جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۳۴-۱۲۵)

مقاومت تقاطعی کنه دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) به آبامکتین و اسانس روغنی رزماری

نرگس معماری زاده[۱]، محمد قدمیاری[۲]*، رضا حسن ساجدی[۳] و جلال جلالی سندی[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیاران و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲۷ - تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۷)

چکیده

در این تحقیق سمیت تدخینی اسانس روغنی رزماری روی جمعیت‌های مقاوم و حساس به آبامکتین کنه دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سمیت تدخینی اسانس رزماری روی جمعیت حساس ۳/۰۶ برابر جمعیت مقاوم است. بنابراین مقاومت تقاطعی کمی بین آبامکتین و بخار اسانس رزماری در جمعیت مقاوم وجود دارد. همچنین در این تحقیق اثرات LC_{50} اسانس رزماری روی آنزیم‌های سم‌زدا در دوره های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت روی هر دو جمعیت مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری فعالیت استراز نشان داد که فعالیت آنزیم جمعیت مقاوم در دوره تیمار ۲۴ ساعت کاهش نیافت اما در دوره تیمار ۴۸ ساعت در مقایسه با دوره تیمار ۲۴ ساعت و گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. در مورد جمعیت حساس، میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۲۴ ساعت نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار و این میزان در تیمار ۴۸ ساعت در مقایسه با تیمار ۲۴ ساعت به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس- ترنسفراز نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها تحت تأثیر تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعتی اسانس رزماری قرار نمی‌گیرد. در مورد میزان مونواکسیژنازهای جمعیت‌های حساس، بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، در حالی‌که میزان این آنزیم در جمعیت مقاوم، با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

واژه‌های کلیدی: *Tetranychus urticae* Koch، مقاومت به آبامکتین، اسانس رزماری، استرازها، گلوتاتیون اس –ترنسفراز، مونواکسیژنازها.

مقدمه

کنه دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch، مهم‌ترین کنه آفت در گلخانه‌های سراسر جهان است که می‌تواند باعث کاهش شدید محصول، به خصوص زمانی که دما به حد کافی بالا است، شود. بروز مقاومت به کنه‌کش‌ها در کنه‌های تارعنکبوتی اغلب آنقدر سریع اتفاق می‌افتد که مدیریت مؤثر آن‌ها در بسیاری از سامانه‌های کشاورزی دشوار است (Jeppson *et al.*, 1975). به تازگی تعداد آفت کش‌های تدخینی مؤثر برای کنترل آفات، به دلیل ناسازگاری با محیط زیست و

* نویسنده مسئول: محمد قدمیاری تلفن: ۰۹۱۱-۱۴۳۸۴۰۰ E-mail: mghadamyari@gmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بروز مقاومت، کاهش یافته است. بنابراین نیاز به توسعه جایگزین‌های امن، ارزان، با امکان مصرف آسان و سازگار با محیط زیست بیش‌تر احساس می‌شود. اسانس‌های روغنی به خصوص ترکیبات عمده آن‌ها یعنی مونوترپنوئیدها جایگزین‌های مناسبی برای آفت‌کش‌های تدخینی قدیمی هستند. با توجه به این‌که مقاومت، تنها به آفت کش‌های مصنوعی محدود نبوده و طیف وسیعی از عوامل بیمارگر و تنظیم کننده‌های رشد آفات را نیز شامل می‌شود، بنابراین ضروری است هر ماده‌ای که پتانسیل آفت‌کشی دارا است، نه تنها برای مؤثر بودن بلکه به منظور بررسی امکان توسعه‌ی مقاومت آفات به آن‌ها نیز مورد آزمایش قرار گیرد (Papachristos & Stamopoulos, 2002). اسانس‌های روغنی گیاهی، ترکیبات عطری حاصل از تقطیر با بخار آب بوته‌ها و گیاهان دارویی هستند (Yatagai, 1997). این اسانس‌ها منبعی غنی از ترکیبات فعال زیستی بوده و از لحاظ زیستی قابل تجزیه و برای پستانداران غیرسمی هستند. لازم به ذکر است که هزینه تولید اسانس‌های روغنی می‌تواند عامل مهمی برای محدودیت کاربرد آن‌ها باشد که این مسئله بستگی به در دسترس بودن گیاه و مقدار محصول در هکتار دارد (Cavalcanti *et al.*, 2010).

رزماری، *Rosmarinus officinalis* L.، گیاهی بوته‌ای، معطر، چوبی، چند ساله و همیشه سبز با برگ‌های سوزنی شکل خاکستری و پوست فلس‌دار است. این گیاه متعلق به خانواده Lamiaceae و دارای پتانسیل آفت‌کشی است (Miresmailli, 2005). Choi *et al.* (2004) ۵۳ اسانس روغنی را روی کنه‌های *T. urticae* و *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot به روش تدخینی آزمایش کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که روغن سنبل هندی، لیمو ترش، اوکالیپتوس، پونه، نعناع بیابانی و دانه زیره سیاه برای هر دو کنه بسیار سمی بودند. هم‌چنین روغن رزماری برای کنه‌های شکارگر *Amblyseius barkeri* Hughes، *A. zaheri* Yousef & El-Borolossy و *Typhlodromun athiasae* Porath سمی شناخته شد (Momen & Amer, 1999). نتایج Calmasur *et al.* (2006) نیز نشان داد که اسانس‌های روغنی *Origanum vulgare* L.، *Nepeta racemosa* L. و *Micromeria fruticosa* L. ممکن است توان بالایی برای مدیریت مؤثر *T. urticae* داشته باشند. Mansour *et al.* (1986) بیان کردند که علاوه بر سمیت اسانس‌های روغنی برخی گونه‌های Lamiaceae، باقیمانده‌ی آن‌ها نیز دارای اثر دورکنندگی بوده و باروی ماده‌های *T. cinnabarinus* Boisd. را کاهش می‌دهند.

