



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۴، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰

doi 10.22055/ppr.2021.17222

تأثیر دی آلایل سولفید و دی آلایل دی سولفید بر سامانه آنتی اکسیدانی و تخصیص انرژی لاروهای شب پره مینوز گوجه فرنگی، *Tuta absoluta* Meyrick

فاطمه طالع پور^۱، آرش زیبایی^{۲*}، مجید عسگری سیاهویی^۳، جلال جلالی سندی^۴

۱- دانشجوی دکتری حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- *نویسنده مسؤل: دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (arash.zibae@guilan.ac.ir)

۳- استادیار گروه گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، بندر عباس، ایران

۴- استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰

چکیده

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تأثیر دو ترکیب موثره موجود در اسانس سیر، دی آلایل سولفید و دی آلایل دی سولفید، بر سامانه آنتی اکسیدانی و مصرف انرژی سلولی لاروهای شب پره مینوز گوجه فرنگی انجام شد. پس از انجام زیست سنجی اولیه به طریق غوطه وری برگ و محاسبه مقادیر LC_{30} و LC_{50} ، لاروها با این غلظت‌ها تغذیه شده و نمونه‌های آنزیمی از کل بدن آنها تهیه شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در لاروهای تیمار شده با دی آلایل سولفید و دی آلایل دی سولفید نسبت به شاهد افزایش داشته و بیشترین مقدار در تیمار LC_{50} دی آلایل دی سولفید مشاهده شد. تفاوت معنی داری در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز لاروهای شاهد و تیمار شده با غلظت LC_{30} دو ترکیب موثره وجود نداشت. فعالیت گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز در همه تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت؛ اما تیمارهای LC_{50} هر دو ماده موثره بیشترین فعالیت این آنزیم را نشان دادند. لاروهای تیمار شده با غلظت‌های LC_{50} دی آلایل دی سولفید و دی آلایل دی سولفید بیشترین مقدار مالون دی آلدئید را نشان دادند در حالی که کمترین غلظت در لاروهای شاهد ثبت شد. میزان مصرف انرژی در لاروهای تیمار نسبت به شاهد کاهش معنی داری را نشان داد به طوری که کمترین مقدار در لاروهای تیمار با غلظت LC_{50} دی آلایل دی سولفید مشاهده شد. نتایج حاضر نشان می‌دهند که علاوه بر کشندگی، دی آلایل سولفید و دی آلایل دی سولفید سبب القای پاسخ‌های آنتی اکسیدانی و تحمیل انرژی مصرفی در لاروهای تیمار شده در مقایسه با شاهد می‌شوند. این تغییرات در نهایت کارایی تولیدمثلی و توانایی انتشار آفت را تحت تأثیر قرار داده و در درازمدت می‌تواند از طغیان جمعیتی آن بکاهد.

کلیدواژه‌ها: *Tuta absoluta*، اسانس سیر، آنتی اکسیدان، هزینه انرژی

دبیر تخصصی: دکتر سید علی همتی

Citation: Talepout, F., Zibae, A., Askari Seyahooei, M., & Jalali Sendi, J. (2022). Effects of diallyl sulfide and diallyl disulfide on the antioxidant system and energy allocation of Tomato leafminer larvae, *Tuta absoluta* Meyrick. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 44(4): 147-163. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17222>

مقدمه

در سال‌های اخیر شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae) خسارت قابل توجهی به تولید گوجه‌فرنگی در گلخانه‌ها و مزارع وارد کرده است (Gharekhani & Salek-Ebrahimi, 2014). این آفت بومی آمریکای جنوبی می‌باشد که از طریق انتقال اندام‌های آلوده میزبان به کشورهای اروپایی، شمال آفریقا و برخی کشورهای آسیایی منتقل شد. لاروها با تغذیه از مراحل رشدی گیاه میزبان سبب ۵۰ تا ۱۰۰ درصد خسارت به صورت کاهش رشد بوته، از بین رفتن و کاهش بازارپسندی میوه می‌شوند (Desneux et al., 2010). مدیریت پایدار و کارآمد این آفت بر پایه‌ی تلفیق روش‌های پیشگیرانه به همراه روش‌های کنترل شیمیایی و غیر شیمیایی استوار است. در حال حاضر مهم‌ترین دغدغه در مورد مینوز گوجه‌فرنگی، مقاومت سریع آن به آفتکش‌های شیمیایی به دلیل کوتاه‌بودن طول دوره زندگی و تعداد نسل زیاد می‌باشد (Shalaby et al., 2013). مقاومت جمعیت‌های پروانه مینوز گوجه‌فرنگی به ترکیبات شیمیایی به ویژه سه گروه ارگانوفسفات‌ها، پیرتروئیدها و بنزوئیل اوره‌ها و نیز گروه‌های جدید آفت‌کش‌های زیستی همچون ترکیبات گیاهی رو به گسترش است (Roditakis et al., 2015; Plata-Rueda et al., 2017; Barati et al., 2019; Bala et al., 2019).

گیاهان بر اساس نیازهای خود، دو گروه مواد شیمیایی تولید می‌کنند. گروه اول دارای ارزش غذایی هستند که گیاهان برای رشد و نمو خود از آنها بهره می‌برد و گروه دوم معروف به متابولیت‌های ثانویه هستند که برای حفاظت گیاهان در مقابل مهاجمان استفاده می‌شوند

(Martínez et al., 2018). در واقع ترکیبات ثانویه در گیاهان، آن‌ها را مجهز به نوعی ساز و کار دفاعی علیه حشرات و موجودات دیگر می‌نماید (Viglianco et al., 2008). آفت‌کش‌ها با منشاء گیاهی می‌توانند به صورت مستقیم باعث مرگ عامل مهاجم شده و صورت غیرمستقیم بر رفتار آنها تأثیرگذار باشد (Isman, 2020). در بررسی‌های متعدد اثرات کشندگی، دور-کنندگی، بازدارندگی تغذیه و تخم‌گذاری ترکیبات تریپنوییدی در حشرات مشاهده شده است (Park & Shin, 2005; Kimbaris et al., 2009; Plata-Rueda et al., 2017; Wang et al., 2019). ترکیبات ثانویه گیاهی در مقایسه با آفت‌کش‌های شیمیایی از مزایایی نظیر سمیت کمتر روی پستانداران و ارگانسیم‌های مفید، عملکرد و جایگاه تاثیر متنوع و کاهش بروز مقاومت، پایداری کم در محیط و داشتن اثرات انتخابی روی آفات هدف، برخوردارند (Isman, 2020; Pavela et al., 2020).

سیر با نام علمی *Allium sativum* L. متعلق به تیره‌ی Alliaceae، دارای اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی است که اثرات بیولوژیکی آن به دلیل ترکیبات مختلف از جمله مونو، دی و تری سولفیدها می‌باشد (Baumgartner et al., 2000; Dziri et al., 2014). اثرات کشندگی و دورکنندگی سیر به علت وجود ترکیبات گوگردی مانند آلپسین^۱ در ساختار آن می‌باشد که پیش‌ماده‌ی تولید ساپونین^۲، آلکالوئیدها^۳ و گلیکوزیدها^۴ است. از دیگر ترکیبات گوگردی می‌توان به دی-آلیل دی-سولفید^۵، دی-آلیل تری-سولفید^۶، دی‌آلیل سولفید^۷، متیل آلپل تری-سولفید^۸، دی‌متیل تری-سولفید^۹، نیل^۱ و ۲-دیتین^{۱۰} و

