JESI
DOI: 10.22117/JESI.2019.124012.1274

نامه انجمن حشره‌شناسی ایران ۷۹-٦٧ ,(۱)۳۹ ,۱۳۹۸
JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2019, 39 (1), 67-79

اثر عصاره متانولی *Rosmarinus officinalis* بر نوروپپتید فعال‌کننده قلب سخت‌پوستان، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های تغذیه‌ای کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

وحید محمدی گیسور، اعظم میکانی* و سعید محرمی‌پور

گروه حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.mikani@modares.ac.ir

چکیده

اثر عصاره متانولی برگ *Rosmarinus officinalis* روی لارو سن سوم کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Hübner) مورد مطالعه قرار گرفت. LC_{50} و LC_{20} آن به ترتیب برابر ۱۲۳٤۷و ۵۱۳۸ پی پی ام تخمین زده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره رزماری (با غلظت ppm ۵۱۳۸) به ۰/۹ گرم غذای مصنوعی اضافه شد. پس از ۷۲ ساعت، کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI) ، کارایی تبدیل غذای هضم شده (ECD) ، نرخ مصرف نسبی (RCR) و نرخ رشد نسبی (RGR) کاهش یافت ولی میزان شاخص تقریبی هضم شوندگی غذا (AD) اضافه شد. علاوه بر این میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پروتئاز و لیپاز نیز در لارو سن سوم *H. armigera* کاهش نشان داد. قرار دادن معده میانی در بافر محتوی نوروپپتید فعال کننده قلب سخت پوستان (CCAP) میزان فعالیت آنزیم لیپاز را افزایش داد. تغذیه از غذای مصنوعی حاوی عصاره رزماری میزان نوروپپتید فعال کننده قلب سخت پوستان را در مغز، همولنف و معده میانی کاهش داد. نتایج نشان داد، تغذیه از ماده غذایی حاوی عصاره رزماری، مانع آزاد سازی CCAP در معده میانی و مغز می‌شود که این موضوع به نوبه خود منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز، پروتئاز و لیپاز شد.

واژه‌های کلیدی: کرم غوزه پنبه، رزماری، نوروپپتید فعال‌کننده قلب سخت‌پوستان، آنزیم‌های گوارشی

Effect of *Rosmarinus officinalis*, leaf methanolic extract on crustacean cardioactive peptide, digestive enzyme activities and nutritional indices of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

Vahid Mohammadi Gisour, Azam Mikani* & Saeid Moharramipour

Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
* Corresponding author, E-mail: a.mikani@modares.ac.ir

Abstract

Efficacy of methanolic leaf extract of *Rosmarinus officinalis* on third instar larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) was studied. The value of LC_{50} and LC_{20} were 5138 and 12347 ppm, respectively. One hundred microliters of the Rosemary's mehanolic extract at 5138 ppm was added to 0.9 gr artificial diet. Efficiency of digested food (ECD), efficiency of conversion of ingested food (ECI), relative consumption rate (RCR) and relative growth rate (RGR) were decreased after 72 h but approximate digestibility (AD) was increased. It also decreased α-amylase, protease and lipase activity in the midgut of third instar larvae of *H. armigera*. Incubation of dissected midgut with crustacean cardioactive peptide (CCAP) increased lipase activity. Feeding on artificial diet containing plant extract caused decreasing in CCAP level in the brain, hemolymph and midgut of the insect. The results showed feeding

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۳، پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲٦
دبیر تخصصی: میر جلیل حجازی

on diet containing rosemary's extract inhibits release of CCAP in the midgut and brain that itself leads to reduction of α-amylase, lipase and protease activities.
Key words: *Helicoverpa armigera, Rosmarinus officinalis,* Crustacean cardioactive peptide, Digestive enzymes
Received: 4 November 2018, *Accepted:* 15 April 2019

مقدمه

کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)، یکی از آفات جدی و مخرب محصولات مختلف کشاورزی در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد. این آفت روی طیف وسیعی از گیاهان شامل محصولات زراعی و گیاهان وحشی خسارت‌زا است (Garcia, 2006). در سال‌های اخیر استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی مختلف برای کنترل آفات اثرات منفی زیادی از جمله افزایش مقاومت آفات و ایجاد خطر برای موجودات زنده غیرهدف را موجب شده است. با توجه به اثرات منفی آفت‌کش‌های شیمیایی، استفاده از ترکیبات گیاهی برای کنترل آفات ضروری به نظر می‌رسد (Shojaei *et al*., 2017). بکارگیری آفت‌کش‌های گیاهی به دلیل کم خطر بودن برای محیط زیست، یکی از روش‌های مناسب برای کاهش مصرف بالای سموم شیمیایی می‌باشد (Dayan *et al*., 2009).

عصاره بذر *Caesalpinia crista* (Linnaeus) دارای اثر ضد تغذیه و اختلال در رشد علیه *H. armigera* بود. علائم لاروهای آلوده به سم مواردی از جمله کاهش در اضافه شدن طبیعی وزن لاروها، تلفات لاروها و شفیره ها و بدشکلی حشرات کامل بود. همچنین بیشترین اثر ضد تغذیه‌ای مربوط به عصاره متانولی این بذر بود (Nathala & Dhingra., 2006). در مطالعه دیگری نشان داده شده بود که عصاره اتیل‌استات *Solanum pseudocapsicum* (Linnaeus) دارای خواص بالای ضد تغذیه‌ای و ممانعت از رشد علیه لاروهای کرم برگخوار پنبه *Spodoptera littoralis* (Boisduval) و *H. armigera* است (Jeyasankar *et al*., 2012).

