

VESZPRÉMI EGYETEM
GEORGIKON MEZOGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
INTERDISZCIPLINÁRIS DOKTORI ISKOLA

Vezető:

DR. habil. VÁRNAGY LÁSZLÓ D.Sc.

Témavezető:

DR. POLGÁR A. LÁSZLÓ C.Sc.

Konzulens:

DR. habil NÁDASY MIKLÓS C.Sc.

**NÖVÉNYI KIVONATOK HATÁSA A ROVAROK
METAMORFÓZISÁRA**

Készítette:

FEKETE GÁBOR

Okleveles agrárkémikus agrármérnök

KESZTHELY

2005

NÖVÉNYI KIVONATOK HATÁSA A ROVAROK METAMORFÓZISÁRA

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta: **FEKETE GÁBOR**

Készült a Veszprémi Egyetem Interdiszciplináris Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Polgár A. László C.Sc.

Elfogadásra javaslom: igen / nem

.....
Dr. Polgár A. László

A jelölt a doktori szigorlaton % -ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
(aláírás)

Bíráló neve: igen /nem

.....
(aláírás)

Bíráló neve: igen /nem

.....
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el

Készthely,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minosítése.....

.....
Az EDT elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

KIVONATOK.....	6
Magyar nyelvű kivonat.....	6
Summary (angol nyelvű kivonat)	8
Zusammenfassung (német nyelvű kivonat).....	9
1. BEVEZETÉS	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
2.1 EKDISZTEROIDOK ÉS NEOKLERODÁNOK.....	14
2.1.1 Az ekdiszteroidok kémiai tulajdonságai	14
2.1.2. Ekdiszteroidok a növényekben (fitoekdiszteroidok).....	14
2.1.3 Fitoekdiszteroidok <i>Ajuga</i> fajokban	16
2.1.4 Ekdiszteroidok a rovarokban.....	17
2.1.4.1 Az ekdiszteroidok szerepe a rovarfejlődés során.....	17
2.1.4.2 Fitoekdiszteroidok hatása rovarokon	17
2.1.5 Neoklerodánok	19
2.2 A FELHASZNÁLT ÍNFU (<i>AJUGA</i>) FAJOK	21
2.2.1 Az indás ínfu (<i>Ajuga reptans</i> var. <i>reptans</i> L.)	21
2.2.2 A kalinca ínfu (<i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreb.)	22
2.2.3 A közönséges ínfu (<i>Ajuga genevensis</i> L.).....	23
2.2.4. <i>Ajuga bracteosa</i> Benth.....	23
2.3 A KÍSÉRLETI ÁLLATOK.....	25
2.3.1 A zöldborsó-levéltetu (<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris).....	25
2.3.2 A gyapoptoloska (<i>Dysdercus cingulatus</i> Fabricius).....	26
2.3.3 Az egyiptomi csíposzúnyog (<i>Aedes aegypti</i> Linnaeus)	27
2.3.4 A nagy vízibolha (<i>Daphnia magna</i> Straus).....	28
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	30
3.1 AZ <i>AJUGA</i> EXTRAKTUMOK	30
3.1.1 Ínfüvek termesztése és gyűjtése	30
3.1.2 Az <i>Ajuga</i> extraktumok készítése.....	30
3.1.3 Az extraktumok fitoekdiszteroid tartalmának meghatározása.....	33
3.2 A KÍSÉRLETI ÁLLATOK ÉS A TESZTMÓDSZEREK.....	34
3.2.1 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	34
3.2.2 <i>Dysdercus cingulatus</i>	37
3.2.3 <i>Aedes aegypti</i>	39
3.2.4 <i>Daphnia magna</i>	40
3.3 A KÍSÉRLETEK STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉSE	41
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	39
4.1 A FELHASZNÁLT <i>AJUGA</i> FAJOK FITOEKDISZTEROID TARTALMA.....	39
4.2 EREDMÉNYEK AZ <i>ACYRTHOSIPHON PISUM</i> LEVÉLTETUN	40
4.3 EREDMÉNYEK A <i>DYSDERCUS CINGULATUS</i> POLOSKAJAJON	46
4.4 EREDMÉNYEK AZ <i>Aedes aegypti</i> CSÍPOSZÚNYOG FAJON	52

4.5 EREDMÉNYEK A <i>DAPHNIA MAGNA</i> VÍZIBOLHÁN.....	54
5. MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK.....	58
6. ÖSSZEFOGLALÁS	63
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	66
8. IRODALOMJEGYZÉK	67
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	76

Kivonatok

Magyar nyelvű kivonat

Növényi kivonatok hatása a rovarok metamorfózisára

Munkánk során célul tűztük ki, hogy négy ífu faj (*Ajuga reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys*, *A. genevensis*, *A. bracteosa*) hatását tanulmányozzuk három rovaron (*Acyrtosiphon pisum*, *Dysdercus cingulatus*, *Aedes aegypti*) és egy nem célszervezet vízi ízeltlábún (*Daphnia magna*). Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy az ífu fajok közül melyik lehet alkalmas hazai előállítású botanikai peszticidként való alkalmazásra, milyen hatással vannak a vizsgált rovarokra, valamint hatásmódjukat próbáltuk megállapítani. Vizsgálatainkba a rovarok vedlési hormonjaként ismert 20-OH ecdizont is bevontuk, a levéltetvek esetén más fitoekdiszteroidokat is teszteltünk.

Az *A. pisum* levéltetűvel végzett *per os* vizsgálataink során a következő hatékonysági sort kaptuk: *A. bracteosa* > *A. chamaepitys* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. genevensis*. Megállapítottuk továbbá, hogy míg az *A. chamaepitys* fitoekdiszteroidokat és neoklerodánokat tartalmazó frakciói is hatással voltak a rovarra, a másik három fajnak csak az ecdiszteroid-frakciói bizonyultak aktívnak. A hatékony frakciók háromféle fejlődési rendellenességet okoztak: farát fázisú pusztulás, csökevényes szárnyfejlődés és az érzögödrök rendellenesen magas száma a szárnyatlan nőtények csápján. Ezen a levéltetű fajon mértük 12 tiszta ecdiszteroid hatását is. Az eredményekből kiderült, hogy a rovarok vedlési hormonjánál (20-OH ecdizon) aktívabb fitoekdiszteroidok is megtalálhatóak növényekben.

A *D. cingulatus* poloskán végzett szintén *per os* vizsgálataink hasonló eredményt adtak. Magasabb koncentrációban az *A. reptans* var. *reptans* hatékonyabb volt, mint az *A. chamaepitys*. Az egyes frakciók vizsgálata is az elozoekhez hasonló eredményt adott, vagyis a fitoekdiszteroid-frakciók mind a négy ífu faj esetében hatékonyak voltak, míg a neoklerodánokat tartalmazók közül csak az *A. chamaepitys* 100 %-os metanolos frakciója bizonyult hatékonynak. A

gyapotpoloskán is több fejlődési rendellenességet megfigyeltünk: farát fázisú pusztulás, egyéb vedlési zavarokkal járó mortalitás és szárnyfejlődési zavarok, köztük pl. rövidszárnyúság (mikropterizmus). A fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakciók jelentősen növelték a *D. cingulatus* fejlődési idejét. A 20-OH ekdizon hasonló koncentrációban volt aktív a gyapotpoloskán mint a zöldborsó-levéltetun.

Az *A. aegypti* csíposzúnyog lárvákkal végzett kísérleteink a következő hatékonysági sort adták: *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. chamaepitys*. Az *A. reptans* var. *reptans* különböző frakcióinak hatásait vizsgálva egyértelműen megállapítottuk, hogy a mért aktivitásért a neoklerodánokat tartalmazó 100 %-os metanolos frakció felelős. A kezelések a csíposzúnyog lárvákon is okoztak farát fázisú pusztulásokat, egyéb elváltozást illetve a fejlődési idő változását azonban nem tudtuk megfigyelni.

A nem célszervezet *D. magna* vízibolhával végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a standard 48 órás tesztekben az ínfu kivonatok, a 20-OH ekdizon és a makiszteron A nem okoznak mobilitásgátlást. A kísérleteket folytatva a 96. órára azonban az *Ajuga* fajok és a tiszta ekdiszteroidok okozta mortalitás jelentős. Az *A. reptans* var. *reptans* 100 %-os metanolos, vagyis a döntően neoklerodánokat tartalmazó frakciója kísérleteink szerint semmiféle hatással nincs a vízibolhára. Aktívnak a 10 és 60 %-os metanolos-vizes (fitoekdiszteroidokat tartalmazó) frakciók bizonyultak. Az *A. reptans* var. *reptans* fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakciója és a makiszteron A morfológiai elváltozást is okoztak, amit mi vedlési rendellenességnek tartunk.

Kísérleteink eredményeiből megállapítható tehát, hogy az ínfu fajok változatos kémiai összetevőinek köszönhetően – melyek közül a fitoekdiszteroidok bizonyítottan, a neoklerodánok pedig valószínűleg hatnak a rovarok fejlődésére – alkalmasak lehetnek botanikai inszekticid előállítására. A további alap kutatási feladatok mellett azonban jelentős, a gyakorlati felhasználást lehetővé tevő fejlesztésre van szükség.

Summary (angol nyelvű kivonat)

The effect of botanical extracts on the metamorphosis of insects

We have studied the efficacy of crude extracts from four *Ajuga* spp. (*Ajuga reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys*, *A. genevensis*, *A. bracteosa*) and their fractionated extracts on the post-embryonic development of two exopterygota sucking insect species (*Acyrtosiphon pisum*, *Dysdercus cingulatus*), an endopterygota species (*Aedes aegypti*) and a non-target organism (*Daphnia magna*).

In the *A. pisum* tests the *A. bracteosa* > *A. chamaepitys* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. genevensis* order of efficacy was found. On *D. cingulatus* the order of efficacy was as follows: *A. reptans* var. *reptans* > *A. bracteosa* > *A. chamaepitys* > *A. genevensis*. Among fractionated extracts the 100% methanolic fraction of *A. chamaepitys* was highly effective on *A. pisum* and less effective on *D. cingulatus*. The entire 60% methanolic fraction was effective on both tested insects. On *A. aegypti* the order of efficacy was as follows: *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. chamaepitys*. The 100 % methanolic fractions were the most effective. In the *D. magna* tests only the 10 % and the 60 % methanolic fractions were active.

Zusammenfassung (német nyelvu kivonat)

Der Effekt der Pflanzenextrakten auf die Metamorphose der Insekten

Wir haben die Effektivität der unverfeinerten Extrakten von vier *Ajuga* spp. (*Ajuga reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys*, *A. genevensis*, *A. bracteosa*) und deren fraktionierte Extrakten an der nach-embryonalen Entwicklung von zwei exopterygoten Sauginsektenarten (*Acyrtosiphon pisum*, *Dysdercus cingulatus*), einer endopterygoten Art (*Aedes aegypti*) und einem Nichtziel-Organismus (*Daphnia magna*) studiert.

In dem *A. pisum* Test die nachstehende Effektivitätsreihe war gefunden: *A. bracteosa* > *A. chamaepithys* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. genevensis*. An dem *D. cingulatus* war die Effektivitätsreihe das Folgende: *A. reptans* var. *reptans* > *A. bracteosa* > *A. chamaepithys* > *A. genevensis*. Zwischen die fraktionierte Extrakten die 100% methanolische Fraktion von *A. chamaepithys* war mehr effektiv an dem *A. pisum* und weniger effektiv an dem *D. cingulatus*. Die voll 60% methanolische Fraktion war effektiv an beiden getesteten Insekten. Die Effektivitätsreihe an dem *A. aegypti* war das Folgende: *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. chamaepithys*. Die 100% methanolische Fraktionen waren am effektivsten. In dem *D. magna* Testen waren nur die 10% und die 60% methanolische Fraktionen aktiv.

1. 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. Használatukkal a növénytermesztés biztonságosabbá vált, csökkent az egységnyi termék előállításának költsége (DARVAS, 1999). Az kémiai növényvédelem első, nagy visszhangot kiváltó kritikája Rachel Carson „*Silent Spring*” című könyve volt, amely felhívta a figyelmet a túlzott peszticidhasználat veszélyeire. Már ekkor több kutatás alternatív, toxikológiai szempontból biztonságosabb növényvédelmi eljárásokra irányult. Ezek közé tartozik a biopeszticidek használata, azon belül is a botanikai inszekticidek fejlesztése.

A botanikai inszekticidek olyan növényi eredetű anyagok, melyek káros hatást gyakorolnak a rovarokra. Egyik ismert képviselőjük a *neem* fa (*Azadirachta indica* Juss.) kivonata, mely komoly nemzetközi karriert futott be. Magbelének olaja közvetlenül használható növényvédelmi célra, de gyárilag metanolos levél- és magkivonatokat is készítenek. A készítmények közös jellemzője, hogy melegvérűeken akut módon gyakorlatilag hatástalanok. Ennek példáján Magyarországon is megkezdődtek a kutatások, egy hasonlóan hatékony, de hazánkban is előállítható botanikai inszekticid kifejlesztésére. Az érdeklődés az ínfu nemzetség (*Ajuga* spp., *Lamiaceae*) fajai felé fordult (DARVAS 1991), melyek magas fitoekdiszteroid tartalmára, és rovarokon való aktivitására több mint harminc éve figyeltek fel (MATSOUKA et al. 1969). A növények által termelt, a rovarok vedlési hormonjához (20-OH ecdizon vagy ecdiszteron) hasonló vegyületeket nevezzük fitoekdiszteroidoknak.

Munkánk során az ínfu fajok rovarokra gyakorolt hatásáról meglévő tudásunkat próbáltuk bővíteni. Négy ínfu faj – *A. reptans* var. *reptans* L., *A. chamaepitys* (L.) Schreb, *A. genevensis* L., *A. bracteosa* Benth. – kivonatainak hatását vizsgáltuk három rovarfajon (*Acyrtosiphon pisum* Harris – zöldborsólevéltetű, *Dysdercus cingulatus* Fabricius – gyapotpoloska, *Aedes aegypti*

Linnaeus – egyiptomi csíposzúnyog) és egy nem célszervezet, a vízi ízeltlábú (*Daphnia magna* Straus – nagy vízibolha) ágascsapú rákon.

Célunk az volt, hogy megállapítsuk, mely növények kivonatai a leghatékonyabbak, és hogy a kivonatokban megtalálható számos vegyület közül melyek felelősek a hatásért. Vizsgálataink továbbá arra a kérdésre is megkísérelnek választ adni, hogy a fitoekdiszteroidok, a rovarok hormonrendszerének megzavarása révén milyen fejlődési deformációkat okozhatnak, illetve hogy az ífu fajokban megtalálható más allelokemikáliák milyen módon fejtik ki hatásukat. A nagy vízibolhával végzett munkák célja az volt, hogy vizsgáljuk az ífu kivonatok használatának esetleges veszélyeit egy nem célszervezet ízeltlábún.

Mindezek alapján munkánkkal megpróbáltunk hozzájárulni annak eldöntéséhez, hogy az ífu fajok alkalmasak-e botanikai inszekticidként való alkalmazásra.

2. Irodalmi áttekintés

Az elmúlt több mint harminc év során számos publikáció jelent meg az ínfu fajok želtlábúakra gyakorolt biológiai hatásairól. A legtöbb esetben a hatást a növényekben jelentos mennyiségben található, nagy számú fitoekdiszteroidnak tulajdonítják, azonban több szerzo foglalkozik az *Ajuga* fajokban szintén nagy mennyiségben előforduló neoklerodánok lehetséges aktivitásával a rovarszetekben (iridoidoknak illetve diglicerideknek tulajdonított hatást egy-egy szerzo említ, ezekre a kevés adat miatt a későbbiekben nem térünk ki). Az általunk (Lauber et al., 2004) legfontosabbnak tartott korábban leírt hatásokra vonatkozó adatokat az alábbiakban mutatjuk be (**1. táblázat**).

Vizsgált fajok	<i>Ajuga</i> faj	Extrakciós módszer	Kezelés formája	Koncentráció	Fo hatások	Referencia
Dictyoptera	AR	K _p , K _e , K _v	táp, L _{utolsó}	6 g drog sz.a./ 4 g táp	c,	RICHTER és BIRKENBEIL 1987, 1989
<i>Periplaneta americana</i> (Linnaeus)						
	AC ARR ARA	K _{an}	táp, I	10 %	a†, e†	DARVAS et al. 1996
Homoptera	AR	K _m	táp, T	30 mg l ⁻¹	f*	MELÉ et al. 1993
<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood)						
Heteroptera	ARR	K _m	ivóvíz, L ₂	0,05-1,0 %	c*, e*, f*†	DARVAS et al. 1997
<i>Dysdercus cingulatus</i> (Fabricius)						
	AA AB ARR	K _m	ivóvíz, L ₂	0,05-1,0 %	c*, d*), e*	DARVAS et al. 1998a, 1998b
Coleoptera	AB AR	K _m	táp, L ₄	2,5-10 %	a†, b, d*, f	SCHMUTTERER és TERVOOREN 1980
<i>Epilachna varivestis</i> (Muls.)						
	AB AR	K _m	topikális kezelés, L ₄	2,5-10 %	d*, f	SCHMUTTERER és TERVOOREN 1980
<i>Sitona humeralis</i> (Steph.)	AC ARR	K _m	táp, I	1ml K _m + 4 ml víz	a	NÁDASY és GÁL 1996
<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	AI	K _a , K _h , K _m	táp, L	0,05 %	b, f	PASCUAL-VILLALOBOS és ROBLEDO 1998
	AI	K _a	topikális kezelés, L	3 ?g/lárva (nyers K)	f	PASCUAL-VILLALOBOS és ROBLEDO 1998
Lepidoptera						

<i>Bombyx mori</i> (Linnaeus)	AB	K _m	táp		c	KUBO et al. 1981
<i>Heliothis virescens</i> (Fabricius)	AB	K _m	táp		nincs hatás	KUBO et al. 1981
<i>Heliothis zea</i> (Boddie)	AB	K _m	táp		nincs hatás	KUBO et al. 1981
<i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders)	AB	K _m	táp		c	KUBO et al. 1981
<i>Pieris brassicae</i> (Linnaeus)	AC ARR	K _m	táp, L ₄	1 ml K _m + 4 ml víz	a, b	NÁDASY és GÁL 1996
<i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith)	AB	K _m	táp		c	KUBO et al. 1981
<i>Spodoptera littoralis</i> (Boisd.)	AC ARA ARR	K _{an}	táp, L ₆	0,1-2,0 %	a†, b†	DARVAS et al. 1996
	AP	K _p , K _{mk} , K _a , K _m , K _v	táp	10-100 mg l ⁻¹	a†•	BELLÉS et al. 1985, BEN JANNET et al. 2000
Diptera						
<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus)	AB AR	K _m	közeg, L ₄	65-740 ppm	d, e, f	MARCARD et al. 1986
	ARR ARA AC	K _{an}	közeg, L ₃	0,05-5 %	d*, f*	DARVAS et al. 1996
	ARR	K _m	közeg, L ₄	0,05-1,0 %	c†	DARVAS et al. 1997
<i>Aedes togoi</i> (Theobald)	AB AR	K _m	közeg, L ₄	65-740 ppm	d, e, f	MARCARD et al. 1986
<i>Culex quinquefasciatus</i> (Say)	AB AR	K _m	közeg, L ₄	65-740 ppm	d, e, f	MARCARD et al. 1986
<i>Neobelieria bullata</i> (Parker)	ARR ARA AC	K _{an}	táp, L ₁	0,5; 1 %	b*, f*	DARVAS et al. 1996
	ARR ARA AC	K _{an}	közeg, L ₃	0,25-25 %	b*, f*	DARVAS et al. 1996
Acarina						
<i>Tetranychus urticae</i> (Koch.)	AB	K _m	táp, l?	2,5-10 %	a, e, f	SCHAUER és SCHMUTTERER 1981
	AB	K _m	Perme- tezés, T	2,5-10 %	d, f	SCHAUER és SCHMUTTERER 1981
	AB	K _m	topikális kezelés, l?	2,5-10 %	a, e, f	SCHAUER és SCHMUTTERER 1981

Megjegyzések: AB – *A. bracteosa*, AC – *A. chamaepitys*, AI – *A. iva*, AP – *A. pseudoiva*, AR – *A. reptans*, ARA – *A. reptans* var. *atropurpurea*, ARR – *A. reptans* var. *reptans*; K_a – acetonos, K_{an} – acetonitriles, K_e – etanolos, K_h – hexános, K_m – metanolos, K_{mk} – metilénkloridos, K_p – petróleuméteres, K_v – vizes kivonatok; T – tojás, L – lárva, l – imágó; *fitoekdiszteroidoknak, †neoklerodánoknak, ‡iridoidoknak, •diglicerideknek tulajdonított hatás; a – táplálkozásgátlás, b – növekedésgátlás, c – vedlési zavarok, d – fejlődési rendellenességek, e – csökkent termékenység, f – mortalitás

1. táblázat: Ínfu kivonatok hatásai rovarokon (Lauber et al. 2004 alapján)

Mint az a táblázat adataiból kitunik, számos extrakciós eljárással készítették kivonatokat, és a mortalitáson kívül sok egyéb, rovarokon tapasztalt rendellenességet leírtak (táplálkozásgátlás, növekedésgátlás, vedlési zavarok, fejlődési rendellenességek, csökkent termékenység).

