

Laboratory Evaluation of the Larvicidal Activity of Essential Oils from Three *Mentha* Species Against *Anopheles stephensi*

Zahra Momen¹,
Mahmoud Fazeli-Dinan²,
Somayeh Shahani^{3, 4},
Mohammad Azadbakht⁵,
Fatemeh Mirzaee⁶,
Seyed Hassan Nikookar⁷,
Ahmad Ali Enayati⁸

¹ MSc in Medical Entomology, Neka Health Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, Health Sciences Research Centre, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants and Metabolic Disorders, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants and Metabolic Disorders, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Assistant Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, Health Sciences Research Center, Addiction Institute, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 30, 2024; Accepted July 27, 2025)

Abstract

Background and purpose: Considering the increasing resistance of disease-transmitting mosquitoes, particularly malaria vectors, to chemical insecticides, as well as the environmental and health concerns arising from their excessive use, this study investigates the insecticidal effects of essential oils from three native *Mentha* species in Mazandaran Province on *Anopheles stephensi* larvae, which could contribute to the development of safe and effective plant-based insecticides.

Materials and methods: In this laboratory experimental study, the samples of three *Mentha* species were collected from different regions of Mazandaran Province. Essential oils were extracted using the Clevenger apparatus. The chemical composition of the essential oils was analyzed using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Bioassays were conducted on late third- and early fourth-instar larvae of *Anopheles stephensi* following the World Health Organization (WHO) protocol. Data were analyzed using probit regression in RStudio, and LC₂₅, LC₅₀, and LC₉₉ values were calculated.

Results: According to the LC₂₅, LC₅₀, and LC₉₉ values, Horsemint exhibited the highest larvicidal activity, with values of 57.50, 77.64, and 218.80 mg/L, respectively, while peppermint showed the lowest activity, with values of 106.88, 143.29, and 393.75 mg/L, respectively. Based on the GC–MS analysis, the number of identified chemical compounds in the essential oils of peppermint, Horsemint, and water mint was 30, 40, and 43, respectively. The most abundant compound identified in the essential oils of peppermint, Horsemint, and water mint was menthol (23.61%), piperitenone oxide (22.63%), and 1,8-cineole (18.54%), respectively. Moreover, 1,8-cineole was observed as a common constituent in the essential oils of all three species.

Conclusion: It was found that all three plants exhibited significant larvicidal effects against *Anopheles stephensi* larvae. Considering that plant-derived insecticides and medicines generally have fewer side effects than chemical compounds, the findings of this study provide valuable insights into the potential use of essential oils as safe and effective alternatives to conventional chemical insecticides.

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (248): 17-31 (Persian).

Corresponding Author: Mahmoud Fazeli Dinan - Mazandaran University of Medical Sciences, Sari Health Faculty, Iran (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com) & Ahmad Ali Enayati- Department of Medical Entomology and Vector Control, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari (E-mail: aenayati1372@gmail.com)

بررسی اثر لارو کشی اسانس سه گونه گیاه نعناع روی پشه آنوفل استفنیسی در شرایط آزمایشگاهی

زهرا مومن^۱
محمود فاضلی دینان^۲
سمیه شاهانی^۳ و^۴
محمد آزادبخت^۵
فاطمه میرزائی^۶
سید حسن نیکوکار^۷
احمدعلی عنایتی^۸

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به افزایش مقاومت پشه‌های ناقل بیماری‌هایی مانند مالاریا در برابر سموم شیمیایی و نگرانی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه آن‌ها، این پژوهش با هدف ارزیابی اثرات حشره کشی اسانس‌های سه گونه نعناع بومی مازندران (نعناع فلفلی، آبی و پونه) روی لارو پشه آنوفل استفنیسی انجام پذیرفت که می‌تواند راهگشای تولید حشره کش‌های گیاهی ایمن و مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نمونه‌های سه گونه نعناع (فلفلی، آبی و پونه) از مناطق مختلف استان مازندران جمع‌آوری شدند و اسانس‌گیری به روش کلونجر انجام شد. ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها با دستگاه GC-MS آنالیز شد. آزمون زیست‌سنجی روی لاروهای اواخر سن سوم و اوایل سن چهارم پشه آنوفل استفنیسی بر اساس پروتکل WHO انجام شد. داده‌ها با رگرسیون پروبیت در نرم‌افزار Rstudio تحلیل و مقادیر LC₂₅، LC₅₀ و LC₉₉ محاسبه گردید.

یافته‌ها: با توجه به مقادیر LC₂₅، LC₅₀ و LC₉₉ اسانس گیاه نعناع پونه به ترتیب ۵۷/۵۰، ۷۷/۶۴، ۲۱۸/۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین و اسانس گیاه نعناع فلفلی به ترتیب ۱۰۶/۸۸، ۱۴۳/۲۹، ۳۹۳/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر کم‌ترین اثر لارو کشی را نشان داد. بر اساس طیف GC-MS در اسانس گیاهان نعناع فلفلی، نعناع پونه و نعناع آبی به ترتیب تعداد ۳۰، ۴۰ و ۴۳ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. بیش‌ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاهان نعناع فلفلی، نعناع پونه و نعناع آبی؛ به ترتیب شامل ترکیب منتول ۲۳/۶۱ درصد، اکسید پیرپیتون، ۲۲/۶۳ درصد و ۱ و ۸-سینئول ۱۸/۵۴ درصد بود. هم‌چنین ترکیب ۱ و ۸-سینئول به‌عنوان ترکیب مشترک در اسانس هر سه گیاه دیده شد.

استنتاج: هر سه گیاه نعناع فلفلی، نعناع پونه و نعناع آبی اثر بخشی مناسبی را بر کشندگی لارو آنوفل استفنیسی دارند. با توجه به این که گیاهان به‌عنوان منابع تهیه حشره کش‌ها، عوارض کم‌تری را نسبت به ترکیبات شیمیایی دارند، بنابراین نتایج این تحقیق می‌تواند چشم‌انداز مناسبی را در استفاده از اسانس گیاهان به‌عنوان جایگزین مناسب برای حشره کش‌های شیمیایی ارائه نماید.

واژه‌های کلیدی: آنوفل استفنیسی، لارو کشی، اسانس، نعناع پونه، نعناع آبی، نعناع فلفلی

مؤلف مسئول: محمود فاضلی دینان - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده بهداشت
E-mail: fazelidinan@gmail.com

احمد علی عنایتی - آدرس: ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده بهداشت
E-mail: aenayati1372@gmail.com

۱. کارشناسی ارشد حشره شناسی پزشکی، کارشناس بهداشت و درمان شهرستان نکا، ایران
 ۲. دانشیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۳. دانشیار، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۴. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده داروهای گیاهی و اختلالات متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۵. استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۶. استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده داروهای گیاهی و اختلالات متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۷. استادیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، موسسه اعتبار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۸. استاد گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۸/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۵/۵

مقدمه

پشه‌ها ناقلین اصلی بیماری‌های ویروسی و انگلی هستند که سلامت عمومی را به شدت تهدید می‌کنند، که می‌توان به مالاریا، تب دنگی، تب زرد، چیکونگونیا، فیلاریازیس و آنسفالیت ژاپنی، اشاره کرد (۱، ۲). پشه‌ی *Anopheles stephensi* یکی از ناقلین برجسته مالاریا در آسیا محسوب می‌شود و اخیراً با گسترش به شاخ آفریقا، چالش‌های نوینی در زمینه کنترل بیماری ایجاد کرده است (۳، ۴). در ایران نیز این گونه در جنوب کشور پراکندگی وسیعی داشته و ناقل اصلی بیماری مالاریا محسوب می‌شود (۳). با وجود پیشرفت‌های علمی، مالاریا هم‌چنان یکی از شایع‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های عفونی در سطح جهان و ایران باقی مانده است و بیش از ۴۰ درصد جمعیت جهان را در معرض خطر قرار می‌دهد. برای مقابله با این بحران جهانی، راهبردهای پایدار و اقدامات پیشگیرانه ضروری هستند (۷-۵).