Makundi & Kashenge (2002) نشان دادند که اسانس درخت چریش مانع تخم‌گذاری و ظهور پوره‌های *T. urticae* می‌شود. در مطالعه Gencsoylu (2007) اثر *Asphedolus aestivus* Brot به عنوان آفت‌کش طبیعی در مقابل *T. cinnabarinus* بررسی شد. خواص دورکنندگی اسانس‌های روغنی رزماری در برابر *Thrips tabaci* L. و اثر آن بر پذیرش و انتخاب میزبان نیز گزارش شده است (Koschier & Sedy, 2003). این ترکیب اغلب در برابر آفات انباری، فعالیت تخم‌کشی نشان می‌دهد (Tunc *et al.*, 2000). اسانس روغنی رزماری شامل ۳۳ ترکیب است و اجزاء اصلی این اسانس شامل آلفا- پینن، ۱و۸- سینئول، کامفور و بتا- پینن و برنئول است(Santoyo *et al.*, 2005). نتایج Miresmailli (2005)، نشان داد که اسانس روغنی رزماری می‌تواند به عنوان یک کنه‌کش/ حشره‌کش، باعث مرگ و میر کنه دولکه‌ای و مگس سفید گلخانه در شرایط آزمایشگاهی شود. هم‌چنین کنه‌های شکارگر در مقایسه با کنه دو لکه‌ای حساسیت کمتری به روغن رزماری نشان دادند.

برخی از اسانس‌های روغنی یا اجزاء خالص شده آن‌ها روی سیستم عصبی اثر می‌گذارند و حشرات تیمار شده علایمی مانند بیش فعالی، جابجایی شدید و لرزش و به دنبال آن زمین گیر شدن (knockdown) را نشان می‌دهند که مشابه علائم ناشی از مسمومیت با حشره‌کش‌های فسفره آلی و کاربامات‌ها است (Kostyukovsky *et al.*, 2002). نتایج Lee *et al.* (2000) نشان داد که بخارات اسانس روغنی اکالیپتوس و ۱ و ۸- سینئول برای دو استرین مقاوم و حساس به کلرپایریفوس-متیل شپشه دندانه‌دار (*Oryzaephilus surinamensis* L.) سمیت دارد و استرین مقاوم به کلرپایریفوس- متیل در مقابل گازدهی روغن اکالیپتوس و ۱و۸- سینئول مقاومت تقاطعی نشان می‌دهد. نتایج Papachristos & Stamopoulos (2002) نیز نشان داد

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

که *Acanthoscelides obtectus* (Say) می‌تواند به بخارات اسانس روغنی اسطوخودوس مقاوم شود و از طرف دیگر استرین‌های مقاوم می‌توانند برای مطالعاتی در مورد طرز عمل بخارات اسانس روغنی و مکانیسم‌های سم‌زدایی مفید باشند.

جمعیت مقاوم مورد بررسی در این تحقیق مقاومت متابولیکی بسیار بالایی به آبامکتین نشان داده بود و آنزیم‌های استراز، گلوتاتیون اس-ترنسفراز و سیستم مونو اکسیژناز از مکانیسم‌های درگیر دراین مقاومت بودند (Memarizadeh *et al.*, 2010). با توجه به این‌که آنزیم‌های سم‌زدا نقش مهمی در غیر سمی نمودن مواد درون زاد (Endogenous) و ناگوارد (Exogenous) دارند، بنابراین این احتمال وجود دارد که این آنزیم‌ها مواد حاصل از بخارات اسانس‌های روغنی را تجزیه نموده و از رسیدن این مواد به مکان هدف جلوگیری کنند. هدف از این تحقیق بررسی این فرضیه بود که آیا آنزیم‌های سم-زدا که عامل مقاومت به آبامکتین هستند می‌توانند باعث مقاومت تقاطعی با اسانس رزماری شوند. همچنین در این تحقیق اثرات زیرکشندگی (LC_{50}) این ترکیب بر میزان فعالیت آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس-ترنسفراز و میزان مونواکسیژنازهای سیتوکروم P_{450} هر دو جمعیت در دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز برآورد شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جمعیت کنه دولکه‌ای

جمعیت مقاوم مورد استفاده در این تحقیق از روی گل رز در گلخانه‌ای واقع در شهر اصفهان، که با مشکل جدی در کنترل مواجه شده بود، جمع‌آوری شد. جمعیت حساس نیز از روی علف‌های هرز *Convolvulus sp* از مناطق بکر دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان که هیچ گونه سابقه‌ی سم‌پاشی نداشتند، جمع‌آوری شد. به منظور شناسایی گونه دو جمعیت، از تعدادی کنه‌های نر و ماده هر دو جمعیت اسلاید تهیه شد و به این ترتیب گونه هر دو جمعیت *T. urticae* تشخیص داده شد. مطالعات اولیه روی این دو جمعیت به ترتیب مقاومت و حساسیت دو جمعیت به آفت‌کش آبامکتین را نشان داد که میزان مقاومت به آبامکتین بیش‌تر از ۳۰۰۰ برابر بود (Memarizadeh *et al.*, 2010).

