تحقیقات آفات گیاهی
۱۳۹۸ -۹ (۳): ۴۱-۵۷

تأثیر بازدارندگی پایری‌پروکسی‌فن بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک کفشدوزک *Adalia decempunctata* L. (Col.: Coccinellidae)

دیانا ناصری[۱]، جلال جلالی سندی[۱*]، محمد قدمیاری[۱] و زهرا مجیب حق قدم[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ۲- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۲۰)

چکیده

کفشدوزک *Adalia decempunctata* L. مشهور به کفشدوزک ده‌نقطه‌ای به‌عنوان شکارگری فعال هم در مرحله لاروی و هم حشره کامل محسوب می‌شوند. این حشره از روی انواع درختان میوه هسته‌دار، دانه‌دار، درختان جنگلی پهن‌برگ و سوزنی-برگ آلوده به آفاتی نظیر شته، شپشک و پسیل از مناطق مختلف جهان گزارش شده است. پرورش کلنی این شکارگر در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انجام شد. در این پژوهش، آزمایش زیست‌سنجی با یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد حشرات به‌نام پایری‌پروکسی‌فن به‌روش موضعی مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های IC_{10}, IC_{30}, IC_{50} و IC_{90} به ترتیب ۱۸/۶، ۳۳/۱، ۴۹/۳ و ۱۳۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تخمین زده شد. هم‌چنین برخی از مهم‌ترین شاخص‌های بیوشیمیایی در لاروهای سن چهارم تیمار شده با غلظت‌های بازدارنده‌ی پایری‌پروکسی‌فن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان لیپید و پروتئین نسبت به شاهد به‌طور نسبی افزایش ولی میزان گلیکوژن در لاروهای تیمار شده کاهش معنی‌داری یافت. فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا (گلوتاتیون اس_ترانسفراز و استرازهای عمومی) در لاروهای تیمار شده به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. آنزیم پراکسیداز نیز فعالیت افزایشی معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. با توجه به اینکه پایری‌پروکسی‌فن دارای ماهیت هورمون جوانی است، بنابراین مراحل نابالغ شکارگر مذکور تحت تأثیر قرار می‌گیرند؛ در حالی‌که حشرات کامل به دلیل گذار از این مرحله به هورمون رشد وابسته نبوده و کم‌تر تحت تأثیر قرار می‌گیرند. بنابراین بررسی‌های تکمیلی در خصوص استفاده هم‌زمان از پایری‌پروکسی‌فن و شکارگر فوق در شرایط صحرایی لازم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کفشدوزک، پایری‌پروکسی‌فن، گلوتاتیون اس – ترانسفراز، پراکسیداز، بازدارندگی

*نویسنده مسئول: j.j.sendi@gmail.com

مقدمه

شته‌ی جالیز *Aphis gossypii* Glover (Hem.: Aphididae) حشره‌ای چندخوار است و گیاهان مختلفی را مورد حمله قرار می‌دهد. این شته خسارت زیادی را در گلخانه‌های پرورش خیار در اروپا (Kocourek *et al*., 1994; Blackman and Eastop, 2000) و نیز در گلخانه‌ها و مزارع پرورش خیار در ایران ایجاد کرده است (Zamani *et al*., 2006). این آفت علاوه بر خسارت مستقیم با ترشح عسلک و هم‌چنین انتقال ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی خسارت غیر مستقیم نیز به محصولات وارد می‌کند (Dáder *et al*., 2012).

کفشدوزک ده نقطه‌ای *Adalia decempunctata* L. (Col.: Coccinellidae) شکارگر مهم شته‌ها در زیست بوم‌های کشاورزی عرصه‌های طبیعی است و بیشتر روی درختان متمرکز است و کمتر روی بوته‌ها و گیاهان علفی دیده می‌شود (Honek, 1985). پژوهش‌های موجود در زمینه دامنه‌ی میزبانی و پراکنش کفشدوزک *A. decempunctata* نشان می‌دهد که لارو و حشرات کامل این کفشدوزک به‌عنوان شکارگری فعال، از روی انواع درختان میوه هسته‌دار، دانه‌دار، درختان جنگلی پهن‌برگ و سوزنی‌برگ آلوده به آفاتی نظیر شته‌ها، شپشک‌ها، پسیل‌ها از مناطق مختلف جهان جمع‌آوری، شناسایی و گزارش شده است (Magro *et al*., 1999; Guncan, *et al*., 2010, Prodanovic *et al*., 2010; Salehi *et al*., 2011; Mohamad poor *et al*., 2013; Kacar, 2015). یکی از ویژگی‌های این گونه که به‌عنوان یک مزیت زیستی برای آن محسوب می‌شود، وجود حالت‌های چندشکلی یا پلی مورفیسم بالا است که بین جمعیت‌های آن در نقاط مختلف زیستگاهی مشاهده می‌شود (Evans *et al*., 2011) .

آفت‌کش‌های شیمیایی از عوامل مهم کنترل جمعیت آفات هستند (Youn *et al*., 2003) و استفاده از آن‌ها می تواند باعث کاهش تأثیر زیان‌بار مستقیم و غیرمستقیم آفات گیاه‌خوار شود (Rugno *et al*., 2015)، اما استفاده بیش از حد از آفت‌کش‌ها می‌تواند اثربخشی عوامل کنترل بیولوژیک را کاهش و باعث شکل‌گیری مقاومت و در نتیجه افزایش مصرف آفت‌کش‌ها شود (Barbosa *et al*., 2017). دشمنان طبیعی و پارازیتوئیدها در مقابله با آفت-کش‌ها بسیار حساس هستند (Martinou *et al*., 2014)، ولی حشره‌کش‌های انتخابی با عوامل کنترل تلفیقی آفات سازگارتر هستند (Galvan *et al*., 2005).

تنظیم‌کنندگان رشد حشرات[1] (IGRs) به منظور کنترل بسیاری از آفات، مورد استفاده هستند و نحوه‌ی عملکرد آن ها از طریق مهار تشکیل کیتین یا به صورت شبه‌هورمون‌های جوانی[2] (JHA) است (Tiwari *et al*., 2012). تنظیم-کننده‌های رشد حشرات می‌توانند جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌ها باشند، زیرا عملکرد آن‌ها مناسب و سازگار با محیط زیست است (Arthur *et al*., 2009). با وجود اینکه تنظیم‌کنندگان رشد حشرات سمیت کم‌تری روی حشرات مفید دارند، اما میزان سازگاری آن‌ها با عوامل کنترل بیولوژیکی باید مورد بررسی قرار گیرد (Liu and Chen, 2000). پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض این دسته از آفت‌کش‌ها ممکن است باعث تلفات زیاد شکارگرها و پارازیتوئیدهای مفید شود (Yu *et al*., 2014). هم‌چنین گزارش شده است که تنظیم‌کنندگان رشد حشرات می‌توانند بر رشد جمعیت دشمنان طبیعی که به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی عمل می‌کنند، تأثیر بگذارد (Mohammadi *et al*., 2014). قرار گرفتن حشرات مفید در معرض آفت‌کش‌ها علاوه بر کشندگی، آن‌ها را از تأثیر زیرکشندگی نیز بی نصیب نخواهد کرد (Biondi *et al*., 2012). نقش ماکرومولکول‌ها نظیر پروتئین، گلیکوژن و لیپید در فرآیند رشدی و تکمیل چرخه‌ی زندگی حشرات بدون شک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. حشرات این مواد را برای ساختار، تشکیل بافت، پوست اندازی، رشد اووسیت‌ها و یا فرآیند اسپرماتوژنز و دیاپوز مورد استفاده قرار می‌دهند (Nation, 2008). آنزیم‌هایی نظیر استرازها به گروه متنوعی از آنزیم‌های سم‌زدا اطلاق می‌شود که از طریق

