نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، ص. ۲۴۲-۲۳۳

Journal of Plant Protection
Vol. 26, No. 3, Fall 2012, P. 233-242

اثر اسانس گندواش روی آنزیم‌های سم زدای کنه دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

مریم مهدوی مقدم[۱]- محمد قدمیاری[۲*]- خلیل طالبی[۳] - نرگس معماری زاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۹

چکیده

کنه دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) یکی از آفات مهم و مخرب گیاهان زراعی، باغی و زینتی در سراسر جهان می‌باشد. تولید مثل بالا و کوتاهی دوره زندگی همراه با کاربرد گسترده کنه کش‌ها برای پایین نگه داشتن خسارت این کنه زیر آستانه زیان اقتصادی، باعث مقاومت این آفت به کنه‌کش‌ها و شکست در کنترل آن شده است. در این تحقیق اثر اسانس گندواش (*Artemisia annua* L.) روی کنه دو لکه‌ای مقاوم به آبامکتین بررسی شد. زیست سنجی به روش تاثیر بخار اسانس روی کنه‌های ماده بالغ انجام شد. نتایج آزمون زیست سنجی نشان داد که LC_{50} اسانس گندواش ۱/۱۳ میکرولیتر بر لیتر هوا بود. همچنین اثر غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۷ و ۳ میکرولیتر بر لیتر هوا روی آنزیم‌های استراز، گلوتاتیون اس-ترنسفراز و سیستم مونواکسیژناز بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف اسانس، فعالیت آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس-ترنسفراز را کاهش دادند. همچنین این اسانس میزان آنزیم‌های مونو اکسیژناز را کاهش داد. اثرات بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس روی الگوی باندی استراز با استفاده از الکتروفورز نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که دو باند در کنه شاهد وجود دارد و با افزایش غلظت اسانس، آنزیم‌های استراز مهار شده و میزان تراکم این باندها با افزایش غلظت کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: کنه دو لکه‌ای، اسانس گندواش، فعالیت استرازی، گلوتاتیون اس-ترنسفراز و سیستم مونو اکسی ژناز

مقدمه

کنه تارتن دولکه‌ای (*Tetranychus urticae* Koch) از آفات مهم گیاهان زینتی، باغی و محصولات گلخانه‌ای در نقاط مختلف جهان است که با تغذیه از شیره گیاهی و تنیدن تار موجب ایجاد خسارت می‌شود. این کنه پلی فاژ بوده و از حدود ۱۲۰۰ گونه گیاهی گزارش شده است. بیش از ۱۵۰ گونه گیاهی دارای اهمیت اقتصادی می‌باشند (۲۰). این آفت از آفات مهم گیاهان زینتی در گلخانه‌ها بوده و باعث کاهش بازار پسندی محصولات تولیدی می‌شود. این کنه دارای چرخه زندگی کوتاه و تعداد نسل زیاد در سال می‌باشد، بنابراین توسعه مقاومت به کنه‌کش‌ها در کنه دولکه‌ای بسیار سریع اتفاق می‌افتد و دشمنان طبیعی کنه‌ها در اثر استفاده از آفت کش‌ها از بین می‌روند. مقاومت به آفت‌کش‌ها باعث افزایش مقدار آفت‌کش مصرفی، تکرار در سم پاشی و از بین رفتن دشمنان طبیعی در اثر مصرف مکرر آفت کش می‌شود (۸). کشاورزان ایرانی برای کنترل این آفت متکی به استفاده از ترکیبات شیمیایی بوده و به طور گسترده از کنه کش‌ها برای کنترل این آفت استفاده می‌شود.

استفاده‌ی زیاد از آفت‌کش‌های مصنوعی، منجر به طغیان کنه‌های تارتن دو لکه‌ای روی بسیاری از محصول‌ها و توسعه‌ی مقاومت به کنه‌کش‌ها شده است. به دلیل گسترش استرین‌های با مقاومت چندگانه به کنه کش‌ها و محدود بودن ترکیبات سنتزی کنه کش، ضروری است تا گروه‌های جدیدی از کنه کش‌ها و ترکیباتی که مکانیسم مقاومت را می‌شکنند، کشف شوند. در سالیان اخیر تحقیقات زیادی روی آفت کش‌های با منشا طبیعی صورت گرفته است.در این میان اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی پتانسیل بالایی را برای کنترل آفات و بیماریهایی گیاهی دارند (۹). مطالعات اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف روی کنه‌های تار عنکبوتی، از دهه‌ی ۱۹۸۰ شروع شد و تا امروز ادامه دارد. گیاهان در طول هزاران سال تکامل، مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی را علیه گیاه‌خواران توسعه داده‌اند که استفاده از متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهان نمونه‌های خوبی از

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشجوی دکتری دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: Email: ghadamyari@guilan.ac.ir)
۳- استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران

این مکانیسم‌ها هستند (۱۲).

اسانس‌های گیاهی، ترکیبات معطر حاصل از تقطیر با بخار آب بوته‌ها و گیاهان دارویی هستند (۴۱). که به‌طور سنتی به عنوان داروهای گیاهی در بسیاری کشورها استفاده شده است. در سال‌های اخیر برخی از ترکیبات اسانس‌های گیاهی به عنوان عوامل کنترل آفات به مرحله تجاری رسیده‌اند (۲۲). اسانسهای گیاهی از لحاظ زیست محیطی ناپایدار بوده و به جز در موارد محدود، اغلب برای انسان‌ها (۱۱) ماهی‌ها و حیات وحش (۲۵) غیر سمی هستند.

