اثرات کشندگی و فیزیولوژیکی اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبدا سای‌هالوترین روی پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته، Agonoscena pistaciae (Hemiptera: Psyllidae)

ابوالفضل دهشیری[۱]، حمزه ایزدی[۱*] و علی علیزاده[۱]

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

چکیده

پسیل معمولی پسته، *Agonoscena pistaciae* از آفات کلیدی پسته است و کنترل شیمیایی مهم‌ترین روش کنترل آن به‌حساب می‌آید. در این تحقیق، حساسیت پوره‌های سن پنجم آفت به آفت‌کش‌های اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبداسای‌هالوترین و اثر این آفت‌کش‌ها بر تحمل سرمایی پوره‌ها مورد بررسی قرار گرفت. اثر دزهای زیرکشنده آفت‌کش‌های مورد آزمایش بر فعالیت آنزیم‌های استراز بررسی شد. نتایج نشان داد که لامبداسای‌هالوترین با دز کشنده پنجاه درصد ۳/۳ میلی‌گرم ماده موثره بر لیتر موثرترین آفت‌کش علیه پوره سن پنجم پسیل بود. دز کشنده پنجاه درصد آفت‌کش‌های اسپیروتترامات و فلونیکامید به‌ترتیب ۲۵۹/۴ و ۱۴۸۶/۸ میلی‌گرم ماده موثره بر لیتر به‌دست آمد. لامبدا سای‌هالوترین در صفر درجه سیلیسیوس هیچ اثری بر تحمل سرمایی پوره‌ها نداشت اما درصد بقا پوره‌ها با کاهش دما از صفر به منفی پنج درجه سلسیوس در تمام غلظت‌ها کاهش یافت. در مورد آفت‌کش‌های اسپیروتترامات و فلونیکامید در پنج درجه سیلیسیوس با افزایش غلظت و کاهش دما بقای پوره‌ها به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. ارزیابی آنزیمی نشان داد که در پوره‌های تیمار شده با فلونیکامید و لامبدا سای‌هالوترین فعالیت آنزیم‌های استراز در مقایسه با اسپیروتترامات کمتر است. فعالیت آنزیم‌های استراز در هر دو آفت‌کش فلونیکامید و لامبدا سای‌هالوترین به‌وسیله دو غلظت LC_{50} و LC_{25} ممانعت شد. در آفت‌کش اسپیروتترامات غلظت زیرکشنده (LC_{25}) باعث کاهش و غلظت کشنده (LC_{50}) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های استراز شد. اگرچه در این پژوهش لامبداسای‌هالوترین کشنده‌ترین ترکیب علیه پسیل معمولی پسته بود اما اسپیروتترامات به‌طور موثری تحمل سرمایی آفت را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: پسیل معمولی پسته، زیست‌سنجی، تحمل سرمایی، ارزیابی آنزیمی

[۱] دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

[*]نویسنده مسئول: izadi@vru.ac.ir

مقدمه

پسیل معمولی پسته، Agonoscena pistaciae Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) یکی از مهم‌ترین آفات درختان پسته در ایران است. این آفت در تمام مناطق پسته‌کاری از جمله رفسنجان که مهم‌ترین منطقه پسته‌کاری کشور است، پراکنده شده است. در پاییز افراد بالغ پسیل در زیر پوستک‌های تنه درختان، در خاک و زیر برگ‌های ریخته شده وارد دیاپوز شده و زمستان‌گذرانی می‌کنند. این آفت چند نسل در سال دارد (Mehrnejad, 2003). مهم‌ترین روش کنترل پسیل پسته کنترل شیمیایی است. اسپیروتترامات به‌عنوان یک شاخه فرعی از تترامیک اسید یک ترکیب جدید از گروه کتوانول‌های حلقوی است که علیه آفات مکنده معرفی شده است. نحوه اثر این این آفت‌کش در حشرات تیمار شده، ممانعت از سنتز چربی‌هاست. در نتیجه این عمل میزان چربی کم شده، رشد افراد نابالغ و توانایی تولید مثلی افراد بالغ کاهش می‌یابد (Bielza *et al*., 2019)

فلونیکامید به‌عنوان یک حشره‌کش جدید از گروه پایریدین کربوکسآمید حشره‌کشی سیستمیک با اثر ضدتغذیه‌ای بر علیه حشرات مکنده است. مهم‌ترین اثر حشره‌کشی این آفت‌کش جلوگیری از نفوذ استایلت‌های حشره تیمار شده به‌درون بافت گیاهی و در نتیجه گرسنگی و مرگ می‌باشد(Morita *et al*., 2007). لامبداسای‌هالوترین از حشره‌کش‌های پایروتروئیدی است که در سطح وسیعی بر علیه شته‌ها، قاب‌بالان و بال‌پولک‌داران به‌کار می‌رود (Amweg *et al*., 2005). پایروتروئیدها از جمله سموم عصبی هستند که بر روی کانال سدیم اثر می‌گذارند (Shafer & Meyer, 2004).

