 $\mu L/L_{air}$) of *M. longifolia*, *T. daenensis* and *A. aucheri* essential oil were 84, 80.67, and 77.33 %, respectively after 24h. Enzymatic activity

increased with essential oil high concentrations. Data indicated a significant increase in the activity of catalase, superoxide dismutase enzymes and the concentration of malondialdehyde as peroxidation lipid indicator in treated larvae with essential oils of *M. longifolia*, *T. daenensis* and *A. aucheri* compared with the untreated (negative control), and DDVP® (positive control) on treated 4th instar larvae of *S. cerealella* after 24h.

Conclusion

It seems that different essential oils of *M. longifolia*, *T. daenensis* and *A. aucheri* with the effect on the enzymatic activities of antioxidants, including catalase, superoxide dismutase enzymes and malondialdehyde as lipid peroxidation indicator of the fourth instar larvae of *S. cerealella* via the disruption of physiological processes and survival. Regarding the existence of different aromatic plants in Iran, we can use the species with higher toxicity that would be more economical to produce the botanical insecticides and use in the integrated pest management programs for this pest control.

Keyword: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Lipid peroxidation, MDA.

Associate editor: N. Sahebzadeh (Ph.D.)

Citation: Mahmoudvand, S., Shakarami, J., Alirezaei, M., Jafari, S. & Mardani- Talaee, M. (2022). Toxicity of plant essential oils three on antioxidant enzymes activity of fourth instar larvae of *Sitotroga cerealella* (Oliver). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(2), 1-16. https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17384.