بسیاری از محققین ویژگی‌های سمی، ضد تغذیه ای و دفع‌کنندگی اسانس‌های گیاهی علیه بسیاری از آفات مهم کشاورزی را گزارش کرده‌اند. چوی و همکاران (۱۰)، ۵۳ نوع اسانس گیاهی را علیه *T. urticae* و *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot به روش تدخینی آزمایش کردند و نشان دادند که برخی از این اسانس‌ها برای هر دو کنه بسیار سمی بودند. اسانس‌های لیمو (*Citrus limon* L.)، اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn)، پونه (*Mentha logifolia* L.) و نعناع (*Mentha piperita* L.) روی کنه دو لکه‌ای در دوز $۱/۴ \times ۱۰^{-۳}$ میکرولیتر بر میلی لیتر هوا بسیار موثر بودند. همچنین مومر و آمر (۳۳) نشان دادند که روغن رزماری (*Rosemarinus officinalis* L.) نسبت به کنه‌های شکارگر *Amblyseius barkeri* Hughes، *A. zaheri* Yousef & El-Borolossy و *Typhlodromus athiasae* Porath سمی می‌باشد.

تیمول (یکی از مواد موجود در اسانس‌های گیاهی) دارای اثر سمی و دور کنندگی علیه کنه‌ی دو لکه‌ای بود (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر، مونوترپنوئیدهای تیمول و سیترونلیک اسید علیه مگس خانگی، کرم ریشه‌ی اروپائی ذرت *Diabrotica vergifera vergifera* LeConte و کنه‌ی دو لکه‌ای سمی تشخیص داده شد (۲۷). مطالعات ایسمن و همکاران (۲۳) نشان داد که اسانس آویشن (*Thymus mastichina* L.) دارای اثرات حشره کشی روی *Spodoptera litura* (Fabricius) می‌باشد. نتایج میر اسماعیلی (۳۲) نشان داد که اسانس رزماری می‌تواند باعث مرگ و میر کامل کنه دولکه‌ای و سفیدبالک گلخانه (*Trialeurodes vaporariorum* (West.)) در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌هایی که هیچ گیاه‌سوزی روی میزبان ایجاد نمی‌کنند، گردد. همچنین این اسانس بیشترین سمیت را به صورت تماسی برای کنه دو لکه‌ای و به صورت تدخینی برای مگس سفید داشت. نتایج کالماسور و همکاران (۹) نشان دادند که اسانس‌های *Nepeta racemosa* L.، *Micromeria fruticosa* L. و *Origanum nulgave* L. ممکن است پتانسیل بالایی برای مدیریت مؤثر جمعیت *T. urticae* داشته باشند. منصور و همکاران (۳۱) بیان کردند که علاوه بر سمیت، باقیمانده‌ی اسانس‌های برخی گونه‌های گیاهی خانواده نعنائیان دور کننده بوده و به‌شدت باروی کنه‌های ماده *T. cinnabarinus* (Boisduval) را کاهش می دهد. ماکندی و کاشنگ (۲۹) در بررسی اسانس درخت چریش دریافتند که این ترکیب مانع تخم‌گذاری و ظهور پوره‌های *T. urticae* گردید. در مطالعه‌ی گنسویلو (۱۶)، اثر *Asphedolus aestivus* Brot به عنوان آفت‌کش طبیعی در مقابل *T. cinnabarinus* بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که سمیت اسانس ریشه بیش از برگ بود و ۳ برابر تخم‌گذاری و ۴ برابر قابلیت تفریخ تخم این کنه را در مقایسه با شاهد کاهش داد.

با توجه به اینکه اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی حاوی اجزای متفاوتی بوده و مکان‌های هدف متفاوتی دارند. استفاده از عصاره طبیعی گیاهان در صورتی که اثرات بازدارندگی مؤثر و قابل مقایسه با ترکیبات شیمیایی مصنوعی داشته باشد، جایگزین‌های مناسبی برای آفت کش‌های سنتزی خواهد بود. گیاه گندواش *Artemisia annua* L. یکی از گیاهان خودرو در استان گیلان می‌باشد که به وفور در طبیعت یافت می‌شود و مطالعات قبلی نشان داده است که عصاره این ترکیب اثرات حشره کشی روی شب پره هندی، آفات انباری و کنه *T. cinnabarinus* دارد (۳، ۳۸ و ۴۲) به همین دلیل در این تحقیق اثر بخارات حاصل از اسانس این گیاه روی کنه دو لکه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این تحقیق اثرات زیر کشندگی غلظت‌های مختلف این ترکیب روی آنزیم‌های استراز، گلوتاتیون اس –ترنسفراز و سیستم MFO بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

کنه مورد نظر از روی گل رز در گلخانه‌ای واقع در اصفهان جمع‌آوری شد. پس از تهیه اسلاید از کنه‌های نر و ماده گونه این آفت تشخیص داده شد. همچنین گونه این جمعیت با استفاده از ژن کدکننده آنزیم سیتوکروم اکسیداز I (COI) میتوکندریایی تایید شد. مطالعات اولیه نشان داده بود که این کنه به آفت کش آبامکتین مقاوم می‌باشد (۱).

گیاهان گندواش از شهرستان رشت در شهریورماه جمع آوری شد. پس از خشک شدن برگها در سایه، با استفاده از تقطیر با آب اسانس این گیاه بدست آمد. برای اسانس گیری از دستگاه Clevenger (شرکت کشت و صنعت گیاه و اسانس) استفاده شد. اسانس بدست آمده با استفاده از سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شد.

تهیه کنه‌های هم سن برای آزمون‌های زیست سنجی و بیوشیمیایی

ساقه‌ی سه برگی لوبیا از سوراخ تعبیه شده در درب چوب پنبه‌ای

شیشه‌ی پنیسیلین محتوی آب عبور داده شد و تعداد ده عدد کنه‌ی بالغ ماده روی برگها منتقل شد. بعد از ۲۴ ساعت کنه‌های بالغ از روی برگ‌ها برداشته شده و فقط تخم‌ها باقی ماندند. برگ‌ها در انکوباتور با دمای ۲±۲۴ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره‌ی روشنایی ۱۶:۸ (تاریکی : روشنایی) نگهداری شدند و بدین ترتیب کنه‌های هم‌سن برای انجام آزمون‌ها فراهم شد.