دیاپوز از جمله سازگاری‌های‌ست که به بقا حشره در شرایط نامساعد محیطی طی ماه‌های سرد کمک می‌کند. در مناطق معتدل و سرد بسیاری از حشرات برای جلوگیری از اثرات سوء فصل سرد به دیاپوز می‌روند. دیاپوز در واقع نوعی خواب ژنتیکی تحت کنترل هورمون است که در یک مرحله رشدی خاص از زندگی حشره اتفاق می‌افتد(Denlinger, 1991) . اثر دما بر زندگی حشرات به‌خوبی شناخته شده است. تقریبا تمام مراحل زندگی حشرات تحت تاثیر دما قرار دارد. به‌عنوان یک گروه، حشرات بیش از سایر جانوران پرسلولی نه‌تنها برای بقا بلکه برای رشد و نمو در شرایط محیطی و دماهای مختلف سازش یافته‌اند (Lee, 1991). تحمل سرما به‌عنوان توانایی یک گونه برای بقا در دماهای پایین در طولانی و یا کوتاه مدت تعریف شده‌است. این توانایی به‌وسیله عوامل مختلف مانند مرحله رشدی، توانایی ژنتیکی، فصل، طول مدت در معرض قرار گرفتن و شرایط تغذیه تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Lee, 1991). حشرات برای بقا در شرایط

نامساعد محیطی از استراتژی‌های مختلفی استفاده می‌کنند. هم تحمل سرما و هم دیاپوز از جمله این استراتژی‌ها برای تحمل شرایط سخت زمستان مناطق معتدل و سرد هستند(Denlinger, 1991) .

مقاومت به آفت‌کش‌ها به‌معنی کاهش حساسیت جمعیتی از آفت به آفت‌کش خاصی است که قبلا نسبت به آن حساس بوده و به‌وسیله آن کنترل شده است. مقاومت خود را به‌صورت عدم توانایی پی‌درپی آفت‌کش در کنترل یک آفت بروز می‌دهد. استفاده بی‌رویه از حشره‌کش‌ها از مهم‌ترین علت‌های بروز و توسعه مقاومت می‌باشد. برای بروز مقاومت، حشرات معمولا از استراتژی‌ها و مکانیسم‌های مختلفی استفاده می‌کنند. مهم‌ترین این مکانیسم‌ها عبارتند از تجزیه سموم و موتاسیون در محل اثر حشره‌کش. عمل سم‌زدایی به‌وسیله آنزیم‌های مختلف مانند کربوکسیل‌استرازها، مونواکسیژنازها و گلوتاتیون-اس-ترانسفرازها صورت می‌گیرد (Devonshire & Moores, 1982).

با توجه به موارد بالا تحقیق حاضر در نظر دارد اثرات سمشناسی و فیزیولوژیکی آفت‌کش‌های اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبداسای‌هالوترین را بر علیه پوره سن پنجم پسیل معمولی پسته مشخص کند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری پسیل معمولی پسته

برگ‌های حاوی پوره‌های پسیل از درختان آلوده باغ موسسه تحقیقات پسته رفسنجان با مختصات ۷۲"E. ۲۰´۵۶°۵۵ و ۵۹"N. ۲۶´۲۳°۳۰ جدا شد و در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان پوره‌های سن پنجم از روی آنها جمع‌آوری گردید. پس از جمع‌آوری پوره‌های سن پنجم، تنها پوره‌های سن‌های پایین‌تر روی برگ باقی ماندند. برگ‌های حاوی پوره‌های سنین پایین‌تر داخل نایلون‌های شفاف و سوراخ شده (جهت تهویه) در اتاقک رشد با دمای ۳۰ درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۵٪ نگه‌داری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، برگ‌ها از داخل نایلون بیرون آمده و بازبینی شدند. پوره‌های هم‌سن شده سن پنجم برای آزمایشات زیست‌سنجی استفاده شدند.

حشره‌کش‌ها

در این آزمایش فرمولاسیون تجاری اسپیروتترامات (Movento, CS 10%, Bayer CropScience, Germany)، فلونیکامید (Teppeki, CS 96%, BioScience, Belgium) و لامبداسای‌هالوترین (Pilarkiom, EC 2.5%, China) مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش‌های زیست‌سنجی

در این بررسی، جهت انجام کلیه آزمایشات زیست‌سنجی ابتدا آزمایشات مقدماتی برای تعیین محدوده حداقل و حداکثر مرگ‌ومیر حشرات صورت

گرفت. غلظتی که حدود ۲۵ درصد تلفات را ایجاد کرد به عنوان پایین‌ترین غلظت و غلظتی که حدود ۷۵ درصد تلفات را ایجاد کرد به عنوان بالاترین غلظت مؤثر برای انجام آزمایش‌ها انتخاب شد. غلظت‌های اصلی در فاصله لگاریتمی تعیین شدند(Ross & Finney, 1972). براساس آزمایش‌های مقدماتی، برای هر آفت‌کش شش غلظت به‌علاوه شاهد در نظر گرفته شد. غلظت‌های ۱۶۰، ۱۸۵، ۲۱۷، ۲۵۴، ۲۹۶ و ۳۵۰ میلی‌گرم ماده موثر بر لیتر اسپیروتترامات، ۱۰۰۰، ۱۱۵۰، ۱۳۲۰، ۱۵۲۰، ۱۷۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم ماده موثر بر لیتر فلونیکامید و ۱/۰، ۱/۴، ۲/۰، ۲/۹، ۴/۲ و ۶/۰ میلی‌گرم ماده موثر بر لیتر لامبداسای‌هالوترین مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های مختلف آفت‌کش، با آب مقطر تهیه شدند. برای شاهد از آب مقطر تنها استفاده شد. برای آزمایش از پتری‌دیش‌هایی با قطر ۶۰ میلی‌متر و ارتفاع ۱۰ میلی‌متر که درب آن‌ها با پارچه‌ای از جنس حریر پوشانده شده بود، استفاده شد. هم‌چنین برای تامین رطوبت پتری‌دیش‌ها، از پنبه و کاغذ صافی مرطوب در کف پتری‌ها استفاده شد. برگ‌های پهن درختان پسته، رقم‌های اکبری و احمدآقایی جهت تهیه دیسک برگی مورد استفاده قرار گرفت. برگ‌ها دقیقا به اندازه قطر پتری با اسکالپل بریده شده و در کف پتری ثابت شدند. پوره‌ها با استفاده از قلم موی بسیار نرم روی دیسک برگی که در داخل پتری قرار گرفته بود منتقل شدند سپس دو میلی‌لیتر از هر غلظت، از طریق برج پاشش با فشار ۱۵ الی ۱۶ بار روی پتری‌های حاوی پوره‌ها پاشیده شد (تقریبا ۰/۰۵ میلی‌لیتر بر سانتی‌متر مربع). این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. برای هر تیمار سه تکرار که هر کدام دارای ۲۰ عدد پوره سن پنجم پسیل معمولی پسته بود، در نظر گرفته شد. پتری‌ها در داخل اتاقک رشد با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵٪ و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. مرگ‌ومیر پوره‌ها بعد از ۲۴ ساعت ثبت شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های استراز