استفاده‌ی بلند مدت از حشره‌کش‌های شیمیایی برای کنترل ناقلین بیماری و آفات، با افزایش مقاومت حشرات هدف و پیامدهای منفی برای محیط زیست و سلامت انسان همراه بوده است (۸، ۹). کاهش اثر بخشی، آسیب به موجودات غیر هدف، آلودگی منابع طبیعی و تهدید تنوع زیستی از جمله چالش‌های مهم ناشی از این ترکیبات هستند. این مسئله، ضرورت بهره‌گیری از رویکردهای جایگزین یا تلفیقی را مطرح کرده است؛ از جمله استفاده از ترکیبات طبیعی با منشأ گیاهی که با کاهش آسیب‌های زیست محیطی، سازگاری بیش‌تری با سلامت انسان دارند (۹، ۱۰). آفت‌کش‌های زیستی گیاهی از منظر سم‌شناسی محیطی، گزینه‌ای ایمن محسوب می‌شوند و بدون برجا گذاشتن باقی‌مانده‌های مضر، اثرات منفی کم‌تری دارند (۱۱). ترکیبات فعال گیاهی، با تأثیر بر گونه‌های هدف، در کنترل آفات عملکرد مؤثرتری دارند. در مقایسه با حشره‌کش‌های شیمیایی که منجر به مقاومت و آلودگی می‌شوند، ترکیبات گیاهی جایگزین کم‌ضررتری به‌شمار می‌آیند (۱۲، ۱۳). به دلیل قابلیت تجزیه پذیری در

محیط زیست، ترکیبات گیاهی می‌توانند در مدیریت تلفیقی ناقلین نقش مکمل و مؤثری ایفا کنند. اسانس‌های گیاهی به‌عنوان مواد مؤثره اصلی، دارای خواص ضد زیستی گسترده‌ای هستند و تولید تجاری آن‌ها، ضمن کاهش وابستگی به ترکیبات شیمیایی، چشم‌اندازی ایمن برای کنترل پایدار ارائه می‌دهد (۱۶-۱۴). در این میان، خانواده نعناعیان از نظر دارویی و کشاورزی اهمیت بالایی دارند. بسیاری از گونه‌های جنس *Mentha* دارای ترکیبات زیست فعال بوده و نقش مهمی در کنترل ناقلین بیماری‌ها ایفا می‌کنند (۱۹-۱۷). از جمله گونه‌های مهم این جنس می‌توان به نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)، نعناع پونه (*Mentha longifolia*) و نعناع آبی (*Mentha aquatica*) اشاره کرد (۲۰). نعناع فلفلی، بومی مدیترانه بوده و در اکثر استان‌های ایران کشت می‌شود. این گیاه دارای ترکیباتی نظیر لیمونن، پولگون و ترانس ساینین هیدرات است و خواص دارویی متنوعی از جمله ضد نفخ، صفرا آور و ضد باکتری دارد (۲۱، ۲۲). نعناع پونه در آسیا و نواحی مدیترانه انتشار دارد و اسانس آن حاوی پیرتینون و ۱،۸-سینئول با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی است (۲۳). نعناع آبی، بومی اروپا و شمال ایران است و اسانس آن شامل ۱،۸-سینئول و پیرتینون اکساید بوده و در درمان اسهال و عفونت‌های مجاری ادراری کاربرد دارد (۲۴، ۲۵). بنابراین این مطالعه به بررسی اثرات لاروکنشی اسانس‌های استخراج شده از سه گونه‌ی مهم نعناعیان شامل، نعناع فلفلی، نعناع پونه و نعناع آبی پرداخته است تا میزان تأثیر آن‌ها بر مرگ لاروهای پشه آنوفل استفسنی سنجیده شود. چرا که با توجه به نقش حیاتی پشه‌ی آنوفل در انتقال مالاریا، کنترل مؤثر جمعیت لاروی آن می‌تواند تأثیر به‌سزایی در کاهش شیوع بیماری داشته باشد. هم‌چنین یافته‌های حاصل از این پژوهش می‌تواند در توسعه‌ی راهکارهای طبیعی و پایدار برای مدیریت ناقلین بیماری‌های واگیر مورد استفاده قرار گرفت و به‌عنوان جایگزینی بالقوه برای روش‌های شیمیایی موجود مطرح شوند.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

گیاهان در این مطالعه تجربی با کد اخلاق IR.MAZUMS.AEC.1402.022 از استان مازندران جمع آوری شدند. گیاه نعنای فلفلی از روستای حسین آباد بهشهر با ۱۸ متر ارتفاع از سطح دریا، "۵۳°۲۲'۵۰" طول جغرافیایی و "۳۶°۴۴'۴۵/۷" عرض جغرافیایی، گیاه نعنای آبی از منطقه نکا روستای دنگسرک با ارتفاع ۱۴ متر از سطح دریا، "۵۳°۱۷'۵۰" طول جغرافیایی و "۳۶°۳۸'۵۹/۶" عرض جغرافیایی و گیاه نعنای پونه از منطقه بهشهر روستای شهید آباد با ارتفاع ۲۰ متر از سطح دریا، "۵۳°۲۹'۴۷" طول جغرافیایی و "۳۶°۴۰'۳۹" عرض جغرافیایی، گیاهان جمع آوری شده در سایه و دور از نور مستقیم خشک و شناسایی آن‌ها توسط متخصص سیستماتیک گیاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تایید شد.

اسانس‌گیری

ساقه و برگ گیاهان در جریان هوای طبیعی و دور از نور مستقیم خشک شدند، سپس با آسیاب برقی پودر شده و در ظروف پلاستیکی تیره همراه با اطلاعات گیاه ذخیره شدند. برای استخراج اسانس، ۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه در بالن ۲۰۰۰ میلی لیتری حاوی آب مقطر دیونیزه قرار گرفت و به دستگاه کلونجر متصل شد. قطعات حساس با فویل آلومینیومی عایق‌بندی شدند تا اتلاف حرارتی کاهش یابد. پس از تقطیر ۴ ساعته، اسانس‌ها با سدیم سولفات انیدرید خشک و در ظروف شیشه‌ای تیره نگهداری شدند. نمونه‌ها تا انجام تست‌های زیستی و تجزیه GC-MS در یخچال با دمای ۲ تا ۴ درجه سانتی‌گراد حفظ شدند.

انجام کروماتوگرافی گازی و شناسایی ترکیبات اسانس دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Agilent5975 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵

میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS برای تجزیه و تحلیل ترکیبات شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. برنامه دمایی ستون به این صورت تنظیم گردید که دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما و زمان پاسخ ۷۵ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۳ دقیقه به صورت split 1 به ۳۵ و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. این طیف سنجی مورد استفاده مدل Agilent5975 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود.

پرورش کلنی پشه آنوفل

مطابق روش فاضلی و همکاران (۲۰۲۲)، کلنی پشه آنوفل استفسنی تحت شرایط کنترل شده (دمای ۲۷±۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۵±۵ درصد، و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی) در انسکتاریوم به مدت حداقل سه نسل پرورش داده شد (۴). تخم‌ها در ظروف آزمایشگاهی مناسب قرار گرفتند و لاروها پس از تفریح با غذای ماهی TetraMin تغذیه شدند. لاروهای مراحل سوم و چهارم به ظروف مجزا منتقل شدند تا فرآیند شفیرگی بدون اختلال ادامه یابد. پس از ظهور حشرات بالغ، نمونه‌ها با ثبت تاریخ در قفس‌هایی با ابعاد ۴۰×۴۰×۴۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. برای تغذیه، محلول ۱۰ درصد آب قند استفاده شد و جهت خون‌دهی پشه‌های ماده، خوکچه هندی نر هر سه روز یک بار به وسیله مقید کننده روی قفس قرار گرفت. پس از اتمام خون‌دهی، یک کاسه آب بدون کلر برای تخم‌ریزی قرار داده شد که به‌طور روزانه بررسی و تخم‌ها به ظروف لاروی منتقل شدند. تاریخ، نسل و زمان تفریح جهت پایش دقیق کلنی ثبت شد.