آزمون‌های زیست سنجی

ابتدا آزمون‌های مقدماتی برای تعیین محدوده غلظت‌های مؤثر اسانس روغنی بر کنه انجام گرفت و غلظت‌هایی که بین ۱۰ تا ۹۰ درصد تلفات ایجاد می‌کردند، مشخص و در آزمون نهایی استفاده گردید. آزمایش با روش تاثیر بخارات اسانس با تغییراتی در روش اصلان و همکاران (۵) با استفاده از ظروف شیشه‌ای با حجم یک لیتر با درب سمباده‌ای انجام شد. ابتدا ساقه‌های برگ لوبیا از سوراخ تعبیه شده در درب چوب پنبه‌ای شیشه‌های پنیسیلین محتوی آب عبور داده شد و تعداد ۱۵–۱۰ عدد کنه‌ی بالغ هم‌سن روی برگ قرار گرفت. قطعه‌ای دایره‌ای شکل کاغذ صافی به قطر ۲ سانتی متر روی دیواره‌ی داخلی ظرف شیشه‌ای چسبانده شد. ۲۰ میکرولیتر از غلظت مشخص اسانس در حلال استون به‌وسیله‌ی میکروسمپلر روی کاغذ صافی قرار داده شد. در این مرحله شیشه پنیسیلین آماده شده داخل ظرف شیشه‌ای قرار داده شد. چهار غلظت از اسانس در چهار تکرار انجام شد. آزمایش در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره ی نوری ۱۶:۸ (تاریکی : روشنایی) انجام گردید. پس از ۲۴ ساعت تعداد تلفات تعیین گردید. کنه‌هایی که هنگام تحریک با قلم مو قادر به حرکت پاهای خود نبودند به عنوان مرده در نظر گرفته شدند. آنالیز پروبیت روی داده‌های حاصل از مرگ ومیر توسط نرم افزار پولو پی سی انجام شد (۳۴).

آزمایش‌های بیوشیمیایی

مواد شیمیایی

آمونیوم پرسولفات[1]، آلفا نفتیل استات[2] (α-NA)، بتا نفتیل استات[3] (ß-NA)، سوکروز، بروموفنل بلو[4]، تریس[5]، اکریل آمید[6]،[7]CDNB، بیس اکریل آمید[8]، TEMED[9] و گلایسین[10] از شرکت مرک[11] (آلمان) و نمک فاست بلو آر آر[12] از شرکت فلوکا[13] (کشور آمریکا) تهیه شد. TMBZ[14] از شرکت پانرآک[15] کشور اسپانیا خریداری شد.

تهیه عصاره آنزیمی

۲۰عدد کنه ماده بالغ در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر یک دهم مولار فسفات با پی‌هاش ۷ ($NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$) حاوی تریتون X–۱۰۰ به نسبت دو دهم درصد (V/V) برای استراز و بدون تراپتون برای سیستم MFO و گلوتاتیون اس –ترنسفراز با استفاده از همگنه شیشه ای همگن شدند. سپس محلول همگن شده در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. محلول رونشین به ظروف شیشه‌ای جدید منتقل شده و با بافر فسفات ۰/۱ مولار رقیق گردید.

اندازه گیری فعالیت استرازی

فعالیت کربوکسیل استراز مطابق روش ون اسپرن (۴۰) اندازه گیری شد. برای اندازه گیری فعالیت استرازها از زیرنهشت‌های α-NA و ß-NA به غلظت ۳×۱۰^{-۴} مولار به طور جداگانه استفاده گردید. ۱۲/۵ میکرولیتر محلول رونشین، ۱۲/۵ میکرولیتر سوبسترا و ۱۱۲/۵ میکرولیتر بافر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به چاهکهای میکروپلیت اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر نمک فاست بلو آر آر بدان اضافه شد و مقدار آلفا نفتول تولید شده بوسیله یک میکرو پلیت ریدر[16] (Stat fax 3200) در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. آزمایش در سه تکرار انجام گردید. برای اندازه گیری فعالیت استرازی منحنی استاندارد با استفاده از آلفا نفتول رسم شد.

اندازه گیری فعالیت گلوتاتیون اس –ترنسفراز

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس –ترنسفراز با استفاده از سوبسترای CDNB و مطابق روش هبیگ و همکاران (۱۸) صورت گرفت. در این آزمایش ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۲۵ میکرولیتر GSH (۱۰۰ میلی مولار)، ۱۰ میکرولیتر CDNB (۵۰ میلی مولار) و

1 - Ammonium persulfate
2 - Alpha naphtyl acetate
3 - Beta naphtyl acetate
4 - Boromophenol blue
5 - Tris
6 - Acrylamide
7 - 1-chloro-2,4-dinitrobenzene
8 - Bis-acrylamide
9 - Tetramethylethylenediamine
10 - Glycine
11 - Merck
12 - Fast blue RR salt
13 - Fluka
14 - 3, 3`, 5, 5` tetramethyl benzidine
15 - Panreac
16 - Microplate reader

۲۲۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=7، ۰/۱ مولار) در چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شده و جذب در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. از ضریب جذب مولی CDNB برای محاسبه فعالیت ویژه استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450}

برای این منظور از روش heme-peroxidase و اندازه‌گیری میزان کل پروتئین حاوی آهن استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر نمونه، ۸۰ میکرولیتر بافر پتاسیم- فسفات ۰/۶۲۵ مولار (pH= ۷/۲)، ۲۰۰ میکرو لیتر محلول 3, 3`, 5, 5` tetramethyl benzidine (TMBZ) (۰/۰۱ گرم TMBZ در ۵ میلی لیتر متانول بعلاوه‌ی ۱۵ میلی لیتر بافر سدیم- استات ۰/۲۵ مولار) و ۲۵ میکرو لیتر H_2O_2 (۳٪ در آب) داخل پلیت‌های الایزا ریخته شد. بعد از ۲ ساعت نگهداری در تاریکی، جذب در طول موج ۴۵۰ خوانده شد. از غلظت‌های مختلف سیتوکروم اکسیداز خالص برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

اندازه گیری مقدار پروتئین

اندازه گیری مقدار پروتئین با استفاده از روش بردفورد (۶) با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی صورت گرفت.

