تحقیقات آفات گیاهی
جلد ۳/شماره ۱/سال ۱۳۹۲

تاثیر پیروپیروکسی فن بر آنزیم‌های سم‌زدا و موثر در متابولیسم حدواسط بید آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)

محبوبه شریفی[۱]، علی اصغر کوثری[۲]، آرش زیبایی[۳]* و جلال جلالی سندی[۴]
۱ و ۲ ، دانشجوی دکتری و ۳ و ۴ به ترتیب استادیار و دانشیار دانشکده علوم کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۳۰)

چکیده

تنظیم کننده‌های رشد حشرات (IGRs[1]) ترکیباتی هستند که در فیزیولوژی رشد حشرات به ویژه فرایند جلداندازی اختلال ایجاد کرده و کنترل موثری را علیه آفات محصولات کشاورزی ایجاد می‌کنند در این بررسی غلظت‌های زیرکشنده تنظیم‌کننده رشد حشرات، پیروپیروکسی‌فن، پس از آزمون مقدماتی تهیه و روی لاروهای سن آخر شب‌پره *Ephestia kuehniella* تیمار شدند تا تاثیر آن‌ها روی برخی از آنزیم‌های سم‌زدا و موثر در متابولیسم حدواسط مشخص شود. پس از تعیین دوز کشنده ۴۵/۷۲ میکروگرم بر میلی لیتر، لاروهای تیمار شده با استون به عنوان شاهد و دوزهای ۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیروپیروکسی‌فن در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار به طور تصادفی انتخاب شدند تا فعالیت آنزیم‌های استراز عمومی، گلوتاتیون اس-ترانسفراز، اسید و آلکاین فسفاتاز، آلانین و آسپارتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز تعیین شوند. با استفاده از دو سوبسترای آلفا-نفتیل استات و بتا-نفتیل استات مشخص شد که با افزایش غلظت پیروپیروکسی‌فن فعالیت استراز عمومی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به صورتی که لاروهای تیمار شده با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین فعالیت استراز عمومی را در هر دو بازه زمانی نشان دادند. وضعیت مشابهی نیز در مورد گلوتاتیون اس-ترانسفراز با استفاده از دو معرف CDNB و DCNB مشاهده شد. در مورد اسید و آلکالین فسفاتاز بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در شاهد و تیمار ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیروپیروکسی‌فن مشاهده شد. در مورد آلانین و آسپارتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز نیز نتایجی مشابه اسید و آلکالین فسفاتاز مشاهده شد. نتایج حاضر نشان می‌دهند که با افزایش غلظت پیروپیروکسی‌فن روی لاروهای تیمار شده فعالیت آنزیم‌های سم-زدا افزایش یافت تا کم‌ترین تاثیر آفت‌کش تیمار شده روی فیزیولوژی داخلی بدن لارو ایجاد شود ولی با وجود این پیروپیروکسی‌فن مداخله معنی‌داری در آنزیم‌های موثر در متابولیسم حدواسط لاروهای *E. kuehniella* ایجاد کرد.

واژه‌های کلیدی: پیروپیروکسی‌فن، *Ephestia kuhniella*، متابولیسم حدواسط

*نویسنده مسئول: arash.zibaee@guilan.ac.ir

[1] Insect Growth Regulators

مقدمه

تنظیم کننده‌های رشد حشرات (IGRs[1]) ترکیباتی هستند که در فیزیولوژی رشد حشرات به ویژه فرایند جلداندازی اختلال ایجاد کرده و کنترل موثری را علیه آفات محصولات کشاورزی ایجاد می‌کنند. به‌طور کلی سه گروه اصلی از این ترکیبات وجود دارند که گروه اول از فعالیت هورمون جوانی ممانعت کرده یا آن را تقلید می‌کنند. گروه دوم ترکیباتی هستند که از سنتز کیتین ممانعت می‌کنند و گروه سوم آن-هایی هستند که مشابه هورمون اکدایزون عمل می‌کنند (Nijhout, 1994). نرکیباتی که فعالیت هورمون جوانی را تقلید می‌کنند منجر به ایجاد جلداندازی اضافه و افزایش سن لاروی شده و در رشد و نمو لاروها اختلال ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، شبه هورمون‌های جوانی روی تخم حشرات باعث عقیم شدن شده، رفتار تولید مثلی را مختل کرده و باعث اختلال در دیاپوز می‌شوند. بازدارنده‌های هورمون جوانی باعث بدشکلی در افراد بالغ شده، مرگ و میر شفیره ها را با اختلال در تبدیل بافت‌های لاروی به فرد بالغ افزایش می‌دهند (Goodman and Granger, 2005). پیریپروکسی‌فن،[2] آفت‌کشی با بنیان پیریدین[3] است که علیه طیف وسیعی از حشرات موثر می‌باشد (Ishaaya and Horowitz, 1995). این ترکیب نوعی شبه هورمون جوانی است که از تبدیل لاروها به افراد بالغ ممانعت کرده و در افراد بالغ باعث اختلال در تولید مثل می‌شود (Ishaaya and Horowitz, 1995).

