

## بررسی اثر چند ترکیب حشره‌کش روی بالشتک مرکبات *Pulvinaria aurantii* Ckll. و شکارگر آن *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant

محمدفاضل حلاجی ثانی<sup>۱</sup>، بهرام ناصری<sup>۱\*</sup>، هوشنگ رفیعی دستجردی<sup>۱</sup>، سیروس آقاجانزاده<sup>۲</sup> و محمد قدمیاری<sup>۳</sup>

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران ۲- پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران و ۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bnaseri@uma.ac.ir

### چکیده

بالشتک مرکبات، *Pulvinaria aurantii* Ckll. مهم‌ترین شپشک باغ‌های مرکبات شمال کشور است. اثر کشندگی حشره-کش‌های کلرپایریفوس، استامی‌پراید، پایی پروکسی فن و پالیزین، به‌تنهایی و همراه با روغن امولسیون شونده روی پوره‌های سن یک بالشتک مرکبات مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در شرایط طبیعی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۰ تیمار و ۳ تکرار انجام و اثر تیمارها، ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از سمپاشی مقایسه شد. علاوه بر این، اثر حشره‌کش‌های یاد شده روی دوره نابالغ و عمر حشره ماده کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant بررسی شد. همچنین فعالیت برخی آنزیم‌های غیرسمی کننده (گلوکاتیون اس-ترانسفراز، آلفا و بتا استراز) در لاروهای سن سوم کفشدوزک مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش‌ها روی کفشدوزک در شرایط آزمایشگاهی و در دمای ۲۶±۱ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۵±۵ درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام شدند. تیمارهای استامی‌پراید، پایی پروکسی فن، پالیزین و کلرپایریفوس همراه با روغن، بیشترین درصد تلفات را در پوره‌های سن اول بالشتک ایجاد کردند. طولانی‌ترین زمان تفریح تخم کفشدوزک (۸/۱۳ روز) در تیمار کلرپایریفوس و کوتاه‌ترین آن در تیمار شاهد (۴/۸۰ روز) به دست آمد. بین تیمارهای مورد آزمایش، کوتاه‌ترین طول عمر حشرات کامل ماده کفشدوزک، در تیمار کلرپایریفوس (۵۳/۵۰ روز) مشاهده شد. کلرپایریفوس باعث بیشترین کاهش فعالیت آلفا استراز و استامی‌پراید باعث بیشترین کاهش فعالیت گلوکاتیون اس-ترانسفراز در لارو سن سوم کفشدوزک شدند. پالیزین نسبت به سه حشره‌کش دیگر اثر منفی کمتری روی فعالیت بتا استراز کفشدوزک داشت. نتایج به دست آمده نشان داد که در میان ترکیبات مورد بررسی، پالیزین همراه با روغن ترکیب مناسبی برای کنترل بالشتک مرکبات می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم غیرسمی کننده، پالیزین، تأثیر کشندگی، آفت‌کش شیمیایی

## Investigating the effect of some insecticides on *Pulvinaria aurantii* Ckll. and its predator, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant

Mohamadfazel Hallaji Sani<sup>1</sup>, Bahram Naseri<sup>1,\*</sup>, Hooshang Rafiee Dastjerdi<sup>1</sup>, Sirous Aghajanzadeh<sup>2</sup> & Mohammad Ghadamyari<sup>3</sup>

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, 2. Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran & 3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht

\* Corresponding author, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir

#### Abstract

The orange pulvinaria scale, *Pulvinaria aurantii* Ckll. is the most important scale of citrus in the northern Iran. The lethal effects of chlorpyrifos, pyriprooxyfen, acetamiprid and palazin, alone and in combination with emulsifying oil, were evaluated on first-instar nymphs of *P. aurantii*. The experiment was conducted under natural condition in a randomized complete block design with 3 replications and 10 treatments, and treatments effect was compared 1, 7, 14 and 21 days after spraying. Moreover, the effect of these insecticides was investigated on duration of immature stages and female longevity of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant. The activity of some detoxification enzymes (alpha-esterase, beta-esterase and glutathion-S-transferase) in third instar larvae was evaluated. The experiments on the ladybird were conducted under laboratory conditions at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $75 \pm 5\%$  RH and a photoperiod of 14:10 (L:D) h. The treatments with acetamiprid + oil, pyriprooxyfen + oil, chlorpyrifos + oil and palazin + oil had the highest mortality on first nymphal instar of the scale. The longest incubation period of *C. montrouzieri* was in chlorpyrifos treatment (8.13 days), and the shortest was in control (4.80 days). Moreover, among treatments the female longevity of *C. montrouzieri* was the longest in control (96.60 days), and shortest in chlorpyrifos treatment (53.50 days). Chlorpyrifos and acetamiprid caused the highest reduction in alpha-esterase and glutathion-S-transferase activities of the third larval instar of *C. montrouzieri*, respectively. Also, palazin had less negative effect on the activity of beta-esterase in comparison with other tested insecticides. The results of this study indicated that among tested compounds, palazin in combination with the oil is a suitable compound to control of the orange pulvinaria scale.

**Key words:** detoxification enzyme, palazin, lethal effect, chemical pesticide

Received: 29 December 2018, Accepted: 9 July 2019.

#### مقدمه

کشور ایران در زمینه تولید مرکبات با ۵ میلیون تن، سهم ۳/۷ درصدی و رتبه هفتم جهان را داراست. مازندران، فارس، کرمان (جیرفت و کهنوج) و هرمزگان، مهم‌ترین استان‌های تولیدکننده مرکبات در ایران می‌باشند (Agricultural statistics, 2016).

بالشتک مرکبات *Pulvinaria aurantii* Ckll، از مهم‌ترین شپشک‌های درختان مرکبات استان مازندران می‌باشد (Hallajisani, 2000). این آفت با تغذیه از شیره گیاهی در سطح زیری و رویی برگ‌ها و ترشح عسلک، سبب تضعیف درختان شده و در تراکم بالا منجر به ریزش میوه‌ها و برگ‌ها می‌شود. بالشتک مرکبات در استان مازندران از منطقه گلوگاه در شهرستان بهشهر تا کتالم در شهرستان رامسر گزارش شده است (Rajabpour, 2005). این آفت دو نسل در سال دارد (Rajabpour, 2005; Hallajisani, 2000) و به انواع درختان مرکبات و همچنین گیاهان دیگر از جمله درختچه زیتنی (*Pittosporium tabira* (Tunb.))، گونه‌های خرمندی و داروآش و ندرتاً میخک ژاپنی، ازگیل ژاپنی و خرزهره حمله می‌کند (Modarres Aval, 2002).

کفشدوزک شکارگر *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant مهم‌ترین شکارگر بالشتک مرکبات در ایران است (Hallajisani, 2000). در باغ‌های مرکبات شمال ایران، به دلیل سم‌پاشی‌های گسترده‌ای که همه ساله برای کنترل بالشتک مرکبات انجام می‌گیرد (Damavandian & Tavakoli, 2004)، این شکارگر نیز همواره در معرض آسیب‌های جدی ناشی از کاربرد بی‌رویه‌ی حشره‌کش‌های شیمیایی قرار می‌گیرد. از جمله این آسیب‌ها، می‌توان به اثرات منفی حشره‌کش‌های کلریپایریفوس و پایریپروکسی فن روی میزان زادآوری و درصد تفریح تخم کفشدوزک *C. montrouzieri* اشاره کرد (Planes et al., 2013).

