مقاله پژوهشی

فصلنامه علمی – پژوهشی طب مکمل، شماره۴، زمستان ۱۳۹۵

ارزیابی فعّالیت دافع حشره‌ی عصاره‌ی برگ درخت گردو بر روی پشه‌ی Culex pipiens در شرایط آزمایشگاهی

حامد فتحی[۱]، سید فرزاد متولی حقی[۲*]، محمدعلی ابراهیم زاده[۳]، سید حسن نیکوکار[۴]، محسن کرمی[۵]، بهزاد پارسی[۶]

۱. کارشناس ارشدزیست‌شناسی، مرکز تحقیقات طبّ سنّتی و مکمّل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۲. استادیار، دکترای انگل‌شناسی جانوری، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۳. استاد، دکترای شیمی داروئی، گروه شیمی داروئی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده‌ی داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۴. دانشجوی دکترای علوم بهداشتی، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات علم بهداشتی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۵. استادیار، دکترای حشره‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.
۶. استادیار، دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

تاریخ دریافت:۱۳۹۵/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۰۶

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، مصرف بیش از حدّ سموم علاوه بر ایجاد مخاطرات بهداشتی- محیطی، احتمالاً باعث بروز مقاومت در حشرات نیز شده است؛ ازاین‌رو، یافتن یک روش ایمن، بادوام و اقتصادی در مبارزه با حشرات، ضروری است. استفاده از دورکننده‌ها، روش خوبی در پیشگیری از بیماری‌هاست. از اندام‌های مختلف درخت گردو (*Juglans regia L*) در طبّ سنّتی استفاده شده و از برگ آن اثرات ضدّ التهابی، ضدّ درد و آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است. هدف این تحقیق، شناسایی و استفاده از گیاهان بومی بی‌خطر در دفع حشرات است؛ به‌نحوی‌که مسمومیتی نیز در انسان ایجاد ننمایند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی- آزمایشگاهی، برگ درخت گردو، از رویشگاه طبیعی ساری (گله‌کلا سفلی-کردخیل) جمع‌آوری و شناسایی شد و پس از خشک شدن، از آن عصاره گیری شد. سپس عصاره‌ی متانولی به‌دست‌آمده از آن با غلظت‌های مختلف بر روی پوست خوکچه‌ی هندی پخش شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه از زمان تماس، تعداد گزش‌های پشه‌ی بالغ کولکس(*Culex pipiens*)در منطقه‌ی مورد نظر ثبت و مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: مقایسه‌ی میانگین‌های مربوط به اثر دورکنندگی عصاره‌های برگ درخت گردو بر روی پشه‌ی کولکس نشان داد در غلظت‌های بالا، میزان خون‌خواری در پشه‌ها کمتر است و اختلاف معناداری در غلظت‌های مختلف آن وجود دارد (P.Value=۰/۰۰۱). بیشترین اثر دورکنندگی مربوط به غلظت ۲۵۰mg/kg برابر ۷۳/۳۶٪ بوده است.

نتیجه‌گیری: اثر عصاره‌های برگ درخت گردو بر روی پشه‌ی کولکس نشان داد با افزایش غلظت عصاره، میزان دورکنندگی حشرات افزایش می‌یابد. درمجموع غلظت‌ها، درصد اثربخشی در آزمایش‌های حیوانی به‌اندازه‌ی ۴۹,۷۸٪ (میانگین کل) بوده است؛ لذا پیشنهاد می‌گردد از عصاره‌ی گیاه جهت تهیه‌ی فرآورده‌ای برای پیشگیری از نیش پشه‌های شهری (کولکس) استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: دافع حشره، درخت گردو، پشه‌ی کولکس.