Native PAGE کربوکسیل استراز

الکتروفورز با ژل ۷/۵ درصد با استفاده از روش دیویس (۱۳) در 100V و دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. از محلول سوکروز ۴۰ درصد حاوی ۰/۰۲ درصد بروموفنل بلو به عنوان بافر نمونه استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۰/۱ مولار اسید بوریک در دمای ۱۰ درجه سلسیوس خوابانده شد. سپس برای رنگ آمیزی در محلول (۰/۰۲ درصد ۱- نفتیل استات + ۰/۰۲ درصد ۲- نفتیل استات + نمک فاست بلو آرآر) به مدت یک ساعت نگهداری شد (۲۴).

داده‌های بدست آمده از آزمونهای بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون توکی برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمون زیست سنجی

بر اساس نتایج آنالیز پروبیت میزان LC_{50} اسانس گندواش روی کنه‌های ماده بالغ ۱/۱۳ میکرولیتر بر لیتر هوا بدست آمد (جدول ۱).

اثر غلظت‌های مختلف اسانس گندواش روی آنزیم‌های سم‌زدا

نتایج نشان داد هنگامی که از آلفا نفتیل استات (α-NA) به عنوان سوبسترا استفاده شد، فعالیت آنزیم استراز تحت تاثیر اسانس کاهش یافت (P_{value}=۰/۰۰۰۱، df=۳ ، f =۴۱/۹۳)، اما هنگامی که از بتا نفتیل استات (ß-NA) به عنوان سوبسترا استفاده گردید، اختلاف معنی داری بین شاهد و غلظت‌های مختلف اسانس مشاهده نشد (شکل ۱). همچنین نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف اسانس فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس -ترنسفراز را در مقایسه با شاهد کاهش داد (شکل ۲) (P_{value}=۰/۰۰۰۱، df=۴ ، f =۶۹/۵). میزان آنزیم مونو اکسی ژناز نیز تحت تاثیر اسانس گندواش نیز در مقایسه با شاهد کاهش داشت (شکل ۳) (P_{value}=۰/۰۰۳، df=۴ ، f =۷/۶۶).

الگوهای پراکنش باندهای استرازی

در الکتروفورز ژل هموژنانت کل بدن کنه، دو نوار ثبت گردید. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف اسانس اثر بازدارندگی روی فعالیت استرازی داشته و با افزایش غلظت تراکم باندها کاهش یافت (شکل ۴).

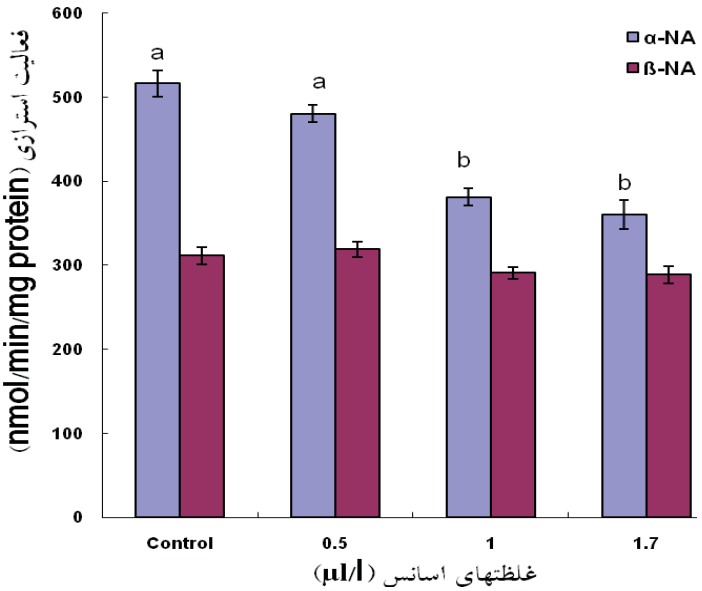
بحث

میزان LC_{50} اسانس گندواش در این تحقیق ۱/۱۳ میکرولیتر بر لیتر هوا بدست آمد. میراسماعیلی (۳۲) ، میزان LC_{50} اسانس رزماری برای کنه دو لکه‌ای را به روش Leaf disc painting ، ۱٪ (۱۰ ml/litre) بدست آورد و نتایج این محقق نشان داد که تحت شرایط آزمایشگاهی، روغن رزماری می‌تواند مرگ و میر کامل در جمعیت‌های آفات در غلظت‌هایی که برای گیاه‌های میزبان مضر نیستند، ایجاد کند. این ترکیب، سمیت کمی برای کنه‌های شکارگر داشته است و خیلی سریع در محیط تجزیه می‌شود (۳۲).

