

مهار پاسخ شاخکی حشرات نر شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) به فرومون جنسی تحت تاثیر سه حشره‌کش در مطالعات الکتروفیزیولوژیک

زیبا ممدوح^{۱*}، مرتضی موحدی فاضل^۲، علی اصغر سراج^۱ و جیانفرانکو آنفورا^۳

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، ۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران و ۳- گروه اکولوژی شیمیایی، مرکز تحقیقات و فناوری فوندازیون ادموند ماخ، سان میکل آل آدیجه، ترتینو، ایتالیا

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: z.mamdooh@gmail.com

چکیده

مینوز گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta* Meyrick از آفات درجه اول گوجه‌فرنگی محسوب می‌شود و خسارت اقتصادی قابل توجهی را در گلخانه و مزرعه وارد می‌کند. به دلیل رفتار تغذیه‌ای درون بافتی و تولیدمثل بالا، ایجاد جمعیت مقاوم در این آفت محتمل می‌باشد. با تکیه بر امکان تاثیر سموم شیمیایی بر اختلال در جفت‌گیری حشرات کامل، می‌توان رویکرد دیگری را در کاربرد حشره‌کش‌ها علیه این آفت بکار برد. در این آزمایش، تاثیر سه حشره‌کش ایمیداکلوپرید، ایندوکساکارب و نیم‌آزال با مکانیسم اثر متفاوت در چهار غلظت (۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰) بر میزان پاسخ الکتروفیزیولوژیکی گیرنده‌های شاخکی حشرات نر ۲-۳ روزه به فرومون جنسی مورد بررسی قرار گرفت. میزان پاسخ شاخکی در ۶ زمان متوالی پس از سمپاشی، نسبت به میزان تحریک به فرومون جنسی قبل از پاشش به صورت درصد مهارکنندگی محاسبه و با روش مشاهدات مکرر آنالیز شد. نتایج بدست آمده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مورد آزمایش در مقایسه با شاهد و زمان‌های پس از پاشش حشره‌کش و نیز اثر متقابل بین این دو فاکتور را نشان داد. در صورتی که بین سموم مورد آزمایش تفاوتی مشاهده نشد. حشره‌کش‌های مورد بررسی بین ۲۰-۱۸ درصد موجب مهار پاسخ گیرنده‌های شاخکی شده‌اند که در یک ارتباط غلظت-پاسخ، بالاترین میزان درصد مهارکنندگی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. نتایج گویای اثر این حشره‌کش‌ها بر گیرنده‌های شاخکی می‌باشد و پاسخ آن‌ها به فرومون جنسی را مختل می‌نماید.

واژگان کلیدی: اندام‌های حسی بویایی، الکتروآنتنوگرام، مهار پاسخ الکتروفیزیولوژیک، اختلال در جفت‌گیری.

Inhibition of antennal response of the tomato leaf miner males, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) to its sex pheromone under the influence of three insecticides in an electrophysiological study

Ziba Mamduh^{1,*}, Morteza F. Movahedi², Aliasghar Seraj³ & Gianfranco Anfora⁴

1. Department of Plant Protection, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran, 2. Department of Plant Protection, University of Zanjan, Zanjan, Iran & 3. Department of Chemical Ecology, Fondazione Edmund Mach, Research and Innovation Centre, San Michele all'Adige, TN, Italy

* Corresponding Author, Email: z.mamdooh@gmail.com

Abstract

The tomato leaf miner moth *Tuta absoluta* Meyrick is an invasive pest of tomato which damages this crop economically in greenhouse and field conditions. Due to the endophytic feeding habits of larvae

and the high fecundity, the resistant populations has developed. Based on the effect of chemical pesticides on the mating disruption efficacy, it is therefore possible to exploit novel approaches on the use of insecticides against this pest. In this study, the efficacy of 3 insecticides, imidaclopride, indoxacarb and NeemAzal, with different mode of action, in 4 concentrations (0, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) were assayed on Electroantennogram response of antennal receptors of 2-3 days old males to sex pheromone. The antennal responses rate to sex pheromone were measured during 6 time intervals, after insecticide spray and were calculated as inhibitory percentage in comparison to the response rate before spray and the data was analysis by repeated measure method. The results showed a significant difference between different concentrations of each insecticides compared to the control, the time of EAG assay and also the interaction effects of these factors, while, there was no significantly difference between tested pesticides. All insecticides were inhibited the antennal response in range of 18-20%. There was a dose- dependent relationship between concentration levels of each insecticides and the highest inhibition percentage was calculated in 100 $\mu\text{g/ml}$. The results confirmed the inhibitory effect of the tested insecticides on the antennal receptors leading to disruption of their response to sex pheromone.

Keywords: Olfactory organs, Electroantennogram, Inhibition of electrophysiological response, Mating disruption.

Received: 3 November 2017, Accepted: 27 June 2018

مقدمه

مینوز گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta* Meyrick بومی آمریکای جنوبی است و با گسترش به آمریکای مرکزی، اروپا، آفریقا و آسیا از جمله ایران، هم اکنون به عنوان یکی از مهم‌ترین و خطرناکترین آفات گوجه‌فرنگی و نیز دیگر گیاهان خانواده بادنجانیان (Solanaceae) در جهان به شمار می‌آید (EPPO, 2005). ظرفیت تولیدمثلی بالا، دوره زندگی کوتاه و تعداد زیاد نسل‌ها در هر سال و فعالیت درون بافتی، توان آسیب‌زایی این آفت روی گوجه‌فرنگی را تا حدود ۵۰ تا ۱۰۰ درصد افزایش داده است (EPPO, 2005). برای کنترل این آفت با وجود انجام کنترل زراعی و بیولوژیک، تکیه‌ی اصلی بر انجام کنترل شیمیایی است. متأسفانه سمپاشی‌های پی‌درپی به علت فعالیت درون بافتی لاروها ناموفق بوده است و ضمن اثرگذاری جانبی بر حشرات سودمند و آلودگی‌های محیطی، مقاومت گسترده این آفت را نسبت به بسیاری از آفت‌کش‌ها در پی داشته است (Siqueira *et al.*, 2000; Lietti *et al.*, 2005). این در حالی است که اثرات غیر مستقیم آفت‌کش‌های شیمیایی بر فیزیولوژی و رفتار حشرات بالغ نباید نادیده گرفته شود.

حس بویایی به عنوان یک حس حیاتی و مشترک در همه حشرات است که در میزبان‌یابی و تعیین محل تغذیه، جفت‌گیری، تولیدمثل و نیز سازماندهی کلنی در حشرات اجتماعی و تمامی ارتباطات اکولوژیکی و رفتاری آن‌ها نقش دارد (Cardé & Millar, 2004). در چند دهه اخیر، بهره‌گیری از تعامل‌های شیمیایی موجود در اکوسیستم جایگاه ویژه‌ای را در مدیریت تلفیقی آفات به خود اختصاص داده است و راهبردهای کاربردی همچون پیش‌آگاهی از جمعیت آفت، اختلال در جفت‌گیری، جلب و کشتن، کشش و رانش و نیز شکار انبوه شاهدهی بر این مدعا هستند (Reddy & Guerrero, 2010). مینوز گوجه‌فرنگی نیز از این قاعده مستثنی نمی‌باشد. در بحث رفتار تولیدمثلی این حشره همانند بسیاری از پروانه‌ها، حشرات نر به کمک فرومون جنسی، حشرات ماده را از فواصل دور ردیابی می‌کنند و این پروسه از اولین لحظه تماس با ملکول‌های فرومون تا رسیدن به جفت و تماس فیزیکی ادامه دارد (Puigmarti *et al.*, 2015).

در حشرات، پردازش و تشخیص بوهای دریافتی در سیستم عصبی مرکزی انجام می‌شود؛ ولی سلول‌های گیرنده بویایی محیطی نقش مهمی را در دریافت، شناسایی و تفکیک ابتدایی ملکول‌های بو دارند (Hansson, 1995). درک حسی توسط اندام حسی موجود در سطح شاخک انجام می‌شود که سبب دریافت و درک اختصاصی مولکول‌های فرار فرمونی و غیر فرمونی می‌شود (Hansson, 1995; Bawin *et al.*, 2017). با دریافت

و انتقال ملکول بو به سطح گیرنده حسی و تحریک آن، پیام الکتریکی به سیستم عصبی مرکزی مخابره می‌شود (Hansson, 1995; Xu *et al.*, 2005; Santos da Silva *et al.*, 2015) و در نهایت آنزیم‌های شاخکی، ملکول‌های بو را تجزیه می‌کنند (Durand *et al.*, 2011; Cherteremps *et al.*, 2012). هرگونه اختلال در روند دریافت در سطح گیرنده، انتقال در همولنف و تجزیه‌ی مولکول‌های بو و نیز پردازش در بخش شاخکی (Antennal lobe)، می‌تواند شناسایی ترکیب فرومونی را دستخوش تغییر نماید و به تبع آن پاسخ رفتاری به فرومون جنسی را مختل سازد (Pophof *et al.*, 2000; Giner *et al.*, 2009; Tricoire-Leignel *et al.*, 2012; Dominguez *et al.*, 2016).

