نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۸۹ – ۳۰(۲): ۳۱-۴۵

بررسی اثر کنه‌کشی اسانس پونه‌ی کوهی *Mentha longifolia* (Lamiaceae) روی کنه‌ی واروا، *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) و تأثیر آن بر زنبور عسل اروپایی *Apis mellifera* (Hym.: Apidae)

وحید قاسمی[۱]، سعید محرمی‌پور[۱و*] و غلام‌حسین طهماسبی[۲]

۱- گروه حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۲- موسسه‌ی تحقیقات علوم دامی کشور، کرج.
*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moharami@modares.ac.ir

Acaricidal activity of essential oil from *Mentha longifolia* (Lamiaceae) against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its effect on *Apis mellifera* (Hym.: Apidae)

V. Ghasemi[1], S. Moharramipour[1&*] and G. H. Tahmasbi[2]
1. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 2. Animal Science Research Institute, Karaj, Iran.
*Corresponding author, E-mail: moharami@modares.ac.ir

چکیده

کنه‌ی واروا، *Varroa destructor* Anderson & Trueman، یکی از مهم‌ترین آفات زنبور عسل اروپایی، *Apis mellifera* L.، در سرتاسر جهان می‌باشد که با تغذیه از همولنف مراحل مختلف رشدی زنبور عسل و همچنین انتقال عوامل بیماری‌زای ویروسی، خسارت اقتصادی بالایی را به صنعت زنبورداری وارد می‌کند. در طی سال‌های اخیر، استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی به منظور کنترل کنه‌ی واروا منجر به ایجاد مقاومت در این آفت و آلودگی محصولات کندو شده است. لذا موضوع تحقیق حاضر بررسی میزان سمیت تنفسی اسانس پونه‌ی کوهی *Mentha longifolia* L. بر کنه‌ی واروا و زنبور عسل می‌باشد. بدین منظور کنه‌های بالغ ماده در شرایط اتاق رشد، با دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۴۰ درصد و تاریکی به مدت ۱۰ ساعت با غلظت‌های مختلف اسانس مورد مطالعه (از ۰/۵ تا ۳/۷۵ میکرولیتر بر لیتر هوا) تیمار شدند. همچنین زنبورهای عسل کارگر در شرایط انکوباتور (دمای ۳۲ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰-۴۵ درصد و تاریکی به مدت ۱۰ ساعت) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه‌ی کوهی (از ۰/۶۲ تا ۶/۲۵ میکرولیتر بر لیتر هوا) قرار گرفتند. همه‌ی تیمارها در ٤ تکرار طراحی شدند. تعداد افراد مرده و زنده برای هر تکرار پس از شروع اسانس‌دهی و هر یک ساعت یک‌بار شمارش شد. نتایج نشان داد که میزان مرگ و میر کنه‌ی واروا و زنبور عسل با افزایش غلظت و زمان اسانس‌دهی افزایش پیدا کرده است. میزان LC_{50} برای کنه‌ی واروا، ۹ و ۱۰ ساعت پس از شروع اسانس‌دهی، به‌ترتیب ۲/۰۵ و ۱/٦۵ میکرولیتر بر لیتر هوا محاسبه شد؛ درحالی‌که، میزان LC_{50} در مورد زنبور عسل در طی ۹ و ۱۰ ساعت پس از اسانس‌دهی به‌ترتیب ۵/۰۸ و ٤/۷٦ میکرولیتر بر لیتر هوا بود که نشان‌دهنده‌ی حساسیت بیشتر کنه‌ی واروا به اسانس پونه‌ی کوهی در مقایسه با زنبور عسل اروپائی است. بنابراین، لازم است تحقیقات بیشتری برای تنظیم غلظت و مدت زمان اسانس‌دهی پونه‌ی کوهی صورت گیرد تا بتوان از آن در برنامه‌های کنترل کنه‌ی واروا در زنبورستان‌ها استفاده نمود.

دریافت: ۱۳۸۸/۴/۲، پذیرش: ۱۳۸۸/۱۱/۲۷.

واژگان کلیدی: کنه‌ی واروا، پونه‌ی کوهی، سمیت تنفسی، زنبور عسل اروپائی

Abstract

Varroa destructor Anderson & Trueman is one of the most important pests of *Apis mellifera* L. world widely. It causes great economic loss to the beekeeping industry through feeding on various developmental stages of bees and by transmission of pathogenic viral agents. Recently, application of chemical pesticides has led to the occurrence of mite resistance and contamination of hive products. Therefore, the objective of the current study is to evaluate fumigant toxicity of essential oil from *Mentha longifolia* L. against varroa mite and honey bee. Adult females of varroa mites were treated with different concentrations of essential oil (from 0.5 to 3.75 µl/l air) at 25°C and 40% RH in darkness for 10 h. Also, worker honey bees were exposed to concentrations of essential oil (from 0.62 to 6.25 µl/l air) in incubator set at 32°C and 45 - 50% RH in dark for 10 h. All experiments were conducted with four replications. The number of dead and live treated animals was counted each hour from commencement of exposure. Results showed that the mortality was increased as concentration and exposure time of the oil increased. Estimated LC_{50} value of *M. longifolia* treated on *V. destructor* 9 and 10 h after exposure was 2.05 and 1.65 µl/l air, respectively. However, LC_{50} values of the oil on *A. mellifera* at the same exposure times were 5.08 and 4.76 µl/l air, respectively. These findings indicate that varroa mite is more susceptible than *A. mellifera*. Therefore, more comprehensive experiments are necessary to find appropriate concentration and exposure time of *M. longifolia* essential oil in varroa mite control programs in apiaries.