در این پژوهش تغییرات استرازهای عمومی بعد از ۲۴ ساعت و پس از تیمار شدن پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته با غلظت‌های LC50 و LC25، از هر سه آفت‌کش مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری تغییرات آنزیمی در هر غلظت، ۳ تکرار که هر تکرار شامل ۲۰۰ عدد حشره بود، استفاده شد. جهت جمع‌آوری این حشرات، ابتدا ۸۰۰ الی ۹۰۰ پوره سن پنجم با غلظت‌های LC50 و LC25 آفت‌کش‌ها از طریق برج پاشش تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت، حشراتی که زنده مانده بودند به تعداد ۲۰۰ عدد جمع‌آوری و داخل اپندورف‌های دو میلی‌لیتری منتقل شده و در دمای ۱۰- درجه سلسیوس فریز شدند. پوره‌های پسیل در ۲۰۰ میکرولیتر بافر یک دهم مولار فسفات (pH ۷) حاوی یک دهم درصد ترایتون

X-100 همگن شدند. سانتریفیوژ محلول همگن در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس انجام و رونشین به‌عنوان منبع آنزیمی در آزمایش‌ها مورد استفاده گرفت. سنجش آنزیم با اضافه کردن ۱۵ میکرولیتر نمونه آنزیم به ۲۵ میکرولیتر بافر فسفات (pH ۷)،۱۰میکرولیتر زیرنهشت آلفا نفتیل استات (۱۰ میلی‌مولار در استون) و ۵۰ میکرولیتر معرف رنگی صورت گرفت و با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجش انجام شد (Brogdon & Dickinson, 1983).

اندازه‌گیری تغییرات تحمل سرمایی

بررسی تغییرات تحمل سرمایی برای هر آفت‌کش در چهار غلظت صورت گرفت. غلظت‌های مورد نظر در هر سه آفت‌کش، به‌طور تقریبی برابر با LC5، LC25، LC50 و LC75 آفت‌کش‌ها بود. در این قسمت از آزمایش، ابتدا آستانه تحمل سرمایی شاهد بعد از ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. بدین معنی که حشرات شاهد در مدت زمان‌های مذکور در دماهای ۵، ۰، ۵- و ۱۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند. جهت انجام این کار نمونه‌های شاهد در داخل یخچال قابل تنظیم با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵٪ قرار گرفتند، سپس دمای یخچال با سرعت ۰/۵ درجه سلسیوس در دقیقه کم شد تا به دمای مورد نظر رسید. بر اساس نتایج به‌دست آمده در دماهای مورد نظر، تغییرات تحمل سرمایی در دو دمای ۰ و ۵- درجه سلسیوس بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته با غلظت‌های مورد نظر تیمار شد و بعد از ۲۴ ساعت حشرات زنده مانده جهت آزمایش‌های تغییرات تحمل سرمایی جمع‌آوری شدند و در داخل پتری‌های در بسته (در پتری‌ها جهت تهویه سوراخ شده و توسط پاره حریر پوشانده شده بودند) گذاشته شدند. پتری‌ها داخل یخچال با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵ درصد قرار گرفتند. دمای یخچال با سرعت ۰/۵ درجه سلسیوس در دقیقه کاهش یافت تا به دمای مد نظر (۰ یا ۵- درجه سلسیوس) رسید. پس از ۲۴ ساعت که پوره‌ها در دمای مورد نظر قرار گرفتند دمای یخچال با سرعت ۰/۵ درجه در دقیقه افزایش یافت تا به دمای ۳۰ درجه سلسیوس برسد. بعد از این‌که دما به ۳۰ درجه سلسیوس رسید به مدت ۱۵ دقیقه حشرات در آن دما باقی ماندند و پس از آن از یچخال بیرون آمده و تلفات ثبت شد. حشراتی که پس از تکان داده شدن با قلم‌مو هیچ‌گونه حرکتی از خود نشان ندادند مرده حساب شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد و هر تکرار شامل یک پتری‌دیش با ۳۰ پسیل بود (Khani & Moharramipour, 2010)

تجزیه و تحلیل داده‌ها

از نرم افزار Polo plus برای به‌دست آوردن LC50، شیب خط لگاریتم-دز و مقدار Chi square و از نرم افزار SAS 9.1، آزمون دانکن و تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده شد. کلیه نمودارها توسط نرم‌افزار Excel (۲۰۰۷) و نرم‌افزار Sigmaplot 10.0 رسم گردید.

