دانشکده علوم کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

تاثیرحشره کشی ۴- هگزیل رسورسینول روی پروانه‌های سفید اشجار(*Hyphantria cunea*) و برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis*) و بازدارندگی آن روی فعالیت فنل‌اکسیداز

از:

محبوبه شریفی

استاد راهنما:

دکتر محمد قدمیاری

شهریور ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

(گرایش حشره شناسی)

عنوان:

تاثیرحشره کشی ۴- هگزیل رسورسینول روی پروانه‌های سفید اشجار(*Hyphantria cunea*) و برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis*) و بازدارندگی آن روی فعالیت فنل‌اکسیداز

از:

محبوبه شریفی

استاد راهنما:

دکتر محمد قدمیاری

استادان مشاور :

دکتر رضا حسن ساجدی

دکتر آرش زیبایی

شهریور ۱۳۹۱

تقدیم به دو وجود مقدس زندگی ام

پدر و مادرم

به پاس همه رنج ها، محبت ها، مهربانی ها و بزرگواری هایشان

خدای را سپاس بیکران که نه فقط به اندازه توانستن که به قدر دانستن مسئولیت داد. با سپاس از لطف بی پایان الهی که انگیزه آموختن، توفیق یادگیری و فرصت آزمودن را عطا فرمود و هدایتگر درون را شوق نگاشتن هدیه نمود.

سپاس و ستایش پدر و مادر بزرگوارم آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند، سختی ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم و همچنین از برادران عزیزم که همواره در دوران تحصیل از دلسوزی ها و محبت های بی دریغ و بی منتشان بهره مند گشتم سپاسگذارم.

از استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر محمد قدمیاری که اگر وجود ایشان نبود بی شک دفاع از این پایان نامه ممکن نبود. ایشان نه تنها استاد علمی من، بلکه استاد اخلاق من نیز بودند به واسطه زحمت هایی که برایم متحمل شدند از ایشان تشکر و قدردانی میکنم.

از استاد مشاور گرامی جناب آقای دکتر آرش زیبایی و دکتر رضا حسن ساجدی به خاطر حمایت ها و راهنمایی های علمی شان کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر جلال جلالی و جناب آقای دکتر محسن اصغری که زحمت داوری و باز خوانی این پایان نامه را متقبل شدند صمیمانه سپاسگذارم.

بر خود لازم می دانم از زحمات اساتید محترم گروه گیاهپزشکی جناب آقای دکتر احد صحرا گرد، دکتر جلیل حاجی زاده و دکتر رضا حسینی که افتخار شاگردیشان را داشتم قدر دانی کنم. از کارکنان محترم گروه گیاه پزشکی، آقایان مهندس سلیمی، مهندس رفعتی، مصطفی خاتمی و کریم خشنود تشکر م.

از تمام دوستان خوبم در گروه گیاه پزشکی که همواره حامی و پشتیبان اینجانب بوده اند صمیمانه سپاسگزارم.

در پایان آرزوی طول عمر همراه با عزت، سعادت و سلامت برای همه این عزیزان از خداوند بزرگ مسئلت دارم.

محبوبه شریفی

تابستان ۱۳۹۱

چکیده فارسی .....
چکیده انگلیسی .....
مقدمه ۲

فصل اول: کلیات و مرور منابع
۱-۱پروانه سفید اشجار *Hyphantria cunea* Drury ۶
۱-۱-۱ روش‌های کنترل پروانه سفید اشجار ۶
۱-۱-۲ اقدامات قرنطینه ۶
۱-۱-۳ کنترل مکانیکی ۷
۱-۱-۴ کنترل بیولوژیک ۸
۱-۱-۵ کنترل شیمیایی ۸
۱-۲ پروانه برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* Walker ۸
۱-۱-۲روش‌های کنترل پروانه برگ‌خوار توت ۹
۱-۳ فنل‌اکسیداز ۱۰
۱-۳-۱ خصوصیات بیوشیمیایی تیروزیناز ۱۲
۱-۳-۲ واکنش‌های تیروزیناز ۱۱
۱-۳-۲-۱منوفنل اکسیداز، منوفنولاز یا کرسولاز ۱۱
۱-۳-۲-۲ دی‌فنل‌اکسیدازی، دی‌فنولاز یا کتکولاز ۱۱
۱-۳-۲-۳ پلی‌فنل‌اکسیداز ۱۱
۱-۳-۲-۴ لاکاز ۱۲
۱-۳-۳ نقش تیروزیناز در حشرات ۱۳
۱-۳-۳-۱اسکلروتیزاسیون ۱۳
۱-۳-۳-۲ سیستم ایمنی ۱۶
۱-۳-۳ سوبسترای اختصاصی تیروزیناز ۱۷
۱-۳-۴ مهارکننده تیروزیناز ۱۸
۱-۳-۴-۱ کنترل سوبسترا ۱۸
۱-۳-۴-۲ کنترل تشکیل کوئینون ۱۸
۱-۳-۴-۳ عوامل احیا کننده بعنوان آنتی اکسیدانت ۱۸

