بررسی مولکولی مقاومت به سموم پایرتروئیدی درلاروهای مگس خانگی (*Musca Domestica*) در مرغداری‌های تخمگذار شمالغرب ایران

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت مگس خانگی به حشره‌کش‌های پایرتروئیدی با استفاده از آنالیز مولکولی انجام شد. مگس‌ها از مرغداری‌های چهار شهر مختلف آذربایجان غربی جمع‌آوری شدند و برای ارزیابی مقاومت آنها به پایروتروئیدها با استفاده از سنجش زیستی مقاومت به حشره‌کش‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. DNA ژنومی از مگس‌های حساس و مقاوم استخراج شد. در این مطالعه برای تکثیر الل اختصاصی مگس خانگی، از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) استفاده شد که وجود تغییرات آلل ژنتیک در ژن کانال سدیم نوع پارا (*para*) را برای شناسایی جهش از نوع هموزیگوت با حساسیت کامل(*sus/sus*) به نوع هموزیگوت جهش یافته با مقاومت کامل(*kdr/kdr*) یا نوع هتروزیگوت جهش یافته(*kdr/sus*) نشان میدهد. در این مطالعه، این ژنوتیپ‌ها با استفاده از پرایمرهای خاص برای شناسایی این تغییرات ژنتیکی مورد هدف قرار گرفتند. نتایج حاصل از سنجش زیستی مقاومت بالای ۵۰٪ را در همه‌ی جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد که بالاترین میزان مقاومت از مگس‌های خانگی شهرستان ارومیه با فراوانی (۸۶ درصد) گزارش شد. از آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی *kdr* همو یا هتروزیگوت در مگس خانگی به منظور تعیین فراوانی *kdr* استفاده شد وآلل L1014 F در تمام جمعیت مورد آزمایش یافت شد. فراوانی *kdr* در جمعیت‌های مورد مطالعه بالا و از ۳۷ درصد تا ۸۱ درصد متغیر بود. بیشترین درصد (۷۱ درصد) ژنوتیپ هموزیگوت (*kdr/kdr*) در ارومیه و پس از آن تکاب (۶۱ درصد) و کمترین درصد در سردشت (۳۰ درصد) رخ داد. مگس‌ها با ژنوتیپ *kdr/kdr* در تمام جمعیت‌های آزمایش شده شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: *پایرتروئید، حشره‌کش، مقاومت، مگس خانگی.*

مقدمه:

بندپایان مجموعه‌ای گسترده و شگفت‌انگیز از بی‌مهرگان متعددی هستند که بیش از ۸۰ درصد گونه‌های جانوری شناخته شده را شامل می‌شوند و دارای پراکندگی جهانی هستند. دوبالان (*Diptera*) از بزرگترین راسته‌های رده حشرات با بیش از ۱۲۰۰۰۰ گونه شناخته شده می‌باشند (Wall & Shearer, 1997). راسته دو بالان به سه زیر راسته سیکلورافا، براکی‌سرا و نماتوسرا تقسیم می‌شوند. مگس خانگی در زیر راسته سیکلورافا و خانواده موسیده قرار دارد (Tavassoli, 2009). مگس خانگی، *Musca domestica*، یک آفت رایج است که به دلیل نقش آن به عنوان ناقل بیماری در انسان، دام و طیور باید کنترل شود، مگس‌های خانگی به عنوان ناقل‌های مکانیکی پاتوژن‌ها شناخته شده‌اند که باعث ایجاد تعداد زیادی از بیماری‌ها می‌شوند مانند سالمونلوز، فلج اطفال، هپاتیت، اسهال خونی باسیلی، وبا، حصبه، پاراتیفوئید و اسهال خونی آمیبی (Ugbogu *et al*., 2006 ; Greenberg *et al*., 1970). آنها همچنین می‌توانند باعث میاز تصادفی شوند و سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک را منتقل کنند (Macovei & Zurek, 2006; Hemmatinezhad *et al*., 2015, Rahman *et al*., 2015).

در حال حاضر، عمدتا از حشره کش های شیمیایی برای کنترل جمعیت مگس های خانگی در محیط های مختلف در فصل فعالیت آنها استفاده می شود. هر چند استفاده از سموم باعث کاهش جمعیت حشرات می شود اما استفاده پی در پی از ترکیبات شیمیایی باعث ایجاد مقاومت در جمعیت های حشرات و بازگشت جمعیت آنها می شود که این جمعیت های تازه علاوه بر افزایش تعداد، دارای ژن های مقاوم به آفت کش ها نیز هستند. گرچه کنترل کنندگان آفات با انواع مختلفی از شیوه ها و حشره کشهای شیمیایی مانند ترکیبات پایرتروئیدی با مگس ها مبارزه می کنند اما مطالعات نشاندهنده ایجاد مقاومت به پایرتروییدها در مگس های خانگی می باشد (Peck et al., 2014)

حشره‌کش‌های پایرتروئیدی ترکیبی از فعالیت حشره‌کشی بالا با سمیت کم برای پستانداران و پایداری کم محیطی هستند. بنابراین استفاده گسترده از آنها برای کنترل بسیاری از آفات که برای کشاورزی و سلامت انسان مهم هستند، رایج است (Elliott , 1980) . استفاده گسترده جهانی از پایرتروئیدها منجر به ایجاد مقاومت در بسیاری از گونه‌های آفات شده است (Georghiou, 1990). مقاومت در برابر حشره‌کش‌ها یکی از بزرگترین چالش‌ها در کنترل کاربردی آفات است (Metcalf , 1989). بنابراین، درک درستی از مکانیسم‌های مقاومت به حشره‌کش‌ها و شناسایی ژن‌های درگیر برای پایش و مدیریت مقاومت، حیاتی در نظر گرفته می‌شوند (NRC, 1986).

پایرتروئیدها نوروتوکسین‌هایی هستند که در کانال سدیم حساس به ولتاژ (*Vssc*) عمل می‌کنند. دو مکانیسم اصلی مقاومت در برابر حشره‌کش‌های پایرتروئید شامل: جهش درکانال سدیم حساس به ولتاژ (*Vssc*) که منجر به عدم حساسیت محل هدف می‌شود (Shono, 1985; Huang, 2004) و سم‌زدایی با واسطه سیتوکروم P450 مونوکسیژناز(Scott, 1999; scott, 2001). کانال سدیم حساس به ولتاژ نقش مهمی به عنوان یک هدف اولیه برای اثر پایرتروئید در مگس خانگی دارد (Elliott, 1978; Miyazaki, 1978). سه آلل *Vssc* مگس خانگی در مقاومت به پیرتروئیدها نقش دارند: *kdr*، *kdr-his* و *super-kdr*.(Williamson *et al*., 1993; Rinkevich *et al*., 2006). الل *kdr* به دلیل تغییر اسیدآمینه منفرد از لوسین به فنیل آلانین در اسیدآمینه ۱۰۱۴ (L1014F) است. آلل *super-kdr* به دلیل دو جهش M918T (متیونین به ترئونین) + L1014F (Rinkevich *et al*., 2013) و در مواردی که از قبل *kdr* دارند رخ میدهد (Rinkevich, *et al*., 2012b). آلل *kdr-his* به دلیل تغییر اسید آمینه منفرد از لوسین به هیستیدین در اسید آمینه ۱۰۱۴ (L1014 H) است (Liu & Pridgeon, 2002) . هر سه آلل در سطح جهانی یافت می‌شوند، اگرچه فراوانی آلل‌ها بین مکان‌ها به طور چشمگیری متفاوت است (Williamson *et al*., 1993; Rinkevich *et al*., 2006; Rinkevich *et al*., 2012a; Shono *et al*., 2002; Wang *et al*., 2012). نقش این جهش‌ها در مقاومت توسط مطالعات الکتروفیزیولوژیک تایید شده است (Rinkevich *et al*., 2013) سطح حفاظت اعطا شده توسط این آلل‌ها در داخل بدن به ترتیب بالاترین عبارت است از*super-kdr* به دنبال ان *kdr* و کمترین برای *kdr-his* (Rinkevich *et al*., 2006; Farnham *et al*., 1987). اولین جهش در Vssc که برای ایجاد مقاومت پیرتروئیدی (L1014F) یافت شد به عنوان *kdr* شناخته شد(Milani. & Travaglino, 1957). از این رو در مطالعه‌ی پیش رو جهش *kdr* برای بررسی مورد انتخاب قرار گرفت.

