Archive of SID

تحقیقات آفات گیاهی
۱۳۹۸ -۹ (۲): ۲۵-۳۷

بررسی مقاومت کنه قرمز مرکبات *Panonychus citri* به کنه‌کش بروموپروپیلات و تاثیر سه نوع سینرژیست روی سطح مقاومت آن

حمیرا امامی[1] و محمد قدمیاری[1]*

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۱)

چکیده

ویژگی‌های زیست‌شناسی کنه قرمز مرکبات، *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) مانند دوره زندگی، نتاج فراوان و تولیدمثل نرزایی باعث شده تا توانایی بالایی در گسترش مقاومت به کنه‌کش‌ها داشته باشد. یکی از ترکیبات توصیه شده توسط سازمان حفظ نباتات برای کنترل کنه قرمز مرکبات، بروموپروپیلات است. در این تحقیق میزان مقاومت این کنه به بروموپروپیلات مورد بررسی قرار گرفت. آزمون‌های زیست‌سنجی سموم و سینرژیست‌ها با برج پاشش انجام شد. نتایج نشان‌دهنده مقاومت ۱۰/۶۳ برابری این کنه نسبت به بروموپروپیلات می باشد. پیش‌تیمار جمعیت حساس (SP) کنه قرمز مرکبات با بازدارنده سیتوکروم اکسیداز (PBO)، بازدارنده استراز (TPP) و بازدارنده گلوتاتیون اس-ترانسفراز (DEM) سمیت بروموپروپیلات را به‌ترتیب ۵/۵۸، ۵/۸۹ و ۴/۵۹ برابر افزایش داد، در حالی‌که این نسبت‌ها برای جمعیت مقاوم (RP) به‌ترتیب ۲/۴۴، ۲/۵۱ و ۲/۳۸ برابر بود. نتایج آزمون‌های سینرژیستی نشان‌دهنده‌ی عدم دخالت آنزیم‌های استرازی، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و مونواکسیژناز در مقاومت به بروموپروپیلات می‌باشند. هرچند که میزان فعالیت سیستم مونواکسیژناز، آلفا-، بتا- استراز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز در جمعیت مقاوم به‌ترتیب ۱/۳۹، ۱/۷۰، ۱/۸۳ و ۱/۳۴ برابر بیش‌تر از جمعیت حساس بود. اندازه‌گیری فراسنجه‌های کینتیکی نشان‌دهنده تغییر کیفی در آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون اس-ترانسفرازی می‌باشد. دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا ممکن است ناشی از کاربرد کنه‌کش‌هایی باشد که علیه جمعیت مقاوم در باغ‌های مرکبات به‌کار برده‌شده‌است. بنابراین به احتمال سازوکارهایی غیر از مقاومت متابولیکی مانند غیرحساس شدن مکان هدف یا کاهش نفوذ، دلیل بروز مقاومت می‌باشد. برای جلوگیری از توسعه بیشتر مقاومت ضروری است علاوه بر کاهش مصرف بروموپروپیلات، از کنه‌کش‌هایی با شیوه تاثیر متفاوت استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: مقاومت، کنه‌کش، کنه قرمز مرکبات، سینرژیست، آنزیم‌های سم‌زدا