مطالعه اثرات زیرکشنده ایمیداکلوپراید روی کفشدوزک *Serangium japonicum* Chapin نشان داد که میزان رشد، ظرفیت تولیدمثل و میزان تغذیه کفشدوزک از سفیدبالک *Bemisia tabaci* Genadius نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (He et al., 2012). مقایسه اثر حشره‌کش کلریپایریفوس با حشره‌کش‌های گیاهی دایابون و پالیزین

در شرایط مزرعه‌ای روی کفشدوزک شکارگر نقابدار دولکه‌ای (*Chilocorus bipustulatus* (Gordon)، مشخص نمود که کلرپایرفوس (۲۰۰۰ پی پی ام) و دایابون (۵۰۰۰ پی پی ام)، به ترتیب بیش‌ترین و کمترین میزان تلفات را روی کفشدوزک داشتند (Eshaghi Sani et al., 2017). سمیت روغن معدنی و حشره‌کش‌های دیازینون، مالاتیون و کلرپایرفوس روی لارو و حشره کامل کفشدوزک *C. montrouzieri* در شرایط آزمایشگاه توسط Saedi et al. (2018) بررسی شد. نتایج ایشان نشان داد که روغن معدنی و کلرپایرفوس در مقایسه با دو حشره‌کش دیگر سمیت کمتری برای این شکارگر داشتند. آنزیم‌های متابولیسم حشرات در غیر سمی کردن مواد سمی نقش دارند. رایج‌ترین ساز و کارهای مقاومت متابولیکی در حشرات، آنزیم‌های استراز و گلوکوتایون اس- ترانسفراز هستند که در غیر سمی کردن ترکیبات شیمیایی، به خصوص ترکیبات فسفره نقش مهمی دارند (Booth & O'Halloran, 2001). آنزیم‌های استراز عمومی در برابر طیف وسیعی از حشره‌کش‌های فسفره، پیریتروئیدها، کارباماتها و نئونیکوتینوئیدها عمل می‌کنند (Hollingworth & Dong, 2008). آنزیم گلوکوتایون اس- ترانسفراز نیز می‌تواند باعث ایجاد مقاومت در برابر حشره‌کش‌های فسفره و پیریتروئیدها شود (Enayati et al., 2005). علاوه بر آنزیم-های ذکر شده، مونواکسیژنازها نیز به عنوان یکی از عوامل ایجادکننده مقاومت متابولیکی در حشرات زنده-مکنده نسبت به سموم نیکوتینوئیدی گزارش شده‌اند (Jones et al., 2011). بر اساس جستجو در منابع علمی در دسترس، تاکنون هیچ تحقیقی درباره تاثیر حشره‌کش‌های مختلف روی فعالیت آنزیم‌های سم زدای *C. montrouzieri* صورت نگرفته است. با این حال، پژوهش‌هایی روی سایر گونه‌های کفشدوزک‌های شکارگر انجام شده است. به عنوان مثال، Kumral et al. (2011) گزارش کردند که حشره‌کش فسفره متیل پاراتیون باعث کاهش فعالیت آنزیم سم‌زدای کربوکسیل استراز در کفشدوزک *Stethorus gilvifrons* (Muls.) شد اما روی آنزیم گلوکوتایون اس- ترانسفراز کفشدوزک اثر قابل ملاحظه‌ای نداشت.

با توجه به خطرات زیست محیطی ناشی از کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی به‌ویژه روی دشمنان طبیعی و حشرات غیرهدف موجود در باغ‌های مرکبات، شناسایی ترکیبات کم خطرتر و سازگارتر با محیط زیست، به منظور کنترل آفات مرکبات ضروری است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر صابون حشره‌کش پالیزین و سه حشره‌کش رایج در باغ‌های مرکبات (کلرپایرفوس، پایی پروکسی فن و استامی پرید) به‌تنهایی و همراه با روغن امولسیون شونده، روی بالشتک مرکبات و برخی مراحل زیستی و آنزیم‌های سم‌زدای کفشدوزک *C. montrouzieri* می‌باشد. از آنجا که میزان فعالیت آنزیم‌های غیرسمی‌کننده حشرات در پاسخ به آفت‌کش‌های مختلف می‌تواند بیانگر میزان مقاومت متابولیکی آنها باشد، بنابراین تعیین سطوح فعالیت این گروه از آنزیم‌ها می‌تواند در انتخاب حشره‌کش مناسب در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات مفید واقع شود. بر این اساس، در تحقیق حاضر، علاوه بر تاثیر کشندگی حشره‌کش‌های ذکر شده در بالا روی بالشتک مرکبات، اثرات آنها روی مراحل زیستی و آنزیم‌های سم‌زدای کفشدوزک شکارگر *C. montrouzieri* نیز مطالعه شد تا حشره‌کش موثر روی بالشتک مرکبات و در عین حال با خطر کمتر برای شکارگر مشخص شود.

## مواد و روش‌ها

### اثر حشره‌کش‌ها روی بالشتک مرکبات *P. aurantii*

در منطقه رامسر (عرض جغرافیایی ۳۶° ۵۳' ۰۹" شمالی و طول جغرافیایی ۴۱° ۴۱' ۵۰" شرقی) باغ مناسبی که از لحاظ جمعیت بالشتک مرکبات نسبتاً یکنواخت بود، انتخاب شد. پس از نمونه برداری از جمعیت بالشتک،

زمان خروج حداکثر پوره‌های سن یک آفت از کیسه‌های تخم در اوایل تیر ماه سال ۱۳۹۵ تعیین شد. به این صورت که پس از مشاهده کاهش تعداد پوره‌های سن یک در طی نمونه‌برداری‌های هفتگی، زمان سمپاشی مشخص شد. سمپاشی با سمپاش ۱۰۰ لیتری Robin 20 EY انجام شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۰ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. بلوک‌بندی بر مبنای وضعیت درختان، موقعیت باغ و وضعیت آفت بود. فاصله درختان تیمار شده ۵ در ۴ متر بود. برای هر تکرار آزمایش، یک درخت پرتقال تامسون ناول cv. *Citrus sinensis* Thomson navel با عمر بیش از ۱۰ سال در نظر گرفته شد. نمونه برداری با جدا نمودن تعداد ۲۰ برگ از ارتفاع حدود دو متری چهار جهت اصلی جغرافیایی درخت انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده درون کیسه فریزر به آزمایشگاه منتقل شدند. تعداد ۱۰۰ پوره زنده بالشتک مرکبات قبل از اعمال تیمارها، در اول تیر ماه و ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ روز بعد از سم پاشی، در آزمایشگاه شمارش شدند. درصد تاثیر تیمارها با فرمول هندرسون تیلتون تعیین شد. تجزیه آماری داده‌ها به روش تجزیه واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار SAS نسخه 9.1 انجام شد (Shaaban et al., 2012).

تیمارهای این آزمایش عبارت بودند از: کلرپایرفوس (Foska EC 40.8%) تولیدی شرکت کاوش کیمیا کرمان به نسبت ۲ در هزار، استامی‌پراید (Ekka SP 20%) تولیدی شرکت Krishi هند به نسبت ۰/۵ در هزار، پایی پروکسی فن (Pyroprooxyfen EC10%) تولیدی شرکت کاوش کیمیا کرمان به نسبت ۰/۵ در هزار، روغن امولسیون شونده شرکت کاوش کیمیا کرمان به نسبت ۰/۵ درصد، کلرپایرفوس به نسبت ۲ در هزار همراه با روغن ۰/۵ درصد، استامی‌پراید به نسبت ۰/۵ در هزار همراه با روغن ۰/۵ درصد، پایی پروکسی فن به نسبت ۰/۵ در هزار همراه با روغن ۰/۵ درصد، پالیزین به نسبت ۲ در هزار، پالیزین به نسبت ۲ در هزار همراه با روغن ۰/۵ درصد و شاهد (محلول پاشی با آب). آزمایش به همین ترتیب در سال ۱۳۹۶ تکرار شد.

