The University of Tehran Press

Biological Control of Pests and Plant Diseases

Online ISNN: 2322-2883

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

Effect of formulated essential oil of Ajwain, *Trachyspermum ammi* (L.) on some biological and physiological parameters of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*

Davoud Mohammadi[1]✉, Fateme Rashki Hervan[2], Reza Farshbaf Pourabad[3]

1. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University-Tabriz-Iran. E-mail: mohamadi@azaruniv.ac.ir
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: fatemehrashki.1991@gmail.com
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ege University, 35100 Izmir, Türkiye. E-mail: reza.farshbaf.pourabad@ege.edu.tr

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 10 January 2024

Revised: 20 February 2024

Accepted: 26 February 2024

Published online: 22 December 2022

Keywords:

enzyme inhibitor,

essential oil,

mortality,

thymol.

ABSTRACT

Unrestricted use of chemical insecticides, especially at high concentrations, has reduced their efficacy. Plant-based pesticides, due to their relatively high safety levels to humans and environment as well as effective control on insects, have become a suitable alternative to conventional pesticides. The aim of this study was to investigate the biological and physiological effects of the formulated essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) on the larvae of *Helicoverpa armigera* Hüb. The obtained essential oil was formulated into an emulsion using Tween 20 as emulsifier. Chemical analysis of the extracted essential oil indicated that Terpinen (14.4%), Cymene (18.5%), and Thymol (61.6%) were the major compounds. The essential oil of *T. ammi* have a significant repellency rate on third and sixth instar larvae of cotton bollworm at different observed time intervals, with an average repellency rate of 61-76%. Regarding fumigant toxicity, the highest concentration of the essential oil (500 µL/L) resulted in 100% larval mortality. The LC_{50} value for fumigant toxicity measured as 82.73 µL/L. The duration of larval development significantly increased in treatments compared to control. In EO concentrations of 2.5-1.25 percent an increase was observed respectively in the duration of the larval stage by 9 and 7 days. The pupae and adult's emergence affected in dose dependent manner. At concentration of 50 µl/l, 89% inhibition of protease enzyme recorded. With regards to the biological and physiological effects observed in the formulated *T. ammi* essential oil, with complimentary researches, it could be used in integrated management programs of cotton bollworm.

Cite this article: Mohammadi, D., Rashki Hervan, F., & Farshbaf Pourabad, R. (2022). Effect of formulated essential oil of Ajwain, *Trachyspermum ammi* (L.) on some biological and physiological parameters of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 11 (2), 115-134. DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.370937.328

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.370937.328

Extended Abstract

Introduction

The use of chemical pesticides as the most common method of pest control with less selective properties, has resulted in problems such as residual, development of resistance in pests, negative effects on natural enemies, and consequently pest outbreaks. These problems have led to develop alternative control methods with fewer adverse effects in recent years. Plant extracts and essential oils with acceptable insecticidal, antifeedant, repellent, attractant, lower cost and less environmental pollution properties can be used in pest management programs.

Cotton bollworm is one of the most important pests of agricultural crops, vegetables and even ornamentals. It is a polyphagous insect and the use of various pesticides in high concentrations has led to develop resistance to a wide range of chemical pesticides from different groups. Alternative methods for controlling this pest

include agricultural methods, biological control, the use of resistant plants, the use of plant metabolites, and integrated pest management recommended by researchers in the field of plant conservation.

Trachyspermum ammi is an annual plant belonging to the apiaceae family which has a high percentage of essential oil in its seeds. Numerous studies have been conducted on the biological effects of this plant essential oil on insects, including the fumigant effect, repellency, digestive system disruption, physiology and other sublethal effects on biology of insects. In recent years, with the expansion of attention to biological pesticides, the insecticidal effects of this plant have also been well studied, including its fumigant, lethal effects, antifeedant, larvicidal, and repellent effects against various pests.

The present study aimed to investigate the various biological, behavioral, and physiological effects of *T. ammi* essential oil emulsion on cotton bollworm.

Material and Methods

Insects reared in controlled condition on artificial diet. The essential oil of *T. ammi* seeds was prepared by water distillation using Clevenger apparatus. To prepare the emulsion of EO, Tween 20 used as emulsifier.

Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was used to identify the essential oil chemical composition.

Biological effects including ovicidal, repellent activity, fumigant toxicity and sublethal effects including larval life span, adults and pupa emergence, mortality during generation recorded. Inhibitory activity of essential oils in different concentrations on alpha-amylase, protease and acetylcholine esterase, carried out using standard protocols.

The data was analyzed using SPSS v: 26 software. In case of observing mortality in control treatments, the Abbot formula was used to correct the data. SPSS software and F-test were used for data analysis and mean comparisons.

Results and discussion

The main identified compounds of the *T. ammi* essential oil extract, using gas chromatography, include thymol, cymene, and terpinene, with percentages of 61.6%, 18.5%, and 14.4%, respectively.

The ovicidal assays indicate that, with increasing the concentration of the EO hatching rate decreased. the concentration of 2.5 percent showed up to 80% ovicidal toxicity. The LC_{50} value obtained was 0.632 percent. The slope of the concentration-mortality line was calculated to be 1.36.

The highest concentration of the oil, 500 microliters per liter, caused 100% mortality of larvae, and after that, with a concentration of 250 µl/l air, 81.66% mortality recorded. The LC_{50} and LC_{70} values were calculated as 82.73 and 151.14 µl/l air, respectively. The slope of the concentration-mortality line was also calculated as 2.002.

About repellent activity of *T. ammi* essential oil, a repellency rate of 61 to 76 percent was observed for 3rd and 64 to 76 percent for 6th larvae instars at different time intervals of 6 to 16 hours.

with increasing the concentrations, the length of larval developmental period increased, and a direct relationship between the concentration of the essential oil and the length of the larvae developmental duration was recorded. At concentrations of 2.5 and 1.25 percent of *T. ammi* essential oil, the length of the larvae developmental period increased to 9 and 7 days, respectively, in comparing with the control.

About sublethal effects, the highest concentration of essential oil (5%) completely prevented the pupation and adult's emergence. Even at the lowest concentration of *T. ammi* essential oils (0.039%), only 28% pupation and adult emergence appeared, indicating the significant effect of the essential oil on the population of cotton bollworm. Also some deformities were also observed in the emerged pupas.

The essential oil of *T. ammi* caused significant inhibition of alpha-amylase, protease and acetylcholinesterase enzymes activity in 6th instar larvae of cotton bollworm.

Conclusion

According to the results of current research, the formulated essential oil of *T. ammi* has good potential to manage cotton bollworm. The observed biological and physiological effects indicate the significant impact of this essential oil in reducing the population of cotton bollworm.

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، دوره ۱۱، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۸۰۹۰

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

تاثیر اسانس فرموله شده بذر زنیان (*Trachyspermum ammi* (L.) بر برخی ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژیک کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hüb.

داود محمدی[۱] ✉ | فاطمه رشکی هروان[۲] | رضا فرشباف پورآباد[۳]

۱. نویسنده مسئول، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: mohamadi@azaruniv.ac.ir

۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه:fatemehrashki.1991@gmail.com

۳. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اگه، ازمیر، ترکیه. رایانامه: reza.farshbaf.pourabad@ege.edu.tr

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱

کلیدواژه‌ها:

اسانس، تیمول، مرگ و میر، مهارکننده آنزیم.

چکیده

استفاده بی‌رویه از آفت‌کش‌های شیمیایی کارایی آن‌ها را به‌عنوان روش کنترل موثر کاهش داده است. آفت‌کش‌های با منشا گیاهی با توجه به امنیت نسبی بالا نسبت به پستانداران، جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند. هدف کلی این پژوهش بررسی اثرات زیستی و فیزیولوژیکی اسانس فرموله شده گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* (L.) بر لاروهای کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hüb بود. اسانس زنیان با استفاده از توئین ۲۰ به‌صورت امولسیون فرموله شد. آنالیز شیمیایی اسانس زنیان مشخص کرد که سه ترکیب ترپینن (۱۴/۴٪)، سیمن (۱۸/۵٪) و تیمول (۶۱٪) به‌عنوان ترکیبات عمده بود. نتایج دورکنندگی نشان داد به‌طور متوسط در زمان‌های مختلف ۶۱ الی ۷۶ درصد دورکنندگی وجود دارد. در خصوص اثرات تدخینی، غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر بر لیتر به هترتیب موجب مرگ ۱۰۰ و ۸۱/۶۶ درصد لاروها شد. مقدار LC_{50} اثر تدخینی، ۸۲/۷۳ میکرولیتر بر لیتر هوا بدست آمد. طول دوره رشدی لاروی در تیمارها به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت (۹ و ۷ روز در غلظت‌های ۲۵ و ۱۲/۵در هزار). درصد تبدیل شدن به شفیره، ظهور حشرات کامل بخصوص در غلظت‌های بالا به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد. در غلظت ۵۰ درهزار هیچ شفیره و حشره کاملی ظاهر نشد. آنزیم استیل‌کولین‌استراز کرم غوزه پنبه کمتر از ۲۰ درصد در غلظت ۵۰ در هزار مهار شد. در غلظت ۵۰ درهزار ۳۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز و ۸۹ درصد فعالیت پروتئاز مهار شد. با توجه به اثرات زیستی و فیزیولوژیکی اسانس زنیان، می‌توان با مطالعات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای، از آن در مدیریت تلفیقی کرم غوزه پنبه استفاده کرد.

