**مقاله تحقیقی**

# تأثیر عصاره نعناع فلفلی، مریم گلی، شیرین بیان و زعفران بر سلولهای خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز لارو شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae)

**زهرا ابراهیمی‌زاده[1]، مریم عجم‌حسنی[2]**

۱، ۲– دانشجوی کارشناسی ارشد حشره شناسی ، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.
مسئول مکاتبات: مریم عجم‌حسنی، ایمیل: shahroodm@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷ ۱۰(۱) ۱۶۹–۱۸۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱

## چکیده

همولنف حشرات آخرین سد دفاعی آن‌ها در مقابل عوامل بیگانه مانند ذرات سموم، آلاینده‌ها، اسپور قارچ‌ها و باکتری‌ها و متابولیت‌های گیاهی است. هموسیت‌ها به عنوان رکن اصلی دفاع فیزیولوژیک در همولنف گردش می‌کنند و در مراحل اولیه با تغییر تعداد در برابر تنش، واکنش نشان می‌دهند. در این تحقیق تأثیر عصاره آبی گیاهان نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران بر سامانه ایمنی لارو شب پره هندی *Plodia interpunctella (Lepidoptera ;Pyralidae)* بررسی شد. لاروهای سن چهارم این آفت انباری، با عصاره‌های آبی نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین بیان و زعفران در غلظت‌های ۶، ۱۰و ۲۰ درصد تیمار شدند و تراکم سلول‌های خونی و فعالیت فنل اکسیداز در دو بازه زمانی ۲۴و ۴۸ ساعت اندازه‌گیری و ثبت شد. نتایج نشان داد تأثیر عصاره‌های مختلف گیاهان نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران بر تعداد کل سلول‌ها، پلاسموتوسیت‌ها وگرانولوسیت‌ها نسبت به شاهد معنی‌دار بود و با افزایش غلظت عصاره‌ها در همه تیمارها و در هر دو زمان آزمایش افزایش یافت. تعداد کل سلول‌ها و گرانولوسیت‌ها در تیمار مریم گلی با غلظت۶ درصد پس از ۴۸ ساعت و نعناع فلفلی با غلظت‌ها ی ۱۰ و ۲۰ درصد در هر دو زمان بیشترین افزایش را در تعداد کل سلول‌های خونی نسبت به شاهد داشتند. پلاسموتوسیت‌ها نیز تحت اثر تیمار نعناع فلفلی با غلظت‌های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد پس از ۲۴ ساعت و غلظت۲۰ درصد پس از ۴۸ ساعت بیشترین افزایش را نسبت به شاهد داشتند. با توجه به ارزیابی‌های صورت گرفته غلظت ۲۰٪ مریم‌گلی بیشترین افزایش فعالیت آنزیم فنل اکسیداز را نسبت به شاهد و سایر تیمارها نشان داد. بر اساس نتایج، حضور مقادیر اندک از عصاره‌های گیاهی به‌کارگرفته شده در این تحقیق، به ویژه مریم گلی و نعناع فلفلی در همولنف لاروهای شب پره هندی می‌تواند تاثیر معنی‌داری بر تغییرات تراکم سلول‌های خونی داشته باشد که بالتبع، واکنش ایمنی حشره را در مقابل عامل بیگانه تحریک می‌کند و می‌توان از این یافته در مطالعات ایمنی شناسی این حشره مهم انباری استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** شب‌پره هندی، عصاره آبی گیاهان، ایمنی سلولی، آنزیم فنل اکسیداز

## مقدمه

آفات انباری اغلب به طیف وسیعی از محصولات ذخیره شده در انبارها حمله می‌کنند و هرساله خسارت‌های جبران‌ناپذیری به انبارها و سیلوها وارد می‌کنند (Koul *et al.*, 2008) این حشرات علاوه بر تأثیرات منفی بر روی کمیت و کیفیت محصولات غذایی ذخیره شده، بر ارزش غذایی و بازاریابی آن‌ها تأثیر می‌گذارند (Rajendran & Sriranjini, 2008). شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* (Hubner) متعلق به خانواده Pyralidae، یک آفت جهانی است که از محصولات ذخیره شده و کالاهای غذایی

فرآوری شده تغذیه می‌کند. این حشره می‌تواند انواع مواد غذایی خشک و خشکبار و فرآورده‌های آردی مانند بیسکویت، ماکارونی و نیز انواع شکلات و سبزیجات و مواد سلولزی خسارت وارد می‌کند و می‌توان گفت یکی از مهم‌ترین حشرات آفت مواد غذایی فرآوری شده است (Mohandass *et al*., 2007, Abo–El–Saad and El–Shafie 2013).

موفقیت حشرات در بقا و تولیدمثل تا حد زیادی به سیستم ایمنی قوی آن‌ها مربوط می‌شود. اولین مانع دفاعی در برابر عوامل برون‌زا مربوط به کوتیکول حشره، پرده اطراف غذا، اپیتلیوم روده میانی و نای است (Hillyer, 2016; Stanley & Miller, 2006). ایمنی سلولی آخرین و مهم‌ترین سد دفاع حشره در برابر انواع تنش‌ها و عوامل بیگانه است و اغلب نقش تعیین‌کننده‌ای در بقای حشره دارد. در این بخش نقش مشارکت سلول‌های خونی و فعالیت سیستم فنل‌اکسیداز قابل‌توجه است (Ajamhassani, 2015). به‌طورکلی سیستم ایمنی حشرات از نوع ذاتی بوده که در مقابل ورود عوامل بیگانه یا آلوده و هر نوع تنش مانند گرسنگی، تغییرات دمایی و اسیدیته، دیاپوز و... فعال می‌شود. پس از ورود عوامل مهاجم به همولنف، اولین اقدام شناسایی آن‌ها توسط لکتین‌هایی است که روی سطح غشای گرانولوسیت‌ها مستقر هستند. در واقع هر اندازه گرانول‌های سطح گرانولوسیت‌ها بیشتر باشند، امکان شناسایی عوامل بیگانه افزایش یافته و سلول‌های خونی با سرعت بیشتری برای انهدام آن‌ها وارد عمل می‌شوند. پس از شناسایی عوامل بیگانه وارد شده در هموسل، اولین واکنش ایمنی بندپایان با تغییرات تعداد و شکل سلول‌های خونی همراه است (Li *et al*., 2019). این امر در همان ساعات ابتدایی ورود عامل بیگانه یا تنش صورت می‌گیرد و فرایندهای بیگانه‌خواری و گره‌زایی و بلوکه‌شدن عامل بیگانه در راستای مبارزه رخ می‌دهد. در حین انجام این فعالیت‌های ایمنی، پروفنل اکسیداز موجود در اپیدرم، لوله‌های مالپیگی و دیواره لوله گوارش نیز فعالی می‌شود که با ترشح کوئینون بر روی عامل بیگانه محاصره شده توسط هموسیت‌ها، آن را ملانیزه کرده و به یک لکه دفعی تبدیل می‌کند. نهایتا این لکه دفعی به همراه جریان خون به سمت لوله‌های مالپیگی حرکت می‌کند تا از طریق مخرج همراه با سایر فضولات گوارشی و متابولیسمی از بدن دفع شود (Borges *et al*., 2008).

