

Received: 25.07.2018 / Accepted: 12.09.2018

Biological activity of phenolic acids extracts against the grain aphid (*Sitobion avenae* F.)

Aktywność biologiczna roślinnych ekstraktów zawierających kwasy fenolowe w stosunku do mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* F.)

Paweł Czerniewicz*, Aldona Kopczyńska, Grzegorz Chrzanowski

Summary

The aphids are serious pests of plants and they can significantly decrease yield by direct feeding, and indirectly by viruses transmission. Application of synthetic insecticides is still the main method of aphid control, however, it has a negative impact on ecosystems. The effect of plant phenolic extracts from *Juglans regia*, *Nicotiana tabacum*, *Mentha × piperita*, *Sambucus nigra* and *Hypericum perforatum* on behavior and development of the grain aphid was studied. Moreover, the influence of the plant phenolics on the aphid proteolytic enzymes was examined as well. The significant reduction of aphid growth and development was found after the treatment with walnut, tobacco, and peppermint extracts. These extracts decreased fecundity of the aphid females and in consequence intrinsic rate of natural increase. It was proved that walnut phenolics inhibited the aphid proteolytic enzymes, trypsin and pepsin the most. Moreover, phenolic acids from tobacco and peppermint reduced the activity of these enzymes as well, however, this effect was weaker than after the treatment with walnut extract.

Key words: aphids; biopesticides; antibiosis; deterrence index; pepsin; trypsin

Streszczenie

Mszycy są jednymi z najważniejszych szkodników roślin. Obniżają wysokość plonów w wyniku bezpośredniego żerowania, jak również są wektorami wirusów. Zastosowanie syntetycznych insektycydów pozostaje główną metodą walki z tymi szkodnikami, jednak powoduje ono niekorzystny wpływ na ekosystemy. W pracy zbadano wpływ roślinnych ekstraktów (*Juglans regia*, *Nicotiana tabacum*, *Mentha × piperita*, *Sambucus nigra* i *Hypericum perforatum*) zawierających kwasy fenolowe na zachowanie oraz rozwój mszycy zbożowej. Ponadto określono wpływ tych związków na zmiany aktywności proteaz. Wykazano, że kwasy fenolowe z orzecha włoskiego, tytoniu szlachetnego i mięty pieprzowej ograniczały płodność samic *Sitobion avenae* oraz hamowały ich rozwój. Dowiedziono, że ekstrakt z orzecha włoskiego najsilniej hamował aktywność pepsyny i trypsyny w tkankach mszyc. Również fenole z tytoniu szlachetnego i mięty pieprzowej ograniczały aktywność peroksydaz, jednak efekt ten był wyraźnie słabszy niż w przypadku kwasów orzecha włoskiego.

Słowa kluczowe: mszyce; biopestycydy; antybioza; indeks deterencji; pepsyna; trypsyna

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej
Prusa 14, 08-110 Siedlce

*corresponding author: pawel.czerniewicz@uph.edu.pl

Wstęp / Introduction

Mszyce uważane są za jedno z najważniejszych szkodników roślin. Wykorzystując kłująco-ssący narząd gębowy wysysają one sok floemowy zawierający asymilaty, jednocześnie ze śliną wprowadzają substancje toksyczne powodując bezpośrednie zaburzenia w metabolizmie roślin żywicielskich (Karban i Agrawal 2002). Ponadto owady te są wektorami wirusów, między innymi wirusa żółtej karłowatości jęczmienia BYDV (Brault i wsp. 2007), a na wydzielanej spadzi mogą rozwijać się patogenne grzyby.

Obecnie w świecie, zastosowanie syntetycznych insektycydów stanowi najczęściej stosowaną metodę ochrony roślin przed tymi szkodnikami. Jednak, coraz częściej poddaje się w wątpliwość korzyści płynące ze stosowania insektycydów, zważywszy na negatywne skutki uboczne. Dotyczą one przede wszystkim zanieczyszczenia środowiska oraz ujemnego wpływu na człowieka i organizmy pożyteczne (Boatman i wsp. 2007). Joshi i Sharma (2009) dowodzą, że neonikotynowy pestycyd – imidaklopryd, efektywnie ogranicza liczebność populacji mszyc. Z drugiej jednak strony związek ten wykazuje silne właściwości onkogenne i teratogenne w stosunku do szczurów, może powodować uszkodzenia DNA, jak również jest neurotoksyczny (CDPR 2013). Ponadto Johnson i wsp. (2010) sugerują, że problem wymierania populacji pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) spowodowany był głównie przez stosowanie pestycydów, w tym fosforoorganicznych, pyretroidowych i karbaminianowych.