گیاه رزماری *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiales: Lamiaceae) یک گیاه همیشه سبز و دارویی است که به طور گسترده‌ای از آن در تولید داروهای پزشکی و طب سنتی استفاده می‌شود (Chang *et al*., 1977; Leung & Foster., 1996; Haloui *et al*., 2000).

عصاره رزماری روی شب‌پره برگخوار توت *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) دارای خاصیت لاروکشی بوده و باعث تغییر در شاخص‌های تغذیه‌ای، برخی ترکیبات متابولیکی کلیدی و فعالیت آنزیم‌های کلیدی شده‌است (Yazdani *et al*., 2013).

نوروپپتیدها یکی از مهم‌ترین عواملی هستند که بر روی بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک در حشرات موثراند که برخی از آن‌ها شامل تنظیم‌کننده رشد، پوست‌اندازی، یادگیری، حافظه، تغذیه و تولیدمثل می‌باشند (Nässel, 2002).

نوروپپتید فعال‌کننده قلب سخت‌پوستان در تحریک ضربان قلب موثر است و برای اولین بار از خرچنگ سبز *Carcinus maenas* (Linnaeus) جداسازی شد (Stangier *et al*., 1988). این نوروپپتید وظایف دیگری ازجمله دخالت در رفتارهای پوست‌اندازی، گردش خون، یادگیری و حافظه را در گونه‌های مختلف حشرات و سایر بندپایان را عهده‌دار است (Dircksen, 1998). در مطالعه روی سوسری آمریکایی *Periplaneta Americana* (L.) افزایش میزان CCAP در معده میانی منجر به بالا رفتن میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز شد (Sakai *et al*., 2006). در بررسی دیگری نشان داده‌شد که حذف میان کره مغز (pars intercerebralis) منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و پروتئاز و نیز افزایش سی سی ای پی در معده میانی شد که این مساله بیانگر ممانعت میان کره مغز از بیان سی سی ای پی در معده میانی حشره بود (Matsui *et al*., 2013).

از آنجایی که استفاده از آفت‌کش‌های گیاهی از روش‌های کم خطر برای کنترل آفات بوده و از طرف دیگر نحوه اثر آنها از طریق نوروپپتیدها کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است، لذا در این پژوهش اثر عصاره متانولی برگ رزماری روی میزان تلفات، شاخص‌های تغذیه‌ای، میزان CCAP در معده میانی، همولنف و مغز و در نهایت فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در معده میانی حشره لارو سن سوم *H. armigera* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

پرورش کرم غوزه پنبه

لارو این آفت از مزارع پنبه استان گلستان شهرستان گالیکش جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه بر روی غذای مصنوعی (Shorey & Hale, 1965) در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶:۸ ساعت و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد داخل ژرمیناتور پرورش یافتند. حشرات بالغ با آب و شکر (۱۰ درصد) تغذیه شدند. از آنجایی که عمده خسارت این آفت از سن سوم لاروی آغاز می شود، بر این اساس در اتمامی آزمایش‌ها از آفت یاد شده استفاده شد.

تهیه عصاره متانولی گیاه رزماری

به منظور تهیه عصاره متانولی گیاه رزماری ۳۰ گرم از برگ سایه خشک پس از توزین با آسیاب برقی به خوبی پودر شده مطابق روش Warthen *et al.* (1984) عصاره متانولی آن تهیه شد و به مدت دو ساعت در مقدار ۳۰۰ میلی‌لیتر از حلال متانول ۸۵ درصد روی همزن مغناطیسی قرارداده شدند. محلول به مدت ۴۸ ساعت در یخچال در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس یک ساعت دیگر روی همزن مغناطیسی قرار گرفته و از کاغذ صافی واتمن شماره ٤ عبور داده شد و حلال آن با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ (IKA، آمریکا) در دمای ٤٠ درجه سلسیوس جداسازی شد. به باقیمانده، ۱۰ میلی لیتر حلال متانول ۸۵ اضافه شد. عصاره این گیاه در دمای ٤ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. در تمامی آزمایش‌های انجام شده از آب برای رقیق‌سازی این عصاره استفاده شد.

زیست سنجی

به منظور آزمایش زیست سنجی ۵ غلظت مختلف از عصاره گیاه جهت تعیین LC_{50} تهیه و به غذای مصنوعی اضافه شد. در هر آزمایش از لارو سن سوم در ٤ تکرار و در هر تکرار از ۷۵ عدد لارو استفاده شد. مرگ و میر پس از ۷۲ ساعت ثبت شد و میزان LC_{50} با بکارگیری نرم افزار SAS 6.12 تخمین زده شد (Finney, 1971).

سنجش شاخص‌های تغذیه‌ای

در راستای سنجش شاخص های تغذیه‌ای کرم قوزه پنبه، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی به غلظت ۵۱۳۸ پی پی ام به ۰/۹ گرم غذای مصنوعی اضافه شد و داخل یک ظرف پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتی متر و ارتفاع ۷ سانتی متر قرار گرفت. آزمایش‌ها در ٤ تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ عدد لارو بود. پس از ۷۲ ساعت شاخص‌های تغذیه‌ای طبق فرمول Waldbauer (1968) محاسبه شد.