جدول۱- نتایج آنالیز پروبیت مرگ و میر کنه دو لکه‌ای (*Tetranychus urticae*) در اثر اسانس گندواش (*Artemisia annua*)

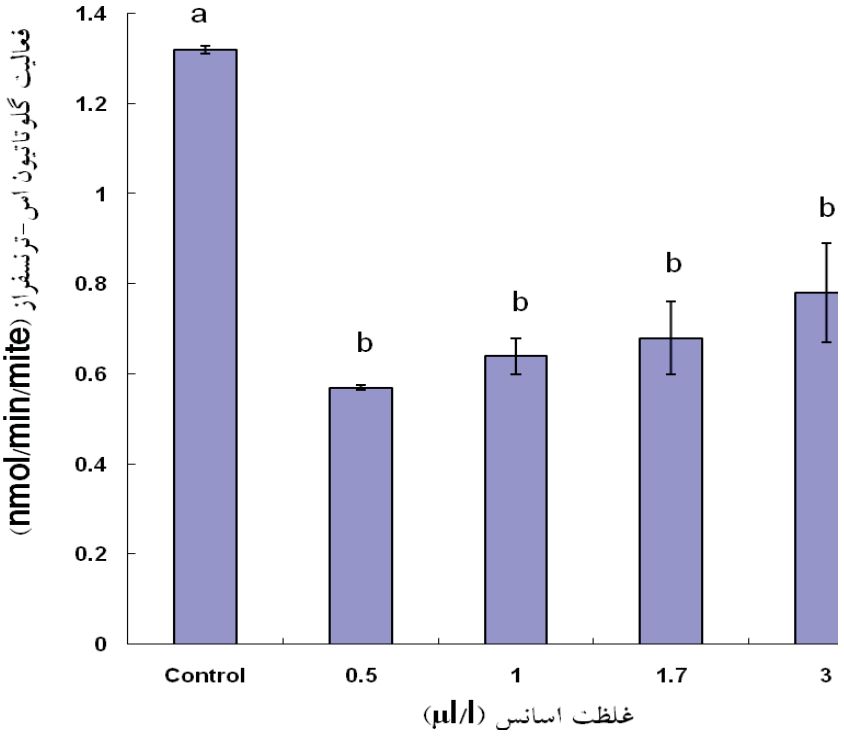
تعداد کنه	LC_{50}[a] (حدود قابل اطمینان ۹۵٪)	نسبت g	SE± شیب خط	هتروژنیسیتی
۶۹۵	۱/۱۳ (۰/۳-۱/۹)	۰/۳۹	۱/۸۸±۰/۲۴	۱/۴

[a] میکرولیتر اسانس بر لیتر هوا



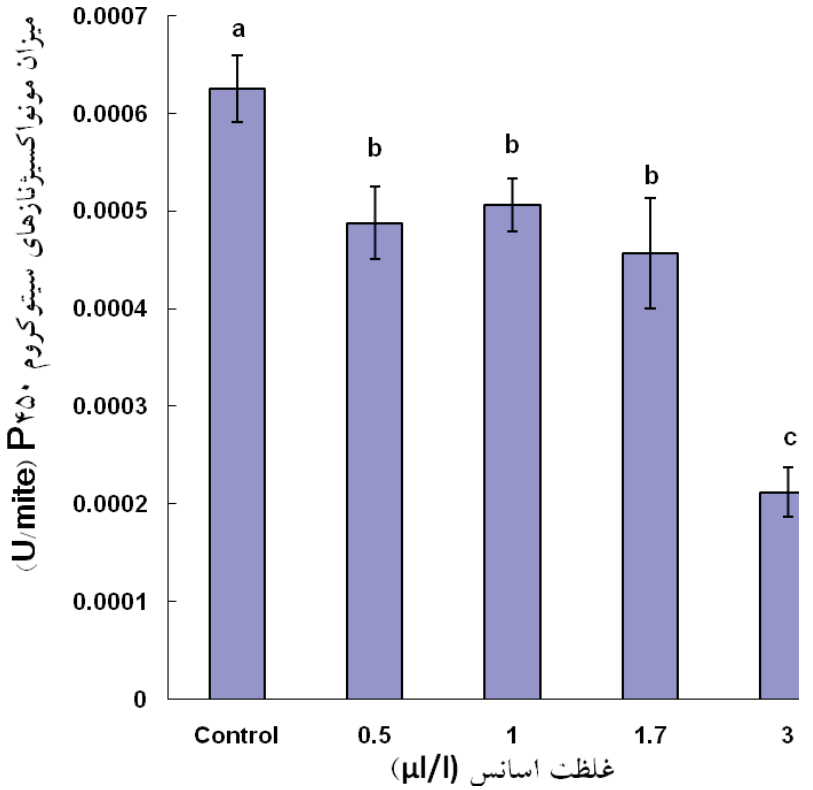
شکل۱- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم استراز کنه دولکه‌ای (*Tetranychus urticae*)تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گندواش با استفاده از دو سوبسترای آلفا نفتیل استات و بتا نفتیل استات

*در مورد هر سوبسترا ستون‌های با حروف مشابه تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی در سطح یک درصد).



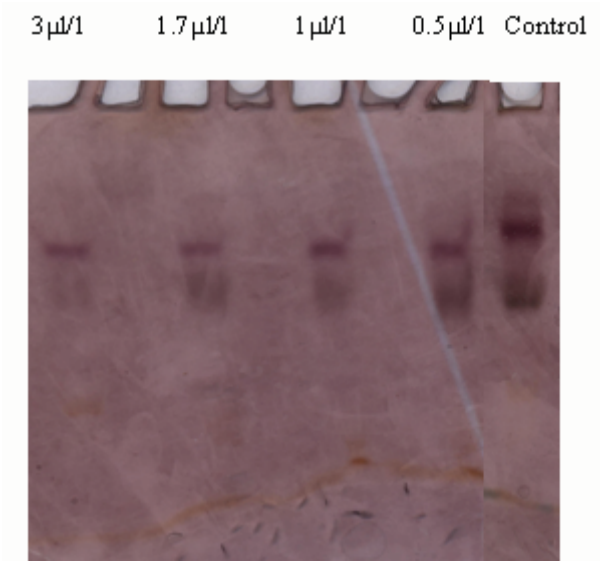
شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز کنه دولکه‌ای (*Tetranychus urticae*)تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گندواش

* ستون‌های با حروف مشابه تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی در سطح یک درصد).



