نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2021.343220.2801
جلد ۳۷، شماره ۲، صفحه ۳۱۴-۳۰۰ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1400.37.300.106.2.1578.41

تأثیر عصاره اتانولی گیاهان آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.) و به‌لیمو (*Aloysia citriodora* Ort. et Palav.) بر تلفات و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک لارو بید آرد (*Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae))

مریم عجم حسنی[1*]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

پست الکترونیک: shahroodm@gmail.com

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۹ | تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۹ | تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۹

چکیده

تأثیرات کشندگی و فیزیولوژیکی متابولیت‌های ثانویه گیاهی بر طیف وسیعی از حشرات آفت ثابت شده است. این ترکیب‌ها ضمن داشتن اثر مستقیم بر آفت هدف، برای انسان و محیط زیست کم خطر هستند و این موضوع سبب مزیت آنها بر ترکیب‌های شیمیایی شده است. در این تحقیق تأثیر کشندگی عصاره‌های اتانولی آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.) و به‌لیمو (*Aloysia citrodora* Palau) بر لاروهای سن سوم *Ephestia kuehniella* تعیین شد. میزان مرگ و میر لاروها با افزایش غلظت عصاره‌ها ارتباط مستقیم داشت. فعالیت بعضی آنزیم‌های گوارشی لوله گوارش و تغییرات هموسیت‌ها نیز در لاروهای سن سوم تیمار شده با عصاره‌ها بررسی شد. ابتدا غلظت زیرکشنده عصاره‌های اتانولی گیاهان محاسبه شد. سپس لاروها از غذای آلوده شده با غلظت کشنده ۲۵٪ (LC_{25}) عصاره‌ها (۴۰ppm برای آنغوزه و ۳۰ppm برای به‌لیمو) تغذیه کردند. گروه شاهد شامل لاروهایی بود که از آرد آلوده با اتانول رقیق شده تغذیه کردند. نتایج نشان داد که هر دو عصاره سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین شدند. عصاره آنغوزه فعالیت آنزیم‌های لیپاز و بتا گلوکوزیداز را نسبت به شاهد به‌شدت کاهش داد ولی تأثیر عصاره به‌لیمو بر فعالیت این دو آنزیم با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفت. عصاره‌ها بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز تأثیر چندانی نداشتند. فعالیت ایمنی لاروها نیز متأثر از هر دو عصاره با تغییرات تعداد سلول‌های خونی تحریک شد. تعداد کل سلول‌ها و گرانولوسیت‌های همولنف در تیمار با هر دو عصاره با گذشت ۱۲ ساعت از تغذیه افزایش معنی‌داری نشان داد ولی تا زمان ۲۴ ساعت به‌تدریج کاهش یافت اما همچنان از گروه شاهد بالاتر بود. پلاسموتوسیت‌ها در تیمار به‌لیمو پس از ۱۲ ساعت افزایش چشمگیری نشان دادند ولی در مورد تیمار آنغوزه این افزایش پس از گذشت ۲۴ ساعت بسیار معنی‌دار بود. شناخت اثرات متقابل عصاره‌های گیاهی با خصوصیات فیزیولوژیکی حشره مانند فیزیولوژی سیستم‌های گوارش و گردش خون می‌تواند به امکان‌سنجی استفاده مناسب‌تر از این عوامل در کنترل آفت هدف منجر شده و در برنامه‌های مدیریت آفات بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره‌های گیاهی، فعالیت آنزیم گوارشی، سلول‌های خونی، *Ephestia kuehniella*.

مقدمه

شب‌پره مدیترانه‌ای آرد (*Ephestia kuehniella* Zeller) یکی از آفات مهم انباری است که روی محصولات انباری و خشکبار خسارت‌زا می‌باشد و عمده خسارت آن روی آرد گزارش شده است (Ayvaz *et al.*, 2010؛ Jallouli *et al.*, 2013). این حشره همچنین به‌عنوان یک میزبان واسط برای پرورش انبوه زنبورهای پارازیتوئید مانند تریکوگراما بکار می‌رود. قبلاً در انبارها و سیلوهای غلات به‌منظور کنترل این آفت از متیل بروماید و فسفین استفاده می‌شده است اما به‌تدریج با ظهور مضرات ترکیب‌های شیمیایی این روند کاهش یافت (Haque *et al.*, 2000). در واقع، امروزه بروز مقاومت در آفات هدف و اثرهای مخرب زیست محیطی ناشی از استفاده از ترکیب‌های شیمیایی، آنها را به گزینه‌هایی نامطمئن در کنترل آفات تبدیل کرده است. از سوی دیگر، کاربرد حشره‌کش‌های گیاهی سازگار با طبیعت که خواص حشره‌کشی آنها ثابت شده است، به‌ویژه در کنترل آفات انباری رو به گسترش است (Isman *et al.*, 2011). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی ضمن کم‌خطر بودن برای انسان، پستانداران و طبیعت، اغلب به‌عنوان جایگزین‌های مناسبی برای ترکیب‌های شیمیایی هستند (Gaire *et al.*, 2017؛ Zha *et al.*, 2018). متابولیت‌های گیاهی در گیاهان مختلف در طول متابولیسم و در پاسخ به تنش‌های محیطی تولید می‌شوند (Rice & Coats, 1994). ترکیب‌های موجود در عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان مخلوطی از منوترپنوییدها با گروه‌های مختلف مانند فنل، کتون، هیدروکربن، اسید و ... هستند. ثابت شده که این ترکیب‌ها معمولاً روی رشد و تولیدمثل و بقای حشرات تأثیر داشته و اغلب به‌طور بالقوه ظرفیت حشره‌کشی دارند و می‌توانند علیه آفات کشاورزی استفاده شوند (Gaire *et al.*, 2020). مطالعات الکتروفیزیولوژی نشان داده که ترکیب‌های گیاهی اگر به شکل تماسی و یا تدخینی استفاده شوند روی سیستم عصبی حشرات تأثیر گذاشته و عملکرد این سیستم را مختل می‌کنند. البته تأثیر عصاره‌های گیاهی بر کاهش معنی‌دار فعالیت گانگلیون‌های قفسه سینه و شکم در ساس رختخواب (*Cimex lectularius*) ثابت شده است (Gaire *et al.*, 2019). گزارش‌های بسیاری از خاصیت حشره‌کشی، دورکنندگی و اثرهای ضدتغذیه‌ای و ضد تخم‌ریزی گیاهان متعلق به خانواده‌های مختلف گیاهی ثبت شده است. اثر لاروکشی و دورکنندگی رزماری روی بید سیب‌زمینی (*Phthorimaea operculella*) (Rafiei-Kahroodi *et al.*, 2011)، دورکنندگی و کشندگی درمنه روی شب‌پره بید آرد (*E. kuehniella*) (Bouzeraa *et al.*, 2019)، کشندگی عصاره نعناع و پونه روی سوسک آرد (*Tribolium castaneum*) (Heydarzade *et al.*, 2019)، اثر ضد تخم‌ریزی عصاره چوب ابریشمی و ضد تغذیه‌ای اسانس مرکبات بر کرم برگخوار مصری (*Spodoptera litura*) (Kiran *et al.*, 2006؛ Samir *et al.*, 2018) مشخص شده است.

