مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۵۳-۱۴۳

تأثیر حشره‌کش‌های پریمیکارب و تیامتوکسام بر فعالیت آنزیم‌های سم-زدای شته سیاه باقلا

Effect of Pirimicarb and Thiamethoxam on detoxification enzyme activity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scopoli (Hem: Aphididae)

شیما رحمانی*[۱]، علیرضا بندانی[۲]، سولماز عظیمی[۳]

Shima Rahmani[1*], Ali R. Bandani[2], Solmaz Azimi[3]

۱- عضو هیئت علمی گروه حشره شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ، ایران
۲- عضو هیئت علمی گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.
۳- عضو هیئت علمی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

1- Department of Entomology, Science and reaserch branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Plant Protection Dept., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3-Department of Plant Protection, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shrahmani@srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹)

چکیده

در بسیاری از موجودات زنده، آنزیم‌های سم‌زدا نقش مهمی در سم‌زدایی ترکیبات ناگوارد ایفا می‌کنند و به عنوان نشانگرهای زیستی قرارگیری در معرض ترکیبات ناگوارد قلمداد می‌شوند. در واقع، درجات مختلف حساسیت به ترکیبات شیمیایی ممکن است به دلیل تفاوت‌های بیوشیمیایی در سم‌زدایی حشره‌کش‌ها باشد. در بررسی پیش‌رو، اثر تیامتوکسام و پیریمیکارب در غلظت‌های زیرکشنده بر میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدای شته سیاه باقلا، *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) مورد ارزیابی قرار گرفته است. به منظور تعیین اثرات کشنده در شرایط آزمایشگاهی، غلظت میانه کشنده برای شته در معرض تیامتوکسام و پیریمیکارب به ترتیب (۶۲۵/۱۶-۶۸/۹۴) ۱۱۳/۸۵ و (۷۱/۹۹-۱/۳) ۲/۹۴ $mg(ai)L^{-1}$ محاسبه شد. هم‌چنین فعالیت مونواکسیژنازها به عنوان آنزیم‌های سم‌زدا اندازه‌گیری شد. تأثیر هر دو حشره‌کش بر شته *A. fabae* باعث افزایشی معنی‌دار در القای آنزیم‌های مونواکسیژناز شد ($P<0/0001$). در این بررسی فعالیت گلوتاتیون-اس-ترانسفراز (GST) به موازات افزایش غلظت‌های زیرکشنده پیریمیکارب القا می‌شود ($P=0/0001$، $F=18/17$، $df=5$، ۱۲). تیامتوکسام نیز در غلظت‌های بالاتر (۴۸/۰۷، ۷۵/۰۶ و ۱۱۳/۸۵ mg (ai)/L) فعالیت این آنزیم را القا کرد ($P=0/0009$، $F=18/17$، $df=5$، ۱۲). نتایج نشان داد که در غلظت‌های زیرکشنده می‌توان دو شته‌کش مهم تیامتوکسام و پیریمیکارب را توسط آنزیم‌های سم‌زدا به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی شناسایی کرد.

واژه‌های کلیدی

Aphis fabae،
پریمیکارب،
تیامتوکسام،
آنزیم‌های سم‌زدا،
نشانگرهای زیستی.

مقدمه

شته سیاه باقلا، *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae)، در تمامی مناطق ایران از جمله سواحل شمالی کشور و شهرستان‌های مرکزی و اطراف تهران انتشار دارد (Esmaili *et al*. 1998؛ Khanjani, 2004). این شته از مهم‌ترین آفاتی است که در دنیا بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی میزبان دارد و باعث خسارت به گیاهان میزبان به ویژه گونه‌هایی از دو خانواده Chenopodiaceae و Fabaceae می‌شود (CAB International 2000). شته سیاه باقلا از نظر انتقال بیماری‌های ویروسی نظیر ویروس موزاییک و زردی چغندر قند نیز اهمیت دارد و گاهی خسارت از این لحاظ قابل توجه است Esmaili *et al.* (1998؛ Khanjani, 2004). کنترل شته‌ها بیشتر مبتنی بر استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی است. سموم شیمیایی که در کنترل شته‌ها استفاده می‌شود باعث آلودگی‌های زیست محیطی و اثرات مخرب بر سایر موجودات زنده می‌شوند (Hasanshai *et al.* 2016).

تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمی و بافت شناسی به منظور تخمین تأثیر پذیری موجودات زنده از مواد شیمیایی و آلاینده‌های محیط زیست اهمیت روزافزون یافته است. این تغییرات با استفاده از نشانگرهای زیستی که نشانگر این تغییرات هستند، شناسایی می‌شوند. به علت این‌که غلظت برخی آلاینده‌ها برای ردیابی و شناسایی بسیار پایین است لذا برای شناسایی اثرات این آلاینده‌ها بر موجودات زنده از نشانگرها استفاده می‌کنند. آنزیم‌های سم‌زدا مانند آنزیم‌های مونواکسیژناز P_{450} و گلوتاتیون ترانسفراز نمونه‌ای از نشانگرهای زیستی پروتئینی می‌باشند. این آنزیم‌ها در سم‌زدایی و بیوترانسفرماسیون مواد شیمیایی آلی دخالت دارند (Hyne and Maher, 2003). در بسیاری از موارد، بررسی‌های نشانگرهای بیوشیمیایی بر موجودات زنده در معرض مواد سمی منتخب در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی انجام می‌گیرد. این مطالعات آزمایشگاهی با نتایجی که در پی دارند، می‌توانند در پیش بینی اثرات آلودگی بر جمعیت‌های طبیعی در مزرعه راه‌گشا باشند (Hayes and Pulford, 2003).

از دیرباز، اثرات آفت‌کش‌ها و سایر مواد سمی بر موجودات زنده با استفاده از پارامترهای ساده شده‌ای برای تعیین اثر، مانند LC_{50} یا LD_{50} (دز یا غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد افراد یک جمعیت می‌شود) ارزیابی می‌شوند. ارزیابی‌های غلظت کشنده، تخمین و مقایسه سریع چندین ماده سمی را با توجه به اثر آن‌ها بر افراد یک گونه خاص امکان‌پذیر می‌سازد. هم‌چنین تخمین LC_{50} از این راه برای گونه‌های هدف و غیرهدف نسبتا ارزان است (Stark *et al.* 2007). به منظور طراحی زیست‌سنجی‌ها که اثرات آفت‌کش‌ها را بر موجود زنده ارزیابی می‌کنند برخی موارد مهم شامل گونه، مرحله زندگی جنس‌ها، راه‌های ورود آفت‌کش، پارامترهای تاریخچه زیستی، اندازه پلات مزرعه و فرمولاسیون‌های آفت کش باید در نظر گرفته شوند (Ruberson, 1998).