نتایج و بحث

در هر سه آفت‌کش مورد آزمایش، میزان مرگ‌ومیر پوره‌ها با غلظت آفت‌کش متناسب بود و با افزایش غلظت میزان مرگ‌و میر افزایش یافت. تفاوت بین میزان مرگ‌ومیر آفت‌کش‌ها و شاهد معنی‌دار بود. تجزیه پروبیت نشان داد که لامبداسای‌هالوترین با دز کشنده پنجاه درصد ۳/۳ میلی‌گرم ماده موثر بر لیتر سمی‌ترین حشره‌کش علیه پوره سن پنجم پسیل معمولی پسته بود و به‌دنبال آن اسپیروتترامات با دز کشنده پنجاه درصد ۲۵۹/۴ میلی‌گرم ماده موثر بر لیتر و فلونیکامید با دز کشنده پنجاه درصد ۱۴۸۶/۸ میلی‌گرم ماده موثر بر لیتر قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- ارزیابی فلونیکامید، لامبداسای‌هالوترین و اسپیروتترامات برعلیه پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته، *Agonoscena pistaciae*

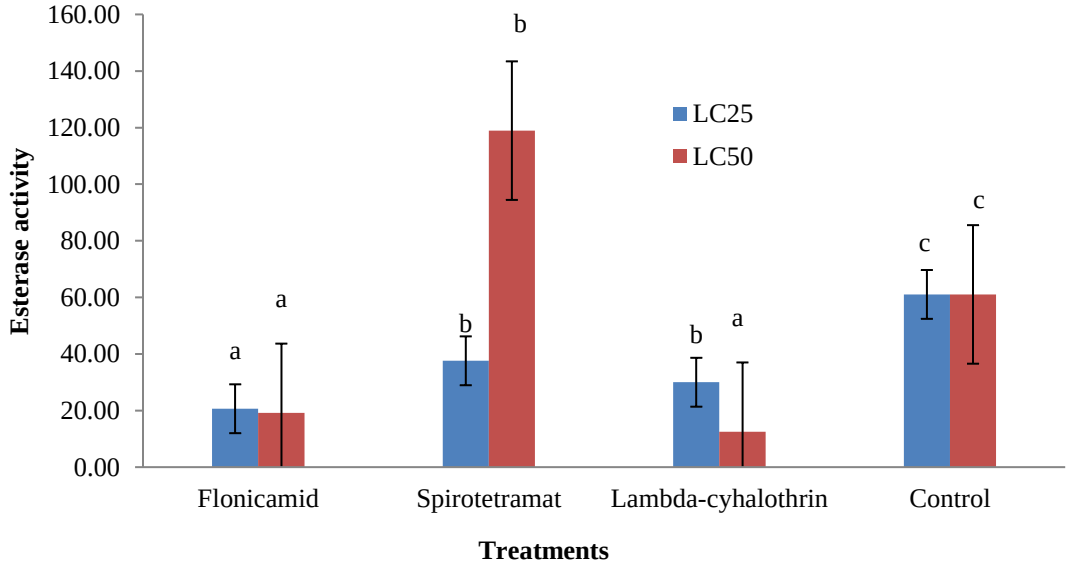
Compound	n	Slope ± SE	LC_{50} (mg/l)	Fiducial limits (P=0.05)	X^2	df
Flonicamid	420	6.19±0.87	1486.8	1383.6-1589.3	3.03	5
Lambda-cyhalothrin	420	1.84±0.31	3.3	2.6-4.2	3.99	5
Spirotetramat	420	3.65±0.71	259.4	228.5-296.1	2.36	5

X^2= chi-square, n= number of treated nymphs, df= degree of freedom

ارزیابی سه آفت‌کش مورد آزمایش علیه پوره سن پنجم پسیل معمولی پسته بیانگر این است که اسپیروتترامات با مجموع مربعات ۲/۳۶ در مقایسه با فلونیکامید با مجموع مربعات ۳/۰۳ و لامبداسای‌هالوترین با مجموع مربعات ۳/۹۹ دارای بهترین تناسب برای پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته است. به عبارت دیگر، مجموع مربعات اسپیروتترامات ۱/۳ برابر کمتر از فلونیکامید و ۱/۷ برابر کمتر از لامبداسای‌هالوترین است. درجه آزادی برای تمام حشره‌کش‌های مورد آزمایش یکسان بود (جدول ۱).

تاثیر سه آفت‌کش مورد آزمایش در ممانعت‌کنندگی فعالیت آنزیم‌های استراز پوره‌های سن

پنجم پسیل معمولی پسته بعد از یک دوره اینکوباسیون ۲۴ ساعته، در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج بیانگر این است که در غلظت کشنده بیست و پنجم درصد دو در هر سه تیمار فعالیت آنزیم به‌طور معنی‌دار از شاهد کمتر بود ولی در تیمار لامبداسای‌هالوترین و اسپیروتترامات تفاوت معنی‌داری بین فعالیت آنزیم‌های استراز وجود ندارد. در پوره‌های تیمار شده با غلظت کشنده پنجاه درصد اسپیروتترامات فعالیت آنزیمی به‌طور معنی‌دار از شاهد و دو تیمار دیگر بیشتر بود. بیشترین فعالیت آنزیمی با ۱۱۸/۹۲ میکرومول بر نفتیل بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین مربوط به پوره‌های تیمار شده با غلظت کشنده پنجاه درصد اسپیروتترامات و کم‌ترین آن با ۱۲/۵۰ میکرومول بر نفتیل بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین مربوط به پوره‌های تیمار شده با غلظت کشنده پنجاه درصد لامبداسای‌هالوترین بود. تفاوت در فعالیت آنزیمی پوره‌های تیمار شده با دو غلظت LC_{50} و LC_{25} فقط در اسپیروتترامات مشاهده شد. میزان افزایش فعالیت آنزیمی در پوره‌های تیمار شده با اسپیروتترامات با افزایش دز ارتباط مستقیم داشت و بین غلظت‌های مختلف این آفت‌کش و شاهد تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($F_{14, 6}$= 46.30; P= 0.0001) (شکل ۱).