### اثر حشره‌کش‌ها روی مراحل زیستی کفشدوزک *C. montrouzieri*

بررسی‌ها در شرایط آزمایشگاهی با دمای  $26 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $75 \pm 5$  درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام شد. برای مطالعه اثر حشره‌کش‌های مورد آزمایش، از روش Filter paper residue test (Michaud & Angela, 2003)، با برخی تغییرات، استفاده شد. کفشدوزک‌ها از یک باغ رها شده در غرب شهرستان رامسر در اوایل خرداد ۱۳۹۵، جمع‌آوری شده و در شرایط آزمایشگاهی ذکر شده در بالا روی نهال‌های نارنج پرورش داده شدند. لاروهای کفشدوزک در دو مرحله تیمار شدند. در مرحله اول، لاروهای سن اول ۲۴ ساعت پس از خروج از تخم و در مرحله دوم، لاروهای سن سوم ۲۴ ساعت پس از تعویض جلد تیمار شدند. ابتدا یک نوار کاغذ صافی به ابعاد  $2 \times 9$  سانتیمتر کف پتری‌هایی شیشه‌ای قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از غلظت توصیه شده مزرعه‌ای حشره‌کش‌های کلرپایرفوس (۲۰۰۰ پی پی ام)، پالیزین (۲۰۰۰ پی پی ام)، استامی‌پراید (۵۰۰ پی پی ام)، پایی پروکسی فن (۵۰۰ پی پی ام) و آب مقطر به عنوان شاهد روی نوار کاغذ صافی با برج پاشش پاشیده شد. پس از خشک شدن کاغذها، تعداد ۶۰ لارو نئونات کفشدوزک به صورت انفرادی همراه با ۲۰ عدد تخم شپشک آردآلود *Planococcus citri* (Risso) به عنوان طعمه درون پتری قرار داده شدند. دلیل استفاده از شپشک آردآلود، سهولت پرورش آزمایشگاهی آن نسبت به بالشتک مرکبات بود (Hallajisani, 2000). پس از گذشت ۲۴ ساعت، لاروهای زنده به درون پتری‌های شیشه‌ای فاقد حشره‌کش (قطر ۹ سانتی متر) منتقل شده و برگ‌های مرکبات حاوی ۳۰ پوره و تخم شپشک آردآلود روی کاغذ صافی قرار داده شدند. برگ‌ها هر دو روز یکبار تعویض شدند. پتری‌ها به صورت روزانه مورد بازدید قرار گرفته و زمان مراحل لاروی یادداشت شد. پس از خروج حشرات کامل، آنها به مدت ۷ روز با هم نگهداری شدند تا از جفت‌گیری آنها اطمینان حاصل

شود. سپس حشرات ماده به صورت جداگانه در ظروف محتوی برگ‌های حاوی ۳۰ پوره و تخم شپشک آردآلود قرار داده شدند. از شروع زمان تخم‌گذاری حشرات ماده، برگ‌های حاوی تخم کفشدوزک، مورد بازدید روزانه قرار گرفتند تا طول دوره جنینی محاسبه شود. طول عمر حشرات کامل ماده نیز از زمان خروج از پوسته شفیرگی تا زمان مرگ محاسبه شد.

### سنجش فعالیت استرازهای عمومی

فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا استراز به ترتیب با استفاده از دو سوبسترای آلفا- نفتیل استات و بتا- نفتیل استات اندازه‌گیری شد (van Asperen, 1962). برای تهیه محلول نفتیل استات، ۰/۱۳۱ گرم  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  به ۰/۴۱۵ گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  اضافه شد (اسیدیته ۷). سپس ترکیب مذکور با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. با توجه به اینکه جهت مدیریت بالشتک در باغ‌های مرکبات، رهاسازی کفشدوزک با رعایت فاصله زمانی پس از سم‌پاشی روی بالشتک، می‌تواند در کنترل بهتر آفت موثر باشد از دوز توصیه شده ترکیبات مذکور کلرپایریفوس (۲۰۰۰ پی پی ام)، پالیزین (۲۰۰۰ پی پی ام)، استامی‌پراید (۵۰۰ پی پی ام)، پایری‌پروکسی فن (۵۰۰ پی پی ام) به روش Filter paper residue استفاده شد. در این آزمایش از لاروهای سن ۳ کفشدوزک (۳۰ عدد لارو به ازای هر تیمار) استفاده شد زیرا این لاروها از اندازه مناسبی برخوردار بوده و کارایی بیشتری در تغذیه از شپشک آردآلود (به عنوان طعمه) داشتند (مشاهدات شخصی). هرلارو به تنهایی در ۱۱۲/۵ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (اسیدیته ۷) شامل ۰/۱ درصد تریتون X-100 همگن شدند. مخلوط‌های همگن حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۱۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس لایه بالایی محلول (رونشین) به عنوان منبع آنزیم به یک میکروتیوب جداگانه منتقل شد. مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر از لایه بالایی به میکروتیوب‌های حاوی ۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (اسیدیته ۷) شامل ۰/۱ درصد تریتون X-100 اضافه شده و درون هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد. سپس ۲۵ میکرولیتر سوبسترا (۰/۴۵ میلی مولار) به چاهک اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر RR Salt blue - (شرکت Fluka)، ۰/۰۷۵٪ به میکروتیوب اضافه شد و ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. برای آلفا استراز، جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر و برای بتا استراز در ۵۴۰ نانومتر، در فواصل زمانی ۲ دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه با میکروپلیت ریدر Fax<sup>®</sup> 3200 خوانده شد. از نفتول به عنوان ماده استاندارد برای محاسبه فعالیت ویژه استفاده شد.

### سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس- ترانسفراز

به منظور سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس- ترانسفراز از معرف ۱- کلو و ۲، ۴- دی نیتروبنزن (CDNB) استفاده شد (Habig et al., 1974). مقدار ۱۵ میکرولیتر از محلول آنزیم به صورت جداگانه در سه چاهک در میکروپلیت ۹۶ چاهکی ریخته شد، سپس به آن ۱۰۰ میکرولیتر CDNB ۱/۲ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر گلوکاتایون احیاء شده ۱۰/۳۵ میلی مولار در بافر فسفات (۰/۱ مولار در اسیدیته ۷) اضافه شد. چاهک شاهد شامل ۱۰۰ میکرولیتر CDNB ۱/۲ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر گلوکاتایون احیاء شده و ۱۵ میکرولیتر بافر فسفات بود. فعالیت آنزیم به طور مداوم هر دو دقیقه، تا مدت ۲۰ دقیقه در ۳۴۰ نانومتر و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با میکروپلیت ریدر Fax<sup>®</sup> 3200 خوانده شد. شیب خط رگرسیونی حاصل از افزایش جذب در واحد زمان به عنوان فعالیت اولیه آنزیمی در نظر گرفته شد. برای محاسبه فعالیت ویژه از ضریب خاموشی  $\text{CDNB}$  ( $9.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) استفاده شد و فعالیت ویژه به صورت نانومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

## اندازه‌گیری غلظت پروتئین

به منظور محاسبه غلظت پروتئین موجود در نمونه‌ها، از روش Bradford (1976) به کمک آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

تجزیه آماری داده‌های مربوط به شکارگر به روش تجزیه واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار SAS نسخه 9.1 انجام شد (Shaaban et al., 2012).