1. Insect growth regulators
2. Juvenile hormone analogue

کاهش سمیت با فعالیت‌های هیدرولیزی و یا از طریق رقابت جهت اتصال به ماده‌ی سمی، مولکول‌های هدف را حمایت می‌کنند (Memarizadeh *et al*., 2011). گلوتاتیون‌اس-ترانسفراز نیز به گروهی از آنزیم‌ها تعلق دارند که در سم-زدایی مواد سمی درون‌زاد و بیرونی، در انتقال مواد بین-سلولی، تولید هورمون‌ها و جلوگیری از تنش‌های اکسیداتیو نقش کلیدی دارند (Enayati *et al*., 2005). آفت‌کش‌ها هم‌چنین برخی از فرآیندهای فیزیولوژیکی یا بیوشیمیایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند که بر زنده‌مانی، رشد، تکامل، ازدیاد و حتی رفتار دشمنان طبیعی تأثیر می‌گذارد (Fernandes *et al*., 2016). پایری‌پروکسی‌فن[1] از گروه پیریدین‌ها و به نسل سوم حشره‌کش‌ها تعلق دارد و جزء تنظیم‌کننده‌های رشد حشرات نیز محسوب می‌شود. این آفت‌کش به‌دلیل خاصیت انتخابی خود در برابر دشمنان طبیعی برای کنترل آفات توصیه شده است (Gerling, 1990; Ishaaya *et al*., 1998). پایری‌پروکسی‌فن به-عنوان یک شبه‌هورمون جوانی در آفات مختلف علاوه بر خواص تخم‌کشی قوی، روی لاروها به‌خصوص لاروهای مسن‌تر تأثیر کشندگی نیز دارد (Horowitz and Ishaaya, 1994).

در حال حاضر پایری‌پیروکسی‌فن علیه مگس‌های سفید و شپشک‌ها وپسیل‌ها در مزارع و باغ ها مورد استفاده است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی تأثیر مستقیم و غیر مستقیم این آفت‌کش روی یکی از شکارگرهای مفید و موجود در این گونه مزارع و باغ‌ها به نام کفشدوزک *Adalia decempunctata* L. می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه میزبان

به منظور پرورش گیاه میزبان، به‌صورت هفتگی تعداد ۳۰ عدد بذر خیار (رقم ویکتور[2]) ۲۴ ساعت در آب ولرم خیسانده شد. سپس به‌مدت ۴۸ ساعت روی دستمال نمناک و در مکان تاریک قرار داده شد. پس از جوانه‌زنی درون لیوان‌های پلاستیکی با ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر کاشته شد و پس از دو برگی شدن به گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۴ و ارتفاع ۱۶ سانتی‌متر در گلخانه‌ی دانشکده‌ی علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انتقال یافتند. بستر رشد گیاهان، خاک زراعی همراه با کوکوپیت به نسبت مساوی بود.

پرورش شته جالیز *A. gossypii*

شته‌ی جالیز از روی گل‌های ختمی در سطح شهر رشت و دانشکده‌ی علوم کشاورزی دانشگاه گیلان جمع‌آوری و پس از شناسایی با توجه به منابع معتبر (رضوانی، ۱۳۸۹)، روی بوته‌های خیار که در مرحله ی ۴-۵ برگی قرار داشتند، مستقر شدند. پس از استقرار کامل و آلوده سازی بوته‌ها، برگ‌های خیار به همراه شته‌ی جالیز جهت تغذیه در اختیار کفشدوزک‌ها قرار گرفتند.

پرورش کفشدوزک *A. decempunctata*

برگ‌های حاوی شته و دسته‌های تخم و سنین مختلف لاروی کفشدوزک *A. decempunctata* از درخت‌های انار در منطقه شاندرمن و ماسال و گل‌های ختمی در سطح شهر رشت جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پرورش در شرایط اتاقک رشد با دمای ۲± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت (تاریکی: روشنایی) انجام شد. بدین منظور از ظروف پلاستیکی درپوش‌دار شفاف به ابعاد ۱۰×۸×۵ سانتی‌متر استفاده شد، که روی درپوش آن‌ها به‌منظور تهویه، توری تعبیه شده بود. لاروها به‌صورت انفرادی در شرایط کنترل شده تا زمان شفیره شدن و ظهور حشرات کامل روی برگ-های خیار حاوی شته جالیز پرورش یافتند. برای جلوگیری از خشک شدن برگ، انتهای دم‌برگ‌ها باپنبه‌های خیس شده با آب مقطر پیچیده شدند. سپس برگ‌های خیار که حاوی تخم کفشدوزک بود جدا و تا زمان تفریخ تخم‌ها در ظروف جداگانه در شرایط اتاقک پرورش نگهداری شدند. برای جلوگیری از هم‌خواری[3] (Rondoni *et al*., 2012) لاروهای سن اول کفشدوزک پس از ظهور به‌صورت انفرادی درون ظرف‌های جداگانه به‌همراه برگ‌های خیار

1. Pyriproxyfen
2. Victor
3. Cannibalism

حاوی شته‌ی جالیز قرار داده شدند. پس از تشکیل کلنی اولیه، برای به دست آوردن لاروهای هم‌سن، حشرات نر و ماده داخل ظروف پرورش به ابعاد ۱۰×۸×۵ سانتی‌متر به‌همراه برگ خیار حاوی شته قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، تخم‌های گذاشته شده روی برگ‌ها به ظرف پرورش دیگری منتقل شدند.

آزمایش‌های زیست‌سنجی

در این پژوهش حشره‌کش پایری‌پروکسی‌فن ماده‌ی تکنیکال (۹۷٪) خریداری شده از مجتمع شیمیایی بیستون (کرمانشاه–ایران) مورد استفاده قرار گرفت. شش غلظت ۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از پایری‌پروکسی‌فن با حلال استون (Merck Co.,Germany) تهیه شد. برای تعیین IC_{10}, IC_{30}, IC_{50} و IC_{90} تعداد ۹۰ لارو سن چهارم به ازای هر غلظت و ۹۰ لارو به ازای شاهد مورد آزمایش قرار گرفت. قسمت پشتی (بند دوم شکمی) هر لارو به‌وسیله میکرواپلیکاتور (Drummond, USA) با غلظت ۲ میکرولیتر به‌صورت موضعی تیمار شد. میزان تلفات و بدشکلی‌ها (لارو ماندگار، شفیره ماندگار و حالت بین شفیره و حشره‌ی کامل) تا زمان ظهور حشره‌ی کامل ثبت شد و میزان IC_{90}-IC_{10} با استفاده از نرم‌افزار POLO-PC (1987) تخمین زده شد.

آزمایش‌های بیوشیمیایی

بعد از انجام آزمایش‌های زیست سنجی، لاروهای سن چهارم با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پایری‌پیروکسی‌فن تیمار شدند و لاروهای زنده مانده بعد از ۲۴ و ۷۲ ساعت جدا شد و برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین لاروهای سن چهارم تیمار شده با استون به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از کل بدن لاروها و برای یکنواخت‌سازی نمونه ها از هموژنایزر دستی استفاده شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل

برای اندازه‌گیری پروتئین از روش بردفورد استفاده شد (Bradford, 1976). بدین منظور، هر لارو با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات[1] همگن شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. سپس به ۱۰ میکرولیتر از محلول رونشین، ۵۰۰ میکرولیتر معرف بردفورد اضافه شد (معرف بردفورد: ۱۰ میلی‌گرم پودر کوماسی برلیانت بلو[2] G250 در ۵ میلی لیتر اتانول[3] ۹۶٪ حل شده و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک[4] (w/w) ۸۵٪ به آن اضافه و حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد). میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (AWARENESS Stat Fax 3200 Co., USA) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. میزان پروتئین کل با استفاده از منحنی استاندارد پروتئین سرم گاوی محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان لیپید و گلیکوژن

برای اندازه‌گیری میزان لیپید و گلیکوژن به‌روش وان هندل عمل شد (Van Handel, 1965). بدین منظور تعداد سه عدد لارو سن چهارم در ۱۰۰ میکرولیتر سولفات سدیم[5] ۲٪ (۰/۲گرم در ده میلی‌لیتر آب مقطر) همگن شد و سپس با اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم[6]:متانول[7] (۱:۲) به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد.