استناد: محمدی، داود؛ رشکی هروان، فاطمه؛ و فرشباف پورآباد، رضا (۱۴۰۱). تاثیر اسانس فرموله شده بذر زنیان (*Trachyspermum ammi* (L.) بر برخی ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژیک کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hüb. *نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی* ، ۱۱ (۲)، ۱۳۴-۱۱۵. DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.370937.328

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.370937.328

مقدمه

استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی به‌عنوان معمول‌ترین روش کنترل آفات، با خاصیت انتخابی کمتر مشکلاتی از قبیل باقیمانده سموم، ایجاد مقاومت در آفات، تاثیر منفی بر دشمنان طبیعی و در نتیجه طغیان آفات شده است (Aggarwal *et al*., 2006; Kumar and Kumar, 2019). این مشکلات سبب تلاش پژوهشگران جهت یافتن سایر روش‌های کنترلی با اثرات سوء کم‌تر شده است. عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان با داشتن خواص حشره‌کشی، ضد تغذیه‌ای، دورکنندگی، جلب‌کنندگی، هزینه کم‌تر تولید و ماندگاری و آلودگی کم‌تر در محیط‌زیست، می‌توانند در برنامه‌های مدیریت آفات مورد استفاده قرار گیرند (Regnault-Roger 1997; Koul *et al.*, 2008; Said-Al Ahl *et al*., 2017). گیاهان از زمان‌های دور به‌عنوان یکی از منابع موثر حشره‌کش‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Isman, 2006, Koul *et al*., 2008). اثرات عصاره‌ها با متابولیسم، فعالیت‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و رفتاری حشرات در ارتباط می‌باشد (Abd El-Aziz, 2011). بسته به گونه گیاه، عصاره‌ها و اسانس‌های آن‌ها اثرات مختلف زیستی و فیزیولوژیکی مانند کشندگی، تخم‌کشی، تدخینی، تنظیم‌کنندگی رشد، ضدتغذیه‌ای، رفتاری، مهارکنندگی سیستم‌های آنزیمی مختلف مانند آنزیم‌های گوارشی، تنفسی و سیستم عصبی حشرات مختلف را دارند (Regnault-Roger 1997; Koul *et al*. 2008). هر اسانس گیاهی ممکن است چند نوع اثر بر روی حشرات آفت داشته باشند و حتی تشخیص مکانیسم عمل دقیق آن‌ها مستلزم مطالعات بیوشیمیایی مختلف است (Koul *et al*. 2008; Tripathi *et al*. 2009) با توجه به تلفیق‌پذیری با سایر روش‌های کنترل و مخاطرات زیست‌محیطی و اثرات سوء آفت‌کش‌های مصنوعی متداول، استفاده از ترکیبات گیاهی در بحث مدیریت آفات مختلف حائز اهمیت است (Isman 2000; Said-Al Ahl *et al*. 2017). اثرات مختلف فیزیولوژیکی که ترکیبات گیاهی بر حشرات دارند از جنبه‌های مختلف قابل بررسی است تا بتوان به نحوه اثر احتمالی این ترکیبات پی‌برد (Saad *et al*., 2013; Yang *et al*., 2020). اغلب ترکیبات گیاهی بر رفتار حشرات تاثیر داشته و اثرات دورکنندگی خوبی نشان داده‌اند که این موضوع توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (Nerio *et al*., 2010; Conti *et al*., 2010). علاوه بر تاثیر بر رفتار، تغذیه از این ترکیبات و ورود آن‌ها در سامانه گوارشی حشرات نیز اثرات ضدتغذیه‌ای و مهارکنندگی علیه سامانه‌های آنزیمی گوارشی حشرات مختلف داشته است و اثرات ضدتغذیه‌ای از نظر اکولوژیکی و فیزیولوژیکی موجب تضعیف و حتی کاهش شدید زاد و ولد و مرگ و میر بالا طی زمان می‌شود که اهمیت بالای در بحث مدیریت جمعیت آفات دارد (Saroukolai *et al*., 2014; Jeyasankar *et al*., 2016). سامانه‌های آنزیمی مختلفی مانند آلفا–آمیلاز و پروتئاز در کرم غوزه پنبه به‌عنوان مهم‌ترین و موثرترین عامل نشو و نما توسط ترکیبات گیاهی مختلف مهارشده و فیزیولوژی گوارش آن‌ها می‌تواند تحت تاثیر قرار گرفته و کارایی هضم و جذب مواد غذایی کاهش یابد (Yazdani *et al*., 2014; El-Sabrout *et al*., 2018). اسانس‌های گیاهی از ترکیبات پیچیده‌ای تشکیل شده‌اند، پژوهش-های متعددی تاثیر مستقیم برخی از این ترکیبات را بر سامانه عصبی حشرات به اثبات رسانده و گزارش‌های متعددی از سازوکار مهارکنندگی آنزیم استیل‌کولین‌استراز و یا مهار گیرنده استیل‌کولین در فضای پس‌سیناپسی سلول‌های عصبی وجود دارد (Yeom *et al*., 2012; Saad *et al*., 2013).

کرم غوزه پنبه از مهم‌ترین آفات گیاهان زراعی، صیفی‌جات و حتی گل‌های زینتی است. حشره‌ای پلی‌فاژ بوده و استفاده از انواع آفت‌کش‌ها در دوزهای بالا، موجب بروز مقاومت به طیف وسیعی از آفت‌کش‌های شیمیایی از گروه‌های مختلف شده است (Martin *et al*., 2000; Torres-Vila *et al*., 2002; Aggarwal *et al*., 2006; Upendhar *et al*., 2017). روش‌های جایگزین برای کنترل این آفات شامل روش‌های زراعی، کنترل بیولوژیک، استفاده از گیاهان مقاوم، استفاده از متابولیت‌های گیاهی و مدیریت تلفیقی مورد توصیه پژوهشگران بوده است (Fite *et al*., 2018). در این بین عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با توجه به پتانسیل بالای کنترلی، اثرات سوء کم‌تر، زیست تخریب‌پذیر بودن و سازگاری با محیط زیست به‌عنوان یک بازوی قدرتمند در مدیریت این آفت می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (Regnault-Roger 1997; Tripathi 2009; Regnault-Roger *et al*.,2012).

گیاه زنیان *Trachyspermum ammi*، یک‌ساله متعلق به تیره چتریان، درصد بالایی اسانس در بذرهای خود دارد که مطالعات متعددی در خصوص اثرات زیستی آن‌ها صورت گرفته است. اثرات تدخینی، دورکنندگی، تاثیر بر سیستم گوارشی، تاثیر بر فیزیولوژی و زیست‌شناسی حشرات مختلف در مطالعات متعددی گزارش شده است (Vitali *et al*., 2016; Soni *et al*., 2016; Torabi pour 2017; Chaubey 2018). در سال‌های اخیر با گسترش توجه به آفت‌کش‌های زیستی اثرات حشره‌کشی این گیاه نیز مورد توجه بوده و اثرات تدخینی، کشندگی، گوارشی، لاروکشی و دورکنندگی آن علیه آفات مختلف بررسی شده است (Vitali *et al*., 2016; Chaubey 2018). عمده ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس این گیاه شامل تیمول، ترپینن و ترکیبات فنلی است که اثرات زیستی و رفتاری مختلف آنها در حشرات مختلف بررسی شده است (Moein *et al*., 2015). اسانس زنیان، *T. ammi* از نظر فعالیت‌های دفع‌کنندگی، حشره‌کشی و مهار تخم‌گذاری در شپشک ذرت، *Sitophilus zeamais* ارزیابی شد و اثرات تدخینی و کشندگی علیه حشرات‌کامل و اثرات ضدتخم‌ریزی مشاهده شد (Chaubey, 2018). در بررسی دیگری اثرات اسانس این گیاه علیه لارو سن چهارم پروانه مینوز گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta*، بررسی شد و اثرات کشندگی خوبی از اسانس این گیاه ثبت شد (Piri *et al*., 2020). همچنین حشره‌کشی اسانس زنیان علیه آفات مهم اقتصادی مانند شپشه برنج *Sitophilus oryzae* (L.)، سوسک چینی حبوبات *C. vhinensis* بید کلم *Plutella xylostella (L.)*، شپشه آرد *Tribolium castaneum*، بید مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehiella* و پشه آنوفل گزارش شده است (Khajeh *et al*., 2004; Mohagheghzadeh *et al*., 2007; Pandey *et al*., 2009; Habashi *et al*., 2011; Kim *et al*., 2012).

پژوهش حاضر در راستای بررسی تاثیر اثرات مختلف زیستی، رفتاری و فیزیولوژیک اسانس زنیان بر کرم غوزه پنبه انجام شد.

مواد و روش‌ها

مشخصات محل پرورش و نحوه پرورش کرم غوزه پنبه

کلنی حشرات در واحد انسکتاریوم گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهیدمدنی آذربایجان (تبریز) تشکیل و با استفاده از غذای مصنوعی بر پایه لوبیا چشم بلبلی (Shorey & Hale, 1965) پرورش یافت. دمای محل پرورش۲±۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت‌نسبی ٪۱۰±۶۰ درنظرگرفته شد که به‌صورت خودکار تنظیم می‌شد. دوره نوری روز بلند ۸ :۱۶ (تاریکی : روشنایی) ساعت برای پرورش درنظرگرفته‌شد. لاروهای سنین چهارم به بعد جهت جلوگیری از هم‌خواری به‌صورت انفرادی پرورش یافتند.

تهیه اسانس زنیان

اسانس با استفاده از کلونجر و تقطیر با آب مقطر تهیه شد. بذر زنیان نیم‌کوب شده و به مقدار۵۰ گرم داخل بالن‌های یک لیتری ریخته و آب مقطر تا جایی که روی بذور قرار بگیرد اضافه شد. بالن‌ها سوار شوف‌بالن‌ها شده و به دستگاه کلونجر وصل شد. در ابتدا دمای شوف‌بالن را به ۱۰۰ درجه سلسیوس رسانده بعد از به جوش آمدن و گرم شدن لوله‌های اتصالی دمای شوف‌بالن را به ۲۰ درجه سلسیوس رسانده و به‌مدت ۴ساعت اسانس مورد نظر استخراج شد. جهت حذف آب از سولفات سدیم استفاده شد. اسانس تهیه شده سپس به ظروف شیشه‌ای تیره منتقل و در شرایط فریزر تا زمان استفاده نگهداری شد (Kedia *et al*., 2015).

جداسازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی با استفاده از دستگاه گازکروماتوگراف

برای شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه کروماتوگرافی‌گازی متصل‌شده به طیف سنجی جرمی (GC-MS مدل Agilent 5977A) ساخت کشور آمریکا، با ستون HP-5 MS (۵ درصد فنیل متیل پلی‌سیلوکسان به‌طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ماده جاذب ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. در برنامه‌ریزی دمایی آون، ابتدا دما در عرض ۵ دقیقه به ۶۰ درجه سلسیوس رسید. بعد از آن به‌مدت ۲۰ دقیقه در این دما نگه‌داری شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سلسیوس بود. محفظه تزریق در حالت تقسیم (نسبت تقسیم ۱:۳۰) تنظیم شده بود و محدوده جذب جرمی از ۴۰ تا ۴۰۰m/z بود. به‌منظور محاسبه شاخص بازداری پیک‌ها، مخلوطی از هیدروکربن آلیفاتیک (C8-C40) تحت شرایط تحلیلی بالا به‌داخل سیستم GC تزریق شد. نرم افزار مورد استفاده Chemstation بود. محاسبه و شناسایی ترکیبات اسانس به کمک شاخص‌های بازداری خطی آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتاب مرجع (Adams, 2007) و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت (Adams and Sparkman, 2007).

تهیه امولسیون اسانس زنیان و غلظت‌های لازم برای زیست‌سنجی

برای تهیه امولسیون ۵۰۰ میکرولیتر توین−۲۰ به‌همراه ۵۰۰ میکرولیتر اسانس به‌مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر مخلوط شده بعد از ۳۰ دقیقه قطره قطره آب مقطر اضافه شده و به حجم ۴۰۰۰ میکرولیتر رسید. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از هموژنایزر Ultra-Turrax® T18 با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، هموژنیزه شده و در ظروف شیشه‌ای تیره نگهداری شد (Fernández-Peña *et al.*, 2019). برای تهیه غلظت‌های مختلف اسانس زنیان از آب مقطر استفاده شد. غلظت‌ها به‌صورت فاصله لگاریتمی بین ۱۰۰ تا ۰/۳۹ درهزار بر اساس ماده موثر تهیه شد و در بررسی‌های مختلف بسته به محدوده تاثیر مورد استفاده قرار گرفت.

اثرات تخم‌کشی

دسته تخم‌های ۱۵−۱۰ تایی کرم غوزه پنبه روی کاغذ معمولی به‌مدت ۱۰ ثانیه در هر غلظت فرو برده شده و پس از حذف محلول اضافی در داخل پتری‌های پلاستیکی دارای تهویه مناسب قرار گرفت. هر روز چند بار لاروهای تفریخ‌شده از ظروف حذف و یادداشت شد. تا ۴ روز شمارش ادامه یافت. درصد تخم‌کشی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Malarvannan *et al.*, 2009):

$$\%\text{Ovicide} = \left(\frac{H.eggs\ in\ Control - H.eggs\ in\ Treatment}{H.eggs\ in\ Control}\right) \times 100 \qquad \text{رابطه ۱)}$$

H: تعداد تخم‌های تفریخ‌شده

اثرات دورکنندگی

اثرات دورکنندگی اسانس فرموله شده زنیان بر لاروهای سن ۳ و ۶ کرم غوزه پنبه، با روش تست انتخاب مطالعه شد (Maia and Moore 2011). برای این منظور از یک بویایی‌سنج دست‌ساز که یک ظرف پلاستیکی مستطیلی شکل به ابعاد ۳۰×۱۰×۲ سانتی‌متر بود استفاده شد. در دو طرف درب ظروف، سوراخی به قطر ۴ سانتی‌متر جهت تهویه تعبیه شده و با توری مناسب پوشانده شد. در دو طرف ظرف غذای تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس و شاهد (تیمار شده با آب مقطر) قرارگرفت.

تعداد ۱۰ لارو سن ۳ و۶ هم‌سن کرم غوزه پنبه در وسط ظرف رهاسازی شد و مدت زمان حضور لاروها در دو نیمه ظرف در زمان‌های مختلف ثبت و درصد دورکنندگی با رابطه ۲ محاسبه شد (Kuri-Morales *et al*., 2017).

$$\%R = (\frac{nC-nT}{nC}) \times 100$$ رابطه ۲)

R: درصد دورکنندگی، nC, nT : تعداد حشرات ثبت شده در تیمار و شاهد

بررسی اثرات تدخینی اسانس زنیان

از ظروف شیشه‌ای دربدار به حجم ۲۰ میلی‌لیتر به‌منظور بررسی اثرات تدخینی استفاده شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر غلظت بر روی۱۰ ورقه کاغذ صافی به‌قطر ۷ میلی‌متر منتقل شده و در درب ظروف قرار گرفته و با توری پوشانده شد. در تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. تعداد ۱۰ لارو سن اول کرم غوزه پنبه به ظروف منتقل و مرگ و میر به مدت ۳ روز ثبت شد (Nenaah, 2014).

بررسی اثرات زیرکشندگی اسانس زنیان

برای بررسی اثرات زیرکشندگی اسانس فرموله شده زنیان، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر غلظت (در محدوده ۰/۳۸ الی ۱۰۰ در هزار بر اساس ماده موثر) با ۵۰۰ میلی‌گرم غذای مصنوعی مخلوط و در ظروف پتری دربدار ۶ سانتی‌متری قرارگرفت. روی درب ظروف به‌منظور تهویه سوراخی به قطر ۱/۵ سانتی‌متر تعبیه و با تور مناسب پوشانده شد. تعداد ۱۰ عدد لارو سن اول کرم غوزه پنبه روی غذاهای تیمار شده منتقل شد. مرگ و میر لاروها تا چهار روز ثبت گردید. برای جلوگیری از هم‌خواری، از روز پنجم به بعد لاروها به‌صورت انفرادی به ظروف پلاستیکی دربدار با تهویه مناسب منتقل شدند. در این بررسی طول دوره لاروی، مرگ و میر در طی زمان، درصد تبدیل شدن به شفیره، بدشکلی شفیره و حشرات کامل و درصد ظهور حشرات کامل ثبت شد. آزمایشات در ۵ تکرار انجام گرفت (Mojarab-Mahboubkar *et al*., 2015).

اثرات مهارکنندگی آنزیمی اسانس زنیان

برای بررسی اثرات مهارکنندگی، از چهار غلظت ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ درهزار (ماده موثر) اسانس زنیان استفاده شد. تعداد ۵ عدد لارو سن سوم کرم غوزه پنبه پس از بی‌حس شدن در یک میلی‌لیتر بافر فسفات (pH 7) با استفاده از هاون چینی له شده سپس با استفاده از هموژنایزر با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه به‌مدت یک دقیقه هموژن شد. در ادامه به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول روشناور به‌عنوان منبع آنزیم‌های گوارشی در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جمع شده و در مطالعات آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Mojarab-Mahboubkar *et al*., 2015).

آلفا-آمیلاز: سنجش فعالیت آلفاآمیلاز توسط دی‌نیتروسالسیلیک‌اسید انجام‌گرفت. نشاسته یک‌درصد به‌عنوان زیرنهشت مورد استفاده قرارگرفت. ده میکرولیتر از هر نمونه آنزیم به همراه ۲۰ میکرولیتر محلول نشاسته در داخل لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌سلسیوس داخل بن‌ماری با ۴۱۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH 7) انکوبه شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر دی نیتروسالسیلیک‌اسید متوقف شده و لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه داخل آب جوش حرارت داده شده و بلافاصله به مدت پنج دقیقه داخل آب یخ قرار داده شد. سپس به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، جذب محلول رونشین در طول موج 540 nm ثبت شد (Bernfeld *et al*., 1955) برای سنجش مهارکنندگی غلظت‌های مورد نظر اسانس، با آنزیم حشره به مدت ۱۰ دقیقه پیش‌انکوبه شده و بقیه مراحل مثل روش اشاره شده انجام گرفت. درصد مهارکنندگی از فرمول زیر محاسبه خواهد شد:

$$\%I = (\frac{Ab.C-Ab.T}{Ab.C}) \times 100$$ رابطه ۳) جذب در شاهد و تیمار:T و Ab.C ،درصد مهارکنندگی:I

پروتئاز: از آزوکازئین (Azocasein)، به‌عنوان زیرنهشت برای اندازه‌گیری فعالیت تام پروتئاز استفاده شد. در یک لوله‌ی آزمایش مقدار 100µl از محلول آنزیمی حشره، همراه 200µl بافر گلایسین (glycine-NaOH 0.2 M, pH 10, 5mM $CaCl_2$)، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شده، سپس مقدار 200 µl آزوکازئین ۱٪ اضافه شده به مدت ۶۰ دقیقه دیگر در شرایط مذکور نگه‌داری شد تا واکنش صورت پذیرد. با اضافه کردن 300 µl محلول ۱۰٪ Trichloroacetic acid (TCA) واکنش متوقف شده لوله‌های آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه به ظرف حاوی آب یخ منتقل، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با rpm10000 سانتریفیوژ شده سپس به محلول سطحی حجم مساوی، NaOH 1M اضافه شده و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محلول شاهد با اضافه کردن حجم مساوی بافر به‌جای زیرنهشت تهیه شد. برای بررسی اثرات مهارکنندگی عصاره‌ها بر فعالیت آنزیم پروتئاز تام، ۱۰ دقیقه پیش از اضافه کردن زیرنهشت نمونه آنزیمی با غلظت مورد نظر اسانس پیش‌انکوبه شده و بقیه مراحل مثل بالا انجام شد (Heydarzade *et al*., 2019).