Az alábbi fejezetben az ekdiszteroidok és neoklerodánok legfontosabb tulajdonságait, előfordulásukat és szerepüket tárgyaljuk, valamint bemutatjuk az általunk használt *Ajuga* fajokat és tesztállatokat.

2.1 Ekdiszteroidok és neoklerodánok

2.1.1 Az ekdiszteroidok kémiai tulajdonságai

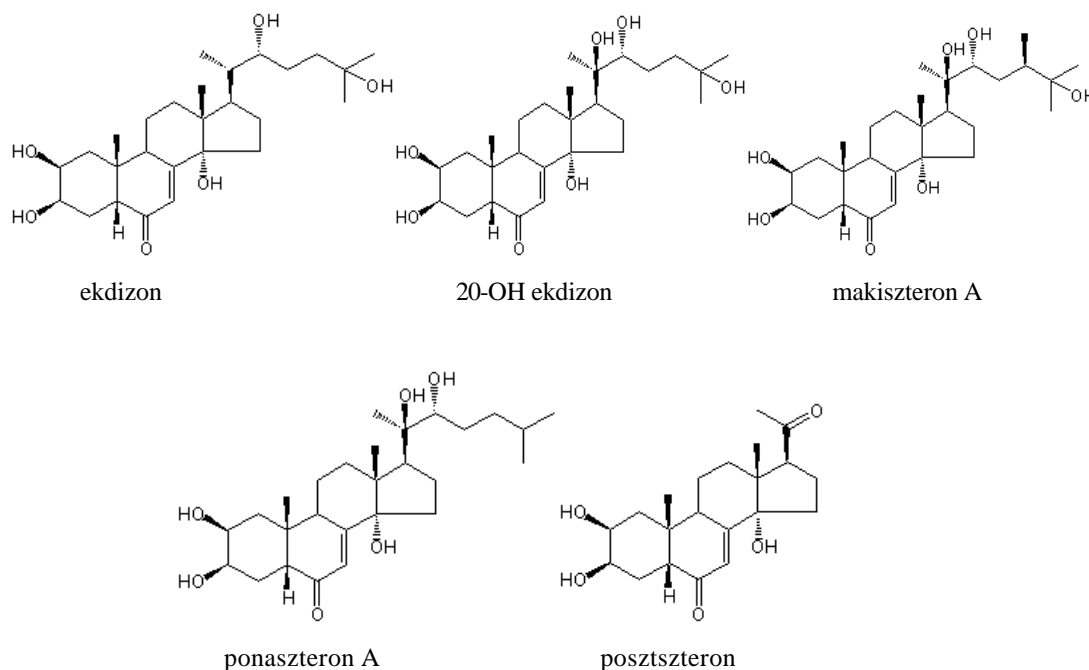
Az ekdiszteroidok C_{27} felépítésű szteránvázú vegyületek. Bár a vázuk a koleszteroléval azonos, térbeli struktúrájuk eltér a magasabbrendű szervezetekben megtalálható szteroid hormonoktól. Az A és a B gyűrű síkja egymásra merőleges. Nagyszámú poláros szubsztituens (hidroxil-csoportok) található bennük, ez okozza jó vízoldékonyságukat (**1. ábra**).

Nagy biológiai aktivitással a C-20 hidroxil származékok (pl.: 20-OH ekdizon, makiszteron A, ponaszteron A) rendelkeznek, míg az oldalláncon nem hidroxilált származékok inaktívak (posztszteron). A vedlési hormon aktivitásához tehát elengedhetetlen a hidroxilált oldallánc.

2.1.2. Ekdiszteroidok a növényekben (fitoekdiszteroidok)

Az első növény, amelyben 1966-ban fitoekdiszteroidot találtak a *Podocarpus nakaii* Hayata (Podocarpaceae) volt, amiből a ponaszteron A-t izolálták (Nakanishi et al. 1966). Azóta már több mint 100 családba tartozó növény mintegy 300 különböző fitoekdiszteroidja ismert. Előfordulnak a növények levelében, hajtásában, rizómájában, kérgében, virágjában és magjában is. Pontos funkciójukról azonban nincs tudomásunk, sokan a növények védekező jellegű, másodlagos anyagainak tartják őket (CAMPS et al. 1991). Mások a

gyökérképződésben, és a virágok megjelenésében látják a szerepüket, illetve a növényi sejtek differenciálódásának irányításában (DARVAS, 1991, PONGRÁCZ et al. 2000).



1. ábra: Néhány ekdiszteroid szerkezeti képlete (LAFONT et al. 2002)

Nehezíti a különböző funkcióról alkotott elképzelések bizonyítását, hogy a növényekben mennyiségileg és minőségileg is igen eltérő a fitoekdiszteroid összetétel. Legnagyobb mennyiségben a *Diploclisia glaucescens*-ben Blume (Menispermaceae) található meg a 20-OH ecdizon, ez a kifejlett hajtásban mintegy 32.000 ppm (LAFONT és HORN, 1989). Jelentős a fitoekdiszteroidok mennyisége a *Cyanotheris arachnoides* Clarke (Commelinaceae) növényfajban, melynek gyökere 29.000 ppm 20-OH ecdizont is tartalmazhat (CHU és LU, 1980), a *Dacrydium intermedium* Kirk (Podocarpaceae), melyben 22.000 ppm fitoekdiszteroid van (RUSSEL et al. 1972), valamint a *Serratula* (Asteraceae) fajokban, melyek virágjában és magjában 20.000 ppm ekdiszteroid lehet (BÁTHORI et al. 1990). A *Vitex* (Verbenaceae) és a *Silene* (Caryophyllaceae) fajok kevesebb, de még mindig jelentős mennyiségű fitoekdiszteroidot tartalmaznak (KUBO et al. 1984; BÁTHORI et al. 1987). Az *Ajuga reptans*ban

szintén nagy mennyiségű (200-3000 ppm), fitoekdiszteroid található (TOMÁS et al. 1992).

A növény korától függően a fitoekdiszteroidok mennyisége folyamatosan változik, általában a fiatal, illetve a virágzó növényben található meg a legnagyobb mennyiségben, de ugyanígy a különböző fitoekdiszteroidok egymáshoz viszonyított aránya sem állandó ugyanazon növényfajban.

2.1.3 Fitoekdiszteroidok *Ajuga* fajokban

Az általunk vizsgált *Ajuga* fajok eltérő mennyiségű és összetételű fitoekdiszteroidokat tartalmaznak:

- az *A. bracteosa* ~2000 ppm fitoekdiszteroidot termel (csökkenő mennyiségben – ciaszteron, ajugalakton, 22-acetil-ciaszteron, 22-acetil-3-epi-ciaszteron, szengoszteron, polipodin B, 3-epi-ciaszteron, ajugaszteron);
- az *A. chamaepitys* ~150 ppm fitoekdiszteroidot termel (ajugalakton, makiszteron A, ciaszteron, 20-OH ekdizon);
- az *A. genevensis* ~760 ppm fitoekdiszteroidot termel (29-norciaszteron, 29-norszengoszteron, ajugalakton, 20-OH ekdizon, 22-acetil-ciaszteron);
- az *A. reptans* ~1600 ppm fitoekdiszteroidot termel (20-OH ekdizon, ajugalakton, ajugaszteron B', ciaszteron, polipodin B, 28-epi-szengoszteron, szengoszteron, kapitaszteron) (TOMÁS et al. 1993; DARVAS et al. 1993, DARVAS, 2001).

Az *Ajuga* fajok által termelt fitoekdiszteroidok minősége és mennyisége a tenyészidőszak alatt változik (pl. üvegházban alacsonyabb, mint szabadföldön, napfényes körülmények között; nyáron kétszer akkora, mint tavasszal). Fenológiai fázis szerint: a virágzás előtti és a virágzó növényben (*A. reptans*) sokkal nagyobb mennyiségben (1567 ppm) és többféle fitoekdiszteroid volt mérhető, mint virágzás után (892 ppm). Növényi részek szerint (*A. reptans*): a levélben nagyobb mennyiségben (1567 ppm) találták, mint a gyökérben (948 ppm) (TOMÁS et al. 1993; DARVAS et al. 1993).

2.1.4 Ekdiszteroidok a rovarokban

2.1.4.1 Az ekdiszteroidok szerepe a rovarfejlődés során

A rovarok nem képesek a szteránváz szintézisére, ezért a táplálékfelvétel útján kell, hogy ehhez hozzájussanak. Növényeво rovarok esetén a fitoszterolok biztosítják a szteránváz forrását (MARÓY és DARVAS, 1990).

Az agy neuroszekréciós sejtjeiben termelődik a protoracikotrop neurohormon (PTTH), amely az elotori mirigyet az ekdizon szekréciójára készíti. Innen az ekdizon a hemolimfába kerül, majd a perifériális szervekben hidroxilálódik 20-OH ekdizonná. Ez a vegyület aktiválja a vedléskor az mRNS-t, részt vesz a kutikula lebontásában és képzésében (FÓNAGY, 1990).

Az ekdiszteroidok szintje a rovarokban általában 1 ppm körüli, a vedlés előtt egy rövid időre megnövekszik, majd ismét visszaáll az alapszintre.

2.1.4.2 Fitoekdiszteroidok hatása rovarokon

Az fitoekdiszteroidok kutikulán való áthaladása poláros tulajdonságuk miatt nem lehetséges. Rovarokon a tápban és az ivóvízben való adagolással kiváltott hatásai vizsgálhatók, illetve injektálhatóak. A rovarok *per os* (= tápcsatornán át bejuttatott) ekdiszteroid-érzékenysége csoport, illetve fajfüggő. Az eddigi kísérletek alapján a lárvák relatív érzékenységi sora (LC₅₀ értékek alapján, rokon vegyületekre – pl. ekdizon, 20-OH ekdizon, ciaszteron, ponaszteron A stb. – vonatkoztatva) a következő: *Nematocera* (fonalascsapú kétszárnyúak; 3-50 ppm), *Ixodidae* (kullancsok; 5-50 ppm), *Lepidoptera* (lepkék; 25-200 ppm), *Aleyrodidae* (molytetvek; 50-200 ppm), *Brachicera* (rövidcsapú kétszárnyúak; 100-300 ppm), *Coleoptera* (bogarak; 500-5000 ppm). A rovarok érzékenysége a konkrét fitoekdiszteroidtól, illetve az adott faj fejlettségi állapotától függően változik. Kisebbségi koncentrációban vedlési rendellenességeket okoznak lárvákon, nagyobb koncentrációban az imágók szaporodási képességére hatnak (pl. petefészkek fejlődési zavarok) (DARVAS, 1991). Üvegházi molytetű (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) esetében az első stádiumú lárvák a vedlés alatt

elpusztultak, ha őket preparált (100 mg/l ajugalakton- illetve 29-norszengoszteron-kivonatot tartalmazó oldatba merített), majd táptalajra helyezett *Nicotiana glauca* Graham (dohány) levéldarabokon (*in vitro*) nevelték. Hasonlóan magas mortalitást figyeltek meg az első lárvastádiumban 20-OH ekdizonos kezelés során (MELÉ et al. 1993).

A fitoekdiszteroidoknak *agonista* (serkento) és *antagonista* (gátló) hatásaik lehetnek. *Agonista* hatás akkor jelentkezik, ha a rovarba 20-OH ekdizon (a vedlési hormon), ekdizon (a vedlési prohormon) vagy más, a rovarokban nem jelenlévo, de bennük 20-OH ekdizonként viselkedo ekdiszteroidok kerülnek. Ezek közvetlenül, vagy aktiváló anyagcsere-folyamatok után, a vedlési hormon receptor-helyeire kötödvé korábban indítják el a vedlés folyamatát, amire az állat még nincs fiziológiásan felkészülve, így annál vedlési rendellenességek mutatkoznak. Vedlési rendellenesség a *prematurált* (fejlödési szempontból korai) vedlés, ennek egy lehetséges következményeként a fejtök megszorul (az állat nem tudja levedleni, ami táplálkozásképtelenséghez, pusztulásához vezet). Ezt, valamint a súlynövekedés gátlását figyelték meg KUBO és munkatársai (1983), amikor 25, 50 és 100 ppm-ben 20-OH ekdizont keverték selyemlepke (*Bombix mori* L.) lárájának tápjához. *Neobellieria bullatan* (Parker) (Diptera) a lárva és báb stádiumok időtartamának csökkenését figyelték meg *Ajuga reptans* var. *reptans* és *A. reptans* var. *atropurpurea* acetonitriles kivonatainak hatására (DARVAS et al. 1993). *Antagonista* hatás akkor jelentkezik, ha a rovarba kerülö (számára idegen) ekdiszteroid vagy annak – anyagcsere-folyamatok során létrejövo – származéka a vedlési hormon receptor-helyeire kötödik, ami megakadályozza a (saját) 20-OH ekdizon stimuláló hatásának érvényesülését. Ekkor a fejlődési idő, az egyes lárvastádiumok hossza megnö, a vedlések késnek. A téma kutatásának új lendületet ad, hogy 2003-ban a *Heliothis virescens* Fabr. bagolylepke fajon leírták az ekdiszteroidreceptor szerkezetét (BILLAS et al. 2003), így lehetővé vált az egyes ekdiszteroidok hatásmódjainak tanulmányozása számítógépes molekula-modellezéssel, valamint a potenciális ekdiszteroid agonisták és antagonisták tényleges hatáshelyének vizsgálata.

Szubletális alkalmazás esetén az ekdiszteroidok hatása dózis-függöen serkento vagy gátló: míg 5 ppm 20-OH ekdizon gyorsította a selyemlepke

fejlődését, ennek kétszerese lassította azt (SHIGEMATSU et al. 1974). Ez meglehetősen tipikus, az optimummal rendelkező hormonális hatás esetén. Kevés gyorsítja a fejlődést, mert nem kell koleszterolból sokszorosán hidroxilált ekdizont készíteni, majd azt a 20-as helyzetben aktiválni. Több már zavart okoz, mert időben előrehozza a pre-ekdiziális folyamatokat.

2.1.5 Neoklerodánok

A diterpenoid neoklerodánok eleinte a rovarokon tapasztalt táplálkozást gátló hatásukkal tuntek ki. Nevüket a *Clerodendron infortunatum*-ról (Gart.) (Verbenaceae) kapták, amelyben előfordulásukat eloször észlelték. Növények közül a *Baccharis tricuneata* (Pers.; Asteraceae), a *Leonurus cardiaca* (L.; Lamiaceae) és a *Teucrium africanum* (Thunb.; Lamiaceae) termeli őket jelentős mennyiségben. A neoklerodánok többsége gyenge vízoldhatóságú.

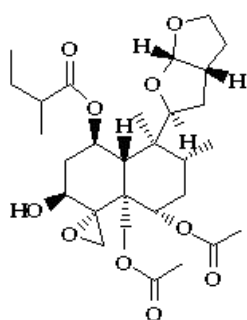
A legjelentősebb neoklerodán termelők az ífu fajok (*Ajuga* spp., Lamiaceae) között találhatóak, melyek többsége termel valamilyen speciális neoklerodánt (**2. táblázat**) (DARVAS, 1991). Ezen vegyületek izolálása növényekből rendkívül nehézkes. A szerveskémia napjainkban jutott addig, hogy a vegyületcsoportot képes legyen jól elválasztani. Tehát az ífu fajokban előforduló neoklerodánokról a közeljövöben várhatóak új eredmények.

A neoklerodánok deterrens tulajdonságai gyors elutasítást okoznak, míg a fitoekdiszteroidok késleltetve, a rovarok hormonális rendszerének megzavarása útján vedlési zavarokat és utódprodukció csökkenést okozva fejtik ki hatásukat (DARVAS et al. 1994).

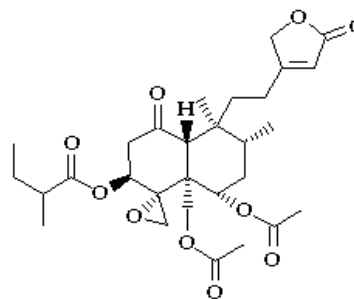
<i>Ajuga</i> faj	Neoklerodánok	Referencia
<i>A. bracteosa</i>	ajugarin I-V, bracteonin A	KUBO et.al. 1976, 1982, 1983, VERMA et al. 2002
<i>A. chamaepitys</i>	ajugapitin és dihidro származékai, 15-etoxi-14-hidro-ajugapitin, 14-hidro-15-hidroxi-ajugapitin, chamaepitin, ajugachin A, B	BONEVA et al. 1990, CAMPS et al. 1984, 1987, HERNANDEZ et al. 1982
<i>A. reptans</i>	ajugareptansin, ajugareptanson A, B, 14,15-dihidro-ajugareptansin, 3-béta-hidroxi-ajugavensin B, 3-alfa-hidroxi-ajugamarin F4, areptin A, B, ajugavensin A, ajugatansin A1, B1, D1, ajugarepton	BREMNER et al. 1998, CAMPS et al. 1979, 1981, 1987, CARBONNEL és Coll 2001, MALAKOV és PAPANOV 1998, NISHIDA et al. 2004

2. táblázat: Jelentős neoklerodán-termelő *Ajuga* fajok

Ajuga reptans var. *reptans* (2. ábra) frakcionált kivonataival való kezelés hatására farát fázisban (imágóvá vedlés során) bekövetkezett pusztulást (juvenilhormon agonista típusú hatás) figyeltek meg csíposzúnyogon (*Aedes aegypti* L.), melyet a neoklerodán frakciók okoztak (DARVAS et al. 1997).



ajugareptansin



ajugareptanson A

2. ábra: *Ajuga reptans* L. két leggyakoribb neoklerodánja (DARVAS, 2000 nyomán)

Az *Ajuga chamaepitys* által termelt neoklerodánok kiemelkedőek széles körben megnyilvánuló hatásai miatt. Amerikai csótányon (*Periplaneta americana*

L.) az *A. chamaepitys* acetónitriles (1 g száraz drog anyagai /ml) frakcionált kivonatai (10 %-ban a táphoz keverve) szignifikánsan csökkentették az *ootheca* (tojástok) súlyát. A *Spodoptera littoralis* Boisd. lárvák növekedését a 2 %-os kivonat gátolta (a hatodik lárvastádiumban, bábozódás előtt elpusztultak), míg a 0.5 %-os kivonat táplálkozást gátló hatást mutatott (25 %-kal csökkentette az elfogyasztott táp mennyiségét) (DARVAS et al. 1996).

2.2 A felhasznált ífu (*Ajuga*) fajok

Az ífu fajok (*Ajuga* spp.) a zárvatermők törzsébe (*Angiospermatophyta*), a kétszikűek osztályába (*Dicotyledonopsida*), az árvacsalán-virágúak rendjébe (*Lamiales*) és az ajakosok családjába (*Lamiaceae*) tartoznak (SOÓ, 1968).

2.2.1 Az indás ífu (*Ajuga reptans* var. *reptans* L.)

Szinonim neve: *Ajuga vulgaris* Rouy ssp. *reptans* (SOÓ, 1968).

A növény levelei átellenesek, minden virág jól látható csészével rendelkezik (3. ábra). Gyökértörzse áttelelo. A magházat a csésze és a párta körülzárja, két barázda osztja négy részre. A párta felső és alsó ajakra különül, színe kék, felső ajka csökevényes, két kicsi karéjból áll. A szár négyélű. A virágban négy porzó található. Az alsó ajak háromhasábú, a középső hasáb hosszú és újból kéthasábú. A növény szorózott, bozontos (SIMON és CSAPODY, 1965).