حشرات برای حرکت، پرواز و تولید مثل نیازمند انرژی هستند که از غذای خورده شده به‌دست می‌آورند. غذای خورده شده پس از هضم و جذب به صورت گلیکوژن، تری آسیل گلیسرید و پروتئین در اجسام چربی حشرات ذخیره می‌شود تا در موقع لزوم در واکنش‌های گلیکولیز، کربس، انتقال الکترون و بتااکسیداسیون اسیدهای چرب به انرژی تبدیل شوند (Nation, 2008). در این میان بعضی از آنزیم-ها با فعالیت خود سوبستراهای لازم برای انجام چرخه‌های اصلی تولید انرژی را فراهم می‌کنند. به‌طور مثال، اسید و آلکالین فسفاتاز با جداکردن دی آسیل گلیسریدها از پروتئین‌های ناقل آن‌ها را وارد مرحله فعال‌سازی بتا-اکسیداسیون می‌کنند. آمینو ترانسفرازها با تبدیل اسید آمینه-های مختلف به هم ضمن تامین اسیدآمینه‌های مورد نیاز بدن در حشراتی که از پرولین به عنوان سوخت استفاده می‌کنند منجر به ایجاد پیرووات از آلانین می‌شوند. لاکتات دهیدروژناز نیز لاکتات حاصل از پروازهای طولانی را احیاء کرده و شاخصی به‌عنوان تخریب بافتی نیز می‌باشد (Nation, 2008; Zibaee *et al*., 2011).

بید آرد یا *Ephestia kuhniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) یکی از مهم‌ترین آفات محصولات گیاهی خشک به‌ویژه دانه غلات می‌باشد که خسارت شدیدی را روی محصولات انباری ایجاد می‌کند. بهترین راه کنترل این آفت حفظ بهداشت محصولات و جلوگیری از ورود این آفت به انبارها است. از آنجایی که امکان استفاده از آفت کش‌های معمول علیه این آفت روی محصولات انباری وجود ندارد، کاربرد تنظیم کننده‌های رشد حشرات به‌دلیل غیر سمی بودن روی انسان و دام می‌توانند گزینه امنی برای کنترل این آفت باشند. در این میان، حداقل کردن غلظت مورد استفاده از این ترکیبات به گونه‌ای که با اختلال در مسیرهای تامین انرژی منجر به کنترل شود قابل تامل به نظر می‌رسد. بنابراین اهداف بررسی حاضر تعیین غلظت موثر پیروپیروکسی فن روی بید آرد و تغییر فعالیت دو آنزیم سم زدای استراز عمومی و گلوتاتیون اس-ترانسفراز به همراه آنزیم‌های موثر در متابولیسم حدواسط آفت می‌باشد.

مواد و روش ها

پرورش بید آرد

پرورش آزمایشگاهی بید آرد در ظروف پلاستیکی به ابعاد ۵×۹×۱۷ سانتی‌متر روی رژیم غذایی مصنوعی حاوی آرد گندم (۴۳ گرم)، مخمر (۶ گرم) و گلیسرین (۲۰ میلی لیتر) در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵± ۷۰

[1] Insect Growth Regulators

[2] Pyriproxyfen

[3] Pyridine

درصد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام شد (Lima *et al*., 2001).