استیل‌کولین‌استراز: برای سنجش فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز از کیت تشخیصی این آنزیم، ساخت شرکت بیورکس فارس استفاده شد. این کیت حاوی دو معرف R1 و R2 می‌باشد که معرف اول حاوی Pyrophosphate Buffer pH7.6, 75 mM/l و Potassium hexacyanoferrate, 2.0 mM/l است. معرف دوم نیز حاوی s-Butyrylthiocholine iodide, 15 mM/l می‌باشد که زیرنهشت واکنش بوده و در نسبت ۵ به ۱ (R1 به R2) در واکنش استفاده می‌شوند. واکنش در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای بررسی فعالیت آنزیمی، ۹۶۰ میکرولیتر بافر و ۶۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی لاروهای کرم غوزه پنبه در داخل لوله آزمایش ریخته و در داخل بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس میزان جذب نمونه در ۴۰۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر زیرنهشت (R2) به محلول اضافه شد و میزان جذب یادداشت شده و تفاضل اعداد به‌دست آمده میزان فعالیت آنزیم استیل‌کولین نمونه‌ها را نشان می‌دهد. برای بررسی اثر مهارکنندگی اسانس، غلظت‌های مورد نظر به نسبت مساوی با آنزیم قبل از شروع واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه پیش‌انکوبه شده و فعالیت آنزیم طبق پروتوکل ارائه شده سنجیده شد(Phrompittayarat *et al*., 2013). با مقایسه فعالیت آنزیم در شاهد و تیمارهای حاوی اسانس درصد مهارکنندگی محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه پروبیت داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. در صورت مشاهده مرگ و میر در تیمارهای شاهد از فرمول آبوت برای تصحیح داده‌ها استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها و مقایسات میانگین از نرم افزار SPSS و آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج

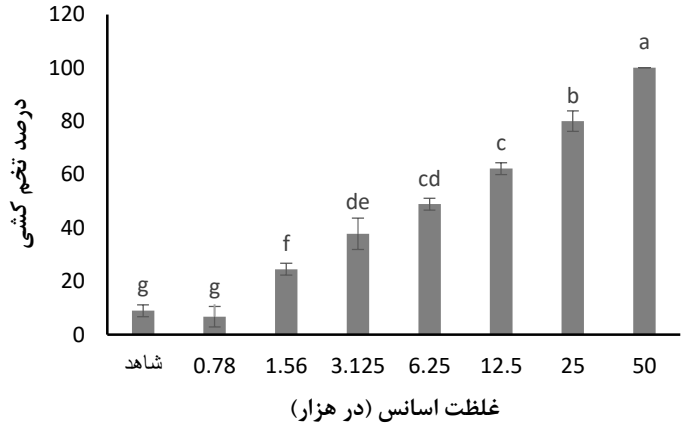
عمده ترکیبات شناسایی‌شده اسانس زنیان، با استفاده از کروماتوگرافی‌گازی شامل، تیمول، سیمن و ترپینن به‌ترتیب با نسبت ۶۱/۶، ۱۸/۵ و ۱۴/۴ درصد از کل ترکیبات بود (جدول ۱). بتا-پینن نیز با ۰/۷درصد در درجه چهارم اهمیت قرار دارد.

جدول ۱. ترکیبات شناسایی شده از گیاه زنیان با استفاده از GC-MS

ترکیبات	RI[a]	درصد
α-thujene	۹۲۱	۰/۴
α-pinene	۹۲۶	۰/۲
Sabinene	۹۶۵	۰/۱
β-pinene	۹۶۸	۰/۷
Myrcene	۹۸۹	۰/۴
δ-3-carene	۱۰۰۸	۰/۳
α-terpinene	۱۰۱۴	۰/۳
p-cymene	۱۰۲۲	۱۸/۵
β-phellandrene	۱۰۲۵	۰/۵
γ-terpinene	۱۰۵۷	۱۴/۴
Terpinolene	۱۰۸۵	۰/۱
Linalool	۱۱۰۲	۰/۲
terpinen-4-ol	۱۱۷۳	۰/۲
α-terpineol	۱۱۸۹	۰/۱
Thymol	۱۲۹۵	۶۱/۶
Carvacrol	۱۳۰۳	۰/۴
Total identified (%)	-	۹۸/۴

نتایج تخم‌کشی اسانس زنیان

نتایج حاصل از تیمار دسته‌های تخم کرم غوزه پنبه با اسانس زنیان در غلظت‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد، غلظت‌های مختلف اسانس زنیان تأثیر متفاوت و معنی‌داری بر نرخ تخم‌کشی ($F_{8,18}=139.12$, $p<0.01$) کرم غوزه پنبه دارند. همان‌گونه که در شکل ۱ نیز دیده می‌شود با افزایش غلظت اسانس، میزان تخم‌کشی افزایش یافته است و یک رابطه مستقیم بین غلظت اسانس و میزان تخم‌کشی قابل مشاهده است. بالاترین غلظت اسانس یعنی ۵۰ در هزار موجب عدم تفریخ ۱۰۰ درصد تخم‌ها شده است پس از آن غلظت ۲۵ در هزار نیز تا ۸۰ درصد از تفریخ تخم‌ها جلوگیری کرده است. پایین‌ترین غلظت یعنی ۰/۷۸ درهزار اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد.



شکل ۱. درصد تخم‌کشی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان علیه کرم غوزه پنبه
حروف مشابه روی ستون‌ها نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول تجزیه پروبیت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس زنیان بر تخم‌های کرم غوزه پنبه در جدول ۲ آمده است. مقدار LC_{50} بدست آمده ۶/۳۲ در هزار است و مقدار LC_{70} نیز معادل ۱۵/۳۲ در هزار بدست آمد. شیب خط غلظت–کشندگی نیز ۱/۳۶ محاسبه گردید و مولفه کیدو با درجه آزادی ۳ غیر معنی‌دار بود که نشان دهنده عدم اختلاف در مقادیر کشندگی بدست آمده با مقادیر برآورد شده است.

جدول ۲. نتایج تجزیه پروبیت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس زنیان بر تخم‌های کرم غوزه پنبه و اثر تدخینی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان بر لاروهای سن یک کرم غوزه پنبه

نوع اثر	se±شیب خط	Chi square			LC_{30} (حدود اطمینان)	LC_{50} (حدود اطمینان)	LC_{70} (حدود اطمینان)
		Prob.	df	χ^2			
اثر تخم‌کشی	۱/۳۶ ± ۰/۲۱	۰/۲۵۴^{ns}	۳	۴/۰۶۸	۲/۶۰* (۰/۹۵ -۴/۶۵)	۶/۳۲ (۳/۹-۲۳/۶۳)	۱۵/۳۲ (۱۰/۱۳ - ۲۱/۶۷)
اثر تدخینی	۲/۰۰۲ ± ۰/۱۷	۰/۱۲۴^{ns}	۳	۵/۷۵	۴۵/۲۸* (۲۸/۲۵ -۶۲/۸۳)	۸۲/۷۳ (۵۹/۳۸ -۱۲۰/۳۷)	۱۵۱/۱۴ (۱۰۶/۰۹ -۲۷۱/۳۱)

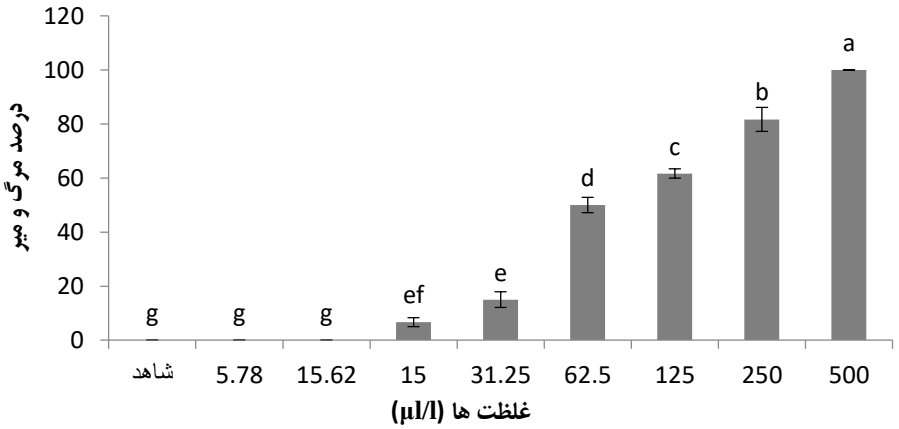
*غلظت اثر تخم‌کشی، در هزار و غلظت اثر تدخینی علیه لارو سن، یک میکرولیتر بر لیتر است.

ns غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

نتایج اثرات تدخینی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان

نتایج حاصل از تیمار لاروهای سن اول کرم غوزه پنبه با اسانس زنیان در غلظت‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد، غلظت‌های مختلف اسانس زنیان تأثیر متفاوت و معنی‌داری بر مرگ و میر لاروهای ($F_{18,8}$= 329.85, p<0.01) کرم غوزه پنبه داشت. همان‌گونه که در شکل ۲ نیز دیده می‌شود، با افزایش غلظت اسانس، میزان مرگ و میر افزایش یافته است و یک رابطه مستقیم بین غلظت اسانس و میزان مرگ و میر قابل مشاهده است. بالاترین غلظت اسانس یعنی ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر در هزار موجب مرگ ۱۰۰ درصد لاروها شده است پس از آن در اثر غلظت ۲۵۰ میکرولیتر بر لیتر نیز تا ۸۱/۶۶ درصد از لاروها از بین رفته‌اند. پایین‌ترین غلظت یعنی ۵/۷۸ میکرولیتر بر لیتر مرگ و میر اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد.

جدول تجزیه پروبیت تاثیر تدخینی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان بر لاروهای سن یک کرم غوزه پنبه در جدول ۲ آمده است. مقدار LC_{50} و LC_{70} به‌ترتیب ۸۲/۷۳ و ۱۵۱/۱۴ میکرولیتر بر لیتر هوا بدست آمد. شیب خط غلظت–کشندگی نیز ۲/۰۰۲ محاسبه گردید و مولفه کیدو با درجه آزادی ۳ غیرمعنی‌دار بود که نشان دهنده عدم اختلاف در مقادیر کشندگی بدست آمده با مقادیر برآورد شده است.