برای اندازه‌گیری میزان لیپید، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رونشین برداشته شد و برای تبخیر محلول موجود در آن در آون با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس، به نمونه خشک شده ۵۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک[8] اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه (دمای ۹۰ درجه سلسیوس) در بن ماری قرار داده شد. پس از سرد شدن، ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌ها همراه با ۲۷۰ میکرولیتر معرف وانیلین[9] (۶ میلی‌گرم وانیلن حل شده در یک میلی‌لیتر آب مقطر و چهار میلی‌لیتر اسید

1. Phosphate buffer
2. Coomassie brilliant blue
3. Ethanol
4. Phosphoric acid
5. Sodium sulfate
6. Chloroform
7. Methanol
8. Sulfuric acid
9. Vanillin

فسفریک ۸۵٪) داخل چاهک‌های پلیت الیزا قرار داده شد. پس از ۳۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۴۵ ناتومتر خوانده شد. میزان لیپید کل با استفاده از منحنی استاندارد کلسترول تعیین شد.

برای تعیین مقدار گلیکوژن از ته‌نشین محلول سانتریفیوژ شده استفاده شد. ابتدا ته‌نشین سه بار در متانول ۸۰ ٪ شستشو شد و سپس به آن ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت پنج دقیقه (دمای ۷۰ درجه سلسیوس) در بن‌ماری حرارت داده شد. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر آن، ۵۰۰ میکرولیتر معرف آنترون[1] اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس در بن‌ماری حرارت داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها داخل چاهک‌های پلیت الیزا منتقل و میزان جذب آن ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. میزان گلیکوژن کل هر لارو با استفاده از منحنی استاندارد گلیکوژن محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت استرازهای عمومی

فعالیت استرازهای عمومی مطابق روش ون اسپرن اندازه گیری شد (Van Asperen, 1962). برای اندازه‌گیری فعالیت استراز از سوبسترهای آلفا- نفتیل استات[2] و بتا- نفتیل استات[3] استفاده شد. ابتدا هر لارو در ۱۰۰ میکرولیتر بافرفسفات (20mM; pH 7.0) حاوی ترایتون[4] به نسبت ۰/۱ درصد همگن شد، سپس محلول همگن شده در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. ۱۳ میکرولیتر از محلول رونشین با ۱۱۲ میکرولیتر بافر فسفات، ۲۵ میکرولیتر سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر معرف رنگی[5] به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد و جذب محصول رنگی ایجاد شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای سوبسترای آلفا- نفتیل استات و ۵۴۰ نانومتر برای سوبسترای بتا- نفتیل استات هر ۳۰ ثانیه یکبار با ۱۲ تکرار خوانده شد. جذب محصول رنگی به صورت کاینتیک[6] و در زمان‌های مختلف خوانده شد و از شیب خط رگرسیونی برای محاسبه فعالیت آنزیم‌های استراز استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز[7]

به منظور اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز به روش هبیگ مورد انجام شد (Habig *et al*., 1974). با استفاده از سوبسترای CDNB[8] ابتدا هر لارو در ۱۵۰ میکرولیتر بافر فسفات همگن شد. سپس، محلول همگن شده در ۱۲۰۰۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول رونشین با ۱۱۰ میکرولیتر بافر فسفات ، ۸۰ میکرولیتر سوبسترای CDNB (1.2 mM) و ۱۰۰ میکرولیتر گلوتاتیون احیا شده GSH[9] (10 mM) مخلوط شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر هر ۲۰ ثانیه و در ۱۱ تکرار خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز POD[10]

برای اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز از روش برگمیر استفاده شد (Bergmeyer, 1974). بدین منظور تعداد دو عدد لارو سن چهارم در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم همگن و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. واکنش در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر انجام شد که شامل ۲۲۵ میکرولیتر (پراکسید هیدروژن[11] ۲۲۵ میلی‌مولار) و ۲۲۵ میکرولیتر (گایاکول[12] ۴۵ میلی‌مولار) انجام شد و از ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با هفت به عنوان بلانک استفاده شد. در این روش فعالیت آنزیم که در نتیجه اکسیداسیون گایاکول می‌باشد، با پایش تغییرات جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر از زمان صفر تا دو دقیقه هر ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری شد.

1. Anthrone
2. Alpha naphthyl acetate
3. Beta naphthyl acetate
4. Triton
5. Fast blue RR salt
6. Kinetic
7. Glutathione S-transferase
8. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
9. Glutathione
10. Peroxidase
11. H_2O_2
12. Guaiacol

تجزیه و تحلیل داده‌ها

میزان غلظت‌های بازدارنده‌ی پایری‌پروکسی‌فن با استفاده از نرم‌افزار POLO-PC (1987) تخمین زده شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 (2002) و مقایسه میانگین‌ها پس از نرمال‌سازی با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

حشرات شکارگر از طریق روش‌های مختلف، به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم با تغذیه از طعمه‌های آلوده به آفت‌کش‌ها و یا به دلیل تماس با بقایای آفت‌کش‌ها روی گیاهان، تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Medina *et al*., 2003). مقادیر بازدارندگی (IC_{10}، IC_{30}، IC_{50} و IC_{90}) ترکیب پایری‌پروکسی‌فن را روی لارو سن چهارم کفشدوزک *A. decempunctata* به ترتیب ۱۸/۶، ۳۳/۱، ۴۹/۳ و ۱۳۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر برآورد شد (جدول ۱). علیزاده و همکاران (Alizadeh *et al*., 2012) غلظت کشنده‌ی فرمولاسیون EC10% آن را برای لارو سن سوم پروانه پشت الماسی، ۲/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند. از طرف دیگر، شریفی و همکاران (Sharifi *et al*., 2013) میزان غلظت کشنده را برای لارو سن پنجم بید آرد، ۴۵/۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد کرده‌اند، اما مطالعه حاضر نشان می‌دهد که این ترکیب روی شکارگر مذکور تأثیر بازدارندگی بیش‌تری داشته است. به طور کلی پژوهش‌ها در خصوص تأثیر این آفت‌کش و سایر تنظیم کنندگان رشد روی شکارگرها بسیار محدود است. مدینا و همکاران (Medina *et al*., 2003) غیر سمی بودن این ترکیب را برای لارو بالتوری سبز گزارش کردند. هم‌چنین مطالعه ناگایی(Nagai, 1990) روی سن *Orius* نیز نتیجه مشابهی داشته و نشان از امن بودن این ترکیب برای شکارگر مذکور دارد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر سمیت این آفت‌کش روی حشرات آفت و شکارگرها متفاوت است. این نتیجه می‌تواند انگیزه‌ای برای استفاده از این ترکیب به منظور حفظ شکارگرها باشد.