باتوجه‌به اینکه محصولات انباری از نظر اقتصادی دارای جایگاه ویژه‌ای هستند، می‌توان از جایگزین‌های ایمن مانند عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به‌جای سموم شیمیایی بهره گرفت چرا که عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی دارای متابولیت‌های موثر بر ویژگی‌های زیستی و تغذیه‌ای و ایمنی حشرات مختلف می‌باشند (Gaire *et al*., 2020). Darnahal *et al*. (2020) در همین راستا مطالعه تأثیر عصاره‌های آنغوزه و به‌لیمو بر سامانه ایمنی بید آرد نشان داد در همان ساعات اولیه پس از ورود عصاره‌ها به سیستم گردش خون حشره میزان کل سلول‌های خونی به طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کند (Ajamhassani, 2021). همچنین اثر اسانس ریحان مقدس، ریحان میخکی و گل ابری بر کرم ابریشم سبب افزایش تعداد کل سلول‌های خونی در ساعات اولیه شد (Khanikor & Bora, 2012) تیمار عصاره درمنه بر تعداد کل سلول‌های خونی سن گندم نشان می‌دهد که پاسخ ایمنی حشره می‌تواند به دلیل اثر سمی عصاره باشد (Zibaee & Bandani., 2010). افزایش معنی‌دار تعداد گرانولوسیت‌ها در لاروهای *Spodoptera litura* تیمار شده با عصاره سوسن صغیر (*Acorus calamus*) گزارش شده است (Sharma *et al*., 2008). افزودن ترکیبات گیاهی کاساوا به رژیم غذایی *S.litura* سبب افزایش بارز گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در ساعات اولیه ورود به همولنف شد (Manjula *et al*., 2020)به علاوه گزارشاتی مبنی بر تاثیر عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز حشرات وجود دارد (Oftadeh *et al*., 2021). آنزیم فنل‌اکسیداز جزء آنزیم‌های رده Oxydoreductases است که با انتقال الکترون از مولکول سوبسترا به سایر مولکول‌ها باعث اکسیداسیون سوبسترا می‌گردد. این آنزیم یکی از مهم‌ترین آنزیم‌هایی موجود در سیستم ایمنی ذاتی بی‌مهرگان می‌باشد (Cerenius & Soderhall, 2004, Ling *et al*,).

(2014. افزایش شمار انوسیتوئیدها در بازه زمانی بالاتر پس از تزریق، می‌تواند در ارتباط با نقش مهم این یاخته‌های خونی به‌عنوان منبع فنل اکسیداز باشد که به دنبال افزایش شمار آن‌ها، به احتمال منجر به تولید بیشتر فنل اکسیداز از مسیر یاخته‌ای می‌شود (Ribeiro& Brehelin 2006).

اثرات کشندگی، دور کنندگی، ضد تغذیه ای و ضد تخمریزی عصاره‌های گیاهی نعناع فلفلی (Wubie *et al*, 2014)، مریم گلی (Irfan *et al*., 2016)، شیرین بیان (Nazeefullah *et al*., 2017) بر حشرات ثابت شده است همچنین گزارش شده است که عصاره گلبرگ‌های زعفران بر فاکتورهای خونی موش موثر است (Hariri *et al*, 2018). از طرف دیگر، تحقیقات در ارتباط با برهم‌کنش ایمنی حشرات با این عصاره‌های گیاهی، چندان توسعه یافته نیست. بنابراین، در تحقیق حاضر، بررسی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهان نعناع فلفلی، مریم گلی، شیرین بیان و زعفران بر فراوانی سلول‌های خونی و فعایت آنزیم فنل اکسیداز شب پره هندی هدف قرار گرفت.

## مواد وروش‌ها

### پرورش حشرات

لارو شب‌پره هندی از انبار کشمش‌های بی‌دانه و پسته از شهرستان درگز جداسازی گردید. سپس بر روی غذای مصنوعی (پودر جوانه گندم ۴۰۰ گرم +عصاره مالت جو ۸۰ گرم+۵۰ سی‌سی عسل +۵۰ سی‌سی گلیسرول) (Ebrahimi & Ajamhassani, 2020) درون ظروفی با ابعاد (۱۰×۱۰× ۲۰ سانتیمتر) که درب آن دارای توری، جهت تبادل اکسیژن بود قرار داده شدند. آن‌گاه ظروف پرورش در اتاق رشد (دمای ۲± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰٪ و روشنایی و تاریکی ۱۶:۸ ساعت) پرورش داده شدند. پس از سه نسل پرورش، از لاروهای سن چهارم برای آزمایش‌های ایمنی‌شناسی استفاده شد. برای مشخص نمودن سن لارو از طول بدن و عرض کپسول سر استفاده شد (Dayar,1890).

### مواد گیاهی

گیاهان موردمطالعه نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران در این پژوهش، از زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها در شهرستان درگز جمع‌آوری شدند. این گیاهان به طور طبیعی در دمای اتاق (۲۵–۲۳ درجه سلسیوس) قرار داده شدند، پس از یک هفته گیاهان خشک شده و از عصاره آن‌ها در آزمایشات استفاده شد.

### تهیه عصاره آبی گیاهی

عصاره‌ها با استفاده از روش (Azimi, *et al*., 2006) با کمی تغییر تهیه گردید. بدین صورت که مقدار ۲/۵ گرم از اندام هوایی هر گیاه آسیاب شده و دورن یک لوله فالکون با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. لوله درون بن ماری (۹۵ درجه سلسیوس) به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده شد. (در مورد زعفران از گلبرگ‌های گیاه عصاره گیری شد). سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید و به‌منظور تبخیر آب و استحصال عصاره درون آون در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. عصاره حاصل در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد و در زمان‌های مورد نیاز جهت آزمایشات استفاده شد.

### زیست‌سنجی

برای انجام زیست‌سنجی، غلظت‌های مختلف با آزمایش‌های ابتدایی از عصاره‌های هر چهار گیاه تهیه شدند. این غلظت‌ها جداگانه به غذای مصنوعی (پودر جوانه گندم ۴۰۰ گرم، پودر عصاره مالت جو ۸۰ گرم، گلیسرول ۵۰ سی‌سی، عسل ۵۰ سی‌سی) تیمار شدند. به این طریق که مقدار یک گرم از غذای مصنوعی در هر پتری قرار داده شد و سپس با استفاده از میکرو پیپت، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهان با غلظت‌های ۱٪، ۲٪، ۶٪، ۱۰٪، ۱۵٪، ۲۰٪ به غذای مصنوعی هر پتری، اضافه گردید. باتوجه‌به اینکه درون هر پتری یک عدد لارو سالم سن چهارم قرار داده می شد، بنابراین برای هر غلظت از هر عصاره، تعداد ۴۰ عدد پتری آماده شد که در واقع شامل ۴ گروه (تکرار) ۱۰ تائی بودند. همچنین تیمار شاهد نیز شامل پتری‌های غذای مصنوعی حاوی لارو بود که به غذا آب مقطر افزوده شد.