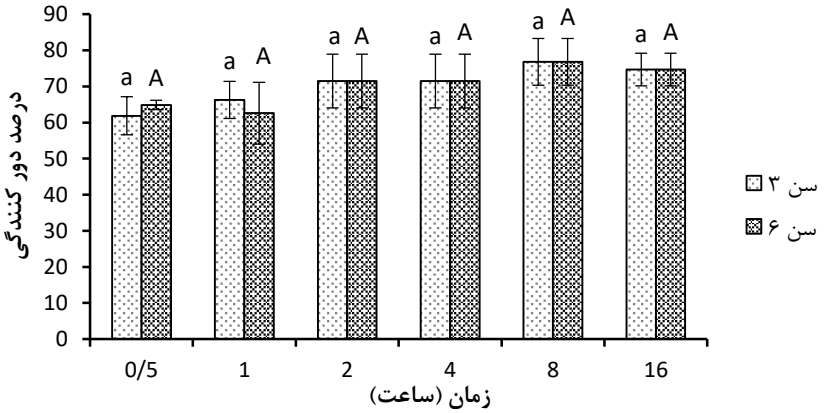


شکل ۲. نتایج حاصل از اثرات تدخینی اسانس زنیان بر لاروهای سن یک کرم غوزه پنبه

حروف مشابه روی ستون‌ها نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

نتایج حاصل از اثرات دورکنندگی اسانس زنیان بر لارو سن ۳ و ۶ کرم غوزه پنبه

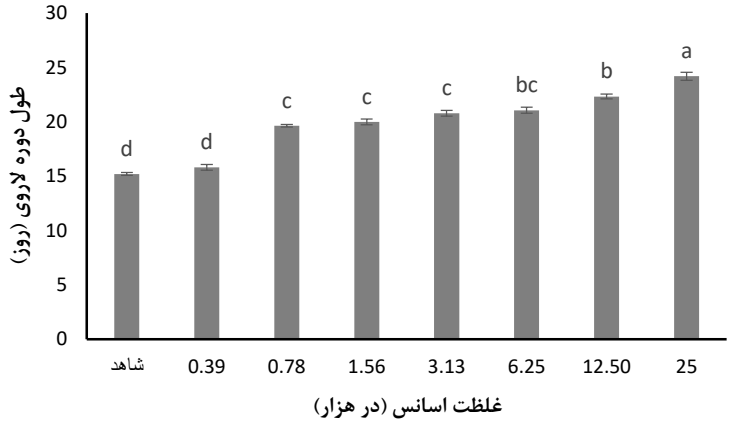
نتایج حاصل از تیمار لاروهای کرم غوزه پنبه با آفت‌کش اسانس زنیان بر نرخ دورکنندگی لارو سن ۳ و ۶ کرم غوزه پنبه در شکل ۳ نشان داده شده است. اسانس زنیان تأثیر معنی‌داری بر نرخ دورکنندگی لارو سن ۳ ($F_{12,5}=0.797, p>0.05$) و ۶ ($F_{12,5}=0.738, p>0.05$) کرم غوزه پنبه در زمان‌های مختلف ثبت نتایج نداشت و هر دو سن لاروی را به میزان مشابهی دور کرد. به‌طور متوسط در زمان‌های مختلف ۶۱ الی ۷۶ درصد دورکنندگی برای لاروهای سن ۳ و ۶۴ الی ۷۶ درصد دورکنندگی برای لاروهای سن ۶ تا ۱۶ ساعت بررسی مشاهده شد.



شکل ۳. نتایج حاصل از اثرات زمان بر دورکنندگی لاروهای سن ۳ و ۶ کرم غوزه پنبه
حروف مشابه روی ستون‌های هم‌شکل نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

نتایج حاصل از اثرات غلظت‌های مختلف زنیان بر طول دوره‌لاروی

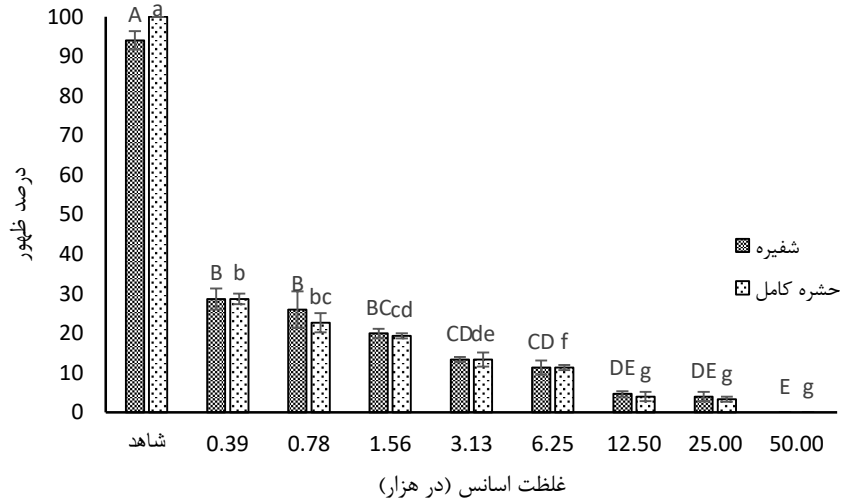
نتایج حاصل از تیمار لاروهای کرم غوزه پنبه با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان بر طول دوره لاروی کرم غوزه پنبه در شکل۴ نشان داده شده‌است. غلظت‌های مختلف اسانس زنیان تأثیر متفاوت و معنی‌داری بر طول دوره رشدی لاروهای کرم غوزه پنبه داشت ($F_{18,8}=131.37, p<0.01$). با افزایش غلظت اسانس، طول دوره لاروی افزایش یافته است و یک رابطه مستقیم بین غلظت اسانس و طول دوره لاروی قابل مشاهده است. در غلظت‌های ۲۵ و ۱۲/۵درهزار اساس زنیان طول دوره لاروی به‌ترتیب تا ۹ و ۷ روز در مقایسه با شاهد افزایش یافته است.



شکل ۴. نتایج حاصل از اثرات غلظت‌های مختلف زنیان بر طول دوره لاروی کرم غوزه پنبه
حروف مشابه روی ستون‌ها نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

اثرات غلظت‌های مختلف اسانس زنیان بر درصد ظهور شفیره و حشرات کامل کرم غوزه پنبه

نتایج حاصل از تیمار لاروهای کرم غوزه پنبه با آفت‌کش اسانس زنیان بر نرخ تشکیل شفیره و ظهور حشرات کامل این آفت در شکل ۵ نشان داده شده است. اسانس زنیان تأثیر معنی‌داری بر نرخ تشکیل شفیره ($F18,8= 182.03, p<0.05$) و ظهور حشرات کامل ($F_{18,8}=631.03, p<0.01$) کرم غوزه پنبه داشت. با افزایش غلظت اسانس، میزان تبدیل شدن به شفیره کاهش یافت. بالاترین غلظت اسانس یعنی ۵۰ در هزار موجب عدم ظهور شفیره و حشرات کامل شد. در مقایسه با شاهد (۹۴ درصد) نرخ ظهور شفیره و حشرات کامل در تمام غلظت‌ها بسیار پایین بود. حتی در پایین‌ترین غلظت اسانس زنیان، ۰/۳۹ در هزار، تنها ۲۸ درصد شفیره و حشرات کامل ظاهر شدند که عدد بسیار کمی بوده و نشان دهنده اثر معنی‌دار اسانس بر جمعیت کرم غوزه پنبه است. بدشکلی‌هایی نیز در جمعیت شفیره‌های ظاهر شده مشاده شد که نمونه‌هایی از آن در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۵. اثرات غلظت‌های مختلف اسانس زنیان بر درصد تبدیل شدن به شفیره و ظهور حشرات کامل کرم غوزه پنبه
حروف مشابه روی ستون‌های هم‌شکل نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

شکل ۶. شفیره ناسالم در اثر تیمار لاروها با اسانس گیاه زنیان (الف و ب) در مقایسه با تیمار شاهد (ج) (اصلی)

نتایج مطالعات آنزیمی

آنزیم آلفا–آمیلاز: همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود اسانس زنیان موجب مهار معنی‌دار آنزیم آلفا–آمیلاز لاروهای سن ششم کرم غوزه پنبه نسبت به تیمار شاهد شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در غلظت ۵۰ درهزار اسانس زنیان

حدود ۳۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز مهار شده است و در غلظت بعدی (۲۵ در هزار) فعالیت آنزیم ۲۴ درصد مهار شده است. غلظت ۶/۲۵ در هزار اسانس به میزان بسیار کم‌تری ۳/۵ درصد فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز را مهار کرده‌است.

پروتئاز تام: اثر مهارکنندگی اسانس زنیان برای پروتئاز تام لاروهای سن‌آخر کرم غوزه پنبه در جدول ۳ خلاصه شده است. همان‌گونه که قابل مشاهده است اسانس زنیان تقریبا در تمام غلظت‌های مورد بررسی اثر مهارکنندگی بسیار خوبی از خود نشان داده است. در غلظت ۵۰ در هزار اسانس، ۸۹ درصد فعالیت آنزیم پروتئاز مهار گردید و در غلظت ۲۵ در هزار نیز ۸۷ درصد فعالیت آنزیم مهار گردید. در مقایسه به آلفا–آمیلاز اثر مهارکنندگی اسانس زنیان بر پروتئاز بسیار بیشتر بود. حتی غلظت ۱۲/۵ در هزار به میزان قابل توجهی (۴۴/۶۶ درصد) فعالیت آنزیم را مهارکرده است.

استیل‌کولین‌استراز: آنزیم استیل‌کولین‌استراز کرم غوزه پنبه به میزان کم‌تری در مقایسه با دو سیستم آنزیمی دیگر تحت تاثیر قرار گرفته است بیشترین میزان مهار (کمتر از ۲۰ درصد) در غلظت ۵۰ در هزار ثبت گردید و همچنین در غلظت ۲۵ در هزار نیز با اختلاف اندکی ۱۸ درصد فعالیت آنزیم مهار گردید. دو غلظت ۱۲/۵ و ۶/۲۵ در هزار اسانس زنیان به‌میزان ۹ و ۵/۷ درصد فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز را مهار کردند.