آزمون زیست سنجی

نوع گیاه و غلظت و تابع (`summarise()`) برای محاسبه میانگین و خطای استاندارد استفاده شد. برای مدل سازی رابطه دوز-پاسخ و برآورد غلظت های مؤثر LC_{25} ، LC_{50} و LC_{99} ، از مدل رگرسیون پروبیت استفاده شد. این تحلیل ها به صورت جداگانه برای هر اسانس گیاهی با استفاده از بسته های `drc`، `dplyr` و `ggplot2` انجام شد. در هر مدل، نسبت لاروهای مرده به کل لاروها به عنوان متغیر وابسته (پاسخ) و غلظت اسانس (به ppm) به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شد. هم چنین، تعداد کل لاروها به عنوان وزن مشاهدات در مدل لحاظ گردید تا برازش دقیق تری حاصل شود. مقادیر LC_{25} ، LC_{50} و LC_{99} ، همراه با فواصل اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از روش دلتا (Delta method) محاسبه شد. برای هر اسانس، رگرسیون خطی مقدار پروبیت درصد مرگ در برابر لگاریتم غلظت (\log_{10}) برازش داده شد. بر اساس مدل رگرسیون، مقادیر برازش شده و فواصل اطمینان ۹۵ درصد برای هر نقطه محاسبه و در نمودار نهایی نمایش داده شد. در این تحلیل، برای هر اسانس به صورت جداگانه مدل رگرسیون برازش داده شد و سپس نمودار مقایسه ای شامل خطوط برازش شده برای هر اسانس، نقاط مشاهده شده و باند اطمینان مربوطه ترسیم گردید. مقایسه بصری بین اسانس ها از طریق شیب و موقعیت خطوط برازش انجام گرفت. برای تجسم داده ها و نتایج مدل، از بسته های `ggplot2` و `dplyr` استفاده شد. این نمودار امکان بررسی دقیق شیب و موقعیت خط پاسخ را برای هر اسانس فراهم ساخت.

یافته ها

بازدهی اسانس گیاهان

در این مطالعه، استخراج اسانس از ۱۰۰ گرم پودر خشک شده ساقه و برگ سه گونه گیاهی از جنس *Mentha* شامل نعنای فلفلی، نعنای آبی و نعنای پونه انجام گرفت. نتایج حاصل از اندازه گیری حجم اسانس های به دست آمده نشان داد که به ترتیب از گیاهان نعنای

غلظت های مختلف اسانس ها با حل کردن مقادیر متفاوت اسانس در حلال اتانول (حداقل پنج غلظت مختلف) تهیه شدند (اسانس گیاه نعنای آبی: ۷۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر؛ اسانس گیاه نعنای فلفلی: ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰، ۲۰۰ و ۲۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر؛ اسانس گیاه نعنای پونه: ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر). بر اساس روش استاندارد WHO، در هر بشر ۵۰۰ میلی لیتری، ۲۲۴ میلی لیتر آب کلر زدایی شده به همراه یک میلی لیتر اسانس با غلظت های مشخص بر حسب میلی گرم بر لیتر اضافه شد. سپس ۲۵ عدد لاروهای اواخر سن سه و ابتدای سن چهار پشه آنوفل استفسنی در ۲۵ میلی لیتر آب ظروف لاروی به بشر حاوی ۲۲۵ میلی لیتر محلول اضافه شدند (مجموعاً ۲۵۰ میلی لیتر) و در معرض هر یک از غلظت ها قرار گرفتند. برای هر غلظت، سه تکرار در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که برای تیمار شاهد تنها یک میلی لیتر از حلال به بشر اضافه شد (۲۴۹ میلی لیتر آب شیر + یک میلی لیتر حلال اتانولی). تعداد مرگ لاروها در تمام تیمارها و شاهد پس از ۲۴ ساعت شمارش شد و سپس با توجه به داده های ثبت شده در محدوده مرگ ۱۰ تا ۹۰ درصد، مقادیر LC_{50} ، LC_{95} و LC_{99} محاسبه گردید. در این مطالعه، لارو پشه ای که قادر به حرکت و شنا نبود و حتی با تحریک یک قلم مو نیز واکنشی نشان نمی داد، مرده در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

برای تحلیل داده ها، از زبان برنامه نویسی R در محیط نرم افزاری Rstudio نسخه X.4.5 استفاده شد. داده های مرگ لاروی در قالب داده فریم (data frame) ساختار دهی شد. برای انجام محاسبات آماری شامل میانگین درصد مرگ و خطای استاندارد، از توابع موجود در بسته ی `dplyr` استفاده گردید. از تابع (`mutate`) برای محاسبه درصد مرگ؛ تابع (`group_by()`) برای گروه بندی بر اساس

جدول شماره ۱: ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان نعنای پونه، نعنای

فلغلی و نعنای آبی به روش GC-MS

مقدار (درصد)	اسانس گیاه نعناع آبی	مقدار (درصد)	اسانس گیاه نعناع فلغلی	مقدار (درصد)	اسانس گیاه نعناع پونه
۰/۰۴	Alpha-thujene	۰/۰۱	Thujene	۱/۵۲	Alpha-pinene
۱/۸	Alpha-pinene	۰/۱۵	Alpha thujene	۰/۱۹	Camphene
۱/۵۸	Sabinene	۰/۲۶	Alpha pinene	۲/۴۸	Sabinene
۳/۹۷	Beta-pinene	۰/۰۶	Camphene	۰/۶۹	Beta-pinene
۱/۶۷	Beta-myrcene	۰/۰۷	Sabinene	۱/۱۸	Myrcene
۰/۲	Alpha-phellandrene	۰/۰۳	Alpha-Terpinene	۰/۸۱	Limonene
۰/۲۱	Alpha-terpinene	۰/۶۷	P-cymene	۷/۶۲	1,8-Cineol
۱۸/۵۴	1,8-cineol	۲/۳۱	1,8-cineol	۱/۵۴	Z-ocimene
۰/۲۵	Cis-β-ocimene	۰/۰۳	Trans-beta ocimene	۰/۰۴	E-ocimene
۰/۳۶	trans-β-ocimene	۰/۰۳	Gamma-terpinene	۰/۴۷	gamma-Terpinene
۰/۱۴	Terpinolene	۰/۰۴	Cis-sabinene hydrate	۰/۲۲	Terpinolene
۰/۱	Linalool	۰/۲۱	Terpinolene	۰/۶۶	Menthone
۱/۰/۷	Menthone	۰/۵۸	Linalool	۰/۸۴	Iso-pulegone
۱/۴۵	Iso-menthone	۲/۵۲	Allo-ocimene	۱/۴۸	Iso-pulegole
۶/۰۹	Menthofurane	۱۷/۴	Menthone	۴/۱۹	Iso-menthone
۲/۵۶	Neo-menthol	۳/۵۹	Iso-menthone	۲۱/۰۱	Sis-piperitone epoxide
۴/۸۶	Menthol	۳۳/۶۱	Menthol	۱/۹۲	trans-piperitone epoxide
۳/۹۸	Iso-menthol	۰/۶۷	Alpha-Terpineol	۲/۸۲	Trans-carvone oxide
۱/۴۴	Neo-isomenthol	۰/۶۷	Thymol, methyl ether	۳/۳	2-hydroxypiperitone
۰/۶۵	Alpha-terpineol	۰/۵۱	Carvacrol, methyl ether	۱۱/۲۰	Nepetalactone
۴/۴	Trans-dihydrocarvone	۰/۲۷	Piperitone	۲۲/۶۳	Piperitone oxide
۱/۳۶	Trans-carveol	۰/۱۶	Neo-menthyl acetate	۱/۸۴	Cis-jasmone
۱/۳۴	Pulegone	۰/۹۶	Menthyl acetate	۰/۵۱	Beta-bourbonene
۰/۳۱	Carvone	۸/۹۹	3-methoxy acetophenone	۰/۱۸	Beta-clemene
۲/۴۹	Thymol	۲/۹۳	Carvacrol	۰/۲۸	Alpha-humulene
۰/۳۲	Eugenol	۷/۵۶	Metha-acetanisole	۰/۳۵	Gamma-cadinene
۰/۴۷	Piperitone oxide	۰/۲۲	Thymol acetate	۰/۲۱	Calamene
۰/۰۵	Methyl para-anisate	۰/۱۴	Eugenol	۰/۱۷	Caryophyllene oxide
۰/۱۲	Beta-bourbonene	۰/۲۵	Carvacrol acetate	۰/۴۳	Alpha-Himachalene
۰/۴۳	Bate-clemene	۰/۰۴	Beta-bourbonene	۰/۱۷	Alpha-cadinol
۵/۳۴	Beta-caryophyllene	۰/۱	Trans-Jasmone		
۱/۶۶	Humulene	۰/۵۳	Iso-caryophyllene		
۰/۳۹	Beta-E-Famesene	۳/۵۱	Beta-caryophyllene		
۵/۵۴	Germacrene-D	۰/۱۱	Aromandendrene		
۱/۶۷	Bicyclogermacrene	۰/۲۳	Alpha-humulene		
۰/۱	Gamma-cadinene	۰/۴۲	Beta-E-Famesene		
۰/۳۲	Delta-cadinene	۰/۳۳	Germacrene-D		
۰/۶۹	Caryophyllen oxide	۰/۸۷	Bicyclogermacrene		
۲/۰۶	Viridiflorol	۰/۲۶	Delta-cadinene		
۱/۸۷	Alpha-cadinol	۲/۱۵	Spathulenol		
		۲/۹	Viridiflorol		
		۰/۲	Tau-muurolol		
		۰/۴۶	Alpha-cadinol		
Total:		Total:		Total:	
90.79		91.85		91.31	