A faj Európában és É-Amerikában, a síkságtól az alpin tájig gyakori. A közömbös, laza, tápanyagban és bázisokban gazdag, gyengén savanyú humuszos törmelék-, vályog-, öntés- és erdei talajokat kedveli. Jellemző rá a rovar- és önmegporzás, a proterandria, vagyis a porzók a termők előtt válnak éretté (SOÓ, 1968).



3. ábra: *Ajuga reptans* var. *reptans* (fotó: www.missouriplants.com)

2.2.2 A kalinca ínfu (*Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb.)

A kalinca ínfu 10-25 cm magasra nőve egyéves gyomnövény (4. ábra). Ágai rendszerint földrefekvok és felemelkedok. A növény suru borzas szoru, felső részében mirigyes is, szaga jellegzetes. Alsó levelei keskeny-lándzsásak, épek, a középsők szárnyasan 3-5 metszetűek, a felsők három keskeny, szálcsallangokra osztottak. A murvaleveleknél rövidebb pártái citromsárgák. A sárga virág ajakos, de a felső ajka olyan rövid, hogy úgy látszik, mintha csak az alsó ajka volna meg. Május elejétől szeptemberig virágzik. A kötöttebb meszes talajokat kedveli. Szántóföldi kultúrák, tarlók, gyomtársulások gyakori eleme az egész országban.

Szubmediterrán faj, Közép-Európától keletre Iránig, Turkesztánig megtalálható. Magyarországon főleg az *A. chamaepitys* ssp. *ciliata* alfaja gyakori. Az *A. chamaepitys* ssp. *chamaepitys* alfaj Délkelet- és Nyugat-Dunántúlon fordul elő (SOÓ, 1968; SOÓ és KÁRPÁTI, 1968; UJVÁROSY, 1973).



4. ábra: *Ajuga chamaepitys* (fotó: Ripley R.)

2.2.3 A közönséges ífu (*Ajuga genevensis* L.)

A közönséges ífu 10-30 cm magas évelő növény. Indát nem fejleszt. Tölevelei visszás tojásdadok, rövid nyélbe keskenyednek, virágzáskor (május-június) már rendszerint elszáradnak. A szárlevelek széles elliptikusak, durván fogasak. A virágzat laza, a virágok álörvökben állnak. A párta kék, ritkán rózsaszínu, felső ajka rövid. Mérszékedvelő; löszpusztagyepek, rétek, karsztbokorerdek, száraz tölgyesek növénye.

Hazánkban gyakori és közönséges az egész országban. Elterjedt Dél-, Közép- és Kelet-Európában, egészen a Kaukázusig (SOÓ, 1968; SOÓ és KÁRPÁTI, 1968; UJVÁROSY, 1973).

2.2.4. *Ajuga bracteosa* Benth.

Hazájában 10-30 cm magas, évelő növény, míg nálunk – a Tajvanról származó populáció – egynyári növényként viselkedik (5. ábra). Felálló habitusú, a

szár töve indás, alaptól elágazó. Áprilistól júniusig hozza lila virágait. A talaj kötöttségére, pH-jára nem érzékeny. Nedves, napfényes, félárnyékos, füves domboldalakon fordul elő Dél-Ázsiában, Kínában (Szecsuán és Jünnan tartományokban), valamint Afganisztán, India és Nepál környékén (ZHENG-YI és RAVEN, 1994).



5. ábra: *Ajuga bracteosa* (fotó: www.biotech.tipo.gov.tw)

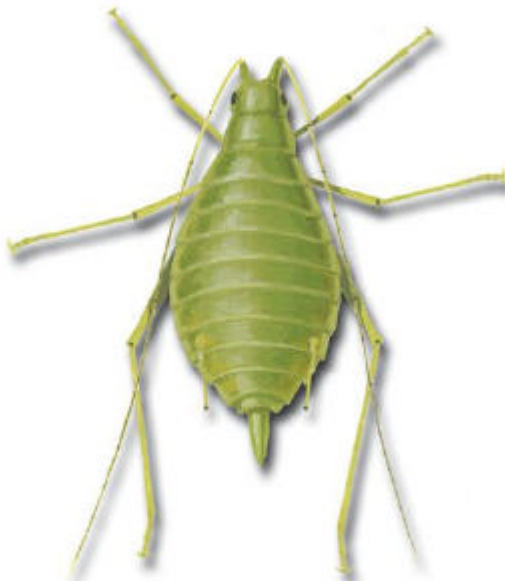
2.3 A kísérleti állatok

2.3.1 A zöldborsó-levéltetu (*Acyrtosiphon pisum* Harris)

Homoptera, Aphididae

Szinonim neve: lucerna-levéltetu, *Macrosiphum pisi* Kaltenbach, *Acyrtosiphon onobrychis* Boyer de Fonscolombe (SZALAY-MARZSÓ, 1989).

A szárnyatlan nostény (3. ábra) teste hosszúkás, orsó alakú, világoszöld vagy rózsaszínu, de az osanyák színe mindig zöld. A karcsú és hosszú potrohcsövek világoszöldek, végük füstszürke. A csápok sárgászöldek, az ízek vége sötétszürke. A lábak szintén zöldek, a lábízek vége szürke, míg a lábfej ízek feketék. A farkocska nyújtott nyelv alakú. Testhossza 4,8-5 mm.



3. ábra: *Acyrtosiphon pisum* szárnyatlan nostény (kép: University of Michigan)

A szárnyas nostény tora világosbarna, testének többi része sárgászöldtől a sötétzöldig változhat. Testhossza 4-4,5 mm. A heteroszexuális nostény morfológiája megegyezik a monoszexuális szárnyatlanéval, azzal a különbséggel,

hogy a 3. lábpárnak a lábszára duzzadt, rajta több gödröcskével (szexferomon mirigymezo). A hímeknek is ismert szárnyas és szárnyatlan alakja egyaránt, testük a szárnyas nőtényétől annyiban tér el, hogy sötétebb színű, és csápjaik feketék. A tojás elliptikus alakú, eloször világosan csillogó, majd sötétedik, végül fekete lesz (SZALAY-MARZSÓ, 1969, 1989).

Az *A. pisum* tojás alakban telet a lucerna, illetve évelő *Vicia*-fajok tövén. Az osanyák március végére, április elejére kelnek ki. Április végén érik el fejlettségüket, és szuznemzéssel szaporodva a második nemzedéktől kezdve egyre nagyobb számban jelennek meg szárnyas egyedek is. Ezek újabb pillangósvirágúakra repülnek, és általában júliusra éri el az egyedszámuk a maximumot. Ez után a tömegszaporodás összeomlik. Az ivaros egyedek október-november hónapokban fejlődnek ki. A heteroszexuális nőtény az oszi fagyok beállta előtt rak 3-10 tojást. Magyarországon csak a holociklikus fejlődésmenetű populációi ismertek. Az osanya (fundatrix), az osanya első leánynemzedéke (fundatrigen) és a nyári nemzedékek (*alienicolae*) szuznemzéssel és lárvaszüléssel hozzák létre utódaikat. Az imágóvá fejlődésig optimális környezeti viszonyok esetén 7-9 napra van szükség. Hazánkban 12-15 nemzedéke fejlődik ki évente.

Euráziában és Amerikában gyakori kártevő, de megtalálható Afrikában és Ausztráliában is, Magyarországon közönséges (SZALAY-MARZSÓ, 1989).

2.3.2 A gyapotpoloska (*Dysdercus cingulatus* Fabricius)

Heteroptera, Pyrrhocoridae

Teste megnyúlt ovális, háta lapos, feje háromszögletű, pontszemei hiányoznak. Fejének elülső részéből kiszögello, nyugalmi állapotban a mell felé behajlítható, szúrásra és szívásra alkalmas szipókájával szívja ki a gyapotmagvak nedveit. Eloháta trapéz alakú, oldalai egyenesek, kinövések vagy nyúlványok nélkül. Potroha fokozatosan szélesedő és a végén szabályosan lekerekített (**4. ábra**). Elofordulása Ausztráliában, Dél-Ázsiában és Afrikában gyakori.

Posztembrionális fejlődését öt lárvastádium jellemzi, a teljes kifejlődési idő laboratóriumi körülmények (26-28 °C, napi 16 óra megvilágítás) között egy hónap (BENEDEK, 1988; FARAG, 1982).



4. ábra: *Dysdercus cingulatus* imágó (fotó: Fekete G.)

2.3.3 Az egyiptomi csíposzúnyog (*Aedes aegypti* Linnaeus)

Diptera, Culicidae

A kis méretű (3 - 5 mm), sötét színű csíposzúnyog imágó lábán fehér gyűrűk láthatók. Feje fekete, a csáp vége fehér. Sötét színű torán a pajzsocska fehérén mintázott, szárnyain sötét pikkelyek vannak. Nosténye csak vérszívás után képes fertilis tojásokat rakni. Lárvai (5. ábra) vízben élnek, az aljzaton vízi mikrobióta szervezetekkel, szerves törmelékekkel táplálkoznak, a felszínre légvételtkor úsznak fel. Négy lárvastádiuma van, optimális körülmények között 7-9 nap alatt fejlődnek szabad bábbá, az imágóvá fejlődésig további 2 nap telik el.

Afrikában és az Amerikai kontinensen gyakori elofordulású, a tropikális és szubtropikális régiókban (WOMACK, 1993).



5. ábra: *Aedes aegypti* L₄-es lárva (fotó: Russel R.C.)

2.3.4 A nagy vízibolha (*Daphnia magna* Straus)

Cladocera, Crustacea

Teste vese alakú, áttetszo **6. ábra**), csápjai kétfelé ágaznak. Testüket páncél borítja, melyből 46 pár mellkasi toldalék áll ki és melyet költotérnek is használnak, végtagjai a páncélzaton belül helyezkednek el. A potroh és a potrohvég rendszerint a tor alatt előre hajlik. Az úszás a második nagyobb csáp lefelé irányuló csapkodásával valósul meg. A mellkasi függelékek folyamatos mozgatása a víz egyenletes áramlását idézi elő az oldalnyílások között. A vízben lévő kis (kisebb, mint 50 mikron átméőju) részecskéket a mellkason lévő lábak sörtéi megszűrlik és egy, a lábak alján lévő vájat mentén a szájba juttatják. A vízben lebegő fitoplanktonnal, rothadó szerves anyagokkal és szabadon lebegő algákkal táplálkoznak.

Tavasztól kora oszig folyamatos szuznemzéssel és lárvaszüléssel szaporodik, ha azonban a körülmények nem megfelelőek (alacsony homérséklet, táplálékhiány stb.), illetve oszszel tojášt rak, melyek egy részéőol hímek fejlődnek, és heteroszexuális módon szaporodik (SCOURFIELD és HARDING, 1958).



5. ábra: Kifejlett *Daphnia magna* (fotó: Fekete G.)

3. Anyag és módszer

3.1 Az *Ajuga* extraktumok

3.1.1 Ínfüvek termesztése és gyűjtése

Az összes általunk használt törzset korábban Darvas Béla gyűjtötte és az MTA Növényvédelmi Kutatóintézete Ökológiai Kutatóhelyén szaporítottuk fel. Az *A. reptans* var. *reptans* és az *A. genevensis* árnyékkedvelő fajok, ezért fák alatt, vagy hálóval letakarva termesztjük. Az *A. chamaepitys* fényturo, míg az *A. bracteosa* csak üvegházban képes áttelelni.

A minták gyűjtését minden esetben a virágzáskor, vagy közvetlenül a virágzás után végeztük, mivel ekkor a legmagasabb a növények fitoekdiszteroid tartalma. A növények föld feletti és gyökérrészeit is begyűjtöttük, majd a növényeket napfénytől védett helyen megszárazítottuk, súlyukat lemértük és az így nyert száraz növényi részeket (drog) orlésszel aprítottuk, majd feldolgoztuk (3.1.2 fejezet). Kísérleteinkhez a föld feletti részekből készült kivonatokat használtunk.

3.1.2 Az *Ajuga* extraktumok készítése

A megszárazított ínfu növényekből először metanollal teljes, úgynevezett nyers kivonatokat készítettünk. Ez után az extraktumokat tisztítottuk (fehérjék, színyanyagok eltávolítása), majd további frakciókra bontottuk. A feldolgozás részletes menetét a **6. ábra** szemlélteti.

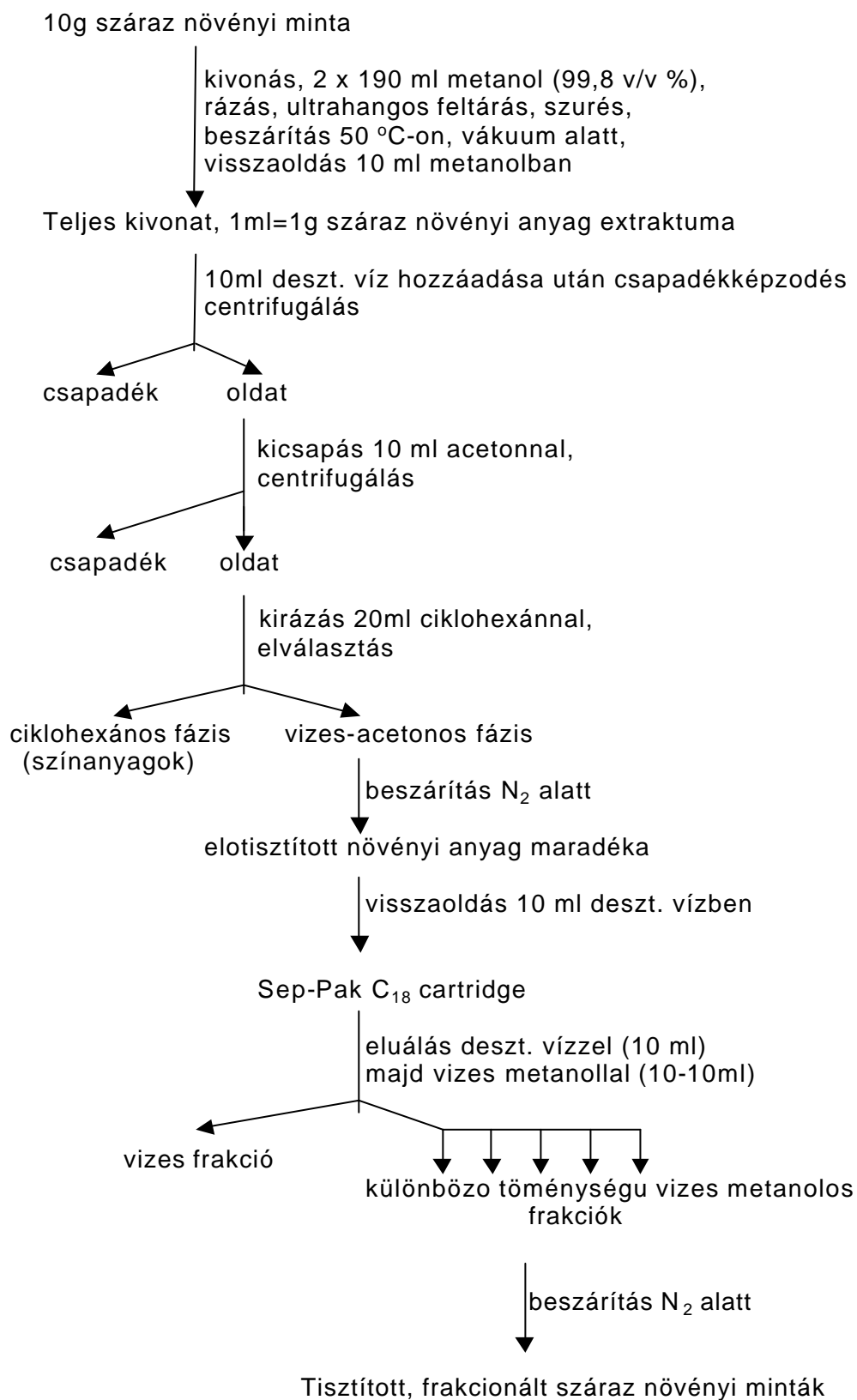
Mind a nyers extraktumok, mind pedig a különböző frakciókat úgy készítettük el, hogy annak 1 ml-e 1 g száraz növényi anyag kivonatát tartalmazza. A későbbiek során ezt tekintettük 100 %-os oldatnak.

A vizes-metanolos frakciókból általában három típust készítettünk:

a. víz : metanol = 90 : 10

b. víz : metanol = 40 : 60

c. víz : metanol = 0 : 100



6. ábra: Az ínfu kivonatok készítése

A 10 % metanolos frakciók rovarokon kevésbé aktív komponenseket pl. flavonoidokat tartalmaznak, de kis mennyiségben fitoekdiszteroidok is előfordulhatnak bennük. A 60 % metanolos frakciókban találhatóak legnagyobb részt a fitoekdiszteroidok, a 100 %-osban pedig a neoklerodánok. A nyers kivonatokat és a frakcionált extraktumokat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

3.1.3 Az extraktumok fitoekdiszteroid tartalmának meghatározása

Az *Ajuga* fajok fitoekdiszteroid tartalmát kromatográfiai módszerekkel határoztuk meg. Rétegekromatográfia (TLC) estén Báthori Máriával (Szegedi Egyetem, Farmakognóziai Intézet) együttműködve dolgoztunk, míg a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) esetén Josep Coll Toledano (Department of Biological Organic Chemistry, CID-CSIC, Barcelona) volt segítségünkre.

Az adszorpciós rétegekromatográfiát az ínfu fajok fitoekdiszteroidjainak kvalitatív meghatározására használtuk. Alkalmazott szorbens: DC-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany).

Alkalmazott kifejlesztőelegyek:

kloroform : metanol : benzol (25:5:3)

toluol : aceton : etanol : ammónium-hidroxid (50:70:16:4,5)

kloroform : etanol (4:2)

A detektálást UV fényen (254 nm), és vanillin-kénsav reagenssel történő elohívás után UV fényen és természetes fényen (366 nm) végeztük.

A legeredményesebb HPLC mérések fordított fázisú, 125 x 4 mm-es Lichrocart C₁₈ oszlopon (töltet: Lichrospher 100 RP-18, 5 µm) mentek végbe, elúciós sebesség: 1,2 ml/perc.

Eluensek:

0-30 perc izopropanol : víz (64 ml/l)

30-50 perc izopropanol : víz (144 ml/l)

50-70 perc izopropanol

A detektálás 242 nm hullámhosszon történt.

3.2 A kísérleti állatok és a tesztműszerek

3.2.1 *Acyrtosiphon pisum*

A kísérletben felhasznált levéltetveket lóbabon tartottuk üvegházban, ezek szabadföldi lucernáról származó egyedek, de már több éve folyamatos szuznemzéssel szaporodott az állomány. A kísérletek elvégzéséhez eloször a tesztműszert kellett kidolgozni, melyet a levéltetvek szintetikus tápoldaton tartásával sikerült megoldanunk.

Levéltetvek szintetikus tápoldaton tartására bár számos receptura létezik, a tápoldatot Kunkel módszere alapján állítottuk össze (**3. táblázat**). A táblázatból kitunik, hogy ez cukor alapú oldat, ami 22-féle aminosavat, vitaminokat és egyéb szervesetlen sókat, illetve szerves anyagokat tartalmaz. A pH-t KOH-al állítottuk be 7,5-re (KUNKEL, 1977).

Az oldat 3 külön részegységben -20°C-on három hónapig tárolható. Az első részegység az aminosavakat tartalmazza a tirozin kivételével, a másodikban vannak a vitaminok, a harmadikban pedig a fémsók egy része. Közvetlen a felhasználás előtt kell az aminosavak között feloldani a tirozint, utána kerül bele a szacharóz, a MgSO₄, FeCl₃, a KH₂PO₄ és az aszkorbinsav, majd feloldjuk a vitaminokat és a fémsókat is. Ezek után kell a pH beállítását elvégezni, majd a tápoldatot desztillált vízzel egészítjük ki. Az összeállítás után a tápot sterilizáltuk, amire 0,45 µm-es lyukboségu mikrobiológiai szurot használtunk, melyet elozoleg

0,5 atm nyomáson kétszer 40 percig inkubáltunk 63°C-on. Az így elkészített oldat kb. egy hétig tárolható, szintén mélyhűtőben.