روش تشخیصی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تشخیص جایگزینی‌های نوکلئوتیدی ایجادکننده مقاومت در گونه‌های مختلف، از جمله *M. domestica* توسعه یافته است (Williamson *et al*,. 1996a). مطالعه‌ی پیش‌رو با هدف، بررسی میزان فراوانی جهش *kdr* در مگس‌های خانگی مرغداری‌های استان آذربایجان غربی صورت گرفت.

پیشینهٔ پژوهش

کامدار و همکاران در سال ۲۰۱۸، فراوانی جهش *Kdr* را در مگس‌های خانگی جمع‌آوری شده از شمالغرب ایران مورد بررسی قرار دادند که در این مطالعه نمونه های مگس خانگی از پناهگاه‌های انسانی و حیوانی، قصابی‌ها، لبنیاتی‌ها، تره‌بار و زبالهدان‌ها جمع‌آوری شده بودند. بعد از استخراج DNA و انجام فرایند PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، هیچ یک از جهش های رایجی (L1014F و M918T+L1014F) که از پیش گزارش شده بودند، شناسایی نشد. (Kamdar *et al*., 2018) .

در سال ۲۰۱۴ مطالعه مشابهی توسط Al-Deeb در امارات متحده عربیه انجام گرفت که در این مطالعه مگس های خانگی از ۵ مکان مختلف جمع اوری گشتند و بعد از استخراج DNA و انجام فرایند PCR ، حداکثر نرخ(۷۰درصد) ظهور ژنوتیپ هموزیگوت (*kdr/kdr*) مربوط به یکی از جمعیت های مورد مطالعه بود، همچنین قابل به ذکر است در این مطالعه حشرات مقاوم با ژنوتیپ (*kdr/kdr*) در تمامی پنج جمعیت مورد آزمایش، شناسایی شدند(Al-Deeb, 2014).

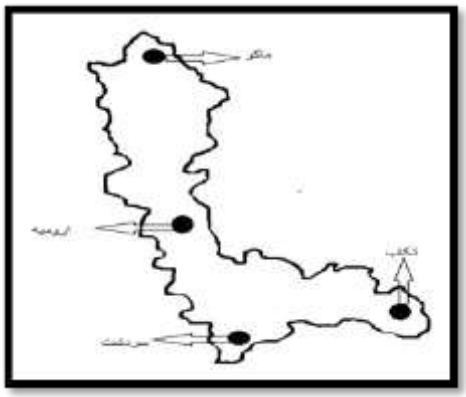
هم چنین Huang و همکاران در سال ۲۰۰۴، فراوانی ژن *Kdr* در مگس خانگی را مورد بررسی قرار دادند. ۱۴ جمعیت مختلف از مگس خانگی که از مزارع دام دانمارکی جمع‌آوری شده بود را مورد آزمایش قرار دادند که نتایج حاکی از حضور آلل L1014 F در تمام جمعیتهای مورد آزمایش بود و فراوانی kdr در جمعیت‌های مورد مطالعه بالا بود و از۴۶ درصد تا ۹۹ درصد متغیر بود (Huang *et al*., 2004) . Alfatlawi و همکاران، در سال ۲۰۱۹ ژنوتیپهای اللی مقاومت پایتروئیدی در مگس‌های خانگی در عراق را مورد مطالعه قرار دادند، ۶۰ مگس خانگی از ۶ منطقه القادسیه عراق جمع آوری شد و بعد از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز نتایج نشاندهنده وجود ژنوتیپ *sus/sus* (حساس) با نرخ فرکانس ۱۰۰درصد در تمامی مگس های مورد مطالعه بود و سایر ژنوتیپ‌ها در هیچ یک از مگس ها دیده نشد (Alfatlawi *et al*., 2019).

برای شناخت بهتر راه های مبارزه و محدود کردن جمعیت مگس ها در تاسیسات دامپروری و مرغداری، باید به خصوص‌یات زی‌ستی، رفتاری و عوامل تاثیر گذار در سلامت و زندگی آنها آگاهی داشت. موسکا دامستیکا مانند دیگر حشرات در طی برخورد های پی در پی با انواع حشره کش ها نشانه هایی از مقاومت از خود بروز داده است. از این رو افزایش دانش نسبت این حشرات و شناخت همه جانبه آنها بویژه ساز و کار های مربوط به ایجاد مقاومت نسبت به سموم می تواند در زمینه مبارزه با آنها یاری بخش باشد

روش شناسی پژوهش

منطقه مورد مطالعه: دراین مطالعه از مرغداری‌های تخمگذار چهار ناحیه جغرافیایی مختلف استان آذربایجان غربی در سال ۱۴۰۱(۲۰۲۳) و در فصل تابستان نمونه‌ها به صورت زنده (تعدادی مگس خانگی بالغ به همراه لارو آنها) جمع‌آوری شده و برای زیست سنجی و تعیین ژنوتیپ به آزمایشگاه انگل شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل گشتند. که این مناطق شامل: شمال استان شهر ماکو (۳۹/۲۸۶۷°شمالی ۴۴/۵۵۸۶°شرقی) (نوع اقلیم: معتدل مایل به سرد و نیمه خشک)، مرکز استان شهر ارومیه (° ۳۷/۳۳۱۹ شمالی، ° ۴۵/۰۴۲۱ شرقی) (نوع اقلیم:مدیترانه‌ای با باران بهاره) جنوب استان شهر سردشت (° ۳۶/۱۵۷۸۵شمالی، ° ۴۷۶۷۷۲ /۴۵) (نوع اقلیم:معتدل مایل به سرد و نیمه مرطوب) و شرق استان شهر تکاب (۴۰۱۵°/ ۳۶شمالی،

°۴۷/۱۱۱۵ شرقی)(نوع اقلیم: رژیم بارانی نیمه بیابانی یا نیمه خشک) . در انتخاب مناطق مورد مطالعه تلاش بر این بود که علاوه بر حضور مرغداری‌های تخمگذار در آنها، از موقعیت جغرافیایی و نوع آب و هوای متفاوت بهره‌مند باشند.



شکل ۱. نقشه استان آذربایجان غربی: موقعیت شهرستان‌های مورد مطالعه

روش جمع‌آوری و نمونه برداری: لاروها همراه با بستر انتقال داده شدند و اطراف آن حفاظ و مقداری ضایعات در بستر قرار داده شد تا لارو ها رشد کنند (Freeman *et al*., 2019) . بالغین مگس خانگی در انسکتاریوم حشره شناسی ۳۰x۳۰ در دمای۲۴–۲۸ در ۱۲: ۱۲ نور/تاریکی و رطوبت ۷۰ درصد پرورش داده شدند. مگس‌های بالغ با محلول شکر ۲/۵ درصد مخلوط با پودر شیر و زرده تخم مرغ تغذیه شدند (Singh & Jerram, 1976). زمانی که تخم گذاری شد تخم ها برداشته شدند و در محفظه ای جداگانه قرار گرفتند و یک رژیم مصنوعی مختص لارو تهیه شد که شامل: پودر شیر کامل (۱۰۰گرم)، مخمر آبجو خشک (۲۵ گرم) آگار (۳۰ گرم) و آب بود (براساس: Singh & Jerram, 1976 با کمی اصلاحات).

روش زیست سنجی:مقاومت لاروهای جمع‌آوری شده مگس خانگی مربوط به مرغداری‌های مرغ تخمگذار از چهار شهر استان با استفاده از کاغذهای واتمن آغشته به حشره کش مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعداد لاروها مورد استفاده برای هر یک از مناطق مورد مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. تعداد لاروهای مورد استفاده برای مناطق مورد مطالعه

منطقه مورد مطالعه	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	مجموع لاروها
ماکو	۶۰	۶۰	۶۰	۱۸۰
ارومیه	۶۰	۶۰	۶۰	۱۸۰
تکاب	۶۰	۶۰	۶۰	۱۸۰
سردشت	۶۰	۶۰	۶۰	۱۸۰

همچنین ۱۸۰ عدد لارو مگس در سه گروه ۶۰ تایی به عنوان گروه کنترل منفی تحت تیمار با آب مقطر استریل جای گرفتند که در مجموع ۹۰۰ عدد لارو مگس خانگی مورد استفاده قرار گرفتند. قبل از انجام آزمایش لاروها به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا مقداری از تحرک آنها کاسته شود. با استفاده از یک پیپت، سطح داخل کاغذ واتمن نمره ۱ (با قطر ۸/۵ سانتی متر) به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از سم سایپرمترین ۱۰ درصد (ppm۱۰۰) قابل خرید از بازار MAC-TOMIL 10%EC®, National) Agrochemical

غیر قابل استناد

Company, Iran) مطابق با دوز توصیه شده توسط شرکت سازنده آغشته گردید. سپس لبه‌های کاغذ واتمن به اندازه ۱۰ میلی متر به طرف داخل تا شده و با استفاده از گیره فلزی به خوبی محکم گردید. در سطح خارجی کاغذ، مشخصات هر گروه یادداشت شده و سپس لاروهای زنده و متحرک در داخل پاکت های تهیه شده قرار گرفتند. در مرحله آخر، پاکت‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۲۷±۱ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۷۰ تا ۹۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (Farooq & Freed, 2016). بعد از ۲۴ ساعت لاروها از لحاظ زنده مانی مورد بررسی قرار گرفتند. مبنای زنده نبودن لاروها، مشاهده عدم تحرک آنها بعد از تحریک به وسیله ی پنس آزمایشگاهی در زیر لوپ بود. لاروها زمانی که هیچ گونه علایم حیاتی نداشتند تحت عنوان لارو «مرده» در نظر گرفته شدند (Shepprad & Hinkle, 1987).

