

بررسی تاثیر حشره کشی ترکیبات جدید فسفر آمیدی روی تعدادی از حشرات آفت

محبوبه شریفی^۱، محمد قدمیاری^{۲*}، خدایار قلی‌وند^۳ و علی اصغر ابراهیمی ولموزی^۴

- ۱- دانشجوی دکتری حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
- ۲- *نویسنده مسوول: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران (mghadamyari@gmail.com)
- ۳- استاد گروه شیمی معدنی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- دانشجوی دکتری شیمی معدنی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۱۵

چکیده

برخی از مشتقات ترکیبات فسفر آمیدی توانایی مهار آنزیم استیل کولین استراز را داشته و به عنوان حشره کش مطرح هستند. در این تحقیق اثر حشره کشی بازده نوع از ترکیبات فسفر آمیدی روی شته سیاه افاقیا *Aphis craccivora* (Koch, 1854)، سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* (Müller, 1766) شب‌پره برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) و زنبور برگ‌خوار رز *Achropus rosae* (Linnaeus, 1790) از طریق زیست‌سنجی با غوطه‌وری لاروهای آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از میان این ترکیبات، ترکیب پروپیلن-*N* و *N'*-بیس *O* و *O'*-دی اتیل فسفر آمیدوتیوات *(propylene-N,N'-bis(O,O'-diethylphosphoramidothioate))* بیشترین اثر را داشته و LC_{50} ی تماسی آن روی شته سیاه افاقیا، سوسک برگ‌خوار نارون، شب‌پره برگ‌خوار توت و زنبور برگ‌خوار رز به ترتیب ۳۱۷۴/۲۸، ۲۵۳۶/۷۲، ۳۴۷۴/۶۹ و ۳۶۲۷/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر (پی پی ام) محاسبه شد. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و استرازهای عمومی در نمونه‌های تیمار شده با این ترکیب برای هر چهار آفت فوق‌مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، میزان I_{50} بازده ترکیب روی استیل کولین استراز هر چهار آفت فوق‌تعیین شد و کمترین مقدار I_{50} مربوط به ترکیب پروپیلن-*N* و *N'*-بیس *O* و *O'*-دی متیل فسفر آمیدوتیوات بود که روی شب‌پره برگ‌خوار توت بدست آمد. امروزه این نکته ثابت شده است که بین ساختار شیمیایی و فعالیت بیولوژیکی (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) ترکیبات رابطه مستقیم وجود دارد. اطلاعات بدست آمده از این پژوهش پیشنهاد می‌کند که برای کشف ترکیبات حشره‌کش جدیدتر در آینده می‌توان روی خاصیت حشره‌کشی مشتقات مربوط به ترکیب پروپیلن-*N* و *N'*-بیس *O* و *O'*-دی اتیل فسفر آمیدوتیوات متمرکز شد.

کلیدواژه‌ها: فسفر آمیدها، حشره‌کشی، استیل کولین استراز، QSAR

مقدمه

استفاده می‌شود که شامل حشره‌کش‌ها، گیاهان دست-کاری شده ژنتیکی و کنترل بیولوژیک می‌باشند. همه این عوامل سود و زیان خود را داشته و هیچ یک از آن‌ها به-طور کامل بی‌ضرر نمی‌باشند (Rechigl and Rechigl, 2000). اثر رضایت‌بخش و مصرف اقتصادی آفت‌کش‌ها منجر به استفاده گسترده‌شان در

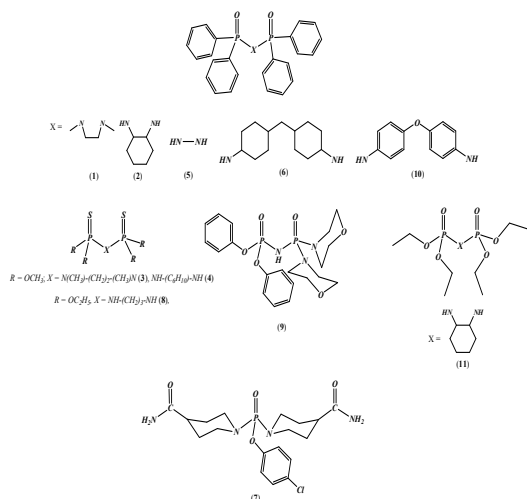
امروزه تلاش‌های فراوانی برای دستیابی به غذای کافی برای تغذیه جمعیت رو به رشد دنیا صورت می‌گیرد. برای تولید محصولات گیاهی کافی و باکیفیت، طیف وسیعی از آفات باید کنترل شوند و در نیل به این هدف، از ابزارهای زیادی برای کنترل حشرات آفت

بررسی خواص حشره کشی ترکیبات جدید فسفر آمیدی است تا بتوان ترکیبات دارای پتانسیل حشره کشی را شناسایی نمود. با توجه به این که این ترکیبات مهارکننده استیل کولین استراز و استرازا هستند، بنابراین میزان مهار استیل کولین استراز و استرازا توسط این ترکیبات در شرایط *in vitro* و *in vivo* نیز مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان با استفاده از این اطلاعات اولیه و با کمک نرم افزار^۱ QSAR ترکیباتی موثرتری را در آینده سنتز نموده و ترکیبات حشره کش موثرتر را شناسایی نمود.

مواد و روش ها

ترکیبات فسفر آمیدی مورد استفاده

نام و مشخصات شیمیایی ترکیبات فسفر آمیدی مورد استفاده در این مطالعه در شکل ۱ و جدول ۱ نشان داده شده است (Gholivand et al., 2014).