شاخص مصرف Consumption index (CI)

$$CI = \frac{E}{A}$$

شاخص تقریبی هضم شوندگی غذا Approximate digestibility (AD)

$$AD = \frac{E-F}{E}$$

بازدهی تبدیل غذای بلعیده‌شده Efficiency of conversion of ingested food (ECI)

$$ECI = \frac{P}{E}$$

بازدهی تبدیل غذای هضم شده Efficiency of conversion of digested food (ECD)

$$ECD = \frac{P}{E-F}$$

نرخ مصرف نسبی Relative consumption rate (RCR)

$$RCR = \frac{E}{A*T}$$

نرخ رشد نسبی Relative growth rate (RGR)

$$RGR = \frac{P}{A*T}$$

که در این روابط:

E = وزن خشک غذای خورده شده (میلی‌گرم)

A = میانگین وزن خشک لاروها در طول دوره (میلی‌گرم)

F = وزن خشک فضولات تولیدشده (میلی‌گرم)

P = افزایش وزن خشک لاروها (میلی‌گرم)

T = دوره‌ی زمانی مصرف غذا (روز) می باشد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پروتئاز و لیپاز

معده میانی لاروسن سوم کرم غوزه پنبه در محلول Tris–HCl ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۹/۵ برای سنجش میزان فعالیت آلفا آمیلاز و ۱۱ برای سنجش پروتئاز جداسازی شد و به مدت ۳۰ دقیقه در این محلول در دمای اتاق نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آلفا آمیلاز با استفاده از کیت کیکومن (Kikkoman Corp., Chiba, Japan) و مطابق روش ساکایی و همکاران (Sakai *et al*. 2004) انجام شد. جذب توسط میکروپلیت ریدر (Biotek, U.S.A) در ٤٠٠ نانومتر خوانده شد. اندازه‌گیری میزان فعالیت پروتئاز طبق روش Elpidina *et al*. (2001) انجام شد. جذب توسط میکروپلیت ریدر(Biotek, U.S.A) در ۳۳۵ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت لیپاز با استفاده از کیت سنجش لیپاز (QuantichromTM Lipase Assay Kit, BioAssay System, USA) و مطابق روش Mikani *et al*. (2012) انجام شد. به طور خلاصه، معده میانی حشره در محلول بافر فسفات (PBS; 145 mM NaCl, 1.45 mM NaH_2PO_4, 8.55 mM Na_2HPO_4, pH 7.5) جداسازی و در همین بافر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. به منظور ساخت محلول برای اندازه‌گیری، ۵ میلی‌گرم از محلول رنگی و ١٤٠ میکرولیتر بافر فسفات به ۸ میکرولیتر Dimercaptopropanol tributyrate، اضافه شدند.١٤٠ میکرولیتر از این محلول به ۱۰ میکرولیتر نمونه اضافه شده و جذب در ٤١٢ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر (Biotek, U.S.A) خوانده شد.

اثر CCAP بر میزان فعالیت لیپاز

مطابق روش Mikani *et al*. (2012)، پس از خارج کردن معده میانی از بدن لارو، در محلول PBS به مدت ۳۰ دقیقه در حضور و یا عدم حضور غلظت‌های مختلفی از CCAP در دمای اتاق قرار گرفت. فعالیت آنزیمی که پس از ۳۰ دقیقه وارد PBS شد اندازه گیری شد.

سنجش میزان نوروپپتید CCAP در معده میانی کرم غوزه پنبه با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی

این آزمایش مطابق روش Sakai *et al.* (2006) و با استفاده از کیت (Vectastain ABC KIT PK-6101) انجام شد. در ابتدا معده میانی نمونه‌های تیمار و شاهد در بافر PBS تشریح و جداسازی شده و به مدت یک شب در دمای ٤ درجه سلسیوس در محلول بویین (۱۵ حجم اسید پیکریک ، ۵ حجم فرمالین، ۱ حجم اسید استیک) قرارداده شدند. سپس نمونه‌ها به منظور آب‌گیری به ترتیب در الکل ۷۰، ۹٦ و ۱۰۰ درصد و در انتها بوسیله محلول زایلین شستشو داده شدند (شستشو در هر یک از محلول‌های الکلی و زایلین به تعداد دو بار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه بود). نمونه‌ها پس از آبگیری درون قالب‌های فلزی کوچک قرار گرفته و روی آن‌ها با پارافین پوشانده و درون آون در دمای ٦۰ درجه به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفتند. برای برش عرضی نمونه‌های معده میانی تثبیت شده در پارافین از دستگاه میکروتوم (شرکت دید سبز، ایران) استفاده شد. سپس برش‌ها به روی یک لام میکرسکپی که با محلول آب ژلاتین خیس شده بود منتقل شدند. لام‌ها به مدت ۲٤ ساعت درون آون با دمای ٤۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از اتمام زمان موردنظر، نمونه‌ها شستشو داده شدند. به این منظور، لام‌ها به ترتیب در زایلین، اتانول ۹٦ درصد، اتانول ۷۰ درصد، آب مقطر و تریس بافر سالین (TBS; 135 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 25 mM Tris–HCl, pH 7.6) هرکدام به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس آماده‌سازی محلول سرم با نسبت ۱۰۰۰ میکرولیتر TBS به ۱۵ میکرولیتر سرم بز انجام شد و نمونه‌ها در ظرف مرطوب درب دار قرار گرفتند. روی هر لام مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول سرم ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی اولیه (CCAP) با غلظت یک در هزار در TBS تهیه و روی هر لام ریخته شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در یخچال قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها سه بار با محلول TBS، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. سپس بر روی نمونه‌ها مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی ثانویه (به نسبت یک در هزار در محلول TBS) ریخته و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از اتمام این زمان دوباره شستشو با TBS انجام شد. سپس از شستشو نمونه‌ها با TBS به مدت ۱۰ دقیقه ۳ بار، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ABC (مطابق کیت) روی هر لام ریخته و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس شستشو ۳ بار به مدت ۱۰ دقیقه با TBS انجام شد. آنگاه نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با تریس اچ سی ال (Tris–HCl) یک دهم مولار با pH برابر ۷/۵ شستشو داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در محلول رنگی دی آمینوبنزیدین تتراهیدروکلراید (Diaminobenzidine tetrahydrochloride: DAB) به نسبت ۲/۵ میلی‌گرم DAB، ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰٪ و ٤۸ میلی‌لیتر تریس اچ سی ال (Tris–HCl) ۰/۱ مولار با pH برابر ۷/۵ قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها به ترتیب با آب مقطر، اتانول ۷۰، ۹٦، ۱۰۰درصد و زایلین شستشو داده شدند و از آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ (Olympus BX51, Japan) عکس‌برداری شد. در نمونه شاهد، به آنتی بادی پیش از مصرف آن، آنتی ژن سنتتیک (یک میکرو گرم بر میلی لیتر) اضافه شد.