6- Diallyl trisulfide

7- Diallyl sulfide

8- Methyl allyl trisulfides

9- Dimethyl trisulfide

10- Vinyl and 2 dithiins

1- Allysine

2- Saponin

3- Alkaloid

4- Glycoside

5- Diallyl disulfide

می‌دهند. منشا این ترکیبات می‌تواند داخلی یا خارجی باشد که از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده این ترکیبات، اشعه ماورای بنفش، آفت‌کش‌ها، آلاینده‌های هوا، فلزات و برخی از مواد شیمیایی صنعتی می‌باشند (Davies & Dean, 1997). حشرات جهت مقابله با رادیکال‌ها، سامانه دفاعی آنتی‌اکسیدانی را گسترش داده‌اند (Felton & Summers, 1995). در حالت عادی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد و فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدانی تعادل وجود دارد؛ اما عواملی نظیر تنش‌های محیطی و ترکیبات سمی می‌توانند برهم‌زننده این تعادل باشند که در چنین شرایطی تولید ترکیبات اکسیدانی در بدن بالا رفته و باعث خسارت اکسیداتیو، آسیب سلولی و مرگ خواهد شد (Lalouette et al., 2011). در حشرات سامانه آنتی‌اکسیدانی با از بین بردن یا ممانعت از تشکیل رادیکال‌های آزاد، سلول‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداسیونی محافظت می‌کند (Felton & Summers, 1995). سامانه دفاعی آنتی‌اکسیدانی در حشرات به دو دسته آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شود که هر دو دسته در محیط درون و بیرون سلولی در سم‌زدایی و حذف متابولیت‌های حد واسط اکسیژنه موثرند (Lyakhovich et al., 2006). مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حشرات شامل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز^۲ و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل اسید آسکوربیک^۳، تیول^۴ و آلفا-توکوفرول^۵ می‌باشند (Dubovskiy et al., 2008). نظریه هزینه متابولیک پیشنهاد می‌کند که تغییرات متابولیک در یک موجود زنده با ایجاد تنش‌هایی از قبیل تغییرات آب و هوایی یا ترکیبات شیمیایی القا شود که نتیجه آن کاهش انرژی تخصیص یافته به روندهای فیزیولوژیک و متعاقب آن اختلال در رشد و تولیدمثل است (Calow & Sibly, 1990). کل ذخیره انرژی در بدن حشرات به صورت

متیل‌آلیل‌دی-سولفید^۱ اشاره کرد (Block et al., 1988; Rahman & Schmidt, 1999; Pino et al., 2001; Attia et al., 2012; Campbell et al., 2011; Plata-Rueda et al., 2017). در این بین، دی‌آلیل‌سولفید و دی‌آلیل‌دی‌سولفید کارایی حشره‌کشی مناسبی از خود نشان داده‌اند (Ho et al., 1996; Huang et al., 2000; Park & Shin, 2005; Kimbaris et al., 2009). به عنوان مثال، Plata-Rueda et al. (2017)، فعالیت حشره‌کشی اسانس سیر و ترکیبات موثره آن را روی *Tenebrio molitor* L. (Col.: Tenebrionidae) مطالعه کردند. میزان LC₅₀ و LC₉₀ اسانس سیر روی لارو، سفیره و حشره کامل به ترتیب برابر (۰/۷۷۱، ۱/۳۶۵)، (۲/۳۷۱، ۴/۰۱۶) و (۲/۰۳۲، ۴/۷۳۶) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بدست آمد. همچنین میزان LC₅₀ و LC₉₀ برای دو ترکیب دی‌آلیل‌سولفید روی لارو، سفیره و حشره کامل به ترتیب برابر، (۱۱۷/۱، ۲۲۲/۸)، (۴۸/۸۶، ۲۱۰/۵)، (۸۵/۹۷، ۲۴۷/۵) و دی‌آلیل‌دی‌سولفید برابر (۵۷/۶۸، ۱۵۴/۳)، (۵۵/۱۳، ۱۰۹/۱)، (۸۱/۵۲، ۱۶۸/۱) در ۴۸ ساعت محاسبه شد. علاوه بر این، اسانس سیر برای این حشره سمی بوده و دی‌آلیل‌دی‌سولفید سمیت بیشتری نسبت به دی‌آلیل‌سولفید داشته است. (Shahriari and Sahebzadeh, 2017) گزارش کردند که دی‌آلیل‌دی‌سولفید سمیت گوارشی بالایی (LC₅₀= 0.31 درصد) بر لاروهای سن چهارم Zeller *Ephestia kuehniella* (1879) داشته و غلظت LC₅₀ آن باعث اختلال در متابولیسم و کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان ذخایر انرژی لاروها گردید. در بسیاری از مواقع حشرات در معرض ترکیبات اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند که این ترکیبات به شدت واکنش‌زا بوده و با مولکول‌های مختلف واکنش

4- Thiol

5- α -توکوفرول

1- Methyl allyl disulfides

2- Ascorbate peroxidase

3- Ascorbic acid

غلظت‌های LC_{30} و LC_{50} دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید بر سامانه آنتی‌اکسیدانی و تخصیص انرژی لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی انجام شد تا اطلاعات بیشتری در مورد تأثیر این ترکیبات بر روند فیزیولوژیک لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی حاصل شود.

مواد و روش‌ها

پرورش

حشرات بالغ شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی از باغ‌های استان هرمزگان جمع‌آوری و درون قفس‌هایی به ابعاد $60 \times 60 \times 120$ سانتی‌متری روی بوته‌های رشد یافته گوجه‌فرنگی درون گلدان‌ها رها سازی شدند. دیواره‌ی این قفس‌ها توری و سقف آن‌ها شیشه‌ای بوده و در شرایط کنترل شده 25 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 60 تا 70 درصد و دوره نوری 8 ساعت تاریکی و 16 ساعت روشنایی نگهداری شدند. هر هفته گلدان‌های جدید به محیط پرورش اضافه شدند تا گیاه شاداب برای تخم‌ریزی و تغذیه لاروها فراهم باشد (Sohrabi et al., 2015). پرورش لاروها در همین شرایط کنترل شده تا رسیدن به سن دوم لاروی ادامه یافت.

زیست‌سنجی

آزمون زیست‌سنجی لاروها به روش دیسک برگ‌ی انجام شد. ابتدا آزمایش‌های مقدماتی به منظور به دست آوردن محدوده غلظت‌ها با کمینه تلفات 20 تا 25 درصد و بیشینه تلفات 80 تا 85 درصد روی لاروهای مینوز گوجه‌فرنگی انجام و سپس 5 غلظت با فاصله‌ی لگاریتمی (0.0625 ، 0.125 ، 0.25 ، 0.5 ، 1 و 2 درصد) از دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید انتخاب شدند. هر برگ (به قطر 8 سانتی‌متر) جداگانه به مدت 10 ثانیه در محلول سمی غوطه‌ور شده و برگ‌ها پس از 10 دقیقه به ظروف پتری به قطر هشت سانتی‌متری انتقال یافته و لاروهای سن دوم (هفت تا ده روزه) روی برگ‌ها قرار داده شدند (آزمایش در 3 تکرار و هر

انرژی در دسترس (E_a) است که نشان‌دهنده کل انرژی کسب شده از چربی، پروتئین، گلوکز و گلیکوژن است که تحت تأثیر عوامل مختلف تغییر می‌کند. مصرف انرژی (E_c) در شرایط اشباع سوبسترا اندازه‌گیری شده و تغییر در آن باید با مقدار آنزیم بدن موجود زنده محاسبه شود. به عبارت دیگر، مصرف انرژی فعالیت سامانه انتقال الکترون را نشان داده و تغییر در آن با برهمکنش ترکیب شیمیایی و سامانه انتقال الکترون مشخص می‌شود (Spicer & Weber, 1991; Oberdorster et al., 1998). در نتیجه روش CEA (Cellular Energy Allocation) یک پارامتر مناسب انرژی است که می‌تواند تأثیر ترکیبات شیمیایی را روی منابع مختلف انرژی و مقدار انرژی در دسترس را در موجود زنده نشان دهد. این روش بر مبنای تغییر در مقدار ذخایر انرژی (کربوهیدرات، پروتئین و چربی) و مصرف انرژی پایه‌گذاری شده و بر اساس تغییر در مقدار این ذخایر می‌تواند محاسبه شود (De Coen & Janssen, 1997).

