Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 52, No 1, Spring and Summer 2021 (135-147)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.310598.1006952

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰ (ص۱۴۷-۱۳۵)

بررسی آنزیمی حساسیت جمعیت‌های مختلف شته جالیز *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) نسبت به دو حشره‌کش اسپیروتترامات و فلونیکامید

مجید محمد نژاد هاوستین[۱] ؛ قدرت اله صباحی[۲*]

۱-دانشجوی دکتری،گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- دانشیار ،گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۰۷- تاریخ پذیرش:۹۹/۰۹/۳۰)

چکیده

شته جالیز *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) یکی از مهم‌ترین آفات خیار است که مقاومت آن در برابر حشره کش‌ها باعث ایجاد مشکلات بسیاری در کنترل آن شده است. جمع آوری داده‌های اساسی با استفاده از روش زیست سنجی و بیوشیمیایی برای مدیریت مقاومت در برابر آفات ضروری است. در این مطالعه ، حساسیت آفت به حشره کش‌های اسپیروتترامات و فلونیکامید برای دو جمعیت جمع آوری شده از کرج (استان البرز) و بیرجند (استان خراسان جنوبی)، ایران مورد بررسی قرار گرفت. آزمون‌های زیست سنجی به روش غوطه وری دیسک برگ انجام شد. مرگ و میر پس از ۷۲ ساعت ثبت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار Polo-Plus انجام شد. نتایج نشان داد که در جمعیت کرج و بیرجند، مقدار غلظت کشنده ۵۰درصد برای اسپیروتترامات به ترتیب ۵۲/۸۱ و ۳۳/۳۵ میلی گرم ماده موثره بر لیتر و برای فلونیکامید نیز به ترتیب ۶/۷۸ و ۳/۷ میلی گرم ماده موثره بر لیتر بود. مقادیر نسبت LC_{50} برای اسپیروتترامات و فلونیکامید برای این جمعیت‌ها به ترتیب ۱/۶۳۳ و ۱/۸۲۹بود که بطور معنی داری متفاوت بودند. همچنین نتایج آزمایشات بیوشیمیایی مقاومت بالاتری را در جمعیت کرج نشان داد. آنزیم‌های مختلف درگیر در مقاومت شامل کربوکسیل استراز (ارزیابی شده توسط آلفا نفتیل استات و بتا نفتیل استات)، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و مونواکسیژناز است. نسبت فعالیت آنزیم‌های فوق الذکر در جمعیت کرج به ترتیب ۱/۳۹ ، ۱/۲۹ ، ۱/۵۱ و ۱/۰۶ برابر بیشتر از جمعیت بیرجند بود. نتایج آنزیمی موازی با نتایج بدست آمده از آزمون‌های زیست سنجی بود. بنابراین، به نظر می‌رسد که هر سه سیستم آنزیمی در سم زدایی ترکیبات آزمایش شده نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: شته جالیز؛ مقاومت، آنزیم‌های سم زدا، سم زدایی متابولیکی

Enzymatic susceptibility evaluation of different populations of melon aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) to two insecticides: spirotetramat and flonicamid

Majid Mohammad Nejad Havestin[1], Qodratollah Sabahi[2*]
1-Ph.D. Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Recourses, University of Tehran, Karaj, Iran 2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Recourses, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: September 28, 2020 - Accepted: December 20, 2020)

ABSTRACT

Aphis gossypii Glover (Hemiptera: Aphididae) is one of the most important pests of cucumber and its resistance to insecticides has caused many problems in controlling measures. Collecting fundamental data by using bioassay and biochemical tests is essential for pest resistance management. In this study, the susceptibility of the pest to the insecticides; spirotetramat and flonicamid was investigated for two populations collected from Karaj (Alborz Province) and Birjand (South Khorasan Province), Iran. Bioassay tests were conducted by leaf disk immersion method. Mortality was recorded after 72 hours. The data analysis was performed by Polo-Plus software. Results showed that in Karaj and Birjand populations, the LC_{50} values for spirotetramat were 52.81 and 33.35 mg. a.i /L, respectively, and for flonicamid were 6.78 and 3.7 mg. a.i/L, respectively. The LC_{50} Ratio values for spirotetramat and flonicamid were 1.633 and 1.829 for those populations, respectively which were significantly different. Also results of biochemical tests showed higher resistance in Karaj population. Different enzymes involved in resistance include carboxyl esterase (evaluated by α-naphthyl acetate and ß-naphthyl acetate substrate), glutathione S-transferase and monooxygenase. The activity ratios of above-mentioned enzymes in Karaj population were 1.39، 1.29، 1.51 and 1.06 times higher than those in Birjand population, respectively. The enzymatic results were parallel with the results obtained from the bioassay tests. Therefore, it seems that all three enzymatic systems are involved in detoxifying of the tested compounds.

Key words: Melon aphid، Resistance، Detoxifying enzymes، Metabolic detoxification.

* Corresponding author E-mail: qodratsabahi@gmail.com

مقدمه

شته جالیز *Aphis gossypii* Glover از آفات مهم اقتصادی در گیاه خیار به شمار می‌رود. این حشره از طریق تغذیه از شیره گیاهی، موجب خسارت مستقیم به محصولات کشاورزی می‌شود. همچنین از طریق انتقال بسیاری از بیماری‌های ویروسی در مناطق تحت کشت موجب خسارت جدی به گیاه میزبان می‌شود (Gong *et al.*, 2016). به طور کلی شته‌ها دارای ظرفیت بالای تولید مثلی برای افزایش جمعیت خود هستند و با ترشح عسلک باعث کاهش فتوسنتز گیاه شده و موجب پژمردگی و مرگ گیاه می‌شوند. مجموعه این عوامل موجب کاهش تولید در مزرعه و کاهش کیفیت محصول می‌شود (Eid *et al.*, 2018). حشره‌کش ها در کشاورزی برای کنترل آفات و ناقلین بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند. حشره‌کش‌هایی مانند نئونیکوتینوئیدها، پایروتیروئیدها و فسفره‌های آلی بعنوان عوامل اولیه کنترل آفات متعدد به کار می‌روند. این استفاده بیش از حد از حشره‌کش‌ها موجب ایجاد مقاومت به حشره‌کش‌ها در آفات می‌شود. مطالعات قبلی بیش از ۵۰۰ گونه حشره دارای مقاومت به حشره‌کش‌ها را نشان داده است. آفات متعددی مانند کرم ذرت و دیگر گونه‌های هدف محصولات کشاورزی مانند توتون، پنبه و غیره مقاومت به ترکیبات حشره‌کش جدید را نشان داده‌اند (Khan *et al.*, 2020). بنابراین ارائه حشره‌کش‌هایی با نحوه تاثیر متفاوت برای کنترل شته‌ها در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات ضروری است (Gong *et al.*, 2016).