سپس به لاروها اجازه داده شد که به مدت ۲۴ ساعت، از غذای آلوده تغذیه نمایند. با محاسبه $LC_{25}$، $LC_{50}$ و $LC_{75}$ غلظت‌های مورد نیاز برای انجام آزمایشات تعیین شد.

## بررسی تأثیر عصاره‌های گیاهان نعناع فلفلی، مریم‌گلی بر تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در لاروهای سن چهارم شب‌پره هندی

جهت انجام آزمایش از غلظت‌های ۶، ۱۰ و ۲۰ درصد (به ترتیب $LC_{25}$، $LC_{50}$ و $LC_{75}$ ) بر اساس نتایج زیست سنجی استفاده شد. در هر پتری دیش مقدار پنج گرم غذای مصنوعی آلوده شده با یک سی سی عصاره قرار داده شد. آنگاه تعداد ۵ عدد لارو سن چهار در پتری قرار داده شد. به عبارتی، برای هر غلظت از هر گیاه چهار پتری غذای آلوده در نظر گرفته شد که هر پتری محتوی ۵ لارو بود. تیمار شاهد شامل گروهی از لاروها بود که غذای آن‌ها با آب مقطر آغشته شد. به لاروها اجازه داده شد که مدت ۲۴ و۴۸ ساعت از غذای آلوده تغذیه کنند. سپس از لاروها خون‌گیری به عمل آمد. همولنف مربوط به پنج لاروی که درون هر پتری بودند به عنوان یک تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. (هر تیمار دارای چهار تکرار). به این ترتیب، پس از گذشت زمان مقرر، تعداد کل هموسیت‌ها، تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها مربوط به تیمارهای مختلف شمارش و ثبت گردید.

$$\frac{\text{تعداد هموسیت ها} \times 1mm^2 \times \text{ضریب رقت} \times \text{عمق خانه های لام گلبول شمار}}{\text{تعداد خانه های شمارش شده از لام}}$$

سپس با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 تجزیه داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح یک درصد انجام شد.

## اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنل اکسیداز:

برای تعیین اثر عصاره‌های گیاهی بر روی فعالیت آنزیم فنل اکسیداز لاروهای سن چهارم شب‌پره هندی از روش هموسیت لایزیت استفاده گردید (Leonard, 1985). در این روش برای هر تیمار از ۳۰ عدد لارو سن چهارم، خون گیری انجام شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

## نتایج

بر اساس جدول شماره ۱، سمیت گوارشی عصاره‌های آبی نعناع فلفلی، مریم گلی، شیرین بیان و زعفران بر لارو سن چهارم شب پره هندی تعیین شد. مقدار $LC_{50}$ عصاره نعناع فلفلی و مریم گلی پایینتر از سایر گیاهان به دست آمد که نشان دهنده سمیت بیشتر این گیاهان علیه حشره بود. دور زیر کشنده $LC_{50}$ هم برای هر گیاه مشخص شده است (جدول ۱). از غلظت‌های ۶، ۱۰ و ۲۰ درصد گیاهان نامبرده بر اساس پروبیت داده ها، به عنوان غلظتهای $LC_{25}$، $LC_{50}$ و $LC_{90}$ در آزمایشات ایمنی شناسی استفاده شد.

جدول ۱– سمیت گوارشی عصاره نعناع فلفلی، مریم گلی، شیرین بیان و زعفران روی لاروهای سن چهارم شب پره هندی

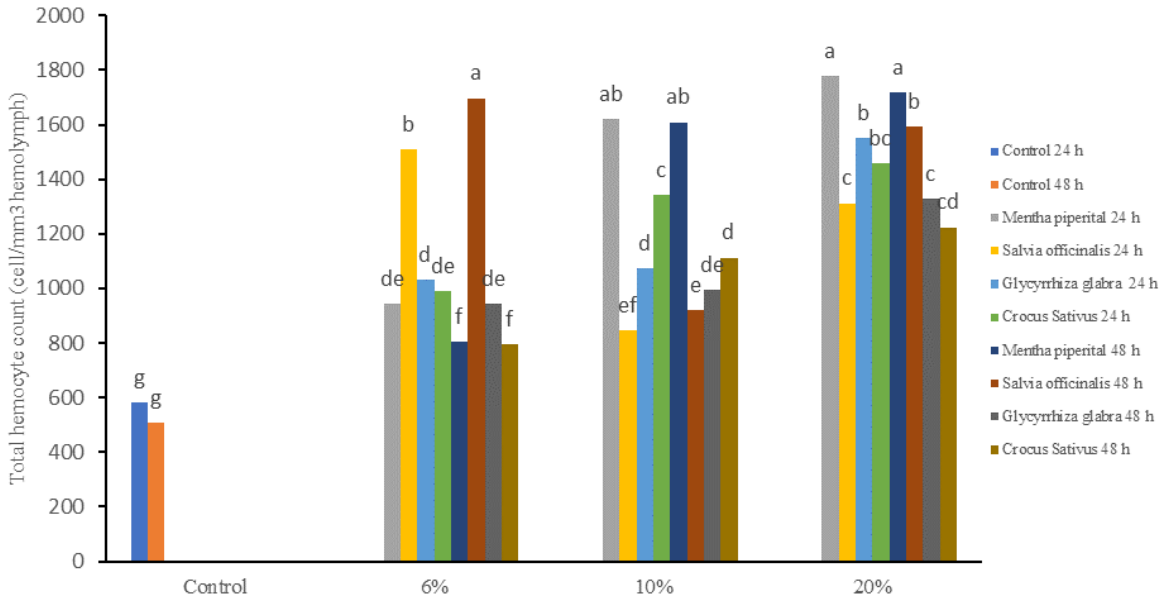
Table 1. Probit analysis of the oral toxicity of extract of *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Glycyrrhiza glabra* and *Crocus sativus* on fourth instar larvae of *Plodia interpunctella.*

| Bioassay (Oral Toxicity) | LC25 (95% CL) | LC50 (95% CL) | LC90 (95% CL) | Slope ± SE | $X^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| *Mentha piperita* | 6.67 (4.56–7.23) | 9.76 (7.86–11.45) | 19.25 (17.88–21.04) | 3.753±0.43 | 2.67 |
| *Salvia officinalis* | 6.21 (5.34–7.90) | 10.34 (8.06–12.46) | 20.55 (18.87–22.4) | 3.56±0.66 | 2.15 |
| *Glycyrrhiza glabra* | 7.76 (5.58±8.44) | 11.34 (8.75±13.56) | 21.34 (19.6±23.45) | 2.87±0.23 | 2.88 |
| *Crocus sativus* | 8.44 (6.33±9.90) | 11.50 (10.34±12.77) | 22.36 (20.4±24.8) | 2.90±0.55 | 3.12 |

LC: lethal concentration (% W/V), CL: confidence limits, $X^2$. Chi–square value, and df: degrees of freedom.