Z uwagi na skutki uboczne stosowania pestycydów, w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie badaniami, które mają na celu poszukiwanie alternatywnych metod ograniczania populacji szkodliwych owadów. Jedną z bardziej popularnych metod jest zastosowanie ekstraktów roślinnych zawierających substancje naturalne. Mieszaniny takie charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznej, łatwo ulegają biodegradacji, a przede wszystkim nie wykazują wysokiej toksyczności w stosunku do organizmów pożytecznych. W oddziaływaniach rośliny – owady na szczególną uwagę zasługują związki fenolowe, a wśród nich kwasy fenolowe. Związki te, występując w wysokim stężeniu mogą wykazywać właściwości antybiotyczne i toksyczne, natomiast w stężeniu niskim pozwalają roślinie przezwyciężyć niekorzystne skutki żerowania owadów i zwiększyć poziom tolerancji (Czerniewicz i wsp. 2017). Natomiast Leszczyński i wsp. (1985) oraz Chrzanowski (2007) dowodzą, że kwasy fenolowe stosowane w testach *in vitro* ograniczały żerowanie i rozwój populacji mszycy czeremchowo-zbożowej (*Rhopalosiphum padi* L.) oraz mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* F.).

Poszukując źródeł wtórnych metabolitów naturalnych wykazujących wysoką aktywność biologiczną, szczególną uwagę zwracano na te rośliny, z których ekstrakty odznaczały się właściwościami przeciugrzybiczymi, antybak-

teryjnymi lub przeciwzapalnymi. Insektocydalne i antyfidantne właściwości wyciągów uzyskanych z orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) w stosunku do przędziorków i chrząszczy były podnoszone we wcześniejszych badaniach (Wang i wsp. 2007; Eriksson i wsp. 2008). Chrzanowski i wsp. (2012) wykazali, że kwasy fenolowe ekstrahowane z liści i zielonych okryw owoców orzecha włoskiego oraz z liści porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) i wiśni (*Prunus cerasus* L.) ograniczały rozwój mszycy zbożowej oraz indukowały w tkankach owada wzrost aktywności transferazy S-glutationowej (GST), jednego z ważniejszych enzymów odpowiadających za detoksykację ksenobiotyków. Z kolei, wtórne metabolity ekstrahowane z mięty pieprzowej (*Mentha piperita* L.) oddziaływały repelentnie na mszycę kapuścianą (*Brevicoryne brassicae* L.) i toksycznie na przędziorka szklarniowca (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Mekuaninte i wsp. 2011).

Podjęte w prezentowanej pracy badania, miały więc na celu ocenić wpływ mieszanin kwasów fenolowych ekstrahowanych z liści orzecha włoskiego (*J. regia*), tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum* L.), mięty pieprzowej (*Mentha × piperita* L.), bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.) oraz ziela dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum* L.) na zachowanie oraz wzrost i rozwój mszycy zbożowej (*S. avenae*). Ponadto zbadano oddziaływanie ekstraktów zawierających kwasy fenolowe na aktywność enzymów hydrolizujących białka (pepsyny i tripsyny), a zatem uczestniczących w przyswajaniu pokarmu przez mszycę.

Materiały i metody / Materials and methods

Bezskrzydłe samice mszycy zbożowej użyte w eksperymentach pochodziły z hodowli prowadzonej na siewkach pszenicy ozimej, odmiany Tonacja w Uniwersytecie Przyrodniczo-Humanistycznym w Siedlcach. Testy antybiotycznego i deterentnego oddziaływania badanych ekstraktów w stosunku do mszycy zbożowej wykonano w pokoju hodowlanym Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej, w kontrolowanych warunkach temperatury (24/18°C, dzień/noc), fotoperiodu (16/8 h, dzień/noc) oraz wilgotności względnej 65%.

1. Ekstrakcja kwasów fenolowych

Kwasy fenolowe ekstrahowano z pięciu roślin (tab. 1). Ekstrakcję kwasów fenolowych przeprowadzono według procedury opisanej przez Czerniewicza i wsp. (2017). Kwasy fenolowe ekstrahowano z 50 g powietrznie suchego materiału roślinnego używając 80% (obj./obj.) metanolu. Po odwirowaniu (7 000 × g, przez 30 minut), do supernatantu dodano wody do uzyskania stężenia metanolu 20% i wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) do końcowego stężenia 5%.

Tabela 1. Gatunki roślin wykorzystane do ekstrakcji kwasów fenolowych

Table 1. Plant species used for preparing of phenolic acids extracts

Nazwa Scientific name	Rodzina Family	Części roślin Parts of plants
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hypericaceae	ziele – aerial parts
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	liście – leaves
<i>Mentha × piperita</i> L.	Lamiaceae	liście – leaves
<i>Sambucus nigra</i> L.	Adoxaceae	liście – leaves
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Solanaceae	liście – leaves

Całość wytrząsano przez 3 godziny i pozostawiono w ciemności na 12 godzin, po czym ponownie wytrząsano i odwirowano. Mieszaninę zakwaszono do pH = 2, używając 6M kwasu chlorowodorowego (HCl). Metanol odparowano na wyparce próżniowej w temperaturze 40°C (Hei-VAP Precision, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Niemcy). Kwas fenolowy odzyskiwano metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) stosując sorbent Bondesil C-18 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Złoże płukano wodą i następnie elucję kwasów fenolowych prowadzono z użyciem metanolu. Ekstrakt metanolowy zawierający kwasy fenolowe odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Suchą pozostałość zważono i rozpuszczono w etanolu (roztwór podstawowy). Mieszaniny wykorzystywane do opryskiwania, zawierające 0,05% Tween 80 i 4% etanolu, sporządzono przez dalsze wodne rozcieńczenie roztworu podstawowego.