اسانس روغنی گیاه رزماری

اسانس روغنی رزماری از شرکت کشت و صنعت گیاه و اسانس با استفاده از Clevenger تهیه و در آزمون زیست‌سنجی استفاده شد. لازم به ذکر است برگ و ساقه‌های خشک شده این گیاه پس از خشک شدن در سایه، اسانس‌گیری شد و گیاه مورد نظر در خرداد ماه جمع‌آوری و برای اسانس‌گیری استفاده گردید.

زیست سنجی

هم‌سن سازی

برای انجام زیست سنجی و آزمون‌های بیوشیمیایی ایجاد جمعیتی یکنواخت و هم‌سن ضروری است. برای این منظور ساقه‌ی سه برگی لوبیا از سوراخ تعبیه شده در درب چوب پنبه‌ای شیشه‌ی پنیسیلین محتوی آب عبور داده شد و تعداد ۱۰ عدد کنه‌ی بالغ ماده به برگ‌ها منتقل شد، بعد از ۲۴ ساعت کنه‌های بالغ از روی برگ‌ها برداشته شد و فقط تخم‌ها باقی ماندند. برگ‌ها تا زمان بالغ شدن کنه‌ها در اتاقک پرورش 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.

آزمون مقدماتی برای تعیین دامنه غلظت

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.

آزمون نهایی

در این آزمایش روش تاثیر بخارات اسانس روغنی، با استفاده از ظروف شیشه‌ای درب سمباده‌ای با حجم ۱ لیتر، برای تخمین LC_{50} رزماری به کار رفت (Aslan*et al.*, 2004). 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 ماده بالغ هم‌سن (۰-۲۴ ساعته) روی برگ قرار گرفت. سپس دایره‌هایی به قطر ۲ سانتی‌متر از کاغذ صافی بریده و روی دیواره‌ی داخلی ظروف شیشه‌ای چسبانده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از غلظت مشخص اسانس (که در استون تهیه می‌شد) به‌وسیله‌ی سمپلر روی آن‌ها قرار

داده شد. در این مرحله شیشه‌های پنیسیلین آماده شده داخل ظروف شیشه‌ای قرار داده شدند. در این آزمون چهار غلظت از اسانس روغنی تهیه و بخارات آن روی کنه دولکه‌ای اثر داده شد. برای هر غلظت چهار تکرار در نظر گرفته شد و پس از ۲۴ ساعت میزان تلفات تعیین گردید. کنه‌هایی که هنگام تحریک با یک قلم مو قادر به حرکت پاهای خود نبودند و علایم مسمومیت شدید نشان می‌دادند، به عنوان مرده در نظر گرفته شدند.

تجزیه داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده از آزمون زیست‌سنجی به کمک نرم‌افزار پولوپی‌سی تجزیه گردید (Leora Software, 1978).

بررسی اثر LC_{50} اسانس رزماری روی دو جمعیت حساس و مقاوم در شرایط *in vivo*

بعد از برآورد LC_{50} اسانس رزماری روی دو جمعیت، غلظت LC_{50} هر جمعیت بر کنه‌های هم سن همان جمعیت در طول دوره ۲۴ و ۴۸ ساعت (به روش تعیین LC_{50}) اثر داده شد و کنه‌های زنده مانده در هر تیمار جمع‌آوری و تا زمان ارزیابی‌های آنزیمی در فریزر ۲۰-°C نگهداری شدند. اثر LC_{50} روی کنه های حساس و مقاوم حداقل در ۱۰ تکرار انجام شد تا مقدار کنه لازم برای آزمون‌های بیوشیمیایی فراهم شود. آزمون‌های بیوشیمیایی در ۴ تکرار انجام شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی

مواد شیمیایی

آمونیوم پرسولفات، آلفا نفتیل استات (α-NA)، سوکروز، بروموفنل بلو، تریس، اکریل آمید، بیس اکریل آمید، TEMED، گلایسین، گلوتاتیون احیا شده (GSH) و (CDNB) (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) از شرکت مرک (آلمان) و نمک فاست بلو آر آر از شرکت فلوکا (کشور آمریکا) تهیه شد. 3,3`,5, 5` tetramethyl benzidine (TMBZ) از شرکت Panreac خریداری شد.

تهیه عصاره آنزیمی

۲۰ عدد کنه ماده بالغ در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$ و pH ۷) حاوی تریتون X-۱۰۰ به نسبت دو دهم درصد (V/V) برای استراز و بدون ترایتون برای سیستم MFO و گلوتاتیون اس-ترنسفراز با استفاده از همگنه شیشه‌ای همگن شدند، سپس محلول همگن شده در ۱۰۰۰۰g و به مدت ۱۵دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. محلول رونشین (Supernatant) به ظروف شیشه‌ای جدید منتقل شده و با بافر فسفات رقیق گردید.

اندازه‌گیری فعالیت استرازی

فعالیت کربوکسیل استراز مطابق روش Van Aspern (1962) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت استرازها از سوبسترای ۱-نفتیل استات به غلظت ۱/۸ میلی‌مولار استفاده گردید. ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول رونشین با سوبسترا و بافر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. بعد از انقضای زمان واکنش، محلول رنگی نمک فاست بلو آر آر اضافه شد و میکرو پلیت به مدت بیست دقیقه در تاریکی نگهداری گردید. بعد از گذشت بیست دقیقه مقدار آلفا نفتول تولید شده بوسیله یک میکرو پلیت ریدر (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 و فعالیت به صورت نانومول بر دقیقه بر هر کنه محاسبه گردید.

