

## تاثیر ساپونین بذر چای بر مرگ و میر، ویژگی‌های زیستی و پارامترهای بیوشیمیایی کنه قرمز پا کوتاه چای

فاطمه پارسا، سمیر رمزی\*، رضا آزادی‌گنبد و علی سراجی

پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان-ایران

\*s.ramzi@areeo.ac.ir

### چکیده

با توجه به خسارت قابل توجه کنه قرمز پا کوتاه (*Brevipalpus obovatus* Donnadieu)، کنترل مؤثر این آفت اهمیت بسزایی دارد. در این مطالعه، ساپونین از هسته بذر چای استخراج و خالص‌سازی شد و آزمایش‌های مربوط به تأثیر ساپونین بر مرگ و میر و ویژگی‌های زیستی فرم بالغ کنه انجام گرفت. قالب آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین آن‌ها به روش LSD انجام گرفت. برگ‌ها در محلول ۰/۰۱ درصد ترایتون حاوی غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ درصد ساپونین فرو برده و سپس روی کاغذ صافی خشک شدند. برای هر غلظت ۱۵ کنه بالغ روی ۳ برگ در شرایط اتاق قرار گرفت. مرگ و میر کنه‌ها در فواصل زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت ثبت شد، سپس با نرم‌افزار Polo-PC مقادیر LC<sub>50</sub> و LC<sub>30</sub> اندازه‌گیری شد. نتایج تعیین خلوص نشان داد که درصد خلوص ساپونین استخراج شده ۸۰ درصد است. مقدار غلظت لازم برای مرگ و میر در کنه قرمز چای در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱/۶۴، ۱/۳۱ و ۰/۸۷ درصد به دست آمد. نتایج تأثیر ساپونین بر دوره زیستی نشان داد که اضافه کردن آن به رژیم غذایی کنه‌ها سبب افزایش ۶ روزه طول دوره زیستی نسبت به تیمار شاهد می‌شود. نتایج سنجش فعالیت استراز و اندازه‌گیری تعیین میزان ذخایر غذایی در کنه‌های تغذیه شده با ساپونین نسبت به تیمار شاهد نشان داد که فعالیت استراز در کنه‌های تیمار شده افزایش یافته و میزان پروتئین و گلیکوژن کاهش پیدا کرد.

**کلمات کلیدی:** متابولیت ثانویه، کنه‌های خسارت زاء، ساپونین، زیست‌سنجی، استراز

### مقدمه

استراحت دوم، پوره سن دوم (Deutonymph)، استراحت سوم، مراحل قبل از تخم‌گذاری، مدت تخم‌گذاری، روند تخم‌گذاری، خاتمه تخم‌گذاری، تعداد تخم و در نهایت مرگ است (Taghavi, 1996). مراحل مختلف زندگی این کنه در سطح زیرین برگ، دمبرگ اطراف رگبرگ اصلی بوته چای سپری می‌شود. در اثر تغذیه، رنگ رگبرگ اصلی به سبز کم‌رنگ و سطح‌روی برگ نیز به رنگ زرد تیره یا برنزه درمی‌آید. اختلال در فتوسنتز سبب کاهش مواد کلروفیلی در گیاه شده که در نهایت باعث کاهش محصول در سال بعد می‌شود. در جمعیت بالا خسارت زیاد بوده و گاهی باعث ریزش برگ و خشک شدن گیاه می‌شود. این کنه در سال‌های خشک و کم باران طغیان کرده و بیشترین طغیان در شهر یورماه گزارش شده و از آن به بعد جمعیت کاهش می‌یابد (Taghavi, 1996).

آفت‌کش‌های شیمیایی اثرات مخربی بر موجودات غیرهدف و محیط زیست دارند اما آفت‌کش‌های گیاهی مانند ساپونین به جهت داشتن ویژگی‌هایی نظیر کاهش بروز مقاومت و تجزیه سریع در محیط می‌توانند، تا حدی جایگزین آفت‌کش‌های مصنوعی شوند (Prakash and

بذر چای حاوی ترکیب فعالی به نام ساپونین از گروه تری‌ترپنوئیدها است که در آب و چربی حل شده، دارای ویژگی پاک‌کنندگی بوده و در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی استفاده‌های زیادی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که ساپونین فعالیت آفت‌کشی داشته و می‌تواند برای مبارزه با آفات از آن استفاده شود (De Geyter et al., 2007a). کنه قرمز پا کوتاه از آفات مهم چای در ایران است که با استقرار روی برگ‌ها باعث برنزه یا قهوه‌ای شدن آن‌ها شده و در صورت خسارت زیاد سبب ضعف عمومی و کاهش محصول به صورت کمی و کیفی می‌شود، این کنه یکی از گونه‌های خانواده Tenuipalpidae است و روی گیاهان زراعی، باغی، زینتی و غیره نیز فعالیت دارد. این کنه اولین بار توسط Donnadieu در سال ۱۸۷۵ از فرانسه و روی گیاهان سرخاب و پامچال جمع‌آوری و توصیف شد. اولین گزارش وجود کنه چای و برگ نو در شمال ایران در سال ۱۳۴۰ بود (Taghavi, 1996).