از سوی دیگر ثابت شده که متابولیت‌های گیاهی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی حشرات مانند فعالیت آنزیم‌های گوارشی و سم‌زدا یا اجزای ایمنی آنها به‌طور چشمگیری تأثیرگذار است (Manjula *et al.*, 2020). چنانکه اثر اسانس رزماری بر فعالیت آنزیمی پروانه برگخوار توت *Glyphodes pyloalis* (Yazdani *et al.*, 2013)، اثر عصاره‌های گیاهی بر فعالیت استیل کولین استراز و گلوتاتیون اس- ترانسفراز در شپشه دندانه‌دار (*Sitophilus zeamais*) (Li *et al.*, 2013)، تأثیر لینالول، سینول و تیمول بر فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در بید کلم (*Plutella xylostella*) (Kumrungsee *et al.*, 2014) و اثر اسانس درمنه (*Artemisia annua*) بر فعالیت ایمنی سن گندم (*Eurygaster integriceps*) گزارش شده است (Zibaee & Bandani, 2009). در حشرات ماکرومولکول‌های غذا در معده توسط آنزیم‌های گوارشی به واحدهای ساده‌تر شکسته می‌شوند (Lokesh *et al.*, 2006). کیفیت هضم غذا وابسته به فعالیت مناسب این آنزیم‌هاست. چنانچه ترکیب‌هایی روی

هیدرولاز کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها تأثیر بگذارند و به‌نوعی فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند کربوهیدرازها و پروتئازها را بلوکه کنند، فرایند هضم به درستی انجام نشده، در نتیجه حشره دچار ضعف و گرسنگی ناشی از فقر غذا شده و در نهایت می‌میرد (Gatehouse & Gatehouse, 1999). از سوی دیگر، رژیم غذایی نقش کلیدی بر فعالیت‌های ایمنی حشرات دارد. چنانچه حشره از غذای آلوده شده با سموم و یا متابولیت‌های گیاهی تغذیه نماید تغییرات چشمگیری در تعداد هموسیت‌های آن رخ می‌دهد. هموسیت‌ها به‌عنوان اجزای مهم سیستم ایمنی بندپایان، آخرین سد دفاعی بدن در مقابل انواع آلودگی‌ها و تنش‌های محیطی می‌باشند. البته تغییرات شکل و تعداد هموسیت‌ها در سیستم گردش خون، برای حفظ تعادل آب و یون‌ها در موجود زنده ضروریست (Duarte *et al.*, 2020).

آنغوزه از خانواده چتریان و به‌لیمو از خانواده شاه‌پسند، دو گیاه دارویی می‌باشند که در سراسر دنیا پراکنش دارند. خاستگاه آنغوزه استپ‌های ایران و افغانستان است (Ross, 2007؛ Leaman, 2006). آنغوزه با ظاهر، عطر و رنگ‌های گوناگون در کشور ایران عمدتاً در مراتع استان‌های خراسان، سمنان، کردستان، همدان و بخش‌هایی از فارس رشد می‌کند (Khosravi & Mehrabi, 2006). در طب سنتی، تأثیر ضد تشنج، رفع بیماری‌های عصبی، ضد گرفتگی عضلات و تأثیر بر فشار خون برای آنغوزه ذکر شده است، به‌علاوه از صمغ آن در صنایع عطرسازی استفاده می‌شود (Khajeh *et al.*, 2005). فعالیت نماتدکشی اسانس آنغوزه روی لاروهای نماتد ریشه گیاهی *Meloidogyne javanica* مثبت ارزیابی شد (Khayat *et al.*, 2014). همچنین تأثیر حشره‌کشی عصاره این گیاه روی شب‌پره آرد و شپشه آرد (Moharramipour *et al.*, 2003) گزارش شده است. به‌لیمو بومی آمریکای جنوبی یعنی کشورهای پرو، شیلی و برزیل است (Bahramsoltania *et al.*, 2018). در ایران درختچه‌های آن اغلب در استان‌های شمالی رشد می‌کنند. خواص دارویی این گیاه مانند درمان سرگیجه و تقویت حافظه و رفع بی‌خوابی به اثبات رسیده است (Elechosa *et al.*, 2017). مشخص شده که این گیاه اثر دورکنندگی روی حشرات دارد (Benzi *et al.*, 2009). به‌علاوه عصاره روغنی به‌لیمو در غلظت‌های ۲-۱٪ دارای خواص حشره‌کشی و باکتری‌کشی است (Oukerrou *et al.*, 2017).

تأثیرات مستقیم یا جانبی اغلب متابولیت‌های گیاهی نیز بر زنده‌مانی، رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی حشرات گزارش شده است. نقش عصاره‌های گیاهی بر سازوکار فیزیولوژی حشرات می‌تواند در اتخاذ روش‌های مختلف کنترل آفات بر پایه متابولیت‌های گیاهی مؤثر باشد (Shahriari *et al.*, 2017). آنغوزه و به‌لیمو به‌طور طبیعی در ایران در سطح وسیع وجود دارند و می‌توانند به‌عنوان گیاهانی قابل توجه در بحث کنترل آفات به‌ویژه آفات انباری مورد توجه قرار بگیرند؛ ازاین‌رو در این تحقیق میزان کشندگی و تأثیر عصاره‌های این گیاهان بر جنبه‌های فیزیولوژیکی بید آرد با توجه ویژه به فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تغییرات فراوانی سلول‌های خونی، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

تخم‌های شب‌پره بید آرد از مؤسسه گیاه‌پزشکی کشور تهیه و در شرایط آزمایشگاه (دمای ۱±۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰٪ و دوره روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت) روی ظروف پرورش محتوای آرد منتقل شدند. پس از یک نسل پرورش، از لاروهای سن سوم دو روزه در آزمایش‌ها استفاده شد.

آماده‌سازی بافت گیاهی

گیاه آنغوزه *Ferula assa-foetida* در اسفند ماه سال ۹۷ از مراتع شهرستان شاهرود و گیاه *Aloysia citriodora* (به‌لیمو) در بهار سال ۹۸ از استان مازندران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برگ گیاهان پس از شستشو و خشک کردن به‌وسیله آسیاب خرد شد، به‌طوری که قابل عبور از الک یک مش بود.

تهیه عصاره اتانولی گیاهان

در این روش مقدار پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده شد، سپس ۷۵ میلی‌لیتر از محلول را برداشته و با اضافه کردن ۲۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل، حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرارداده شد، سپس بخش‌های مختلف جدا گردید و بخش اتانولی برای تبخیر الکل و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد. عصاره پس از حدود ۲ ساعت از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد تا محلول اتانولی همگن و شفاف عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بدست آید (Bahraminejad *et al.*, 2008).

زیست‌سنجی

برای انجام زیست‌سنجی، غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۷۰، ۱۲۰ و ۲۰۰ppm از عصاره‌های هر دو گیاه تهیه شدند. این غلظت‌ها جداگانه به غذای لاروها (آرد) تیمار شدند و سمّیت گوارشی عصاره‌ها روی لاروها بررسی و تعیین شد. به این ترتیب برای هر غلظت از هر عصاره ۴۰ پتری آماده شد که شامل ۴ گروه ۱۰ تایی بود (تکرار). درون هر پتری یک گرم آرد و یک عدد لارو سالم سن سوم قرار گرفت، سپس با کمک میکروپیپت عصاره‌ها به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به آرد اضافه شد. پتری آرد محتوای اتانول نیز برای لاروهای شاهد در نظر گرفته شد. به لاروها اجازه داده شد که مدت ۲۴ ساعت از غذای آلوده تغذیه نمایند. سپس با محاسبه LC_{50} و بررسی تلفات، غلظت زیر کشنده هر یک از عصاره‌های گیاهی تعیین شد. برای انجام آزمایش‌ها تعیین فعالیت آنزیم و ایمنی‌شناسی از غلظت زیرکشنده استفاده شد. محاسبه میزان سمّیت عصاره‌ها با استفاده از نرم‌افزار POLO-PC انجام گردید.