شکل ۱- فعالیت آنزیم‌های استراز (µmol/min/mg protein) در پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته تیمار شده با دزهای LC_{50} و LC_{25} از سه آفت‌کش اسپیروتترامات، لامبداسای‌هالوترین و فلونیکامید. در هر غلظت حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P> 0.05, Tukey's test)

در یک آزمایش دیگر، تحمل سرمایی پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته در برابر غلظت‌های مختلف آفت‌کش‌های مورد آزمایش بررسی شد. همان‌طور که داده‌های جدول شماره ۲ نشان می‌دهند، غلظت‌های مختلف لامبداسای‌هالوترین در صفر درجه سیلیسیوس هیچ اثری بر تحمل سرمایی پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته نداشتند ($F_{11,4}$ =1.05; P =0.427) اما درصد بقا پوره‌ها با کاهش دما از صفر به منفی پنج درجه سلسیوس در تمام غلظت‌ها کاهش یافت ($F_{4,1}$=55.15; P=0.0018). همچنین، در پنج درجه سیلیسیوس در بالاترین غلظت درصد بقا به‌طور معنی‌دار از شاهد کمتر بود. در تیمار اسپیروتترامات، درصد بقا پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته در صفر درجه سیلیسیوس و در کم‌ترین غلظت با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت ($F_{15,2}$=63.32; P=0.0001) اما با افزایش غلظت درصد بقا به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. در دمای منفی پنج درجه سیلیسیوس، در تمام غلظت‌ها، درصد بقا پوره‌های تیمار شده و شاهد معنی‌دار بود ($F_{13,4}$=29.93; P=0.0001) در هر حال با کاهش دما از صفر به منفی پنج درجه سیلیسیوس افزایش غلظت تاثیری در درصد بقا پوره‌ها نداشت. در تیمار فلونیکامید، در صفر درجه سیلیسیوس درصد بقا فقط در بالاترین غلظت (۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) با سایر غلظت‌ها دارای تفاوت معنی‌دار بود ولی تفاوت تمام غلظت‌ها با شاهد معنی‌دار بود. در دمای منفی پنج درجه سیلیسیوس درصد بقا پوره‌ها با افزایش غلظت آفت‌کش کاهش یافت و در بالاترین غلظت (۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) به کم‌ترین میزان (۵٪) رسید. بین درصد بقا پوره‌های تیمار شده و شاهد در صفر ($F_{12,4}$=18.31; P=0.0001) و پنج درجه سیلیسیوس ($F_{9,4}$=95.70; P=0.0001) تفاوت معنی‌دار بود. درصد بقا پوره‌ها در بالاترین غلظت و در دمای منفی پنج درجه سیلیسیوس حدود ۱۱ برابر از درصد بقا در صفر درجه سیلیسیوس کم‌تر بود. هم‌چنین درصد بقا در دمای منفی پنج درجه سیلیسیوس و در بالاترین غلظت حدود ۱۴/۵ برابر از شاهد کم‌تر بود. دو آفت‌کش اسپیروتترامات و فلونیکامید تحمل سرمایی پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته را کاهش دادند. در مقایسه بین این دو آفت‌کش، فلونیکامید نسبت به اسپیروتترامات اثر بیشتری در کاهش قدرت بقا پوره‌ها داشت. در دمای منفی پنج درجه سیلیسیوس و در بالاترین غلظت درصد بقا پوره‌ها در فلونیکامید در حدود ۷ برابر کم‌تر از اسپیروتترامات بود.

جدول ۲- درصد بقا پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته در اثر تیمار با آفت‌کش‌های فلونیکامید، لامبداسای‌هالوترین و اسپیروتترامات و در معرض دمای صفر و منفی پنج درجه‌سیلیسیوس قرار گرفتن

Compound	Concentration (mg/l)	%Survival (mean ± SE) at 0.0 °C	%Survival (mean ± SE) at -5.0 °C
Spirotetramat	50	98.20±1.2aA	58.00±3.0bB
	150	70.50±1.6bA	49.66±1.2bB
	250	52.50±4.3cA	41.20±2.7cA
	350	45.00±3.2cA	36.00±2.7cA
	Control	98.00±1.0aA	72.00±1.1aB
Lambda-cyhalothrin	0.64	95.66±2.1aA	68.33±2.3bB
	1.92	96.75±1.2aA	68.00±2.0bB
	3.20	93.66±1.7aA	64.33±6.9bB
	6.00	90.33±4.3aA	58.00±1.7bB
	Control	98.00±1.0aA	72.00±1.1aB
Flonicamid	300	84.00±0.5bA	42.33±5.8bB
	900	80.75±2.1bA	24.50±0.5cB
	1480	74.66±7.8bA	10.00±1.7dB
	2000	58.75±3.7cA	5.00±0.5eB
	Control	98.00±1.0aA	72.00±1.1aB

برای هر حشره‌کش در هر ستون میانگین‌هایی که با حرف کوچک مشابه نشان داده شده‌اند دارای تفاوت معنی دار نیستند ($P> 0.05$). در هر ردیف میانگین‌هایی که با حرف بزرگ مشابه نشان داده شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

بر اساس دز کشنده پنجاه درصد، تاثیر سه آفت‌کش مورد آزمایش روی پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته را می‌توان به این ترتیب گروه‌بندی کرد: لامبداسای‌هالوترین> اسپیروتترامات> فلونیکامید. وقتی که پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته به‌عنوان یک معیار برای سنجش کشندگی سه آفت‌کش اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبداسای‌هالترین به کار گرفته شدند، داده‌های مربوط به تجزیه پروبیت نشان داد که حساسیت حشره مورد آزمایش به لامبداسای‌هالترین در حدود ۷۹ برابر اسپیروتترامات و در حدود ۴۵۰ برابر بیش‌تر از حساسیت آن نسبت به فلونیکامید است. سمیت اسپیروتترامات در حدود ۵/۷ برابر سمیت فلونیکامید بود. نسبت تغییرات اثر یک آفت‌کش در رابطه با یک واحد تغییر در غلظت به وسیله شیب خط بیان می‌شود. شیب خط به نوبه خود بیان‌کننده تنوع در تغییر حساسیت یک جمعیت مشخص از حشره تحت آزمایش است. خط با شیب تند بیان‌گر تغییرات کم در حساسیت جمعیت است در حالی که خط با شیب کند، نشان دهنده تغییر زیاد در