محصولات شیمیایی گیاهی، به ویژه عصاره‌ها یا اسانس‌های گیاهی، به عنوان جایگزین‌های بالقوه آفت‌کش‌های مصنوعی برای کنترل حشرات آفات پیشنهاد شده است (Plata-Rueda et al., 2017). با توجه به سطح زیرکشت گوجه‌فرنگی و پراکنش گسترده این شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی، استفاده از ترکیبات شیمیایی سنتزی به دلیل مخاطرات زیستی و ایجاد مقاومت در این آفت مناسب به نظر نمی‌رسد. استفاده از ترکیبات با منشأ طبیعی به دلیل تجزیه سریع و کشندگی اختصاصی می‌تواند جایگزین‌های مناسبی برای ترکیبات شیمیایی به منظور کنترل مینوز گوجه‌فرنگی باشند. در پژوهش قبلی مشخص شد که دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید به طور تکی و مخلوط شده باعث مرگ و میر لاروهای مینوز گوجه‌فرنگی شده و کارایی تغذیه‌ای و متابولیسم حد واسط آنها را تحت تأثیر قرار دادند (Talepour et al., 2021). در پژوهش حاضر، تاثیر

دو در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار اسیدیتته ۷/۱ حل شدند) و ۲۰ میکرولیتر محلول زانتین اکسیداز (۱۰ میلی گرم آلومین گاوی و ۱۰۰ میکرولیتر زانتین اکسیداز که در دو میلی لیتر بافر فسفات حل شده‌اند) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری و سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد (McCord & Fridovich, 1969).

پروکسیداز

مخلوط واکنش شامل سه میلی لیتر پیروگالول (پیروگالول ۰/۵ مولار در بافر فسفات ۰/۱ مولار (اسیدیتته ۷)) و ۰/۵ میلی لیتر H_2O_2 یک درصد بود. جذب مخلوط واکنش هر ۳۰ ثانیه یک بار در طول مدت دو دقیقه در طول موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد (Addy & Goodman, 1972).

تعیین فعالیت آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز

فعالیت این آنزیم با روش (Balinsky and (1963) Bernstein, اندازه گیری شد. محلول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بافر تریس-هیدروکلرید ۰/۱ مولار (اسیدیتته ۸/۲)، $NADP^+$ ۰/۲ میلی مولار و کلرید منیزیم $MgCl_2^3$ ۰/۱ مولار همراه با آب و نمونه‌ی آنزیمی در داخل کووت ریخته شد. واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر گلوکز ۶-فسفات آغاز شده روند افزایش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر بررسی شد.

تعیین غلظت مالون دی آلدید MDA

فرآیند پراکسیداسیون لیپید، در نهایت منجر به تشکیل MDA می‌شود. به منظور دستیابی به غلظت MDA، از روش اندازه گیری تیوباربتوریک اسید^۵ TBA با کمی تغییرات استفاده خواهد شد (Bar-Or et al., 2001). ۱۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد با ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط شد. مخلوط واکنش در ۱۵۰۰۰

تکرار شامل ۱۰ عدد لارو بود). لاروهای شاهد روی دیسک‌های برگ‌ی غوطه‌ور شده در حلال (آب مقطر و استون به نسبت ۴ به ۱) قرار گرفتند. طی ۲۴ ساعت پس از تیمار، میزان مرگ و میر لاروها شمارش و با نرم‌افزار POLO-Plus میزان LC_{50} محاسبه شد.

تیمار لاروهای برای ارزیابی سامانه آنتی اکسیدانی و تخصیص انرژی

ابتدا، لاروهای سن دوم مینوز گوجه‌فرنگی به طور جداگانه با غلظت‌های LC_{30} و LC_{50} دی آلیل سولفید (۰/۲۳۵ و ۰/۵۱۸ درصد) و دی آلیل دی سولفید (۰/۱۸۴ و ۰/۳۹۰ درصد) به صورت غوطه‌وری برگ تیمار شدند. لاروهای شاهد فقط با حلال (آب مقطر و استون به نسبت ۴ به ۱) تغذیه شده و در هر تیمار به طور جداگانه از ۶۰ لارو سن دوم استفاده شد (۳۰ لارو برای آنتی اکسیدان و ۳۰ لارو برای تخصیص انرژی). پس از ۲۴ ساعت، لاروهای تیمار و شاهد به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شده و هر گروه در آب مقطر هموزنایز شدند. نمونه‌ها در $20000 \times g$ ، دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رونشین برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده شد.

کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش (Wang et (2001) al. محاسبه شد که طی آن، ۵۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن یک درصد به عنوان سوبسترا، به پنج میکرولیتر از نمونه آنزیمی اضافه شده و مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس آنکوبه شد. در نهایت، کاهش جذب مخلوط واکنش در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد.

سوپراکسید دیسموتاز

مقدار ۸۰ میکرولیتر نمونه به ۵۰۰ میکرولیتر مخلوط واکنش (۷۰ میکرولیتر NBT^۱ و ۱۲۵ میکرولیتر زانتین که هر

4- Malondialdehyde
5- Thiobarbituric acid

1- Nitro blue tetrazolium
2- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
3- Magnesium chloride

دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس سانتیفریوژ شده بود. محلول روشن به ۱۰۰ میکرولیتر معرف تیوباربتوریک اسید ۰/۸ درصد اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. جذب کروموفور در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. غلظت MDA شامل نانومول‌های MDA تولیدشده به ازای هر میلی‌گرم پروتئین است.

مصرف انرژی

ارزیابی مصرف انرژی (CEA) طبق روش Yuval et al. (1998) و (2004) Verslycke et al. با اندکی تغییر انجام شد. CEA پس از تعیین Ea و Ec با فرمول ذیل محاسبه شد:

$$Ea = \sum (\text{glucose, total lipid, glycogen and total protein}) (\text{mj mg}^{-1} \text{wet wt h}^{-1})$$

$$Ec = \text{ETS activity} (\text{mj mg}^{-1} \text{wet wt h}^{-1})$$

$$CEA = Ea/Ec$$

ارزیابی میزان ذخایر انرژی؛ لپید کل، گلوکز و گلیکوژن، پس از همگنه‌سازی لاروها در ۴۰۰ میکرولیتر Na_2SO_4 ۲ درصد با استفاده از هموژنایزر دستی انجام شد. پس از افزودن ۱۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم؛ متانول (۱:۲، حجم: حجم) به مخلوط، در ۸۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. مایع روشن بدست آمده برای ارزیابی تری‌گلسرید و گلوکز و ته‌نشین برای ارزیابی میزان گلیکوژن مورد استفاده قرار گرفت. بافر همگنه‌سازی برای ارزیابی پروتئین و سامانه کل انتقال الکترون (ETS) مخلوط بافر تریس-هیدروکلرید (۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۵)، ۱۵ درصد (وزن/حجم محلول نهایی) پلی‌وینیل‌پیرولیدون، ۱۵۳ میکرومولار MgSO_4 و ۰/۲ درصد (وزن/حجم) Triton X-100 بود. پس از سانتیفریوژ کردن، مایع روشن بدست آمده برای ارزیابی میزان پروتئین کل و فعالیت سامانه انتقال الکترون استفاده شد (Yuval et al., 1998; Verslycke et al., 2004).

اندازه‌گیری لپید

پنجاه میکرولیتر از مایع روشن حاصل در ۹۰ درجه‌ی سلسیوس خشک شده و پس از ۱۰ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر

H_2SO_4 به آن اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه به ۱۳۵ میکرولیتر معرف وانیلین در هر چاهک میکروپلیت اضافه شده و برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شده و در نهایت جذب نوری در ۵۳۰ نانومتر خوانده شد (معرف وانیلین با استفاده از حل کردن ۶۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۴۰۰ میلی‌لیتر H_3PO_4 ۸۵ درصد تهیه شد). منحنی استاندارد برای ارزیابی میزان لپید با استفاده از کلسترول به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد (van Handel & Day, 1988).

اندازه‌گیری گلوکز

سنجش مقدار گلوکز با افزودن ۳۰ میکرولیتر سوپرناتانت به ۲۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف آنترون انجام شد. سپس نمونه در آب در حال جوش برای ۱۵ دقیقه گرم شده و پس از سرد شدن، جذب در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف گلوکز به عنوان استاندارد استفاده شد (Yuval et al., 1998).