تحلیل آماری: داده های بدست آمده در MS Excel جدول بندی شده و میانگین مرگ و میر در ۳ تکرار محاسبه گشت. سپس با استفاده از فرمول زیر کارایی سم را در هر مرغداری محاسبه شد.(El-Hamid *et al*., 2018)

۱۰۰*میانگین تعدادحشرات زنده در گروه کنترل/ می‌انگی‌ن تعداد حشرات زنده در گروه درمان- می‌انگین تعداد حشرات زنده در گروه کنترل

استخراج DNA: DNA ژنومی لاروهایی که بعد از تاثیر سم زنده ماندند و نیز لاروهایی که تلف شده بودند با استفاده از کیت استخراج DNA (MBST) ، تهران، ایران) براساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. به طور خلاصه، ابتدا لاروها تک به تک داخل یک پلیت با استفاده از اسکالپل به خوبی تکه تکه کرده و مدتی در دمای اتاق قرار گرفتند تا الکل نمونه‌ها زدوده شود و نمونه خشک گردد. سپس با هاون استریل به آرامی کوبیده شدند و به حالت هموژن تبدیل شدند. سپس نمونه‌ها توسط قاشقک استریل به میکروتیوپ‌های استریل ۱,۵ میلی لیتری منتقل شدند. مقدار DNA بدست امده حاصل از استخراج در ۱۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده‌ی موجود در کیت مخلوط گردید و با درج مشخصات کامل روی هر میکروتیوب، جهت انجام PCR و آزمایشات بعدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش انجام PCR : بعد از استخراج DNA، لارو مگس خانگی، برای انجام PCR از کیت PCR شرکت سیناژن (سیناژن، تهران) استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، مواد مورد نیاز، غلظت و مقادیر آنها برای هر نمونه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول۲. مواد مورد نیاز، غلظت و مقادیر آنها برای انجام PCR

نام مواد	بافر xPCR	Mgcl2	dNTP	Tag DNA Polymerase	آب دیونیزه	DNA	پرایمرها
غلظت(پیکومولار)	۱۰	-	۱۰	-	-	-	۱۰
حجم(میکرولیتر)	۲/۵	۲	۰/۵	۰/۵	۱۵/۵	۳	۰/۵

در نهایت مواد به میکروتیوب‌های مخصوص ۰/۲ میکرولیتری ریخته شد. برای هر واکنش یک کنترل منفی در نظر گرفته شد. که شامل تمامی اجزای واکنش به غیر از نمونه DNA بود. سپس میکروتیوب‌ها به مدت۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند تا قطرات محلول از دیواره لوله در ته لوله جمع گردد. برای PCR از دستگاه ترموسایکلر (Quants Biotech, England, QB-96) استفاده شد.

تکثیر آلل اختصاصی مگس خانگی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PASA[1]): جهش آلل-*kdr* برای تعیین حضور جایگزینی اسید آمینه لوسین به جای اسید آمینه فنیل الانین در کانال سدیمی S6 مورد بررسی قرار گرفت (Williamson *et al.*, 1996b). به این منظور، دو آغازگر اختصاصی آلل خارجی (*kdr1 & kdr4*) که فرایند تکثیر مربوط به قطعه خارجی از ژن *kdr* را بر عهده دارند و دو آغازگر اختصاصی آلل داخلی (*kdr3 & kdr2*) که مسئول فرایند تکثیر مربوط به قطعه داخلی از ژن *kdr* هستند،طراحی شدند تا جهش *Kdr* (L1014 F; CTT to TTT) را در مگس خانگی تشخیص دهند، به طوریکه جهش‌های هموزیگوت و هتروزیگوت را می‌توان در یک واکنش PCR منفرد متمایز کرد.

فرایند تکثیر DNA مربوط به قطعه خارجی از ژن *Kdr* با استفاده از پرایمرهای :

*Kdr*1 5′- -AAGGATCGCTTCAAGG-3′

*Kdr*4 5′--TTCACCCAGTTCTTAAAACGAG-3′

و فرایند تکثیر DNA مربوط به قطعه داخلی از ژن *Kdr* با استفاده از پرایمرهای :

*Kdr*2 5′--TCGTGATCGGCAATT-3′

*Kdr*3 5′--GTCAACTTACCACAAG-3′

انجام گردید. اغازگر اختصاصی آلل داخلی *Kdr*2 که به T ختم می‌شود تا با کدون TTT جهش یافته مربوط به آلل مقاومت مطابقت داشته باشد، همچنین آغازگر اختصاصی آلل داخلی *Kdr*3 به یک G ختم میشود تا با کدون CCT مربوط به آلل حساسیت مطابقت داشته باشد. برای این منظور هر واکنش PCR شامل ۴۰ چرخه بود که ابتدا به مدت ۲ دقیقه DNA لارو مگس در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد واسرشت ابتدایی شد و سپس ۴۰ چرخه که شامل مرحله واسرشت سازی ثانویه در۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۴درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط اولیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام پذیرفت. مرحله بسط نهایی جهت تکثیر نهایی در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه نیز صورت گرفت.

sus یا قطعه آللی حساسیت (۲۰۰bp) با استفاده از پرایمرهای *kdr1* و *kdr3* و *kdr* یا قطعه آللی مقاومت (۲۸۰bp) با پرایمرهای *kdr2* و *kdr4* تکثیر شدند. تکثیر قطعه کنترل (۴۸۰bp) نیز با استفاده از پرایمرهای *kdr1* و *kdr4* صورت گرفت.

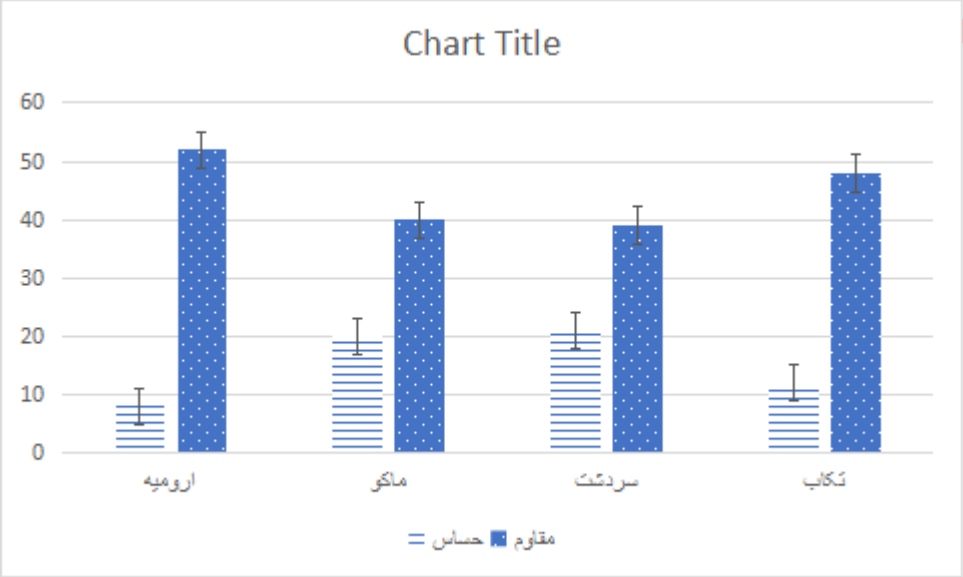
الکتروفورز محصولات PCR :از ژل آگارز با غلظت ۱/۵٪ در الکتروفورز محصول نهایی PCR استفاده شد، به این ترتیب که در چاهک اول نشانگر به میزان ۳ میکرولیتر، چاهک دوم کنترل منفی و در چاهکهای بعدی محصول PCR بارگذاری شد و برای حدود ۷۰ دقیقه با شدت جریان ۱۰۰ ولت بر سانتیمتر الکتروفورز انجام شد. بعد از زمان مذکور، ژل به داخل UV- BTS- 20M, Japan)

[1] PCR Amplification of Specific Alleles

Transilluminator) منتقل شد و باندهای تکثیر شده مشاهده و ثبت گردیدند، که مقایسه با باندهای موجود در نشانگر، اندازه قطعه مورد انتظار در مورد مگس خانگی تخمین زده شد.

