بسم الله الرحمن الرحيم

۹۴۱۵۳

دانشکده‌ی کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه
برای دریافت درجه‌ی دکتری در رشته‌ی حشره‌شناسی کشاورزی

عنوان

مقایسه‌ی حساسیت جمعیت‌های مختلف سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) به حشره کش اندوسولفان و بررسی سازوکارهای بیوشیمیایی و مولکولی مقاومت احتمالی

استاد راهنما
دکتر میرجلیل حجازی

اساتید مشاور
دکتر سید ابوالقاسم محمدی
دکتر محمدرضا رشیدی

پژوهشگر
محمود محمدی شریف

۱۳۸۷ /۲/ ۸

بهمن ۱۳۸۵

شماره‌ی ۳

۹۴۱۵۳

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که فرصتی برای آموختن عطا کرد و آرزو که باقی عمر آموختن نیز مرهون رحمت او باشد.

از استاد راهنمای عزیزم جناب آقای دکتر میر جلیل حجازی که بسیاری از آموزه‌های زندگیم را مدیون ایشان هستم تشکر می‌کنم و امید که در باقی عمر بتوانم لختی از این همه محبت را پاسخگو باشم.

از اساتید مشاورم آقایان دکتر محمدی و دکتر رشیدی که با گشاده‌دستی امکان طی مراحل پایان نامه را فراهم نموده و راهنمایی‌هایشان چاره ساز چالش‌های علمی این پروژه بود، قدردانی می‌نمایم. از آقایان دکتر سخندان، دکتر طالبی جهرمی و دکتر عنایتی که زحمت داوری پایان نامه را عهده‌دار بودند، تشکر می‌کنم. از آقای دکتر فاخری نماینده‌ی محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه، آقای دکتر نیکنام مدیریت محترم گروه گیاهپزشکی و سایر اساتید محترم گروه بخاطر زحماتشان تشکر می‌کنم.

از سایر افرادی که نیز به نحوی در انجام این پایان نامه مرا مورد لطف خود قرار دادند، قدردانی می‌نمایم: مهندس برادری بخاطر در اختیار گذاشتن ماده‌ی تکنیکال حشره‌کش‌ها، پروفسور گاتل و دکتر طلایی جهت تهیه و ارسال جمعیت حساس سوسک کلرادوی سیب زمینی و مهندس قراملکی و مهندس شهیم بخاطر کمک‌هایشان در نمونه برداری‌ها.

از خانم‌ها کریم‌زاده، علمیه و حسینی و آقایان صفاپور، گلمحمدی، خاقانی نیا، کهنمویی و برادر عزیزم محمد محمدی شریف بخاطر کمک‌هایشان در بخش‌های مختلف کار عملی پایان نامه تشکر می‌کنم.

از همسر عزیزم بخاطر همراهی ارزنده‌اش در طی مراحل عملی پایان نامه و بردباریش در این مسیر طولانی قدردانی می‌نمایم.

در نهایت سپاس بی پایان خود را نثار پدر، مادر، خانواده‌ی عزیزم و خانواده‌ی محترم همسرم می‌نمایم که در طی مراحل تحصیلی مشوق و پشتیبان من بوده‌اند.

نام خانوادگی دانشجو: محمدی شریف **نام:** محمود

عنوان پایان‌نامه: مقایسه‌ی حساسیت جمعیت‌های مختلف سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) به حشره کش اندوسولفان و بررسی سازوکارهای بیوشیمیایی و مولکولی مقاومت احتمالی

استاد راهنما: دکتر میر جلیل حجازی

اساتید مشاور: دکتر ابولقاسم محمدی دکتر محمد رضا رشیدی

مقطع تحصیلی: دکتری **رشته:** گیاه‌پزشکی **گرایش:** حشره‌شناسی کشاورزی

دانشگاه: تبریز **دانشکده:** کشاورزی **تاریخ فارغ التحصیلی:** ۸۵/۱۱/۱۸

تعداد صفحه: ۱۴۵

کلید واژه‌ها: مقاومت به حشره‌کش‌ها، سوسک کلرادو، سیب‌زمینی، اندوسولفان، آزینفوس متیل، فوزالن، سینرژیسم، گلوتاتیون اس- ترنسفراز، *Rdl*، PASA

چکیده:

مقاومت به حشره‌کش‌ها یکی از مهمترین مشکلاتی است که متخصصین مدیریت آفات با آن مواجه هستند. مقاومت به حشره‌کش‌ها باعث کاهش کارایی گروه‌های مختلف حشره‌کش‌ها و کاهش تعداد حشره‌کش‌های موثر می‌شود. هدف از این بررسی، آگاهی از وضعیت حساسیت جمعیت‌های سوسک کلرادو به حشره‌کش‌های آزینفوس متیل، اندوسولفان و فوزالون و بررسی سینرژیستی، بیوشیمیایی و مولکولی سازوکارهای ممکن مقاومت بود.

جمعیت‌هایی از دو استان آذربایجان شرقی و اردبیل در سالهای ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ جمع‌آوری گردیدند. این جمعیت‌ها در یکی از بخش‌های گلخانه‌ی تحقیقاتی گروه گیاه‌پزشکی در دمای $^{\circ}C$ ۲ ± ۲۶ ، رطوبت ۵ ± ۵۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند.