ارزیابی فعالیت انتقال الکترون

مخلوطی از ۱۲/۵ میکرولیتر بافر همگن‌سازی، ۷۵ میکرولیتر محلول سوپرناتانت بافری (بافر تریس هیدروکلراید ۰/۱۳ مولار حاوی ۰/۳ درصد وزن/حجم؛ Triton X100، اسیدیته ۸/۵)، ۲۵ میکرولیتر مخلوط نیکوتین‌امید آدنین‌دی‌نوکلئوتید (NADH) (۱/۷ میلی‌مولار) و نیکوتین‌امید آدنین‌دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) (۲۵۰ میکرومولار) و ۵۰ میکرولیتر نیتروترازیولوم (۸ میلی‌مولار) به ۱۲/۵ میکرولیتر از نمونه اضافه شد. جذب واکنش به طور پیوسته در ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Verslycke et al., 2004; Bagheri et al., 2010).

محاسبه‌ی Ec:

اجزای مختلف ذخایر انرژی به معادلات انرژی تبدیل شد. معادل این ذخایر انرژی احتراق است که شامل ۱۷۵۰۰ میلی‌ژول/ میلی‌گرم گلیکوژن و قند، ۲۴۰۰۰ میلی‌ژول/

بیشترین فعالیت گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز در لاروهای تیمار شده با غلظت LC_{50} هر دو ترکیب مشاهده شد و کمترین فعالیت نیز در لاروهای تیمار شده با غلظت‌های LC_{30} ثبت شد (شکل ۲، $Pr>f= 39.78$; $p \leq 0.0001$; $df=4, 10$). در نهایت، غلظت مالون‌دی‌آلدهید در لاروهای تیمار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را داشت و بیشترین فعالیت در غلظت LC_{50} هر دو ترکیب مشاهده شد (شکل ۲، $Pr>f= 65.63$; $p \leq 0.0001$; $df=4, 10$).

مقدار تخصیص انرژی در لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی تیمار شده با دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. کمترین مقدار در لاروهای تیمار شده با غلظت LC_{50} دی‌آلیل دی‌سولفید مشاهده شد؛ اما تفاوت معنی‌داری در این مقدار بین سایر تیمارها وجود نداشت (شکل ۳، $Pr>f= 104.28$; $p \leq 0.0001$; $df=4, 10$).

بحث

سامانه آنتی‌اکسیدان برای حفاظت از سلول‌های موجودات زنده در برابر مولکول‌های حد واسطه اکسیژنه ضروری است تا از پراکسیداسیون چربی‌ها، تخریب پروتئین و DNA جلوگیری کند (Felton & Summers, 1995; Dubovskiy et al., 2008). آنتی‌اکسیدان‌های متعددی در این روند درگیر هستند که می‌توان به کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز، گلوکاتایون پراکسیداز در کنار ترکیبات غیرآنتی‌اکسیدان‌ها همچون آسکوربیک اسید، تیول‌ها و آلفا توکوفرول‌ها اشاره کرد (Fridovich, 1978; Dubovskiy et al., 2008). در این پژوهش مشخص شد که فعالیت سه آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در لاروهای تیمار شده با دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید بویژه در غلظت LC_{50} بیشتر از شاهد بود.

میلی گرم پروتئین و ۳۹۵۰۰ میلی ژول / میلی گرم لیپید است. Ec بوسیله‌ی فرمول ذیل براساس فعالیت انتقال الکترون به معادل مصرف انرژی محاسبه خواهد شد. از دیدگاه نظری، تشکیل ۲ میکرولیتر فرمازان، ۱ میکرومول O_2 استفاده خواهد شد (King & Pakard, 1975).

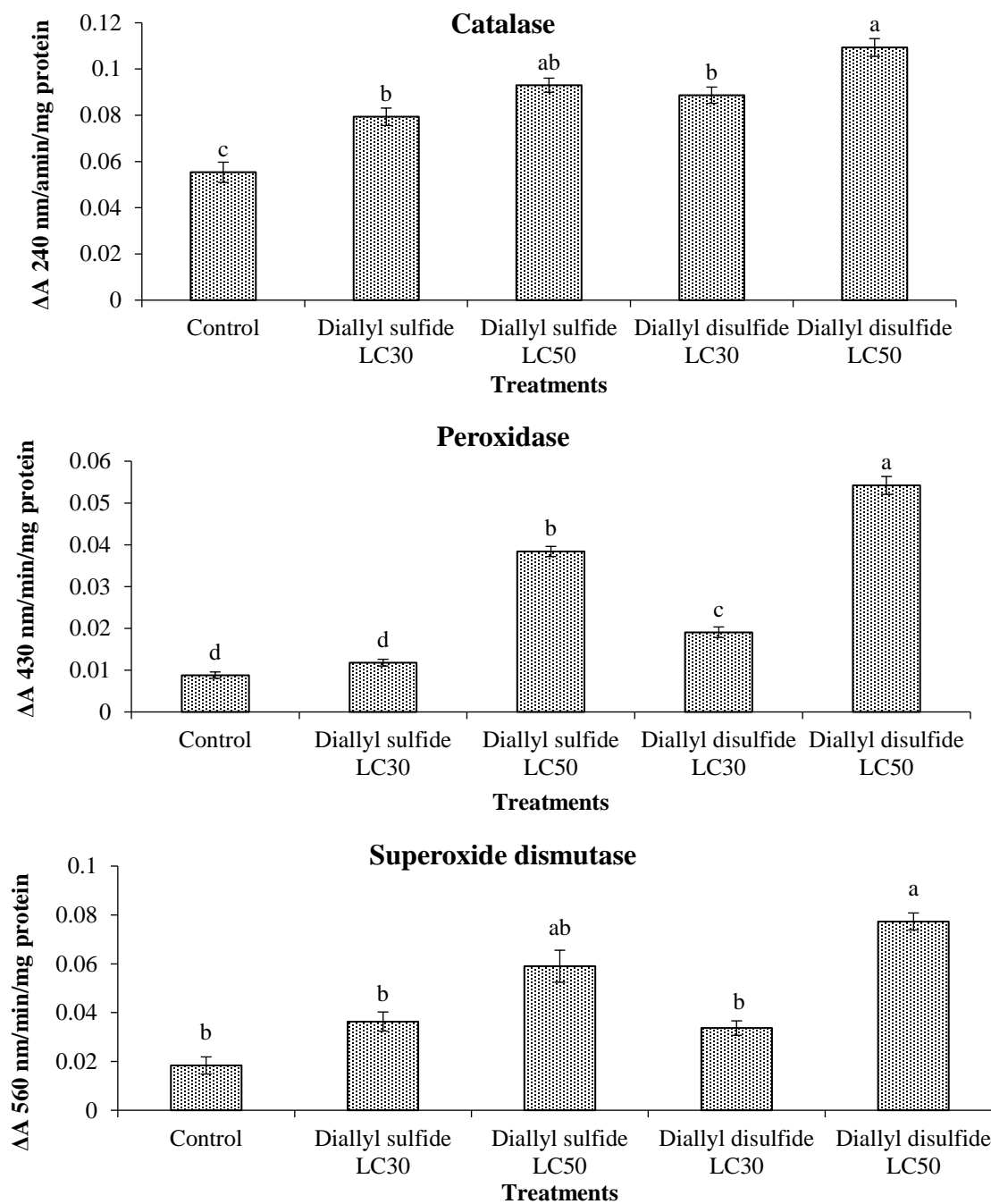
که V_r = ظرفیت واکنش پایانی؛ V_h = نمونه اصلی (ظرفیت کلی نمونه)؛ V_a = کسری مایع روشن‌نشین استفاده شده در مخلوط واکنش)

تجزیه آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ و مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