اندازه‌گیری میزان نوروپپتید CCAP درمغز، همولنف و معده میانی کرم غوزه پنبه با استفاده از الایزای رقابتی (Competitive ELISA)

الایزای رقابتی مطابق روش Sakai *et al.* (2006) انجام شد. در این روش ابتدا معده میانی و یا مغز نمونه‌های تیمار و شاهد در بافر TBS تشریح و جداسازی شدند. محتویات معده میانی خارج و در TBS هموژنایز شدند. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها (٤۰۰۰ دور، ٤ درجه، ۱۵ دقیقه) محلول رویی (سوپرناتانت) برداشته و جهت انجام آزمایش الایزا مورداستفاده قرارگرفت. در مورد همولنف، پس ازخارج کردن آن با استفاده از سرنگ هامیلتون،

نمونه جداسازی شد. ابتدا محلول مزدوج آنتی‌ژن- BSA با اضافه‌کردن دی‌متیل‌سوبریمیدیت (0.6 µg/mL) تهیه شد . سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول درون هر چاهک ریخته شده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرارگرفت. سپس ۲۵۰ میکرولیتراز شیر بدون چربی ۲ درصد درون هر چاهک ریخته و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. مقدار ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن یا محلول استاندارد (۰/۰۱ تا ۱۰۰ نانومول در هر چاهک) در هرچاهک ریخته شده و سپس ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی به غلظت یک در ۱۱۰۰۰ (شیر بدون چربی ۲ درصد در TBS) به آن اضافه شد. ظرف چاهک ۹۶ تایی به مدت یک شب در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار گرفت. هر چاهک با مقدار۲۵۰ میکرولیتر بافر (TBS-Tween) TBS-T برای ۳ بار شستشو داده شد. بعد از اتمام شستشو درون هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه با نسبت ۱ در ۱۰۰۰ ریخته و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس محلول نیتروفنیل فسفات دی سدیم سالت (Nitrophenylphosphate disodium salt) با نسبت یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر دی اتانول آمین ۱۰ میلی‌مولار با پی اچ (pH) برابر ۹/۵ آماده‌شده و در هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ریخته و در دمای اتاق به مدت یک ساعت قرار گرفت. واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر NaOH ٤ مولار متوقف شده و جذب با دستگاه الایزاریدر (بایوتک، آمریکا) در طول‌موج ٤۰۵ نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) برای بررسی وجود تفاوت معنی دار بین میانگین تیمارها استفاده شد (Fishers LSD).

نتایج

زیست‌سنجی

نتایج آزمایش زیست سنجی عصاره متانولی رزماری روی لارو سن سوم کرم غوزه پنبه به روش تغذیه از غذای مصنوعی پس از گذشت ۷۲ ساعت در جدول (۱) ارائه شده است. مقدار LC_{50} برای عصاره متانولی رزماری ۱۲۳٤۷ پی پی ام محاسبه شد.

جدول ۱- سمیت عصاره متانولی رزماری، *R. officinalis*، روی لارو سن سوم کرم غوزه پنبه، *H. armigera*، پس از ۷۲ ساعت تغذیه از غذای مصنوعی حاوی عصاره رزماری

Table 1. Toxicity of methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* on third instar larvae of *Helicoverpa armigera*, 72 hours after feeding on artificial diet containing rosemary extract

Plant	N	χ^2 (df)	P-value	Slope ± SE	LC_{20}(ppm)	LC_{50}(ppm)	LC_{80}(ppm)
					(95% CL[1])		
Rosmarinus officinalis	300	0.93 (3)	0.82	2.21 ± 0.29	5138	12347	18555
					(3594 – 6464)	(10494 – 14550)	(15563 – 23230)

[1]CL= Confidence limit

اثر عصاره متانولی *Rosmarinus officinalis* بر شاخص‌های تغذیه‌ای

شاخص تقریبی هضم‌شوندگی غذا (AD) در لارو سن سوم کرم غوزه پنبه که از غذای مصنوعی حاوی LC_{20} عصاره متانولی رزماری به مدت ۷۲ ساعت تغذیه کرده بود نسبت به شاهد بالاتر بود. سایر شاخص‌ها اعم از نرخ

مصرف نسبی (RCR)، نرخ رشد نسبی (RGR)، بر کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI)، کارایی تبدیل غذای هضم شده (ECD) و میزان شاخص مصرف (CI) در تیمار پایین تر از شاهد بود (جدول ۲).

جدول ۲- شاخص‌های تغذیه‌ای لارو سن سوم کرم غوزه پنبه، *H. armigera*، ۷۲ ساعت بعد از تغذیه روی غذای مصنوعی آلوده به ۵۱۳۸ ppm (LC_{20}) عصاره متانولی رزماری، *R. officinalis*.

Table 2. Nutritional indices of third instar larvae of *Helicoverpa armigera*, 72h after feeding on diet containing 5138 ppm (LC_{20}) of *Rosmarinus officinalis*.