AMINOSAVAK	mg/100ml
L-Alanin	100
L-Arginin	400
L-Aszparagin	300
L-Aszparaginsav	100
L-Cisztein	50
L-Cisztin	5
L-Glutaminsav	200
L-Glutamin	600
L-Hisztidin	200
DL-Homoszerin	800
L-Izoleucin	200
L-Leucin	200
L-Lizin	200
L-Metionin	100
L-Fenilalanin	100
L-Prolin	100
L-Szerin	100
L-Treonin	200
L-Triptofán	100
L-Tirozin	20
L-Valin	200

VITAMINOK	mg/100ml
Biotin	0,1
D-Ca-pantotenát	5
Folsav	1
Piridoxin-HCl	2,5
Tiamin-diklorid	2,5
Nikotinsav	10
Riboflavin	5

SZERVETLEN KOMPONENSEK	mg/100ml
FeCl ₃ *6H ₂ O	4,46
NaCl	2,54
Ca-citrát	10
MgSO ₄	118
KH ₂ PO ₄	250
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,27
Mn-acetát	0,69
ZnCl ₂	0,83
KOH	pH=7,5-ig
H ₂ O	kiegészít

EGYÉB SZERVES KOMPONENSEK	mg/100ml
p-Amino-benzoésav	10
L-Aszkorbinsav	100
Kolin-klorid	50
mio-Inozitol	50
Szacharóz	35.000
Koleszterol-benzoát	2,5

3. táblázat: Az *A. pisum* tápoldat összetétele

Az így elkészült tápoldatban oldottuk fel a vizsgálandó anyagokat (per os hatás). A levéltetvek elhelyezésére 2,5 cm-es átméروju muanyag gyurut használtunk, melynek a szélét elozoleg simára csiszoltuk, hogy ki ne szakítsa a késobb rákerülo parafilmet, aljára pedig hálót ragasztottunk (**7. ábra**). A parafilmet felhasználás előtt fél órára UV-lámpa alá helyeztük sterilizálás céljából. Ezek után a parafilmet óvatosan vékonyra húzzuk, és rátesszük a gyurure, a széleit odanyomva. A kihúzást úgy kell elvégezni, hogy az első stádiumú lárva is át tudja majd szűrni, tehát az a cél, hogy a lehető legvékonyabb legyen. Erre kerül rá még egy réteg parafilm, de ennek a széleit még nem tapasztjuk a gyuruhöz, mivel elotte a ketto közé kell juttatni a tápoldatot egy steril fecskendővel. A gyuru széle nem lehet nedves, mert akkor nem tapad meg a parafilm. Egy tápgyuruhöz 0,2-0,3 ml oldatra van szükség.



7. ábra: Táplálkozó levéltetvek a szintetikus tápon (fotó: Fekete G.)

Egy gyurube 3-5 szárnyatlan nostony levéltetu imágót raktunk, és ezek utódait neveltük tovább. 24 órával késobb az imágókat eltávolítottuk, hogy mozgásukkal ne akadályozzák utódaik táplálkozását. A nem táplálkozó lárvákat szintén kivettük. A tápoldatot 2-3 naponként cseréltük, mivel a harmadik nap után a

benne felszaporodó mikroszervezetek miatt már nem alkalmas a táplálásra, opálos lesz, és jellegzetes szaga is figyelmeztet a megromlásra.

A zöldborsó-levéltetun mind a négy ínfu faj nyers kivonatait, és azok 10, 60 és 100 %-os metanolos-vizes frakciót teszteltük 0,1-5 %-os koncentrációkban, valamint más növényekből Báthori Mária által izolált tiszta ekdiszteroidokat (dakrihainanszteron, polipodin B, pteroszteron, 22-deoxi-20-OH ekdizon, integriszteron, 20-OH ekdizon, izovitezion, 25-OH- dakrihainanszteron, ekdizon, ajugaszteron C, herkeszteron, turkeszteron), melyek egy része megtalálható az ínfu fajokban is.

Az *Ajuga*-extraktumos, és a tiszta fitoekdiszteroidos kezelésekkor szintén imágókból indultunk ki, így már szintetikus tápoldaton született egyedekkel dolgoztunk, és az L₁-L₂ vedlést követően (születéstől számított 48-72 óra) kezdtük meg az ínfu kivonatot tartalmazó táp adagolását, hogy kizárjuk a szintetikus tápoldatot elfogadni képtelen egyedeket a kísérletből.

A tápoldatot és a levéltetveket tartalmazó tápgyurukat klímakamrába helyeztük el, ahol 20 °C hőmérsékletet és napi 16 órás megvilágítást biztosítottunk. Ezeket az egyedeket a pusztulásuk bekövetkeztéig azonos koncentrációjú oldaton tartottuk. A kezeléseket négy ismétlésben végeztük, és kétnaponta, az imágóvá fejlődésig (ez többnyire 10 nap) értékeltük.

A tápgyuruból minden értékeléskor eltávolítottuk az elpusztult egyedeket és 70 %-os etil-alkoholba tettük. Az elpusztult egyedek mintegy 50 %-át kipreparáltuk, beleértve a kontrollt is. A preparátumok készítéséhez Berlese-Hoyler oldatot használtunk. A preparált egyedeket fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk, fejlődési és vedlési rendellenességek feljegyzése céljából.

3.2.2 *Dysdercus cingulatus*

A kísérletekhez az MTA NKI Ökológiai Kutatóhelyén tenyészetben tartott állatokat használtuk. A tenyészetek 26-28 °C-os, napi 16 órás megvilágítású tenyészszobában voltak elhelyezve. A gyapótpoloskák táplálékául egész és

megroppantott gyapotmagvak szolgáltak, itatóvízként csapvizet kaptak, vattadugóval ellátott üvegfialákban.

A tenyésztés során a poloskák tojásait tüllhálóval lezárt üvegedénybe rakják. A hálón áthullott tojások Petri-csészébe kerülnek, majd néhány nap múlva megkezdődik a kelés. Azonos korú L₁-es lárvákat imbisz-poharakba helyeztünk, táplálékul roppantott gyapotmagot kaptak, és üvegfialába itatóvizet (**8. ábra**). A vízben oldottuk fel a vizsgálandó anyagokat (per os hatás). A kísérleteket négy ismétlésben végeztük, 15-20 lárvát használva ismétlésenként. Az imbisz-poharakat a tenyészszobában helyeztük el, az alapteryészettel megegyező körülmények közé.

Eloszor a négy ínfu faj nyers kivonatait teszteltük 0,1-0,5 %-os koncentrációkban. Az így hatékonynak bizonyult *A. reptans* var. *reptans*, *A. bracteosa* és *A. chamaepitys* nyers kivonatokból készítettük a 10, 60 és 100 %-os metanolos-vizes frakciókat és ezekkel dolgoztunk tovább 0,25-1 %-os dózisokban.

A tiszta ekdiszteroidok közül csak a 20-OH ekdizon hatását vizsgáltuk a *D. cingulatus* lárváin, 0,5-1 mg/l koncentrációkban. Ezen kívül meghatároztuk négy ekdiszteroid-antagonista azolanalóg LC₅₀ értékeit is gyapotpoloskán (részletezve lásd: BÉLAI és FEKETE, 2003).

A kísérleteket kétnaponta értékeltük, feljegyeztük a mortalitásokat, és az elpusztult egyedek mindegyikét sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk. A kísérleteket az imágóvá fejlődésig (20-25 nap) folytattuk.



8. ábra: Itatóvíz köré gyűlt L₃-as *Disdercus cingulatus* lárvák (fotó: Fekete G.)

3.2.3 *Aedes aegypti*

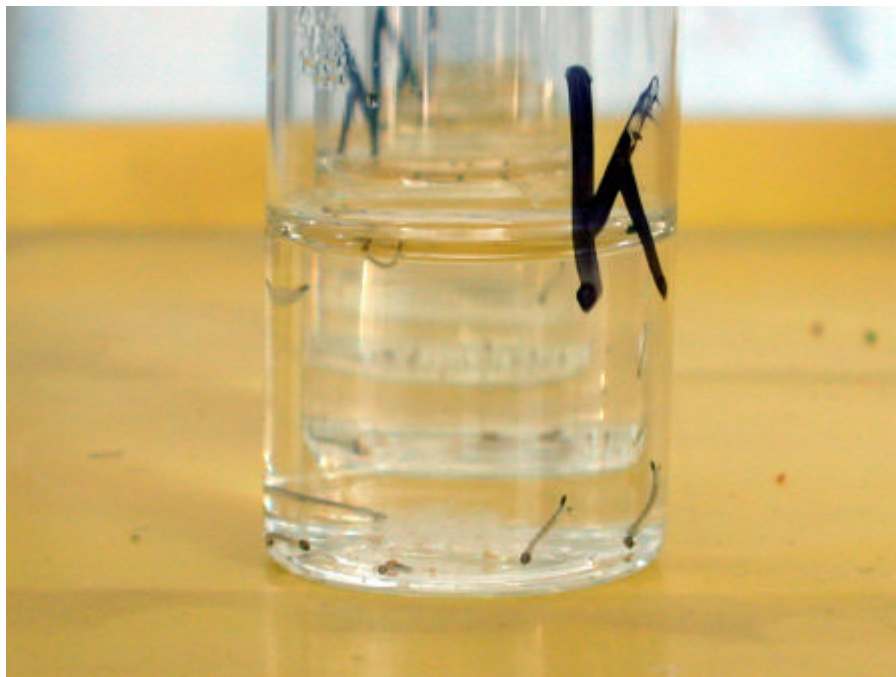
A kísérletekhez az MTA NKI Ökológiai Kutatóhelyén, illetve részben az Agro-Chemie Kft. laboratóriumában tenyésztetben tartott állatokat használtunk. A tenyészetek 26-28 °C-os, napi 16 órás megvilágítású tenyészszobában voltak elhelyezve. A csíposzúnyog lárvákat csapvízben neveltük, táplálékul orölt, száraz macskatápot (Whiskas vagy Friskies) kaptak. Az imágókat erre a célra kialakított ketrecekben tarjuk, a nőtények 2-3 naponta vért szívnak (fehéregér).

A vizsgálatokat faeces poharas kísérletekkel végeztük, minden esetben 4 ismétlésben, úgy, hogy minden pohárba 8-15 L₃-as, fiatal L₄-es stádiumú lárvát helyeztünk 10 ml, csapvízzel készült oldatba (9. ábra). Mivel a vizsgálandó anyagokat a lárvák éloközegében oldottuk fel, így az extraktumok vízoldható komponensei topikálisan, a kültakarón felszívódva fejtik ki hatásukat, míg a vízben

nem oldódó részekkel a lárvák üledékevésük során (*per os*) kerülnek kapcsolatba (részletezve lásd: ZÖLDI et al. 2005).

A kísérleteket a tenyésztettel azonos tesztszobában végeztük, kétnaponta értékeltük, és az imágóvá fejlődésig végeztük (max. 10 nap).

Mind a négy ínfu faj (*A. genevensis*, *A. bracteosa*, *A. reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys*) nyers kivonatait teszteltük 0,1-5 %-os koncentrációkban, és az *A. reptans* var. *reptans* a 10 %, 60 % és 100 %-os metanolos-vizes frakcióit, 0,1-0,5 %-os dózisokban. Vizsgáltuk a 20-OH ekdizon hatását is, 0,5-2 mg/l dózisokban.



9. ábra: *Aedes aegypti* lárvákkal végzett kísérlet, aljzaton táplálkozó L4-es lárvák (fotó: Fekete G.)

3.2.4 *Daphnia magna*

A nagy vízibolhával végzett tesztek a növényvédő szerek engedélyezése során kötelező vizsgálatok, a hazai gyakorlatban is. Céljuk, hogy toxikológiai adatokhoz jussunk, egy nem célszervezet vízi ízeltlábún is.

A kísérletekhez az MTA NKI Ökológiai Kutatóhelyén tenyészetben tartott állatokat használtunk. A tenyészetek 20 °C-os, napi 16 órás megvilágítású tenyészszobában voltak elhelyezve.

A kísérletket részben az ISO szabvány 48 órás immobilizációs protokoll (ISO 6341:1996) szerint, és ezen túlmenően, 96 órás tesztekell állítottuk be, tekintettel az ífu kivonatoknál tapasztalt késleltetett hatásokra. A standard teszt szerint 10 db egy napos vízibolha lárvákat helyeztünk az éloközegükbe (CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 , KCl 10 ml desztillált vízben oldva), amelyben feloldottuk a vizsgálandó anyagokat. 48 óráig a lárvák nem kaptak táplálékot, a tesztek folytatásához azonban szárazélesztő adagolása szükséges volt. Koncentrációnként 4 ismétléssel dolgoztunk. A tesztek a tenyészettel azonos tenyészszobában végeztük. A kísérletek előtt a standard leírás szerint vizsgáltuk tenyészletünk érzékenységét. A kálium-dikromáttal ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) meghatározott 24 órás LC_{50} minden esetben a megadott 0,6-1,7 mg/l között volt.

Három ífu faj (*A. reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys*, *A. bracteos*) 10 %, 60 % és 100 %-os metanolos-vizes frakciót teszteltük 0,1-10 %-os koncentrációkban, valamint a 20-OH ekdizont és a makiszteron A-t.

3.3 A kísérletek statisztikai értékelése

A mortalitási illetve immobilizációs adatok, az LC_{50} értékek számításához és a fejlődési ütemek eredményeinek értékeléséhez Microsoft® Excel 2000 és Statistica 5.5 programokat használtunk. Egyes esetekben – fejlődési rendellenességek ábrázolásához – a Harvard Graphics 7.0.0 programot vettük igénybe.

A mortalitási % számolása során minden esetben a Henderson-Tilton képletet használtuk, mely a kezeléseket korrigálja a kontroll kezelés mortalitásával, valamint kiszűri az ismétléseknél előforduló különböző egyedszámok hatását. A továbbiakban a mortalitási százalék kifejezés alatt a Henderson-Tilton formulával korrigált adatok értendők.

A Henderson-Tilton képlet:

$$M\% = \frac{H - T}{1 - \frac{Keu - Koe}{Kee - Kou}} \cdot 100$$

ahol

Kee – a kezelt egyedek száma a kezelés előtt,

Keu – a kezelt egyedek száma a kezelés utáni adott időpontban,

Koe – a kontroll kezelés egyedeinek száma a kezelés előtt,

Kou – a kontroll kezelés egyedeinek száma a kezelés utáni adott időpontban.

A kapott mortalitási adatokat t-próbával vetettük össze. Az LC₅₀ és LC₉₅ értékek számításánál regresszió analízist és egyutas ANOVA-t alkalmaztunk

A fejlődési ütemek adatait (*A. pisum* és *D. cingulatus*) az alábbiak szerint számoltuk: minden fejlődési stádiumhoz hozzárendeltünk egy számot (*D. cingulatus*: L₁ – 1, L₂ – 2, L₃ – 3, L₄ – 4, L₅ – 5, imágó – 6, *A. pisum*: L₁ – 1, L₂ – 2, L₃ – 3, L₄ – 4, imágó – 5). Minden értékelési napon számbavettük, hogy az egyes lárvastádiumokhoz hány egyed tartozik, és ezt rendre megszoroztuk az adott lárvastádiumhoz tartozó számmal. A kapott értékeket összeadtuk, és elosztottuk az összes egyed számával. Az így kiszámolt (1 és 6, illetve 1 és 5 közötti) végső érték a rovarok adott értékelési napra vonatkozó átlagos fejlettségi állapotát (lárvastádiumát) tükrözi.

A fejlődési rendellenességek számának statisztikai értékeléséhez nem volt elegendő adatunk, így azok tájékoztató jellegűek, a hatás módjára utalnak.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A felhasznált *Ajuga* fajok fitoekdiszteroid tartalma

Rétegekromatográfiás módszerrel a vizsgált négy ínfu faj fitoekdiszteroidjainak kvalitatív meghatározása során a következő eredményekre jutottunk:

A 10 %-os metanolos-vizes frakciók csak elenyésző mennyiségben tartalmaznak fitoekdiszteroidokat. Ezekben a frakciókban pontosan nem azonosított flavonoidokat találtunk jelentős mennyiségben. A 100 %-os frakciókban ekdiszteroidokat egyáltalán nem találtunk, viszont minden növény tartalmazott neoklerodánokat, melyet TLC segítségével nem tudtunk azonosítani.

A 60 %-os metanolos vizes frakciók a TLC mérés szerint a következő fitoekdiszteroidokat tartalmazták növényenként:

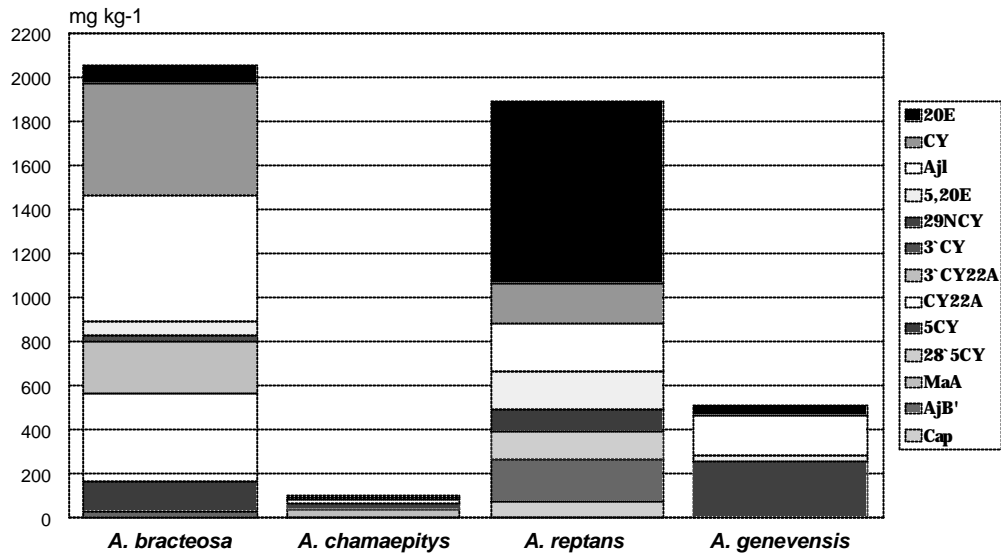
Ajuga reptans var. *reptans*: 20-OH ekdizon, 2-deoxi-20-OH ekdizon, polipodin B, makiszteron A,

A. chamaepitys: 20-OH ekdizon, makiszteron A

A. genevensis: 20-OH ekdizon, 2-deoxi-20-OH ekdizon

A. bracteosa: 20-OH ekdizon, polipodin B

Az MTA NKI laboratóriumában és a SZE Farmakognóziai Intézetében sikerült meghatározni négy ekdiszteroid (20-OH ekdizon, 2-deoxi-20-OH ekdizon, polipodin B, makiszteron A) detektálási helyét HPLC-n, mely alapján közelítő kvantitatív analízist végeztünk az ínfu fajok fitoekdiszteroid tartalmára vonatkozóan. A részletes folyadékromatográfiás vizsgálatokat együttműködésünk keretében a CID-CSIC Department of Biological Organic Chemistry laboratóriumában Darvas Béla segítségével készültek (**10. ábra**).



rövidítések: 20E – 20-OH ekdizon, CY – ciaszteron, Ajl – ajugalakton, 5,20E – polipodin B, 29NCY – 29-norciaszteron, 3`CY – 3-epi-ciaszteron, 3`CY22A – 22-acetil-3-epi-ciaszteron, CY22A – 22-acetil-ciaszteron, 5CY – szengoszteron, 28`5CY – 28-epi-szengoszteron, MaA – makiszteron A, AjB` – ajugaszteron B`, Cap – kapitaszteron)

10. ábra A vizsgált ífu fajok ekdiszteroid profilja

A vizsgált *Ajuga* fajok közül az *A. bracteosa*-t és az *A. reptans* var. *reptans* ~2000 ppm fitoekdiszteroid szint jellemzi, míg az *A. genevensis*-t 500, az *A. chamaepitys*-t ~100 ppm körüli érték. Az *A. reptans* var. *reptans*-ra 20-OH ekdizon, míg az *A. bracteosa*-ra ciaszteron és származékainak túlsúlya a jellemző.

4.2 Eredmények az *Acyrthosiphon pisum* levéltetun

Első eredményünk, hogy a szintetikus tápoldaton nevelt rovarok 90-100 %-a életben maradt az imágóvá fejlődésig, így a teszt módszer alkalmassá vált a biotesztek elvégzésére.