زیست سنجی

با افزایش غلظت عصاره‌ها، درصد مرگ لاروها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. عصاره نعنای پونه در غلظت ۱۵۰ ppm با میانگین مرگ ۹۴/۷±۳/۵، و نعنای فلغلی در غلظت ۲۴۰ ppm با ۹۳/۳±۶/۶، بیش‌ترین اثر را نشان دادند (جدول شماره ۲).

فلغلی، نعنای آبی و نعنای پونه به میزان ۰/۶، ۱/۵ و ۰/۵ میلی‌لیتر اسانس خالص استخراج شد.

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان بر اساس آنالیز GC-MS

نتایج آنالیز GC-MS نشان داد که اسانس حاصل از نعنای پونه عمدتاً از ترکیبات مونوترپنی و سزکوئی‌ترینی تشکیل شده است. سهم مونوترپن‌ها در این اسانس ۸۹/۰۱ درصد و سهم سزکوئی‌ترین‌ها ۲/۳ درصد محاسبه گردید که بیانگر غلبه ترکیبات مونوترپنی در ساختار شیمیایی اسانس این گونه است. در مجموع، تعداد ۳۰ ترکیب شیمیایی در اسانس نعنای پونه شناسایی شد. مهم‌ترین ترکیبات غالب در اسانس این گیاه به ترتیب شامل اکسید پیریتنون (۲۲/۶۳ درصد)، سیس-پیریتنون اپوکساید (۲۱/۰۱ درصد) و نپتالاکتون (۱۱/۲۰ درصد) بودند. این ترکیبات از جمله مواد مؤثر بیولوژیکی شناخته شده با خواص آنتی‌باکتریال، حشره‌کش و ضد قارچ می‌باشند (جدول شماره ۱). آنالیز GC-MS نشان داد که ترکیبات مونوترپنی در اسانس نعنای فلغلی با سهم ۷۶/۳۸ درصد بیش‌ترین فراوانی را در ترکیب شیمیایی این اسانس دارند. در رتبه بعدی، ترکیبات سزکوئی‌ترینی با سهم ۱۵/۴۷ درصد قرار دارند که در مجموع گویای تنوع قابل توجهی از ترکیبات فرار در این گیاه است. مجموعاً در اسانس گیاه نعنای فلغلی، تعداد ۴۳ ترکیب شیمیایی شناسایی گردید. از میان این ترکیبات، دو ماده غالب به ترتیب متول (۲۳/۶۱ درصد) و متون (۱۷/۴ درصد) بودند. در اسانس نعنای آبی ترکیبات شیمیایی عمدتاً شامل مونوترپن‌ها با سهم ۷۰/۷ درصد و سزکوئی‌ترین‌ها با سهم ۲۰/۰۹ درصد بودند. بر اساس این نتایج، مونوترپن‌ها همانند دو گونه قبلی، غالب‌ترین دسته از ترکیبات شیمیایی را تشکیل می‌دهند. در این اسانس، مجموعاً ۴۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد که ترکیبات اصلی شامل ۱ و ۸-سینئول (۱۷/۵۴ درصد) و متون (۱۰/۰۷ درصد) بودند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۲: تأثیر غلظت اسانس های نعناع آبی، نعناع فلفلی و نعناع پونه بر میانگین درصد مرگ لاروهای پشه آنوفل استنسنسی

اسانس گیاه	غلظت (ppm)	میانگین درصد مرگ SE±	اسانس گیاه	غلظت (ppm)	میانگین درصد مرگ SE±
کنترل	۰	۰	کنترل	۰	۰
نعناع آبی	۵۰	۱۷/۳±۱/۳۳	نعناع فلفلی	۸۰	۱۳/۳±۳/۵۳
نعناع آبی	۷۵	۳۳/۳±۱/۳	نعناع فلفلی	۱۲۰	۲۰±۰
نعناع آبی	۱۰۰	۵۰/۷±۱/۳	نعناع فلفلی	۱۶۰	۴۴±۶/۱
نعناع آبی	۱۲۰	۸۱/۳±۳/۵	نعناع فلفلی	۲۰۰	۶۱/۳±۲/۶
نعناع آبی	۱۵۰	۹۳/۳±۶/۶	نعناع فلفلی	۲۴۰	۸۴±۶/۱

دهنده‌ی رابطه مستقیم میان افزایش غلظت و افزایش مرگ لاروها است و بیانگر وجود یک الگوی دوز-پاسخ منطقی در هر سه گیاه است. اسانس نعناع پونه دارای شیب تندتری نسبت به دو اسانس دیگر است در نتیجه در غلظت‌های پایین‌تر، مقادیر بالاتری از مرگ را نشان می‌دهد. این موضوع نشان می‌دهد که اسانس نعناع پونه قوی‌ترین اثر حشره‌کشی را بر لاروها دارد و در نتیجه دارای کم‌ترین LC₅₀ و LC₉₉ است. اسانس نعناع آبی عملکرد متوسطی دارد و در مقایسه با پونه، نیاز به غلظت بالاتری برای دستیابی به مرگ مشابه دارد. بنابراین می‌توان گفت نعناع آبی دارای اثر بخشی متوسط در میان اسانس‌های مورد بررسی است. اسانس نعناع فلفلی نسبت به دو اسانس دیگر اثر بخشی کم‌تری به‌ویژه در غلظت‌های پایین‌تر دارد و در نتیجه مرگ لاروها در پاسخ به افزایش غلظت آهسته‌تر افزایش یافته است. نوارهای اطراف خطوط رگرسیون نشان دهنده‌ی فواصل اطمینان ۹۵ درصد برای پیش‌بینی‌های مدل هستند که عدم قطعیت داده‌ها را در هر نقطه مشخص می‌کنند. هرچه فواصل اطمینان باریک‌تر باشد بیانگر دقت بالاتر مدل در هر اسانس را نشان می‌دهد (نمودار شماره ۱).