سموم شیمیایی می‌توانند به عنوان گزینه‌ای در خصوص اختلال در سیستم ارتباطی حشرات مطرح باشند که با تاثیر بر انتقال تکانه عصبی، سیستم حسی و قابلیت شناختی را در حشرات مختل سازند (Haynes, 1988; Desneux *et al.*, 2007; Tricoire-Leignel *et al.*, 2012). رفتار تولیدمثلی در حشرات شامل وقایع پیچیده فیزیولوژیکی و رفتاری تحت کنترل سیستم‌های عصبی و هورمونی می‌باشد؛ بر این اساس، گروهی از سموم نروتوکسیک و تنظیم کننده‌های رشدی می‌توانند این هماهنگی موجود در ارگان‌های مربوطه را دستخوش تغییر کنند و کاهش موفقیت در تولیدمثل را سبب شوند (Haynes, 1988; Barrett, 2008; Tricoire-Leignel *et al.*, 2012).

بر اساس مطالعات انجام شده، غلظت‌های غیر کشنده باعث کاهش تولید و رهایش فرومون جنسی و نیز تغییر در نسبت ترکیبات فرومون جنسی و نیز ایزومری ترکیبات متشکل شده است (Yang & Du, 2003; Zhou *et al.*, 2011). همچنین، گروهی از حشره‌کش‌ها می‌توانند بر فرآیندهای نروفیزولوژیکی حشرات نر در عملکرد نرون‌های حسی و نرون‌های بینابینی و نیز انتقال اطلاعات بویایی به سیستم عصبی مرکزی و مغز، نرون‌های حرکتی، انقباضات ماهیچه‌ای و پاسخ رفتاری حشرات اثرگذار باشند (Haynes, 1988; Moore *et al.*, 1988; Tricoire-Leignel *et al.*, 2012). از سموم موثر در این خصوص می‌توان به تاثیر آفت-کش‌های دلتامترین و کلریپیرفوس بر ارتباطات فرومونی در زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* (Hym.: Trichogrammatidae) Bezdenko (Delpuech *et al.*, 2001)، سایپرترین بر شب‌پره *Trichoplusia ni* (Lep.: Noctuidae) Hübner (Clark & Haynes, 1992) اشاره کرد. پرمترین با اثر بر هر دو جنس *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lep.: Gelechiidae)، بر تولید و دریافت سیگنال شیمیایی اثر گذاشته و موفقیت تولیدمثلی حشره را تهدید می‌کند (Haynes, 1988). محققان نشان دادند که تیمار موضعی حشرات نر *Ostrinia furnacalis* (Lep.: Crambidae) Guenee با حشره‌کش مالاتیون علاوه بر کاهش میزان پرواز خلاف جهت باد در تونل باد، در حدود ۶۰-۹۰ درصد توانایی ردیابی منبع فرومون جنسی را نیز کاهش می‌دهد که بعد از ۵ روز قابل برگشت است (Zhou *et al.*, 2005). غلظت معینی از کلردیمفرم سبب ایجاد رفتار بیش فعالی در بال زدن و پرواز در زمان غیر فعال بودن حشرات کامل *Manduca sexta* Linnaeus (Lep.: Sphingidae) می‌شود (Haynes, 1988). همچنین، افزایش حساسیت به فرومون در غلظت‌های زیرکشنده کلردیمفرم روی حشرات نر کرم وجبی کلم، *T. ni*، مشاهده شده است (Haynes, 1988). تیمار لاروهای این حشره با دلتامترین نیز نتایج مشابهی را در پی داشته است (Wei & Du, 2004). گروهی از محققان ادعان داشتند که حشره‌کش دلتامترین روی پاسخ نرون‌های گیرنده بویایی به فرومون جنسی اثر منفی دارد (Lucas & Renou, 1992). تغذیه لاروهای شب‌پره‌ی پشت الماسی، *Plutella xulostella* L. با غذای آغشته به غلظت‌های زیر کشنده ایندوکساکارب، میزان موفقیت در رفتار معاشقه‌گری و جفت‌گیری در حشرات نر را کاهش می‌دهد (Wang *et al.*, 2011). در سم‌پاشی‌های مزرعه با بکارگیری دو حشره‌کش متوکسی‌فونوزید و تبوفنوزید، پاسخ رفتاری

چندین گونه از شب‌پره‌ها را کاهش داده است (Reinke & Barrett, 2007; Barrett, 2008). آفت‌کش متوکسی- فنوزید علاوه بر اختلال در پاسخ جلب حشرات نر کرم سیب (*Cydia pomonella* L. (Lep.: Tortricidae) به ماده‌های جفت‌گیری نکرده و نیز فرومون سنتتیک (Barrett, 2008)، بر پاسخ به ترکیب استر گلابی نیز تاثیر گذار بوده است (Barret, 2010). از طرفی، برخی از دوزهای غیرکشنده کلردتیانیدین نیز می‌توانند پرواز جهت- دار به فرومون جنسی را در نرهای *Agrotis ipsilon* Hufnager (Lep.: Noctuidae) مختل سازند (Rabhi et al., 2014). همچنین، گروهی از ترکیبات شیمیایی بنزنی و مشتقات آن قابلیت مهار حس بویایی و چشایی را در شب‌پره‌ی کرم ابریشم نشان داده است و به تبع آن کاهش پاسخ رفتاری به فرومون جنسی را به دنبال داشته است (Paduraru et al., 2008).

در این تحقیق امکان مهار پاسخ گیرنده‌های بویایی شاخک حشرات نر جفت‌گیری نکرده شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی، *T. absoluta* به ترکیب اصلی فرومون جنسی تحت تاثیر گروهی از حشره‌کش انتخابی با بهره- گیری از روش الکتروفیزیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. در حقیقت، روش الکتروفیزیولوژیکی با تکیه بر دستگاه الکتروآنتنوگرام (EAG: Electroantennogram) می‌باشد که یک روش به منظور ثبت پاسخ گیرنده‌های موجود روی شاخک می‌باشد. امروزه، بهره‌گیری از این روش در مطالعات اکولوژی شیمیایی، جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است و برای شناسایی ترکیبات فرومون جنسی، ترکیبات فرار گیاهی میزبان و غیر میزبان بکار می‌رود (Floyd et al., 1976; Fraser et al., 2003; Ansebo et al., 2004; Batista-Pereira et al., 2006; Beck et al., 2014; Germinara et al., 2016). بنابراین کنترل رفتاری با مهار پاسخ فرومون جنسی می‌تواند در بحث اختلال در جفت‌گیری این آفت حائز اهمیت باشد (Megido et al., 2013). در این بررسی امکان مهار پاسخ شاخکی به فرومون جنسی تحت تاثیر غلظت‌هایی از سه حشره‌کش نیم‌آزال، ایمیداکلوپراید و ایندوکساکارب با مکانیسم اثر متفاوت بر روی گیرنده‌های بویایی حشرات نر مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه میزبان

بذرهای گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L. (Solanacea) در گلدان‌های پلاستیکی مستطیلی شکل (۱۳×۱۶×۵۲ cm³) حاوی کوکویت با نور و آبیاری کافی در یک اتاقک رشد با دمای یکنواخت ۲۲±۲ درجه سلسیوس پرورش داده شدند. پس از رشد، نشاءها در مرحله‌ی دو برگگی با تراکم بالا در گلدان‌های جدید کشت شدند و در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۴±۱۰ درجه سلسیوس و نور کافی پرورش داده شدند.

پرورش حشره

شفیره‌های شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی از کشتزارهای حومه شهر زنجان واقع در موقعیت جغرافیایی ۳۷°۸' شمالی و ۴۷°۷' شرقی جمع‌آوری و به مؤسسه تحقیقات و فناوری فوندازیون ادموند ماخ (Research & Innovation Centre of Fondazione Edmund Mach) در کشور ایتالیا منتقل شدند.

حشرات کامل پس از خروج درون قفسه‌های توری (۱۳۰×۵۰×۵۰ cm³) حاوی گلدان‌های گیاه گوجه- فرنگی مستقر شدند. برای هر گلدان به طور میانگین ۱۰ جفت حشره نر و ماده منظور شد. پس از تخم‌ریزی و تفریح تخم‌ها، مراحل لاروی درون دالان‌های برگگی انجام و برای شفیرگی از کاغذهای تاخوردۀ مواج استفاده شد. شفیره‌ها پس از تعیین جنسیت به روش (Sannino & Espinosa, 2010)، جداسازی و به درون جعبه‌هایی با دیواره‌های توری (۲۰×۲۰×۲۰ cm³) حاوی پنبه مرطوب و ظرف‌های حاوی آب و عسل ۱۰ درصد منتقل شدند.