تهیه عصاره آنزیمی

برای این منظور لاروهای زنده مانده پس از زمان ۲۴ ساعت که از دوز زیر کشنده هر یک از عصاره‌های گیاهی تغذیه کرده بودند به مدت پنج دقیقه به روی یخ منتقل شدند تا بی‌حس شوند. گروه شاهد شامل لاروهایی بود که از آرد به همراه اتانول رقیق شده با آب تغذیه کردند. سپس روده میانی لاروها استخراج شده و به درون یک میکروتیوب انتقال داده شد. درون هر میکروتیوب ۱۰ عدد روده شب‌پره بید آرد قرار داده شد. حدود ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به هر میکروتیوب اضافه و محتویات با هموژنایزر دستی خرد شدند. نمونه‌ها در سانتریفوژ (Sigma-Germany) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از مایع رونشین به‌عنوان منبع آنزیمی در برآوردهای آنزیمی استفاده شد. یادآوری می‌شود که نمونه‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

بررسی فعالیت آنزیمی

تعیین فعالیت سرین پروتئازها

فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین به‌عنوان دو زیرگروه از سرین پروتئینازها با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار از سوبستراهای اختصاصی آنها به‌ترتیب شامل بنزوئیل-ال-آرژنین-پی-نیترو آلانید و ساکسینیل-آلانین-آلانین-پرولین-فنیل آلانین-پی- نیترو آلانید اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۸۵ میکرولیتر بافر یونیورسال (اسیدیته ۹)، ۵ میکرولیتر از سوبستراهای ذکر شده و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود (Oppert *et al.*, 1997). با استفاده از الایزا ریدر (ELX800-USA) جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان کل ۲۰ دقیقه و فواصل زمانی ۵ دقیقه ثبت گردید.

تعیین فعالیت لیپاز

با توجه به اینکه لیپازها به غشای لوله گوارش متصل هستند، بنابراین از بافر فسفات ترایتون‌دار برای همگن

نمودن نمونه استفاده شد. حجم ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی را با ۱۸۰ میکرولیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷) مخلوط نموده، سپس ۲۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل بوتیرات اضافه و مخلوط شدند. جذب واکنش در ۴۰۵ نانومتر به‌طور پیوسته با فاصله زمانی ۱ دقیقه تا ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد (Tsujita *et al.*, 1989).

تعیین فعالیت α و β گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز براساس روش (Parry *et al.*, 1996؛ Low *et al.*, 1986) با اندکی تغییر انجام شد. به این منظور ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۸۵ میکرولیتر بافر با اسیدیته ۱۰ در حضور ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی به‌ترتیب پارا نیتروفنیل آلفا گلوکوپیرانوزید و پارا نیتروفنیل بتا گلوکوپیرانوزید به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید دو مولار واکنش متوقف و میزان پارانیتروفنل آزاد شده توسط الایزا ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری و نتایج ثبت گردید.

آزمایش‌های ایمنی‌شناسی

به این منظور ابتدا غلظتی از عصاره‌ها که حدود ۲۵٪ تلفات در لاروها ایجاد می‌کرد یعنی LC_{25} با آزمون زیست‌سنجی تعیین شد. این غلظت برای آنغوزه ۴۰ppm و برای به‌لیمو ۳۰ppm بدست آمد. سپس در ظروف پتری‌دیش به‌طور جداگانه یک گرم آرد آلوده به ۵۰۰ میکرولیتر غلظت زیر کشنده از هر عصاره به همراه یک عدد لارو سن سه قرار داده شد و مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت به لاروها اجازه داده شد تا از غذای آلوده تغذیه کنند. آزمایش‌های ایمنی‌شناسی روی لاروها انجام شد. این آزمایش شامل پنج تیمار شاهد (لاروهایی که از آرد و اتانول ۳٪ تغذیه کردند)، لاروهایی که ۱۲ ساعت از غذای آلوده (آنغوزه و به‌لیمو) تغذیه کردند و لاروهایی که ۲۴ ساعت از غذای آلوده (آنغوزه و به‌لیمو) تغذیه کردند بود. سپس خون‌گیری از لاروها انجام شد. برای هر تیمار ۱۵ عدد لارو در نظر گرفته شد (۳ تکرار ۵ تایی)، به این معنی که همولنف ۵ لارو جمع‌آوری شده و با هم مخلوط گردید و با اضافه کردن حجمی در حدود ۲/۵ برابر، از بافر ضد انعقاد خون (محلول تایسون) به‌عنوان یک تکرار استفاده شد.

شمارش کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها

تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها با استفاده از لام نئوبار و فرمول جونز محاسبه شد (Jones & Liu, 1969). برای هر تیمار، ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۵ عدد لارو سن سوم) در نظر گرفته شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه داده‌ها برای تمام آزمایش‌های بیوشیمیایی و ایمنی‌شناسی با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

نتایج

زیست‌سنجی

براساس نتایج زیست‌سنجی هر دو عصاره گیاهی دارای تأثیر کشندگی بر لارو سن سوم بید آرد بودند (جدول ۱). با افزایش غلظت عصاره‌ها، میزان تلفات لاروی در مدت ۲۴ ساعت افزایش یافت، به‌طوری‌که غلظت ۲۰۰ppm عصاره هر دو گیاه سبب مرگ و میر ۱۰۰ درصدی لاروهای بید آرد شد.

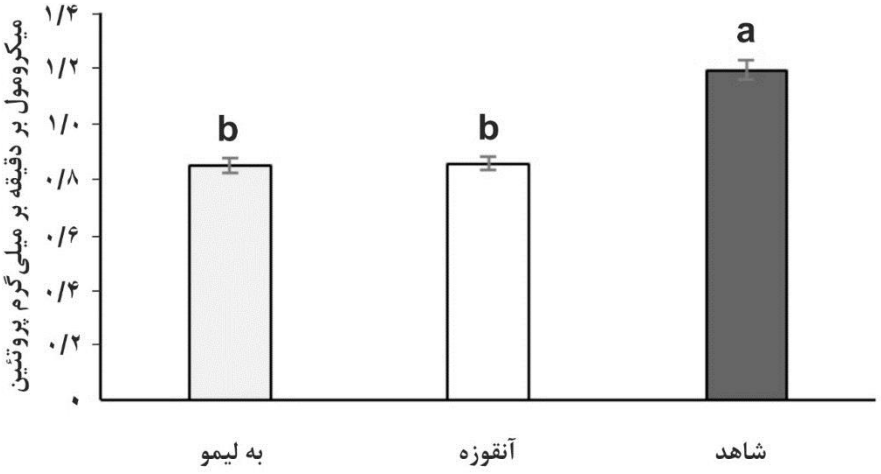
جدول ۱- بررسی سمّیت عصاره‌های اتانولی آنغوزه و به‌لیمو بر لارو سن سوم بید آرد

حشره	عصاره‌های گیاهی	تعداد حشره	Chi-square	Slope±se	df	LC_{50}(90%FL)(ppm) حد بالا–حد پایین
لارو شب‌پره آرد	برگ آنغوزه	۲۸۰	۱/۳	۴/۲ ± ۰/۵	۳	۴۲ (۳۸/۵ –۵۸)
	برگ به‌لیمو	۲۸۰	۱/۵	۴/۵ ± ۰/۴۵	۳	۳۱ (۲۶/۶ –۵۲/۳)

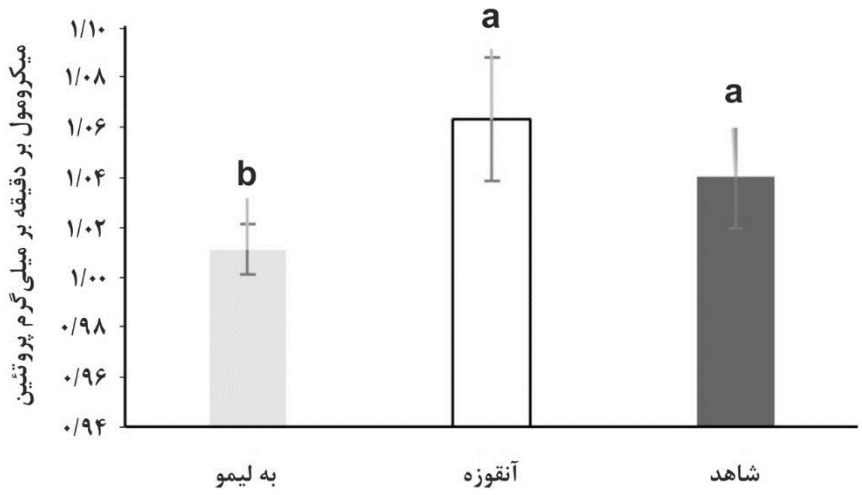
بررسی اثر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی

عصاره هر دو گیاه به‌طور معنی‌داری سبب کاهش فعالیت تریپسین شد ($F=14.7, df=2, p\leq0.0001$) (شکل ۱). در واقع در روده لاروهای شاهد، فعالیت تریپسین بالاتر از لاروهای تیمار شده بود. شکل ۲ فعالیت آنزیم کیموتریپسین را در روده لاروهای تیمار شده با عصاره‌ها نشان می‌دهد. در این بخش، عصاره به‌لیمو به‌طور چشمگیری سبب کاهش فعالیت کیموتریپسین شد ($F=13.56, df=2, p\leq0.0001$). به‌عبارت دیگر عصاره اتانولی آنغوزه تأثیر چندانی بر فعالیت کیموتریپسین نداشت و با لاروهای شاهد در یک گروه آماری قرار گرفت.