Treatment	Concentration ppm	CI mg/mg/Day	AD %	ECI %	ECD %	RCR mg/mg/Day	RGR mg/mg/Day
Control	0	4.01 ± 0.07	31 ± 0.05	38 ± 0.2	82.8 ± 0.42	1.07 ± 0.07	0.75 ± 0.01
Rosmarinus officinalis	LC_{20}	1.95 ± 0.15*	54 ± 5.18*	15 ± 0.8*	34 ± 7.4*	0.65 ±0.05*	0.1 ± 0.01*

CI: میزان شاخص مصرف، AD : شاخص تقریبی هضم‌شوندگی غذا، ECI : بر کارایی تبدیل غذای خورده شده ،ECD: کارایی تبدیل غذای هضم شده، RCR: نرخ مصرف نسبی، RGR: نرخ رشد نسبی.

*از تی استیودنت برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شده است ($p < 0.05$).

RGR: relative growth rate; RCR: relative consumption rate; ECI: efficiency of conversion of ingested food; ECD: efficiency of conversion of digested food; AD: approximate digestibility. An asterisk indicates a significant difference relative to the control treatment

Each point represents the Mean ± SEM.

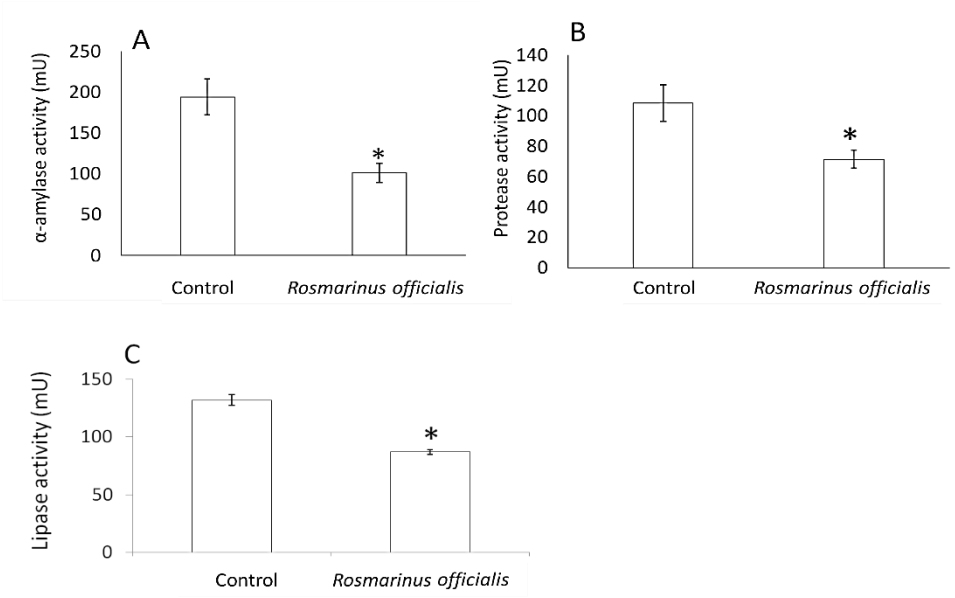
* Present significantly difference from control using Student's t-test ($p < 0.05$).

اثر عصاره متانولی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پروتئاز و لیپاز

میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز و پروتئاز در کرم غوزه پنبه پس از تغذیه لاروهای سن سوم از غذای مصنوعی حاوی عصاره‌های متانولی (LC_{20}) رزماری پس از ۷۲ ساعت محاسبه شد. نتایج نشان داد مقدار آنزیم آلفا آمیلاز از 194 mU در شاهد به 101.13 mU در حشرات تیمار کاهش یافت (شکل ۱A). همچنین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز از 108.2 mU در شاهد به 71.4 mU در حشرات تیمار کاهش داشت (شکل ۱B). میزان فعالیت لیپاز از 132 mU در شاهد به 87.3 mU در تیمار کاهش یافت (شکل ۱C).

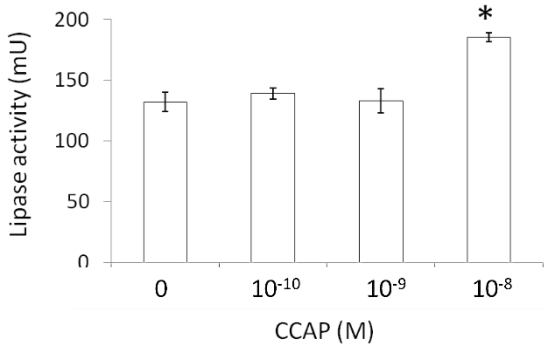
تاثیر CCAP روی میزان فعالیت آنزیم لیپاز

قرار دادن معده میانی خارج شده از بدن لارو، در محلول PBS به مدت ۳۰ دقیقه در حضور غلظت 10^{-8}مول CCAP در دمای اتاق فعالیت آنزیمی آن را پس از ۳۰ دقیقه، ۱/۳ برابر افزایش داد (شکل ۲).



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز (A)، پروتئاز (B) و لیپاز(C) در معده میانی لارو سن سوم کرم غوزه پنبه، *H. armigera*، ۷۲ ساعت پس از قرارگرفتن در معرض عصاره متانولی رزماری ، *R. officinalis*، با غلظت ۵۱۳۸ پی پی ام (LC 20). از تی استیودنت برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد ($p < 0.05$*).

Fig.1. α-Amylase (A), protease (B) and lipase (C) activities in third instar larvae of *Helicoverpa armigera*, 72h after feeding on diet containing 5138 ppm (LC20) of *Rosmarinus officinalis* methanolic extract. Each point represents the mean±SEM. *$p < 0.05$, significantly different from control (Student's t-test).