*نویسنده مسئول: mghadamyari@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کنه قرمز مرکبات، *Panonychus citri* (McGregor)، یکی از آفات مهم گیاهی در جهان (Kasap, 2009) و از آفات مهم مرکبات در شمال ایران می‌باشد که در سال ۱۳۱۵ به کشور وارد شده است (Behdad, 2009). یکی از روش‌های رایج در کنترل کنه قرمز مرکبات، استفاده از ترکیبات کنه‌کش می‌باشد (Feng and Isman, 1995). کاربردهای پیوسته کنه‌کش برای محدود کردن جمعیت کنه زیر سطح زیان اقتصادی همراه با دوره‌ی زندگی کوتاه، توانایی تولیدمثل بالا و تولیدمثل جنسی هاپلو-دیپلوئیدی باعث تسهیل توسعه‌ی مقاومت در این کنه شده‌است (Gerson and Cohen, 1989). این کنه مقاومت ۲۳ برابری به دیکوفول[1] نشان داده و همچنین مقاومت به پایرتروئیدها[2]،کنه‌کش‌های فسفره آلی[3]، آمیتراز[4]، پروپارژیت[5]، دیافنتیورن[6] و مهارکننده‌های انتقال الکترونی میتوکندری[7] (METI) در این کنه گزارش شده است (Ran *et al*., 2009; Yu *et al*., 2011). پیریدابین[8] در دهه گذشته به طور گسترده به‌منظور کنترل کنه‌های آفت، روی گیاهان زینتی و باغ‌ها در ایالات متحده آمریکا مورد استفاده قرار گرفته است (Sterk and Versmissen, 1992). امروزه، مقاومت ۱۱/۲ برابری کنه قرمز مرکبات به این آفت‌کش ناشی از عملکرد گلوتاتیون اس-ترانسفراز[9] گزارش شده است (Meng *et al*., 2000; Niu *et al*., 2011). فوکسیم[10] از کنه‌کش‌های فسفره آلی است که به‌صورت گسترده برای کنترل آفات کنه‌ای استفاده می‌شود و کنه قرمز مرکبات ۱۸/۶ برابر به آن مقاوم شده‌است، کربوکسیل استراز[11] و استیل کولین استراز عوامل مقاومت به این ترکیب تعریف شده‌اند (Chen *et al*., 2009). هم‌چنین مشخص شده است که کنه قرمز مرکبات توانایی بالایی در توسعه‌ی مقاومت به هگزیتیازوکس[12] دارد و طی ۲۰ نسل گزینش با این ترکیب، ۳۵۳۲ برابر مقاومت به این ترکیب افزایش یافت. سطح مقاومت به هگزیتیازوکس در تمام مراحل رشدی آن بالا است، همچنین تاثیر پیرونیل‌بوتوکساید روی این آفت‌کش نیز بررسی شد و تاثیر سینرژیستی در آن مشاهده نشد (Yamamoto *et al*., 1995). در آزمایش‌های زیست‌سنجی، سمیت کنه‌کش اسپیرودایکلوفن[13]، اسپیروتترامات[14] و اسپیرومسیفن روی کنه قرمز مرکبات بررسی شد و این نتیجه به‌دست آمد که کنه قرمز مرکبات نسبت به اسپیرودیکلوفن مقاومت ۳/۷ برابری دارد و اسپیرودیکلوفن با دو کنه‌کش دیگر مقاومت تقاطعی دارند (Hu *et al*., 2010; Ouyang *et a*l., 2012). سینرژیست[15] پیپرونیل بوتوکساید و گلوتاتیون اس-ترانسفراز مقاومت این کنه را نسبت به اسپیرودیکلوفن کاهش داد (Yu *et al*., 2011). بیفنازات[16] از مشتقات هیدرازین است، سیتوکروم B[17] در مقاومت کنه قرمز مرکبات به بیفنازات نقش دارد و هم‌چنین مقاومت تقاطعی آن به اسکوئینوسیل[18] نیز گزارش شده است (Dekeyser, 2005; Van Leeuwen *et al*., 2011). مقاومت کنه قرمز مرکبات نسبت به فن‌پروپاترین[19]، اوکس[20] و فن بوتاتین اکساید[21] گزارش شده است (Meng *et al*., 2002; Doker and Kazak, 2012). مقاومت ۱۳/۴ برابری به آبامکتین در کنه قرمز ناشی از افزایش سم‌زدایی مبتنی بر گلوتاتیون اس‌ترانسفراز معرفی شده است (Liao *et al*., 2015).