۱-۳-۴-۴ اسیدی کننده‌ها.....۱۹
۱-۳-۴-۵ کنترل آنزیمی. ۱۹
۱-۳-۵ معرفی برخی از مهارکننده‌های تیروزینازی.....۲۰
۱-۳-۵-۱ آنالوگ‌های سوبسترا.....۲۰
۱-۳-۵-۲ آمین‌های آروماتیک ، O- دی آمین ها و O-آمینوفنول ها.....۲۰
۱-۳-۵-۳ خانواده سالسیلیک اسید.....۲۰
۱-۳-۵-۴ تری هیدروکسی فلاون‌ها.....۲۱
۱-۳-۵-۵ کوپفرون.....۲۱
۱-۳-۵-۶ مجموعه‌های جدید bipiperidine. ۲۱
۱-۳-۵-۷ مزدوج‌های کوجیک اسید - آمینواسید به عنوان مهارکننده تیروریناز. ۲۲

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ جمع‌آوری حشرات ۲۴
۲-۲ نحوتهیه همولنف ۲۴
۲-۳زیست سنجی ۲۵
۲-۴تهیه سوبسترا.....۲۵
۲-۴-۱ تهیه محلول سوبسترا برای سنجش فعالیت آنزیم مونوفنل‌اکسیدازی ۲۵
۲-۴-۲ تهیه محلول سوبسترا برای سنجش فعالیت آنزیم دی‌فنل‌اکسیدازی..... ۲۶
۲-۴-۳ تهیه محلول سوبسترا برای سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز ۲۶
۲-۵ سنجش فعالیت آنزیم مونوفنل‌اکسیدازی..... ۲۶
۲-۶ سنجش فعالیت آنزیم دی‌فنل‌اکسیدازی.....۲۷
۲-۷ سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز.....۲۷
۲-۸ خالص‌سازی آنزیم فنل‌اکسیداز.....۲۷
۲-۸-۱ تعیین PH بهینه برای فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز.....۲۹
۲-۸-۲ تعیین دمای بیهینه برای فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز ۲۹
۲-۸-۳ بررسی میزان پایداری دمایی آنزیم.....۲۹
۲-۸-۴ تعیین I_{50}.....۳۰
۲-۸-۵ بررسی مکانیسم بازدارندگی.....۳۰

۲-۸-۶ آنالیز سینیتیکی ۳۰
۲-۸-۷بررسی اثر یون‌ها روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز..... ۳۰
۲-۸-۸ تعیین غلظت پروتئین ۳۱
۲-۸-۹ الکتروفورز SDS-PAGE و زایموگرام تیروزیناز..... ۳۲
۲-۸-۹-۱ روش انجام الکتروفورز SDS-PAGE و زایموگرام تیروزیناز ۳۴
۲-۸-۱۰تجزیه و تحلیل آماری نتایج..... ۳۶

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱زیست سنجی ۳۹
۳-۱-۱ تعیین سمیت گواراشی پروانه برگ‌خوار توت..... ۳۹
۳-۱-۲ تعیین سمیت گواراشی پروانه سفید اشجار ۴۱
۳-۲ اثرات ۴-هگزیل رسورسینول روی فعالیت آنزیم های فنل‌اکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز در شرایط زنده ۴۵
۳-۲-۱ پروانه برگ‌خوار توت ۴۵
۳-۲-۲ پروانه سفید اشجار ۴۷
۳-۳ بررسی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیدازی لاکاز ۵۴
۳-۴ خالص سازی آنزیم فنل‌اکسیدازی ۵۵
۳-۴-۱ بررسی اثرات pH روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز ۶۲
۳-۴-۱-۱ پروانه برگ‌خوار توت ۶۲
۳-۴-۱-۲ پروانه سفید اشجار..... ۶۳
۳-۴-۲ بررسی اثرات دما و پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیدازی ۶۵
۳-۴-۲-۱ پروانه برگ‌خوار توت ۶۵
۳-۴-۲-۲ پروانه سفید اشجار..... ۶۶
۳-۴-۳ بررسی اثرات یون‌ها روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیدازی..... ۶۹
۳-۴-۳-۱ پروانه برگ‌خوار توت ۶۹
۳-۴-۳-۲ پروانه سفید اشجار..... ۷۰

۳-۴-۴ بررسی اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیدازی..... ۷۲
۳-۴-۴-۱ پروانه برگ‌خوار توت ۷۲
۳-۴-۴-۲ پروانه سفید اشجار..... ۳۷
۳-۴-۵ بررسی مکانیسم اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیدازی..... ۷۵
۳-۴-۵-۱ پروانه برگ‌خوار توت ۷۵
۳-۴-۵-۲ پروانه سفید اشجار..... ۷۷
۳-۸ نتیجه گیری کلی..... ۷۹
۳-۹ پیشنهادات ۸۱
منابع ۸۳