حشرات نر پس از خروج به صورت جداگانه درون لوله‌های فالكون ۱۵ میلی‌لیتر قرار گرفتند. برای تغذیه‌ی حشرات کامل، درب همه فالكون‌ها سوراخ شده و یک لوله اپندورف ۲ میلی‌لیتر حاوی آب عسل ۱۰ درصد در آن تعبیه شد. پرورش همه مراحل رشدی حشره در شرایط دمایی 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد و دوره نوری ۱۰D:۱۴L ساعت انجام شد.

حشره‌کش‌های مورد آزمایش

در این آزمایش سه حشره‌کش ایمیداکلوپرید (کونفیدور) (SC ۳۵٪) از گروه نئونیکوتینوئیدها (شرکت گل سم گرگان)، آزادیراختین (نیم‌آزال) (ماده موثر ۱٪/۱۰g/l) از گروه تنظیم‌کننده‌های رشد (IGRs) (-Trifolio M GmbH, Lahnau, Germany) و ایندوکساکارب (آوانت) (TC ۹۵٪) از گروه آفت‌کش‌های اکسادیازین (Jiangsu inter China group corporation) برای آزمایش‌های الکتروفیزیولوژیکی با دستگاه الکتروآنتنوگرام EAG (Syntech, Hilversum, Netherlands) انتخاب شدند. به منظور تعیین قدرت مهارکنندگی بر پاسخ گیرنده‌های شاخکی حشرات نر به فرومون جنسی، سه حشره‌کش منتخب در سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حلال آب مقطر تهیه شدند و آب مقطر به عنوان شاهد (غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر) در نظر گرفته شد.

آزمایش الکتروآنتنوگرافی (EAG)

در این آزمایش از حشرات نر ۲-۳ روزه‌ی جفت‌گیری نکرده استفاده شد. پاسخ الکتروفیزیولوژیک طبق روش Beck *et al.* (2014) توسط دستگاه استاندارد الکتروآنتنوگرام انجام شد. الکترودهای شیشه‌ای مینا و ثبات به گونه‌ای که حباب هوا درون آن ایجاد نشود، از محلول فیزیولوژیکی Kaissling (1987) پر شدند. پیش از آغاز آزمایش، حشرات به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای منفی ۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند و پس از بی-حرکت شدن حشره، سر آن‌ها توسط تیغ جراحی جدا شد. برای اعمال یکنواختی در همه آزمایش‌ها، از شاخک سمت راست حشره استفاده شد؛ بر این اساس همزمان با سر، شاخک چپ حشره نیز حذف شده و همچنین، بند آخر انتهایی شاخک راست مورد آزمایش نیز حذف شد تا ارتباط مستقیم همولنف با محلول فیزیولوژیکی برقرار شود. الکترودهای شیشه‌ای مینا از محل گردن درون سر قرار گرفت. پس از ثابت کردن الکترودها، به کمک یک تار ظریف از قلم مو، انتهای تازک شاخک به درون الکترودهای هدایت و تثبیت شد. جریان مرطوب و تصفیه شده هوا، به میزان 0.25 min/l و به مدت دو ثانیه از درون پیپت پاستور روی شاخک دمیده شد. پاسخ الکتروفیزیولوژیک به صورت دیپلاریزاسیون ایجاد شده ناشی از اتصال ترکیب با گیرنده‌های بویایی شاخک به میلی‌ولت ثبت شد.

الف- تعیین دوام پاسخ شاخک به تحریک فرومونی

با توجه به اهمیت تعیین مدت زمان زنده‌مانی شاخک و تعیین مدت تحریک پذیری آن نسبت به فرومون جنسی، به منظور استفاده از نتایج بدست آمده در طراحی مراحل بعدی تحقیق، این آزمایش انجام شد. ترکیب اصلی فرومون جنسی بید گوجه‌فرنگی، 3E,8Z,11Z)-3,8,11-tetradecatrien-1-yl acetate (تهیه شده از شرکت Russell) به صورت خالص به میزان یک میکرولیتر روی کاغذ صافی واتمن شماره یک ($1 \times 1/5 \text{ cm}^2$) ریخته شد و درون پیپت پاستور قرار گرفت. دو انتهای پیپت پاستور با پارافیلیم مسدود و تا هنگام آغاز آزمایش (بیشینه تا ۱۲ ساعت) در دمای منفی ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

به منظور تعیین میزان کاهش پاسخ گیرنده‌های شاخکی به فرومون جنسی در طول زمان، پس از آماده کردن شاخک مطابق با روش Beck *et al.* (2014)، فرومون جنسی در اولین زمان پس از اتصال (زمان صفر)،

روی شاخک دمیده شد. سپس در زمان‌های مختلف ۲، ۴، ۶، ۱۱، ۲۱ و ۳۱ دقیقه پس از تحریک ابتدایی، فرومون جنسی مجدداً به شاخک دمیده شده و پاسخ الکتروفیزیولوژیکی شاخک در طول زمان ثبت شد. این آزمایش بر روی حشرات نر جفت‌گیری نکرده ۳-۲ روزه با ۵ تکرار انجام شد.

ب- تعیین قدرت مهارکنندگی پاسخ شاخکی حشره‌کش‌ها

به دلیل وزن ملکولی بالا و فرار بودن کمتر سموم شیمیایی مورد آزمایش، به منظور بررسی حساسیت گیرنده‌های شاخکی به سموم از روش ابداعی پاشش در حین آزمایش با دستگاه الکتروآنتنوگرام بهره گرفته شد. پس از ایجاد یک مدار الکتریکی بسته، به جای عبور جریان هوا، امولسیون تهیه شده از حشره‌کش‌های انتخابی توسط افشانه‌هایی به حجم ۵۰ سی‌سی به صورت مه‌پاش از فاصله ۲۰ سانتی‌متری روی شاخک اسپری شدند. پس از اتصال شاخک، در مرحله اول فرومون جنسی به شاخک دمیده شد (زمان صفر) و میزان پاسخ الکتروفیزیولوژیکی برآورد گردید. پس از یک دقیقه، پاشش حشره‌کش روی شاخک انجام شد و به طور مجدد، پاسخ شاخک در طول زمان پس از پاشش سم نسبت به فرومون جنسی در زمان‌های مختلف ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۸ تکرار برای هر غلظت در هر حشره‌کش مورد آزمایش در نظر گرفته شد. به منظور مقایسه با شاهد (غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر)، شاخک منطبق با همین روش تحت اسپری آب مقطر قرار گرفت.

تجزیه آماری

میزان درصد کاهش حساسیت شاخک طبق فرمول زیر برای هر شش زمان مورد آزمون نسبت به زمان صفر محاسبه شد:

$$\text{درصد کاهش حساسیت شاخک} = \frac{(\text{پاسخ به فرومون در زمان‌های بعدی} - \text{پاسخ به فرومون در زمان صفر})}{\text{پاسخ به فرومون در زمان صفر}} \times 100$$

داده‌های مربوط به میزان کاهش حساسیت گیرنده‌های شاخکی به فرومون جنسی در طول زمان بر طبق آزمون آزمون کلموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov test) نرمال بودند و در قالب طرح کاملاً تصادفی با روش ANOVA و مقایسه‌ی میانگین توکی-کرامر (Tukey-Kramer tests) آنالیز شدند. در آزمایش تاثیر مهارکنندگی حشره‌کش‌ها بر پاسخ گیرنده‌های بویایی به فرومون جنسی، میزان اثر سم به صورت درصد مهارکنندگی در زمان‌های مختلف (شش زمان) طبق فرومون ذیل برآورد شد:

$$\text{درصد مهارکنندگی} = \frac{(\text{پاسخ به فرومون در زمان‌های بعد پاشش سم} - \text{پاسخ به فرومون در زمان قبل پاشش سم})}{\text{پاسخ به فرومون در زمان قبل پاشش سم}} \times 100$$

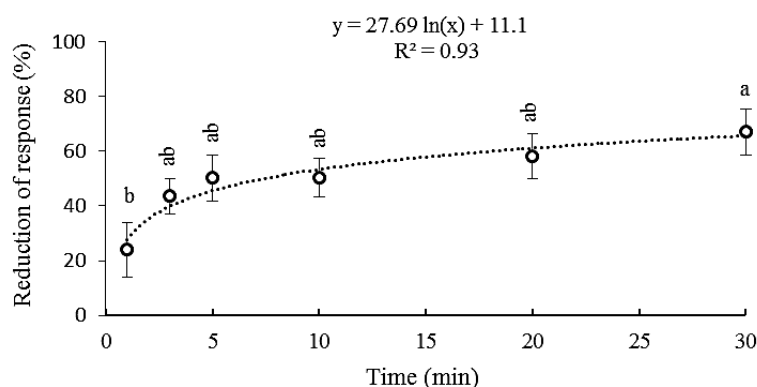
از آنجا که حساسیت شاخک در طول زمان به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد؛ بر این اساس، اثر کاهش حساسیت بر اثر زمان از تاثیر حشره‌کش در درصد مهارکنندگی هر یک از زمان‌های پس از پاشش سم، کسر و سپس آنالیز داده‌ها انجام شد. در این آزمایش، دو متغیر مستقل نوع حشره‌کش (سه حشره‌کش) و میزان غلظت (چهار غلظت) بر پاسخ در طول زمان (شش زمان) بصورت آزمون فاکتوریل با اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated measures analysis) در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند. با توجه به عدم برقراری فرض کرویت (Mauchly's $W = 0.348$ ، $p < 0.01$)، تجزیه واریانس مشاهدات مکرر با اعمال ضریب هیون-فلت

(Command Syntax Reference, SPSS Inc. v.22 تمامی آزمون‌ها با نرم افزار (Huynh-Feldt) انجام شد. Command Syntax Reference, SPSS Inc. v.22 انجام شد. Chicago, Illinois, USA).