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تأثیر عصاره‌های آبی گیاهان نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران بر کل سلول‌های خونی (THC) نشان داد ($F=23.60;\ d_{t,e} = 25,78\ ;P < 0.0001$) تعداد کل سلول‌های خونی تیمارها با شاهد دارای تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ هستند.

بر اساس نتایج تیمار نعناع فلفلی با غلظت‌های ۱۰و۲۰ درصد که همان غلظت های $LC_{50}$ و $LC_{90}$ پس از۲۴ ساعت سبب بیشترین افزایش تعدادکل سلول‌ها به ترتیب به مقدار ۱۶۱۹±۵۱/۰۲، ۱۷۷۹±۴۶/۸۵ عدد در میلی متر مکعب در خون حشره نسبت به شاهد شدند. به علاوه، عصاره نعناع فلفلی با غلظت‌های ۱۰ و۲۰ درصد و مریم‌گلی با غلظت ۶ درصد پس از ۴۸ ساعت به ترتیب به مقدار ۱۶۰۹/۴±۵۴، ۱۷۱۷/۰۲ و ۱۶۷۹±۱۰۴/۹ عدد در میلی متر مکعب در خون حشره سبب افزایش THC شدند. بر اساس مشاهدات شکل ۱، سایر تیمارها نیز همگی افزایش قابل توجهی در تعداد کل سلول‌ها نسبت به شاهد داشتند (شکل ۱).

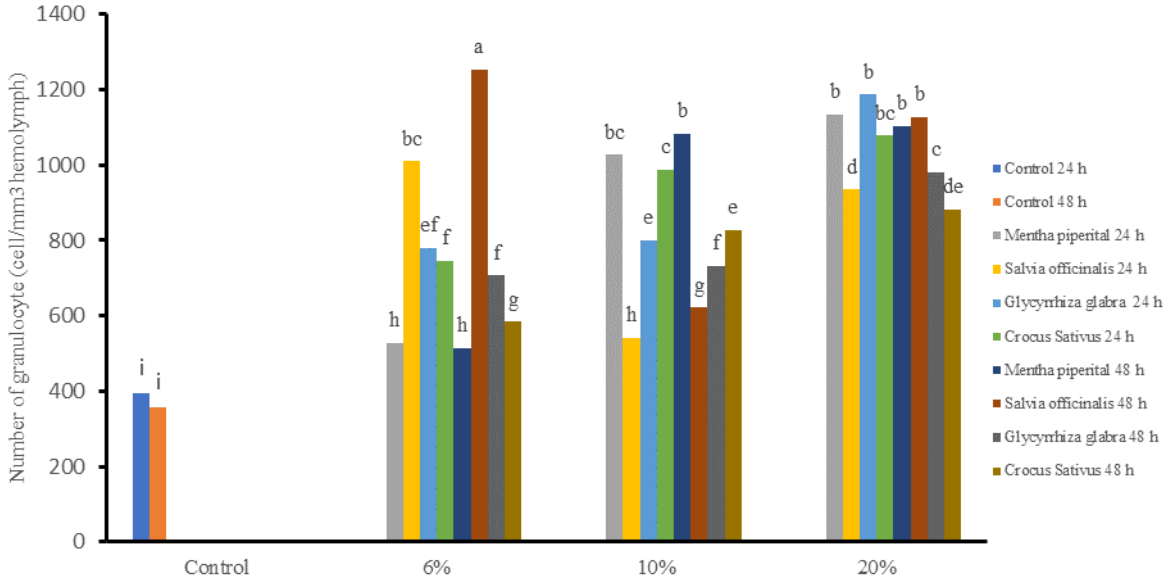



شکل ۱– تعداد کل سلول‌های خونی لارو سن چهارم شب‌پره هندی تحت‌تأثیر تغذیه از غذای مصنوعی آلوده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت

Fig. 1. Total hemocyte count of fourth instar larvae of *Plodia interpunctella* affected by feeding on infected diet by different concentration of plant extracts after 24 and 48 h.

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تأثیر عصاره‌های گیاهی نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران بر تعداد گرانولوسیت‌ها در تمامی تیمارها ($F=36.75;\ d_{t,e} = 25,78; P = 0.0001$)نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ بود.

تیمار مریم‌گلی با غلظت۶٪ پس از ۴۸ ساعت بیشترین افزایش را در تعداد گرانولوسیت‌ها به مقدار ۹۴/۵۶ ± ۱۲۵۴ عدد در میلی متر مکعب خون نشان داد. نعناع فلفلی با غلظت۶٪ پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت کمترین افزایش گرانولوسیت‌ها را به ترتیب به مقدار ۵۲۸±۷۱/۰۱ و۵۱۴±۷۱/۱۳ عدد در میلی متر مکعب خون حشره نسبت به شاهد نشان دادند. سایر تیمارها به ویژه در غلظت ۲۰ درصد، سبب افزایش حدود ۳ برابری گرانولوسیت‌ها شدند. این سلول‌ها به عنوان سلولهای اصلی مشارکت کننده در بیگانه خواری و گره‌زایی، بالاترین فعالیت را در فرایند دفاعی حشرات دارند (شکل ۲).