یافته‌های پژوهش

سنجش زیستی : شکل شماره ۲ میانگین وضعیت مقاومت و حساسیت لاروهای مگس خانگی جمع‌آوری شده را به تفکیک شهر-های مربوط به نواحی ۴ گانه را نشان می‌دهد (شکل ۲). لازم به ذکر است تمام لاروهای موجود در هر سه گروه کنترل زنده بودند. میزان کارایی سم در هر یک از مناطق مورد مطالعه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.



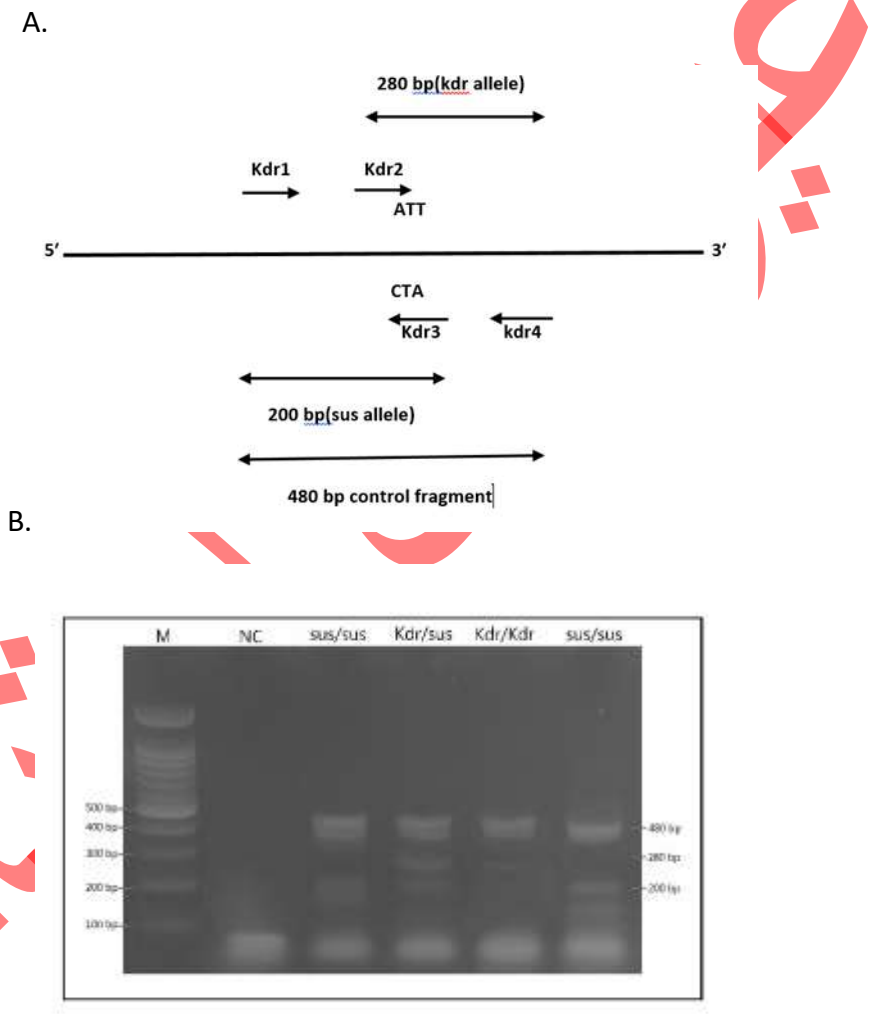
شکل۲. میانگین وضعیت مقاومت و یا حساسیت لارو مگس خانگی مربوط به شهرهای مختلف بعد از در معرض گذاری با سم سایپرمترین ۱۰٪ درصد (ppm۱۰۰)

جدول ۳. میزان کارایی سم(٪) در مرغداری های مناطق مورد مطالعه

منطقه	ارومیه	تکاب	سردشت	ماکو
اثربخشی سم(٪)	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳

آنالیز ملکولی: فراوانی جهش *kdr* L1014 F در چهار جمعیت مگس خانگی که سطوح مختلف مقاومت به پایرتروئید را نشان دادند، تعیین شد. مگس‌ها در سال ۱۴۰۱(2023) برای تعیین وضعیت و توسعه مقاومت به حشره‌کش‌ها در جمعیت مگس‌های خانگی آذربایجان غربی جمع‌آوری شدند. یک تست ساده PCR برای شناسایی *kdr* همو یا هتروزیگوت در مگس خانگی برای تعیین فراوانی *kdr* استفاده شد. بعد از انجام آزمایشات زیست سنجی، DNA ژنومی از مگس‌های خانگی استخراج شد. ۶۰ مگس از هر جمعیت مورد آزمایش قرار گرفتند. الل L1014 F در تمام جمعیت‌های آزمایش شده یافت شد. فراوانی *kdr* در جمعیت‌های مورد مطالعه بالا و از ۳۷ درصد تا ۸۱ درصد متغیر بود. قطعه آللی مربوط به حساسیت (۲۰۰ bp) با پرایمرهای *kdr1* و *kdr3* و قطعه آللی مربوط به

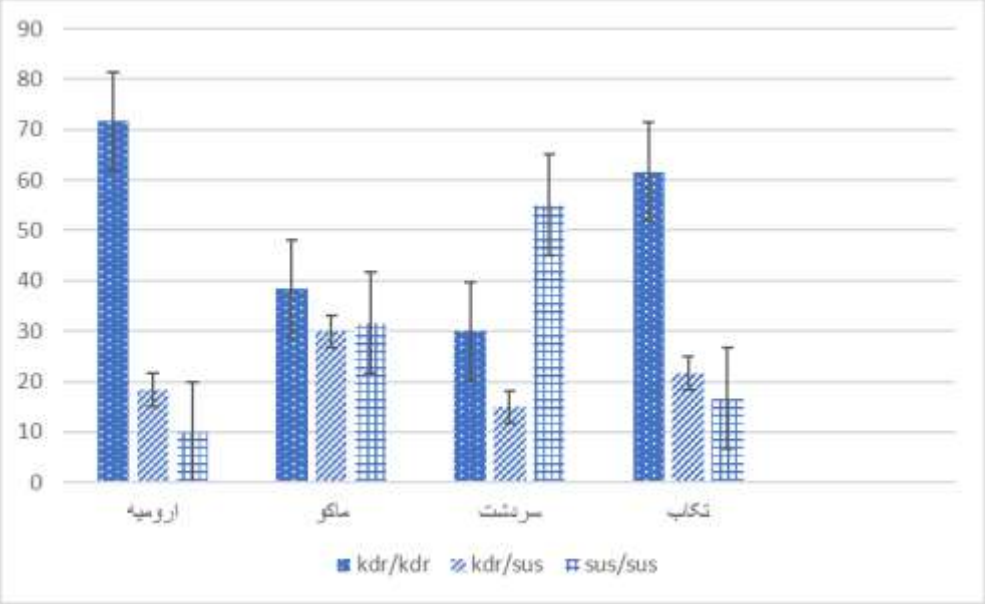
مقاومت (bp ۲۸۰) با پرایمرهای *kdr2* و *kdr4* تکثیر شدند(شکل شماره ۳). درصد سه ژنوتیپ (*kdr/kdr*، *kdr/sus* و *sus/sus*) در بین چهار جمعیت مگس آزمایش شده متفاوت بود (جدول شماره ۴). ژنوتیپ *kdr/kdr* دارای ژن مقاومت است و باند آن ۲۸۰bp، *sus/sus* دارای ژن حساسیت بوده و باند آن ۲۰۰bp و *kdr/sus* هردو ژن مقاوم و حساس را دارد و نیز هردو باند ۲۰۰bp و ۲۸۰bp را نشان داد. بیشترین تعداد مگس خانگی(۷۱ درصد) با ژنوتیپ *Kdr/kdr* در ارومیه و بعد از آن در تکاب قرار داشت(۶۱ درصد). در حالی که کمترین تعداد مربوط به سردشت (۳۰ درصد) بود (شکل شماره ۳). علاوه بر این، حشرات با ژنوتیپ *kdr/kdr* در تمام جمعیت‌های آزمایش شده شناسایی شدند(شکل شماره ۴).