*نویسنده مسئول: E.mail: haghi77@yahoo.com

مقدمه

استفاده از حشره‌کش‌ها در کنترل آفات در ایران از جایگاه خاصی برخوردار است؛ به‌طوری‌که در حال حاضر حشره‌کش‌های ارگانوکلره، ارگانوفسفره، کاربامات‌ها و یا پیروتروئیدهای سنتتیک به‌عنوان ترکیبات اصلی در مبارزه با حشرات به کار می‌روند. مبارزه‌ی شیمیایی به دلیل تأثیر آنی و سریع روی جمعیت آفات و خاصیت کنترل حشرات ناقل بیماری، مهم‌ترین روش مبارزه با آفات و ناقلان محسوب می‌شود. البته امروزه از سموم شیمیایی به علت تجمع در زنجیره‌ی غذایی، پایداری در محیط، مقاومت ناقلان در برابر آن‌ها، آلودگی محیط زیست و بر هم زدن تعادل طبیعی موجودات با احتیاط فراوان، استفاده می‌شود (۱). طی سال‌های گذشته استفاده‌ی طولانی‌مدت از مواد شیمیایی برای کنترل، دفع و از بین بردن حشرات و بندپایان، نگرانی‌های فراوانی را برای محیط زیست و سلامت انسان ایجاد کرده است. ازاین‌رو، پژوهشگران از محصولات جایگزین طبیعی و گیاهی که دارای اثرهای غیر مضر بوده و با محیط زیست سازگار بودند، استفاده کردند. پژوهش در مورد گیاهان داروئی و استفاده از آنها مهم بوده و رو به افزایش است (۲ و ۳). کنترل پشه‌ها و حفاظت انسان‌ها از گزش آن‌ها یکی از راه‌های مهم پیشگیری از بیماری‌های منتقله به‌وسیله‌ی آن‌هاست. پشه‌های خانواده‌ی کولیسیده قادرند بیماری‌های مالاریا[1]، تب دینگو[2]، فیلاریازیس[3]، خون‌ریزی دینگو، تب زرد و انسفالیت[4] را در نواحی گرمسیری منتقل کنند. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، کشورهای حوزه‌ی مدیترانه‌ی شرقی مانند ایران از مهم‌ترین کانون‌های بیماری‌های منتقله به‌وسیله‌ی حشرات و سایر بندپایان در دنیا بوده و این کشورها با توجه به تنوع ناقلان به‌ویژه گونه‌های پشه‌ها، در معرض خطر انتشار بسیاری از بیماری‌ها قرار دارند (۴). تعیین انواع پشه‌های کولکس[5] نسبت به سایر جنس‌های زیرخانواده‌ی کولیسینه[6]، در کشورمان ایران دارای سابقه‌ی بیشتری بوده و از دلایل افزایش انتشار این پشه، شهرنشینی مردم و صنعتی شدن سریع جامعه بدون تأمین تسهیلات زه‌کشی آب‌های راکد است (۵). یکی از روش‌های کنترل این بیماری، حفاظت افراد از گزش پشه‌های ناقل می‌باشد. استفاده از دورکننده‌ها به‌ویژه دورکننده‌های گیاهی از روش‌های مناسب برای حفاظت افراد به شمار می‌رود (۶). مطالعات و تحقیقات وسیعی درزمینه‌ی کشف و تهیه‌ی داروهای دافع حشرات از زمان بروز جنگ جهانی دوم تاکنون، در دنیا و در ایران انجام گرفته است (۷). بااین‌حال، بروز برخی از عوارض جانبی در استفاده‌ی طولانی‌مدت از مواد دافع شیمیایی و صنعتی رایج، باعث شده است که توجه محققان به مواد دافع گیاهی جلب گردد (۸). اسانس‌ها و اجزای آن‌ها، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که اثرات زیادی بر روی حشرات دارند؛ به‌طوری‌که تا به امروز گونه‌های گیاهی مختلفی (مانند افسنطین[7]، اکالیپتوس[8] و...) با فعّالیت دافع حشره شناسایی و استفاده شده و این خاصیت را از خود نشان داده‌اند (۹). در این مطالعه برگ گردو با نام علمی *Juglans regia* L (شکل شماره‌ی ۱) که از خانواده‌ی گردودیان[9] می‌باشد مورد مطالعه قرار گرفت. این گیاه در ایران به‌خصوص در مناطق شمالی مانند مازندران (و البته ساری) به‌وفور یافت می‌شود (۱۰). از میوه‌ی گردو جهت تغذیه استفاده می‌شود. از پوست درخت و میوه‌ی گردو به‌عنوان ماده‌ی قابض و برای درمان ترشحات زنانه و بیماری سل و ورم مفاصل و شست‌وشو و التیام زخم‌ها استفاده می‌شود (۱۱). متخصصان انگلیسی در سده‌های اخیر برگ گردو را با پیاز، نمک و عسل برای سم‌زدایی حاصل از گزش مار و عقرب و... استفاده می‌کردند. از برگ‌های گردو، جهت درمان

[1]-Malaria
[2]- Dengue
[3]-filariasis
[4]-Ensephalitis
[5]- Culex
[6]- Culicinae
[7]-Artemisia
[8]-Eucalyptus
[9]- Juglandaceae