شکل ۱- ساختار شیمیایی ترکیبات فسفر آمیدی مورد استفاده در زیست سنجی

Figure. 1. The chemical structure of phosphoramidate compounds used in bioassay

کنترل آفات شده است. به دلیل نیاز به حفظ سلامت محیط زیست و کاهش زیان مواد سمی و مشکل مقاومت به آفت کش ها، جست و جو و کشف حشره کش های جدید الزامی است. کشف حشره کش های جدید بر پایه توسعه و بکارگیری روش های مدیریت تلفیقی آفات از اوایل دهه ۱۹۷۰ میلادی آغاز شد که در این دوره تاکید روی کشف حشره کش های جدیدتر، موثرتر و مولکول های ناپایدارتر بود. علاوه بر این، توسعه مقاومت به حشره کش های موجود نیز یک عامل کلیدی برای کشف ابزارهای جدید کنترل حشرات می باشد (Spark et al., 2013). امروزه بیش از ۵۵۰ گونه از حشرات به یک یا چندین حشره کش مقاومت نشان داده اند و در نتیجه این مساله منجر به طراحی حشره کش های جدید شده تا به سهولت در برنامه مدیریت مقاومت به حشره کش ها (Insect Resistance Management) مورد استفاده قرار گیرند (Roush, 1989; Whalon et al., 2008). با توجه به این عوامل، کشف حشره کش های جدید یک موضوع جالب برای علاقه مندان و موضوع خیلی از پژوهش ها بوده است.

ترکیبات فسفره آلی نقش بسیار مهمی در فرایندهای بیوشیمیایی بدن موجودات زنده برعهده دارند. فرآیندهای از قبیل فسفوسنتز، متابولیسم، سنتز قندها، ساختار ماریچی اسید نوکلئیک، سیستم کوآنزیم ها و بسیاری از موارد دیگر اهمیت خود را از فسفر کسب می کنند (Chesnut, 2003). امروزه حشره کش های فسفره سهم بزرگی از حشره کش ها را به خود اختصاص داده اند که دلیل آن وجود ترکیبات انتخابی در این گروه و ناپایداری آنها در محیط زیست می باشد. غالب حشره کش های فسفره آلی با مهار آنزیم استیل کولین استراز اثر خود را اعمال می کنند. مکانیزم عمل استرها و آمیدهای فسفر در محیط بیولوژیکی شامل برهم کنش آنها با گروه هیدروکسیل سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز می باشد که منجر به غیر فعال شدن این آنزیم ضروری، در بدن موجود زنده می شود (Ghadimi et al., 2008). هدف از این پژوهش،

جدول ۱- نام شیمیایی و فرمول بسته ترکیبات فسفرآمیدی مورد استفاده در زیست‌سنجی
 Table 1. Chemical name and formula of phosphoramidate compounds used in bioassay

Compound	Chemical name	formula
1	Ethylene N, N'-Di methyl-Bis(Di phenyl Phosphoramidate)	$(C_6H_5)_2P(O)N(CH_3)-(CH_2)_2-(CH_3)NP(O)(C_6H_5)_2$
2	1,2- Cyclohexane- N, N'- Bis(Di phenyl Phosphoramidate)	$(C_6H_5)_2P(O)NH(C_6H_{10})HNP(O)(C_6H_5)_2$
3	Ethylene N, N'-Di methyl-Bis(O,O'- Di methyl Phosphor amidothioate)	$(CH_3O)_2P(S)N(CH_3)-CH_2-CH_2-(CH_3)NP(S)(OCH_3)_2$
4	1,2- Cyclohexane- N, N'- Bis(O,O'- Di methyl Phosphor amidothioate)	$(CH_3O)_2P(S)NH(C_6H_{10})HNP(S)(OCH_3)_2$
5	Hydrazine N, N'- Bis(O,O'- Di methyl Phosphor amidothioate)	$(CH_3O)_2P(S)NH-HNP(S)(OCH_3)_2$
6	Methyl Di hexane N, N'- Bis(O,O'-Di phenyl Phosphoramidate)	$(C_6H_5O)_2P(O)NH-C_6H_{10}-CH_2-C_6H_{10}-HNP(O)(OC_6H_5)_2$
7	N, N'- Bis(4-aminocarbonylpeprazineyl) phosphoramidic 4- Chloro phenyl Esther	$(NH_2-C(O)-C_5H_9N)_2-P(O)(p-ClC_6H_4O)$
8	propylene -N, N'-bis (O, O' diethyl phosphoramidothioate)	$(CH_3CH_2O)_2P(S)NH-(CH_2)_3-HNP(S)(OCH_2CH_3)_2$
9	O,O'- Di ethyl-Di morpholin-emido di phosphate	$(C_6H_5O)_2P(O)NHP(O)(NC_4H_8O)_2$
10	Oxy Di hexane N, N'- Bis(O,O'-Di phenyl Phosphoramidate)	$(C_6H_5O)_2P(O)NH-C_6H_4-O-C_6H_4-HNP(O)(OC_6H_5)_2$
11	1,2- Cyclohexane- N, N'- Bis(O,O'- Di ethyl Phosphoramidate)	$(CH_3CH_2O)_2P(O)N(C_6H_{10})NP(O)(OCH_2CH_3)_2$

پرورش حشرات

در این پژوهش از چهار حشره متعلق به راسته‌های مختلف شامل شته سیاه افاقیا *Aphis craccivora* (Hemiptera) (Koch, 1854)، سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera) (Müller, 1766)، شب‌پره برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* (Lepidoptera) (Walker, 1859) و زنبور برگ‌خوار رز *Achropus rosae* (Hymenoptera) (Linnaeus, 1790) استفاده شد. شته سیاه افاقیا از درختچه‌های افاقیا، زنبور برگ‌خوار رز از بوته‌های رز و سوسک برگ‌خوار نارون نیز از درختان نارون واقع در محوطه دانشگاه گیلان، واقع در رشت و شب‌پره برگ‌خوار توت از توتستان‌های واقع در شهرستان رشت در تابستان ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. حشرات

جمع‌آوری شده در شرایط آزمایشگاهی و در اتاق پرورش با دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد نگهداری شدند.

