

Acta Biol. Debr. Oecol. Hung 18: 21–26, 2008

## ÍNFŰ (*AJUGA*) KIVONATOK HATÁSA *AEDES AEGYPTI* CSÍPŐSZÚNYOG LÁRVÁKON

BOKÁN KATALIN<sup>1,2</sup> – FEKETE GÁBOR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Szent István Egyetem, Állatorvos-Tudományi Kar, 1078 Budapest, István u. 2.

<sup>2</sup>Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Kutatóintézete, Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztály, 1022 Budapest, Herman Ottó u. 15.

### THE EFFECT OF *AJUGA* EXTRACTS ON YELLOW FEVER MOSQUITO (*AEDES AEGYPTI*) LARVAE

K. BOKÁN<sup>1,2</sup> – G. FEKETE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Szent István University, Faculty of Veterinary Science, István u. 2., H-1078 Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Plant Protection Institute of the HAS, Department of Ecotoxicology and Environmental Analysis, Herman Ottó u. 15., H-1022, Budapest, Hungary

**KIVONAT:** *Ajuga* fajok (*A. chamaepitys*, *A. genevensis*, *A. bracteosa*) teljes kivonatainak és metanolos-vizes frakcióinak a poszttembrionális fejlődésre gyakorolt hatását vizsgáltuk *Aedes aegypti* csípőszúnyog lárvákban. Célunk volt megtalálni a leghatékonyabb kivonatot, és megállapítani, mely összetevők felelősek a tapasztalt hatásokért. Teljes kivonatok használatakor a következő hatékonysági sorrendet tapasztaltuk: *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. chamaepitys*. A mortalitás a 4. napon *A. genevensis* esetén 100 %-os, míg az *A. bracteosa* használatakor 80 %-os volt. A metanolos-vizes frakciók tesztelésékor megállapítottuk, hogy mindhárom infű faj 100 %-os metanolos, tehát a neoklerodánokat tartalmazó extraktumai bizonyultak a leghatékonyabbnak. *A. bracteosa* és *A. chamaepitys* metanolos-vizes frakciói esetében a teljes kivonattól eltérő hatást tapasztaltunk, amely valószínűsíthetően a tisztítási eljárások után fellépő szinergikus és antagonikus folyamatok eredménye.

**ABSTRACT:** We have studied the efficacy of crude extracts from three *Ajuga* spp. (*A. chamaepitys*, *A. genevensis*, *A. bracteosa*) and their fractionated extracts on the post-embryonic development of *Aedes aegypti* larvae. Our aim was to find out which botanical extracts were the most effective, and which of their components are responsible for the effect. Using the crude extracts the order of efficacy was *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. chamaepitys*. On the fourth day *A. genevensis* was highly effective (100% mortality) and *A. bracteosa* shows 80% mortality. Extracts were fractionated using a range of methanol- water mixture. In the case of all three plants the 100% methanolic fraction (containing neoclerodanes) was the most effective. We observed that the methanolic fractions caused different effects compared to the crude extracts which may be caused by the appearing synergic and antagonist processes after the cleaning procedure.

**Key words:** neoclerodane, phytoecdysteroids, *Ajuga* spp., *Aedes aegypti*, botanical insecticides

## Bevezetés

A XX. század ötvenes éveiben a növényvédelem helyzete alapvetően megváltozott. Megjelentek olyan széles hatásspektrumú szerves vegyületek, mint a klórozott szénhidrogének, foszforsavészterek és a zoocid karbamátok (FEKETE 2005). Hamarosan azonban fény derült e szerek széles körű környezetkárosító hatására, melyet a nem szelektív hatásmód okozott. Ezek negatív környezet-egészségügyi mellékhatásainak felismerésekor fordult a fejlesztés az összehasonlító élettan felé és kereste azokat a speciális biokémiai folyamatokat, amelyek a rovarokra jellemzők. Ezek támadásával ugyanis szelektív hatóanyagok kifejlesztésére nyílt lehetőség (DARVAS et al. 1997).

Napjainkban az allelokémikus interakciók a növények és állatok közt az egyik legjobban kutatott téma, többek közt mivel érdekes perspektívát nyújt a növényi eredetű peszticidek fejlesztésében. Számos olyan másodlagos növényi anyagcsere-terméket fedeztek fel, melyek befolyással lehetnek a rovarok fejlődésére, növekedésére vagy viselkedésére (CAMPS 1991).