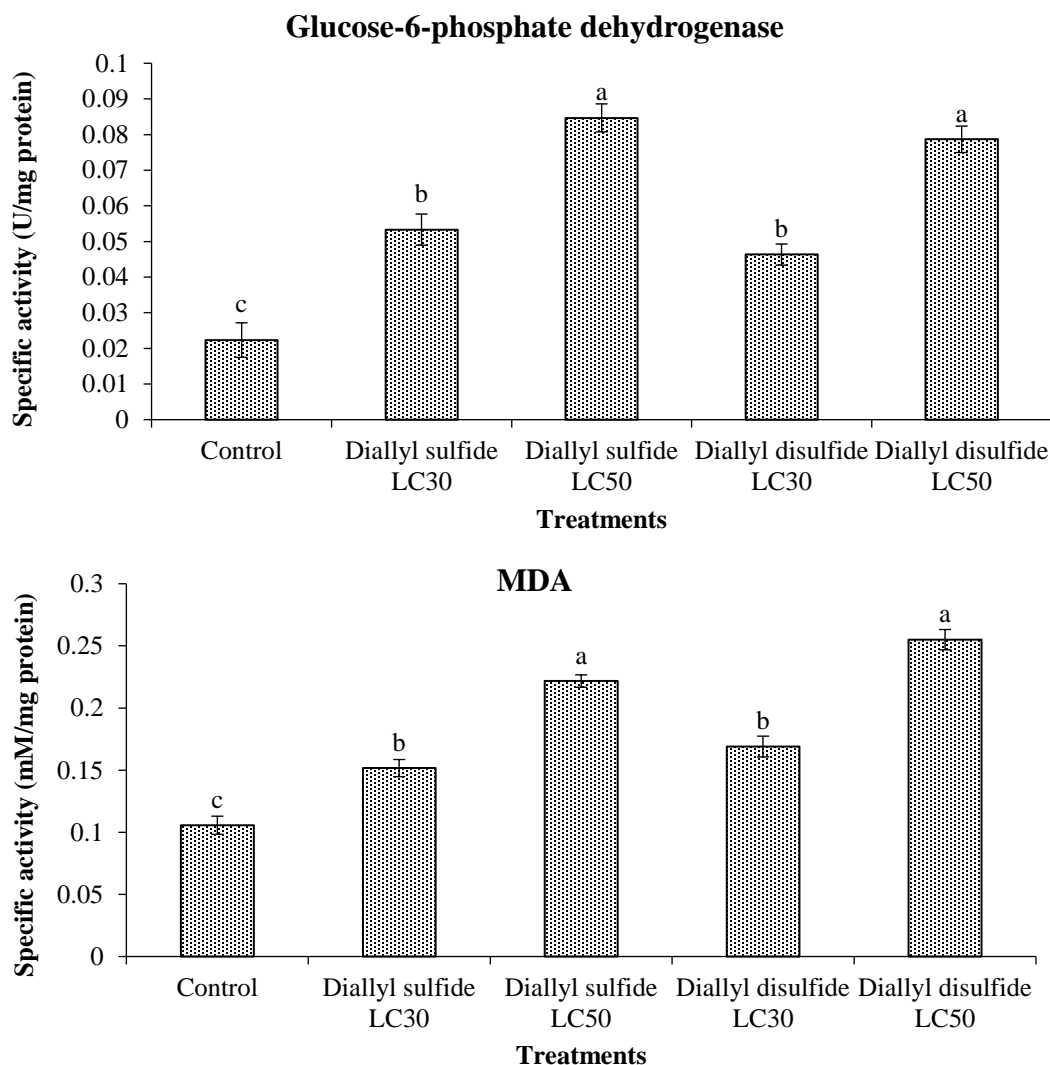
نتایج

تغذیه لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی از برگ‌های آغشته به آلیل دی‌سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید سبب تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. فعالیت کاتالاز در لاروهای تیمار به طور معنی‌داری بیشتر از لاروهای شاهد بود. بیشترین فعالیت در تیمار LC_{50} با دی‌آلیل دی‌سولفید مشاهده شد و بین دو تیمار LC_{30} دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱، $Pr>f= 28.33$; $p \leq 0.0001$; $df=4, 10$). فعالیت پراکسیداز لاروهای تیمار نیز به جز غلظت LC_{30} دی‌آلیل سولفید نسبت به شاهد افزایش یافت و بیشترین فعالیت در تیمار LC_{50} با دی‌آلیل دی‌سولفید مشاهده شد (شکل ۱، $Pr>f= 208.64$; $p \leq 0.0001$; $df=4, 10$). اگرچه بیشترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در لاروهای تیمار شده با غلظت LC_{50} با دی‌آلیل دی‌سولفید مشاهده شد؛ اما تفاوت معنی‌داری در غلظت‌های LC_{30} دو ترکیب مورد استفاده نسبت به لاروهای شاهد وجود نداشت (شکل ۱، $Pr>f= 29.37$; $p \leq 0.0001$; $df=4, 10$).



شکل ۱- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان؛ کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در لاروهای *Tuta absoluta* شاهد و تیمار شده با دی‌آلیل‌سولفید و دی‌آلیل‌دی‌سولفید. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف مشخص شده‌اند (آزمون توکی، $p \leq 0.05$).

Figure 1. Activities of the antioxidant enzymes; Catalase, Peroxidase and superoxide dismutase in the control and treated *Tuta absoluta* larvae by diallyl sulfide and diallyl disulfide. Statistical differences have been marked with different letters (Tukey test, $p \leq 0.05$).



شکل ۲- فعالیت گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز و غلظت مالون دی آلدئید در لاروهای *Tuta absoluta* شاهد و تیمار شده با دی آلایل سولفید و دی آلایل دی سولفید. تفاوت های آماری با حروف مختلف مشخص شده اند (آزمون توکی، $p \leq 0.05$).

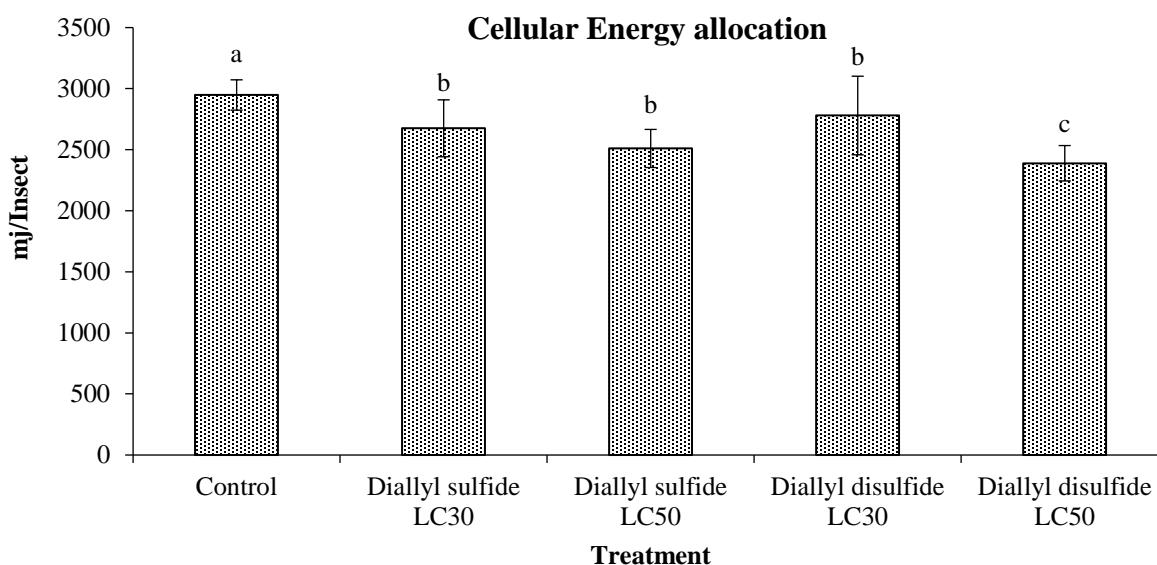
Figure 2. The activity of Glucose-6-phosphate dehydrogenase and Malondialdehyde concentration in the control and treated *Tuta absoluta* larvae by diallyl sulfide and diallyl disulfide. Statistical differences have been marked with different letters (Tukey test, $p \leq 0.05$).