2. Indeks deterencji

Deterenty wpływ dwóch stężeń (0,05% i 0,20%) ekstraktów kwasów fenolowych w stosunku do *S. avenae* zbadano w oparciu o testy wyboru. Dwie siewki pszenicy ozimej odmiany Tonacja zanurzano na 10 sekund w badanym ekstrakcie lub roztworze kontrolnym (woda zawierająca 0,05% Tween 80 oraz 4% etanolu), a następnie suszono powietrznie w temperaturze pokojowej. Traktowane i kontrolne siewki pszenicy układano na dwóch brzegach w szalkach Petriego (średnica 20 cm) wyłożonych zwilżoną bibułą filtracyjną. W centrum szalki, umieszczano 20 (głodzonych przez 1 godzinę) mszyc zbożowych i po upływie 3, 6 i 24 godzin zliczano mszyce na kontrolnych i traktowanych siewkach pszenicy. Indeks deterencji (DI) obliczano w oparciu o liczbę mszyc na siewkach:

$$DI = \frac{C - T}{C + T}$$

gdzie:

C – liczba mszyc na siewkach kontrolnych,

T – liczba mszyc na siewkach traktowanych.

3. Antybiotyczne oddziaływanie ekstraktów kwasów fenolowych

Wpływ dwóch stężeń (0,05% i 0,20%) ekstraktów kwasów fenolowych na wzrost i rozwój populacji mszycy zbożowej określono na podstawie testu antybiozy. Na 10 siewek pszenicy ozimej odmiany Tonacja w fazie pierwszego liścia (G.S. 11) naniesiono bezskrzydłe samice mszycy zbożowej (1 samicę na 1 siewkę), rośliny z mszycami zaizolowano za pomocą pleksiglasowego izolatora w kształcie walca (ID 10 × 40 cm), posiadającego otwory wentylacyjne. Po urodzeniu potomstwa, na każdej siewce pozostawiono, w tym samym czasie, po pięć larw, pozostałe larwy i samice delikatnie usunięto. Po dwóch dniach mszyce na siewkach opryskiwano testowanymi roztworami lub wodą zawierającą 0,05% Tween 80 i 4% etanolu (kontrola). Zabieg opryskiwania powtórzono dwukrotnie w 4-dniowych odstępach czasowych. Obserwacje prowadzono każdego dnia, aż do śmierci mszyc, notując liczbę samic i urodzonych larw. Od chwili uzyskania dojrzałości partenogenetycznej przez *S. avenae*, nowo urodzone larwy były każdego dnia delikatnie usuwane. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji sporządzono tabele przyżyciowe dla mszycy zbożowej, w oparciu o które wyznaczone zostały parametry: okres prereprodukcyjny (PRP), średnia dzienna płodność samic w okresie reprodukcji (DF) i wrodzone tempo wzrostu populacji (r_m) (Birch 1948):

$$\sum l_x \times m_x \times e^{-r_m x} = 1$$

gdzie: l_x – liczba żywych samic w czasie x , jako ułamek początkowej ich liczby, m_x – liczba urodzonych larw w czasie x w przeliczeniu na jedną samicę, x – czas obserwacji.

4. Aktywność proteolityczna

Dwieście pięćdziesiąt bezskrzydłych samic *S. avenae* umieszczono na siewkach pszenicy ozimej odmiany Tonacja w fazie pierwszego liścia (G.S. 11), po 2 godzinach mszyce były opryskiwane roztworami kwasów fenolowych (0,2%) lub wodą, zawierającą 0,05% Tween 80 i 4% etanolu (kontrola). Żywe mszyce były zbierane 24, 48 i 72 godziny od opryskiwania w celu określenia aktywności proteolitycznej w ich tkankach. Siedemdziesiąt pięć bezskrzydłych samic mszycy zbożowej zebranych w każdym terminie, traktowano 10 cm³ ciekłego azotu i przechowywano w temp –80°C do czasu wykonania oznaczenia aktywności enzymów.

Tkanki mszyc homogenizowano w 2,5 cm³ wychłodzonego buforu 0,1M Tris-HCl pH = 7,0 i odwirowano 15 000 × g przez 20 minut w temperaturze 4°C. Supernatant wykorzystano do oznaczania aktywności pepsyny i trypsyny oraz oznaczania białka enzymatycznego. Zawartość białka w ekstraktach określono na podstawie metody Bradforda (1976) używając albuminy wołowej jako standardu.