نتایج

تعیین دوام پاسخ شاخک به تحریک فرمونی

نتایج حاصل بیانگر کاهش تحریک‌پذیری گیرنده‌های شاخکی نسبت به زمان صفر است و همبستگی مستقیمی را بین زمان و درصد کاهش تحریک‌پذیری گیرنده‌ها نشان می‌دهد ($P < 0.01$ و $r = 0.96$). به طوری که با گذشت زمان از اولین تحریک در زمان صفر (اولین تحریک پس از اتصال شاخک)، میزان کاهش تحریک‌پذیری در شاخک رو به افزایش است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در شش زمان، وجود اختلاف آماری معنی‌داری را در بین زمان‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد ($F_{(5,29)} = 3.212$ و $P = 0.023$). کم‌ترین درصد کاهش حساسیت شاخک به فرمون در دقیقه اول و بیش‌ترین میزان در زمان ۳۰ دقیقه پس از تحریک اولیه (زمان صفر) مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- درصد کاهش پاسخ الکتروفیزیولوژیک در طول زمان نسبت به زمان صفر تحریک، در شاخک حشرات نر *Tuta absoluta* به ترکیب اصلی فرمون جنسی. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت میانگین‌ها در آزمون توکی-کرامر در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Fig. 1. The reduction of electrophysiological response (%) in during the time to the initial excitation time in the antennae of *Tuta absoluta* males to the main compound of sex pheromone. Different letters indicate the mean comparison in the Tukey-Cramer test at a probability level of 5%.

تعیین قدرت مهارکنندگی پاسخ شاخکی حشره‌کش‌ها

تجزیه واریانس فاکتورهای مورد بررسی که عبارتند از نوع حشره‌کش، غلظت و اثرات متقابل آن‌ها در میزان مهارکنندگی تحت تاثیر سموم مورد آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که از دو فاکتور مورد آزمایش، تنها فاکتور غلظت حشره‌کش اثر معنی‌داری را بر میزان درصد مهارکنندگی داشت ($F_{(3,94)} = 16.710$ و $P < 0.001$) و بین سه حشره‌کش مورد آزمایش، تفاوتی وجود نداشت. همچنین، اثر متقابل این دو فاکتور نیز در میزان پاسخ بی تاثیر بود (جدول ۱). نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون بین غلظت و درصد کاهش تحریک‌پذیری گیرنده‌ها، وجود همبستگی مثبت را بین این دو فاکتور تایید کرد ($r = 0.99$ و $P < 0.01$).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات درون موردی دو متغیر نوع حشره‌کش و غلظت آن بر میزان درصد مهارکنندگی پاسخ الکتروفیزیولوژیک شاخک حشرات نر *Tuta absoluta* به ترکیب اصلی فرومون جنسی.

Table 1. Analysis of variance of the effects of two variables of insecticide type and its concentration on the percentage of the electrophysiological response inhibition of *Tuta absoluta* males to the main compound of sex pheromone.

Index	df	SS	MS	F	P
Insecticide (a)	2	150.5	75.3	0.38	0.69
Concentration (b)	3	10076.4	3358.8	16.75	P<0.001
Interaction effect (a×b)	6	1214.3	202.4	1.01	0.43
Error	84	16844.4	200.5		

در ارزیابی تغییر میزان درصد مهارکنندگی در طول زمان‌های مورد آزمون، نتایج گویای آن بود که درصد مهارکنندگی پاسخ الکتروفیزیولوژیک در زمان‌های مختلف به لحاظ آماری متفاوت بود ($P=0/001$ و $F=4/392$) همچنین، اثر متقابل زمان و غلظت حشره‌کش بر میزان درصد مهارکنندگی معنی‌دار بود ($F=0/006$ و $P=2/301$) سایر اثرات متقابل همچون اثر متقابل زمان و نوع حشره‌کش و نیز اثر متقابل هر سه متغیر (زمان و غلظت و نوع حشره‌کش) تاثیر قابل توجهی بر درصد مهارکنندگی نداشت (جدول ۲).

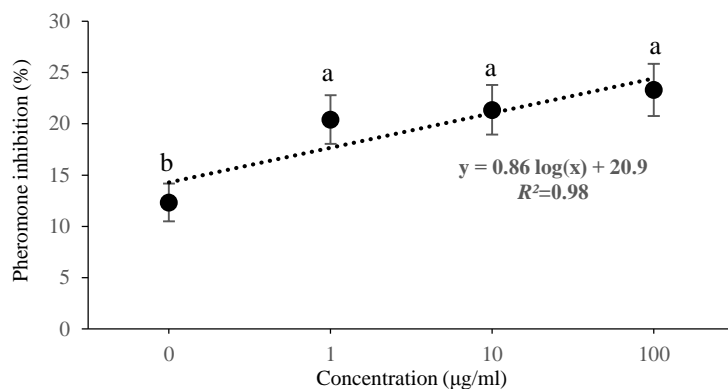
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات درون موردی سه متغیره (زمان و نوع حشره‌کش و غلظت) بر میزان درصد مهارکنندگی پاسخ الکتروفیزیولوژیک شاخک حشرات نر *Tuta absoluta* به ترکیب اصلی فرومون جنسی.

Table 2. Analysis of variance of the effects of three variables (time, insecticide type and concentration) on the percentage of the electrophysiological response inhibition of *Tuta absoluta* males to the main compound of sex pheromone.

Index	df	SS	MS	F	P
Time	4.3	2567.2	591.4	4.39	P<0.001
Insecticide×Time	8.7	1523.7	175.5	1.30	0.24
Concentration×Time	13.0	4035.1	309.9	2.30	P<0.001
Insecticide × Concentration×Time	26.1	5185.2	199.1	1.48	0.06
Error	364.6	49104.0	134.7		

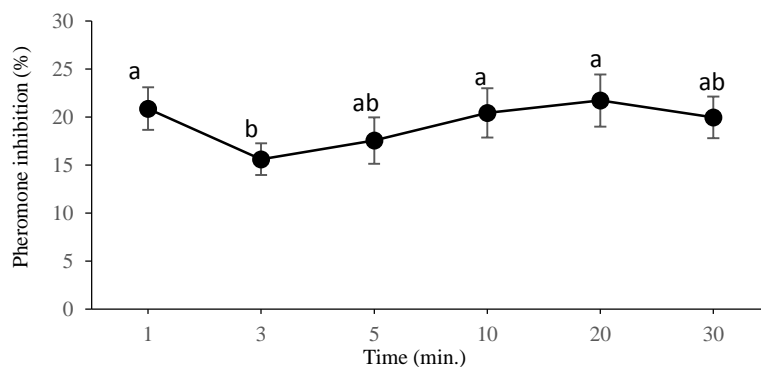
نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که سه حشره‌کش ایمیداکلوپراید، ایندوکساکارب و نیم‌آزال تقریباً به یک میزان در محدوده ۱۸-۲۰ درصدی، پاسخ الکتروفیزیولوژیک را مهار نمودند. میانگین میزان درصد مهارکنندگی حاصل از غلظت در شکل ۲ ترسیم شده است که نشان می‌دهد هر سه غلظت مورد بررسی در حشره‌کش‌ها (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در گروهی جداگانه از شاهد (غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار دارند و بالاترین غلظت حشره‌کش (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و شاهد (صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان درصد مهارکنندگی را داشته‌اند. در خصوص تداوم اثر مهارکنندگی در طول زمان، مشخص شد که پس از افت پاسخ الکتروفیزیولوژیکی در دقیقه نخست پس از پاشش، میزان درصد مهارکنندگی از دقیقه سوم رو به افزایش بود (شکل ۳). اثر متقابل زمان و غلظت نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دقیقه اول پس از پاشش با میانگین $29/2 \pm 2/4$ درصد، دارای افت شدید در پاسخ شاخکی به ترکیب اصلی فرومون جنسی بود و نمونه‌های شاهد (غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دقیقه اول پس از پاشش با میانگین $5/4 \pm 2/4$ کمترین میزان مهارکنندگی را به دنبال داشت (جدول ۳). در اثرات متقابل هر سه فاکتور مورد ارزیابی، اگرچه اثر معنی‌داری به لحاظ آماری مشاهده نشد (جدول ۲)،

بالاترین میزان مهارکنندگی پاسخ شاخکی مربوط به تیمار، ایمیداکلوپراید $\times 100$ میکروگرم بر میلی لیتر \times زمان ۲۰ دقیقه بود.



