The University of Tehran Press

Biological Control of Pests and Plant Diseases

Online ISNN: 2322-2883

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

Effects of plant-based insecticide, Bino2 and entomopathogenic fungi on the digestion, detoxification, and chitinase activity of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae)

Mahdieh Mousavi[1], Fariba Mehrkhou[2]✉, Nurper Güz[3], Youbert Ghosta[4], Remzi Atlihan[5]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. Email: mousavimahdieh@yahoo.com
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. Email: f.mehrkhou@urmia.ac.ir
3. Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey. Email: Nurper.Guz@agri.ankara.edu.tr
4. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. Email: y.ghoosta@urmia.ac.ir
5. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Van Yüzüncü Yıl University, Van, Turkey. Email: ratlihan@yyu.edu.tr

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 20 April 2024

Revised: 26 June 2024

Accepted: 28 June 2024

Published online: Spring 2023

Keywords:

plant-based insecticide,

entomopathogenic fungi,

cabbage aphid,

digestive proteases,

detoxification enzymes.

ABSTRACT

Cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.), is one of the most important pests of cabbage crops. The use of plant-based insecticides, as well as biological control agents such as insect pathogenic fungi, has been considered as complementary methods in integrated pest management. In this research, the effect of Bino2 and two types of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* AB and *Lecanicillium lecanii* 229, as biological insecticides on the protein content, digestive protease activity, chitinase enzyme, acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase enzymes of the cabbage aphid adults were examined at a temperature of 25±2 °C, relative humidity of 60±5% and a photoperiod of 16:8 h (L: D). The results indicated that the use of lethal concentration (LC_{50}) of the fungal isolates caused the digestion of protein and chitin in the aphid cuticle, which in turn increased the sensitivity of aphids to these agents by increasing the secretion of protease and chitinase enzymes. Also, the Bino2 insecticide had an anti-nutritional effect by reducing the amount of protein and inhibiting the activity of digestive enzymes. In parallel to the decrease in the activity of digestive enzymes, the activity of detoxifying enzymes also decreased under the influence of the Bino2. The results of this research showed that the tested entomopathogenic fungi and Bino2 insecticide led to an increase in the mortality of cabbage aphids, thus the obtained information can be used in the management of this pest.

Cite this article: Mousavi, M., Mehrkhou, F., Güz, N., Ghosta, Y. & Atlihan, R. (2024). Effects of plant-based insecticide, Bino2 and entomopathogenic fungi on the digestive, detoxification, and chitinase activity of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 12 (1), 73-94. DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.375379.342

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.375379.342

Extended Abstract

Introduction

The cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. (Hemiptera: Aphididae), is known one of the most destructive pests, causing damage either directly by sucking or indirectly by secreting honeydew. It is also known as a vectors of various plant viruses. Chemical insecticides are the primary strategy used to control aphids. However, extensive usage of insecticides results in resistance and other toxicity problems for humans, natural enemies and environment. Consequently, the aforementioned side effects of insecticides have stimulated studies exploring the complementary methods to control of aphids. Entomopathogenic fungi (EPFs) which are effective a wide range of insect pests are known as a valuable biological control agents against insect pests.

Some EPFs, including *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. and *Lecanicillium lecanii* Zimm known as fungal endophytes, have negative effects on insects. Because of some exclusive characteristics of EPFs including specificity against target pests, environmentally friendly formulations, and compatibility with insecticides, they are considered as biological agents in integrated pest management programs. The commercial products of the most important EPFs such *M. anisopliae* and *L. lecanii* have received increasing intrest in pest control. In the present research, we used two native isolates, *M. anisopliae* and *L. lecanii*. The usage of native isolates has advantages including compatibility with the environment, insecticides, and native pests and not causing adverse effects on indigenous species. *Sophora flavescens* Ait. (Fabaceae), Bino2®, is a plant- derived insecticide which has different insecticidal, and antifeedant activity against plant- sucking pests such as aphids, grasshoppers, mites, etc. The insecticidal activity of herbal and biorational insecticide, refers to the existence of alkaloids, i. e. Sophocarpine, oxymatrine, matrine, isomatrine.

Materials and Methods

In the present study, the effect of two aforementioned EPFs and Bino2 were examined on the digestion, detoxification enzymes, and chitinase activity of cabbage aphid adults at a temperature of 25±2 °C, relative humidity of 60±5% and a photoperiod of 16:8 h (L: D). The dipping method was used in bioassay tests. Briefly, the cabbage leaf discs were dipped in five different concentrations of Bino2 (150, 185.39, 229.13, 283.90, and 350 µl/L) for 10 s. In terms of EPFs, the used concentrations were in the ranges of 10^1-10^5 (conidia/mL) containing 0.05% Tween 80. The treated leaves were air-dried for 30 min at room temperature, and then 15 adults of cabbage aphid were released into the ventilated Petri dishes containing the treated leaflet. Distilled water and the distilled water containing 0.05% Tween 80 were used as controls for Bino2 and EPFs, respectively. The bioassay tests were replicated four times for each concentration of Bino2, EPFs, and controls. The percentage of adult mortality was counted 48 h and 6 days after treatment for Bino2 and EPFs, respectively. The lethal concentrations (LC_{50}, LC_{90}), and 95% confidence limits in each treatment were obtained using the Probit analysis, which was conducted by SPSS software (Ver. 20, 2011). Analysis of variance between treatments was done and the means were evaluated by Tukey's multiple-range test and T-test for EPFs and Bino2, respectively using SPSS software Ver. 20, 2011).

Results and Discussion

The results indicated that lethal concentration (LC_{50}) of the fungal isolates increased the protease and chitinase enzyme activity in the aphid cuticle, which in turn increased the sensitivity of aphids to the aforementioned agents. There were significant differences between EPFs isolates regarding trypsin ($F=4.58$; $df= 2, 6$; $P=0.038$) and chitinase ($F=3.21$; $df=2, 6$; $P=0.021$) activity. The highest and lowest trypsin activity was obtained on *M. anisoplia* (0.1595±0.0236 µmol/min/mg protein) and *L. lecanii* isolates (0.066±0.0027 µmol/min/mg protein), respectively. Also, the highest and lowest chitinase activity was obtained *M. anisoplia* (0.1722±0.0025) and control treatments (0.0080±0.0021) µmol/min/mg protein, respectively. However, there was no significant difference ($F=0.48$; $df = 2, 6$; $P=0.704$) between EPFs isolates regarding chymotrypsin activity. Bino2 insecticide had an anti-nutritional effect by reducing the amount of protein and inhibiting the digestive enzymes activity. The results indicated that the adults of aphids which exposed to the LC_{50} concentration of Bino2 (247.60 µl/L) had the lowest protein content (0.08±0.027 mg protein/ mg adult weights), and protease (0.0076±0.0002 µmol/min) activity. Along with digestive enzyme activity, the of detoxification enzymes of the cabbage aphid adults were affected by LC_{50} concentration of Bino2. The lowest and highest acetylcholinesterase (0.0011±0.0003 µmol/min/mg protein) and glutathion-s transferase (0.0014±0.0006 µmol/min/mg protein) activity were found on Bino2 adults compared to control group.

Conclusion

The overall results of this research showed that either the tested entomopathogenic fungi or Bino2 insecticide, led to an increase in the mortality of cabbage aphids and the obtained information can be used in the management of this pest.

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی، دوره ۱۲، شماره ۱

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۸۰۹۰

انتشارات دانشگاه تهران

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

تاثیر حشره‌کش بینو ۲ و عوامل بیماریزای قارچی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، سم زدا و کیتینازی شته مومی کلم، *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae)

مهدیه موسوی[۱] | فریبا مهرخو[۲]✉ | نورپر گوز[۳] | یوبرت قوستا[۴] | رمزی آتلیهان[۵]

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: akram.shanaghi@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: s.rahimik@ut.ac.ir

۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آنکارا، آنکارا، ترکیه. رایانامه: Nurper.Guz@agri.ankara.edu.tr

۴. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: ahmadz@ut.ac.ir

۵. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یوزینجی یل، وان، ترکیه. رایانامه: ratlihan@yyu.edu.tr

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۸
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۲

کلیدواژه‌ها:
حشره¬کش با منشا گیاهی، قارچهای بیماریزای حشرات، شته مومی کلم، پروتئازهای گوارشی، آنزیم های سم زدا.

چکیده

شته مومی کلم *Brevicoryne brassicae* (L.)، یکی از مهمترین آفات محصولات کلم می‌باشد. استفاده از حشره‌کش‌هایی با منشا گیاهی و عوامل کنترل بیولوژیک نظیر قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به عنوان روش-های تکمیلی در مدیریت تلفیقی آفت مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، تاثیر حشره‌کش بینو ۲ و دو گونه قارچ بیماری‌زای حشرات، *Metarhizium anisopliae* AB و *Lecanicillium lecanii* 229، به‌عنوان حشره‌کش‌های بیولوژیک، روی محتوای پروتئینی، فعالیت پروتئازهای گوارشی، آنزیم کیتیناز، آنزیم های استیل کولین استراز و گلوتاتیون–اس–ترانسفراز حشره کامل شته مومی کلم در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰±۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت کشنده (LC_{50}) ایزوله‌های قارچی با افزایش ترشح آنزیم‌های پروتئازی و کیتینازی باعث هضم پروتئین و کیتین موجود در کوتیکول شته شده و حساسیت شته‌ها را نسبت به این عوامل افزایش دادند. همچنین حشره‌کش بینو۲ با کاهش میزان پروتئین و مهار فعالیت آنزیم‌های گوارشی، اثر ضدتغذیه‌ای داشته است. به موازات کاهش فعالیت آنزیم های گوارشی، فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا هم تحت تاثیر حشره‌کش بینو۲ کاهش یافت. نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ‌های مورد مطالعه و حشره‌کش بینو۲ منجر به افزایش مرگ و میر حشرات کامل شته مومی کلم شدند و از اطلاعات حاصله می‌توان در مدیریت این آفت استفاده کرد.

استناد: موسوی، مهدیه؛ مهرخو، فریبا؛ گوز، نورپر؛ قوستا، یوبرت و آتلیهان، رمزی (۱۴۰۲). تاثیر حشره¬کش بینو ۲ و عوامل بیماریزای قارچی بر فعالیت آنزیم¬های گوارشی، سم زدا و کیتینازی شته مومی کلم، *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). *نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی*، ۱۲ (۱)، ۹۴-۷۳.
DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.375379.342

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.375379.342

مقدمه

شته مومی کلم، *Brevicoryne brassicae* L. (Hemiptera: Aphididae)، یکی از آفات مهم کلم در ایران و بسیاری از نقاط دیگر جهان بوده و خسارت قابل توجهی به این محصول وارد می‌کند. این شته دارای قدرت تولیدمثل بالایی است و جمعیت خود را به سرعت افزایش داده و باعث ایجاد خسارت مستقیم و غیرمستقیم به گیاه می‌شود. در خسارت مستقیم، با تغذیه از شیره گیاهی، منجر به پیچیدگی و بدشکلی برگ‌ها شده و در نتیجه خسارت غیرمستقیم، با تولید عسلک، زمینه را برای فعالیت قارچ‌های فوماژین فرهم می‌کند و از طرف دیگر در انتقال ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی نیز موثر است (Ellis *et al*., 2000; Dáder *et al*., 2017; Mahmoodi *et al*., 2020)، به طوری که میزان خسارت وارده توسط این شته بین ۳۵-۸۰٪ متغیر است (Ramanujam *et al*., 2017; Mousavi *et al*., 2022).