میزان لیپید در لاروهای تیمار شده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پایری‌پروکسی‌فن، ۲۴ ساعت پس از تیمار افزایش معنی‌داری نشان داد ($F=16.13, df=2,9, P=0.0029$). هم‌چنین، مقدار لیپید، ۷۲ ساعت پس از تیمار اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تیمار نشان داد ($F=48.33, df=2,9, P=0.0001$) (شکل ۱). حشرات بعد از قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌ها به سنتز و ذخیره‌سازی چربی می‌پردازند و با کمک ذخایر چربی به تنش‌های فیزیولوژیکی ایجاد شده توسط ترکیبات سمی و یا آلاینده‌های زیست محیطی غلبه می‌کنند (Shahriari *et al*., 2019)، بنابراین این احتمال وجود دارد که افزایش مقدار لیپید در لاروهای تیمار شده به دلیل پاسخ به تنش وارد شده با پایری‌پروکسی‌فن باشد. لیپیدها منابع حیاتی انرژی حشرات محسوب می‌شوند و تنظیم آن‌ها توسط غدد درون‌ریز تبیین می‌شود (Nation, 2008). شبه هورمون جوانی از عوامل مهم سنتز و مصرف لیپید در حشرات محسوب می‌شود (Etebari *et al*., 2007). به‌نظر می‌رسد که لارو این کفشدوزک به دلیل افزایش مقدار هورمون جوانی در همولنف (تحت تیمار با پایری‌پروکسی‌فن)، مجبور به سنتز لیپید و ذخیره‌سازی آن شده و سپس آن را کاتابولیز می‌کند تا به مصرف فرآیندهای متابولیکی به‌ویژه زمانی‌که طول دوره‌ی لاروی افزایش می‌یابد، برساند (Chapman, 2013). در حشرات با دگردیسی کامل، لاروها به دوره‌ی شفیرگی ورود پیدا می‌کنند و بنابراین عملکرد لیپید در حضور شبه هورمون جوانی اختلاف فاحشی را با حشرات دارای دگردیسی ناقص نشان می‌دهد. برای مثال، باقری و همکاران (Bagheri *et al*., 2010) کاهش لیپید را در حشرات تیمار شده خود، *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera.: Pentatomidae) که یک حشره‌ی دارای دگردیسی ناقص است، گزارش می‌کنند. تحقیق حاضر با نتایج سایر پژوهشگران (Etebari *et al*, 2007; Shekari *et al*., 2008) از نظر افزایش لیپید که روی حشرات دارای دگردیسی کامل کار کرده‌اند، مشابه و با تحقیق باقری و همکاران متفاوت است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در شکل ۲ میزان گلیکوژن در ۲۴ ساعت (F=93.77, df=2,9, P=0.0001) و ۷۲ ساعت (F=26.19, df=2,9, P=0.0002) نسبت به شاهد کاهش یافته است. کربوهیدرات‌ها که شامل قندهای ساده نشاسته و سایر پلی‌ساکاریدها هستند، از اجزای مهم غذایی حشرات محسوب می‌شوند. این ترکیبات جزء سوخت تنفسی هستند، قابلیت تبدیل به چربی را دارند و هم‌چنین در سنتز اسیدهای آمینه مشارکت دارند. علاوه بر این کوتیکول حشرات واجد پلی‌ساکارید کیتین می‌باشد (Chapman, 2013). گلیکوژن به‌عنوان یک کربوهیدرات ذخیره شدنی و پلی‌مری از گلوکز محسوب می‌شود. هورمون آدیپوکاینتیک (AKH)[1] در تجزیه گلیکوژن به گلوکز نقش دارد و هورمون‌های شبه آنسولین (ILPs)[2] نیز در تجزیه‌ی آن‌ها دخالت دارند که اولی در اجسام کاردیاکا و دومی توسط اجسام آلاتا ترشح می‌شوند (Chapman, 2013). به نظر می‌رسد که به دلیل افزایش فعالیت اجسام آلاتا به دلیل حضور پایری‌پروکسی‌فن، تجزیه‌ی گلیکوژن انجام شده، بنابراین کاهش مقدار گلیکوژن از این منظر قابل توجیه است. از طرفی، کاهش در میزان گلیکوژن ناشی از شکسته شدن آن در اجسام چربی و انتشار آن به‌صورت ترهالوز تحت شرایط تنش به‌دلیل حضور پایری‌پروکسی‌فن تلقی شده است (Nath, 2003). نتایج تحقیق حاضر با نتایج میرحق‌پرست و همکاران (Mirhaghparast *et al*., 2015) و رحیمی و همکاران (Rahimi *et al*., 2013) که به‌ترتیب تأثیر هگزافلومورون و پایری‌پروکسی‌فن را به ترتیب روی کرم ساقه خوار برنج و کرم غوزه‌ی پنبه، گزارش کرده‌اند، منطبق است.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، میزان پروتئین در لاروهای تیمار شده با غلظت IC_{30} پایری‌پروکسی‌فن ۲۴ ساعت پس از تیمار نسبت به شاهد افزایش یافته است (F=16.64, df=2,9, P=0.0017). این در حالی است که ۷۲ ساعت پس از تیمار با هر دو غلظت IC_{30} و IC_{10} پایری‌پروکسی‌فن، میزان پروتئین به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافته است (F=14.01, df=2,9, P=0.0017)، اما بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. پروتئین‌ها نقش بنیادی در ساختار آنزیم‌های مختلف، هورمون‌ها، ریخت‌سازی، اسکلریته شدن کوتیکول، دیاپوز و انتقال پیام‌های عصبی دارند (Chapman, 2013). بررسی‌ها در خصوص تأثیر شبه-هورمون جوانی (پایری‌پروکسی‌فن) در بال‌پولکداران (کرم ابریشم) نشان داده است که مقدار پروتئین کل کاهش پیدا می‌کند (Etebari *et al*., 2007). شبه‌هورمون جوانی، حشره را تحت تنش قرار می‌دهد، بنابراین لارو برای تشکیل آنزیم‌های سم‌زدا و به‌ویژه استرازها، پروتئین را تجزیه و به اسیدهای آمینه تبدیل می‌کند (Perveen and Miyata, 2000; El-Sayed *et al*., 2018). در تحقیق حاضر، افزایش میزان پروتئین کل بدون در نظر گرفتن نوع پروتئین‌ها را می‌توان به نقش هورمون جوانی در سنتز و آزاد سازی پروتئین‌های ساختاری که در جلد به‌کار می‌روند و یا به احتمال در تولید میکرو و ماکرو ویتولوژن‌هایی نسبت داد که سبب بروز حالت‌های بین شفیره و لارو می‌شوند. در خصوص راسته سخت‌بالپوشان، افزایش مقدار پروتئین و ژن منتسب به فعال‌سازی پروتئین گزارش شده است که با تحقیق حاضر در میزان افزایش سطح پروتئین مطابقت دارد (Aribi *et al*., 2006).

همان‌طور که در شکل ۴ قابل مشاهده است، فعالیت ویژه آلفا-استراز در لاروهای سن چهارم تیمار شده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ (F=11.58, df=2,9, P=0.0032) و ۷۲ (F=12.46, df=2,9, P=0.0011) ساعت افزایش یافت. در شکل ۵، فعالیت ویژه بتا-استراز تحت تیمار IC_{30}، ۲۴ ساعت پس از تیمار با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار است (F=14.92, df=2,9, P=0.0036). در ۷۲ ساعت پس از تیمار، هر دو غلظت مورد استفاده با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند (F=49.07, df=2,9, P=0.0001). آنزیم‌های سم‌زدا در حشرات نقش بسیار موثری را در غیر فعال کردن ترکیبات خارجی داشته و در حفظ شرایط با ثبات فیزلوژی حشره

1. Adipokinetic hormone
2. Insulin-like peptides

حیاتی می‌باشند (Li and Liu, 2007; Sayyed *et al*., 2010). طبق گزارش‌ها، استرازها به‌عنوان یکی از عوامل اصلی در مقاومت مگس خانگی نسبت به آنالوگ‌های هورمون جوانی محسوب می‌شوند (Bull and Meola, 1994; Li *et al*., 2007)، بنابراین افزایش فعالیت استراز ها در تحقیق حاضر را می‌توان به‌حضور پایری‌پروکسی‌فن نسبت داد.

فعالیت GST ۲۴ ساعت پس از تیمار با پایری‌پروکسی-فن (IC_{10} و IC_{30}) نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($F=18.01, df=2,9, P=0.0044$). پس از ۷۲ ساعت تحت تیمار IC_{30} اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد و IC_{10} دیده شد ($F=39.56, df=2,9, P=0.0001$) (شکل ۶). آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در مقاومت حشرات به حشره‌کش‌ها نقش اساسی دارد (Vanhaelen *et al*., 2001). افزایش معنی‌دار GST ۷۲ ساعت پس از تیمار تحت غلظت IC_{30} نشان‌دهنده‌ی نقش آن در سم‌زدایی پایری‌پروکسی‌فن است. نتایج حاضر منطبق با گزارش فهمی در لارو *Spodoptera littoralis* پس از تیمار دو نوع IGR به‌نام‌های بوپروفزین[1] و پایری‌پروکسی‌فن بود که به این نتیجه رسید که بوپروفزین توانست GST را فعال کند، اما در مورد پایری‌پروکسی‌فن فعالیت محسوسی مشاهده نشد (Fahmy, 2012).