## نتایج و بحث

اثر حشره‌کش‌ها روی بالشتک مرکبات *P. aurantii*

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای حشره‌کش روی پوره‌های سن اول بالشتک مرکبات در سال ۱۳۹۵ نشان داد که یک روز (F=8.259; df=18, 26; P<0.0001)، ۷ روز (F=10.296; df=18, 26; P<0.0001)، ۱۴ روز (F=11.407; df=18, 26; P<0.0001) و ۲۱ روز (F=8.222; df=18, 26; P<0.0001) بعد از محلول‌پاشی بین تیمارها اختلاف معنی دار وجود داشت. پس از یک روز، کلرپایریفوس + روغن بیشترین درصد تلفات و تیمار محلول‌پاشی با روغن کمترین درصد تلفات را ایجاد کرد. پس از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز، تیمار کلرپایریفوس + روغن بیشترین تلفات را روی پوره‌های سن اول بالشتک داشت، هر چند بین این تیمار و تیمارهای استامی‌پراید + روغن، پایی‌پروکسی فن + روغن و پالیزین + روغن، اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۱).

جدول ۱ - تاثیر حشره‌کش‌های مختلف روی درصد تلفات (میانگین  $\pm$  خطای معیار) پوره بالشتک مرکبات در ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از سمپاشی در شرایط طبیعی در سال ۱۳۹۵

**Table 1.** Effect of different insecticides on percentage mortality (mean $\pm$ SE) of orange pulvinaria nymphs at 1, 7, 14 and 21 days after spray at natural conditions in 2016.

Pesticides	Concentration (%)	Efficiency (%)			
		1 day after treatment	7 days after treatment	14 days after treatment	21 days after treatment
Chlorpyrifos	0.2	39 $\pm$ 1.5bcd	65 $\pm$ 2.3bc	67 $\pm$ 1.2b	67 $\pm$ 1.8b
Oil	0.5	24 $\pm$ 2.2e	40 $\pm$ 1.9d	45 $\pm$ 1.5c	47 $\pm$ 1.7c
Pyriproxyfen	0.05	31 $\pm$ 0.6de	64 $\pm$ 2.3bc	64 $\pm$ 2.6b	74 $\pm$ 1.7b
Palizin	0.2	24 $\pm$ 2.1e	58 $\pm$ 0.9c	64 $\pm$ 2.7b	66 $\pm$ 2.4b
Acetamiprid	0.05	38 $\pm$ 1.7cd	68 $\pm$ 2.5b	68 $\pm$ 2.9b	72 $\pm$ 1.5b
Chlorpyrifos+oil	0.2+0.5	54 $\pm$ 1.5a	85 $\pm$ 2.0a	86 $\pm$ 1.2a	90 $\pm$ 0.6a
Pyriproxyfen+oil	0.05+0.5	42 $\pm$ 1.9bc	81 $\pm$ 1.9a	82 $\pm$ 1.5a	87 $\pm$ 1.5a
Acetamiprid+oil	0.05+0.5	47 $\pm$ 2.1b	82 $\pm$ 0.8a	87 $\pm$ 2.7a	90 $\pm$ 1.5a
Palizin+oil	0.2+0.5	39 $\pm$ 1.7bcd	82 $\pm$ 1.8a	83 $\pm$ 2.1a	83 $\pm$ 1.8a

Means with the same letters in each column are not significantly different (Tukey test, P<0.01).

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای حشره‌کش در سال ۱۳۹۶ نیز مشخص نمود که یک روز (F=10.444; df=18, 26; P<0.0001)، ۷ روز (F=15.556; df=18, 26; P<0.0001)، ۱۴ روز (F=12.222; df=18, 26; P<0.0001) و ۲۱ روز (F=11.889; df=18, 26; P<0.0001) پس از سمپاشی، بین تیمارها اختلاف معنی دار وجود داشت. پس از یک روز، کلرپایریفوس+روغن بیشترین درصد تلفات و تیمار روغن کمترین درصد تلفات را ایجاد کردند. بعد از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز، بین تیمارهای کلرپایریفوس+روغن، استامی‌پراید+روغن و پایی‌پروکسی فن+روغن و پالیزین+روغن، اختلاف معنی داری وجود نداشت و کمترین تلفات در تیمار سمپاشی با روغن بود (جدول ۲).

**جدول ۲** - تاثیر حشره‌کش‌های مختلف روی درصد تلفات (میانگین  $\pm$  خطای معیار) پوره بالشتک مرکبات در ۱، ۱۴، ۷ و ۲۱ روز پس از سمپاشی در شرایط طبیعی در سال ۱۳۹۶

**Table 2.** Effect of different insecticides on percentage mortality (mean $\pm$ SE) of orange pulvinaria nymphs at 1, 7, 14 and 21 days after spray at natural conditions in 2017.

Pesticides	Concentration (%)	Efficiency (%)			
		1 day after treatment	7 days after treatment	14 days after treatment	21 days after treatment
Chlorpyrifos	0.2	36 $\pm$ 2.1cde	63 $\pm$ 1.5b	65 $\pm$ 1.6b	65 $\pm$ 2.0b
Oil	0.5	26 $\pm$ 0.9f	45 $\pm$ 2.0c	49 $\pm$ 1.2c	51 $\pm$ 1.2c
Pyriproxyfen	0.05	31 $\pm$ 1.5def	65 $\pm$ 1.7b	62 $\pm$ 2.9b	69 $\pm$ 1.8b
Acetamiprid	0.05	40 $\pm$ 1.2bdc	65 $\pm$ 4.7b	66 $\pm$ 2.2b	64 $\pm$ 2.9b
Palizin	0.2	28 $\pm$ 1.9ef	62 $\pm$ 2.0b	61 $\pm$ 2.8b	66 $\pm$ 2.3b
Chlorpyrifos+oil	0.2+0.5	53 $\pm$ 0.8a	86 $\pm$ 0.8a	86 $\pm$ 1.2a	89 $\pm$ 1.5a
Pyriproxyfen+oil	0.05+0.5	41 $\pm$ 1.9bc	82 $\pm$ 0.9a	85 $\pm$ 2.1a	91 $\pm$ 1.2a
Acetamiprid+oil	0.05+0.5	46 $\pm$ 2.9b	83 $\pm$ 1.8a	85 $\pm$ 2.0a	91 $\pm$ 1.7a
Palizin+oil	0.2+0.5	34 $\pm$ 1.7cde	82 $\pm$ 1.8a	82 $\pm$ 2.0a	83 $\pm$ 2.5a

Means with the same letters in each column are not significantly different (Tukey test,  $P < 0.01$ ).

نتایج تجزیه مرکب دو ساله (سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶) اعمال تیمارهای حشره‌کش روی پوره‌های سن اول بالشتک مرکبات نشان داد یک روز ( $F=9.215$ ;  $df=32, 53$ ;  $P < 0.0001$ )، ۷ روز ( $F=11.810$ ;  $df=32, 53$ ;  $P < 0.0001$ )، ۱۴ روز ( $F=12.245$ ;  $df=32, 53$ ;  $P < 0.05$ ) و ۲۱ روز ( $F=9.349$ ;  $df=32, 53$ ;  $P < 0.0001$ ) بعد از محلول‌پاشی بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت. پس از یک روز، کلرپایریفوس + روغن بیشترین درصد تلفات و تیمار سمپاشی با روغن کمترین درصد تلفات را داشت. پس از ۷، ۱۴ و ۲۱ روز، تیمارهای کلرپایریفوس+روغن، استامی‌پراید+روغن، پایی‌پروکسی‌فن+روغن و پالیزین+روغن بیشترین درصد تلفات و تیمار سمپاشی با روغن، کمترین درصد تلفات را نشان دادند (جدول ۳).

**جدول ۳** - تاثیر حشره‌کش‌های مختلف روی درصد تلفات (میانگین  $\pm$  خطای معیار) پوره بالشتک مرکبات در فواصل زمانی یک، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از سمپاشی در شرایط طبیعی در سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶.

**Table 3.** Effect of different insecticides on mortality percentage (mean $\pm$ SE) of orange pulvinaria nymphs 1, 7, 14 and 21 days after spraying under natural conditions in 2016-2017.