شکل۱- ۱)ترتیب واکنش‌های مربوط به سختت شدن کوتیکول.....۱۳
شکل ۱-۲)تفاوت بین بتااسکلروتیزاسیون و آلفااسکلروتیزاسیون در مراحل سخت شدن کوتیکول ۱۴
شکل۱-۳)مراحل تشکیل ملانین ۱۵
شکل ۳-۱)خط رگرسیون پاسخ ۴-هگزیل رسورسینول روی لاروسن آخر پروانه برگ‌خوار توت ۹۶ ساعت پس از تیمار ۳۹
شکل ۳-۲) خط رگرسیون پاسخ ۴-هگزیل رسورسینول روی لارو شش روزه پروانه سفید اشجار ۹۶ ساعت پس از تیمار.....۴۱
شکل ۳-۳) خط رگرسیون پاسخ ۴-هگزیل رسورسینول روی لارو دوازه روزه پروانه سفید اشجار ۹۶ ساعت پس از تیمار.....۴۲
شکل ۳-۴) خط رگرسیون پاسخ ۴-هگزیل رسورسینول روی لاروپانزده روزه پروانه سفید اشجار ۹۶ ساعت پس از تیمار.....۴۳
شکل ۳-۵)فعالیت نسبی آنزیم فنل‌اکسیداز در لارو سن آخر پروانه برگ‌خوار توت تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۴۵
شکل ۳-۶) اثرات ۴-هگزیل رسورسینول روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروسن آخر پروانه برگ‌خوار توت ۴۷
شکل ۳-۷)فعالیت نسبی آنزیم فنل‌اکسیداز در لارو های شش روزه پروانه سفید اشجار تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۴۸
شکل ۳-۸)فعالیت نسبی آنزیم فنل‌اکسیداز در لارو های دوازده روزه پروانه سفید اشجار تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ...۴۸
شکل ۳-۹)فعالیت نسبی آنزیم فنل‌اکسیداز در لارو های پانزده روزه پروانه سفید اشجار تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۵۰
شکل ۳-۱۰)فعالیت نسبی آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در لارو های شش روزه پروانه سفید اشجار تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۵۰
شکل ۳-۱۱)فعالیت نسبی آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در لارو های دوازده روزه پروانه سفید اشجار تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۵۱
شکل ۳-۱۲)فعالیت نسبی آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در لارو های پانزده روزه پروانه سفید اشجار تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۵۱
شکل ۳-۱۳) بررسی فعالیت فنلاکسیدازی لاکاز با استفاده از پیش ماده پیروکتکول در لاروهای پانزده روزه پروانه سفید اشجار ۹۶ ساعت بعد از تیمار ۵۳
شکل ۳-۱٤) بررسی فعالیت فنلاکسیدازی لاکاز با استفاده از پیش ماده پیرو گالول در لاروهای پانزده روزه پروانه سفید اشجار ۹۶ ساعت بعد از تیمار ۵۳
شکل ۳-۱۵) SDS-PAGE مربوط به پروانه سفید اشجار.....۵۷
شکل۳-۱٦) زایموگرام فنلاکسیداز مربوط به پروانه سفید اشجار ۵۷
شکل ۳-۱۷) SDS-PAGE مربوط به پروانه برگخوار توت.....۵۸
شکل۳-۱۸) زایموگرام فنلاکسیداز مربوط به پروانه برگخوار توت ۵۸
شکل ۳-۱۹)رابطه بین Rf و لگاریتم وزن مولکولی برای پروانه سفید اشجار ۵۹
شکل ۳-۲۰) رابطه بین Rf و لگاریتم وزن مولکولی برای پروانه برگخوار توت.....۵۹
شکل ۳-۲۱) میزان جذب فرکشنهای مربوط به ژل فیلتراسیون فنلاکسیداز همولنف لارو سن آخر پروانه سفید اشجار ۶۰

شکل ۳-۲۲) میزان جذب فرکشنهای مربوط به ژل تبادل یونی فنلاکسیداز همولنف لارو سن آخر پروانه سفید اشجار.....۶۱
شکل ۳-۲۳) میزان جذب فرکشنهای مربوط به ژل فیلتراسیون فنلاکسیداز همولنف لارو سن آخر پروانه برگ خوار توت... ۶۱
شکل ۳-۲۴) میزان جذب فرکشنهای مربوط به ستون تبادل یونی فنلاکسیداز همولنف لارو سن آخر پروانه برگ خوار توت ۶۲
شکل ۳-۲۵) بررسی اثرات pH روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از لاروهای سن آخر پروانه برگخوار توت.....۶۲
شکل ۳-۲۶) بررسی اثرات pH روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف لاروهای سن آخر پروانه سفید اشجار.۶۳
شکل ۳-۲۷) بررسی اثرات دمایی روی فعالیت آنزیم خالص شده فنلاکسیداز پروانه برگخوار توت.....۶۵
شکل ۳-۲۸) بررسی مدت زمان پایداری دمایی آنزیم فنلاکسیداز از همولنف خالص شده پروانه برگخوار توت..... ۶۶
شکل ۳-۲۹) بررسی اثرات دمایی روی فعالیت آنزیم خالص شده فنلاکسیداز پروانه سفید اشجار.....۶۶
شکل ۳-۳۰) بررسی مدت زمان پایداریی دمایی آنزیم خالص شده فنلاکسیداز از همولنف پروانه ابریشم باف پاییزی.....۶۸