زیست سنجی

لاروهای سن آخر پروانه بید آرد به‌طور تصادفی انتخاب شده و با غلظت‌های ۵، ۸، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی-لیتر پیروپیروکسی فن (EC 10%) به طور موضعی تیمار شدند. لاروهای شاهد با استون تیمار شده و در هر تیمار ۳۰ لارو مورد استفاده قرار گرفت (۳ تکرار). بعد از ۴۸ ساعت تعداد تلفات و لاروهای زنده نسبت به شفیره های تشکیل شده در شاهد و تیمار پس از ۴۸ ساعت (در ۲۴ ساعت پاسخی مشاهده نشد) ثبت شده و با استفاده از نرم افزار POLO-PC غلظت های LC_{10}، LC_{30} و LC_{50} تخمین زده شدند. جهت بررسی های بیوشیمیایی، غلظت های ۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر پیروپیروکسی فن بر ۳۰ لارو سن آخر تیمار و در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت ۱۵ لارو جدا و در بررسی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه نمونه برای بررسی‌های بیوشیمیایی

لاروهای مورد بررسی در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت جداگانه و به نسبت ۵ لارو در ۱ میلی لیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷/۱ و مولاریته ۰/۰۲ مول) هموژنایز شدند. سپس نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. مایع رونشین به عنوان منبع آزمون‌های بیوشیمیایی جدا شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

سنجش فعالیت استراز عمومی

سنجش آنزیم استراز عمومی با استفاده از دو سوبسترای آلفا-نفتیل استات[1] و بتا-نفتیل استات[2] طبق روش هان و همکاران (Han *et al*. 1995) انجام شد. پانزده میکرولیتر از هر سوبسترا (۱۰ میلی مولار) به همراه ۱۰ میکرولیتر RR-Salt blue جداگانه با ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات مخلوط شد. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه‌های آنزیمی به آن اضافه شد و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر در فواصل ۱۰ ثانیه‌ای به مدت ۱ دقیقه خوانده شد با استفاده از دستگاه مایکروپلیت ریدر (Awareness Co., USA) شیب خط رگرسیونی حاصل به عنوان فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز

از روش اوپنورث (Oppenorth, 1979) برای سنجش آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز استفاده شد. دو معرف CDNB[3] و DCNB[4] به غلظت ۲۰ میلی مولار و به مقدار ۱۰ میکرولیتر جداگانه به ۳۰ میکرولیتر گلوتاتیون احیاء شده (۲۰ میلی مولار) اضافه شدند. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه آنزیمی به مخلوط اضافه شد و جذب در ۳۴۰ نانومتر در فواصل ۹ ثانیه ای به مدت ۱ دقیقه خوانده شد. شیب خط رگرسیونی حاصل به عنوان فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز

سنجش این دو آنزیم با استفاده از سوبسترای پارا-نیتروفنول فسفات بر اساس روش بسی (Bessey*et al*., 1946) انجام شد. به ۴۰ میکرولیتر بافر تریس (۲۰ میلی مولار) اسیدیته ۸، ۲۰میکرولیتر سوبسترا اضافه شد. سپس فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در طول موج ۴۰۵ نانومتر با اضافه کردن نمونه‌ها در فواصل ۱ دقیقه ای به مدت ۵ دقیقه خوانده شد. در مورد اسید فسفاتاز، به ۴۰ میکرولیتر بافر تریس (۲۰ میلی مولار) اسیدیته ۵، ۲۰میکرولیتر سوبسترا اضافه شد. سپس فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در طول موج ۴۰۵ نانومتر با اضافه کردن نمونه ثبت شد. تعیین فعالیت آنزیم با کم کردن جذب ۵ دقیقه از ۱ دقیقه تعیین شد.

سنجش فعالیت آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز

فعالیت این دو آنزیم بر اساس روش توماس (Thomas, 1998) با استفاده از کیت شرکت بیوکم ایران در طول موج ۳۴۰ نانومتر پس از ۲۰ دقیقه تعیین شد. ابتدا معرف های A تا E به فاصله ۱۰ دقیقه دو به دو در دمای آزمایشگاه با هم انکوبه شده و سپس با اضافه کردن نمونه فعالیت آنزیمی پایش شد.

سنجش فعالیت لاکتات دهیدروژناز

[1] α-naphtyl acetate

[2] β-naphtyl acetate

[3] 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

[4] 1,2-dichloro-4-nitro-benzene

فعالیت این آنزیم بر اساس روش کینگ (King, 1965) با استفاده از کیت شرکت بیوکم ایران در طول موج ۴۵۰ نانومتر پس از ۳۰ دقیقه تعیین شد. معرف های R1 و R2 با هم به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شده و سپس با اضافه کردن آنزیم فعالیت آنزیمی پایش شد.