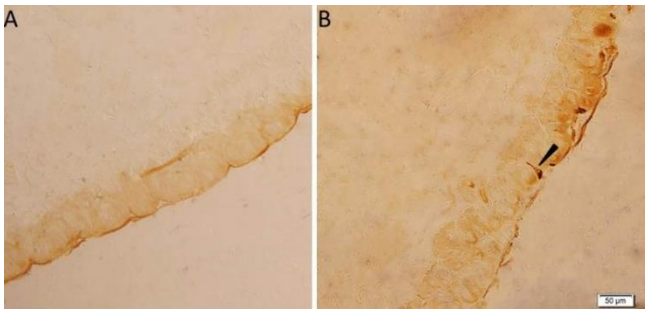
شکل ۲- تاثیر CCAP روی فعالیت آنزیم لیپاز در معده میانی لارو سن سوم کرم غوزه پنبه، *H. armigera*، در محیط غیرزنده (*In vitro*). هر تیمار دارای ۸ تکرار بود ($p < 0.05$*، LSD test).

Fig. 2. Effect of CCAP on lipase activity in third instar larvae of *Helicoverpa armigera*, *in vitro*. Each point represents the mean ± S.E.M. of 8 preparations. *$p < 0.05$, compared with lipase activity in the absence of CCAP (LSD test).

تاثیر عصاره متانولی رزماری برروی میزان سی سی ای پی در معده میانی، مغز و همولنف

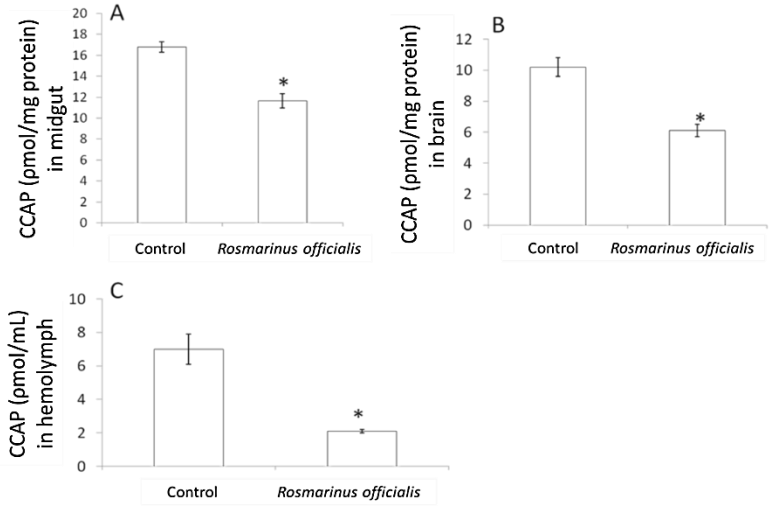
در ابتدا با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی وجود سیگنال سی سی ای پی در معده میانی حشره تایید شد (شکل ۳). سپس میزان سی سی ای پی در معده میانی با استفاده از روش الایزای رقابتی اندازه‌گیری شد. این میزان در لاروهای شاهد برابر با ۱٦/۸ پیکومول/ میلی‌گرم پروتئین بود درحالی‌که این میزان در لاروهایی که از

غذای مصنوعی حاوی عصاره متانولی رزماری تغذیه کرده بودند به ۱۱/۸٤ پیکومول/ میلی‌گرم پروتئین رسید. به بیان دیگر، بین تیمار شاهد و لاروهایی که از غذای مصنوعی حاوی عصاره متانولی رزماری تغذیه کرده بودند ازنظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت(شکل ٤A). نتایج الایزای رقابتی نشان داد که میزان این نوروپپتید در مغز (شکل ٤B) و همولنف (شکل ٤C) حشره نیز پس از تغذیه از غذای آلوده به عصاره متانولی رزماری به صورت معنی‌داری کاهش یافت.



شکل ۳- سلول‌های ایمنو ری اکتیو نوروپپتید سی سی ای پی در اپیتلویم معده میانی لارو سن سوم کرم غوزه پنبه، *H. armigera*. شاهد (A)، نوک پیکان عکس‌العمل ایمنی به سی سی ای پی را در سلول معده میانی نشان می‌دهد (B).

Fig. 3. CCAP-ir cells in the midgut epithelium of third instar larvae of *H. armigera*. A, control (preabsorption test). B, CCAP-ir cells in the midgut epithelium. The arrowhead shows a cell that became reactive to the CCAP antibody. Scale bars, 50 μm. CCAP: crustacean cardioactive peptide.



شکل ٤- تعیین میزان غلظت سی سی ای پی در معده میانی (A)، مغز (B) و همولنف (C) لارو سن سوم کرم غوزه پنبه، *H. armigera*، بعد از ۷۲ ساعت تغذیه از غذای مصنوعی حاوی عصاره متانولی رزماری ، *R. officinalis* ، با غلظت ۵۱۳۸ پی پی ام (LC_{20}) با استفاده از الایزای رقابتی (آزمون تی استیودنت).

Fig. 4. A competitive ELISA detected CCAP titer in the midgut (A), brain (B) and hemolymph (C) of third instar larvae of *Helicoverpa armigera*, 72 h after feeding on diet containing 5138 ppm (LC20) of *Rosmarinus officinalis* methanolic extract. Each point represents the mean ± SEM. *p < 0.05, significantly different from control (Student's t-test).