بیماری‌های پوستی، دردهای رماتیسمی، تب و دیابت، و از ریشه‌ی آن برای درمان دیابت و از گل‌های آن برای درمان مالاریا و دردهای رماتیسمی استفاده می‌شود (۱۲ و ۱۳). تاکنون اثرات ضدّ میکروبی گیاه گردو بر روی چند قارچ و چند باکتری مانند باسیلوس سوبتیلیسو باسیلوس مایکوبیدس مطالعه و گزارش شده است (۱۴). خاصیت آنتی‌باکتریال آن نیز اثبات شده و قابل توجه بوده است (۱۵). ارزیابی عصاره‌ی آبی و استونی برگ گردو نشان داد که این ترکیب حاوی الاژیتانین است که دارای خواص ضدّسرطانی و ضدّ التهابی است (۱۶). دو گروه عمده‌ی ترکیب‌های فنلی موجود در برگ گردو اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها هستند. اسیدکافئوئیلکوینیک و اسیدکوماروئیلکوینیک مهم‌ترین اسیدهای فنلی برگ گردو هستند. ژوگلون، کوئرستین، گالاکتوزید، مشتق‌های کوئرستین پنتوزید، کوئرستین آرابینوزید، کوئرستین گزیلوزید، کوئرستین رامنوزید و مشتق‌های کامپفرول پنتوزید مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در برگ گردو هستند (۱۷). برگ گردو دارای خاصیت ضدّ سرطانی، تصفیه‌کنندگی خون و آنتی‌اکسیدانی است (۱۸) این پژوهش به دلایل زیر روی برگ درخت گردو و پشه‌های کولکس پیپینس[1] – که در مناطق شهری و بیشتر مناطق ایران و برخی مناطق روستایی و البته در استان مازندران وجود دارند و عمدتاً گونه‌ی غالب را تشکیل می‌دهند (۲۲) انجام شد: اثرات و خواص داروئی محصولات طبیعی مانند گیاهان داروئی (۱۹) و فعّالیت‌های علمی و آزمایشگاهی صورت گرفته روی آن‌ها (۲۰)، گزارش‌های خوبی که از اثرات بیولوژیک و دارویی این گیاه مانند اثرات ضدّ سم، کاهش قند خون و ... در طبّ سنّتی ایران و جهان (در منابعی مانند مخزن‌الادویه‌ی عقیلی) موجود است (۲۱) و گزارش‌های تحقیقات گذشته مبنی بر اینکه علاوه بر تکثیر راحت، مصرف آن‌ها برای انسان بی‌خطر بوده و مسمومیتی را در فرد ایجاد نمی‌کنند.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی گیاه و عصاره‌ی گیاهی: در این مطالعه‌ی پژوهشی – آزمایشگاهی، برگ درخت گردو از رویشگاه طبیعی روستای گله کلا سفلی –کردخیل (دهستان اسفیورد، بخش مرکزی، شوراب شهرستان ساری) تهیه شد و به‌وسیله‌ی متخصص دارای دکترای سیستماتیک با استفاده از کلید شناسایی مورد تشخیص و شناسایی قرار گرفت. سپس برگ‌ها در محلی با جریان هوا، دور از نور مستقیم آفتاب و برخوردار از دما و رطوبت مناسب، در طول ۱۴ تا ۱۸ روز خشک شدند (۲۳). اندام خشک شده با آسیاب برقی پودر شد و از آن عصاره‌ی تام متانولی به روش پرکولاسیون تهیه شد. استخراج عصاره در سه مرحله‌ی پی‌درپی انجام شد. برگ گیاه خشک شده ۱۰۰ گرم بود که حلّال متانول به میزان مورد نیاز، به آن اضافه شد و مجموعه برای ۲۴ ساعت به حال خود رها شد. روز بعد، حلّال خارج شد و حلّال جدید به مقدار ماده‌ی خشک قبلی به آن اضافه شد. این عمل، سه بار تکرار شد و درنهایت، حلّال در دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه حذف شد و باقی‌مانده‌ی آن با دستگاه فریز درایر ۵۵– درجه، کاملاً خشک شد. جهت بررسی تأثیر دفع – دورکنندگی– (مواد دورکننده باعث دوری یا فرار حشرات از سطوح آغشته به سم می‌شوند) بر روی پشه‌ی کولکس، غلظت‌های mg/kg ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ از عصاره‌ی تام متانولی برگ گردو با حلال ٪DMSO۱۰[2] در آب مقطر تهیه شد و جهت کار و آزمایش بر روی خوکچه‌ی هندی با وزن ۴۰۰ تا ۴۵۰ گرم استفاده گردید (۲۴).

انتخاب حشره: پشه‌های بالغ کولکس ۳ تا ۵ روزه از یکی از مکان‌های پرورش پشه در شهرستان آمل، وابسته به دانشکده‌ی بهداشت تهران تهیه و بلافاصله به آزمایشگاه دانشکده‌ی بهداشت ساری منتقل شدند. جهت انتقال، از کاپس‌های پلاستیکی که روی آن‌ها با توری پوشانده شده بود به همراه پنبه‌ی خیس استفاده شد و پشه‌ها با محلول ساکارز تغذیه شدند. در آزمایشگاه از پشه‌های ماده

[1]- Cx. Pipiens

[2]-DimethyL sulfoxide

جهت آزمایش استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از آزمایش، غذای پشه‌ها قطع شد تا در هنگام آزمایش کاملاً گرسنه باشند. درنهایت، برای هر آزمایش در هر قفس ۲۵ عدد پشه‌ی ۳ تا ۵ روزه قرار داده شد. جنس دیواره‌ی قفس از پلی‌اتیلن انتخاب شد تا درون آن شفاف و قابل مشاهده باشد؛ همچنین سقف آن با پارچه‌ی توری مسدود شد تا برای پشه‌ها امکان داشته باشد از میان آن نیش بزنند (۲۵).