تعیین میزان پروتئین

با استفاده از پروتئین سرم گاوی میزان پروتئین نمونه‌ها به روش لوری و همکاران (Lowry *et al*., 1951) تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی انجام شده و اختلاف آماری بین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد با نرم افزار SAS تعیین شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ نشان دهنده غلظت‌های موثر پیروپیروکسی فن روی لاروهای سن آخر بید آرد است. نتایج نشان دادند که غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر پیروپیروکسی‌فن می‌تواند از شفیره شدن ۵۰ درصد لاروهای تحت تیمار جلوگیری کند و یا حتی باعث مرگ آن‌ها شود. ویلیامز (Williams, 1967) پیشنهاد کرد که تیمار حشرات با هورمون‌های جوانی می‌تواند با به‌هم زدن فیزیولوژی تولیدمثلی و رشدی حشرات باعث کنترل آن‌ها شود. در واقع این ترکیب با تقلید از هورمون جوانی باعث افزایش طول دوره لاروی و جلوگیری از بلوغ حشرات می‌شود. در بررسی حاضر نیز عدم تبدیل لاروها به شفیره در مقایسه با افراد شاهد مشاهده شد که مطابق با نتایج ادواردز و همکاران (Edwards *et al*., 1995)، کلوکه و سلطانی (Kellouche and Soltani, 2006)، ساشیندران وهمکاران (Sashindran *et al*., 2005) و قاسمی (Ghasemi *et al*., 2010) می‌باشد.

در مطالعه حاضر تیمار لاروها با غلظت‌های مختلف پیروپیروکسی فن باعث افزایش معنادار فعالیت استراز عمومی نسبت به شاهد شد که این افزایش وابسته به غلظت بود (جدول ۲). وضعیتی مشابه نیز در مورد گلوتاتیون اس-ترانسفراز مشاهده شد (جدول ۳). به عبارت دیگر، با افزایش غلظت پیروپیروکسی فن فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز برای هر دو معرف و در هر دو بازه زمانی افزایش یافت. درضمن فعالیت آنزیم مذکور در معرف DCNB بیشتر از CDNB بود (جدول ۳). استرازهای عمومی گروهی متنوع از آنزیم‌های هیدرولیز کننده هستند که با هیدرولیز ترکیبات دارای پیوند استری مثل پیروپیروکسی فن می‌توانند باعث مقاومت حشرات به این گونه آفت‌کش‌ها شوند (Talebi, 2005). تاکنون این آنزیم‌ها در مقاومت بسیاری از حشرات به آفت کش‌ها نقش داشته‌اند (Konno and Shishido, 1985; Qu*et al*., 2003; Yang *et al*., 2005; Li *et al*., 2007; Zibaee*et al*., 2009). گلوتاتیون اس-ترانسفرازها خانواده‌ای از آنزیم‌ها با نقش‌های چندگانه هستند که واکنش‌های مزدوج شدن مولکول‌ها با گلوتاتیون احیاء شده را تسهیل می‌کنند. تاثیر این آنزیم‌ها تبدیل مولکول چربی دوست به مولکولی محلول در آب است (Habig *et al*., 1974). تیمار حشرات با آفتکش‌های فسفره و کلره منجر به افزایش فعالیت این آنزیم و سپس مقاومت حشرات به آفت‌کش‌ها می‌شود (Motoyama and Dauterman 1975; Clark *et al.,* 1984; Hemingway *et al.* 1985; Grant and Matsumura 1989; Fournier *et al*. 1992; Lagadic *et al*., 1993; Zibaee *et al*., 2009). افزایش فعالیت این دو آنزیم پس از تیمار غلظت‌های مختلف پیروپیروکسی‌فن می‌تواند نشان دهنده سم زدایی این آفت‌کش توسط این آنزیم‌ها باشد و در طولانی مدت منجر به مقاومت شود. درضمن به نظر می‌رسد که این سم‌زدایی کارایی لازم را نداشته باشد زیرا با افزایش فعالیت آنزیم‌های سم زدا باز هم پیروپیروکسی فن توانسته با افزایش غلظت اثر منفی روی متابولیسم حدواسط بید آرد بگذارد. اسید و آلکالین فسفاتاز آنزیم‌های هیدرولازی هستند که گروه‌های فسفات را از مولکول‌هایی میتل نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها، آلکالوییدها، آفت‌کش‌های فسفره جدا کرده و در جدا کردن اسیدهای چرب از پروتئین‌های ناقل در همولنف حشرات نیز نقش دارند (Klowden, 2007; Zibaee *et al*., 2009). هر نوع تغییر در فعالیت این دو آنزیم تحت تاثیر شرایط فیزیولوژی بدن حشرات یا آفت‌کش‌ها می‌تواند در هضم، انتقال و در دسترسی مواد غذایی در همولنف و اجسام چربی موثر باشد. پس از تیمار پیروپیروکسی‌فن فعالیت اسید