جدول ۲-۱-مقدار یون‌های مورد نیاز برای تهیه ۱۰میلی لیتر محلول ۱۰۰ میل‌مولار..... ۳۱
جدول ۲-۲ نحو آماده سازی محلول‌های استاندارد و نمونه برای تعیین غلظت پروتذین به روش برادفورد ۳۲
جدول ۳-۱-فعالیت حشره‌کشی ۴-هگزیل رسورسینول روی لارو سن آخر پروانه برگ‌خوار توت در زمان‌های مختلف پس از تیمار ۳۹
جدول ۳-۲- فعالیت حشره‌کشی ۴-هگزیل رسورسینول روی لارو شش روزه پروانه سفید اشجار در زمان‌های مختلف پس از تیمار..... ۴۱
جدول ۳-۳- فعالیت حشره‌کشی ۴-هگزیل رسورسینول روی لارو شش روزه پروانه سفید اشجار در زمان‌های مختلف پس از تیمار..... ۴۲
جدول ۳-۴- فعالیت حشره‌کشی ۴-هگزیل رسورسینول روی لارو پانزده روزه پروانه سفید اشجار در زمان‌های مختلف پس از تیمار..... ۴۳
جدول ۳-۵-برآورد میزان $I_{۵۰}$ برای ۴-هگزیل رسورسینول (گرم برلیتر) روی فنل‌اکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای تیمار شده *G. pyloalis* تحت شرایط زنده ۴۶
جدول ۳-۶-برآورد میزان $I_{۵۰}$ برای ۴-هگزیل رسورسینول (گرم برلیتر) روی فنل‌اکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای شش روزه تیمار شده *H. conea* تحت شرایط زنده ۵۱
جدول ۳-۷-برآورد میزان $I_{۵۰}$ برای ۴-هگزیل رسورسینول (گرم برلیتر) روی فنل‌اکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای دوازده روزه تیمار شده *H. conea* تحت شرایط زنده ۵۲
جدول ۳-۸-برآورد میزان $I_{۵۰}$ برای ۴-هگزیل رسورسینول (گرم برلیتر) روی فنل‌اکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای پانزده روزه تیمار شده *H. conea* تحت شرایط زنده ۵۳
جدول ۳-۹-اثر ترکیبات شیمیایی روی فعالیت فنل‌اکسیداز خالص شده از همولنف پروانه برگ‌خوار توت ۵۹
جدول ۳-۱۰-اثر ترکیبات شیمیایی روی فعالیت فنل‌اکسیداز خالص شده از همولنف پروانه سفید اشجار ۷۰
جدول ۳-۱۱-بازدارندگی کوئرسین هیدرات، کوجیک اسید و ۴هگزیل رسورسینول روی فعالیت فنل‌اکسیداز خالص شده پروانه برگ‌خوار توت ۷۲
جدول ۳-۱۲-بازدارندگی کوئرسین هیدرات، کوجیک اسید و ۴هگزیل رسورسینول روی فعالیت فنل‌اکسیداز خالص شده پروانه سفید اشجار ۷۳
جدول ۳-۱۳- بررسی نحو مکانسیم بازدارندگی کوئرسین هیدرات، کوجیک اسید و ۴هگزیل رسورسینول روی فعالیت فنل‌اکسیداز خالص شده پروانه سفید اشجار ۷۶
جدول ۳-۱۴- بررسی نحو مکانسیم بازدارندگی کوئرسین هیدرات، کوجیک اسید و ۴هگزیل رسورسینول روی فعالیت فنل‌اکسیداز خالص شده پروانه برگ‌خوار توت ۷۷

جدول ضمیمه۱) لیست مواد مورد استفاده ۳۹

جدول ضمیمه ۲) لیست دستگاههای مورد استفاده ۴۹

جدول ضمیمه ۳)گروه‌بندی دانکن میانگین درصد مهار کنندگی آنزیم فنلاکسیداز لاروهای پروانه برگخوار توت ۹۵

جدول ضمیمه ۴)گروه‌بندی دانکن میانگین درصد مهار کنندگی آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز لاروهای دوازده روزه پروانه سفید اشجار ۹۵

جدول ضمیمه ۵) گروه‌بندی دانکن میانگین درصد مهار کنندگی آنزیم فنلاکسیداز لاروهای دوازده روزه پروانه سفید اشجار ۹۵

جدول ضمیمه ۶) تجزیه واریانس میزان فعالیت وِیژه فنلاکسیدازی لاکازبا استفاده ازپیش ماده پیروکتکول روی لاروهای پانزده روزه تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۹۶

جدول ضمیمه۷) تجزیه واریانس میزان فعالیت وِیژه فنلاکسیدازی لاکاز با استفاده از پیش ماده پیروگالول روی لاروهای پانزده روزه تیمار شده با ۴-هگزیل رسورسینول ۹۶

جدول ضمیمه ۸) تجزیه واریانس بررسی تغییرات PH روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز از همولنف پروانه سفید اشجار ۹۷