آزمایش سنجش دافع حشره: برای آزمایش‌های حیوانی از خوکچه‌ی هندی آلبینو[1] از جنس نر با وزن ۴۰۰ تا ۴۵۰ گرم استفاده شد. در ابتدا موهای ناحیه‌ی پهلوی حیوان با تیغ تراشیده شد و با اتانول ضدّ عفونی گشت. سپس سایر قسمت‌های بدن حیوان پوشانده شد تا پشه‌ها امکان نیش زدن و خون‌خواری از دیگر نواحی به‌جز منطقه‌ی موردنظر را نداشته باشند. ابتدا و به‌عنوان شاهد، خوکچه‌هایی که پوست آن‌ها به هیچ ماده‌ی دافع حشرات آغشته نشده بود، در معرض گزش حشرات درون قفس قرار داده شدند. در این حالت، پشه‌ها به سمت بدن حیوان میزبان بسته - شده در قفس، هجوم برده با سرعت مبادرت به خون‌خواری کردند. در مرحله‌ی بعد، مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر از عصاره‌های تهیه‌شده با حلّال ۱۰٪DMSO (مرک آلمان) با آب مقطر مخلوط شد و با در نظر گرفتن وزن حیوان در غلظت‌هایmg/kg ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ بر روی پوست خوکچه در مساحتی به‌اندازه‌ی ۶×۴ سانتی‌متر پخش شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، تعداد گزش‌ها در منطقه‌ی مورد نظر ثبت شد و درنهایت، این آزمایش برای دافع N و N دیاتیل ۳-متیلبنزامید ((Deet) [2] (ماده‌ی شیمیایی شناخته‌شده به‌عنوان دافع حشرات) به‌عنوان کنترل مثبت، با همان مقدار ۰/۴ میلی‌لیتر در مساحت موردنظر، انجام شد (۲۶). ملاحظات اخلاقی نیز در این مطالعه رعایت شد و نحوه‌ی انجام پژوهش به‌گونه‌ای بود که خطری برای ادامه‌ی حیات خوکچه‌ها نداشته باشد.

برای هر یک از تیمارها آزمایش در ۳ مرحله تکرار شد و با نتایج به‌دست‌آمده از طرح آزمایشی[3] با انجام آزمون آنالیز واریانس (LSD) در سطح احتمال ۵٪ مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت. درصد میزان خون‌خواری و دورکنندگی نیز به درصد ارائه شد.

یافته‌ها

بازده عصاره‌ی برگ درخت گردو *Juglans regia* (L) که به روش پرکولاسیون و با حلّال متانول به دست آمد ۱۴/۹٪ بوده است.

جهت ارزیابی گزش پشه‌ها در غلظت‌های متفاوت، این غلظت‌ها در سه گروه mg/kg ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ آزمایش شدند و نمونه‌برداری در هر غلظت و در همه‌ی گروه‌ها انجام شد.

مقایسه‌ی میانگین‌های مربوط به اثر دورکنندگی عصاره‌ی برگ درخت گردو (*Juglans regia* L) با حلّال متانولی بر روی پشه‌ی کولکس پیپینس (*Culex pipiens*) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌های این گیاه، میزان خون‌خواری حشرات کاهش یافت؛ بدین معنی که میزان آن در غلظت mg/kg ۵۰، ٪۷۶ بود، در غلظت mg/kg ۱۵۰، ٪۴۸ بود و در غلظت mg/kg۲۵۰، ۲۶٪/۶۴ بود و در هر سه غلظت، معنادار بود (P.Value =۰/۰۰۱).

(جدول شماره‌ی ۱).

میزان تأثیرگذاری عصاره در صورت عدم هجوم حشرات و دورکنندگی آن بر روی حشرات (پشه‌ی کولکس گونه‌ی *Cx. Pipiens*) با افزایش غلظت، فزونی یافت و در غلظت‌های mg/kg ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ معنادار گزارش شد.

(جدول شماره‌ی ۲).

همچنین مشخص شد میانگین تعداد گزش در هر گروه در غلظت‌های گوناگون تفاوت معناداری ازنظر آماری در سطح اطمینان ۹۵٪ دارد (P-Value≤0.05)؛ برای بررسی تفاوت غلظت‌ها در گروه‌ها از آزمون LSD

[1]- Albino
[2]- N, N diethyl-3-methylbenzamide
[3]-Experimental Designs

استفاده شد که پی ولیوِ گروه‌ها و غلظت‌های مختلف آن، در جدول شماره‌ی ۲ ثبت شد و اختلاف نیز معنی‌دار بود. بیشترین اثر دورکنندگی برابر ۷۳/۳۴٪ و مربوط به غلظت ۲۵۰ mg/kg بوده است (البته در غلظت ۵۰ mg/kg میانگین دورکنندگی ۲۴٪ و در غلظت ۱۵۰mg/kg، ۵۲٪ بوده است) (جدول شماره‌ی ۱). میانگین‌های موجود در سطح آماری ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. میانگین کلی دورکنندگی درمجموع ۳ غلظت ۵۰mg/kg، ۱۵۰ و ۲۵۰، نظر به برآورد غلظت‌های مختلف عصاره‌ی برگ درخت گردو، به میزان ۴۹/۷۸٪ بوده است.