اگرچه کنترل شیمیایی دارای عوارض نامطلوبی از قبیل آلودگی محیط زیست، سمیت برای موجودات غیر هدف همچون دشمنان طبیعی آفات و همینطور ایجاد مقاومت می‌باشد (Hussain *et al*., 2002; Ogendo *et al*., 2003; Bullangpoti *et al*., 2007)، با این حال استفاده از این روش همچنان به عنوان یکی از روش‌های موثر در مدیریت آفات کلم محسوب می‌شود (Mahmoodi *et al*., 2020). استفاده آگاهانه و هدفمند از ترکیبات شیمیایی، از جمله حشره‌کش‌های گیاهی و قارچ های بیماری‌زای حشرات یکی از راه‌های موثر و سازگار با محیط زیست برای کنترل آفات می‌باشد و از ارکان مهم در اجرای برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات نیز محسوب می‌شود (Tapondjou *et al*., 2005, Briggs *et al*., 2006; Roy *et al*., 2010).

در این تحقیق، از حشره‌کش گیاهی بینو۲[1] و دو گونه قارچ بیماری‌زای حشرات، *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. و *Lecanicillium lecanii* Zimm به عنوان عوامل زیستی کنترل حشرات، با مطالعه تاثیر آنها بر فیزیولوژی آنزیم‌های گوارشی، سم‌زدا و آنزیم‌های کیتینازی شته مومی کلم جهت تعیین میزان کارایی آنها استفاده شده است.

حشره‌کش گیاهی بینو۲ با استفاده از عصاره ریشه گیاه تلخه‌بیان، *Sophora flavescens* Alt. (Fabales: Fabaceae) فرموله شده است. حشره‌کش مذکور به دلیل دارابودن ترکیبات آلکالوئیدی نظیر ماترین[2]و سوفوکارپین[3] اثرات حشره‌کشی، ضدتغذیه‌ای روی حشرات دارد (Tian & Zhang, 2023)، این حشره‌کش، همچنین با تامین اسیدهای آمینه ضروری گیاه و تحریک فیتوآلکسین‌ها، منجر به رشد و نمو بهتر گیاه و افزایش مقاومت گیاهان در برابر خسارت حشرات مکنده می‌شود (Reshadat-Salvanagh, 2021). ماترین و اکسی ماترین از ترکیبات موثر در عصاره تلخه‌بیان بوده که دارای اثرات ضدتغذیه‌ای بر موریانه داشتند، اگرچه ترکیباتی نظیر سوفورانول ، سوفوریدین و ایزومترین نیز از دیگر ترکیبات آلکالوئیدی[7] در ساختار این ترکیب گیاهی می‌باشند (Mao & Henderson, 2007). اثرات حشره‌کشی گیاه تلخه بیان، *S. flavescens*، روی اغلب آفات مکنده نظیر زنجره‌ها، شته‌ها، کنه‌ها و حتی آفات پروانه‌ای و انباری ثابت شده است (Liu *et al*., 2007; Marcic *et al*., 2012).

استفاده از حشره‌کش‌ها، علاوه بر اثر مستقیم بر مرگ و میر حشرات، می‌تواند در پارامترهای بیوشیمیایی آن‌ها نیز تغییراتی ایجاد کند. به عنوان مثال، تماس با یک ماده سمی سبب تغییر در فعالیت آنزیم‌های گوارشی و سم‌زدا و در نهایت منابع انرژی موجود زنده می‌شود و تغییر در متابولیسم انرژی یک حشره در نهایت ویژگی‌های زیستی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. استراز ها و گلوتاتیون اس- ترنسفرازها آنزیم‌هایی هستند که در خنثی‌سازی مواد سمی ازجمله حشره‌کش‌ها نقش دارند. این گروه از

1Bino2®
2Matrine
3Sophocarpine
4Oxymatrine
5Sophoranol
6Sophoridine
7Isomatrine

آنزیم‌ها، به‌دلیل نقشی که در متابولیسم بسیاری از مواد شیمیایی کشاورزی و در نتیجه در تعیین مقاومت یا حساسیت حشرات به حشره‌کش‌ها دارند، بسیار مهم می‌باشند (Hosseini naveh &Ghadamyari, 2013).

گونه‌های قارچی مورد مطالعه در این پژوهش از شناخته شده‌ترین قارچ‌های بیمارگر در دنیای حشرات محسوب می‌شوند (Hall, 1981; Zimmermann, 2007). از ویژگی‌های اصلی قارچ‌های بیمارگر حشرات، بیماریزایی و سمیت آن‌ها است. بیماریزایی می‌تواند به عنوان توانایی میکروارگانیسم برای ایجاد بیماری تعریف شود (Mustafa & Kaur, 2009). این ویژگی‌ها با ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک تجزیه‌کننده کوتیکول ازجمله پروتئازها، کیتینازها، لیپازها (Santi *et al*., 2010)، کاتالازها و فسفولیپاز C (Schrank & Vainstein, 2010) مرتبط است. قارچ‌های بیماری‌زای حشرات با ترشح آنزیم‌های مذکور موجب تخریب و تجزیه کوتیکول میزبان شده و به داخل هموسل راه می‌یابند (Hussain *et al*., 2010; Hussain *et al*., 2016). پروتئازها از عوامل مهم در فرآیند نفوذ قارچ‌ها به بدن میزبان و تعیین میزان قدرت تهاجم آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند(Charnley, 2003; Mustafa and Kaur, 2009; Chui-Chai et al., 2012)، بنابراین توجه ویژه روی نقش پروتئازها بوده است.

پیشینه پژوهش

اغلب مطالعات انجام شده توسط محققین، در خصوص اثرات حشره‌کشی، ضدتغذیه ای حشره‌کش بینو۲ و میزان کارایی و بیماریزایی قارچ‌های بیماریزای حشرات گونه های مذکور و حشره‌کش بینو۲ را با مطالعه اثرات کشندگی و زیرکشندگی آنها بر میزان مرگ و میر، فراسنجه های جدول زندگی، تولیدمثلی و رشد جمعیتی مورد مطالعه قرار داده اند. در پژوهشی Asgharnezhad (2021)، تاثیر حشره‌کش‌های فلونیکامید و بینو۲ بر فراسنجه‌های رشد جمعیتی شته مومی کلم پرداخته و بینو۲ را به عنوان حشره‌کش موثر در قالب برنامه مدیریتی معرفی کرده است. Reshadat-Salvanagh (2021) نیز، در کنترل سفیدبالک گلخانه‌ای، به تاثیر بیشتر حشره‌کش بینو۲ نسبت به فلونیکامید اشاره کرده است. همچنین، اثرات حشره‌کشی برخی ترکیبات گیاهی از جمله ماترین در کشت هیدروپونیک خیار، تحت شرایط گلخانه‌ای روی شته پنبه *Aphis gossypii* Glov (Hemiptera: Aphidiidae) و کنه تارتن دولکه‌ای بیانگر تاثیر بالای آن بر روی آفات مذکور داشت (Saleem *et al*. 2019). تاکنون مستنداتی در زمینه تاثیر حشره‌کش بینو۲ بر تغییرات آنزیم‌های گوارشی و سم‌زدا روی حشرات وجود ندارد، اگرچه در اغلب مطالعات انجام یافته، بر کاهش فعالیت آنزیم‌های مذکور در نتیجه استفاده از حشره‌کش‌ها و اسانس‌های گیاهی اشاره شده است. به عنوان مثال، نتیجه یافته‌های Kumral *et al*. (2011) ، بیانگر کاهش فعالیت آنزیم سم‌زدای کربوکسیل استراز در کفشدوزک *Stethorus gilvifrons* (Muls.) توسط حشره‌کش فسفره متیل پاراتیون و عدم تاثیر آن بر روی آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز کفشدوزک بود. همچنین بررسی حشره‌کش‌های کلرپایریفوس، دیازینون و فنیتروتیون روی آنزیم‌های سم‌زدای سن شکارگر *Andrallus spinidens* Fabricius نشان داد که هر سه حشره‌کش باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های استراز، گلوتاتیون اس- ترنسفراز و استیل کولین استراز سن شکارگر شدند (Gholamzadeh-Chitgar *et al*. 2015).

در تحقیقی که بر روی اثرات زیرکشندگی گونه‌های قارچی *M. anisopliae* و *Beauveria bassiana* بر روی فراسنجه-های جدول زندگی شته مومی کلم انجام شد، حساسیت بالای شته مومی کلم به عامل بیولوژیک قارچی *M. anisopliae* AB نسبت به ایزوله *B. bassiana* مشاهده شد که کاهش فراسنجه‌های رشد جمعیتی را در پی داشت (Mousavi *et al*. 2022). گزارش‌هایی مبنی بر مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک تجزیه کننده کوتیکول توسط قارچ‌های بیماریزا در حشرات وجود دارد. پروتئازهای Pr1 و Pr2 بیشترین مطالعات آنزیمی پروتئولیتیک را به خود اختصاص داده‌اند. فعالیت Pr1 و Pr2 در قارچ‌های *B. bassiana*، *M. anisopliae*، *Lecanicillium lecanni* (Zimmerman) Viegas و *N. rileyi* (Gams and Roszypal) *M. flavoviridae* مشخص شده است (Bidochka & Meltzer 2000; Khorrami 2018).

پروتئاز Pr1 یک آنزیم خارج سلولی کلیدی است که در نفوذ به کوتیکول دخیل است و بدون این آنزیم، فرآیند آلودگی رخ نخواهد داد (Mustafa & Kaur 2009). علاوه بر این، پروتئاز Pr1 یک شاخص بیمارگری برای قارچ‌های بیمارگر حشرات است (Castellanos-Moguel *et al*. 2007). مطالعات Kim *et al*. (2014) میزان فعالیت کیتینازی و پروتئازی قارچ *B. bassiana* را بر روی سفیدبالک گلخانه، به ترتیب ۳۴۲/۲۸ و ۴۶۱/۷۰ واحد فعالیت/ میلی‌لیتر گزارش کردند. Murad *et al*. (2006: 2007) فعالیت آنزیم‌های کیتینولیتیک، پروتئولیتیک و آلفا آمیلولیتیک قارچ‌های *M. anisopliae* و *Beauveria bassiana* را روی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* مورد ارزیابی قرار دادند و طبق نتایج آنها، بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک مربوط به فعالیت آنزیم‌های کیتینازی بود. Abdelaziz *et al*. (2018)، فعالیت آلکالین پروتئاز سه قارچ بیماریزای حشرات را روی شته *Metopolophium dirhodum* (walker) (Hemiptera: Aphididae) را مورد مطالعه قرار داده و نتایج آنها بیانگر فعالیت پروتئازی بالای قارچ *L. alfalfa* نسبت به *B.bassiana* و *Cladosporium cladosporioides* بود.