اکسیداتیو در این لاروهاست. به عبارت دیگر، تغذیه لاروهای شب پره مینوز گوجه فرنگی از دی آلایل سولفید و دی آلایل دی سولفید سبب افزایش مقادیر رادیکال های سوپراکسید و همچنین پراکسید هیدروژن شده و در نتیجه، فعالیت آنزیم های مرتبط با آنها افزایش پیدا کرده است. از طرف دیگر، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نیز می تواند

سوپراکسید دیسموتاز رادیکال O_2 را به H_2O_2 تبدیل می کند؛ در حالی که کاتالاز و پراکسیداز مولکول اخیر را به آب تبدیل می کنند که نقش مهمی در حفاظت از موجودات زنده در برابر رادیکال های آزاد اکسیژنه دارند (Felton & Summers, 1995). القای فعالیت این آنزیم ها در حشرات تیمار شده بسته به نوع و غلظت ماده مصرفی نشانگر تنش

فعالیت سوپراکسیددیسموتاز وجود نداشت. Wei et al. (2015) با تیمار تغذیه‌ای اسانس *Chenopodium ambrosioides* L. و دو ماده موثره آن، α -terpinene و p-cymene، علیه شب‌پره پشت الماسی *Plutella xylostella* L. (Lep.: Plutellidae) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید-دیسموتاز به نسبت لاروهای شاهد افزایش یافت. تیمار تغذیه‌ای لاروهای بید آرد با مواد موثره آلفا-پینن، ترانس آنتول و تیمول سبب القای فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت به لاروهای شاهد شد (Shahriari et al., 2018). در پژوهشی دیگر، اسانس گیاهان سیر و اکالیپتوس باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در لاروهای سن چهارم بید آرد شدند (Shahriari et al., 2019).

مرتبط با افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و تولید مولکول‌های پراکسید هیدروژن ناشی از فعالیت این آنزیم در لاروهای تیمار است. در چندین گزارش نشان داده شده است که ترکیبات با منشأ گیاهی سبب القای فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حشرات می‌شوند. Aucoin et al. (1991) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در لاروهای *Asota plagiata* (Walker (Lep.: Noctuidae) تغذیه شده از هایپرینین که نوعی ترکیب شیمیایی گیاهی است افزایش معنی‌داری داشته است. (Figuerola et al. (1999) افزایش دو برابری فعالیت آنزیم کاتالاز را در شته یولاف تغذیه شده از ماده Dimboa را نسبت به شاهد نشان دادند. Pinho et al. (2014) افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را در لاروهای مگس سرکه تیمار شده با اسانس *Psidium guajava* (Myrtaceae) گزارش کردند اگرچه فعالیت معنی‌داری در



شکل ۳- تخصیص انرژی سلولی در لاروهای *Tuta absoluta* تیمار شده با دی‌آلیل سولفید و دی‌آلیل دی‌سولفید در مقایسه با شاهد. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف مشخص شده‌اند (ازمون توکی، $p \leq 0.05$).

Figure 3. Cellular energy allocation in *Tuta absoluta* larvae treated with diallyl sulfide and diallyl disulfide compared to control. Statistical differences have been marked with different letters (Tukey test, $p \leq 0.05$).

افزایش میزان مالون دی آلدئید به عنوان محصول نهایی این اکسیداسیون نشان دهنده تخریب و افزایش نفوذپذیری غشاء سلول هاست (Wang et al., 2001). بنابراین مالون دی آلدئید به عنوان معرف بررسی صدمه به غشاء در شرایط تنش مورد استفاده قرار می گیرد و شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون چربی غشاء محسوب می شود (Rael et al., 2004). نتایج حاضر مشابه دو پژوهش قبلی (Shahriari et al., 2018, 2019) نشان می دهند که ترکیبات موثره گیاهی باعث افزایش تنش اکسیداتیو به همراه پراکسیداسیون چربی می شوند.

انرژی در دسترس برای یک موجود زنده به کل انرژی حاصل از محتوای لیپید، پروتئین، کربوهیدرات و گلیکوژن اشاره دارد که تحت تأثیر عواملی نظیر نوع تغذیه، فعالیت زیستی و حضور مواد تنش زا مثل آفت کش ها و بیمارگران اشاره دارد. از سوی دیگر، تعیین میزان مصرف انرژی در موجودات زنده با اندازه گیری سامانه انتقال الکترون و مصرف اکسیژن برآورد می شود، هر نوع تغییر این مقدار با تغییر در مصرف اکسیژن مرتبط است (Verslycke et al., 2004). بنابراین، کاهش مصرف انرژی در لاروهای تیمار شده با دی آلیل سولفید و دی آلیل دی سولفید ممکن است به اختلال در فرآیند تامین انرژی، کاهش ذخایر غذایی (Talepour et al., 2021) و روندهای متابولیسم حدواسط مرتبط باشد. پژوهش های زیادی در مورد تاثیر ترکیبات گیاهی بر مصرف انرژی حشرات وجود نداشته و اطلاعات به سایر ترکیبات شیمیایی محدود می شود. تنها مورد مشابه تغییر تخصیص انرژی وابسته به غلظت ترکیب شیمیایی به بررسی های Bagheri et al. (2010) مربوط می شد که نشان دادند تغییر در میزان انرژی مصرفی در غلظت های مختلف پیری پروکسی فن علیه سن سبز پنبه، *Nezara viridula* L. (Hem.: Pentatomidae)، با تغییر مقدار ذخایر غذایی مرتبط است.

گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز دیگر آنزیم موثر در حذف عوامل اکسیداتیو در سیتوزول است که هنگام کاهش NADPH به NADP⁺ تولید می شوند. افزایش فعالیت این آنزیم در لاروهای شب پره مینوز گوجه فرنگی تیمار شده با دی آلیل سولفید و دی آلیل دی سولفید نشانگر اعمال تنش اکسیداتیو به بافت های بدن و تقاضای انرژی برای ترمیم تنش یا صدمه وارد شده ناشی از ماده شیمیایی است. تنش اکسیداتیو سبب پراکسیداسیون چربی ها و پراکسیداسیون آسکوربات و تولید H₂O₂ توسط آسکوربات پراکسیداز می شود که جهت خنثی کردن اثرات منفی باید سنتز و فعالیت گلوکز- ۶- فسفات دهیدروژناز افزایش یابد تا با تسریع انتقال الکترون از طریق کاهش NADPH به NADP⁺ از انتقال الکترون به رادیکال های آزاد ممانعت شود (Barbehenn et al., 2001). در بررسی (Shahriari et al., 2018) غلظت LC₅₀ ترکیبات تیمول، آلفا پینن و ترانس آنتول باعث افزایش معنی دار میزان فعالیت گلوکز- ۶- فسفات دهیدروژناز و آسکوربات پراکسیداز در لاروهای بید آرد شد. علاوه بر این، مالون دی آلدئید نوعی ترکیب آلی است که به طور طبیعی در محیط های طبیعی وجود داشته و غلظت آن به تنش اکسیداتیو ارتباط دارد. تولید این ماده در نتیجه پراکسیداسیون چربی ها صورت می گیرد که می تواند به نقش رادیکال های آزاد اکسیژنه در تجزیه چربی های اشباع نشده دیواره سلولی مرتبط باشد (Wang et al., 2001; Dubiovsky et al., 2008). افزایش غلظت این ماده در لاروها پس از تیمار دو ماده موثره که در غلظت LC₅₀ نسبت به LC₃₀ نیز بیشتر بود که نشانگر مرگ سلولی و تجزیه چربی های غشای سلول ها است که طی آن چربی های غشا پراکسیده شده و با تولید رادیکال های آزاد تنش اکسیداتیو را در لاروهای تیمار القا کرده اند. ایجاد گونه های فعال اکسیژن در تنش های مختلف می تواند باعث پراکسیداسیون چربی های غشاء شده که