و آلکالین فسفاتاز در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار به طور معنی داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت (جدول ۴). تیمار افراد بالغ سن گندم *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) با پیروپیروکسی‌فن فعالیت ACP را کاهش و فعالیت ALP را افزایش داد (Zibaee *et al.*, 2011). تیمار حشرات مختلف با آفت‌کش‌های سنتزی و عصاره‌های گیاهی نیز باعث کاهش فعالیت این دو آنزیم شده است (Senthil-Nathan, 2006; Shekari *et al.*, 2008; Zibaee and Bandani, 2010; Hasheminia *et al.*, 2011).

تیمار غلظت‌های مختلف پیروپیروکسی‌فن باعث کاهش معنی دار فعالیت آنزیم های آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت شد به صورتی که بیشترین فعالیت در شاهد و کم‌ترین آن در لاروهای تیمار شده با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (جدول ۵). آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز آنزیم‌های ناقل گروه‌های آمینو هستند که در همولنف و اجسام چربی حشرات و کبد مهره‌داران فعال هستند (Thomas, 1998). این دو آنزیم واکنش‌های ترانس آمیناسیون را در حشرات تسریع می‌کنند تا به سرعت در چرخه کربس مورد استفاده قرار گیرد (Klowden, 2007). افزایش فعالیت این دو آنزیم نشان دهنده وجود چالش فیزیولوژیک به دلیل حضور بیمارگر، تخریب بافتی یا حضور عوامل سمی است (Giboney, 2005). زیبایی و همکاران (Zibaee *et al.*, 2011) نیز به نتایج مشابهی با پژوهش حاضر در مورد سن معمولی گندم پس از تیمارآن‌ها با پیروپیروکسی‌فن رسیدند.

در مراحل نهایی چرخه گلیکولیز، آنزیم لاکتات دهیدروژناز تحت شرایط بی‌هوازی پیرووات را به لاکتات تبدیل می‌کند. این آنزیم با نشان دادن کاهش یا افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها به‌عنوان شاخص فعالیت متابولیکی و و صدمه به بافت‌های بدن عمل می‌کند (Thomas, 1998). تیمار لاروهای بید آرد با غلظت‌های مختلف پیروپیروکسی‌فن باعث کاهش معنی‌دار فعالیت لاکتات دهیدروژناز نسبت به شاهد شد که این کاهش ۲۴ ساعت پساز تیمار مشهودتر بود (جدول ۶). تیمار آفت‌کش‌ها و ترکیبات گیاهی مختلف نیز باعث کاهش فعالیت این آنزیم در سن معمولی گندم، *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) و *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) شد (Arshad *et al.*, 2002; Senthil-Nathan and Kalviani, 2005; Zibaee *et al.*, 2011).

به‌طورکلی نتایج حاصل نشان داد که تیمار لاروهای بید آرد با غلظت‌های مختلف پیروپیروکسی فن می‌تواند در فعالیت آنزیم‌های موثر در متابولیسم حدواسط اختلال ایجاد کند. پس از تیمار پیروپیروکسی فن فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا نیز افزایش پیدا کردند که نشان‌دهنده سم‌زدایی این آفت‌کش توسط استرازهای عمومی و گلوتاتیون اس-ترانسفراز است ولی با این وجود، بازهم در متابولیسم حدواسط این حشره اختلال دیده شد. اختلال در متابولیسم حدواسط حشرات توسط آفت‌کش ها می‌تواند به‌عنوان راهکار جایگزین مرگ و میر در کنترل حشرات آفت شود.

جدول ۱- تخمین غلظت‌های کشنده پیروپیروکسی فن روی لاروهای سن آخر لاروی *Ephestia kuehniella*

Table 1. Estimation of lethal concentration (LC) estimation of pyriproxyfen on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

	Concentration (µg/ml)	Slope±SE	df	X^2
LC_{10}	6.04	1.459±0.39	3	0.150
LC_{30}	22.76	1.459±0.39	3	0.150
LC_{50}	45.72	1.459±0.39	3	0.150

*. All values have been estimated by POLO-PC software (N=180)

جدول ۲- تاثیر پیروپیروکسی فن بر فعالیت استراز عمومی (OD/min) در روی لاروهای سن آخر *Ephestia kuehniella*.