A botanikai inszekticidek olyan növényi eredetű anyagok, melyek káros hatást gyakorolnak a rovarokra. Az alkalmazott készítményekkel szemben támasztott alapvető elvárás, hogy melegvérűeken akut módon gyakorlatilag hatástalanok legyenek. Legismertebb képviselőjük a *neem* fa (*Azadirachta indica* Juss.) kivonata. Ennek példáján Magyarországon is megkezdődtek a kutatások, egy hasonlóan hatékony, de hazánkban is előállítható botanikai inszekticid kifejlesztésére. Az érdeklődés az Ínfű nemzetség (*Ajuga* spp., *Lamiaceae*) fajai felé fordult (DARVAS 1991), melyek rovarokon való aktivitására több mint harminc éve figyeltek fel (MATSOUKA et al. 1969).

Az *Ajuga* fajok, melyek már régóta ismertek a népi gyógyászatban, mint a torokfájás, gyulladások, a láz és a cukorbetegség természetes ellenszerei, egyúttal számos allelokémikáliát is termelnek, melyek hatással lehetnek a gerinctelenek poszt embrionális fejlődésére és szaporodására (DARVAS et al. 1997). Jelentős mennyiségű, részben táplálkozást gátló hatású neoklerodánokat (pl. ajugarinok, ajugareptansonok, ivainok, stb.) és a rovarok hormonális rendszerén keresztül ható, fejlődésgátló hatású fitoekdiszteroidokat (pl. 20-OH-ekdizon a rovarok vedlési hormonja, ajugaszteron, ajugalakton, stb.) tartalmaznak (DARVAS 1991).

A felhasznált ínfű fajok fitoekdiszteroid és neoklerodán összetételének vizsgálatai azt mutatták, hogy ezen allelokémikáliák tartalma fajonként jelentős mértékben eltér. A hatékony komponensek kémiai jellemzőik alapján tisztítási, frakcionálási eljárások segítségével elkülöníthetőek. Standard metanolos-vizes elválasztás során a 10 %-os metanolos frakciókba főként rovarokon inaktív flavonoidok kerülnek, a 60 %-os frakciók tartalmazzák a fitoekdiszteroidokat, míg a 100 %-os frakcióra a neoklerodán tartalom jellemző (FEKETE 2004, FEKETE és POLGÁR 2004, BÁTHORI 2006).

**1. táblázat.** *Ajuga* fajokra jellemző neoklerodánok és fitoekdiszteroidok (FEKETE 2005, LAUBER et al. 2004, MALAKOV et al. 1991)

<i>Ajuga</i> faj	Neoklerodánok	Fitoekdiszteroidok
<i>A. bracteosa</i>	ajugarin I-V, bracteonin A	ciaszteron, ajugalakton, 22-acetil-ciaszteron
<i>A. chamaepitys</i>	ajugapitin, chamaepitin, ajugachin A, B	ajugalakton, makiszteron A, ciaszteron
<i>A. genevensis</i>	Ajugavensin A– C	29-norciaszteron, 29-norszengoszteron, ajugalakton

Az ínfű fajok felhasználásakor a csípőszúnyog lárvák elleni védekezés alapfeltétele, hogy a szükséges élővizes kezelések miatt megfelelő víztoxikológiai paraméterekkel bírjanak, vagyis a kezelés helyén a társulás más fajaira ne gyakoroljanak jelentős mérgező hatást. Előzetes vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az ínfű fajok fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakciói a nem célszervezet vízi ízeltlábú *Daphnia magna* fajon toxikusnak mutatkoztak, azonban a jellemzően neoklerodán tartalmú frakciók még extrém magas dózisban sem gyakoroltak káros hatást a nagy vízízbőlhára (FEKETE et al. 2003).

Munkánk során az ínfű fajok rovarokra gyakorolt hatásáról meglévő tudásunkat próbáltuk bővíteni. Három ínfű faj – *A. chamaepitys* (L.) Schreb, *A. genevensis* L., *A. bracteosa* Benth. – kivonatainak hatását vizsgáltuk *Aedes aegypti* csípőszúnyog lárvákon. Célunk az volt, hogy megállapítsuk, mely növények kivonatai a leghatékonyabbak, és hogy a kivonatokban megtalálható számos vegyület közül melyek felelősek a hatásért. Mindezek alapján munkánkkal megpróbáltunk hozzájárulni annak eldöntéséhez, hogy az ínfű fajok megfelelhetnek-e csípőszúnyogok elleni botanikai inszekticidként való alkalmazásra.