برای کنترل شته در ایران حشره‌کش‌های متعددی توسط سازمان حفظ نباتات توصیه شده است که بطور اختصاصی برای شته ها به کار می‌روند. همچنین ترکیبات دیگری نیز بر علیه این آفت یا بطور همزمان بر علیه سایر آفات مکنده مانند سفید بالک ها و یا تریپس‌ها و کنه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد که با توجه به طیف گسترده اثر می‌تواند باعث بروز انواع مقاومت در این آفت شود. اسپیروتترامات یک حشره‌کش جدید با قابلیت حرکت دوسویه در درون آوندهای آبکشی و چوبی است. این حشره‌کش از گروه تترونیک اسیدها است که در گروه ۲۳ حشره‌کش‌ها توسط (IRAC) (Insecticides Resistance Action Committee) قرار گرفته است و دیگر ترکیبات این گروه شامل اسپیرومسیفن و اسپیرودایکلوفن هستند که هر دو بعنوان بازدارنده بیوسنتز لیپید عمل می‌کنند و موجب کاهش باروری و زادآوری در هنگام تغذیه بوسیله مراحل نابالغ حشرات مکنده مانند شته‌ها، پسیل ها، شپشک‌ها، مینوزهای برگی، تریپس‌ها، شپشک‌های آردآلود و سفیدبالک‌ها می‌شوند (Gong *et al.*, 2016). فلونیکامید که به گروه پیریدین کربوکسامید تعلق دارد، گروهی از حشره‌کش‌های شیمیایی است که برای کنترل شته‌های مقاوم به سایر حشره‌کش‌ها به کار می‌رود. سازوکار اصلی حشره‌کشی فلونیکامید گرسنگی ناشی از بازدارندگی نفوذ استایلت به درون بافت‌های گیاهی است (Morita *et al.*, 2007). این حشره‌کش توسط (IRAC) در گروه ۲۹ بعنوان تنظیم کننده اندام‌های کوردوتونال (گیرنده‌های مکانیکی زیر کوتیکولی) قرار داده شده است و دیگر عضو این گروه پی‌متروزین است که هر دو به نحوی از تغذیه شته‌ها جلوگیری می‌کنند ولی برای فلونیکامید تاکنون مکانسیم تاثیر معینی مشخص نشده است (Taylor-Wells *et al.*, 2018). مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی در مقاومت حشرات به حشره‌کش‌ها نقش دارند که مهم‌ترین آنها می‌تواند مقاومت به محل هدف و مقاومت متابولیکی باشد (Khan *et al.*, 2020). در مقاومت مربوط به جایگاه تاثیر (محل هدف) جایگاه اتصال حشره‌کش تغیر یافته یا از بین می‌رود و سرعت عمل جایگاه تاثیر برای فعال شدن کاهش می‌یابد (Bass *et al.*, 2011). اما یکی از مهم‌ترین مکانسیم‌های درگیر در مقاومت حشرات، مقاومت متابولیکی است که مربوط به دخالت آنزیم‌های سم‌زدایی حشرات در مقاومت به حشره کش‌ها است (Rane *et al.*, 2016). مقاومت متابولیکی به آنزیم‌های مختلفی مانند مونواکسیژنازها (مانند سیتوکرم P_{450} و ترانسفرازها مانند گلوتاتیون اس-ترانسفراز و هیدرولازها مانند استرازها بستگی دارد. اهمیت این آنزیم‌ها ترکیبات ناگوارد را به ترکیبات غیر سمی تبدیل می‌کنند. دو مرحله برای اینکار وجود دارد: فاز اولیه شامل

هیدرولیز و یا اکسیداسیون و فاز دوم که در برگیرنده اتصال (مزدوج شدن) با ترکیبات فاز یک است (Berenbaum *et al.*, 2015).

استراز گروه بزرگی از آنزیم‌های متابولیکی مرحله اول است که دارای توانایی متابولیزه کردن انواع سوبستراهای داخلی و خارجی را دارد. استرازهایی مانند E4وFE4 بصورت انبوه در پاسخ به برخی گروه-های حشره‌کش‌ها تولید شده و بوسیله تجزیه باند استری پایروتیروئیدها، فسفره‌های آلی، کاربامات‌ها و نئونیکوتینوئیدها قبل از رسیدن به جایگاه هدف، موجب ایجاد مقاومت به حشره‌کش‌ها می‌شوند (Zhu *et al.*, 2015). بیان بیش از حد استراز ناشی از افزایش ژن، تنظیم بالا و یا ترکیبی از هردو است. تولید بیش از حد کربوکسیل استراز در شته سبز هلو مشاهده شده است. E4 وFE4 به ترتیب بوسیله ژن-های E4(19kb)وFE4(5kb) تولید می‌شوند (Khan *et al.*, 2020).

سیتوکروم‌ها آنزیم‌های واحدی هستند که تاثیر معنی‌داری در شکسته شدن ترکیبات خارجی و داخلی، ترکیبات شیمیایی سرطان زا و حشره‌کش‌ها مانند نئونیکوتینوئیدها و فسفره‌های آلی دارند. این آنزیم‌ها توانایی کاتالیز واکنش‌های مختلفی مانند ان-دی آلکیلاسیون، اپوکسیداسیون، هیدورکسیلاسیون و یا او- دآلکیلاسیون را دارند. P_{450} نقش قابل توجهی در برهمکنش بین گیاه میزبان و متابولیسم حشره‌کش-های مختلف دارد (Alptekin *et al.*, 2016). تولید بیش از حد آنزیم‌های مونواکسیژناز در پاسخ به حشره-کش‌های نئونیکوتینوئیدی و ایجاد مقاومت متابولیکی در آفات اتفاق می‌افتد. مقاومت در شته‌ها بطور اولیه با تکرار متعدد ژن سیتوکروم P_{450}(CYP6CY3) ارتباط دارد. شته‌های مقاوم ۱۸ رونوشت از این ژن را دارند درحالی که حشرات حساس فقط دو رونوشت دارند. این ژن مقاومت را ۲۲ برابر در حشرات مقاوم شته افزایش می‌دهد (Khan *et al.*, 2020).

گلوتایتون اس- ترانسفراز بعنوان پیوند شناخته می‌شود و بطور وسیع در کاتالیز کردن بوسیله مزدوج شدن با فرم‌های کوچک گلوتاتیون با سوبستراهای خارجی وارد می‌شود که بطور عمده برای فرآیندهای غیر سمی کردن استفاده می‌شوند. نقش اصلی آنزیم گلوتاتیون غیر سمی کردن ترکیبات گوناگون مانند ترکیبات ناگوارد خارجی و داخلی است. همچنین این آنزیم‌ها در نقل و انتقال‌های درون سلولی، حفاظت در برابر استرس‌های اکسیداتیو و بیوسنتز هورمون‌ها نیز دخیل هستند (Khan et al., 2020). گلوتاتیون اس ترانسفرازهای میتوکندریایی بعنوان کاپا گلوتاتیون اس ترانسفراز نیز شناخته می‌شوند. این گروه در همه جا وجود دارند ولی در آفات مشاهده نشده اند (Board *et al.*, 2013). این آنزیم در کلنی‌های مقاوم به حشره کش مگس خانگی به طور بیش از حد تولید می‌شود. از اینرو بیان بیش از حد این آنزیم با مقاومت به نئونیکوتینوئیدها ارتباط دارد. ۴۰ ژن گلوتاتیون در مگس دروزوفیلا شناسایی شده است و بیان بیش از حد این ژن‌ها موجب مقاومت به د.د.ت شده است (Gonzalez *et al.*, 2018).

در بررسی که توسط Almasi *et al.* (2016) انجام شد، نشان دادند که با افزایش سن پورگی شته جالیز میزان سمیت حشره‌کش‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. همچنین بیان کردند که با گذشت زمان تغییر معنی‌داری در میزان مرگ و میر شته در اثر ترکیبات یاد شده صورت نمی‌گیرد. در مطالعه Emami *et al.* (2015) غلظت کشنده ۵۰ درصد اسپیروتترامات بر روی شته سیاه باقلا را بعد از ۲۴ ساعت ۰/۷ میلی گرم بر لیتر گزارش نمودند. Emami *et al.* (2019) در بررسی اثر اسپیروتترامات بر روی شته سبز هلو میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد را بعد از ۲۴ ساعت ۰/۸۵ میلی گرم بر لیتر گزارش نمودند. بدلیل نحوه تاثیر کاملا متفاوت فلونیکامید نسبت به سایر ترکیبات حشره‌کشی تاکنون مقاومتی برای این حشره‌کش گزارش نشده است و همچنین مکانیسم-های مولکولی رایج مقاومت با سایر حشره‌کش‌ها در مورد این حشره‌کش ذکر نشده است.(Margaritopoulos *et al.*, 2020) در بررسی‌های انجام شده تاکنون مواردی از مقاومت در شته جالیز نسبت به اسپیروتترامات گزارش نشده است ولی در مورد