کنه قرمز چای آزادی بوده و مراحل زندگی شامل دوره لاروی، استراحت اول یا استراحت لاروی (Nymphochrysalis)، پوره سن اول (Protonymph)،

Rao, 1997) و (Viglianco et al., 2008) و در حفظ و توسعه پایدار محیط زیست نقش مهمی ایفا کنند (Geyter et al., 2007b).

ساپونین‌ها فعالیت آفت‌کشی از خود نشان دادند که بیشترین تأثیرات مشاهده شده شامل افزایش مرگ و میر، کاهش جذب غذا، کاهش وزن، عقب افتادگی در رشد و کاهش تولیدمثل است. طبق فرضیه‌های ارائه شده در منابع، ساپونین‌ها فعالیت دفاعی - بازدارندگی دارند و سبب مشکلات گوارشی، اختلال در پوست‌اندازی و سمیت سلولی در آفات می‌شوند. به همین منظور به عنوان یک ابزار بسیار کارآمد در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات برای حفظ محصولات کشاورزی و باغبانی در برابر حشرات آفت از این ترکیبات گیاهی به صورت اسپری یا انتخاب وارسته‌هایی با ساپونین بیشتر استفاده می‌شود (Geyter et al., 2007a). به دلیل افزایش هزینه تولید و توسعه آفت‌کش‌های جدید، افزایش مقاومت آفات به ترکیبات مصنوعی و هزینه بالای استفاده از نوع وارداتی آن‌ها استفاده از ترکیبات گیاهی مقرون به صرفه‌تر است (Isman, 1994). با استخراج صنعتی ساپونین و استفاده درست از آن در برابر حمله آفات می‌توان علاوه بر افزایش عملکرد محصولات کشاورزی و حفظ محیط زیست، با ایجاد اشتغال گامی مؤثر در بهبود روند اقتصادی کشور برداشت. بنابراین هدف از انجام این پژوهش در ابتدا بررسی کشندگی ساپونین خالص شده چای روی کنه قرمز چای بود، سپس تأثیر غلظت زیرکشنده ساپونین روی دوره زندگی، فعالیت آنزیم استراز و تغییر مقادیر درشت‌مولکول‌های ذخیره‌ای بود.

## مواد و روش‌ها

در اجرای این پروژه از بذر بوته‌های چای هیبرید چینی (گونه غالب مناطق چای‌کاری ایران) در ایستگاه تحقیقاتی شهید افتخاری فومن استفاده شد. بذرها در آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۴). مغزهای بذر به وسیله آسیاب با دور تند کاملاً پودر شدند و از این پودر در سه تکرار برای استخراج ساپونین استفاده شد. برای انجام آزمایش‌ها، استاندارد ساپونین (Sigma-aldrich, 68990-67-0) و انیلین (Sigma-aldrich, 121-33-5) و

آمونیم بیکربنات (Sigma-aldrich, 1066-33-7) از شرکت سیگما و پلی‌آلومینیوم کلراید از شرکت ساینس لب (1327-41-9) خریداری شد.

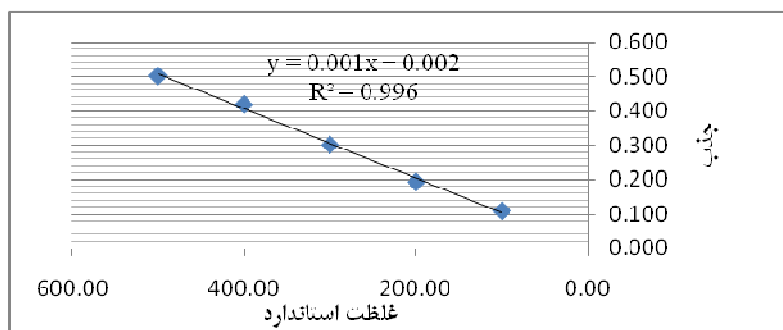
### ۱- تهیه عصاره آبی و پودر خالص سازی شده ساپونین