بحث

برگ گیاه گردو دارای مواد مؤثری از قبیل ترکیبات فنلی (مانند کتشین و تانن) است که علاوه بر خواص داروئی کاربردهای زیاد نیز دارند (۱۳)؛ این ترکیبات می‌توانند منجر به عملکردهای بیولوژیک و داروئی مانند ضدّیت با میکروب، مهار فعّالیت آنزیمی، خاصیت ضدّ اکسایشی، کاهش استرس اکسیداتیو و پیشگیری از سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و سیستم ایمنی، و دورکنندگی حشرات گردند (۲۷). کیدرلرن[1] و همکاران از کتشین به‌عنوان یک عامل دورکننده‌ی پشه‌ی خاکی ناقل بیماری سالک نام برده‌اند (۲۸). در مطالعه‌ای که به‌وسیله‌ی ترک و همکاران انجام شد اثر دورکنندگی عصاره‌ی پوست و مغز دانه‌ی گیاه جینکو[2] روی کنه‌ی تارتن دونقطه‌ای *Tetranychus* urticae Koch بررسی شد؛ در این مطالعه ترکیب کتشین در عصاره‌ی مغز و ترکیب کورستین در عصاره‌ی پوسته مشاهده شد و مشاهدات دیگر حاکی از وجود اثر دورکنندگی عصاره‌ها بر روی کنه‌ی تارتن دونقطه‌ای بوده است (۲۹). در مطالعه‌ی حاضر نیز از برگ درخت گردو جهت آزمایش و بررسی اثر دورکنندگی استفاده شد که نتیجه‌ی نسبتاً خوبی داشت. در بسیاری از تحقیقات گذشته از چند گیاه دارویی به‌عنوان دافع و بازدارنده و ازبین‌برنده‌ی تخم ولاروی حشره‌ی کامل سه گونه‌ی *Culex quinque-fasciatus*، *Aedes aegypti* و Anopheles *stephensi* پشه استفاده شد. درنهایت، اسانس گیاهان رزماری[3] و زنجبیل[4] به‌ترتیب، به‌عنوان از بین برنده و دافع سه گونه‌ی پشه معرفی شد (۳۰). در این مطالعه از عصاره‌ی متانولی گیاه *Juglans regia L* برای دفع حشره‌ی کولکس استفاده شد. نتایج بررسی، نشان‌دهنده‌ی خاصیت دورکنندگی خوبی بود که این نتایج با گزارش وانگ[5] (۳۱) مطابقت دارد. برگ گردو محتوی استر[6]، ترپن[7]، هیدروکربن[8] و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی ازجمله ترکیبات فونولیک است. ترکیبات فنولیک (تانن، فلاونول و فلاونوئید) اثرات سمّی زیادی برای بسیاری از حشرات، باکتری‌ها و قارچ‌ها دارند (۳۲ و ۳۳). در مطالعه‌ای که عباداللهی و همکاران انجام دادند مشخص شد اسانس گیاه گل مکزیکی[9] روی حشرات کامل ۷ تا ۱۴ روز *O. surinamensis* به‌صورت معنی‌داری سمّیت تنفسی دارد و مقدار LC50 حساب‌شده‌ی این اسانس روی این آفت انباری ۱۷/۷۸ میکرولیتر بر لیتر هوا گزارش شد (۳۴). در پژوهش حاضر میزان دورکنندگی برگ درخت گردو مورد استفاده قرار گرفت و تأثیر دورکنندگی آن گزارش شد. در این مطالعه نیز میزان دورکنندگی کلی برای عصاره‌ی برگ درخت گردو به میزان ۴۹/۷۸٪ بوده است. در تحقیقی که به‌وسیله‌ی مدرس و همکاران در مورد کاربرد فرآورده‌های درخت اکالیپتوس (پودر برگ و دانه) در کنترل آفات انباری مهم گندم و جو انجام شد، نتایج نشان داد که میزان دورکنندگی پودر بذر اکالیپتوس برای لمبه‌ی گندم ۶۷٪ و برای شپشه‌ی آرد ۷۵٪ است؛ درحالی‌که میزان

[1]- Kiderlen
[2]- *Ginkgobiloba* L
[3]- *Rosmarinus officinalis*
[4]- *Rosmarinus officinalis*
[5]- wang
[2]-Ester
[7]-Terpene
[8]-Hydrocarbon
[9]- *Agastache foeniculum* (Pursh)