آنزیم‌های مونواکسیژناز P_{450} و گلوتاتیون ترانسفراز به عنوان آنزیم‌های سم‌زدا نقش اصلی را در سم‌زدایی سموم کارباماتی و نیکوتینوئیدی دارند (Basij *et al*. 2016; Sulaiman *et al*. 2016). پیریمیکارب یک حشره کش دی متیل‌کاربامات است که علیه شته‌ها و سفید بالک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Syngenta, 2004). تیامتوکسام نیز از جمله حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی است که در داخل و خارج از گلخانه برای مدیریت حشرات مکنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cloyd and Bethke, 2011). پیریمیکارب و حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی اگرچه برای گرده افشان‌ها خطرناک هستند (Sanchez-Bayo and Goka, 2014)، اما شته‌کش‌های مناسبی به شمار می‌روند و در عین حال برای بسیاری از دشمنان طبیعی شته‌ها بی‌زیان هستند (Jalali *et al*. 2009).

گلوتاتیون اس-ترانسفرازها (EC 2.5.1.18, GSTs) آنزیم‌های سم‌زدای فاز دو در بیشتر موجودات زنده هستند.

(Hayes and Pulford, 1995). این آنزیم‌ها در سم‌زدایی برخی گروه‌های حشره‌کش‌های شیمیایی مانند ارگانوفسفره‌ها، پایروتروئیدها، کاربامات‌ها و هیدروکربن-های کلره مانند DDT دخالت دارند (Ronson *et al.* 2001) و در مقاومت به حشره‌کش‌ها از طریق متابولیسم مستقیم حشره‌کش (Wei *et al.* 2001)، تفرق (Sequestration) (Balabaskaran *et al.* 1989) یا با حفاظت در برابر اثرات سمی ثانویه مانند افزایش در پروکسیداسیون لیپید، القا شده با حشره کش درگیر هستند (Vontas *et al.* 2001).

دخالت گلوتاتیون اس-ترانسفرازها در متابولیسم حشره-کش‌ها از مگس خانگی، کنه شکارگر *Neoseiulus fallacis* (Mullin *et al.* 1982) ، لارو *Heliothis virescens* (Bull and Whitten, 1972) و سوسک آرد، *Tribolium castaneum* (Wool *et al.* 1982) گزارش شده است. نقش گلوتاتیون اس-ترانسفرازها هم‌چنین در *Plutella xylostella* ضمن توسعه مقاومت به ارگانوفسفره‌ها به خوبی مشخص شده است (Ho, 1966 ; Balabaskaran *et al.* 1989). از سوی دیگر، P_{450} ها گروه متنوعی از آنزیم‌ها با عملکردهای بسیار با طیفی گسترده از بیوستنز تا متابولیسم زنوبیوتیک‌ها هستند. تعداد ژن‌های P_{450} در ژنوم حشره، از ٤٦ تا بیش از ۱۵۰ عدد متغیر است که هر یک، کدکننده یک آنزیم ویژه از P_{450} هستند (Feyereisen, 2006; Nelson, 2006). افزایش بیان سیتوکروم P_{450} ها دلیل عمده مقاومت به حشره‌کش‌ها در گونه‌هایی از حشرات مهم از نظر تجاری بوده است (Opennorth, 1985).

در این بررسی، ابتدا به منظور تعیین اثر کشندگی دو حشره کش فرموله شده تیامتوکسام و پیریمیکارب بر شته سیاه باقلا، *A. fabae*، در طی ٢٤ ساعت، از طریق غوطه-وری برگ باقلا در غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی، آزمون‌های زیست سنجی انجام گرفت. سپس غلظت‌های زیرکشنده‌ای که باعث ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤٠ و ۵۰ درصد مرگ و میر شته می‌شدند برای ارزیابی چگونگی تغییرات در سیستم آنزیمی مونواکسیژنازها و گلوتاتیون اس-ترانسفرازهای شته سیاه باقلا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت باقلا

بذر گیاهان باقلا (*Faba vulgaris*) به طور منظم، دو بار در هفته، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک اره کاشته می‌شدند. خاک اره علاوه بر وزن سبک، که حمل و نقل گلدان‌ها را آسان می‌سازد، از شیوع آلودگی قارچی به ویژه رایزوکتونیا و فوزاریوم جلوگیری می‌کند و پوشش مناسبی برای انجام عمل تهویه و نگهداری رطوبت بوده و جایگزین مناسبی برای خاک محسوب می‌شود. بذرهای باقلا که پیش از کاشت به منظور تسریع در جوانه زنی، به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در آب خیس خورده بودند، به تعداد ۱۰ تا ۱۲ عدد در سطح خاک اره‌ای که به ارتفاع ۱۰ تا ۱۵ سانتی متری از کف گلدان ریخته می‌شد، قرار داده می‌شدند. نهایتا روی بذرها با مقداری دیگر خاک اره پوشانیده می‌شد. گیاهان (در شرایط گلخانه با دمای ۵±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۲۰±۵۰ درصد) یک روز در میان آبیاری می‌شدند و برای جبران کمبود مواد غذایی، هر چهار روز یک بار کود کامل هورتی-گرو (N: K: P: Mg: ۲۰: ۲۰: ۲۰: ۲ درصد؛ تولید هورتی‌لند، هلند) به نسبت یک و نیم تا سه گرم در لیتر به گیاهان داده می‌شد. دو هفته بعد از شروع کاشت، زمانی که گیاهان به ارتفاع حدود ۱۲ سانتی متری می‌رسیدند، به اتاق رشد منتقل می‌شدند تا توسط شته‌ها آلوده شوند.