A nyers extraktumok 1 %-osnál töményebb oldataival végzett kísérletekben a levéltetvek mortalitása a harmadik napon már 100 %-os volt, amit feltételezhetőleg felismerési-elutasítási reakció okozott. A lárvák láthatóan alig táplálkoztak, csupán próbaszívásokat végeztek. A legalacsonyabb koncentrációjú,

0,1 %-os oldatokkal, a levéltetven a következő hatékonysági sort mértük: *A. bracteosa* > *A. chamaepitys* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. genevensis*.

0,1 %-os dózisban az *A. bracteosa* kivonata 100 %-os mortalitást okozott, a kezelést követő 6. napon, míg a beállítás utáni 2. és 4. napon még egyáltalán nem mértünk pusztulást. Az *A. chamaepitys* kivonata folyamatosan, napról-napra növekvő mértéku pusztulást eredményezett, mely a kísérlet utolsó, 10. napján 84 %-os volt. Az *A. reptans* var. *reptans* kivonata ~ 30 %-os pusztulást okozott a kísérlet végére, míg az *A. genevensis* esetén nem tudtuk a kontrolltól eltérő hatást kimutatni.

0,5 %-os koncentrációban az elobbival megegyező hatékonysági sorrendet mértünk. Itt azonban az *A. reptans* var. *reptans* kivonat már 80 % feletti mortalitást okozott, míg az *A. genevensis* hatása 50 % körül alakult a kezelést követő 10. napon (**4. táblázat**).

<i>Ajuga</i> kivonatok	Mortalitási % a kezelést követő 4. napon (\pm SE)	Mortalitási % a kezelést követő 10. napon (\pm SE)
<i>A. bracteosa</i>	0,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
<i>A. chamaepitys</i>	31,58 \pm 5,26	100,00 \pm 0,00
<i>A. genevensis</i>	55,55 \pm 6,41	53,41 \pm 9,63
<i>A. reptans</i> var. <i>reptans</i>	23,16 \pm 3,04	84,21 \pm 9,11

4. táblázat: Különböző infu fajok nyers kivonatainak hatása 0,5%-os koncentrációban, *A. pisum* tesztállaton

Az 1 %-os extraktumok mind a négy növényfaj esetén 100 %-os mortalitást okoztak a 10. napon. A pusztulási ütem sem változott jelentősen, vagyis az *A. bracteosa* itt is előzmények nélkül a 6. napon fejtette ki hatását, míg a másik három fajnál fokozatosan növekvő mortalitást tapasztaltunk.

A következő lépésben a nyers kivonatok 10, 60 és 100 %-os metanolos-vizes frakciót teszteltük 0,1-1 %-os koncentrációkban. A 10 %-os frakciók nem okoztak jelentős pusztulást egyik esetben sem. Ez alapján megállapítható, hogy az ebben a frakcióban található flavonoidok kis mennyiségben nem hatnak az *A.*

pisum levéltetüre. A 60 %-os frakciók és az egyetlen általunk hatékonynak talált 100 %-os frakció hatását az **5. táblázat** mutatja.

<i>Ajuga</i> fajok frakciói (metanol %)	Mortalitási % a kezelést követő 4. napon (\pm SE)	Mortalitási % a kezelést követő 10. napon (\pm SE)
<i>A. bracteosa</i> 60%	37,50 \pm 12,50	100,00 \pm 0,00
<i>A. chamaepitys</i> 60%	26,32 \pm 10,53	84,21 \pm 5,26
<i>A. chamaepitys</i> 100%	10,00 \pm 5,00	100,00 \pm 0,00
<i>A. genevensis</i> 60%	25,28 \pm 7,63	51,50 \pm 8,50
<i>A. reptans</i> var. <i>reptans</i> 60%	21,06 \pm 5,27	52,63 \pm 15,79

5. táblázat: Különböző 0,1 %-os koncentrációjú ínfu frakciók hatása *A. pisum* tesztállaton

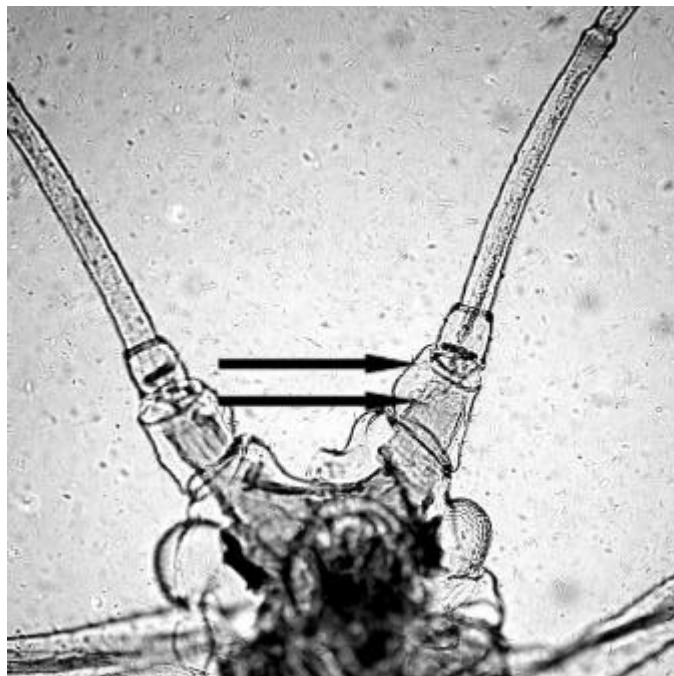
Az adatokból kitunik, hogy míg a kezelést követő 4. napra minden frakció alacsony, és lényegesen nem különböző mortalitást okozott, a 10. napra már jelentős különbségek alakultak ki. Az *A. bracteosa* 60 %-os és az *A. chamaepitys* két frakciója között statisztikai értelemben nincs különbség ($p < 0,05$), mindhárom gyakorlatilag teljes pusztulást okozott. Az *A. reptans* var. *reptans* és az *A. genevensis* kivonata 50 % körüli mortalitást eredményezett.

Magasabb koncentrációkban (0,5 % és 1 %) hasonló eredményeket kaptunk, az elobbiekben kevésbé hatékony két frakció is növekvő mortalitást okozott, bár az *A. genevensis* még 1 %-os dózisban sem okozott teljes pusztulást.

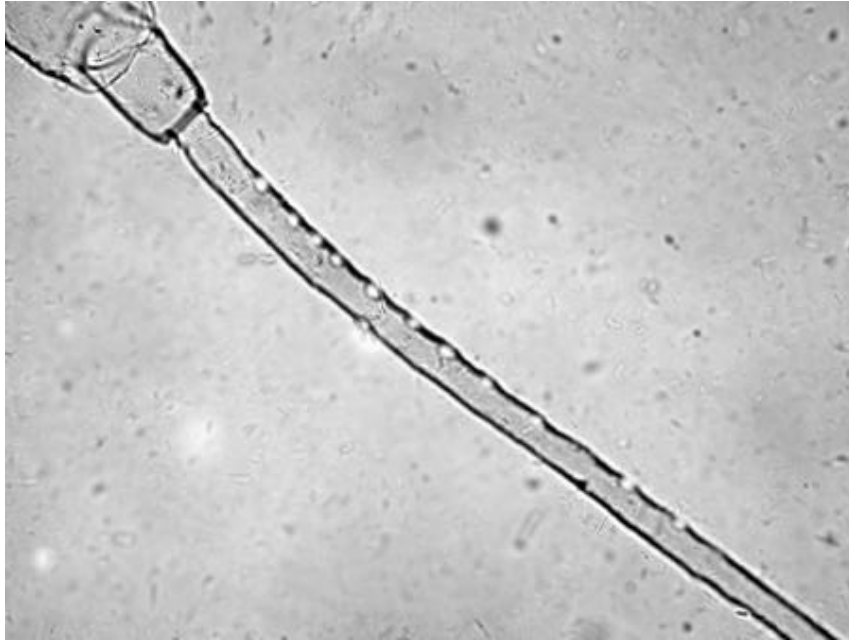
A mortalitási adatokon túlmenően feljegyeztük a levéltetvek fejlődési ütemét is. Jelentős, a kezelés végére akár egy teljes fejlődési fázist jelölő lemaradást tapasztaltunk az *A. reptans* var. *reptans* 60 %-os frakciója esetén, 0,5 %-os dózisonál. Vagyis a 10. napon, mikorra a kontroll egyedek mindegyike imágóvá fejlődött, a kezelt egyedek átlagosan még negyedik stádiumú lárvák voltak. Hasonló mértéku fejlődési lemaradást az *A. genevensis* 60 %-os és az *A. chamaepitys* 100 %-os frakciója okozott.

A hatékonyak bizonyult frakcióknál vizsgáltuk az egyes kezelések hatására bekövetkezett morfológiai elváltozásokat, fejlődési rendellenességeket is. Három tipikus rendellenességet figyeltünk meg:

- a. A lárvák potrohán és a csáp tövén jól látható kettos kutikula (**11. ábra**) az elpusztult egyedeknél. Feltehetően megkezdődött a vedlés, de a régi lárvabor nem vált le a testrol, amikor/amitól a pusztulás bekövetkezett (farát fázisú pusztulás - *A. reptans* var. *reptans* 60 %, *A. chamaepitys* 60 %, 100 %, *A. bracteosa* 60 %, *A. genevensis* 60 % frakciók).
- b. Az imágók csökevényes szárnyal fejlődtek (*A. reptans* var. *reptans* 60 %, *A. chamaepitys* 100 %, *A. genevensis* 60 % frakciók).
- c. Szárnyatlan imágók csápjának harmadik ízén az érzogödörk rendellenesen magas száma (**12. ábra**). Az *A. pisum* szárnyatlan imágóinál 2-3 érzogödörk található a 3. csápízen, míg egyes kezelésekbén 7-11 érzogödörrel rendelkező egyedeket is találtunk (*A. reptans* var. *reptans* 60 % frakció). A szárnyas imágóknál az érzogödörk normális száma 15-17.



11. ábra: Kettos kutikula *A. pisum* csáp tövénél (fotó: Fekete G.)



12. ábra: *A. pisum* szárnyatlan nostény harmadik csápíze, az érzögödrök száma 11 (fotó: Fekete G.)

A hatás módjára a tapasztalt morfológiai elváltozások alapján lehet következtetni. A vedlési közben tapasztalt pusztulások (kettos kutikula) egyértelműen zavart vedlési hormonműködésre utalnak. Az ífu fajokban megtalálható fitoekdiszteroidok agonistaként, vagy a 20-OH ecdizon magas szintje miatt korai vedlést indítanak meg, illetve a vedlés során idő előtt aktiválhatják a vedlési folyadék fenoloxidáz enzimét, így az új kutikula tágulás előtt szklerotizálódik. Egyes fitoekdiszteroidokról (ajugalaktonok) vedlésgátló hatást is feltételeztek. Amennyiben az ecdiszteroid képes kötődni az ecdizon receptorhelyhez, megakadályozhatja a 20-OH ecdizont, hogy hatását kifejtse a vedlés során.

A tiszta ecdiszteroidokkal végzett kísérleteink eredményei, kombinálva a receptorhelyhez kötődést bemutató molekulamodelláló programokkal, a jövőben magyarázatot adhatnak a hatásmódok pontosabb megismeréséhez.

Az eddig vizsgált 12 tiszta ecdiszteroid *A. pisum* testállaton mért LC₅₀ értékei a **6. táblázatban** láthatóak.

Ekdiszteroid		LC ₅₀ mg/l kezelés utáni 4. napon	Konfidencia intervallum
20-OH ekdizon	A	1,07	0,47 - 1,60
22-deoxi-20-OH ekdizon		0,7	0,19 - 1,21
25-OH-dakrihainanszteron		8,22	6,49 - 10,64
ajugaszteron C	A	17,48	14,79 - 20,17
dakrihainanszteron		0,16	0,01 - 0,25
ekdizon		10,00	10,00 - 10,00
herkeszteron*		29,98	19,14 - 43,17
integriszteron		1,02	0,75 - 1,27
izovitexiron		5,73	3,25 - 8,35
polipodin B	A	0,21	0,13 - 0,29
pteroszteron		0,46	0,15 - 0,73
turkeszteron		>50	

A - Az általunk vizsgált ífu fajokban megtalálható

* - Báthori Mária és munkatársai által izolált új vegyület, közlés alatt

6. táblázat: Ekdiszteroidok LC₅₀ értékei *A. pisum* levéltetun, a kezelést követő 4. napon

Az eredményekből kiderül, hogy az egyes ekdiszteroidok levéltetven mért hatásai között nagyságrendi különbségek vannak. Az általunk vizsgált ífu fajokban is megtalálható polipodin B (*A. bracteosa*, *A. genevensis*, *A. reptans* var. *reptans*) kb. ötször aktívabbnak bizonyult a vedlési hormonnál. A kivonatok esetén a hatásért ténylegesen felelős vegyületek azonosítása feltételezhetően molekula modellező program segítségével lesz lehetséges, mely a receptorhelyhez kötődés stabilitását is képes kiszámítani. Természetesen figyelembe kell venni a tesztállatban lejátszódó detoxifikációs folyamatokat is, ami miatt jelentős eltérések lehetnek a számított és a ténylegesen mért biológiai aktivitások között.

A tiszta ekdiszteroidokkal végzett vizsgálatok közül morfológiai elváltozásokat a 20-OH ekdizon, ekdizon, polipodin B és az ajugaszteron C esetén vizsgáltuk. Farát fázisú pusztulást mind a négy vegyület hatásaként előfordult, de rendellenes számú érzögödröket csak a 20-OH ekdizonnál tapasztaltunk.

4.3 Eredmények a *Dysdercus cingulatus* poloskafajon

A nyers kivonatok vizsgálata során a 0,1 % *Ajuga* extraktumot tartalmazó itatóvízzel végzett kezelések közül a legjelentősebb mortalitást az *A. bracteosa* okozta. Ennek hatására ugyanis már a kezelés megkezdése utáni 6. napon közel 70 %-os mortalitás jelentkezett, ami a 12. napra elérte a 90 %-ot. Jelentős pusztulást figyelhettünk meg *A. chamaepitys* kivonat hatására, amely a 20. napon 80 %-os mortalitást okozott. Az *A. genevensis* valamint az *A. reptans* var. *reptans* kisebb, de azért számottevő hatást okozott.

Nagyobb, 0,25 %-os koncentrációban alkalmazva az ínfu kivonatokot, már erőteljesebb hatások mutatkoztak. Az *A. bracteosa*-val végzett kezelés hatása kiemelkedő, a kezelt állatok mortalitása már a kezelés kezdete utáni 4. napon közel 70 %, a 6. napon 85 %, míg a 12. napra eléri a 100 %-ot. A lárvák mortalitása a kezeléseik végére *A. reptans* var. *reptans* esetén meghaladta az *A. chamaepitys* esetén pedig megközelítette a 90 %-ot. Az *A. genevensis* esetében a 6. naptól 60 % körül alakult.

A 0,5 %-os metanolos *Ajuga* kivonatok alkalmazásakor a lárvákon már a 2. napon több mint 40 %-os pusztulást okozott az *A. chamaepitys* kivonata, mely tovább emelkedett 100 %-ig (12. nap). Az *A. bracteosa* a 4. napon mutatott ~87 %, majd a 8. napra már 100 %-os mortalitást. Az *A. reptans* var. *reptans* a kezelés kezdete utáni 12. napra kezelt állatok teljes pusztulását okozta. Az *A. genevensis* a 6. nap után 60-70 % mortalitást okozott.

A kezeléseik során elpusztult és alkoholban tárolt egyedeket sztereomikroszkóppal megvizsgálva, a gyapotpoloskán az alábbi fejlődési és vedlési rendellenességeket figyeltük meg:

- a. farát fázisú pusztulás: a régi lárvabor elvált a testtől, de a rovar nem tudta azt levedleni (**13. ábra**);
- b. egyéb vedlési zavarok: vedlés közben bekövetkezett pusztulás; a régi kutikula felreped, de nem válik le a testről;
- c. szárnydeformációk: a fedoszárnyak csak részben fejlődtek ki (**14. ábra**):
 - i./ a szárnyak nem takarják a genitáliákat;

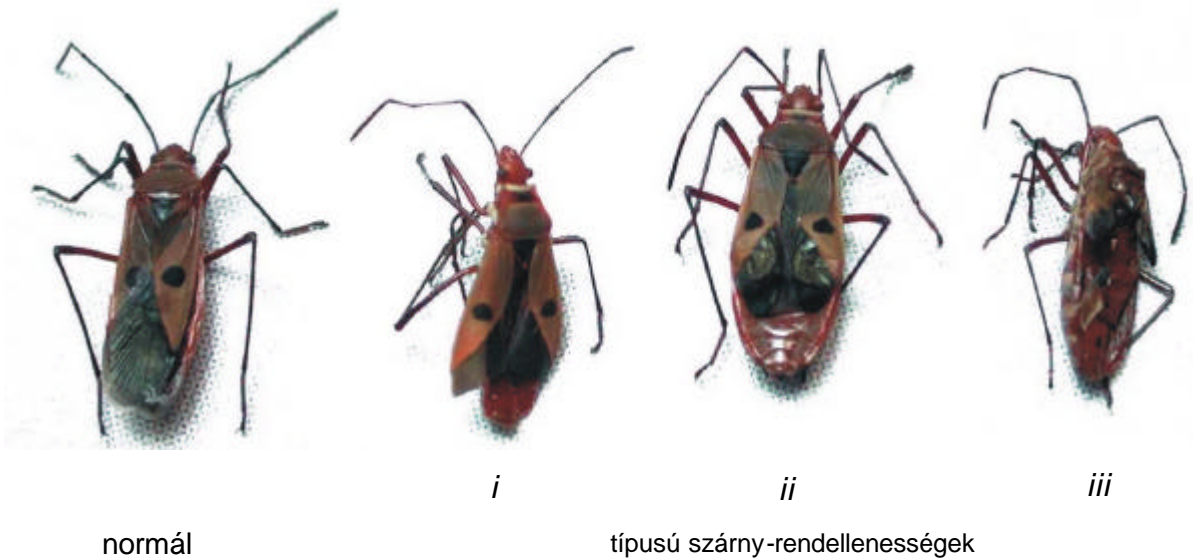
ii./ a szárnyak csak a hát közepéig érnek, az utolsó 3-5 potrohszelvény látható;

iii./ a szárnyak csak csökevényesen fejlődtek ki (mikropterizmus).

Mivel az *i* típusú szárnyfejlődési rendellenesség többször előfordult a nem kezelt egyedeken is, későbbiekben csak a *ii* és *iii* típusú szárnydeformációk előfordulását követtük nyomon. A látható morfológiai elváltozás nélkül elpusztult egyedeket egy 4. csoportba soroltuk.

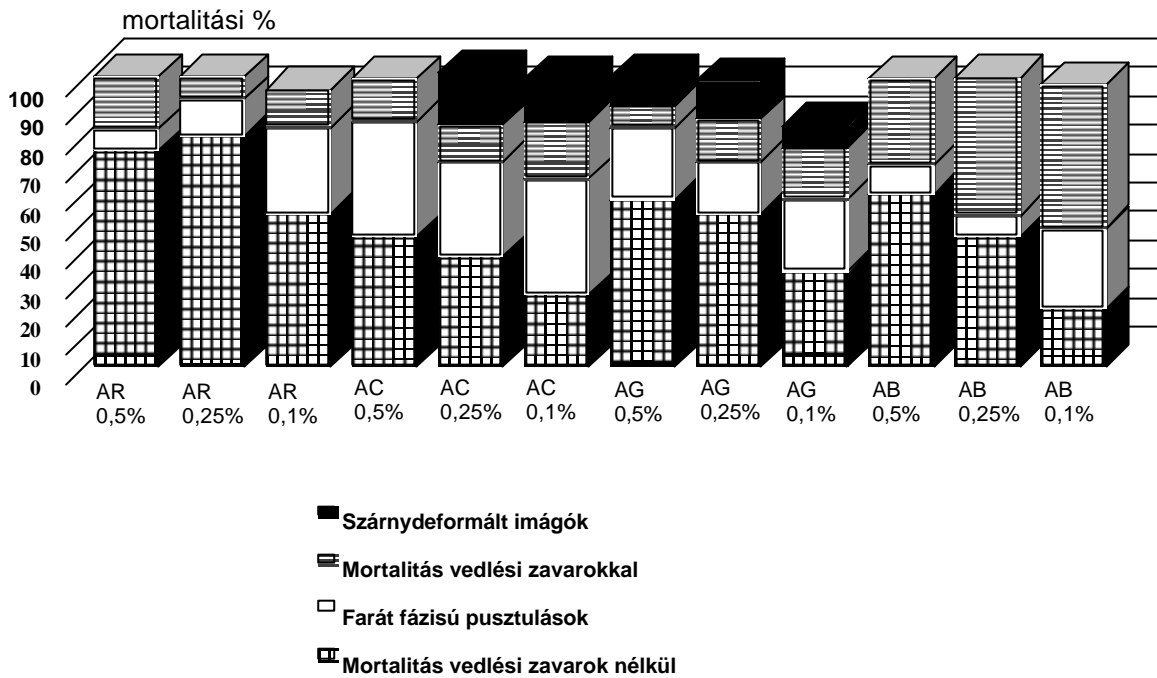


13. ábra *Dysdercus cingulatus* farát imágó (fotó: Fekete G.)