با توجه به اهمیت اقتصادی شته مومی کلم روی میزبان‌های مختلف گیاهی و بروز مقاومت به اغلب حشره‌کش‌های شیمیایی (Mahmoodi *et al*. 2020; Razmjou *et al*. 2019; Taheri- Sarhozaki & Safavi 2014)، تحقیق حاضر با هدف اثرات کشندگی (LC_{50}) و تعیین میزان کارایی حشره‌کش گیاهی بینو۲ و دو گونه از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات با مطالعه آنزیم‌های هیدرولیتیک تجزیه‌کننده کوتیکولی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و سم زدا صورت گرفت. چراکه علاوه بر تعیین میزان سمیت حاد و مزمن آنها روی حشرات آفت، با مطالعه آنزیم‌های گوارشی و آنزیم‌های سم زدا، نه‌تنها می‌توان از تغییرات فعالیت آنزیمی آگاهی پیدا کرد، بلکه از اطلاعات حاصله به عنوان راهکار کنترلی در جهت استفاده از مهارکننده‌های گیاهی، حساسیت و مقاومت آفت به حشره‌کش‌ها بهره جست.

روش‌شناسی پژوهش

کشت گیاه میزبان، پرورش شته مومی کلم و همسن سازی آنها

جهت کشت گیاه میزبان از بذرهای گیاه کلم سفید واریته (*Brassica oleracea* L. var. *capitate*) استفاده شد که بر روی ترکیبی از خاک باغچه، ماسه و خاکبرگ به‌ترتیب به نسبت ۳، ۱ و ۰/۵ استفاده شد (Mousavi 2022). جمعیت اولیه شته مومی کلم *B. brassicae* از مزارع کلم سفید مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه جمع‌آوری شد و پس از شناسایی (خانجانی، (Khanjani 2005)، بر روی گلدان‌های کلم کاشته شده در گلخانه رهاسازی شدند. حشرات جمع آوری شده، قبل از استفاده در آزمایش‌ها، به مدت ۳ نسل بر روی کلم پرورش داده شدند. برای همسن‌سازی شته‌ها، ۳۰ عدد حشره بالغ از کلنی اولیه جدا شده و روی بوته‌های کلم رهاسازی شدند. بعد از بیست و چهار ساعت بعد از پوره‌زایی، حشرات بالغ از بوته‌ها حذف شدند و بدین‌ترتیب پوره‌های یک‌روزه و همسن به‌دست آمد. این پوره‌ها پس از تبدیل شدن به حشرات بالغ یک‌روزه در آزمایش‌ها استفاده شدند. پرورش شته مومی کلم در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت (روشنایی: تاریکی) پرورش داده شدند (Mousavi *et al*. 2022).

تهیه و کشت ایزوله های قارچی بیماریزای حشرات

قارچ‌های استفاده شده در این مطالعه متعلق به گونه‌های *M. anisopliae* AB و *L. lecanii* 229 بودند. ایزوله‌های قارچ‌های *M. anisopliae* و *L. lecanii* به ترتیب از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و بخش حشره-شناسی دانشگاه تهران تهیه شده و در آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. کشت ایزوله‌ها به روش Musavi *et al*. (2022) انجام گرفت. بدین ترتیب که ایزوله‌ها در پتری‌دیش‌های ۸ سانتی‌متری روی محیط کشت سابرود دکستروز

آگار۸ کشت داده شدند و به مدت ۱۵ روز در انکوباتور با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی نگهداری شدند تا کنیدی‌زایی قارچ به اندازه کافی انجام گیرد. سپس برای تهیه سوسپانسیون کنیدیومی، کنیدیوم‌ها از سطح محیط کشت خراش داده شد و داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل که به آن ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ اضافه شده بود، ریخته شد. درب لوله‌ها بسته شده و به خوبی تکان داده شدند سپس از چند لایه پارچه ململ عبور داده شده تا میسیلیوم‌ها و احتمالا قطعات محیط کشت حذف شوند. برای تعیین تراکم اسپوری از نئوبار هموسایتومتر استفاده گردید و غلظت‌های موّرد نظر اسپوری از سوسپانسیون اصلی تهیه شدند (Mousavi *et al*. 2022).

زیست‌سنجی ایزوله‌های قارچی

پس از انجام آزمایشات مقدماتی و تهیه غلظت‌های مورد نظر کنیدیومی (10^{1}–10^{5}کنیدی/میلی‌لیتر)، از روش زیست‌سنجی غوطه‌ورسازی برگ‌های کلم برای ارزیابی میزان بیماری‌زایی گونه‌های قارچی استفاده گردید (Mousavi *et al*. 2022). برای این منظور، دیسک‌های برگی کلم به قطر ۷ سانتی‌متر تهیه شده و داخل بشر با گنجایش ۲۰۰ میلی‌لیتری به مدت ۱۰ ثانیه در ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدیومی غوطه‌ور شده، سپس به درون پتری دیش‌هایی با قطر ۸ سانتی‌متر که درب آن‌ها جهت تهویه سوراخ شده بود منتقل شدند. در مرحله بعد، تعداد ۱۵ عدد حشره کامل یک روزه هم سن شته مومی کلم روی برگ‌های تیمارشده کلم قرار داده شدند. برای تیمار شاهد در شرایط یکسان و تنها از ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل همراه با ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ استفاده شد. زیست‌سنجی برای هر یک از تیمارها و شاهد در ۴ تکرار و هر تکرار حاوی ۱۵ عدد حشره کامل شته مومی کلم انجام گرفت. پتری‌دیش‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره روشنایی ۸:۱۶ ساعت روشنایی/تاریکی نگه‌داری شدند. برای محاسبه LC_{50} از آمارگیری مرگ ومیر که ۶ روز بعد از تیمار به‌دست آمد، استفاده شد. ظروف مورد آزمایش به‌طور روزانه بررسی شدند و حشرات مرده از سایر حشرات جدا شدند. جهت اطمینان از مرگ ومیر حشرات تحت تاثیر عوامل بیماری‌زای قارچی، حشرات مرده داخل پتری حاوی کاغذ صافی استریل خیس شده قرار گرفته و مجموعه در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از آن پتری‌ها هر روز بررسی و در صورت مشاهده پوشش قارچی در سطح بدن حشرات به‌عنوان آلوده شده توسط قارچ محاسبه می‌شدند (Akbari *et al.* 2014).

زیست سنجی حشره کش بیولوژیکی بینو ۲

حشره‌کش بیولوژیکی بینو۲، از عصاره گیاه *S. flavescens* به صورت سوسپانسیون، از محصولات وارداتی شرکت رها اندیش کاوان و شرکت سازنده آن MR اینوویشن[4]کره جنوبی است. غلظت توصیه شده روی برچسب سم بینو۲ به عنوان معیاری برای مشخص کردن غلظت‌ها در نظر گرفته شد. جهت انجام زیست‌سنجی و تعیین ۵۰ درصد کشندگی (LC_{50}) از حشرات کامل یک روزه براساس روش Lashkari *et al*. (2007) استفاده شد. پس از انجام آزمایشات مقدماتی، غلظت‌هایی که در حشرات مورد آزمایش تلفات ۲۰–۸۰ درصد را ایجاد نمودند، برای زیست‌سنجی اصلی انتخاب شدند. از پنج غلظت (۱۵۰، ۱۸۵/۳۹، ۲۲۹/۱۳، ۲۸۳/۹۰ و ۳۵۰ میکرولیتر بر لیتر) برای تعیین۵۰ درصد کشندگی (LC_{50}) استفاده گردید. غوطه‌وری برگ در غلظت‌های مورد نظر روش زیست‌سنجی برای انجام آزمایشات بود. بدین منظور برگ‌های کلم، داخل غلظت‌های مذکور حاوی توییین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) به مدت ۱۰ ثانیه غوطه ور شدند. در تیمار شاهد نیز از آب مقطر و توییین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) استفاده شد. بدین ترتیب دیسک‌های برگی نیم ساعت (جهت خشک شدن قطرات سم)، پس از تیمار با هریک از غلظت‌ها،

1 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
2 Tween 80
3 Neubauer haemocytometer
4 Innovation

درون پتری دیش‌های هشت سانتی‌متری قرار گرفت. برای هر غلظت از ۶۰ عدد حشره کامل هم سن یک روزه استفاده شد(هر تیمار دارای ۴ تکرار و هر تکرار دارای ۱۵ عدد حشره). حشرات به کمک قلم مو روی دیسک‌های برگی رهاسازی شدند و پس از استقرار حشرات کامل شته‌ها روی دیسک‌ها، به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰±۱۰ درصد، دوره نوری ۸:۱۶ (روشنایی: تاریکی) منتقل شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت میزان تلفات با شمارش مرگ و میر آنها محاسبه گردید (استفاده از سوزن داغ و عدم بروز عکس العمل و عدم حرکت شته‌ها معیاری جهت مرگ و میر آنها بود). پس از انجام آزمایشات و داده‌برداری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 22 میزان ۵۰ درصد کشندگی (LC_{50}) محاسبه و در آزمایش‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی و آنزیم‌های سم‌زدا استفاده گردید (Robertson *et al*. 2007).

سنجش فعالیت آنزیم‌های شته مومی کلم *B. brassicae*

تهیه عصاره آنزیمی از حشرات کامل شته مومی کلم تیمار شده با سم بینو۲ و ایزوله های قارچی

برای تهیه عصاره آنزیمی شته مومی کلم تیمارشده با بینو۲ و ایزوله های قارچی جهت مطالعه آنزیم‌های گوارشی، آنزیم‌های سم‌زدا و آنزیم های هیدرولیتیک تجزیه کننده قارچی از روش های متفاوتی استفاده شد. بدین ترتیب که برای مطالعه آنزیم‌های گوارشی شته مومی کلم، کل بدن حشرات کامل شته مومی کلم زنده مانده پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت LC_{50} حشره‌کش بینو۲ با استفاده از هموژنایزر دستی همگن شده و سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمایی ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. مایع رونشین به‌عنوان منبع آنزیمی به میکروتیوب‌های جدید منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگه‌داری شدند (Shojaei *et al*. 2017; Hu *et al*. 2019).

به منظور اندازه گیری میزان فعالیت آنزیمی آنزیم‌های سم‌زدا، برای همگن‌سازی حشرات از بافر سدیم فسفات (۰/۱ مولار و pH 7) حاوی ترایتون X-100 به نسبت ۰/۱ درصد استفاده شد. سپس همگنه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند و رونشین‌ها به‌عنوان منبع آنزیم استفاده شد. در شاهد از آب مقطر حاوی ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ جهت تیمار حشرات کامل استفاده گردید.