پودر مغز بذر چای از الک با مش ۲۰ عبور داده شده و در آب گرم به مدت شش ساعت به کمک همزن خیسانده شد. بهترین دما برای استخراج ۸۰ درجه سلسیوس، نسبت مایع (آب مقطر) به جامد شش به یک و اسیدیته برابر ۹ بود. سپس به کمک سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس عصاره جدا شد. برای جداسازی ناخالصی از عصاره اولیه، از پلی‌آلومینیوم کلراید (۳۰ درصد) به مدت دو ساعت استفاده شد. بهترین مقدار یک درصد وزن مایع استخراج شده اولیه بود (تغییراتی در نحوه انجام خالص سازی نسبت به مقاله مرجع انجام گرفت و چهار درصد پلی‌آلومینیوم کلراید به یک درصد کاهش یافت) که در دمای اتاق در جایی ثابت به مدت چهار ساعت قرار گرفت تا هیچ جامد معلق در عصاره نباشد، سپس بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس، مایع عصاره خالص به دست آمد. پنج گرم از عامل رسوب‌کننده اکسیدکلسیم به این مایع خالص اضافه و خوب هم زده شد، تا بعد از سانتریفیوژ رسوب ساپونین به دست آید. سپس با اضافه کردن بی‌کربنات آمونیوم ساپونین آزاد شد، مایع میکس شده از دستگاه صافی به کمک سانتریفیوژ جدا شد و رسوب بعد از شستشو با آب گرم دوباره سانتریفیوژ شد، دو محلول عصاره در یک ظرف ریخته شد و بعد از فرایند غلیظ‌سازی به کمک بن ماری در آون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و کریستال ساپونین خالص به دست آمد (Li et al., 2012).

### ۲- تعیین درصد خلوص ساپونین

تهیه محلول استاندارد: برای تهیه محلول ساپونین چای، ۰/۱ گرم از استاندارد ساپونین به دقت در یک بالون ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد. سپس اتانل ۸۰ درصد به مقداری که ساپونین در آن حل شود، اضافه شد. محلول با اتانل بیشتر خوب تکان داده شد و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به این ترتیب محلول ۰/۱ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر ساپونین در اتانل تهیه شد (Li et al., 2012). بنابراین، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد بالا، به دقت به لوله آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری

رسیدن به دمای محیط، جذب آن صفر گردید (Li et al., 2012). یک سری محلول استاندارد صفر میلی‌لیتر، ۰/۱ میلی‌لیتر، ۰/۲ میلی‌لیتر، ۰/۳ میلی‌لیتر، ۰/۴ میلی‌لیتر و ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه استاندارد برداشته و سپس به روش بالا به صورت مخلوط تهیه شد. بعد از خواندن جذب محلول‌ها، منحنی استاندارد (شکل ۱) به کمک اکسل به دست آمد (Li et al., 2012). در این روش، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ گرم ساپونین در ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانل طبق روش ۱-۲ و ۲-۲ توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و غلظت‌های مربوطه توسط دستگاه خوانده شد.



شکل ۱- منحنی استاندارد ساپونین

سمیت تدخینی، درپوش ظروف از مرکز به قطر ۲ سانتی‌متر سوراخ و با پارچه توری پوشانده شد. برای جلوگیری از فرار کنه اطراف دیسک‌های برگ‌ها با پنبه مرطوب پوشانده شد. مرگ و میرکنه‌ها در فواصل زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعت ثبت شد، سپس با نرم افزار Polo-PC مقادیر  $LC_{10}$ ،  $LC_{30}$  و  $LC_{50}$  تعیین شد (Hollingsworth, 2005).

#### ۴- تأثیر ساپونین بر خصوصیات دوره زیستی کنه

جهت انجام این آزمایش از دز زیر کشنده (غلظت  $LC_{30}$ ) استفاده شد. ۳۰ ماده بالغ نو ظهور روی برگ‌های شاهد و غلظت  $LC_{30}$  ساپونین در گروه‌های ۵ تایی رها شدند. هر کدام از برگ‌ها با یک میلی‌لیتر محلول ساپونین و شاهد که برگ‌های آن‌ها با مخلوط آب مقطر و ترایتون ۰/۱ درصد تیمار شده بودند، غوطه‌ور شدند و بعد از رهاسازی کنه‌ها، برگ‌ها با پنبه مرطوب برای جلوگیری از فرار کنه‌ها احاطه شدند. بسته به مرگ و میر، طی ۱۵ روز، دوره قبل از تخم‌ریزی، تعداد تخم‌های گذاشته شده، درصد تفریح تخم‌ها و طول دوره زیستی مراحل مختلف رشدی و

توسط قطره چکان ریخته و در یک حمام آب یخ گذاشته شد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول وانیلین ۸ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۷ درصد به آن اضافه شد. بعد از خوب هم زدن، لوله آزمایش داخل حمام بخار آب در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه برای پس دادن رنگ گذاشته شد و سپس در حمام آب و یخ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. جذب محلول پس از رسیدن به دمای محیط در کووت یک سانتی‌متری با جذب ماکزیمم ۵۴۵ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری یا اسپکتروفتومتر خوانده شد. شاهد هم مثل نمونه، بعد از قرار گرفتن در حمام آب و یخ و