Key words: *Varroa destructor*, *Mentha longifolia*, Fumigant toxicity, *Apis mellifera*

مقدمه

کنه‌ی واروا، *Varroa destructor* Anderson & Trueman، به عنوان زیان‌آورترین آفت زنبور عسل اروپایی، *Apis mellifera* L.، و مهم‌ترین عامل تهدیدکننده‌ی صنعت زنبورداری در سرتا سر دنیا به شمار می‌آید (Anderson & Trueman, 2000). مراحل تولید مثل این کنه درون حجرات شفیرگی زنبورهای عسل طی می‌شود که در این مرحله خسارت جبران‌ناپذیری را به زنبور وارد می‌کند. کنه‌ی واروا با تغذیه از همولنف مراحل شفیرگی و بالغ زنبور عسل باعث کاهش آب و وزن بدن، پایین آمدن سطح پروتئین و کربوهیدرات و نهایتاً مرگ آن می‌شود (Bowen-Walker & Gunn, 2001). این انگل خارجی علاوه بر خسارت مستقیم، با انتقال عوامل ویروسی موجب ایجاد بدشکلی در بال‌ها و کاهش طول عمر زنبورهای عسل کارگر و نر در کندو می‌گردد (De Jong *et al*., 1982). در سال‌های اخیر، کنترل کنه‌ی واروا توسط سموم شیمیایی به‌ویژه آفت‌کش‌های پایروتروئیدی (تئو- فلووالینات و فلومترین) صورت می‌گیرد. لذا استفاده بی‌رویه و نادرست از این ترکیبات باعث ایجاد مشکلاتی از قبیل وجود باقی‌مانده‌ی سموم در فرآورده‌های حاصل از زنبور عسل، آلودگی محیط زیست و از همه مهم‌تر ظهور جمعیت‌های مقاوم کنه‌ی واروا در زنبورستان‌ها شده است (Milani, 1995; Elzen *et al*., 1998). این مشکلات باعث شده است که محققان به دنبال استفاده از روش‌های کم‌خطرتر برای کنترل این آفت باشند. در این میان می‌توان به کاربرد اسانس‌های گیاهی اشاره کرد. این اسانس‌ها که

از گیاهان معطر استحصال می‌شوند به دلیل داشتن بوی تند و سمیت کم برای پستانداران، عدم تأثیر سوء چشم‌گیر بر محیط زیست و مقبولیت در میان عامه‌ی مردم از جمله ترکیبات بسیار مفید برای کنترل آفات به حساب می‌آیند (Isman, 2000). تقریباً اسانس ۱۵۰ گونه‌ی گیاهی یا ترکیبات حاصل از آن‌ها علیه کنه‌ی واروا مطالعه شده، که نتایج مختلفی را در پی داشته است (Calderone & Spivak, 1995; Imdorf *et al.*, 1999).

بسیاری از اسانس‌های مورد آزمایش نتایج مطلوبی را در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای از خود به جای گذاشته‌اند (Calderone, 1999; Melathopoulus *et al.*, 2000; Ruffinengo *et al.*, 2002). تحقیقات Ariana *et al.* (2002) در ارتباط با بررسی خواص کنه‌کشی برخی از ترکیبات گیاهی علیه کنه‌ی واروا در شرایط کندوچه‌های آزمایشگاهی نشان داد که پاشش غلظت ۲ درصد اسانس *Zataria multiflora* Boiss، *Mentha spicata* L.، *Satureja hortensis* L. و *Anethum graveolens* L. روی زنبور عسل آلوده به این کنه پس از یک هفته، با داشتن حداقل تلفات (۲/۵ درصد) بر زنبور عسل موجب از بین رفتن ۵۸–۴۳ درصد کنه‌های مورد آزمایش می‌شود. Ebrahimi *et al.* (2006) در آزمایش‌های خود نشان دادند که استفاده از ۳۵ گرم کریستال منتول به مدت ۲۸ روز در کندوهای آلوده به کنه‌ی واروا موجب از بین رفتن ۵۶/۶۸ درصد کنه‌های تیمار شده می‌گردد. بر همین اساس فرمولاسیون‌های مختلفی که مواد مؤثره‌ی آن‌ها را ترکیبات گیاهی تشکیل داده‌اند به بازار عرضه شده است. فرمولاسیون Apilife VAR® که مواد مؤثره‌ی آن را تیمول (۷۶٪)، اکالیپتول (۱۶/۴٪)، منتول (۳/۸٪) و کامفور (۳/۸٪) تشکیل داده، طی هشت هفته ۹۷/۷ درصد و در طی چهار هفته ۹۳/۷ درصد اثر کنه‌کشی دارد (Imdorf *et al.*, 1995a). پونه‌ی کوهی، *Mentha longifolia* L.، گیاهی زود رشد، یک‌ساله و با برگ‌هایی به رنگ سبز روشن یا تیره تا خاکستری می‌باشد. زنبورها و پروانه‌ها در موسم گل‌دهی به سمت این گیاه جلب می‌شوند. این گونه‌ی گیاهی همانند سایر گونه‌های خانواده‌ی Lamiaceae دارای خواص دارویی است. اسانس گیاه پونه‌ی کوهی به دلیل داشتن فعالیت ضد میکروبی بالا علیه بعضی گونه‌های باکتریایی و مخمرهای پاتوژن انسانی از اهمیت زیادی برخوردار است (Hajlaoui *et al.*, 2008). تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با خاصیت کنه‌کشی اسانس پونه‌ی کوهی روی کنه‌ی واروا صورت