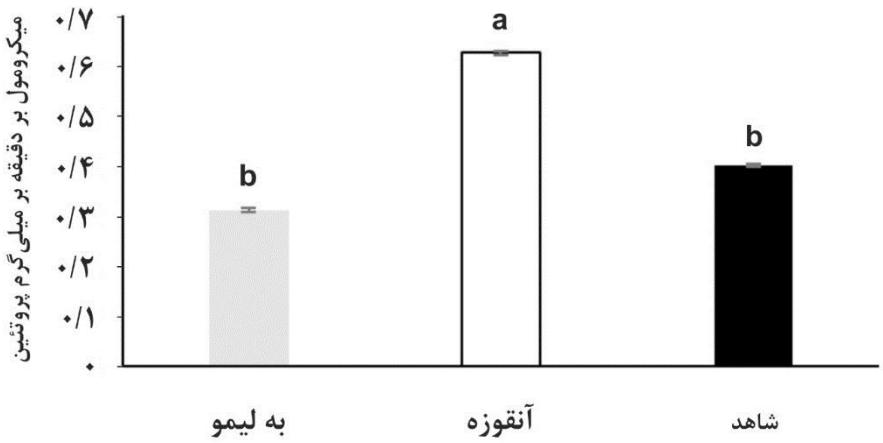
فعالیت لیپاز تحت تأثیر عصاره‌های گیاهی، تغییرات معنی‌داری نشان داد. آنغوزه سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیپاز در روده لارو بید آرد شد ($F=8.83, df=2, p\leq0.0006$). در حالی‌که تأثیر عصاره به‌لیمو بر این آنزیم تفاوت چندانی نسبت به شاهد نشان نداد (شکل ۳). شکل‌های ۴ و ۵ نشان‌دهنده تغییرات فعالیت آنزیم‌های آلفاگلوکوزیداز و بتاگلوکوزیداز است. عصاره‌های گیاهی فعالیت آلفاگلوکوزیداز را در مقایسه با شاهد اندکی افزایش دادند، هرچند که این افزایش معنی‌دار نبود ($F=2.56, df=2, p\leq0.15$) (شکل ۴). ولی عصاره آنغوزه در شکل ۵ فعالیت بتاگلوکوزیداز را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($F=55.2, df=2, p\leq0.0001$).



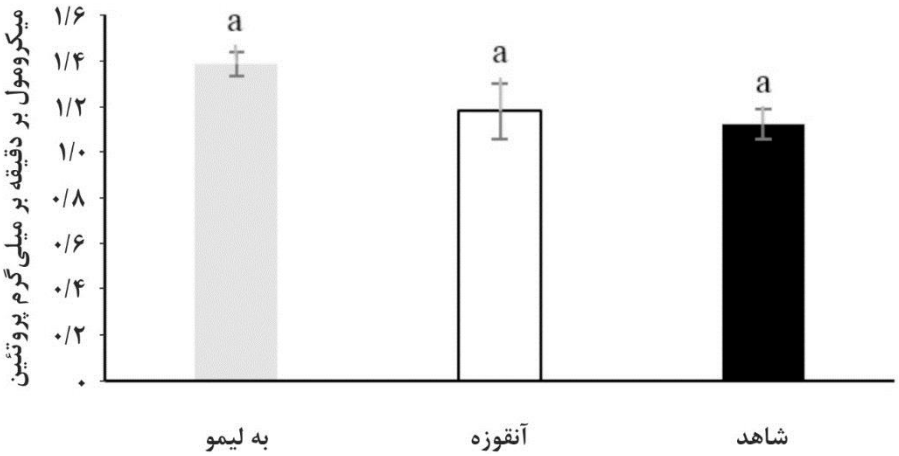
شکل ۱- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر فعالیت تریپسین در معده لارو بید آرد



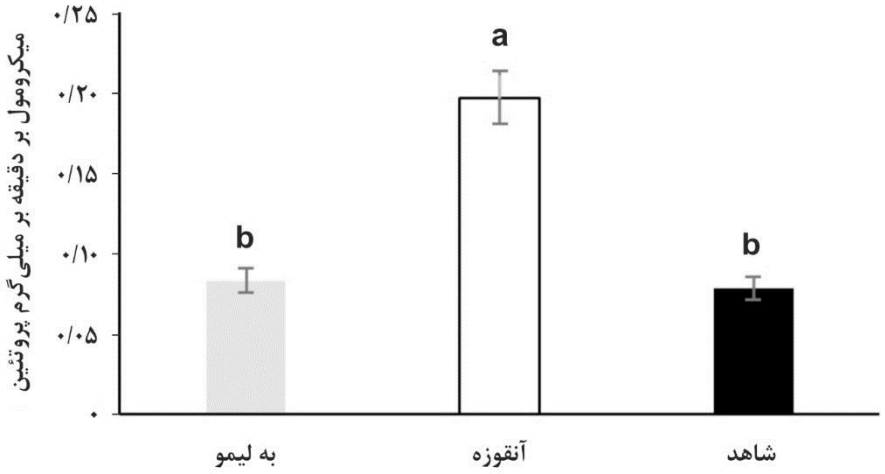
شکل ۲- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر فعالیت کیموتریپسین در معده لارو بید آرد



شکل ۳- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر فعالیت لیپاز در معده لارو بید آرد



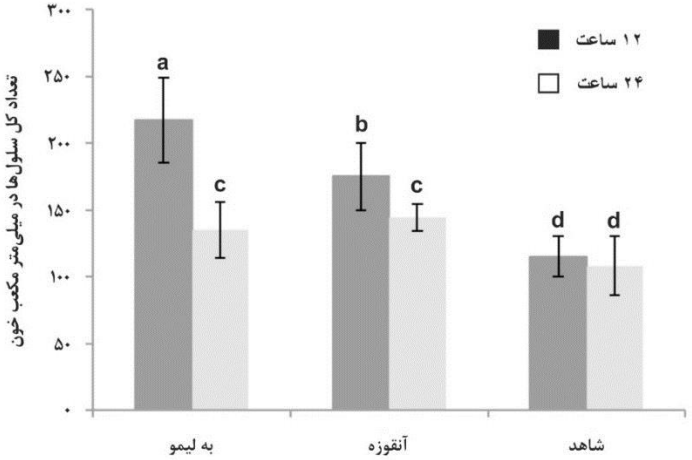
شکل ۴- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر فعالیت آلفاگلوکوزیداز در معده لارو بید آرد



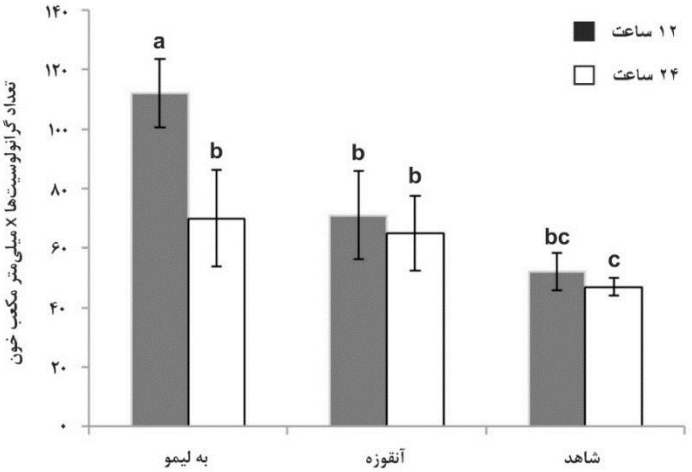
شکل ۵- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر فعالیت بتاگلوکوزیداز در معده لارو بید آرد