#### ۳- زیست‌سنجی ساپونین روی کنه بالغ قرمز پا کوتاه چای

کنه‌ها از روی برگ‌های خسارت دیده جمع‌آوری شدند. در آزمایشگاه کنه‌ها از روی برگ‌ها به کمک قلم موی ظریفی جمع‌آوری شده و تحت دمای محیط آزمایشگاه؛ ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت  $75 \pm 5$  نگهداری شدند. تعداد ۲۱ پتری دیش آماده شد و ۲۱ برگ یک اندازه روی کاغذ صافی روی پتری دیش قرار گرفت. محلول‌های مختلف ساپونین با غلظت‌های ۰-۰/۱-۰/۲-۰/۴-۰/۸-۰/۱۶-۳/۲ درصد در محلول ۰/۰۱ درصد ترایتون ایکس-۱۰۰ تهیه شدند. برگ گیاه چای به مدت ۲۰ ثانیه داخل غلظت‌های تهیه شده از ساپونین غوطه‌ور شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شده و پس از خشک شدن برگ‌ها، هر برگ روی کاغذ صافی که حاوی ۵ کنه بالغ بود قرار داده شد. محلول شاهد محلول آب و ۰/۰۱ درصد ترایتون بود. طوری که ۳۰ عدد کنه قرمزپا کوتاه برای هر غلظت روی ۳ برگ قرار گرفت. روی دیسک‌های برگ‌ها درپوش پتری گذاشته و برای جلوگیری از به وجود آمدن

بقای افراد بالغ رشد یافته از تخم های تیمار شده با ترکیبات مورد نظر ارزیابی و ثبت شد (Shekari et al., 2008).

#### ۵- سنجش فعالیت استراز

سنجش فعالیت استراز با استفاده از سوبسترای آلفانفتیل استات و بتانفتیل استات و با مخلوط کردن هر سوبسترا با ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات با ۱۰ میکرولیتر از نمونه های آنزیمی و نمک RR salt fast blue انجام شد. سپس جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر در فواصل ۱۰ ثانیه ای به مدت ۱ دقیقه با الیزاریدر خوانده و شیب خط رگرسیونی فعالیت آنزیمی رسم شد (Han et al., 1998).

#### ۶- تعیین میزان ذخایر غذایی

گلیکوژن: برای اندازه گیری گلیکوژن، تعداد ۱۰۰ کنه بالغ در یک میلی لیتر محلول ۳۰ درصد حاوی هیدروکسیدیتاسیم و سولفات سدیم غوطه ور شد. تیوپ های حاوی نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفته و ۲ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ به آن ها اضافه شد. سپس تیوپ ها تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و یک میلی لیتر آب مقطر جهت ته نشینی اضافه شد. سپس با اضافه کردن محلول فنل ۵ درصد به نمونه ها، انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انجام گرفت. استاندارد گلیکوژن نیز در غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و در نهایت، استانداردها و نمونه ها در ۴۹۲ نانومتر خوانده شدند (Chun and Yin, 1998).

تری گلیسرید: براساس کیت ساپونین آیو کم، ۱۰۰ میکرولیتر معرف و ۲۰ میکرولیتر محلول رونشین حاصل از سانتریفیوژ کل بدن کنه و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر به عنوان بلانک جداگانه در پلیت الیزا ریخته و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵

درجه سلسیوس انکوبه و در نهایت، میزان تری گلیسرید در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد (Fossati, 1982).

پروتئین: بر اساس کیت شرکت زیست کم (ZiestChem (ZiestChem, Co., Tehran-Iran)، ۵۰ میکرولیتر معرف با ۱۰ میکرولیتر استاندارد (پروتئین سرم گاو به غلظت ۵۰ میلی گرم) و ۵۰ میکرولیتر معرف با ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه جداگانه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه و جذب در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد. سپس جذب نمونه بر جذب استاندارد تقسیم و بر اساس دستورالعمل زیست کم در عدد ۵۰ به عنوان غلظت استاندارد ضرب و مقدار حاصل به عنوان میلی گرم پروتئین بر میلی لیتر در نظر گرفته شد (Lowry, 1951).

### نتایج

مقدار میانگین پودر ساپونین استخراج و خالص سازی شده ۹/۶۴۵۶٪ از ۵۰ گرم ماده خشک بود. اندازه گیری درصد خلوص ساپونین به کمک اسپکتروفتومتر و استاندارد ساپونین نشان داد که درصد خلوص ۸۰٪ است. نتایج زیست سنجی تیمار ساپونین در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی کنه های بالغ در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار ۱/۶۴۸ درصد ساپونین بعد از ۲۴ ساعت (LC<sub>50</sub>) سبب مرگ و میر ۵۰ درصد از جمعیت کنه ها شد. نتایج طول دوره زیستی نیز نشان داد که مقدار ۱/۰۴۵ درصد ساپونین بعد از ۲۴ ساعت (LC<sub>30</sub>) سبب افزایش معنی داری روی دوره های انکوباسیون (رشدی) تخم، پوره سن ۲، پوره سن ۳ و دوره قبل از تخم گذاری شده و کل دوره زیستی را حدود ۶ روز افزایش داده است (جدول ۲).