شکل ۳- مقایسه میزان مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} کنه دولکه‌ای (*Tetranychus urticae*) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گندواش

* ستون‌های با حروف مشابه تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی در سطح یک درصد).



شکل ٤- الگوی پراکنش باندهای آنزیم استراز در کنه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اسانس گندواش و شاهد

البته لازم به ذکر است که کنه‌های مورد آزمون توسط میراسماعیلی به دو روش تماسی و تنفس بخارات رزماری تحت تاثیر قرار گرفته، اما در این روش کنه‌ها با بخارات اسانس گندواش تماس داشته‌اند. در مطالعه‌ای دیگر چوی و همکاران (۱۰)، سمیت ۵۳ اسانس‌روغنی شامل رزماری را علیه تخم‌ها و بالغین کنه دو نقطه‌ای به‌صورت تدخینی مورد بررسی قرار دادند. در مقایسه با دانه زیره سیاه

Citronella java، لیمو، اکالیپتوس، پونه معطر (*Menthe pulegium* L.) و اسانس روغنی نعناع (در غلظت 14×10^{-3} میکرولیتر بر میلی لیتر هوا)، که روی کنه‌های مورد آزمون خیلی سمی هستند و مرگ و میر بیشتر از ۹۰٪ ایجاد می‌کنند، روغن رزماری مرگ و میر کمتر از ۶۰٪ ایجادکرد. تونک و ساهینکایا (۳۹) نشان دادند که مرگ و میر حاصل از بخارات اسانس‌های روغنی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) برای ماده‌های *T. cinnabarinus* و شته *Aphis gossypii* در دوره ۹۶ ساعت در معرض بودن و تحت دوز ۲ میکرولیتر در لیتر هوا، ۱۰۰٪ است. نتایج تحقیقات معماری‌زاده و همکاران (۱) نشان داد که سمیت تدخینی اسانس رزماری روی جمعیت حساس و مقاوم به آبامکتین به ترتیب برابر با ۰/۷۲ و ۲/۲۱ میکرولیتر بر لیتر هوا می‌باشد.

روش رایج برای بررسی تأثیرات یک ماده سمی بر پایه اندازه‌گیری مرگ و میر فرد (دز یا غلظتی که باعث کشتن ۵۰ در صد جمعیت می‌شود) است، اما بعد از سم‌پاشی تعدادی از افراد جمعیت که در معرض سم قرار گرفته‌اند، زنده مانده و ممکن است تغییراتی در دوره زندگی، نسبت رشد، تولید مثل، نسبت جنسی و دیگر پارامترهای زندگی و یا سیستم‌های آنزیمی آن‌ها ایجاد شود (۳۶). اسانس‌ها حاوی چندین ماده و متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند و آنزیم‌های سم زدا از آنزیم‌هایی هستند که با این مواد برهمکنش دارند. این آنزیم‌ها شامل آنزیم‌های استراز، گلوتاتیون اس –ترنسفراز و سیستم مونو اکسی ژناز می‌باشد. نتایج ما نشان می‌دهد که اسانس گندواش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس –ترنسفراز را کاهش می‌دهد. گلوتاتیون ترانسفرازها (GST) خانواده متنوعی از آنزیم‌ها هستند که در همه جانداران از جمله حشرات و کنه‌ها یافت می‌شوند. این آنزیم‌ها در خنثی سازی طیف وسیعی از مواد سمی درون زاد و ناگوارد[1] از جمله حشره کش‌ها نقش اساسی دارند. همچنین GST در نقل و انتقال داخل سلولی، تولید هورمون‌ها و محافظت در مقابل استرس‌های اکسیدانی موثر می‌باشند. GST نقش مهمی در مقاومت کنه‌ها به آفت‌کش‌ها دارد. این آنزیم‌ها کنه کش‌ها را یا به وسیله تسهیل واکنش دهیدروکلریناسیون و یا پیوند مواد سمی با گلوتاتیون احیاء شده، دگرگون می‌کنند که این موضوع باعث تولید متابولیت‌هایی می‌شود که حلالیت بیش تری در آب داشته و به راحتی دفع می‌شوند. بعلاوه این آنزیم‌ها در دفع انواع رادیکال‌های سمی‌که در جریان فعالیت کنه کش‌ها به وجود می‌آیند، نقش دارند (۱۴). نتایج این پژوهش نشان می دهد که احتمالا مکان کاتالیکی این آنزیم با مواد فرار اسانس درگیر شده و منجر به کاهش فعالیت آن در کنه دو لکه‌ای تیمار شده گردیده است.