1. Dicofol
2. Pyrethroid
3. Organotin Miticide
4. Amitraz
5. Propargite
6. Diafenthiuron
7. Mitochondrial Electron Transport Inhibitors
8. Pyridabine
9. Glutathione S-Transferase
10. Phoxim
11. Carboxylesterases
12. Hexythiazox
13. Spirodiclofen
14. Spirotetramat
15. Synergist
16. Bifenazate
17. Cytochrome B
18. Acequinocyl
19. Fenpropathrin
20. Ovex
21. Fenbutatinoxid

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از ترکیباتی که در شمال کشور برای کنترل این کنه استفاده می‌شود، بروموپروپیلات[1] (ایزوپروپیل ۴، ۴۹-دیابروموبنزیلات)[2] با نام تجارتی نئورون®[3] است (Norbakhsh, 2017). بروموپروپیلات، کنه‌کشی تماسی به نسبت بادوام است که روی پنبه، درختان میوه، انگور و گیاهان زینتی مصرف می‌شود. این کنه‌کش در غلظت به نسبت بالا روی کنه‌های مقاوم به ترکیبات فسفره موثر است (Talebi, 2010). تاکنون در آفات متعلق به رده کنه‌ها، مقاومت تقاطعی به بروموپروپیلات در کنه دو لکه‌ای *Tetranychus urticae* (Koch) مقاوم به فن‌پیروکسی‌میت گزارش شده است (Kim *et al*., 2006)، حساسیت کنه قرمز اروپایی به بروموپروپیلات از طریق پاشش کنه‌کش روی دیسک برگی با دستگاه برج پاشش اندازه‌گیری شد، میزان LC_{50} بین ۰/۸-۳/۶ گزارش شده است (Kumral and Kovanci, 2007). همچنین گزارش شده است که این کنه‌کش با فن‌پیروکسی میت[4] مقاومت تقاطعی دارد (Kim *et al*., 2004). تاکنون پژوهشی در زمینه مقاومت کنه قرمز مرکبات به بروموپروپیلات انجام نشده‌است. هدف این تحقیق، تعیین میزان مقاومت کنه قرمز مرکبات به بروموپروپیلات، تاثیر سینرژیست‌ها روی میزان مقاومت و اندازه‌گیری آنزیم‌های سم‌زدا در جمعیت حساس و مقاوم به این کنه‌کش است. از این اطلاعات می‌توان در برنامه‌ریزی مدیریت مقاومت کنه قرمز مرکبات استفاده کرد (Rodrigues *et al*., 2013).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جمعیت کنه قرمز مرکبات

جمعیت مشکوک به مقاومت از باغ‌های مرکبات با سابقه سم‌پاشی واقع در شهر رامسر (مرکز تحقیقات مرکبات) و جمعیت مشکوک به حساسیت نیز از باغی واقع در روستای دلیوندان صومعه‌سرا در سال ۲۰۱۷ جمع‌آوری شد که هیچ سابقه‌ای از کاربرد آفت‌کش‌ها در این باغ وجود نداشت.

پرورش کنه قرمز مرکبات

به‌منظور پرورش کنه قرمز مرکبات از نارنج (*Citrus aurantium* L.) استفاده شد. نهال‌ها از کاشت مستقیم بذر نارنج در خاک تهیه شدند. به منظور جلوگیری از اختلاط جمعیت مشکوک به مقاومت و حساس، جمعیت‌ها به صورت جداگانه در شرایط گلخانه‌ای (دمای ۳±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد) روی نهال‌های نارنج نگهداری شدند.

هم‌سن‌سازی کنه قرمز مرکبات

ابتدا برگ‌های مرکبات با آب شسته شد، سپس برگ‌ها روی پنبه خیس داخل ظروف پتری قرار داده شدند، به طوری‌که قسمت زیری برگ روی پنبه خیس قرار گرفت. اطراف برگ نیز نوار نازکی از پنبه به‌منظور جلوگیری از فرار کنه‌ها ایجاد شد، کنه‌های نر و ماده به این برگ‌ها متنقل شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، کنه‌های بالغ از برگ‌ها حذف و تخم‌های گذاشته شده به دستگاه پرورش حشرات (پارادایز، ساخت شرکت نور صنعت فردوس) با دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (Villanueva and Walgenbach, 2006).