پرورش شته سیاه باقلا

جمعیت اولیه شته سیاه باقلا، *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) متعلق به آزمایشگاه مدیریت تلفیقی آفات (IPM) واقع در ساختمان موزه جانورشناسی دانشکده کشاورزی کرج، دانشگاه تهران، بود که در شرایط جدید روی گیاهان باقلا در اتاقک رشد، با دمای ۱±۲۳ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰

درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده می‌شد. به منظور حفظ جمعیت شته-ها، هر دو تا سه روز یک بار، چند گیاه سالم و شاداب به اتاق رشد منتقل شده در اختیار شته‌ها قرار می‌گرفت.

حشره کش‌ها

دو ترکیب حشره‌کش پیریمیکارب (پریمور®، ۵۰٪ WP، گل سم گرگان) و تیامتوکسام (آکتارا®، ۲۵٪ WG، سینجنتا) برای آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. فرمولاسیون تجاری این دو حشره کش به ترتیب، از شرکت گل سم گرگان و اداره حفظ نباتات تهران تهیه شد.

تست زیست سنجی شته‌ها

زیست‌سنجی شته‌ها به روش تماس با باقیمانده خشک سم به جای مانده بر سطح برگ طی مدت زمان ۲۴ ساعت، با استفاده از شته‌های ماده بالغ بی بال ۲۴ ساعته، انجام شد. بدین منظور، پس از این که غلظت‌های بالا و پایین (کمتر از ۱۰ و بیش از ۹۰ درصد کشندگی) از فرمولاسیون‌های حشره‌کش طی آزمون‌های اولیه تعیین شدند، برای انجام آزمون‌های اصلی با استفاده از روش گفته شده در بالا، پنج غلظت از هر یک از فرمولاسیون-های تجاری (تیامتوکسام، بین ۱۷/۵ تا ۷۵۰ میلی گرم ماده مؤثر بر لیتر و پیریمیکارب، ۰/۲۵ تا ۱۵ میکرولیتر ماده مؤثر در لیتر) در آب مقطر به عنوان حلال ساخته شد. برای آزمایش زیست سنجی، برگ‌های باقلا از گیاهان هم سن و از نواحی هم‌سانی از گیاهان از قسمت دمبرگ بریده شدند. در آزمایشگاه در هر یک از غلظت‌های محلول‌های حشره‌کش، به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شده، در زیر هود به مدت یک ساعت خشک شدند. برگ‌ها در محیط آگار-آگار ۱/۲ درصد طوری قرار داده شدند که سطح پشتی آن‌ها رو به بالا باشد. پس از بستن آگار، شته-های ماده بالغ هم‌سن (۲۴ ساعته) روی برگ‌ها مستقر - شدند. آزمایش در سه تکرار و طی روزهای مختلف با ۲۰ حشره در هر تیمار انجام گرفت و مجموعا برای هر غلظت، ۶۰ حشره و نهایتا برای هر یک از حشره کش‌ها، ۳۶۰ شته بالغ بدون بال مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور هم سن کردن شته‌ها، تعداد بیش از ۱۰۰ شته ماده بالغ بدون بال به هر گلدان دارای گیاهان هم سن باقلا درون انکوباتور با دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، این شته‌ها حذف شده و به پوره‌ها اجازه داده شد تا در اتاق رشد (دمای ۱±۲۳ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت) به بلوغ برسند. دمای بالاتر انکوباتور پوره‌زایی را تسریع می‌کرد و دمای پایین‌تر اتاق رشد مانع از مرگ و میر شته‌ها می‌شد. بدین ترتیب، شته‌های بالغ شش روزه برای آزمون‌های زیست سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون در فاصله زمانی ۲۴ ساعت و مجددا در انکوباتور با شرایط ثابت گفته شده در بالا انجام گرفت و شته‌هایی که بعد از این زمان با تحریک قلم موی نازک حرکت نمی‌کردند، مرده تلقی شدند.

تعیین فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا

پس از تعیین غلظت زیر کشنده، واحدهای آزمایشی به شیوه زیست سنجی آماده شدند و شته‌های بالغ هم سن، به روش گفته شده تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده (LC_{10}، LC_{20}، LC_{30}، LC_{40} و LC_{50} برای شته) قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت افراد زنده مانده برای آزمون-های بیوشیمی در ویال‌های جداگانه قرار داده شدند.

تعیین غلظت پروتئین

میزان پروتئین توسط روش بردفورد (Bradford, 1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد، در جذب نوری ۶۳۰ نانومتر تعیین شد.

سنجش آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز

هموژنایز افراد زنده در بافر تریس-HCL سرد ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۸ و سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس صورت گرفت

(Stump and Nauen, 2002). در سنجش گلوتاتیون اس-ترانسفراز روش (Stump and Nauen, 2002) مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای DCNB یا CDNB (دارای ۰/۱ درصد اتانول) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول GSH در بافر تریس- HCl (۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۸) در چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد و جذب نوری آنزیم طی زمان پنج دقیقه در طیف نوری ۳٤۰ نانومتر خوانده شد. غلظت نهایی GSH پنج میلی مولار و سوبستراهای بنزنی یک میلی مولار در محلول واکنش بودند.

فعالیت اکسیداز میکروزومی کل

کل بدن حشرات زنده مانده در بافر فسفات سدیم ۰/۰٤ مولار با اسیدیته ۷ هموژنایز شدند. هموژنات‌ها در ۱۰۰۰۰g در ٤ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و رونشین به عنوان عصاره آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Wang *et al*. 2001). میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم مونواکسیداز با استفاده از سوبسترای TMBZ (۳ ،۳'، ۵، ۵'، تترامتیل بنزیدین دی‌هیدروکلراید (خلوص بیشتر از ۹۸ درصد) با روش مارتین و همکاران (Martin *et al*. 2002) انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (اسیدیته ۷/۲)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۵۰ میکرولیتر TMBZ (۱۳ میلی گرم در ٦/۵ میلی لیتر متانل در ۱۹/۵ میلی لیتر در بافر استات سدیم ۰/۲۵ مولار با اسیدیته۵/۰) بود. سپس ۲۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (سه درصد) افزوده شد. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب در ٦۳۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد به وسیله سیتوکروم c رسم شد.