نگرفته است. لذا با توجه به مزایای استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل کنه‌ی واروا، در این تحقیق استفاده از اسانس گیاه پونه‌ی کوهی به منظور کنترل این آفت مد نظر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی کنه‌ی واروا از روی بدن زنبور عسل اروپایی و تهیه‌ی نمونه‌های گیاهی

در پژوهش حاضر جداسازی کنه از روی بدن زنبور عسل، با استفاده از گاز دی‌اکسیدکربن و مطابق با روش Ariana *et al.* (2002) صورت پذیرفت. کنه‌های جداشده پس از به هوش آمدن توسط قلم‌مو به درون پتری‌دیش‌ها منتقل شدند. زنبورهای عسل نیز دو ساعت پس از به هوش آمدن برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند.

گیاه پونه‌ی کوهی در بهار سال ۱۳۸۷ از باغات اطراف شهرستان شیروان جمع‌آوری شد. برگ‌های این گیاه پس از جمع‌آوری در محل کاملاً تاریک خشک شده و در پاکت‌های کاغذی در فریزر، در دمای ۲٤- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند.

تهیه‌ی اسانس

به منظور اسانس‌گیری از برگ پونه‌ی کوهی، برگ‌ها با استفاده از آسیاب برقی خرد شدند. هر بار ٤۰ گرم از برگ‌های خردشده به‌همراه ٦۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیری شیشه‌ای مدل Clevenger در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ٤ ساعت اسانس‌گیری شد (Negahban *et al.*, 2007). اسانس‌های حاصله با کمک سولفات سدیم آب‌گیری شده و تا زمان استفاده در ظروف پلاستیکی به حجم ۲ میلی‌لیتر با روپوش آلومینیومی در یخچال در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند (Negahban *et al.*, 2006).

آزمایشات زیست سنجی

آزمایش‌های زیست‌سنجی برای ارزیابی خاصیت کنه‌کشی اسانس گیاه پونه‌ی کوهی روی کنه‌ی واروا و مقایسه‌ی میزان حساسیت این آفت با میزبان خود، زنبور عسل اروپایی، انجام پذیرفت. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین حدود پایین و بالای غلظت اسانس مورد

مطالعه که موجب ایجاد مرگ و میر بین ۲۰ تا ۸۰ درصد در کنه‌های تیمارشده گردید، آزمایش‌های اصلی انجام پذیرفت. بدین منظور هر ۱۰ عدد کنه‌ی ماده بالغ ۱ تا ۳ روزه که به تازگی از حجره‌های شفیرگی خارج شده بودند، پس از جدا شدن از روی بدن زنبور عسل به درون یک پتری‌دیش (با قطر دهانه‌ی ۱۸/٤٤ سانتی‌متر و حجم ۸۰۰ میلی‌لیتر) منتقل شدند. کنه‌های داخل پتری‌دیش با استفاده از میکروپیپت و با کمک کاغذ صافی (واتمن شماره ۱ به قطر ۲ سانتی‌متر) نصب‌شده در سطح داخلی دهانه‌ی پتری‌دیش به مدت ۱۰ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۰/۷۲، ۱/۰۹، ۱/٦٥، ۲/۵۱ و ۳/۷۵ میکرولیتر بر لیتر هوا) اسانس گیاه مورد مطالعه که با فاصله‌ی لگاریتمی محاسبه شدند، قرار گرفتند. به‌منظور جلوگیری از هدر رفتن اسانس، درِ پتری‌دیش‌ها توسط پارافیلم کاملاً بسته شد. تمامی تیمارها تحت شرایط اتاق رشد با دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی۵ ± ٤۰ درصد و تاریکی نگه‌داری شدند. پس از شروع اسانس‌دهی تعداد کنه‌های زنده و مرده به صورت هر یک ساعت یک‌بار و حداکثر تا ۱۰ ساعت ثبت گردید. تیمار شاهد نیز در شرایط مشابه و بدون اعمال اسانس نگه‌داری شد. تمامی غلظت‌ها و تیمار شاهد ٤ بار تکرار شدند. عدم حرکت در پاها و کلیسر کنه‌های تیمارشده و شاهد، به‌عنوان علایم مرگ در نظر گرفته شد.