بررسی اثر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر پاسخ ایمنی بید آرد

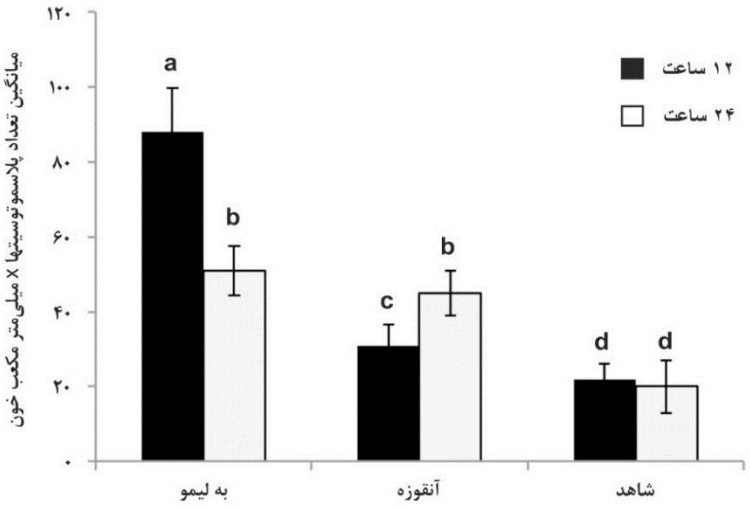
براساس نتایج (شکل‌های ۶، ۷ و ۸) اثر عصاره اتانولی گیاهان آنغوزه و به‌لیمو بر تغییرات فراوانی سلول‌های خونی درگیر در ایمنی، معنی‌دار بود. تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای تیمار شده با آنغوزه و به‌لیمو بعد از ۱۲ ساعت تغذیه، به‌طور چشمگیری افزایش یافت ($F=24.5, df=2, p\leq0.00$). البته این افزایش تعداد کل سلول‌ها در لاروهایی که از غذای آلوده با عصاره به‌لیمو تغذیه کرده بودند بیشتر مشاهده شد و به ۲۱۵±۳۲/۵ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف رسید. با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای تیمار شده به‌تدریج کاهش یافت ولی همچنان از سطح سلول‌های خونی در لاروهای شاهد بالاتر قرار گرفت (شکل ۶). تأثیر عصاره‌ها بر تعداد گرانولوسیت‌ها نیز روندی مشابه تعداد کل سلول‌ها نشان داد. به این معنی که آنغوزه و به‌لیمو سبب افزایش تعداد گرانولوسیت‌ها پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه شاهد شدند ($F=16.7, df=2, p\leq0.03$). هر چند که این افزایش در مورد لاروهای تغذیه کرده از غذای آلوده با به‌لیمو پس از ۱۲ ساعت بسیار زیاد بود، به‌طوری که میانگین گرانولوسیت‌ها در این تیمار تا سطح ۱۱۲±۱۱/۴ عدد در میلی‌متر مکعب خون بالا رفت (شکل ۷). شکل ۸ تغییرات تعداد پلاسموتوسیت‌ها را تحت تأثیر عصاره‌های گیاهی نشان می‌دهد. در اینجا نیز با گذشت زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت تعداد پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لاروهای تیمار شده با عصاره‌های گیاهی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد ($F=31.1, df=2, p\leq0.001$). لاروهای تیمار شده با به‌لیمو افزایش پلاسموتوسیت‌ها را بیشتر در بازه ۱۲ ساعت (۸۸±۱۱/۷ عدد در میلی‌متر مکعب خون) پس از تغذیه نشان دادند ولی تأثیر آنغوزه بر افزایش پلاسموتوسیت‌ها با تأخیر بیشتری رخ داد؛ به این معنی که آنغوزه پس از ۲۴ ساعت سبب افزایش ناگهانی تعداد پلاسموتوسیت‌ها (۴۵±۶ عدد در میلی‌متر مکعب خون) شد و در گروه آماری دیگری قرار گرفت.



شکل ۶- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر تعداد کل سلول‌های خونی لارو بید آرد



شکل ۷- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر تعداد گرانولوسیت‌های لارو بید آرد



شکل ۸- تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر تعداد پلاسموتوسیت‌های لارو بید آرد

بحث

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده تأثیر لاروکشی عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر شب‌پره بید آرد بود. اثر کشندگی و دورکنندگی عصاره‌های گیاهی بسیاری بر شب‌پره آرد (*E. kuehnialla*) گزارش شده است (Bouzeraa *et al.*, 2019؛ Najafzadeh *et al.*, 2019؛ Ghasemi *et al.*, 2014).

پروتئین، لیپید و کربوهیدرات از مهمترین اجزای شیمیایی بدن حشرات هستند و در بسیاری از عملکردهای بیوشیمیایی بدن آنها دخالت دارند. بسیاری از پروتئین‌ها در ساختار آنزیم‌ها برای انتقال و ذخیره مولکول‌های گیرنده، ریخت‌زایی، اسکلریته شدن کوتیکول، سنتز رنگدانه‌های بینایی، دیاپوز و حتی انتقال پیام‌های عصبی نقش دارند. کربوهیدرات‌ها به‌عنوان منبع تولید انرژی در بیشتر حشرات مطرح هستند. کربوهیدرات‌ها ممکن است تبدیل به چربی شده و یا ممکن است در تولید پروتئین سهیم باشند. لیپیدها نیز کارکردهای ویژه‌ای دارند. اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و استرول‌ها از ترکیب‌های مهم دیواره سلولی هستند. لیپیدها منابع مهم تولید انرژی برای فرایندهای تولیدمثل، رشد جنینی و پوست‌اندازی بوده و نقش آنها در دفاع در مقابل پاتوژن‌ها به اثبات رسیده است (Chapman, 1998). بسیاری از سموم حشره‌کش و اسانس‌های گیاهی دارای خواص ضدتغذیه‌ای بوده و باعث کاهش بازدهی تغذیه در حشرات تیمار شده می‌شوند، بنابراین مقدار برخی از ترکیب‌های حیاتی مانند پروتئین‌ها در بدن حشره کاهش می‌یابد؛ در نتیجه متابولیسم تولید انرژی دچار اختلال شده و از این نظر حائز اهمیت است، زیرا رژیم غذایی مناسب باعث تعدیل بسیاری از این ماکرومولکول‌ها در بدن حشره می‌شود (Etebari *et al.*, 2006).

کربوهیدرازها، پروتئازها و لیپاز به‌عنوان مهمترین گروه آنزیم‌های گوارشی نقش کلیدی در فیزیولوژی هضم غذا دارند تا انرژی لازم برای رشد و تولیدمثل، پرواز و دیگر فعالیت‌های حیاتی را تأمین کنند (Erturk, 2006). ثابت شده که تنش ناشی از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی ممکن است باعث تغییرات بیوشیمیایی مانند افزایش یا کاهش فعالیت انواع آنزیم‌های گوارشی شود. نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو عصاره آنغوزه و به‌لیمو به‌طور معنی‌داری سبب کاهش فعالیت پروتئازهای تریپسین و کیموتریپسین شدند. از سوی دیگر، عصاره آنغوزه سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز و لیپاز در معده لارو بید آرد شد. نتایجی مشابه این تحقیق در بررسی تیمار عصاره متانولی درمنه (*A. annua*) به غذای پروانه برگخوار توت (*G. pyloalis*) حاصل شد (Khosravi *et al.*, 2011). لاروهای سفیده کلم (*Pieris brassicae*) پس از تغذیه از غذای آلوده با عصاره هفت‌بند (*Polygonum persicaria*) کاهش شدید فعالیت سرین پروتئازها را نشان دادند (Zibaee *et al.*, 2014). فعالیت پروتئازهای تریپسین و کیموتریپسین در معده لاروهای سن چهارم بید آرد (*E. kuehniella*) پس از تغذیه از آرد تیمار شده با عصاره کلپوره (*Teucrium polium*) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Shahriari *et al.*, 2017). به گزارش برخی محققان، ترکیب‌های موجود در عصاره‌های گیاهی ممکن است ساختار پروتئازها را تغییر داده و مانع عملکرد آنها در هضم پروتئین‌ها شود (Ramzi *et al.*, 2013).