Pesticides	Concentration (%)	Efficiency (%)			
		1 day after treatment	7 days after treatment	14 days after treatment	21 days after treatment
Chlorpyrifos	0.2	38 $\pm$ 1.8d	64 $\pm$ 1.9bc	66 $\pm$ 0.9b	66 $\pm$ 1.9c
Oil	0.5	25 $\pm$ 1.5f	43 $\pm$ 1.9d	45 $\pm$ 1.3c	49 $\pm$ 1.5d
Pyriproxyfen	0.05	31 $\pm$ 1.1de	65 $\pm$ 2.1bc	63 $\pm$ 1.7bb	72 $\pm$ 1.7c
Palizin	0.2	26 $\pm$ 2.0ef	60 $\pm$ 1.5c	62 $\pm$ 1.8b	66 $\pm$ 2.4c
Acetamiprid	0.05	39 $\pm$ 1.5dc	67 $\pm$ 3.7b	67 $\pm$ 2.5b	69 $\pm$ 2.3c
Chlorpyrifos+oil	0.2+0.5	53 $\pm$ 1.8a	85 $\pm$ 2.1a	86 $\pm$ 1.2a	90 $\pm$ 1.1a
Pyriproxyfen+oil	0.05+0.5	42 $\pm$ 1.4bc	82 $\pm$ 0.9a	84 $\pm$ 1.8a	89 $\pm$ 1.3ab
Acetamiprid+oil	0.05+0.5	47 $\pm$ 2.5b	83 $\pm$ 1.3a	86 $\pm$ 1.5a	90 $\pm$ 1.5a
Palizin+oil	0.2+0.5	37 $\pm$ 1.7cd	82 $\pm$ 1.8a	82 $\pm$ 2.1a	83 $\pm$ 2.1b

Means with the same letters in each column are not significantly different (Tukey test,  $P < 0.01$ ).

طبق نتایج تحقیق حاضر، افزودن روغن به هر یک از حشره‌کش‌ها، خاصیت کشندگی آنها را افزایش داد. بنابراین برای کنترل بهتر آفت و کاهش مصرف سموم شیمیایی، توصیه می‌شود از ترکیب روغن با حشره‌کش‌ها استفاده شود. همسو با یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر، (Shahnazari Aval (2013) گزارش کردند که کاربرد مالاتیون با روغن و بوپروفرین با روغن به ترتیب روی پوره‌های سن یک و سه بالشتک مرکبات در شرایط صحرائی نسبت به کاربرد هر یک از حشره‌کش‌ها به تنهایی مؤثرتر عمل کردند. صابون حشره‌کش پالیزین در ترکیب با روغن در ۱۴، ۷ و ۲۱ روز بعد از کاربرد، بیش از ۸۰ درصد پوره‌های سن یک بالشتک را کنترل کرد. نتایج بررسی غلظت‌های

۱/۵، ۲ و ۲/۵ در هزار صابون پالیزین روی شته درختچه توری، *Tinocallis kahawaluokalani* (Kirdkaly) و کفشدوزک شکارگر آن، *Harmonia axyridis* (Pallas) در شرایط آزمایشگاه، توسط Gholamzadeh-Chitgar (2017) نشان داد که غلظت‌های این حشره‌کش به ترتیب باعث ۸۶/۶، ۹۰ و ۹۵ درصد تلفات روی شته‌ها شد. تیمار ۲ در هزار پالیزین (۱۷/۵ روز) نسبت به شاهد (۱۶/۲ روز)، باعث طولانی‌شدن مدت نشو و نمای کفشدوزک شد. تحقیق ما نیز، نتایج این بررسی را تایید کرد. رهاسازی کفشدوزک *C. montrouzieri* بعد از سمپاشی علیه پوره‌های سن یک بالشتک مرکبات با پالیزین و روغن باعث ۸۲ درصد تلفات در این پوره‌ها شد (Hallajisani, 2018)، که نتایج بررسی ما نیز کنترل موثر بالشتک با استفاده از پالیزین را تایید می‌کند.

### اثر تیمارها روی طول دوره مراحل مختلف زیستی کفشدوزک

نتایج تجزیه واریانس اعمال تیمارهای حشره‌کش روی مراحل مختلف زیستی کفشدوزک *C. montrouzieri* مشخص نمود که طول دوره جنینی کفشدوزک در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشت ( $F=0.62$ ;  $df=145$ ), ( $P<0.0001$ ). تخم کفشدوزک در اثر کاربرد کلرپایریفوس با میانگین ۸/۱۳ روز، طولانی‌ترین زمان تفریح را داشت. به عبارت دیگر، کلرپایریفوس بیشترین اثر منفی را روی دوره تفریح تخم حشره داشت (جدول ۴). بر اساس اظهارات Planes et al. (2013) پایی‌پروکسی فن باعث نابارور شدن تخم‌های کفشدوزک *C. montrouzieri* می‌شود.

حشره‌کش‌های مورد آزمایش روی طول دوره لاروی سن یک کفشدوزک نیز اثر معنی‌دار داشتند ( $F=0.46$ ;  $df=145, 149$ ;  $P<0.0001$ ). لاروهای سن یک تیمار شده با پایی‌پروکسی فن (با میانگین ۵/۸۰ روز) و کلرپایریفوس (با میانگین ۲/۷۳ روز) به ترتیب طولانی‌ترین و کوتاه‌ترین دوره لاروی را سپری کردند (جدول ۴). اثر تیمارهای مختلف حشره‌کش روی طول دوره لاروی سن دو کفشدوزک ( $F=0.414253$ ;  $df=145, 149$ ;  $P<0.0001$ ) نیز مشخص نمود که طولانی‌ترین طول دوره مربوط به لاروهای تیمار شده با پایی‌پروکسی فن (با میانگین ۵/۰۳ روز) و کوتاه‌ترین آن مربوط به لاروهای تیمار شده با کلرپایریفوس (با میانگین ۲/۹۶ روز) بود. هر چند بین این تیمار و تیمار پالیزین (با میانگین ۳/۱۳ روز) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴). طول دوره لاروی سن سه کفشدوزک نیز در تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشتند ( $F=0.450805$ ;  $df=145, 149$ ;  $P<0.0001$ ). میانگین طول دوره رشدی لاروهای سن سه در تیمار با پایی‌پروکسی فن (با میانگین ۶/۰۷ روز) طولانی‌ترین و در تیمار با کلرپایریفوس (با میانگین ۳/۲۳ روز) بدون اختلاف معنی‌دار با استامی پراید (با میانگین ۳/۳۳ روز)، کوتاه‌ترین به دست آمد (جدول ۴). طول دوره لاروی در سن چهارم کفشدوزک تیمار شده با پایی‌پروکسی فن نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت در حالی‌که این افزایش با تیمارهای پالیزین و شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $F=0.46$ ;  $df=145, 149$ ;  $P<0.0001$ ), استامی پراید طول دوره لاروی سن چهارم را کاهش داد، ولی اختلاف معنی‌داری با تیمار کلرپایریفوس نداشت. مجموع دوره لاروی (از سن اول تا چهارم) در تیمار پایی‌پروکسی فن با میانگین ۲۲/۰۳ روز، طولانی‌ترین و در تیمار کلرپایریفوس با میانگین ۱۳/۶۷ روز، کوتاه‌ترین زمان بود ( $F=1.756$ ;  $df=145, 149$ ;  $P<0.0001$ ). تیمارهای پالیزین (با میانگین ۱۴/۹۷ روز) و استامی پراید (با میانگین ۱۴/۵۶ روز)، در یک گروه قرار گرفتند. نتایج مشخص نمود که حشره‌کش کلرپایریفوس بیشترین اثر را در کوتاه‌تر شدن دوره لاروی کفشدوزک داشت. طبق گزارش Planes et al. (2013) کلرپایریفوس روی مراحل رشدی نابالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* تاثیر منفی دارد که نتایج بررسی ما نیز اثرات منفی کلرپایریفوس روی مراحل نابالغ این کفشدوزک را تایید کرد.



