

تأثیر پیروپیروکسی فن بر آنزیم‌های سم‌زدا و موثر در متابولیسم حدواسط یید 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

تنظیم‌کننده‌های رشد حشرات (IGRs) 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، پیروپیروکسی فن، پس از آزمون مقدماتی تهیه و روی لاروهای سن آخر شب‌پره *Ephestia kuehniella* تیمار شدند تا تأثیر آن‌ها روی برخی از آنزیم‌های سم‌زدا و موثر در متابولیسم حدواسط مشخص شود. پس از تعیین دوز کشنده ۴۵/۷۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، لاروهای تیمار شده با استون به عنوان شاهد و دوزهای ۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیروپیروکسی فن در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار به طور تصادفی انتخاب شدند تا فعالیت آنزیم‌های استراز عمومی، گلوکاتایون اس-ترانسفراز، اسید و آلکالین فسفاتاز، آلانین و آسپارات 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 پیروپیروکسی فن 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 گلوکاتایون اس-ترانسفراز با استفاده از دو معرف DCNB و CDNB مشاهده شد. در مورد اسید و آلکالین فسفاتاز بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در شاهد و تیمار ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیروپیروکسی فن مشاهده شد. در مورد آلانین و آسپارات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز نیز نتایج مشابه اسید و آلکالین فسفاتاز مشاهده شد. نتایج حاضر نشان می‌دهند که با افزایش غلظت پیروپیروکسی فن روی لاروهای تیمار شده فعالیت آنزیم‌های سم-زدا افزایش یافت تا کم‌ترین تأثیر آفت‌کش تیمار شده روی فیزیولوژی داخلی بدن لارو ایجاد شود ولی با وجود این پیروپیروکسی فن مداخله معنی‌داری در آنزیم‌های موثر در متابولیسم حدواسط لاروهای *E. kuehniella* ایجاد کرد.

واژه‌های کلیدی: پیروپیروکسی فن، *Ephestia kuhniella*، متابولیسم حدواسط

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

¹ Insect Growth Regulators

مقدمه

ها با فعالیت خود سوبستراهای لازم برای انجام چرخه‌های اصلی تولید انرژی را فراهم می‌کنند. به‌طور مثال، اسید و آلکالین فسفاتاز با جدا کردن دی‌آسیل گلیسریدها از پروتئین‌های ناقل آن‌ها را وارد مرحله فعال‌سازی بتا-اکسیداسیون می‌کنند. آمینو ترانسفرازها با تبدیل اسید آمینه‌های مختلف به هم ضمن تامین اسید آمینه‌های 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; Zibae 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 آفت‌کش‌های معمول علیه این آفت روی محصولات انباری وجود ندارد، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد حشرات به‌دلیل غیر سمی بودن روی انسان و دام می‌تواند 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 پیروپروکسی فن روی بید آرد و تغییر فعالیت دو آنزیم سم‌زدای استراز عمومی و گلوکاتایون اس-ترانسفراز به همراه آنزیم‌های موثر در متابولیسم حدواسط آفت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش بید آرد

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

تنظیم‌کننده‌های رشد حشرات (IGRs^۱) 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 آن‌هایی هستند که مشابه هورمون اکدایزون عمل می‌کنند (Nijhout, 1994). ترکیباتی 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 دیپوز می‌شوند. بازدارنده‌های هورمون جوانی باعث بدشکلی در افراد بالغ شده، مرگ و میر شفیره‌ها را با اختلال در تبدیل بافت‌های لاروی به فرد بالغ افزایش می‌دهند (Goodman and Granger, 2005). پیروپروکسی فن،^۲ آفت‌کشی با بنیان پیریدین^۳ 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، تری‌آسیل 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

¹ Insect Growth Regulators

² Pyriproxyfen

³ Pyridine

دقیقه خوانده شد با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Awareness Co., USA) شیب خط رگرسیون حاصل به عنوان فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت گلوکوتایون اس-ترانسفراز

از روش اوپنورث (Oppenorth, 1979) برای سنجش آنزیم گلوکوتایون 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 گلوکوتایون 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 رگرسیون 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، ۲۰ میکرولیتر 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، ۲۰ میکرولیتر 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 آسپارات آمینوترانسفراز

فعالیت این دو آنزیم بر اساس روش توماس (Thomas, 1998) با استفاده از کیت شرکت بیو کم 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

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

زیست سنجی

لاروهای سن آخر پروانه بید آرد به طور تصادفی انتخاب شده و با غلظت های 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 بررسی های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه نمونه برای بررسی های بیوشیمیایی

لاروهای مورد بررسی در بازه های 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 روشنین به عنوان منبع آزمون های 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^۱ و بتا-نفتیل استات^۲ 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 نمونه های آنزیمی به آن اضافه شد و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر در فواصل ۱۰ ثانیه ای به مدت ۱

³ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

⁴ 1,2-dichloro-4-nitro-benzene

¹ α -naphthyl acetate

² β -naphthyl acetate

یافت. در ضمن فعالیت آنزیم مذکور در معرف DCNB بیشتر از CDNB بود (جدول ۳). استراهای عمومی گروهی متنوع از آنزیم های هیدرولیز کننده هستند که با هیدرولیز ترکیبات دارای پیوند استری مثل پیروپروکسی فن می توانند باعث مقاومت حشرات به این گونه آفت کش ها شوند (Talebi, 2005). تاکنون این آنزیم ها در مقاومت بسیاری از حشرات به آفت کش ها نقش داشته اند (Konno and Shishido, 1985; Quet *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Zibaeet *et al.*, 2009) گلوکاتایون اس-ترانسفرازها خانواده ای از آنزیم ها با نقش های چندگانه هستند که واکنش های مزدوج شدن مولکول ها با گلوکاتایون احیاء شده را تسهیل می کنند. تاثیر این آنزیم ها تبدیل مولکول چربی دوست به مولکولی محلول در آب است (Habig *et al.*, 1974). تیمار حشرات با آفتکش های فسفره و کلره منجر به افزایش فعالیت این آنزیم و سپس مقاومت حشرات به آفت کش ها می شود (Motoyama and Dauterman 1975; Clark *et al.*, 1984; Hemingway *et al.* 1985; Grant and Matsumura 1989; Fournier *et al.* 1992; Lagadic *et al.*, 1993; Zibae *et al.*, 2009). افزایش فعالیت این دو آنزیم پس از تیمار غلظت های مختلف پیروپروکسی فن می تواند نشان دهنده سم زدایی این آفت کش توسط این آنزیم ها باشد و در طولانی مدت منجر به مقاومت شود. در ضمن به نظر می رسد که این سم زدایی کارایی لازم را نداشته باشد زیرا با افزایش فعالیت آنزیم های سم زدا باز هم پیروپروکسی فن توانسته با افزایش غلظت اثر منفی روی متابولیسم حدواسط بید آرد بگذارد. اسید و آلکالین فسفاتاز آنزیم های هیدرولازی هستند که گروه های فسفات را از مولکول هایی میتل نوکلئوتیدها، پروتئین ها، آلکالوئیدها، آفت کش های فسفره جدا کرده و در جدا کردن اسیدهای چرب از پروتئین های ناقل در همولنف حشرات نیز نقش دارند (Klowden, 2007; Zibae *et al.*, 2009). هر نوع تغییر در فعالیت این دو آنزیم تحت تاثیر شرایط فیزیولوژی بدن حشرات یا آفت کش ها می تواند در هضم، انتقال و در دسترسی مواد غذایی در همولنف و اجسام چربی موثر باشد. پس از تیمار پیروپروکسی فن فعالیت اسید

فعالیت این آنزیم بر اساس روش کینگ (King, 1965) با استفاده از کیت شرکت بیو کم 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 نمونه ها به روش لوری و همکاران (Lowry *et al.*, 1951) تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

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

نتایج و بحث

جدول ۱ نشان دهنده غلظت های موثر پیروپروکسی فن روی لاروهای سن آخر بید آرد است. نتایج نشان دادند که غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر پیروپروکسی فن می تواند 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 هورمون های جوانی می تواند با به هم 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 می شود. 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 و همکاران (Sashindran *et al.*, 2005) و قاسمی (Ghasemi *et al.*, 2010) می باشد.

در مطالعه حاضر تیمار لاروها با غلظت های مختلف پیروپروکسی فن باعث افزایش معنادار فعالیت استراژ عمومی نسبت به شاهد شد که این افزایش وابسته به غلظت بود (جدول ۲). وضعیتی مشابه نیز در مورد گلوکاتایون اس- ترانسفراز مشاهده شد (جدول ۳). به عبارت دیگر، با افزایش غلظت پیروپروکسی فن فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس- ترانسفراز برای هر دو معرف و در هر دو بازه زمانی افزایش

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 صدمه به بافت‌های بدن عمل می‌کند (Thomas, 1998). تیمار لاروهای بید آرد با غلظت‌های مختلف پیروپروکسی فن باعث کاهش معنی‌دار فعالیت لاکتات دهیدروژناز نسبت به شاهد شد که این کاهش ۲۴ ساعت پس از 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; Zibae et al., 2011).

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

و آلکالین فسفاتاز در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت (جدول ۴). تیمار افراد بالغ سن گندم *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) با پیروپروکسی فن فعالیت ACP را کاهش و فعالیت ALP را افزایش داد (Zibae 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; Zibae and Bandani, 2010; Hasheminia et al., 2011).

تیمار غلظت‌های مختلف پیروپروکسی فن باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آلانین و آسپاراتات 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 آسپاراتات 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 کریس مورد استفاده قرار گیرد (Klowden, 2007). افزایش فعالیت این دو آنزیم نشان‌دهنده وجود چالش فیزیولوژیک به دلیل حضور بیمارگر، تخریب بافتی یا حضور عوامل سمی است (Giboney, 2005). زیبایی و همکاران (Zibae et al., 2011) نیز به نتایج مشابهی با پژوهش حاضر در مورد سن معمولی گندم پس از تیمار آن‌ها با پیروپروکسی فن رسیدند.