از سویی، افزایش فعالیت بتا گلوکوزیداز و لیپاز در حشرات تیمار شده با آنغوزه، به افزایش زیست‌توده حشره مرتبط است (Desai & Desai, 2000؛ Ahmad *et al.*, 2006). بنابراین به نظر می‌رسد که عصاره آنغوزه در ترکیب‌های متشکله خود حاوی مقادیری کربوهیدرات و چربی است (Mahendra & Bisht, 2012) و این موضوع به نوعی فعالیت آنزیم‌های وابسته را نسبت به تیمارهای دیگر افزایش داده است. در واقع، این تفاوت فعالیت‌های آنزیم‌های مختلف معده حشرات تیمار شده بستگی به نوع ترکیب‌های موجود در عصاره یا ترکیب شیمیایی وارد شده به لوله گوارش دارد (Yazdani *et al.*, 2013). گزارش‌های محققان مبنی بر چگونگی تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی پس از تیمار حشره با عصاره‌های گیاهی مختلف، متنوع است. براساس گزارش Yazdani و همکاران (۲۰۱۳)

فعالیت پروتئاز و لیپاز در کانال گوارشی پروانه برگخوار توت (*G. pyloalis*) پس از تغذیه از اسانس رزماری افزایش یافت. به‌علاوه زمانی که این حشره از برگ‌های توت آلوده به عصاره درمنه تغذیه کرد سطح لیپاز گوارشی در معده آن به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (Khosravi *et al.*, 2011). در حالی‌که Marie و همکاران (۲۰۰۹) کاهش فعالیت لیپاز را در لاروهای *S. litura* با تغذیه از گیاه جوجوبا مشاهده کردند. سطح لیپاز در معده پروانه برگخوار (*Cnaphalocrocis medinalis*) که از غذای تیمار شده با عصاره آزادیراختین تغذیه کرده بود کاهش یافت (Senthil-nathan, 2006). فعالیت لیپاز در بید آرد تیمار شده با عصاره کلپوره نیز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Shahriari *et al.*, 2017).

در بخش دیگری از این مطالعه، شاهد تأثیر معنی‌دار عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر تعداد سلول‌های خونی لارو بید آرد بودیم. این تیمارها تقریباً در همان ساعات اولیه پس از جذب به سیستم گردش خون افزایش چشمگیر تعداد کل سلول‌ها و گرانولوسیت‌ها را سبب شدند. افزایش پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لاروهایی که از غذای آلوده به آنغوزه و به‌لیمو تغذیه کرده بودند کمی دیرتر اتفاق افتاد. سیستم ایمنی حشرات از نوع ذاتی بوده که در مقابل ورود عوامل بیگانه و یا آلوده و هر نوع تنش فعال می‌شود. پس از شناسایی عامل بیگانه وارد شده در هموسل، اولین واکنش ایمنی بندپایان با تغییرات تعداد و شکل سلول‌های خونی همراه است (Li *et al.*, 2019). در واقع، سلول‌های خونی در مواجهه با عوامل متعددی مانند پوست‌اندازی، جنسیت، جفتگیری، گرسنگی، دما، ورود پاتوژن‌ها و سموم به همولنف واکنش نشان می‌دهند (Duarte *et al.*, 2020). گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها سلول‌های مؤثر در ایمنی سلولی هستند که پروفایل آنها در فرایند ایمنی حشرات به شدت تغییر می‌کند (Nakahara *et al.*, 2003). این تغییرات به شکل افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های خونی بروز می‌کند که با توجه به گونه حشره، مرحله رشدی و نوع آلودگی متفاوت است (Gupta, 1979).

مشخص شده که کیفیت غذا بر رشد و نمو و پاسخ دفاعی حشره در مقابل پاتوژن‌ها مؤثر است. به‌عبارت دیگر حشراتی که از رژیم‌های غذایی غنی‌تر بهره‌مند هستند، حساسیت کمتری به آلودگی‌های ناشی از پاتوژن‌ها و پارازیتیسم نشان می‌دهند (Vogelweith *et al.*, 2015). Ebrahimi و Ajamhassani (۲۰۲۰) ثابت کردند که غذای مصنوعی (عسل و آرد گندم و مخمر) ایمنی شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella*) را با افزایش معنی‌دار ایمنوسیت‌ها در مقایسه با رژیم‌های با محتوای غذایی کمتر افزایش داد. ترکیب‌های موجود در عصاره‌ها و یا حشره‌کش‌های گیاهی چنانچه در رژیم غذایی به مصرف حشره برسند، می‌توانند سامانه ایمنی آن را تحریک کنند (Manjula *et al.*, 2020). در این ارتباط تحقیقات بسیاری قابل ذکر است. چنانکه در همولنف لاروهای کرم ساقه‌خوار ذرت *Sesamia cretica* که با عصاره نوعی آنغوزه (*Ferula ovina*) تیمار شدند و پس از ۴۸ ساعت افزایش معنی‌دار گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها مشاهده شد (Sadeghi *et al.*, 2017). همچنین افزایش معنی‌دار تعداد گرانولوسیت‌ها در لاروهای *S. litura* تیمار شده با عصاره سوسن صغیر (*Acorus calamus*) گزارش شده است (Sharma *et al.*, 2008). لاروهای همین حشره ۲۴ ساعت پس از تیمار شدن با آزادیراختین، واکنش ایمنی را با افزایش معنی‌دار تعداد کل هموسیت‌ها نشان دادند (Sharma *et al.*, 2003). افزودن ترکیب‌های گیاهی کاساو (نوعی فرفیون) (*Manihot esculenta*) به رژیم غذایی *S. litura* سبب افزایش بارز گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در ساعات اولیه ورود به همولنف شد (Manjula *et al.*, 2020). در مطالعه‌ای دیگر، زمانی که لاروهای پروانه برگخوار (*Samia Cynthia*) از برگ‌های کاساو تغذیه کردند تعداد کل سلول‌های خونی آنها در مقایسه با لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی مصنوعی افزایش یافت (Tungjitwitayakul & Tatun, 2017). در همین راستا تیمار لاروهای پروانه برنج (*Antheraea assama*) با ریحان (*Ocimum sanctum*) و گل ابری (*Ageratum conizoides*) سبب واکنش ایمنی بالای لاروها

تا ۴۸ ساعت پس از تیماردهی شد (Khanikor & Bora, 2012). در تحقیقی مشابه مطالعه ما، تأثیر تماسی و تنفسی عصاره باریجه (*Ferula gummosa*) بر ایمنی بید آرد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد کل سلول‌ها با گذشت زمان پس از ۴۸ ساعت روند افزایشی پیدا کرد (Ghasemi *et al.*, 2014). در این تحقیق اثر عصاره آنغوزه و به‌لیمو به شکل گوارشی و تغذیه از غذای اصلی حشره (آرد) آلوده شده بررسی شد و تغییرات کمی سریعتر اتفاق افتاد، یعنی افزایش هموسیت‌ها در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیماردهی معنی‌دار بود. بنابراین به نظر می‌رسد که روش تیمار عصاره‌های گیاهی (تماسی، تنفسی و یا گوارشی) بر چگونگی پاسخ ایمنی حشره هدف در ساعات مختلف تأثیرگذار است.