زیست سنجی به روش قرار دادن سم در سطح بدن حشره انجام گردید. در این آزمایش‌ها، لاروهای سن چهار تا ۲۴ ساعته که بمدت ۲۴ ساعت در شرایط یکنواخت تغذیه شده بودند، استفاده شدند. محدوده‌ی دوزهای مورد استفاده‌ی حشره‌کش‌های آزینفوس متیل، اندوسولفان و فوزالون روی جمعیت حساس بترتیب ۱ - ۰/۲ ، ۰/۵ - ۰/۰۵ و µg ۵ - ۲ به ازای هر حشره بود. این محدوده در مورد سایر جمعیت‌ها در سال ۱۳۸۲ بترتیب ۶ - ۰/۰۵ ، ۶۰ - ۱ و µg ۵۰ -۱ به ازای هر حشره و در سال ۱۳۸۳ بترتیب ۲ - ۰/۲ ، ۸۰- ۲ و µg ۴۰ - ۲ به ازای هر حشره بود. این

آزمایش‌ها برای هر یک از سموم و برای هر جمعیت چهار بار در روزهای مختلف تکرار گردیدند. نتایج نشان داد که مقاومت قابل توجهی نسبت به اندوسولفان وجود دارد و میزان حساسیت جمعیت‌ها نسبت به دو حشره‌کش دیگر تا حدودی مشابه جمعیت حساس بود. بیشترین مقاومت به اندوسولفان در جمعیت‌های جمع‌آوری شده از بستان آباد مشاهده شد. بدین ترتیب که در آزمایش‌های انجام شده در دو سال بترتیب ۲۲۰ و ۱۰۹ برابر مقاومت مشاهده گردید.

در آزمایش‌های سینرژیستی از دو ترکیب سینرژیست DEF و PBO استفاده گردید. این آزمایش‌ها در سال ۱۳۸۳ روی جمعیت بستان آباد و حساس انجام شد. روش کار بدین ترتیب بود که یک ساعت قبل از تیمار با دوزهای حشره‌کش اندوسولفان، لاروهای انتخاب شده یا با دوز ۵ µg/µl ترکیب PBO یا با دوز ۱۰ µg/µl ترکیب DEF تیمار شدند. سایر شرایط مشابه آزمایش‌های زیست سنجی بود. نسبت سینرژیسم برای این دو ترکیب در مورد جمعیت بستان آباد بترتیب ۲/۳ و ۳/۵ محاسبه گردید.

میزان سینرژیسم بوجود آمده توسط PBO در حدی نبود که مبین تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان فعالیت سیستم اکسایشی در دو جمعیت حساس و مقاوم باشد. میزان سینرژیسم مربوط به DEF نیز قابل توجه نبود. میزان فعالیت سیستم آنزیمی گلوتاتیون S- ترنسفراز در دو جمعیت با استفاده از زیرنهشت CDNB اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت این سیستم آنزیمی در دو جمعیت تفاوت معنی‌داری ندارد. برآورد عوامل کینتیکی K_m و V_{max} نیز عدم دخالت قابل توجه گلوتاتیون S- ترنسفرازها را در مقاومت به اندوسولفان تأیید نمود. از این رو غیر حساس شدن نقطه‌ی هدف در اثر جهش‌های نقطه‌ای به عنوان عامل مقاومت مورد سوء ظن قرار گرفت.

برای بررسی این موضوع در آزمایش‌های مولکولی، در ابتدا بخش مورد نظر از ژن عامل مقاومت به ترکیبات سایکلودینی با استفاده از آغازگر رو به جلوی دژنره CPBF6 و آغازگر رو به عقب CPBR4 که اختصاصی سوسک کلرادو بود، تکثیر گردید. قطعات تکثیر شده از ژل آگاروز استخراج شده و با استفاده از پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شدند. توالی یابی قطعات همسانه‌سازی شده جهش نقطه‌ای عامل مقاومت به ترکیبات سایکلودینی (جایگزینی اسید آمینه‌ی آلانین با سرین) را برای اولین بار در سوسک کلرادو مشخص نمود. در مرحله‌ی بعدی وجود الل مقاوم با روش تکثیر اختصاصی الل (PASA) تأیید گردید.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
۱- بررسی منابع	۳
۱-۱- مقاومت به حشره‌کش‌ها	۴
۱-۲- اهمیت مقاومت به حشره‌کش‌ها	۵
۱-۳- اهمیت پی بردن به سازوکارهای مقاومت	۶
۱-۴- سازوکارهای مقاومت به حشره‌کش‌ها	۷
۱-۴-۱- افزایش غیر سمی شدن آفت‌کش	۹
۱-۱-۴-۱- سازوکارهای غیرسمی شدن	۱۰
۱-۱-۱-۴-۱- تکثیر و افزایش ژن	۱۰
۲-۱-۱-۴-۱- تغییر در تنظیم ژن‌ها	۱۱
۳-۱-۱-۴-۱- تغییر در جای‌گیری ژن	۱۲
۲-۱-۴-۱- نقش سیستم آنزیمی گلوتاتیون S- ترنسفراز در غیرسمی شدن حشره‌کش‌ها	۱۲
۲-۴-۱- غیر حساس شدن نقطه‌ی اثر	۱۳
۱-۲-۴-۱- گیرنده‌های گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) و نقش آنها در مقاومت به سایکلودین‌ها	۱۴
۱-۱-۲-۴-۱- توصیف گیرنده‌های GABA	۱۴
۲-۱-۲-۴-۱- گیرنده‌های GABA در پستانداران و حشرات	۱۴
۳-۱-۲-۴-۱- ساختار و نقش فیزیولوژیکی گیرنده‌های GABA در حشرات	۱۵
۴-۱-۲-۴-۱- فارماکولوژی گیرنده‌های GABA	۱۵
۵-۱-۲-۴-۱- سایکلودین‌ها	۱۶
۶-۱-۲-۴-۱- نقش گیرنده‌های تغییر یافته GABA در مقاومت به سایکلودین‌ها	۱۷
۳ -۴-۱- کاهش نفوذ حشره‌کش‌ها	۲۱
۵- ۱- روش‌های بررسی و پی بردن به سازوکارهای مقاومت	۲۲
۱-۵-۱- روش‌های مبتنی بر زیست سنجی	۲۲
۱-۱-۵-۱- روش‌های سنتی	۲۲
۲-۱-۵-۱- استفاده از الگوهای مقاومت تقاطعی	۲۳
۳-۱-۵-۱- استفاده از اثر تشدید کنندگی	۲۴
۲-۵-۱- روش‌های بیوشیمیایی	۲۶
۳-۵-۱- روش‌های مولکولی	۲۷
۱-۳-۵-۱- PCR و استفاده از آنزیم‌های برشی	۲۸
۲-۳-۵-۱- تکثیر الل‌های اختصاصی با استفاده از PCR (PASA)	۲۹