جدول ۱ - درصد کشندگی تیمار ساپونین بر کنه بالغ در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

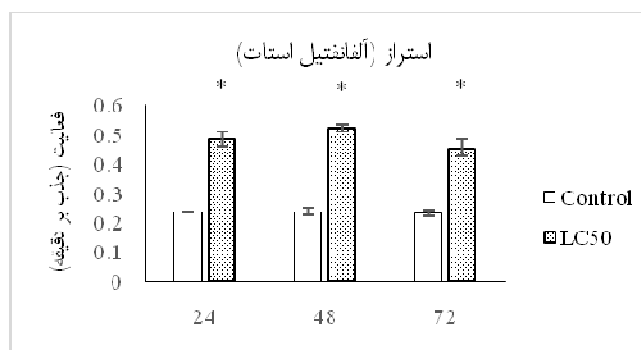
| زمان (ساعت) | LC <sub>10</sub> | LC <sub>30</sub> | LC <sub>50</sub> |
|-------------|------------------|------------------|------------------|
| ۲۴          | ۰/۵۲۴            | ۱/۰۴۵            | ۱/۶۴۸            |
| ۴۸          | ۰/۳۲۱            | ۰/۷۳۸            | ۱/۳۱۴            |
| ۷۲          | ۰/۲۷             | ۰/۵۴۱            | ۰/۸۷۷            |

جدول ۲- تاثیر ساپونین (LC 30) روی دوره زیستی کنه بالغ

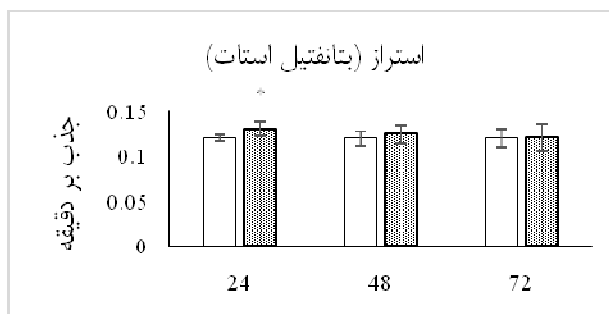
| تیمار (روز)      | رشد تخم | پروتونمف | دئونمف | تريتونمف | قبل از تخمگذاری | مجموع دوره‌ها |
|------------------|---------|----------|--------|----------|-----------------|---------------|
| شاهد             | ۹/۸     | ۲/۲      | ۳/۵    | ۴/۳      | ۳/۸             | ۲۳/۶          |
| LC <sub>30</sub> | ۱۱/۲    | ۲/۸      | ۴/۴    | ۵/۵      | ۵/۲             | ۲۹/۱          |

فعالیت آنزیم استراز به‌عنوان ترکیب سم‌زدا به علت وجود پیوند استری در ساختار شیمیایی ساپونین بررسی شد. فعالیت آنزیم استراز با سوبسترای آلفا نفتیل استات در بازه‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و سوبسترای بتا نفتیل استات در بازه زمانی ۲۴ ساعت بر کنه قرمز پا کوتاه تغذیه شده با تیمار ساپونین با روش تی- تست با احتمال کمتر از ۰/۰۵ نسبت به شاهد معنی‌دار بوده است (شکل ۲ و ۳).

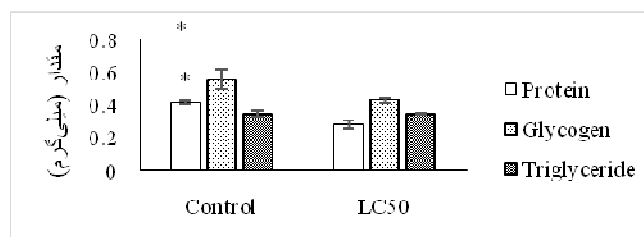
تاثیر ساپونین روی مقادیر ذخایر غذایی پروتئین و گلیکوژن کنه قرمز پا کوتاه با روش تی- تست با احتمال کمتر از ۰/۰۵ نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ۴). تغذیه کنه چای با تیمار ساپونین سبب کاهش درشت مولکول‌های ذخیره‌ای پروتئین و گلیکوژن شد، ولی روی تری‌گلیسرید تاثیری نداشت.



شکل ۲- فعالیت آنزیم استراز با سوبسترای آلفا نفتیل استات بر کنه بالغ در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



شکل ۳- فعالیت آنزیم استراز با سوبسترای بتا نفتیل استات بر کنه بالغ در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.