شکل ۲- میانگین درصد مهارکنندگی پاسخ الکتروفیزیولوژیک شاخک حشرات نر *Tuta absoluta* به ترکیب اصلی فرمون جنسی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف حشره‌کش‌های مورد آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت میانگین‌ها در آزمون توکی-کرامر در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Fig. 2. The mean of inhibition of the electrophysiological response (%) of the antennae of *Tuta absoluta* males to the main compound of sex pheromone influenced by different concentrations of the tested insecticides. Different letters indicate the mean comparison by using Tukey-Cramer test at 5% probability level.



شکل ۳- میانگین درصد مهارکنندگی پاسخ الکتروفیزیولوژیک شاخک حشرات نر *Tuta absoluta* به ترکیب اصلی فرمون جنسی در طول زمان پس از پاشش حشره‌کش. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت میانگین‌ها در آزمون توکی-کرامر در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Fig. 3. The mean of inhibition of the electrophysiological response (%) of the antennae of *Tuta absoluta* males to the main compound of sex pheromone during the time after spraying of the insecticide. Different letters indicate the mean comparison by using Tukey-Cramer test at 5% probability level.

جدول ۳- میانگین درصد مهارکنندگی پاسخ الکتروفیزیولوژیک شاخک حشرات نر *Tuta absoluta* تحت تاثیر توام متغیرهای زمان و غلظت حشره‌کش.

Table 3. The mean of the electrophysiological response inhibition (%) of the antennae of *Tuta absoluta* males influenced by interaction effects of time and concentrations of insecticide.

Concentration	Time					
	1	3	5	10	20	30
100 µg/µl	29.2±2.4 a	18.2±1.7 abcd	22.7±2.4 abc	20.8±2.7 abcd	26.5±2.6 ab	22.6±2.2 abc
10 µg/µl	25.4±2.4 ab	15.6±1.7 bcde	20.2±2.4 abcd	21.4±2.7 abc	22.0±2.6 abc	23.7±2.2 abc
1 µg/µl	23.6±2.4 abc	16.2±1.7 bcde	18.1±2.4 abcd	22.3±2.7 abc	21.8±2.6 abc	20.6±2.2 abcd
0 µg/µl	5.4±2.4 e	12.5±1.7 cde	9.3±2.4 de	17.4±2.7 abcde	16.7±2.6 bcde	12.9±2.2 cde

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در آزمون توکی-کرامر در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Different letters indicate significant difference among means according to Tukey-Kramer test at 5% probability level.

بحث

دریافت محرک‌های بویایی فرومون در شب‌پره‌ها توسط نرون‌های گیرنده‌ی بویایی بر روی موهای حسی بلند *Trichodea* مستقر بر شاخک حشرات نر انجام می‌گیرد (Hansson, 1995) که البته حشرات *T. absoluta* نیز از این قاعده مستثنی نمی‌باشند (Bawin et al., 2017). پس از ورود به منفذ و لومن (Hansson, 1995)، مولکول‌های فرومون از طریق پروتئین‌های متصل شونده فرومون (PBP: Pheromone-Binding Protein) به محل گیرنده‌های موجود بر سطح دندریت نرون‌های گیرنده بویایی (ORN: Olfactory Receptor Neuron) منتقل می‌شود و با تاثیر بر کانال‌های یونی و ایجاد جریان‌های الکتریکی، اطلاعات مولکول بو به صورت پیام الکتریکی به لب شاخکی و مغز مخابره می‌شود (Hansson, 1995; Xu et al., 2005). استرازهای شاخکی نیز از آنزیم‌های اصلی در کاتابولیسیم سریع استرهای فرومونی اغلب شب‌پره‌ها، از جمله شب‌پره‌ی *T. absoluta* می‌باشند (Dominguez et al., 2016)، که پس از تجزیه گروه استات، ترکیبی با قابلیت پایین در اتصال با گیرنده را حاصل کرده و موجبات آماده‌سازی گیرنده برای دریافت مولکول بویایی دیگر و جهت‌گیری به سمت منبع بویایی را فراهم می‌سازند (Durand et al., 2011). ایجاد اختلال در هر یک از مراحل از روند دریافت، انتقال و تحریک گیرنده‌ها توسط مولکول‌های فرومونی و نیز مهار آنزیم‌های تجزیه کننده، هر یک می‌تواند در پاسخ حشره به فرومون جنسی اثرگذار باشد.

در نتایج حاصل از زیست‌سنجی برخی از حشره‌کش‌های منتخب در این آزمایش بر گیرنده‌های شاخکی شب‌پره‌ی بید گوجه‌فرنگی، نقش مهارکنندگی آن‌ها در تحقیق حاضر محرز گردید. براساس مطالعات انجام شده ترکیبات متعددی هستند که روی گیرنده‌های حشرات از جمله گیرنده‌های شاخکی اثر مهار کنندگی و آنتاگونیستی دارند. ترکیباتی از گروه مشتقات تری‌فلئورکتون با مهار آنزیم‌های استراز شاخکی می‌توانند سبب کاهش پاسخ حشرات نر گروهی از پروانه‌ها به فرومون جنسی شوند (Pophof et al., 2000; Giner et al., 2009; Malo et al., 2013). آنالوگ‌های هالواستات فرومون برخی حشرات از جمله شب‌پره پشت الماسی می‌تواند فعالیت آنزیم‌های تجزیه فرومون را مهار کنند (Prestwich & Streinz, 1988). علاوه بر موارد مذکور، وجود ترکیبات فرار گیاهی غیر میزبان و نیز گروهی از ترکیبات شیمیایی و سموم آفت‌کش نیز می‌توانند بر پاسخ رفتاری حشرات به فرومون جنسی اثرگذار باشند (Party et al., 2009; Jactel et al., 2011; Tricoire, 2009; Leignel et al., 2012; López et al., 2013; Dominguez et al., 2016).

بیشتر مطالعات در خصوص سم‌شناسی مربوط به تخمین درصد بقا و مرگ و میر حشرات می‌باشند. اگرچه نباید اثرات غیر مستقیم سموم آفتکش بر اختلالات رفتاری حشرات نادیده گرفته شود (Reddy & Guerrero, 2010; Vacas et al., 2011; Tricoire-Leignel et al., 2012). بیش‌ترین سموم نروتوکسین مورد استفاده در کشاورزی در حقیقت بر روند دریافت و انتقال پیام عصبی اثر گذار هستند، بنابراین تاثیر آن‌ها بر سیستم حسی به خصوص حس بویایی حشرات امری طبیعی می‌باشد و به این ترتیب تمامی رفتارهای هدایت شده از طریق سیستم حسی و نیز فعالیت حرکتی، قابلیت تشخیص، یادگیری و حتی حافظه در حشرات تحت الشعاع قرار می‌گیرند (Desneux et al., 2007; El-Hassani et al., 2008; Tricoire-Leignel et al., 2012). باقیمانده حشره‌کش‌ها در محیط می‌تواند با دستکاری سیستم تعاملات شیمیایی و حس بویایی، شانس تولیدمثل را در حشرات هدف کاهش دهد (Barrett, 2008; Tricoire-Leignel et al., 2012; Rabhi et al., 2014).

