

مقدمه

سوسک کشیش، *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae)، از مهم‌ترین آفات خسارت‌زای بذره‌های غلاتی مثل گندم، جو، ذرت و برنج به شمار می‌رود (Obretenchev *et al.*, 2020). حشرات کامل این آفت می‌توانند میزبان را از فاصله حدود یک کیلومتری پیدا کنند و همچنین، از قدرت پرواز بالایی برخوردارند (Ahmad *et al.*, 2013). تمام مراحل لاروی و بیشتر دوره زندگی حشرات کامل، به‌عنوان مراحل خسارت‌زای آفت، به‌طور معمول داخل بذره‌های آلوده سپری می‌شود (Scheff *et al.*, 2022). از آنجا که ترکیبات تدخینی می‌توانند به‌راحتی به مناطقی که حشرات در آنجا مخفی شده‌اند نفوذ کنند، استفاده از سموم تدخینی راهبرد اصلی در مدیریت حشرات آفت محصولات انباری می‌باشد (Hagstrum and Athanassiou, 2019). اگرچه استفاده از سموم تدخینی شیمیایی راهبرد اصلی در مدیریت سوسک کشیش است، ولی کاربرد بی‌رویه چنین آفت‌کش‌هایی عوارض جانبی بیشماری از جمله آلودگی محیط زیست و سمیت برای انسان و موجودات غیرهدف را در پی داشته است (Loddé *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2020). علاوه بر این، مقاومت سوسک کشیش به آفت‌کش فسفین به‌عنوان یکی از سموم تدخینی رایج در کنترل آفات محصولات انباری و برخی از حشره‌کش‌های دیگر گزارش شده است (Collins *et al.*, 2017; Sakka *et al.*, 2021). بنابراین، معرفی عوامل سازگار با محیط زیست و در عین حال کارآمد باید در اولویت پژوهش‌های مربوط به مدیریت چنین آفاتی قرار گیرد.

گیاهان ترکیبات پیچیده‌ای با عنوان متابولیت‌های ثانویه را در مواجهه با گیاه‌خواران تولید می‌کنند که می‌توانند برای حشرات گرده‌افشان جلب‌کننده و برای آفات دورکننده و یا سمی باشند (Pichersky and Gershenzon, 2002). در سال‌های گذشته حدود ۱۷۵۰۰ گونه گیاهی به لحاظ داشتن اهمیت آفت‌کشی معرفی شده‌اند (Mossa, 2016). اسانس-

های استخراج شده از گونه‌های متنوعی از گیاهان معطر، به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه فعال در این گیاهان، توانمندی آفت‌کشی بالایی علیه راسته‌های مختلف حشرات نشان داده‌اند (Isman and Grieneisen, 2014; Ebadollahi *et al.*, 2020; Isman, 2020). اسانس‌های گیاهی ترکیباتی زیست‌تجزیه‌پذیر و به‌طور معمول در دسترس هستند و نسبت به آفت‌کش‌های خطرناک شیمیایی برای پستانداران و موجودات غیرهدف سالم می‌باشند (Pavela and Benelli, 2016). از طرفی به دلیل داشتن اجزای شیمیایی بسیار پیچیده‌ای از قبیل گروه‌های مختلف ترکیبات تربنی و الگوی عمل چندگانه ناشی از آن‌ها، حشرات آفت شانس بسیار کمی برای توسعه مقاومت در برابر این عوامل زیستی را خواهند داشت (Isman, 2006; Hernández-Carlos and Gamboa-Angulo, 2019).

حدود ۸۰۰ گونه از گیاهان جنس اکالیپتوس (*Eucalyptus*) متعلق به تیره مورد (Myrtaceae)، به دلایل مختلف از جمله سازگاری بالا در برابر کم‌آبی و رشد سریع تا تولید محصولات مثلی چوب، صمغ و اسانس، در بسیاری از نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا کاشت می‌شوند (Coppen, 2002). درخت *Eucalyptus oleosa* F. Muell به‌عنوان یکی گونه‌های غنی از اسانس در جنس اکالیپتوس شناخته می‌شود؛ به‌طوری‌که میزان اسانس برگ‌های این گیاه از ایران (Rahimi-Nasrabadi *et al.*, 2013) و تونس (Ben-Marzoug *et al.*, 2010) به ترتیب ۶/۷ و ۴/۴ درصد (w/w) گزارش شده است. خواص زیستی متنوع اسانس *E. oleosa* شامل آثار آنتی‌اکسیدانت، ضد قارچ، ضد باکتری و خاصیت آفت‌کشی ثبت شده است (Ben-Marzoug *et al.*, 2011; Rahimi-Nasrabadi *et al.*, 2017). برای مثال، سمیت این اسانس روی ماده‌های بالغ کنه‌تارتن دو لکه‌ای (*Tetranychus urticae* Koch) با غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC₅₀) ۲/۴۲ میکرولیتر بر لیتر هوا ثبت شده است (Ebadollahi *et al.*, 2017). بررسی اجزای شیمیایی اسانس *E. oleosa* نشان داده است که ترکیبات تربنی مثل

سوسک کشیش برای اولین بار در تحقیق حاضر بررسی شد. علاوه بر بررسی تاثیر اسانس *E. oleosa* در تلفات آفت، تاثیر زیرکشدگی آن هم در محتوای ذخایر انرژی شامل پروتئین، لیپید و گلیکوزن، فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و پروتئاز و آنزیم‌های سم‌زادی آلفا- و بتا-استراز و شاخص-های تغذیه‌ای آفت بررسی شد. همچنین، اجزای شیمیایی اسانس *E. oleosa* با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی-طیف‌سنج جرمی بررسی شده و ارتباط احتمالی ترکیبات عمده موجود در اسانس با فعالیت‌های حشره‌کشی مشاهده شده مورد بحث قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی و استخراج اسانس

برگ‌های تازه درخت اکالیپتوس گونه *E. oleosa* پس از جمع‌آوری از باغ گیاه‌شناسی کاشان طی اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۱ در شرایط سایه داخل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی خشک شدند. اسانس‌گیری از نمونه‌ها با روش تقطیر با آب مقطر و با کمک دستگاه کلونجر شیشه‌ای انجام شد. پنجاه گرم از پودر برگ‌های خشک شده گیاه به همراه ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه کلونجر ریخته شد و اسانس-گیری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و به مدت ۱۸۰ دقیقه انجام گرفت. اسانس جمع‌آوری شده با استفاده از سولفات سدیم آب‌گیری شد و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای پوشیده شده با روکش آلومینیومی در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد (Ebadollahi et al., 2022a).

بررسی اجزای شیمیایی اسانس

اجزای شیمیایی اسانس *E. oleosa* با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی^۷ متصل به طیف‌سنج جرمی^۸ بررسی شد. طول، قطر و ضخامت ستون دستگاه گاز کروماتوگرافی (HP-5ms) به ترتیب ۳۰ متر، ۰/۲۵ میلی‌متر و ۰/۲۵

آلفا-پینن، ۱،۸-سیننول، سلینن^۱ و اسپاتونلول^۲ به ترتیب از گروه‌های مونوترپن‌های هیدروکربنه^۳، مونوترپنوئیدها^۴، سسکوئیترپن‌های هیدروکربنه^۵ و سسکوئیترپنوئیدها^۶ درصد بالایی در این اسانس دارند (Rahimi-Nasrabadi et al., 2013; Ebadollahi et al., 2017).