Pepsyna

Aktywność pepsyny oznaczono względem hemoglobiny po zakwaszeniu do pH = 3,0. W tym celu do ekstraktu dodano 1M kwasu chlorowodorowego i prowadzono inkubację w temperaturze 30°C przez 1 godzinę. Następnie dodano 2% (w/obj.) hemoglobiny i ponownie mieszaninę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 30°C. Reakcję zatrzymano dodając kwasu trichlorooctowego do końcowego stężenia 15%. Po odwirowaniu, oznaczono liczbę moli produktów dających barwne kompleksy z odczynnikiem Folin-Ciocalteu, wykonując pomiar spektrofotometryczny przy 720 nm. Aktywność pepsyny wyrażono jako liczbę moli tyrozyny uwalnianej w ciągu minuty przez mg białka enzymatycznego.

Trypsyna

Aktywność trypsyny oznaczono w środowisku zasadowym, stosując jako substrat chlorowodorek p-nitroanilidu N α -benzoilo-DL-argininy (BapNA) z 0,02M dodatkiem CaCl₂. Próba 100 μ l ekstraktu enzymatycznego i 400 μ l buforu 0,1M Tris-HCl pH = 8,0 była inkubowana 5 minut w temperaturze 25°C, po czym dodano 1,0 cm³ substratu (BapNA). Reakcję prowadzono w temperaturze 25°C i po 20 minutach zatrzymano dodając 0,5 cm³ 20% kwasu octowego. Liczbę moli p-nitroaniliny powstałej w reakcji enzymatycznej oznaczono spektrofotometrycznie przy 410 nm.

5. Analiza statystyczna

Testy antybiotycznego oddziaływania ekstraktów zawierających kwasy fenolowe w stosunku do mszycy zbożowej wykonano w 10 powtórzeniach. Zróżnicowanie parametrów demograficznych szacowano za pomocą testu Kruskala-Wallis (nieparametryczny odpowiednik analizy ANOVA) i testu post-hoc Scheffego, przyjmując poziom istotności przy P < 0,05. Analizy chemiczne wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. Istotność różnic oceniono stosując test ANOVA oraz post-hoc test Tukeya. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Dell Statistica ver. 13.1 (Dell Inc. 2016).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Przeprowadzone testy wyboru (tab. 2) wykazały, że samice mszycy zbożowej w większości przypadków unikały roślin traktowanych ekstraktami zawierającymi kwasy fenolowe. Efekt ten nasilał się wraz ze wzrostem stężenia wtórnych metabolitów. Najsilniejsze deterentne oddziaływanie na *S. avenae* wywierały kwasy fenolowe pozyskiwane z liści orzecha włoskiego. Obliczone indeksy po zastosowaniu ekstraktów z tej rośliny, w najwyższym (0,2%) stężeniu, oscylowały w przedziale 0,38–0,55. Również

Tabela 2. Wartości indeksów deterencji (DI) określone dla roślinnych ekstraktów zawierających kwasy fenolowe w stosunku do mszycy zbożowej

Table 2. Values of deterrence indices (DI) calculated for plant phenolic acid extracts towards the grain aphid

Ekstrakt kwasów fenolowych Phenolic acids extract	Stężenie Concentration [%]	Czas obserwacji Observation time [h]		
		3	6	24
<i>Hypericum perforatum</i>	0,05	–0,05	–0,05	–0,07
	0,20	0,10	0,12	0,11
<i>Juglans regia</i>	0,05	0,12	0,21	0,25
	0,20	0,38	0,46	0,55
<i>Mentha × piperita</i>	0,05	0,12	0,12	0,13
	0,20	0,33	0,38	0,41
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,05	0,15	0,20	0,20
	0,20	0,35	0,38	0,44
<i>Sambucus nigra</i>	0,05	–0,02	0,01	0,01
	0,20	0,15	0,19	0,21

związki fenolowe ekstrahowane z tytoniu szlachetnego i mięty pieprzowej powodowały niższy poziom zasiedlenia roślin traktowanych związkami naturalnymi. Wskaźniki deterencji były jednak o około 0,1 niższe w porównaniu do traktowania fenolami z orzecha włoskiego, szczególnie po 6 i 24 godzinach. Zaskakujące wyniki otrzymano w przypadku traktowania siewek pszenicy kwasami fenolowymi z dziurawca zwyczajnego, gdyż obliczone indeksy deterencji (wartości ujemne) dla najniższego stężenia, wskazują że ekstrakty z tej rośliny mogły pełnić rolę słabych atraktantów. Przeprowadzone obserwacje w odstępach czasowych pozwoliły ponadto stwierdzić, że właściwy wybór rośliny żywicielskiej przez mszycę zbożową odbywał się po około 6 godzinach od zastosowania kwasów fenolowych.