Table 2. Effect of pyriproxyfen on general esterase activity (OD/min) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*.

	α-naphtyl	α-naphtyl	β-naphtyl	β-naphtyl
Concentration (µg/ml)	24	48	24	48
Control	0.026±0.002a	0.056±0.002bc	0.012±0.001b	0.026±0.001b
5	0.031±0.006b	0.035±0.003c	0.003±0.001b	0.035±0.002b
15	0.078±0.005c	0.073±0.002ab	0.021±0.002b	0.046±0.002b
30	0.141±0.011c	0.099±0.015a	0.039±0.002a	0.099±0.018a

*. Means with various letters show statistical differences by using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

*. میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون تفاوت‌های آماری را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهند.

جدول ۳- تاثیر پیروپیروکسی فن بر فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز (OD/min) روی لاروهای سن آخر *Ephestia kuehniella*

Table 3. Effect of pyriproxyfen on glutathione *S*-transferase activity (OD/min) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

	CDNB	CDNB	DCNB	DCNB
Concentration (µg/ml)	24	48	24	48
Control	0.019±0.001b	0.040±0.002a	0.051±0.007a	0.048±0.002a
5	0.024±0.002ab	0.053±0.003b	0.051±0.001b	0.073±0.005b
15	0.040±0.000ab	0.062±0.006bc	0.069±0.003b	0.087±0.004b
30	0.085±0.012a	0.108±0.003c	0.157±0.018b	0.111±0.005c

*. Means with various letters show statistical differences by using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

*. میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون تفاوت‌های آماری را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهند.

جدول ۴- تاثیر پیروپیروکسی فن بر فعالیت آلکالین و اسید فسفاتاز (µmol/min/mg protein) روی لاروهای سن آخر *Ephestia kuehniella*

Table 4. Effect of pyriproxyfen on alkaline (ALP) and acid phosphatase (ACP) activities (µmol/min/mg protein) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

	ALP	ALP	ACP	ACP
Concentration (µg/ml)	24	48	24	48
Control	2.90±0.22a	4.61±0.57a	3.40±0.121a	2.95±0.061a
5	1.72±0.06ab	1.22±0.17a	0.51±0.176b	1.81±0.14ab
15	1.36±0.06b	2.10±0.19b	1.11±0.028bc	1.16±0.03bc
30	0.91±0.55b	3.87±0.27b	1.87±0.421c	0.61±0.46c

*. Means with various letters show statistical differences by using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

*. میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون تفاوت‌های آماری را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهند.

جدول ۵- تاثیر پیروپیروکسی فن بر فعالیت آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز (µmol/min/mg protein) روی لاروهای سن آخر *Ephestia kuehniella*

Table 5. Effect of pyriproxyfen on alanine (ALT) and aspartate (AST) amino transferase activities (µmol/min/mg protein) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

	ALT	ALT	AST	AST
Concentration (µg/ml)	24	48	24	48
Control	0.051±0.005a	0.045±0.002a	0.039±0.006a	0.03±0.001a
5	0.034±0.007ab	0.033±0.004ab	0.021±0.001ab	0.026±0.001a
15	0.021±0.002bc	0.021±0.003bc	0.018±0.0007b	0.018±0.002b
30	0.010±0.005c	0.004±0.002c	0.018±0.003b	0.018±0.0004b

*. Means with various letters show statistical differences by using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

*. میانگین‌های دارای حروف مختلف در هر ستون تفاوت‌های آماری را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهند.

جدول ۶- تاثیر پیروپیروکسی فن بر فعالیت لاکتات دهیدروژناز (µmol/min/mg protein) روی لاروهای سن آخر *Ephestia kuehniella*

Table 6. Effect of pyriproxyfen on lactate dehydrogenase activity (µmol/min/mg protein) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

	LDH	LDH
Concentration (µg/ml)	24	48
Control	0.269±0.014a	0.098±0.011a
5	0.098±0.009b	0.103±0.007a
15	0.111±0.007b	0.067±0.002ab
30	0.097±0.008b	0.050±0.012b

*. Means with various letters show statistical differences by using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

*. میانگین‌های دارای حروف مختلف تفاوت‌های آماری را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهند.