شکل ۳. ژنوتیپ جهش *kdr* توسط PASA . (A) قطعه آللی حساسیت (200 bp) با پرایمرهای *kdr1* و *kdr3* و قطعه آللی مقاومت (280 bp) با پرایمرهای *kdr2* و *kdr4* تکثیر شدند. قطعه کنترل (۴۸۰bp) با پرایمرهای *kdr1* و *kdr4* تکثیر شد. (B) محصولات PCR متعلق به هریک از مگس های خانگی پس از جداسازی روی ژل آگارز ۱٫۵ درصد. M = نشانگر ۱۰۰bp، NC = کنترل منفی

جدول ٤. ژنوتیپ‌های مگس خانگی و فراوانی آلل *Kdr* مقاومت پایرتروئیدی در شهرهای مختلف اذربایجان غربی

محل	تعداد	*Kdr/kdr*	*Kdr/sus*	*Sus/sus*	فراوانی *kdr*
ارومیه	۶۰	۴۳	۱۱	۶	٪۸۱
ماکو	۶۰	۲۳	۱۸	۱۹	٪۵۳
سردشت	۶۰	۱۸	۹	۳۳	٪۳۷,۵
تکاب	۶۰	۳۷	۱۳	۱۰	٪۷۲,۵



شکل ٤. درصد ژنوتیپ‌ها در جمعیت‌های مگس خانگی در شهرهای مختلف آذربایجان غربی.

بحث

مقاومت به حشره‌کش‌ها پدیده ایست که بر روی محیط زیست تاثیر گذار می‌باشد، زیرا زمانی که افراد با مشکل مقاومت به حشره-کش‌ها روبرو می‌شوند میزان دوز مصرفی حشره‌کش را، نسبت به دوز توصیه شده افزایش می‌دهند که این امر ممکن است منجر به افزایش آلودگی زیست محیطی و خطر برای سلامت عمومی شود (Khan & Akram, 2017). از سوی دیگر، دسترسی آسان به سموم و سهولت خریداری آنها و فرمولاسیون‌های اماده برای استفاده (نظیر : اسپری) موجبات این امر را فراهم نمود که کنترل شیمیایی به عنوان یک روش کاربردی ارزان و آسان تلقی شود و افراد ترجیحا از چنین فرمولاسیون‌هایی به جای اتخاذ اقدامات پیشگیرانه (مانند: مکانیکی، فیزیکی و..) برای کنترل آفات استفاده کنند (khan, 2019). بنابراین، ابداع استراتژی‌های مدیریت مقاومت به حشره‌کش‌ها در تلاش برای کاهش اثرات منفی بر محیط زیست مطلوب است (Khan *et al*., 2018). حشره‌کش‌های پایرتروئید علیرغم اینکه اثربخشی آنها با تکامل مقاومت کاهش یافته، احتمالاً همچنان به طور گسترده برای کنترل مگس‌های خانگی استفاده می‌شوند (scott, 2017). مقاومت به حشره‌کش‌های پایرتروئیدی در گونه‌های مختلف آفات در سراسر جهان گزارش شده است مانند *Anopheles stephensi* (khan *et al*., 2018)، *Culex pipiens* (scott *et al*., 2015) *Aedes aegypti* و *Aedes albopictus*

Cimex ، (Y-Fung *et al*., 2021) *Hyalella azteca* و (Kusimo *et al*., 2022) *Anopheles albimanus* ،(Smith *et al*., 2016) *hemipterus* و (Ghavami *et al*., 2021) *Varroa destructor* (Vlogiannitis *et al*., 2021).

مقاومت به کلاس‌های مختلف حشره‌کش‌ها در مگس خانگی و شناسایی چندین جهش منفرد مرتبط با مقاومت به حشره‌کش‌ها از کشورهای مختلف گزارش شده است (Williamson *et al*., 1996a; Rinkevich *et al*., 2006; Rinkevich *et al*., 2012; Scott *et al*., 2013; Mazzoni *et al*. 2015).

آزمایشات زیست سنجی در مطالعه‌ی حاضر بیانگر این بود که مگس‌های خانگی مقاوم به پایرتروئیدها در سطح استان حضور دارند. بیشترین مقاومت مگس خانگی به سموم پایرتروئید در شهرستان ارومیه (۸۶٪) دیده شد، بعد از آن به ترتیب بیشترین مقاومت مربوط به تکاب(۸۰٪)، ماکو(۶۶/۶٪) و کمترین میزان مقاومت مربوط به سردشت(۶۵٪) بود.میزان کارایی سم در هر مرغداری نیز زیر یک درصد بود. در نتایج حاصل از زیست سنجی در هر چهار جمعیت مورد مطالعه نرخ مقاومت بالای ۵۰درصد بود که این نتایج بیانگر عدم حساسیت هر چهار جمعیت های مورد مطالعه به سم پایرتروئید است. اپراتورهای کنترل آفات در مناطق مختلف معمولا از سموم پایرتروئیدی(غالبا سایپرمترین ۱۰ درصد) برای کنترل مگس خانگی و سایر آفات کمک می‌گیرند و مردم نیز اغلب از این محصولات که به آسانی در فروشگاه‌های محلی در دسترس هست، استفاده می‌کنند. در نتیجه، حشره‌کش‌های پایرتروئیدی اغلب از نظر غلظت و تعداد کاربرد به درستی استفاده نمی شوند، که این امر می‌تواند موجب وارد آمدن فشار غیر ضروری حشره‌کش‌ها به مگس خانگی و سایر آفات شود. با گذر زمان،سبب افزایش میزان مقاومت مگس خانگی به سم پایرتروئید و عدم اثر بخشی آن میشود.

مطالعات مشابهی نیز در ایران انجام شده است که میزان مقاومت به پایرتروئیدها را در مگس خانگی به روش زیست سنجی بررسی کرده‌اند برای مثال، لدنی و موسوی ایوانکی در سال ۱۳۷۱، سطح حساسیت مگس‌های خانگی جمع‌آوری شده از مرغداری واقع در کرج را، نسبت به حشره‌کش‌های مختلف مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه برخلاف نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، حساسیت مگس خانگی به سموم پایرتروئیدی نسبت به دیگر سموم مورد آزمایش بیشتر بود، با توجه به این موضوع که مطالعه مذکور در چندین سال قبل صورت گرفته، بیانگر این حقیقت است که در طول سالیان متمادی، مصرف بی رویه سموم پایرتروئیدی منجر به ایجاد مقاومت در مگس خانگی و عدم اثر بخشی آن شده است. همچنین مطالعه ای توسط احمدی و همکاران در سال ۲۰۲۰ در ارتباط با میزان مقاومت مگس خانگی جمع‌آوری شده از گاوداری‌های استان اصفهان و چهارمحال بختیاری نسبت به سموم پایرتروئیدی (پرمترین، سایپرمترین و دلتامترین) انجام شده است. که همانند مطالعه حاضر، میزان مقاومت بالایی(بالاتر از ۵۰ درصد) در مگس خانگی نسبت به سموم پایرتروئیدی مشاهده کردند. در سراسرجهان نیز مقاومت مگس خانگی به سموم پایرتروئید گزارش شده است، در سال ۲۰۲۰، Ranian و همکاران مقاومت به برخی پایرتروییدها و ارگانوفسفره‌ها را در مگس خانگی مورد مطالعه قرار دادند و مقاومت را در سه نسل بررسی کردند نتایج حاصل نشان داد که جمعیت مگس خانگی به پایرتروئیدها نسبت به ارگانوفسفره‌ها مقاوم‌تر هستند. همچنین،Khan و همکاران در سال ۲۰۱۳ مقاومت به سموم پایرتروئید را در مگس‌های خانگی جمع‌آوری شده از پاکستان ارزیابی کردند که در مطالعه آنها مقاومت به سم سایپرمترین در جمعیت‌های مورد آزمایش همانند مطالعه حاضر نرخ بالایی (۷۰ درصد–۳۰ درصد) داشت. . مطالعه مشابه دیگری توسط Kaufman و همکاران در سال ۲۰۰۱ در ایالات متحده انجام گرفته شده که نتایج آن مشابه با مطالعه حاضر است و مقاومت بالای ۵۰ درصد به سموم پایرتروییید در مگس خانگی را گزارش کردند.