Podobne wyniki uzyskali Czerniewicz i wsp. (2016), chociaż swoje obserwacje prowadzili na mszycy czerechowo-zbożowej (*Rhopalosiphum padi* L.) i mszycy brzo-skwiniowej (*Myzus persicae* Sulz.), które zasiedlają większą pulę roślin żywicielskich aniżeli *S. avenae*. Jednak autorzy ci wyznaczyli niższe wartości indeksów deterencji dla oligofagicznej *R. padi* i polifagicznej *M. persicae* niż dla badanej *S. avenae*. Wyniki te mogą zatem sugerować, że owady o szerszych preferencjach pokarmowych w mniejszym stopniu reagują na niekorzystne oddziaływanie związków naturalnych lub też łatwiej uruchamiają zdolności adaptacyjne. Z drugiej jednak strony zastanawiające jest, że kwasy fenolowe z ziela dziurawca posiadały charakter słabych atraktantów dla monofagicznej mszycy zbożowej, czego nie stwierdzili Czerniewicz i wsp. (2016) w stosunku do oligo- i polifagicznego gatunku.

Tabela 3. Wpływ ekstraktów kwasów fenolowych na wzrost i rozwój populacji *Sitobion avenae*Table 3. Effect of phenolic plant extracts on the growth and development of *Sitobion avenae* population

Ekstrakt kwasów fenolowych Phenolic acids extract	Stężenie Concentration [%]	Parametry bionomiczne – Bionomic parameters		
		PRP	DF	r_m
Kontrola – Control		6,30 ± 0,21 c	3,42 ± 0,51 a	0,36 ± 0,04 a
<i>Hypericum perforatum</i>	0,05	7,04 ± 0,44 abc	3,27 ± 0,53 ab	0,33 ± 0,03 ab
	0,20	7,33 ± 0,69 abc	2,30 ± 0,58 cd	0,28 ± 0,06 bc
<i>Juglans regia</i>	0,05	7,25 ± 0,32 abc	2,39 ± 0,45 cde	0,29 ± 0,03 bc
	0,20	8,05 ± 0,32 a	1,82 ± 0,32 e	0,25 ± 0,03 d
<i>Mentha × piperita</i>	0,05	7,31 ± 0,34 abc	3,04 ± 0,48 bc	0,31 ± 0,04 bc
	0,20	7,45 ± 0,47 ab	2,36 ± 0,36 cde	0,28 ± 0,04 cd
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,05	7,01 ± 0,61 abc	2,74 ± 0,43 cd	0,31 ± 0,05 bc
	0,20	7,52 ± 0,50 ab	2,05 ± 0,28 de	0,27 ± 0,04 cd
<i>Sambucus nigra</i>	0,05	6,95 ± 0,52 abc	3,22 ± 0,64 ab	0,33 ± 0,06 ab
	0,20	7,06 ± 0,33 bc	2,61 ± 0,40 cd	0,30 ± 0,05 bc

PRP – okres prereprodukcyjny – pre-reproduction period

DF – średnia dzienna płodność samic w okresie reprodukcji – average daily fertility of females during reproduction

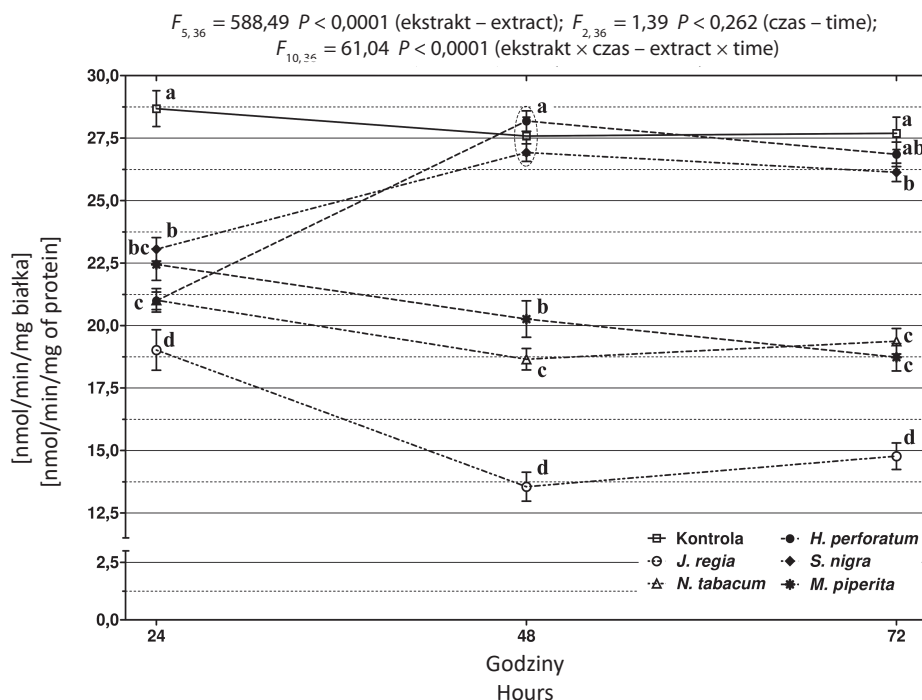
 r_m – wrodzone tempo wzrostu populacji – intrinsic rate of natural increaseWartości parametrów w kolumnach oznaczone różnymi literami, różnią się statystycznie przy $P < 0,05$ (test Tukeya)Values for each parameter in the column marked by different letters are statistically different at $P < 0.05$ (Tukey's test)