طول عمر حشرات کامل ماده کفشدوزک در تمام تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ( $F=13.75494$ ;  $df=145$ )، طولانی‌ترین عمر حشرات ماده در تیمار شاهد (با میانگین ۹۶/۶۰ روز)، و کوتاه‌ترین آن در تیمار کلرپایریفوس (با میانگین ۵۳/۵۰ روز) ثبت شد (جدول ۴). همسو با یافته‌های تحقیق حاضر، Mostafaloo *et al.* (2012) نشان دادند که تماس با باقیمانده حشره‌کش کلرپایریفوس، اثرات منفی روی مراحل نابالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* داشت. (Alvandy *et al.* (2013) نشان دادند که غلظت زیرکشندهی حشره‌کش فسفره دیازینون موجب کاهش طول عمر حشرات کامل کفشدوزک *C. montrouzieri* شد. بررسی سم‌پاشی مستقیم استامی پراید روی حشرات ماده کفشدوزک *C. montrouzieri* نشان داد که این حشره‌کش ۱۰۰ درصد تلفات روی حشرات ماده ایجاد کرد (Hallajisani, 2018). در مطالعه دیگر گزارش شد که ایمیداکلوپراید و آبامکتین باعث کاهش طول عمر و بقای حشرات ماده کفشدوزک *C. montrouzieri* شدند (Khani *et al.*, 2012). بررسی اثرات مستقیم حشره‌کش‌های بوپروفزین، پایی پروکسی فن، استامی پراید، بوپروفزین، کلوتیانیدین و دینوتفورون روی حشرات بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* مشخص نمود که بوپروفزین و پایی پروکسی فن کمترین اثر را (۱۰ تا ۲۰ درصد) بعد از ۴۸ ساعت داشتند. اما استامی پراید، کلوتیانیدین و دینوتفورون بعد از ۴۸ ساعت، ۱۰۰ درصد تلفات ایجاد کردند (Raymond & Dickinson, 2006). بررسی ما نیز نشان داد که پایی پروکسی فن، اثرات منفی کمتری نسبت به استامی پراید، روی حشرات ماده *C. montrouzieri* داشت (جدول ۴).

**جدول ۴-** تاثیر حشره‌کش‌های مختلف روی میانگین ( $\pm$ خطای معیار) دوره رشدی نابالغ و طول عمر حشره ماده

(روز) کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri*

**Table 4.** Effect of different insecticides on mean ( $\pm$ SE) developmental times and female longevity (days) of *Cryptolaemus montrouzieri*

Treatments	Incubation	1 <sup>st</sup> instar	2 <sup>nd</sup> instar	3 <sup>rd</sup> instar	4 <sup>th</sup> instar	Overall instars	Female longevity
Palizin	5.57±0.11c	2.93±0.12 bc	3.13±0.09 c	3.86±0.13b	5.03±0.12ab	14.97±0.29c	75.10±0.61 c
Chlorpyrifos	8.13± 0.14a	2.73±0.12 c	2.96±0.12c	3.23±0.10c	4.73±0.12bc	13.67±0.19d	53.50±0.46 e
Pyriproxyfen	5.87±0.15 bc	5.80±0.14 a	5.03±0.13 a	6.07±0.14 a	5.13±0.14a	22.03±0.28a	82.73±0.68 b
Acetamiprid	6.23±0.16 b	3.13±0.14 b	3.67±0.12 b	3.33±0.09 c	4.50±0.10c	14.56±0.21c	69.40±0.40 d
Control	4.80±0.14 d	3.13±0.11b	3.56±0.17b	4.00±0.14 b	5.06±0.12ab	15.66±0.24b	96.60±0.97 a

Means with the same letters in each column are not significantly different (Tukey test,  $P<0.01$ ).

نتایج استفاده از صابون‌های حشره‌کش گیاهی (M-Pede)، روغن‌های گیاهی و ترکیب Azatin (حاوی آزادیراکتین) در مقایسه با حشره‌کش کارباریل روی چهار گونه کفشدوزک شکارگر مشخص کرد که ترکیبات گیاهی و روغن‌های گیاهی تلفات کمتری در مقایسه با کارباریل روی کفشدوزک‌ها داشتند (Smith & Krischik, 2000). مطالعه اثرات زیرکشنده ایمیداکلوپراید (کنفیدور) روی کفشدوزک *Serangium japonicum* Chapin مشخص نمود که میزان رشد، ظرفیت تولید مثل کفشدوزک و میزان تغذیه از سفیدبالک *Bemisia tabaci* Genadidius نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (He *et al.*, 2012).

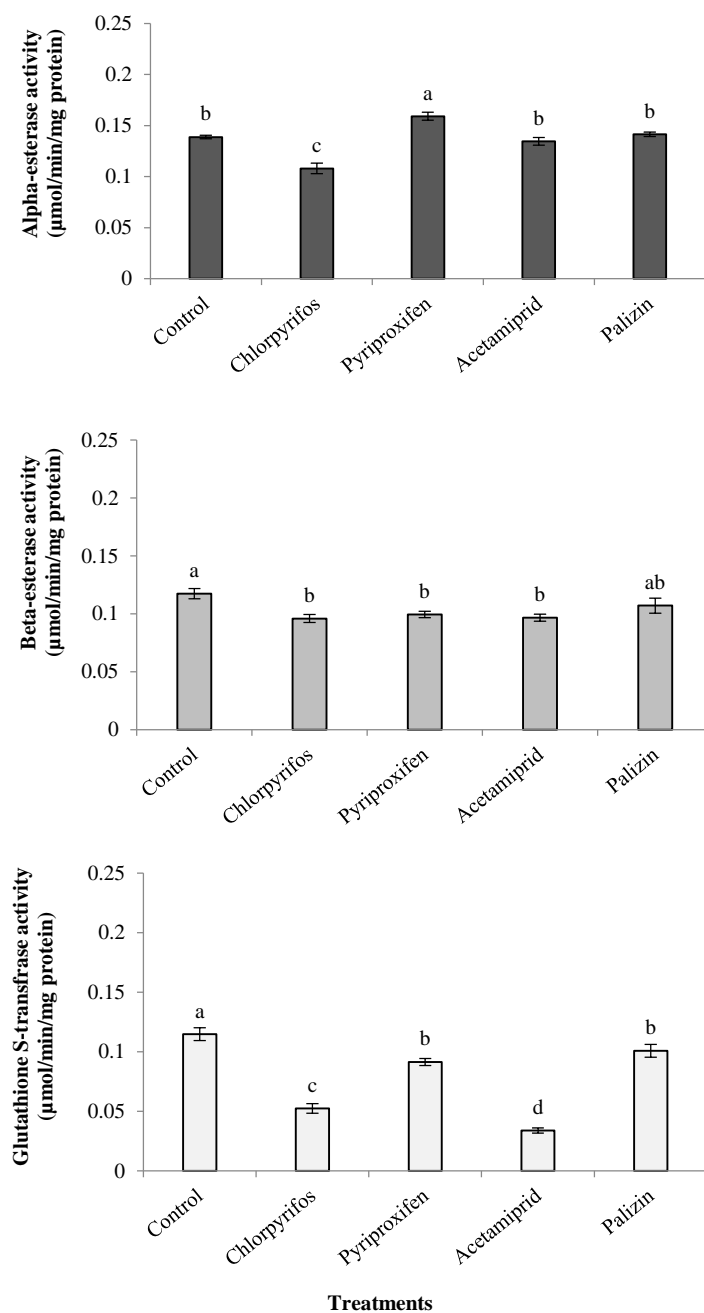
#### سنجش فعالیت استراژهای عمومی

نتایج اثر تیمارهای مختلف روی فعالیت آنزیم آلفا استراز ( $F=26.42$ ;  $df=30, 34$ ;  $P<0.0001$ ) و بتا استراز ( $F=4.55$ ;  $df=30, 34$ ;  $P<0.0054$ ) لاروهای سن سوم کفشدوزک *C. montrouzieri* مشخص نمود که در اغلب موارد بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۱). بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم آلفا استراز به ترتیب در تیمار پایی پروکسی فن و کلرپایریفوس بود. بین تیمارهای پالیزین، استامی پراید و شاهد اختلاف