حساسیت سوسک کشیش به اسانس‌های گیاهی در پژوهش‌های اخیر نشان داده شده است. برای مثال، سمیت تدخینی اسانس مرزه طالشی (*Satureja intermedia* C. A. Mey) روی حشرات کامل سوسک کشیش که همبستگی مستقیم با غلظت اسانس و زمان در معرض قرارگیری داشت، گزارش شد (Ebadollahi and Setzer, 2020). در این تحقیق، سوسک کشیش ($LC_{50} = 12.83 \mu\text{L/L}$) در برابر تدخین اسانس مرزه طالشی حساس-تر از لمبه گندم (*Trogoderma granarium* Everts) ($LC_{50} = 20.49 \mu\text{L/L}$) و شیشه قرمز آرد (*Tribolium castaneum* (Herbst)) ($LC_{50} = 35.61 \mu\text{L/L}$) بود. در تحقیقی دیگر، تدخین اسانس شوید (*Anethum graveolens* L.) علاوه بر ایجاد تلفات معنی‌دار، باعث کاهش محتوای پروتئین و آنزیمی‌های سم‌زادی آلفا- و بتا-استراز و گلوکوتیون-اس-ترانسفراز در حشرات کامل سوسک کشیش تیمار شده نسبت به گروه شاهد شد (Jayakumar et al., 2021). بررسی حساسیت این آفت به اسانس اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* L.) هم نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و پروتئاز حشرات کامل تیمار شده در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت (Tine et al., 2021). با توجه به نتایج پژوهش‌های بیان شده، امکان مدیریت سوسک کشیش به وسیله اسانس-های گیاهی وجود دارد.

با توجه به لزوم استفاده از ترکیبات کم‌خطر و در عین حال کارآمد در مدیریت حشرات آفت، سمیت تدخینی اسانس اکالیپتوس گونه *E. oleosa* روی حشرات کامل

5. Sesquiterpene hydrocarbons

6. Sesquiterpenoids

7. Agilent 7890B

8. Agilent 5977A

1. Selinene

2. Spathulenol

3. Monoterpene hydrocarbons

4. Monoterpenoids

۲۶/۷۸، ۳۵/۵۶، ۴۷/۶۲، ۶۴/۲۶ و ۸۵/۶۸ میکرو لیتر بر لیتر هوا برای بررسی سمیت تدخینی اسانس انتخاب و به وسیله میکروبیوت روی قطعات دایره‌ای شکل کاغذ صافی به قطر ۳ سانتی متر ریخته شدند. قطعات کاغذ صافی داخل درپوش ظروف شیشه‌ای چسبانده شدند. به منظور جلوگیری از خروج بخار اسانس، درپوش ظروف بلافاصله با استفاده از پارافیلیم به صورت غیر قابل نفوذ به هوا بسته شدند. برای هر غلظت و گروه شاهد سه تکرار در نظر گرفته شد و تلفات آفت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد ثبت شد. در گروه‌های شاهد تمامی مراحل به جز افزودن اسانس تکرار شد. حشراتی که در تماس قلم مو با شاخک‌ها و پاها هیچ عکس‌العملی نشان نمی‌دادند، به عنوان حشرات مرده در نظر گرفته شدند (Ebadollahi and Setzer, 2020).

آزمایش‌های بیوشیمیایی

از غلظت کشنده ۳۰ درصد ($LC_{30} = 22.08 \mu\text{L/L}$) air) که بر اساس آزمایش‌های سمیت تدخینی محاسبه شده بود، برای ارزیابی تاثیر زیرکشندگی اسانس *E. oleosa* روی فعالیت‌های بیوشیمیایی حشرات کامل سوسک کشیش استفاده شد. برای انجام آزمایش‌های بیوشیمی از کل بدن حشرات کامل استفاده شد و در گروه شاهد حشرات کامل تیمار نشده در نظر گرفته شدند.

فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات کامل سوسک کشیش

برای تهیه عصاره آنزیمی، ۵۰ عدد حشره کامل به صورت جداگانه با استفاده از یک همگن‌کننده شیشه‌ای دستی له شد. مخلوط‌های همگن حاصل با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و روئین‌های حاصل داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Naseri and Majd-Marani, 2022). به منظور تامین اسیدیته مناسب از بافر استات-سدیم هیدروکسید (۵۰ میلی مولار) استفاده شد. برای برآورد فعالیت پروتئازی کل، از سوبسترای آزوکازین بر اساس روش الپیدینا و همکاران (Elpidina

میکرومتر بود. برنامه دمایی دستگاه از ۵۰ تا ۳۰۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. تزریق محلول اسانس (۱ اسانس: ۱۰ متانول) به میزان ۱ میکرو لیتر در دمای ۲۸۰ درجه سلسیوس صورت گرفت. هلیوم به عنوان گاز حامل با نرخ ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه به کار برده شد. شناسایی ترکیبات با مقایسه زمان‌های بازدارندگی^۱ و الگوی طیف‌های ترسیم شده توسط طیف‌سنج با منابع کتابخانه‌ای دستگاه (Wiley 7n.1 [Standard و NIST [Wiley, New York, USA] Reference Data, Gaithersburg, USA] انجام گرفت.

پرورش حشره آفت

حشرات کامل سوسک کشیش از گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی تهیه شدند و در ظروف پلاستیکی استوانه‌ای شکل حاوی ۲۰۰ گرم گندم خرد شده (رقم آفتاب) که دهانه آن برای تأمین تهویه با پارچه توری پوشانده شده بود، پرورش داده شدند. ظروف پرورش در اتاقک رشد با شرایط دمایی ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 5 ± 60 درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Naseri and Majd-Marani, 2022). به حشرات کامل چهل و هشت ساعت فرصت تخم‌گذاری داده شد و پس از این مدت از ماده غذایی حذف شدند. دانه‌های گندم آلوده به تخم آفت برای پرورش مراحل بعدی آفت در اتاقک رشد نگهداری شدند. بیست و چهار ساعت بعد از حشرات کامل ۱ روزه به صورت تصادفی برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی استفاده شد.

سمیت تدخینی اسانس

برای بررسی سمیت تدخینی اسانس، ۲۰ عدد حشره کامل یک روزه سوسک کشیش به صورت تصادفی انتخاب شدند و درون ظروف شیشه‌ای ۱۴۰ میلی لیتری با درپوش غیر قابل نفوذ به هوا به عنوان ظروف تدخین قرار داده شدند. بر اساس آزمایش‌های مقدماتی، شش غلظت شامل ۲۰/۰۰،

¹. Retention Time = RT

حشرات کامل (۵۰ عدد) تیمار شده با غلظت کشنده ۳۰ درصد اسانس در ۲۵۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات (۴۰ میلی مولار و pH ۷/۰) روی یخ همگن شدند. مخلوط همگن با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و روشنین حاصله به عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-استراز آفت بر اساس روش وان اسپرن (van Asperen, 1962) ارزیابی شد. مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱۱۲/۵ میکرولیتر بافر سدیم فسفات، ۵۰ میکرولیتر آلفا-نفتیل استات ۰/۵ میلی مولار و بتا-نفتیل استات ۱/۸ میلی مولار به-طور جداگانه (به ترتیب برای آنزیم‌های آلفا- و بتا-استراز) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شدند. سپس، ۵۰ میلی گرم فاست بلو آر آر ۳ در ۵۰ میلی لیتر بافر سدیم فسفات به مخلوط اضافه شد. جذب نمونه‌ها در ۴۵۰ نانومتر برای آلفا-نفتیل استات و ۵۴۰ نانومتر برای بتا-نفتیل استات به مدت ۷ دقیقه هر ۳۰ ثانیه یک بار توسط دستگاه الایزایدردر (Anthos 2020, UK) خوانده شد (van Asperen, 1962).