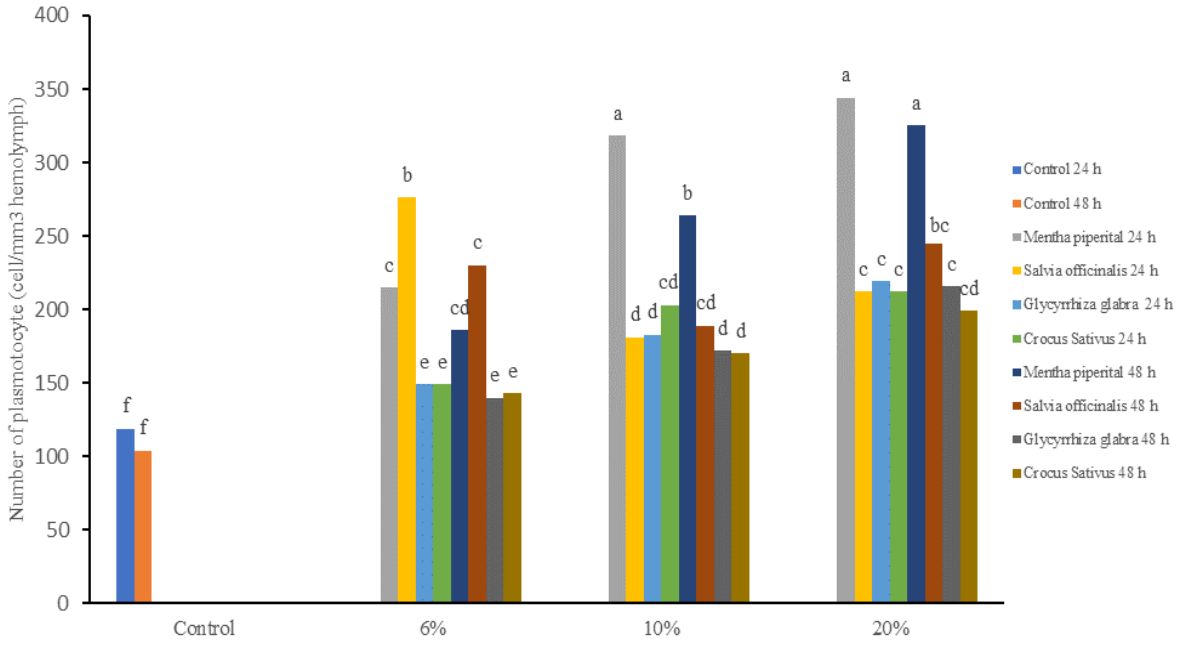



شکل ۲– تعداد گرانولوسیت‌های لارو سن چهارم شب‌پره هندی تحت‌تأثیر تغذیه از غذای مصنوعی آلوده با غلظت‌های مختلف عصاره های گیاهی پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت

Fig. 2. number of granulocytes of fourth instar larvae of *Plodia interpunctella* affected by feeding on infected diet by different concentration of plant extracts after 24 and 48 h.

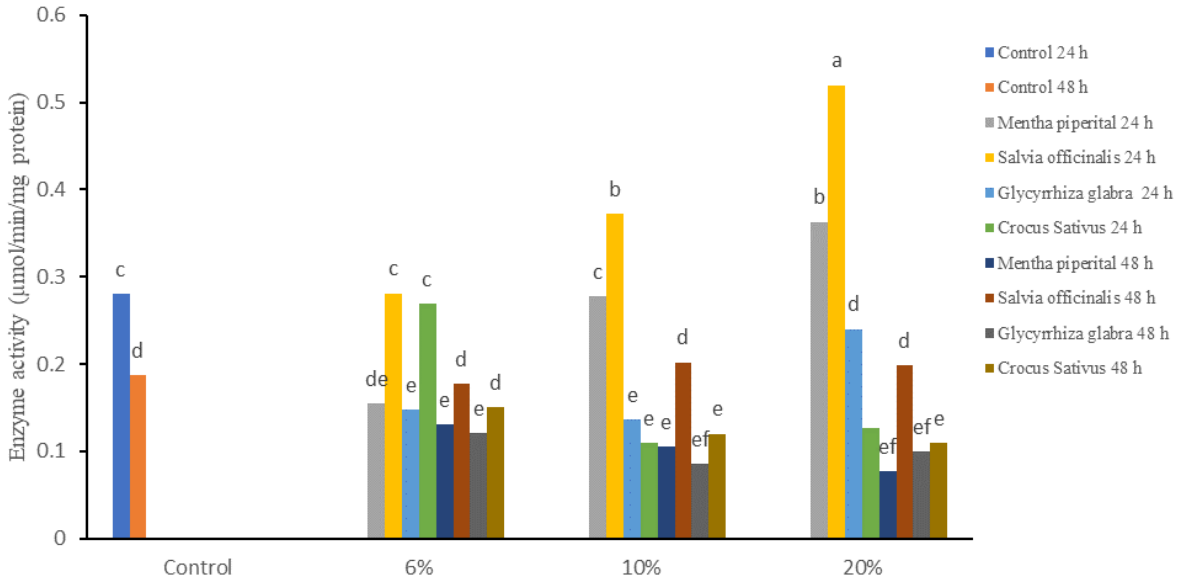
تراکم پلاسموتوسیت‌های لارو شب پره هندی پایین‌تر از گرانولوسیت‌ها بود. در عین حال، تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش تأثیر عصاره‌های آبی گیاهان نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران نشان داد که تمامی غلظت‌های تیمارها تفاوت معنی‌داری در تعداد پلاسموتوسیت‌ها در سطح ۵٪ با شاهد داشتند ($F=11.88;d_{t,e}=25,78;P=0.0001$).

بر اساس ارزیابی‌های صورت‌گرفته تیمارهای نعناع فلفلی در غلظت‌های ۱۰و۲۰ درصد پس از ۲۴ ساعت و تیمار نعناع فلفلی در غلظت ۲۰ درصد پس از گذشت ۴۸ ساعت سبب افزایش معنی دار تعداد پلاسموتوسیت‌ها به ترتیب به مقدار ۲۸/۴±۳۱۸، ۲۱/۹±۳۴۴ و۸±۳۲۵ عدد در میلی متر مکعب خون حشره شدند. تیمار شیرین بیان و زعفران با غلظت۶٪ پس از ۴۸ ساعت کمترین افزایش را در تعداد پلاسموتوسیت‌ها به ترتیب به مقدار ۱۴۰±۹و۱۰/۲±۱۴۳ عدد در میلی متر مکعب خون حشره سبب شدند (شکل ۳). تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تأثیر عصاره‌های گیاهان نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران بر میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در تمامی تیمارها نسبت به شاهد اختلاف ($F=11.39;d_{t,e}=25,52;P<.0001$) معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ نشان داد. نتایج نشان داد غلظت ۲۰٪ مریم‌گلی پس از گذشت ۲۴ ساعت بیشترین افزایش را در میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز نسبت به شاهد (۰/۰۰۶ ± ۰/۵۶ میکرو مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) داشته است (شکل ۴). عصاره مریم گلی در غلظت ۱۰ درصد و نعناع فلفلی در غلظت ۲۰ درصد (هر دو تیمار پس از ۲۴ ساعت) در مرتبه بعدی از نظر افزایش دهندگان فعالیت فنل اکسیداز قرار گرفتند. عصاره نعناع فلفلی در تمام غلظت‌ها پس از ۴۸ ساعت کاهش معنی داری فعالیت این آنزیم را در همولنف لارو شب پره هندی به همراه داشت. به علاوه شیرین بیان و زعفران در تمام تیمارها (به جز عصاره زعفران ۶ درصد پس از ۲۴ ساعت)، سبب کاهش فعالیت آنزیم فنل اکسیداز شدند (شکل ۴).




شکل ۳– تعداد پلاسموتوسیتهای لارو سن چهارم شب‌پره هندی تحت‌تأثیر تغذیه از غذای مصنوعی آلوده با غلظت‌های مختلف عصاره های گیاهی پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت

Fig. 3. number of plasmotocytes of fourth instar larvae of *Plodia interpunctella* affected by feeding on infected diet by different concentration of plant extracts after 24 and 48 h.




شکل ۴– میزان فعالیت فنل اکسیداز لارو سن چهارم شب‌پره هندی تحت‌تأثیر تغذیه از غذای مصنوعی آلوده با غلظت‌های مختلف عصاره های گیاهی پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت

Fig. 4. enzyme activity of fourth instar larvae of *Plodia interpunctella* affected by feeding on infected diet by different concentration of plant extracts after 24 and 48 h.