سایر آفات مانند کنه‌های جنس *Tetranychus* و *Panonychus* و همچنین سفیدبالک‌گلخانه (*Trialeurodes vaporariorum*) مواردی از مقاومت نسبت به این حشره‌کش گزارش شده است (Margaritopoulos *et al*., 2020). در بررسی-های صورت گرفته مهم‌ترین آنزیم‌های موثر در مقاومت نسبت به اسپیروتترامات را افزایش بیان ژن-های سیتوکرومP_{450} (Pan *et al*., 2018) و ژن های کربوکسیل استرازی عنوان کرده اند (Gong *et al*., 2016). بیان بیش از حد استیل کوآ کربوکسیلاز(ACC) موجب بروز مقاومت مربوط به محل هدف نسبت به اسپیروتترامات و اس- انول در شته جالیز می‌شود (Pan *et al*., 2017). سم زدایی اکسیداتیو افزایش یافته وابسته به افزایش بیان P450 نقش مهمی را در مقاومت شته جالیز به اسپیروتترامات دارد (Pan *et al*., 2018). یوریدین دی فسفات گلوکوزیل ترانسفراز یکی از آنزیم های اصلی فاز دوم غیر سمی کردن ترکیبات ناگوارد داخلی و خارجی می باشد که از طریق گلیکوزیله کردن ترکیبات با قندها آنها را تبدیل به ترکیبات آبدوست می کند که به راحتی میتوانند از بدن دفع شوند و یکی از مکانیسم های غیر سمی کردن ویژه به حساب می آید (Bock, 2016). در بررسی‌های انجام شده توسط Pan *et al*. (2020)، نشان داده شد که استفاده از دو بازدارنده یوریدین دی فسفات گلیکوزیل ترانسفراز(UGTs) می‌تواند بطور معنی داری موجب افزایش سمت اسپیروتترامات برای پوره های سن ۳ شته جالیز مقاوم شود و این نشان دهنده آن است که UGTs در مقاومت به اسپیروتترامات در شته جالیز نقش دارد.

هدف مطالعه حاضر بررسی حساسیت دو جمعیت کرج و بیرجند شته جالیز در برابر ترکیبات حشره‌کش اسپیروتترامات و فلونیکامید بود که از طریق آزمون-های زیست سنجی و همچنین تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در دو جمعیت مورد مطالعه و بررسی نقش این آنزیم ها در میزان حساسیت جمعیت ها, صورت گرفت.

مواد و روش ها

پرورش حشرات

نمونه برداری از شته‌ها در شهرستان بیرجند از روی گیاه میزبان خیار در مزرعه و در کرج از گیاه میزبان خیار در گلخانه انجام شد. پرورش حشرات روی گیاهان خیار دردمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در درون اتاقک رشد در گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران صورت گرفت (Gong *et al*., 2016).

حشره کش ها

دو ترکیب حشره‌کش اسپیروتترامات (Movento® EC10%) ساخت شرکت بایر و فلونیکامید (Teppeki® WG50%) ساخت شرکت سینجنتا برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

زیست سنجی

زیست‌سنجی شته به روش غوطه‌وری دیسک برگی در درون غلظت‌های تهیه شده از هریک از حشره‌کش‌ها صورت گرفت (Peng *et al*., 2016). برای دست‌یابی به غلظت‌هایی از فرمولاسیون‌های حشره کش که باعث مرگ‌و میر بین ۱۰ تا ۹۰ درصد در هر یک از جمعیت‌ها شود, آزمون‌های اولیه انجام شد. پنج غلظت از هریک از ترکیبات حشره کش مورد استفاده با استفاده از آب مقطر به‌عنوان حلال تهیه شد. در تیمار شاهد نیز آب مقطر به‌تنهایی استفاده شد. غلظت‌های انتخابی اسپیروتترامات برای جمعیت کرج به ترتیب ۱۰-۱۹/۷-۳۸/۷-۷۶-۱۵۰ و برای جمعیت بیرجند به ترتیب ۵-۱۱-۲۴/۵-۵۴-۱۲۰ میلی گرم ماده موثره در لیتر بود. همچنین غلظت‌های فلونیکامید مورد استفاده برای جمعیت کرج به ترتیب ۱۲-۷/۶-۵-۳-۲ میلی گرم ماده موثره در لیتر و برای جمعیت بیرجند ۸-۴/۷-۲/۸-۱/۷-۱ میلی گرم ماده موثره در لیتر بود. برای انجام آزمایشات زیست سنجی؛ دیسک‌های برگی خیار به مدت ۱۵ ثانیه در هریک از غلظت‌های محلول حشره کش غوطه ور شده و پس از خشک شدن، برگ‌ها در درون پتری دیش حاوی آگار دو درصد قرار گرفت، به‌طوری که سطح پشتی برگ به سمت بالا قرار گیرد. محلول آگار بعد از حل کردن ۲ گرم آگار در ۱۰۰سی سی آب و کمی سرد شدن به درون پتری‌ها

اضافه شده و سپس برگ‌ها بطور وارونه در درون پتری قرار می‌گیرند و رطوبت موجود در آگار باعث می‌شود برگ های خیار حداقل تا ۵ روز سالم بمانند. تعداد ۲۰ شته بالغ به درون هر یک از پتری‌ها منتقل‌شده و سپس درون انکوباتور با شرایط دمایی ۲±۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفت. مشاهدات برای هر دو ترکیب بعد از ۷۲ ساعت ثبت شد و حشراتی که قادر به حرکت نبودند، مرده تلقی شد. آزمایشات در سه تکرار طی روزهای مختلف انجام شد.

در هریک از تکرارها تعداد ۲۰ عدد حشره بالغ ۱-۲ روزه استفاده شد که در مجموع برای هر غلظت با سه تکرار، ۶۰ عدد شته بالغ و برای شاهد نیز ۶۰ عدد شته بالغ استفاده شد.

اندازه گیری آنزیم های سم زدا

برای تهیه محلول آنزیمی با غلظت مناسب جهت کاربرد در آزمایش‌های بیوشیمیایی, ۲۰ عدد حشره بالغ, به‌طور جداگانه در هموژنایزر شیشه‌ای به همراه ۳۰۰ میکرو لیتر از بافر مورد استفاده در مورد هر یک از آنزیم‌های سم‌زدا قرار داده شد. هموژن کردن مکانیکی کل بدن نمونه‌ها به مدت تقریبی ۱۰ دقیقه بر روی یخ انجام گرفت. هموژناتها سپس در دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار به مدت۲۰ دقیقه در دمای ۴درجه سانتی‌گراد و در تعداد دور g ۱۰۰۰۰ قرار گرفتند و رو نشین به‌عنوان عصاره آنزیمی بر روی یخ نگهداری شد (Wang, 2004).

تعیین غلظت پروتئین

پیش از اندازه‌گیری سطوح و فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا غلظت پروتئین موجود در هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین توسط روش بردفورد (1976) با اندکی تغییرات با استفاده ازسرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد، در جذب نوری ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه میکرو پلیت ریدر مدل (ELX808 Bio-Tek) اندازه گیری شد.

سنجش استرازهای عمومی

سنجش فعالیت استرازهای عمومی با استفاده از آلفا و بتا نفتیل استات به عنوان سوبسترا و بافر فسفات سدیم ۰/۰۴ مولار با اسیدیته ۷ به روش Aspern (1962) با اندکی تغییرات انجام گرفت. روش کار به این صورت بود که ۲۰ میکرو لیتر از محلول رو نشین، ۷۰ میکرو لیتر از بافر فسفات سدیم و ۹۰ میکرو لیتر از سوبسترا در چاهک پلیت ریخته و مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از طی زمان انکوباسیون، ۹۰ میکرو لیتر محلول نمک Fast Blue RR به مخلوط واکنش اضافه شد. در نهایت مقدار آلفا نفتول حاصل در ۴۵۰ نانومتر (در مورد سوبسترای آلفا نفتیل استات) و بتا نفتول حاصل در ۵۴۰ نانومتر (در مورد سوبسترای بتا نفتیل استات) در دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت شدند. سنجش استرازهای عمومی به روش مذکور در سه تکرار انجام شد (Wang *et al*., 2004).