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت و زایموگرام آنزیم استراز نشان داد که در کنه‌های تیمار شده با افزایش غلظت اسانس، فعالیت این آنزیم کاهش یافت. برخی استرازها خواص کاتالیتیکی محدودی دارند اما به طور مؤثر طی فرآیند منزوی کردن و به‌واسطه‌ی ترکیب شدن با حشره‌کش‌ها و مواد سمی آن‌ها را از مکان هدفشان دور می‌کنند و به‌این وسیله در دسترس بودن آن‌ها را کاهش می‌دهند (۲۴). استرازها به دو صورت در سم زدایی نقش دارند. ممکن است این آنزیمها مواد سمی را هیدرولیز نمایند و یا اینکه باعث منزوی کردن[2] مواد سمی شده و به طور موقت سموم را از هملنف خارج نموده و فرصت کافی برای بقیه آنزیمها سم زدا فراهم نمایند. منزوی کردن حشره کش‌ها به وسیله کربوکسیل استرازها یکی از ساز و کارهای مهم غیر سمی نمودن سموم گزارش شده است (۲۴). سوزوکی و همکاران (۳۷) نقش مستقیم استرازهای بیش از اندازه تولید شده در شته جالیز مقاوم را در منزوی کردن فنیتروتیون ثابت نمودند. نتایج نشان می‌دهد که احتمالا استرازهای موجود در کل بدن کنه نقش بسیار مهمی در غیر سمی کردن یا منزوی کردن اسانس گندواش دارد (شکل۴). احتمالا آنزیم‌های استراز موجود در بدن کنه با مواد فرار موجود در اسانس درگیر شده و مقداری از این مواد منزوی شده و باعث کاهش دسترسی این مواد به مکان هدف خواهد شد. البته این موضوع بایستی در تحقیقات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج حاضر نشان می‌دهد که مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گندواش کاهش یافت. تحقیقات نشان داده است که مونوترپن‌ها که از ترکیبات عمده اسانس‌های گیاهی محسوب می‌شوند،ممکن است به وسیله سیستم مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} تجزیه شوند (۲۸). P450LM2 مشتق شده از خرگوش به واسطه‌ی فرآیند هیدروکسیلاسیون در متابولیسم چندین مونوترپن شامل جرانیول[3] و نرول[4] شرکت دارد (۲۸). زمانی که سوسک پیرگو[5]، *Paropsisterna tigrina* Chapuis، از برگ‌های درخت چای استرالیایی *Melaleuca alternifolia* Cheel تغذیه می‌کند، ۱،۸- سینئول توسط سیتوکروم P_{450} به ۲ بتا-هیدروکسی‌سینئول[6] متابولیزه می‌شود(۳۵). اسانس‌های گیاهی یا مونوترپن‌ها می‌توانند میزان و فعالیت اپوکسیدازی مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} را در موش صحرایی و حشرات القا کنند (۱۹).برعکس، نتایج حاضر نشان می‌دهد که میزان این آنزیم‌ها در کنه‌های تیمار شده با اسانس گندواش کاهش یافته است. آلانسون (۴) نشان داد که

1 - Xenobiotic

2 - Sequestering
3 - Geraniol
4 - Nerol
5 - Pyrgo
6 - β-hydroxycineole

مونوترپن‌ها با یک گروه ساختاری هیدروکسیل قابل دسترس فعالیت اپوکسیدازی سوبسترای سمی و P_{450} میکروزومی را در *Spodoptera litura* F. القا می‌کنند. براتستن و ویلکینسون (۷) دریافتند که α-pinene (یک مونوترپن دوحلقه‌ای) قوی‌ترین القا کننده فعالیت ان-دمتیلاز در روده میانی *S. eridania* Cramer می‌باشد. این گزارش‌ها درگیری مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} را در سم‌زدایی اسانس‌های گیاهی یا مونوترپن‌ها در بدن حشرات نشان می‌دهد.

اسانس‌های روغنی ترکیبات پیچیده‌ای هستند و این امکان وجود دارد که بیش از یک مکان هدف داشته باشند. بنابراین مقاومت به این ترکیبات به کندی صورت خواهد گرفت و این ترکیبات می‌توانند در مدیریت مقاومت به آفت کش‌ها نقش مهمی ایجاد کنند. گیاه گندواش علاوه بر خاصیت حشره‌کشی و کنه‌کشی دارای خاصیت قارچ کشی نیز می باشند (۲) و از گیاه گندواش در مبارزه پشه مالاریا در چین باستان استفاده می شده است. این گیاه به وفور در استان گیلان به صورت خودرو رویش دارد و می تواند به عنوان یک ابزار مهم در مدیریت تلفیقی کنه دو لکه‌ای مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از امکانات دانشگاه گیلان انجام شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان قدر دانی می‌شود. از آقایان دکتر جلیل حاجی زاده و دکتر حسن رحمانی به خاطر تایید گونه *T. urticae* سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱- معماری‌زاده ن.، قدمیاری م.، ساجدی ر. ح. و جلالی سندی ج. ۱۳۸۹. مقاومت تقاطعی کنه دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) به آبامکتین و اسانس روغنی رزماری. مجله دانش گیاهپزشکی ایران. جلد ۴۰، شماره ۱: صفحات ۱۲۵-۱۳۴.

۲- احمدی تولمی س.ب.، جلالی سندی ج.، قدمیاری م.، خداپرست س.ا.، حسن زاده ن. و پاداشت ف. ۱۳۸۸. اثر ضد قارچی عصاره چند گیاه بومی روی *Magnaporthe grisea*، عامل بلاست برنج در آزمایشگاه. مجله دانش گیاهپزشکی ایران. جلد ۳۹، شماره ۱: صفحات ۹۷-۱۰۵.

۳- زمانی ش. ۱۳۸۷. تاثیر عصاره گیاه رزماری *Rosemarinus officinalis* L. و گندواش *Artemisia annua* L. روی فیزیولوژی و برخی پارامترهای زیستی شب پره هندی آرد *Plodia interpunctella* (hubner) در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه گیلان. ۸۴صفحه.

4- Allanson R.B. 1982. Induction of aldrin epoxidase activity of cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Spodoptera litura* by monoterpenes. Diploma of Agriculture, Dissertation, The University of Sydney. Sydney.

5- Aslan I., Ozbek H., Calmasur O. and Sahin F. 2004. Toxicity of essential oil vapors to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Industrial Crop and Products, 19: 167-173.

6- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

7- Brattsten L.B. and Wilkinson C.F. 1977. Herbivore-plant interactions: mixed-function oxidases and secondary plant substances. Science, 196: 1349-1352.

8- Brown T. M. 2003. Insect resistance to insecticide. Pp. 913-924. In: Plimer, J. R., Gammon, D. W. and N. N. Ragsdale (eds). Encyclopedia of Agrochemicals. John Wiley and Sons. Inc. Publication.

9- Calmasur O.C., Aslan I. and Fikrettin S. 2006. Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Journal of Industrial Crops and Products, 23: 140–146.