جدول ۳. تاثیر اسانس زنیان بر درصد مهار آنزیم آلفا–آمیلاز، پروتئاز و استیل کولین استراز لاروهای کرم غوزه پنبه

غلظت اسانس (در هزار)	آلفا–آمیلاز	پروتئاز	استیل کولین استراز
۵۰	۳۰/۳۵	۸۹/۳۰	۱۹/۵۴
۲۵	۲۴/۱۰	۸۷/۴۴	۱۸/۳۹
۱۲/۵	۱۶/۹۶	۴۴/۶۶	۹/۱۹
۶/۲۵	۳/۵۷	۸/۸۳	۵/۷۴

بحث

اثرات مختلف زیستی و فیزیولوژیکی اسانس‌های گیاهی در ارتباط مستقیم با متابولیت‌های موجود در آنهاست. در بررسی حاضر γ-terpinene، *p*-cymene و Thymol به‌عنوان ترکیبات با درصد بالا در آنالیز شیمیایی اسانس زنیان معرفی گردید. در مطالعات دیگری نیز همین ترکیبات نزدیک ۹۰ درصد کل ترکیبات شیمیایی اسانس بذر این گیاه را به خود اختصاص داده‌اند. در بررسی معین و همکاران (Moein *et al*., 2015) بیشترین ترکیب اسانس زنیان به‌ترتیب γ-terpinene، *p*-cymene و Thymol گزارش شده است. درصد این ترکیبات به‌ترتیب ۴۸/۰۷، ۳۳/۷۳ و ۱۷/۴۱ درصد از کل ترکیب بود که با نتایج تحقیق حاضر از نظر کیفی مشابه ولی از نظر کمی تفاوت داشت. در مطالعات دیگر نیز این سه متابولیت به‌عنوان ترکیبات عمده در اسانس زنیان شناسایی شدند و درصد آنها نیز با تفاوت اندکی با بررسی حاضر مشابهت داشت (Gandomi *et al*., 2013; Lee *et al*., 2020). با توجه به تشابهات متابولیت‌های اصلی تیمول، ترپینن و سیمن به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس زنیان، می‌توان اثرات زیستی و فیزیولوژیکی مشاهده شده در مطالعه حاضر را به این ترکیبات نسبت داد.

یکی از مهم‌ترین و موثرترین اثرات بیولوژیکی اسانس‌های گیاهی تخم‌کشی، زادآوری و باروری است (Warikoo *et al*., 2011; Siriporn and Mayura, 2012; Hyder *et al*., 2022). تاثیر تخم‌کشی غلظت‌های مختلف تیمول به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس زنیان بر تخم‌های پشه *Culex pipiens* بررسی و مشخص گردید در پایین‌ترین و بالاترین غلظت مورد بررسی (به‌ترتیب ۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌ترتیب ۲۰ و ۱۰۰ درصد تخم‌ها از بین رفتند (Youssefi *et al*., 2019). مقدار LC_{50} نیز ۱۳ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که در مقایسه، بیشتر از نتیجه تحقیق حاضر (۶/۲۲ در هزار) بود. هر چند در بررسی حاضر خود تیمول به‌عنوان ترکیب مجزا مورد بررسی قرار نگرفت ولی با توجه به درصد بالای تیمول در اسانس زنیان (۶۱/۶٪) اثرات تخم‌کشی علیه کرم غوزه پنبه را می‌توان به این ترکیب نسبت داد.

در بررسی حاضر، اثرات تدخینی و دورکنندگی اسانس زنیان نیز قابل توجه بود. در یک بررسی تاثیر تدخینی اسانس زنیان بر شپشه ذرت *Sitophilus zeamais* L. (Col.: Curculionidae) مطالعه شده و مشخص شد که اثرات تدخینی بسیار خوبی بر این آفت دارد. مقدار عددی LC_{50} برای دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌ترتیب ۰/۳۸۵ و ۰/۳۲۳ میکرولیتر بر سانتی‌متر مکعب بدست آمد (Kumar Chaubey, 2018). در حالی که در بررسی حاضر این عدد ۸۲/۷۳ میکرولیتر بر لیتر بدست آمد که در مقایسه با تحقیق اشاره شده تاثیر کشندگی بهتری بر تخم‌های کرم غوزه پنبه داشت. در یک تحقیق، ترکیبات عمده استخراج شده از اسانس گیاه زنیان شامل تیمول، سیمن و ترپینن را به‌طور جداگانه به‌صورت تدخینی علیه *Aethina tumida* مطالعه و مشخص گردید ترکیبات مورد بررسی، اثر تدخینی خوبی داشت ولی بیشترین تاثیر تدخینی در تیمار تیمول بدست آمد که ترکیب عمده اسانس زنیان است (Bisrat and Jung, 2020). مقدار LC_{50} اسانس خالص ۸۹ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که در مقایسه با مطالعه حاضر که این عدد ۸۲/۷۳ میکرولیتر بر لیتر بود سمیت کمتری داشته است. مقادیر LC_{50} برای تیمول، ترپینن و سیمن به‌ترتیب ۵۲، ۵۲۲ و ۱۰۲۷ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد که نشان می‌دهد تیمول موثرترین ترکیب از نظر اثرات تدخینی است. در بررسی حاضر نیز مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان نشان داد که تیمول ترکیب عمده با درصد بالا است و می‌توان با احتمال زیاد دلیل اثرات تدخینی اسانس را به درصد بالای تیمول نسبت داد. تفاوت‌ها به نوع حشره و مرحله زیستی آن مربوط می‌باشد.

در بحث مدیریت آفات، اثر دورکنندگی ترکیبات به‌دلیل این‌که می‌توانند بدون برهم‌زدن توازن جمعیت حشرات با دور کردن آن‌ها باعث کاهش صدمات آفات از طریق ممانعت از تغذیه و یا ممانعت از تخم‌ریزی شوند دارای اهمیت بالایی است. اثر دورکنندگی ترکیبات متعددی که منشا گیاهی دارند علیه آفات مختلف بررسی شده است. در یک بررسی تاثیر دورکنندگی اسانس زنیان بر شپشه ذرت *S. zeamais* L. (Coleoptera: Curculionidae) مطالعه شده و مشخص گردید که اثرات دورکنندگی قابل‌توجهی بر این آفت دارد. در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۶ درصد به‌ترتیب ۷۴، ۹۸، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد دورکنندگی ثبت گردید. که نشان‌دهنده تاثیر دورکنندگی بسیار خوب اسانس زنیان می‌باشد (Kumar Chaubey, 2018). همچنین در مطالعه دیگری اثرات دورکنندگی اسانس گیاه زنیان بر شپشه آرد *Tribolium confusum* بررسی و مشخص گردید حتی در غلظت‌های کم نیز اثرات دورکنندگی خوبی وجود دارد. در این بررسی در غلظت ۰/۳درصد اسانس، ۱۰۰درصد و در غلظت ۰/۲درصد نیز ۹۷ درصد دورکنندگی گزارش شد (Kumar Chaubey, 2007). در یک بررسی که ترکیبات عمده استخراج شده از اسانس گیاه زنیان شامل تیمول، سیمن و ترپینن را به‌طور جداگانه علیه *A. tumida* مطالعه کردند مشخص شد که تمام اسانس مورد مطالعه اثرات دورکنندگی خوبی داشت ولی تیمول بیشترین تاثیر را نشان داد که ترکیب عمده اسانس زنیان است. دو ترکیب ترپینن و سیمن اثرات دورکنندگی زیادی نشان ندادند (Bisrat and Jung, 2020). در بررسی حاضر نیز با توجه به غالب بودن میزان تیمول در ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان می‌توان دلیل اثرات دورکنندگی اسانس بر لاروهای سن سوم و ششم کرم غوزه پنبه را به درصد بالای تیمول نسبت داد.

تأثیر اسانس‌های گیاهی بر طول دوره لاروی، در حشرات مختلف بررسی شده است که در بیشتر موارد، طول دوره لاروی در اثر اختلال در سامانه‌های فیزیولوژیک حشرات تحت تاثیر قرار گرفته است. در حین فعالیت‌های بیوشیمیایی مربوط به سمیت‌زدایی آفت‌کش‌ها، میزان مصرف انرژی در حشرات افزایش پیدا می‌کند که این پدیده می‌تواند منجر به تغییر طول دوره لاروی در حشرات شود. افزایش طول دوره لاروی همچنین می‌تواند با کاهش رشد و نمو و تغذیه آفت‌ها ارتباط داشته باشد (Mervat 2012). در منابع مختلف دلایل متعددی برای تاثیر اسانس گیاهان بر طول دوره رشدی ذکر شده است. از جمله تاثیر بر متابولیسم، تحریک سامانه ایمنی بدن و صرف انرژی برای مبارزه با عوامل خارجی، تاثیر بر میزان هضم و جذب مواد غذایی، صدمه به بافت معده میانی و کاهش کارایی آن، اختلال در فشار اسمزی سلول‌های دیواره معده میانی و تغییر و ناپایداری اسیدیته آن و غیره که در مجموع با اثرات سوء بر هضم و جذب و متابولیسم موجب کاهش کارایی هضم و جذب و رشد عادی حشره می‌شود. از طرفی، تطویل دوره لاروی با تاثیر بر اکولوژی حشره، با اختلال در بیولوژی آفت در راستای زمستان‌گذرانی،

غیرهمزمانی با مرحله حساس گیاه، تاثیرپذیری بیشتر از عوامل کنترل زیستی و کاهش تعداد نسل حشره می‌تواند در امر کاهش جمعیت حشرات آفت موثر باشد (Thomas 1999; Koul *et al*., 2008). همچنین از مزایای آن می‌توان به تاثیر کمتر بر دشمنان طبیعی را نیز ذکر کرد (Jansen *et al*. 2017).