بحث

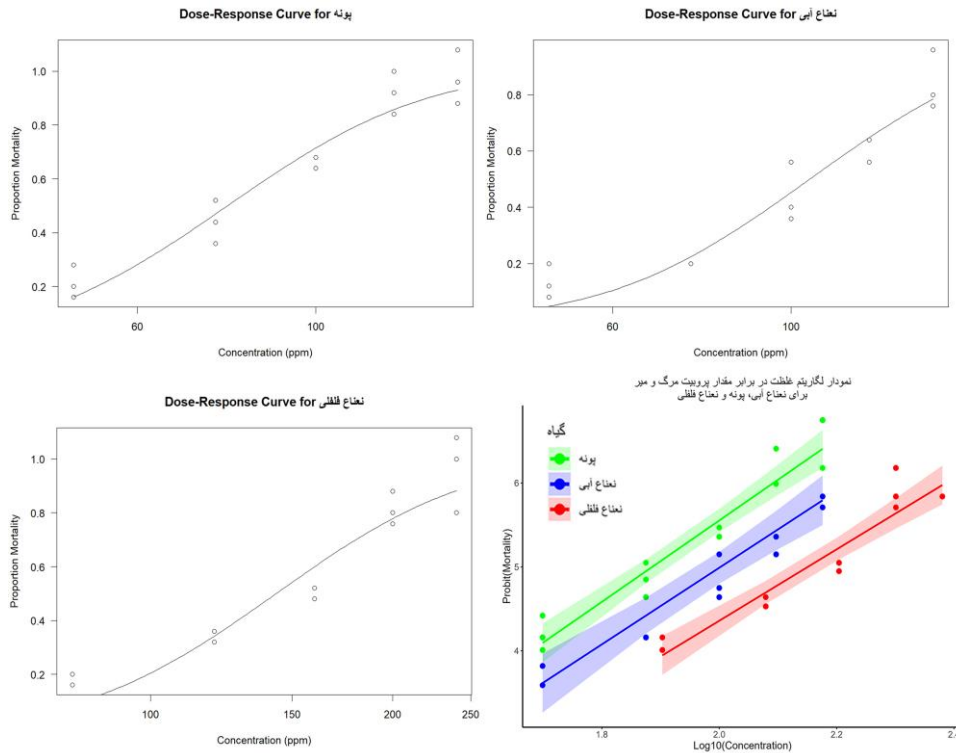
اسانس گیاه نعناع پونه بیش‌ترین اثر لاروکشی را روی لارو پشه‌ی آنوفل استنسنسی دارد. این یافته با نتایج پژوهش‌های قبلی مانند مطالعات صانعی دهکردی و همکاران (۲۰۲۲)، Abbas و همکاران (۲۰۲۲) در پاکستان، Al-Sarar و همکاران (۲۰۱۴) در هندوستان، و هم‌چنین پژوهش‌های شاه میرزایی و همکاران (۲۰۱۶) و Pavela و همکاران (۲۰۱۴) هم‌راستا است.

مقدار LC₅₀ برای اسانس پونه برابر با ppm ۷۷/۶۴±۲/۸۸ برآورد شد که به‌طور معنی‌داری کم‌تر از مقادیر متناظر در اسانس‌های نعناع آبی ۱۰۵/۴۵±۳/۴۰ و نعناع فلفلی ۱۴۳/۲۹±۵/۷۰ است. هم‌چنین، مقادیر LC₂₅ و LC₉₉ برای پونه نیز پایین‌تر از سایر اسانس‌ها به دست آمد که نشان دهنده اثر بخشی بالاتر این اسانس در سطوح پایین‌تر غلظت است (جدول شماره ۳). بررسی فواصل اطمینان ۹۵ درصد برای LC₅₀ نشان داد که فاصله اطمینان اسانس پونه (۷۱/۴۲-۸۳/۸۶) با فاصله اطمینان نعناع آبی (۱۱۲/۷۹-۹۸/۱۰) و نعناع فلفلی (۱۳۰/۹۷-۱۵۵/۶۱) هم‌پوشانی ندارد؛ این موضوع حاکی از وجود تفاوت آماری معنی‌دار میان اثرات کشندگی این اسانس‌ها است (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: مقادیر LC₂₅، LC₅₀ و LC₉₉ به همراه فواصل اطمینان ۹۵ درصد برای سه اسانس گیاهی در آزمون زیست‌سنجی روی لاروهای پشه آنوفل استنسنسی

اسانس گیاه	LC (درصد)	برآورد (Estimate)	خطای استاندارد (Std. Error)	حد پایین ۹۵ درصد	حد بالا ۹۵ درصد
نعناع آبی (M. aquatica)	۲۵	۹۰/۷۷	۵۱/۴	۱۷/۶۸	۶۶/۸۷
نعناع فلفلی (M. piperita)	۲۵	۸۸/۱۰۶	۲۴/۷	۲۴/۹۱	۵۳/۱۲۲
نعناع پونه (M. longifolia)	۲۵	۵۰/۵۷	۴۰/۳	۱۵/۵۰	۸۶/۶۴
	۹۹	۸۰/۲۱۸	۰۹/۲۴	۷۶/۱۶۶	۸۵/۲۷۰

نمودار حاصل از مدل‌سازی پروبیت، رابطه بین لگاریتم غلظت اسانس‌ها (محور افقی) و مرگ لاروها برحسب مقدار پروبیت (محور عمودی) را برای سه اسانس گیاهی شامل نعناع آبی، پونه و نعناع فلفلی نشان می‌دهد (نمودار شماره ۱). نتایج نشان می‌دهد که شیب خطوط رگرسیون برای هر سه اسانس مثبت است، که نشان



نمودار شماره ۱: نمودار دز-پاسخ و مقایسه پروبیت مرگ- لگاریتم غلظت اسانس گیاهان نعنای فلفلی، نعنای آبی، نعنای پونه

لارو کشی بالاتر اسانس نعنای فلفلی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی آن‌ها است (۳۲، ۳۳). در مجموع، با وجود اثبات خاصیت لارو کشی اسانس‌های گیاهان تیره نعنایان در مطالعات مختلف، تفاوت‌هایی در میزان کشندگی گزارش شده است. این اختلاف می‌تواند به عوامل محیطی، ترکیبات شیمیایی گیاه، شرایط رشد، جمعیت هدف حشره و سایر عوامل مرتبط باشد (۳۰، ۳۲، ۳۴).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که رابطه دز-پاسخ در اسانس همه گیاهان مورد مطالعه وجود دارد چرا که درصد مرگ لارو با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. هم‌راستا با نتایج مشاهده شده، رابطه دز-پاسخ در سایر مطالعات در خصوص اثر اسانس گیاهان مختلف روی لارو پشه‌های خانواده کولیسیده وجود دارد (۳۸-۳۵). چنانچه Tripathi و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی اثر لارو کشی شش غلظت از اسانس نعنای دشتی روی لارو پشه آنوفل استفسنی پی بردند که با افزایش غلظت میزان مرگ لاروها افزایش می‌یابد و با رسیدن غلظت به ۸۰

این مطالعات نیز با ارائه مقادیر پایین LC_{50} برای اسانس نعنای پونه، قدرت بالای آن را در برنامه‌های کنترل بیولوژیک لاروهای پشه امیدوار کننده نشان داده‌اند (۳۰-۲۶). نتایج به دست آمده در این مطالعه هم‌راستا با تحقیقات محدودی است که درباره خاصیت لارو کشی اسانس گیاه نعنای آبی انجام شده‌اند. در پژوهش Ferrati و همکاران (۲۰۲۳) در ایتالیا، اثر کشندگی این اسانس روی لاروهای پشه کولکس گزارش شده است و مقادیر LC_{50} به دست آمده بیانگر اثر مطلوب این اسانس بوده است، هر چند با مطالعه حاضر از نظر مقدار تفاوت‌هایی دارد (۳۱). در رابطه با اسانس گیاه نعنای فلفلی، مطالعات مختلفی از جمله پژوهش‌های Kharoubi و همکاران (۲۰۲۱) و Kumar و همکاران (۲۰۱۱)، اثرات مثبت این اسانس را در زمینه‌ی لارو کشی بر گونه‌های مختلف پشه شامل آنوفل استفسنی، کولکس پیپینس و آئدس اجیپتی گزارش کرده‌اند. مقایسه‌ی مقادیر LC_{50} ارائه شده در این مطالعات با یافته‌های تحقیق حاضر، نشان دهنده‌ی قدرت

پی پی ام، مرگ لاروها به ۱۰۰ درصد می‌رسد (۳۹). همچنین کاظم پور و همکاران (۲۰۲۱) تعداد ۵ غلظت لگاریتمی از اسانس گیاه پونه را روی لارو آنوفل استفسی آزمایش کردند که نتایج این مطالعه نیز وجود رابطه دز - پاسخ را به‌خوبی نشان داد (۴۰).