سنجش گلوتاتیون اس- ترانسفراز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز با استفاده از سوبسترای ۱-کلرو ۲ و ۴ دی نیتروبنزن (CDNB) و گلوتاتیون کاهش یافته (GSH) و بافر تریس-HCl سرد ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۸ مطابق روش Habig *et al.* (1974) با اندکی تغییرات انجام شد. حجم ۱۰ میکرو لیتر از قسمت رو نشین و ۲۰۰ میکرو لیتر محلول (مخلوط ۱۲۵ میکرولیتر CDNB و ۲/۵ میلی لیتر GSH) درون چاهک‌های میکرو پلیت ریخته شد و جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر به‌صورت پیوسته هر یک دقیقه یک‌بار به مدت ۵ دقیقه خوانده شد. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت.

اندازه گیری اکسیداز میکروزومی کل

اندازه‌گیری مقدار مونواکسیژنازهای کل، به روش ارزیابی میزان هم-پراکسیداز کل با استفاده از روش Pragdon *et al.* (1997). که میزان کل پروتئین حاوی آهن را اندازه‌گیری می‌کند، انجام شد.

در مرحله بعد، مقادیر تغییرات جذب (ΔOD)

به‌دست‌آمده با منحنی استاندارد سیتوکروم C خالص‌شده مقایسه گردید. حجم ۲۰ میکرو لیتر آنزیم، ۸۰ میکرو لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۶۲۵ مولار (pH۷/۲)؛ ۲۰۰ میکرو لیتر محلول TMBZ و (۳- '۳ و ۵ و '۵-تترامتیل بنزیدین) و ۲۵ میکرو لیتر ۳ درصد (H2O2) به چاهک‌های میکروپلیت منتقل گردید و پس از دو ساعت نگهداری در تاریکی در دمای اتاق، جذب نوری مخلوط واکنش در ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار Polo- Plus و نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۲ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Polo-plus صورت گرفت. درآنالیزهای آماری از طرح کاملا تصادفی استفاده شد و در داده های بیوشیمیایی برای مقایسه جمعیت ها از آزمون تی – استیودنت (T-test) استفاده شد.

نتایج

۱- اسپیروتترامات

زیست سنجی شته جالیز با حشره کش اسپیروتترامات در دو جمعیت کرج و بیرجند به روش غوطه‌وری دیسک برگی نشان داد که میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) اسپیروتترامات و غلظت زیرکشنده ۳۰ درصد (LC_{30}) بعد از ۷۲ ساعت به ترتیب ۵۲/۸۱۵ و ۲۵/۶۷۳ برای جمعیت کرج و ۳۲/۳۵۰ و ۱۵/۰۴۹ میلی گرم ماده موثره بر لیتر برای جمعیت بیرجند بدست آمد (جدول۱). مقایسه نتایج زیست‌سنجی غلظت کشنده ۵۰ درصد اسپیروتترامات در دو جمعیت کرج و بیرجند با استفاده از (LC_{50} Ratio) نشان داد که با میزان ۱/۶۳۳ :LC_{50} Ratio دو جمعیت با حدود اطمینان ۹۵ درصد و حد بالا و پایین (۲/۲۵۹-۱/۱۸۰) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند (جدول۱). با مقایسه نمودارهای دز-پاسخ هریک از جمعیت‌های مورد مطالعه، فرضیه مساوی بودن غلظت کشنده ۵۰ درصد در ($P<0/05$ و $X^2=11.36$ و df=2 Tail probability=0.003) رد شد. ولی فرضیه موازی بودن خط دز- پاسخ ۵۰ درصد در ($P> 0/05$ و$X^2=1.63$ و df=1 وTail probability=0.202) رد نشد (منحنی ۱).

جدول ۱- نتایج زیست سنجی دو ترکیب حشره کش در دوجمعیت کرج و بیرجند شته جالیز. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین غلظت کشنده است.

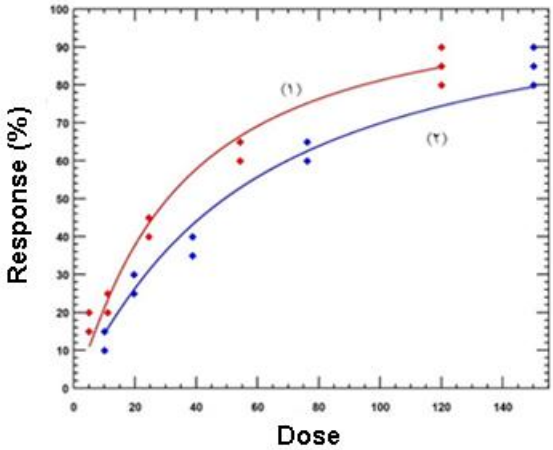
Table1- Bioassay results of two insecticide for Karaj and Birjand populations of melon aphid. Different letters showed significant difference among lethal concentrations.

Insecticides	Population	Number of insects	LC_{30}(mg.a.i/l)[۱]	LC_{50}(mg.a.i/l)	Slope±SE	X^2	LC_{50} Ratio
Spirotetramat	Karaj	360	25.67 (21.58-35.6)	52.815[a] (43.02-65.53)	1.977±0.247	13.31(13)	1.633
Spirotetramat	Birjand	360	15.049 (10.65-19.56)	32.35[b] (25.29-41.88)	1.578±0.195	2.884(13)	
Flonicamid	Karaj	360	4.421 (3.49-5.21)	6.782[a] (5.8-8.05)	2.822±0.434	5.998(13)	1.829
Flonicamid	Birjand	360	2.355 (1.89-2.77)	3.707[b] (3.17-4.36)	2.661±0.337	8.105(13)	

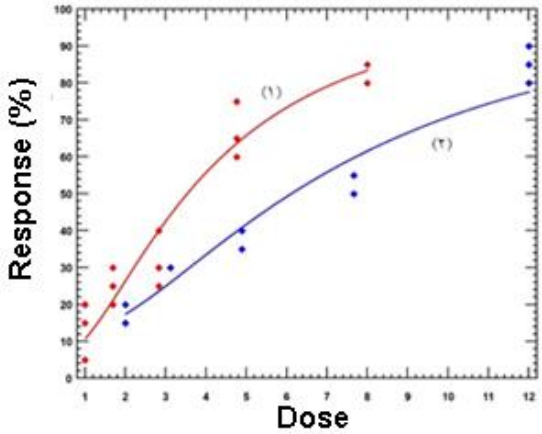
۲- فلونیکامید

میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) و غلظت زیر کشنده ۳۰ درصد (LC_{30}) فلونیکامید بعد از ۷۲ ساعت به ترتیب ۶/۷۸۲ و۴/۴۲۱ میلی گرم ماده موثره بر لیتر برای جمعیت کرج و ۳/۷۰۷ و۲/۳۵۵ میلی گرم ماده موثره بر لیتر برای جمعیت بیرجند بود (جدول ۱). نسبت غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50} Ratio) برای فلونیکامید در دو جمعیت کرج و بیرجند ۱/۸۲۹ محاسبه شد که با حدود اطمینان ۹۵ درصد و حد بالا و پایین (۲/۲۸۸-۱/۴۶۳) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر

نشان دادند (جدول۱). با بررسی منحنی های دز-پاسخ هریک از جمعیت ها، فرضیه مساوی بودن غلظت کشنده ۵۰ درصد در ($P<0/05$ و$X^2= 26.7$و df=2 و Tail probability 0/000) رد شد. ولی فرضیه موازی بودن خط دز- پاسخ ۵۰ درصد$P> 0/05$ و $X^2= 0/09$ و df=1 و Tail probability 0/768) رد نشد (منحنی ۲).