شکل ۴- فعالیت تیمار ساپونین روی مقدار پروتئین، گلیکوزن و تری گلیسرید کنه بالغ

مؤثر کشندگی ساپونین بر کنه بالغ ۱۶۴۸۰، ۱۳۱۴۰ و ۸۷۷۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت طبق جدول ۱ بود، که مقدار کشندگی ساپونین برای کنه بالغ بعد از ۷۲ ساعت تقریباً نزدیک به مقدار کشندگی استاندارد برای لارو آفت پروانه کلم بود.

هدف از استفاده از آفت‌کش‌ها از بین بردن آن‌ها نیست، بلکه مدیریت جمعیت آن‌ها است، چون خود جزء زنجیره غذایی در محیط زیست هستند. استفاده از حشره‌کش‌ها باعث می‌شود، که حشرات منبع غذایی مطلوب نداشته باشند و انرژی خود را برای تهیه غذا، سم‌زدایی ترکیبات ثانویه و حذف آن ترکیبات مصرف کنند، در نتیجه برای رشد و نمو از انرژی لازم برخوردار نباشند و با افزایش طول دوره زیستی، کاهش تعداد تخم‌ها و یا عقیم شدن آن‌ها، جمعیت نیز به تدریج کم شود، در مقابل حشراتی که طول دوره زیستی کوتاه‌تری دارند، نسل‌های بیشتری داشته و می‌توانند جمعیت خود را به شدت افزایش دهند. فعالیت ساپونین بذر چای در غلظت ۱/۰۴۵ درصد بعد از ۲۴ ساعت (LC<sub>30</sub>) بر دوره زیستی کنه بالغ چای در جدول ۲ آورده شده است، طول دوره زیستی کنه بالغ شامل انکوباسیون تخم، پوره سن ۲، پوره سن ۳، دوره قبل از تخم‌گذاری نسبت به جمعیت شاهد، ۶ روز افزایش معنی‌دار نشان داد. در یک پژوهش، فعالیت کنه‌کشی و زیستی عصاره الکلی برگ گیاه *Dodonaeaviscosa* ساپونین‌ها و فلاوون‌های جدا شده روی طول دوره زیستی کنه تارتن بالغ ماده نشان داده است، که فاکتورهای زیستی اندازه‌گیری شده شامل انکوباسیون تخم، تعداد تخم، دوره قبل از تخم‌گذاری نسبت به جمعیت شاهد معنی‌دار بود، اما تأثیر ساپونین در دوره قبل از تخم‌گذاری معنی‌دار نشد، اما باروری به طور جدی کاهش پیدا کرد. در دوره تخم‌گذاری بیشترین کاهش در تعداد تخم‌ها مربوط به تیمار عصاره الکلی بود (El-Gengaihi et

## بحث

نتایج زیست‌سنجی نشان داد که ساپونین استخراج و خالص شده از بذر چای در غلظت ۱/۶۴۸ درصد بعد از ۲۴ ساعت سبب مرگ و میر ۵۰ درصدی در جمعیت کنه‌ها شد. در پژوهشی اثرات کنترلی ساپونین استخراج شده و خالص شده بذر چای در مقابل مراحل زیستی دو گونه از کنه‌های تارتن و لارو دو گونه از پروانه‌ها در آزمایشگاه به روش غوطه‌وری بررسی شد، جمعیت دو گونه از کنه‌ها *T. urticae* و *kanzawai* در غلظت بالای ساپونین ۰/۱٪، نسبت به غلظت‌های پایین‌تر ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱٪ در طول ۹ روز به شدت کاهش یافت. ساپونین از خود خاصیت کنه‌کشی در برابر پوره‌ها نشان داد، اما خاصیت کنه‌کشی بر کنه‌های بالغ مشاهده نشد. تأثیر ساپونین روی گونه *T. urticae* نسبت به گونه *T. urticae* بیشتر بود و ساپونین هیچ تأثیری روی بقای لاروهای *Adoxophyes honmai* و *Pryeriasinica* نداشت (Kawai et al., 1999). در پژوهش حاضر نیز ساپونین، در غلظت ۰/۱٪ بر کنه بالغ اثر کشندگی نداشته است و کمترین غلظت زیر کشندگی بر اساس جدول ۱ در غلظت ۰/۲۷۰٪ بعد از ۷۲ ساعت بوده است.

همچنین، کشندگی ساپونین استخراج شده و خالص شده بذر چای برای لارو پروانه کلم *Plutellaxylostella* نسبت به تیمار شاهد ۲۱۰۶/۳۲ میلی گرم بر لیتر و برای شته اقاچیا *Aphis craccivora* ۵۴۰/۷۹ میلی گرم بر لیتر پس از ۹۶ ساعت به روش غوطه‌وری اندازه‌گیری شده است، که مقدار مؤثر کشندگی از ساپونین بذر چای در مقایسه با LC<sub>50</sub> تیمار استاندارد که برای لارو آفت پروانه کلم ۷۲۵۵ میلی گرم بر لیتر و برای شته اقاچیا ۳۶۶۹ پس از ۹۶ ساعت تعیین شده بود، کمتر بود (Dolma et al., 2017). که در تحقیق حاضر نیز مقدار

al., 2011). در پژوهشی دیگر نیز تاثیر عصاره الکلی و عصاره اتیل استات برگ گیاه دودوناویسکوزا، ساپونین‌ها و فلاوون‌های جدا شده از این عصاره روی طول دوره زیستی حلزون‌های *Biomphalaria alexandrina* نشان داد، که تعداد تخم‌ها به شدت کاهش پیدا کرد و اثر دو تیمار عصاره الکلی و اتیل استات روی تفریح تخم‌ها بسیار قابل ملاحظه بود (Hostettmann et al., 1982).