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری

در آزمون تعیین سمیت در کوتاه مدت (۲٤ ساعت) رگرسیون غلظت-مرگ و میر در شته‌ها از طریق آنالیز پروبیت با استفاده از نرم افزار Polo-plus (Robertson *et al*. 2007). ارزیابی شد تا علاوه بر غلظت کشنده میانه، و LC های مورد نیاز برای آزمایش های بعدی، محدوده اطمینان ۹۵ درصد (FL) و شیب خطوط به دست آیند.

آزمایش‌های بیوشیمیایی در سه تکرار و بر اساس طرح کامل تصادفی انجام گرفت. در تمامی واکنش‌ها در بلانک‌ها به جای عصاره آنزیمی، از آب مقطر استفاده شد. تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون LSD (Least significant difference) در نرم افزار SAS (SAS Institute Inc. 2003) انجام شد.

نتایج و بحث

اثرات کوتاه مدت (۲٤ ساعته) دو حشره‌کش تیامتوکسام و پیریمیکارب بر شته *Aphis fabae* نشان داد که غلظت میانه کشنده به ترتیب برای شته در معرض تیامتوکسام ۱۱۳/۸۵ و در معرض پیریمیکارب ۲/۹٤ میلی‌گرم ماده مؤثره بر لیتر بودند. محققین از روش‌های مختلفی برای زیست‌سنجی استفاده کرده‌اند (Gerami and Heidari, 2013; Zuo *et al*. 2016). در این بررسی در مورد شته‌ها از روش غوطه‌ورسازی برگ در محلول سمی استفاده شد که تکنیک متداولی در ارزیابی اثر تماسی با حشره‌کش‌ها است (Coon *et al*. 2009; Zuo *et al*. 2016). نتیجه زیست سنجی‌ها، نشان‌گر حساسیت بالای شته‌ها به این حشره‌کش‌ها بودند (جدول ۱). نیکویی برازش در تیمارهای تیامتوکسام نسبتا مناسب بود و ناهمگونی ناچیز و نزدیک به یک در تیمار تیامتوکسام (۰/۹۹) مشاهده شد. ناهمگونی تیمارهای تحت تأثیر پیریمیکارب (۱/٦۱) شاید به دلیل فرمولاسیون پودر وتابل باشد، زیرا این آفت‌کش باید به طور مداوم در ظرف هم زده شود (جدول ۱). از آن جایی که LC_{50} پیریمیکارب برای شته ۳۸/۷ برابر

پایین‌تر از LC_{50} محاسبه شده برای تیامتوکسام بود، این موضوع پیریمیکارب را بیش از حشره‌کش دیگر به عنوان شته‌کش اختصاصی معرفی کرد. از سوی دیگر، شدت کشندگی پیریمیکارب نیز برای شته بالاتر از تیامتوکسام ارزیابی شد (جدول ۱).

پیریمیکارب یک شته‌کش اختصاصی کاربامات با عملکرد سریع است که از طریق تماسی، خوراکی، بخار، و سیستم ریشه فعالیت می‌کند (Jutsum *et al*. 1988). مطالعات مختلفی مقایسه جمعیت‌های حساس و مقاوم گونه‌های مختلفی از شته‌ها به پیریمیکارب را نشان می‌دهد (Coon *et al*., 2009). هم‌چنین در آزمایشی، استرین‌هایی از شته *Myzus persicae* را به صورت دوره‌ای با غلظت LC_{30} فرمولاسیون پیریمیکارب به این آفت‌کش مقاوم کردند (Kwon *et al*. 2009). زیست سنجی باقیمانده آفت‌کش روی برگ در مدت زمان ٤٨ ساعت میزان LC_{50} برای استرین حساس را ١٦/٥ پی پی ام نشان می‌داد و مقاومت استرین مقاوم ١٣١ برابر بیشتر بود که با توجه نوع فرمولاسیون پیریمیکارب (pirimicarb, 25% WP) و محاسبه میزان ماده تکنیکال، LC_{50} ١/٤ برابر بیشتر از جمعیت حساس *Aphis fabae* در زیست سنجی ٢٤ ساعته در آزمایش ما بود. هم‌چنین شدت کشندگی در هر دو شته تقریبا قابل مقایسه بود (٠/٤٢±٢/٥٨ و ٠/٤±٢/٣ = Slope ± SE به ترتیب در شته *Aphis fabae* و شته *Myzus persicae*).

حساسیت شته‌های مختلف به نئونیکوتینوئیدها به وسیله محققان مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. میزان LD_{50} ایمیداکلوپرید را بر دو جمعیت شته *Myzus persicae* جمع آوری شده از رشت و کرج به ترتیب ٨/٥٦ و ٧/٨٠ نانوگرم ماده مؤثره به ازای هر حشره محاسبه کردند(Ghadamyari *et al*. 2008). در یک آزمایش مشابه، شته‌های *Myzus persicae* حساس، LC_{50} معادل ١/٩ و ٣/٩ به فرمولاسیون ایمیداکلوپرید و استامیپرید (imidacloprid 10% WP، acetamiprid 8% WP) داشتند. در حالی که شته‌های مقاوم به پیریمیکارب به این دو حشره‌کش مقاومت تقاطعی نشان دادند و به ترتیب LC_{50} برابر با ١٠ و ١٧٥/٢ داشتند (Kwon *et al*., 2009).

حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی مختلف، اثرات مختلفی بر شته‌ها داشتند. ضمن زیست سنجی به صورت قطره‌گذاری با میکرواپلیکاتور، LC_{50} دو کلون شته *Myzus persicae* تحت تأثیر ماده تکنیکال تیامتوکسام ٠/٦٥ و ١٩/٧ میلی گرم در لیتر گزارش شد. هم‌چنین غلظت کشنده نیمی از جمعیت دوکلون این شته با ایمیداکلوپرید ١/١٣ و ٣١/١، با کلوتیانیدین ٠/٥٩ و ١٧/٧٧ و با تیاکلوپرید ٠/٦١ و ١٨/ ٢٥ میلی گرم در لیتر بود (Puinean *et al*. 2010).