دورکنندگی پودر برگ اکالیپتوس برای لمبه‌ی گندم ۵۰٪ و برای شپشه‌ی آرد ۶۵٪ بود (۳۵). در پژوهش حاضر و دیگر مطالعات ارزیابی شده به‌وسیله‌ی محققانی مانند Kweka، به‌عنوان کنترل مثبت از ترکیب شیمیایی دافع N-N دیاتیل-3 متیل بنزامید (DEET) استفاده شد و تأثیر دورکنندگی بالای آن برای حشرات آشکار شد (۳۶). در این مطالعه نیز اثر دورکنندگی برگ درخت گردو (*Juglans regia* L) در غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به ترتیب ۲۴، ۵۲ و ۷۳/۳۴٪ بوده است. در پژوهش دیگر بنده بروجنی و همکاران، که در آن اثرات حشره‌کشی اسانس برگ نارنج *Citrus aurantium* L بر آفات مهم انباری مورد بررسی قرار گرفت درصد دافع اسانس برگ گیاه برای سوسک کشیش، شپشه‌ی آرد و شپشه‌ی دندانه‌دار پس از 2 ساعت قرارگیری در معرض اسانس در بالاترین غلظت استفاده شده به ترتیب ۴۸/۹۰ و ۸۴٪ گزارش شد (۳۷). عوامل متعددی در آزمایش در دفع حشرات دخالت دارند که از این میان می‌توان استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان و درصد استفاده از آن‌ها، حلّال‌ها، روش‌های مختلف در استخراج و عصاره‌گیری در دفع حشرات و تعداد حشرات موجود در قفس مورد آزمایش را برشمرد (۸). البته در مواردی همچون تهیه و برداشت گیاه گردو و اندام مورد نظر در زمان و فصل خاص و دسترسی به دیگر گونه‌ها، انجام آزمایش بر روی انسان ازلحاظ عدم حسّاسیت و ایمنی و تعیین دوز مؤثر محدودیت‌هایی وجود دارد که جا دارد با تحقیقات، مطالعات و آزمایش‌های با دقت و ظرافت بیشتر بر روی حیوان برطرف گردند تا بتوان داروهایی ازاین‌دست را تولید و در راستای نیل به اهداف اقتصادی و برنامه‌های سلامت، روانه‌ی بازار کرد و آن‌ها را مصرف نمود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثربخشی عصاره‌ی برگ درخت گردو (*Juglans regia* L)، در مجموع غلظت‌ها در آزمایش‌های حیوانی به میزان ۴۹/۷۸٪ بود؛ به‌طوری‌که بیشترین اثر دورکنندگی آن برابر ۷۳/۳۶٪ و مربوط به غلظت ۲۵۰mg/kg بود. لذا عصاره‌ی این گیاه در دفع پشه‌ی کولکس در مقایسه با سایر گیاهان، دارای اثربخشی بالایی است که در صورت اثربخشی مطلوب در آزمایش‌های انسانی به‌عنوان جایگزینی مناسب پیشنهاد می‌گردد و می‌توان با به دست آوردن فرمولاسیون داروئی گیاهی مناسب آن مثلاً به شکل کرم و پماد از آن به‌عنوان دافع حشرات استفاده کرد. در پایان، با توجه به اینکه شناسایی ترکیبات مواد تشکیل‌دهنده‌ی اسانس و عصاره برای ارزیابی حسّاسیت‌زدایی، اثربخشی و دوام آن در افراد حائز اهمیت است توصیه می گردد نسبت به شناسایی ترکیب‌های موجود در اسانس و عصاره، زمان جمع‌آوری، مرحله‌ی رشد و نوع واریته‌ی گیاه اقدام شود و همچنین در مورد اثربخشی آن برای دیگرگونه‌های پشه‌ها با سایر حلّال‌ها و روش‌های عصاره‌گیری و اندام‌های دیگر گیاه نیز اقدام شود. ضمناً نظر به اینکه در این تحقیق مواد دورکننده در مقابل یک گونه حشره آزمایش شده است، پیشنهاد می شود بر روی دیگر گونه ها انجام گردد

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد ۱۳۴۱ در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات طبّ سنّتی و مکمّل تصویب شد؛ لذا از آن معاونت و مرکز محترم و از مرکز تحقیقات علوم داروئی و دانشکده‌های داروسازی و بهداشت ساری بابت همکاری در اجرا و مشاوره‌ی این تحقیق، تشکر می‌گردد.

شکل شماره‌ی (۱) برگ گیاه گردو (*Juglans regia* L)

جدول شماره‌ی(۱) مقیاس میانگین خون‌خواری و اثر دورکنندگی عصاره‌های خشک‌شده‌ی برگ گردو (*Juglans regia* L) بر میزان دفع حشره *culex pipiens* بر خوکچه‌ی هندی

ردیف	غلظت (mg/kg)	تعداد حشره در هر آزمایش	تعداد تکرار	میانگین خون‌خواری٪	میانگین دورکنندگی٪	F	P.Value
۱	۵۰	۲۵	۳	۰۰/۷۶	۰۰/۲۴		
۲	۱۵۰	۲۵	۳	۰۰/۴۸	۰۰/۵۲	۲۵/۸۲۵	۰/۰۰۰۱
۳	۲۵۰	۲۵	۳	۶۴/۲۶	۳۶/۷۳		

جدول شماره‌ی (۲) مقایسه‌ی دوگانه‌ی دورکنندگی عصاره‌ی برگ گردو (*Juglans regia* L) در غلظت‌های مختلف

غلظت (mg/kg)		انحراف معیار	P.Value	۹۵٪ فاصله‌ی اطمینان Lower Bound	Upper Bound
۵۰	۱۵۰	۷۲۱۳۳/۱	۰۰۷/۰	۷۸۸۱/۲	۲۱۱۹/۱۱
	۲۵۰	۷۲۱۳۳/۱	۰۰۰/۰	۱۲۱۴/۸	۵۴۵۳/۱۶
۱۵۰	۵۰	۷۲۱۳۳/۱	۰۰۷/۰	−۲۱۱۹/۱۱	−۷۸۸۱/۲
	۲۵۰	۷۲۱۳۳/۱	۰۲۱/۰	۱۲۱۴/۱	۵۴۵۳/۹
۲۵۰	۵۰	۷۲۱۳۳/۱	۰۰۰/۰	−۵۴۵۳/۱۶	−۱۲۱۴/۸
	۱۵۰	۷۲۱۳۳/۱	۰۲۱/۰	−۵۴۵۳/۹	−۱۲۱۴/۱

References:

1. Motevalli-Haghi F. Introduction to pesticides and their application in health care. First printing.Sari.Publishing Avaye Masih. 2011:56-57. [Persian]
2. Barat shooshtari M, Ghalandari R. Comparative study on repellent effect of extracts and essential oils of Melissa officinalis L, Rosmarinus officinalis L and Lavandula angustifolia Mill, against main malaria vector, Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2012;(27)4:606-614. [Persian]
3. Rahimi-Esboei B, Ebrahimzadeh M, Fathi H, Anzahaei FR. Scolicidal effect of Allium sativum flowers on hydatid cyst protoscolices.European review for medical and pharmacological sciences.2016;20(1):129-32.
4. Knell A. Malaria: Oxford University press. Oxford. 1991: 154 – 6
5. Azari-Hamidian S, Joeafshani M, Mosslem M, Rassaei A. Mosquito fauna and distribution of the genus Culex (Diptera:Culicidae) in Guilan province. Pajouhesh & Sazandegi .2005;68:39-45. [Persian]
6. Coleman RE, Robert LL, Roberts LW, Glass JA, Seeley DC, Laughinghouse A, et al. Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). Journal of medical entomology. 1993;30(3):499-502.
7. Abu-Qare, A.W. Abou-Donia, M.B..Development of high performance liquid chromatographic method for the quantification of chlorpyrifos, pyridostigmine bromide, N, N-diethyl toluamide and their metabolites in rat plasma and urine. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,2001; 754(2): 533-538.
8. Barnard DR, Xue R-D. Laboratory evaluation of mosquito repellents against Aedes albopictus, Culex nigripalpus, and Ochlerotatus triseriatus (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology. 2004;41(4):726-30.
9. Pérez S, Ramos-López M, Zavala-Sánchez M, Cárdenas-Ortega N. Activity of essential oils as a biorational alternative to control coleopteran insects in stored grains. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(25):2827-35.
10. Sharafati-chaleshtori R, Sharafati-chaleshtori F, Rafieian M.Antibacterial Effects of Ethanolic Extract of Walnut Leaves *(Juglans Regia)* on Propionibacterium Acnes.Zanjan University of Medical Sciences. 2010;18(71):42-49. [Persian]
11. Emami A, Shams-Ardekani MR, Nekoei-naeini N. [Translation] Valnet J. Phytotherapy, treatment of disease by plants. Tehran: Rahe-Kamal press; 2002.
12. Erdemoglu N, Küpeli E, Yeşilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 2003;89(1):123-9.
13. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira IC, et al. Walnut (Juglans regia L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and

antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology. 2007;45(11):2287-95.
14. 14- Mehrabian S, Majd A, Majd I. Antimicrobial effects of three plants (rubia tinctorum, carthamus tinctorius and juglans regia) on some airborne microorganisms. Aerobiologia. 2000;16(3-4):455-8.
15. Fathi H, Ebrahimzadeh MA, Ahanjan M. Comparison of the Antimicrobial Activity of Caucasian Wingnut Leaf Extract (Pterocarya fraxinifolia) and Walnut (Juglans regia L.) plants. Acta Biologica Indica. 2015;4(1):67-74.
16. Kaur K, Michael H, Arora S, Harkonen PL, Kumar S. Studies on correlation of antimutagenic and antiproliferative activities of Juglans regia L. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology. 2003;22(1): 59 –67.
17. Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnuts (Juglans regia L).Phytochemistry. 2003;63(7):795-801.
18. Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2005;582(1):155-62
19. Khoobdel M, Panahi Y, Ala Sh, Zarghi A. Determination and comparision of repulsive effect of Iranian and foreign DMT insecticide lotion and cream rifle-pit against culex pipiens in vitro. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences .2007;16(56): 83-90. [Persian]
20. Fathi H, Mohammadi HR. Determination of in vitro total phenolic, flavonoid contents and antioxidant capacity of the methanolic extract of Echium amoenum L.Complementary Medicine Journal. 2016;6(1):1441-51. [Persian]
21. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh M, Abdi M, Arimi Y, Fathi H. Antidepressant activities of Feijoa sellowiana fruit.European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2015;19(13):2510-3.
22. Zargari A. Medical Plants. Tehran: Tehran University Press; 1990. p. 459. [Persian]
23. Fathi H, Ebrahimzadeh MA, Ziar A, Mohammadi H. Oxidative damage induced by retching; antiemetic and neuroprotective role of Sambucus ebulus L. Cell biology and toxicology. 2015;31(4-5):231-9.
24. Fathi H, Lashtoo Aghaee B, Ebrahimzadeh M. Antioxidant activity and phenolic contents of Achillea wilhelmsii.Pharmacologyonline. 2011;2:942-9.
25. Oshaghi M, Ghalandari R, Vatandoost H, Shayeghi M, Kamali-Nejad M, Tourabi-Khaledi H, et al. Repellent effect of extracts and essential oils of Citrus limon (Rutaceae) and Melissa officinalis (Labiatae) against main malaria vector, Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae). Iranian Journal of Public Health. 2003;32(4):47-52. [Persian]
26. Norashiqin M, Sallehudin S, Hidayatulfathi O. The Repellent Activity of *Piper aduncum* L.