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، وجود ترکیبات گیاهی با کمیت و کیفیت متفاوت می‌تواند نقش مهمی در انتخاب گیاهان مناسب برای تولید حشره‌کش‌های گیاهی ایفا کند. در همین راستا، ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان نعناع فلفلی، نعناع پونه و نعناع آبی با استفاده از روش طیف‌سنجی گروماتوگرافی (GC-MS) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان دادند که ترکیبات شناسایی شده در این سه گونه تا حدی از لحاظ کیفیت و کمیت با یکدیگر تفاوت دارند؛ به‌طوری که دو ترکیب منتون و ۱،۸-سینئول در هر سه گیاه به‌عنوان ترکیبات مشترک با مقادیر متفاوت شناسایی شدند. این تفاوت‌ها در ترکیب شیمیایی می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند شرایط اقلیمی محل رشد گیاه قرار گیرد. به‌عنوان نمونه، مطالعه پیرمحمدی و همکاران (۲۰۲۳) در استان چهارمحال و بختیاری به بررسی اثر اقلیم‌های گوناگون بر ترکیبات اسانس و خاصیت دافع پشه گیاه نعناع پونه پرداخت. یافته‌ها حاکی از آن بود که نوع و تعداد ترکیبات شیمیایی این گیاه در چهار اقلیم متفاوت با یکدیگر تفاوت داشتند، به‌گونه‌ای که در اقلیم مرطوب، بیش‌ترین تنوع ترکیبی با ۶۵ ترکیب شناسایی شد، در حالی که در اقلیم‌های نیمه مرطوب و بسیار گرم این عدد به ۱۱ ترکیب کاهش یافت (۴۱).

در مطالعه حاضر، مشخص شد که اسانس گیاه نعناع پونه بیش‌ترین اثر لاروکشی را در مقایسه با سایر گونه‌های مورد بررسی دارد، که این ویژگی احتمالاً ناشی از کیفیت و کمیت ترکیبات موجود در اسانس آن است. بررسی شیمیایی نشان داد که ترکیب اکسید پیریتنون تنها در این گیاه به‌عنوان ترکیب عمده حضور دارد؛ ترکیبی که مطالعات متعدد نقش آن را در افزایش

مرگ‌ومیر لاروها تأیید کرده‌اند. برای نمونه، Tripathi و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که اثر لاروکشی اکسید پیریتنون به‌مراتب بیش‌تر از اسانس خام گیاه نعناع دشتی *M. spicata* است (۳۹). هم‌چنین Pavela و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که اسانس نعناع پونه اثر لاروکشی بالاتری نسبت به سایر گونه‌های نعناعیان دارد و این اثر به غلبه ترکیب اکسید پیریتنون در این گونه نسبت داده شد (۴۲). مطالعات دیگر از جمله Kavallieratos و همکاران (۲۰۲۲)، نیز این ترکیب را به‌عنوان عامل مؤثر در کشندگی لارو در سایر گونه‌های *Mentha* معرفی کرده‌اند (۴۳). مجموعه این یافته‌ها اهمیت اکسید پیریتنون را به‌عنوان یک ترکیب کلیدی در طراحی و توسعه حشره‌کش‌های گیاهی تأیید می‌کند.

در مطالعه حاضر مشخص گردید که اسانس گیاه نعناع آبی پس از نعناع پونه بیش‌ترین اثر لاروکشی را دارد. در این گیاه اگر چه ترکیب پیریتنون اکساید به‌عنوان ترکیب مازور شناسایی نگردید اما ترکیب ۱ و ۸-سینئول به‌عنوان ترکیب مازور معرفی شد. مطالعات نشان داده که حضور ترکیب ۱ و ۸-سینئول در اسانس سایر گونه‌های *Mentha* نیز می‌تواند به‌عنوان عامل کشندگی در لارو پشه‌ها مطرح باشد (۳۱). برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Koliopoulos و همکاران (۲۰۱۰) در یونان انجام شد، اثر لاروکشی اسانس گیاهان جنس‌های *Mentha*، *Salvia* و *Melissa* روی لارو پشه کولکس پپینس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیش‌ترین اثرات لاروکشی که مربوط به گیاه نعناع سیبی *M. suaveolens* است که وابسته به ترکیب شیمیایی اکسید پیریتنون (۶۲/۴ درصد) است. نکته قابل توجه این است که در اسانس سایر گیاهان اشاره شده ترکیب ۱ و ۸-سینئول به‌عنوان عامل کشندگی لارو اهمیت دارد (۳۵). اهمیت ترکیب ۱ و ۸-سینئول به‌عنوان عامل کشندگی در سایر حشرات نیز به‌خوبی مطالعه شده است. برای مثال در مطالعه‌ای که توسط Zavala-

Gómez و همکاران (۲۰۲۱) به منظور اثر لارو کشی اسانس گیاه *Salvia keerii* انجام شد، ترکیب ۱ و ۸- سینثول به عنوان یکی از ترکیبات عمده در حشره کشی معرفی شده است (۴۴). هم چنین در مطالعه Aggarwal و همکاران (۲۰۰۱) اثر حشره کشی مناسب این ترکیب گزارش شد (۴۵).

همان طور که در نتایج پژوهش حاضر آورده شده است ترکیب منتول در کنار ترکیبات اکسید پیریتنون و ۱ و ۸- سینثول به عنوان ترکیب عمده در اسانس گیاه نعناع فلفلی شناسایی گردید. در مطالعات مختلف به اهمیت ترکیب منتول در اسانس استخراج شده از گیاهانی نظیر نعناع وحشی *M. arvensis*، نعناع پونه و نعناع دشتی در میزان کشندگی لارو به خوبی اشاره شده است. برای مثال حضور ترکیب منتول به عنوان فراوان ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاهان جنس نعناع در هند، پاکستان و ویتنام به ترتیب با مقادیر ۷۱/۱، ۸۰ و ۶۶ درصد گزارش شده است که نشان دهنده اهمیت ترکیب منتول است (۴۸-۴۶). هم چنین در مطالعهی Manh و همکاران (۲۰۲۰) اثرات لارو کشی اسانس گیاه نعناع وحشی روی پشه های آندس اجیتی انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد ۱۳ ترکیب شیمیایی به روش GC-MS گزارش شد که بالاترین ترکیب اسانس گیاه مربوط به ترکیب منتول با مقدار ۶۶/۰۴ درصد بوده است که با فراوان بودن و کشندگی ترکیب منتول در اسانس گیاه نعناع فلفلی *M. piperita* در مطالعه حاضر مطابقت دارد (۴۸).

مجموعه مطالعات انجام شده نشان می دهد که میزان اثر لارو کشی اسانس گیاهان جنس *Mentha* به طور معنی داری با حضور ترکیبات شیمیایی گروه مونوترپن ها مانند اکسید پیریتنون، ۱ و ۸- سینثول، و منتول مرتبط است؛ که این یافته با نتایج مطالعه حاضر نیز هم راستا می باشد. در این تحقیق، گروه مونوترپن ها فراوان ترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاهان نعناع فلفلی، نعناع آبی و نعناع پونه بودند. مطالعاتی مانند

پژوهش فیروزیان و همکاران (۲۰۲۲) بر روی گیاه مورد *Myrtus communis L* و Ferrati و همکاران (۲۰۲۳) بر روی گیاه نعناع آبی نیز تأیید کرده اند که مونوترپن های هیدروکربنی و اکسیژنه، به ویژه در ترکیب های غالب مانند اکسید پیریتنون، نقش قابل توجهی در افزایش کشندگی لاروها دارند (۳۱، ۴۹). بنابراین، نوع و کمیت ترکیبات مونوترپنی در اسانس های گیاهی یکی از عوامل کلیدی در اثر بخشی بیولوژیک آن ها است، و شناسایی این ترکیبات در مطالعات مرتبط با کنترل ناقلان بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است.