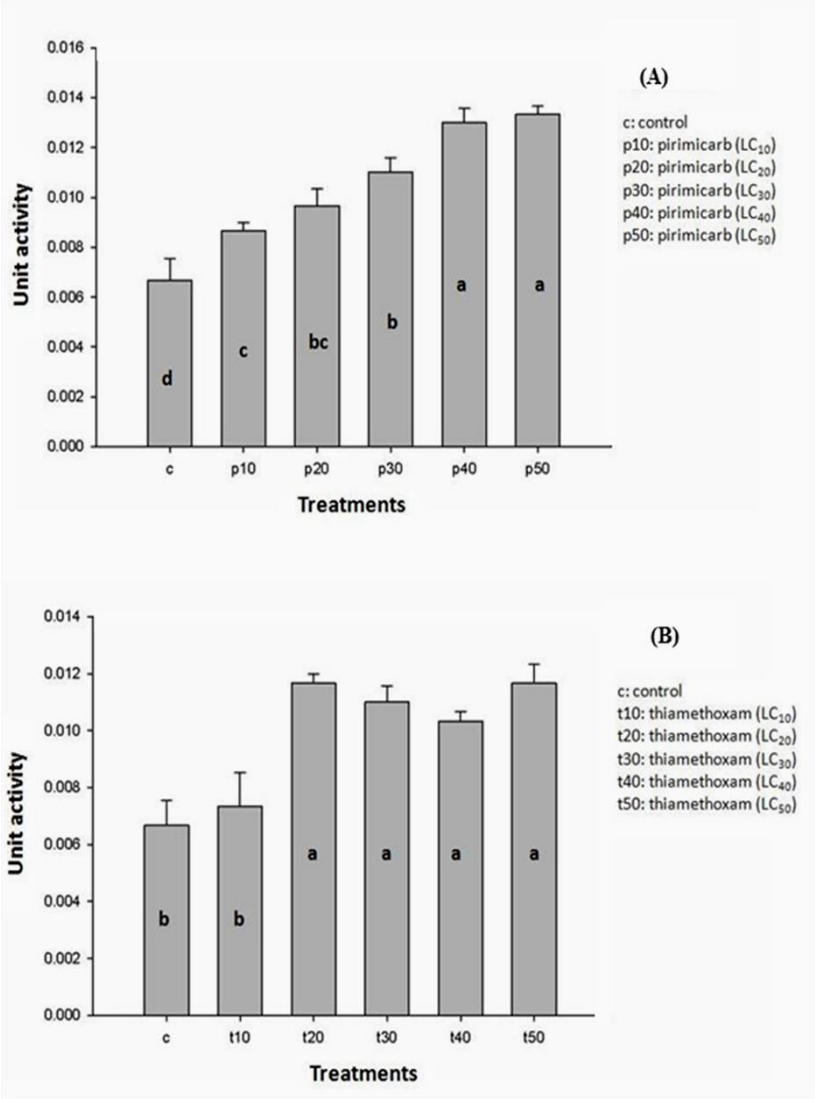
نتایج حاکی از ارزیابی اثرات دو حشره کش تیامتوکسام و پیریمیکارب بر آنزیم‌های سم‌زدای شته *A. fabae* نشان داد زمانی که آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز با سوبسترای CDNB اندازه گیری می‌شود، در شته *A. fabae* نوعی القای آنزیم با افزایش غلظت‌های زیرکشنده پیریمیکارب مشاهده می‌شود (df =١٢، F=١٨/٨٧ ، P = ٠/٠٠٠١) (شکل ١A). هم‌چنین تیامتوکسام نیز در غلظت‌های بالاتر اثر القا کنندگی آنزیم را نشان می‌داد اما روند افزایش آنزیم خطی نبود (df =١٢، F=٩/١٥ ، P=٠/٠٠٠٩) (شکل ١B). با این وجود اندازه گیری گلوتاتیون اس-ترانسفراز به وسیله سوبسترای DCNB داده قابل نتیجه گیری نشان نداد.

استفاده از سوبستراهای مختلف در بسیاری مواقع فعالیت-های متفاوتی از آنزیم را نشان می‌دهند. این موضوع به ویژه در ارتباط با سوبسترای DCNB در دو زنجرک تشخیص میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز قابل تأمل‌تر بوده است (Hung *et al*. 1990; Yang *et al*., 2001). محققین با مقایسه برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های سم‌زدا در کفشدوزک شکارگر *Harmonia axyridis* و دو شته شکار آن، *Aphis citricola* و *Myzus malisuctus* دریافتند در تمامی گونه‌های تست شده فعالیت GST از طریق CDNB بسیار بیشتر از DCNB بوده است.

جدول ۱- حساسیت ماده بالغ بدون بال شته سیاه باقلا، *A. fabae* به دو حشره کش تیامتوکسام و پیریمیکارب.

Table 1. Suscebtility of the apterous adult female of *A. fabae* to the insecticides, thiamethoxam and pirimicarb

حشره کش	تعداد	غلظت $mg(ai)L^{-1}(95\%Cl)^{-1}$ LC_{50}	LC_{40}	LC_{30}	LC_{20}	LC_{10}	Slope±SE	X^2(df)
پیریمیکارب	۳۶۰	۲/۹٤(۱/۷۱-۳/۹۹)	۲/۳۵(۱/۱۷-۳/۲۹)	۱/۸٤(۰/۷۸-۲/۷۱)	۱/۳۹(۰/۲۳-۱/۱۹)	۰/۹۳(۰/۲۳-۱/٦٤)	۲/۵۸±۰/٤۲	۲۱/۰۰(۱۳)
تیامتوکسام	۳٦۰	۱۱۳/۸۵(٦۸/۹٤-۱٦٦/۲۱)	۷۵/۰٦(٤۰/۲٦-۱۱۳/۷۰)	٤۸/۰۷(۲۲/۱۱-۷۷/۵٦)	۲۸/۵۳(۱۰/۷۷-۵۰/٤٤)	۱۳/۸۵(۳/۹۱-۲۸/۲)	۱/٤۰±۰/۲۱	۱۲/۸۹(۱۳)



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف دو حشره کش پیریمیکارب (A) و تیامتوکسام (B) بر آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز شته *A. fabae* با استفاده از سوبسترای CDNB.

Figure 1. Effect of two insecticides, pirimicarb (A) and thiamethoxam (B) on the *A. fabae* Glutathione-s-transferase enzyme using CDNB as substrate.