نتیجه‌گیری نهایی

حشره‌کش‌های گیاهی امروزه جایگاه مهمی در کنترل حشرات آفت پیدا کرده‌اند. لذا لزوم معرفی ترکیبات جدید و موثر در این عرصه بسیار حائز اهمیت خواهد بود. در پژوهش حاضر، دو ترکیب دی-آلیل دی-سولفید و دی-آلیل سولفید از طریق پراکسیداسیون چربی‌ها و تنش اکسیداتیو، باعث افزایش فعالیت سامانه‌ی آنتی‌اکسیدانی در لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی شده و مقدار انرژی مورد نیاز جهت فعالیت‌های متابولیکی در لاروها افزایش و انرژی در دسترس بدن کاهش یافت. امروزه استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی ضمن داشتن بقایا در محصولات کشاورزی منجر به آلودگی محیط زیست و تأثیر روی موجودات غیرهدف می‌شوند. استفاده از آفت‌کش‌های طبیعی هم‌چون

متابولیت‌های گیاهی، می‌تواند یکی از روش‌های ایمن و سازگار با محیط زیست در کنترل آفت کشاورزی باشد. با توجه به نتایج حاضر، به نظر می‌رسد طراحی آزمایش‌های صحرائی با در نظر کشندگی این ترکیبات روی شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی و نقش آن‌ها در کاهش خسارت محصول در مقایسه با مزارع شاهد صورت گیرد. علاوه بر این، می‌توان کارایی و تلفیق این ترکیبات را با سایر روش‌های کنترل در مزرعه مقایسه کرد تا بتوان محصولی سالم و با حداقل خسارت آفت را ارائه کرد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به دلیل حمایت از این پژوهش قدردانی می‌شود.

References

- Addy, S. K., & Goodman, R. N. (1972). Polyphenol oxidase and peroxidase in apple leaves inoculated with a virulent or an avirulent strain for *Ervinia amylovora*. *Indian phytopathology*, 25, 575–579.
- Attia, S., Grissa, K. L., Maillieux, A. C., Lognay, G., Heuskin, S., Mayoufi, S., & Hance, T. (2012). Effective concentrations of garlic distillate (*Allium sativum*) for the control of *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *Journal of Applied Entomology*, 136(4), 302-312. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01640.x>.
- Aucoin, R. R., Philoghe, J. R. B., & Arnason, J. T. (1991). Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous Lepidoptera. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 16, 139–152. <https://doi.org/10.1002/arch.940160206>.
- Bagheri, F., Talebi, K., & Hosseininaveh, V. (2010). Cellular energy allocation of pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera.: Pentatomidae) in relation to juvenoid pyriproxyfen. *African Journal of Biotechnology*, 9(35), 1-8.
- Bala, I., Mukhtar, M., Saka, H., Abdullahi., N., & Ibrahim, S. (2019). Determination of insecticide susceptibility of field populations of tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) in Northern Nigeria. *Agriculture*, 9, 7; doi:10.3390/agriculture9010007.

- Balinsky, D., & Bernstein, R. E. (1963). The purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 67, 313- 315. [https://doi.org/10.1016/0926-6569\(63\)90239-6](https://doi.org/10.1016/0926-6569(63)90239-6).
- Barati, R., Hejazi, M., & Mohammadi, A. (2018). Insecticide Susceptibility in *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) and Metabolic Characterization of Resistance to Diazinon. *Journal of Economic Entomology*, 111(4), 1551–1557. <https://doi.org/10.1093/jee/toy134>.
- Barbehenn, R. V., Bumgarner, S. L., Roosen, E. F., & Martin, M. M. (2001). Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of insect physiology* 47(4–5), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00125-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00125-6).
- Bar-Or, D., Rael, L. T., Lau, E. P., Rao, N. K., Thomas, G. W., Winkler, J. V., & Curtis, C. G. (2001). An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(3), 856-862. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5042>.
- Baumgartner, S., Dax, T. G., Praznik, W., & Falk, H. (2000). Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). *Carbohydrate Research*, 328(2), 177-183. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00097-5).
- Block, E., Iyer, R., Grisoni, S., Saha, C., Belman, S., & Lossing, F. P. (1988). Lipoxygenase inhibitors from the essential oil of garlic. Markovnikov addition of the allyldithio radical to olefins. *Journal of the American Chemical Society*, 110(23), 7813-7827. <https://doi.org/10.1021/ja00231a037>.
- Calow, P., and Sibly, R. (1990). A physiological basis of population processes. Ecotoxicological implications. *Functional Ecology*, 4, 283-288.
- Campbell, C., Gries, R., Khaskin, G., & Gries, G. (2011). Organosulphur constituents in garlic oil elicit antennal and behavioural responses from the yellow fever mosquito. *Journal of Applied Entomology*, 135(5), 374-381. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01570.x>.
- De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing: IV. Cellular Energy Allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicantstressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem*, 6, 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., González-Cabrera, J., Ruescas, D. C., Tabone, E., & Frandon, J. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83(3), 197-215. <https://doi.org/10.1007/s10340-010-0321-6>.
- Dubovskiy, I. M., Martemyanov, V. V., Vorontsova, Y. L., Rantala, M. J., Gryzanova, E. V., & Glupov, V. V. (2008). Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 148, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.02.003>.

Dziri, S., Casabianca, H., Hanchi, B. & Hosni, K. (2014). Composition of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) as influenced by drying method. *Journal of Essential Oil Research*, 26(2), 91-96. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.868329>.

Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2, 187-197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-879.

Ho, S. H., Koh, L., Ma, Y., Huang, Y., & Sim, K. Y. (1996). The oil of garlic, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), as a potential grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Postharvest Biology and Technology*, 9, 41-48. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(96\)00018-X](https://doi.org/10.1016/0925-5214(96)00018-X).

Gharekhani, G. H., & Salek-Ebrahimi, H. (2014) Evaluating the damage of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on some cultivars of tomato under greenhouse condition. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47, 429-436.

Huang, Y., Chen, S. X., & Ho, S. H. (2000). Bioactivities of methyl allyl disulfide and diallyl trisulfide from essential oil of garlic to two species of stored-product pests, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 93, 537-543. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.537>.

Kimbaris, A. C., Kioulos, E., Koliopoulos, G., Polissiou, M. G., & Michaelakis, A. (2009). Coactivity of sulfide ingredients: a new perspective of the larvicidal activity of garlic essential oil against mosquitoes. *Pest Management Science*, 65, 249-254. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010>.

Isman, M. B. (2020). Botanical insecticides in the twenty-first century—fulfilling their promise? *Annual Review of Entomology*, 65, 233-249. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010>.

Lalouette, L., Williams, C. M., Hervant, F., Sinclair, B. J., & Renault, D. (2011). Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 158, 229-234. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.007>.

Lyakhovich, V. V., Vavilin, V. A., Zenkov, N. K., & Menshchikova, E. B. (2006). Active defense under oxidative stress. *The antioxidant responsive element. Biochemistry*, 71, 962-1183.

Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Colares, H. C., Campos, J. M., Dos Santos, M. H., Fernandes, F. L., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2018). Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Bulletin of Entomological Research*, 108, 716-725. <https://doi.org/10.1017/S0007485317001262>.

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of biological chemistry*, 244, 6049-6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).

Oberdorster, E., Rittschof, D., & McClellan-Green, P. (1998). Induction of cytochrome P450 3A and heat shock protein by tributyltin in blue crab, *Callinectes sapidus*. *Aquatic Toxicology*, 41, 83-100. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00067-2).

Park, I. K., & Shin, S. C. (2005). Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4388-4392. <https://doi.org/10.1021/jf050393r>.

Pavela, R., Maggi, F., Petrelli, R., Cappellacci, L., Buccioni, M., Palmieri, A., Canale, A., & Benelli, G. (2020). Outstanding insecticidal activity and sublethal effects of *Carlina acaulis* root essential oil on the housefly, *Musca domestica*, with insights on its toxicity on human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 111037. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111037>.

Pinho, A. I., Wallau, G. L., Nunes, M. E. M., Leite, N. F., Tintino, S. R., Da Cruz, L. C., Da Cunha, F. A. B., Da Costa, J. G. M., Douglas Melo Coutinho, H., Posser, T., & Franco, J. L. (2014). Fumigant activity of the *Psidium guajava* var. pomifera (Myrtaceae) essential oil in *Drosophila melanogaster* by means of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/696785>.