## بحث

ترکیبات موجود در عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان، مخلوطی از مونوترپنوئیدها با گروه‌های مختلف مانند فنل، کتون، هیدروکربن، اسید و... هستند و ثابت شده که این ترکیبات معمولاً روی رشد و تولیدمثل و بقای حشرات تأثیر داشته و اغلب به طور بالقوه ظرفیت حشره‌کشی دارند و می‌توانند علیه آفات کشاورزی به کار گرفته شوند (Gaire *et al.*, 2020). این ترکیبات به طور معمول، فرّار و تا اندازه‌ای چربی‌دوست هستند. به همین دلیل، با سرعت به داخل بدن حشرات وارد عمل شده و با تأثیر بر سیستم عصبی، در فرایندهای فیزیولوژیکی و رفتاری آن‌ها مداخله می‌کنند. اثرات آفت‌کش‌های گیاهی بر روی آفات گسترده است و شامل طیفی از فرایندهای بیولوژیکی، مانند کاهش تغذیه، تأخیر در پوست‌اندازی، مرگ‌ومیر لاروها و شفیره‌ها و عقیم شدن حشرات کامل می‌باشد (Huang *et al.*, 2010). از طرف دیگر ثابت شده که متابولیت‌های گیاهی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی حشرات مانند فعالیت آنزیم‌های گوارشی و سم‌زدا یا اجزای سامانه ایمنی آن‌ها به طور فاحشی تأثیرگذار است (Manjula *et al.*, 2020).

در تحقیق صورت‌گرفته توسط (Sharma *et al.*, 2003) لاروهای حشره *Sesamia litera* که با عصاره چریش تیمار شدند، پس از ۲۴ ساعت افزایش معنی‌دار تعداد کل هموسیت‌ها را نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر، زمانی که لاروهای پروانه برگ‌خوار (*Samia cynthia*) از برگ‌های کاساوا (گیاهی از خانواده فرفیون) تغذیه کردند تعداد کل سلول‌های خونی آن‌ها در مقایسه با لاروهای تغذیه کرده از غذای مصنوعی افزایش یافت (Tungjitwitayakul & Tatun, 2017) نتایج حاصل از این تحقیق در ارتباط با عصاره‌های نعناع فلفلی، شیرین‌بیان و زعفران به لحاظ افزایش تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای تحت تیمار با نتایج فوق تطابق دارد. در تحقیقی تأثیر تماسی و تنفسی عصاره (*Ferula gummosa*) بر ایمنی بید آرد مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد تعداد کل سلول‌ها باگذشت ۴۸ ساعت روند افزایشی پیدا کرد. (Ghasemi *et al.*, 2014). به نظر می‌رسد که روش تیمار عصاره‌های گیاهی (تماسی، تدخینی و یا گوارشی) بر چگونگی پاسخ ایمنی حشره هدف در ساعات مختلف تأثیر می‌گذارد (Ajamhassani, 2021). از سوی دیگر نتایج برخی محققان نشان می‌دهد که در تنش‌ها تعداد سلول‌های خونی همیشه افزایش پیدا نمی‌کند و گاهی به خاطر منتقل شدن سلول‌ها به سمت بافتهای دیواره بدن و یا اضمحلال آن‌ها تعداد سلول‌های خونی کاهش می‌یابد (Pipe & Coles,1995). بر همین اساس می‌توان دلیل کاهش سلول‌های خونی را در غلظت ۱۰٪ و ۲۰٪ مریم‌گلی نسبت به غلظت ۶٪ عصاره همین گیاه را توجیه نمود از سوی دیگر می‌توان سمیت ترکیبات گیاهان دارویی را بر کاهش ایمونوسیت‌ها مؤثر دانست چرا که سموم تولید شده از متابولیسم این گیاهان در سیستم گردش خون حشره هدف می‌تواند بر فعالیت و تقسیمات میتوزی هموسیت‌ها تأثیرگذار باشد و یا گاه با بلوکه کردن هموسیت، مانع فعالیت مثبت بیگانه‌خواری یا گره زایی آن در مقابل عامل بیگانه شود و به این ترتیب تعداد سلول‌ها و یا شکل ساختاری آن‌ها را تحت تأثیر خود قرار دهد (KhaniKor & Bora, 2012; Rahimi *et al.*, 2019). بخش اعظم عصاره مریم‌گلی را ترکیب‌های سزکوئی‌ترپنی تشکیل می‌دهد (Izadi *et al.*, 2010) و در گزارش Moghaddam *et al.* (2013) ترکیبات منتون (۳۰/۶۳ درصد) و منتول (۲۵/۱۶ درصد) اجزای اصلی عصاره نعناع فلفلی را تشکیل می‌دهد، گلبرگ‌های زعفران هم دارای ترکیبات فلاونوئید، گلیکوزید و آنتوسیانین‌ها است (Giland, 2002; Omidi *et al.*, 2014). و ترکیبات اصلی در برگ شیرین‌بیان تانن و نیتروژن می‌باشد (Chang *et al.*, 2020). به نظر می‌رسد ترکیبات اصلی موجود در هر عصاره می‌تواند در نوسانات تعداد کل سلول‌ها، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌های حشره تیمار شده مؤثر باشد. بر اساس مشاهدات این تحقیق لاروهای تیمار شده با عصاره‌های نعناع فلفلی، مریم‌گلی، شیرین‌بیان و زعفران نسبت به شاهد با افزایش و یا کاهش تعداد کل سلول‌ها در ساعات اولیه ورود به هموسل حشره روبه‌رو شده است. و در واقع نشان دهنده واکنش مثبت سامانه ایمنی حشره نسبت به عامل خارجی است.

گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها سلول‌های مؤثر در ایمنی سلولی هستند که پروفایل آن‌ها در فرایند ایمنی حشرات به‌شدت تغییر می‌کند (Nakahara *et al*., 2003). فراوانی گرانولوسیت‌ها در همه‌ی راسته‌های حشرات به‌ویژه سنین بالای لاروهای بال پولک‌داران زیاد می‌باشد. ثابت شده این سلول‌ها قادر به تقسیم به اسفرولوسیت‌ها هستند. در نتیجه می‌تواند در ذخیره و انتقال هم مؤثر باشد (Yamashita & Iwabuchi., 2001). همولنف لاروهای کرم ساقه خوار ذرت *Sesamia cretica* که با عصاره نوعی آنغوزه (*Ferula ovina*) تیمار شدند، پس از ۴۸ ساعت افزایش معنی‌دار گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها را به همراه داشتند . محققین دلیل افزایش گرانولوسیت‌ها پس از ۲۴ ساعت را این‌گونه توجیه کردند که سلول‌ها در ساعات اولیه درگیر تشکیل گره بوده و لایه‌های زیاد گره حاکی از مشارکت گرانولوسیت‌ها می‌باشد (Sadeghi *et al*., 2017).