پراکسیدازها از جمله ترکیبات بسیار مهم در سامانه آنتی اکسیدانی حشرات محسوب می‌شوند و نقش حیاتی در تنش اکسیداتیو دارند. تنش اکسیداتیو به معنی عدم توازن بین تولید رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های فعال نظیر گونه‌های فعال اکسیژن است (ROS)[2] (Piner and Uner, 2013). نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت ویژه پراکسیداز (شکل ۷) در لاروهای سن چهارم تیمار شده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ نسبت به شاهد افزایش یافته است ($F=26.64, df=2,9, P=0.0001$). این در حالی است که ۷۲ ساعت پس از تیمار با هر دو غلظت IC_{30} و IC_{10} پایری‌پروکسی‌فن، میزان فعالیت پروکسیداز نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($F=19.93, df=2,9, P=0.0022$)، اما بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. حشرات در مقایسه با بسیاری از مهره‌داران طول عمرکوتاهی دارند، اما بیش‌تر تحت تأثیر تنش‌های اکسیداتیو قرار دارند. رشد و نمو، زنده‌مانی، زادآوری و طول عمر حشرات ممکن است تحت تأثیر پرواکسیدان‌ها[3] و اکسیژن‌های واکنش‌گر قرار گیرد. بنابراین حشرات دارای مجموعه‌ای از آنزیم‌ها هستند که در حذف اکسیژن‌های واکنش‌گر از بدن حشرات نقش دارند که یکی از این آنزیم‌ها پراکسیداز است (Felton and Clinton, 1995). افزایش فعالیت پراکسیداز در این پژوهش نشان می‌دهد که این آنزیم برای کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن فعالیت بیشتری نشان داده است که این تنش وارده می‌تواند به علت در معرض قرار گرفتن پایری‌پروکسی‌فن باشد.

پایری‌پروکسی‌فن به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی رشد در حشرات محسوب می‌شود و بر اساس گزارش منتشر شده روی حشراتی نظیر شته *A. gossypii* تأثیر قابل توجهی در مراحل پورگی نشان داده است (Barrania and Abou-Taleb, 2014). بر اساس همین گزارش، پایری‌پروکسی‌فن تأثیر چندانی روی مراحل بالغ ندارد و دلایل تأثیر آن روی مراحل نابالغ از طریق اختلال در فرایند رشد است. از طرفی دیگر، گزارش‌هایی مبنی بر بروز مقاومت در *A. gossypii* به سموم نئونیکوتینوئیدها[4] نظیر ایمیداکلروپراید[5] وجود دارد (Hirata *et al*, 2017). بنابراین استفاده از ترکیباتی با تأثیر کند و با هدف تأثیر روی مراحل نابالغ، و هم‌چنین با تأثیر کمتر روی دشمنان طبیعی مطلوب‌تر به‌نظر می‌رسد (Rothwangle *et al*., 2004). بررسی حاضر نشان می-دهد که آفت‌کش پایری‌پروکسی‌فن ترکیبی به نسبت امن است، بنابراین امکان رهاسازی حشرات بالغ شکارگر *A. decempunctata* همراه با این آفت‌کش قابل بررسی

1. Buprofezin
2. Reactive Oxygen Species

3. Prooxidants
4. Neonicotinoid
5. Imidacloprid

است. هرچند کاربرد هم‌زمان این شکارگر و آفت‌کش مذکور در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه نیازمند بررسی-های تکمیلی است تا بتوان به یک نتیجه‌ی قطعی رسید.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه گیلان برای تأمین بخشی از کمک‌های مالی جهت انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

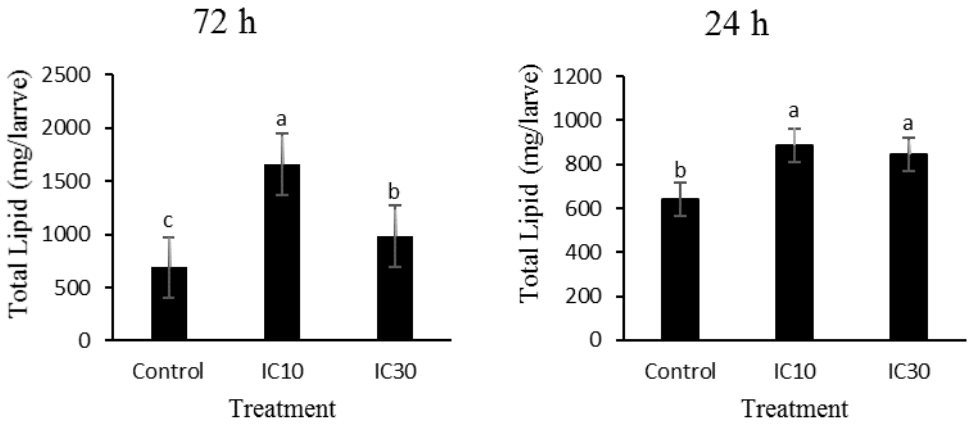
جدول ۱- واکنش لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* به پایری‌پروکسی‌فن و برآورد مقادیر $IC_{90}, IC_{50}, IC_{30}$, IC_{10} بر حسب میلی‌گرم بر لیتر، حدود اطمینان (٪۹۵) و شیب خط رگرسیونی پس از تیمار

Table 1. Response of the 4th instar larvae of *Adalia decempunctata* to pyriproxyfen and estimation of (IC_{10}, IC_{30}, IC_{50} and IC_{90}) in mg per liter, confidence limit (%95) and regression slope after treatment

IC_{10} (mg ai/L) (95% CL) *	**IC_{30} (mg ai/L) (95% CL)** *	**IC_{50} (mg ai/L) (95% CL)** *	**IC_{90} (mg ai/L) (95% CL)** *	**X^2 (df)****	**Slop ± SE**
18.6 (13.3 - 23.4)	33.1 (26.9 – 38.4)	49.3 (43.1 - 55.1)	130.6 (112.03 – 161.6)	3.1 (4)	3.03 ± 0.31

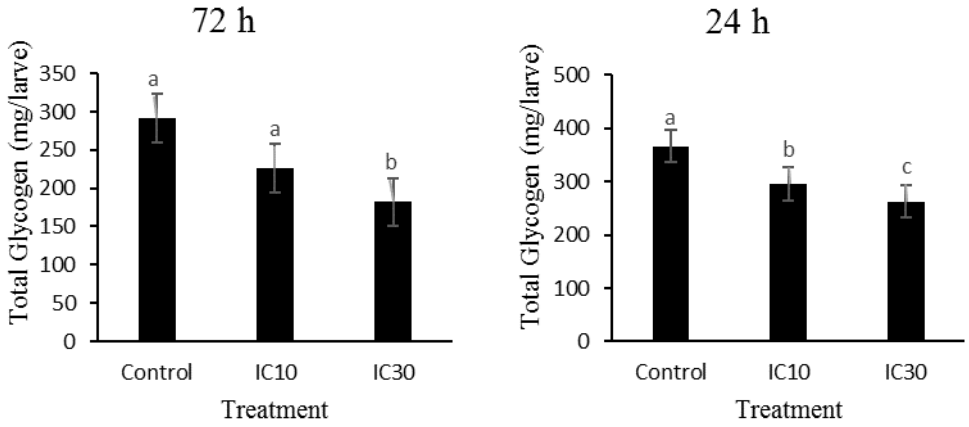
*CL=Confidence Limit **X^2=Chi-Square, (df)=Degrees of freedom

Data were recorded after all the controls became adult.