۳-۳-۵-۱- تجزیه‌ی چند شکلی تک رشته‌ای تطبیقی (SSCP) ۳۱
۶-۱- سوسک کلرادوی سیب‌زمینی ۳۲
۱-۶-۱- تاریخچه ۳۲
۲-۶-۱- چرخه‌ی زیستی ۳۳
۷-۱- مدیریت سوسک کلرادو ۳۴
۱-۷-۱- تأثیر اقتصادی ۳۴
۲-۷-۱- کنترل زراعی ۳۵
۳-۷-۱- استفاده از ارقام مقاوم گیاه میزبان ۳۵
۴-۷-۱- کنترل زیستی ۳۵
۵-۷-۱- کنترل شیمیایی ۳۶
۸-۱- مقاومت سوسک کلرادو به حشره‌کش‌ها ۳۷
۱-۸-۱- مقاومت به ترکیبات کلره و سایکلودین‌ها ۳۸
۲-۸-۱- مقاومت به ترکیبات فسفره و کارباماتی ۳۹
۳-۸-۱- مقاومت به پایریتروئیدها ۳۹
۴-۸-۱- مقاومت به نئونیکوتینوئیدها ۳۹
۵-۸-۱- مقاومت به ابامکتین ۴۰
۹-۱- عوامل موثر در ایجاد مقاومت در سوسک کلرادو ۴۰
۱-۹-۱- ظرفیت برای رشد سریع جمعیت ۴۰
۲-۹-۱- بزرگ بودن بخش تیمار شده‌ی جمعیت در هر نسل ۴۱
۳- ۹-۱- گزینش روی تمام مراحل زیستی فعال ۴۲
۴-۹-۱- یک سازوکار واحد عامل مقاومت تقاطعی گسترده در سوسک کلرادو ۴۲
۱۰-۱- مدیریت مقاومت در سوسک کلرادو ۴۳
۱-۱۰-۱- تناوب زراعی و سایر عوامل کنترل کننده‌ی غیرشیمیایی ۴۳
۲-۱۰-۱- پایش مزرعه و در نظر گرفتن آستانه‌های اقتصادی ۴۴
۳-۱۰-۱- ایجاد پناهگاه برای افراد حساس ۴۵
۴-۱۰-۱- جایگزینی و تناوب حشره‌کش‌ها ۴۵
۵-۱۰-۱- جایگزینی حشره‌کش‌های قابل مصرف در خاک با تیمار شاخ و برگ ۴۷
۱۱-۱- سازوکارهای مقاومت سوسک کلرادو به حشره‌کش‌ها ۴۷
۱-۱۱-۱- سازوکارهای مقاومت به ترکیبات فسفره و کارباماتی ۴۷
۲-۱۱-۱- سازوکارهای مقاومت به پایریتروئیدها ۵۰
۳-۱۱-۱- سازوکارهای مقاومت به اورمکتین‌ها ۵۲
۴-۱۱-۱- سازوکارهای مقاومت به نئونیکوتینوئیدها ۵۳

۲- مواد و روشها ۵۴
۱-۲- جمع‌آوری حشرات ۵۵
۲-۲- پرورش حشرات ۵۶

۱-۲-۲- محل پرورش ۵۶
۲-۲-۲- شیوه‌ی پرورش ۵۶
۳-۲- آزمایش‌های زیست‌سنجی ۶۲
۴-۲- آزمایش‌های اثر سینرژیست‌ها ۶۶
۵-۲- آزمایش‌های بیوشیمیایی ۶۷
۶-۲- آزمایش‌های مولکولی ۷۰
۱-۶-۲- استخراج DNA ۷۰
۲-۶-۲- طراحی آغازگرهای اختصاصی و دژنره ۷۱
۳-۶-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۷۴
۴-۶-۲- استخراج قطعات از ژل ۷۵
۵-۶-۲- همسانه‌سازی ۷۶
۶-۶-۲- تأیید جهش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی الل حساس و مقاوم ۸۲

۳- نتایج و بحث ۸۴
۱-۳- آزمایش‌های زیست‌سنجی ۸۵
۱-۱-۳- جمعیت‌های بستان آباد ۸۹
۲-۱-۳- جمعیت اردبیل ۹۱
۳-۱-۳- جمعیت عجب‌شیر ۹۲
۲-۳- آزمایش‌های اثر سینرژیست‌ها ۹۵
۳-۳- آزمایش‌های بیوشیمیایی ۹۸
۱-۳-۳- مقادیر پروتئین نمونه‌ها ۹۸
۲-۳-۳- فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز و عوامل کینتیکی در دو جمعیت ۹۹
۴-۳- آزمایش‌های مولکولی ۱۰۲
۱-۴-۳- تکثیر ژن *Rdl* ۱۰۲
۲-۴-۳- همسانه‌سازی قطعه‌ی تکثیر شده ۱۰۷
۳-۴-۳- توالی یابی ۱۰۸
۴-۴-۳- بررسی و تأیید جهش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی الل ۱۱۴
۵-۳- جمع‌بندی ۱۲۸

پیشنهادها ۱۳۰
منابع مورد استفاده ۱۳۱
ضمیمه ۱۴۲
چکیده‌ی انگلیسی ۱۴۴

مقدمه:

استفاده‌ی وسیع از حشره‌کش‌های آلی به مقاومت تعداد زیادی از حشرات آفت به حشره‌کش‌ها منجر شده است. در واقع، مقاومت به حشره‌کش‌ها مهمترین مشکلی است که متخصصین مدیریت آفات در مزارع و باغات، مراتع و حشره‌شناسی پزشکی با آن مواجهند. بیش از ۵۰۰ گونه حشره یا کنه به یک یا تعداد بیشتری حشره‌کش یا کنه‌کش مقاوم شده‌اند [۴۲].