روش‌های استاندارد زیست‌سنجی برای ارزیابی وضعیت و توسعه مقاومت به حشره‌کش در تعیین فنوتیپ جمعیت‌ها ارزشمند هستند. در مقایسه با روش PCR، آزمایش‌های زیستی همیشه زمان‌بر و به تعداد زیادی نمونه نیاز دارند. یکی از مزایای سنجش مولکولی

نسبت به سنجش زیستی استاندارد این است که می‌تواند هتروزیگوت‌ها را با موفقیت شناسایی کند، که در پایش جمعیت‌هایی که فنوتیپ حساس را نشان می‌دهند در حالی که دارای بخش زیادی از هتروزیگوت‌ها هستند، مهم است، که می‌تواند به طور قابل‌توجهی بر کارایی کنترل پایرتروئیدها تأثیر بگذارد (Soderlund & Knipple, 2003) . مطالعه حاضر نشان‌دهنده این بود که روش تشخیصی مولکولی PASA برای تعیین فنوتیپ‌های مقاومت و فراوانی *kdr* ابزار قدرتمندی است و می‌تواند برای ارائه اطلاعات در ارتباط با توصیه‌هایی در مورد مدیریت آفات و مقاومت مورد استفاده قرار گیرد.

از نظر تئوری، ژن‌های مسئول ایجاد مقاومت معمولاً نادر هستند و پس از تکامل می‌توانند در سراسر جهان گسترش یابند (Raymond *et al.*, 1991). به احتمال زیاد، انتخاب جهش‌های *kdr* در دهه ۱۹۴۰ آغاز شد، همزمان با استفاده از DDT و در دهه ۱۹۸۰ با استفاده از پایرتروئیدها افزایش یافت (Scott & Georghiou, 1986; Rinkevich *et al.*, 2006).

در مطالعه حاضر،تعیین ژنوتیپ هر مگس خانگی برای بررسی حضور آلل مقاومت *kdr* با استفاده از PASA نشان داد که این آلل در چهار جمعیت مگس خانگی مورد آزمایش وجود دارد. این یافته با تکثیر قطعه آللی هموزیگوت ۲۸۰–bp *Kdr/Kdr* تایید شد. تعدادی از مگس‌ها هتروزیگوت و دارای آلل (*kdr/sus*) بودند که با تکثیر دو قطعه آللی (۲۸۰–bp برای *kdr* و ۲۰۰–bp برای sus) مشخص شدند و تعدادی از مگس‌ها نیز دارای آلل حساس (*sus/sus*) بودند.درصد فراوانی آلل *kdr* در مناطق مختلف مورد مطالعه به این صورت بود: ارومیه(۸۱٪)، ماکو(۵۳٪)، سردشت (۳۷,۵٪) و تکاب (۷۲,۵٪) بود. همچنین درصد فراوانی ژنوتیپ *sus/sus* در شهرستان های مورد مطالعه بدین شرح بود: ارومیه(۱۰٪)، ماکو(۳۱,۶٪)،سردشت(۵۵٪) و تکاب(۱۶,۶٪) بود.آنجایی که مگس‌هایی با ژنوتیپ *kdr/kdr* به حشره‌کش‌های پایرتروئیدی مقاوم هستند، نتایج نشان داد که سطح مقاومت می‌تواند با گذشت زمان در جمعیت مگس‌های استان آذربایجان غربی افزایش یابد که این امر می‌تواند منجر به شکست برنامه‌های کنترلی آفات شود. جمعیت‌های مگس خانگی بررسی شده در مطالعه حاضر، تنوع در درصدهای سه ژنوتیپ(*kdr/kdr*, *kdr/sus* , *sus/sus*) را نشان دادند که نشان‌دهنده سطوح متفاوت مقاومت پایرتروئیدی است . تنوع در ژنوتیپ جمعیت‌های مگس خانگی توسط Rinkevich و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ گزارش شده بود،که بیان کرد ترکیب آلل‌های مقاوم به حشره‌کش پایرتروئیدی بین مناطقی که مگس‌های خانگی از آن جمع‌آوری شده‌اند بسیار متغیر است. در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی آلل *kdr* در ارومیه یافت شد. بنابراین، ۷۱ درصد از جمعیت مگس‌های آن مکان، دارای ژنوتیپ هموزیگوت *kdr/kdr* مقاوم بودند. بعد از آن بیشترین فراوانی ژنوتیپ *kdr/kdr* متعلق به تکاب (۶۱/۶ درصد) بود.اما کمترین تعداد (۳۰ درصد) مگس با ژنوتیپ *kdr/kdr* در سردشت یافت شد. در ماکو نیز تنها ۳۸٪ از جمعیت مورد مطالعه دارای ژنوتیپ *kdr/kdr* بودند. این یافته نشان داد که جمعیت مگس خانگی سردشت و ماکو نسبتا تحت سلطه مگس-های حساس بوده و در نتیجه می‌توان با استفاده از حشره‌کش‌های پایرتروئیدی با آنها به مبارزه پرداخت. ولی در دو جمعیت مورد مطالعه مربوط به ارومیه و تکاب بیش از ۵۰ درصد از جمعیت مگس خانگی دارای ژنوتیپ مقاومت هستند که بیانگر عدم اثر بخشی سم پایرتروئید روی آنهاست پس ملزم به مدیریت مقاومت به طرق مختلف هستند نتایج مطالعه حاضر با نتایج حاصل از بررسی‌ای که توسط کامدار و همکاران در سال ۲۰۱۸ در شمال غرب ایران گزارش شده بود مغایرت داشت، جمعیت مگس مورد آزمایش در مطالعه آنها که از پناهگاه‌های انسانی و حیوانی، قصابی‌ها، لبنیاتی‌ها، تره‌بار و زباله‌دان‌ها جمع‌آوری شده بودند همچنان حساس به پایرتروئید بودند و جهش *kdr* در آنها مشاهده نشده بود، با توجه به این موضوع که در مطالعه‌ی آنها جمعیت مگس‌ها در سال ۲۰۱۵ جمع‌آوری شده بود و تفاوت زمانی چندین سال از مطالعه‌ی آنها نسبت به مطالعه حاضر، تفاوت در نتایج بدست آمده احتمالا مربوط به گذشت زمان نسبتا زیاد و مصرف بیشتر سموم شیمیایی و توسعه مقاومت می‌باشد. مطالعات مشابهی نیز در سراسر جهان انجام گرفته، Huang و همکاران در سال ۲۰۰۴ ، فراوانی ژن *kdr* را در جمعیت‌های مگس خانگی مزارع دانمارک بررسی کردند و نتایج

آن با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت، آنها هر سه آلل را با فراوانی‌های (۲۳,۹ درصد) *sus /sus* و (۳۶ درصد) *kdr/sus* و (۴۵,۵ درصد) *kdr/kdr* در جمعیت مورد مطالعه مشاهده کردند. همچنین، Al-Deeb در سال ۲۰۱۴ در امارات متحده عربی فراوانی ژن *kdr* را در مگس‌های خانگی بررسی کرد و در مطالعه آن نیز همانند مطالعه حاضر هر سه آلل را با فراوانی (۳۹,۳ درصد) *sus/sus* (۱۹,۷ درصد) *kdr/sus* و (۴۵,۹ درصد) *kdr/kdr* مشاهده نمود. هر دو مطالعه ذکر شده (Huang *et al*., 2004; Al-Deeb, 2014) همانند مطالعه حاضر تنوع در درصدهای سه ژنوتیپ (*kdr/kdr, kdr/sus, sus/sus*) را نشان دادند.در سال ۲۰۱۹ نیز Alfatlawi حضور ژن مقاوم به پایروتروئید را در مگس‌های خانگی در عراق بررسی نمود و برخلاف نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات مشابه تمام مگس‌های تست شده تنها دارای ژنوتیپ sus/sus بودند.

DNA ژنومی نسبتاً از تعداد کمی از مگس‌های خانگی به دلیل زمان و بودجه محدود در مطالعه حاضر استخراج شد. آزمایش تعداد بیشتری از مگس‌ها در مطالعات آینده توصیه می‌شود، زیرا تعداد مگس‌های بیشتر، تخمین دقیق تری از فراوانی آلل *kdr* و سطوح مقاومت پایرتروئیدی را ارائه می‌دهد. با این حال، مطالعه کنونی شواهد کافی را مبنی بر اینکه آلل *kdr* در جمعیت‌های مگس خانگی آزمایش‌شده در استان آذربایجان غربی وجود دارد را ارائه کرد. هنگامی که یک جمعیت حشره نسبت به حشره‌کش مقاومت نشان می‌دهد، برنامه‌های کنترل با استفاده از این حشره‌کش دیگر موثر نیستند. بر این اساس، فهرست حشره‌کش‌های پایرتروئیدی که برای کنترل مگس‌های خانگی در در سطح استان استفاده می‌شود، باید دوباره ارزیابی شود تا فراوانی آلل مقاومت *kdr* در جمعیت مگس‌ها کاهش یابد. علاوه بر این، اجرای کاربردی یک طرح جهانی برای مدیریت مقاومت به حشره‌کش‌ها در سطح کشور نیز ضروری است.