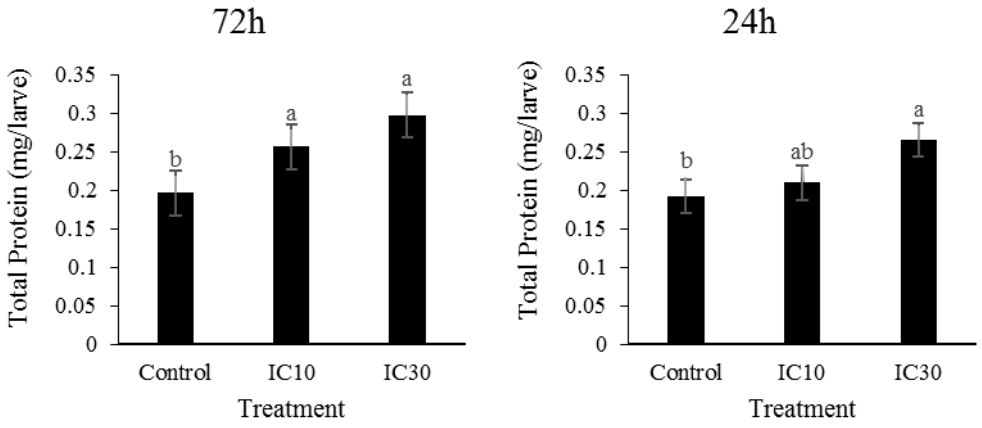
شکل ۱- میانگین±خطای معیار لیپید بر حسب میلی‌گرم بر لارو در لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* تیمار شده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} (میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0.05$)).

Figure 1. The mean ± SE of lipid in mg per larve in 4rd larval stage of *Adalia decempunctata* treated with IC_{10} and IC_{30} concentrations (The means with different letters show significant differences at $P<0.05$)



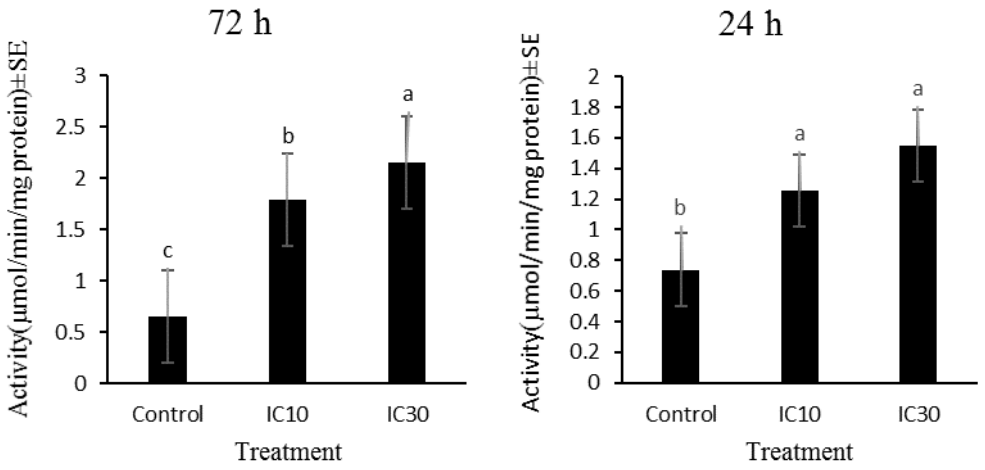
شکل ۲- میانگین±خطای معیار گلیکوژن بر حسب میلی‌گرم بر لارو در لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* تیمار شده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت (میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی-دار هستند ($P<0.05$)).

Figure 2. The mean ± SE of glycogen in mg per larve in 4rd larval stage of *Adalia decempunctata* treated with IC_{10} and IC_{30} concentrations after 24 and 72 hours (The means with different letters show significant differences at $P<0.05$)



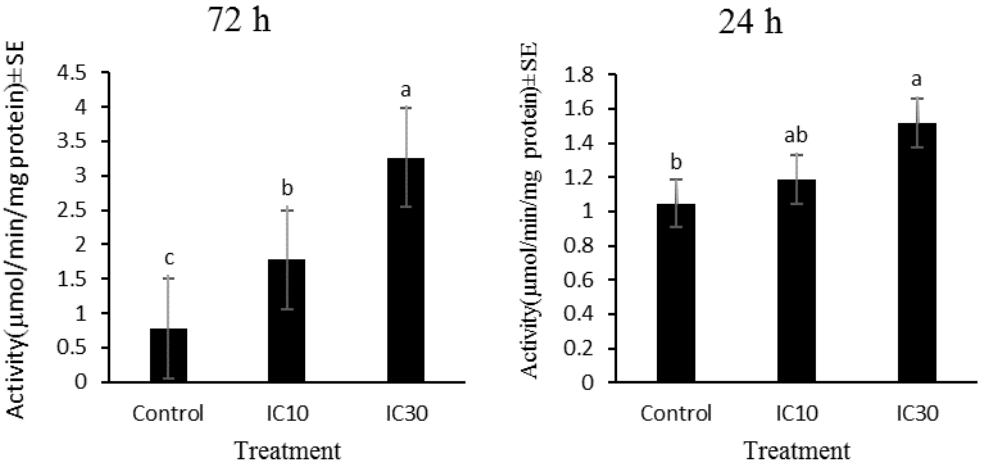
شکل ۳- میانگین±خطای معیار پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر لارو در لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* تیمار شده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت (میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی-دار هستند ($P<0.05$)).

Figure 3. The mean ± SE of protein in mg per larve in 4rd larval stage of *Adalia decempunctata* treated with IC_{10} and IC_{30} concentrations after 24 and 72 hours (The means with different letters show significant differences at $P<0.05$)



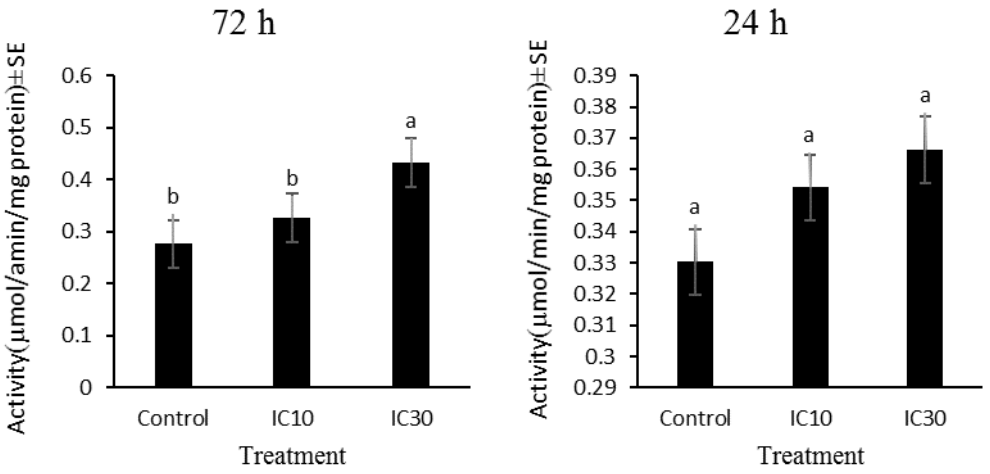
شکل ۴- فعالیت ویژه ± خطای معیار آنزیم آلفا – استراز در لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* تیمارشده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت (میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0.05$).

Figure 4. Specific activity ± SE of α-esterase enzyme in 4rd larval stage of *Adalia decempunctata* treated with IC_{10} and IC_{30} concentrations after 24 and 72 hours (The means with different letters show significant differences at $P<0.05$)



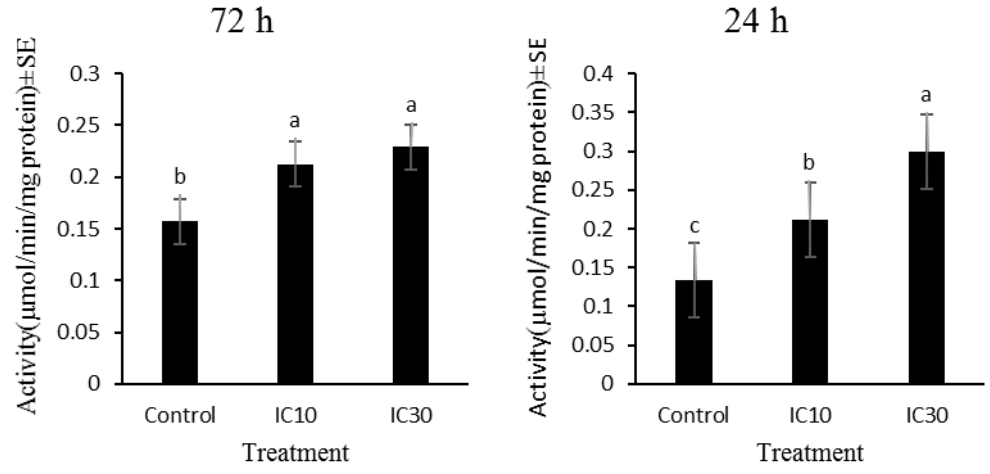
شکل ۵- فعالیت ویژه ±خطای معیار آنزیم بتا – استراز روی لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* تیمارشده با غلظت-های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت(میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی‌دارهستند ($P<0.05$).