حساسیت جمعیت مورد آزمایش است. شیب خط در منحنی خط دز- پاسخ (مرگ و میر) در مورد آفت‌کش‌های اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبداسای‌هالترین بدین صورت است که فلونیکامید دارای شیبی تقریبا دو برابر شیب اسپیروتترامات و اسپیروتترامات نیز دارای شیبی تقریبا دو برابر شیب خط لامبداسای‌هالترین می‌باشد. یعنی فلونیکامید دارای شیب بیشتر از دو آفت‌کش دیگر است. به عبارتی تفاوت بین غلظت‌های بالا و پایین این آفت‌کش کم است و در واقع حساسیت جمعیت پسیل معمولی پسته به این آفت‌کش همگن است و با اندکی افزایش در غلظت، میزان مرگ‌ومیر شدیدا افزایش می‌یابد. شیب خط در منحنی خط دز-پاسخ (مرگ‌ومیر) در مورد لامبداسای‌هالترین بیان‌گر شیب کمتر است. به عبارتی تفاوت بین غلظت‌های بالا و پایین زیاد است و با افزایش زیاد در غلظت، میزان مرگ‌ومیر به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد(Robertson & Preisler, 1992) . مقایسه شیب خطوط همچنین نشان می‌دهد که فلونیکامید و اسپیروتترامات به ترتیب در مقایسه با لامبداسای‌هالترین شیب بیشتری دارند. یعنی با افزایش جزیی در غلظت، مرگ‌ومیر به میزان بیشتری افزایش می‌یابد. این موضوع در کنترل آفات بسیار مهم است و بایستی در استفاده از این حشره‌کش‌ها دقت زیادی انجام داد چرا که اشتباه در تنظیم دز سبب می‌شود که با استفاده از دزهای بالاتر، جمعیت را تحت فشار قرار داده و انتخاب افراد مقاوم تسریع شود. بنابراین در انتخاب دز در مورد آفت‌کش‌های فلونیکامید و اسپیروتترامات که دارای شیب نسبتا تندتری هستند باید دقت لازم صورت گیرد. علاوه بر این، با توجه به این‌که شیب خط اثر متغیرهایی را که در بروز پاسخ و چگونگی اندازه‌گیری آن دخالت دارند نشان می‌دهد، وقتی دو خط موازی هستند یعنی شیب خط یکسانی دارند، دو ترکیب احتمالا نحوه تأثیر یکسانی دارند (Ross & Finney, 1972). در این پژوهش مشخص شد که سه آفت‌کش اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبداسای‌هالترین دارای شیب خط یکسانی نیستند بنابراین احتمال یکسان نبودن نحوه اثر این سه آفت‌کش وجود دارد.

استراتژی حشرات برای تحمل سرما به‌طور کلی به دو گروه تقسیم می‌شود: گروه اول متحمل به یخ‌زدگی که نسبت به ایجاد یخ خارج سلولی متحمل می‌باشند و گروه دوم حساس به یخ‌زدگی که حشره با کاهش دما خود را از اثرات کشندگی یخ‌زدگی دور می‌کند (Lee *et al*., 1989). تحمل سرما در حشرات با چندین مکانیسم صورت می‌گیرد. در گروه دوم یعنی حساس به یخ‌زدگی، تحمل سرما با دفع هسته‌های یخ از بدن، سنتز مولکول‌هایی نظیر کریوپروتکتانت‌های با وزن مولکولی پایین (پلی‌اول‌ها و قندها) و پروتئین‌های ضدیخ صورت می‌گیرد. در مورد گروه اول تحمل سرما با سنتز پروتئین‌های تشکیل‌دهنده

هسته یخ، لیپوپروتئین‌ها و مولکول‌هایی نظیر کریوپروتکتانت‌های با وزن مولکولی پایین صورت می‌گیرد (Toxopeus & Sinclair, 2018). در حشرات متحمل به سرما تغییرات فیزیولوژیکی وسیعی در پاسخ به استرس ناشی از کاهش دما و در راستای کاهش اثرات آن صورت می‌گیرد (Lee, 1991; Zachariassen, 1985) . این تغییرات فیزیولوژیکی شامل سنتز پروتئین‌های (King & MacRae, 2015) شوک‌گرما، افزایش تولید قند خون حشرات (Behroozi *et al*., 2012; Bemani *et al*., 2012; Sadeghi *et al*., 2012) افزایش گلیسرول یا سوربیتول و افزایش اسیدهای‌آمینه (Andersen *et al*., 2017) یا دوپامین (Rauschenbach *et al*., 1993) می‌باشد. ممکن است یکی یا چند مورد از این فاکتورهای فیزیولوژیکی حفاظتی مورد تاثیر اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبداسای‌هالترین قرار گیرد. در میان فاکتورهای مختلف درگیر در تحمل سرمایی، کربوهیدرات‌های با وزن مولکولی پایین نظیر ترهالوز و قندهای الکلی نظیر گلیسرول به خوبی شناخته شده‌اند. این ترکیبات زمانی‌که دمای بدن حشرات به زیر دمای بهینه برای رشد برسد، سنتز می‌شوند(Denlinger, 1991) . در مناطق معتدل بسیاری از حشرات در طول زمستان قندها و پلی‌اول‌های با وزن مولکولی پایین را ذخیره می‌کنند (Ramløv, 2000) . این ترکیبات با افزایش تحمل سرمایی شانس بقا را در طول زمستان زیاد می‌کنند (Košt'ál *et al*., 2001) بنابراین، این امکان وجود دارد که تیمار پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته با سم‌های اسپیروتترامات و فلونیکامید قبل از قرار دادن آنها در معرض سرما، ساخته شدن و تجمع قندهای الکلی و کربوهیدرات‌های با وزن مولکولی پایین را تحت تاثیر قرار داده و بدین‌ترتیب تحمل سرمایی آنها را کاهش داده است و در نتیجه می‌تواند کاهش نسل اول آفت در سال بعد را به‌دنبال داشته باشد.