اندازه گیری فعالیت گلوتاتیون اس -ترنسفراز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز با استفاده از سوبسترای CDNB و مطابق روش Habig *et al.* (1974) صورت گرفت. در این آزمایش ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۲۵ میکرولیتر GSH (۱۰۰ میلی مولار)، ۱۰ میکرولیتر CDNB (۵۰ میلی‌مولار) و ۲۲۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار با pH ۸) در چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شد و جذب در ۳۴۰ نانومتر به صورت پیوسته (Kinetic) با فاصله زمانی ۲۰ ثانیه و به مدت پنج دقیقه با استفاده از میکروپلیت ریدر STAT FAX 3200 خوانده شد.

اندازه‌گیری مقدار مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450}

برای این منظور از روش heme-peroxidase و اندازه‌گیری میزان کل پروتئین حاوی آهن استفاده می‌شود (Brogdon *et al.*, 1997). ۲۰ میکرو لیتر آنزیم، ۸۰ میکرو لیتر بافر پتاسیم- فسفات ۰/۶۲۵ مولار (pH ۷/۲)، ۲۰۰ میکرو لیتر محلول 3, 3`, 5, 5` tetramethyl benzidine (TMBZ) و ۲۵ میکرو لیتر H_2O_2 (۳٪) داخل پلیت‌های الایزا ریخته شد. بعد از ۱ ساعت نگهداری در تاریکی، جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر

خوانده شد. در این روش از سیتوکروم C خالص شده به عنوان استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین

به منظور اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل روش Bradford (1976) به‌کار گرفته شد. همچنین از غلظت‌های مختلف پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

Native PAGE کربوکسیل استراز

الکتروفورز با ژل ۷/۵ درصد با استفاده از روش Davis (1964) در ۱۰۰ولت 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 رنگ‌آمیزی در محلول (۰/۰۲ درصد ۱- نفتیل استات + ۰/۰۲ درصد ۲- نفتیل استات + ۰/۱ درصد نمک فاست بلو آرآر) به مدت یک ساعت نگهداری شد (Kono & Tomita, 1992).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

محاسبات این آزمایش نیز با کمک نرم‌افزار اکسل انجام شد. مقایسه بین مقادیر در دو جمعیت در نرم‌افزار SAS و با آزمون t انجام شد.

نتایج و بحث

زیست‌سنجی

نتایج حاصل از زیست سنجی اسانس روغنی رزماری روی کنه‌های بالغ در جدول ۱ نشان داده شده است. این روش به وسیله Aslan *et al.* (2003) و Calmasur *et al.* (2004)، به منظور بررسی سمیت تعدادی اسانس‌های گیاهی برای کنه‌ی دولکه‌ای *Bemisia tabaci* Genn. و استفاده شده است. محدوده اطمینان ۹۵٪ نسبت LC_{50}های محاسبه شده (یعنی سمیت نسبی) توسط برنامه پولو- پی سی برای جمعیت‌های حساس و مقاوم شامل عدد یک نشد (جدول ۱). بنابراین از نظر آماری LC_{50} این جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری دارند و جمعیت مقاوم به آبامکتین به اسانس رزماری نیز مقاوم است. Miresmailli (2005)، میزان LC_{50} اسانس رزماری خالص را روی کنه دولکه‌ای به روش (Leaf disc painting)، ۱۳/۱۹ml/litre گزارش نمود.

با توجه به این‌که شیب خط نشان دهنده کیفیت عمل آنزیم مؤثر در غیرسمی کردن است و انطباق خطوط از نظر بیولوژیکی بدین معنی است که ارگانیسم دارای آنزیم‌هایی هستند که فعالیت آن‌ها از نظر کمی و کیفی یکسان هستند. چون در مورد این دو جمعیت شیب خطوط یکسان نبوده و خطوط بر هم منطبق نیستند، بنابراین احتمالاً آنزیم‌های غیرسمی‌کننده اسانس رزماری از نظر کیفی و کمی در جمعیت‌های حساس و مقاوم متفاوت می‌باشند.

اثر زیر کشندگی اسانس روغنی رزماری روی آنزیم‌های سم‌زدا

با توجه به این‌که روش‌های رایج برای بررسی تأثیرات یک ماده سمی بر پایه اندازه‌گیری مرگ و میر فرد (دز یا غلظتی که باعث کشتن ۵۰ درصد جمعیت می‌شود) است، یکی از مواردی که در سم‌شناسی

جدول ۱- برآورد غلظت کشنده ۵۰ درصد، محدوده اطمینان ۹۵ درصد و پارامترهای خطوط غلظت-پاسخ جمعیت‌های حساس و مقاوم کنه دولکه‌ای به اسانس‌روغنی رزماری

جمعیت	تعداد کنه با شاهد	LC_{50} [a] (محدوده اطمینان ۹۵٪)	سمیت نسبی [b] (محدوده اطمینان ۹۵٪)	SE ± شیب	χ^2 (df) [c]
مقاوم	۳۶۵	۲/۲۱ (۱/۸۰ – ۲/۶۱)	*۳/۰۶ (۲/۲۳ – ۳/۴۶)	۲/۴۴±۰/۳۹	۱/۷ (۲)
حساس	۳۱۵	۰/۷۲ (۰/۵۲ – ۱/۱۷)	d	۱/۳۶±۰/۳۳	۱/۰۱ (۲)

a مقدار LC_{50} بر حسب $\mu l/l_{air}$ و محدوده اطمینان ۹۵٪

b سمیت نسبی = مقدار LC_{50} جمعیت مشکوک به مقاومت تقسیم بر LC_{50} جمعیت حساس و محدوده اطمینان ۹۵٪