یافته های این مطالعه نشان داد که اسانس های گیاهان نعناع فلفلی، نعناع آبی و نعناع پونه پتانسیل قابل توجهی در کنترل پشه آنوفل استفسنی، ناقل مهم بیماری مالاریا، دارند. این اسانس ها به دلیل خواص بیولوژیکی و دور کنندگی، می توانند به عنوان جایگزینی طبیعی برای حشره کش های شیمیایی مورد توجه قرار گیرند. با این حال، محدودیت هایی نظیر چالش های پرورش استاندارد لاروها و نیاز به دقت در استاندارد سازی غلظت اسانس ها، بر لزوم بهبود روش های آزمایشگاهی تأکید دارد. از دیگر محدودیت های اصلی، عدم استفاده از کنترل مثبت مانند حشره کش های شیمیایی استاندارد بود که به دلیل تمرکز بر ارزیابی اولیه خواص اسانس های گیاهی و محدودیت های لجستیکی در دسترسی به ترکیبات استاندارد رخ داد. پیشنهادات ارائه شده برای تحقیقات آینده، از جمله بررسی اثرات سینرژیستی، استفاده از کنترل مثبت، نانوامولسیون ها و پایداری این اسانس ها، می تواند به توسعه فرمولاسیون های مؤثرتر و ایمن تر برای کنترل ناقلین بیماری ها کمک کند. در نهایت، این مطالعه بر اهمیت استفاده از ترکیبات گیاهی در مدیریت پایدار ناقلین بیماری ها تأکید دارد و راه را برای تحقیقات جامع تر در راستای کاربرد عملی این اسانس ها در برنامه های کنترل ناقلین هموار می سازد.

از آنجایی که اسانس گیاهان بر اساس مقدار LC_{50} به شش دسته شامل، به شدت فعال، اسانس گیاهان با LC_{50}

به دنبال آن طبقه بندی اسانس‌ها عوامل مختلفی دخالت دارند که می‌توانند بر خواص بیولوژیکی ترکیبات شیمیایی اسانس‌های مورد مطالعه تأثیر بگذارند. از جمله موقعیت جغرافیایی، اندام‌های مورد مطالعه گیاه، نوع و روش استخراج، روش خشک کردن، شرایط نگهداری، مرحله رسیدن میوه، حلال مورد استفاده و نوع گیاه مورد مطالعه را می‌توان نام برد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت حمایت مالی سپاسگزاری می‌شود.

کم‌تر از یک پی‌پی‌ام، خیلی فعال، بین یک تا پنج پی‌پی‌ام، فعال، پنج تا ۵۰ پی‌پی‌ام، نسبتاً فعال، ۵۰ تا ۱۰۰ پی‌پی‌ام، کمی فعال، ۱۰۰ تا ۲۰۰ پی‌پی‌ام و غیر فعال، بالاتر از ۲۰۰ پی‌پی‌ام طبقه بندی می‌شوند؛ بنابراین، در مطالعه حاضر اسانس گیاه نعنای پونه در گروه نسبتاً فعال و دو گونه‌ی دیگر یعنی نعنای فلفلی و نعنای آبی در گروه کمی فعال طبقه بندی می‌شوند (۵۰). در نتیجه اسانس نعنای پونه دارای پتانسیل بالاتری به عنوان یک عامل حشره کش گیاهی در مقایسه با نعنای آبی و نعنای فلفلی است و می‌تواند در مدیریت زیست محیطی پشه‌ها، به ویژه در مراحل لاروی، نقش مؤثرتری ایفا نماید. اگر چه باید به خاطر داشت که در مقدار کشندگی اسانس‌های گیاهی و

References

- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, et al. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 1999; 400(6741): 256-261 PMID: 10421366.
- Venkatesan P. WHO world malaria report 2024. *The Lancet Microbe* 2025; 6(4):101073.
- Seyfarth M, Khaireh BA, Abdi AA, Bouh SM, Faulde MK. Five years following first detection of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in Djibouti, Horn of Africa: populations established-malaria emerging. *Parasitol Res* 2019; 118(3): 725-732 PMID: 30671729.
- Fazeli-Dinan M, Azarnoosh M, Özgökçe MS, Chi H, Hosseini-Vasoukolaei N, Haghi FM, et al. Global water quality changes posing threat of increasing infectious diseases, a case study on malaria vector *Anopheles stephensi* coping with the water pollutants using age-stage, two-sex life table method. *Malaria Journal* 2022;21(1):178.
- Weiss DJ, Dzianach PA, Saddler A, Lubinda J, Browne A, McPhail M, et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: a spatial and temporal modelling study. *The Lancet* 2025; 405(10483): 979-990.
- Patel P, Bagada A, Vadia N. Epidemiology and current trends in malaria. *Rising Contagious Diseases: Basics, Management, and Treatments* 2024: 261-282.
- Azizi H, Davtalab-Esmaeili E, Farahbakhsh M, Zeinolabedini M, Mirzaei Y, Mirzapour M. Malaria situation in a clear area of Iran: an approach for the better understanding of the health service providers' readiness and challenges for malaria elimination in clear areas. *Malaria Journal* 2020; 19:1-10.
- Ansari MS, Moralet MA, Ahmad S. Insecticides: impact on the environment and human health. *Environmental Deterioration and Human Health* 2014: 99-123.

9. Fazeli-Dinan M, Mostafavi A, Osia-Laghab H, Azadbakht M, Amini M, Davoodi A, et al. Evaluation of Medicinal Plant Extracts as Safe Alternatives to Chemical Insecticides for Enhancing Food Safety and Public Health. *Journal of Health Research in Community* 2025; 11(1): 50-62.
10. Fazeli-Dinan M, Osia-Laghab SH, Amini M, Davoodi A, Nikookar SH, Yazdani Charati J, et al. Phytochemical composition, toxicity, and repellent effects of medicinal plants *Peganum harmala*, *Pterocarya fraxinifolia*, and *Tanacetum parthenium* extracts against *Sitophilus oryzae* L. *Toxin Reviews* 2023; 42(2): 548-558.
11. Bunse M, Daniels R, Gründemann C, Heilmann J, Kammerer DR, Keusgen M, et al. Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. *Front Pharmacol* 2022; 3: 956541.
12. Kuppusamy E, Dhamodharan KI, Jayakumar S. Role of plants and plant-based products towards the control of insect pests and vectors: A novel review. *Journal of Coastal Life Medicine* 2016; 4(11): 902-917.
13. Şengül Demirak MŞ, Canpolat E. Plant-based bioinsecticides for mosquito control: Impact on insecticide resistance and disease transmission. *Insects* 2022;13(2):162.
14. Qasim M, Islam W, Rizwan M, Hussain D, Noman A, Khan KA, et al. Impact of plant monoterpenes on insect pest management and insect-associated microbes. *Heliyon* 2024; 10(20): e39120 PMID: 39498017.
15. Garay J, Brennan T, Bon D. Essential oils a viable pest control alternative. *Int J Ecotoxicol Ecobiol* 2020; 5(2):13-22.
16. Kozics K, Mesárošová M, Šramková M, Bučková M, Puškárová A, Galová D, et al. Evaluation of Bioactivity of Essential Oils: Cytotoxic/Genotoxic Effects on Colorectal Cancer Cell Lines, Antibacterial Activity, and Survival of Lactic Acid Bacteria. *Molecules* 2025; 30(4): 890.
17. Zhou Y, Pei T, Zhou X, Xu ML, Gao H, Wang L, et al. An Investigation into the Biological Activities of Four Lamiaceae Essential Oils Against *Thrips flavus*, Crops, and Weeds. *Plants* 2025; 14(3): 448 PMID: 39943010.
18. Fariat K, Malika B, Fouzia B, Nabil T, Adil M, Danish S, et al. Chemical composition and insecticidal activity of *Mentha rotundifolia* and *Chrysanthemum coronarium* essential oils against the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Sci Rep* 2025; 15(1): 1411 PMID: 39789073.
19. Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products* 2011;34(1):802-817.
20. Shaikh S, Yaacob HB, Rahim ZHA. Prospective role in treatment of major illnesses and potential benefits as a safe insecticide and natural food preservative of mint (*Mentha* spp.): a Review. *Asian J Biomed Pharmac Sci* 2014; 4(35): 1-12.
21. Buleandra M, Oprea E, Popa DE, David IG, Moldovan Z, Mihai I, et al. Comparative chemical analysis of *Mentha piperita* and *M. spicata* and a fast assessment of commercial peppermint teas. *Natural product communications*. 2016; 11(4): 551-555.
22. Balakrishnan A. Therapeutic uses of peppermint-a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and research* 2015;7(7):474-476.
23. Tourabi M, Nouioura G, Touijer H, Baghouz A, El Ghouizi A, Chebaibi M, et al.