14. ábra: A *Dysdercus cingulatus* szárnyfejlődési rendellenességei (fotó: Fekete G.)

Az *Ajuga* kivonatok hatását a gyapotpoloska posztembrionális fejlődésére, a **15. ábra** foglalja össze. A tényleges mortalitást okozó vedlési rendellenességeken felül itt került bemutatásra a különböző szárnydeformációkat mutató, a kezelés végén (1 hónap után) még életben lévo imágók száma is.



AR – *A. reptans* var. *reptans*, AC – *A. chamaepitys*, AG – *A. genevensis*, AB –
A. bracteosa

15. ábra: Nyers *Ajuga* kivonatok hatása a *D. cingulatus* posztembrionális fejlődésére

Az *A. chamaepitys* 0,1 %-os oldatának hatására a fent felsorolt vedlési és fejlődési rendellenességek mindegyik típusa igen nagy számban jelentkezett, valamint az alkalmazott koncentrációtól függetlenül nagy mértéku pusztulást okozott farát fázisban. A legtöbb szárnydeformált imágó az *A. chamaepitys* 0,25 %-os kivonatánál jelentkezett, ennek oka az, hogy az alacsony lárvamortalitás miatt sokkal több egyed fejlődött imágóvá, mint a többi kezelésben. Az *A. bracteosa* hatására jellemző, hogy – különösen 0,1 %-os koncentrációban – farát

fázisban bekövetkezett, és vedlési zavart mutató pusztulást okozott. Magasabb koncentrációknál feltehetőleg a pusztulások jelentős része az előtt következett be, hogy látható fejlődési rendellenességeket okozott volna. A 0,25 %-os *A. reptans* var. *reptans* kivonat okozta a legnagyobb látható morfológiai elváltozás nélküli pusztulást.

A kísérletek során megfigyeltük a *D. cingulatus* fejlődési ütemét is. Az *A. reptans* var. *reptans* csak a legnagyobb, 0,5 %-os koncentrációban lassította mérhetően a gyapótpoloskák kifejlődését úgy, hogy a kezelt egyedek az ötödik lárvastádium után nem vedlettek imágóvá a teszt végéig. Az *A. chamaepitys* kivonatóval végzett kezelések esetében a fejlődési idő meghosszabbodása mutatkozott a 0,1 és 0,25 %-os koncentrációk esetén, majd L₅ stádiumban megrekedt a lárvák fejlődése. Az *A. genevensis* kivonata csak a legnagyobb koncentrációban okozott némi fejlődési lemaradást. Az *A. bracteosa* kivonatanál sem tudunk jelentős fejlődési lemaradást kimutatni, ennek oka azonban az, hogy a lárvák többsége korán elpusztult.

A 10, 60 és 100 %-os metanolos vizes frakciókkal az *A. reptans* var. *reptans*, az *A. chamaepitys* és az *A. bracteosa* esetén dolgoztunk 0,25, 0,5 és 1 %-os koncentrációkkal. A legkevésbé hatékony *A. genevensis*-t kihagytuk a további tesztekben.

A legkisebb dózisonál az *A. bracteosa* 60 %-os frakciója a 16. napra 100 %-os pusztulást okozott, ezen kívül az *A. chamaepitys* 60 és 100 %-os frakciója volt hatékony, 50 % feletti mortalitást okozva a beállítást követő 20. napra.

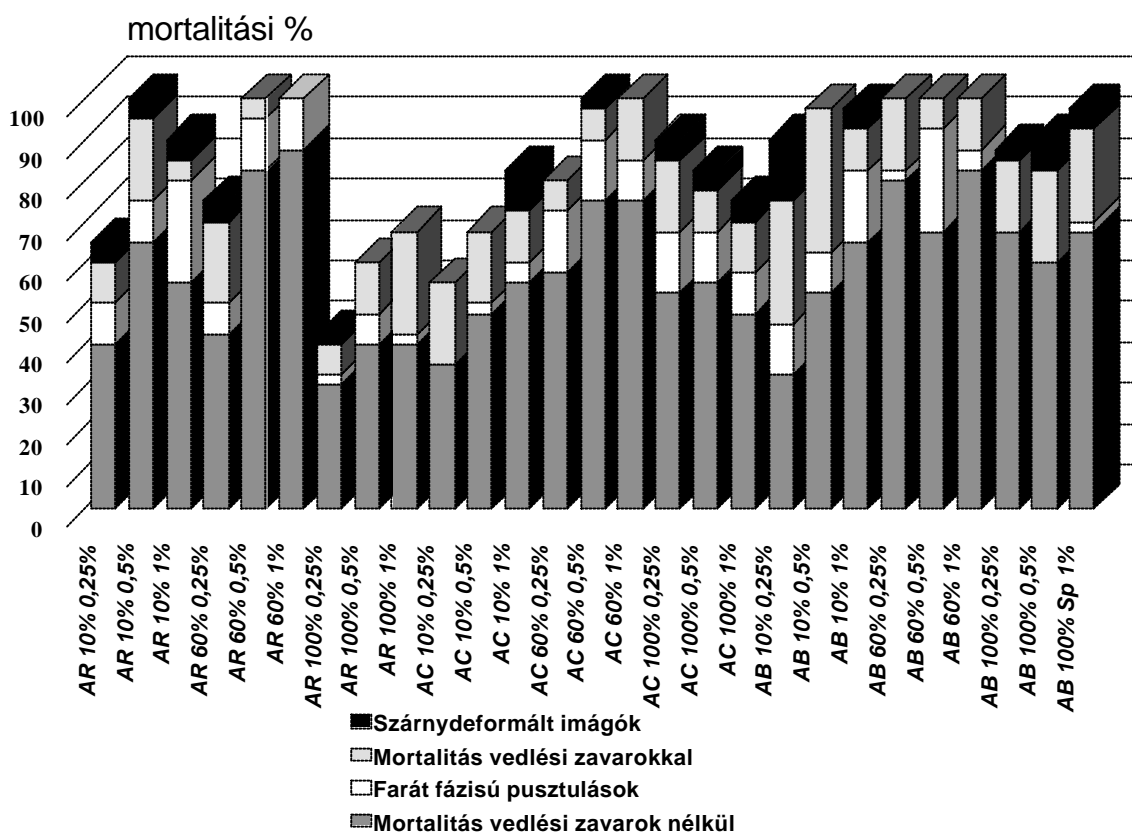
0,5 %-os koncentrációnál (**7. táblázat**) az *A. reptans* var. *reptans* és az *A. bracteosa* 60 %-os frakciói voltak a leghatékonyabbak, ezeket követték az *A. chamaepitys* 60 és 100 %-os frakciói. *A. reptans* var. *reptans* és az *A. bracteosa* 100 %-os frakciói nem okoztak pusztulást, ahogy az *A. chamaepitys* 10 %-os frakciója sem. Azonban a két előbbi faj 10 %-os frakciói a levéltetveknél tapasztaltakkal ellentétben, a kontrollhoz képest eltérő, 15-35 %-os mortalitást okoztak a 10. napra. Ezt feltehetőleg a frakciók alacsony, de azért kimutatható fitoekdiszteroid tartalma okozta, de utalhat más, biológiailag aktív anyagok jelenlétére is.

<i>Ajuga</i> fajok frakciói (metanol %)	Mortalitási % a kezelést követő 4. napon (\pm SE)	Mortalitási % a kezelést követő 10. napon (\pm SE)	Mortalitási % a kezelést követő 20. napon (\pm SE)
<i>A. bracteosa</i> 60%	34,77 \pm 13,06	88,89 \pm 11,11	100,00 \pm 0,00
<i>A. chamaepitys</i> 100%	29,73 \pm 5,41	58,62 \pm 13,79	59,37 \pm 14,54
<i>A. chamaepitys</i> 60%	16,22 \pm 8,11	65,00 \pm 15,00	88,89 \pm 11,11
<i>A. reptans</i> var. <i>reptans</i> 60%	16,11 \pm 6,11	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00

7. táblázat: Különböző 0,5 %-os koncentrációjú ínfu frakciók hatása *D. cingulatus* tesztállaton

1 %-os koncentrációnál a mortalitás az elozoeknél magasabb volt az *A. chamaepitys* 60 %-os frakciója esetén, a 20. napra elérte a 100 %-ot. A 100 %-os frakciók közül ebben az esetben is csak az *A. chamaepitys* kivonatának volt hatása, de nem növekedett a 0,5 %-os koncentrációnál tapasztaltakhoz képest. Erre az lehet a magyarázat, hogy a neoklerodánok vízoldhatósága rossz, így az itatóvízben nem volt képes több hatékony komponens feloldódni. Az *A. reptans* var. *reptans* és az *A. bracteosa* 10 %-os frakciónak hatása némileg növekedett (40 %-os mortalitás a kezelés végére).

A kezeléseknél szintén elvégeztük az egyes egyedek sztereomikroszkópos vizsgálatát. A morfológiai elváltozásokat a **16. ábra** szemlélteti.



AR – *A. reptans* var. *reptans*, AC - *A. chamaepitys*, AB – *A. bracteosa*

16. ábra: Frakcionált *Ajuga* kivonatok hatása a *D. cingulatus* posztembrionális fejlődésére

A fejlődési ütemet szintén nyomon követtük. Jelentős fejlődési lemaradást (egy teljes stádium a kezelések végére) mindhárom ínfu faj kivonatának 60 %-os frakciója okozott. A mortalitás szempontjából hatékony *A. chamaepitys* 100 %-os frakciója azonban nem okozott fejlődési idő növekedést.

A feljegyzett morfológiai elváltozásokkal megegyező hatása volt az általunk vizsgált azole-analóg ekdiszteroid-antagonistáknak is, így feltételezhetően nagyon hasonló a hatásmódjuk az ínfu kivonatokéval.

A 20-OH ekdizon hatása hasonló volt a levéltetveken tapasztaltakéval, 1 mg/l koncentrációban 47 %-os mortalitást okozott (pontos LC_{50} értéket elegendő adat hiányában nem tudtunk számítani). Az elpusztult egyedek között fele-fele arányban volt farát fázisú illetve egyéb vedlési zavarok közben elpusztult egyed, azonban szárnydeformációt nem tapasztaltunk.

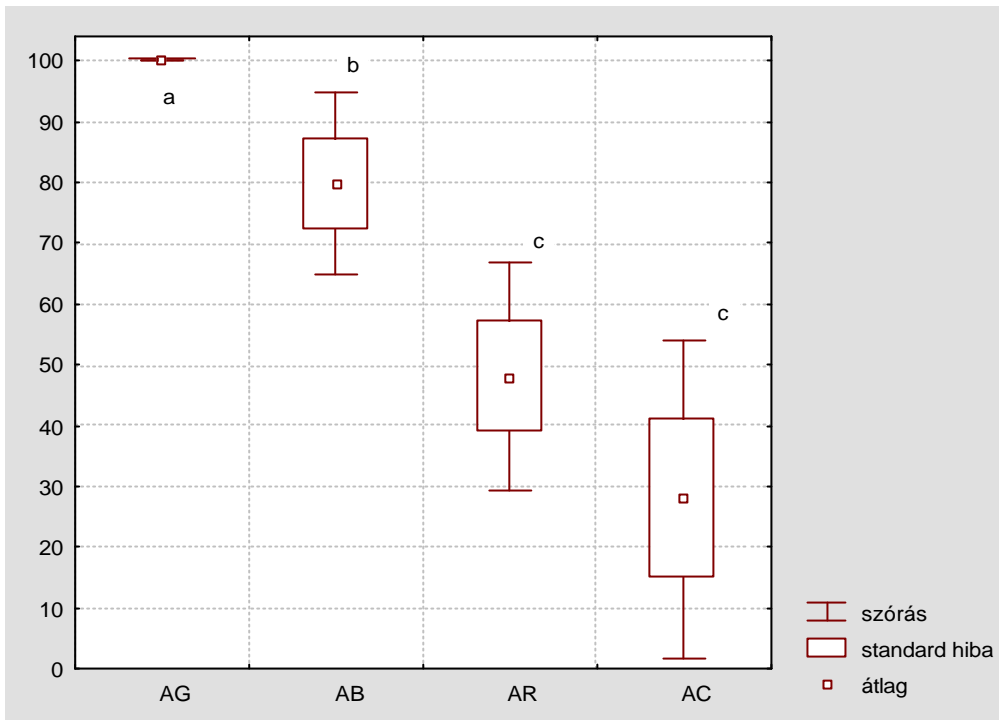
4.4 Eredmények az *Aedes aegypti* csíposzúnyog fajon

A nyers ínfu kivonatok tesztelése során a korábbiaktól jelentősen eltérő hatékonysági sort kaptunk. 0,1 %-os koncentrációnál ez a következők szerint alakult: *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. chamaepitys* (17. ábra). A pusztulások többsége a beállítást követő 4. napra következett be, és mértéke a nyolcadik napig növekedett. Az *A. reptans* var. *reptans* kivonata 0,5 %-os koncentrációban már 100 %-os mortalitást okozott a nyolcadik napra, míg az *A. chamaepitys* jelentős, 70 % feletti pusztulást csak 1 %-os koncentrációban okozott a beállítást követő 8. napra.

Az *A. aegypti* fejlődési ütemét rendkívül nehéz nyomon követni, mivel tapasztalataink szerint a *faeces* pohárban lévő lárvák száma jobban befolyásolja a kifejlődési időt, mint a kezelések. Így sok esetben a ~90 %-os túlélést mutató kontroll beállításokban az egyedek lassabban fejlődtek imágóvá, mint az 1-3 túlélőt tartalmazó kezelések esetén. A gyengébb hatású kezeléseknél (*A. reptans* var. *reptans* 0,1 %, *A. chamaepitys* 0,1 és 0,5 %) ugyan tapasztaltunk némi fejlődési lemaradást, ez azonban nem volt egyértelműen kimutatható.

A fejlődési rendellenességek egy típusát, a farát fázisú pusztulást észleltük mind az L₃ – L₄, mind az L₄ – báb átalakulások során, az *A. reptans* var. *reptans*, az *A. chamaepitys* és az *A. bracteosa* nyers kivonatainál. Az *A. genevensis* kivonata túlzottan gyors mortalitást okozott ahhoz, semhogy látható fejlődési rendellenességek kialakuljanak.

Farát fázisú pusztulást mind az L₃ – L₄, mind az L₄ – báb átalakulás közben feljegyeztünk, az *A. reptans* var. *reptans* és az *A. bracteosa* kivonatainak hatásaként.



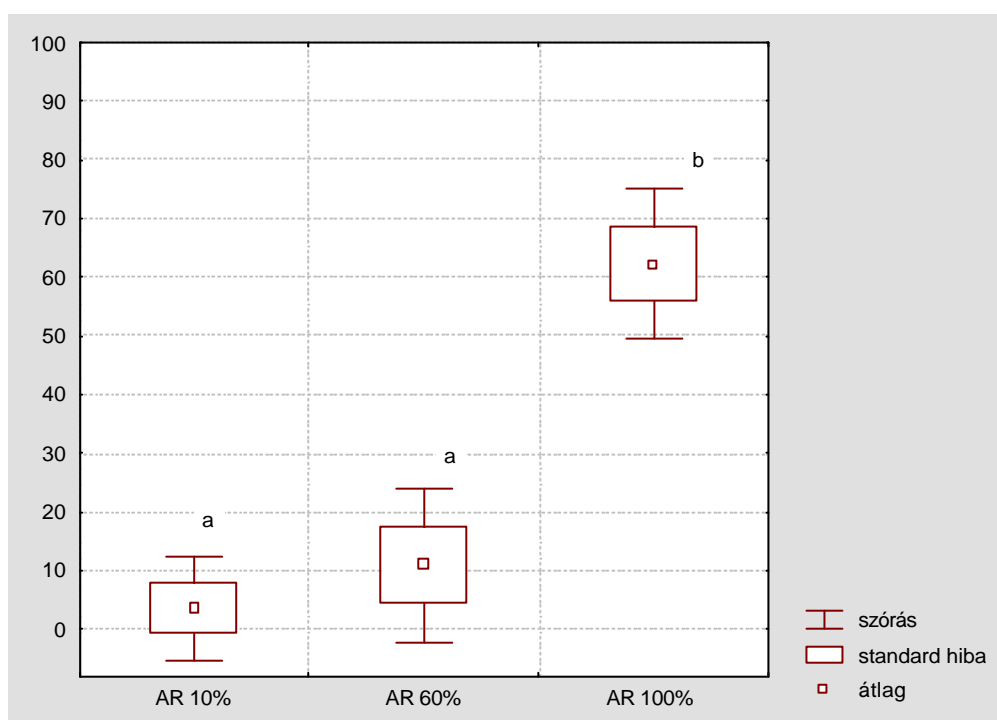
AG – *A. genevensis*, AB – *A. bracteosa*, AR – *A. reptans* var. *reptans*, AC – *A. chamaepitys*

17. ábra: Különböző infu fajok nyers kivonatainak hatása 0,1 %-os koncentrációban, *A. aegypti* lárvákon

A továbbiakban az *A. reptans* var. *reptans* 10, 60 és 100 %-os metanolos-vizes frakcióit teszteltük. Ez alapján egyértelműen megállapítható, hogy a nyers kivonathoz tapasztható hatást elsősorban a 100 %-os, vagyis a neoklerodánokat tartalmazó frakció okozza (**18. ábra**). Míg ez utóbbi hatása, és a pusztulás üteme is megegyezett a nyers kivonat eredményeivel, addig a 10 és 60 %-os frakciók minimális mortalitást okoztak. Még a nagyobb koncentrációkban (0,5 és 1 %) is, csak a 100 %-os frakció okozott nagyobb, teljes pusztulást, a másik két frakció hatástalan maradt.

A 20-OH ekdizon az alkalmazott koncentrációkban (0,1-2 mg/l) teljesen hatástalan volt. Ennek, és a fitoekdiszteroidokat tartalmazó 60 %-os frakció hatástalanságának oka, hogy az ekdiszteroidok kutikulán való áthaladása természetes úton nem lehetséges, tehát azokat a rovaroknak táplálkozás során kell felvenni. Tehát a csípőszúnyogoknál általánosan alkalmazott teszt nem alkalmas az ekdiszteroidok hatásainak tanulmányozására. A 100 %-os frakció

hatékonysága azonban reménykelto, a továbbiakban tiszta neoklerodánok hatékonyságát lesz érdemes vizsgálni. Mivel az egyébként jelentos neoklerodán tartalmú *A. chamaepitys* csak minimális hatást gyakorolt a lárvákra, ellentétben a többi fajjal, a vizsgálatokat olyan neoklerodánokkal érdemes kezdeni, ami a másik három fajban jelentos mennyiségben fordul elo, míg az *A. chamaepitys*ben nem. (Tehát az ajugareptansinok, ajugareptansonok, ajugarin stb. jöhetnek számításba.)