Badając wpływ ekstraktów kwasów fenolowych na wzrost i rozwój populacji mszycy *S. avenae* (tab. 3) stwierdzono, że w nieznacznym stopniu wpływały one na wydłużenie okresu prereprodukcyjnego (PRP) i tylko najwyższe stężenie zastosowanych ekstraktów z orzecha włoskiego, tytoniu szlachetnego i mięty pieprzowej powodowało późniejsze wydawanie potomstwa przez samice mszycy zbożowej. Jednak wartości PRP wyznaczone po traktowaniu wspomnianymi ekstraktami nie różniły się od długości okresów prereprodukcyjnych określonych dla pozostałych ekstraktów, jak i różnych ich stężeń. Czerniewicz i wsp. (2016) wykazali, że traktowanie ekstraktami kwasów fenolowych polifagicznej *M. persicae* nie powodowało zmian w długości okresu PRP, jednak w przypadku oligofagicznej *R. padi* okres prereprodukcyjny uległ wydłużeniu w następstwie stosowania roślinnych związków fenolowych. Z kolei Chrzanowski i wsp. (2012) dowodzą, że zarówno silnie, jak i słabo oddziałujące ekstrakty kwasów fenolowych powodowały wydłużenie PRP i obniżenie płodności samic *S. avenae*. Istotną redukcję płodności (DF), jak i hamowanie wrodzonego tempa rozwoju populacji (r_m) wykazano także w niniejszej pracy. Należy podkreślić, że obniżenie płodności owadów, obok toksyczności, uznawane jest za jeden z ważniejszych czynników wpływających na ograniczenie liczebności szkodników (Das i wsp. 2008; Ali i wsp. 2010; Chrzanowski i wsp. 2016; Czerniewicz i wsp. 2018).

Cao i wsp. (2015) dowiedli, że rośliny pszenicy w odpowiedzi na żerowanie mszycy zbożowej wykształciły

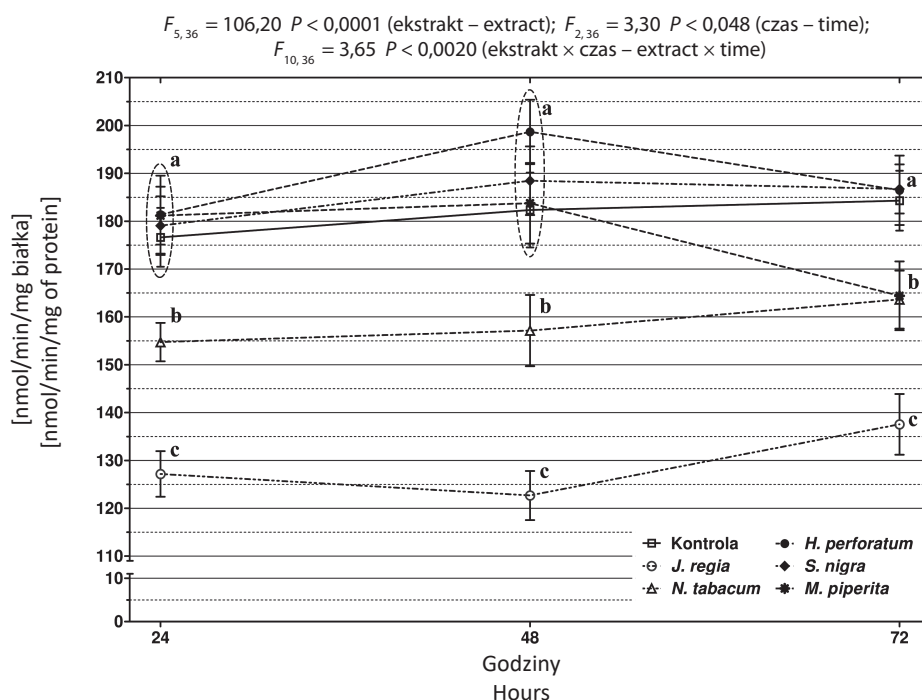
głównie dwa mechanizmy obronne – antybiozę i tolerancję. Natomiast wcześniejsze rozważania Chen (2008) sugerują, że za bezpośrednią odporność roślin w stosunku do owadów odpowiadają mechanizmy oddziałujące w sposób antyżywniowy, toksyczny lub obniżający preferencję. Przy czym, charakter antyżywniowy wynikać może z obniżenia wartości pokarmowej rośliny, w wyniku biosyntezy w jej tkankach wtórnych metabolitów lub poprzez hamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za przyswajanie pokarmu. W następstwie tych procesów dochodzi do zaburzeń wzrostu i rozwoju owadów.