با توجه به این‌که طول دوره رشدی لاروی تحت تاثیر تیمار با اسانس قرار گرفته است، میزان تبدیل شدن به شفیره با مرگ و میر در طی دوره رشدی لاروی نیز کاهش معنی‌داری نشان داده و تحت تاثیر آن قرار می‌گیرد. شاخص‌های زیستی حشراتی که در معرض اسانس گیاهی قرار گرفتند اغلب تحت تاثیر اسانس قرار گرفته و اثرات ضدتغذیه‌ای و اختلال در سامانه گوارشی به‌عنوان فاکتورهای موثر بر نشو و نمای لاروها گزارش شده‌اند. فرایند تبدیل شدن به شفیره و ظهور حشرات کامل فرایندی بسیار حساس در حشرات با دگردیسی‌کامل است هرگونه اختلال بیولوژیکی و فیزیولوژیکی که توسط ترکیبات شیمیایی مختلف ایجاد می‌شود می‌تواند موجب مرگ و میر شفیره‌ها و جلوگیری از ظهور حشرات کامل نیز گردد (Abdelgaleil and El-Sabrout, 2018). در بررسی حاضر درصد معنی‌داری از شفیره‌ها و حشرات کامل در تمام غلظت‌های اسانس زنیان ظاهر نشدند که می‌تواند به‌دلیل تغییرات فیزیولوژیکی و اختلالات هورمونی باشد. تاثیری که اسانس گیاه درمنه *Artemisia annua* بر لاروهای کرم غوزه پنبه داشت به کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند آلفا–آمیلاز و پروتئاز نسبت داده شده است (Mojarab-Mahboubkar *et al*., 2015).

تاثیری که اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بر بیولوژی و فیزیولوژی حشرات دارند از جنبه‌های مختلف قابل بررسی است. مرگ و میر به‌دلیل تاثیر بر سیستم عصبی یکی از جنبه‌های مهم تاثیر این ترکیبات است. معمولا مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز به‌عنوان یک پیام‌رسان عصبی، جزو اولین مواردی است که بخصوص در مرگ و میر سریع حشرات در اثر تیمار با یک ترکیب گیاهی مورد بررسی قرار می‌گیرد (Miyazawa andYamafuji, 2005; Younsi *et al*., 2016; Georgiev *et al*., 2022). اصولا در ترکیبات حشره‌کش مصنوعی هم تاثیر بر سیستم عصبی به‌عنوان مهم‌ترین مکانیسم عمل مورد توجه محققین بوده است. مطالعات مختلفی نشان داده است که متابولیت‌های مختلف اسانس گیاهان می‌توانند به‌عنوان مهارکننده آنزیم استیل‌کولین استراز عمل کنند (Aazza *et al*., 2011). در یک بررسی مشخص شد که تیمول به‌عنوان یک مهارکننده آنزیم استیل‌کولین استراز عمل می‌کند (Jukic, 2007; Darrag, 2021). با توجه به اینکه تیمول به‌عنوان ترکیب عمده اسانس زنیان در بررسی حاضر معرفی شده است شاید بتوان اثرات کشندگی و زیرکشندگی مشاهده شده را به واسطه تاثیر تیمول بر آنزیم استیل‌کولین‌استراز کرم غوزه پنبه توجیه کرد. در یک مطالعه اختصاصا به بررسی نقش اسانس‌های گیاهی بر میزان فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز اشاره شده است. تیمول، کارواکرول، سیمن و در مواردی ترپینن به‌عنوان ترکیبات عمده استخراج شده از گیاهان اثر مهار کنندگی آنزیم استیل‌کولین‌استراز را نشان دادند(Georgiev *et al*. 2022). در مطالعه‌ای مشخص گردید غلظت‌های مختلف اسانس *Melaleuca alternifolia* شامل ۱۰ الی ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بین ۲۰ الی ۵۰ درصد آنزیم استیل کولین‌استراز لاروهای کرم غوزه پنبه را مهار کردند و اثرات کشندگی اسانس را به مهار این آنزیم و تاثیر عصبی ترکیب عمده اسانس یعنی ترپینن نسبت دادند (Liao *et al*., 2017). با توجه به مهار نزدیک ۲۰ درصد فعالیت آنزیم استیل کولین‌استراز لاروهای کرم غوزه پنبه توسط اسانس زنیان احتمال دارد اثرات کشندگی تدخینی و اثرات زیستی مشاهده شده به‌دلیل مهار این آنزیم باشد.

اثرات مهارکنندگی اسانس گیاهان بر آنزیم آلفا–آمیلاز نیز در منابع مختلف اشاره شده است (Rahali et al., 2017). این آنزیم در دستگاه گوارش هم مسئول هضم نشاسته بوده و در همولنف حشرات در استفاده از گلیکوژن ذخیره شده نقش دارد. اختلال در کارکرد این سامانه اثرات بیولوژیکی و سوءهاضمه را به دنبال خواهد داشت که تاثیر آن در منابع مختلف به‌صورت تطویل دوره رشدی، افزایش سنین لاروی، عدم افزایش وزن لاروها، تغییر در نسبت جنسی و غیره خود را نشان داده است (Darvishzadeh *et al*., 2014). همچنین آنزیم پروتئاز که نقش بسیار مهمی در زیست‌شناسی آفات دارد در بررسی حاضر به خوبی توسط غلظت‌های مختلف اسانس زنیان مهار شده است. در مطالعه‌ای (Mojarab-Mahboubkar *et al*., 2015)

اسانس گیاه درمنه تا ۲/۵ برابر فعالیت آنزیم پروتئاز را مهار کرده است و با توجه به اثرات زیستی متعدد این اسانس بر لاروها و نشو و نمای کرم غوزه پنبه، مهار این آنزیم به‌عنوان یکی از مهم‌ترین دلایل اثرات ثبت شده گزارش گردیده است.

در بررسی حاضر اثرات بیولوژیکی متعدد و قابل‌توجهی در اثر تیمار لاروهای کرم غوزه پنبه با اسانس زنیان ثبت گردید. اثرات مشاهده شده به‌صورت مرگ و میر در طی دوره لاروی، طولانی‌تر شدن دوره لاروی، بدشکلی در لارها و شفیره‌ها، اثرات تدخینی و تخم‌کشی خوب ثبت گردید. مطالعات آنزیمی نیز نشان داد که فعالیت سه گروه آنزیمی مورد بررسی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس زنیان قرار گرفت که مهم‌ترین آنها آنزیم پروتئاز بود. با توجه به اهمیت بسیار بالای پروتئین در نشو و نما و تمام فعالیت‌های فیزیولوژکی حشرات شاید یکی از مهم‌ترین دلایل تاثیر خوب اسانس زنیان بر کرم غوزه پنبه همین اختلال در سیستم آنزیمی پروتئاز باشد. آنزیم آلفا–آمیلاز نیز تا حدود زیادی تحت تاثیر قرار گرفته و فعالیت آن مهار گردید. این آنزیم نیز نقش بسیار موثری در سوخت و ساز نشاسته و گلیکوژن دارد و در دنیای حشرات مشاهده شده است که هر گونه اختلال در سامانه گوارشی می‌تواند نشو و نما، زاد و ولد و حتی رفتار حشرات را تحت تاثیر قراردهد. سه ترکیب شیمیایی عمده در اسانس زنیان شامل تیمول، سیمن و ترپینن بر سامانه گوارشی و حتی آنزیم‌های دخیل در متابولیسم، تنفس، دگردیسی و سیستم آنزیمی استیل‌کولین‌استراز تاثیر دارند. با توجه به نتایج تحقیقات حاضر اسانس فرموله شده زنیان پتانسیل لازم برای کنترل جمعیت کرم غوزه پنبه را در شرایط آزمایشگاهی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته حشره‌شناسی کشاورزی نویسنده دوم است که با حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان انجام گرفته است. بدینوسیله از معاونت محترم تقدیر و تشکر می‌گردد.

REFERNCES

Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, MG. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16, 7672–7690.

Abd-El-Aziz, SE. (2011). Control strategies of stored product pests. *Journal of Entomology*, 8, 101-122.

Abdelgaleil, SAM., & El-Sabrout, AM. (2018). Anti-nutritional, antifeedant, growth-disrupting and insecticidal effects of four plant essential oils on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of. Crop Protection*, 7 (2), 135-150

Adams, RP., & Sparkman, OD. (2007). Review of identification of essential oil components by Gas Chromatography /Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 803-806.

Aggarwal, N., Brar, DS. & Basedow, T. (2006). Insecticide resistance management of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on pests and yield of cotton in North India. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113 (3), 120–127.

Bisrat, D. & Jung, C. (2020). Insecticidal toxicities of three main constituents derived from *Trachyspermum ammi* (L.) sprague ex turrill fruits against the small Hive beetles, *Aethina tumida* Murray. *Molecules*, 25, 1100; doi:10.3390/molecules25051100.

Chaubey, MK. (2018). Study of insecticidal properties of *Trachyspermum ammi* and *Mentha arvensis* essential oils against *Sitophilus zeamais* L.(Coleoptera: Curculionidae). *Current Life Sciences*, 4(1), 10-17.

Conti, B., Canale, A., Cioni, PL., & Flamini, G., (2010). Repellence of essential oils from tropical and Mediterranean lamiaceae against *Sitophilus zeamais*. *Bulletin of Insectology*, 63, 197–202.

Darrag, HM., Mohammed Alhajhoj, R. & Ezzat Khalil, H., (2021). Bio-insecticide of *Thymus vulgaris* and *Ocimum basilicum* extract from cell suspensions and their inhibitory effect against Serine, Cysteine, and Metalloproteinase of the Red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *Insects*, 2021, 12, 405. https:// doi.org/10.3390/insects12050405.

Darvishzadeh, A., Hosseininaveh, V. & Salimian Rizi, S. (2014). Enzymatic activity of α-amylase in alimentary tract *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae): Characterization and Compartmentalization. *Arthropods*, 3(3), 138-146

El-Sabrout, A., Zahran, HE-D. & Abdelgaleil, S. (2018). Effects of essential oils on growth, feeding and food utilization of *Spodoptera littoralis* larvae. *Journal of Entomology*, 15(1),36–46.

Fernández-Peña, L., Gutiérrez-Muro, S., Guzmán, E., Lucia, A., Ortega, F., & Rubio R. (2019). Oil-In-water microemulsions for thymol solubilization. *Colloids and Interfaces*, 3: 64. https://doi.org/10.3390/colloids3040064

Fite, T., Tadele T., Mulugeta, N., Tebekew, D., & Waktole, G. (2018). Management of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) by nutritional indices study and botanical extracts of *Millettia ferruginea* and *Azadirachta indica*. *Advances in Entomology*, 6: 235-255. doi:10.4236/ae.2018.64019

Gandomi, H., Abbaszadeh, S., JebelliJavan, A. & Sharifzadeh, A. (2013). Chemical constituents, antimicrobial and antioxidative effects of *Trachyspermum ammi* essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 1690–1695.