برای مطالعه آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز ترشح شده توسط عوامل بیماری‌زای قارچی از روش (Murad *et al*. 2007) استفاده شد. بدین ترتیب که ایزوله‌های قارچی ابتدا در محیط کشت کامل به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شدند. جهت تهیه کوتیکول خشک شده حشرات کامل شته، ابتدا حشرات کامل شته‌ها در بافر سدیم فسفات (pH 7) شستشو داده شده، وبه داخل آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. سپس کوتیکول خشک شده با هاون چینی کاملا پودر گردید. جهت تهیه رونشین آنزیمی مقدار مشخصی از کوتیکول پودر شده به محیط کشت SDA ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی با غلظت کشنده ۵۰ درصد به محیط کشت حاوی کوتیکول خشک شده حشرات کامل شته‌ها اضافه شد. مخلوط حاصله بعد از گذشت شش روز، در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و رونشین به‌عنوان منبع آنزیم به‌کار رفت. بدین ترتیب کوتیکول خشک شده حشرات کامل شته در معرض عوامل بیماری‌زای قارچی جهت ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئازی و کیتینازی قرار گرفت.

تاثیر حشره‌کش بینو۲ بر فعالیت پروتئینازی کل

سنجش فعالیت پروتئینازی کل بر مبنای روش Elpidina *et al*. (2001) با کمی تغییرات و با استفاده از پروتئین آزوکازئین به عنوان سوبسترا صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل ۱۷/۵ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۲ درصد، ۴۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (۰/۱ مولار) و ۱۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی است که در حمام بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۰ دقیقه انکوبه شد. هضم پروتئینی با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۳۰ درصد (TCA) متوقف شد. آزوکازئین هیدرولیز نشده موجود در واکنش، با قرار دادن در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت بطور کامل رسوب داده شد و

مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. حجم برابر از هیدروکسید سدیم (۱ مولار) به ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رونشین اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت. هر یک از آزمایشات مربوط به تیمارهای مختلف در سه تکرار و دو بلانک برای هر تیمار انجام گرفت.

تاثیر حشره‌کش بینو۲ بر فعالیت سرین پروتئازها

سنجش فعالیت اندوپروتئاز تریپسین و کیموتریپسین به‌عنوان دو زیرگروه از سرین پروتئازها با استفاده از سوبسترای تخصصی BApNA[1] (به‌عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین) و SAAPFpN[2] (به‌عنوان سوبسترای اختصاصی کیمو تریپسین) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار انجام گرفت. واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر بافر تریس (۲۵ میلی‌مولار pH 8,) و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۳۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا آغاز شد (Oppert *et al*. 1997). مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد و در نهایت جذب به‌صورت زمان‌دار با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek ELX 808) در طول موج ۴۰۵ نانومتر مشخص گردید.

بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

برای همگن‌سازی حشرات از بافر فسفات سدیم (۰/۱ مولار و pH 7) حاوی ترایتون X-100 به نسبت ۰/۱ درصد استفاده شد. سپس همگنه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند و رونشین‌ها به‌عنوان منبع آنزیم استفاده شد. فعالیت استیل کولین استراز (AChE) با استفاده از روش ارائه شده توسط Ellman *et al*. (1961) با استفاده از استیل تیوکولین آیوداید [3]به‌عنوان سوبسترا، با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۴۰ میکرو لیتر از نمونه آنزیمی، ۱۴۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH 7)، ۴۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا (۱/۵ میلی‌مولار) و ۲۰ میکرولیتر محلول دی تیو بیس نیترو بنزوآت [4](DTNB) (۵ میلی‌مولار) به میکروپلیت اضافه شدند. میزان جذب نوری به‌صورت زمان‌دار در هر ۲ دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه با طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر تعیین شد. میزان پروتئین در نمونه‌های آنزیمی به وسیله روش Bradford (1976) تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون‌ــاس‌ــترانسفراز

برای آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی حشرات از بافر فسفات سدیم (۰/۰۲ مولار و pH 7) استفاده شد. سپس همگنه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند. سنجش فعالیت گلوتاتیون–S– ترانسفراز (GST) با استفاده از روش هبیگ [5] و همکاران (۱۹۷۴) با کمی تغییرات صورت گرفت. در هر چاهک از میکروپلیت، ۲۰ میکرولیتر از نمونه آنزیم به ۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی CDNB[6](۶۳ میلی‌مولار حل شده در متانول) و گلوتاتیون احیاشده GSH (۱۰ میلی‌مولار) با نسبت ۱:۲۰ اضافه شد. ارزیابی فعالیت GST با استفاده از تغییر در جذب نوری که در هر ۳۰ ثانیه به مدت ۵ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر اندازه‌گیری می‌شد، صورت گرفت. شیب خط رگرسیونی حاصل به‌عنوان فعالیت آنزیمی درنظر گرفته شد.

1Nα-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide
2N-succinyl-alanine-alanine- proline-phenylalanine-p-nitroanilide
3acetylthiocholine iodide
4Dithiobisnitro-benzyoat
5Habig
61-chloro-2,4-dinitrobenzene

سنجش آنزیم های کیتیناز و پروتئینازی

برای سنجش فعالیت کیتینازی از روش Leger (1991) استفاده شد. داخل هر چاهک پلیت ۹۶ تایی، ۸۰ میکرولیتر از بافر سیترات ۰/۱ مولار (pH 5) با ۱۰ میکرولیتر سوبسترای p-nitrophenyl-N-acetyl-B-Dglucosaminide ۱۰ میلی مولار ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر رونشین آنزیمی به آن اضافه گردید. برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفت. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر NaHCO3-Na2CO3 ۰/۵ مولار واکنش خاتمه یافت. جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد. غلظت p-nitrophenyl آزاد شده توسط منحنی استاندارد تخمین زده شد. یک واحد آنزیمی برابر با مقدار آنزیمی است که یک میکرومول p-nitrophenyl در یک دقیقه آزاد کند.

برای سنجش آنزیم‌های پروتئازی Pr1 و Pr2 از روش Leger *et al*. (1987) استفاده شد. برای آنزیم Pr1 و Pr2 به ترتیب از سوبستراهای N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide و Phenylalanine-valine-arginine-p-nitroanilide استفاده شد. پنجاه میکرولیتر از هر سوبسترا با غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار (حل شده در بافر تریس) با ۸۵۰ میکرولیتر از بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار با pH 8.5 مخلوط شده و ۱۰۰ میکرولیتر رونشین آنزیمی به آن اضافه شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت و واکنش با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰ درصد خاتمه یافت. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه داخل هر چاهک پلیت ۹۶ تایی ریخته شد و جذب نوری با سه تکرار برای هر تیمار در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر ثبت گردید. از ضریب جذب مولی ۸۸۰۰ (M^{-1} cm^{-1}) برای محاسبه غلظت نهایی پارانیتروآنیلین آزاد شده استفاده گردید (Gupta *et al*. 1992).

تجزیه داده‌ها

جهت تعیین ۵۰ درصد کشندگی (LC_{50}) حشره‌کش و قارچ‌های مورد آزمایش، در محدوده اطمینان ۹۵ درصد از برنامه پروبیت در نرم افزار SPSS ver 22 استفاده گردید. جهت برآورد میانگین و مقایسه آماری میانگین فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی در تیمارهای حشره‌کش بینو۲ و ایزوله‌های قارچی به ترتیب از آزمون‌های t-test و توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد در نرم افزار SPSS ver 22 استفاده گردید.

یافته‌های پژوهش

اثرات کشندگی ایزوله‌های قارچی و حشره‌کش بینو ۲روی شته مومی کلم *B. brassicae*

هر دو ایزوله قارچی مورد آزمایش در برابر شته‌های بالغ *B. brassicae* در غلظت‌های کنیدیایی استفاده شده بیماری‌زا بودند و نرخ مرگ و میر شته‌ها به غلظت کنیدیوم وابسته بود. براساس نتایج به‌دست آمده یک رابطه خطی بین غلظت کنیدیایی هر ایزوله قارچی و مرگ‌ومیر شته‌ها وجود داشت. مقادیر LC_{50} و LC_{90}، فواصل اطمینان و شیب خط ایزوله‌های قارچی و حشره‌کش بینو۲ مورد استفاده در برابر شته‌های بالغ در جدول ۱ نشان داده شده است. ایزوله *M. anisopliae* (AB) با LC_{50} ($۳/۲۱\times۱۰^{۲}$ کنیدیوم بر میلی‌لیتر) نرخ مرگ و میر بالایی را در شته‌های بالغ موجب شد و در مقابل *L. lecanii* (229) با LC_{50} ($۲/۷۲\times۱۰^{۸}$ کنیدیوم بر میلی‌لیتر) اثر حشره‌کشی ضعیفی را در برابر آفت مذکور از خود نشان داد (جدول ۱). سمیت بینو۲ در برابر *B. brassicae* در جدول ۱ نشان داده شده است. LC_{50} حشره‌کش گیاهی مذکور در برابر آفت مذکور برابر با ۲۴۷/۶۰ میکرولیتر بر لیتر موثر بوده است.

جدول ۱. مقادیر LC_{50} و LC_{90} برآورد شده بعد از ۶ روز و ۴۸ ساعت قرارگیری به ترتیب با ایزوله های قارچی و حشره کش بینو۲ روی حشرات کامل شته مومی کلم

تیمار		LC_{50} (حدود اطمینان ۹۵ ٪)	LC_{90} (حدود اطمینان ۹۵ ٪)	Slope ± S.E.	X^2(df)
ایزوله‌های قارچی	*M. anisopliae* (AB) (کنیدیوم بر میلی‌لیتر)	۳/۲۱×۱۰^{۲} (۲/۶×۶–۱۰^{۲}/۳۴×۱۰^{۳})	۱/۴۷×۱۰^{۵} (۴/۷۷×۵–۱۰^{۴}/۶۰×۱۰^{۵})	۰/۰±۴۸/۱۱	۳/۱۶ (۳)
	L. lecanii (229) (کنیدیوم بر میلی‌لیتر)	۲/۷۲×۱۰^{۸} (۵/۵۲×۵–۱۰^{۷}/۷۵×۱۰^{۹})	۱/۶۶×۱۰^{۱۲} (۴×۴–۱۰^{۱۰}/۴۲۵ E+۱۵)	۰/۰±۳۴/۰۶	۰/۷۰(۳)
حشره کش	بینو ۲ (میکرولیتر بر لیتر)	۲۴۷/۶۰ (۲۲۴/۲۷۶–۶۷/۱۰)	۴۸۱/۳۶ (۳۹۳/۷۱۵–۸۰/۸۸)	۴/۰±۴۴/۷۹	۲/۹۰(۳)

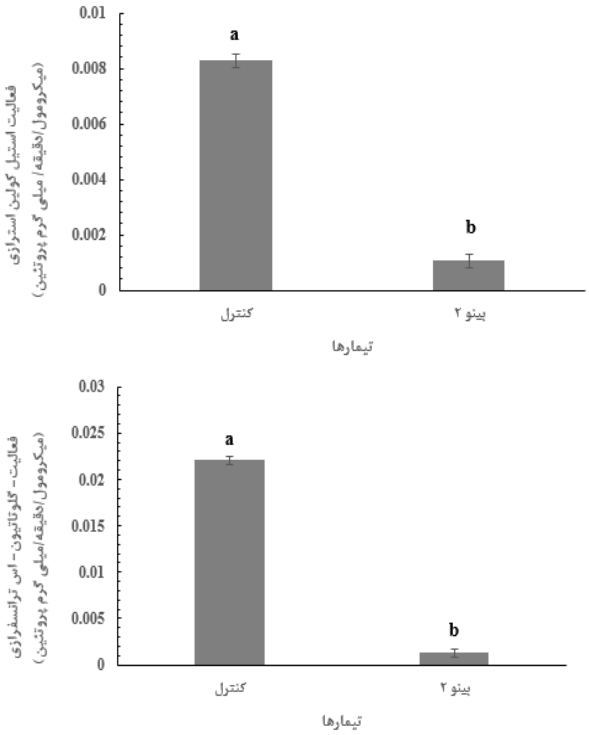
تاثیر حشره‌کش بینو۲ بر فعالیت پروتئازها و آنزیم‌های سم زدای شته مومی کلم