نتیجه گیری و پیشنهادها

این مطالعه نشان می‌دهد که آلل *kdr* مقاوم به حشره‌کش پایرتروئید در جمعیت‌های مگس خانگی استان آذربایجان غربی یافت می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه حاکی از آن است که مقاومت در مگس‌های خانگی استان آذربایجان غربی نسبت به گروه‌های مختلف حشره‌کش‌های پایرتروئید که رایج‌ترین حشره‌کش‌های مورد استفاده برای کنترل آفات هستند، توسعه یافته است. استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی در مناطقی که آفت هدف در برابر آنها مقاوم است می‌تواند منجر به افزایش حجم حشره‌کش در محیط اطراف شود و حشره‌کش‌ها علاوه بر عدم کنترل آفت هدف ،آسیب فراوان به انسان و محیط زیست وارد می‌کنند. بنابراین، تشخیص پدیده مقاومت در آفات و ناقلین و ارائه برنامه‌هایی برای کاهش یا حذف آن امری ضروری است.

سپاسگذاری

از زحمات مسئولین مرغداری‌ها و اقای دکتر خوش نژاد برای همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها و همچنین زحمات بی دریغ آقای دکتر آوات سمیعی در انجام مراحل پژوهش و تهیه نسخه خطی عمیقا قدردانی می‌گردد.

منابع فارسی

توسلی، موسی (۱۳۸۸). *روش کار آزمایشگاه حشره‌شناسی دامپزشکی*. چاپ اول. ارومیه: انتشارات دانشگاه ارومیه.

لدنی، حسین و موسوی ایوانکی، علیه (۱۳۷۱). سطح حساسیت مگس‌های خانگی جمع‌آوری شده از یک مرغداری واقع در مردآباد کرج نسبت به حشره‌کش های مختلف به طریق تماس موضعی در سال ۱۳۷۱. روزنامه انجمن حشره‌شناسان ایران. جلد دوازدهم و سیزدهم.

REFERENCES

Ahmadi, E., Khajehali, J. & Rameshgar, F.(2020). Evaluation of resistance to permethrin, cypermethrin and deltamethrin in different populations of *Musca domestica* (L.), collected from the Iranian dairy cattle farms. *Journal of Asia-Pacific Entomology*,23,277-284.

Al-Deeb, M.A.(2014). Pyrethroid insecticide resistance *kdr* gene in the house fly, *Musca domestica (Diptera: Muscidae*), in the United Arab Emirates. *Agricultural Sciences*, 05(14),1522-1526.

Alfatlawi, M.A.A., Ali, M.J. & Nase, H.H.(2019).Molecular identification of allelic genotypes of pyrethroid-insecticide resistance in housefly, Iraq. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 33(2), 209-212.

El-Hamid, A., Madiha, M., Helal, E. M. & Mohamadeen, F. T. (2018). Laboratory evaluation of the toxicity of silver nanoparticles against housefly, *Muscadomestica* (*Diptera: Muscidae*). *Alexandria Science Exchange Journal*. 39(3):511-520.

Elliott, M.(1980).Established pyrethroid insecticides, *Pesticide science*, 11, 119–128.

Elliott, M., Janes, NF. & Potter, C. (1978).The future of pyrethroids in insect control. *Annual review of entomology*, 23(1),443-469.

Farnham, A.W., Murray, A.W.A., Sawicki, R.M., Denholm, I.& White, J.C.(1987). Characterization of the structure-activity relationship of *kdr* and two variants of *super-kdr* to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica L.*). *Pesticide Science*,19, 209–220.

Farooq, M. & Freed, S.(2016).Infectivity of housefly, *Musca domestica* (*Diptera: Muscidae*) to different entomopathogenic fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 807-816.

Freeman, J.C., Ross, D.H. & Scott, J.G. (2019).Insecticide resistance monitoring of house fly populations from the United States. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 3575(19), 30128-2.

Georghiou, G.P.(1990).Overview of insecticide resistance. In: Green, M.B., LeBaron, H.M. & Moberg, W.K. (editors) Managing resistance to agrochemicals. *American Chemical Society*, Washington DC, pp, 18-41 .

Ghavami, M.B., Ghahremani, Z,. Raeisi, N. & Taghiloo, B.(2021). High levels of pyrethroid resistance and *super-kdr* mutations in the populations of tropical bed bug, *Cimex hemipterus*, in Iran. *Parasites & Vectors*,14,14(1),470.

Greenberg, B., Kowalski, J.A. & Klowden, M.J. (1970). Factors affecting the transmission of *Salmonella* by flies: Natural resistance to colonization and bacterial interference, *Infection and Immunity*, 2,800–809.

Hemmatinezhad, B., Ommi, D., Taktaz- Hafshejani, T. & Khamesipour, F.(2015).Molecular detection and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from houseflies (*Musca domestica*) in Iran. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21, 18.

Huang, J., Kristensen, M., Qiao, Ch.L. & Jespersen, J.B.(2004). Frequency of *kdr* Gene in House Fly Field Populations: Correlation of Pyrethroid Resistance and *kdr* Frequency. *Journal of Economic Entomology*, 97(3),1036-1041.

Kamdar, Sh., Farmani, M., Akbarzadeh, K. Jafari, A. & Gholizadeh, S.(2018). Low Frequency of Knockdown Resistance Mutations in *Musca domestica* (*Muscidae: Diptera*) Collected From Northwestern Iran. *Journal of Medical Entomology*, 56(2),501–505.

Kaufman, P.E., Scott, J.G. & Rutz, D.A. (2001). Monitoring insecticide resistance in house flies (*Diptera: Muscidae*) from New York dairies. *Pest Managment Science*, 57,514–521.

Khan, H.A.A. (2019). Characterization of permethrin resistance in a *Musca domestica* strain: resistance development, cross-resistance potential and realized heritability. *Pest Managment Science*, 75(11),2969-2974.

Khan, H.A.A., Akram, W. & Ali-Shad, S.(2013). Resistance to conventional insecticides in Pakistani populations of *Musca domestica L. (Diptera: Muscidae*): a potential ectoparasite of dairy animals. *Ecotoxicology*, 22,522–527.

Khan, H.A.A. & Akram, W.(2017). Cyromazine resistance in a field strain of house flies, *Musca domestica L.*: Resistance risk assessment and bio-chemical mechanism. *Chemosphere*,167,308-313.

Khan, H.A.A., Akram, W. & Lee, S.(2018). Resistance to selected pyrethroid insecticides in the malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (*Diptera: Culicidae*), from Punjab, Pakistan. *Journal of Medical Entomology*, 55(3), 735-738.

Ladonni, H. & Musavi- Aivaneki, A.(1992). The level of sensitivity of houseflies collected from a poultry farm located in Mard Abad Karaj to different insecticides by local contact method in 1371. *Journal of the Entomologists' Association of Iran*, Volumes 12 & 13. (in persian)

Liu, N. & Pridgeon, J.W.(2002). Metabolic detoxication and the *kdr* mutation in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*,73, 157–163.

Macovei, L. & Zurek, L. (2006). Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology*,72,4028–4035.

Mazzoni, E., Chiesa, O., Puggioni, V., Panini, M., Manicardi, G.C. & Bizzaro, D. (2015). Presence of *kdr* and *s-kdr* resistance in *Musca domestica* populations collected in Piacenza province (Northern Italy). *Bulletin of Insectology*,68, 65–72.

Metcalf, R.L.(1989). Insect resistance to insecticides, *Pesticide Science*, 26 , 333–358.

Milani, R. & Travaglino, A. (1957). Ricerche genetiche sulla resistenza al DDT in *Musca domestica* concatenazione del gene *kdr* (knockdown-resistance).*con due mutanti morfologigi. Rivista Di Parassitologia* 18: 199–202

Miyazaki, M., Ohyama, K., Dunlap, DY. & Matsumura, F.(1996). Cloning and sequencing of the *para-type* sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Molecular & General Genetics*,252(1-2),61-68.

NRC, Executive summary, pesticide resistance strategies and tactics for management, in: NRC (Ed.) Pesticide Resistance Strategies and Tactics for Management, National Academy Press, Washington, D.C., 1986, pp. 1–9.

O-Kusimo, M., Mackenzie-Impoinvil, L., S-Ibrahim, S., Muhammad, A., Irving, H., Hearn, J., E- Lenhart, A. & S-Wondji, Ch.(2022). Pyrethroid resistance in the New World malaria vector *Anopheles albimanus* is mediated by cytochrome P450 CYP6P5. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,183,105061.