هم‌سن سازی حشرات

حشرات جمع‌آوری شده یک نسل در آزمایشگاه بر روی میزبان مربوطه پرورش داده شدند و در مورد شته افاقیا از حشره بالغ هم‌سن و در مورد سه حشره دیگر از لارو سن سوم هم‌سن برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی استفاده شد.

زیست‌سنجی

برای آزمون‌های زیست‌سنجی از روش غوطه‌ور کردن حشرات در محلول سمی استفاده شد (Hill and Foster, 2000). شته سیاه افاقیا، سوسک برگ‌خوار نارون، شب‌پره

کار تکرار شد (Ellman et al., 1961). سپس از شیب خط برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد. فعالیت استرازاها به روش (van Asperen, 1962) اندازه گیری شد. ابتدا نمونه‌ها در بافر فسفات حاوی تریتون Triton X-100 هموژنایز شدند و سپس در ۱۰۰۰۰ ×g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول رویی به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استراز، ۱۲/۵ میکرولیتر نمونه به چاهک الایزا حاوی ۱۱۲/۵ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد. بعد از آن با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر سوبسترا (۱/۸ mM پتا-نفتیل استات، ۰/۵ mM آلفا-نفتیل استات) واکنش آغاز شد. پس از آن با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول فاست بلو آر آر (۰/۰۷۵٪) جذب ماده رنگی حاصل از واکنش به ترتیب در ۴۵۰ و ۵۴۰ نانومتر به وسیله میکروپلت به مدت ۱۲ دقیقه و با فاصله زمانی دو دقیقه خوانده شد. لازم به ذکر است که به منظور محاسبه فعالیت ویژه آنزیم، منحنی استاندارد محصول تولید شده با استفاده از غلظت‌های ۶/۳۵، ۱۲/۵، ۵۰، ۱۵۰ میکرومولار نفتول رسم گردید (van Asperen, 1962). این آزمایش در چهار تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری I₅₀ ترکیبات روی استیل کولین استراز

ابتدا ۱۰ میکرولیتر از عصاره آنزیم استیل کولین استراز با بازدارنده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق اینکوبه شد. سپس بقیه مراحل همانند بند سنجش فعالیت آنزیم استیل-کولین استراز انجام شد. با استفاده از داده‌های بدست آمده، I₅₀ و حدود اطمینان آن تخمین زده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد و با نرم افزار (SAS 1997) انجام شد. میزان LC₅₀ و حدود اطمینان آن با استفاده از نرم‌افزار Polo-pc برای ترکیبات مختلف تخمین زده شد (LeOra Software, 1987). مرتب کردن داده‌ها اعم از محاسبات میانگین‌ها، خطای استاندارد،

برگ‌خوار توت و زنبور برگ‌خوار رز در ابتدا با غلظت ۵۰۰۰ میلی گرم برمیلی لیتر تیمار شده و به ترتیب بر روی برگ اقاچیا، نارون، توت و رز منتقل شدند و میزان مرگ-ومیر ۲۴ ساعت بعد از مواجهه محاسبه شد. سپس ۴ غلظت ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم بر لیتر برای انجام آزمون‌های زیست‌سنجی نهایی انتخاب شدند. شته‌های بالغ و لاروهای سن سوم سوسک برگ‌خوار نارون، شب‌پره برگ‌خوار توت و زنبور برگ‌خوار رز با روش غوطه‌ور سازی به مدت ۲۰ ثانیه در غلظت‌های مختلف فرو برده شدند. آزمایش در ۴ تکرار ده تایی انجام و بعد از ۲۴ ساعت میزان تلفات آن‌ها ثبت شد.

سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و استرازاها عمومی

فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و استرازاها عمومی در حشرات تیمار شده با غلظت‌های مختلف ترکیب پروپیلن-N و -N' بیس O و O'-دی اتیل فسفرآمیدوتیوات (تیمار شده تحت شرایط *in vivo*) اندازه گیری شد. بدین منظور حشرات زنده مانده پس از ۲۴ ساعت تیمار، به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. برای تهیه عصاره آنزیمی، هر لارو سوسک برگ-خوار نارون در ۳۰۰ میکرولیتر، لارو زنبور برگ‌خوار رز و شب‌پره برگ‌خوار توت در ۱۰۰ میکرولیتر و هر عدد شته در ۴۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی تریتون X-100 هموژنایز و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شده و قسمت بالایی محلول به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا محلول سوبسترا با غلظت ده میلی‌مولار از استیل تیوکولین یداید با بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) تهیه شد. علاوه بر آن محلول دیگری به نام المن شامل DTNB، NaHCO₃، بافر فسفات آماده شد. این محلول‌ها به اضافه عصاره آنزیمی، تولید آنیون زرد رنگ می‌کند که در ۴۱۲ نانومتر بیشترین جذب را دارد و هر یک دقیقه میزان جذب قرائت شد و حداقل برای ده مرتبه این

با توجه به نتایج آزمایش غربال‌گری، از میان ترکیبات مورد آزمون، ترکیب پروپیلن-N و N'-بیس ترکیبات فسفرآمیدوتیوات برای انجام زیست‌سنجی و محاسبه LC₅₀ انتخاب شد و میزان LC₅₀ محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار POLO-PC در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که میزان LC₅₀ این ترکیب برای سوسک برگ‌خوار نارون از بقیه حشرات مورد مطالعه کمتر بوده است و بنابراین سمیت نسبی این ترکیب روی سوسک برگ‌خوار نارون با حدود اطمینان ۹۵٪ (۱/۵۳-۱/۰۰۹) برابر شته افاقیا، (۱/۸۷-۱/۱۳) برابر شب‌پره برگ‌خوار توت و (۱/۸۸-۱/۱۶) برابر زنبور برگ‌خوار رز بود.