ذخایر انرژی حشرات کامل سوسک کشیش

تعداد ۱۰۰ عدد حشره کامل یک روزه سوسک کشیش در معرض غلظت زیرکشنده ۳۰ درصد اسانس قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، کل بدن حشرات کامل تیمار شده با استفاده از یک هموژنایزر شیشه‌ای دستی و ۲۵۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات (۰/۴ مولار و pH 7) در دمای ۴ درجه سلسیوس هموژنیزه شد. مخلوط‌های همگن حاصل با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای اندازه-گیری محتوای لیپید بدن حشرات کامل از روش ون هندل (van Handel, 1985) استفاده شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل حشره با روش برادفورد (Bradford, 1976) و با استفاده از پروتئین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد انجام گرفت و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری محتوای گلیکوژن از معرف آنترون

(et al., 2001) استفاده شد. بیست میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۸۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱/۵ درصد در بافر ۲-مورفولینوتان سولفونیک اسید (۵۰ میلی مولار و pH ۶/۰) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ دقیقه مخلوط شد. واکنش آنزیمی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۳۰٪ درصد متوقف شد. آزوکازئین هیدرولیز نشده با قراردادن در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت رسوب داده شد. سپس، مخلوط حاصله با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. حجمی مساوی از هیدروکسید سدیم دو مولار به روشنین (۱۰۰ میکرولیتر) اضافه شده و جذب آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر ارزیابی شد. هر یک از آزمایش‌های مربوط به تیمارها و شاهد سه مرتبه تکرار شدند. در بلانک عصاره آنزیمی بعد از اضافه کردن تری کلرواستیک اسید به مخلوط واکنش افزوده شد. تغییر در جذب نوری به ازای هر میلی گرم پروتئین در هر دقیقه به عنوان یک واحد از فعالیت پروتئاز تعریف شد.

برای ارزیابی فعالیت آمیلازی کل، ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر استات (۵۰ میلی مولار و pH 6) و ۴۰ میکرولیتر نشاسته ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شدند. بعد از اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی در دمای ۸۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس، جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, UV/Vis 2100, USA) خوانده شد. هر یک از آزمایش‌های مربوط به تیمار و بلانک در سه تکرار انجام شد. مقدار آنزیم مورد نیاز برای تولید ۱ میلی گرم مالتوز در ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌عنوان یک واحد از فعالیت آمیلاز تعریف شد (Bernfeld, 1955).

فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-استراز حشرات کامل سوسک کشیش

3. Fast Blue RR

1. 2-Morpholinoethanesulfonic acid buffer

2. Trichloroacetic acid

اسمیرنوف بررسی شد. در تکرارهایی که تلفاتی در گروه-های شاهد مشاهده شد، درصد مرگ و میر با استفاده از فرمول آبوت اصلاح شد. سپس داده‌ها تجزیه واریانس شده و با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه میانگین شدند. تجزیه پروبیت داده‌ها برای برآورد غلظت‌های کشته و مقادیر مربوط به خطوط رگرسیونی صورت گرفت. داده‌های مربوط به آثار زیرکشندهگی اسانس هم تجزیه واریانس شده و میانگین‌های مربوطه توسط آزمون t با گروه شاهد مقایسه شدند. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد.

نتایج

بررسی اجزای شیمیایی اسانس

تجزیه شیمیایی اسانس *E. oleosa* با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی - طیف‌سنج جرمی نشان داد که ترکیبات ترپنی ۱۸-سینئول (۱۸/۸۸ درصد)، آلفا-پینن (۱۷/۴۲ درصد)، ترانس-پینوکاروتول (۴/۱۷ درصد)، اس-آلفا-ترپینئول (۴/۵۶ درصد) و بتا-اودسمول (۳/۸۲ درصد) اجزای اصلی اسانس اکالپیتوس بودند. از بین ۹۳/۸۲ درصد از ترکیبات شناسایی شده در اسانس، ۸۸/۱۶ درصد را ترکیبات ترپنی از گروه‌های مختلف مونوترپن‌های هیدروکربنه، مونوترپنوئیدها، سسکووترپن‌های هیدروکربنه و سسکووترپنوئیدها به خود اختصاص دادند. همچنین، ترکیب ایزوآمیل ایزووالریت^۴ (۲/۴۲ درصد) به عنوان یک استر اسید چرب و ترکیب فنیل پروپانوئیدی ترانس-آنتول^۵ (۲/۰۲ درصد) هم به عنوان ترکیبات عمده غیر ترپنی شناسایی شدند (جدول ۱).

استفاده شده و جذب نوری آن در طول موج ۶۲۶ نانومتر خوانده شد (Yuval et al., 1998).

شاخص‌های تغذیه‌ای سوسک کشیش

برای تعیین فعالیت ضد تغذیه‌ای اسانس *E. oleosa* از ۲۰۰ عدد حشره کامل یک روزه سوسک کشیش تیمار شده با غلظت زیرکشنده ۳۰ درصد اسانس (سمیت تدخینی) استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت، حشرات زنده مانده به ۷ گروه ۱۰ تایی تقسیم و داخل ظروف پتری ۶ سانتی‌متری حاوی ۳ گرم بذر گندم خرد شده (رقم آفتاب) منتقل شدند. وزن غذای داده شده، وزن حشرات کامل قبل و بعد از تغذیه و وزن غذای باقی مانده بعد از ۲ هفته با استفاده از ترازوی دیجیتال ۴ صفر (Sartorius AG, GCA803S, Germany) ثبت شد. نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت داخل آون خشک شده و وزن خشک حشرات کامل و غذا قبل و بعد از خشک شدن ثبت شد. داده‌های مذکور برای محاسبه شاخص‌های تغذیه‌ای شامل شاخص مصرف، نرخ مصرف نسبی، نرخ رشد نسبی^۳ و کارایی تبدیل غذای خورده شده با استفاده از فرمول‌های زیر مورد استفاده قرار گرفت (Waldbauer, 1968)؛

$$\text{Consumption Index} = F/A$$

$$\text{Relative Consumption Rate} = F/TA$$

$$\text{Relative Growth Rate} = G/TA$$

$$\text{Efficiency of Conversion of Ingested food} = G/F$$

در فرمول‌های قید شده، F وزن خشک غذای خورده شده (میلی گرم)، T دوره تغذیه (روز)، A میانگین وزن خشک حشرات در طول دوره تغذیه (میلی گرم) و G وزن خشک کسب شده حشره در طول دوره تغذیه (میلی گرم) می‌باشند.

تجزیه داده‌ها

نرمال بودن داده‌های مربوط به مرگ و میر آفت تحت تاثیر اسانس *E. oleosa* با استفاده از آزمون کولموگروف-

4. Efficiency of Conversion of Ingested food (ECI)

5. Isoamyl isovalerate

6. trans-Anethole

1. Consumption Index (CI)

2. Relative Consumption Rate (RCR)

3. Relative Growth Rate (RGR)

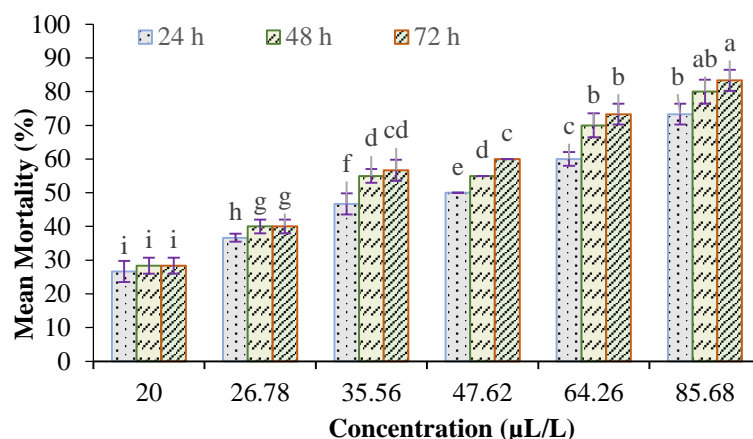
جدول ۱- اجزای شیمیایی اسانس مستخرج از برگ‌های *Eucalyptus oleosa*Table 1. Chemical composition of essential oil isolated from leaves of *Eucalyptus oleosa*. RT: Retention Time (minute)