Peck, G.W., Ferguson, H.J., LePage, J.T., Hebert, V.R., O'Neal, S.D., Walsh, D.B.(2014). Evaluation of sunlight-exposedpyrethroid-treated netting for the control of face fly and housefly (*Diptera*: *Muscidae*). *Pest Management Science*. 70(1):123–129.

Rahman, A., Ishfaq, A., Arshad Azmi, M. & Khatoon, N. (2015). Cutaneous myiasis of scalp in a young girl related to *Musca domestica*. *Dermatology Online Journal*, 21(11).

Ranian, K., Zahoor, M.K., Zahoor, M.A., Rizvi, A., Rasul, A., Majeed, H.N., Jabeen, F., Sarfraz, I., Zulhussnain, M., Riaz, B. & Ullah, A.(2020). Evaluation of resistance to some pyrethroid and organophosphate insecticides and their underlying impact on the activity of esterases and phosphatases in house fly, *Musca domestica* (*Diptera:Muscidae*). *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(1),327-336.

Raymond, M., Callaghan, A., Fort, P. & Pasteur, N.(1991). Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, 350, 151-153.

Rinkevich, F.D., Zhang, L., Hamm, R.L., Brady, S.G., Lazzaro, B.P. & Scott, J.G. (2006). Frequencies of the pyrethroid resistance alleles of *Vssc1* and *CYP6D1* in house flies from the eastern United States. *Insect Molecular Biology*, 15(2), 157–167.

Rinkevich, F.D.,Hedtke, S.M., Leichter, C.A., Harris, S.A., Su, C., V-Taskin, B.S. G., Qiu, X. & Scott, J.G. (2012a). Multiple origins of *kdr*-type resistance in the house fly, *Musca domestica*. *PLoS ONE*,7(12),1-6.

Rinkevich, F.D., Su, C., Lazo, T.A., Hawthorne, D.J.,Tingey, W.M. Naimov, S.& Scott, J.G. (2012b).Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (*kdr*) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104,192–200..

Rinkevich, F.D., Du, Y. & Dong, K.(2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106,93–100

Scott, J.G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29,757–777.

Scott, J.G. (2001). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance: lessons from *CYP6D1*, in: I. Ishaaya (Ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer-Verlag, New York, pp, 255–267.

Scott, J.G.(2017). Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Pest Managment Science*,73(4),716-722.

Scott, J. G. & Georghiou, G. P. (1986). The biochemical genetics of permethrin resistance in the Learn-PyR strain of house fly. *Biochemical Genetics*,24(1-2), 25–37.

Scott, J.G., Leichter, C.A., Rinkevich, F.D., Harris, S.A., Su, C., Aberegg, L.C., Moon, R., Geden, C.J. & Gerry, A.C.(2013). Insecticide resistance in house flies from the United States: resistance levels and frequency of pyrethroid resistance alleles. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107,377–384.

Scott, J.G., Hardstone-Yoshimizu, M.& Kas, Sh.(2015). Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120,68-76.

Sheppard, D.C. & Hinkle, N.C. (1987). A Field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 4, 87- 89.

Shono, T.(1985). Pyrethroid resistance: importance of the *kdr*-type mechanism. *Journal of pesticide science*, 10,141–146.

Shono, T., Kasai, S., Kamiya, E., Kono, Y. & Scott, J.G.(2002).Genetics and mechanisms of permethrin resistance in the YPER strain of house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,73, 27–36.

Singh, P. & Jerram, E. (1976). Rearing housefly larvae in polyethene bags. *New Zealand Journal of Zoology*,3,57-58.

Soderlund, D. M. & Knipple, D.C.(2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 563-577.

Smith, L.B., Kasai, Sh. & Scot, J.G. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,133,1-12.

Tavassoli, M.(2009). *Laboratory Methods in Veterinary Entomology*. Urmia: Publication of Urmia University.(in Persian).

Ugbogu, O.C., Nwachukwu, N.C. & Obguagu, U.N. (2006). Isolation of *Salmonella* and *Shigella* species from house flies (*Musca domestica L.*) in Uturu, Nigeria, *African Journal of Biotechnology*, 5,1090–1091.

Vlogiannitis, S., Jonckheere, W., Laget, D., C-de-Graaf, D., Vontas, J. & Van-Leeuwen, T.(2021). Pyrethroid target-site resistance mutations in populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (*Acari: Varroidae*) from Flanders, Belgium. *Experimental and Applied Acarology*,85(2-4),205-221.

Wall, R. & Shearer, D. (1997). *Veterinary Entomology*. Bristol: Springer Dordrecht.

Wang, Q., Li, M., Pan, J., Di, M., Liu,Q., Meng, F., Scott, J.G. & Qiu, X.(2012).Diversity and frequencies of genetic mutations involved in insecticide resistance in field populations of the house fly (*Musca domestica L.*) from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, 153–159.

Williamson, M.S., Denholm, I., Bell, C.A. & Devonshire, A.L.(1993). Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly *(Musca domestica*). *Molecular & General Genetics*, 240, 17–22.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Castells, N. & Devonshire, A. L. (1996a). Analysis of sodium channel gene sequences in pyrethroid-resistant house flies. In T. M. Brown [ed.], *Molecular genetics and evolution of pesticide resistance*. American Chemical Society, Washington, DC, pp, 52- 61.

Williamson, M. S., Martinez-Torres, D., Hick C.A. & Devonshire, A.L.(1996b). Identification of mutations in the house fly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Molecular & General Genetics*, 252, 51- 60.

Y- Fung , C., Yan Zhu , K., Major , K., C -Poynton, H., E-Huff Hartz, K., Wellborn, G. & J- Lydy, M.(2021). The contribution of detoxification pathways to pyrethroid resistance in *Hyalella Azteca*. *Environmental Pollut*ion,284(2),117-158.

Extended Abstract

Introduction

The *Diptera* order is divided into three sub-orders, *Cyclorapha*, *Brachycera* and *Nematocera*. The housefly is in the *Cyclorapha* sub-order and the *Musidae* family. The house fly, *Musca domestica*, is a common pest that is necessary to control due to its role as a disease vector in humans, livestock, and poultry. Pyrethroid insecticides combine high insecticidal activity with low mammalian toxicity and lack of environmental persistence, thus promoting their widespread use to control many pests that are important to agriculture and to human health. However, their intensive use has led to development Resistance in many insect species, which often leads to Control failures. The present study was aimed to assess the house fly susceptibility to pyrethroid insecticides using molecular analysis.

Materials and Methods

In this study, sampling was done from four different geographical areas of West Azarbaijan province in 2023 (2023) and in the summer season and were transferred to Urmia University parasitology laboratory for bioassay and genotype determination. The resistance of collected housefly larvae was evaluated using Whatman papers impregnated with insecticide. Genomic DNA of the larvae that survived after the effect of the insecticide, as well as the larvae that died, was extracted using a DNA extraction kit (MBST, Tehran, Iran) according to the manufacturer's instructions. After extracting the DNA of house fly larvae, the PCR kit of Cinagen Company (Cinagen, Tehran) was used to perform PCR. For this purpose, Two outer allele-specific primers (*kdr1*,*kdr4*) and two inner allele-specific primers(*kdr2*,*kdr3*) were designed to detect the *Kdr* mutation (L1014 F; CTT to TTT) in house flies. Eventually, PCR products were electrophoresed using 1.5% agarose gel.

Results

The results of bioassay showed more than 50% resistance in all studied populations , and the highest level of resistance was reported from houseflies in Urmia city (86%) And the lowest level of resistance reported was related to Takab city(65%). The frequency of the L1014 F *kdr* mutation in four housefly populations that showed different

levels of pyrethroid resistance was determined using molecular analysis. The L1014 F allele was found in all tested populations. The frequency of *Kdr* in the studied populations was high and varied from 37% (Sardasht) to 81%(Urmia). In addition, houseflies with the *kdr/kdr* genotype were identified in all tested populations. The highest number of houseflies with *kdr*/*kdr* genotype was reported from Urmia(71%), followed by Takab (61%). While the lowest number was related to Sardasht (30%).

Conclusion

The results obtained from this study indicate that resistance has been developed in houseflies of West Azerbaijan province to different groups of pyrethroid insecticides, which are the most common insecticides used for pest control. When an insect population shows resistance to an insecticide, control programs using this insecticide are no longer effective. Based on this, the list of pyrethroid insecticides used to control house flies in the province should be re-evaluated to reduce the frequency of *kdr* resistance allele in the population of flies.

غیر قابل استناد