نتایج این تحقیق نشان داد که حشره‌کش بینو ۲، میزان پروتئین را در حشرات کامل شته مومی کلم تحت تاثیر قرار داد. براساس نتایج آزمون t (α =٪۵)، این اختلاف معنی‌دار است (جدول ۲). میانگین غلظت پروتئین حشرات کامل شته‌مومی کلم در تیمار شاهد (۱/۱۲±۰/۰۰۳ میلی‌گرم پروتئین/میلی‌گرم وزن حشرات کامل)، بیشتر از حشره‌کش بینو ۲ (۰/۰۲۷ ±۰/۰۸ میلی‌گرم پروتئین/میلی‌گرم وزن حشرات کامل)، بود. مقایسه فعالیت پروتئازی در pH بهینه با استفاده از سوبسترای عمومی آزوکازئین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون t انجام شده (α =٪۵) بین شاهد و بینو ۲ وجود دارد. کمترین میزان واحد فعالیت پروتئازی مربوط به شته‌های تیمار شده با حشره‌کش بینو ۲ (۰/۰۰۰۲ ± ۰/۰۰۷۶) میکرومول بر دقیقه و بیشترین آن مربوط به تیمار شاهد بود . فعالیت آنزیم های تریپسینی و کیموتریپسینی در حشرات تیمارشده با حشره‌کش بینو۲ کمتر از تیمار شاهد به دست آمد. نتایج آزمون t انجام شده (α =٪۵) نشان داد که بین میانگین فعالیت آنزیم‌های مذکور بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

همان طوری‌که از شکل۱ مشخص است، میزان فعالیت استیل‌کولین‌استرازی وگلوتاتیون–اس‌ترانسفرازی حشرات کامل شته مومی‌کلم تحت تاثیر حشره‌کش بینو۲ و تیمار شاهد قرارگرفت و بر اساس نتایج آزمون t انجام شده (α =٪۵)، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد (شکل ۱). کمترین و بیشترین میزان فعالیت استیل‌کولین‌استرازی در حشرات کامل شته مومی‌کلم به ترتیب مربوط به تیمار حشره‌کش بینو ۲ (۰/۰۰۰۳ ±۰/۰۰۱۱میکرومول/دقیقه/میلی‌گرم پروتئین) و شاهد بود (۰/۰۰۰۲ ۰/۰۰۸± میکرومول/دقیقه/ میلی‌گرم پروتئین). از نظر میزان فعالیت براساس آزمون t انجام شده (α =٪۵) اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر میزان فعالیت گلوتاتیون–اس ترانسفرازی وجود دارد. میزان فعالیت گلوتاتیون–اس ترانسفراز، در حشرات تیمارشده با حشره‌کش بینو۲ (۰/۰۰۰۶ ±۰/۰۰۱۴ میکرومول/دقیقه/ میلی‌گرم پروتئین) کمتر از تیمار شاهد (۰/۰۰۰۳ ۰/۰۲۲± میکرومول/دقیقه/ میلی‌گرم پروتئین) مشاهده گردید.

جدول۲. میانگین غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، تریپسیناز و کیموترپسیناز) شته مومی کلم تحت تاثیر حشره‌کش بینو۲

پارامتر	تیمار	تعداد	میانگین	F	Sig	t	df	Sig
غلظت پروتئین (mg protein/mg of adults)	شاهد	۳	۱/۱۲	۱/۵۳	۰/۲۸۴	۵/۳۸۰	۴	۰/۰۱۲
	بینو۲	۳	۰/۰۸					
فعالیت پروتئازی (µmol/min/mg)	شاهد	۳	۰/۰۰۸۶	۳/۳۷۹	۰/۱۴۰	۳/۰۵۱	۴	۰/۰۴۸
	بینو۲	۳	۰۰۷۶۰					
فعالیت تریپسینازی (µmol/min/mg)	شاهد	۳	۰/۱۳۳۵	۶/۶۰۲	۰/۰۶۲	-۲/۰۹۰	۴	۰/۰۳۶
	بینو۲	۳	۰/۰۹۹					
فعالیت کیموتریپسینازی (µmol/min/ mg)	شاهد	۳	۰/۱۶۰	۰/۲۵۵	۰/۶۴۰	۰/۷۸۷	۴	۰/۰۴۷
	بینو۲	۳	۰/۱۱۵					



شکل ۱. تاثیر حشره‌کش بینو ۲ بر فعالیت آنزیم های استیل کولین استراز و گلوتاتیون- اس ترانسفراز شته مومی کلم

تاثیر ایزوله‌های قارچی *M.anisopliae* AB و *L. lecanii* 229 بر فعالیت پروتئازی و کیتینازی شته مومی کلم

مقایسه فعالیت ویژه در pH بهینه ۹ با استفاده از سوبستراهای تخصصی تریپسین (F=4.58; df=2,6; P=0.038) و کیمو تریپسین (F=0.48; df=2,6; P=0.704) تحت تاثیر تیمارهای مورد مطالعه، بیانگر تاثیر معنی‌دار تیمارهای مختلف بر روی فعالیت تریپسینی بوده است، درحالی که فعالیت ویژه کیموتریپسینی تحت تاثیر تیمارهای مختلف به‌طور معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین میزان فعالیت تریپسین مربوط به تیمار *M. anisopliae* AB (۰/۰۲۳۶ ± ۰/۱۵۹۵) و کمترین مربوط به تیمار *L. lecanii* 229 (۰/۰۰۲۷ ± ۰/۰۶۶۵) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۴). مقایسه فعالیت کیتینازی با استفاده از سوبسترای تخصصی (F=3.21; df=2,6; P=0.021) بیانگر تاثیر معنی‌دار تیمارهای مختلف بر روی فعالیت کیتینازی بوده است. بیشترین میزان فعالیت کیتینازی مربوط به تیمار *M. anisopliae* AB (۰/۰۰۲۵ ± ۰/۱۷۲۲) و کمترین مربوط به تیمار شاهد (۰/۰۰۲۱ ± ۰/۰۰۸۰) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۳).

جدول ۳. میانگین ± خطای معیار فعالیت پروتئاز و کیتیناز شته مومی کلم تحت تاثیر تیمارهای مختلف ایزوله های قارچی

تیمارها	فعالیت پروتئاز (µmol/min/mg)	تریپسین (Pr2) (µmol/min/mg)	کیموتریپسین (Pr1) (µmol/min/mg)	کیتیناز (µmol/min/mg)
شاهد	۰/۰۰۸۷ ± ۰/۰۰۰۳ ab	ab ۰/۰۹۹۹ ± ۰/۰۰۷۹	a ۰/۱۵۵۹ ± ۰/۰۳۳۷	c ۰/۰۰۸۰ ± ۰/۰۰۲۱
L. lecanii 229	۰/۰۱۰۶± ۰/۰۰۰۵ a	b۰/۰۶۶۵ ± ۰/۰۰۲۷	a ۰/۱۲۲۵± ۰/۰۲۷۵	b ۰/۰۱۱۲ ± ۰/۰۰۴۱
M. anisopliae AB	۰/۰۱۰۷± ۰/۰۰۰۹ a	a ۰/۱۵۹۵ ± ۰/۰۲۳۶	a ۰/۰۹۴۱± ۰/۰۴۵۲	a ۰/۱۷۲۲ ± ۰/۰۰۲۵

حروف غیرمشابه در هر ستون نمایان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها بین تیمارها در سطح احتمال آماری ۵ درصد است.

بحث

در این تحقیق، تاثیر حشره کش بینو ۲ و ایزوله های قارچی *M. anisopliae* AB و *L. lecanii* 229 بر آنزیم‌های گوارشی، آنزیم‌های سم‌زدا و آنزیم‌های کیتینازی شته مومی کلم جهت تعیین میزان حساسیت آن نسبت به عوامل مورد استفاده، مورد ارزیابی قرار گرفت.

در مطالعات انجام شده بر روی آفت‌کش‌های بیولوژیک با منشا گیاهی، اثرات متفاوتی بر حشرات آفت داشته‌اند. این ترکیبات با مهار فعالیت آنزیمی، کاهش رشد حشره، بازدارندگی تغذیه‌ای، مهار فیزیولوژی تغذیه‌ای و کاهش تخم‌ریزی، در کاهش جمعیت حشرات آفت مشارکت دارند (Senthil-Nathan 2013; Thirumurugan *et al*. 2018). بازدارنده‌های پروتئینی موجود در گیاهان، با مهار فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات، می‌توانند منجر به تاخیر در رشد، کاهش وزن یا اندازه بدن و نهایتا کاهش بازدهی تغذیه‌ای حشره شوند (Mehrabadi *et al*. 2012).

حشره‌کش بینو۲ به‌عنوان یک حشره‌کش گیاهی ، با تامین اسیدهای آمینه ضروری برای رشد و نمو بهتر گیاه، منجر به افزایش مقاومت گیاهان در برابر خسارت ناشی از حشرات مکنده می‌شود. همچنین، حشره‌کش بینو۲ اثرات ضدتغذیه‌ای داشته و با ممانعت از تغذیه حشرات آفت، باعث مرگ‌ومیر آن‌ها می‌شود. جهت اثبات این موضوع، اقدام به مطالعه اثر حشره‌کش بینو ۲ بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی شته مومی کلم گردید. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، حشره‌کش بینو۲ با منشا گیاهی و از عصاره ریشه تلخه بیان اثرات حشره‌کشی قابل توجهی را در برابر *B. brassicae* نشان می‌دهد. نتایج ارائه شده در این تحقیق اولین گزارش علمی در رابطه با کشندگی حشره‌کش بینو۲ روی *B. brassicae* می‌باشد. یافته‌های حاصل از این تحقیق موید این واقعیت بود که حشره‌کش بینو ۲ با کاهش غلظت پروتئین و فعالیت پروتئازهای گوارشی، مانع از فرآیند هضم مواد غذایی خورده شده توسط حشره شده، به‌طوری که با کاهش فعالیت آن‌ها، منجر به تلفات شته مومی کلم شده است. اغلب مطالعات انجام شده بر روی گیاه تلخه بیان، *S.flavescens*، اثرات حشره‌کشی و ترکیب موثر آن (ماترین) را بر روی آفات زننده- مکنده نظیر شته پنبه، *A. gossypii* (Saleem *et al*. 2019)، کنه‌های تارتن دولکه ای و کنه قرمز اروپایی

Panonychus ulmi Koch (Acari: Tetranychidae) را مورد مطالعه قرار داده اند (Marcic *et al*. 2012) ولی اطلاعات آنزیمی در رابطه با حشره‌کش گیاهی مذکور وجود ندارد. به موازات یافته‌های این تحقیق، اثرات مهارکنندگی عصاره گیاهی لوبیا قرمز، باعث کاهش فعالیت آنزیم گوارشی آلفا آمیلازی شته مومی کلم شده است (Sabeghi Khosroshahi *et al*. 2021). بازدارندگی تغذیه‌ای ترکیبات گیاهی بر روی آفات پروانه‌ای نظیر *Spodoptera frugiperda* (Bogorni & Vendramim 2005)، *S. exigua* (Caballero *et al*. 2008)، *Plutella xylostella* (Krishna-Kumari *et al*. 2003) و *Pieris brassicae* (Qi *et al*. 2003) به اثبات رسیده است.