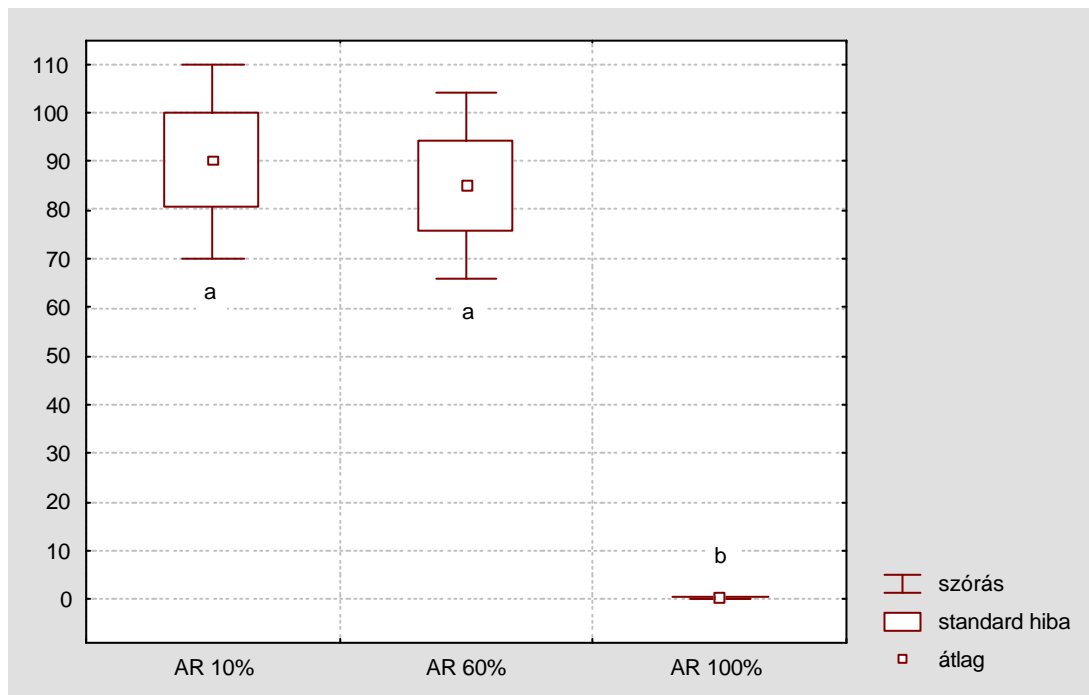
18. ábra: 0,1 %-os *A. reptans* var. *reptans* metanolos-vizes frakciók hatása *A. aegypti* lárvákon a kezelést követő 8. napon

4.5 Eredmények a *Daphnia magna* vízibolhán

A nagy vízibolha kísérleteinkbe történő bevonása az ífu fajok a csípőszúnyogokon tapasztalt aktivitása után merült fel. Ezért elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a nem célszervezet *D. magna* hogyan reagál kivonatokat különböző frakcióira, illetve hogy hormonrendszerükre hogyan hatnak az ekdiszteroidok.

Vizsgálatainkat három ífu faj (*A. reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys*, *A. bracteosa*) 10, 60 és 100 %-os metanolos-vizes frakcióival végeztük el. Megállapítottuk, hogy a frakciók még az extrém magas 10 %-os koncentrációban sem gyakorolnak hatást a *D. magna* lárvákra a standard 48 órás tesztekben. A tesztek folytatva azonban már egészen mást tapasztaltunk. Mindhárom ífu faj kivonatának a 10 és 60 %-os frakciója magas, (85-100 %-os) mortalitást illetve mobilitásgátlást okozott a 96. órára, az 1 %-os dózisban. A 0,1 %-os koncentrációkban ez a legtöbb esetben jelentősen csökkent, bár az *A. bracteosa* 60 %-os frakciója még itt is közel teljes pusztulást okozott.

Megnyugtató ugyanakkor, hogy a csíposzúnyog lárvákon hatékony *A. reptans* var. *reptans* 100 %-os frakció a vízibolhákön semmiféle aktivitást nem mutatott (**19. ábra**), hiszen az a további kutatásokat kérdojelezné meg az ífu fajok vízben való alkalmazhatóságával kapcsolatban.



19. ábra: 1 %-os *A. reptans* var. *reptans* metanolos-vizes frakciók hatása *D. magna* lárvákon a kezelést követő 96. órában

Az elpusztult egyedeket fénymikroszkóp alatt megvizsgálva a vízibolhánál is vedlési rendellenességet figyeltünk meg. *A. reptans* var. *reptans* 60 %-os frakciójának hatására a vízibolhát burkoló kutikula rendezetlenné vált, mikroszkóp alatt több rétegnek látszott (**20. ábra**).

A 20-OH ekdizon és a makiszteron A esetén hasonló eredményeket kaptunk, mint a 10 és 60 %-os ínfu frakcióknál. 48 óráig egyik anyag sem okozott mobilitásgátlást (1 és 10 mg/l), míg a 96. órára mindkettőnél 90 % feletti volt a mortalitás, a koncentrációktól függetlenül. Vedlési rendellenességet csak a makiszteron A kezelésnél tapasztaltunk.



20. ábra: Vedlési rendellenesség *D. magna* lárván (fotó: Fekete G.)

5. Megvitatás és következtetések

Az ífu fajokkal végzett kémiai munkák során megállapítottuk, hogy azokból viszonylag könnyen lehet a hatékony komponenseket tartalmazó kivonatokat készíteni. A nyers kivonatokból laboratóriumban, kis mennyiségekben egyszerűen lehet olyan frakciókat készíteni, melyek a különböző típusú vegyületeket többé-kevésbé jól elkülönítve tartalmazzák. A frakcionálás ipari méretekben történő kivitelezése azonban megoldásra vár.

Az analitikai munkák során szerzett tapasztalataink szerint a rétegekromatográfiás vizsgálatokhoz 10-20 g száraz növényből készült extraktum elegendő, ha a cél a főkomponens fitoekdiszteroidok detektálása. A folyadékkromatográfiás vizsgálatok ennél nagyobb mennyiséget (100-1000 g száraz növény kivonata) igényelnek, ha egy növény teljes fitoekdiszteroid profilját kívánjuk meghatározni.

Az *Ajuga reptans* var. *reptans* esetén – ellentétben néhány korábbi munkával, ahol a 29-norciaszteron túlsúlyát mérték (TOMÁS et al., 1993;) – saját vizsgálataink szerint a 20-OH ekdizon található a legnagyobb mennyiségben (42 %). A ciaszteron és származékai valóban jelentős összetevői az *A. reptans* var. *reptans* fitoekdiszteroid profiljának.

Az eredményekből megállapítható, hogy a fitokémiai módszerek fejlődésével egyre több ekdiszteroid lesz kimutatható, pontosabb mennyiségi eredményekkel. Ugyanakkor a vizsgálatokat jelentősen befolyásolhatja a termesztés módja, gyűjtés ideje és a feldolgozás mikéntje. Tehát sok esetben az új eredmények nem a korábbiak cáfolatai, de felhívják a figyelmet arra, hogy a hatásvizsgálatokat csak párhuzamosan elvégzett kémiai analízissel kiegészítve érdemes elvégezni.

A zöldborsó-levéltetűvel végzett kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a szintetikus tápoldaton alapuló teszt módszer alkalmas a növényi kivonatok, ekdiszteroidok és ezek alapján más vegyületek *per os* hatásának vizsgálatára. A módszer rendkívül érzékeny, így kis mennyiségben rendelkezésre álló vegyületek tesztelésére is kiválóan alkalmas, ami az *in vivo* tesztekénél nem gyakori. Érzékenysége következtében vízben kevésbé jól oldódó komponensek

tesztelésére is részben alkalmas. A hatás módját tisztázó elemzés bonyolult. A preparálás, majd az egyedek egyenkénti mikroszkópos vizsgálata, a fejlődési rendellenességek észlelése az állat kis mérete miatt munkaigényes. A fejlődési lemaradások számszerűsítése sem könnyű a rovar gyors posztembrionális fejlődése miatt. A teszt módszer további hátránya az ahhoz szükséges vegyszerek magas ára, és a kivitelezés nagy munkaigénye.

Megállapítottuk, hogy az *A. pisum* levéltetű faj nagyon érzékeny a fitoekdiszteroidok (20-OH ekdizon $LC_{50}=1,07$ ppm) és az ínfu kivonatok tápcsatornán keresztüli adagolására. A tiszta ekdiszteroidokkal végzett vizsgálataink egyértelműen azt mutatják, hogy az eredmények megadásakor mindig specifikálni kell a konkrét fitoekdiszteroidot. Az általunk vizsgált vegyületek között, a hatékonyság tekintetében több nagyságrendi különbségek is voltak. Korábban az *A. pisum* levéltetűvel nem végeztek hasonló vizsgálatokat, és nincsenek *per os* teszteredmények más levéltetű fajokkal sem, így az eredményeinket nem tudjuk összevetni irodalmi adatokkal.

A gyapotpoloskával végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a módszer szintén alkalmas a növényi kivonatok, ekdiszteroidok és ekdiszteroid-antagonisták vizsgálatára. Ugyanakkor, a vízben rosszul oldódó anyagok tesztelése itt is nehézkes. A tesztállat kiválóan alkalmas a morfológiai elváltozások elemzésére. Mérete lehetővé teszi, hogy a főbb deformációkat preparálás nélkül sztereomikroszkóppal vizsgáljuk. Hosszú posztembrionális fejlődése segíti a fejlődési időben bekövetkező változások mérését.

A *D. cingulatus per os* 20-OH ekdizon érzékenysége hasonló az *A. pisum* levéltetűéhez. A növényi kivonatokkal végzett vizsgálataink részben alátámasztják a korábbi eredményeket (DARVAS et al. 1997, 1998a, 1998b), melyek szerint a hatásért főképp az ínfu kivonatok fitoekdiszteroid tartalma a felelős. Ugyan akkor az *A. chamaepitys* 100 %-os, vagyis a neoklerodánok tartalmazó frakciója is jelentős mortalitást okozott. Mind a három vizsgált ínfu faj (*A. reptans*, *A. chamaepitys*, *A. bracteosa*) különböző metanolos-vizes frakciói fejlődési és vedlési rendellenességeket okoztak a tesztállaton. Megállapítható tehát, hogy a fitoekdiszteroidokon mellett más vegyületek, feltételezéseink szerint főképp a

neoklerodánok, jelentos hormonális zavarokat okoznak a *D. cingulatus* poloskafajon.

Az *A. aegypti* esetén alkalmazott teszt módszer a fitoekdiszteroidok hatásának vizsgálatára csak korlátozottan alkalmas, elsosorban a dermális hatású anyagok tesztelésére jó. A teszt egyszeru, gyorsan kivitelezhető, költségigénye minimális.

A korábban leginkább aktívnak tartott *A. bracteosa* és *A. reptans* (MARCARD et al. 1986, DARVAS et al. 1996, 1997.) fajok kisebb mértékű mortalitást okoztak, mint az általunk vizsgált *A. genevensis*. Az irodalmi adatok fitoekdiszteroidoknak és neoklerodánoknak tulajdonítható hatást említene az *A. reptans* esetén, míg a mi vizsgálataink szerint csak a neoklerodánokat tartalmazó frakció aktív. A 60 %-os, fitoekdiszteroidos frakció még magas (1 %-os) dózisban sem okozott pusztulást.

A *Daphnia magna* vízibolha fajjal végzett vizsgálatainkból egyértelműen kiderült, hogy a 48 órás ISO szabvány teszt nem alkalmas a hormonális úton ható vegyületek víztoxikológiai minosítésére. Az idoben kibovított vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy az ínfu kivonatok nem alkalmazhatóak megkötések nélkül élovízben, és azok közvetlen környezetében. A részletes ökotoxikológia megítéléshez természetesen számos további vizsgálat szükséges.

Ínfu kivonatok és ekdiszteroidok hatásáról vízibolha fajokon nincsenek irodalmi adatok, így eredményeinket nem tudjuk összevetni más vizsgálatokkal.

Az ínfu fajok kivonataival és azok frakcióival végzett kísérletek eredményeit összevetve megállapítottuk, hogy az *Ajuga* növények, a termelt változatos allelokemikáliáknak köszönhetően alkalmasak lehetnek hazai eloállítású botanikai inszekticid gyártására. Az *Ajuga* kivonatok melegvérűeken a rendelkezésre álló információk szerint káros hatást nem okoznak (sőt, több országban forgalmaznak ínfu kivonatot tartalmazó gyógykenocsöket), így növényvédelmi célú alkalmazásuk valószínűleg humán-egészségügyi kockázat nélkül lehetséges.

A hatásért felelos komponensek alapján két fejlesztési irány lehetséges. Egyrészt a poloskán és a levéltetűn aktív fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakciókat kell tovább vizsgálni. Reményeink szerint tiszta ekdiszteroidok tesztelésével megállapítható lesz, hogy a növények mely részei alkalmasak leginkább botanikai

peszticidként való felhasználásra. Ehhez azonban számos egyéb problémát kell megoldani, többek között az ínfu fajok termesztését nagy mennyiségben és az elválasztási módszerek hatékonyabbá tételét, valamint vizsgálni kell a hatékony komponensek stabilitását is.

Az elsősorban csíposzúnyog lárvákon aktív frakciókat tovább kell vizsgálni. Legfontosabb az egyes neoklerodánok egyenkénti tesztelése, hogy megállapítható legyen, mely vegyületek felelősek az aktivitásért. A vizsgálatok során a hatás módját is fel kell deríteni. Mint azt megállapítottuk, a neoklerodánokat tartalmazó frakció vizsgálatainkban elsősorban nem táplálkozást gátló hatást mutatott, viszont nagy számú fejlődési rendellenességet okozott. Megnyugtató eredmény, hogy ugyanez a frakció a *D. magna* lárvákon inaktív volt.

Mivel az *A. bracteosa* magyarországi körülmények között csak üvegházban képes áttelelni, hazai felhasználásra a másik három faj közül kell kiválasztani a legalkalmasabbakat a további fejlesztésre. Az *A. reptans* var. *reptans* relatív magas zöldtömeg és fitoekdiszteroid hozama mellett kémiailag jól felderített faj. Minden vizsgálatunkban jelentős hatást mutatott, így széles körű felhasználásra ad esélyt. Termesztéstechnológiája megoldást igényel, mert árnyékkedvelő.

Az *A. chamaepitys* hozama alacsony, fénykedvelőképessége miatt termesztése egyszerűbb az elozoeknél, azonban nincs számottevő gyomelnyomóképessége. Ekdiszteroid tartalma alacsony, neoklerodán tartalma viszont magas. *Per os* tesztjeinkben több frakciója is jó eredményeket mutatott, ezért érdemes foglalkozni vele a továbbiakban is.

Az *A. genevensis* szintén magas zöldtömeg-hozamú faj, fitoekdiszteroid tartalma azonban alacsony, a benne található neoklerodánok pedig szinte teljesen felderítetlenek. Hatása változó volt, véleményünk szerint a csíposzúnyogon mért aktivitása miatt mégis alkalmas lehet a további munkákra.

A legújabb kutatási eredmények, az ekdizon receptorhely leírása az ekdiszteroid agonisták és antagonisták fejlesztésére is új lehetőségeket adott. Az ekdiszteroidok modell alapján számított hatásokat összevetve az általunk *in vivo* tesztben kapott eredményekkel segítheti az ilyen irányú kutatásokat.

6. Összefoglalás

Munkák során célul tűztük ki, hogy négy ífu faj (*Ajuga reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys*, *A. genevensis*, *A. bracteosa*) hatását tanulmányozzuk három rovaron (*Acyrtosiphon pisum*, *Dysdercus cingulatus*, *Aedes aegypti*) és egy nem célszervezet vízi ízeltlábún (*Daphnia magna*). Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy az ífu fajok közül melyik lehet alkalmas hazai eloállítású botanikai peszticidként való alkalmazásra, milyen hatással vannak a vizsgált rovarokra, valamint hatásmódjukat próbáltuk megállapítani.

Az elmúlt 35 évben számos publikáció jelent meg az *Ajuga* fajok rovarokon való aktivitásáról és kémiai profiljukról. Jelen munkánk ebbéli tudásunk bővítésére tett kísérletet.

Az *A. pisum* levéltetűvel végzett *per os* vizsgálataink során a következő hatékonysági sort kaptuk: *A. bracteosa* > *A. chamaepitys* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. genevensis*. Megállapítottuk továbbá, hogy míg az *A. chamaepitys* fitoekdiszteroidokat és neoklerodánokat tartalmazó frakciói is hatással voltak a rovarra, a másik három fajnak csak az ekdiszteroid-frakciói bizonyultak aktívnak.

A hatékony frakciók háromféle fejlődési rendellenességet okoztak: farát fázisú pusztulás, csökevényes szárnyfejlődés és az érzögödrök rendellenes száma a szárnyatlan nostények csápján. Az, hogy a fitoekdiszteroidok a hormonrendszert befolyásoló hatásuk miatt fejlődési deformációkat okoznak, nem volt meglepo, azonban a neoklerodánokat tartalmazó frakciók hasonló aktivitása figyelemre méltó.

A levéltetűn mértük 12 tiszta ekdiszteroid hatását is. Az eredményekből kiderült, hogy a rovarok vedlési hormonénál (20-OH ekdizon) aktívabb fitoekdiszteroidok is megtalálhatóak növényekben, ezek közül a polipodin B ífu fajokban is. Megállapítottuk továbbá, hogy a tiszta ekdiszteroidok közül több is okoz farát fázisú pusztulást, míg az érzögödrök számának alakulását csak a 20-OH ekdizon befolyásolta.

A *D. cingulatus* poloskán végzett szintén *per os* vizsgálataink hasonló eredményt adtak. Magasabb koncentrációban az *A. reptans* var. *reptans*

hatékonyabb volt mint az *A. chamaepitys*. Az egyes frakciók vizsgálata is az elozoekhez hasonló eredményt adott, vagyis a fitoekdiszteroid-frakciói mind a négy ínfu fajnak hatékonyak voltak, míg a neoklerodánokat tartalmazók közül csak az *A. chamaepitys* 100 %-os metanolos frakciója. Az *A. reptans* var. *reptans* és *A. bracteosa* 10 %-os metanolos-vizes frakciói kis mértéku aktivitást mutattak a rovaron, amit feltehetőleg minimális, de azért kimutatható ekdiszteroid tartalmuk okozott.

A gyapotpoloskán is több fejlődési rendellenességet megfigyeltünk: farát fázisú pusztulás, egyéb vedlési zavarokkal járó mortalitás és szárnyfejlődési zavarok, köztük mikropterizmus. Ezeket a jelentos mortalitást nem okozó frakcióknál is feljegyeztük, ami utalhat az elválasztási eljárások pontatlanságára, de egyéb eddig nem vizsgált hatású biológiailag aktív anyagok jelenlétére is.

Egyes kezelések (fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakciók) jelentosen, akár egy teljes stádium tartamával megnövelték a *D. cingulatus* fejlődési idejét. Jelentos fejlődési lemaradást a többi frakció nem okozott.

A 20-OH ekdizon hasonló koncentrációban volt aktív a gyapotpoloskán, mint a levéltetun. Hatására vedlési zavarokat és farát fázisú pusztulásokat jegyeztünk fel, azonban szárnydeformációt nem tapasztaltunk.

Az *A. aegypti* csíposzúnyog lárvákkal végzett kísérleteink a következő hatékonysági sort adták: *A. genevensis* > *A. bracteosa* > *A. reptans* var. *reptans* > *A. chamaepitys*. Az *A. chamaepitys* kivonata csak nagy (1 %, illetve a feletti) dózisban mutatkozott aktívnek. Az *A. reptans* var. *reptans* különböző frakcióinak hatásait vizsgálva egyértelműen megállapítottuk, hogy a mért aktivitásért a neoklerodánokat tartalmazó 100 %-os metanolos frakció felelos.

A neoklerodán frakció csíposzúnyog lárvákon okozott farát fázisú pusztulásokat, egyéb elváltozást, illetve a fejlődési idő változását azonban nem tudtuk megfigyelni.

A nem célszervezet *D. magna* vízibolhával végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a standard 48 órás tesztekben az ínfu kivonatok még extrém magas (10 %) dózisban sem okoznak mobilitásgátlást. A kísérleteket folytatva a 96. órára azonban az *Ajuga* fajok okozta mortalitás jelentos, az *A. bracteosa* kivonatának ekdiszteroidokat tartalmazó frakciója még 0,1 %-os koncentrációban is csaknem

teljes pusztulást okozott. Megnyugtató ugyanakkor, hogy a csíposzúnyog lárvákon aktív *A. reptans* var. *reptans* 100 %-os metanolos frakciója kísérleteink szerint semmiféle hatással nincs a vízibolhára. Aktívnak a 10 és 60 %-os metanolos-vizes frakciók bizonyultak.

A 20-OH ekdizon és a makiszteron A hatásait vizsgálva a vízibolhán hasonló eredményeket kaptunk, mint a 10 és 60 %-os ínfu frakcióknál. 48 óráig egyik anyag sem okozott mobilitásgátlást, míg a 96. órára mindkettonél 90 % feletti volt a mortalitás, a koncentrációktól függetlenül (1 és 10 mg/l).