## Anyagok és módszerek

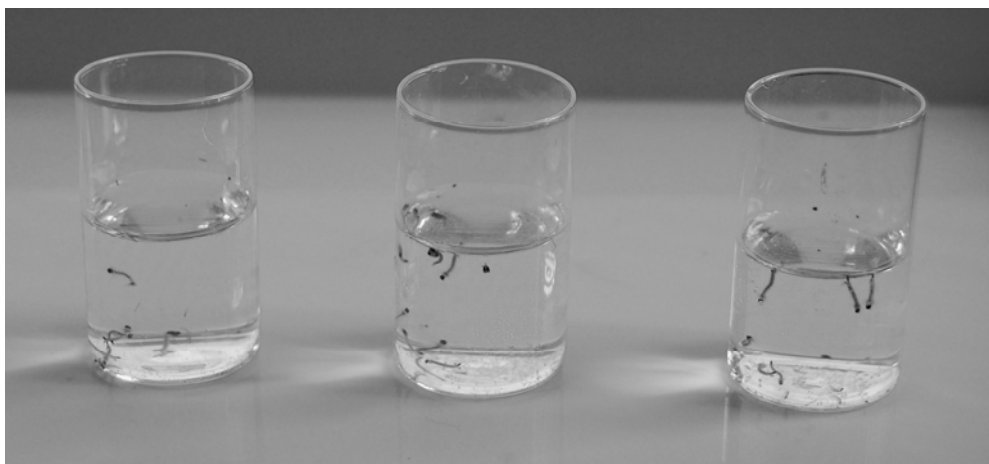
A kísérleteket a MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztály laboratóriumában végeztük.

A felhasznált ínfű kivonatok: A vizsgálatokat a kalinca ínfű (*Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb.), a közönséges ínfű (*Ajuga genevensis* L.), és egy dél-ázsiai faj, az *Ajuga bracteosa* Bent fajokon végeztük. A vizsgálathoz felhasznált növényeket az MTA NKI területén, szabadföldön illetve üvegházban (*A. bracteosa*) termesztettük, és minden esetben a virágzás idején gyűjtöttük be a föld feletti részeket. A kivonatok készítése FEKETE (2005) szerint történt. A kísérletekhez a leszárított, porrá őrölt növényi részekből készült kivonatokot használtuk. Ennek elkészítéséhez 10 g száraz növényi mintát 2×190 ml metanolban (99,8 v/v %) extraháltunk 5 percig ultrahangos feltárás segítségével. Szűrés után egyesítettük a két metanolos fázist, 50 °C-on vákuum alatt beszáritottuk, majd 10 ml metanolban visszaoldva tároltuk -40 °C-on a további felhasználásig. Az így kapott teljes kivonat 1 ml-e megfelel 1 g száraz növényi anyag extraktumának, amit 100 %-osnak tekintünk. A vizsgálatokhoz a teljes extraktumokból metanolos–vizes frakciókat készítettünk a követ-

kező összetételekben: metanol:víz=10:90, metanol:víz=60:40, metanol:víz=100:0. Ehhez a teljes növényi kivonatokhoz 10 ml desztillált vizet adtunk. Az oldatot centrifugáltuk (5 perc, 3000 1/perc fordulatszám), majd a keletkező csapadék eltávolítása után 10 ml acetont hozzáadásával (fehérjék eltávolítása) újból centrifugáltuk 5 perc-re, 3000 1/perc fordulatszámon. A kapott oldatot 20 ml n-hexánnal ráztuk ki (színyanyagok eltávolítása), a továbbiakban az elválasztott vizes-acetonos fázist beszárítottuk N<sub>2</sub> gáz árama alatt. Az így képzett előtisztított növényi anyag maradékot visszaoldottuk 10 ml desztillált vízben, majd Sep-Pak C18 kis-oszlop segítségével eluáltuk a különböző töménységű vizes metanollal, így jutottunk a 10%, 60% és 100%-os töménységű metanos(-vizes) frakciókhoz. A frakciók 1 ml-e továbbra is 1 g száraz növényi anyag extraktumát tartalmazta, amit 100 %-osnak tekintettünk.