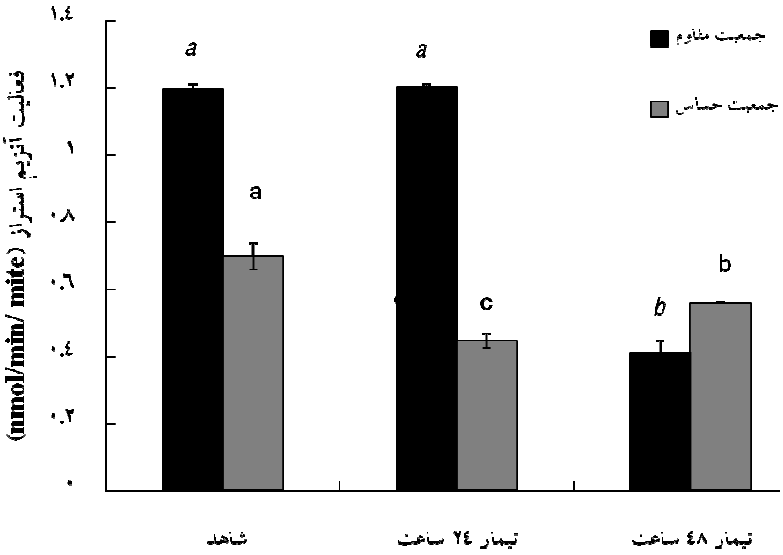
c مقدار χ^2 در سطح ۵٪ از مقدار χ^2 جدول کمتر است، که نشان دهنده‌ی برازش مناسب داده‌ها و خطوط رگرسیونی پیشنهادی است.

d جمعیت پایه حساس

* از لحاظ LC_{50} و عدم همپوشانی محدوده اطمینان ۹۵٪ با جمعیت حساس پایه اختلاف معنی داری دارد.

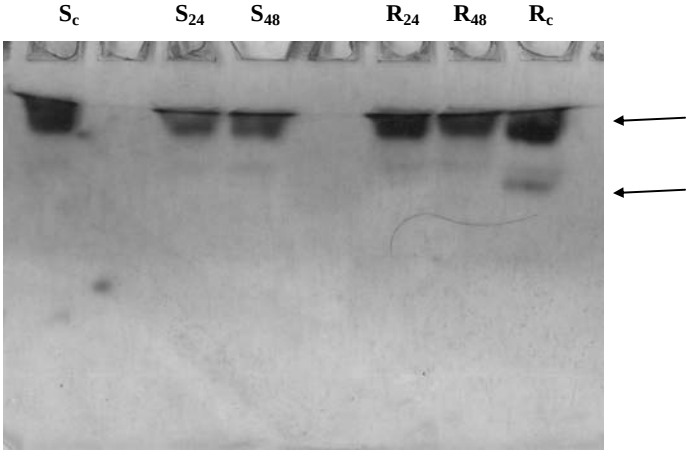
می‌تواند مورد تحقیق قرار گیرد، چگونگی بررسی اثرات کلی یک ماده سمی روی فیزیولوژی موجود زنده است. چرا که در این روش‌ها به دلیل لحاظ نکردن اثرات زیر کشنده، تأثیرات کلی و قطعی ترکیباتی که برای آفات اثر زیر کشندگی دارند، مشخص نمی‌شود. به این ترتیب که پس از سم‌پاشی تعدادی از افراد جمعیت که در معرض سم قرار گرفته‌اند زنده مانده و ممکن است تغییراتی در دوره زندگی، نرخ رشد، تولید مثل، نسبت جنسی و دیگر پارامترهای زیستی و یا سیستم‌های آنزیمی آن‌ها ایجاد شود (Stark & Bank, 2003).

در این تحقیق اثرات زیر کشندگی روی فعالیت آنزیم‌های سم‌زدای افراد زنده مانده از دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت با این ترکیب برآورد شد. نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های استراز کنه دو لکه‌ای حساس و مقاوم تحت تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت اسانس رزماری در غلظت LC_{50} در شکل یک آمده است. تفاوت معنی‌داری در مقدار فعالیت آنزیم‌ها بین شاهد و تیمارها در دو جمعیت مشاهده شد و نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌ها در مورد جمعیت مقاوم بعد از ۲۴ ساعت تیمار با میزان فعالیت آنزیم در شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. اما میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۴۸ ساعت به طور معنی‌داری نسبت به تیمار ۲۴ ساعت و شاهد کاهش نشان داد (شکل۱). در مورد جمعیت حساس، میزان فعالیت آنزیم در تیمار ۲۴ ساعت نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار و این میزان در تیمار ۴۸ ساعت در مقایسه با تیمار ۲۴ ساعت به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (شکل۱). همچنین زایموگرام حاصل از آنزیم‌های استراز، داده‌های به‌دست آمده در آزمایش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم را تأیید نمود. زایموگرام حاصل از اثر غلظت LC_{50} اسانس رزماری در دو تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت) برای دو جمعیت در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصل از سنجش آنزیمی و نتایج به‌دست آمده در زایموگرام، که نشان‌دهنده درگیر شدن آنزیم استراز تحت تأثیر اسانس رزماری است، می‌توان این‌چنین جمع‌بندی کرد که فعالیت آنزیم استراز در جمعیت مقاوم با یک تأخیر زمانی تحت تأثیر بازدارندگی اسانس رزماری قرار می‌گیرد به طوری‌که بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار، مقدار فعالیت آنزیم در جمعیت مقاوم کاهش چشم‌گیری می‌یابد (شکل ۱). در صورتی که در جمعیت حساس طی تیمار ۲۴ ساعت، فعالیت استراز تحت تأثیر بازدارندگی رزماری کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد و پس از گذشت ۴۸ ساعت بازدارندگی کاهش می‌یابد به طوری‌که میزان فعالیت در جمعیت حساس از مقاوم بیش‌تر می‌شود.