در این مطالعه، تأثیر کشندگی عصاره‌های اتانولی گیاهان آنغوزه و به‌لیمو بر لاروهای سن سوم شب‌پره بید آرد به اثبات رسید. همچنین مشخص شد که متابولیت‌های این گیاهان ویژگی‌های فیزیولوژیکی حشره را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به‌طوری که فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ایمنی آفت در مدت ۲۴-۱۲ ساعت به سرعت دستخوش تغییرات شد. شناخت و آنالیز متابولیت‌ها و ترکیب‌های تشکیل‌دهنده برگ این گیاهان می‌تواند هدف تحقیقات آینده قرار گیرد تا نخست اثرهای متقابل این ترکیب‌ها با خواص فیزیولوژیکی حشره با مطالعه دقیقتری انجام شود و درثانی بتوان با اطمینان بیشتری نسبت به استفاده از این گیاهان در برنامه‌های مدیریتی بید آرد و سایر آفات انباری اقدام نمود.

منابع مورد استفاده

- Ahmad, M., Emam, S.S., Naidia, Y. and Megally, G., 2006. Furocouarin and quinoline alkaloid with larvicidal and antifeedant activities isolated from *Ruta chalepensis* Leaves. Journal of Natural Products, 2: 10-22.
- Ayvaz, A., Sagdic, O., Karabörklü, S. and Ozturk, I., 2010. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. Journal of Insect Science, 10(21): 1-13.
- Bahraminejad, S., Asenstorfer, R.E., Riley, I.T. and Schultz, C.J., 2008. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.). Journal of Phytopathology, 156: 1-7.
- Bahramsoltania, R., Rostamiasrabadic, P., Shahpiria, Z., Marquesd, A.M., Rahimi, R. and Farzaei, M. H., 2018. *Aloysia citriodora* Paláu (*Lemon verbena*): a review of phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology, 222: 34-51.
- Benzi, V.S., Murray, A.P. and Ferrero, A.A., 2009. Insecticidal and insect-repellenta ctivities of essential oils from Verbenaceae and Anacardiaceae against *Rhizopertha dominica*. Natural Product Communications, 4: 1287-1290.
- Bouzeraa, H., Bessila-Bouzeraa, M. and Labed, N., 2019. Repellent and fumigant toxic potential of three essential oils against *Ephestia kuehniella*. Biosystems Diversity, 27(4): 349-353.
- Chapman, R.F., 1998. The Insects Structure and Function. Cambridge University Press, Cambridge, 782p.
- Desai, D.E. and Desai, B.D., 2000. Studies on insecticides properties of some plants. Shaspha, 71: 85-88.
- Duarte, J.P., Silva, C.E., Ribeiro, P.B. and Carcamo, M.C., 2020. Do dietary stresses affect the immune system of *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae)? Brazilian Journal of Biology, 80(1): 73-80.
- Ebrahimi, M. and Ajamhassani, M., 2020. Investigating the effect of starvation and various nutritional types on the hemocytic profile and phenoloxidase activity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). Invertebrate Survival Journal, 17: 175-185.
- Elechosa, M.A., Lira, P., Juarez, M.A., Carmen, I., Viturro, C.I., Heit, C.I., Molina, A.C., Martínez, A.J. and Lopez, S., 2017. Essential oil chemotypes of *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) in Northwestern Argentina. Biochemical Systematics and Ecology, 74 19-29.
- Erturk, O., 2006. Antifeedant and toxicity effects of some plant extracts on *Thaumetpoae solitaria* Frey. (Lep: Thaumetopoeitidae). Turkish Journal of Biology, 30: 51-57.
- Etebari, K., Bizhannia, A.R., Sorati, R. and Matindoost, L., 2006. Biochemical changes in haemolymph of silkworm larvae due to pyriproxyphen residue. Pesticide Biochemistry and Physiology, 88: 14-19.
- Gaire, S., O'Connell, M., Holguin, F.O., Amatya, A., Bundy, S. and Romero, A., 2017. Insecticidal properties of essential oils and some of their constituents on the Turkestan cockroach (Blattodea: Blattidae). Journal of Economic Entomology, 110: 584-592.
- Gaire, S., Scharf, M.E. and Gondhalekar, A.D., 2020. Synergistic toxicity interactions between plant essential oil components against the common bed bug (*Cimex lectularius* L.). Insects, 11(133): 1-13.

galbanifula on Meloidogyne javanica in laboratory condition. Journal of Palnt Protection, 28(3): 338-345.
- Khosravi, H. and Mehrabi, A., 2006. Economic study of *Ferula* harvesting in Tabass region. Iranian Journal of Natural Research, 58(4): 933-944.
- Khosravi, R., Jalali Sendi, J., Ghadamyari, M. and Yazdani, E., 2011. Effect of sweet wormwood *Artemisia annua* crude leaf extracts on some biological and physiological characteristics of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. Journal of Insect Science, 11: 156.
- Kiran, S.R., Reddy, A.S., Devi, P.S. and Reddy, K.J., 2006. Insecticidal, antifeedant and oviposition deterrent effects of the essential oil and individual compounds from leaves of *Chloroxylon swietenia*. Pest Management Science, 62: 1116-1121.
- Kumrungsee, N., Pluempanupat, W., Koul, O. and Bullangpoti, V., 2014. Toxicity of essential oil compounds against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and their impact on detoxification enzyme Activities. Journal of Pest Science, 87: 721-729.
- Leaman, D.J., 2006. Medicinal plant conservation newsletter of the medicinal plant specialist group of the IUCN species survival commission. Silphion, 13: 24-26.
- Li, S.G., Li, M.Y., Huang, Y.Z., Hua, R.M., Lin, H.F., He, Y.J., Wie, L.L. and Liu, Z.Q., 2013. Fumigant activity of Illicium verum fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult Sitophilus zeamais. Journal of Pest Science, 86: 677-683.
- Li, T., Yan, D., Wang, X., Zhang, L. and Chen, P., 2019. Hemocyte changes during immune melanization in *Bombyx Mori* infected with *Escherichia coli*. Insects, 10(301): 1-15.
- Lokesh, G., Narayanaswamy, M. and Ananthanarayana, S.R., 2006. The effect of chemical mutagen on haemolymph proteins of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Pyralidae) in F1 stage. Journal of Applied Science and Environmental Management, 10: 21-25.
- Low, N.H., Vong, V. and Spornest, P., 1986. A new enzyme, β-glucosidase, in honey bee. Journal of Apical Research, 25: 178-181.
- Mahendra, P. and Bisht, S.H., 2012. *Ferula asafoetida*: Traditional uses and pharmacological activity. Pharmacognosy Reviews, 6(12): 141-146.
- Manjula, P., Lalitha, K., Vengateswari, G., Patil, J., Senthil, S.N. and Shivakumar, M.S., 2020. Effect of *Manihot esculenta* (Crantz) leaf extracts on antioxidant and immune system of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 23: 1-9.
- Marie, S.S., Amr, E.M. and Salem, N.Y., 2009. Effect of some plant oils on biological, physiological and biochemical aspects of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5: 103-107.
- Gaire, S., Scharf, M.E. and Gondhalekar, A., 2019. Toxicity and neurophysiological impacts of essential oil components on bed bugs (Cimicidae: Hemiptera). Scientific Reports, 9: 3961.
- Gatehouse, J.A. and Gatehouse, A.M.R., 1999. Genetic engineering of plants for insect resistance: 211-241. In: Rechcigl, J.E. and Rechcigl, N.A., (Eds.). Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. CRC Press, Boca Raton. 392p.
- Ghasemi, V., Khoshnood Yazdi, A., Zaker Tavallaie, F. and Jalali Sendi, J., 2014. Effect of essential oils from *Callistemon viminalis* and *Ferula gummosa* on toxicity and on the hemocyte profile of *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(3): 268-278.
- Gupta, A.P., 1979. Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques. New York (NY): Cambridge University Press, 628p.
- Haque, M.A., Nakakita, H., Ikenaga, H. and Sota, N., 2000. Development inhibiting activity of some tropical plants against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research, 36: 281-287.
- Heydarzade, A., Valizadegan, O., Negahban, M. and Mehrkhou, F., 2019. Efficacy of *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* essential oil nanoformulation on mortality and physiology of *Tribolium castaneum* (Col.: Tenebrionidae). Journal of Crop Protection, 8(4): 501-520.
- Isman, M.B., Miresmailli, S. and Machial, C., 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochemistry Reviews, 10(2): 197-204.
- Jallouli, W., Abdelkefi-Mesrati, L., Tounsi, S., Jaoua, S. and Zouari, N., 2013. Potential of *Photorhabdus temperata* K122 bioinsecticide in protecting wheat flour against *Ephestia kuehniella*. Journal of Stored Products Research, 53: 61-66.
- Jones, J.C. and Liu, D.P., 1969. The effects of ligaturing *Galleria mellonella* larvae on total haemocyt counts and on mitotic indices among haemocytes. Journal of Insect Physiology, 15: 1703-1708.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F. and Pirmoradei, M.R., 2005. Comparision of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry, 91: 639-644.
- Khanikor, B. and Bora, D., 2012. Effect of plant based essential oil on immune response of silkworm, *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae). Internanional Journal of Industrial Entomology, 25(2): 139-146.
- Khayat, F., Mahdikhani Moghadam, E. and Azizi, M., 2014. Effect of nematicide activity of essential oil of *Ecalyptus* sp., *Dorema ammoniacum* and *Ferula*