معنی داری مشاهده نشد، بیشتر بودن فعالیت آلفا استراز در تیمار پایی پروکسی فن نسبت به شاهد نشان می دهد که لارو کفشدوزک در پاسخ به تیمار با این حشره کش و به منظور خنثی کردن اثرات سمی آن بر فیزیولوژی بدن خود، سطح فعالیت آنزیم آلفا استراز خود را افزایش داده است. با این حال، عدم اختلاف معنی دار بین شاهد و تیمارهای پالیزین و استامی پراید نشان می دهد که حشره به منظور مقابله با اثرات این دو حشره کش، از آنزیم آلفا استراز استفاده نمی کند. کاربرد حشره کش های پایی پروکسی فن، کلرپایرفوس و استامی پراید باعث کاهش فعالیت بتا استراز لارو کفشدوزک شد، با این حال، پالیزین اثر معنی داری روی فعالیت بتا استراز نداشت (شکل ۱). این نتایج نشان دهنده کاهش فعالیت ویژه بتا استراز لارو این شکارگر در تیمار حشره کش های شیمیایی مورد استفاده و عدم تاثیر تیمار حشره کش پالیزین بر میزان فعالیت این آنزیم می باشد. استفاده از پایی پروکسی فن در برخی حشرات مانند *Chilo suppressalis* (Walker) باعث افزایش فعالیت آنزیم های آلفا و بتا استراز شد (Mirhaghparast et al., 2014) که نتایج بررسی ما نیز افزایش آنزیم های آلفا استراز حشره مورد آزمایش را نشان می دهد. بررسی حشره کش های کلرپایرفوس، دیازینون و فینتروتیون روی آنزیم های سم زدای سن شکارگر *Andrallus spinidens* Fabricius مشخص نمود که هر سه ترکیب باعث کاهش فعالیت آنزیم های استراز، گلوکاتایون اس ترانسفراز و استیل کولین استراز سن شکارگر شدند (Gholamzadeh-Chitgar et al., 2015)، که نتایج بررسی ما نیز اثرات منفی کلرپایرفوس روی فعالیت آنزیم آلفا استراز کفشدوزک *C. montrouzieri* را تایید می کند. با این حال، در تحقیق حاضر حشره کش گیاهی پالیزین تاثیر معنی داری روی فعالیت آلفا و بتا استراز نداشت. به عبارت دیگر، احتمال بروز مقاومت متابولیکی در لاروهای تیمار شده با پالیزین نسبت به لاروهای تیمار شده با حشره کش های شیمیایی به ویژه کلرپایرفوس، بیشتر است.

### سنجش فعالیت گلوکاتایون اس-ترانسفراز

نتایج اثر تیمارهای مختلف روی فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز لارو سن سوم کفشدوزک *C. montrouzieri* مشخص نمود که تمام حشره کش های مورد آزمایش باعث کاهش فعالیت این آنزیم شدند ( $F=65.64$ ;  $df=30, 34$ ;  $P<0.0001$ ). با این حال، در بین تیمارهای مورد آزمایش، تیمار پالیزین و پایی پروکسی فن کمترین اثر کاهشی و تیمار استامی پراید بیشترین اثر کاهشی را روی فعالیت این آنزیم داشتند (شکل ۱). با توجه به اینکه میزان فعالیت آلفا استراز بین تیمار استامی پراید و شاهد اختلاف معنی داری نداشت، بنابراین این احتمال وجود دارد که حشره در پاسخ به تیمار با این حشره کش، فعالیت آنزیم آلفا استراز خود را در سطح بالا حفظ کرده است. به عبارت دیگر می توان چنین ادعان نمود که مهار یا کاهش فعالیت گلوکاتایون اس-ترانسفراز در تیمار استامی پراید با افزایش تولید آنزیم آلفا استراز جبران شده است. بررسی حشره کش های کلرپایرفوس، استامی پراید و دلتامترین روی فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز زنبور عسل، *Apis mellifera* L مشخص نمود که ترکیبات یاد شده روی فعالیت این آنزیم اثر منفی داشتند (Nabti et al., 2014) که نتایج تحقیق حاضر نیز اثر منفی کلرپایرفوس و استامی پراید را روی فعالیت گلوکاتایون اس ترانسفراز کفشدوزک تایید می کند.



شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف حشره‌کش روی میانگین ( $\pm$  خطای معیار) فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون اس ترانسفراز، آلفا و بتا استراز لارو سن سوم کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri*. میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (توکی،  $P < 0.05$ ).

**Fig. 1.** Effect of different insecticide treatments on activity (mean  $\pm$ SE) of glutathione S-transferase, alpha, and beta-esterases enzymes in third instar larvae of *Cryptolaemus montrouzieri*. The means with different letters are significantly different (Tukey,  $P < 0.01$ ).

نتایج به دست آمده از فعالیت آنزیم‌های سم زدای لارو *C. montrouzieri* نشان داد که سطوح فعالیت آنزیم‌های سم زدا در تیمار پالیزین و پایری پروکسی فن بیشتر از سایر حشره‌کش‌های مورد آزمایش بود. بنابراین، احتمال

بروز مقاومت متابولیکی این شکارگر نسبت به این دو حشره کش بیشتر از کلرپایرفوس و استامی پراید می باشد. با عنایت به افزایش فعالیت آلفا استراز و کاهش فعالیت بتا استراز و گلوکاتایون اس-ترانسفراز در تیمار پایی پروکسی فن، احتمال بروز مقاومت متابولیکی بر پایه استفاده از آنزیم آلفا استراز در لارو این شکارگر بیشتر از سایر تیمارها می باشد. نتایج جدول ۴ نشان داد که تیمار پایی پروکسی فن کمترین اثر سوء را بر مراحل لاروی این کفشدوزک دارد، به طوری که در این تیمار طول دوره لاروی حتی طولانی تر از تیمار شاهد بود. با این حال، بیشترین میزان کاهش فعالیت آلفا استراز در تیمار کلرپایرفوس نشان می دهد که این حشره کش اثرات منفی شدیدتری روی لارو سن ۳ کفشدوزک دارد. نتایج مربوط به تاثیر تیمار کلرپایرفوس روی دوره لاروی سن ۳ این کفشدوزک (جدول ۴) نیز موید این مطلب می باشد. بنابراین، علی رغم تاثیر کشندگی بالای کلرپایرفوس روی بالشتک مرکبات، به دلیل اثرات منفی قابل توجهی که روی لارو این شکارگر دارد در مدیریت تلفیقی آفت توصیه نمی گردد.