شکل ۱- مقایسه فعالیت آنزیم‌های استراز تحت تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت با LC_{50} اسانس رزماری در جمعیت‌های مقاوم و حساس

حروف مشابه روی هر ستون با استفاده از آزمون توکی و در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.



شکل ۲- اثر غلظت LC_{50} اسانس رزماری روی زایموگرام آنزیم‌های استراز در دوره‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت
R_c: جمعیت مقاوم (شاهد)، R_{48}: جمعیت مقاوم تیمار ۴۸ ساعت، R_{24}: جمعیت مقاوم تیمار ۲۴ ساعت،
S_{48}: جمعیت حساس تیمار ۴۸ ساعت، S_{24}: جمعیت حساس تیمار ۲۴ ساعت و S_c: جمعیت حساس (شاهد).

نتایج Papachristos & Stamopoulos (2002) نشان داد که *A. obtectus* می‌تواند به بخارات اسانس روغنی اسطوخودوس حتی بعد از چند نسل مواجهه، مقاومت نشان دهد. پیش تیمار *A. obtectus* گزینش شده با بخارات اسانس اسطوخودوس با تری‌فنیل‌فسفات (بازدارنده استراز) درجه‌ای از تشدیدکنندگی را نشان نداد که این نتیجه نشان‌دهنده عدم درگیری این آنزیم در سم‌زدایی بخار اسانس روغنی اسطوخودوس به وسیله *A. obtectus* است. داده‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان فعالیت استراز در جمعیت مقاوم و حساس ۴۸ ساعت بعد از تیمار با اسانس رزماری کاهش می‌یابد، احتمالاً این آنزیم در غیرسمی نمودن اسانس رزماری نقش داشته باشد، بنابراین پیشنهاد می‌شود تا نقش آنزیم‌های استراز در غیرسمی نمودن اسانس رزماری در آزمون‌های سینرژیست مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز، تحت تأثیر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعتی رزماری و مقایسه‌ی آن‌ها با شاهد برای هر جمعیت نشان داد بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۳).

نتایج Lee *et al.* (2000)، نشان داد که بین سمیت تدخینی اسانس روغنی اکالیپتوس و ۱ و ۸- سینئول روی دو استرین حساس و مقاوم *O. surinamensis* اختلاف معنی‌داری وجود دارد. داده‌های این محقق نشان داد که استرین مقاوم به کلرپایریفوس- متیل ممکن است در مقابل گازدهی روغن اکالیپتوس و ۱ و ۸- سینئول مقاوم باشد. این استرین مقاومت متوسطی حدود ۴ برابر بیش‌تر از استرین حساس (بعد از گزینش با کلرپایریفوس-متیل) نشان داد. مقاومت به کلرپایریفوس- متیل کشف شده در *O. surinamensis* به‌واسطه افزایش آنزیم‌های سم‌زدا مثل مونواکسیژنازهای سیتوکروم P_{450}، گلوتاتیون اس-ترنسفراز و استرازها است (Lee *et al.*, 2000).

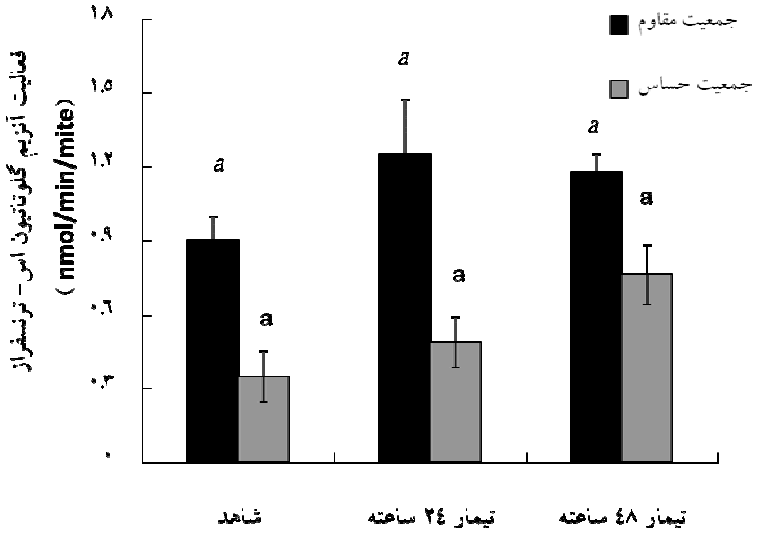
نتایج Papachristos & Stamopoulos (2002) نشان داد که پیش تیمار *A. obtectus* گزینش شده با بخارات اسانس اسطوخودوس با دی‌اتیل‌مالآت (بازدارنده گلوتاتیون اس-ترنسفراز) نسبت مقاومت را اندکی کاهش داد که این نتیجه درگیری گلوتاتیون اس-ترنسفراز را در این مقاومت پیشنهاد می‌کند. لازم به ذکر است که *A. obtectus* از طریق فشار گزینشی با بخارات اسانس اسطوخودوس مقاوم شده است. ولی جمعیت مورد آزمون در این تحقیق قبلاً تحت فشار گزینشی با کنه‌کش‌ها بوده است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های مونواکسیژناز در کنه‌های حساس و مقاوم تیمار شده در این تحقیق نشان داد که بین تیمارها و شاهد جمعیت حساس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۴)، در حالی‌که بین مقادیر این آنزیم‌ها در نمونه‌های تحت تیمار و شاهد جمعیت مقاوم، در سطح ۱٪، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (شکل ۴). همان طور که در شکل