برای ارزیابی اثر اسانس پونه‌ی کوهی روی زنبور عسل، آزمایشی مشابه آزمایش فوق انجام پذیرفت. در این آزمایش نیز پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین حدود پایین و بالای غلظت اسانس مورد مطالعه، تعداد ۱۰ عدد زنبور عسل کارگر صفر تا ۳ روزه، داخل پتری‌دیش‌هایی به حجم ۸۰۰ میلی‌لیتر در معرض غلظت‌های مختلف (۳/۰۷، ۳/۵۳، ٤/۰٦، ٤/٦۷، ۵/۳۷ و ٦/۲۵ میکرولیتر بر لیتر هوا) اسانس پونه‌ی کوهی که با فاصله‌ی لگاریتمی محاسبه شده بودند، قرار گرفتند. تیمارها در شرایط انکوباتور (دمای ۳۲ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰-٤۵ درصد و تاریکی) نگه‌داری شدند و تعداد افراد زنده و مرده پس از شروع اسانس‌دهی و هر یک ساعت یک‌بار و حداکثر تا ۱۰ ساعت شمارش شدند. زنبورهایی که قادر به حرکت پاها و بال‌های خود نبودند به عنوان مرده در نظر گرفته شدند.

در هر آزمایش درصد مرگ و میر اصلاح‌شده طبق فرمول Abbott (1925) و مقادیر LC_{50} به روش Finney (1971) به کمک نرم‌افزار SAS 6.12 محاسبه شد. از تجزیه واریانس یک‌طرفه

(One-way ANOVA) برای بررسی درصد مرگ و میر کنه‌ی واروا و زنبور عسل اروپایی در غلظت‌های مختلف در هر واحد زمانی استفاده شد. قبل از تجزیه‌ی واریانس، داده‌ها با استفاده از جذر آرک‌سینوس (arcsinus) مرگ و میر اصلاح شدند. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (Tukey's test) در سطح احتمال آماری پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش‌های زیست‌سنجی نشان داد که اسانس گیاه پونه‌ی کوهی اثرات قابل توجهی علیه کنه‌ی واروا در پی داشته است. مقادیر LC_{50}، شیب خط رگرسیون، عرض از مبدأ و حدود اطمینان ۹۵ درصد مربوط به کنه‌ی واروا و زنبور عسل اروپایی نشان می‌دهد که اسانس پونه‌ی کوهی بر هر دو گونه‌ی مورد آزمایش اثر کشندگی دارد (جدول ۱)، اما میزان تلفات با توجه به غلظت اسانس، مدت زمان اسانس‌دهی و نوع موجود مورد آزمایش تغییر پیدا می‌کند. نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که مقدار LC_{50} اسانس پونه‌ی کوهی با مقایسه‌ی حدود اطمینان ۹۵ درصد، ۹ و ۱۰ ساعت پس از اسانس‌دهی در کنه‌ی واروا به ترتیب ۲/۰۵ و ۱/٦٥ میکرولیتر بر لیتر هوا و در زنبورهای عسل کارگر به‌ترتیب ۵/۰۸ و ٤/۷٦ میکرولیتر بر لیتر هوا می‌باشد. مقایسه‌ی حدود بالا و پائین برای مقادیر LC_{50}، در هر دو گونه‌ی مورد آزمایش، نشان‌دهنده‌ی عدم هم‌پوشانی و وجود تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها است. بر اساس مقادیر LC_{50} و حدود اطمینان برآوردشده، معلوم گردید که کنه‌ی واروا در مقایسه با زنبور عسل اروپایی حساسیت بالاتری نسبت به اسانس پونه‌ی کوهی دارد. شکل ۱ رابطه‌ی لگاریتم غلظت و پروبیت درصد تلفات کنه‌های واروا و زنبورهای عسل تیمارشده با غلظت‌های مختلف اسانس پونه‌ی کوهی را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت اسانس مورد مطالعه، میزان مرگ و میر موجودات مورد آزمایش افزایش پیدا می‌کند.

شکل ۲ نیز نشان می‌دهد که در غلظت ۲/۵ میکرولیتر بر لیتر هوا پس از ۵، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ ساعت اسانس‌دهی میزان مرگ و میر در کنه‌های تیمارشده به ترتیب ۲۲/۵، ۳۲/۵، ٤۰، ۵۷/۵، ٦۲/۵ و ٦۵ درصد و در زنبورهای عسل کمتر از ٦ درصد بود. با افزایش زمان

اسانس‌دهی تا ۷ ساعت میزان مرگ و میر در غلظت ۳/۱۲ میکرولیتر بر لیتر هوا، در کنه‌ی واروا به ٤٥ درصد و در زنبور عسل به۷/۵ درصد رسید؛ اما در همین غلظت پس از ۹ ساعت اسانس‌دهی میزان تلفات در کنه‌ی واروا ۵۵ درصد و در زنبور عسل کمتر از ۱۰ در صد بود.

جدول ۱. مقادیر LC_{50} محاسبه‌شده‌ی اسانس پونه‌ی کوهی، *M. longifolia*، روی کنه‌ی واروا، *V. destructor*، و زنبور عسل اروپائی، *A. mellifera*.

Table 1. Estimated LC_{50} values of *M. longifolia* essential oil for *V. destructor* and *A. mellifera*.