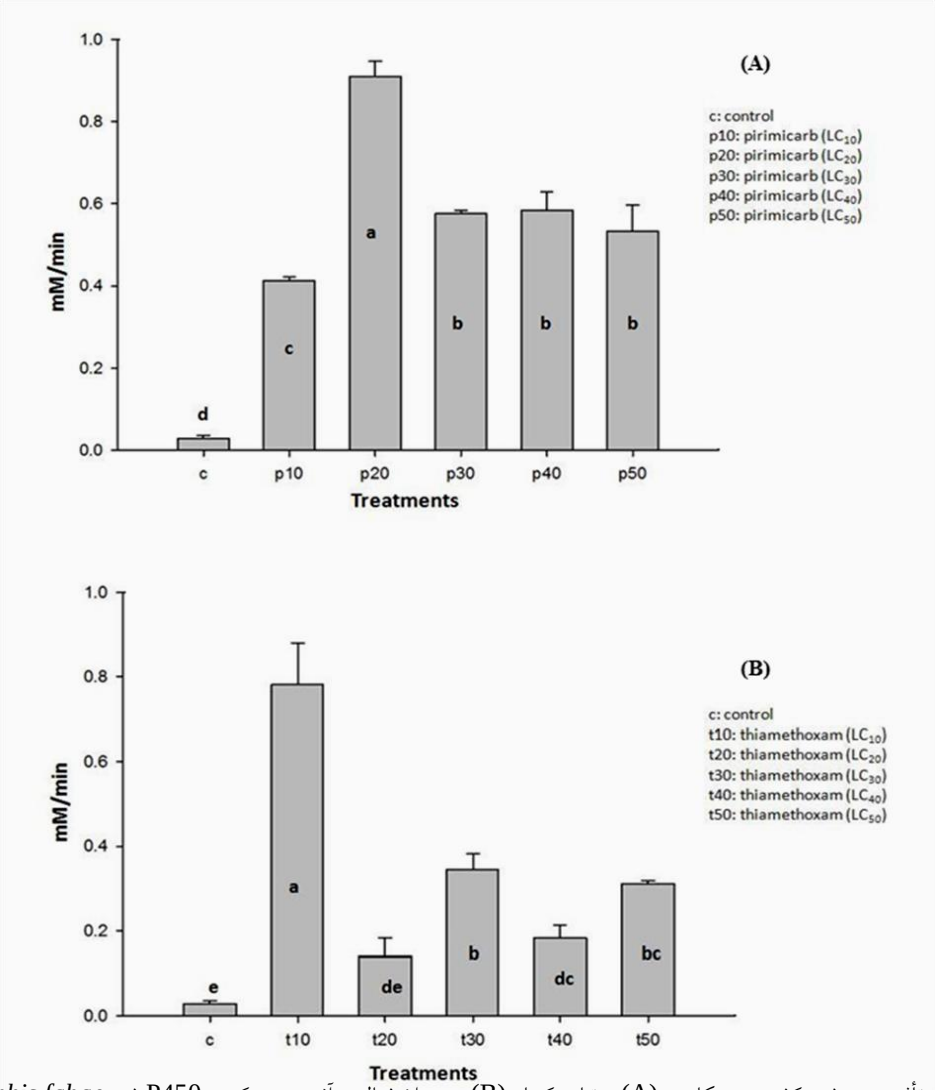
در حقیقت، اتصال (conjugation) DCNB در هیچ یک از دو گونه *M. malisuctus* و *A. citricola* مشاهده نشد. هرچند، دلیل این عدم اتصال (conjugation) آشکار نگردید. مشابه با این بررسی، محققین گزارش کردند که فعالیت GST از طریق سوبسترای CDNB در تمامی حشرات تست شده بسیار بالاتر از DCNB بوده و هیچ اتصالی به سوبسترای DCNB در *Nilaparvata lugens* و *Laodelpha stiatellus* دیده نشده است (Hung *et al*. 1990). نیز محققین نشان دادند سوبسترای CDNB به وضوح تفاوت فعالیت آنزیم‌های GST را در کنه‌های پرورش یافته روی ذرت، لوبیا و خیار نشان می‌دهد (Yang *et al*. 2001). این روند افزایش فعالیت آنزیم هم سو با گذشت زمان صورت می‌گرفت. در مقابل، وقتی که DCNB به عنوان سوبسترا برای سنجش به کار رفت، تفاوتی در فعالیت GST در میان کنه‌های تارتن تغذیه شده با گیاهان مختلف دیده نشد.

تفاوت‌های موجود در میزان فعالیت آنزیم‌ها را هم‌چنین می‌توان در سایر انواع سوبستراها مشاهده کرد. به عنوان مثال، در یک بررسی ، ضمن مقایسه جمعیت‌های مختلف پسیل آسیایی مرکبات *Diaphorina citri* با جمعیت حساس آزمایشگاهی با استفاده از آلفا-نفتیل استات به عنوان سوبسترا تفاوت‌های آماری معنی داری مشاهده نکردند (Tiwari *et al*. 2011). با این وجود تفاوت‌ها ضمن استفاده از بتا-نفتیل استات چشم‌گیر بود. تعیین فعالیت‌های گلوتاتیون اس-ترانسفراز با سه سوبسترای CDNB، DCNB و DNIB در مراحل مختلف زندگی کفشدوزک *Adalia bipunctata* نیز حاکی از فعالیت‌های بسیار پایینی در ارتباط با DCNB بود، اما در ارتباط با دو سوبسترای دیگر سطوح بالاتری از آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز ارزیابی شد (Fransis *et al*. 2002).

سیتوکروم مونوکسیژنازهای P_{450} سیستم متابولیکی مهمی هستند که افزون بر آنابولیسم و کاتابولیسم ترکیبات درون زاد شامل هورمون‌ها و فرمون‌ها، در سم زدایی یا فعال سازی زنوبیوتیک‌ها نقش دارند (Brown *et al*., 2003). تأثیر حشره‌کش پیریمیکارب بر آنزیم سیتوکروم P_{450} شته *A. fabae* باعث افزایش القای آنزیمی شد و تفاوت معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف به وجود آورد (df=۱۲ ، F=۶۳/۶۲ ،P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۲A). هم‌چنین تأثیر حشره کش تیامتوکسام نیز بر آنزیم سیتوکروم P_{450} شته سیاه باقلا افزایشی معنی‌دار را در تیمارهای مختلف نشان می‌داد (df=۱۲ ، F=۲۹/۶۳ ،P<۰/۰۰۰۱) (شکل B ۲).