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از آنالیز اندازه‌گیری‌های مکرر در میزان مهارکنندگی پاسخ الکترو فیزیولوژیک نشان داد که بین سه حشره‌کش ایمیداکلوپراید، ایندوکساکارب و نیم‌آزال، تفاوت معناداری وجود ندارد و تنها فاکتور غلظت دارای اثر معنی‌دار بر میزان درصد مهارکنندگی پاسخ به ترکیب اصلی فرمون بود. این مورد گویای آن است که هر سه حشره‌کش مورد آزمایش، پاسخ شاخکی حشرات نر بید گوجه‌فرنگی به فرمون جنسی را مهار می‌کنند. به طوری که هر سه غلظت مورد بررسی (۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با شاهد (غلظت صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان دادند. همچنین، با افزایش غلظت حشره‌کش، میزان درصد مهارکنندگی رو به افزایش بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با گزارش‌های Dominguez et al. (2016) در خصوص تاثیر گروهی از مهارکننده‌های استرازهای شاخکی (متیل‌کتون و تری‌فلوئورومتیل‌کتون) روی پاسخ EAG شاخک حشرات نر *T. absoluta* به فرمون جنسی می‌باشد. این محققان نشان دادند که مهارکنندگی ترکیبات مورد آزمایش با افزایش غلظت رو به افزایش است و بالاترین میزان مربوط به غلظت ۱۰۰ µg (بالاترین غلظت بررسی شده) می‌باشد (Dominguez et al., 2016). در خصوص سموم شیمیایی می‌توان به هماهنگی نتایج حاصل از اثر سم مالاتیون از گروه نروتوکسین موثر بر آنزیم کولین‌استراز، بر پاسخ الکتروفیزیولوژیکی شاخک حشرات نر *O. furnacali* به فرمون جنسی اشاره داشت که میزان پاسخ EAG را تا ۰/۱۳ میلی‌ولت به طور میانگین در مقایسه با شاهد کاهش داده و موجب اختلال در روند انتقال پیام عصبی به مغز می‌گردد (Zhou et al., 2005)، که این اثر مهارکنندگی، وجود یک همبستگی مثبت به غلظت‌های سم مورد آزمایش را به اثبات رسانده است (Zhou et al., 2005). در تحقیقی دیگر مشاهده شد که دلتامترین در سطح موی حسی با مهار تحریک الکتریکی، پاسخ نرون گیرنده بویایی به فرمون در نرهای *Mamestra spp.* را مختل می‌سازد که این تاثیر تابع غلظت سم می‌باشد (Lucas & Renou, 1992). مطالعات پیشین نشان دادند که ایمیداکلوپراید به عنوان یک آگونیست گیرنده‌های نیکوتینی، بر نرون‌های حسی *Apis mellifera* Linnaeus (Hym.: Apidae) اثرگذار است (Nauen et al., 2001). آزادیراختین با دخالت در کانال‌های یونی در غشای عصبی و ایجاد اثرات هیجانی در فعالیت الکتریکی سیستم عصبی می‌تواند روی فعالیت خودبخودی طناب عصبی شکمی و ابر آکسون‌های سوسری آمریکایی *Periplaneta Americana* Linnaeus (Blattodea: Blattidae) اثرگذار باشد و این تاثیر تابع منحنی غلظت-پاسخ می‌باشد (Shafeek et al., 2004).

سم نیم‌آزال با ماده موثره آزادیراختین، به عنوان یک سم چند منظوره می‌باشد که علاوه بر اثرات کشندگی، دارای تاثیر بر رشد و نمو، تولیدمثل و رفتار حشرات نیز می‌باشد (Gunasekaran et al., 2009; Pandey & Tiwari, 2011; Ahmad et al., 2015; Rana et al., 2015; Chaudhary et al., 2017). ولی اثرات

نوروفیزیولوژیکی آن کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه اثر بازدارندگی سم نیم‌آزال در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش بر پاسخ گیرنده‌های شاخکی به فرومون جنسی بید گوجه‌فرنگی اثبات شد. (2001) Reddy *et al.* تغییرات الکتروفیزیولوژیک مشاهده شده در طناب عصبی شکمی سوسری آمریکایی تحت تیمار با آزادیراختین را همچون سایپرمتین به اثر گذاری آن‌ها بر کانال‌های یونی در گیرنده‌های عصبی نسبت دادند. محققان دیگری نیز به نتایج مشابهی در این خصوص اشاره کرده‌اند (Shafeek *et al.*, 2004). گروهی از محققان بر این باورند که آزادیراختین با اثر بر جریان پتاسیمی وابسته به ولتاژ می‌تواند پتانسیل عمل را تغییر دهد (Scott *et al.*, 1999). از طرفی، اثرات مهارکنندگی عصاره درخت چریش و ترکیب آزادیراختین روی آنزیم کولین-استراز نیز به اثبات رسیده است (Anjum *et al.*, 2010; Rana *et al.*, 2015). مهار استیل کولین‌استراز سبب تجمع استیل کولین در سیناپس و به تبع آن تحریکات متوالی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌شود (Anjum *et al.*, 2008; Nathan *et al.*, 2010). از آنجا که آنزیم‌های استرازی در شاخک سبب جدا شدن ملکول فرومون از روی گیرنده شده و با جایگزینی مولکول بوی دیگر، جهت‌گیری به سمت منبع بویایی انجام می‌گیرد (Durand *et al.*, 2012; Chertemps *et al.*, 2011); بنابراین، می‌توان چنین در نظر گرفت که اثرگذاری سموم مهار کننده آنزیم‌های شاخکی بیش‌تر در مقوله پرواز و جلب حشره به فرومون جنسی باشد (Zhou *et al.*, 2005). اگرچه مطالعاتی نیز گویای آن است که این گروه از سموم با مکانیزم اثر مهارکنندگی آنزیم‌های استرازی توانستند سبب اختلال در پاسخ الکتروفیزیولوژیک در حشرات نر *O. furnacalis* و *T. absoluta* به فرومون جنسی شوند (Zhou *et al.*, 2005; Dominguez *et al.*, 2016). بر این اساس می‌تواند مکانسیم مهار آنزیم‌های استرازی شاخکی را نیز در توجیه احتمالی تاثیر سم نیم‌آزال بر مهار پاسخ شاخکی به فرومون جنسی در حشرات نر *T. absoluta* عنوان کرد. لازم به ذکر است که مطالعات پیشین نشان دادند که یکی از عوامل موثر آزادیراختین بر تغییرات رفتار حشرات و حساسیت نرون‌های عصبی به فرومون جنسی می‌تواند به دلیل اثرات تنظیم‌کنندگی رشدی و تاثیر بر هورمون جوانی این ترکیب باشد (Anton & Ghadenne, 1999; Tricoire-Leignel *et al.*, 2012). البته شاید این مورد بیش‌تر در بحث پاسخ رفتاری و اثرات درازمدت آزادیراختین بتواند توجیه قابل قبولی باشد و در این مورد نتواند پاسخگوی کاملی در خصوص دلایل اختلال در پاسخ گیرنده‌ی شاخکی شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی به فرومون جنسی باشد.

در خصوص حشره‌کش ایندوکساکارب به عنوان سم موثر بر کانال‌های سدیمی نیز اثرات مهارکنندگی بر پاسخ گیرنده‌های شاخکی در حشرات نر *T. absoluta* مشاهده شد که این مورد مطابق با نتایج تحقیقات Wang *et al.* (2011) بر اثرات کاهش غلظت‌هایی از حشره‌کش ایندوکساکارب در تیمار خوراکی لاروی روی میزان پاسخ الکتروفیزیولوژیک نرهای بالغ شب‌پره‌پشت الماسی به مخلوط فرومون جنسی بوده است. هرچند غلظت‌ها تفاوت معناداری را نشان نداده‌اند. باید اذعان داشت که نوع کاربرد خوراکی سم و زمان تیمار حشرات در تحقیقات Wang *et al.* (2011) می‌تواند یکی از دلایل مغایرت در سطح معنی‌داری با نتایج بدست آمده از کاربرد مستقیم ایندوکساکارب بر شاخک مینوز گوجه‌فرنگی در تحقیق حاضر باشد.

ایمیداکلوپرید از گروه نئونیکوتینوئیدها، جزء آگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین محسوب می‌شود که بر انتقال تحریک عصبی توسط جریان‌های یونی ایجاد شده در محل گیرنده‌های نرون‌های حسی اثر می‌گذارد (Tan *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2011). با تکیه بر این مکانسیم اثر می‌توان اذعان داشت که با تاثیر سم ایمیداکلوپرید روی گیرنده‌های شاخکی مینوز گوجه‌فرنگی، جریان حاصل از اتصال ترکیب فرومون اصلی به گیرنده‌ها و ایجاد پتانسیل عمل مختل می‌شود (Tan *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2011). لازم به ذکر است که سموم دیگری از گروه نئونیکوتینوئیدها همچون کلوتیانیدین، پاسخ الکتروفیزیولوژیک به فرومون جنسی را

طبق روش SSR (Single Sensillum Recording) مختل نمی‌سازد (Rabhi *et al.*, 2016). مطالعات دیگری نیز حاکی از تغییر حساسیت نرون‌های خروجی تحت تاثیر ایمیداکلوپراید در ثبت اختلاف پتانسیل در لب شاخکی می‌باشد (Rabhi *et al.*, 2016).

بر طبق شکل ۳ مشخص شد که قدرت مهارکنندگی بعد از دقیقه سوم پس از پاشش حشره‌کش، همزمان با گذشت زمان رو به افزایش است و علیرغم کاهش محدودی در آخرین زمان (دقیقه ۳۰)، درصد مهار کنندگی به صفر میل نمی‌کند. این مطلب بیانگر اثر مهارکنندگی غیر قابل برگشت در مدت زمان مورد آزمایش می‌باشد. این نتایج در تطابق با گزارش‌های پیشین است (Lucas & Renou, 1992; Dominguez *et al.*, 2016). همچنین، حشره‌کشی از گروه پایروترئیدها نظیر پرمترین، میزان تحریکات فرومونی را در پروانه کرم سرخ پنبه *P. gossypiella* تحت تیمار، به مدت ۴ روز کاهش می‌دهد (Haynes, 1988). چنین نتایجی در جهت تاخیر در برگشت اثرات منفی سم بر روی پاسخ گیرنده‌های بویایی به فرومون جنسی و همچنین رفتار حشرات نر در مطالعات Zhou *et al.* (2005) نیز عنوان شده است.