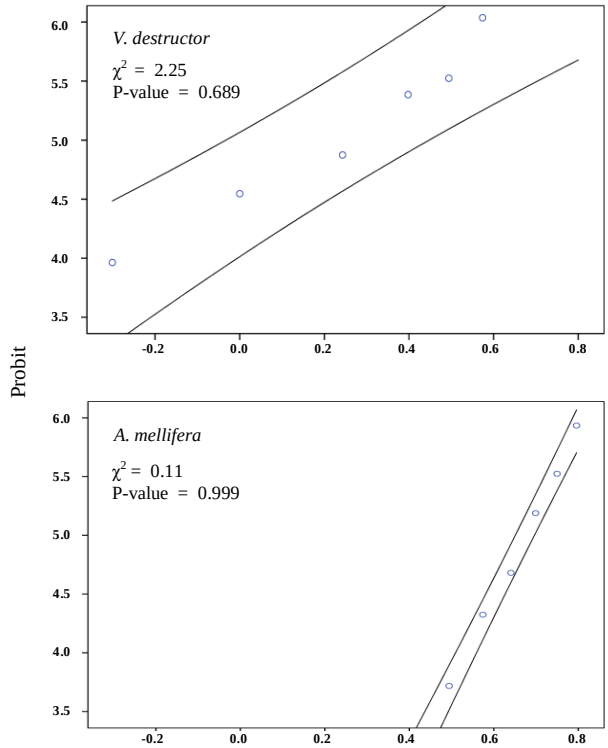
Species	Time (h)	n	LC_{50} (95% fiducial limits) (µl/l air)	Intercept ± SE	df	Slope ± SE
V. destructor	9	240	2.05 (1.64 – 2.64)	4.64 ± 0.12	4	2.08 ± 0.41
	10	240	1.65 (1.36 – 1.98)	4.52 ± 0.12	4	2.37 ± 0.42
A. mellifera	9	240	5.08 (4.78 – 5.54)	0.09 ± 0.72	4	6.59 ± 1.04
	10	240	4.76 (4.50 – 5.05)	-0.10 ± 0.71	4	7.52 ± 1.04

همچنین در غلظت ۳/۱۲ میکرولیتر بر لیتر هوا، افزایش زمان اسانس‌دهی از ۵ ساعت به ۱۰ ساعت منجر به افزایش میزان تلفات کنه‌ی واروا از ۲۵ درصد به ۷۰ درصد شد، در حالی که در زنبور عسل میزان مرگ و میر از ۲/۵ درصد تنها به ۷/۵ درصد رسید. بیشترین میزان تلفات کنه‌ی واروا (۸۵ درصد) پس از ۱۰ ساعت اسانس‌دهی و در غلظت ۳/۷۵ میکرولیتر بر لیتر هوا حاصل شد که در شرایط مشابه میزان مرگ و میر در زنبور عسل حدود ٢٤ درصد بود. این امر نشان‌دهنده‌ی تحمل بالای زنبور عسل اروپایی در مقایسه با این کنه در برابر اسانس پونه‌ی کوهی است (شکل ۲).

بحث

استفاده از اسانس‌های گیاهی برای کنترل کنه‌ی واروا به دلیل افزایش گزارش‌ها مبنی بر مقاومت این آفت به سموم شیمیایی از قبیل تئوفلووالینات، کومافوس و آمیتراز و آلودگی محصولات کندو یک امر ضروری به شمار می‌آید. در طی سال‌های اخیر، آزمایش‌های گسترده‌ای به‌منظور بررسی خواص کنه‌کشی اسانس‌های گیاهی روی کنه‌ی واروا صورت گرفته است که تعدادی از آن‌ها اثرات مطلوبی را در پی داشته‌اند. نتایج حاصل از پژوهش

حاضر نشان می‌دهد که اسانس پونه‌ی کوهی دارای اثـر کـشندگی روی هـر دو گونـه‌ی مـورد آزمایش بوده و این تأثیر با توجه به غلظت اسانس، زمان اسانس‌دهی و گونه‌ی مـورد آزمـایش تغییر پیدا می‌کند. بر اساس LC_{50} محاسبه‌شده برای هر دو گونه‌ی مورد آزمایش در این تحقیق، کنه‌ی واروا در مقایسه با زنبور عسل اروپایی حساسیت بالاتری نسبت به اسانس پونه‌ی کوهی از خود نشان می‌دهد. نتایج آزمایش‌های مختلف نیز نشان می‌دهد که کنه‌ی واروا از حساسیت