۴ مشخص شده است میزان این آنزیم در جمعیت مقاوم، با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

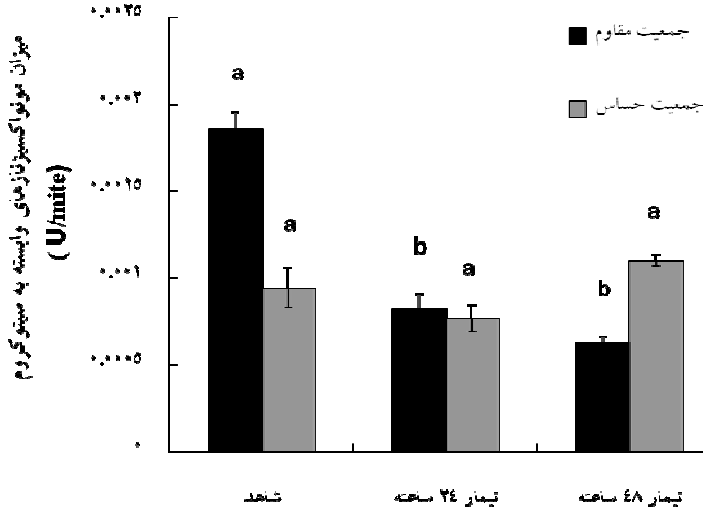
مونوترپن‌ها می‌توانند به وسیله سیستم مونو اکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} تجزیه شوند. P450LM2 مشتق شده از خرگوش به واسطه فرآیند هیدروکسلاسیون در متابولیسم چندین مونوترپن شامل جرانیول (Geraniol) و نرول (Nerol) شرکت دارد (Licht & Coscia, 1978). زمانی که سوسک پیرگو (*Paropsisterna tigrina* Chapuis) از برگ‌های درخت چای استرالیایی *Melaleuca alternifolia* Cheel تغذیه می‌کند، ۱ و ۸- سینئول به ۲ بتا-هیدروکسی‌سینئول (ß- hydroxycineol) متابولیزه می‌شود (Southwell *et al*., 1995).

اسانس‌های روغنی یا مونوترپن‌ها می‌توانند غلظت و



شکل ۳- مقایسه فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز تحت تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت با LC_{50} اسانس رزماری در جمعیت‌های مقاوم و حساس

حروف مشابه روی هر ستون با استفاده از آزمون توکی و در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.



شکل ۴- مقایسه میزان آنزیم‌های مونواکسیژناز تحت تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت با LC_{50} اسانس رزماری در جمعیت‌های مقاوم و حساس

حروف مشابه روی هر ستون با استفاده از آزمون توکی و در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.

فعالیت اپوکسیدازی مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} را روی سوبسترای سمی در موش صحرایی و حشرات القا کنند (Hiroi, 1995). Allanson (1982) نشان داد که مونوترپن‌های دارای گروه ساختاری هیدروکسیل قابل دسترس، فعالیت اپوکسیدازی P_{450} میکروزومی را روی سوبسترای سمی در *Spodoptera litura* F. القا می‌کنند. Brattsten & Wilkinson (1977) نیز دریافتند که α-pinene (یک مونوترپن دوحلقه‌ای) قوی‌ترین القا کننده در میان سوبستراهای گیاهی ثانویه مورد آزمون برای فعالیت ان-دمتیلازی در روده میانی *S. eridania* Cramer می‌باشد. این گزارش‌ها ممکن است درگیری مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450} را در سم‌زدایی اسانس‌هاس روغنی یا مونوترپن‌ها در بدن حشرات نشان دهد، هرچند که اطلاعات دقیق از اثر اسانس‌هاس روغنی یا مونوترپن‌ها در فرآیند متابولیکی در دست نیست.

Collins *et al.* (1992) نیز نشان دادند که فعالیت اپوکسیدازی روی سوبسترای سمی در یک استرین مقاوم به کلرپایریفوس- متیل، ۲۱/۹ بار بیش‌تر از استرین حساس است و غلظت آنزیم‌های سیتوکروم در استرین مقاوم ۱۲/۵ بار بیشتر از استرین حساس می‌باشد. بنابراین احتمالاً فعالیت مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450}، مرتبط با سم‌زدایی اسانس‌های روغنی یا مونوترپن‌ها در *O. surinamensis* است.