ترکیبات حشره‌کش با منشا گیاهی، علاوه بر تاثیر منفی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، اغلب موجب مهار آنزیم‌های سم‌زدا مثل استیل کولین استراز (Yeom *et al*. 2012)، گلوتاتیون اس–ترانسفراز (Li *et al*. 2013) و سیستم مونواکسیژناز (Haouas *et al*. 2012) و یا مهارکانال‌های کلر، سدیم، گیرنده‌های اکتاپامین، گیرنده‌های تیرامین، گیرنده‌های استیل کولین نیکوتینیک (nAChR) (Prates *et al*. 1998; Tong 2010; Ziaee *et al*. 2014) می‌شوند. در این تحقیق نیز، در نتیجه مهار گیرنده استیل کولین و کاهش فعالیت آنزیم کولین‌استرازی و کاهش فعالیت آنزیم سم‌زدای گلوتاتیون اس– ترنسفراز توسط حشره‌کش بینو۲ حساسیت حشره نسبت به آن افزایش یافته و منجر به افزایش مرگ و میر حشره گردید. بنابراین یکی دیگر از دلایل مرگ ومیر حشره مذکور را می‌توان به مهار آنزیم‌های سم‌زدای آفت مذکور نسبت داد. همچنین، براساس مطالعه‌ی Abdelaal *et al*. (2021)، کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در شته *Aphis craccivora* تحت تاثیر نانوامولسیون ریحان *Basilicum ocimum* Basil، زیره سبز *Cuminum cyminum* L.، مرزنجوش *Origanum marjorana* L. و بابونه *Matricaria chamomilla* L. مشاهده شد. اگرچه در برخی مطالعات، افزایش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در جمعیت‌های مقاوم و پلی‌فاژ حشرات گزارش شده است. به‌طوریکه نتایج تحقیقات Pan *et al*. (2013) بیانگر القا آنزیم‌های سم‌زدا در سفیدبالک پنبه نسبت به واریته‌های تراریخته پنبه بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در حشرات پلی فاژ، نوعی مکانیسم دفاعی حشره در جهت کاهش فعالیت آللوکمیکال‌های گیاهی در جهت سازش با تغییر میزبان گیاهی است (Bandani 2013; Gunderson *et al*. 2018).

یکی از شاخص‌های ارزیابی میزان بیماریزایی عوامل قارچی حشرات، بررسی نوع و میزان آنزیم‌های دخیل در فرایند تجزیه کوتیکول میزبان می‌باشد. قارچ‌های بیماری‌زای حشرات ، با افزایش فعالیت پروتئازی و کیتینازی جهت نفوذ به کوتیکول حشرات میزبان استفاده می‌کنند (Jeong *et al*. 2023). بنابراین پروتئازها در قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به‌طور قابل توجهی در تخریب کوتیکول نقش دارند (Chui-Chai *et al*. 2012). به‌طوریکه این قارچ‌ها، پس از شکستن اپی‌کوتیکول توسط لیپاز ها، مقادیر زیادی کیموتریپسین (Pr1) تولید می‌کنند. کیموتریپسین (Pr1) و تریپسین (Pr2) از مهم‌ترین پروتئازها هستند که منجر به تجزیه پروتئین‌های کوتیکول شده و نقش حیاتی آن‌ها در نفوذ از کوتیکول مشخص شده است (Liu et al. 2007; Dias *et al*. 2008). بنابراین وجود Pr1 در قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به عنوان یک شاخص بیماری‌زایی در نظر گرفته می‌شود (Castellanos-Moguel et al. 2007). گزارشات نشان داده است که ایزوله‌های مختلف قارچ‌های بیماری‌زای حشرات ممکن است مقادیر متفاوتی از پروتئازهای تجزیه کننده کوتیکول تولید کنند (Pinto *et al*. 2002; Revathi *et al*. 2011).

نتایج اثرات کشندگی مطالعه حاضر با استفاده از عوامل بیماری‌زای قارچی نشان داد که ایزوله *M. anisopliae* AB علیه حشره بالغ *B. brassicae* موثرتر از ایزوله *L. lecanii* 229 بود. نتایجی که مرگ‌ومیر قابل توجهی را در غلظت‌های پایین کنیدیایی نشان می‌دهند از نظر اقتصادی جالب‌توجه هستند و می‌توانند به‌عنوان عامل امیدبخش در برنامه‌های کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه عملکرد ایزوله *L. lecanii* 229 بسیار کند بوده و رضایت‌بخش نبود. علت قدرت بیماریزایی بالای ایزوله *M. anisopliae* AB نسبت به *L. lecanii* 229 را می‌توان به افزایش فعالیت پروتئازی و کیتینازی آن نسبت داد. ایزوله‌هایی که فعالیت پروتئازی بالایی دارند انتظار می‌رود که بیماری‌زایی بالایی نیز نسبت به میزبانشان نشان

دهند. اثربخشی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات جهت کنترل *B. brassicae* قبلا گزارش شده است (Akbari *et al*. 2014; Akbari *et al*. 2020; Mousavi *et al*. 2022). در مطالعه‌ای Wu *et al*. (2010)، افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ *M. anisopliae* منجر به افزایش مرگ‌ومیر لارو و کاهش درصد شفیرگی *Plutella xylostella* L. شدند. در پژوهشی دیگر، Revathi *et al*. (2011) به این نتیجه رسیدند که قارچ *M. anisopliae* آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز و لیپاز بالاتری نسبت به گونه‌های دیگر قارچی تولید می‌کند که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر فعالیت بالای کیتینازی و پروتئازی *M. anisopliae* با زهراگینی بالا نسبت به *L. lecanii* مطابقت دارد. همچنین در تحقیقی دیگر Zare *et al*. (2014) تنوع بالایی را در فعالیت پروتئولیتیکی و بیماری‌زایی ایزوله‌های قارچی به اثبات رساندند. این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر به لحاظ وجود تنوع در فعالیت‌های پروتئازی در بین ایزوله‌های قارچی مطابقت داشته‌اند. Elhakim *et al*. (2020) نشان دادند که همبستگی مثبتی بین فعالیت پروتئازی و بیماری‌زایی ایزوله‌ها وجود دارد. به‌طوری‌که ایزوله‌هایی که دارای بیشترین فعالیت پروتئازی بودند ،خاصیت کشندگی بالایی نیز روی *Tetranychus urticae* داشتند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشته است. اگرچه، Derakhshan *et al*. (2007) گزارش کردند که، چهار ایزوله *L. lecanii* بیماری‌زایی بالاتری را در بین ۲۵ ایزوله تست شده از قارچ‌های مختلف روی *B. brassicae* نشان دادند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر *L. lecanii* ایزوله ۴۱۱۸۵ بالاترین بیماری‌زایی را در برابر دو آفت *M. persicae* و *A. gossypii* با مقادیر کنترلی نزدیک ۱۰۰ درصد نشان داد (Vu *et al*. 2007). تفاوت در بیماری‌زایی می‌تواند به‌دلیل تنوع ژنتیکی ایزوله‌های قارچی و همین‌طور تفاوت در نوع میزبان حشره و نواحی جغرافیایی ایجاد گردد (Suwannakut *et al*. 2005).

Ferreira *et al*. (2021) با تعیین میزان پروتئازهای مترشحه توسط ایزوله *M. robertsii*، به موثر بودن آن علیه لاروهای پشه مصری *Aedes aegypti* L. پی بردند. علاوه بر این Keppanam *et al*. (2017) عملکرد پروتئازهای سه ایزوله *M. anisopliae* را در برابر لارو *Galleria mellonella* F. مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که با افزایش فعالیت آنزیمی، درصد تلفات لاروها نیز افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، ایزوله *M. anisopliae* (AB) کشندگی بسیار بالایی در مقایسه با *L. lecanii* (229) در برابر *B. brassicae* نشان داد. همچنین حشره‌کش بینو۲ نیز با منشا گیاهی و از عصاره ریشه تلخه بیان اثرات حشره‌کشی قابل توجهی داشته است. عوامل مورد بررسی در این تحقیق با مکانیسم‌های متفاوت، بر پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی شته مومی کلم اثر سوئ دارند، به‌طوریکه کاهش میزان پروتئین و کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی شته مومی کلم را می‌توان به اثر ضدتغذیه‌ای و مهار آنزیم‌های گوارشی حشره‌کش بینو۲ ربط داد. همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا نیز موید مهار فعالیت گیرنده‌های مربوطه در نتیجه استفاده از حشره‌کش بود. از طرفی دیگر ایزوله قارچی *M. anisopliae* AB، با ترشح بیشتر آنزیم‌های هیدرولیزکننده کوتیکولی ازجمله پروتئازها و کیتینازها باعث مصرف بیشتر پروتئین و کیتین کوتیکول شده و شته را نسبت به نفوذ این عوامل حساستر می‌کند. در نهایت بررسی تغییرات سایر آنزیم‌های حشره مورد نظر تحت تاثیر تیمارهای مورد آزمایش جهت پایش هرچه بیشتر تغییرات فیزیولوژیکی در حشره آفت توصیه می گردد. با مطالعه سازگاری حشره کش بینو۲ با عوامل بیماریزایی قارچی مطالعه شده در این پژوهش و اثرات کشندگی و زیرکشندگی آنها بر روی دشمنان طبیعی شته مومی کلم می‌توان به اطلاعات جامعی در جهت مدیریت آن دست یافت.

منابع

اصغرنژاد، شیوا (۱۳۹۹). مقایسه‌ی اثر زیر کشندگی دو سم بینو۲ و فلونیکامید بر فراسنجه‌های دموگرافی شته مومی کلم *Brevicoryne*

(Hem.:Aphididae) *brassicae* در شرایط آزمایشگاهی. *پایان‌نامه کارشناسی ارشد*. به‌راهنمایی فریبا مهرخو. ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکدهٔ کشاورزی.

حسینی نوه، وحید و قدمیاری، محمد (۱۳۹۲). *مبانی و مفاهیم روش‌های آزمایشگاهی در بیوشیمی، فیزیولوژی و سم‌شناسی حشرات*. چاپ اول. تهران: موسسه انتشارات دانشگاه تهران.

خانجانی، محمد (۱۳۸۴). *آفات گیاهان زراعی ایران*. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. همدان. چاپ اول. ۴۶۷ صفحه.