Figure 5. Specific activity ± SE of β-esterase enzyme in 4rd larval stage of *Adalia decempunctata* treated with IC_{10} and IC_{30} concentrations after 24 and 72 hours (The means with different letters show significant differences at $P<0.05$)



شکل ۶- فعالیت ویژه ± خطای معیار آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز روی لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* تیمارشده با غلظت‌های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت (میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0.05$)).

Figure 6. Specific activity ± SE of glutathione S-transferase enzyme in 4rd larval stage of *Adalia decempunctata* treated with IC_{10} and IC_{30} concentrations after 24 and 72 hours (The means with different letters show significant differences at $P<0.05$)



شکل ۷- فعالیت ویژه ±خطای معیار آنزیم پراکسیداز روی لاروهای سن چهارم *Adalia decempunctata* تیمارشده با غلظت-های IC_{10} و IC_{30} پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت (میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0.05$)).

Figure 7. Specific activity ± SE of peroxidase enzyme in 4rd larval stage of *Adalia decempunctata* treated with IC_{10} and IC_{30} concentrations after 24 and 72 hours (The means with different letters show significant differences at $P<0.05$)

References

Alizadeh, M., Karimzadeh, J., Rassoulian, G. R., Farazmand, H., Hoseini-Naveh, V. and Pourian. H. R. 2012**.** Sublethal effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue, on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): life table study. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 45(14): 1741–1763.

Aribi, N., Smagghe, G., Lakbar, S., Soltani-Mazouni, N. and Soltani, N. 2006. Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm, *Tenebrio molitor*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 84: 55–62.

Arthur, F. H., Liu, S., Zhao, B. and Phillips, T. W. 2009. Residual efficacy of pyriproxyfen and hydroprene applied to wood, metal and concrete for control of stored-product insects**. Pest Management Science** 65: 791–797.

Bagheri, F., Talebi, Kh. and Hosseininaveh, V. 2010. Cellular energy allocation of pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera.: Pentatomidae) in relation to juvenoid pyriproxyfen. **African Journal of Biotechnology** 9(35): 5746-5753.

Barbosa, P., Oliveira, M. D., Barros, E. M., Michaud, J. P. and Torres, J. B. 2017. Differential impacts of six insecticides on a mealybug and its coccinellid predator. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 147: 963–971.

Barrania, A. and Abou-Taleb, H. K. 2014. Field efficiency of some insecticide treatments against whitefly, *Bemisia tabaci*, cotton aphid, *Aphis gossypii* and their associated predator, *Chrysopa vulgaris*, in cotton plants. **Alexandria Journal of Agricultural Research** 59(2): 105-111.

Bergmeyer, H. U. 1974. Methods of enzymatic analysis, vol II, Academical Press, New York. pp.495-496.

Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L. and Desneux, N. 2012. The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. **Pest Management Science** 68: 1523–1536.

Blackman, R. L. and Eastop, V. F. 2000. Aphids on the world's crops: an identification and information guide (2nd ed.), Wiley, London, United Kingdom.

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.

Bull, D. L. and Meola, R. W. 1994. Efficacy and toxicodynamics of pyriproxyfen after treatment of insecticide susceptible and resistant strains of the house fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology** 87: 1407-1415.

Dáder, B., Moreno, A., Viñuela, E. and Fereres, A. 2012. Spatio-temporal dynamics of viruses are differentially affected by parasitoids depending on the mode of transmission. **Viruses** 4: 3069-3089.

Enayati, A. A., Ranson, H. and Hemingway. J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticides resistance. **Insect Molecular Biology** 14(1): 3-8.

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.

Evans, E. W., Soares, A. O. and Yasuda, H. 2011. Invasions by ladybugs, ladybirds, and other predatory beetles. **Biological Control** 56(4): 597–611.

Fahmy, M. N. 2012. Impact of two insect growth regulators on the enhancement of oxidative stress and antioxidant efficiency of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Biosd.). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences** 5(1): 137-149.

Fernandes, M. E., Alves, F. M., Pereira, R. C., Aquino, L. A., Fernandes, F. L. and Zanuncio, J. C. 2016. Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials. **Chemosphere** 156: 45–55.

Galvan, T. L., Koch, R. L. and Hutchison, W. D. 2005. Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development, and reproduction of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: coccinellidae). **Biological Control** 34: 108–114.

Felton, G. W. and Summer, C. B. 1995. Antioxidant systems in insects. **Archives of insect Biochemistry and Physiology** 29: 187-197.

Gerling, D. 1990. Whiteflies: Their bionomics, pest status and management. Winborne, Uk, Intercept. 348 pp.

Guncan, A. and Yoldas, Z. 2010. Studies on the aphids (Hemiptera: Aphididae) and their natural enemies on peach orchards in Izmir**. Turkish Journal of Entomology Dergisi** 34(3): 399-408.

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biology and Chemistry** 249: 7130-7139.

Hirata, K., Akiya, J., Seigo, K., Kanazawa, J. and Takao, I. 2017. The R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor of *Aphis gossypii* is associated with neonicotinoid insecticide resistance with differential effects for cyano- and nitrosubstituted neonicotinoids. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 143: 57-65.

Hodek, I. 1973. Biology of Coccinellidae. Praha: Academia publishing house of the Czechoslovak Academy of Sciences; 260 p.

Honek, A. 1985. Habitat preferences of aphidophagous Coccinellids (Coleoptera). **Entomophaga** 30(3): 253-64.

Horowitz, A. R. and Ishaaya, I. 1994. Managing resistadce to insect growth regulators in the sweet potato whitefly (Hom: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology** 87(4): 866-871.

Ishaaya, I., Mendelson, Z. and Melamed-Madgev, V. 1998. Effects of buprofezin on embryogenesis and progeny formation of sweet potato whitefly (hom: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology** 81(3): 781-78.

Kacar, G. 2015. Survey of Coccinellid species and their preys in olive groves in Turkey. **Egyptin Journal of Biological Pest Control**. 25(1): 157-161.

Kocourek, F. Havelka, J. Derankova, J. and Jarosinc, V. 1994. Effect of temperature on developmental rate and intrinsic rate of increase of *Aphis gossypii* reared on greenhouse cucumbers. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 71: 59–64.

LeOra Software. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley CA.

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

Li, X. Z. and Liu, Y, H. 2007. Diet influences the detoxification enzyme activity of *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae). **Acta Entomologica Sinica** 50(10): 989-995.

Liu, T. X. and Chen, T. Y. 2000. Effects of the chitin synthesis inhibitor buprofezin on survival and development of immatures of *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae). **Journal of Economic Entomology** 93: 234-245.

Magro, A., Araujo J. and Hemptinne J. L. 1999. Coccinellids (Coleoptera: Coccinellidae) in citrus groves in Portugal: listing and analysis of geographical distribution. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas** 25: 335-45.

Martinou, A. F., Seraphides, N. and Stavrinides, M. C. 2014. Lethal and behavioral effects of pesticides on the insect predator *Macrolophus pygmaeus*. **Chemosphere** 96: 167–173.

Medina, P., Smaghe, G., Budia, F., Tirry, L. and Vinuela, E. 2003. Toxicity and Absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after Topical Application in Predatory Larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology** 32(1): 196-203.