در آزمایش حاضر، غلظت‌های پایین‌تر تیامتوکسام و پیریمیکارب، القاگران مؤثرتری بر فعالیت P_{450} شته سیاه باقلا بودند (شکل ۲). در این ارتباط، دیوید و همکاران (David *et al*. 2006) نتایج مشابهی را ارائه کردند. ایشان گزارش کردند که لاروهای پشه *Aedes aegypti* که در معرض دز زیرکشنده مواد سمی برگ بوده‌اند در میزان فعالیت اتوکسی کومارین-او- داتیلاز آن‌ها افزایش دیده می‌شود. در واقع، با افزایش دز تا حداکثر پنج درصد که باعث مرگ و میر ۳۰ درصدی لاروی می‌شد، افزایش معنی‌داری در فعالیت‌های P_{450} لاروی دیده شد. در دزهای بالاتر مواد سمی برگ، فعالیت‌های P_{450} مجددا کاهش می‌یافت؛ به طوری که در دز ۱۰ درصد، که باعث مرگ و میر ۹۷ درصد لاروها می‌شد، میزان فعالیت P_{450}به سطحی معادل شاهد می‌رسید. این روند می‌تواند نشان دهد که هر موجود زنده دارای ظرفیت متابولیکی و حد تحمل ویژه‌ای در مواجهه با یک ترکیب زنوبیوتیک است و در حقیقت، واکنش موجود زنده در برابر دزهایی بالاتر از حد تحمل به صورت افزایش احتمال مرگ و میر بروز می‌کند و در میزان فعالیت‌های آنزیم‌های سم‌زدا تغییرات خاصی دیده نمی‌شود. شواهد مشخصی از بررسی‌ها بر روی بدن جانور و مطالعات کشت بافت موجود است که ثابت می‌کند آفت‌کش‌ها القای استرس اکسیدی می‌کنند. از سوی دیگر، بیومارکرهای در معرض قرار گیری (Biomarkers of Exposure) در سم‌شناسی مهم هستند، زیرا آن‌ها شاخص‌های مناسبی برای دزهایی که وارد بدن می‌شوند یا مقادیری از مواد شیمیایی که

توسط بدن جذب می‌شوند، هستند. در بررسی حاضر، طی انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، بر سنجش آنزیم‌های سم‌زدا (گلوتاتیون اس-ترانسفرازها و سیتوکروم P_{450}) تکیه شد و مشخص شد که در شته *A. fabae* هر دو آنزیم‌های یاد شده این قابلیت را داشتند که به عنوان بیومارکر مورد توجه قرار گیرند. افزون بر این که مونواکسیژنازهای P_{450} آنزیم‌های بسیار مناسبی در تشخیص آلودگی شته تحت تأثیر سموم کاربامات و نئونیکوتینوتیدی در غلظت‌های بسیار پایین (۱۰ درصد کشنده) می‌باشند. در حالی که گلوتاتیون اس-ترانسفرازها به ویژه در ردیابی آلودگی ترکیبات کاربامات، فعالیتی وابسته به غلظت ترکیب دارند و با افزایش مقدار این ترکیبات، فعالیت آن‌ها افزایش پیدا می‌کند.



شکل ۲- تأثیر دو حشره کش پیریمیکارب (A) و تیامتوکسام (B) بر میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 شته *Aphis fabae*

Figure 2. Effect of two insecticides, pirimicarb (A) and thiamethoxam (B) on the activity of *A. fabae* Cytochrome P450 enzyme.

منابع

Adams M.D, Celniker S.E, Holt R.A, Evans C.A, Gocayne J.D, Amanatides P.G, Scherer S.E, Li P.W, Hoskins R.A, Galle R.F. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 2185.

Balabaskaran S, Chuen SS. And Muniandy S. 1989. Glutathione s-transferase from the diamond back moth (*Plutella xylostella* linnaeus). Insect Biochemistry 19: 435-443.

Basij M, Talebi K, Ghadamyari M, Hosseininaveh V, Salami SA. 2016. Status of resistance of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to Neonicotinoids in Iran and Detoxification by Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. Neotropical Entomology 25(5): 1-10.

Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analithcal Biochemistry 72: 248–254.

Brown D., Zhang L, Wen Z., And Scott JG. 2000. Induction of P450 Monooxygenases in the German cockroach, *Blattella germanica* L. Arch. Insect Biochemistry Physiology 2003: 53:119–124.

CAB. 2000. International, Crop Protection Compendium, Global Module, 2nd edn. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Chandrasena D, Difonzo Ch, and Byrne A. 2011. An Aphid-Dip Bioassay to Evaluate Susceptibility of Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) to Pyrethroid, Organophosphate, and Neonicotinoid Insecticides. Journal Economic Entomology 104(4): 1357-1363.

Cloyd R.A. and Bethke J.A. 2011. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. Pest Management Science 67: 3–9.

Coon M.J. Vaz A.D. Bestervelt L.L. 1996. Peroxidative reactions of diversozymes. Fedration of American Soceities for Experimental Biology 10: 428-434.

David J.P, Boyer S, Mesneau A, Ball A, Ranson H. And Dauphin-Villemant C. 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. Insect Biochemistry Molocular Biology 36:410–420.

Esmaili M, Mirkarimi A.A, Azmayesh Fard P. 1998. Agriculture Entomology. Tehran University Publication (In Farsi with English Abstract).

Feyereisen R. 1995. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicology Letter 82/83: 83–90.

Feyereisen R. 2006. Evolution of insect P450. Biochemistry Society Transaction 34: 1252–1255.

Feyereisen R. 2015. Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. Pest Management Science 71(6): 793–800.

Francis F. Haubruge E. And Dierick P. 2002. Glutathione S-Transferase Isoenzymes in the Two-Spot Ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Archive Insect Biochemistry Physiology 49:158–166.

Gerami Sh, and Heidari A. 2013. Effect of Different Bioassay Methods on Enzymatic Characteristics of Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Journal of Agricultural Science and Technology 3: 819-824.