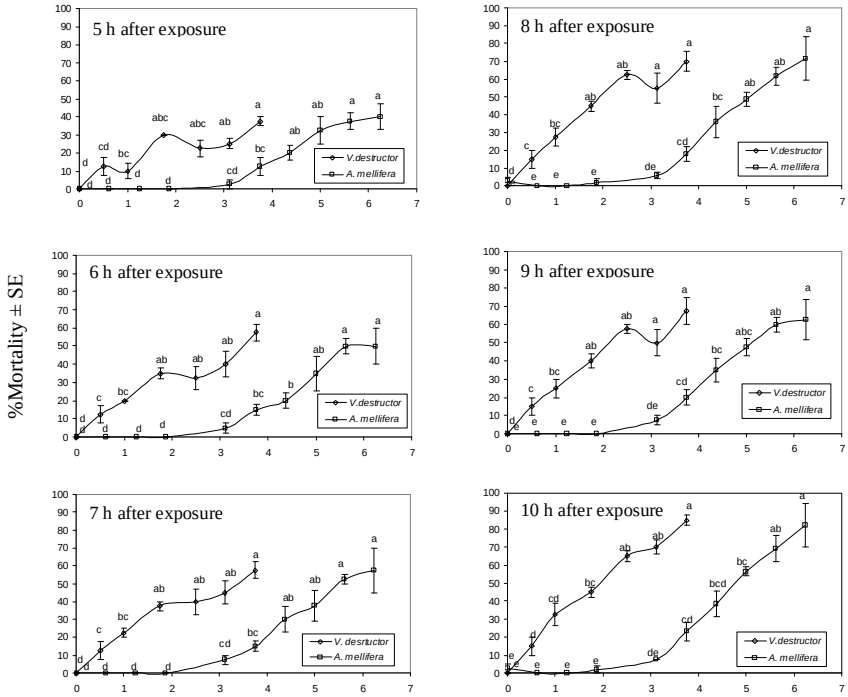


شکل ۱. رگرسیون خطی غلظت‌های مختلف اسانس پونه‌ی کوهی روی کنـه‌ی واروا و زنبـور عسل اروپائی پس از ۱۰ ساعت اسانس‌دهی با حدود اطمینان ۹۵ درصد.

Fig. 1. Regression line plot with 95% fiducial limits for different concentrations of *M. longifolia* essential oil on *V. destructor* and *A. mellifera* 10 h after exposure.

بالاتری در مقایسه با زنبور عسل در برابر اسانس‌های گیاهی مختلف برخوردار است. با افزایش غلظت اسانس پونه‌ی کوهی میزان لرزش در کلیسرها و پاهای کنه‌های تیمارشده افزایش پیدا کرد. همچنین، هیجان و میزان انقباض‌های ماهیچه‌های شکمی در زنبورهای عسل، با افزایش غلظت و زمان اسانس‌دهی افزایش یافت. Ruffinengo *et al*. (2007) نشان دادند که ۵۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس دو گونه‌ی گیاهی *Tagetes minuta* L. و *Heterodera latifolia* Buckey پس از ٤٨ ساعت اسانس‌دهی به روش پاششی با داشتن تلفات کمتر از ۱۰ درصد در زنبور عسل منجر به مرگ و میر بیش از ۷۰ درصد کنه‌های تیمار شده گردید.

بررسی آزمایشگاهی فوق موید این مطلب است که زنبور عسل در مقایسه با کنه‌ی واروا از تحمل بالاتری در برابر اسانس گیاهان مورد مطالعه برخوردار است که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد. نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که فاکتورهایی از قبیل جثه بزرگ‌تر، وزن بیشتر بدن، میزان اجسام چربی و فعالیت بالای آنزیم‌هایی که در غیرسمی کردن مواد سمی وارد شده به بدن نقش دارند، از جمله‌ی عوامل کلیدی در متحمل بودن یک حشره به یک عامل سمی است (Javvi *et al*., 2005). با توجه به این مطلب، می‌توان تحمل بیشتر زنبور عسل اروپایی را در مقایسه با کنه‌ی واروا نسبت به اسانس پونه‌ی کوهی به عوامل فوق و همچنین وجود کیسه‌های هوایی بزرگ در داخل بدن که امکان عمل تهویه‌ی بیشتر را برای این حشره فراهم می‌کند نسبت داد. مطالعات Ariana *et al*. (2002) نشان دادند که ۲۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس گیاه *Mentha pulegium* L. پس از ۳ ساعت اسانس‌دهی به روش تماسی منجر به از بین رفتن ۲۵ درصد کنه‌های مورد آزمایش گردید که در مقایسه با اسانس مورد مطالعه در تحقیق حاضر اثر کنه‌کشی کمتری روی کنه‌ی واروا دارد. نتایج حاصل از آزمایش حاضر نشان داد که در دو غلظت ۲/۵ و ۳/۱۲ میکرولیتر بر لیتر هوا، پس از ۱۰ ساعت اسانس‌دهی با اسانس پونه‌ی کوهی میزان تلفات در کنه‌ی واروا به‌ترتیب ٦٥ و ۷۰ درصد و در زنبور عسل ۵ و ۷ درصد بود که این میزان تلفات در زنبورهای تیمارشده از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با تلفات مشاهده شده در تیمار شاهد نداشت. با افزایش غلظت اسانس تا ۳/۷۵ میکرولیتر بر لیتر هوا، میزان مرگ و میر در کنه‌ی واروا و زنبور عسل به‌ترتیب به ۸۵ و ٢٤ درصد رسید که با وجود ایجاد مرگ و میر قابل توجه در کنه‌های تیمارشده، تلفات سنگینی بر زنبور عسل وارد شد.