جدول ضمیمه ۹) تجزیه واریانس بررسی تغییرات PH روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه برگخوار توت.....۹۷

جدول ضمیمه ۱۰) تجزیه واریانس بررسی تغییرات دما روی فعالیت آنزیم فنلاکسیدازخالص شده از همولنف پروانه برگخوار توت.....۹۷

جدول ضمیمه ۱۱) تجزیه واریانس بررسی تغییرات دما روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از پروانه سفید اشجار ...۹۸

جدول ضمیمه ۱۲) تجزیه واریانس اثرات یونها روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه برگخوار توت ...۹۸

جدول ضمیمه ۱۳) تجزیه واریانس اثرات یونها روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه سفید اشجار ۹۸

جدول ضمیمه ۱۴) تجزیه واریانس بررسی پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه سفید اشجار (دمای ۳۵ درجه سانتیگراد).....۹۹

جدول ضمیمه ۱۵) تجزیه واریانس بررسی پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه سفید اشجار (دمای ۳۰ درجه سانتیگراد).....۹۹

جدول ضمیمه ۱۶) تجزیه واریانس بررسی پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه سفید اشجار (دمای ۴۰ درجه سانتیگراد).....۹۹

جدول ضمیمه۱۷) تجزیه واریانس بررسی پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه برگخوار توت (دمای ۴۵ درجه سانتیگراد) ۱۰۰

جدول ضمیمه۱۸) تجزیه واریانس بررسی پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه برگخوار توت (دمای ۴۰ درجه سانتیگراد) ۱۰۰

جدول ضمیمه۱۹) تجزیه واریانس بررسی پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم فنلاکسیداز خالص شده از همولنف پروانه برگخوار توت (دمای ۵۰ درجه سانتیگراد) ۱۰۱

جدول ضمیمه ۲۰) تجزیه واریانس مربوط به فعالیت فنلاکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای سن آخر پروانه برگخوار توت ۱۰۱

جدول ضمیمه ۲۱)تجزیه واریانس مربوط به فعالیت فنلاکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای شش روزه پروانه سفید اشجار: ۱۰۲

جدول ضمیمه ۲۲) تجزیه واریانس مربوط به فعالیت فنلاکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای دوازده روزه پروانه سفید اشجار: ۱۰۲

جدول ضمیمه ۲۳) تجزیه واریانس مربوط به فعالیت فنلاکسیداز و گلوتاتیون اس ترانسفراز روی لاروهای پانزده روزه پروانه سفید اشجار:..... ۱۰۳

چکیده:

تاثیرحشره کشی ۴- هگزیل رسورسینول روی پروانه‌های سفید اشجار و برگ‌خوار توت و بازدارنـدگی آن روی فعالیت فنل‌اکسیداز

محبوبه شریفی

آنزیم فنل اکسیداز (EC ۱،۱٤،۱۸،۱) یکی از آنزیم‌های کلیدی در رشد و ایمنی حشرات می باشد. بنابراین مهار این آنزیم با اهمیت توسط مهارکننده‌هایش می‌تواند به عنوان روشی جدید برای کنترل آفات مورد استفاده قرار بگیرد. پروانه سفید اشجار (*Hyphantria cunea* Drury) یکی از آفات مهم درختان جنگلی، میوه و زینتی در استان گیلان می‌باشد. این آفت به‌دلیل داشتن نرخ باروری بالا قادر است در مدت زمان کوتاهی خسارت قابل توجهی به درختان وارد می‌کند. پروانه برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis* Walker) یکی از آفات مهم درختان توت در شمال ایران است که با تغذیه از برگ توت در پرورش کرم ابریشم اختلال ایجاد می‌کند. در این پژوهش اثر ترکیب ۴-هگزیل رسورسینول روی لاروهای سن آخر پروانه برگ‌خوار توت و لاروهای شش، دوازده و پانزده روزه پروانه سفید اشجار مورد بررسی قرار گرفت. سمیت این ترکیب تحت شرایط آزمایشگاهی روی دو آفت نشان داد که $LC_{۵۰}$ این ترکیب روی لاروهای سن آخر پروانه برگ‌خوار توت بعد از ۹۶ ساعت تیمار ۵/۰۳ گرم برلیتر بوده و برای لاروهای شش، دوازده و پانزده روزه پروانه سفید اشجار بعد از ۹۶ ساعت تیمار به ترتیب ۵/۰۴، ۲/۵۸ و ۲/۹۵ گرم برلیتر بدست آمد. همچنین اثر غلظت‌های مختلف ۴-هگزیل رسورسینول روی فعالیت آنزیمهای فنل-اکسیداز و گلوتاتیون اس-ترنسفراز در لاروهای تیمار شده دو آفت اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ترکیب در همه تیمارها میزان فعالیت کاهش پیدا می‌کند. در این تحقیق آنزیم‌های فنل‌اکسیداز از همولنف پروانه برگ‌خوار توت و سفید اشجار با استفاده از رسوب با سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی ژل و کروماتوگرافی تبادل یونی خالص شد و وزن ملکولی آنها با استفاده از SDS-PAGE برای پروانه برگ‌خوار توت و پروانه سفید اشجار به ترتیب برابر با ۶۹/۶۶ و ۶۹/۸۲ کیلو دالتون بدست آمد. غلظتی از کوئرسین، کوجیک اسید و ۴-هگزیل رسورسینول که می‌تواند فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز همولنف خالص شده را تا نصف کاهش دهد ($IC_{۵۰}$) برای هر دو آفت محاسبه شد و مقدار آن به ترتیب ۷/۳۹، ۲۵/۹۸ و ۴/۳۵ میکرو مولار برای *G. pyloalis* و ۲٤/۰٤، ۱۹/۱٤ و ۸/۲ برای *H. Cunea* بدست آمد. مهارکنندگی نسبی ۴-هگزیل رسورسینول ۵/۰۳ و ۱/۵ برابر بیشتر از کوجیک اسید و کوئرسین برای پروانه برگ‌خوار توت بوده و از طرفی مهارکنندگی نسبی ۴-هگزیل رسورسینول ۱/۸۷ و ۲/۸۹ برابر کوجیک اسید و کوئرسین برای فنل‌اکسیداز پروانه سفید اشجار می‌باشد و برای هر دو آفت مهار کنندگی ۴-هگزیل رسورسینول از نوع رقابتی و همچنین برای کوئرسین هیدرات و کوجیک اسید از نوع مختلط می‌باشد. بررسی ویژگی‌های آنزیمی نشان داد که اسیدیته مطلوب آنزیم فنل‌اکسیداز برای هر دو آفت ۷ می‌باشد و دمای بهینه فنل اکسیداز پروانه سفید اشجار و پروانه برگ‌خوار تو ت به ترتیب ۳۵ و ۴۵ درجه سلسیوس بدست آمد. پایداری دمایی هر دو آفت ۳۰ دقیقه بدست آمد. همچنین یون $Zn^{۲+}$ دارای اثرات کاهشی بسیار معنی داری روی فعالیت آنزیم خالص شده هر دو آفت می‌باشد