پلاسموتوسیت‌ها مهم‌ترین سلول‌ها در کپسوله‌کردن عامل بیگانه‌اند .(Strand, 2008) تغییرات به شکل افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های خونی بروز می‌کند که بسته به گونه حشره، مرحله رشدی و نوع آلودگی متفاوت است (Gupta, 1979).

سیستم فنل اکسیداز به عنوان جزء کلیدی در سیستم ایمنی بدن حشره و پلی در فاصله بین ایمنی سلولی و ایمنی هیومرال حشرات در نظر گرفته می‌شود و عمل آن در آخرین مرحله دفاع سلولی به‌منظور تشکیل ملانیزاسیون ضروری است. این آنزیم به همراه فعالیت سلول‌های خونی، عامل بیگانه را بلوکه کرده و با تولید کوئینون سبب سمی شدن عامل بیگانه می‌شود. نهایتاً عامل بیگانه توسط انتقال دهنده خون به لوله‌های مالپیگی منتقل شده تا از بدن دفع شوند. مهار فنل اکسیداز برای لاروهای کرم برگ‌خوار توت تحت تأثیر اسانس درمنه ثبت شده است (Oftadeh *et al*., 2021). در مطالعه‌ای دیگر کمترین دوز اسانس گیاهان ریحان مقدس، ریحان میخکی و گل ابری نمی‌تواند باعث تغییر فعالیت فنل اکسیداز در لارو *Antheraea assama* می‌شود درحالی‌که افزایش دوزها به طور قابل‌توجهی فعالیت آنزیمی را در لاروها افزایش می‌دهد (Khanikor & Bora, 2012).

در نتایج تحقیق حاضر ما شاهد افزایش فعالیت فنل اکسیداز در تیمار مریم گلی با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد و نعناع فلفلی در غلظت ۲۰ درصد بودیم، برخی تیمارها تفاوت معنی داری با شاهد نشان ندادند و برخی نیز کاهش فعالیت این آنزیم را به دنبال داشتند. همانطور که در نتایج مربوط به تغییرات تعداد سلول‌ها مشخص است، تقریبا در همه نمودارها، عصاره‌های نعناع فلفلی و مریم گلی در غلظتها و زمانهای مختلف تاثیر گذاری بیشتری بر افزایش سلولهای خونی نشان دادند. در واقع تاثیرات متابولیتی این گیاهان به طور مشخص بیشتر از زعفران و شیرین بیان مشاهده شد. از آنجا که فنل اکسید آنزیمی است که علاوه بر اپیدرم لوله گوارش از سلولهای خونی نیز تولید می شود، طبعا ارتباط کمابیش مستقیمی بین تراکم سلولهای تحت تاثیر هر تیمار گیاهی و فعالیت این آنزیم در بدن حشره هدف وجود خواهد داشت. از طرف دیگر، سلول‌های اونوسیتوئید منابع بالقوه تولید این آنزیم به ویژه در بالپولکداران محسوب می‌شوند. تغییرات تعداد این سلولها در مواجهه با عصاره های گیاهی می تواند دلیلی بر تغییرات افزایشی یا کاهشی فعالیت فنل اکسیداز محسوب شود (داده‌های مشاهده‌ای).

## نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضرنشان دادکه در ساعات اولیه ورود عصاره‌های گیاهی به همولنف شب پره هندی، سلول‌های خونی موثر در ایمنی و آنزیم فنل اکسیداز، واکنش‌های مختلفی در مقابل عامل بیگانه نشان می‌دهند. تاثیر عصاره‌های مریم گلی و نعناع فلفلی که هر دو از خانواده نعناعیان می‌باشند به‌طور بارزی بیشتر از زعفران و شیرین بیان مشاهده شد که حاکی از تاثیرات بالقوه آلکالوییدهای این خانواده بر فاکتورهای خونی حشره دارد. با تحقیقات تکمیلی در خصوص برهمکنش انواع قارچ‌های بیمارگر یا سموم با پاسخ‌های ایمنی این حشره، می‌توان امیدوار بود که بتوان از مجموع این عوامل در راستای کنترل بهتر این حشره

استفاده کرد. قطعا چنانچه ایمنی حشره در مواردی ضعیف میکروبی علیه این آفت به دست آورد.
عمل نماید می‌توان نتایج بهتری از روش‌های کنترل

**References**


Abo–El–Saad, M. & El–Shafie, H. 2013. Dates: Postharvest science, processing technology and health benefits. In: Siddiq M, Aleid SM, Kader AA, (eds.). Insect Pests of Stored Dates and Their Management. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 81–104.

Ajamhassani, M. 2015. Study on morphology and abundance of hemocytes in spurge hawk moth Hyles euphorbiae Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 38(3): 49–62.

Ajamhassani, M. 2021. Hemocyte changes of larvae of the beet moth, *Scrobipalpa ocellatella* (Lepidoptera: Gelechiidae) affected by thermal stress. Journal of Entomological Society of Iran, 41(1): 101–103. (In Persian with English summary).

Azimi, A.A, Delnavaz, H.B. & Mansour, G.A. 2006. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of Sorghum bicolour against Fusarium solani, Fusarium poa in Persian. Medical Plants, 6(1): 26–32.

Borges, A.R., Santos, P.N., Furtado, A.F. & Figueiredo, R.C. 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduvidae). Micron, 39: 486–49.

Cerenius, L. & Soderhall, K. 2004. The prophenol–oxidase–activating system in invertebrates. Immunological Review, 198: 116–126.

Darnahal, E. Jamshidi. M., Jafarlou. M. & Hasheminia, S. 2020. Insecticidal and repellent effects of essential oils from different parts of Achillea millefolium against adult of *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae). Applied Plant Protection.

Gaire, S., Scharf, M.E. & Gondhalekar, A.D. 2020. Synergistic Toxicity Interactions between Plant Essential Oil Components against the Common Bed Bug (*Cimex lectularius* L.). Insects, 11(2): 133–140.

Ghasemi, V., Khoshnood Yazdi, A., Zaker Tavallaie, F. & Jalali Sendi, J. 2014. Effect of essential oils from Callistemon viminalis and Ferula gummosa on toxicity and on the hemocyte profile of *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47: 268–278.

Gupta, A.P. 1979. Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques. New York (NY): Cambridge University Press, p. 628.

Hillyer, J.F. 2016. Insect immunology and hematopoiesis. Developmental and Comparative Immunology, 58: 102–118.

Huang, F., Yang, Y.Y., Shi, M., Li, J.Y., Chen, Z.Q., Chen, F.S. & Chen, X.X. 2010. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from Plutella xylostella larva:cell types and their role in phagocytosis. Tissue and Cell, 42(6): 360–364.

Irfan, S., Rani, S., Ali Sani, I., Irfan, H., Shabbir, S. & Ahmed, N. 2016. Leaves and Flowers Insecticidal Activity Investigation of *Salvia officinalis* L. against *Sitophilus oryzae* L. COMU Journal of Agriculture Faculty, 4(2): 105–108

Izadi, Z., Esna–Ashari M., Ahmadvand, G., Davoodi, P. & Piri, K.H. 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essence oil of Peppermint (*Mentha piperita* L.), 14(3): 45–54.