شکل۱- منحنی دز-پاسخ نسبت به اسپیروتترامات در دو جمعیت بیرجند(۱) و کرج (۲)
Figure.1- Dose-response curve of spirotetramat in two populations. Birjand (1) and Karaj (2)



شکل۲- منحنی دز-پاسخ نسبت به فلونیکامید در دو جمعیت بیرجند(۱) و کرج (۲)
Figure 2- Dose-response curve of flonicamid in two population. Birjand (1) and Karaj (2)

فعالیت آنزیم های مونواکسیژناز

میزان فعالیت آنزیم‌های مونواکسیژناز در دو جمعیت کرج و بیرجند که به روش Pragdon *et al*., (1997) ارزیابی‌گردید. میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت کرج برابر با ۰/۰۳۳۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین و درجمعیت بیر جند ۰/۰۳۲۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود. نرخ فعالیت ویژه این آنزیم در جمعیت کرج ۱/۰۶ برابر بیشتر از جمعیت بیرجند بود که نشان دهنده میزان بالای آنزیم در جمعیت کرج و در نتیجه مقاومت بیشتر این جمعیت نسبت به جمعیت بیرجند بود (جدول ۲).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس – ترانسفراز

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس – ترانسفراز به Habig *et al*., (1974) با اندکی تغییرات صورت

گرفت. میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت‌های کرج و بیرجند به ترتیب ۰/۰۶۷ و ۰/۰۴۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بدست آمد. طبق نتایج به‌دست‌آمده نرخ فعالیت این آنزیم در جمعیت کرج ۱/۵۱ برابر بیشتر از جمعیت بیرجند بود ($P\leq0.01$. t= 2 df=4) که نشان دهنده بالا بودن این آنزیم در جمعیت کرج نسبت به جمعیت بیرجند و در نتیجه افزایش مقاومت نسبت به سموم در این جمعیت نسبت به جمعیت بیرجند بود (جدول ۲).

بررسی فعالیت آنزیم کربوکسیل استراز

فعالیت استرازی جمعیت‌های مختلف شته جالیز با استفاده از سوبستراهای آلفا نفتیل استات و بتا نفتیل استات مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم های استرازی در جمعیت کرج با دو سوبسترای آلفا نفتیل استات و بتا نفتیل استات به ترتیب ۰/۰۱۵۴ و ۰/۰۲۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین و برای جمعیت بیرجند به ترتیب ۰/۰۱۱ و ۰/۰۱۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود . نتایج به دست آمده نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کربوکسیل استراز در جمعیت کرج در حضور سوبسترای آلفا نفتیل استات ($p\leq0.01$ t= 5 و df=4) و بتا نفتیل استات ($p\leq0.01$ ؛ t=2 و df=4) به ترتیب ۱/۳۹ و۱/۲۹ برابر بیشتر از جمعیت بیرجند بود که نشان دهنده میزان بالای فعالیت این آنزیم در جمعیت کرج و مقاومت بیشتر این جمعیت نسبت به جمعیت بیرجند است (جدول ۲).

جدول ۲- میزان فعالیت آنزیم‌های سم زدا در دو جمعیت کرج و بیرجند

Table2- Specicific activity rate of detoxifying enzemies in Karaj and Birjan populations

Enzyme	Substrate	Karaj Population Specific activity±SE	Birjand Population Specific activity±SE	Specific activity ratio Karaj/Birjand[e]
Carboxyl esterase	α-Naphtyl acetate [1]	0.0154±0.0002b	0.0110±0.00069a	**1.395**
	B-Naphtyl acetate[2]	0.023±0.00063b	0.018±0.0025a	**1.29**
Glutation S-transferase	CDNB[3]	0.067±0.0003b	0.044±0.0056a	**1.51**
Monooxygenase	TMBZ[4]	0.0334±0.0064b	0.0322±0.0014a	**1.066**

a حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در سطح ۱درصد است

۱- فعالیت هیدرولیزی آلفا نفتیل و بتا نفتیل استات بر حسب (nmol/mg/mg protein)

۲-فعالیت اتصال گلوتاتیون با سوبسترایCDNB برحسب(µmol/min/mg protein)

۳-فعالیت او-دمتیلاسیون TMBZ بوسیله MFO برحسب (p/mol/min/mg proteins)

۴-نسبت فعالیت آنزیمی در جمعیت کرج نسبت به جمعیت بیرجند

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر برای اولین بار اثر دو حشره‌کش اسپیروتترامات و فلونیکامید که به ترتیب به گروه های تترونیک اسید و پریدین کربوکسامید تعلق دارند، بر روی شته جالیز در ایران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از زیست سنجی حاکی از وجود تفاوت معنی دار در میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد برای ترکیب فلونیکامید و اسپیروتترامات در بین دو جمعیت کرج و بیرجند بود.

میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) برای ترکیب اسپیروتترامات در جمعیت کرج و بیرجند به ترتیب ۵۲/۸۱ و ۳۳/۳۵ میلی گرم ماده موثره بر لیتر و برای ترکیب فلونیکامید نیز به ترتیب ۶/۷۸ و ۳/۷ میلی گرم ماده موثره بر لیتر بدست آمد. Gong *et al.* (2016) دربررسی‌های خود نشان دادند که بیشترین تاثیر اسپیروتترامات بعد از روز چهارم سمپاشی اتفاق می‌افتد و تاثیر بسیار آرامی دارد ولی بیشترین تاثیر را بر روی مراحل نابالغ دارد و موجب مرگ و میر مراحل نابالغ شته‌ها و سفید بالک‌ها ۲ الی ۱۰ روز بعد از سمپاشی می‌شود و حساسیت مراحل نابالغ بیشتر از مراحل بالغ شته‌ها است. Bruck *et al.* (2009) عنوان کردند که سرعت عمل اسپیروتترامات بستگی به مرحله زیستی حشره هدف و برخی عوامل خارجی دارد و مراحل پوره‌گی حشرات مکنده ۲ الی ۵ روز بعد

از تیمار کردن از بین می‌روند. حشره‌کش فلونیکامید نیز با نحوه تاثیر کاملا متفاوت که بازدارنده تغذیه حشره است و موجب مرگ حشره بدلیل عدم تغذیه و گرسنگی می‌شود در حدود نیم ساعت بعد از تیمار کردن بر روی حشرات مکنده تاثیر می‌گذارد. Chen *et al.* (2018) نشان دادند که در روش دیسک برگی فلونیکامید نمی‌تواند به خوبی سفید بالک را کنترل کند در حالی که استفاده از روش‌های زیست سنجی قفس طولانی مدت با حشرات کامل سفید بالک، مرگ و میر ۹۵ درصد را در طول ۱۰ روز تحت تاثیر قرار گرفتن نسبت به فلونیکامید ایجاد می‌کند. درحالی که این میزان در جمعیت شاهد ۶۰ روز است. همچنین Jiang *et al.* (2020) نشان دادند که روش سمپاشی مورد استفاده از فلونیکامید بر علیه حشره آفت می-تواند بطور معنی داری با همدیگر متفاوت باشد و حتی تاثیرات جانبی آن نیز بر روی دشمنان طبیعی باهم کاملا متفاوت است. بطوریکه استفاده از روش سمپاشی همراه با آبیاری قطره ای تاثیر بهتر و طولانی مدتی نسبت به روش اسپری برگی داشته و به طور قابل توجهی میزان تلفات بر روی دشمنان طبیعی را کاهش می‌دهد.