علی‌رغم تنوع و گوناگونی ترکیبات شیمیایی و گونه‌های آفت، سازوکارهای مقاومت محدود هستند. این سازوکارها عبارتند از: کاهش نفوذ کوتیکولی، افزایش متابولیسم توسط سیستم مونواکسیژناز وابسته به سایتوکروم P_{450} ، هیدرولازها و گلوتاتیون S- ترنسفرازها و کاهش حساسیت نقطه‌ی اثر [۳۰].

پس از مسأله ساز شدن موضوع مقاومت به حشره‌کش‌ها، روش‌های مختلف و متفاوتی برای بررسی سازوکارهای مقاومت ابداع شده و مورد توجه قرار گرفته است. از نظر تاریخی اولین شیوه‌ها، زیست سنجی حشره‌کش‌ها بوده است. در این روش‌ها اثر هر حشره‌کش روی جمعیت‌های مقاوم و جمعیت حساس یا جمعیتی که کمتر در معرض حشره‌کش قرار گرفته، تعیین می‌شود. بسته به حشره‌کش مورد استفاده و نحوه‌ی عمل آن روی حشرات، نوع اثر و شیوه‌ی بررسی آن متفاوت است. میزان کشندگی، عمده‌ترین ویژگی مورد بررسی حشره‌کش‌هاست. استفاده از الگوهای مقاومت تقاطعی و نیز ترکیبات سینرژیست، از دیگر روش‌های مبتنی بر زیست سنجی هستند. در روش‌های بیوشیمیایی میزان فعالیت یک سیستم آنزیمی حشره یا دیگر جنبه‌های بیوشیمیایی این سیستم‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد. این سیستم‌های آنزیمی مسئول غیر سمی نمودن حشره‌کش و بروز مقاومت هستند. روش‌های مولکولی جدیدترین روش‌هایی هستند که از اواخر دهه‌ی ۸۰ و اوایل دهه‌ی ۹۰ قرن بیستم میلادی کشف شده و اهمیت یافته‌اند. در این روش‌ها مبنای مولکولی یا به عبارتی تغییرات مولکولی عامل مقاومت مورد توجه هستند.

در بین آفات حشره‌ای سیب‌زمینی، سوسک کلرادو *Leptinotarsa decemlineata* مهم‌ترین آفت این گیاه به حساب می‌آید. این گونه تا سال ۱۳۶۳ به عنوان آفت قرنطینه‌ای در ایران محسوب می‌شد، ولی در این سال از اردبیل جمع‌آوری، شناسایی و گزارش گردید [۳]. به دلیل عدم رعایت اصول و قوانین قرنطینه‌ای، این

آفت گسترش یافت و امروزه علاوه بر اردبیل در اکثر مناطق سیب‌زمینی کاری کشور استقرار یافته و خسارت به بار می‌آورد [۱ و ۲].

در برخی از نقاط دنیا این گونه تقریبا به هر حشره‌کشی که برای کنترل آن استفاده می‌شود، مقاوم شده است و یکی از مثال‌های بسیار معروف شکست کنترل شیمیایی حشرات به دلیل بروز مقاومت در برابر حشره‌کش‌هاست. از نظر وسعت بروز مقاومت به حشره‌کش‌ها این حشره پس از شته سبز هلو در مقام دوم قرار دارد. سوسک کلرادو یکی از اولین گونه‌هایی است که به د.د.ت مقاوم شد و پس از آن به ترکیبات سایکلودینی، فسفره و کارباماتی نیز مقاوم شده است. بروز مقاومت به ترکیبات مصنوعی در سوسک کلرادو خیلی سریع رخ می‌دهد، بطوری که این گونه در ایالت میشیگان آمریکا طی ۲ تا ۴ سال پس از کاربرد پایریتروئیدها، به این گروه از سموم مقاوم شد [۹، ۱۱، ۴۰، ۴۴ و ۴۵].

در این بررسی جمعیت‌هایی از اردبیل و دو منطقه در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و پرورش داده شدند. یک جمعیت حساس شناخته شده خارجی نیز، در شرایط مشابه پرورش داده شد. به منظور آگاهی از حساسیت این جمعیتها به حشره‌کش‌های آزینفوس متیل، اندوسولفان وفوزالن، آزمایش‌های زیست‌سنجی انجام گردید. این آزمایش‌ها نشان دادند که مقاومت قابل توجهی به اندوسولفان وجود دارد. در مرحله‌ی بعدی با استفاده از ترکیبات سینرژیست PBO و DEF احتمال تاثیر سیستم‌های غیرسمی کننده به عنوان عوامل مقاومت مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش‌های بیوشیمیایی احتمال دخیل بودن سیستم آنزیمی گلوتاتیون S-ترنسفراز آزمایش گردید. به عنوان مرحله‌ی پایانی این پژوهش، احتمال جهش‌های مولکولی عامل مقاومت از طریق آزمایش‌های مولکولی مورد توجه قرار گرفت. در این مرحله پس از تکثیر موفقیت آمیز ژن عامل مقاومت به ترکیبات سایکلودینی و همسانه‌سازی آن، ژن مورد نظر توالی‌یابی شده و جهش نقطه‌ای عامل مقاومت به ترکیبات سایکلودینی برای اولین بار در مورد سوسک کلرادو مشخص گردید. در ادامه‌ی آزمایش‌های مولکولی وجود جهش در افراد مقاوم با روش تکثیر الل‌های اختصاصی[1] مورد بررسی قرار گرفت.