کلمات کلیدی: ۴-هگزیل رسورسینول، *Hyphantria cunea*، *Glyphodes pyloalis*، $IC_{۵۰}$، $LC_{۵۰}$، فنل‌اکسیداز

Abstract:

Insecticidal effects of 4- *hexylresorcinol on Hyphantria cunea* and *Glyphodes pyloalis* as well as its inhibitory on the phenoloxidase activity

Mahboobeh Sharifi

Insect phenoloxidase (PO) (EC 1.14.18.1) is the key enzyme in development and immunity of insects. So, it may provide a new target for pest control by inhibiting of this key enzyme. Fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury is an important pest of forest, fruit and ornamental trees in Guilan province. Due to high reproduction potential, this pest cause considerable damage on trees in a short time. The lesser mulberry snout moth, *Glyphodes pyloalis* Walker is an important pest of mulberry trees in north of Iran. This pest feeds on mulberry leaves; it causes serious problems for the silk industries. The toxicity effect of 4- hexylresorcinol was assessed against *H. cunea* and *G. pyloalis* in a bioassay under laboratory conditions. The 50% lethal dose (LC_{50}) of this compound was estimated 5.03 g/liter for 5^{th} instar larvae of *G. pyloalis* after 96h exposure and LC_{50} for 6-, 12- and 15- day old larvae of *H. cunea* were determined as 5.04, 2.58 and 2.95 g/liter 96h after treatment, respectively. Also, the effect of 4-hexylresorcinol concentrations on glutathione S- transferase and PO activities were measured in treated larvae and results showed increasing the concentration of the 4- hexylresorcinol decreases the activity of both enzymes in two pests. In this study PO from haemolymph of *G. pyloalis* and *H. cunea* were purified by ammonium sulphate precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration. The apparent molecular mass of the PO determined by SDS-PAGE as 69.66 and 69.82 kDa for *G. pyloalis* and *H. cunea*, respectively. The IC_{50} of quercetin, kojic acid and 4- hexylresorcinol on purified *G. pyloalis* PO were 7.39, 25.98, and 4.35 µM, respectively. Also, The IC_{50} of quercetin, kojic acid and 4- hexylresorcinol on *H. cunea* PO determined as 24.04, 19.14, and 8.2 µM, respectively. The inhibitory potency of 4-hexylresorcinol on *G. pyloalis* PO was 5.03- and 1.5- fold higher than that of kojic acid and quercetin, respectively. Also, the inhibitory potency of 4- hexylresorcinol on *H. cunea* PO estimated 1.87- and 2.89- fold higher than that of kojic acid and quercetin, respectively. The inhibitory kinetics of PO by 4-hexylresorcinol was found to be a competitive inhibitor in both pests. Also, inhibition kinetics of PO by kojic acid and quercetin were mixed. Optimal pH on PO purified form *G. pyloalis* and *H. cunea* was 7 and maximum temperature for *G. pyloalis* and *H. cunea* PO corresponded to 45 and 35°C, respectively. Thermal stability of PO purified from *G. pyloalis* and *H. cunea* were 30 min. Also, Zn^{2+} had a significant inhibitory effect on PO activity in both pests.