RT	Compound	%	RT	Compound	%
5.505	α -Pinene ^{MH}	17.42	12.191	Carvotanacetone ^{OM}	0.19
5.925	Camphene ^{MH}	0.1	12.283	<i>trans</i> -Geraniol ^{OM}	0.45
6.393	β -Pinene ^{MH}	2.32	12.369	Piperitone ^{OM}	1.19
7.186	<i>o</i> -Cymene ^{MH}	0.70	12.824	Phellandral ^{OM}	0.74
7.260	<i>m</i> -Cymene ^{MH}	1.45	12.886	Durenol ^{OM}	0.33
7.352	1,8-Cineole ^{OM}	18.88	13.701	<i>trans</i> -Anethole ^P	2.02
7.875	γ -Terpinene ^{MH}	1.22	13.150	Thymol ^{OM}	1.57
8.410	Fenchone ^{OM}	1.03	13.396	Carvacrol ^{OM}	1.51
8.662	Isoamyl isovalerate ^O	2.42	13.882	Methyl geraniate ^O	0.70
8.760	Linalool ^{OM}	1.11	16.538	<i>allo</i> -Aromadendrene ^{SH}	0.45
9.086	Fenchol ^{OM}	0.89	17.528	Isoamyl Phenylacetate ^O	0.33
9.313	α -Terpinene ^{MH}	0.52	17.719	α -Selinene ^{SH}	0.21
9.424	<i>trans</i> -Pinocarveol ^{OM}	4.17	18.204	Myristicin ^O	0.19
9.535	Camphor ^{OM}	0.85	19.041	<i>epi</i> -Globulol ^{OS}	0.43
9.947	<i>trans-p</i> -Menthan-3-one ^{OM}	0.30	19.428	Spathulenol ^{OS}	1.26
10.020	Borneol L ^{OM}	0.73	19.582	Globulol ^{OS}	1.74
10.174	Pinocarvone ^{OM}	0.43	20.461	γ -Eudesmol ^{OS}	1.74
10.303	Borneol ^{OM}	2.39	20.897	β -Eudesmol ^{OS}	3.82
10.549	Terpinen-4-ol ^{OM}	2.48	20.940	α -Eudesmol ^{OS}	2.02
10.598	α -Terpineol ^{OM}	1.03	22.029	(Z)-Farnesol ^{OS}	0.11
10.777	Cryptone ^{OM}	1.88		Monoterpene hydrocarbons (MH)	23.73
10.937	(S)- α -Terpineol ^{OM}	4.56		Oxygenated monoterpenoids (OM)	52.65
11.017	Myrtenol ^{OM}	0.88		Sesquiterpene hydrocarbons (SH)	0.66
11.219	<i>trans</i> -Carveol ^{OM}	0.87		Oxygenated sesquiterpenoids (OS)	11.12
11.318	(S)-Verbenone ^{OM}	0.25		Phenylpropanoid (P)	2.02
11.804	Carvone ^{OM}	1.50		Others (O)	3.64
12.037	Pulegone ^{OM}	2.44		Total identified	93.82

آفت معنی‌دار نبود ($F = 0.457$; $df = 10, 36$; $P = 0.907$). مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی نشان داد که بیشترین درصد تلفات در بالاترین غلظت (۵۸/۶۸ میکرو لیتر بر لیتر هوا) و طی زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌دست آمده است. همچنین، غلظت ۲۰ میکرو لیتر بر لیتر هوا از اسانس کمترین تلفات را در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌وجود آورده است ($P < 0.05$) (شکل ۱).

سمیت تدخینی اسانس

بر اساس نتایج آزمون کولموگروف اسمیرنوف، داده‌های حاصل از سمیت تدخینی اسانس *E. olea* روی حشرات کامل سوسک کشیش دارای توزیع نرمال بودند ($Z = 0.628$; Significant (2 tailed) = 0.826). تجزیه واریانس داده‌های مذکور نشان داد که غلظت‌های مورد استفاده ($F = 82.864$; $df = 5, 36$; $P < 0.001$) و زمان‌های در معرض قرارگیری ($F = 8.309$; $df = 2, 36$; $P = 0.001$) اثر معنی‌داری در مرگ و میر حشرات کامل داشتند. با این حال، اثرات متقابل غلظت‌ها و زمان‌ها در مرگ و میر



شکل ۱- مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی سمیت تدخینی اسانس *Eucalyptus olea* روی حشرات کامل *Rhyzopertha dominica* با استفاده از آزمون توکی

Figure 1. The mean comparison of data obtained from the fumigant toxicity of *Eucalyptus olea* essential oil on *Rhyzopertha dominica* adults using Tukey's test. Dissimilar letters indicate a statistically significant difference for means ($P < 0.05$)

سمیت بالاتر اسانس را در این زمان نشان می‌دهد. مقادیر بالای ضریب همبستگی سمیت تدخینی اسانس *E. oleosa* روی حشرات کامل سوسک کشیش نشان‌دهنده همبستگی مثبت و مستقیم بین غلظت‌های مورد استفاده و تلفات آفت می‌باشد (جدول ۲).

مقدار LC_{50} اسانس *E. oleosa* بعد از ۲۴ ساعت ۴۲/۹۲۳ میکرولیتر بر لیتر هوا برآورد شد که با افزایش زمان تا ۷۲ ساعت به صورت معنی‌داری کاهش و به ۳۴/۰۴۴ میکرولیتر بر لیتر هوا رسید. به عبارتی حساسیت حشره آفت به اسانس با افزایش زمان افزایش یافت. همچنین، مقدار بیشتر سمیت نسبی (Relative Potency) در زمان ۷۲ ساعت،

جدول ۲- مقادیر غلظت‌های کشنده (LC) و اطلاعات خطوط رگرسیونی سمیت تدخینی اسانس *Eucalyptus olea* روی حشرات کامل *Rhyzopertha dominica*

Table 2. Lethal Concentration (LC) values and regression lines' information of the fumigant toxicity of *Eucalyptus olea* essential oil on adults of *Rhyzopertha dominica*

Time (h)	LC_{50} with 95% Confidence Limits (µL/L air)	LC_{90} with 95% Confidence Limits (µL/L air)	χ^2 ($df = 4$)	Slope \pm SE	Significant ^a	R^2	RP ^b
24	42.923 (38.564–47.564)	217.833 (150.441–408.367)	1.373	1.817 \pm 0.249	0.849	0.976	-
48	35.828 (31.515–40.149)	145.004 (111.293–219.661)	2.471	2.111 \pm 0.254	0.650	0.970	1.198
72	34.044 (30.185–37.794)	120.027 (96.538–166.363)	1.578	2.342 \pm 0.259	0.813	0.984	1.261

^a Since the significance level is greater than 0.05, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits. ^b Relative potency (RP) = The greatest LC_{50} value / another LC_{50} value. The number of tested insects is 420 in each time.

شده نسبت به حشرات تیمار نشده در گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). حشرات کامل سوسک کشیش تحت تاثیر غلظت ۲۲/۰۸۲ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-استراز را به صورت معنی‌داری نسبت گروه شاهد افزایش دادند ($P < 0.05$) (جدول ۳).

تاثیر بیوشیمیایی اسانس

استفاده از غلظت کشنده ۳۰ درصد (۲۲/۰۸۲ میکرولیتر بر لیتر هوا) اسانس اکالیپتوس موجب کاهش معنی‌دار محتوی پروتئین، گلیکوژن و لیپید به عنوان منابع اصلی انرژی در حشرات کامل سوسک کشیش شد ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و پروتئاز هم در حشرات تیمار

جدول ۳- تاثیر بیوشیمیایی غلظت کشنده ۳۰ درصد اسانس *Eucalyptus oleosa* (۲۲/۰۸۲ میکرو لیتر بر لیتر) (میانگین \pm خطای معیار) روی حشرات کامل *Rhyzopertha dominica*

Table 3. The biochemical effects of LC₃₀ of *Eucalyptus oleosa* essential oil (22.082 μ l/l) (mean \pm SE) on the adults of *Rhyzopertha dominica*

Biochemical effects	Control	Treatment	T test (<i>df</i> = 2)	
			T value	Significant (2-tailed)
Protein content (μ g/adult)	125.112 \pm 2.008 ^a	103.167 \pm 0.441 ^b	-8.964	0.012
Glycogen content (μ g/adult)	60.556 \pm 2.042 ^a	35.167 \pm 1.512 ^b	-8.873	0.012
Lipid content (μ g/adult)	7.533 \pm 0.371 ^a	4.667 \pm 0.353 ^b	-16.252	0.004
Amylase activity (mg maltose/min/individual)	0.520 \pm 0.035 ^a	0.167 \pm 0.009 ^b	-6.705	0.022
Protease activity (mU/individual)	0.142 \pm 0.018 ^a	0.035 \pm 0.004 ^b	-4.727	0.042
α -Esterase activity (μ mol/min/mg protein)	0.050 \pm 0.001 ^b	0.096 \pm 0.001 ^a	25.491	0.002
β -Esterase activity (μ mol/min/mg protein)	0.120 \pm 0.002 ^b	0.165 \pm 0.010 ^a	6.719	0.021

Mean values in a row followed by dissimilar lowercase letters are significantly different on the basis of T test ($P < 0.05$).