economic entomology. 2007;100(4):1298-303.
32. Buttery RG, Flath RA, Mon TR, Ling LC.Identification of germacrene D in walnut and fig leaf volatiles.Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1986;34(5):820-2.
33. Miliauskas G, Venskutonis P, Van Beek T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry. 2004;85(2):231-7.
34. Ebadollahi A, Safaralizadeh M, Pourmirza A, Gheibi S. Toxicity of essential oil of Agastache foeniculum (Pursh) Kuntze to Oryzaephilus surinamensis L. and Lasioderma serricorne F. Journal of Plant Protection Research. 2010;50(2):215-9.
35. Modarres S, Najafabadi H, Fanai Gh. Study on Eucalyptus Product Uses (Seed and Leaf Powder) on Stored Product Pests of Wheat and Barley in Sistan Region-Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants .2006;22(2):117-12. [Persian]
36. Kweka E, Mwango'onde B, Mahande M, Mosha F, Kimaro E, Msangi S, et al. Evaluation of Ocimum suave essential oil against anthropophilic malaria vector Anopheles gambiae ss after ten years of storage. Tanzania Journal of Health Research. 2009;11(2):94-6.
37. Bandeh Borojeni Sh, Zandi Sohani N, Ramzani L. Chemical compounds of Citrus aurantium L leaf Essential oil and it's insecticidal effects on three major pest of storage. Scientific Journal of Agriculture.2016;38(4):23-31. [Persian]

(Family: Piperaceae) Essential Oil against *Aedes aegypti* Using Human Volunteers. The Journal of Tropical Medicine Parasitology,2008;31: 63-69.
27. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM.Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993;90(17):7915-22.
28. Kiderlen AF, Kayser O, Ferreira D, Kolodziej H. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of Leishmania donovani and release of nitric oxide and tumour necrosis factor a in macrophages in vitro. Zeitschrift für Naturforschung C. 2001;56(5-6):444-54.
29. Tork P.Sabahi Gh, Talebi JahromyKH, Bandani A R .Identification ofthe compounds in the extract of the skin andseed of *Ginkgobiloba* L andtheirrepellenteffect on *Tetranychusurticae* Koch. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture).2013;36(1):39-49. [Persian]
30. Prajapati V, Tripathi A, Aggarwal K, Khanuja S. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against Anopheles stephensi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. Bioresource Technology. 2005;96(16):1749-57.
31. Wang Y, Shi G, Zhao L, Liu S, Yu T, Clarke S, et al. Acaricidal activity of Juglans regia leaf extracts on Tetranychus viennensis and Tetranychus cinnabarinus (Acari: Tetranychidae). Journal of

Original Article

Evaluating the repelling property of *Juglansregia* L leaf extract on the culex pipiens in invitro conditions

Fathi H[1], MotevalliHaghi F[*2], Ebrahimzadeh MA[3], Nikookar H[4], karami M[5], parsiB[6]

[1] M.Sc in Biology,Traditional and Complementary Medicine Research Center,Mazandaran University ofMedical Sciences, Sari, Iran.

[2]Assistant Professor, PhD in Animal Parasitology,Department of Entomology, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

[3] Professor,PhD inMedicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center,Department of Medicinal Chemistry,Faculty of Pharmacy,Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

[4]Ph.D Student inHealth Sciences, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health and Health Sciences Research Center, Student Research Committee,Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

[5]Assistant Professor, Ph.D inMedical Entomology,Department of parasitology and mycology, Faculty of Medicine ,Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

[6] Assistant Professor, Ph.D in Physiology,Department of Physiology, Faculty of Medicine,Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Received: 20 April, 2016 ؛Accepted: 27 August, 2016

Abstract

Introduction*:* In the recent years, the over use of pesticides is not only following by the health hazardous and environmental problems, but also leading to the resistance of the pests to pesticides. Therefore, it is necessary to find a proper, safe, durable and economic method in order to get rid of them thoroughly. Hence, the use of pest repellents which have been prepared from *Juglans regia* L is an Idean method in the prevention of several diseases. In the traditional medicine, different parts of the *Juglans regia* L have been used for the various purposes. It has been reported that the leaf extract of this plant is anti-inflammatory analgesic, antioxidant and with other biological properties. The present study aims to identify and use the domestic plants which are pest repellent and safe for man.

Methods*:* In this experimental laboratory Research, the *Juglans regia* L leaves were collected from the natural growing regions of Sari Township (central, Asfyord district, the Galeh Kola Sofla, Kordkhayl Village). After drying, the leaf extraction was performed. The concentration of 50,100and250mg/kg were prepared and spread on the skin of Albino Gunipig. After 30 minutes, the number of the Culex pipiens bites on the skin area was recorded and statistical analysis was performed.

Result: The mean repelling effect comparison of the leaf extract on the Culex pipiens showed at high concentrations of leaf extracts of *Juglans regia* L, blood feeding of insects was less observed and in these various concentrations, significant difference was reported (P=0.001) the highest repelling property was correlated with the concentration of 250mg/kg of *Juglans regia* L extract and the repelling effect was73.36%.

Conclusion*:* The metanolic *Juglans regia* L leaf extract effect on the c.pipiens, showed that the repelling effect of the extract goes up with the increase of the extract concentration. The efficacy percentage for the average concentration was49.78% in animal experiments. Therefore, it is recommended to use *Juglans regia* L leaf extract in the preparation of this product in order to prevent the culex pipiens bite.

Keywords: Pest repellent, *Juglans regia* L, *Culex pipiens*

*Corresponding author: E.mail: haghi77@yahoo.com