Ghadamyari M, Talebi K, Mizuno H. & Kono Y. 2008. Oxydemeton-Methyl Resistance, Mechanisms, and Associated Fitness Cost in Green Peach Aphids (Hemiptera: Aphididae). Journal of Economic Entomology 101: 1432-1438.

Hasanshahi Gh, Abbasipour H, Jahan F, Askarianzadeh A, Karimi J, and Rastegar F, 2016. Fumigant toxicity and nymph production deterrence effect of three essential oils against two aphid species in the laboratory condition. Journal of Essential Oil Bearing Plants 19 (3): 706 – 711.

Hayes J.D, And Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Biochemistry Molocular Biology 30: 445-600.

Ho T.H. 1965. The life history of the diamond-black moth in Malaya. Diversity of agriculture Bulletin 188: 26.

Hung C.F, Kao CH, Liu C.C, Lin J.G. And Sun C.N. 1990. Detoxifying enzymes of selected insect species with chewing and sucking habits. Journal of Economic Entomology 83: 361-365.

Hyne R.V. And Maher W.A. 2003. Invertebrate biomarkers. Links to toxicities that predict population decline. Ecotoxicology Environmental Safety 54: 366-374.

Jalali M.A, Leeuwen T.V, Tirry L. And De Clercq P. 2009. Toxicity of selected insecticides to the two-spot ladybird *Adalia bipunctata*. Phytoparasitica 37: 323-326.

James DG. 2003. Pesticide Susceptibility of Two Coccinellids (*Stethorus punctum* picipes and *Harmonia axyridis*) Important in Biological Control of Mites and Aphids in Washington. Biocontrol Science Technology 13:253-259.

Jutsum A.R, Franz J.M, Deacon J.W, Payne C.C, Lewis T, Paterson R.R.M, Waage J.K. And Van Emden HF. 1998. Commercial application of biological control: status and prospects. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B 318: 357–373.

Khanjani M. 2004. Field Crop Pest in Iran. Bu-Ali Sina University Publication (In Farsi with English Abstract).

Kwon D.H, Choi B.R, Lee S.W, Clark J.M. & Lee S.H. 2009. Characterization of carboxylesterase-mediated pirimicarb resistance in *Myzus persicae*. Pesticide Biochemistry and Physiology 93: 120-126.

Martin T, Chandre F, Ochou O.G, Vaissayre M, Fournierd D. 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. Pesticide Biochemistry Physiology 74: 17–26.

Mullin C.A, Croft B.A, Strickler K, Matsumura F. and Miller J.R. 1982. Detoxification enzyme differences between a herbivorous and predatory mite. Science 217: 1270-1272.

Nelson D.R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J.J, Feyereisen R, Waxman D.J, Waterman M.R, Gotoh O, Coon M.J, Estabrook R.W, Gunsalus I.C, Nebert D.W. 1996. 450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6:1-42.

Oppenoorth F.J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In And Gilbert LJ (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and PharmacologyKerkut GS. Pergamon, Oxford 12: 731-773.

Puinean A.M, Foster S.P, Oliphant L, Denholm I, Field L.M., Millar N.S, Williamson M.S, And Bass C. 2010. Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*. PLoS Genetics 6: 1-11.

Ranson H, Rossiter L, Ortell F, Jensen B, Wang X, Roth C.W, Collins F.H. And Hemingway J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochemistry Journal 359: 295–304.

Rendic S and DiCarlo F.J. 1997. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drag Metabolism review. 29: 413-580.

Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K., & Savin, N.E. 2007. Bioassays with Arthropods. Second Edition, Taylor and Francis, Boca Raton London New York, pp 199.

Ruberson J.R, Nemoto H. And Hirose Y. 1998. Pesticides and conservation of natural enemies in pest management, In: Barbosa P. (Ed.), Conservation Biological Control, Academic Press, New York 207-220.

Sánchez-Bayo F, Goka K. 2014. Pesticide residues and bees – a risk assessment. PLoS One 9:e94482.

SAS Institute, SAS/STAT. 2003. Guide for Personal Computers. Ver. 6.12. SAS Institute, Cary, NC.

Stark J.D, Sugayama R.L, and Kovaleski A. 2007. Why demographic and modeling approaches should be adopted for estimating the effects of pesticides on Biocontrol agents. BioControl 52: 365-374.

Stumpf N. And Nauen R. 2002. Biochemical markers linked to abamectin resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). Pesticide Biochemistry Physiology 72: 111-121.

Sulaiman S, Ndula M, Riveron J.M, Irving H and Wondji Ch. 2016. The P450 CYP6Z1 confers carbamate/pyrethroid crossresistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. Molecular Ecology 25(14): 3436–3452.

Syngenta, Catalogo. 2004. Syngenta Crop Protection. Syngenta, LisboaPortugal.

Tiwari S, Mann R.S, Rogers M.E. And Stelinski L.L. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. Pest Management Sciety 2011: 67: 1258–1268.

Vontas J.G, Small G.J, Hemingway J. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in Nilaparvata lugens. Biochemistry Journal 357: 65-72.

Wang K.Y, Liu T.X, Yu C.H, Jiang X.Y. And Yi M.Q. 2002. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxification enzymes on cotton and cucumber. Journal of Economic Entomology 2002: 95: 407-413.

Wei SH, Clark AG, And Syvanen M. 2001. Identification and cloning of a key insecticide metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly Musca domestica. Insect Biochemistry Molocular Biology 31: 1145–1153.

Wool D, Noiman S, Manheim O. And Cohen E. 1982. Malathion resistance in *Tribolium strains* (Coleoptera, Tenebrionidae) and their hybridsinheritance patterns and possible enzymatic mechanisms. Biochemistry Genetic 20: 621-636.

Yang TC, Chi H. 2006. Life tables and development of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) at different temperatures. Journal of Economic Entomology 99: 691-698.

Yang X, Margolies DC, Zhu KY. 2001. And Buschman LL: Host plant-induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology 94: 381-387.

Zuo Y, Wang K, Zhang M, Peng X, Jaime C. Chen M. 2016. Regional susceptibilities of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) to ten insecticides. Florida Entomologist 99(2): 269-275.