رسم نمودارها و تعیین شیب خط آزمون‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ صورت گرفت.

نتایج

آزمون سمیت

سمیت یازده ترکیب فسفرآمیدی روی *A. rosae* غربال‌گری شد و نتایج نشان داد که تنها در مورد ترکیب شماره ۸ یعنی پروپیلن-N،N'-بیس (O،O')-دی اتیل فسفرآمیدوتیوات در غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تلفات روی هر چهار آفت قابل توجه بود (۸۰-۹۵ درصد مرگ و میر) (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین درصد مرگ و میر شته سیاه افاقیا *Aphis craccivora*، سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* شب‌پره برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* و زنبور برگ‌خوار رز *Achropus rosae* تیمار شده با غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ترکیبات فسفرآمیدی

Table 2. The mean mortality percentage of *Aphis craccivora*, *Xanthogaleruca luteola*, *Glyphodes pyloalis* and *Achropus rosae* treated with 5000 mg/l of phosphoramidate compounds

Compound	Percentage of mortality after 24 h (5000 mg/l)			
	<i>A. craccivora</i>	<i>X. luteola</i>	<i>G. pyloalis</i>	<i>A. rosae</i>
1	5±0.01e	5±0.04e	0d	10±0.15d
2	0f	5±0.1e	0d	5±0.01e
3	5±0.03e	15±0.08d	0d	10±0.2d
4	5±0.5e	0f	0d	0f
5	15±0.6cd	80±1.5ab	0d	30±0.7bc
6	5±0.10e	10±0.95de	0d	25±2.4c
7	20±1.5b	45±2.56c	0d	30±3.01bc
8	90±2.1a	95±1.75a	90±2.06a	80±1.1a
9	20±0.82b	60±3.14b	55±2.76b	45±2.12b
10	10±0.81d	70±1.81b	0d	15±1.3cd
11	15±0.48c	85±1.54ab	10±0.68c	25±2.55c

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، از نظر آماری در سطح 5% اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی).

* Different letters in each column are significant at $p < 0.05$ according Tukey's test

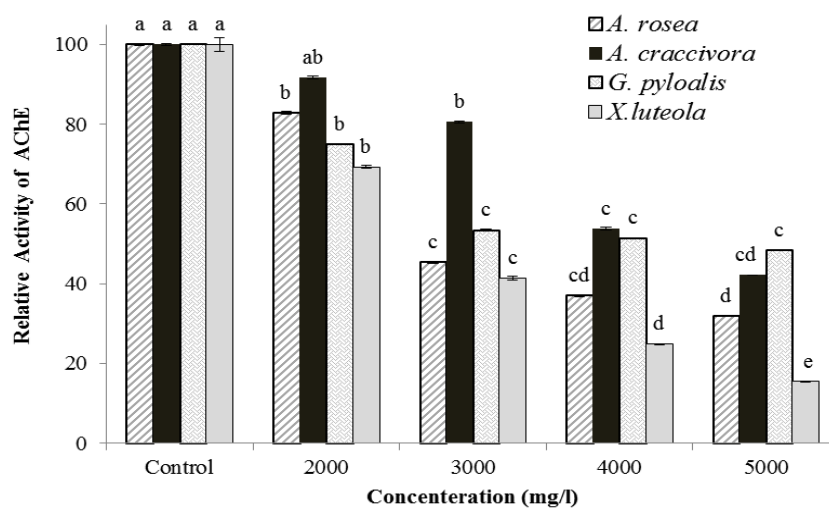
شریفی و همکاران: بررسی تاثیر حشره کشی ترکیبات جدید...

و آنزیم‌های سم‌زدای استراز عمومی حشرات مورد
آزمون ارزیابی شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲
مشاهده می‌شود این ترکیب بیشترین اثر مهارکنندگی را
روی آنزیم استیل کولین استراز در *X. luteola*
مقایسه با سایر حشرات از خود نشان داد.

تاثیر بازدارندگی ترکیب پروپیلن -N',N- بیس
(O',O- دی اتیل فسفرآمیدوتیوات) روی استیل
کولین استراز و استرازهای عمومی در شرایط
in vivo
اثر پروپیلن -N',N- بیس (O',O- دی اتیل-
فسفرآمیدوتیوات) روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

جدول ۳- تخمین پارامترهای خط دز- پاسخ ترکیب پروپیلن -N',N- بیس (O',O- دی اتیل فسفرآمیدوتیوات) روی
Achropus rosae و *Glyphodes pyloalis* *Xanthogaleruca luteola* *Aphis craccivora*
Table 3. Estimation of the dose-response parameters of propylene -N, N'-bis (O, O' diethyl
phosphoramidothioate) on *Aphis craccivora*, *Xanthogaleruca luteola*, *Glyphodes pyloalis* and *Achropus rosae*

	LC ₅₀ (mg/ml)			
	<i>A. cracci</i> <i>vora</i>	<i>X. luteola</i>	<i>G. pyloalis</i>	<i>A. rosae</i>
propylene -N, N'-bis (O, O' diethyl phosphoramidothioate)	3174.28 (3584.9- 2770.2)	2537.72 (1829.4-3012.9)	3474.69 (2997.8-4072.3)	3627.43 (313.5-4352.2)
Slope ± SE	4.76±0.89	3.25±0.83	3.98±0.89	3.75±0.85
K ²	0.73	0.134	0.78	1.64