به صورت معنی داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$). میانگین درصد کارایی تبدیل غذای خورده شده در حشرات تیمار شده با گروه شاهد تفاوت معنی داری نداشت. شاخص بازدارندگی تغذیه ای اسانس با غلظت ۲۲/۰۸۲ میکرو لیتر بر لیتر، ۵۹/۴۰ درصد ارزیابی شد (جدول ۴).

تاثیر ضد تغذیه ای اسانس

تاثیر غلظت کشنده ۳۰ درصد (۲۸/۰۸۲ میکرو لیتر بر لیتر) اسانس اکالیپتوس در شاخص های تغذیه ای حشرات کامل سوسک کشیش در جدول ۴ نشان داده است. شاخص مصرف (CI)، نرخ نسبی مصرف غذا (RCR) و نرخ رشد نسبی (RGR) در حشرات تیمار شده نسبت به گروه شاهد

جدول ۴- تاثیر ضد تغذیه ای غلظت کشنده ۳۰ درصد اسانس *Eucalyptus oleosa* (۲۲/۰۸۲ میکرو لیتر بر لیتر هوا) (میانگین \pm خطای معیار) روی حشرات کامل *Rhyzopertha dominica*

خطای معیار) روی حشرات کامل *Rhyzopertha dominica*

Table 4. The antinutritional effects of LC₃₀ of *Eucalyptus oleosa* essential oil (22.082 μ l/l air) (mean \pm SE) on the adults of *Rhyzopertha dominica*

Nutritional indices	Control	Treatment	T test (<i>df</i> = 6)	
			T value	Significant (2-tailed)
Consumption index (mg/mg)	7.965 \pm 0.011 ^a	3.232 \pm 0.263 ^b	-7.275	0.0003
Efficiency of conversion of ingested food (%)	3.052 \pm 0.198 ^a	2.776 \pm 0.546 ^a	-0.466	0.658
Relative consumption rate (mg/mg/day)	0.570 \pm 0.066 ^a	0.231 \pm 0.019 ^b	-7.275	0.0003
Relative growth rate (mg/mg/day)	0.018 \pm 0.001 ^a	0.007 \pm 0.002 ^b	-3.662	0.011
Feeding deterrence index (%)	-	59.406	-	-

Mean values in a row followed by dissimilar lowercase letters are significantly different on the basis of T test ($P < 0.05$).

از جنوب استان فارس بودند. با وجود اینکه ترکیبات مذکور در تحقیق حاضر هم شناسایی شدند، از نظر کمی مقادیر متفاوتی برای ترکیبات مذکور ثبت شد؛ به ترتیب ۱۸/۹، ۲/۳ و ۱۷/۴ درصد برای ۱، ۸-سینئول، بتا-پینین و آلفا-پینین. علاوه

بحث

جایمند و همکاران (Jaimand *et al.*, 2009) نشان دادند که ۱، ۸-سینئول (۸۹/۴ درصد)، بتا-پینین (۱/۲ درصد) و آلفا-پینین (۱/۰ درصد) ترکیبات غالب اسانس *E. oleosa*

گزارش شده است. در این تحقیق، تدخین ۵۰ میکرولیتر بر لیتر از مونوترپنوئیدهای مذکور باعث تلفات ۱۰۰ درصدی حشرات تیمار شده بعد از ۲۴ ساعت شد. در تحقیقی دیگر غلظت ۵۰ میکرولیتر بر لیتر هوا از ترکیبات آلفا-پینن، بتا-پینن و آلفا-ترپینول که در اسانس مورد مطالعه تحقیق حاضر هم به مقدار قابل توجهی وجود داشتند (به ترتیب ۱۷/۴، ۲/۳ و ۱/۰ درصد)، باعث ایجاد تلفات بالای ۷۵ درصدی حشرات کامل سوسک کشیش بعد از ۷۲ ساعت شدند (do Nascimento et al., 2018). در تحقیقی دیگر، فیلومو و همکاران (Filomeno et al., 2020) نشان دادند که غلظت ۱۵۸ میکرولیتر بر لیتر هوا از مونوترپنوئید ۱،۸-سینئول باعث ایجاد تلفات ۱۰۰ درصدی حشرات کامل سوسک کشیش طی مدت ۴۸ ساعت شد و ترکیبات مونوترپنی آلفا-پینن و پارا-سایمن در غلظت‌های مورد مطالعه (به ترتیب ۲۵/۸ و ۳۴/۴ میکرولیتر بر لیتر هوا) هیچ گونه تلفاتی نداشتند. با وجود این، اختلاط ترکیبات ترپنی مذکور باعث ایجاد تاثیر سینرژیستی بین آنها شد؛ به طوری که اختلاط جداگانه آلفا-پینن و پارا-سایمن با ۸،۱-سینئول باعث افزایش قدرت کشندگی آنها شده و تلفات طی مدت ۴۸ ساعت به ۱۰۰ درصد رسید. با توجه به نتایج پژوهش‌های بیان شده، می توان بیان کرد که اسانس *E. oleosa* حاوی ترکیبات ترپنی حشره کشی می باشد که به طور جداگانه و یا به صورت توام و در قالب خاصیت سینرژیستی روی سوسک کشیش تاثیر گذار می باشند. به عبارتی دیگر، سمیت اسانس *E. oleosa* روی حشرات کامل سوسک کشیش می تواند ناشی از وجود ترکیبات ترپنی موجود در آن باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که علاوه بر داشتن سمیت تدخینی روی سوسک کشیش، اسانس *E. oleosa* آثار زیرکشندگی بیشماری، شامل کاهش محتوای ذخایر انرژی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تاثیر ضد تغذیه‌ای در حشرات کامل تیمار شده دارد. با توجه به اینکه پروتئین‌ها،

بر آن، ترکیبات ترانس-پینوکارونول (۴/۲ درصد) و ترپینن-۴-آل (۲/۵ درصد) در تحقیق حاضر جزو ترکیبات اصلی اسانس *E. oleosa* بودند اما مقادیر گزارش شده برای این ترکیبات توسط جایمند و همکاران بسیار کمتر بود (به ترتیب ۰/۶ و ۰/۹ درصد). در تحقیق بن مرزوق و همکاران (Ben-Marzoug et al., 2011)، اسپاتونلول (۱۶/۱ درصد)، گاما-یودسمول (۱۵/۰ درصد) و ۱،۸-سینئول (۸/۷ درصد) اجزای اصلی اسانس *E. oleosa* از تونس معرفی شدند. اسپاتونلول و گاما-یودسمول در تحقیق حاضر با درصد بسیار پایین تری شناسایی شدند (به ترتیب ۱/۳ و ۱/۷ درصد). همچنین، در تحقیق بن مرزوق و همکاران (۲۰۱۱) مقدار ترکیبات مونوترپنی، مونوترپنوئیدی، سسکوئیترپنی و سسکوئیترپنوئیدی به ترتیب ۷/۵، ۲۱/۲، ۱/۱ و ۴۳/۲ درصد بود که با نتایج تحقیق حاضر متفاوت می باشد. به علاوه، ترکیب فنیل پروپانوئیدی ترانس-آنتول به میزان حدود ۲/۰ درصد در تحقیق حاضر شناسایی شد که در پژوهش‌های جایمند و همکاران (۲۰۰۹) و بن مرزوق و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نشده است. تفاوت‌های مذکور می تواند ناشی از فاکتورهای متعددی از قبیل موقعیت جغرافیایی محل رشد گیاه، تنش‌های مختلف محیطی و زراعی، روش‌های متفاوت خشک کردن و استخراج اسانس و مرحله رشدی گیاه باشد (Moghaddam and Mehdizadeh, 2017).