Przeprowadzone analizy biochemiczne dowiodły, że testowane mieszaniny powodowały zaburzenia w aktywności pepsyny i trypsyny w tkankach mszyc opryskiwanych ekstraktami kwasów fenolowych. Aktywność mszycowej pepsyny (rys. 1) uległa redukcji po 24 godzinach od momentu opryskiwania wszystkimi testowanymi ekstraktami. Jednak w kolejnych godzinach (48 godz. i 72 godz.) tylko kwasy z orzecha włoskiego, tytoniu szlachetnego i mięty pieprzowej obniżały aktywność pepsyny. W przypadku trypsyny (rys. 2) już w pierwszym okresie (po 24 godz.) można było zaobserwować różnice w oddziaływaniu na aktywność tego enzymu między poszczególnymi ekstraktami roślinnymi, ponieważ jedynie *J. regia* i *N. tabacum* hamowały aktywność trypsyny. Charakter zmian aktywności trypsyny w tkankach mszyc pod wpływem kwasów fenolowych utrzymał się również w kolejnych terminach badań, a ponadto w 72 godzinie ekstrakt z mięty pieprzowej hamował aktywność tej proteazy. Należy jednak zaznaczyć, że najsil-



Rys. 1. Aktywność pepsyny w tkankach mszycy zbożowej traktowanej ekstraktami kwasów fenolowych. Punkty w tych samych przedziałach czasowych oznaczone różnymi literami wskazują na różnice istotne statystycznie przy $P < 0,05$ (test Tukeya)

Fig. 1. The activity of pepsin in the grain aphid tissues treated with phenolic acids extracts. Different letters indicate statistical differences for each time period separately at $P < 0.05$ (Tukey's test)



Rys. 2. Aktywność tripsyny w tkankach mszycy zbożowej traktowanej ekstraktami kwasów fenolowych. Punkty w tych samych przedziałach czasowych oznaczone różnymi literami wskazują na różnice istotne statystycznie przy $P < 0,05$ (test Tukeya)

Fig. 2. The activity of trypsin in the grain aphid tissues treated with phenolic acids extracts. Different letters indicate statistical differences for each time period separately at $P < 0.05$ (Tukey's test)

niejszy wpływ na aktywność obu badanych proteaz wywierał ekstrakt z orzecha włoskiego. Można więc stwierdzić, że sposób oddziaływania ekstraktów zawierających kwasy fenolowe związany jest z hamowaniem enzymów odpowiedzialnych za proteolizę i w efekcie przyswajanie pokarmu przez mszycę zbożową.

Z drugiej jednak strony, Chrzanowski i wsp. (2012) dowiedli, że w tkankach mszyc traktowanych kwasami fenolowymi wzrastała aktywność transferazy S-glutationowej odpowiedzialnej za detoksykację ksenobiotyków, a także oksydoreduktaz (peroksydazy i oksydazy polifenolowej) uczestniczących w utlenianiu niekorzystnie oddziałujących substancji fenolowych.

Wydaje się więc, że sposób oddziaływania na mszycę ekstraktów zawierających związki naturalne jest wieloaspektowy. Wynika nie tylko z właściwości antyżywniowych, ale jak sugerują Chrzanowski i wsp. (2012) oraz Czerniewicz i wsp. (2016) składniki ekstraktów mogą również wpływać toksycznie na owady.

Wnioski / Conclusions

1. Spośród testowanych ekstraktów zawierających kwasy fenolowe, najsilniej na mszycę zbożową oddziaływał ekstrakt z orzecha włoskiego, nieco słabiej zaś z tytoniu szlachetnego i mięty pieprzowej.
2. Niekorzystny wpływ kwasów fenolowych na mszycę *S. avenae* związany był z oddziaływaniem deterentnym oraz obniżaniem płodności samic i hamowaniem rozwoju populacji owadów.
3. Ekstrakty kwasów fenolowych mogą ograniczać przyswajanie pokarmu przez mszycę poprzez hamowanie aktywności pepsyny i trypsyny.

Podziękowanie / Acknowledgements

Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego N N310 298739 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz tematu statutowego Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach 472/16/S.