and insecticidal effects of four plant essential oils on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Crop Protection, 7(2): 135-150.
- Senthil-Nathan, S., 2006. Effects of *Melia azadarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guene) (Lepidoptera: Pyralidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 84: 98-108.
- Shahriari, M. Sahebzadeh, N. and Zibaee, A., 2017. Effect of *Teucrium polium* (Lamiaceae) essential oil on digestive enzyme activities and energy reserves of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Invertebrate Survival Journal, 14: 182-189.
- Sharma, P.R., Sharma, O.P. and Saxena, B.P., 2003. Effect of neem gold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera littura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Current Science, 84: 690-695.
- Sharma, P.R., Sharma, O.P. and Saxena, B.P., 2008. Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Micron, 39: 544-551.
- Tsujita, T., Ninomiya, H. and Okuda, H., 1989. P-nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. Journal of Lipid Research, 30: 997-1004.
- Tungjitwitayakul, J. and Tatun, N., 2017. Comparison of biological and biochemical parameters of eri-silkworms, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae), reared on artificial and natural diets. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5: 314-319.
- Vogelweith, F., Moreau, J., Thiéry, D. and Moret, Y., 2015. Food-mediated modulation of immunity in a phytophagous insect: an effect of nutrition rather than parasitic contamination. Journal of Insect Physiology, 77: 55-61.
- Yazdani, E., Sendi, J.J. and Aliakbar, A., 2013. Chemical composition, toxicity and physiological effects of essential oil of *Rosemarinus officinalis* on lesser mulberry pyralid, Glyphodes pyloalis Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Crop Protection, 2(4): 461-476.
- Zha, C., Wang, C. and Li, A., 2018. Toxicities of selected essential oils, silicone oils, and paran oil against the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). Journal of Economic Entomology, 111: 170-177.
- Zibaee, A. and Bandani, A.R., 2009. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the sun pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauvaria bassiana*. Bulletin of Entomological Research, 12: 1-11.
- Zibaee, A., Alborzi, Z., Karimi-Malati, A. and Salimi, M., 2014. Effects of a lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). Journal of Plant Protection Research, 54: 250-257.
- Moharramipour, S., Nazemi, J., Morovati, M., Talebi, A.S. and Fathipour, Y., 2003. Effect of essential oil of *Nerium oleander*, *Lavandula officinalis* and *Ferula assafoetida* on feeding index adults of *Tribolium castaneum*. Journal of Entomological Society of Iran, 23(1): 69-89.
- Najafzadeh, R., Ghasemzadeh, S. and Mirfakhraie, S., 2019. Effect of Essential Oils from *Nepeta crispa*, *Anethum graveolens* and *Satureja hortensis* against the Stored-product Insect *Ephestia kuehniella* (Zeller). Journal of Medicinal Plants and By-products, 2: 163-169.
- Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M. and Kamimura, M., 2003. In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm: cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. Journal of Insect Physiology, 49: 907-916.
- Oppert, B., Kramer, K.J. and McGaughey, W.H., 1997. Rapid microplate assay of proteinase mixtures. Journal of Biotechnology, 23: 70-72.
- Oukerrou, M.A., Tilaoui, M., Mouse, H.A. Leouifoudi, I., Jaafari, A. and Zyad, A., 2017. Chemical Composition and cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil of *Aloysia citriodora* Palau grown in Morocco. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, 2017: 1-10.
- Parry, M.W., 1996. A study of the interaction of some fungal metabolites with the insect species *Hila melanogaster*. Brikeck College University of London, 215p.
- Rafiei-Kahroodi, Z., Moharamipour, S., Farazmand, H. and Karimzadeh-Esfahani, J., 2011. Insecticidal effect of six native medicinal plants essential oil on Indian meal moth, Plodia *Hubner interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Munis Entomology and Zoology Journal, 6: 339-345.
- Ramzi, S., Sahragard, A., Jalali-Sendi, J. and Aalami, A., 2013. Effects of an extracted lectin from *Citrullus colocynthis* L. (Cucurbitaceae) on survival, digestion and energy reserve sof *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Frontiers Physiology, 4: 1-8.
- Rice, P.J. and Coats, J.R., 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the housefly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology, 87: 1172-1179.
- Ross, I.A., 2007. Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc. USA, 487p.
- Sadeghi, R., Hadizadeh Raeisi, N. and Jamshidnia, A., 2017. Immunological responses of *Sesamia cretica* to *Ferula ovina* essential oil. Journal of Insect Science, 17(1): 1-5.
- Samir, A., Abdelgaleil1, M. and. El-Sabrout, A.M., 2018. Anti-nutritional, antifeedant, growth-disrupting

Effects of *Ferula assa-foetida* L. and *Aloysia citriodora* Palau ethanolic extracts on mortality and some physiological characteristics of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

M. Ajamhassani[1*]

1*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran, E-mail: shahroodm@gmail.com

Received: June 2020 Revised: February 2021 Accepted: February 2021

Abstract

The lethal and physiological effects of plant secondary metabolites on a wide range of pest insects have been proved. These compounds, while having a direct effect on the target pest, are low risk to humans and the environment, and this has led to their advantage over chemicals. In this study, the lethal effect of *Ferula assa-foetida* L. and *Aloysia citriodora* Palau ethanolic extracts was determined on the third instar larvae of *Ephestia kuehniella*. The larval mortality was directly related to increasing the extracts concentration. The activity of some digestive enzymes in the gastrointestinal tract and the changes in hemocytes were also studied in the third instar larvae treated with the extracts. First, sublethal concentration of plant ethanolic extracts was calculated. The larvae then fed the diet contaminated by the lethal concentration of 25% (LC_{25}) of the extracts (40 and 30 ppm for *F. assa-foetida* and *A. citriodora*, respectively). The control group consisted of larvae that fed the diet contaminated with diluted ethanol. The results indicated that both extracts significantly reduced the activity of trypsin and chymotrypsin enzymes. *F. assa-foetida* extract significantly reduced the activity of lipase and beta-glucosidase enzymes compared to the control, but the effect of *A. citriodora* extract on the activity of these two enzymes was in a statistical group with the control. The extracts had no significant effects on the alpha-glucosidase enzyme activity. The immune activity of larvae was also stimulated by changes in the number of blood cells affected by both extracts. The total number of cells and granulocytes of hemolymph showed a significant increase after 12 hours of feeding in the both extracts treatments, but gradually decreased until 24 hours that was still higher than the control group. The plasmatocytes showed a significant increase in the *A. citriodora* extract treatment after 12 hours, but in the *F. assa-foetida* extract treatment, this increase was significant after 24 hours. Understanding the intractions of plant extracts with the insect physiological characteristics such as the physiology of digestive and blood circulatory systems can lead to the possibility of appropriate use of these factors in the target pest control and be used in the pests management programs.

Key words: Plant extracts, digestive enzyme activity, blood cells, *Ephestia kuehniella*.