بحث

تاکنون از عصاره‌های گیاهی بسیاری به منظور کنترل حشرات آفت استفاده شده است. دلیل این امر این است که این ترکیبات اثرات سوء کمتری نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی برروی انسان و محیط زیست دارند (Duke, 1988). متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط گیاهان امروزه نقش مهمی را در مقابله با حشرات آفت به دلیل داشتن خواص ضدتغذیه‌ای و تاثیر بر رشدونمو بازی می‌کنند (Isman, 2006). نتایج این تحقیق نشان داد عصاره متانولی رزماری در غلظت‌های بالا دارای خاصیت کشندگی بوده (جدول ۱) و در غلظت‌های کمتر نیز دارای اثرات ضدتغذیه‌ای بوده و باعث کاهش در برخی از شاخص‌های تغذیه‌ای *H. armigera* شد (جدول ۲). در پژوهشی اثرات شیمیایی و کشندگی اسانس رزماری علیه *G. pyloalis* بررسی شد. میزان ECI، ECD، RGR و RCR در لارو تغذیه‌کننده از غذای حاوی اسانس رزماری نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری کمتربوده در حالی که میزان AD نسبت به شاهد بالاتر بود (Yazdani *et al*., 2013).

نتایج شاخص‌های تغذیه‌ای پس از تیمار لاروهای *H. armigera* با غلظت LC_{20} عصاره متانولی رزماری نشان داد میزان AD در لاروهای تیمار شده نسبت به لاروهای شاهد افزایش معنی‌داری داشته‌است که دلیل این افزایش، طولانی شدن دوره لاروی و کاهش مصرف غذا و به دنبال آن حفظ طولانی مدت غذا در لوله گوارش حشره و در نتیجه افزایش میزان جذب ماده غذایی در لاروهای تیمار شده با عصاره می‌باشد (Senthil-Nathan *et al*., 2006). همچنین سایر شاخص‌های تغذیه‌ای نظیر ECI ,RGR ,RCR ,ECD و CI در لاروهای تیمار شده نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشتند. میزان کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI) و هضم شده (ECD) به بیوماس حشره به شدت وابسته به فعالیت آنزیم‌های معده است (Huang *et al*., 2004). کاهش ECI بیانگر این است که بیشتر غذای مصرف شده صرف متابولیزه شدن برای تامین انرژی می‌شود و مقدار کمتری برای افزایش وزن لارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین کاهش ECD نشان‌دهنده عدم توانایی حشرات برای تبدیل غذای هضم‌شده به رشد است. در حقیقت انرژی مواد هضم‌شده ممکن است صرف فرایند سم‌زدایی شود (Ramos Vda *et al*., 2009). کاهش ECD نشان دهنده عدم مناسب بودن مواد غذایی برای حشرات و عدم دسترسی به مواد غذایی مورد نیاز حشرات است (Koul *et al*., 2004).

نوروپپتید CCAP برای اولین بار از غدد سینوسی خرچنگ *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758) جداسازی شد. این نوروپپتید تنظیم‌کننده حرکت ماهیچه‌ها در حشرات مختلف است (Stangier *et al*., 1998). همچنین در بررسی انجام شده توسط Sakai *et al.* (2006) عنوان شد که نوروپپتید CCAP و آلاتوستاتین در معده میانی سوسری آمریکایی وجود دارد. در این بررسی نیز حضور این نوروپپتید در معده میانی حشره تایید شد (شکل ۳). از طرفی قراردادن معده میانی جدا شده از حشره در بافر حاوی CCAP میزان فعالیت آنزیم لیپاز را افزایش داد (شکل ۲). در بررسی‌های پیشین هم مشخص شد که این نوروپپتید میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و پروتئاز را افزایش داد(Mohammadi Gisour *et al*., 2017). به نظر می‌رسد CCAP تولید شده در معده میانی به عنوان یک فاکتور پاراکرین به سلول‌های کناری خود آزاد شده و آزادسازی و یا سنتز آنزیم‌های گوارشی از سلول های ستونی را افزایش دهد. در این تحقیق برای اولین بار گزارش شد که CCAP علاوه بر معده میانی در مغز و همولنف حشره نیز ردیابی شده است (شکل ٤B,C). این نتایج با یافته های پیشین مبنی بر ردیابی این نوروپپتید در مغز و معده میانی سوسری امریکایی مطابقت دارد (Mikani *et al*., 2015; Mikani *et al*., 2012). یافته اخیر نشان می‌دهد که سی سی ای پی در کرم غوزه پنبه علاوه بر "پپتید معده"، نوروپپتید نیز می‌باشد. اجسام کاردیاکا به عنوان یک ارگان عصبی که تولیدات مغز را از طریق همولنف به مغز می‌رساند. ردیابی سی سی ای

پی در همولنف از طریق الایزا نشان می‌دهد که نوروپپتید از مغز وارد همولنف شده و از آنجا روی معده میانی تاثیر می‌گذارد. در واقع این تحقیق که تکمیل‌کننده تحقیق قبلی بود (Mohammadi Gisour *et al*., 2017) نشان داد که سی سی ای پی معده میانی به‌تنهایی و مستقل عمل نکرده و تحت تاثیر نوروپپتید سی سی ای پی مترشحه از مغز عمل می‌کند.

در این پژوهش ضمنا نشان داده شد که تغذیه از غذای آلوده به عصاره رزماری میزان این نوروپپتید را نه تنها در معده میانی بلکه در مغز و همولنف نیز کاهش می‌دهد (شکل ٤).

در واقع می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که تغذیه از غذای مصنوعی حاوی عصاره رزماری باعث تاثیر بر تولید و یا دست کم آزادسازی نوروپپتید سی سی ای پی در مغز کرم غوزه پنبه شده که این نوروپپتید از طریق همولنف سلول‌های پاراکرین معده میانی را تحت تاثیر قرار داده و منجر به آزاد سازی سی سی ای پی در معده میانی حشره می‌شود که این مساله به نوبه خود منجر به کاهش آزادسازی و یا تولید آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز، پروتئاز و لیپاز شده و در نهایت تغذیه حشره کاهش می‌یابد. نتایج این پژوهش می‌تواند گامی در راستای استفاده از نوروپپتیدها و یا تاثیرگذاری روی آنها به منظور کنترل آفات باشد.