Literatura / References

- Ali A., Rizvi P.Q., Khan F.R. 2010. Bio-efficacy of some plant extracts against mustard aphid, *Lipaphis erysimi* Kalt. on indian mustard, *Brassica juncea*. Journal of Plant Protection Research 50 (2): 130–132.
- Birch L.C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. Journal of Animal Ecology 17 (1): 15–26. DOI: 10.2307/1605.
- Boatman N.D., Parry H.R., Bishop J.D., Cuthbertson A.G.S. 2007. Impacts of agricultural change on farmland biodiversity in the UK. p. 1–32. In: "Biodiversity Under Threat" (R.E. Hester, R.M. Harrison, eds.). RSC Publishing, Cambridge, UK, 290 pp.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 (1–2): 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brault V., Herrbach E., Reinbold C. 2007. Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. Micron 38 (3): 302–312. DOI: 10.1016/j.micron.2006.04.005.
- Cao H.H., Pan M.Z., Liu H.R., Wang S.H., Liu T.X. 2015. Antibiosis and tolerance but not antixenosis to the grain aphid, *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae), are essential mechanisms of resistance in a wheat cultivar. Bulletin of Entomological Research 105 (4): 448–455. DOI: 10.1017/S0007485315000322.
- CDPR (California Department of Pesticide Regulation). 2013. Summary of toxicology data imidacloprid. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/toxsums/pdfs/3849.pdf> [Accessed: 18.11.2013].
- Chen M.S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. Insect Science 15 (2): 101–114. DOI: 10.1111/j.1744-7917.2008.00190.x.
- Chrzanowski G. 2007. Impact of selected phenylpropanoid acids on the growth and development of grain aphid *Sitobion avenae* (F.). [Wpływ wybranych kwasów fenylopropanowych na wzrost i rozwój mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* (F.))]. Aphids and Other Hemipterous Insects 13: 175–181.
- Chrzanowski G., Czerniewicz P., Sytykiewicz H., Sempruch C., Cudziło-Abramczuk J. 2016. Alkaloidy jako biopestycydy w stosunku do mszycy czeremchowo-zbożowej [*Rhopalosiphum padi* (L.)] i mszycy brzoskwińowej [*Myzus persicae* (Sulz.)]. s. 30. Streszczenia. 56. Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego. Poznań, 11–12 lutego 2016, 226 ss.
- Chrzanowski G., Leszczyński B., Czerniewicz P., Sytykiewicz H., Matok H., Krzyżanowski R., Sempruch C. 2012. Effect of phenolic acids from black currant, sour cherry and walnut on grain aphid (*Sitobion avenae* F.) development. Crop Protection 35: 71–77. DOI: 10.1016/j.cropro.2012.01.005.
- Czerniewicz P., Chrzanowski G., Sprawka I., Sytykiewicz H. 2018. Aphicidal activity of selected Asteraceae essential oils and their effect on enzyme activities of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). Pesticide Biochemistry and Physiology 145: 84–92. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.01.010.
- Czerniewicz P., Chrzanowski G., Sytykiewicz H., Sprawka I., Leszczyński B. 2016. Aphidicidal and deterrent activity of phenolic acid extracts from some herbal plants towards *Myzus persicae* Sulz. and *Rhopalosiphum padi* L. Fresenius Environmental Bulletin 25 (12a): 5714–5721.
- Czerniewicz P., Sytykiewicz H., Durak R., Borowiak-Sobkowiak B., Chrzanowski G. 2017. Role of phenolic compounds during anti-oxidative responses of winter triticale to aphid and beetle attack. Plant Physiology and Biochemistry 118: 529–540. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.07.024.

- Das B.C., Sarker P.K., Rahman M.M. 2008. Aphidicidal activity of some indigenous plant extracts against bean aphid *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). *Journal of Pest Science* 81 (3): 153–159. DOI: 10.1007/s10340-008-0200-6.
- Dell Inc. 2016. Dell Statistica (data analysis software system), version 13. software.dell.com.
- Eriksson C., Månsson P.E., Sjödin K., Schlyter F. 2008. Antifeedants and feeding stimulants in bark extracts of ten woody non-host species of the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Journal of Chemical Ecology* 34 (10): 1290–1297. DOI: 10.1007/s10886-008-9525-0.
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A., Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41 (3): 312–331. DOI: 10.1051/apido/2010018.
- Joshi N.K., Sharma V.K. 2009. Efficacy of imidacloprid (Confidor 200 SL) against aphids infesting wheat crop. *Journal of Central European Agriculture* 10 (3): 217–222.
- Karban R., Agrawal A.A. 2002. Herbivore offense. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 641–664. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150443.
- Leszczyński B., Warchoła J., Niraz S. 1985. The influence of phenolic compounds on the preference of winter wheat cultivars by cereal aphids. *International Journal of Tropical Insect Science* 6 (2): 157–158. DOI: 10.1017/S1742758400006548.
- Mekuaninte B., Yemataw A., Alemseged T., Nagappan R. 2011. Efficacy of *Melia azadarach* and *Mentha piperita* plant extracts against cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae). *World Applied Sciences Journal* 12 (11): 2150–2154.
- Wang Y.N., Shi G.L., Zhao L.L., Liu S.Q., Yu T.Q., Clarke S.R., Sun J.H. 2007. Acaricidal activity of *Juglans regia* leaf extracts on *Tetranychus viennensis* and *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 100 (4): 1298–1303. DOI: 10.1093/jee/100.4.1298.