Habashi, AS., Safaralizadeh, MH. & Safavi, SA. (2011). Fumigant toxicity of *Carum copticum* L. oil against *Tribolium confusum* du Val, *Rhyzopertha dominica* F. and *Oryzaphilus surinamensis* L. *Munis Entomology and Zoology*, 6(1), 282-289.

Hyder, M., Li, Y., Wang, M., Mao, J., Mari, J.M., Bukero, A., Soomro, H.U., Bukero, A.A. & Zhang, L. (2022). Insecticidal activity, chemical constituents of *Trachyspermum ammi*, withania coagulans and *Murraya koenigii* ethanloic extracts against *Bemisia tabaci*. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e260298 https://doi.org/10.1590/1519-6984.260298

Isman, MB. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608.

Isman, MB. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45–66.

Jansen, JP., Lauvaux, S., Gruntowy, J. & Denayer, J., (2017). Possible synergistic effects of fungicide-insecticide mixtures on beneficial arthropods. *International Organization for Biological and Integrated Control*, 125, 28-35.

Jeyasankar, A., Chennaiyan, V. & Chinnamani, T. (2016). Evaluation of five essential plant oils as a source of repellent and larvicidal activities against larvae of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: tenebrionidae). *Journal of Entomology*, 13, 98-103.

Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M. & Milos, M. (2007). In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21(3), 259-261. doi: 10.1002/ptr.2063. PMID: 17186491.

Kedia, A., Prakash, B., Mishra, PK., Dwivedy, AK. & Dubey, NK. (2015). *Trachyspermum ammi* L. essential oil as plant based preservative in food system, *Industrial Crops and Products*, 69,104-109.

Khajeh, M., Yamini,. Y, Sefidkon, F. & Bahramifar, N. (2004). Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*, 86(4), 587-591.

Kim, SI., Ahn, YJ. & Kwon, HW. (2012). Toxicity of aromatic plants and their constituents against coleopteran stored products insect pests. *New perspectives in plant protection*, 93-120.

Koul, O., Walia, S. & Dhaliwal, GS. (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International*, 4, 63–84.

Kumar Chaubey, M. (2018). Study of insecticidal properties of *Trachyspermum ammi* and *Mentha arvensis* essential oils against *Sitophilus zeamais* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Current Life Sciences*, 4 (1), 10-17.

Kumar, V. & Kumar, P. (2019). Pesticides in agriculture and environment: impacts on human health. In: Contaminants in agriculture and environment: health risks and remediation. Haridwar, India:

Agro Environ Media Agriculture and Environmental Science Academy. pp 76–95.

Lee, SC., Seo, SM., Huh, MJ., Kwon, JH., Nam, I., Park, JH. & Park, IK. (2020). Behavioral and electrophysiological effects of ajowan (*Trachyspermum ammi* Sprague) (Apiales: apiaceae) essential oil and its constituents on nymphal and adult bean bugs, *Riptortus clavatus* (Thunberg) (Hemiptera: alydidae). *Insects,* 11(2):104. doi: 10.3390/insects11020104. PMID: 32033226; PMCID: PMC7074463.

Liao, M., Xiao, J-J., Zhou, L-J., Yao, X., Tang, F., Hua, R-M., Wu, X-W. & Cao, H-Q. (2017). Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the *Helicoverpa armigera*. *Journal of Applied Èntomology*, 141, 721-728.

Liao, M., Xiao, JJ., Zhou, LJ., Yao, X., Tang, F., Hua, RM., Wu, XW. & Cao, HQ. (2017). Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on the *Helicoverpa armigera*. *Journal of Applied Entomology*, 141,721-728.

Martin, TO., Chou, OG., Hala N'klo, F., Vassal, JM. & Vaissayre, M. (2000). Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner), in West Africa. *Pest Management Science*, 56, 549-554.

Mervat, AK., Ahmed, AF. & Moustafa, HZ. (2012). Toxicological and biochemical studies of lufenuron, chlorfluazuron and chromafenozide against *Pectinophora gossypiella* (Saunders). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 4, 37- 47.

Miyazawa, M. & Yamafuji, C. (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1765-1768.

Moein, MR., Zomorodian, K., Pakshir, K., Yavari, F., Motamedi, M. & Zarshenas, MM. (2015). *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague: chemical composition of essential oil and antimicrobial activities of respective fractions. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 20, 50–56.

Mohagheghzadeh, A., Faridi,. P. & Ghasemi, Y. (2007). Carum copticum Benth. Hook., essential oil chemotypes. *Food Chemistry*, 100(3), 1217-1219.

Mojarab-Mahboubkar, M., Jalali Sendi, J. & Aliakbar, A. (2015). Effect of *Artemisia annua* L. essential oil on toxicity, enzyme activities, and energy reserves of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Protection Research*, 55 (4), 371-377 (In Persian).

Nenaah, GE. (2014). Bioactivity of powders and essential oils of three asteraceae plants as post - harvest grain protectants against three major coleopteran pests. *Journal of Asia -Pacific Entomology*, 17, 701 -709.

Nerio, LS., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: *A review of Bioresource Technology*, 101, 372–378.

Pandey, SK/, Upadhyay, S. & Tripathi, AK. (2009). Insecticidal and repellent activities of thymol from the essential oil of *Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague seeds against *Anopheles stephensi*. *Parasitology research*, 105(2), 507-512.

Piri, A., Sahebzadeh, N., Zibaee, A., Sendi, JJ., Shamakhi, L. & Shahriari, M. (2020). Toxicity and physiological effects of ajwain (*Carum copticum*, Apiaceae) essential oil and its major constituents against *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). *Chemosphere*, 256, 127103.

Rahali, N., Mehdi, S., Younsi, F., Boussaid, M. & Messaoud, C. (2017). Antioxidant, α-amylase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Hertia cheirifolia* essential oils: Influence of plant organs and seasonal variation, *International Journal of Food Properties*, 20,1637-1651, DOI: 10.1080/10942912.2017.1352597.

Regnault-Roger, C., Vincent, C. & Arnason, JT. (2012). Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology,* 57, 405–424.

Regnault-Roger, C. (1997). The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, 2(1), 25-34.

Saad, NY. & Muller, CD. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components, *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269–279.

Said-Al-Ahl, H., Hikal, WM. & Tkachenko, KG. (2017). Essential oils with potential as insecticidal agents: A review. *International Journal of Environmental Plant Management*, 3, 23–33.

Saroukolai, AT., Nouri-Ganbalani, G., Hadian, J. & Rafiee-Dastjerdi, H. (2014). Antifeedant activity and toxicity of some plant essential oils to Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Plant Protection Science*, 50, 207–216.

Shorey, HH. & Hale RL. (1965). Mass rearing larvae of nine Noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 58, 522-524.

Siriporn, P. & Mayura, S. (2012). The effects of herbal essential oils on the oviposition-deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Trop Biomed*, 29(1), 138-50.

Soni, R., Sharma, G. & Dut Jasuja, N. (2016). Essential oil yield pattern and antibacterial and insecticidal activities of *Trachyspermum ammi* and *Myristica fragrans*. *Scientifica*, https://doi.org/10.1155/2016/1428194.

Thomas, M., (1999). Ecological approaches and the development of "truly integrated" pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5944 -5951.

Torabi-Pour, H., Shayeghi, M., Vatandoost, HM. & Abai M. (2017). Larvicidal effects and phytochemical evaluation of essential oils of *Trachyspermum ammi* and *Ziziphora clinopodioides* against larvae *Anopheles stephensi*. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 6,185-190.

Torres-Vila, LM., Rodriguez-Molina, MC., Lacasa-Plasencia, A., Bielza-Lino, P. & Rodriguez-del-Rincon, A. (2002). Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: Current status and agroecological perspective, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 93, 55-66.

Tripathi, AK., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. & Bhattacharya, PR. (2009). A review on prospects of essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy Phytotherapy*, 1, 52–63.

Upendhar, S., Sree, KV., Satyanarayana, J. & Singh, TVK. (2017). Cypermethrin and methomyl resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *International Journal of Economic Plants*, 4, 70–75.

Vitali, L., Beghelli, D., Biapa, P., Bistoni, O., Cappellacci, L., Damiano, S., Lupidi, G., Maggi, F., Orsomando, G., Papa, F., Petrelli, D., Petrelli, R., Quassinti, L., Sorci, L., Zadeh, M. & Bramucci, M., (2016). Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*, *Arabian Journal of Chemistry*, 9(6), 775-786.

Warikoo, R., Wahab, N. & Kumar, S. (2011). Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti* L. *Parasitology Research*, 109(4), 1125-31. doi: 10.1007/s00436-011-2355-y. Epub 2011 Mar 29. PMID: 21445613.

Yang, Y., Isman, MB. & Tak, JH. (2020). Insecticidal activity of 28 essential oils and a commercial product containing *Cinnamomum cassia* bark essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Insects*, 11, 1-15.

Yazdani, E., Sendi, JJ. & 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.

Yeom, HJ., Kang, JS., Kim, GK. & Park, IK. (2012). Insecticidal and acetylcholine esterase Inhibition activity of apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of german cockroach (*Blattella germanica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (29), 7194-7203.

Younsi, F., Trimech, R., Boulila, A., Ezzine, O., Dhahri, S., Boussaid, M. & Messaoud, C. (2016). Essential oil and phenolic compounds of *Artemisia herbaalba* (Asso.): Composition, antioxidant, antiacetylcholinesterase and antibacterial activities. *International Journal of Food Properties*, 19, 1425–1438.

Youssefi, MR., Tabari, MA., Esfandiari, A., Kazemi, S., Moghadamnia, AA., Su, TS., Dall'Acqua, S., Benelli, G. & Maggi, F. (2019). Efficacy of two monoterpenoids, carvacrol and thymol, and their combinations against eggs and larvae of the West Nile vector *Culex pipiens*. *Molecules,* 5;24(10): 1867. doi: 10.3390/molecules24101867. PMID: 31096594; PMCID: PMC6572342.