این امر میتواند دلایل متعددی داشته باشد که میتوان به موارد زیر اشارع کرد: ۱- ویژگی خاص خود فلونیکامید که یک حشره کش سیستمیک است و به راحتی بوسیله ریشه جذب شده و به سایر قسمت‌ها منتقل می‌شود. ۲- تغذیه طبیعی شته‌ها با استفاده از قطعات دهانی که برای پاره کردن بافت گیاهی و مکیدن شیره گیاهی بعنوان غذا آماده شده است. ۳- بطور عمومی برگ های جوان تر و پهن تر میزان انتقال مواد بیشتری دارند و در نتیجه میزان فلونیکامید جذب شده در این برگ ها بیشتر است. ۴- پایداری بیشتر فلونیکامید در درون بافت های گیاهی که باعث کاهش مشکلات مربوط به اسپری برگی مانند آبشویی, تجزیه نوری و تجزیه توسط باکتری‌ها می شود(Farha *et al.*, 2016). همچنین فلونیکامید در روش قطره ای بدلیل عدم اسپری مستقیم بر روی دشمنان طبیعی هیچگونه اثر جانبی بر روی حشرات بالغ کفشدوزک و لارو بالتوری‌ها ندارد (Jiang *et al.*, 2020).

با توجه به موارد ذکر شده دلایل متعددی می‌تواند در نتایج بدست آمده موثر باشد از جمله: ۱- روش زیست سنجی مورد استفاده و مدت زمان تحت تاثیر قرار گرفتن که در پژوهش حاضر از روش دیسک برگی استفاده شد و ثبت نتایج برای هر دو ترکیب بعد از ۷۲ ساعت صورت گرفت که بنا به دلایلی از جمله تلفات بیش از ۲۰ درصد در شاهد ادامه ثبت داده ها امکان پذیر نبود که خود یکی از دلایل متفاوت بودن نتایج با سایر محققین است. ۲- به نظر می‌رسد یکی از عوامل اصلی بروز این اختلاف در دو جمعیت مربوط به سابقه مصرف سموم بر علیه این آفت باشد چرا که جمعیت گلخانه‌ای کرج در گذشته تحت تاثیر سمومی مانند ایمیداکلوپرید و دی کلرووس بوده و سابقه مصرف طولانی مدت سم بر علیه جمعیت مزرعه‌ای بیرجند وجود نداشت و این جمعیت کمتر تحت سمپاشی بود. از دیگر عوامل موثر در بروز این اختلاف با سایر محققین می‌تواند تفاوت در گونه مورد مطالعه و مرحله زیستی مورد آزمایش باشد که در پژوهش حاضر مراحل بالغ حشرات مورد آزمایش قرار گرفت.

همچنین با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی، تفاوت در میزان آنزیم‌های سم‌زدا یکی از عوامل اصلی دخیل در بروز این اختلاف است.

با مقایسه منحنی‌های غلظت-پاسخ هر یک از ترکیبات در جمعیت‌های مورد مطالعه, فرضیه موازی بودن منحنی‌های غلظت-پاسخ ۵۰درصد رد نشد که حاکی از آن است که شیب خطوط رگرسیون اختلاف معنی‌داری باهم ندارند؛ اگرچه عرض از مبدا متفاوتی دارند. از نظر زیست شناسی, شیب خط رگرسیون پروبیت, تغییر در فعالیت بر واحد تغییر در غلظت یا غلظت را برآورد می‌کند. بنابراین باتوجه به شواهدی که توسط Koperman *et al*. (1961) ارائه شده شیب خط رگرسیون کیفیت آنزیم‌های درگیر در سم زدایی را مشخص می‌سازد. بنابراین وقتی خطوط موازی باشند مشخص کننده این است که در جمعیت‌های مورد مطالعه آنزیم ها به لحاظ کیفی یکی هستند اما

به لحاظ کمی یعنی سطوح آنزیم‌های سم زدا متفاوت هستند که باتوجه به نمودار حاصل از تجزیه پروبیت و همچنین نتایج حاصل از فرضیه موازی بودن این موضوع مشخص است و همچنین نتایج حاصل از داده-های بیوشیمیایی نیز این تفاوت کمی را بطور واضح در دو جمعیت نمایان می‌کند و نشان دهنده شباهت سیستم‌های آنزیمی درگیر در غیر سمی کردن ترکیبات مورد استفاده است (Hosseininaveh and ghadamyari, 2013).

آنزیم های سم زدا

درآزمون‌های بیوشیمیایی, بر سنجش آنزیم‌های سم زدا (استرازهای عمومی, گلوتاتیون اس-ترانسفراز ها و سیتوکروم P_{450}) تکیه شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های کربوکسیل استراز با سوبسترای آلفا و بتا نفتیل استات؛ گلوتاتیون اس- ترانسفرازها و P_{450} در جمعیت کرج به ترتیب ۱/۳۹ ، ۱/۲۹، ۱/۵۱ و ۱/۰۶۶برابر بیشتر از جمعیت بیرجند بود و تفاوت معنی داری در میزان فعالیت آنزیم‌های سم زدای بین دوجمعیت وجود داشت.

آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز

در بررسی مقاومت به ایمیداکلوپرید Li *et al*. (2007) میزان فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم شته جالیز شبیه به هم و ۱/۲برابر گزارش کردند. در بررسی آنزیم‌های سم‌زدا در دو استرین حساس و مقاوم شته جالیز به ایمیداکلوپرید؛ نرخ فعالیت گلوتاتیون ۰/۷۳ گزارش شد. (Koo *et al.*, 2014). در بررسی مقاومت شته جالیز به ایمیداکلوپرید در جنوب ایران, میزان فعالیت گلوتاتیون در جمعیت مقاوم شته جالیز نسبت به جمعیت حساس ۱/۴ برابر گزارش شد (Seyedebrahimi *et al*., 2015). در مطالعه پیش رو این میزان در جمعیت کرج نسبت به جمعیت بیرجند ۱/۵۱برابر به دست آمد. آنزیم گلوتلاتیون اس- ترانسفراز جزء آنزیم‌هایی محسوب می‌شود که در مرحله دوم غیر سمی کردن ترکیبات وارد شده به بدن حشرات وارد عمل می‌شود و از طریق برخی فرآیندها مانند مزدوج شدن با متابولیت‌های مرحله اول موجب دفع و یا غیر سمی شدن ترکیبات شیمیایی می‌شود. در بررسی‌های صورت‌گرفته تاکنون نقش آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در غیر سمی کردن ترکیبات مورد مطالعه بیان نشده است و هیچگونه اشاره‌ای به نقش این آنزیم‌ها در بروز مقاومت به این حشره کش‌ها و یا سایر حشره‌کش‌هایی با نحوه عملکرد شبیه به این ترکیبات ارائه نشده است اما بطور کلی این آنزیم‌ها در غیر سمی کردن ترکیبات خارجی نقش دارند و بطور غیر مستقیم در غیر سمی کردن ترکیبات اشاره شده دخیل هستند. در پژوهش حاضر میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت کرج ۱/۵۱ برابر جمعیت بیرجند بودکه تفاوت ایجاد شده می‌تواند ناشی از سابقه در معرض قرار گرفتن نسبت به حشره کش‌هایی مانند ایمیداکلوپرید باشد که سایر محققین اشاره شده در بالا نیز نقش این آنزیم در بروز مقاومت به این ترکیبات را بیان کرده اند.