سامانه فیزیولوژیک سم زدایی نقش بسزایی در حذف ترکیبات وارد شده به بدن حشرات و کنه‌ها داشته و بسته به ایزوآنزیم‌ها توانایی آنها در سم‌زدایی متفاوت خواهد بود. استرازاگروه اصلی از آنزیم‌های سم‌زدا در حشرات هستند، که علیه طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی موثرند. استرازاها عمومی گروهی از آنزیم‌های هیدرولاز هستند، که طیف وسیعی از استرها، آلفاتیک و آروماتیک، کولین استرها و ترکیبات ارگانوفسفره را هیدرولیز (تجزیه) می‌کنند. این آنزیم‌ها هیدرولازهای قوی بوده و نقش مهمی در سم‌زدایی ترکیبات ثانویه گیاهی و مقاومت به حشره‌کش‌ها دارند (Hemingway and Karunaratne, 1998). فعالیت این آنزیم در کنه‌های تغذیه شده با ساپونین در غلظت کشندگی  $LC_{50}$  با سوبسترای آلفا نفتیل در تمام بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشتر از شاهد بود، اما با سوبسترای بتا نفتیل فقط بعد از ۲۴ ساعت این افزایش معنی‌دار مشاهده شد، که نشان می‌دهد ایزوآنزیم‌های متفاوتی از این آنزیم در سم‌زدایی ساپونین نقش دارند چراکه ساپونین‌ها از نظر ساختاری دارای یک یا چند گلیکوزید دارند که توسط پسوندهای هیدروژنی به تری‌ترپنویدها یا استروئیدها متصل هستند (شکل ۲ و ۳) (Hostettmann and Marston, 1995).

در جمعیت کنه‌های تغذیه شده با ساپونین در غلظت  $LC_{50}$  کاهش معنی‌داری در مقدار درشت مولکول‌های ذخیره‌ای پروتئین و گلیکوژن نسبت به جمعیت شاهد مشاهده شد، ولی روی مقدار تری‌گلیسرید آنها تاثیر معنی‌داری نداشت (شکل ۴). این نتیجه نشان می‌دهد که اختلالات غذایی ایجاد شده در کنه‌های تحت تیمار ساپونین به دلیل استفاده از این ترکیبات در تامین بافت و انرژی‌زایی برای ادامه حیات بوده است. اثرات ضدتغذیه‌ای ساپونین بذر

چای علیه شته بالغ افاقیا *Aphis craccivora* در غلظت کشندگی ۶۲/۶۲ و ۷۹/۵۴۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب بعد از ۷۲ و ۹۶ ساعت نسبت به شاهد معنی‌دار بوده است، که در مقایسه با استاندارد در غلظت کشندگی ۳۶۶۹ میلی‌گرم بر لیتر بعد از ۹۶ ساعت کمتر بود. ساپونین در غلظت‌های ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نصف زمان استاندارد اثرات سمی بر کنه‌ها نشان داده است، همچنین ساپونین بذر چای روی لارو پروانه کلم *Plutellaxylostella* نیز نسبت به جمعیت شاهد به عنوان سم عمل کرده است (Dolma et al., 2017). ساپونین استخراج شده و خالص‌سازی شده گیاه کویلاجا ساپوناریا *Quillaja Saponaria* در غلظت کشندگی ۵۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر بر جمعیت شته نخود نسبت به جمعیت شاهد اثر سمی و ضد تغذیه‌ای داشته است (Geyter et al., 2012). کاهش ذخایر غذایی شامل پروتئین و گلیکوژن نشان دهنده اختلال در فیزیولوژی گوارش و متابولیسم حدواسط در کنه‌های تیمار شده است. در واقع کاهش جذب مواد غذایی از یک طرف منجر به استفاده کنه‌ها از ذخایر غذایی شده و از طرف دیگر تأثیر منفی ترکیبات گیاهی بر بافت‌ها و تأمین انرژی منجر به استفاده مجدد از این ذخایر شده است.