Key words: 4- hexylresorcinol, *Hyphantria cunea*, *Glyphodes pyloalis*, IC_{50}, LC_{50}, Phenoloxidase

مقدمه

آنزیم فنل‌اکسیداز حشرات در سه فرآیند فیزیولوژیک نقش دارد که شامل اسکلریته کردن کوتیکول، تشکیل کپسول‌های دفاعی و بهبود زخم‌ها می‌باشد[Ashida and Brey, 1995]. تولید o-quinone به وسیله فنل‌اکسیداز به‌عنوان مرحله آغازی در کمپلکس بیوشیمیایی بتا-اسکلروتیزیشن شناخته می‌شود. بیوسنتز کونیون و ملانین فرآیند-هایی هستند که چندین نقش مهم در رشد و سیستم ایمنی حشرات ایفا می‌کنند و این امکان وجود دارد که بازدارنده‌های سنتز فنل‌اکسیداز بتوانند منجر به بهم ریختگی در مکانیسم‌های دفاعی یا نرم شدن بیش از حد کوتیکول حشرات شوند که هر دو عملکرد می‌توانند به عنوان عاملی برای کنترل حشرات مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین مهارکننده‌های فنل‌اکسیداز می‌توانند جایگزین مناسب و سالم در مقابل خطرات زیست محیطی حشره‌کش‌ها باشند [Xue et al., 2006]. مولکول‌های فنل‌اکسیدازحشرات در همولنف به وسیله سلول های خونی در حال گردش بوده یا به صورت غیر فعال (پروفنل‌اکسیداز) در بافت‌ها یافت می شود. طی یکسری واکنش‌های پیچیده آنزیمی، پروفنل‌اکسیداز تبدیل به فرم فعال فنل‌اکسیداز می‌شود [Ashida and Yamazaki, 1990]. دو یا چند فرم از فنل-اکسیداز در حشرات توصیف شده است. این احتمال وجود دارد که یکی از آن‌ها در کوتیکول بوده و به طور اختصاصی در سخت شدن کوتیکول جدید نقش داشته در حالی که فرم دیگر آنزیم در سلول های خونی در حال گردش در همولنف موجود می‌باشد و در بهبود زخم‌ها نقش داشته باشند [Ashida and Brey, 1995].

فنل‌اکسیداز در برخی از حشرات ازقبیل کرم جوانه خوار تنباکو، مگس خانگی (*Musca domestica*)، مگس سرکه (*Drosophilamelanogaster*)، *Aedes aegypti*، سفیده کلم (*Pieris rapae*)، شب پره هندی (*Plodia interpunctella*)، *Sarcophaga bullata* وسن گندم (*Eurygaster integriceps*) مورد بررسی قرار گرفته اند [Yamaura et al., 1980 ، ;Ourth, 1988Fujimoto et al., 1993Burks andFuchs, 1995 ؛ Chase et al., 2000 ، Wang et al., 2004 ؛ ، Hartzer et al 2005 ؛ Xue et al., 2006؛ Zibaee et al.,2011.،]. در حشرات پلی‌فنل‌اکسیدازی که از کوتیکول جدا شده فقط فعالیت دی‌فنل‌اکسیدازی دارد در حالی‌که پلی‌فنل‌اکسیدازی که از همولنف جدا شده فعالیت منوفنل‌اکسیدازی را نشان می‌دهد. پلی‌فنل-اکسیدازی که در کوتیکول میگو حضور دارد، هر دو فعالیت را نشان می‌دهد [Sherman et al., 1995]. اکثر مهارکننده‌های تیروزینازی شناخته شده حاوی ساختار فنلی بوده یا این‌که دارای یک جزء جدا کننده فلزی می‌باشند [Chen et al., 2004.].

پروانه سفید اشجار (*Hyphantria cunea* Drury)یکی از آفات مهم درختان جنگلی، میوه و زینتی در استان گیلان می‌باشد. این آفت به‌دلیل داشتن نرخ باروری بالا قادر است در مدت زمان کوتاهی خسارت غیر قابل تحملی به درختان وارد