Memarizadeh, N. Ghadamyari, M., Sajedi, R. H. and Jalali, J. 2011. Characterization of esterases from abamectin-resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **International Journal of Acarology** 37(4): 271-281.

Mohamad poor, A., Jafari, R. Biranvand, A. Zare M. and Rafiei Karahrudi, Z. 2013. Ladybirds associated with Pomegranate trees in Lorestan province of Iran (Coleoptera: Coccinellidae). **International Research Journal of Applied and Basic Sciences** 5(12): 1585-1589.

Mirhaghparast, S. K., Zibaee, A., Jalali Sendi, J., Hoda, H. and Fazeli-Dinan, M. 2015. Immune and metabolic responses of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to an insect growth regulator, hexaflumuron, **Pesticide Biochemistry and Physiology** 125: 69–77.

Nagai, K. 1990. Effects of a juvenile hormone mimic material, 4-phenoxylphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether, on *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thrypidae) and its predator Orius sp. (Hemiptera: Anthocoridae). **Applied Entomology and Zoology** 25: 199-204.

Nath, B. S. 2003. Shifts in glycogen metabolism in hemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* (Lep.: Bombycidae) in response to organophosphorus insectisides toxicity. **Pesticides Biochemistry and Physiology** 74: 73-74.

Nation, J. L. 2008. Insect Physiology and Biochemistry, 2nd edition. CRC Press.

Perveen, F. and Miyata, T. 2000. Effects of sublethal dose of chlorfluazuron on ovarian development and ogenesis in the common cutworm *Spodoptera liturallis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America** 93: 1131–1137.

Piner, P. and Ünerb, N. 2013. Oxidative stress and apoptosis were induced by bio-insecticide spinosad in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 36(3): 956-963.

Prodanovic, D. J., protic L. and Mihajlovic, L. 2010. Predatorii parazitoidi *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae). **Journal Pesticides and Phytomedicine** 25(1): 29-42.

Rahimi, V., Zibaee, A., Mojahed, S. Madahi, K. and Zare, D. 2013. Effects of pyriproxyfen and hexaflumuron on cellular immunity of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), Romanian, **Journal of Biological Zoology** 58(3): 114-126.

Rahmani, S. and Bandani, A. R., 2013. Sublethal concentrations of thiamethoxam adversely affect life table parameters of the aphid predator, *Hippodamia variegate* Goeze (Coleoptera: Coccinellidae). **Crop Protection** 54: 168-175.

Rezvani, A. 2010. Identification key of Iran aphids. Iran organization of agricultural research. (in Farsi).

Rondoni, G., Onofri, A. and Ricci, C. 2012. Laboratory studies on intraguild predation and cannibalism among Coccinellid larvae (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology** 109: 353–362.

Rothwangl, K. B., Cloyd, R. A. and Wiedenmann, **R. N.** 2004. Effects of Insect growth regulators on citrus mealbug parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Journal of Economic Entomology** 97(4): 1239-1244.

Rugno, G. R., Zanardi, O. Z. and Yamamoto, P. T. 2015. Are the pupae and eggs of the *lacewing cubana* (Neuroptera: chrysopidae) tolerant to insecticides., **Journal of Economic Entomology** 108: 2630 – 2639.

Salehi, T., Pashaei Rad, S. H., Mehrnejad, M. R. and Shokri M. R. 2011. Ladybirds associated with pistachio trees in part of Kerman province, Iran (Coleoptera: Coccinellidae). **Iranian Journal of Animal Biosystematics** 7: 157-69.

SAS Institute. 2002. SAS users guide: Statistics, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.

Sayyed, A. H., Pathan, A. K. and Faheem, U. 2010. Cross-Resistance, Genetics and Stability of Resistance to Deltamethrin in A Population of *Chrysoperla Carnea* from Multan, Pakistan. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 9: 325-332.

Shahriari, M., Zibaee, A., Shamakhi, L., Sahebzadeh, N., Naseri, D. and Hoda, H. 2019. Bio-efficacy and physiological effects of Eucalyptus globulus and Allium sativum essential oils against *Ephestia kuehniella* Zaller (Lepidoptera: Pyralidae). **Toxin Reviews** 36: 1556-9543.

Sharifi, M. A., Kosari, A., Zibaee, A. and Jalali Sendi, J. 2013. Effects of Pyriproxyfen on detoxifying and intermediary enzymes of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Plant Pests Research** 3(1): 35-44.

Shaurub, E. H., Zohdy, N. Z., Abdel-Aal, A. E. and Emara, S. A. 2018. Effect of chlorfluazuron and flufenoxuron on development and reproductive performance of the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae). **Invertebrate Reproduction & Development** 62(1): 27–34.

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

Tiwari, S., Clayson, P. J., Kuhns, E. H. and Stelinski, L. 2012. Effects of buprofezin and diflubenzuron on various developmental stages of asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Pest Management Science** 68: 1405–1412.

Van Asperen, K. 1962. A study of housefly esterases by mean of sensitive colorimetric method. **Journal of Insects Physiology** 8: 401-416.

Van Handel, E. 1965. Microsparation of glycogen, sugars and lipids. **Analytical Biochemistry** 11: 266-272.

Vanhaelen, N., Haubruge, E., Lognay, G. and Francis, F. 2001. Hoverfly glutathione S-transferases and effects of Brassicaceae secondry metabolites. **Pesticides Biochemistry and Physiology** 71: 170-177.

Youn, Y. N., Seo, M. J., Shin, J. G., Jang, C. and Yu, Y. M. 2003. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: coccinellidae). **Biological Control** 28: 164–170.

Yu, C., Fu, M., Lin, R., Zhang, Y., Liu, Y., Jiang, H. and Theo, C. M. B. 2014. Toxic effects of hexaflumuron on the development of *Coccinella septempunctata*. **Environmental Science and Pollution Research** 21: 1418–1424.

Zamani, A., Talebi, A., Fathipour, A. and Baniameri, V. 2006. Effect of temperature on biology and population growth parameters of *Aphis gossypii* Glover (Hom: Aphididae) on greenhouse cucumber. **Journal of Applied Entomology** 130(8): 453–460.

Plant Pest Research
2019- 9 (3): 41-57

Inhibitory effects of pyriproxyfen on some physiological parameters of *Adalia decempunctata* L. (Col.: Coccinellidae)

D. Nasseri[1], J. Jalali Sendi[1*], M. Ghadamyari[1] and Z. Mojib-Haghghadam[2]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran,
2. Plant Protection Research Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

(Received: July 20, 2019- Accepted: September 11, 2019)

Abstract

The lady beetle *Adalia decempunctata* L. (Col.: Coccinellidae) is known as the ten-spotted ladybeetle, whose larvae and adults are active hunters. These insects have been reported from several stone-fruit trees, seed-fruit trees, broad leaved forest trees and coniferous forest trees infested with pests like aphids, mealybugs and psyllid from several countries on the world. The culture of this predator was maintained in laboratory condition (25 ± 2 ºC, 75 ± 5% RH and 16:8h L:D). In this research, the bioassays of pyriproxyfen was performed through topical application method. The concentration of IC_{10}, IC_{30}, IC_{50} and IC_{90} were estimated 18.6, 33.1, 49.3 and 130.6 µg/ml, respectively. Also, in order to have a better understanding, some of the most important biochemical parameters were evaluated in the 4th instar larvae treated with sublethal concentrations of pyriproxyfen. The results showed that lipid and protein amount were relatively increased compared to control, while the glycogen amount was reduced in treated larvae. The activity of detoxifying enzymes (Glutathione S-transferase and general esterases) in treated larvae were significantly increased compared to control. The activity of peroxidase was also increase significantly compared to controls. As the pyriproxyfen is a juvenile hormone analogue, therefore the growing stages of this predator is affected. While adults that have surpassed this stage are no longer dependent to growth hormones and are less affected. Hence, supplementary evaluation of the use of pyriproxyfen and this predator at the same time under field conditions is needed.

Key words: Lady beetle, Pyriproxyfen, Glutathione S-transferase, Peroxidase, Inhibitory effect

*Corresponding author: j.j.sendi@gmail.com