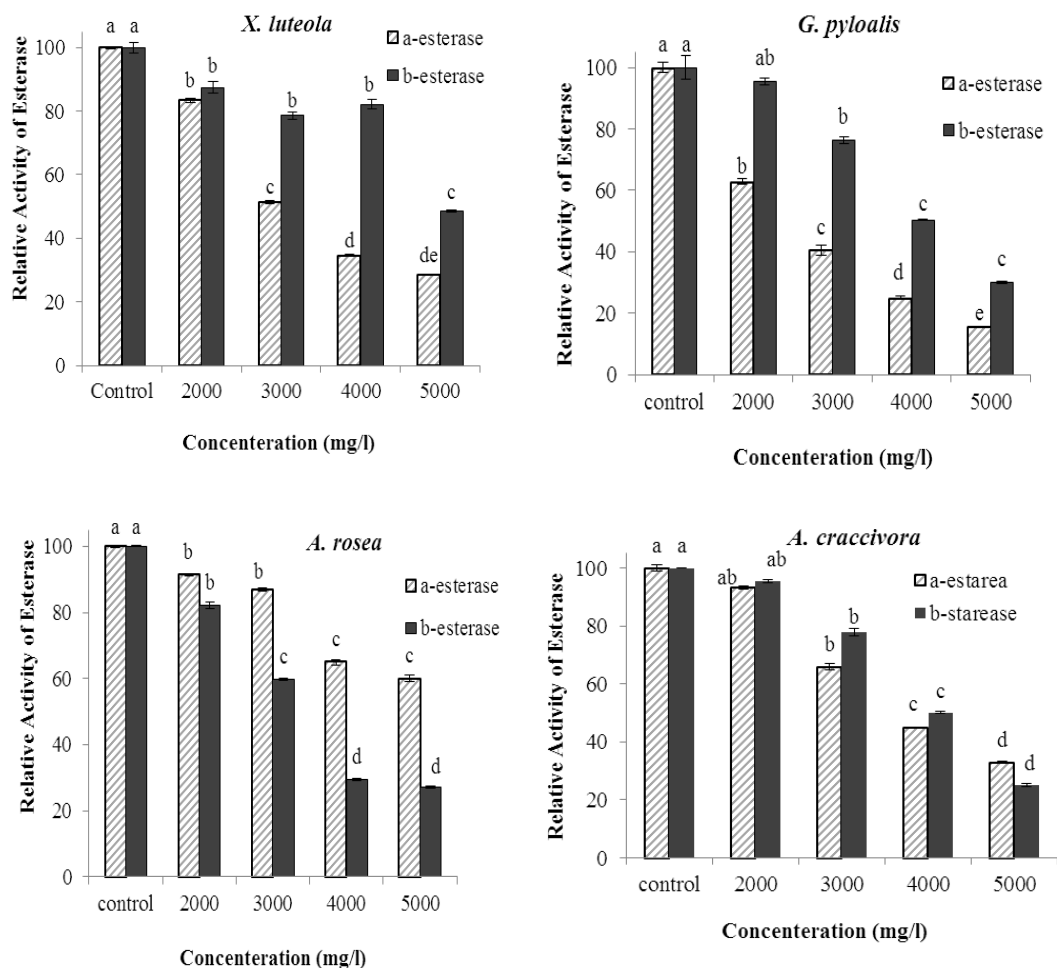
شکل ۲- فعالیت نسبی آنزیم استیل کولین استراز در *Glyphodes pyloalis* *Xanthogaleruca luteola* *Aphis craccivora*
و *Achropus rosae* تیمار شده با ترکیب پروپیلن -N',N- بیس (O',O- دی اتیل فسفرآمیدوتیوات)
* میانگین‌های دارای حروف متفاوت، از نظر آماری در سطح 5% اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند (آزمون توکی)

Figure 2. Relative activity of the acetylcholinesterase (AChE) from *Aphis craccivora*,
Xanthogaleruca luteola, *Glyphodes pyloalis* and *Achropus rosae* treated with propylene -N, N'-bis (O,
O' diethyl phosphoramidothioate)

*Mean with different letters have statistically significant difference at 5% level (Tukey's test)

شوند. به همین دلیل ترکیب پروپیلن- N',N - بیس (دی- O',O -اتیل فسفرآمیدوتیوات) نیز قادر به مهار آنزیم‌های استراز می‌باشد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ترکیب پروپیلن- N',N - بیس (دی- O',O -اتیل فسفرآمیدوتیوات) میزان فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافته است.

آنزیم آلفا- استراز و بتا-استراز در تمام حشرات مورد مطالعه تحت تاثیر ترکیب پروپیلن- N',N - بیس (دی- O',O -اتیل فسفرآمیدوتیوات) قرار گرفته است (شکل ۳). کربوکسیل استرازاها طبق گروه‌بندی آلدریج جزو گروه B- استراز بوده و در مکان فعال خود دارای اسید آمینه سرین هستند و توسط پاراکسان مهار می-



شکل ۳- فعالیت نسبی آنزیم‌های استراز عمومی در

Aphis craccivora، *Xanthogaleruca luteola*، *Glyphodes pyloalis* و *Achropus rosae* تیمار شده با ترکیب پروپیلن- N',N - بیس (دی- O',O -اتیل فسفرآمیدوتیوات)

*میانگین‌های دارای حروف متفاوت، از نظر آماری در سطح 5% اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند (آزمون توکی)

Figure 3. The relative activity of the general esterase (α and β) from *Aphis craccivora*, *Xanthogaleruca luteola*, *Glyphodes pyloalis* and *Achropus rosae* treated with propylene- N, N' -bis (O, O') diethyl phosphoramidothioate)