Az *A. reptans* var. *reptans* fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakciója és a makiszteron A morfológiai elváltozást okoztak, amit mi vedlési rendellenességnek vélünk.

Kísérleteink eredményeiből megállapítható tehát, hogy az ínfu fajok változatos kémiai összetevőinek köszönhetően – melyek közül a fitoekdiszteroidok bizonyítottan, a neoklerodánok pedig valószínűen hatnak a rovarok fejlődésére – alkalmasak lehetnek botanikai inszekticid előállítására. A további alapkutatási feladatok mellett azonban jelentős, a gyakorlati felhasználást lehetővé tevő fejlesztésekre van szükség.

7. Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretnék köszönetet mondani témavezetomnek, Dr. Polgár A. László tudományos fommunkatársnak, aki a kísérletes munkámat irányította és konzulensemnek, Dr. habil. Nádasy Miklós egyetemi docensnek, aki foként PhD tanulmányaim során volt segítségemre.

Kiemelt köszönet illeti Prof. Darvas Bélát, jelen téma hazai megalapozóját, kinek segítségére munkám során gyakran támaszkodtam.

Az analitikai munkákban nyújtott segítségért köszönettel tartozom Dr. Báthori Máriának, Prof. Josep Collnak és Dr. Fónagy Adriennek. A tiszta ekdiszteroidokkal végzett munkáimhoz az izolálást Dr. Báthori Mária, Hunyadi Attila és Dr. Pongrácz Zita végezték. Az ekdiszteroid-antagonistákat Dr. Bélai Iván szintetizálta, ez úton is megköszönöm, hogy bevont ezzel kapcsolatos munkáiba.

Lauber Éva a gyapotpoloskával végzett munkákban volt segítségemre, továbbá irodalmi feldolgozásra irányuló munkája nélkül jelen dolgozat bizonyosan hiányosabb volna. A csíposzúnyog tesztekét részben az Agro-Chemie Kft. laboratóriumában végeztük, köszönet Dr. Pap Lászlónak és Kelemen Máriának a lehetőségért. Hálás vagyok Dr. Inna Levkovetz és Dr. Székács András segítségéért, a nagy vízibolhával végzett vizsgálataimban való közreműködésért.

A tenyészetek fenntartása elsősorban Vajdics Gyöngyi munkájának köszönhető, rajta kívül Kincses Judit és Futó Balázs voltak segítségemre.

Végezetül szeretném megköszönni az MTA Növényvédelmi Kutatóintézete vezetőinek, hogy helyet és lehetőséget biztosítottak munkámhoz.

8. Irodalomjegyzék

Báthori, M., Máthé, I., Solymosi, P. and Szendrei, K. (1987): Phytoecdysteroids in some species of Caryophyllaceae and Chenopodiaceae. *Acta Botanica Hungarica*, 33: 377-385.

Báthori, M., Szendrei, K., Rudel, D., Lafont, R., Gharib, J. and Girault, J.-P. (1990): *Serratula tinctoria* L., an adequate plant source of ecdysteroids. *Invert. Repr. Devel.*, 18: 104.

Bellés, X., Camps, F., Coll, J. and Piulacha, D. M. (1985): Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids against larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera). *J. Chem. Ecol.*, 11: 1439-1445.

Ben Jannet, H., Harzallah-Skhiri, F., Mighri, Z., Simmonds, M. S. J. and Blaney, W. M. (2000): Responses of *Spodoptera littoralis* larvae to Tunisian plant extracts and to neo-clerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves. *Fitoterapia*, 71: 105-112.

Benedek P. (1988): *Pyrrhocoridae* – Verokölto poloskák. In: Jermy T. és Balázs K. (szerk.): A növényvédelmi állattan kézikönyve 1. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Bélai, I. and Fekete, G. (2003): Effects of anti-ecdysteroid quaternary derivatives of azole analogues of metyrapone on the post embryonic development of the red cotton bug (*Dysdercus cingulatus* F.). *Pest. Manag. Sci.* 59: 401-409.

Billas I. M. L., Iwema T., Garnier J. M., Mitschler A., Rochel N. and Moras D. (2003): Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. *Nature* 426: 91-96.

Boneva, I. M., Mikhova, B. P., Malakov, P. Y., Papanov, G. Y., Duddeck, H. and Spassov, S. L. (1990): Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga chamaepitys*. *Phytochemistry*, 29: 2931-2933.

Bremner, P. D., Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M. and Veitch, N. C. (1998): Neo-clerodane diterpenoid insect antifeedants from *Ajuga reptans* var. *reptans* cv. Catlins Giant. *Phytochemistry*, 47: 1227-1232.

Camps, F., Coll, J., Cortel, A. and Messeguer, A. (1979): Ajugareptansin, a new diterpenoid from *Ajuga reptans* (L.). *Tetrahedron Letters*, 20: 1709-1712.

Camps, F., Coll, J. and Cortel, A. (1981): Two new clerodane diterpenoids from *Ajuga reptans* (Labiatae). *Chem. Lett.*, 8: 1093-1096.

Camps, F., Coll, J. and Dargallo, O. (1984): Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga chamaepitys*. *Phytochemistry*, 23: 2577-2579.

Camps, F., Coll, J., Dargallo, O., Rius, J. and Miravittles, C. (1987): Clerodane diterpenoids from *Teucrium* and *Ajuga* plants. *Phytochemistry*, 26: 1475-1479.

Camps, F. (1991): Plant ecdysteroids and their interaction with insects. pp. 331-376. In: Harborne, J.B. and Tomas-Barberan, F.A. (eds.): *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Clarendon Press, Oxford.

Carbonell, P. and Coll, J. (2001): Ajugatansins, neo-clerodane diterpenes from *Ajuga reptans*. *Phytochemical Analysis*, 12: 73-78.

Chu, W. and Lu, H. (1980): Growth regulators and silk production of *Bombyx mori* L. from phytoogenous ecdysteroids. pp. 281-297. In: Hoffmann, J.A. (ed.): *Progress in Ecdysone Research*. Elsevier, Amsterdam.

Darvas B. (1991): *Ajuga* fajok fitoekdiszteroidjai, mint rovar-fejlesztésszabályzó hatású botanikai inszekticidek. *Növényvédelem*, 27: 481-498.

Darvas B., Polgár A. L., Hataláné Zsellér I., Szabó P. Elekesné, Kaminszky M. és Petró E. (1994): *Ajuga* (Labiatae) fajok és alkalmi kártevők (Gondolatok a „tápnövény” fogalmáról). *Növényvédelem*, 30: 319-326.

Darvas B., Polgár L., Bream A.S., Csatlós I., Farag A. I., Torma-Gazdag M., Ilovai Z., Calcagno M. P. and Coll J. (1996): Efficacy of *Ajuga* (*A. chamaepitys*, *A. reptans* var. *reptans*, and var. *atropurpurea*) extracts on a wide variety of non-adapted insect species. Vol. 2. pp. 1083-1100. In: Singh R.P., Chari M.S., Raheja A.K. and Kraus W. (eds): *Neem and environment*, Oxford and IBH Pub. Co. PVT. LTD. New Delhi, Calcutta .

Darvas, B., Polgár, L. A., Bream, A. S., Csatlós, I., Farag, A. I., Torma-Gazdag, M., Ilovai, Z., Calcagno, M. P. and Coll, J. T. (1996): Efficacy of *Ajuga* (*A. chamaepitys*, *A. reptans* var. *reptans*, and var. *atropurpurea*) extracts on a wide variety of non-adapted insect species. Vol. 2. pp. 1085-1100. In: Sing, R. P., Chari, M. S., Raheja, A. K. and Kraus, W. (eds): *Neem and Environment*. Proc. World Neem Conference. Oxford and IBH Publ. Co. Pvt. Ltd., New Delhi and Calcutta, India.

Darvas, B., Defu, C., Polgár, L. A., Körmendy, C., Vidal, E., Pap, L. and Coll, J. (1997): Effects of some materials extracted from *Ajuga reptans* var. *reptans* on *Aedes aegypti* and *Dysdercus cingulatus* larvae. *Pest. Sci.*, 49: 392-395.

Darvas B., Coll, J., Polgár A. L., Farag, A. I., Defu, C., Hassan, E. és Ocete, R. (1998a): *Ajuga* (*A. australis*, *A. bracteosa*, *A. chamaepitys*, *A. laxmanni*, *A. linearifolia*, *A. multiflora*, *A. reptans* var. *reptans*) fajok fitoekdiszteroid profilja és metanolos kivonatuk hatása *Dysdercus cingulatus*-on (Heteroptera: Pyrrhocoridae). Abs. *Növényvédelmi Tudományos Napok*, 44: 48.

Darvas, B., Coll, J. and Polgár, A. L. (1998b): Some aspects of *Ajuga* (*A. australis*, *A. bracteosa*, *A. chamaepitys*, *A. genevensis*, *A. laxmanni*, *A. linearifolia*, *A. multiflora*, *A. reptans*) – insects relationships. Abs. XIII. Ecdysone Workshop, Jena, July 27-31, 13: 52.

Darvas B. (1999): A kémiai növényvédelem és kritikája. 15-48. In: Polgár A. L. (ed.): A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon. OMFB, Budapest.

Darvas B. (2000): A dipterológia alkalmazott aspektusai. Doktori értekezés tézisei. MTA, Budapest.

Darvas B. (2001): Rovarok fejlődésére és szaporodására ható vegyületek kutatása *Ajuga* fajokban. Zárójelentés. OTKA Iroda, Budapest.

Farag, A. (1982): Effects of compounds with anti-hormon activity on insect pests. Candidate Degree (Ph. D.) in Agricultural Science, Entomology. Budapest.

Fónagy A. (1990): A rovarok kutikulája. pp. 60-69. In: Darvas B. (szerk.): A növényvédelmi rovarélettan és toxikológia alapjai. Debreceni Agrártudományi Egyetem, Mezőgazdasági Egyetemi Kar, Növényvédelmi Tanszék, Debrecen.

Hernandez, A., Pascual, C., Sanz, J. and Rodríguez, B. (1982): Diterpenoids from *Ajuga chamaepitys*: two neo-clerodane derivatives. *Phytochemistry*, 21: 2909-2911.

Kubo, I., Lee, Y.-W., Balogh-Nair, V., Nakanishi, K. and Chapya, A. (1976): Structure of ajugarins. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 22: 949-950.

Kubo, I., Klocke, J. A. and Asano, S. (1981): Insect ecdysis inhibitors from the East African medicinal plant *Ajuga remota* (Labiatae). *Agric. Biol. Chem.*, 45: 1925-1927.

Kubo, I., Klocke, J. A., Miura, I. and Fukuyama, Y. (1982): Structure of ajugarin-IV. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 90: 618-619.

Kubo, I., Klocke, J. A. and Asano, S. (1983): Effects of ingested phytoecdysteroids on the growth and development of two lepidopterous larvae. *J. Insect Physiol.*, 29: 307-316.

Kubo, I., Matsumoto, A. and Ayafor, J. F. (1984): Efficient isolation of a large amount of 20-hydroxyecdysone from *Vitex madiensis* (Verbenaceae) by droplet counter-current chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 1683-1684.

Kunkel, H. (1977): Membrane feeding Systems in aphid research. pp. 311-338. In: Harris, K. F. and Maramorosch, K. (eds): Aphids as Virus Vectors) Academic Press, Inc.

Lafont, R. and Horn, D. H. S. (1989): Phytoecdysteroids: structures and occurrence. pp. 39-64. In: Koolman, J. (ed.): Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Lafont, R., Harmatha, J., Marion-Poll, F., Dinan, L. and Wilson, I. D. (2002): The Ecdybase Handbook. <http://ecdybase.org/>

Lauber É., Gharib, A., Kincses J., Vajdics Gy., Fekete G. és Darvas B. (2004): Ínfu fajok (*Ajuga* spp.) orleményeinek hatása aszalványmolyon (*Plodia interpunctella* Hübner). *Növényvédelem*, 40: 559-569.

Malakov, P. Y. and Papanov, G. Y. (1998): Areptins A and B two new neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga reptans*. *Phytochemistry*, 49: 2443-2447.

Marcard, M., Zebitz, C. P. W. und Schmutterer, H. (1986): Wirkung von methanolischen Rohextrakten aus *Ajuga* spp. auf Entwicklungsstadien verschiedener Stechmückenarten. *J. Appl. Ent.*, 101: 146-154.

Maróy P. és Darvas B. (1990): A vedlési hormonok - ekdiszteroidok. pp. 48-60. In: Darvas B. (szerk.): A növényvédelmi rovarélettan és toxikológia alapjai). Debreceni Agrártudományi Egyetem, Mezőgazdasági Egyetemi Kar, Növényvédelmi Tanszék, Debrecen.

Matsouka, T., Imai, S., Sakai, M. and Kamada, M. (1969): Studies on phytoecdysones. *Ann. Rep. Takeda Res. Labs*, 28: 221-271.

Melé, E., Messeguer, J., Gabarra, R., Tomás, J., Coll, J. and Camps, F. (1993): In vitro bioassay for the effect of *Ajuga reptans* phytoecdysteroids on *Trialeurodes vaporariorum* larval development. *Ent. Exp. Appl.* 62: 163-168.

Nádasy M. és Gál Cs. (1996): Az *Ajuga* sp. növények táplálkozásgátló hatásának vizsgálata két jelentősebb rovarkártevőn (*Sitona humeralis* L., *Pieris brassicae* L.). *Növényvédelem*, 32: 281-285.

Nakanishi, K., Koreeda, M., Sasaki, S., Chang, M. L. and Hhu, H. Y. (1966): The structure of ponasterone A, an insect moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay. *Chem. Comm.* 915-917.

Nishida, R., Kawai, K., Amano, T. and Kuwahara, Y. (2004): Pharmacophagous feeding stimulant activity of neo-clerodane diterpenoids for the turnip sawfly, *Athalia rosae ruficornis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 15-25.

Pascual-Villalobos, M. J. and Robledo, A. (1998): Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products*, 8: 183-194.

Pongrácz Z., Blazsó G. és Báthori M. (2000): Az ekdiszteroidok szerepe és jelentősége, különös tekintettel a humán terápiára. *Fitoterápia*, 5 (3-4): 57-64.

Richter, K. and Birkenbeil, H. (1987): The effect of extract of *Ajuga reptans* on moult regulation in *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.*, 33: 933-939.

Richter, K. and Birkenbeil, H. (1989): The effect of extract from *Ajuga reptans* on moult regulation in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR*, 274: 145-150.

Russel, G. B., Fenemore, P. G., Horn, D. H. S. and Middleton, E. J. (1972): Insect moulting hormones: the phytoecdysones of *Dacrydium intermedium*. *Aust. J. Chem.*, 25: 1935-1941.

Schauer, M. und Schmutterer, H. (1981): Wirkung von Frischpressäften and Rohextrakten aus der Labiatae *Ajuga remota* auf die Gemeine Spinnmilbe *Tetranychus urticae* Koch. *Z. angew. Ent.*, 91: 425-433.

Schmutterer, H. und Tervooren, G. (1980): Die Wirkung von Rohpressäften and Rohextrakten aus *Ajuga*-Arten auf Frassaktivität and Metamorphose von *Epilachna varivestis* Muls. *Z. angew. Ent.*, 89: 470-478.

Scourfield, D.J. and Harding, J.P. (1958): A key to the British species of freshwater Cladocera with notes on their ecology. *Fresh. Biol. Assoc. Scientific Publication 5*, Ambleside, Westmorland.

Shigematsu, H., Moriyama, H. and Agui, N. (1974): Growth and silk formation of silkworm larvae influenced by phytoecdysones. *J. Insect Physiol.*, 20: 867-875.

Simon T. és Csapody V. (1965): Kis növényhatározó. Nemzeti Tankönyvkiadó. Budapest.

Soó R. (1968): A magyar flóra és vegetáció rendszertani-növényföldrajzi kézikönyve III. Akadémiai Kiadó. Budapest.

Soó R. és Kárpáti Z. (1968): Növényhatározó II. kötet. Magyar flóra. Harasztokvirágos növények. Tankönyvkiadó, Budapest.

Szalay-Marzsó L. (1969): Levéltetvek a kertészetben. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.

Szalay-Marzsó L. (1989): Valódi levéltetvek – Aphididae. pp. 133-193. In: Jermy T. és Balázs K. (szerk.): A növényvédelmi állattan kézikönyve II.) Akadémiai Kiadó. Budapest.

Tomás, J., Camps, F., Claveria, E., Coll, J. Melé E. and Messeguer J. (1992): Composition and localization of phytoecdysteroid in *Ajuga reptans* L. *in vivo* and *in vitro* cultures. *Phytochemistry*, 31: 1585-1591.

Tomás, J., Camps, F., Coll, J. Melé E. and Messeguer J. (1993): Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue cultures. *Phytochemistry*, 32: 317-324.

Ujvárosy M. (1973): Gyomnövények. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. pp. 253-255.

Verma, V. H. K., Mahmood, U. and Singh, B. (2002): Clerodane diterpenoids from *Ajuga bracteosa* Wall. *Natural Product Letters*, 16: 255-259.

Womack, M. (1993): The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Wing Beats*, 5 (4): 4.

Zheng-Yi, W. and Raven, P. H. (eds.) (1994): Flora of China. 17. *Verbenaceae* through *Solanaceae*. Science Press, Missouri Botanical Garden. pp. 67-68.

Zöldi V., Fekete G. és Darvas B. (2005): Szelektív hatású lárvaölo készítmények összehasonlító vizsgálata *Aedes aegypti* (Linnaeus) és *Culex pipiens* Linnaeus csípőszúnyog (Culicidae) fajokon *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.* 13:259-267.

ISO 6341 (1996): Water quality, Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). *Norsk Standard* 1. utgave mai 1996.

Új tudományos eredmények

1. Eloször került részletes leírásra *Ajuga* kivonatok és azok frakciónak hatása levéltetu fajon. Az ínfu extraktumok *Acyrthosipon pisum* levélteture gyakorolt hatását *per os* vizsgálatokkal bizonyítottuk. Leghatékonyabbak az *A. bracteosa* fitoekdiszteroidokat- valamint az *A. chamaepitys* neoklerodánokat tartalmazó frakciói. Fejlesztési rendellenességek az ínfu kivonatokkal végzett kezelések hatására az *A. pisum* fajon: farát fázisú pusztulás, csökevényes szárnyfejlődés, az érzögödrök rendellenesen magas száma szárnyatlan nostényeken.
2. Tiszta ekdiszteroidok hatását első alkalommal vizsgáltuk levéltetun. Több fitoekdiszteroid (20-OH ekdizon, ekdizon, polipodin B, ajugaszteron C) farát fázisú pusztulásokat okozott, valamint a 20-OH ekdizon hatására szárnyatlan nostényen az érzögödrök száma a szokásostól eltérol volt.
3. Az *Ajuga* extraktumokból készült frakciók részletes hatásvizsgálata *Dysdercus cingulatus* lárvákon. Eloször mutattunk ki neoklerodánoknak tulajdonítható hatást, továbbá a kivonatok hatására bekövetkező fejlesztési idő megnyúlást, valamint fejlesztési rendellenességeket. Jelentős fejlesztési idő változást az *A. reptans* var. *reptans*, *A. chamaepitys* és az *A. bracteosa* fitoekdiszteroidokat tartalmazó frakciói okoztak. A 20-OH ekdizon hatásának vizsgálata, mely vedlési zavarokat, köztük farát fázisú pusztulást okozott.
4. Az *A. genevensis* hatásának vizsgálata *Aedes aegypti* lárvákon. Összevetve a többi ínfu fajjal, egyértelműen az *A. genevensis* kivonata a leghatékonyabb a csíposzúnyog lárvákon. Vizsgálataink más ínfu fajokkal kiegészítették a korábbi eredményt, mely szerint az *A. reptans* var. *reptans* kivonatának neoklerodánokat tartalmazó frakciója hatásos, míg a fitoekdiszteroidos nem.
5. Az *Ajuga* extraktumokból készült frakciók és a 20-OH ekdizon valamint a makiszteron A hatásának elemzése *Daphnia magna* lárvákon. Az ínfu kivonatok és a két tiszta ekdiszteroid nem okoz mobilitásgátlást a standard 48 órás tesztekben, de 96 óra után mindegyik jelentős mortalitást eredményez. A frakciók

közül a fitoekdiszteroidokat tartalmazók aktívak a nagy vízibolhán, azonban a neoklerodánokat tartalmazók egyáltalán nem.