فعالیت‌های حشره کشی اسانس‌های گیاهی با ترکیبات موجود در آنها می تواند ارتباط داشته باشد (Isman et al., 2008; Isman, 2020). سمیت تعدادی از ترکیبات ترپنی به خصوص مونوترپنوئیدهای مستخرج از اسانس‌های گیاهی روی سوسک کشیش ثبت شده است؛ سمیت تدخینی قابل توجه مونوترپنوئیدهای ۱،۸-سینئول، بورنتول، تیمول، کارواکرول، لینالول^۵ و کامفور^۶ که در اسانس مورد مطالعه تحقیق حاضر هم وجود داشتند، روی حشرات کامل سوسک کشیش توسط رزمن و همکاران (Rozman et al., 2007)

^۵. Linalool
^۶. Camphor

^۱. γ -Eudesmol
^۲. Borneol
^۳. Thymol
^۴. Carvacrol

رشد نسبی (RGR) را هم کاهش داده و بازدارندگی تغذیه-ای ۵۹/۴ درصدی را موجب شد. این شاخص‌ها بهره‌مندی از غذای خورده شده یا کارایی هضم را نشان می‌دهند و بیان می‌کنند که حشره چگونه غذای خورده شده را به بیوماس تبدیل کرده است (Yazdani et al., 2014). کاهش در شاخص‌های تغذیه‌ای حشرات می‌تواند منجر به کاهش ذخایر انرژی، باروری و رشد آنها شود (Khosravi et al., 2010). در راستای نتایج تحقیق حاضر، پارسا عارف و همکاران (Parsia Aref et al., 2015 and 2016) نشان دادند که نرخ نسبی مصرف غذا و نرخ رشد نسبی حشرات کامل سوسک کشیش تحت تاثیر اسانس‌های *E. dundasii* Maiden و *E. floribundi* Hugel ex Endi کاهش می‌یابد و غلظت ۲۵/۰ میکرولیتر بر لیتر هوا از اسانس‌ها به ترتیب بازدارندگی تغذیه‌ای ۴۰/۷ و ۱۷/۵ درصد را ایجاد می‌کنند. با وجود این، اختلاف مشاهده شده در شاخص بازدارندگی تغذیه‌ای پژوهش‌های بیان شده و تحقیق حاضر می‌تواند ناشی از متفاوت بودن گونه اسانس اکالیپتوس مطالعه شده و اجزای شیمیایی آنها باشد. ترکیبات ۸،۱-سینئول (۵۴/۲ درصد)، پارا-سایمن (۱۲/۴ درصد)، آلفا-توجن^۱ (۱۱/۴ درصد) و کاروفیلین^۲ (۶/۷ درصد) در اسانس *E. dundasii* و ۸،۱-سینئول (۵۸/۰ درصد)، آلفا-پینن (۲۶/۲ درصد) و ترانس-پینوکارونول (۴/۱ درصد) در اسانس *E. floribundi* بیشترین مقدار را داشتند که با اجزای اصلی اسانس مورد مطالعه در تحقیق حاضر متفاوت می‌باشد. برای مثال، آلفا-توجن در اسانس تحقیق حاضر اصلاً شناسایی نشد. همچنین، تاثیر ضد تغذیه‌ای ترکیبات ترپنی آلفا-پینن، لینالول، ۸،۱-سینئول، کامفور، کارواکرول، تیمول و کاروون^۳ روی لاروهای برگخوار پنبه (*Spodoptera littoralis* Boisduval) و ماده‌های بالغ بی‌بال شته سبز هلو (*Myzus persicae* Sulzer) و شته یولاف (*Rhopalosiphum padi* L. گزارش شده است (Valcárcel et al., 2021). با توجه به اینکه ترکیبات مذکور در اسانس *E. oleosa*

کربوهیدرات‌ها و لیپیدها به عنوان ذخایر انرژی در مسیرهای فیزیولوژیکی حشرات از رشد و نمو، تولید مثل و دگرذیسی تا دیابوز و مقاومت در برابر دماهای پایین نقش حیاتی دارند (Arrese and Soulages, 2010; Senthil-Nathan, 2015; Chowanski et al., 2015). کاهش ذخایر این مواد در بدن حشرات آفت به عنوان مکانیسمی مهم در کنترل آنها می‌تواند در نظر گرفته شود. به عبارتی دیگر، کاهش ذخایر انرژی سوسک کشیش تحت تاثیر اسانس *E. oleosa* می‌تواند مقاومت آفت را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش‌های موجود کاهش دهد. نتایج تحقیق حاضر مبنی بر کاهش ذخایر پروتئین، کربوهیدرات و لیپید در حشرات کامل سوسک کشیش تحت تاثیر اسانس‌های گیاهی در راستای یافته‌های صیادا و همکاران (Sayada et al., 2021) و عباداللهی و همکاران (Ebadollahi et al., 2022a) می‌باشد. فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و پروتئاز هم در حشرات کامل سوسک کشیش تحت تاثیر اسانس *E. oleosa* کاهش پیدا کرد. کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات آفت تحت تاثیر اسانس‌های گیاهی در پژوهش‌های Magierowicz et al., 2020; Oftadeh et al., 2021). برای مثال، هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر اسانس اکالیپتوس گونه *E. globulus* Labill فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد (*Ephestia kuehniella* Zeller) را کاهش داد (Shahriari et al., 2020). یافته‌های اخیر نشان داده است که اسانس‌های گیاهی می‌توانند سنتز آنزیم‌های گوارشی حشرات را از طریق تغییر ساختاری و ایجاد سمیت روی سلول‌های پوششی معده میانی، که موجب کاهش متابولیسم و ترشحات آنزیمی آنها می‌شود، کاهش دهند (Franco et al., 2002; Oftadeh et al., 2021). غلظت ۲۲/۰۸ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس *E. oleosa* و سمیت ناشی از آن شاخص‌های تغذیه‌ای حشرات کامل سوسک کشیش شامل شاخص مصرف (CI)، نرخ نسبی مصرف غذا (RCR) و نرخ

³. Carvone

¹. α -Thujene

². Caryophyllene

اکتوبامین و گاما-آمینو بوتریک اسید (Jankowska et al., 2018) و همچنین، کاهش ذخایر انرژی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی که در تحقیق حاضر هم بر آن تاکید شد، شانس مقاومت آفات در برابر آنها بسیار کم خواهد بود. به بیانی دیگر، با وجود برانگیخته شدن مکانیزم مقاومت سوسک کشیش از طریق افزایش سنتز استرازاها، اسانس *E. oleosa* به دلیل دارا بودن الگوی عمل چندگانه، همچنان دارای خواص حشره کشی قابل توجهی روی آفت بوده و قادر به کنترل آن می‌باشد.

استفاده از اسانس‌های گیاهی برای مدیریت حشرات آفات محصولات انباری به دلیل تجزیه زیستی آسان در محیط و آثار جانبی به نسبت پایین تر از سموم ساختگی روی انسان و موجودات غیر هدف در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، سوسک کشیش به عنوان یکی از مهم‌ترین آفات دانه‌های غلات انباری در بسیاری از کشورهای جهان، در برابر تدخین اسانس مستخرج از برگ‌های اکالیپتوس گونه *E. oleosa* حساس می‌باشد. اگرچه فعالیت آنزیم‌های سم‌زدای آلفا- و بتا-استراز حشره آفت افزایش یافت، اسانس غنی از ترکیبات تریپنی *E. oleosa* آثار کشندگی و زیرکشندگی گسترده‌ای شامل کاهش محتوای ذخایر انرژی پروتئین، لیپید و گلیکوژن و فعالیت‌های آمیلولیتیک و پروتئولیتیک و بازدارندگی تغذیه‌ای قابل توجهی روی حشره آفت داشت. از این رو، امکان استفاده از اسانس *E. oleosa* در برنامه‌های مدیریت سوسک کشیش وجود دارد. با این حال، انجام پژوهش‌های تکمیلی در راستای بررسی آثار جانبی اسانس *E. oleosa* روی محصولات انباری تحت تاثیر قرار گرفته و تهیه فرمولاسیون‌های پایدار و با کارایی بالاتر در شرایط انباری پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی در راستای تأمین کمک‌های مالی برای انجام پژوهش حاضر قدردانی می‌شود.