جدول ۳ نشان می‌دهد که بالاترین میزان درصد مهارکنندگی در تیمار ایمیداکلوپراید $100 \mu\text{g/ml}$ در زمان ۲۰ دقیقه در حدود $41/5 \pm 4$ درصد ثبت شد که این میزان در گزارش حاصل از میانگین درصد مهارکنندگی مشتقات تری‌فلئورومتیل‌کتون و متیل‌کتون در تحقیقات Dominguez *et al.* (2016) بر پاسخ الکتروفیزیولوژیک همین گونه‌ی شب‌پره، *T. absoluta* (در حدود ۷۰ درصد مهارکنندگی) رقم نسبتاً پایینی می‌باشد. از دلایل این اختلاف علاوه بر نوع ترکیب مورد آزمایش، می‌توان به روش تحقیق نیز اشاره داشت. چراکه (2016) Dominguez *et al.*، نه تنها از غلظت خالص از ماده موثره مورد آزمایش به میزان ۱۰۰ و ۱۰ میکروگرم استفاده کرده‌اند، بلکه به دلیل وجود فراریت و وزن ملکولی پایین مشتقات ترفلئورومتیل‌کتون، ترکیب مهارکننده به طور مداوم برای ۵ دقیقه روی شاخک دمیده شده و در نهایت مهار پاسخ الکتروفیزیولوژیک بدون در نظر گرفتن اثر کاهش حساسیت شاخک در طول زمان محاسبه شده است. نتایج ما گویای آن است که هر سه غلظت مورد آزمایش حشره‌کش‌ها در یک گروه آماری طبقه‌بندی شده‌اند که این مورد می‌تواند به دلیل پوشیده شدن یکباره‌ی تمامی موهای حسی روی شاخک در غلظت‌های مورد آزمایش باشد. این احتمال می‌تواند وجود داشته باشد که در کاربرد غلظت‌های بالاتر، اختلاف بین غلظت‌ها به وجود می‌آید؛ ولی به دلیل محدودیت در حساسیت دستگاه الکتروآنتنوگرام، غلظت‌های دیگر مورد بررسی قرار نگرفت. از طرفی، کاربرد مستقیم غلظت‌های بسیار پایین روی شاخک نیز ممکن است اثری بر فعالیت نرون‌ها نداشته باشد (Lucas & Renou, 1992). البته باید توجه داشت که اثرگذاری حشره‌کش‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر بر اساس اختلاف ولتاژ ایجاد شده طبقه‌بندی شده‌اند؛ در صورتی که ممکن است اختلاف ایجاد شده توسط حشره‌کش بر حسب زمان، تاخیر در فاز رپلاریزیشن (Repolarization) غشای گیرنده حسی (Scott *et al.*, 1999) و فرکانس تحریکات حاصله در گیرنده باشد (Shafeek *et al.*, 2004) که موارد مذکور در تحقیق حاضر محاسبه نشده است.

به طور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که گروهی از سموم گیاهی و شیمیایی قابلیت مهار پاسخ گیرنده‌های شاخکی را در حشرات نر *T. absoluta* در واکنش به فرومون جنسی دارا هستند. اگرچه استفاده از سموم شیمیایی با قابلیت مهار پاسخ به فرومون جنسی در کنترل رفتاری آفات، نیازمند به بررسی‌های تکمیلی در شرایط مزرعه و گلخانه می‌باشد.

References

- Ahmad, S., Ansari, M. S. & Muslim, M. (2015) Toxic effects of neem based insecticides on the fitness of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Crop Protection* 68, 72-78.
- Anjum, S. I., Yousf, M. J., Ayaz, S. & Siddiqui, B. S. (2010) Toxicological Evaluation of chlorpyrifos and neem extract (Biosal B) against 3rd instars larvae of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 20, 9-12.
- Ansebo, L., Coracini, M. D. A., Bengtsson, M., Liblikas, I., Ramirez, M., Borg-Karlson, A. K., Tasin, M. & Witzgall, P. (2004) Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. *Journal of Applied Entomology* 128, 488-493.
- Anton, S. & Gadenne, C. (1999) Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 5764-5767.
- Barrett, B. A. (2008) Assessment of methoxyfenozide exposure on the sexual attractiveness and responsiveness of adult codling moth, *Cydia pomonella* (L.), in small orchard blocks. *Pest Management Science* 64, 916-922.
- Barrett, B. A. (2010) Exposure to methoxyfenozide-treated surfaces reduces the responsiveness of adult male codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) to codlemone and pear ester lures in a wind tunnel. *Journal of Economic Entomology* 103, 1704-1710.
- Batista-Pereira, L. G., Fernandes, J. B., Corrêa, A. G., Da Silva, M. F. G. F. & Vieira, P. C. (2006) Electrophysiological responses of eucalyptus brown looper *Thyrinteina arnobia* to essential oils of seven Eucalyptus species. *Journal of Brazilian Chemical Society* 17, 555-561.
- Bawin, T., Collard, F., De Backer, L., Yarou, B. B., Compère, P., Francis, F. & Verheggen, F. J. (2017) Structure and distribution of the sensilla on the antennae of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Micron* 96, 16-28.
- Beck, J. J., Light, D. M. & Gee, S. W. (2014) Electrophysiological responses of male and female *Amyelois transitella* antennae to pistachio and almond host plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 153, 217-230.
- Cardé, T. R. & Millar, G. J. (2004) *Advances in insect chemical ecology*. 275pp. Cambridge University Press, New York.
- Chaudhary, S., Kanwar, R. K., Sehgal, A., Cahill, D. M., Barrow, C. J., Sehgal, R. & Kanwar, J. R. (2017) Progress on *Azadirachta indica* based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Frontiers in Plant Science* 8, 1-13.
- Chertemps, T., François, A., Durand, N., Roseel, G., Dekker, T., Lucas, Ph. & Maibèche-Coisne, M. (2012) A carboxylesterase, esterase 6. Modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. *BMC Biology* 10, 1-12.
- Clark, D. C. & Haynes, K. F. (1992) Sublethal effects of Cypermethrin on chemical communication, courtship, and oviposition in the Cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 85, 1771-1778.
- Delpuech, J. M., Legallet, B. & Fouillet, P. (2001) Partial compensation of the sublethal effect of detamethrin on the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae*. *Chemosphere* 42, 985-991.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52, 81-106.
- Dominguez, A., Puigmart, M., Bosch, M. P., Rosell, G., Crehuet, R., Ortiz, A., Quero, C. & Guerrero, A. (2016) Synthesis, functional assays, electrophysiological