*Mean with different letters have statistically significant difference at 5% level(Tukey's test)

دست‌یابی به حشره‌کش‌های مطلوب‌تر از منظر حفظ محیط زیست به شدت احساس می‌شود. از آنجایی که این فرایند بسیار طولانی و هزینه‌بر است، دانشمندان در پی یافتن روش‌های جدید برای کاهش زمان و هزینه‌ها می‌باشند (Sparks, 2013). در این تحقیق بررسی‌هایی در زمینه اثرات حشره‌کشی ترکیبات فسفرآمیدی انجام شد تا اطلاعات لازم برای مطالعات رابطه ساختمان و فعالیت بیولوژیکی (QSAR) به‌عنوان یک روش جدید در کشف حشره‌کش‌ها بدست آید. استیل‌کولین ماده‌ای اساسی است که به‌عنوان ناقل عصبی در سیستم عصبی حشرات نقش ایفا می‌کند. آنزیم استیل‌کولین استراز وظیفه تجزیه این ناقل را در شکاف عصبی به‌عهده داشته تا از تحریک بیشتر سلول‌ها جلوگیری کند (Fields and Burnstock, 2006). حشره‌کش‌های

تاثیر بازدارندگی ترکیبات فسفرآمیدی روی استیل کولین استراز در شرایط *in vitro*

میزان I_{50} برای یازده ترکیب در شرایط *In vitro* روی فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز *X. craccivora* A. و *G. pyloalis luteola* محاسبه شد و نتایج آن در جدول ۴ آمده است. این داده‌ها نیز بر این موضوع تاکید دارد که ترکیب پروپیلن-N',N- بیس (O',O-دی‌ایتیل فسفرآمیدوتیوات) (ترکیب شماره ۸) از نظر I_{50} موثرتر از سایر ترکیبات بود. در این آزمایش *G. pyloalis* در مقایسه با سایر حشرات I_{50} کمتری را به خود اختصاص داد.

بحث

در سال‌های اخیر نیاز به کشف و تکوین حشره‌کش‌های جدید با توجه به افزایش مقاومت گونه‌های آفت و میل به

جدول ۴- تخمین I_{50} ترکیبات فسفرآمیدی و حدود اطمینان (۹۵٪) روی آنزیم استیل کولین استراز *Aphis craccivora*, *Achropus rosae* و *Glyphodes pyloalis Xanthogaleruca luteola*

Table 4. Estimation of I_{50} of phosphoramidate compounds and their 95% confidence limit on AChE from *Aphis craccivora*, *Xanthogaleruca luteola*, *Glyphodes pyloalis* and *Achropus rosae*

compound	I_{50} (mg/l) Confidence (95%)			
	<i>A. craccivora</i>	<i>X. luteola</i>	<i>G. pyloalis</i>	<i>A. rosae</i>
1	143.38 (110.98-190.25)	184.11 (153.16-201.81)	128.15 (102.59-168.15)	117.17 (103.46-159.72)
2	118.21 (102.23-176.53)	114.63 (98.25-143.12)	110.36 (100.20-145.23)	114.82 (101.71-162.86)
3	68.75 (49.22-92.63)	42.73 (16.26-67.55)	75.24 (50.63-98.69)	73.84 (53.94-100.75)
4	128.64 (101.22-184.58)	149.99 (112.76-193.84)	159.41 (111.23-195.43)	109.62 (88.82-126.12)
5	51.02 (30.58-93.59)	39.36 (27.25-71.31)	41.11 (28.29-67.77)	72.52 (54.10-99.88)
6	16.99 (9.6-25.15)	23.15 (19.09-28.05)	13.68 (11.08-16.25)	68.56 (45.27-110.16)
7	38.45 (28.12-45.49)	14.84 (4.64-18.04)	14.87 (12.04-17.73)	40.72 (29.22-92.58)
8	15.28 (10.83-24.22)	10.91 (7.65-11.880)	3.99 (0.79-5.55)	14.96 (11.02-18.22)
9	25.57 (12.62-31.12)	17.08 (14.06-22.07)	8.10 (5.01-10.59)	29.97 (22.71-39.44)
10	32.46 (24.10-45.44)	18.15 (14.31-22.33)	45.87 (39.64-54.27)	21.75 (15.53-31.17)
11	16.84 (9.88-25.86)	17.10 (13.09-21.34)	11.18 (8.25-13.93)	32.57 (21.66-58.06)

غربال‌گری شدند و از میان آن‌ها فقط ترکیب پروپیلن- N',N - بیس (O',O -دی اتیل فسفرآمیدوتیوات) خاصیت حشره‌کشی قابل توجهی علیه هر چهار گونه حشره از خود نشان داد. این ترکیب توانست در هر چهار مورد بیش از هشتاد درصد مرگ و میر را از خود نشان دهد (جدول ۲). بنابراین در مرحله بعد زیست‌سنجی کامل برای این ترکیب روی هر چهار راسته انجام شد. نتایج نشان داد سوسک‌برگ-خوار نارون در میان چهار راسته از کمترین میزان LC_{50} برخوردار بود و در بین آفات مورد استفاده در آزمون حساس‌ترین بود.

در شرایط *in vivo* آنزیم استیل‌کولین استراز *X. luteola* (مکان تاثیر این ترکیبات) نسبت به سه حشره دیگر بیشتر مهار شده بود (شکل ۲). نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که ترکیب پروپیلن- N',N - بیس (O',O -دی اتیل-فسفرآمیدوتیوات) قادر به مهار استرازهای عمومی (آلفا-استراز و بتا-استراز) هر چهار آفت تحت شرایط *in vivo* بود و بین غلظت و میزان مهار این آنزیم رابطه خطی وجود داشت. گزارش شده است که استرازهای عمومی کارایی کاتالیتیکی کوچکی دارند و می‌توانند با ترکیبات سمی پیوند برقرار نموده و آن‌ها را به آرامی تجزیه نمایند (Devonshire, 1998). در مورد پروپیلن- N',N - بیس (O',O -دی اتیل فسفرآمیدوتیوات) هم ممکن است این پدیده اتفاق افتاده و منجر به کاهش فعالیت استرازهای عمومی در شرایط *in vivo* شده باشد.