1. PCR amplification of specific alleles (PASA)

بررسی منابع

۱-۱- مقاومت به حشره‌کش‌ها

مقاومت عبارت است از توانایی یک سویه‌ی یک موجود برای تحمل دوزهایی از یک ترکیب سمی که برای بیشتر افراد حساس همان گونه کشنده است. این تعریف ممکن است کاملا دقیق نباشد زیرا بر اساس آن مقاومت می‌تواند هم قبل و هم بعد از قرار گرفتن در معرض حشره‌کش ایجاد شود که دو ویژگی کاملا متفاوت هستند. مقاومت یک ویژگی فنوتیپی است که در کل جمعیت بیان می‌شود و یک ویژگی قابل توارث است که قبل از قرار گرفتن در معرض آفتکش در تعدادی از افراد یک جمعیت وجود دارد. مقاومت ایجاد تغییر در حساسیت جمعیت در برابر یک ترکیب سمی به علت گزینش اختصاصی این افراد از قبل سازگار شده در طی چند نسل است. این گزینش در نتیجه‌ی قرار گرفتن در معرض مقادیری از ترکیب سمی است که برای این افراد غیرکشنده بوده اما برای سایر افراد ممکن است کشنده باشد یا نباشد. حشراتی که قادر به غیر سمی نمودن ترکیبات گیاهی اللوشیمایی[1] می‌باشند افرادی هستند که از قبل برای غیر سمی نمودن و بروز مقاومت به آفتکش‌ها سازگار شده‌اند. این حشرات می‌توانند به آفتکش‌هایی با نحوه‌ی عمل مشابه با این ترکیبات اللوشیمیایی، حتی قبل از قرار گرفتن در معرض آفتکش‌ها، مقاوم شوند [۷۳].

بنابراین مقاومت نشان دهنده‌ی یک تغییر ژنتیکی در پاسخ به گزینش است. موجوداتی که واجد این ویژگی ژنتیکی هستند، در برابر ترکیبات شیمیایی مربوط زنده مانده و تولید مثل می‌کنند و احتمالا این ویژگی را به نتاج خود منتقل می‌کنند. افزایش فشار گزینش ناشی از کاربرد حشره‌کش‌ها، فراوانی این ویژگی ژنتیکی (مقاومت) را در جمعیت بسرعت افزایش می‌دهد [۳۰]. در واقع مقاومت یکی از مثال‌های بارز انتخاب طبیعی بوسیله‌ی انسان است [۳۳].

زمانی که در مورد مقاومت به آفتکش‌ها بحث می‌شود عمدتا به توانایی انسان برای کنترل آفات اشاره می‌شود نه توانایی آفات برای دفاع در برابر آفتکش‌ها. قرار گرفتن در معرض آفتکش‌ها یکی از خطرات متعددی است که حشرات برای زنده ماندن با آن مواجه می‌شوند. از این رو قرار گرفتن در معرض آفتکش‌ها می‌تواند نوعی تنش محیطی تلقی شود و مقاومت، پاسخ طبیعی حشره در برابر چنین تنشی است. از زمان استقرار حشرات

1. Allelochemicals

روی کره‌ی زمین، آنها با انواع تنش‌های کشنده و غیرکشنده مواجه بوده‌اند و سازوکارهای مختلفی برای غلبه بر این تنش‌ها در آنها تکامل یافته است [۷۳].

شاید مهم‌ترین پیامد استفاده‌ی گسترده از حشره‌کش‌ها، تکوین مقاومت به حشره‌کش‌ها باشد. مطالعات مولکولی مقاومت به حشره‌کش‌ها نشان داده که چگونه برخی از جانوران می‌توانند در محیط سمی زنده بمانند. به نظر می‌رسد طبیعت جهش‌هایی که باعث مقاومت حشرات به حشره‌کش‌ها می‌شود نباید از نظر ذاتی تفاوت زیادی با جهش‌های عامل تنوع ژنتیکی مربوط به واکنش انسان به مواد شیمیایی خارجی[1] داشته باشد [۳۰].

۲-۱- اهمیت مقاومت به حشره‌کش‌ها

مقاومت پدیده‌ی گسترده‌ای است و تقریبا در مورد تمامی آفات اقتصادی جمعیت‌های مقاوم وجود دارند [۷۳]. گزارش شده که بیش از ۵۰۰ گونه از حشرات و کنه‌ها به یک یا تعدادی از حشره‌کش‌ها مقاوم شده‌اند. تعدادی از آفات کشاورزی و ناقلین بیماری‌ها در برخی نواحی به حدی مقاوم شده‌اند که کنترل شیمیایی آنها با مشکل مواجه شده است. فهرست حشره‌کش‌های موثر برای کنترل آفات کشاورزی و ناقلین بیماری‌ها در حال کاهش است. عواقب مقاومت به حشره‌کش‌ها از جنبه‌ی سم‌شناختی دو چندان است: ۱) استفاده از حشره‌کش‌ها به ورود زرادخانه‌ی عظیمی از ترکیبات شیمیایی به محیط زیست منجر شده که برخی از آنها خیلی سمی هستند و تعدادی از آنها در طی ۵۰ سال گذشته آلودگی محیط زیست را باعث شده‌اند، ۲) بطور سنتی واکنش کشاورزان به مقاومت، افزایش میزان مصرف است که هم مشکل مقاومت و هم آلودگی محیطی را افزایش می‌دهد [۳۰].

مقاومت به حشره‌کش‌ها یکی از مهم‌ترین مشکلاتی است که در مدیریت آفات مختلف با آن مواجه هستیم. مقاومت به حشره‌کش‌ها باعث کاهش کارایی گروه‌های مختلف حشره‌کش‌ها و کاهش تعداد حشره‌کش‌های موثر می‌شود [۴۲].

1. Xenobiotics

مقاومت در مورد تعداد زیادی از گونه‌ها رخ داده و توسط متخصصین شاخه‌های مختلف علوم از جمله حشره‌شناسی کاربردی، رفتارشناسی، بیوشیمی، اکولوژی، ژنتیک، زیست‌شناسی مولکولی، فیزیولوژی، زیست‌شناسی جمعیت و سم‌شناسی مورد بررسی قرار می‌گیرد [۶۳].

جدا از هزینه‌های اقتصادی، اجتماعی و محیط زیستی ناشی از مقاومت در برابر حشره‌کش‌ها، این موضوع از نظر فیزیولوژیکی نیز مهم است. مقاومت به آفت‌کش‌ها جالب‌ترین نمونه‌ی سازگاری تکاملی به تغییرات محیطی است بخصوص زمانی که در نظر داشته باشیم این سازگاری در مقایسه با زمان تکامل نسبتا سریع است [۲۳]. زمانی که ویژگی ظاهری (فنوتیپیک) خاص، نظر متخصصین یک رشته‌ی علمی را جلب می‌کند، فرصت مناسبی برای پرورش ایده‌های تازه پیش می‌آید. تکامل مقاومت به حشره‌کش‌ها نیز چنین فرصتی را پدید آورده است [۶۳].