Pino, J. A., Fuentes, V., & Correa, M. T. (2001). Volatile constituents of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl. ex Sprengel) and rakkyo (*Allium chinense* G. Don). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1328-1330. <https://doi.org/10.1021/jf9907034>.

Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., Dos Santos, M. H., Fernandes, F. L., Wilcken, C. F., Soares, M. A., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2017). Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Reports*, 7, 46406. <https://doi.org/10.1038/srep46406>.

Rahman, M. M., & Schmidt, G. H. (1999). Effect of *Acorus calamus* L. (Aceraceae) essential oil vapours from various origins on *Callosobruchus phaseoli* (Col.: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 35(3), 285-295. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(99\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(99)00012-0).

Rael, L. T., Thomas, G. W., Craun, M. L., Curtis, C. G., Bar-Or, R., & Bar-Or, D. (2004). Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. *BMB Reports*, 37(6), 749-752. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2004.37.6.749>.

Roditakis, E., Vasakis, E., Grispou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M., & Bassi, A. (2015). First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *Journal of Pest Science*, <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0643-5>.

Shahriari, M., & Sahebzadeh, N. (2017). Effect of diallyl disulfide on physiological performance of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50, 33-46. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1253252>.

Shahriari, M., Zibae, A., Sahebzadeh, N., & Shamakhi, L. (2018). Effects of α-pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 150, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.06.015>.

Shahriari, M., Zibae, A., Shamakhi, L., Sahebzadeh, N., Naseri, D., & Hoda, H. (2019). Bio-efficacy and physiological effects of *Eucalyptus globulus* and *Allium sativum* essential oils against *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Toxin reviews*, 1-12. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1554588>.

Shalaby, H. H., Faragalla F. H., El-Saadany H. M., & Ibrahim A. A. (2013). Efficacy of three entomopathogenic agents for control the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Nature and Science*, 11(7), 63-72.

Sohrabi, F., Modaresi, M., & Hosseini, S. J. (2015) Sensitivity evaluation of different developmental stages of Tomato leafminer to different insecticides in the laboratory conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 38(3), 1-12.

Spicer, J. I., & Weber, R. E. (1991). Respiratory impairment in crustaceans and mollusks due to exposure to heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 100, 339-342.

Talepour, F., Zibae, A., Askarysiahoei, M., & Sendi, J. J. (2021) Toxicity and Physiological effects of Diallyl sulfide and Diallyl disulfide on *Tuta absoluta* Meyrick. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101741

Van Handel, E., & Day, J. F. (1988). Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field collected *Aedes vexans*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 4, 549-550.

Verslycke, T., Roast, S. D., Widdows, J., Jones, M. B., & Janssen, C. R. (2004). Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyri-fos exposure: a method comparison. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.022>.

Viglianco, A. I., Novo, R. J., Cragolini, C. I., Nassetta, M., & Cavallo, E. A. (2008). Antifeedant and repellent effects of extracts of three plant from Cordoba (Argentina) against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Bioassay*, 3(4), 1–6.

Wang, Y., Oberley, L. W., & Murhammer, D. W. (2001). Evidence of oxidative stress following the viral infection of two Lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (11), 1448–1455. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00728-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00728-6).

Wang, Y., Zhang, L. T., Feng, Y. X., Guo, S. S., Pang, X., Zhang, D., Geng, Z. F., & Du, S. S. (2019). Insecticidal and repellent efficacy against stored-product insects of oxygenated monoterpenes and 2-dodecanone of the essential oil from *Zanthoxylum planispinum* var. *dintanensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 24988–24997. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05765-z>.

Wei, H., Liu, J., Li, B., Zhan, Z. H., Chen, Y., Tian, H., Lin, S., & Gu, X. (2015). The toxicity and physiological effect of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection*, 76, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.06.013>.

Yuval, B., Kaspi, R., Shloush, S., & Warburg, M. S. (1998). Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecological Entomology*, 23, 211-215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.1998.00118.x>.



© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



Effects of diallyl sulfide and diallyl disulfide on the antioxidant system and energy allocation of Tomato leafminer larvae, *Tuta absoluta* Meyrick

F. Talepour¹, A. Zibae^{2*}, M. Askari Seyahooei³ and J. Jalali Sendi⁴

1. Ph.D. student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. * **Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (arash.zibae@guilan.ac.ir)
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Bandar Abbas, Iran
4. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 1 November 2021

Accepted: 1 December 2021

Abstract

Background and Objectives

Tuta absoluta Meyrick (Lep.: Gelechidae) has recently caused significant damages to tomato production in greenhouses and fields, necessitating sustainable and efficient management. Garlic has antimicrobial and antioxidant properties due to the presence of various compounds such as mono, di, and trisulfides. Meanwhile, diallyl sulfide and diallyl disulfide have demonstrated effective insecticidal activity against various insects. Due to their rapid decomposition and almost specific lethality, natural compounds may be a viable alternative to chemical compounds in the control of tomato leafminer. The purpose of this study was to determine the effect of diallyl sulfide and diallyl disulfide LC30 and LC50 concentrations on the antioxidant system and energy allocation of tomato leafminer.

Materials and Methods

The leaf disc method was used to conduct the larval bioassay. Initially, preliminary testing was performed to determine the final concentrations of 0.0625, 0.125, 0.5, 1, and 2%. Each leaf was submerged in the toxic solution for ten seconds before being transferred to 8 cm Petri dishes. Then, second instar larvae (seven to ten days old) were placed on the leaves and allowed to feed on both control and treated leaves. After 24 hours, larval mortality was counted, and POLO-Plus software was used to calculate lethal concentrations. The second instar larvae were initially immersed separately at LC30 and LC50 concentrations of each component to evaluate the antioxidant system and energy allocation. The control larvae were fed only solvent and each treatment used 60-second instar larva separately. After 24 hours, the treated and control larvae were divided into three groups of 10, and each group was homogenized in distilled water. Samples were centrifuged at 20,000 ×g at 4 ° C for 20 min, and supernatants were used to

determine the activity of catalase, superoxide dismutase, peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and malondialdehyde concentration, as well as energy consumption.

Results

Catalase activity was significantly higher in treated larvae than in control larvae, with the highest activity observed following LC50 treatment with diallyl disulfide. Except for the concentration of diallyl sulfide LC30, the treated larvae had increased peroxidase activity compared to the control. The diallyl disulfide LC50 concentration demonstrated the highest activity. Although larvae treated with diallyl disulfide at the LC50 concentration had the highest superoxide dismutase activity, there was no significant difference in the LC30 concentrations of the two compounds compared to control larvae. The highest glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was observed in larvae treated with both compounds at LC50 concentrations; however, the lowest was observed in larvae treated with both components at LC30 concentrations. Finally, the malondialdehyde concentration was significantly higher in the treated larvae than in the control larvae. The amount of energy allocated to tomato leafminer treated with diallyl sulfide and diallyl disulfide was significantly lower than the control. Finally, the lowest value was observed in larvae treated with diallyl disulfide at its LC50 concentration, but there was no significant difference between the other treatments.

Discussion

The two compounds, diallyl disulfide and diallyl sulfide, increased the antioxidant enzyme activities in tomato leafminer larvae through fat peroxidation and oxidative stress. In treated larvae, the amount of energy required for metabolic activity increased while the amount of energy available to the body decreased significantly. As a result, it is concluded that these two ingredients, garlic essential oil and tomato leafminer mortality, would effectively cause physiological disturbances, most notably in the antioxidant system and energy allocation. Based on the findings, field experiments are necessary to determine the environmental toxicity of these compounds and their importance in reducing crop damage compared to control. Additionally, the efficacy and combination of these compounds can be compared to other field control methods that aim to maintain a healthy crop with minimal pest damage.

Keywords: *Tuta absoluta*, *Garlic essential oil*, *Antioxidant*, *Energy allocation*

Associate editor: S. A. Hemmati (Ph.D.)

Citation: Talepout, F., Zibace, A., Askari Seyahooei, M., & Jalali Sendi, J. (2022). Effects of diallyl sulfide and diallyl disulfide on the antioxidant system and energy allocation of Tomato leafminer larvae, *Tuta absoluta* Meyrick. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 147-163. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17222>