جدول ۱- تخمین غلظت‌های کشنده پیروپروکسی 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 ($\mu\text{g/ml}$)	Slope \pm SE	df	X ²
LC ₁₀	6.04	1.459 \pm 0.39	3	0.150
LC ₃₀	22.76	1.459 \pm 0.39	3	0.150
LC ₅₀	45.72	1.459 \pm 0.39	3	0.150

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

جدول ۲- تاثیر پیروپروکسی 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*.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	α -naphtyl	α -naphtyl	β -naphtyl	β -naphtyl
	24	48	24	48
Control	0.026 \pm 0.002a	0.056 \pm 0.002bc	0.012 \pm 0.001b	0.026 \pm 0.001b
5	0.031 \pm 0.006b	0.035 \pm 0.003c	0.003 \pm 0.001b	0.035 \pm 0.002b
15	0.078 \pm 0.005c	0.073 \pm 0.002ab	0.021 \pm 0.002b	0.046 \pm 0.002b
30	0.141 \pm 0.011c	0.099 \pm 0.015a	0.039 \pm 0.002a	0.099 \pm 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 پیروپروکسی فن بر فعالیت گلو تاتیون 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*

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	CDNB	CDNB	DCNB	DCNB
	24	48	24	48
Control	0.019 \pm 0.001b	0.040 \pm 0.002a	0.051 \pm 0.007a	0.048 \pm 0.002a
5	0.024 \pm 0.002ab	0.053 \pm 0.003b	0.051 \pm 0.001b	0.073 \pm 0.005b
15	0.040 \pm 0.000ab	0.062 \pm 0.006bc	0.069 \pm 0.003b	0.087 \pm 0.004b
30	0.085 \pm 0.012a	0.108 \pm 0.003c	0.157 \pm 0.018b	0.111 \pm 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 پیروپروکسی فن بر فعالیت آلکالین و اسید فسفاتاز ($\mu\text{mol/min/mg protein}$) روی لاروهای سن آخر *Ephestia*

Table 4. Effect of pyriproxyfen on alkaline (ALP) and acid phosphatase (ACP) activities ($\mu\text{mol/min/mg protein}$) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	ALP	ALP	ACP	ACP
	24	48	24	48
Control	2.90 \pm 0.22a	4.61 \pm 0.57a	3.40 \pm 0.121a	2.95 \pm 0.061a
5	1.72 \pm 0.06ab	1.22 \pm 0.17a	0.51 \pm 0.176b	1.81 \pm 0.14ab
15	1.36 \pm 0.06b	2.10 \pm 0.19b	1.11 \pm 0.028bc	1.16 \pm 0.03bc
30	0.91 \pm 0.55b	3.87 \pm 0.27b	1.87 \pm 0.421c	0.61 \pm 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 پیروپروکسی فن بر فعالیت آلانین و آسپارات آمینوترانسفراز ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$) روی لاروهای سن آخر

Ephestia kuehniella

Table 5. Effect of pyriproxyfen on alanine (ALT) and aspartate (AST) amino transferase activities ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ALT	ALT	AST	AST
	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 پیروپروکسی فن بر فعالیت لاکتات دهیدروژناز ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$) روی لاروهای سن آخر *Ephestia*

kuehniella

Table 6. Effect of pyriproxyfen on lactate dehydrogenase activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$) on the last larval instars of *Ephestia kuehniella*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LDH	LDH
	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)-hydroxyphen. **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 houseflies 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. **Acta Entomologica Sinica** 38: 266-272.
- Hashemina, 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., Kisson, 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 maculatus* 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 irritans irritans* (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 houseflies. **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 leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* (Gnenea) (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., Zibae, 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 Verlagsgesellschaft, 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 field populations of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae). **Insect Science** 13: 41-47.
- Zibae, 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 *Beauveria bassiana*. **Bulletin of Entomological Research** 100: 185-196.
- Zibae, 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.
- Zibae, A., Zibae, 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.

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

M. Sharifi¹, A. A. Kosari², A. Zibae^{3*} and J. Jalali Sendi⁴

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 concentrations 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 acetone as control and others treated by 5, 15 and 30 µg/ml of pyriproxyfen were randomly chosen after 24 and 48 hours post-treatment for enzymatic analysis including general esterases, glutathione *S*-transferases, acid and alkaline phosphatases, alanine and aspartate aminotransferases as well as lactate dehydrogenase. By using α - and β -naphthyl acetate as substrates, activities of general esterases increase 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 phosphatase 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 intervenes in activities of enzymes involved in intermediary metabolism of *E. kuehniella*.

Keywords: Pyriproxyfen, *Ephestia kuehniella*, Intermediary metabolism

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