- activity, and field tests of pheromone antagonists of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 3523-3532.
- Durand, N., Carot-Sans, G., Bozzolan, F., Rosell, G., Siaussat, D., Debernard, S., Chertemps, T. & Maibèch-Coisne, M.** (2011) Degradation of pheromone and plant volatile compounds by some odorant degrading enzyme in *Spodoptera littoralis*. *PLoS ONE* 6, 12. e 29147.
- El-Sayed, A. M., Byers, J. A., Manning, L. M., Jürgens, A., Mitchell, J. V. & Suckling, D. M.** (2008) Floral scent Canada thistle and its potential as a generic insect attractant. *Journal of Economic Entomology* 101, 720-727.
- EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization.** (2005) Data sheets on quarantine pests: *Tuta absoluta*. *EPPO Bulletin* 35, 434-435.
- Floyd, M. A., Evans, D. A. & Howse, Ph. E.** (1976) Electrophysiological and behavioural studies on naturally occurring repellents to *Reticulitermes lucifugus*. *Journal of Insect Physiology* 22, 697-701.
- Fraser, A. M., Mechaber, W. L. & Hildebrand, J. G.** (2003) Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 29, 1813-1833.
- Germinara, G. S., De Cristofaro, A. & Rotundo, G.** (2016) Electrophysiological and behavioral responses of *Theocolax elegans* (Westwood) (Hymenoptera: Pteromalidae) to cereal grain volatiles. *BioMed Research International* 2016, 1-8.
- Giner, M., Sans, A., Riba, M., Bosch, D., Gago, R., Rayo, J., Rosell, G. & Guerrero, A.** (2009) Development and biological activity of a new antagonist of the pheromone of the codling moth. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 57, 8514-8519.
- Gunasekaran, K., Vijayakumar, T. & Kalyanasundaram, M.** (2009) Larvicide and emergence inhibitory activities of NeemAzal T/S 1.2 per cent EC against vectors of malaria, filariasis and dengue. *Indian Journal of Medical Research* 130, 138-145.
- Hansson, B. S.** (1995) Olfaction in Lepidoptera. *Experientia* 51, 1003-1027.
- Haynes, K. F. (1988) Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review of Entomology* 33, 149-168.
- IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0.** (2012) Armonk, NY: IBM Corp. Command Syntax Reference, Chicago, Illinois: SPSS Inc.
- Jactel, H., Birgersson, G., Andersson, S. & Schlyter, F.** (2011) Non-host volatiles mediate associational resistance to the pine processionary moth. *Oecologia* 166, 703-711.
- Kaissling, K. E.** (1987) *R. H. Wright lectures on insect olfaction*. Burnaby, B. C., Canada: Simon Fraser University.
- Lietti, M. M. M., Botto, E. & Alzogaray, R. A.** (2005) Insecticide Resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 34, 113-19.
- López, S., Quero, C., Iturrondobeitia, J. C., Guerrero, A. & Goldarazena, A.** (2013) Electrophysiological and behavioural responses of *Pityophthorus pubescens* (Coleoptera: Scolytinae) to (*E,E*)- α -farnesene, (*R*) (+)-limonene and (*S*)-(-)-verbenone in *Pinus radiata* (Pinaceae) stands in northern Spain. *Pest Management Science* 69, 40-47.
- Lucas, P. & Renou, M.** (1992) Electrophysiological study of the effects of deltamethrin, bioresmethrin, and DDT on the activity of pheromone receptor neurons in 2 moth species. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 43, 103-115.
- Malo, E. A., Rojas, J. C., Gago, F. & Guerrero, A.** (2013) Inhibition of the responses to sex pheromone of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Insect Science* 13, 1-14.

- Megido, R. C., Haubruge, E. & Verheggen, F. J.** (2013) Pheromone-based management strategies to control the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *A review. Biotechnology, Agronomy, Society & Environment Journal* 17, 475-82.
- Moore, R. F.** (1988) Inhibition of chemical communication between male and female bollworms (Lepidoptera, Noctuidae) by sublethal amounts of permethrin. *Journal of Economic Entomology* 81, 78-82.
- Nathan, S. S., Choia, M. Y., Seo, Y.H., Paika, H. C., Kalaivani, K. & Kima, J. D.** (2008) Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 244-250.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., & Schmuck, R.** (2001) Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science* 57, 577-586.
- Oliveira, E. E., Schleicher, S., Buschges, A., Schmidt, J., Kloppenburg, P. & Salgado, V. L.** (2011) Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors in central nervous system neurons of the stick insect (*Carausius morosus*) by imidacloprid and sulfoximine insecticides. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 41, 872-880.
- Paduraru, P. M., Popoff, R. T. W., Nair, R., Gries, R., Gries, G. & Plettner, E.** (2008) Synthesis of substituted alkoxy benzene minilibraries, for the discovery of new insect olfaction or gustation inhibitors. *Journal of Combinatorial Chemistry* 10, 123-134.
- Pandey, J. P. & Tiwari, R. K.** (2011) Neem based insecticides interaction with development and fecundity of Red Cotton Bug, *Dysdercus cingulatus* Fab. *International Journal of Agricultural Research* 6, 335-346.
- Pandey, J. P. & Tiwari, R. K.** (2011) Neem based insecticides interaction with development and fecundity of Red Cotton Bug, *Dysdercus cingulatus* Fab. *International Journal of Agricultural Research* 6, 335-346.
- Party, V., Hanot, Ch., Said, I, Rochat, D. & Renou, M.** (2009) Plant terpenes affect intensity and temporal parameters of pheromone detection in a moth. *Chemical Senses* 34, 763-774.
- Pophof, B., Gebauer, T. & Ziegelberger G.** (2000) Decyl thio-trifluoropropane, a competitive inhibitor of moth pheromone receptor. *Journal of Comparative Physiology* 186, 315-323.
- Prestwich, G. D. & Streinz L.** (1988) Haloacetate analogs of pheromones: effects on catabolism and electrophysiology in *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology* 14, 1003-1021.
- Puigmarti, M., Bosch, M. P. & Guerrero, A.** (2015) An improved and convenient new synthesis of the pheromone components of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. *Synthesis* 47, 961-968.
- Rabhi, K. K., Deisig, N., Demondion, E., Le Corre, J., Robert, G., Tricoire-Leignel, H., Lucas, P. Gadenne, C. & Anton, A.** (2016) Low doses of a neonicotinoid insecticide modify pheromone response thresholds of central but not peripheral olfactory neurons in a pest insect. *Proceedings Biological Sciences Royal Society of London B* 283, 1-7.
- Rabhi, K. K., Esancy, K., Voisin, A., Crespin, L., Le Corre, J., Tricoire-Leignel, H., Anton, S. & Gadenne, C.** (2014) Unexpected effect of low doses of a neonicotinoid insecticide on behavioral responses to sex pheromone in a pest insect. *PLoS ONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0114411
- Rana, H., Farhanullah Khan, M., Akbar, M. F., Tahir, H. F., Sohail khan, M. & Ahmed, Z.** (2015) Cholinesterase inhibition effects of *Azadirachta indica* A. Just fresh

leave extract and its effects on *Musca domestica* L., larval mortality, pupation, adult emergence, fecundity and fertility. *International Journal of Agriculture & Applied Sciences* 7, 28-36.

- Reddy, G. R., Madhusudhana, L., Shafeek, A. & Chetty, C. S.** (2001) Azadirachtin and cypermethrin induced alterations in electrophysiological properties of sensory and interneurons in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 828–833.
- Reddy, G. V. & Guerrero, A.** (2010) *New pheromones and insect control strategies*. Volume 83. Edited by Litwek, G. 20. *Pheromones (Vitamins and Hormones)*.
- Reinke, M. D. & Barrett, B. A.** (2007) Sublethal exposure to methoxyfenozide-treated surfaces reduces the attractiveness and responsiveness in adult oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* 100, 72–78.
- Sannino L. & Espinosa, B.** (2010) *Tuta absoluta*. Guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa. 113pp. Edited by L'Informatore Agrario, Verona, Supplemento 1 al n. 46.
- Santos da Silva, R. C., Milet-Pinheiro, P., Bezerra da Silva, P. C., Gomes da Silva, A., Vanusa da Silva, M., Navarro, M. A. F. & Henrique da Silva, N.** (2015) (*E*)-caryophyllene and α -humulene: *Aedes aegypti* oviposition deterrents elucidated by gas chromatography-Electrophysiological assay of *Commiphora leptophloeos* leaf oil. *PLoS ONE* 10, 1-14.
- Scott, R. H., O'Brien, K., Roberts, L., Mordue, M. & Mordue Luntz, L.** (1999) Extracellular and intracellular actions of azadirachtin on the electrophysiological properties of cultured rat DRG neurons. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology* 123, 85-93.
- Shafeek, A., Prasanthi, R. P. J., Reddy, G. H., Chetty, C. S. & Reddy, G. R.** (2004) Alterations in acetylcholinesterase and electrical activity in the nervous system of cockroach exposed to the neem derivative, azadirachtin. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 59, 205-208.
- Siqueira, H. A. A., Guedes, R. N. C. & Picanço, M. C.** (2000) Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Agricultural & Forest Entomology* 2, 147-153.
- Tan, J., Galligan, J. J. & Hollingworth, R. M.** (2007) Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *NeuroToxicology* 28, 829-842.
- Tricoire-Leignel, H., Thany, S. H., Gadenne, C. & Anton, S.** (2012) Pest insect olfaction in an insecticide contamination environment: info-distruption or hormesis effect. *Frontiers in Physiology* 3, 1-6.
- Vacas, S., Alfaro, C., Primo, J. & Navarro-Liopis, V.** (2011) Studies on the development of a mating disruption system to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pest Management Science* 67, 1473-1480.
- Wang, G., Huang, X., Wei, H. & Fadamiro, H. Y.** (2011) Sublethal effects of larval exposure to indoxacarb on reproductive activities of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101, 227–231.
- Wei, H. & Du, J.** (2004) Sublethal effects of larval treatment with deltamethrin on moth sex pheromone communication system of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Pesticid Biochemistry & Physiology* 80, 12–20.
- Xu, P., Atkinson, R., Jones, D. N. & Smith, D. P.** (2005) *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron* 45, 193–200.

- Yang, Z. H. & Du, J.** (2003) Effects of sublethal deltamethrin on the chemical communication system and PBAN activity of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenee). *Journal of Chemical Ecology* 29, 1611–1619.
- Zhou, H., Du, J. & Huang, Y.** (2005) Effects of sublethal doses of malathion on responses to sex pheromones by male Asian corn borer moths, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Journal of Chemical Ecology* 31, 1645–1656.
-