در شرایط *in vitro* میزان بازدارندگی ترکیبات مورد آزمون (شکل ۱) روی آنزیم استیل‌کولین استراز آفات مذکور بررسی شد و نتایج نشان داد که کمترین میزان I_{50} روی آنزیم کولین استراز (جدول ۴) مربوط به ترکیب شماره ۸ بود، ترکیبات شماره ۶، ۷، ۹ و ۱۱ نیز علی‌رغم این که میزان I_{50} پایینی داشتند، اما مرگ و میر کمی ایجاد نمودند که یکی از دلایل آن می‌تواند نفوذ کم به داخل بدن آفت باشد. این موضوع باید در تحقیقات بعدی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. یکی از فاکتورهای مهم در خاصیت حشره‌کشی ترکیبات شیمیایی توانایی نفوذ در بدن آفت است. لایه

فسفره آلی و کارباماتی با قرار گرفتن در جایگاه فعال آنزیم که آمینو اسید سرین نقش اساسی در شکل‌گیری فضایی آن داشته و با تشکیل پیوندهای هیدروژنی با آمینو اسید یاد شده آنزیم استیل‌کولین استراز را غیرفعال کرده که در نتیجه ناقل عصبی استیل‌کولین در شکاف سیناپسی باقی مانده و تحریکات عصبی هم‌چنان ادامه می‌یابد و در نهایت منجر به مرگ حشرات می‌شود.

فسفرآمیدها دسته‌ای از ترکیبات فسفره آلی هستند که علاوه بر کاربرد فراوانی که به عنوان آفت‌کش دارند، تحقیقات فراوانی نیز روی آن‌ها در جهت مبارزه با سلول‌های سرطانی و هم‌چنین ویروس HIV در حال انجام است. با توجه به هزینه‌های بسیار زیاد بخش تحقیقات و توسعه آفت-کش‌ها و ترکیبات دارویی که ناشی از شناسایی ترکیبات فعال، سنتز، آزمایش روی جانداران و کاستن تاثیر جانبی آن‌ها می‌باشد و همچنین طولانی بودن زمان تحقیقات، محققین بر آن شده‌اند که به دنبال روش‌هایی جهت یافتن ترکیباتی با بیشترین فعالیت بیولوژیکی مورد نظر و کمترین تاثیر جانبی باشند. یکی از این روش‌ها پیشگویی فعالیت‌های بیولوژیکی ترکیبات شیمیایی می‌باشد. مطالعات نشان داده است که مشتقات فسفر آمید و اسید استرها می‌توانند تاثیر مهارکنندگی بسزایی بر آنزیم استیل‌کولین استراز داشته باشند. ترکیبات فسفر آمید و اسید استرها با سه پیوند اصلی یعنی $P=O$ ، $P-O$ و $P-N$ و استخلاف چهارم ($P-X$) شناخته می‌شوند. نتایج نشان داده است که در این ترکیبات پیوندهای $P-X$ ی که X آن‌ها اتم نیتروژن باشد، احتمال فعالیت آنتی‌کولین استرازی بیشتری را از خود نشان داده‌اند (Ghadim et al., 2008).

در این تحقیق نیز ترکیباتی از این دسته انتخاب شدند که در آزمایشگاه شیمی سنتز شده بودند که در برخی موارد نقش کاربردی آن‌ها مشخص نبود، این امکان وجود دارد که برخی از این ترکیبات سنتز شده بتوانند فعالیت حشره‌کشی از خود نشان دهند یا به پژوهشگران ایده‌های مرتبط با سنتز ترکیباتی را بدهند که از خود این خاصیت را نشان دهند. بدین منظور یازده ترکیب موجود روی چهار راسته مختلف

به هزینه‌های بسیار فراوان دارد که با این روش می‌توان این هزینه‌ها را به شدت کاهش داد. در این تحقیق یازده ترکیب فسفرآمیدی از لحاظ توانایی حشره کشی مورد بررسی قرار گرفتند و با این اطلاعات و استفاده از نرم‌افزارهای خاص (3D-QSAR, MOPAC, Docking) که ایده سنتز ترکیبات جدیدتر را می‌دهد، می‌توان ترکیباتی با خاصیت حشره کشی بهتر کشف نمود (Hansen, 2004). با توجه به مطالب بیان شده، می‌توان با استفاده از نرم‌افزارهای یاد شده، تغییراتی در ساختار ترکیب پروپیلن-N',N- بیس (O',O-دی اتیل فسفرآمیدوتیوآت) داد و تحقیقات بعدی روی یافتن مشتقاتی از ترکیبات فسفرآمیدی متمرکز شود که توسط این نرم‌افزارها توصیه می‌شود.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از معاونت آموزشی دانشگاه تربیت مدرس و گیلان به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای این تحقیق تشکر کرده و همچنین از داوران محترمی که با نظرات ارزنده‌ی خود سبب بهبود کیفیت علمی این مقاله شدند قدرانی می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (شماره طرح ۹۴۰۰۴۷۸) انجام شده است که بدین وسیله ریاست محترم صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور سپاسگزاری می‌گردد.