References

Arshad, M., Ahmad, I., Naqvi, S. N. H. and Kahkashan, A. 2002. Level of Lactate dehydrogenase in resistant and susceptible strains of culicine mosquitoes of the Karachi region after treatment with DDT, malathion and cyfluthrin. **Turkish Journal of Zoology** 26: 97–100.

Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **Journal of Biological Chemistry** 164: 321–329.

Clark, A. G., Shamaan, N. A., Dauterman, W. C. and Hayaoka, T. 1984.Characterization of multiple glutathione transferases from the housefly, *Musca domestica.***Pesticide Biochemistry and Physiology** 22: 51-59.

Edwards, J. P., Corbit, H. F., McArdle, J. E., Short, J. E. and Weaver, R. J. 1995. Elimination of population of the oriental cockroach (Dictyoptera: Blatellidae) in a simulated domestic environment with the insect juvenile hormone analogue (S)-hydroprene. **Journal of Economic Entomology** 86: 436–443.

Etebari, K., Bizhannia, A. R., Sorati, R. and Matindoost, L. 2007. Biochemical changes in haemolymph of silkworm larvae due to pyriproxyfen residue. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 88 14–19.

Fournier, D., Bride, J. M., Poire, M., Berge, J. B. and Plapp, F. W. 1992. Insect glutathione *S*-transferases: biochemical characteristics of the major forms from houseßies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry** 267: 1840-1845.

Ghasemi, A., Sendi, J. J. and Ghadamyari, M. 2010. Physiological and biochemical effect of pyriproxyfen on *Plodiainterpunctella*Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research** 50: 416-422.

Giboney, P. T. 2005. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. **American Physician** 71: 1105–1110.

Goodman, W. G. and Granger, N. A. 2005. The juvenile hormone, in: L. I. Gilbert, K. Iatrou, S. S. Gill (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier B.V. pp. 320–408.

Grant, D. F. and Matsumura, F. 1989.Glutathione *S*-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti.* **Pesticide Biochemistry and Physiology** 33: 132-140.

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry** 249: 7130-7141.

Han, Q. P., Zhuang, Z., Tang A. 1995. The mechanism of resistance to fenitrothion in *Chilosuppressalis*Walker. **ActaEntomologicaSinica** 38: 266–272.

Hasheminia, S.M., J. JalaliSendi, K. TalebiJahromi, and S. Moharramipour.2011. The effect of *Artemisia annua* L. and *Achille amillefolium* L. crude leaf extracts on the toxicity, development, feeding efficiency and biochemical activities of small cabbage *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 99: 244-249.

Hemingway, J., Malcolm, C. A., Kissoon, K. E., Boddington, R. G., Curtis, C. F. and Hill, N. 1985. The biochemistry of insecticide resistance in Anopheles sacharovi: comparative studies with a range of insecticide susceptible and Resistance *Anopheles* and *Culex* species. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 24: 68-71.

Ishaaya, I. and Horowitz, A. R. 1995. Pyriproxyfen, a Novel Insect Growth Regulator for Controlling White flies : Mechanisms and Resistance Management". **Pesticide Science** 43: 227–232.

Kellouche A. and Soltani N. 2006. Impact of hexaflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on growth, development and reproductive performance of the progeny in *Callosobruchus maculates* after adult treatments. **African Journal Agricultural Research** 1: 57–64.

King, J. 1965. The dehydrogenases or oxidoreductases. Lactate dehydrogenase, in: D. Van Nostrand (Ed.). Practical Clinical Enzymology**.** London, pp. 83–93.

Klowden, M. J. 2007. Physiological Systems in Insects, Academic Press, p. 697.

Konno, Y., Shishido, T. 1985. Resistance mechanism of the rice stem borer to organophosphorus insecticide. **Journal of Pesticide Science** 10: 285-287.

Lagadic, L., Cuany, A., Berge, J. B. and Echaubard, J. 1993. Purification and partial characterization of glutathione S-transferase from insecticide resistant and lindane induced

Susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 23: 467-472.

Li, A. Y., Guerrero, F. D. and Pruett, J. H. 2007. Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonylbutoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritansirritans* (Diptera: Muscidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 87: 147-155.

Lima, F. M., Favero, S. and Lima, J. O. G. 2001. Production of the Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), on an artificial diet containing corn meal. **Neotropical Entomology** 30: 37-42.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193: 265–75.