A kísérleti állatok: A kezelésekhöz *Aedes aegypti* csípőszúnyog L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub>-es stádiumú lárváit használtuk. A lárvák a MTA NKI tenyészetéből származnak. A tenyészet 26-28 °C hőmérsékletű, napi 16 órás megvilágítású tenyészsobában volt elhelyezve.

A kísérlet beállítása: A lárvákat 10 ml csapvízzel töltött faeces poharakba helyeztük, poharanként 10 (8-13) állatot (1. ábra). Az alkalmazott dózisokat a lárvák víz élőközegében oldottuk fel, a szúnyogok behelyezése előtt, dózisonként négy ismétléssel, négy kontrollt alkalmazva. A kísérletek alatt a lárvákat a tenyészsobában tartottuk. A vizsgálatokat kétnaponta értékeltük, a lárvák imágóvá fejlődéséig. Ez alatt feljegyeztük a lárvák fejlődési ütemét és mortalitását. Mind a három ífű faj (*A. genevensis*, *A. bracteosa*, *A. chamaepitys*) teljes kivonatát, és 10%, 60% és 100%-os metanos-vizes frakcióit teszteljük 0,005 - 4%-os dózisokban.



1. ábra. *Aedes aegypti* lárvákkal végzett kísérlet, aljzaton táplálkozó L<sub>4</sub>-es lárvák

A kapott adatokat a Microsoft Office Excel 2003. és Statistica 6.0 programcsomag segítségével dolgoztuk fel. A mortalitási adatokat a Henderson-Tilton képlettel értékeltük, míg az adatok összehasonlítására t-próbát alkalmaztunk.

## Eredmények és értékelésük

A teljes infú kivonatok tesztelése során, 0,1 %-os koncentrációnál a következő hatékonysági sort kaptunk: *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. chamaepitys*. A pusztulások többsége a beállítást követő 4. npra következett be, ami az *A. genevensis* esetén 100 %-os, míg az *A. bracteosa* használatakor 80 %-os volt. Ezzel szemben az *A. chamaepitys* jelentős, 70 % feletti pusztulást csak 1 %-os koncentrációban okozott a beállítást követő 8. npra.

A fejlődési idő meghosszabbodását a gyengébb hatású kezeléseknél (*A. chamaepitys* 0,1 és 0,5 %) tapasztaltuk, azonban ezek mértéke nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll egyedekhez képest.

A metanolos-vizes frakciók tesztelésekor megállapítottuk, hogy mindhárom infú faj 100 %-os metanolos, tehát a neoklerodánokat tartalmazó extraktumai bizonyultak a leghatékonyabbnak (2. táblázat). Az *A. genevensis* esetében a 100 %-os metanolos frakció hatása megegyezett a teljes kivonathoz képest, tehát megállapítható, hogy a mortalitást egyértelműen a neoklerodános frakció okozza.

Az *A. bracteosa* frakciói gyengébb hatást mutattak a teljes kivonathoz képest, ami feltehetőleg a tisztítási eljárások során bekövetkező hatékony komponensek elvesztésének eredménye, vagy a teljes kivonatban érvényre jutó, de az egyes frakciókban már nem érvényesülő esetleges szinergizmus következménye lehet.

Az *A. chamaepitys* egyes frakciói, nem várt módon, hatékonyabbnak bizonyultak a teljes kivonathoz képest. Feltételezzük, hogy a teljes kivonat toxikus voltát antagonisták csökkentik. A 60 %-os, fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakció szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult még az *A. bracteosa* 100 %-os frakciójánál is. Ez az eredmény különösen meglepő annak ismeretében, hogy az *A. chamaepitys* tartalmazza a más rovarokon bizonyítottan aktív fitoekdiszteroidokból a legkisebb mennyiséget.

**2. táblázat.** Frakcionált infú kivonatok LC<sub>50</sub> és LC<sub>95</sub> értékei *Aedes aegypti* lárvákon, a beállítást követő 4. napon