آنزیم سیتوکروم P_{450} مونواکسیژناز

مقاومت وابسته به مونواکسیژنازها یکی از فراوانترین انواع مقاومت برپایه متابولیسم حشره‌کش‌ها است. میزان بالای بیان ژن‌های P_{450}؛ مکانیسم اصلی افزایش سطح آنزیم در افراد مقاوم است (Pan , 2009). در مطالعات صورت گرفته توسط Pan *et al.* (2018) نشان داده شد که سیتوکروم P_{450} نقش اصلی را در مکانیسم مقاومت به اسپیروتترامات را در شته جالیز دارد و گروه های مختلفی از ژن‌های CYP6C در بروز مقاومت نسبت به این حشره‌کش دخیل هستند. همچنین نشان دادند که پای پرونیل بوتوکساید بعنوان مهارکننده این آنزیم بطور معنی‌داری می‌تواند سمیت اسپیروتترامات را در سویه مقاوم شته جالیز افزایش دهد. همچنین بیان کردند که ژن CYP380C6 در بین ۳۵ ژن مختلف سیتوکروم P_{450} تحت فشار اسپیروتترامات بیش از حد بیان می‌شود و خاموشی این ژن باعث افزایش حساسیت نسبت به اسپیروتترامات می‌شود. در بررسی انجام شده توسط

Peng *et al.* (2016) نشان دادند که بیان بیش از حد CYP6A2 با مقاومت اسپیروتترامات و مقاومت تقاطعی در سویه مقاوم شته جالیز ارتباط دارد. همچنین بیان کردند که پای پرونیل بوتوکساید بطور معنی‌داری می‌تواند موجب افزایش سمیت اسپیروتترامات شود. همچنین بیان کردند که افزایش مقاومت به اسپیروتترامات می‌تواند موجب مقاومت تقاطعی سطح بالا نسبت به آلفا- سایپرمترین و بایفن ترین شود. Koo *et al.* (2014) نرخ فعالیت آنزیم‌های مونواکسیژنازها در دو جمعیت حساس و مقاوم شته جالیز را ۰/۸۶گزارش نمودند. همچنین نرخ فعالیت آنزیم مونواکسیژناز در دو جمعیت شته جالیز توسط Seyedebrahimi *et al.*(2015) ۲/۱ گزارش شده است. در تحقیق حاضر میزان نرخ فعالیت سیتوکروم P_{450} در دو جمعیت شته جالیز؛ در جمعیت کرج ۱/۰۶ برابر بیشتر از جمعیت بیرجند بود. در مطالعات قبلی صورت گرفته توسط سایر محققین نیز افزایش میزان فعالیت آنزیم مونواکسیژناز در شته جالیز را یکی از مکانیسم‌های مقاومت برای شته جالیز نام برده اند و با توجه به بالا بودن میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت کرج، به نظر می‌رسد یکی از اصلی ترین مکانیسم‌های درگیر در بروز این اختلاف در بین دو جمعیت مربوط به تفاوت در میزان آنزیم‌های مونواکسیژناز باشد.

آنزیم کربوکسیل استراز

استرازها یکی دیگر از مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در مقاومت حشرات نسبت به حشره کش‌ها هستند. در بررسی انجام شده توسط Vanpottelberg *et al.* (2009) بیان شده است که افزایش فعالیت استرازی در مقاومت کنه تارتن به اسپیرودایکلوفن موثر است. همچنین Gong *et al.* (2016) عنوان کردند که مکانیسم اصلی درگیر در مقاومت در شته ها وابسته به فعالیت استرازها است آنها با بررسی فعالیت کربوکسیل استراز و همچنین بیان ژن‌کربوکسیل‌استراز در شته‌ها درپاسخ به اسپیروتترامات نشان دادند که فعالیت کربوکسیل‌استراز بطور واضحی افزایش می‌یابد و بیان ژن افزایش می‌یابد. همچنین عنوان کردند که تحمل نسبت به اسپیروتترامات ممکن است با افزایش فعالیت کربوکسیل استراز و تجزیه متابولیکی حشره کش در شته‌ها اتفاق بیفتد. افزایش فعالیت استرازی در برخی مطالعات مربوط به سویه‌های مقاوم به اسپیرودایکلوفن مشاهده شده است (Vanpottelberg *et al.*, 2009). با توجه به شباهت نحوه تاثیر اسپیروتترامات و اسپیرودایکلوفن به نظر می‌رسد مسیر غیر سمی کردن مشابهی داشته باشد و اسپیروتترامات نیز بوسیله آنزیم‌های شبه استرازی غیر سمی شود. همچنین مشاهده شده است که تجزیه زیستی اسپیروتترامات در پستانداران می تواند بوسیله زنجیره ای از گروه کربونات استر به متابولیت اولیه اسپیرو-تترامت- انول بوسیله مزدوج شدن گروه انول- هیدروکسیل با گلوکرونیک اسید و تبدیل به اسپیروتترامات-گلوکرونیک اسید صورت گیرد (Gong *et al.*, 2016). در مطالعه پیش رو میزان فعالت آنزیم کربوکسیل استراز با دو سوبسترای آلفا و بتا نفتیل استات در جمعیت کرج بیشتر از جمعیت بیرجند بود که باعث ایجاد تفاوت در میزان حساسیت نسبت به ترکیبات مورد آزمایش شده بود.

نتیجه گیری کلی

در پژوهش حاضر که میزان حساسیت دو جمعیت مختلف شته جالیز مورد بررسی قرار گرفت، جمعیت کرج نسبت به جمعیت بیرجند در برابر ترکیبات مورد آزمایش مقاوم تر بود که یکی از دلایل این امر سابقه در معرض بودن نسبت به آفتکش‌ها است. بررسی آنزیم‌های سم زدای دخیل در بروز مقاومت حاکی از میزان بالای فعالیت کربوکسیل استرازها، مونواکسیژنازها و گلوتاتیون اس- ترانسفراز در جمعیت کرج در مقایسه با جمعیت بیرجند بود که یکی دیگر از عوامل موثر در مقاومت بیشتر جمعیت کرج نسبت به جمعیت بیرجند بود. با توجه به نحوه اثر ترکیب اسپیروتترامات که بر بیوسنتز بافت چربی تاثیر می-گذارد و باعث اختلال در بیوسنتز چربی و در نتیجه مرگ حشره می‌شود و همچنین بدلیل حرکت دوسویه در درون بافت های گیاهی به مدت زیادی در درون

بافت گیاهی بوده و خاصیت حشره کشی خود را حفظ می کند می‌تواند بعنوان یک جایگزین مناسب برای سموم با نحوه تاثیر مشابه و یا دارای مقاومت تقاطعی نسبت به یکدیگر باشد اما گزارشات اخیر در مورد بروز مقاومت نسبت به این ترکیب استفاده از آن را با احتیاط همراه می‌کند. ترکیب فلونیکامید نیز یک شته‌کش اختصاصی است که اثرات جانبی بسیار کمی بر روی حشرات غیر مکنده مخصوصا عوامل بیولوژیک دارد و به همین دلیل برای کنترل آفات مکنده بدون تحت تاثیر قرار دادن عوامل بیولوژیک می‌تواند در اولویت قرار بگیرد. با توجه به موارد گفته شده بنظر می‌رسد استفاده از ترکیب فلونیکامید در شرایط گلخانه بدلیل اثرات جانبی بسیار کم بر روی عوامل بیولوژیک مناسب باشد. همچنین با توجه به حرکت دوسویه اسپیروتترامات در درون بافت های گیاهی و ماندگاری طولانی مدت در درون بافت‌های گیاهی استفاده از این حشره کش در مزارع بر علیه شته جالیز و سایر آفات مکنده مانند سفید بالک می تواند موثر باشد اما از نظر بعد اقتصادی فلونیکامید بدلیل مقرون به صرفه بودن در اولویت است. برای درک بهتر کارکرد این سموم بر روی شته جالیز و میزان حساسیت جمعیت های مختلف, ادامه مطالعه بر روی جمعیت های کاملا حساس و کاملا مقاوم آفت توصیه می شود.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل طرح پایان نامه کارشناسی ارشد است که در پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و با حمایت مالی دانشگاه تهران صورت گرفته که بدینوسیله تشکر می شود.