Motoyama, N. and Dauterman, W. C. 1975. Inter-strain comparison of glutathione dependent reactions in susceptible and resistant houseßies. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 5: 489-493.

Nation, J. L. 2008. Insect physiology and biochemistry.2nd edition. **CRC press**. New York. 544 pp.

Nijhout, H. F. 1994. Insect Hormones. **Princeton University Press**, Princeton, NJ.

Oppenorth, F. J. 1979. Glutathione *S*-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 11: 176–178.

Qu, M., Zhaojun, H., Xinjun, X. and Lina, Y. 2003. Triazophos resistance mechanisms in rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker). **Pesticide Biochemistry and Physiology**: 99-105.

Sashindran, K., Sashindran, J. and Vijayan, V.A. 2007. Alteration in the primary metabolites in three different tissues of silkworm, *Bombyx mori* L. under the influence of a juvenoid, R 394. **Caspian Journal of Environmental Sciences** 5: 27–33.

Senthil-Nathan, S. 2006. Effects of Meliaazedarach on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Gnenee) (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 84: 98–108.

Senthil-Nathan, S. and Kalaivani, K. 2005. Efficacy of nucleopolyhedrovirus (NPV) and azadirachtin on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control** 34: 93–98.

Shekari, M., Sendi, J. J., Etebari, K., Zibaee, A. and Shadparvar, A. 2008. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull (Coleoptera: Chrysomellidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 91: 66–74.

Talebi, K. 2005. Toxicity of pesticides. **University of Tehran press**. 541 pp.

Thomas, L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostic, first ed., TH Books Verlasgesellschaft, Frankfurt, pp. 89–94.

Yang, M. L., Wu, H. H., Guo, Y. P., Ma, E. B. 2005.Toxicological and biochemical characterizations of malathion sensitivity in two Þeld populations of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae). **Insect Science** 13: 41-47.

Zibaee, A. and Bandani, A. R. 2010**.** Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on digestive enzymes profiles and cellular immune reactions of sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauvaria bassiana*. **Bulletin of Entomological Research** 100: 185–196.

Zibaee, A., Sendi, J. J., Ghadamyari, M., Alinia, F. and Etebari, K. 2009. Diazinon Resistance in Different Selected Strains of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Northern Iran. **Journal of Economic Entomology** 102: 1186-1196.

Zibaee, A., Zibaee, I., and Jalali Sendi, J. 2011. A juvenile hormone analogue, Pyriproxifen, affects some biochemical components in the hemolymph and fat bodies of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**100:289–298.

Plant Pests Research
Vol. 3, No. 1, 2013

Effects of Pyriproxyfen on detoxifying and intermediary enzymes of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)

M. Sharifi[1], A. A. Kosari[2], A. Zibaee[3*] and J. Jalali Sendi[4]
1, 2 Ph.D. Student of Entomology, 2 , 3 Assistant professor and Associate professor, respectively, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan

(Received: March 5, 2013- Accepted: May 20, 2013)

Abstract

The insect growth regulators (IGRs) are compounds that interfere with growth physiology, particularly ecdysis and have an effective control against agricultural insect pests. Sublethal concnetrations of an insect growth regulator, pyriproxyfen, were prepared after bracketing test and were treated on last larval instars of *Ephestia kuehniella* to find their effects on detoxifying enzymes and those involving in intermediary metabolism. Treated larvae by aceton as control and others treated by 5, 15 and 30 µg/ml of pyriproxyfen were randomly choose after 24 and 48 hours post-treatment for enzymatic analysis including general esterases, glutathione *S*-transferases, acid and alkaline phosphatases, alanine and apartate aminotransferases as well as lactate dehydrogenase. By using α- and β-naphtyl acetate as substrates, activities of general esterases increases along with increasing of pyriproxyfen concentrations in both time intervals. Similar results were obtained regarding GSTs by using CDNB and DCNB. The lowest and the highest acid and alkaline phosphatses activities were found in control and treated larvae by 30 µg/ml of pyriproxyfen. Similar results were observed in case of alanine- and aspartate aminotransferase as well as lactate dehydrogenase. These results demonstrate that higher concentrations of pyriproxyfen increased activities of detoxifying enzymes to decrease effect of pesticide on larval physiological processes but pyriproxyfen statistically intervene in activities of enzymes involved in intermediary metabolism of *E. kuehniella*.

Keywords: Pyriproxyfen, *Ephestia kuehniella,* Intermediary metabolism

*Corresponding author: arash.zibaee@guilan.ac.ir