۳-۱- اهمیت پی بردن به سازوکارهای مقاومت

در صورتی که فشار گزینش بر اساس یک سازوکار مقاومت به حشره‌کش‌ها ادامه پیدا کند، سطح مقاومت ایجاد شده به حدی است که باعث شکست برنامه‌های کنترل آفات شود. اما اگر فشار گزینش قبل از ایجاد سطوح بالای مقاومت حذف شود، احتمال عدم شکست برنامه‌های کنترلی وجود دارد. از جمله عوامل کلیدی برای احتراز از این شکست، توانایی ردیابی سطوح پایین مقاومت، پایش نوع و میزان مقاومت‌های موجود در جمعیت آفات و اجرای برنامه‌های مدیریتی می‌باشند [۷۳].

دلایل دیگری نیز برای مطالعه‌ی چگونگی مقاوم شدن حشرات به حشره‌کش‌ها وجود دارند. انجام چنین مطالعاتی از جنبه‌های پایه‌ای و کاربردی مهم هستند. اگر مبنای بیوشیمیایی و ژنتیکی مقاومت شناخته شود، طراحی راه فن‌های پایش مؤثر که یکی از عوامل کلیدی در تدوین برنامه‌های مدیریت مقاومت است، امکان‌پذیر خواهد بود. همچنین، با شناخت سازوکار مقاومت، گرفتن تصمیم برای استفاده از ترکیبات جایگزین با آگاهی بهتری صورت می‌گیرد. دلیل سوم برای مطالعه‌ی سازوکار مقاومت این است که با آگاهی از آن ما قادر به ابداع روش‌هایی برای مقابله با مقاومت خواهیم بود [۷۴].

با آگاهی از جوانب مختلف پدیده‌ی مقاومت می‌توان تدابیر بهتری برای مدیریت مقاومت اتخاذ کرد. آگاهی از ژنتیک و سازوکار مقاومت و عوامل موثر در سرعت بروز مقاومت و برگشت آن، از ملزومات اجرای برنامه‌های مدیریتی است [۲۶].

جدا از دلایل کاربردی مطالعه‌ی مقاومت به حشره‌کش‌ها، آفات مقاوم ابزار مفیدی در زمینه‌ی فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، نحوه‌ی اثر حشره‌کش‌ها، تکامل، متابولیسم، فارماکوکینتیک و ژنتیک مولکولی فراهم می‌نمایند. به عنوان مثال از سویه‌های مقاوم برای توضیح سازوکار اثر حشره‌کش‌های سایکلودینی و فسفره، خالص سازی موفق یک سایتوکروم P_{450} ، همسانه‌سازی سایتوکروم P_{450} و آگاهی از تنظیم بیوشیمیایی مونواکسیژنازهای میکروزومی سایتوکروم P_{450} استفاده شده است [۷۴].

کنترل سوسک کلرادو به میزان زیادی متکی به کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی است. اما به علت بروز مقاومت تقاطعی[۱] [۴۰] این روش کنترل اغلب پس از یک یا دو سال کاربرد حشره‌کش‌ها به شکست منتهی می‌شود [۴۶، ۶۶ و ۸۵]. از آنجایی که دشمنان طبیعی موثری در مزارع تجارتی روی سوسک کلرادو فعالیت نمی‌کنند و روش‌های کنترل زراعی حداقل در کوتاه مدت عملی نیستند، بنابراین برای تداوم اقتصادی بودن کنترل سوسک کلرادو باید مدیریت مقاومت بخوبی انجام شود. موفقیت در برنامه‌های مدیریت مقاومت نیازمند آگاهی از سازوکار مقاومت از نظر ژنتیکی و توارث مقاومت و همچنین جریان ژنی بین جمعیت‌های سوسک کلرادو می‌باشد [۴۸].

۴-۱- سازوکارهای مقاومت به حشره‌کش‌ها

سه سازوکار عمده‌ی مقاومت در حشرات عبارتند از: افزایش غیر سمی شدن متابولیکی، کاهش حساسیت نقطه‌ی اثر و کاهش نفوذ کوتیکولی [۲۳].

برای مقاوم شدن موجودات به ترکیبات خارجی از جمله آفتکش‌ها دو راه وجود دارد: تغییر دادن میزان موثر آفتکش موجود در نقطه‌ی هدف یا ایجاد تغییر در خود نقطه‌ی هدف. بنابراین دسته‌بندی مقاومت بصورت

---

۱. مقاومت به ترکیباتی از یک گروه یا گروه‌های شیمیایی متفاوت ناشی از یک سازوکار مقاومت.

مقاومت رفتاری، کاهش نفوذ یا جذب سم، جداسازی[1] و غیر سمی نمودن، همه باعث کاهش دوز آفتکش در محل تأثیر می‌شوند در حالی که کاهش حساسیت نقطه‌ی اثر یا تغییر تعداد نقاط اثر باعث بی اثر شدن آفتکش می‌شود. بر اساس نوع تغییر ژنتیکی که توسط حشره‌کش گزینش می‌شود، سازوکارهای مولکولی مقاومت به دو گروه تقسیم شده‌اند: جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های ساختاری و تغییر در تعداد یا فعالیت ژن‌ها [۳۰].

سابقه‌ی قرار گرفتن در معرض ترکیبات اللوشیمیایی تنها توجیه کننده‌ی مواردی از مقاومت به آفتکش‌هاست که سازوکاری مشابه با غیر سمی شدن این ترکیبات گیاهی دارند. این سؤال مطرح است که قرار گرفتن نسل‌های والد در معرض تنش چگونه موجب مقاومت بیشتر نتاج آنها در برابر تنش می‌گردد. پاسخ این است که قرار گرفتن در معرض تنش باعث تغییر در ماده‌ی ژنتیکی می‌شود. بطور کلی سه نوع تغییر یا جهش در مقاومت دخیل هستند: یک ژن ممکن است تکثیر شده و بجای وجود یک کپی از ژن، چندین کپی از آن در DNA وجود داشته باشد. اگر ژن تکثیر یافته یک آنزیم غیر سمی کننده را رمزگردانی کند در اینصورت حشره می‌تواند به اندازه تعداد کپی‌های موجود آن ژن، یک آفتکش را بیشتر از فرد حساس غیر سمی کند [۷۳].