خرمی، فرشته (۱۳۹۷). ارزیابی کارایی عصاره‌های متانولی گیاهان زنیان و رازیانه با سه گونه متفاوت از قارچ‌های بیماریزای حشرات با راهکارهای نانوفرمولاسیون جهت کنترل بید سیب‌زمینی. *رساله دکتری*. به راهنمایی فریبا مهرخو. ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکدهٔ کشاورزی.

رشادت سلوانق، نازی (۱۴۰۰). بررسی اثرات زیرکشندگی فلونیکامید و بینو۲ روی فراسنجه‌های رشد جمعیت *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *پایان‌نامه کارشناسی ارشد*. به‌راهنمایی فریبا مهرخو. ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکدهٔ کشاورزی.

موسوی، مهدیه. (۱۴۰۱). تاثیر سه گونه قارچ بیمارگر حشرات و سم بینو۲ بر برخی ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی شته مومی کلم، *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). *رساله دکتری*. به راهنمایی فریبا مهرخو. ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکدهٔ کشاورزی.

REFERENCES

Abdelaal, K., Essawy, M., Quraytam, A., Abdallah, F., Mostafa, H., Shoueir, K., ... & Hafez, Y. (2021). Toxicity of essential oils nanoemulsion against *Aphis craccivora* and their inhibitory activity on insect enzymes. *Processes*, *9*(4), 624. https://doi.org/10.3390/pr9040624.

Abdelaziz, O., Senoussi, M. M., Oufroukh, A., Birgücü, A. K., Karaca, I., Kouadri, F., Naima, B., & Bensegueni, A. (2018). Pathogenicity of three entomopathogenic fungi, to the aphid species, *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae), and their Alkaline protease activities. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *28*, 24. https://doi.org/10.1186/s41938-018-0030-7.

Akbari, S., Ali Safavi, S., & Ghosta, Y. (2014). Efficacy of Beauveria bassiana (Blas.) Vuill. against cabbage aphid Brevicoryne brassicae L.(Hem.: Aphididae) in laboratory condition. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *47*(12), 1454-1458. https://doi.org/10.1080/03235408.2013.845972.

Akbari, S., Mirfakhraie, S., Aramideh, S., & Safaralizadeh, M. H. (2020). Effect of fungal isolates and imidacloprid on cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* and its parasitoid *Diaeretiella rapae*. *Zemdirbyste-Agriculture*, *107*(3), 255-262. https://doi.org/10.13080/z-a.2020.107.033.

Alves, E. A., Schmaltz, S., Tres, M. V., Zabot, G. L., Khun, R. C., & Mazutti, M. A. (2020). Process development to obtain a cocktail containing cell-wall degrading enzymes with insecticidal activity from *Beauveria bassiana*. *Biochemical Engineering Journal*, *156*, 107484. https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107484.

Asgharnezhad, S. (2021). Comparison the sublethal effect of Bino2 and Flonicamid on demographic parameters of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (Hem.: Aphididae) in laboratory conditions. MSc. Thesis. Urmia University. pp: 57. (In Persian).

Bandani, A. R. (2013). *Insect physiology*, Tehran: Tehran University Press. (In Persian).

Bidochka, M. J., & Meltzer, M. J. (2000). Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1A, Pr1B, and Pr1C) from Metarhizium strains. *Canadian Journal of Microbiology*, *46*(12), 1138–1144. https://doi.org/10.1139/w00-112.

Bogorni, P. C., & Vendramim, J. D. (2005). Sublethal effect of aqueous extracts of *Trichilia* spp. on *Spodoptera frugiperda* (JESmith) (Lepidoptera:Noctuidae) development on maize. *Neotropical Entomology*, *34*, 311–317. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000200020.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Briggs, L. L., Colwell, D. D., & Wall, R. (2006). Control of the cattle louse *Bovicola bovis* with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Veterinary Parasitology*, *142*(3-4), 344-349. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.018.

Bullangpoti, V., Visetson, S., Milne, J., Milne, M., Sudthongkong, C., & Pronbanlualap, S. (2007). Effects of alpha-mangostin from mangosteen pericarp extract and imidacloprid on *Nilaparvata lugens* (Stal.) and non-target organisms: toxicity and detoxification mechanism. *Journal of Applied Sciences*, *72*(3), 431-441.

Caballero, C., López-Olguín, J., Ruiz, M., Ortego, F., & Castañera, P. (2008). Antifeedant activity and effect of terpenoids on detoxication enzymes of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Spanish Journal of Agricultural Research*, *6*, 177–184. http://dx.doi.org/10.5424/sjar/200806S1-386.

Castellanos-Moguel, J., González-Barajas, M., Mier, T., Reyes-Montes, M. R., Aranda, E., & Toriello, C. (2007). Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista Iberoamericana de Micología*, *24*(1), 62-68.

Charnley, A. K. (2003). Fungal Pathogens of Insects: Cuticle Degrading Enzymes and Toxins. *Advances in Botanical Research*, *40*, 241- 321. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)40006-3.

Chitgar, M. G., Hajizadeh, J., Ghadamyari, M., Karimi-Malati, A., Sharifi, M., & Hoda, H. (2014). Cellular energy allocation in the predatory bug, *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), following sublethal exposure to diazinon, fenitrothion, and chlorpyrifos. *Journal of Plant Protection Research*, *54*(1), 78-84. https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0012.

Chui-Chai, N., Krutmuang, P., Nalumpang, S., Mekchay, S., Khanongnuch, C., & Chanbang, Y. (2012). Insecticidal activity and cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *CMU Journal of Natural Sciences*, *11*(1), 147-155.

Dáder, B., Then, C., Berthelot, E., Ducousso, M., Ng, J. C. K., & Drucke, M. (2017). Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect Science*, *24*(6), 929-946. https://doi.org/10.1111/1744-7917.12470.

Derakhshan, A., Rabindra, R. J., & Ramanujam, B. (2007). Efficacy of different isolates of entomopathogenic fungi against *Brevicoryne brassicae* (linnaeus) at different temperatures and humidities. *Journal of Biological Control*, *21*(1), 65-72.

Dias, B. A., Neves, P. M. O. J., Furlaneto-Maia, L., & Furlaneto, M. C. (2008). Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*, 301-306. https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200019.

Elhakim, E., Mohamed, O., & Elazouni, I. (2020). Virulence and proteolytic activity of entomopathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *30*(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/s41938-020-00227-y.

Ellis, P. R., Kift, N. B., Pink, D. A. C., Jukes, P. L., Lynn, J., & Tatchell, G. M. (2000). Variation in resistance to the cabbage aphid (*Brevicoryne brassica*) between and within wild and cultivated brassica species. *Genetic Resources and Crop Evaluation*, *47*, 395-401.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*, 88-95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9.

Elpidina, E. N., Vinokurov, K. S., Rudenskaya, Y. A., Dunaevsky, Y. E., & Zhuzhikov, D. P. (2001). Proteinase inhibitors in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology, Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, *48*(4), 217-222. https://doi.org/10.1002/arch.10001.

Farahani, S., Bandani, A. R., & Amiri, A. (2020). Toxicity and repellency effects of three essential

oils on two populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Persian journal of acarology*, *9*(1). https://doi.org/10.22073/pja.v9i1.55853.

Ferreira, J. M., Pinto, S. M. N., & Soares, F. E. F. (2021). *Metarhizium robertsii* protease and conidia production, response to heat stress and virulence against *Aedes aegypti* larvae. *AMB Express*, *11*, 166. https://doi.org/10.1186/s13568-021-01326-1.

Gholamzadeh-Chitgar, M., Hajizadeh, J., Ghadamyari, M., Karimi-Malati, A., & Hoda, H. (2015). Effects of sublethal concentration of diazinon, fenitrothion and chlorpyrifos on demographic and some biochemical parameters of predatory bug, *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) in laboratory conditions. *International Journal of Pest Management*, *61*(3), 204-211. https://doi.org/10.1080/09670874.2015.1035772.

Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2005). The insects: An outline of entomology. 3rd ed. Blackwell.

Gunderson, M. P., Nguyen, B. T., Cervantes Reyes, J. C., Holden, L. L., French, J., Smith, B. D., & Lineberger, C. (2018). Response of phase I and II detoxification enzymes, glutathione, metallothionein and acetylcholine esterase to mercury and dimethoate in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Chemosphere*, *208*, 749–756. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.183.

Gupta, S. C., Leaters, T. D., El-Sayed, G. N., & Ignoffo, C. M. (1992). Insect cuticle degrading enzyes from the entomogenous fungus *Baeuveria bassiana*. *Experimental Mycology*, *16*, 132-137. https://doi.org/10.1016/0147-5975(92)90019-N.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jacoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, *249*, 7130-7139. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8.

Hall, R. A. (1981). The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. *Microbial Control of Pests and Plant Disease*, Academic press, London.

Haouas, D., Cioni, P. L., Halima-Kamel, M. B., Flamini, G., & Hamouda, M. H. B. (2012). Chemical composition and bioactivities of three Chrysanthemum essential oils against *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Pest Science*, *85*, 367-379.

Hosseininaveh, V., & Ghadamyari, M. (2013). *Principles and Concepts of Experimental Methods in Insect Biochemistry, Physiology and Toxicology*, Tehran: Tehran University Press. (In Persian).

Hu, J., Wang, W., Dai, J., & Zhu, L. (2019). Chemical composition and biological activity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Artemisia brachyloba* essential oil. *Industrial Crops & Products*, *128*, 29-37. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.076.

Hussain, A., Rizwan-ul-Haq, M., Al-Ayedh, H., & AlJabr, A. M. (2016). Susceptibility and immune defence mechanisms of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) against entomopathogenic fungal infections. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(9), 1518. https://doi.org/10.3390/ijms17091518.

Hussain, A.; Tian, M. Y.; He, Y. R.; Bland, J. M., & Gu, W. X. (2010). Behavioral and electrophysiological responses of *Coptotermes formosanus* Shiraki towards entomopathogenic fungal volatiles. *Biological Control*, *55*, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.08.009.

Hussain, S., Masud, T., & Ahad, K. (2002). Determination of pesticides residues in selected varieties of mango. *Pakistan Journal of Nutrition*, *1*(1), 41-42.

Jarrahi, A., & Safavi, S. A. (2016). Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* on life table parameters of *Habrobracon hebetor* parasitizing *Helicoverpa armigera* larvae at different time intervals. *BioControl*, *61*(2), 167–175. https://doi.org/10.3923/pjn.2002.41.42.

Jeong, G. J., Khan, F., Tabassum, N., & Kim, Y. M. (2023). Chitinases as key virulence factors in microbial pathogens: Understanding their role and potential as therapeutic targets. *International Journal of Biological Macromolecules*, *249*, 126021. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126021.

Kassa, A., Zimmermann, G., Stephan, D., & Vidal, S. (2002). Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncates* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to entomopatogenic fungi from Ethiopia. *Biocontrol Science and Technology*, *12*, 727- 736. https://doi.org/10.1080/0958315021000039905.

Keppanam, R., Sivaperumal, S., Kanta, D. C., Akutse, K. S., & Wang, L. (2017). Molecular docking of protease from *Metarhizium anisopliae* and their toxic effect against model insect *Galleria mellonella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *138*, 8–14. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.01.013.