شکل ۲. روند مرگ و میر کنه‌ی واروا و زنبور عسل اروپایی در غلظت‌های مختلف اسانس پونه‌ی کوهی در زمان‌های مختلف (میانگین‌های با حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد می‌باشد).

Fig. 2. Percentage mortality of *V. destructor* and *A. mellifera* exposed to essential oil of *M. longifolia* for various periods of time (means with the same letters are not significantly different at $p < 0.05$, Tukey's test).

لذا با تنظیم غلظت و زمان اسانس‌دهی، اسانس پونه‌ی کوهی می‌تواند با داشتن حداقل تلفات بر زنبور عسل (۵ درصد)، نتایج مطلوبی به منظور کنترل کنه‌ی واروا در پی داشته باشد. ترکیبات مونوترپنوئیدی از قبیل کارواکرول، تیمول، منتول، کامفور و اکالیپتول که به طور عمده در اسانس گیاهان مختلف مشاهده می‌شوند، می‌توانند اثرات کشندگی مطلوبی بر کنه‌ی واروا داشته باشند.

در این ارتباط Imdorf *et al*. (1995b) نشان دادند که تیمول، کامفور و منتول بدون داشتن اثـرات سوء قابل توجه بر زنبور عسل تلفات چشم‌گیری به کنه‌ی واروا وارد می‌کنند. بر اساس تحقیقات Ruffinengo *et al*. (2005)، اسـانس دو گونـه‌ی گیـاهی *Acantholipia seriphioides* Mold. و *Schinus molle* L. خاصیت کنه‌کشی مطلوبی در کنترل کنه‌ی واروا دارد. از آن‌جا کـه ترکیبـات اصلی اسانس این دو گیاه را تیمول، کارواکرول و ارتوسیمن تشکیل می‌دهد، خواص کنه‌کـشی آن‌ها را به وجود ترکیبات فوق نسبت داده‌انـد. همچنـین Colin *et al*. (1994) نـشان دادنـد کـه پاشش امولسیون آبی کارواکرول روی کنه‌ی واروا، پس از ۲٤ ساعت منجر به از بین رفتن بیش از ۹۰ درصد کنه‌های تیمارشـده مـی‌شـود. Ellis & Baxendale (1997) نیـز در مطالعـات خـود دریافتند که تیمول، منتول، سیترال و کارواکرول تلفات قابل توجهی بر کنـه‌ی تراشـه‌ای زنبـور عسل (*Acarapis woodi* Rennie) وارد می‌کند. بررسی‌هـای Young-Joon *et al*. (1998) نـشان داد که کارواکرول خاصیت کنه‌کشی مطلوبی در کنترل کنه‌ی دولکه‌ای دارد. بـر اسـاس تحقیقـات متعدد انجام شده روی اجزاء ترکیبات اسانس پونه‌ی کوهی، اثبات شده است که ترکیباتی مانند منتول، تیمول، پولگون، ۱ و ۸ سینئول، کارواکرول، منتون، پیپریتنون اکساید و سیس- پیپریتون اپوکساید اجزای اصلی ترکیبات اسانس این گیـاه را تـشکیل مـی‌دهنـد (Gulluce *et al*., 2007; Hajlaoui *et al*., 2008; Harminder *et al*., 2008). بنابراین می‌توان خواص کنه‌کشی اسانس پونه‌ی کوهی بر کنـه‌ی واروا را بـه وجـود ترکیبـات مـؤثر موجـود در آن از قبیـل تیمـول، منتـول و کارواکرول نسبت داد. بر همین اساس، تولید کنه‌کش‌هایی که اجزای مؤثره‌ی آن‌ها را ترکیبـات گیاهی تشکیل می‌دهند، قابلیت جایگزینی با بسیاری از سموم پرخطر شیمیایی را در برنامه‌های کنترل تلفیقی آفات زنبور عسل اروپـایی دارا هـستند. تـاکنـون، مکانیـسم دقیـق نحـوه‌ی اثـر اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مربوط به آن‌ها مشخص نشده است. اما مطالعات اخیـر در ایـن زمینه نشان می‌دهد که این ترکیبات بر سیستم گیرنده‌هـای اکتوپـامینی بـی‌مهرگـان اثـر دارنـد (Ennan *et al*., 1998). گیرنده‌های اکتوپامین به شکلی که در حشرات وجـود دارنـد، از سیـستم عصبی مهره‌داران گزارش نشده است. بنابراین با انجام آزمایش‌های بیشتر روی سمیت تنفـسی اسانس مورد مطالعه در پژوهش حاضر بـر کنـه‌ی واروا و زنبـور عـسل اروپـایی، و همچنـین ارزیابی آن در شرایط طبیعی، اسانس پونه‌ی کوهی می‌تواند در آینده به عنوان یکی از ترکیبات

کم‌خطر برای انسان و محیط زیست به‌منظور کنترل کنه‌ی واروا در زنبورستان‌ها مورد توجه قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از همکاری کارکنان بخش زنبور عسل مؤسسه‌ی تحقیقات علوم دامی کشور و همچنین آقایان محمد آقایی و علی کیان به‌منظور در اختیار قرار دادن کندوهای آلوده به کنه‌ی واروا صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

منابع

Abbott, W. S. (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265-267.