سپاسگزاری

از پروفسور ماکیو تاکدا (دانشگاه کوبه، ژاپن) جهت اهدای آنتی بادی و آنتی ژن تشکر می شود.

References

Chang, S. S., Ostric-Monjasevic, C. B., Hsie, O. L. & Huang, C. L. (1977) Natural antioxidant from Rosemary and sage. *Journal of Food Science* 42, 1102-1106.

Dayan, F. E., Cantrell, C.L. & Duke SO. (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medical Chemistry* 17, 4022-4034.

Dircksen, H. (1998) Conserved crustacean cardioactive peptide (ccap) neuronal networks and functions in arthropod evolution. Seminar Series-Society for Experimental Biology. 333 pp. Cambridge University Press.

Duke, W. (1988) Hyperbolic distribution problems and half-integral weight Mass forms. *Inventiones mathematicae* 92, 73-90.

Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Gromenko, V.A., Rudenskaya, Y.A., Dunaevsky, Y. E. & Zhuzhikov, D.P. (2001) Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 206-216.

Finney, D. J. (1971) Probit Analysis.3th ed. 333 pp. *Cambridge University Press*.

Garcia, F. M. (2006) Analysis of the spatio–temporal distribution of *Helicoverpa armigera* Hb. in a tomato field using a stochastic approach. *Biosystems Engineering* 93, 253-259.

Haloui, M., Loudec, L., Michel, J. B. & Lyoussi, B. (2000) Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and Centaurium erythraea. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 465-472.

Huang Z., Shi P., Dai J. & Du J. (2004) Protein metabolism in Spodoptera litura (F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80, 85-93.

Isman, M. B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51, 45-66.

Jeyasankar, A., Premalatha, S. & Elumalai, K. (2012) Biological activities of *Solanum pseudocapsicum* (Solanaceae) against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner and armyworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidotera: Noctuidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, 981-986.

Koul, O., Singh, G., Singh, R., Singh, J., Daniewski, W. M. & Berlozecki, S. (2004) Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. *Journal of Biosciences* 29, 409-416.

Leung, A. Y. & Foster, S. (1996) Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. 649 pp. John Willey & Sons, Inc.

Matsui, T., Matsumoto, T., Ichihara, N., Sakai, T., Satake, H., Watati, Y. & Takeda, M. (2009) The pars intercerebralis as a modulator of locomotor rhythms and feeding in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Physiology and Behavior* 96, 548-556.

Mikani, A., Wang, Q.S. & Takeda, M. (2012) Brain-midgut short neuropeptide F mechanism that inhibits digestive activity of the American cockroach, *Periplaneta americana* upon starvation. *Peptides* 34, 135-144.

Mikani, A., Watari, Y. & Takeda, M. (2015) Brain-midgut cross-talk and autocrine metabolastat via the sNPF/CCAP negative feed-back loop in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Cell and Tissue Research* 362, 481-496.

Mohammadi Gisour, V., Mikani, A. & Moharramipour, S. (2017) Effect of *Silybum* marianum methanolic extract on nutritional indices, crustacean cardioactive peptide, á-amylase and protease activities of *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 37, 169-180.

Nässel, D. R. (2002) Neuropeptides in the nervous system of drosophila and other insects: Multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology* 68, 1-84.

Nathala, E. & Dhingra, S. (2006) Biological effects of *Caesalpinia crista* seed extracts on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and its Predator, *Coccinella septum punctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 9, 159-164.

Ramos Vda, S., Freire, M.G., Postali, J.R. & Macedo ML. (2009). Regulatory effects of an inhibitor from Plathymenia foliolosaseeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology* 152, 255-261.

Sakai, T., Satake, H., Minakata, H. & Takeda, M. (2004) Characterization of crustacean cardioactive peptide as a novel insect midgut factor: isolation, localization, and stimulation of a-amylase activity and gut contraction. *Endocrinology* 145, 5671-5678.

Sakai, T ,.Satake, H. & Takeda, M. (2006) Nutrient-induced α-amylase and protease activity is regulated by crustacean cardioactive peptide (ccap) in the cockroach midgut. *Peptides* 27, 2157-2164.

Senthil-Nathan, S., Chung, P,G. & Murugan, K. (2006) Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (the rice leaffolder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology Environmental Safety* 64, 382-389.

Shojaei, A., Talebi, K., Sharifan, I. & Ahsaei, S. M. (2017). Evaluation of detoxifying enzymes of *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidae) exposed to essential oil of *Artemisia dracunculus* L. *Biharean Biologist* 11, 5-9.

Shorey, H. & Hale, R. (1965) Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 58, 522-524.

Stangier, J., Hilbich, C., Dircksen, H. & Keller, R. (1988) Distribution of a novel cardioactive neuropeptide (ccap) in the nervous system of the shore crab *carcinus maenas. Peptides* 9, 795-800.

Walbbauer, G. P. (1968) The consumption and utilization of food by insects. *Advances in Insect Physiology* 5, 229-288.

Warthen, J.R., Stokes, J.B., Jacobson, M., & Konzempel, M.P. (1984) Estimation of azadirachtin content in neem extracts and formulations, *Journal of liquid Chromatography* 7, 591.598.

Yazdani, E., Jalali Sendi, J. & Aliakbar, A. (2013) Chemical composition, toxicity and physiological effects of essential oil of *Rosemarinus officinalis* on lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Crop Protection* 2, 461-476.