REFERENCES

1. Almasi, A; Rasekh, A; Esfandiari, M; Askari, M & Ziaei, M. (2016) Evaluation on toxicity of Imidacloprid and Primicarb insecticides on different developmental stages of melon aphid *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), *Plant Protection*, 39(2). 71-83 pp. (in Farsi)
2. Alptekin, S., Bass, C., Nicholls, C., Paine, M. J., Clark, S. J., Field, L., & Moores, G. D. (2016). Induced thiacloprid insensitivity in honeybees (*Apis mellifera* L.) is associated with up- regulation of detoxification genes. *Insect Molecular Biology*, *25*(2), 171-180.
3. Asperen, K. V. (1962). A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, *8*(4), 401-414.
4. Bass, C., Puinean, A. M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., & Foster, S. P. (2011). Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *Bmc Neuroscience*, *12*(1), 51.
5. Berenbaum, M. R., & Johnson, R. M. (2015). Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, *10*, 51-58.
6. Board, P. G., & Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (bba)-General Subjects*, *1830*(5), 3267-3288.
7. Bock, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal plant arms-race and co-evolution. *Biochemical pharmacology*, *99*, 11-17.
8. Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry*, 72.1-2 (1976): 248-254.
9. Brück, E., Elbert, A., Fischer, R., Krueger, S., Kühnhold, J., Klueken, A. M., ... & Steffens, R. (2009). Movento®, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: biological profile and field performance. *Crop Protection*, *28*(10), 838-844.
10. Chen, J. C., Wang, Z. H., Cao, L. J., Gong, Y. J., Hoffmann, A. A., & Wei, S. J. (2018). Toxicity of seven insecticides to different developmental stages of the whitefly *Bemisia tabaci* MED (Hemiptera: Aleyrodidae) in multiple field populations of China. *Ecotoxicology*, *27*(6), 742-751.
11. Eid, A. E., El-Heneidy, A. H., Hafez, A. A., Shalaby, F. F., & Adly, D. (2018). On the control of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glov.(Hemiptera: Aphididae), on cucumber in greenhouses. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *28*(1), 64.
12. Emami, K and Valizadegan, O. (2015) Evaluation of toxisity of two insecticides Movento and Proteus against adult of *Aphis faba* scop (hom: Aphididae), *4th National Conference on Sustainable Agriculture and Natural Resources*, Tehran, Mehr Arvand Higher Education Institute - Environmental Lovers Extension Group, 6pp. (in Farsi).
13. Emami, K & Karimpour, Y. (2019) Evaluation of toxisity of two insecticides Movento and Proteus against Green peach aphid *Mysus persicae* S. (Hom: Aphididae), *5th International Conference on Agricultural and Environmental Engineering with Sustainable Development Approach*, Shiraz, Center for Strategies for Achieving Sustainable Development, 5pp.(in Farsi).
14. Farha, W., Abd El-Aty, A. M., Rahman, M. M., Shin, H. C., & Shim, J. H. (2016). An overview on common aspects influencing the dissipation pattern of pesticides: a review. *Environmental Monitoring and*

Assessment, *188*(12), 693.
15. Gong, Y., Shi, X., Desneux, N., & Gao, X. (2016). Effects of spirotetramat treatments on fecundity and carboxylesterase expression of *Aphis gossypii* Glover. *Ecotoxicology*, *25*(4), 655-663.
16. Gonzalez, D., Fraichard, S., Grassein, P., Delarue, P., Senet, P., Nicolaï, A., ... & Heydel, J. M. (2018). Characterization of a Drosophila glutathione transferase involved in isothiocyanate detoxification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *95*, 33-43.
17. Habig, William H., Michael J. Pabst, and William B. Jakoby. "Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of Biological Chemistry*, 249.22 (1974).
18. Hosseininaveh, V and Ghadmiari, M. (2013). *Fundamentals and concepts of laboratory methods in biochemistry, physiology and toxicology of insects*. University of Tehran Press. 577pp.
19. Jiang, H., Tian, Y., Yan, W., Chen, J., Zhang, Z., & Xu, H. (2020). Drip chemigation of flonicamid effectively controls cotton aphid (*Aphis gossypii*) and is benign to lady beetle (*Coccinella septempunctata*) and lacewing larva (*Chrysoperla sinica*). *Crop Protection*, *129*, 105039.
20. Khan, S., Uddin, M. N., Rizwan, M., Khan, W., Farooq, M., Shah, A. S., ... & Ali, S. (2020). Mechanism of Insecticide Resistance in Insects/Pests. *Polish Journal of Environmental Studies*, *29*(3).
21. Koo, H. N., An, J. J., Park, S. E., Kim, J. I., & Kim, G. H. (2014). Regional susceptibilities to 12 insecticides of melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and a point mutation associated with imidacloprid resistance. *Crop Protection*, *55*, 91-97.
22. Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, *52*, 231-253.
23. Margaritopoulos, J. T., Kati, A. N., Voudouris, C. C., Skouras, P. J., & Tsitsipis, J. A. (2020). Long-term studies on the evolution of resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to insecticides in Greece. *Bulletin of Entomological Research*, 1-16.
24. Morita, M., Ueda, T., Yoneda, T., Koyanagi, T., & Haga, T. (2007). Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *63*(10), 969-973.
25. Pan, Y., Guo, H., & Gao, X. (2009). Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in Malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *152*(3), 266-270.
26. Pan, Y., Zhu, E., Gao, X., Nauen, R., Xi, J., Peng, T., ... & Shang, Q. (2017). Novel mutations and expression changes of acetyl- coenzyme A carboxylase are associated with spirotetramat resistance in Aphis gossypii Glover. *Insect molecular biology*, *26*(4), 383-391.
27. Pan, Y., Chai, P., Zheng, C., Xu, H., Wu, Y., Gao, X., ... & Shang, Q. (2018). Contribution of cytochrome P_{450} monooxygenase CYP380C6 to spirotetramat resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *148*, 182-189.
28. Pan, Y., Wen, S., Chen, X., Gao, X., Zeng, X., Liu, X., ... & Shang, Q. (2020). UDP-glycosyltransferases contribute to spirotetramat resistance in Aphis gossypii Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104565.
29. Peng, T., Pan, Y., Yang, C., Gao, X., Xi, J., Wu, Y., ... & Shang, Q. (2016). Over-expression of CYP6A2 is associated with spirotetramat resistance and cross-resistance in the resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *126*, 64-69.
30. Rane, R. V., Walsh, T. K., Pearce, S. L., Jermiin, L. S., Gordon, K. H., Richards, S., & Oakeshott, J. G. (2016). Are feeding preferences and insecticide resistance associated with the size of detoxifying enzyme families in insect herbivores?. *Current Opinion in Insect Science*, *13*, 70-76.
31. Seyedebrahimi, S. S., Jahromi, K. T., Imani, S., Naveh, V. H., & Hesami, S. (2016). Resistance to imidacloprid in different field populations of *Aphis gossypii* Glover (Hem.: Aphididae) in South of Iran. *Journal of Entomological and Acarological Research*, *48*(1), 6-10.
32. Shojaei, A., Talebi Jahromi, K., Hosseininaveh, V., & Sabahi, G. (2018). Synergistic Effects of Amitraz on Imidacloprid and Malathion against cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hem: Aphididae). *Journal of Agricultural Science and Technology*, *20*(2), 299-308.
33. Taylor-Wells, J., Gross, A. D., Jiang, S., Demares, F., Clements, J. S., Carlier, P. R., & Bloomquist, J. R. (2018). Toxicity, mode of action, and synergist potential of flonicamid against mosquitoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *151*, 3-9.
34. Van Pottelberge, S., Van Leeuwen, T., Nauen, R., & Tirry, L. (2009). Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bulletin of Entomological Research*, 99(1), 23-31.
35. William, G. B., & Janet, C. (1997). Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *13*(3), 233-237.
36. Wang, J. J., Cheng, W. X., Ding, W., & Zhao, Z. M. (2004). The effect of the insecticide dichlorvos on esterase activity extracted from the psocids, *Liposcelis bostrychophila* and *L. entomophila*. *Journal of Insect Science*, *4*(1).
37. Zhu, Y. C., & Luttrell, R. (2015). Altered gene regulation and potential association with metabolic resistance development to imidacloprid in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Pest Management Science*, *71*(1), 40-57.