Anderson, D. L. & Trueman, J. W. H. (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24, 165-189.

Ariana, A., Ebadi, R. & Tahmasbi, G. H. (2002) Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology* 27, 319-327.

Bowen-Walker, P. & Gunn, A. (2001) The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101, 207-217.

Calderone, N. W. (1999) Evaluation of formic acid and thymol-based blend of natural products for the control of *Varroa jacobsoni* in colonies of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology* 92, 253-260.

Calderone, N. W. & Spivak, M. (1995) Plant extracts for control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* in colonies of the western honey bee. *Journal of Economic Entomology* 88, 1211-1215.

Colin, M. E., Ciavarella, F., Otero-Colina, G. & Beizunces, L. P. (1994) A method for characterizing the biological activity of essential oil against *Varroa jacobsoni*. pp. 109-114 in Matheson, A. (Ed.) *New perspectives on varroa*. 164 pp. International Bee Research Association, Cardiff, United Kingdom.

De Jong, D., De Jong, P. H. & Goncalves, L. S. (1982) Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* 21, 165-167.

Ebrahimi, M. V., Nabian, S., Tahmasbi, G. H. & Bahreini, R. (2006) The comparison of Thymol, Menthol, and Perizine on varroa mite (*Varroa destructor*) in Dehbakri region of Kerman province, Iran. *Agricultural Science* 17(1), 165-171.

Ellis, M. D. & Baxendale, F. P. (1997) Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonomidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *Journal of Economic Entomology* 90(5), 1087-1091.

Elzen, P. J., Eischen, F. A., Baxter, J. B., Pettis, J., Elzen, G. W. & Wilson, W. T. (1998) Fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni* from several geographic locations. *American Bee Journal* 138(9), 674-676.

Ennan, E., Beiger, M. & Kende, A. (1998) Insecticidal action of terpens and phenols to cockroaches: effects of octopamine receptors. *International Symposium on Plant Protection, European and Mediterranean Plant Protection Organization, Gent, Belgium.*

Finney, D. J. (1971) *Probit analysis.* 3rd ed. 333 pp. Cambridge University Press, London.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. & Ozkan, H. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry* 103, 1449-1456.

Hajlaoui, H., Snoissi, M., Ben Jannet, H., Mighri, Z. & Bakhrouf, A. (2008) Comparison of chemical composition and antimicrobial activities of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). *Annals of Microbiology* 58(3), 513-520.

Harminder, P. S., Daizy, R. B., Sunil, M., Kuldeep, S. D., Surender, Y. & Ravinder, K. K. (2008) Constituents of leaf essential oil of *Mentha longifolia* from India. *Chemistry of Natural Compounds* 44(4), 528-529.

Imdorf, A., Bogdanov, S., Ibanez Ochoa, R. & Calderone, N. W. (1999) Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* in honey bee colonies. *Apidologie* 30, 209-229.

Imdorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V. & Maquelin, C. (1995a) Apilife var: a new varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World* 76(2), 77-83.

Imdorf, A., Kilchenmann, V., Bogdanov, S., Bachofen, B. & Beretta, C. (1995b) Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* oud. and *Apis mellifera* L. in a laboratory test. *Apidologie* 26, 27-31.

Javvi, E., Safar Alizadeh, M. H. & Pourmirza, A. A. (2005) Studies on the effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on different larval instars of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemelineata* (Say), and the role of synergists in enhancement of it's efficiency under laboratory conditions. *Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources* 8(4), 187-199.

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

Melathopoulus, A., Winston, M., Whttington, R., Smith, T., Lindberg, A., Mukai, A. & Moore, M. (2000) Comparative laboratory toxicity of neem pesticide to honey bees, their mite parasites *Varroa jacobsoni* and *Acarapis woodi*, and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascospharea apis*. *Journal of Economic Entomology* 93, 199-209.

Milani, N. (1995) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26, 415-429.

Negahban, M., Moharramipour, S. & Sefidkon, F. (2006) Insecticidal activity and chemical composition of *Artemisia sieberi* Besser essential oil from Karaj, Iran. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 9, 61-66.

Negahban, M., Moharramipour, S. & Sefidkon, F. (2007) Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Product Research* 43, 123-128.

Ruffinengo, S., Eguaras, M., Cora, D., Bailac, P., Rodriguez, E., Ponzi, M. & Bedascarrasbure, E. (2002) Biological activity of *Heterotheca latifilia* Buckey (Compositae) essential oil against *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari). *Journal of Essential Oil Research* 14, 462-464.

Ruffinengo, S., Eguaras, M., Floris, I., Faverin, C., Bailac, P. & Ponzi, M. (2005) LC_{50} and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology* 98(3), 651-655.

Ruffinengo, S., Maggi, M., Faverin, C., Rosa, S. B., Bailac, P., Principal, J. & Eguaras, M. (2007) Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Zootecnia Tropical* 25(1), 63-69.

Young-Joon, A., Seong-Baek, L., Hoi-Seon, L. & Gil-Ha, K. (1998) Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and β-thujaplicine derived from *Thujopsis dolaborata* var. *hondai* Sawdust. *Journal of Chemical Ecology* 24(1), 81-90.