- Antioxidant, antimicrobial, and insecticidal properties of chemically characterized essential oils extracted from *Mentha longifolia*: in vitro and in silico analysis. *Plants* 2023; 12(21): 3783.
24. Esmaeili A, Rustaiyan A, Masoudi S, Nadji K. Composition of the essential oils of *Mentha aquatica* L. and *Nepeta meyeri* Benth. from Iran. *Journal of Essential Oil Research* 2006; 18(3): 263-265.
25. Diass K, Oualdi I, Kharchoufa L, Touzani R, Chaachouay N, Bussmann RW. *Mentha aquatica* L. *Mentha arvensis* L. *Mentha gattefossei* Maire *Mentha longifolia* (L.) L. *Mentha*× *piperita* L. *Mentha pulegium* L. *Mentha*× *rotundifolia* (L.) Huds. *Mentha spicata* L. *Mentha suaveolens* Ehrh., and *Mentha spicata* subsp. *spicata* L. *Lamiaceae*. *Ethnobotany of Northern Africa and Levant*: Springer 2024; 1- 28.
26. Sanei-Dehkordi A, Agholi M, Shafiei M, Osanloo M. Promising Larvicidal Efficacy of Solid Lipid Nanoparticles Containing *Mentha longifolia* L., *Mentha pulegium* L., and *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oils Against the Main Malaria Vector, *Anopheles stephensi* Liston. *Acta Parasitol* 2022; 67(3): 1265-1272.
27. Al-Sarar A. Chemical Composition, Adulticidal and Repellent Activity of Essential Oils From *Mentha longifolia* L. and *Lavandula dentata* L. against *Culex pipiens* L. *Journal of Plant Protection and Pathology* 2014; 5(7): 817-826.
28. Abbas MG, Haris A, Binyameen M, Nazir A, Mozūratis R, Azeem M. Chemical composition, larvicidal and repellent activities of wild plant essential oils against *Aedes aegypti*. *Biology* 2022; 12(1):8.
29. Shahmirzaei Z, Izadi H, Imani S. Study on the contact and fumigant toxicity of *Mentha longifolia* L. against the confused flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2016; 32(3): 556-559.
30. Pavela R, Kaffkova K, Kumšta M. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from different *Mentha* L. and *Pulegium* species against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Plant Protect Sci* 2014; 50(1): 36-42.
31. Ferrati M, Spinozzi E, Baldassarri C, Maggi F, Pavela R, Canale A, et al. Efficacy of *Mentha aquatica* L. Essential Oil (Linalool/Linalool Acetate Chemotype) against Insect Vectors and Agricultural Pests. *Pharmaceuticals* 2023; 16(4):633.
32. Kharoubi R, Rehim N, Khaldi R, Haouari-Abderrahim J, Soltani N. Phytochemical screening and insecticidal activities of essential oil of *Mentha x piperita* L. (Lamiales: Lamiaceae) and their enzymatic properties against mosquito *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2021; 24(1):134-146.
33. Kumar S, Wahab N, Warikoo R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 1(2): 85-88 PMID: 23569733.
34. Dey P, Goyary D, Chattopadhyay P, Kishor S, Karmakar S, Verma A. Evaluation of larvicidal activity of *Piper longum* leaf against the dengue vector, *Aedes aegypti*, malarial vector, *Anopheles stephensi* and filariasis

- vector, *Culex quinquefasciatus*. South African Journal of Botany 2020; 132:482-490.
35. Koliopoulos G, Pitarokili D, Kioulos E, Michaelakis A, Tzakou O. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. Parasitol Res 2010; 107: 327-335 PMID: 20405142.
36. da Silva Ramos R, Rodrigues ABL, Farias ALF, Simões RC, Pinheiro MT, Ferreira RMdA, et al. Chemical composition and in vitro antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). Scientific World Journal 2017; 2017: 4927214 PMID: 28116346.
37. Ajaegbu EE, Onah GT, Ikuesan AJ, Bello AM. Larvicidal Potency of Some Selected Nigerian Plants against *Aedes aegypti*. Chem Proc 2023;14(1):35.
38. Torabi-Pour H, Shayeghi M, Vatandoost H, Abai M-R. Larvicidal effects and phytochemical evaluation of essential oils of *Trachyspermum ammi* and *Ziziphora clinopodioides* against larvae *Anopheles stephensi*. Journal of Herbmed Pharmacology 2017; 6(4):185-190.
39. Tripathi AK, Prajapati V, Ahmad A, Aggarwal KK, Khanuja SP. Piperitenone oxide as toxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). J Med Entomol 2004; 41(4): 691-698 PMID: 15311462.
40. Kazempour S, Shayeghi M, Abai M, Vatandoost H, Pirmohammadi M. Larvicidal activities of essential oils of indigenous medicinal plants, *Mentha pulegium* L., *Satureja hortensis* L., and *Thymus vulgaris* L. against malaria vector, *Anopheles stephensi*. South African Journal of Botany 2021; 139: 38-41.
41. Pirmohammadi M, Abai MR, Shayeghi M, Vatandoost H, Rahimi S, Pirmohammadi M. Influence of agro-climatic conditions on chemical compositions and repellency effect of *Mentha longifolia* plant against malaria vector, *Anopheles stephensi*. Toxin Reviews 2023; 42(1): 115-121.
42. Pawle G, Singh S. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of *Nigrospora* isolated from living fossil *Ginkgo biloba*. Curr Res Environ Appl Mycol 2014;4(1):1-9.
43. Kavallieratos NG, Nika EP, Skourti A, Xefteri DN, Cianfaglione K, Perinelli DR, et al. Piperitenone oxide-rich *Mentha longifolia* essential oil and its nanoemulsion to manage different developmental stages of insect and mite pests attacking stored wheat. Ind Crops Prod 2022; 178: 114600.
44. Zavala-Gómez CE, Zamora-Avella D, Rodríguez-Chávez JL, Zavala-Sánchez MÁ, Campos-Guillén J, Bah MM, et al. Bioactivity of 1, 8-Cineole and Essential Oil of *Salvia keerlii* (Lamiaceae) Against *Spodoptera frugiperda*. Southwestern Entomologist 2021; 46(2): 385-396.
45. Aggarwal KK, Tripathi AK, Prajapati V, Kumar S. Toxicity of 1, 8-cineole towards three species of stored product coleopterans. International Journal of Tropical Insect Science 2001; 21(2): 155-160.
46. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. J Sci Food Agric 2010; 90(11): 1827-1836 PMID: 20602517.

47. Santos F, Rao V. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plants essential oils. *Phytother Res* 2000; 14(4):240-244 PMID: 10861965.
48. Manh HD, Tuyet OT. Larvicidal and repellent activity of *Mentha arvensis* L. essential oil against *Aedes aegypti*. *Insects* 2020; 11(3): 198 PMID: 32235733.
49. Firooziyan S, Osanloo M, Basseri HR, Moosa-Kazemi SH, Hajipirloo HM, Amani A, et al. Nanoemulsion of *Myrtus communis* essential oil and evaluation of its larvicidal activity against *Anopheles stephensi*. *Arabian Journal of Chemistry* 2022; 15(9): 104064.
50. Vatandoost H, Dehkordi AS, Sadeghi S, Davari B, Karimian F, Abai M, et al. Identification of chemical constituents and larvicidal activity of *Kelussia odoratissima* Mozaffarian essential oil against two mosquito vectors *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Exp Parasitol* 2012; 132(4): 470-474 PMID: 23022522