Khanikor, B. & Bora, D. 2012. Effect of plant based essential oil on immune response of silkworm, Antheraea assama Westwood (Lepidoptera: Saturniidae). Internanional Journal of Industrial Entomology, 25(2): 139–146.

Koul, O., Walia, S. & Dhaliwal, G.S. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. Biopesticides international, 4(1): 63–84.

Leonard, C., Söderhäll, K. & Ratcliffe, N.A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of Blaberus craniifer haemocytes. Insect Biochemistry, 15(6): 803–810.

Li, T., Yan, D., Wang, X., Zhang, L. & Chen, P. 2019. Hemocyte changes during immune melanization in Bombyx mori infected with Escherichia coli. Insects, 10(9): 301.

Ling, E., Shirai, K., Kanehatsu, R. & Kiguchi, K. 2004. Reexamination of phenoloxidase in larval circulating hemocytes of the silkworm, Bombyx mori. Tissue and Cell, 37: 101–107.

Manjula, P., Lalitha, K., Vengateswari, G., Patil, J., Senthil, S.N. & Shivakumar, M.S. 2020. Effect of Manihot esculenta (Crantz) leaf extracts on antioxidant and immune system of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 23: 1–9.

Moghaddam, M. Pourbaigeb, M., Heydar Kourosh Tabarc, Farhadid, N. & Ahmadi Hosseinie, S. 2013. Composition and Antifungal Activity of Peppermint (*Mentha piperita*). Journal of Essential Oil, 16(4): 506–512.

Mohandass, S., Arthur, F.H., Zhu, K.Y. & Throne, J.E. 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. Journal of Stored Products Research, 43(3): 302–311.

Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M. & Kamimura, M. 2003. In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm: cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. Journal of Insect Physiology, 49(10): 907–916.

Nazeefullah, S., Dastagir, G. & Ahmad, B. 2014. Effect of cold-water extracts of Acacia modesta Wall. and Glycyrrhiza glabra Linn. on *Tribolium castaneum* and *Lemna minor*., Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 27(2): 217–222.

Oftadeh, M., Sendi, J.J. & Ebadollahi, A. 2020. Toxicity and deleterious effects of Artemisia annua essential oil extracts on mulberry pyralid (*Glyphodes pyloalis*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 170: 104702.

Pipe, R.K. & Coles, J.A. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Journal of Fish & Shellfish Immunology, 5: 581–595.

Rahimi, V., Hajizadeh, J., Zibaee, A. & Sendi, J.J. 2019. Changes in immune responses of *Helicoverpa armigera* Hübner followed by feeding on Knotgrass, Polygonum persicaria agglutinin. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 101(1): 21543.

Rajendran, S. & Sriranjini, V. 2008. Plant products as fumigants for stored–product insect control. Journal of Stored Products Research, 44(2): 126–135.

Ribeiro, C. & Brehe´lin, M. 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? Journal of Insect Physiology, 52: 417–429.

Sadeghi, R., Hadizadeh Raeisi, N. & Jamshidnia, A. 2017. Immunological responses of *Sesamia cretica* to Ferula ovina essential. Journal of Insect Science, 17(1): 26, 1–5.

Sharma, P.R., Sharma, O.P. & Saxena, B.P. 2003. Effect of neem gold on haemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera littura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Current Science, 84: 690–695. oil. Journal of Insect Science, 17(1): 1–5.

Stanley, D.W. & Miller, J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. Entomologia Experimentalis et Applicata, 119(1): 1–13.

Strand, M.R. 2008. The insect cellular immune response. Insect Science, 15: 1–14.

Tungjitwitayakul, J. & Tatun, N. 2017. Comparison of biological and biochemical parameters of eri–silkworms, Samia cynthia ricini (Lepidoptera: Saturniidae), reared on artificial and natural diets. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5: 314–319.

Wubie, M., Negash, A., Guadie, F., Molla, G., Kassaye, K. & Raja, N. 2014. Repellent and Insecticidal Activity of *Mentha piperita* (L.) Plant Extracts Against Cabbage Aphid [*Brevicoryne brassicae* Linn. (Homoptera: Aphididae). American–Eurasian Journal of Scientific Research, 9(6): 150–156

Yamashita, M. & Iwabuchi, K. 2001. *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. Journal of Insect Physiology, 47: 325– 331.

Zibaee, A. & Bandani, A. 2010. A study on the toxicity of a medicinal plant, *Artemisia annua* L.(Asteracea) extracts to the sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). Journal of Plant Protection Research.

# Effect of extract of of *Mentha piperita, Salvia officinalis, Glycyrrhiza glabra* and *Crocus sativus* on hemocytes and phenoloxidase avtivity in larvae of *Plodia interpuncetlla* (Lepidoptera: Pyralidae)

**Zahra Ebrahimizadeh[1], Maryam Ajamhassani[2]**

1., 2. MSc Entomology Student, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty Agricalture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

Corresponding author: Maryam Ajamhassani, email: shahroodm@gmail.com

Received: Jun., 28, 2023 10(1) 169–180 Accepted: Jul., 22, 2023

**Abstract**

Hemolymph of insects is their last defense barrier against foreign factors such as poison particles, pollutants, fungal and bacterial spores and plant metabolites. As the main pillar of physiological defense, hemocytes circulate in the hemolymph and react to stress by changing their number in the early stages. In this research, the effect of the aqueous extract of *Mentha piperita*, *Salvia officinalis*, *Glycyrrhiza glabra* and *Crocus sativus* on the immune system of *Plodia interpuncetlla* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae) was investigated. Fourth instar larvae were treated with aqueous extracts of plants in concentrations of 10, 6 and 20%. hemocyte density and phenol oxidase activity were measured and recorded in two time periods of 24 and 48 hours. The results showed that the effect of different extracts on the total number of cells, plasmotocytes and granulocytes was significant compared to the control and increased with the increase in the concentration of the extracts in all treatments and at both test times. The total number of cells in the treatment of *S. officinalis* with a concentration of 6% after 48 hours and *M. piperita* with concentrations of 20% and 10% increased the most compared to the control. The number of granulocytes under the treatment of *S. officinalis* with a concentration of 6% after 48 hours showed the greatest increase compared to the control group. plasmotocytes also increased significantly under the effect of *M. piperita* treatment with concentrations of 10% and 20% after 24 hours and 20% concentration after 48 hours compared to the control. According to the evaluations, the 20% concentration of *S. officinalis* showed the highest increase in phenol oxidase activity compared to the control and other treatments. The obtained results confirmed the response of the *P. interpunctella* immune system to the introduction of plant extracts into the hemolymph, which was associated with significant changes in cell density and phenol oxidase enzyme activity.

**Keywords**: *P. interpunctella*, aqueous extract, immune, phenoloxidase