مقدار قابل توجهی شناسایی شدند، فعالیت ضد تغذیه‌ای اسانس *E. oleosa* روی حشرات کامل سوسک کشیش احتمالاً تحت تاثیر این ترکیبات و یا برهم‌کنش ترکیبات دیگر بوده است.

استرازاها قادرند اتصالات استری در ترکیبات سمی وارد شده به بدن حشره را هیدرولیز و سمیت آنها را خنثی کنند (Hemingway and Karunaratne, 1998). مقدار بالای آنزیم‌های استراز نشان‌دهنده فعال بودن سامانه مقاومت حشره در برابر ترکیب سمی مورد استفاده می‌باشد (Ahmed and Freed, 2021). به طور کلی، حشرات مقدار آنزیم‌های سم-زدا را برای ایجاد مقاومت در برابر عوامل خارجی فعال می‌کنند که این کار به نوبه خود مستلزم صرف انرژی بسیار زیادی برای آنها خواهد بود (Abd El-Kareem et al., 2022). در تحقیق حاضر فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-استراز در حشرات کامل سوسک کشیش در برابر تدخین اسانس *E. oleosa* افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم‌های استراز آفات تحت تاثیر اسانس‌های گیاهی در برخی از پژوهش‌های اخیر گزارش شده است. برای مثال، فراهانی و همکاران (Farahani et al., 2020) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-استراز در بالغ‌های کنه تارتن دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch تحت تاثیر اسانس‌های آویشن دناپی (*Thymus daenensis* Celak)، مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica* Bung) و مرزه بختیاری (*S. bakhtiarica* Jamzad) افزایش یافت. در تحقیقی دیگر، افزایش فعالیت آنزیم‌های استراز حشرات کامل سوسک کشیش در برابر تدخین اسانس‌های مستخرج از چهار گونه آویشن شامل *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas، *T. kotschyanus* Boiss & Hohen، *T. fallax* Fisch. & C.A. Mey و *T. vulgaris* L. (Ebadollahi et al., 2022a). با توجه به الگوی عمل چندگانه اسانس‌های گیاهی روی حشرات آفت از قبیل بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های استیل کولین استراز، آدنوزین تری فسفات‌ها (ATPases) و گلوکاتایون-اس-ترانسفراز و اختلال در عملکرد گیرنده‌های

References

- Abd El-Kareem, S. M. I., El-Sabagh, M. M. M. and El-Banna, A. A. 2022. A comparative study between a commercial mixture compound and its individual active ingredients on the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) on tomatoes under semi-field conditions. **The Journal of Basic and Applied Zoology** 83: 23.
- Ahmad, F., Ridley, A., Darglish, G.J., Burrill, P.R. and Walter, G. H. 2013. Response of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* to various resources, near and far from grain storage. **Journal of Applied Entomology** 137: 773–781.
- Ahmed, R. and Freed, S. 2021. Biochemical resistance mechanisms against chlorpyrifos, imidacloprid and lambda-cyhalothrin in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). **Crop Protection** 143: 105568.
- Aref, S. P., Valizadegan, O. and Farashiani, M. E. 2015. *Eucalyptus dundasii* Maiden essential oil, chemical composition and insecticidal values against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.). **Journal of Plant Protection Research** 55: 35–41.
- Aref, S. P., Valizadegan, O. and Farashiani, M. E. 2016. The insecticidal effect of essential oil of *Eucalyptus floribundi* against two major stored product insect pests; *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants** 19: 820–831.
- Arrese, E. L. and Soulages, J. L. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology** 55: 207–225.
- Ben-Marzoug, H. N., Romdhane, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Abderraba, M., Khouja, M. L. and Bouajila, J. 2011. *Eucalyptus oleosa* essential oils: Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). **Molecules** 16: 1695-1709.
- Ben-Marzoug, N. H., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Abderraba, M. and Romdhane, M. 2010. *Eucalyptus* (*gracilis*, *oleosa*, *salubris* and *salmonophloia*) essential oils: Their chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Medicinal Food** 13: 1005-1012.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase, α and β . **Methods in Enzymology** 1: 149–158.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248–254.
- Chowanski, S., Lubawy, J., Spochacz, M., Ewelina, P., Grzegorz, S., Rosinski, G. and Slocinska, M. 2015. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, Molecular & Integrative Physiology** 183: 57–63.
- Collins, P. J., Falk, M. G., Nayak, M. K., Emery, R. N. and Holloway, J. C. 2017. Monitoring resistance to phosphine in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, in Australia: A national analysis of trends, storage types and geography in relation to resistance detections. **Journal of Stored Products Research** 70: 25–36.
- Coppen, J. W. 2002. *Eucalyptus* the Genus *Eucalyptus*. Taylor and Francis Inc.
- do Nascimento, A. F., da Camara, C. A. G. and de Moraes, M. M. 2018. Fumigant activity of *Schinus terebinthifolius* essential oil and its selected constituents against *Rhyzopertha dominica*. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín** 71: 8359–8366.
- Ebadollahi, A. and Setzer, W. N. 2020. Evaluation of the toxicity of *Satureja intermedia* C. A. Mey essential oil to storage and greenhouse insect pests and a predator ladybird. **Foods** 9: 712.
- Ebadollahi, A., Jalali Sendi, J., Maroufpoor, M. and Rahimi-Nasrabadi, M. 2017. Acaricidal potentials of the terpene-rich essential oils of two Iranian *Eucalyptus* species against *Tetranychus urticae* Koch. **Journal of Oleo Science** 66: 307–314.
- Ebadollahi, A., Naseri, B., Abedi, Z., Setzer, W. N. and Changbunjong, T. 2022a. Promising insecticidal efficiency of essential oils isolated from four cultivated *Eucalyptus* species in Iran against the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.). **Insects** 13: 517.
- Ebadollahi, A., Naseri, B., Abedi, Z. and Setzer, W. N. 2022b. Chemical profiles and insecticidal potential of essential oils isolated from four *Thymus* species against *Rhyzopertha dominica* (F.). **Plants** 11: 1567.