بیان یک ژن نیز ممکن است تغییر کرده و باعث مقاومت شود. در این حالت فقط یک کپی از ژن وجود دارد اما تنظیم ژن طوری تغییر می‌کند که در مقایسه با افراد حساس محصول کمتر یا بیشتری تولید شود. به عنوان مثال در یک فرد حساس نسبت ژن به محصول ژن ممکن است یک به یک باشد اما در فرد مقاوم این نسبت تغییر می‌کند. ممکن است تغییر در جهت افزایش تولید (یک به ۱۰) یا در جهت کاهش تولید (یک به ۰/۱) باشد. زمانی که یک آفتکش به فرم فعال آن استفاده می‌شود افزایش تولید آنزیم‌های غیر سمی کننده باعث مقاومت می‌شود اما زمانی که آفتکش در بدن موجود زنده به فرم فعال تبدیل می‌شود، کاهش آنزیم‌ها باعث مقاومت می‌شود [۷۳].

سومین نوع جهش‌ها آنهایی هستند که باعث تغییر در ژن شده و در نتیجه باعث تغییر در ساختار محصول ژن می‌شوند. مثلا جهش نقطه‌ای در یک ژن باعث تغییر در توالی اسید آمینه‌ی پروتئین مربوط شده و این تغییر ساختار سه بعدی محصول را تغییر داده و ممکن است باعث مقاومت شود. این تغییر ممکن است توانایی

1. Sequestration

حشره‌کش را برای اتصال به نقطه‌ی هدف افزایش یا کاهش داده یا ممکن است توانایی محصول ژن را برای متابولیزه کردن حشره‌کش کاهش دهد. تغییر ساختاری کمیت محصول را تغییر نداده بلکه باعث تغییر در کیفیت محصول می‌شود. این تغییرات باعث ایجاد ژن‌های جدید نشده و فقط روی ژن‌هایی که از قبل موجود بوده‌اند موثر می‌باشند. تاکنون ثابت نشده که قرار گرفتن در معرض آفتکش‌ها، باعث ایجاد ژن‌های جدید شود [۷۳].

قرار گرفتن در معرض آفتکش‌ها یکی از عوامل اصلی توزیع ژن‌های مقاومت در جمعیت است. عناصر جابجا شدنی[1] در تغییراتی از نوع تکثیر ژن‌ها نقش دارند. عناصر جابجا شدنی قسمت‌هایی از DNA هستند که می‌توانند به نواحی مختلف کروموزومی منتقل شده و پس از انتقال، نسبت به سایر توالی‌های ژنومی بیشتر تکثیر شوند. این عناصر همچنین می‌توانند ژن‌هایی را که قبلا متحرک نبوده و کارکرد آنها ارتباطی به جابجایی ندارد، منتقل کنند. ژن‌هایی که توسط این عناصر منتقل می‌شوند نیز تکثیر می‌شوند. ژن‌های تکثیر شده ممکن است توسط این عناصر در جمعیت پخش شده و یا یک ژن ممکن است به محلی منتقل شود که بیان آن تغییر کرده و باعث ایجاد مقاومت شود [۷۳].

۱-۴-۱- افزایش غیر سمی شدن آفت‌کش

آنزیم‌های دخیل در غیرسمی شدن حشره‌کش‌ها ممکن است از نظر کیفی یا کمی تغییر کنند. سه گروه آنزیم‌های دخیل در مقاومت متابولیکی به حشره‌کش‌ها عبارتند از: هیدرولازها، گلوتاتیون S- ترنسفرازها[2] و مونواکسیژنازها [۴۷].

1. Transposable elements
2. Glutathione S-transferases (GSTs)

۱-۱-۴-۱- سازوکارهای غیرسمی شدن

سه نوع تغییر مولکولی عمده که باعث افزایش غیر سمی شدن حشره‌کش‌ها می‌شوند، عبارتند از: تکثیر و افزایش ژن[1]، تغییر در تنظیم ژن[2] و تغییر ناشی از جای‌گیری ژن[3] [۴۷].

۱-۱-۱-۴-۱- تکثیر و افزایش ژن

تکثیر DNA باعث افزایش تعداد کپی‌های قسمت‌هایی از کروموزوم که شامل ژن‌های عملکردی[4] هستند، می‌شود. این پدیده برای اولین بار در سلول‌های سرطانی[5] و رگه‌های سلولی پایدار[6] دیده شد. این موضوع در ابتدا به عنوان یک ویژگی غیر طبیعی در کشت‌های سلولی مطرح بود اما امروزه افزایش تکثیر DNA در تمامی موجوداتی که تولید ژن در آنها سریع‌تر از نسخه‌برداری چندین ژن از روی یک کپی صورت می‌گیرد، به اثبات رسیده است. قابل ذکر است که برای ایجاد مقاومت باید ژن تکثیر یافته به پروتئین کارکردی نسخه‌برداری و ترجمه شود [۳۰].

در مورد جمعیت‌های مقاوم حشرات، این پدیده برای اولین بار در مورد شته‌ی سبز هلو *Myzus persicae* مشاهده گردید. در این سویه حالت دو برابر شدن ژن ساختاری استراز[7] E4 به حالت پشت سر هم[8] مشخص گردید. با استفاده از همسانه‌ی cDNA از این ژن به عنوان کاوشگر، ازدیاد DNA تا ۶۴ برابر مشاهده گردید. تجزیه‌ی مولکولی واحد تکثیر یا آمپلیکون استرازها در شته‌ها و پشه‌ها نشان داد که واحدهای تکثیر شده از نظر اندازه بزرگ‌تر از خود ژن‌ها هستند. استراز B1 پشه‌ها یک ژن ۲/۸ kb است که بیش از ۲۵۰ واحد از آن در داخل قطعات تکثیر شده‌ی ۳۰ kb قرار دارد. استراز E4 شته‌ها نیز یک ژن ۴/۳ kb است که به عنوان جزئی از یک قطعه‌ی ۲۵ kb تا ۶۴ برابر تکثیر شده است [۳۰].