### نتیجه گیری نهایی

بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، حشره کش پالیزین در مقایسه با حشره کش های شیمیایی مورد آزمایش، علاوه بر کارایی موثر (همراه با روغن) در کنترل بالشتک مرکبات، اثرات منفی کمتری روی مراحل زیستی کفشدوزک، به ویژه دوره جنینی و طول عمر حشرات کامل ماده داشت. علاوه بر این، با توجه به عدم کاهش فعالیت آلفا و بتا استراز لارو کفشدوزک در تیمار پالیزین و همچنین تاثیر منفی کمتر آن روی فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز در مقایسه با حشره کش های شیمیایی مورد آزمایش، می توان از حشره کش گیاهی پالیزین همراه با روغن در برنامه های مدیریت تلفیقی بالشتک مرکبات استفاده نمود. علاوه بر این، از آنجا که صابون حشره کش پالیزین از لحاظ زیست محیطی کم خطر بوده و فاقد خاصیت گیاه سوزی بر روی درختان مرکبات می باشد، بر این اساس می توان غلظت ۲ در هزار پالیزین را به تنهایی یا همراه با روغن امولسیون شونده به عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی موجود جهت کنترل بالشتک مرکبات توصیه نمود.

### سپاسگزاری

از گروه گیاه پزشکی دانشگاه محقق اردبیلی و دانشگاه گیلان و مدیریت محترم پژوهشکده مرکبات و میوه های نیمه گرمسیری رامسر به خاطر همکاری در اجرای این پژوهش قدردانی می گردد.

### References

- Agricultural statistics of horticultural products of Agriculture-Jahad Ministry.** (2016) Deputy of Planning and Economics. Center for Information and Communication Technology. Tehran, Iran. Available from: <http://www.maj.ir>
- Alvandy, S., Aghabaglou, S., Goldasteh, S. & Rafiei Karahroudi, Z.** (2013) Study on side effects of diazinon and imidacloprid on *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) under laboratory conditions in indirect method in first and second generation (prey treated with insecticide). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 1(5), 78-80.

- Booth, L.H. & O'Halloran, K.** (2001) A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorous insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2494- 2502.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72, 248-254.
- Damavandian, M. R. & Tavakoli, S.** (2004) Laboratory bioassay to estimate LC50 & LC90 of mineral oil on second and third instar and females of *Pulvinaria aurantii* Ckll. Proceeding of 16th Iranian plant protection congress. University of Tabriz. 28 Agu-1 Sep 2004. 226. [In Persian].
- Enayati, A. A., Ranson, H., Hemingway, J.** 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14, 3-8.
- Eshaghi Sani, J., Toorani, A. H., Abbasipour, H. & Amiri, B.** (2017) Comparative effect of chemical and botanical pesticides on the first nymph instar of white peach scale, *Pseudaulacaspis pentagona* and its predator, *Chilocorus bipustulatus* ladybird in the field conditions. 2<sup>nd</sup> Iranian International Congress of Entomology. P.48.
- Gholamzadeh-Chitgar, M. Hajizadeh, J. Ghadamyari, M. Karimi-Malati, A. & Hoda, H.** (2015) Effects of sublethal concentration of diazinon, fenitrothion and chlorpyrifos on demographic and some biochemical parameters of predatory bug, *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) in laboratory conditions. *International Journal of Pest Management* 61(3), 204-211.
- Gholamzadeh-Chitgar, M.** (2017) Effect of insecticidal soap, Palizin on the crapemyrtle aphid, *Tinocallis kahawaluokalani* and its coccinellid predator, *Harmonia axyridis* under laboratory conditions. *Journal of Plant Pests Research* 6 (4), 89-95.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B.** (1974) Glutathion s-transferase, the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- Hallajisani, M. F.** (2000) Investigation of bioecology of the orange citrus scale *Pulvinaria aurantii* Ckll. in North of Iran. MSc Thesis. University of Guilan. [In Persian].
- Hallajisani, M. F.** (2018) Management control of orange Pulvinaria scale, *Pulvinaria aurantii* Ckll. in citrus orchards of Mazandaran province. Final Report of the Project. Horticultural Science Research Institute. Citrus and Subtropical Research Center. [In Persian].
- He, Y. Zhao, J. Zheng, Y. Desneux, N. & Wu, K.** (2012) Lethal effect of imidacloprid on the coccinellid predator *Serangium japonicum* and sublethal effects on predator voracity and on functional response to the whitefly *Bemisia tabaci*. *Ecotoxicology* 21, 1291-1300.

- Hollingworth, R. M. & Dong K.** (2008). The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods. In: Whalon ME, Mota- Sanchez D, Hollingworth RM (eds), Global pesticide resistance in arthropods, CABI, Wallingford, UK, 5-31.
- Jones, C. M. Daniels, M., Andrew, M. & Slater, Russell.** (2011) Age-specific expression of a P450 monooxygenase (*CYP6CM1*) correlates with neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101, 53-58
- Khani, A., Ahmadi, F. & Ghadamyari, M.** (2012) Side effects of imidacloprid and abamectin on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. *Trakia Journal of Sciences* 10(3), 30-35.
- Kumral, N. A., Gencer, N. S., Susurluk, H. & Yalcin, C.** (2011) A comparative evaluation of the susceptibility to insecticides and detoxifying enzyme activities in *Stethorus gilvifrons* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Panonychus ulmi* (Acarina: Tetranychidae). *International Journal of Acarology* 37(3), 255-268.
- Michaud, J.P. & Angela, K.G.** (2003) Sub-lethal effects of a copper sulfate fungicide on development and reproduction in three coccinellid species. *Journal of Insect Science*, 3(1).
- Mirhaghpour, S. K. Zibae, A. & Hoda H.** (2014). Effects of pyriproxyfen on intermediary metabolism of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae). Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 86(1), pp.187-197.
- Modarres Aval, M.** (2002) Iran's Agricultural Pest List and their Natural Enemies (3th ed.). Ferdowsi University Press, Mashhad. [In Persian].
- Mostafaloo, V., Afshari, A., Yazdani, M. & Sarailoo, M. H.** (2012) Effects of chlorpyrifos and abamectin on development of the immature stages of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae). *Plant Pest Research* 2 (1), 39-47.
- Nabti, D., Achou, M. & Soltani, N.** (2014) The toxic effect of the pesticides on *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): glutathione S-transferase activity. *Advances in Applied Science Research* 5(4), 51-55.
- Planes, L., Catala´ n, J., Tena, A., Porcuna, J. L., Jacas, J. A., Izquierdo, J. & Urbaneja, A.** (2013) Lethal and sublethal effects of spirotetramat on the mealybug destroyer, *Cryptolaemus montrouzieri*. *Journal of Pest Science* 86, 321–327.
- Rajabpour, A.** (2005) Investigation on population dynamics and spatial distribution, determination of Economic Injury Level of *Pulvinaria aurantii* (Cockerell) on Thompson Novel orange in Sari and evaluation of two mineral oils efficiency for its control. Master's Thesis. University of Ahwaz. [In Persian].

- 
- Raymond, A. C. & Dickinson A.** (2006) Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *Journal of Economic Entomology* 99(5), 1596-1604.
- Saedi, S., Damavandian, M. R. & Dadpour Moghanloo, H.** (2018) Laboratory evaluation of the toxicity of mineral oil, Diazinon, Malathion and Chlorpyrifos on ladybird, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Col.: Coccinellidae). *Journal of Crop Protection* 7(1), 1-11.
- Shaaban, A., Badary, H. & Noha, A.** (2012) Control measures of two soft scale insects (Hemiptera: Coccidae) infesting guava and mango trees in Egypt. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 65, 55-61.
- Shahnazari Aval, S.** (2013) Evaluation of insecticidal and synergistic effects of alkyl succinate (DG<sup>®</sup>) oil on control of citrus pillows, *Pulvinaria aurantii* Cockerell (Homoptera: Coccidae). MSc Thesis. University of Shahed. [In Persian].
- Smith, S. F. & V. A. Krischik.** (2000) Effects of biorational pesticides on four coccinellid species (Coleoptera: Coccinellidae) having potential as biological control agents in Interiorscapes. *Journal of Economic Entomology* 93(3), 732-736.
- van Asperen, K.** (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology* 8, 401-416.
-