Khanjani, M. (2009). *Field Crop Pests in Iran*. Bu-Ali Sina University Press. Hamedan. First edition. p. 467. (In Persian).

Khorrami, F. (2018). Efficacy of *Trachysperum ammi* and *Foeniculum vulgare* methanolic extracts with three different entomopathogenic fungi by nanoformulation approaches against the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zeller. Phd. Thesis. Urmia University. pp: 111. (In Persian).

Kim, C. S., Lee, J. B., Kim, B. S., Nam, Y. H., Shin, K. S., Kim, J. W., ... & Kwon, G. S. (2014). A technique for the prevention of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* M130. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(1), 1-7. https://doi.org/10.4014/jmb.1306.06033.

Klowden, M. J. (2002). *Physiological systems in insects*, San Diego, California: Academic Press.

Krishna-Kumari, G., Aravind, S., Balachandran, J., Ganesh, M., Soundarya Devi, S., & Rajan, S. (2003). Antifeedant *neo*- clerodanes from *Teucrium tomentosum* Heyne (Labiatae). *Phytochemistry*, *64*, 1119–1123. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00510-7.

Kumral, N. A., Gencer, N. S., Susurluk, H., & Yalcin, C. (2011). A comparative evaluation of the susceptibility to insecticides and detoxifying enzyme activities in *Stethorus gilvifrons* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Panonychus ulmi* (Acarina: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, *37*(3), 255-268. https://doi.org/10.1080/01647954.2010.514289. Lashkari, M. R., Sahragard, A., & Ghadamyari, M. (2007). Sublethal Effects of Imidacloprid and Pymetrozine on Population Growth Parameters of Cabbage Aphid, *Brevicoryne brassicae* on Rapeseed, *Brassica napus* L. *Journal of Insect Science*, *14*, 207-212. https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2007.00145.x.

Li, S. G., Li, M. Y., Huang, Y. Z., Hua, R. M., Lin, H. F., He, Y. J., Wei, L. L., & Liu, Z. Q. (2013). Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. *Journal of Pest Science*, *86*, 677-683.

Liu, S. Q., Meng, Z. H., Yang, J. K., Fu, Y. K., & Zhang, K. Q. (2007). Characterizing structural features of cuticle-degrading proteases form fungi by molecular modeling. *BMC Structural Biology*, *7*, 1-14. https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-33. Liu, Z. L., Goh, S. H., & Ho, S. H. (2007). Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, *43*(3), 290–296. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2006.06.010

Mahmoodi, L., Mehrkhou, F., Guz, N., Forouzan, M., & Atlihan, R. (2020). Sublethal effects of three insecticides on fitness parameters and population projection of *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, *113*(6), 2713-2722. https://doi.org/10.1093/jee/toaa193.

Mao, L., & Henderson, G. (2007). Antifeedant activity and acute and residual toxicity of alkaloids from*Sophora flavescens* (Leguminosae) against *Formosan Subterranean* termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, *100*(3), 866-870. http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493.

Marcic, D., Prijovic, M., Drobnjakovic, T., Medo, I., Peric, P., & Milenkovic, S. (2012) Greenhouse and field evaluation of two biopesticides against *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Phytomed*, 27(2), 313–320.Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Mehrabadi, R., & Alizadeh, H. (2012). Inhibitory activity of proteinaceous α-amylase inhibitors from triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary α-amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *102*, 220-228. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.01.008.

Mousavi, M. (2022). Effect of three entomopathogenic fungi species and Bino2 on some ecophysiological characterices of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, (Hemiptera: Aphididae). PhD. Thesis. Urmia University. pp: 129. (In Persian).

Mousavi, M., Mehrkhou, F., GÜZ, N., Goosta, Y., & Atlihan, R. (2022). Sublethal effects of two entomopathogenic fungi species, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, on the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *46*(4), 441-452. https://doi.org/10.55730/1300-011X.3016.

Murad, A. M., Laumann, R. A., Lima, T. D. A., Sarmento, R. B., Noronha, E. F., Rocha, T. L., Valadares-Inglis, M. C., & Franco, O. L. (2006). Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *142*(3-4), 365-370. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.016.

Murad, A. M., Laumann, R. A., Mehta, A., Noronha, E. F., & Franco, O. L. (2007). Screening and secretomic analysis of enthomopatogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *145*(3), 333-338. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.01.010.

Mustafa, U., & Kaur, G. (2009). Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia microbiologica*, *54*, 499-504.

Nation, J. L. (2008). *Insect physiology and biochemistry*. 2nd ed. CRC Press, Taylor and Francis.

Ogendo, J. O., Belmain, S. R., Deng, A. L., & Walker, D. J. (2003). Comparison of toxic and repellent effect of *Lantana camara* L. with *Tephrosia vogelii* Hook and a synthetic pesticide against *Sitophilus zeamais* in maize grain storage. *Insect Science and Its Application*, *23*, 127-135.

Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D., & McGaughey, W. H. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(38), 23473-23476. https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23473.

Pan, D., Long-jia, C., Zong-lei, Z., Ke-jian, L., & Wei-hua, M. (2013). Responses of detoxifying, antioxidant and digestive enzyme activities to host shift of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Integrative Agriculture*, *12*(2), 296-304. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60228-2.

Pérez, L. de C. S., Florido, J. E. B., Navarro, S. R., Mayagoitia, J. F. C., & López, M. A. R. (2014). Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, *2*, 65-76. https://doi.org/10.4236/aer.2014.22007.

Pinto, F. G. S., Fungaro, M. H. P., Ferreira, J. M., Valadares-Inglis, M. C., & Furlaneto, M. C. (2002). Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride*. *Genetics and Molecular Biology*, *25*(2), 231–234. https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000200018.

Prates, H. T., Santos, J. P., Waquil, J. M., Fabris, J. D., Oliveira, A. B., & Foster, J. E. (1998). Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, *34*, 234-249. https://doi.org/10.1016/S0022-474X(98)00005-8.

Qi, S. H., Wu, D. G., Chen, L., Ma, Y. B., & Luo, X. D. (2003). Insect antifeedants from *Munronia henryi*: structure of munroniamide. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *51*(24), 6949–6952. https://doi.org/10.1021/jf030292y.

Quesada-Moraga, E., Maranhao, E. A. A., Valverde-Garcia, P., & Santiago-Alvarea, C. (2006). Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirement, and toxicogenetic activity. *Biological Control*, *36*, 274-287. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.022.

Ramanujam B, Krishna J, Poornesha B (2017). Field evaluation of entomopathogenic fungi against cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.) and their effect on coccinellid predator, *Coccinella septempunctata* (Linnaeus). *Journal of Biological Control*, 31 (3), 168-171.

https://doi.org/10.18311/jbc/2017/16350

Razmjou, J., Jafary, M., & Borzoui, E. (2019). Host plant preference and life table of *Brevicoryne brassicae*

(Hemiptera: Aphididae). *Journal of Crop Protection, 8* (2), 201-214.__

Reshadat-Selvangh, N. (2021). Survey on the sublethal effects of Flonicamid and Bino2 on the population growth prameters of *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). MSc. Thesis. Urmia University. pp: 64. (In Persian).

Revathi, N., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Gomathi, D., & Uma, C. (2011). Pathogenicity of three entomopathogenic fungi against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, *2*(4), 114. http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000114.

Robertson, J. L., Savin, N. E., Preisler, H. K., & Russell, R. M. (2007). *Bioassays with Arthropods*, Second Edition, Florida: CRC Press.

Roy, H. E., Vega, F. E., Chandler, D., Goettel, M. S., Pell, J., & Wajnberg, E. (2010). *The Ecology of Fungal Entomopathogens*, Cham, Switzerland: Springer.

Sabeghi Khosroshahi, Z., Abbasipour, H., & Rezazadeh, A. (2021). Inhibitory effect of aqueous bean extract, *Phaseolus vulgaris* (fabaceae), on α-amylase of the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *67*(10), 1425-1433. https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1796982.

Saleem, M. S., Batool, T. S., Akbar, M. F., Raza, S., & Shahzad, S. (2019). Efficiency of botanical pesticides against some pests infesting hydroponic cucumber, cultivated under greenhouse conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29:37. https://doi.org/10.1186/s41938-019-0138-4

Santi, L., da Silva, W. O. B., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, *55*, 874–880. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.012.

Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, *56*, 1267–1274. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008.

Senthil-Nathan, S. (2013). Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Frontiers in Physiology*, *4*(359). https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00359.

Shojaei, A., Talebi, K., Sharifian, I., & Ahsaei, S. M. (2017). Evaluation of detoxifying enzymes of *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidae) exposed to essential oil of *Artemisia dracunculus* L. *Biharean Biologist*, *11*(1), 5-9.

St. Leger, R. J. (1991). *The physiology of insect epidermis*, Canberra, Australia: CSIRO publishing, 286-308.

St. Leger, R. J., Charnley, A. K., & Cooper, R. M. (1987). Characterization of cuticle degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemical and Biophysiology*, *253*, 221-232. https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90655-2.

Suwannakut, S., Boucias, D. G., & Wiwat, C. (2005). Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *Journal of invertebrate pathology*, *90*(3), 169-176. https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.08.010.

Taheri- Sarhozaki, M., & Safavi, S. A. (2014). Sublethal effects of tiametoxam on life table parameters of the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) under laboratory conditions. Archives of *Phytopathology and Plant Protection, 47*, 508–515. https://doi.org/10.1080/03235408.2013.813145

Tapondjou, A. L., Adler, C., Fontem, D. A., Bouda, H., & Reichmuth, C. (2005). Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Product Research*, *41*, 91–102. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.01.004.

Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S. S. S., & Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter.

In *Secondary Metabolites - Sources and Applications* edited by Vijayakumar, R., & Raja, S. S. S. 3-21.

Tong, F. (2010). *Investigation of mechanisms of action of monoterpenoid insecticides on insect gamma-aminobutyric acid receptors and nicotinic acetylcholine receptors*. State University, Ames, Iowa. https://doi.org/10.31274/ETD-180810-48.

Vu, V. H., Hong, S. I., & Kim, K. (2007). Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *104*(6), 498-505. https://doi.org/10.1263/jbb.104.498.

Wu, J. H., Ali, S., & Ren, S. X. (2010). Evaluation of chitinase from *Metarhizium anisopliae* as biopesticide against *Plutella xylostella*. *Pakistan Journal of Zoology*, *42*(5), 521-528.

Yeom, H. J., Kang, J. S., Kim, G. H. & Park, I. K. (2012). Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(29), 7194-7203. https://doi.org/10.1021/jf302009w.

Zare, M., Talaei-Hassanloui, R., & Fotouhifar, K. (2014). Relatedness of proteolytic potency and virulence in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* isolates. *Journal of Crop Protection*, *3*(4), 425–434.

Ziaee, M., Moharramipour, S., & Mohsenifar, A. (2014). Toxicity of *Carum copticum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. *Journal of Applied Entomology*, *138*(10), 763–771. https://doi.org/10.1111/jen.12133.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, *17*(9), 715-728. https://doi.org/10.1080/09583150701593963.