در این تحقیق هم‌چنین تاثیر سه آفت‌کش اسپیروتترامات، فلونیکامید و لامبداسای‌هالوترین روی فعالیت آنزیم‌های استراز پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته ارزیابی شد. مهار آنزیمی به‌صورت درصد کاهش در میکروگرم از سوبسترای هیدرولیز شده به‌وسیله تیمار در مقایسه با شاهد بیان می‌شود (Low et al., 2013) . استرازها آنزیم‌های هیدرولیز کننده هستند که در واکنش‌های شیمیایی با آب و تحت عنوان هیدرولیز استرها را به اسید و الکل می‌شکنند (Gordon & Ottea, 2012; Hilliou *et al*., 2021). آنزیم‌های استراز دارای تنوع زیادی بوده و از نظر نوع سوبسترا، ساختمان پروتئینی و وظیفه با هم تفاوت دارند. این آنزیم‌ها نقش مهمی در سمیت‌زدایی در حشرات ایفا می‌کنند. بیشینه و کمینه کاهش در فعالیت استرازها به‌ترتیب زمانی روی داد که پوره‌ها به‌وسیله غلظت کشنده پنجاه درصد

لامبداسای‌هالوترین و اسپیروتترامات تیمار شدند. سمیت کم اسپیروتترامات بیان‌گر گرایش انتخابی این آفت‌کش به آنزیم‌های استراز است که ممکن است باعث هیدرولیز تدریجی آلفا نفتیل استات شود. دو آفت‌کش فلونیکامید و لامبداسای‌هالوترین در هر دو غلظت LC_{50} و LC_{25} به‌طور معنی‌دار مانع فعالیت استرازها شدند اما در مورد اسپیروتترامات بیشترین ممانعت‌کنندگی در غلظت LC_{25} مشاهده شد (شکل ۱). این درحالی است که بعد از تیمار پوره‌ها با دز کشنده پنجاه درصد این آفت‌کش، فعالیت استرازها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. دز کشنده پنجاه درصد لامبداسای‌هالوترین در مقایسه با اسپیروتترامات دوازده مرتبه برای آنزیم‌های استراز سمی‌تر بود. در بررسی اثر آلیا ایزوسیونات (AITC) روی فعالیت چهار آنزیم از افراد بالغ *Sitophilus zeamais* مشخص شد که فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم-سی-اکسیداز، استیل‌کولین استراز و کاتالاز با غلظت پایین آفت‌کش (۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) افزایش یافت اما با افزایش دز آفت‌کش از فعالیت این آنزیم‌ها کاسته شد. فعالیت گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آفت‌کش ممانعت شد و کاهش یافت ولی در غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحریک شد و افزایش یافت (Wu et al., 2014). با توجه به داده‌های این تحقیق به‌نظر می‌رسد که اسپیروتترامات از جمله مهارکننده‌های رقابتی برای استرازهای عمومی پوره پسیل معمولی پسته است. در این نوع رقابت، ممانعت کننده و سوبسترا برای اشغال محل فعال آنزیم با هم رقابت می‌کنند و افزایش غلظت سوبسترا باعث کاهش اثر ممانعت کننده می‌شود.

به‌طور خلاصه داده‌های این تحقیق بیان‌گر این است که از بین سه آفت‌کش مورد آزمایش، لامبداسای‌هالوترین سمی‌ترین حشره‌کش بر علیه پوره‌های سن پنجم پسیل معمولی پسته است. این آفت‌کش می‌تواند به‌عنوان آفت‌کشی مهم در کنترل پسیل پسته معرفی شود. همچنین با توجه به کاهش تحمل سرمایی پوره‌های تیمار شده با آفت‌کش‌های اسپیروتترامات و فلونیکامید این امکان وجود دارد که با سمپاشی پوره‌های سن آخر شانس بقا حشرات کامل زمستان‌گذران را کاهش داد. در هر حال پیشنهاد می‌گردد نسل آخر آفت، با مخلوطی از دو آفت‌کش اسپیروتترامات و لامبداسای‌هالوترین تیمار گردد.

منابع

1. Amweg, E. L., Weston, D. P., & Ureda, N. M. (2005). Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *24*(4), 966–972.
2. Andersen, M. K., Jensen, S. O., & Overgaard, J. (2017). Physiological correlates of chill

susceptibility in Lepidoptera. *Journal of Insect Physiology*, *98*.