بعد از ۸ نسل گزینش حشرات نر و ماده *A. obtectus* با اسانس روغنی اسطوخودوس، این حشرات به ترتیب ۸ و ۵ بار مقاومت بیش‌تری نسبت به جمعیت گزینش نشده نشان دادند. پیش تیمار جمعیت مقاوم با PBO که روی مونواکسیژنازهای میکروزومی سیتوکروم P_{450} عمل می‌کند، مقاومت به بخارات اسانس روغنی اسطوخودوس را تا حد جمعیت تیمار نشده کاهش می‌دهد. این مسئله درگیری مونواکسیژنازهای میکروزومی سیتوکروم P_{450} را در بروز مقاومت به این اسانس نشان می‌دهد و احتمالاً این مهم‌ترین عامل در مقاومت به این اسانس می‌باشد (Papachristos & Stamopoulos, 2002).

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق اثر سمیت تدخینی اسانس روغنی رزماری بر جمعیت مقاوم و حساس به آبامکتین کنه دولکه‌ای بررسی شد و نتایج نشان‌دهنده مقاومت تقاطعی کمی بین ترکیب آبامکتین و اسانس رزماری (۳ برابر) می‌باشد. همچنین اثرات زیر کشندگی اسانس رزماری روی آنزیم‌های سم‌زدا نشان‌دهنده کاهش فعالیت آنزیم‌های استراز در جمعیت مقاوم و حساس به ترتیب ۴۸ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار شدن با بخارات اسانس رزماری می‌باشد. همچنین در جمعیت مقاوم میزان مونواکسیژنازها تحت تیمار با بخارات اسانس رزماری کاهش یافت.

REFERENCES

1. 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.
2. Aslan, I., Ozbek, H., Calmasur, O. & Sahin, F. (2004). Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Industrial Crop and Products*, 19, 167-173.
3. 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.
4. Brattsten, L. B. & Wilkinson, C. F. (1977). Herbivore-plant interactions: mixed-function oxidases and secondary plant substances. *Science*, 196, 1349-1352.
5. Brogdon, W. G., McAllister, J. C. & Vulule, J. (1997). Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13 (3), 233-237.
6. Calmasur, O., Aslan, I. & Sahin, F. (2006). Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Industrial Crop and Products*, 23, 140-146.
7. Cavalcanti, S. C. H., Niculau, E. D. S., Blank, A. F., Camara, C. A., Araujo, G. & Alves, P. B. (2010). Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Bioresource Technology*, 101, 829–832.
8. Choi, W., Lee, S., Park, H. & 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.
9. Collins, P. J., Rose, H. A. & Wegecsanyi, M. (1992). Enzyme activity in strains of the sawtoothed beetle (Coloptera: Cucujidae) differentially resistant to malathion, fenitrothon and chlorpyrifos-methyl. *Journal of Economic Entomology*, 85, 1571-1575.
10. 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.
11. 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.
12. Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974) Glutathion s- transferase, the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
13. Hiroi, T., Miyazaki, Y., Kobayashi, Y., Imaoka, S. & Funae, Y. (1995). Induction of hepatic P_{450} s in rat by essential wood and leaf oils. *Xenobiotica*, 25, 457-467.
14. Jeppson, L. R, Keifer, H. H. & Baker, E. W. (1975). *Mites injurious to economic plants*. University of Carolina Press, Berkeley. CA. 614 pp.
15. Kono, Y. & Tomita, T. (1992). Characteristics of highly active carboxylesterases in insecticide- resistant *Culex pipiens quinquefasciatus. Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 43(4), 297-305.
16. Koschier, E. H. & Sedy, K. A. (2003). Labiatae essential oils affecting host selection and acceptance of *Thrips tabaci* lindeman. *Crop Protection*, 22, 929-934.
17. Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N. & Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science*, 58, 1101-1106.
18. Lee, S. E., Choi, W. S., Lee, H. S. & 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 globulus* and its major monoterpene, 1,8-cineole. *Journal of Stored Products Research*, 36, 383-389.
19. LeOra Software. (1987). POLO-PC: A user guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, California.
20. Licht, H. J. & Coscia, C. J. (1978). Cytochrome P_{450}LM2 mediated hydroxylation of monoterpene alcohols. *Biochemistry*, 17, 5638-5646.
21. Makundi, R. H. & 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.
22. Mansour, F., Ravid, U. & 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.
23. Memarizadeh, N., Ghadamyaria, M., Sajedi, R. H. & Jalali Sendi, J. (2010). Characterization of esterases from abamectin-resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*. (submitted).
24. Miresmailli, S. (2005). *Assessing the efficacy and resistance of rosmary oil-baced miticide/ insecticide for use on greenhouse tomato*. Ph. D. dissertation. University of British Columbia. 385pp.
25. Momen, F. M. & 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.
26. Papachristos, D. P. & Stamopoulos, D. C. (2002). Selection of *Acanthoscelides obtectus* (Say) for resistance to lavender essential oil vapour. *Journal of Stored Products Research*, 39, 433-441.
27. Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J. & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68, 790-795.
28. Stark, J. D. & Banks, J. E. (2003). Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology*, 48, 505-519.
29. Southwell, I. A., Maddox, C. D. A. & Zalucki, M. P. (1995). Metabolism of 1,8-cineole in tea tree (*Melaleuca alternifolia* and *M. linarifolia*) by pyrgo beetle (*Paropsisterna tigrina*). *Journal of Chemical Ecology*, 17, 499–504.
30. Tunc, I., Berger, B. M., Erler, F. & Dagli, F. (2000). Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 36, 161-168.
31. van Asperen, K. (1962). A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8, 401–416.
32. Yatagai, M. (1997). Miticidal activities of tree terpense. *Current Topics of Phytochemistry*, 1, 87-97.