Felhasznált növények	LC50 4. nap %	LC95 4. nap %
<i>A. bracteosa</i> 10%	>4	>4
<i>A. bracteosa</i> 60%	1,06 (0,89-1,68)	1,87 (1,79-2,85)
<i>A. bracteosa</i> 100%	0,60 (0,44-0,75)	1,03 (0,88-1,21)
<i>A. chamaepitys</i> 10%	1,61 (0,4-2,64)	3,41 (2,48-4,89)
<i>A. chamaepitys</i> 60%	0,31 (0,23-0,4)	0,53 (0,47-0,71)
<i>A. chamaepitys</i> 100%	0,018 (0,015-0,021)	0,026 (0,023-0,026)
<i>A. genevensis</i> 10%	1,39 (1,30-1,85)	2,068 (2,062-2,667)
<i>A. genevensis</i> 60%	1,48 (1,26-2,)	2,19 (2,04-2,81)
<i>A. genevensis</i> 100%	0,032 (0,027-0,047)	0,052 (0,048-0,069)

A kísérletek megfigyelései azt mutatták, hogy egyértelmű táplálkozást gátló hatást egyik kezelés sem okozott, a lárvák táplálékfelvétele folyamatos volt. A neoklerodán frakciók jelentős biológiai aktivitásukat feltehetőleg hormonális úton fejtik ki, amit alátámaszt több esetben tapasztalt farát fázisú (a lárv a vedlési folyamat során, annak teljes végbemenése előtt pusztul el, a régi lárvabőr nem válik le, megszorul) pusztulás is.

Az eredmények ismeretében indokolt a további kutatások elvégzése, különösen a neoklerodánok hatásaira vonatkozóan. Mivel a nem célszervezet *D. magna* fajra nem gyakoroltak toxikus hatást ezek a frakciók, így egy neoklerodán alapú, csípőszúnyog lárvák ellen alkalmazható inszekticid kifejlesztése perspektivikus lehet.

### Köszönetnyilvánítás

Jelen munka az NKTH-OTKA 67737 számú támogatásában részesült.

### Felhasznált irodalom

- BÁTHORI, M. (2006): Fitoekdiszteroidok izolálása, analízise és szerkezeti vizsgálata. – Akadémiai doktori értekezés
- CAMPS, F. (1991): Plant ecdysteroids and their interaction with insects. In: HARBORNE, J.B. – TOMAS-BARBERAN, F.A. (szerk.): Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. – Clarendon Press, Oxford, pp. 331–376.
- DARVAS, B. (1991): *Ajuga* fajok fitoekdiszteroidjai, mint rovar-fejlődésszabályzó hatású botanikai inszekticidek. – Növényvédelem 27: 481–498.
- DARVAS, B. – DEFU, C. – POLGÁR, L.A. – KÖRMENDY, C. – VIDAL, E. – PAP, L. – COLL, J. (1997): Effects of some Materials Extracted from *Ajuga reptans* var. *reptans* on *Aedes aegypti* and *Dysdercus cingulatus* Larvae. – Pesticide Science 49: 392–395.
- FEKETE, G. – LEVKOVETZ, I. – STARODUN, N.F., SZÉKÁCS, A. (2003): Nagy vízibolha (*Daphnia magna* Straus) bioteszt alkalmazása különböző ínfű (*Ajuga* spp.) kivonatok, és ekdiszteroidok víztóxicológiai hatásának vizsgálatára. – Abs. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok, pp. 158.
- FEKETE, G. – POLGÁR, A.L. (2004): Különböző ínfű (*Ajuga*) fajok metanolos kivonatainak hatása *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) csípőszúnyog lárvákon. – Abs. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok, pp. 37.
- FEKETE, G. – POLGÁR, L.A. – BÁTHORI, M. – COLL, J. – DARVAS, B. (2004): Per os efficacy of *Ajuga* extracts against sucking insects. – Pest Management Science 60: 1099–1104.
- FEKETE, G. (2005): Növényi kivonatok hatása a rovarok metamorfózisára, Doktori értekezés, Veszprémi Egyetem, Keszthely
- LAUBER, É. – GHARIB, A. – KINCSES, J. – VAJDICS, GY. – FEKETE, G. – DARVAS B. (2004): Ínfű fajok (*Ajuga* spp.) őrlményeinek hatása aszalványmolyon (*Plodia interpunctella* Hübner). – Növényvédelem 40: 559–569.
- MALAKOV, P.Y. – PAPANOV, G.Y. – DELATORRE, M.C. – RODRIGUEZ, B. (1991): Neoclerodane diterpenoids from *Ajuga genevensis*. – Phytocemistry 30: 4083.
- MATSOUKA, T. – IMAI, S. – SAKAI, M. – KAMADA, M. (1969): Studies on phytoecdysones. – Annual Report of. the Takeda Research Laboratory 28: 221–271.