3. Behroozi, E., Izadi, H., Samih, M. A. A., & Moharamipour, S. (2012). Physiological strategy in overwintering larvae of pistachio white leaf borer, *Ocneria terebinthina* Strg. (Lepidoptera: Lymantriidae) in Rafsanjan, Iran. *Italian Journal of Zoology*, *79*(1), 44–49.
4. Bemani, M., Izadi, H., Mahdian, K., Khani, A., & Amin samih, M. (2012). Study on the physiology of diapause, cold hardiness and supercooling point of overwintering pupae of the pistachio fruit hull borer, *Arimania comaroffi*. *Journal of Insect Physiology*, *58*(7), 897–902. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.003
5. Bielza, P., Moreno, I., Belando, A., Grávalos, C., Izquierdo, J., & Nauen, R. (2019). Spiromesifen and spirotetramat resistance in field populations of *Bemisia tabaci* Gennadius in Spain. *Pest Management Science*, *75*(1), 45–52. https://doi.org/10.1002/ps.5144
6. Denlinger, D. L. (1991). Relationship between cold hardiness and diapause. In *Insects at Low Temperature* (pp. 174–198).
7. Brogdon W. G., Dickinson C. M., (1983). A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analytical Biochemistry*, *131:* 499-503.
8. Devonshire, A. L., & Moores, G. D. (1982). A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *18*(2), 235–246.
9. Gordon, J. R., & Ottea, J. (2012). Association of esterases with insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, *105*(3), 971–978.
10. Hilliou, F., Chertemps, T., Maïbèche, M., & Le Goff, G. (2021). Resistance in the genus *Spodoptera*: Key insect detoxification genes. *Insects*, *12*(6), 544.
11. Khani, A., & Moharramipour, S. (2010). Cold hardiness and supercooling capacity in the overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Insect Science*, *10*(83), 1–12.
12. King, A. M., & MacRae, T. H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual Review of Entomology*, *60*(1), 59–75.
13. Košt'ál, V., Šlachta, M., & Šimek, P. (2001). Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in

diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *130*(3), 365–374.

14. Lee, R. E. (1991). Principles of insect low temperature tolerance. In D. D. L. Lee, R.E. Jr. (Ed.), *Insects at Low Temperature* (pp. 17–46). Chapman and Hall, New York.
15. Lee, R. E., Lee Richard E Jr., Lee, R. E., & Lee Jr., R. E. (1989). Insect cold-hardiness: To freeze or not to freeze. *Bioscience*, *39*(5), 308–313.
16. Low, V. L., Chen, C. D., Lee, H. L., Tan, T. K., Chen, C. F., Leong, C. S., Lim, Y. A. L., Lim, P. E., Norma-Rashid, Y., & Sofian-Azirun, M. (2013). Enzymatic characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of Malaysian *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE*, *8*(11).
17. Mehrnejad, M. R. (2003). Pistachio psylla and other major psyllids of Iran. Publication of the Agricultural Research and Education Organization, Tehran, 116.
18. Morita, M., Ueda, T., Yoneda, T., Koyanagi, T., & Haga, T. (2007). Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Management Science*, *63*(10), 969–973.
19. Ramløv, H. (2000). Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Human Reproduction*, *15*(SUPPL. 5), 26–46.
20. Rauschenbach, I. Y., Serova, L. I., Timochina, I. S., Chentsova, N. A., & Schumnaja, L. V. (1993). Analysis of differences in dopamine content between two lines of *Drosophila virilis* in response to heat stress. *Journal of Insect Physiology*, *39*(9), 761–767.
21. Robertson, J. L., & Preisler, H. K. (1992). Pesticide bioassays with arthropods. In *CRC Press*. http://www.crcpress.com/product/isbn/9780849323317.
22. Ross, G. J. S., & Finney, D. J. (1972). Probit Analysis. In *The Statistician* (Vol. 21, Issue 3).
23. Sadeghi, R., Izadi, H., & Mahdian, K. (2012). Energy allocation changes in overwintering adults of the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae* Burckhardt & Lauterer (Hemiptera: Psyllidae). *Neotropical Entomology*, *41*(6), 493–498.
24. Shafer, T. J., & Meyer, D. A. (2004). Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: A critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *196*(2), 303–318.

25. Toxopeus, J., & Sinclair, B. J. (2018). Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biological Reviews*, *93*(4), 1891–1914.

26. Zachariassen, K. E. (1985). Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.*, *65*, 799–832.

Toxicity and Physiological Effects of Spirotetramat, Flonicamid, and Lambda-cyhalothrin against Fifth Instar Nymphs of *Agonoscena pistaciae*

Abolfazl Dehshiri[1], Hamzeh Izadi*, Ali Alizadeh

Abstract

The common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae*, is a serious pest of pistachio. The management of this pest relies on chemical control. We investigated the susceptibility of the fifth instar nymphs to spirotetramat, flonicamid, and lambda-cyhalothrin. As well as the effect of these insecticides on the nymphs' cold tolerance. The effect of sublethal concentrations of pesticides on esterase activity was also examined. Lambda-cyhalothrin, with an LC_{50} value of 3.3 mg a.i./L, was more toxic to nymphs of *A. pistaciae* compared to spirotetramat (LC_{50} = 259.4 mg a.i./L) and flonicamid (LC_{50} = 1486.8 mg a.i./L). At 0.0 °C lambda-cyhalothrin had no significant effect on the cold tolerance of the nymphs, but, the survival rate of nymphs decreased as the temperature dropped from zero to -5 °C across all concentrations. In spirotetramat and flonicamid treatments, the survival of the nymphs significantly decreased with increasing pesticide concentration and decreasing temperature. The esterase activity in nymphs treated with flonicamid and lambda-cyhalothrin was lower than that of spirotetramat. The esterase activity was inhibited by the LC_{50} and LC_{25} concentrations of flonicamid and lambda-cyhalothrin, but restrained at LC_{25} concentration of spirotetramat and induced at LC_{50} concentration. If lambda-cyhalothrin was the most effective insecticide against the fifth instar nymphs, spirotetramat significantly reduced the cold tolerance of the pest. While lambda-cyhalothrin was the most lethal compound against pistachio psylla, spirotetramat effectively reduced the cold tolerance of the pest. Thus, it is recommended to use a combination of both pesticides to target the final generation of the pest.

Keywords: Cold hardiness, Enzyme assay, Cold hardiness, Supercooling point.

[1] Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.

* Corresponding author: izadi@vru.ac.ir