### نتیجه گیری

ساپونین خالص طول دوره زیستی کنه قرمز را ۶ روز افزایش داد. ساپونین بذر چای سبب کاهش مقدار درشت مولکول‌های ذخیره ای گلیکوژن و پروتئین کنه قرمز چای شد. آنزیم استراز در سم زدایی کنه‌های تغذیه شده با ساپونین نسبت به شاهد فعالیت معنی داری را نشان داد. بطورکلی نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که ساپونین استخراج شده از بذر چای می‌تواند با مرگ و میر مستقیم و اثرات زیرکشنده روی مراحل زیستی کنه قرمز پاکوتاه چای سبب کاهش تراکم جمعیتی و خسارت این آفت روی برگ چای شود. جدا از ارزیابی کشندگی، ساپونین به دلیل ماهیت طبیعی داشتن، باقیمانده سمی روی برگ چای باقی نگذاشته و متفاوت از ترکیبات شیمیایی، سبب تولید محصولی سالم می‌شود.

## فهرست منابع

- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۸۴. بذرهایی چای، ویژگی ها و روش های سنجش. شماره ۸۲۴۷.
- Chun, Y. and Yin, Z. D. (1998). Glycogen assay for diagnosis of female genital Chlamydia trachomatis infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1081-1082.
- De Geyter, E.D., Geelen, D. and Smagghe, G. (2007a). First results on the insecticidal action of saponins. *Apple Biological Science*, 72(3): 645-8.
- De Geyter, E.D., Lambert, E., Geelen, D. and Smagghe, G. (2007b). Novel advances with plant saponin as natural insecticides to control pest insects. *Pest Technology*, 1(2):96-105.
- De Geyter, E.D., Smagghe, G., Rahbe, Y. and Geelen, D. (2012). Triterpene saponins of *Quillajasaponaria* show strong aphicidal and deterrent activity against the pea aphid *Acyrtosiphonpisum*. *Pest manaje Science*, 68(2): 164-9.
- Dolma, sh. K., Sharma, E., Gulati, A. and Reddy, S.G.E. (2017). Insecticidal activities of tea saponin against diamondback moth, *plutellaxylostella* and *aphid*, *aphis craccivora*. *Toxin reviews*, <http://informahealth.com>.
- El-Gengaihi S. E., Dimetry, N. Z. and Amer, S. A. A. (2011). Phytochemical, acaricidal and biological activity of *Dodonaeviscosa* L. against the two spotted spider mite *Tetranychusurticae* Koch. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(5): 419-425.
- Fossati, P. (1982). L. Principe'Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produce hydrogen peroxide, *Clinical Chemistry*, 28: pp. 2077-2080.
- Han, Z., Moores, G., Devonshire, A. and Denholm, I. (1998). Association between Biochemical Marks and Insecticide Resistance in the Cotton Aphid, *Aphis gossypii*. *Pesticide Biochemical Physiology*, 62: 164-171.
- Hemingway, J. and Karunaratne, SH.P.P. (1998). Mosquito carboxylesterase: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol*, 12:1-12.
- Hollingsworth, R. G. (2005). Limonene, a Citrus Extract, for control of Mealybugs and Scale Insects. *Journal of Economic Entomology*, 98:772-779.
- Hostettmann, K., Kizu, H., Tomimori, T. (1982). Molluscicidal Properties of Various Saponins. *Planta Medicina*, 44: 34-35.
- Hostettmann, K. and Marston, A. (1995). Saponins. Cambridge: Cambridge University Press. p. 3ff. ISBN 978-0-521-32970-5.
- Isman. M. B. (1994). Botanical insecticides and antifeedant: new sources and perspective. *Pesticide Research journal*, 6: 11- 19.
- Kawai, A., Toshihiro, M., Hideki, H. and Katsunori, K. (1999). Control effect of tea seed saponins against insect pests and mites. *Tea Research Journal*, 87: 7-12.
- Li, M., Zhong, H. and Chen, Y. (2012). Study on Tea Saponin Extraction from Shell of Oil -tea *Camellia* Seeds, *International Conference on Mechanical Engineering and Material Science*. China/ Hunan.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr A. L. and Randall. R. J. (1951). Protein measurement with the Folinphenol reagent. *Journal Biology Chemical*, 193: 265-275.
- Prakash, A. and Rao, J. (1997). Botanical Pesticide in Agriculture. New York/CRC press Inc.
- Shekari, M., Sendi., J., Etebari, K., Zibae, A. and Shadparvar, A. (2008). Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull (Coleoptera: Chrysomellidae). *Pesticide Biochemical Physiology* 91: 66-74.
- Taghavi, A. (1996). Investigation of mite fauna and study of biology of *Brevipalpusobovatus* Donn. On the tea plant *Camellia sinensis* L. in west of Mazandaran. M.Sc. thesis, Shahid Chamran University of Ahvaz, p. 150 (In Farsi).
- Viglianco, A. I., Novo, R. J., Cragnolini, C. I., Nassetta, M. and Cavallo, E.A. (2008). Antifeedant and repellent effects of extracts of three plant from cordoba (Argentina) against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Bioass*, 3:1-6.