بیرونی کوتیکول بدن حشرات آفت خاصیت غیرقطبی دارد و شرط لازم برای نفوذ در بدن آفت حل شدن در لایه مومی اپیکوتیکول می‌باشد. علاوه بر این از نظر قطبیت، مواد شیمیایی تشکیل دهنده کوتیکول حشرات از بیرون جلد به طرف داخل بدن قطبی‌تر می‌شود. کمترین میزان I_{50} روی شب‌پره برگ‌خوار توت بدست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که علی‌رغم حساس‌تر بودن مکان هدف شب‌پره برگ‌خوار توت، این حشره در مقایسه با سوسک برگ‌خوار نارون به ترکیب پروپیلن-N' و N'-بیس O و O'-دی اتیل فسفرآمیدوتیوآت میزان LC_{50} بالاتری داشته است. ممکن است نتیجه بدست آمده به این صورت توجه شود که این ترکیب در رسیدن به مکان هدف شب‌پره برگ‌خوار توت با سیستم دفاعی بیشتری (کوتیکول، آنزیم‌های سم‌زدا، بافت چربی و سایر موانع...) مواجه شده است. لذا علی‌رغم حساس بودن آنزیم کولین استراز شب‌پره برگ‌خوار توت در مقایسه با سوسک برگ‌خوار نارون، نتایج *in vivo* نشان داد که سوسک برگ‌خوار نارون حساس‌تر است. این نکته به اثبات رسیده است که بین ساختار شیمیایی ترکیبات و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها رابطه‌ای وجود دارد که شیمی‌دان‌های امروزی آن را با عنوان QSAR می‌شناسند و امروزه از این فرایند استفاده‌های فراوان می‌شود. یکی از کاربردهای آن شناسایی ترکیباتی است که خاصیت حشره-کشی دارند، زیرا کشف و شناسایی یک ترکیب سمی نیاز

REFERENCES

- Devonshire, A.L. 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 353 (1376): 1677-1684.
- Chesnut, D.B. 2003. Atoms-in-molecules and electron localization function study of the phosphoryl bond. Journal of Physics and Chemistry, 107 (45): 2307-2320.
- Ellman, G.L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7: 88-95.
- Fields, R.D., and Burnstock, G. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. Nature Reviews Neuroscience, 7: 423-436.

Ghadimi, S., Ebrahimi Valmoozi, A.A., Pourayoubi, M., and Samani, K.A. 2008. Structure-activity study of phosphoramido acid esters as acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23: 556–561.

Gholivand, K., Ebrahimi, A.A., and Bonsaii, M. 2014. Synthesis and crystal structure of new temephos analogues as cholinesterase inhibitor: molecular docking, QSAR study, and hydrogen bonding analysis of solid state. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62: 5761–5771.

Hansen, O.C. 2004. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) and pesticides. *Danish Environmental Protection Agency, Pesticides Research*, 94: 52-64.

LeOra Software 1987. *POLO-PC a user's guide to probit or logit analysis*. LeOra Software, Berkeley.

Hill, T.A., and Foster, R.E. 2000. Effect of insecticides on the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(3): 763-768.

Rehcigl, J.E., and Rehcigl, N.A. 2000. Insect pest management: techniques for environmental protection. In: Panizzi, A.R., and J. R. P. Parra (eds.), *Insect bioecology and nutrition for integrated pest management*. Lewis Publishers. New York. pp: 612-745.

Roush, R. 1989. Designing resistance management programs: how can you choose? *Journal of Pesticide Science*, 26: 423–440.

SAS Institute Inc. 1997. *SAS/STAT User's Guide for Personal Computers, Version 6.12*. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Sparks, T.C. 2013. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56: 23-41.

Sparks, T.C., Watson, G.B., Loso, M.R., Geng, C., Babcock J.M., and Thomas. J. D. 2013. Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insect. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 107: 1-7.

van Asperen, K. 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8: 401-416.

Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D., and Hollingworth, R.M. 2008. *Analysis of global pesticide resistance in arthropods*. CAB International, Wallingford.

Investigating the insecticidal effect of new phosphoramidate compounds on some insect pests

M. Sharifi¹, M. Ghadamyari^{2*}, K. Gholivand³, and A. A. Ebrahimi-Valmoozi⁴

1. Ph.D. Student of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Guilan University, Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Guilan University, Iran (mghadamyari@gmail.com)
3. Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Tarbiat Modares University, Iran
4. PhD Student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Tarbiat Modares University, Iran

Received: 6 July 2015

Accepted: 7 April 2016

Abstract

Some derivatives of phosphoramidate compounds are able to inhibit acetylcholinesterase (AChE) and therefore could be considered as insecticides. In this study, insecticidal effects of eleven phosphoramidate compounds were tested on *Aphis craccivora* Koch, *Xanthogaleruca luteola* Müller, *Glyphodes pyloalis* Walker and *Achropus rosae* Linnaeus. Among these compounds, propylene -N, N'-bis O and O' diethyl phosphoramidothioate showed the highest insecticidal effect and the amounts of LC₅₀s obtained were 3174.28, 2536.72, 3474.69 and 3627.43 mg/l for *A. craccivora*, *X. luteola*, *G. pyloalis* and *A. rosae*, respectively. The activities of AChE and general esterases in the insects treated with these compounds were measured. Similarly, the I₅₀ of these compounds was determined *in vitro* on AChE activity in each insect. The results showed the lowest I₅₀ to propylene-N, N'-bis (O, O' dimethyl phosphoramidothioate) on *G. pyloalis*. Today, a direct relationship was observed between chemical structure and biological activity (QSAR) of compounds. According to the results obtained from this study, we can focus on insecticidal effect of propylene -N, N'-bis (O, O' diethyl phosphoramidothioate) derivatives in order to find new insecticides.

Key words: *Phosphoramidate, Insecticide, AChE, QSAR*