10- Choi W., Lee S., Park H. and Ahn Y. 2004. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). Journal of Economic Entomology, 97: 553-558.

11- Cockayne S.E. and Gawkrodger D.J. 1997. Occupational contact dermatitis in an aromatherapist. Contact Dermatitis, 37: 306-309.

12- Dabrowski Z.T. and Seredynska U. 2007. Characterization of two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch, Acari: Tetranychidae) response to aqueous extracts from selected plant species. Journal of Plant Protection Research, 47 (2): 113-124.

13- Davis B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences, 121: 404-427.

14- Enayati A.A., Ranson H. and Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect Molecular Biology, 14: 3–8.
15- Feng R. and Isman M. B. 1995. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae.* Experientia, 51: 831-834.
16- Gencsoylu I. 2007. Effect of *Asphedolus aestivus* Brot. as a botanical acaricide against *Tetranychus cinnabarinus* Boisd. (Acari: Tetranychidae). International Journal of Agricultural Research, 2 (2): 189-192.
17- Gengaihi E., Amer S.E. and Mohamed S.A.A. 1996. Biological activity of thyme oil and thymol against *Tetranychus urticae* Koch. Anzeiger fur Scchadlingskunde Pflanzenscutz Umweltsschutz, 69: 157-159.
18- Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B. 1974. Glutathion s- transferase, the first step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249: 7130-7139.
19- Hiroi T., Miyazaki Y., Kobayashi Y., Imaoka S. and Funae Y. 1995. Induction of hepatic P_{450}s in rat by essential wood and leaf oils. Xenobiotica, 25: 457-467.
20- Huffaker C.B., van de Vrie M. and McMurty J.A. 1969. The ecology of tetranychid mites and their natural control. Annual Review of Entomology, 14: 125-174.
21- Isman M.B. 1996. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. Phytoparasitica, 25(4): 339-344.
22- Isman M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19: 603-608.
23- Isman M.B., Wan A.J. and Passreiter C.M. 2001. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. Fitoterapia, 72: 65-68.
24- Kono Y. and Tomita T. 1992. Characteristics of highly active carboxylesterases in insecticide- resistant *Culex pipiens quinquefasciatus.* Japanese Journal of Sanitary Zoology, 43(4): 297-305.
25- Kumar Anuj D., Florence V., Broughton M.J. and Sriharan S. 2000. Effect of root extracts of Mexican marigold, *Tagetes minuta* (Asterales: Asteraceae), on six nontarget aquatic macroinvertebrates. Environmental Entomology, 29 (2): 140-149.
26- Lee S.E., Choi W.S., Lee H.S. and Park B.S. 2000. Cross-resistance of a chlorpyrifos-methyl resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) to fumigant toxicity of essential oil extracted from *Eucalyptus lobules* and its major monoterpene, 1,8-cineole. Journal of Stored Products Research, 36: 383-389
27- Lee S., Tsao R., Peterson C. & Coats J.R. 1997. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). Journal of Economic Entomology, 90(4): 883-892.
28- Licht H.J. and Coscia C.J. 1978. Cytochrome P_{450}LM2 mediated hydroxylation of monoterpene alcohols. Biochemistry, 17: 5638-5646.
29- Makundi R.H. and Kashenge S. 2002. Comparative efficacy of neem, *Azadirachta indica*, extract formulations and the synthetic acaricide, Amitac (Mitac), against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), on tomatoes, *Lycopersicum esculentum*. Z. Pflanzkr. Pflanzenschutz, 109: 57-63.
30- Memarizadeh N., Ghadamyari M., Sajedi R. H. and Jalali Sendi J. 2010. Characterization of esterases from abamectin-resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). International Journal of Acarology, 37(4): 271–281.
31- Mansour F., Ravid U. and Putievsky E. 1986. Studies on the effects of essential oils isolated from 14 species of Labiatae on the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. Phytoparasitica, 14: 137-142.
32- Miresmailli S. 2005. Assessing the efficacy and resistance of rosmary oil-baced miticide/ insecticide for use on greenhouse tomato. Ph.D. Thesis. University of British Columbia. 385pp.
33- Momen F.M. and Amer S.A.A. 1999. Effect of rosemary and sweet marjoram on three predacious mites of the family Phytoseiidae (Acari: Phytoseiidae). Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 34: 355-361.
34- Software Leora. 1987. POLO-PC: A user guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, California.
35- Southwell I.A., Maddox C.D.A. and Zalucki M.P. 1995. Methabolism of 1,8-cineole in tea tree (*Melaleuca alternifolia* and *M. Linariifolia*) by pyrgo beetle (*Paropsisterna tigrina*). Journal of Chemical Ecology, 21 (4): 439-453.
36- Stark J. D. & Banks J.E. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods.

Annual Review of Entomology, 48: 505-519.
37- Suzuki K., Hama H. and Kono Y. 1993. Carboxylesterase of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), responsible for fenitrothion resistance as a sequestering protein. Applied Entomology and Zoology, 28(4): 439-450.
38- Tripathi A.K., Prajapati V., Aggarwal K.K., Khanuja S.P.S. and Kumar S. 2000. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored product beetles. Journal of Economic Entomology, 93(1): 43–47.
39- Tunc I. and Sahinkaya S. 1998. Sensitivity of two greenhouse pests to vapors of essential oils. Entomologia Experimentalis et Applicata, 86: 183-187.
40- van Asperen K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. Journal of Insect Physiology, 8: 401–416.
41- Yatagai M. 1997. Miticidal activities of tree terpense. Current Topics of Phytochemistry, 1: 87-97.
42- Yong-giang Z., Wei D., Zhi-mo Z., Jing W. and Yu-hu F. 2008. Studies on acaricidal bioactivities of *Artemisia annua* L. extracts against *Tetranychus cinnabarinus* Bois. (Acari: Tetranychidae)**.** Agricultural Science in China, 7(5); 577-584.