---

1. Gene amplification
2. Gene regulation
3. Gene splicing
4. Functional genes
5. Tumor cells
6. Permanent cell lines
7. Esterase
8. Tandem duplication

تکثیر ژن به عنوان عامل مقاومت به حشره‌کش‌ها در پشه‌ی *Culex quinquefasciatus* در مورد استراز Estβ1 نیز گزارش گردیده است [۴۷]. در مورد مقاومت‌های ناشی از تکثیر و افزایش تعداد ژن، همچون مقاومت‌های ناشی از سایر سازوکارها، مهاجرت عامل گسترش مقاومت است [۲۴].

۲-۱-۱-۴-۱- تغییر در تنظیم ژن‌ها

تکثیر DNA سازوکاری است که در نتیجه‌ی افزایش تکثیر ژن، محصول ژن افزایش می‌یابد. با این حال سازوکارهایی وجود دارند که باعث افزایش بیان ژن‌های ساختاری تکثیر نشده می‌شوند. برعکس این حالت بیان ژن ممکن است کاهش یابد. جهش‌های مختلفی ممکن است به ایجاد تغییراتی در بیان ژن منتهی شوند. این تغییرات ممکن است به دو صورت *cis* و *trans* باشند. حالت *cis* مانند تخریب یا حذف یک عنصر تنظیمی بالادست[1] یک ژن که این عنصر ممکن است افزایش دهنده یا محدود کننده‌ی بیان ژن باشد. حالت *trans* مانند تخریب ژن رمزگردان پروتئینی که به عناصر *cis* متصل می‌شود [۳۰].

افزایش بیان ژن بجای افزایش تعداد کپی‌های موجود از یک ژن در مورد پشه‌ها به مقاومت ناشی از گلوتاتیون S- ترنسفرازها و مونواکسیژنازها مربوط می‌شود. با این حال تکثیر و افزایش بیان، دو سازوکار جدا از هم نیستند. مثلا در پشه‌ها ژن‌های مربوط به بعضی استرازها هم تکثیر شده (افزایش تعداد کپی‌های ژن مورد نظر) و هم بیانشان افزایش می‌یابد (افزایش میزان پروتئین تولیدی مرتبط با ژن). افزایش بیان ژن ممکن است به تفاوت در دوام[2] پروتئین یا mRNA مرتبط باشد یا در نتیجه‌ی تغییر در کارایی دو راه‌انداز[3] ایجاد شود [۴۷].

تغییر در بیان ژن بخصوص در مواردی که سیستم‌های آنزیمی گلوتاتیون اس- ترنسفراز و سایتوکروم P_{450} دخیل هستند، اهمیت دارد. افزایش بیان سیستم آنزیمی گلوتاتیون اس- ترنسفراز در سویه‌های مقاوم چندین گونه از حشرات به اثبات رسیده است. افزایش بیان ژن CYP6A1 نیز در تعدادی از سویه‌های مقاوم مگس خانگی تأیید شده است [۳۰].

---

1. Upstream
2. Stability
3. Promoter

در شته‌ی سبز هلو و تعدادی از پشه‌ها، مقاومت ناشی از تکثیر ژن‌های استراز است که اغلب در ترکیب با تنظیم ژن به تولید مقدار بیشتری استراز منتهی می‌شود. در شته‌ی سبز هلو مقاومت یا با تکثیر استراز ۴ (E4) یا تکثیر یک فرم متفاوت به نام فرم E4 سریع[1] همراه است. در این گونه، متابولیسم حشره‌کش آهسته است اما چون آنزیم E4 تا سه درصد وزن بدن شته را تشکیل می‌دهد این آنزیم می‌تواند شبیه یک اسفنج عمل کرده و باعث جداسازی حشره‌کش‌ها شود [۳۳].

۳-۱-۱-۴-۱- تغییر در جای‌گیری ژن

اولین تحقیقات بیوشیمایی انجام شده روی آنزیم‌های گلوتاتیون اس- ترنسفراز (GST) عامل مقاومت در پشه‌ی *Anopheles gambiae* نشان داد که GSTهای متفاوتی در این گونه وجود دارند. توالی‌یابی کامل DNA در ناحیه‌ای که محل استقرار گروه I این آنزیم‌ها بود نشان داد که در این ناحیه از DNA یک ژن فاقد اینترون و تعدادی ژن‌واره[2] کوتاه شده در انتهای ´۵ دیده می‌شوند. بررسی‌های بعدی نشان دادند که اینها ژن‌های دروغی نبوده و بطور فعالی در نتیجه‌ی جای‌گیری و تبدیل اگزون‌های ´۵ به یک اگزون منفرد ´۳ رونویسی می‌شوند. در نتیجه‌ی این تغییرات انواع متفاوتی از آنزیم‌های GST در افراد حساس و مقاوم این گونه مشاهده می‌شوند [۴۷].

۲-۱-۴-۱- نقش سیستم آنزیمی گلوتاتیون اس- ترنسفراز در غیرسمی شدن حشره‌کش‌ها

گلوتاتیون S- ترنسفرازها آنزیم‌های غیرسمی کننده‌ای هستند که باعث مزدوج شدن گلوتاتیون احیا شده (GSH) با زیرنهشت‌های الکتروفیلیک می‌شوند. سپس ترکیب مزدوج شده بوسیله‌ی یک پمپ خارج کننده (فاز III سیستم غیرسمی کننده) از سلول خارج شده و پس از آن بلافاصله به فرم قابل دفع یعنی مرکاپتوریک اسید تبدیل می‌شود. این سیستم آنزیمی در فاز I متابولیسم ترکیبات فسفره اهمیت داشته و اعتقاد بر این است که

1. Fast E4 (FE4)
2. Pseudogene