- Ebadollahi, A., Ziaee, M. and Palla, F. 2020. Essential oils extracted from deferent species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests. **Molecules** 25: 1556.
- Elpidina, E. N., Vinokurov, K. S., Gromenko, V. A., Rudenshaya, Y. A., Dunaevsky, Y. E. and Zhuzhikov, D. P. 2001. Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 48: 206–216.
- Farahani, S., Bandani, A. R. and Amiri, A. 2020. Toxicity and repellency effects of three essential oils on two populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Persian Journal of Acarology** 9: 67–81.
- Filomeno, C. A., Almeida Barbosa, L. C., Teixeira, R. R., Pinheiro, A. L., de Sá Farias, E., Ferreira, J. S. and Picanço, M. C. 2020. Chemical diversity of essential oils of Myrtaceae species and their insecticidal activity against *Rhyzopertha dominica*. **Crop Protection** 137: 105309.
- Franco, O. L., Rigden, D. J. and Melo, F. R. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylase: Structure, function and potential for crop production. **European Journal of Biochemistry** 269: 397–412.
- Hagstrum, D. W. and Athanassiou, C. G. 2019. Improving stored product insect pest management: From theory to practice. **Insects** 10: 332.
- Hemingway, J. and Karunaratne, S. H. P. P. 1998. Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology** 12: 1–12.
- Hernández-Carlos, B. and Gamboa-Angulo, M. 2019. Insecticidal and nematicidal contributions of Mexican flora in the search for safer biopesticides. **Molecules** 24: 897.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** 51: 45–66.
- Isman, M. B. 2020. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. **Phytochemical Review** 19: 235–241.
- Isman, M. B. and Grieneisen, M. L. 2014. Botanical insecticide research: Many publications, limited useful data. **Trends in Plant Sciences** 19: 140–145.
- Isman, M. B., Wilson, J. A. and Bradbury, R. 2008. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*.) against larvae of *Pseudaletia unipuncta*. and *Trichoplusia ni*. in relation to their chemical compositions. **Pharmaceutical Biology** 46: 82–87.
- Jaimand, K., Rezaee, M. B. and Nadery Hajee Bagher Kandy, M. 2009. Volatile oil constituents of the *Eucalyptus viridis* R. T. Baker and *Eucalyptus oleosa* F. Muell. leaves from Iran. **Journal of Medicinal Plants** 8: 105–108.
- Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J. and Stankiewicz, M. 2018. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—A Review. **Molecules** 23: 34.
- Jayakumar, M., Ramachandran, M., Krishnaveni, T. and Nattudurai, G. 2021. Toxicity and biochemical effects of essential oils of *Anethum graveolens* L. and *Melaleuca cajuputi* Powell against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). **International Journal of Tropical Insect Science** 41: 945–951.
- Khosravi, R., Jalali Sendi, J. and Ghadamyari, M. 2010. Effect of *Artemisia annua* L. on deterrence and nutritional efficiency of lesser mulberry pyralid (*Glyphodes pyloalis* Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research** 50: 423–428.
- Loddé, B., Lucas, D., Letort, J. M., Jegaden, D., Pognet, R. and Dewitte, J. D. 2015. Acute phosphine poisoning on board a bulk carrier: analysis of factors leading to a fatal case. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology** 10: 10.
- Magierowicz, K., Górska-Drabik, E. and Sempruch, C. 2020. The effect of *Tanacetum vulgare* essential oil and its main components on some ecological and physiological parameters of *Acrobasis advenella* (Zinck.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 162: 105–112.
- Moghaddam, M. and Mehdizadeh, L. 2017. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In Handbook of Food Bioengineering, 1st ed.; Grumezescu, A. M. and Holban, A. M. Eds.; Academic Press: New York, USA, pp 379–419.
- Mossa, A. T. H. 2016. Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect- pest management. **Journal of Environmental Science and Technology** 9: 354–378.

- Naseri B. and Majd-Marani S. 2022. Different cereal grains affect demographic traits and digestive enzyme activity of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). **Journal of Stored Products Research** 95: 101898.
- Obretenchev, D., Zidan, F. and Atanasova, D. 2020. Food specialization of the lesser grain borer, *Rhyzopertha Dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). **Canadian Journal of Agriculture and Crops** 5: 52–58.
- Oftadeh, M., Sendi, J. J., Ebadollahi, A., Setzer, W. N. and Krutmuang, P. 2021. Mulberry protection through flowering-stage essential oil of *Artemisia annua* against the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker. **Foods** 10: 210.
- Park, M. G., Choi, J., Hong, Y. S., Park, C. G., Kim, B. G., Lee, S. Y., Lim, H. J., Mo H. H., Lim, E. and Cha, W. 2020. Negative effect of methyl bromide fumigation work on the central nervous system. **PLoS ONE** 15: e0236694.
- Pavela, R. and Benelli, G. 2016. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. **Trends in Plant Sciences** 21: 1000–1007.
- Pichersky, E. and Gershenzon, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology** 5: 237–243.
- Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S. M., Nazarian, S., Ahmadi, F. and Batooli, H. 2013. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activities of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus oleosa* leaves. **International Journal of Food Properties** 16: 1080-1090.
- Rozman, V., Kalinovic, I. and Korunic, Z. 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. **Journal of Stored Product Research** 43: 349–355.
- Sakka, M. K., Riga, M., Ioannidis, P., Baliota, G. V., Tselika, M., Jagadeesan, R., Nayak, M. K., Vontas, J. and Athanassiou, C. G. 2021. Transcriptomic analysis of s-methoprene resistance in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, and evaluation of piperonyl butoxide as a resistance breaker. **BMC Genomics** 22: 65.
- Sayada, N., Tine, S. and Soltani, N. 2021. Toxicity and physiological effects of essential oil from *Lavandula angustifolia* (M.) against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) adults. **Journal of Entomological Research** 45: 929–936.
- Scheff, D. S., Campbell, J. F. and Arthur, F. H. 2021. Seasonal, landscape, and attractant effects on lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.), captures in Northeast Kansas. **Agronomy** 12: 99.
- Senthil-Nathan, S. 2013. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. **Frontiers in Physiology** 4: 359.
- Shahriari, M., Zibaee, A., Shamakhi, L., Sahebzadeh, N., Naseri, D. and Hoda, H. 2020. Bio-efficacy and physiological effects of *Eucalyptus globulus* and *Allium sativum* essential oils against *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Toxin Reviews** 39: 422–433.
- Tine, S., Sayada, N., Tine-Djebbar, F. and Soltani, N. 2021. Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions. Springer: Cham.
- Valcárcel, F., Olmeda, A. S., González, M. G., Andrés, M. F., Navarro-Rocha, J. and González-Coloma, A. 2021. Acaricidal and insect antifeedant effects of essential oils from selected aromatic plants and their main components. **Frontiers in Agronomy** 3: 662802.
- van Asperen, K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. **Journal of Insect Physiology** 8: 401–416.
- van Handel, E. 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association** 1: 302–304.
- Waldbauer, G. P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. **Advances in Insect Physiology** 5: 229–288.
- Yazdani, E., Jalali Sendi, J. and Hajizadeh, J. 2014. Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research** 54: 53–61.
- Yuval, B., Kaspi, R., Shloush, S. and Warburg, M. S. 1998. Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. **Ecological Entomology** 23: 211–215.



Research paper

Chemical composition, fumigant toxicity and biochemical and anti-nutritional effects of the essential oil of *Eucalyptus oleosa* Muell. against the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.)

A. Ebadollahi*

Department of Plant Sciences, Moghan College of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: June 26, 2022- Accepted: August 24, 2022)

Abstract

The lesser grain borer, *R. dominica*, causes extensive quantitative and qualitative losses on stored cereal grains. The use of synthetic chemicals in the management of such insect pests resulted in several side effects such as environmental contamination, potential impacts on human health and development of pest resistance. Promising insecticidal potential of the essential oils isolated from several species of *Eucalyptus* genus against insect pests was shown in recent study. In this study, the lethal and sublethal effects of *E. oleosa* essential oil were investigated against the adults of *R. dominica*. Chemical analysis of the essential oil indicated that terpenes, including 1,8-cineole, α -pinene, *trans*-pinocarveol, (*s*)- α -terpineol, and β -eudesmol, had high amount. The adult insects were susceptible to the fumigation of essential oil so that LC_{50} (Lethal Concentration to kill 50% of insects) values were estimated as 42.923, 35.828, and 34.044 μ l/l air after 24, 48 and 72 h, respectively. Despite increases in α - and β -esterase enzymes, total protein, glycogen, and lipid contents and digestive amylolytic and proteolytic activities of the adults treated with LC_{30} (Lethal Concentration to kill 30% of insects) of essential oil were significantly decreased in comparison with the control. The consumption index (CI), relative consumption rate (RCR), and relative growth rate (RGR) were also significantly decreased in treated adults. A 59.40% feeding deterrence index (FDI) was evaluated for insects treated with LC_{30} of the essential oil. According to observed lethal and sublethal effects, the essential oil of *E. oleosa* can be considered in further investigations in the management of *R. dominica*.

Key words: Insecticidal properties, lethal effects, Plant essential oil, sublethal effects, terpenic compounds

*Corresponding author: ebadollahi@uma.ac.ir