کند. نحوه خسارت آفت به شکلی است که علاوه بر خسارت مستقیم به‌صورت تغذیه از برگ‌ها با تشکیل شبکه توری، اندام‌های مختلف گیاه را به‌هم چسبانده وباعث بدشکلی درختان شده و از زیبایی محیط می‌کاهد[Oliver, 1964]. پروانه برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis* Walker)یکی از آفات مهم درختان توت در شمال ایران است که با تغذیه از برگ توت در پرورش کرم ابریشم اختلال ایجاد می‌کند. زمانی که برگ‌های آلوده به فضولات این آفت مورد تغذیه کرم ابریشم قرار می‌گیرد، باعث ایجاد بیماری یبوست در آن‌ها می شود. همچنین این آفت به عنوان میزبان ثانویه ویروس‌های پاتوژن عمل کرده و باعث انتقال بیماری به کرم ابریشم می‌شوند [Watanabe et al., 1988]. با گسترش فعالیت پروانه ابریشم-باف پاییزی در شمال کشور و نقش زیان‌آور آن روی درختان جنگلی، باغ‌های میوه و حتی برخی گیاهان زراعی و طغیان احتمالی آن و احتمال گسترش به استان‌های مجاور، برنامه‌ریزی برای مدیریت و کنترل این آفت لازم به‌نظر می‌رسد. تا-کنون روش‌های مختلف برای مدیریت این آفت بکار گرفته شده است که از آن جمله می توان به روش‌های مکانیکی (جمع آوری توده تخم و نابودی لانه‌های لاروی) و کنترل شیمیایی با استفاده از آفت‌کش‌هایی نظیر دیفلوبنزوران، سایپرمترین، فن‌والریت و پرمترین اشاره کرد [Sikura et al.,1988; Giovanni et al., 1986]. همچنین استفاده از حشره‌کش ها برای کنترل پروانه برگ‌خوار توت به دلیل استفاده از برگ‌های توت برای تغذیه کرم ابریشم، با مشکلاتی همراه است. باتوجه به مساله باقیمانده آفت‌کش ها در محیط زیست، وارد شدن آنها به چرخه غذایی، مقاومت آفات به آفت‌کش‌ها و سمیت آنها روی انسان، امروزه روش‌های ایمن در مدیریت تلفیقی آفات مد نظر می‌باشد. یکی از این روش‌ها، استفاده از مواد شیمیایی انتخابی می باشد که روی حشرات اثر گذاشته، منتهی روی انسان به عنوان موجود غیر هدف سمیت کمی داشته باشد.

یکی از آنزیم‌های فعال در ملانیزاسیون و موثر در سیستم دفاعی حشرات فنل‌اکسیداز می‌باشد. بازدارنده‌های فنل-اکسیدازی از ترکیبات مهمی می‌باشند که در صنایع و تولید دارو و مواد آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و ایمن برای انسان و محیط زیست می‌باشند. به همین سبب امروزه تعداد زیادی از پژوهش‌های مربوط به آنزیم فنل‌اکسیداز روی کشف و بررسی عملکرد بازدارنده‌های این آنزیم تمرکز کرده‌اند. از آنجایی که تیروزیناز در برخی از حشرات مثل کرم شاخدار توتون به عنوان یک حشره مدل، مشابه تیروزیناز قارچی می‌باشد پس به احتمال زیاد بازدارنده‌های تیروزیناز قارچی توانایی مهار تیروزیناز حشرات را نیز دارا می‌باشند. تاکنون تحقیقات کمی روی بازدارنده‌های فنل‌اکسیدازی حشرات صورت گرفته است و بیشتر بازدارنده‌های مورد استفاده مهارکننده‌های تیروزیناز قارچی می‌باشند. به طور مثال ترکیباتی مانند بنزآلدهید،P-هیدروکسی بنزآلدهید، P-کلروبنزآلدهید و P-سیانوبنزآلدهید روی پروانه سفید کلم مورد آزمایش قرار گرفت و مکانسیم بازدارندگی آنها نیز بررسی شد به علاوه حدود ۵۷ ترکیب متعلق به خانواده های بنزوئیک اسید و تیوسمیکاربازون و بنزآلدهید روی پروانه سفیده کلم مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصل از مهارکنندگی آنها به حدی

بوده است که بتوان از این ترکیبات جهت ساخت حشره‌کش‌های بیولوژیک استفاده کرد تایک ترکیب کارآمدتر داشته که میزان مصرف حشره‌کش را کاهش داده و میزان خسارت به محیط زیست را نیز کمتر کنند. امروزه مشخص شده است که ۴- هگزیل رسورسینول و لوتئولون بازدارنده فنل‌اکسیداز پروانه سفیده کلم است [Wang et al., 2010; Xue et al., 2006] به همین دلیل دراین تحقیق پتانسیل حشره‌کشی ۴-هگزیل رسورسینول به عنوان بازدارنده تیروزیناز قارچی، روی دو آفت پروانه برگ‌خوار توت و سفید اشجار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پتانسیل بازدارندگی کوئرسین، کوجیک اسید و ۴-هگزیل رسورسینول روی فنل‌اکسیداز این آفات بررسی شد. در این تحقیق اهداف زیر دنبال شد:

۱- اندازه گیری میزان سمیت ۴- هگزیل رسورسینول روی لاروهای پروانه سفید اشجار و برگ‌خوار توت

۲- خالص سازی نسبی و تعیین برخی خصوصیات بیوشیمیایی فنل اکسیداز پروانه برگ‌خوار توت و سفید اشجار

۳- اندازه گیری I_{50} ترکیبات بازدارنده فنل اکسیداز روی پروانه برگ‌خوار توت و پروانه سفید اشجار و تعیین مکانیسم بازدارندگی

۴- بررسی اثرات زیرکشندگی ۴- هگزیل رسورسینول روی فعالیت فنل اکسیدازی و گلوتاتیون اس ترنسفراز