آزمون‌های زیست‌سنجی

ابتدا، با آزمون مقدماتی محدوده‌ی غلظت‌های مؤثر روی کنه‌ی قرمز مرکبات تعیین شد و غلظت‌هایی که میزان تلفات آن‌ها بین ۱۰ تا ۹۰ درصد بود، در آزمون نهایی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون زیست‌سنجی با استفاده از برج پاشش[5] (میزان پاشش ۰/۲ ± ۱/۵ میلی‌گرم بر سانتی‌مترمربع) انجام شد (Khajehali *et al*., 2010). میزان محلول پاشیده شده روی دیسک‌های برگی ۱/۵ میلی‌لیتر بود. ابتدا غلظت‌های مختلف کنه‌کش و دیسک‌های برگی با قطر ۹ سانتی‌متر آماده شدند. سپس دیسک‌ها با استفاده از برج پاشش سم‌پاشی شدند و بعد از خشک شدن برگ‌ها در شرایط آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه، کنه‌ها روی آن‌ها منتقل شده و در دستگاه پرورش حشرات با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت

[1]. Bromopropylate
[2]. Isopropyl 4,49-Dibromobenzylate
[3]. Neuron
[4]. Fenpyroximate
[5]. Potter Tower

www.SID.ir

Archive of SID

نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آزمایش در پنج تکرار انجام شد؛ به این صورت که روی هر دیسک برگی، ۱۰ کنه بالغ هم‌سن قرار گرفت و میزان تلفات پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ثبت شد (با اندکی تغییرات مطابق روش Sato *et al.*, 2005).

آزمون سینرژیست‌ها

آزمون سینرژیست‌ها بر اساس روش ساکاروکو و همکاران (Tsagkarakou *et al.*, 2009) با اندکی تغییرات در روش مذکور انجام شد. ابتدا با آزمون مقدماتی غلظت-های مورد استفاده برای سه سینرژیست پیپرونیل بوتوکساید (PBO)، دی اتیل مالئات (DEM) و تری‌فنیل‌فسفات (TTP) تخمین زده شد. غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر برای هر سینرژیست که بر اساس آزمون مقدماتی، بیش‌ترین غلظتی است که تلفات آن از ده درصد تجاوز نمی‌کند، به‌کار گرفته شد. سینرژیست‌ها با استفاده از برج پاشش، روی دیسک‌های برگی نارنج بر اساس روش توضیح داده شده در آزمون های زیست سنجی سم‌پاشی شدند. بعد از خشک کردن برگ‌ها در شرایط آزمایشگاه، کنه‌های ماده‌ی بالغ هم‌سن به مدت پنج ساعت به دیسک‌های تهیه شده منتقل شدند. در مرحله‌ی بعد دیسک‌های برگی دیگری نیز با استفاده از برج پاشش و با کنه‌کش سم‌پاشی شده و کنه‌ها از روی دیسک‌های تیمار شده با سینرژیست‌ها به دیسک‌های تیمار شده با کنه‌کش منتقل شدند. دیسک‌ها در دستگاه پرورش حشرات با دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند و سپس میزان تلفات پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت یادداشت شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی

مواد شیمیایی

بروموپروپیلات (نام تجاری: نئورون®) از شرکت بهسم، آلفا-نفتیل استات[1] (α-NA)، بتا-نفتیل استات[2] (β-NA)، گلوتاتیون احیا شده (GSH) و ۱-کلرو ۲ و ۴ دی نیتروبنزن[3](CDNB) از شرکت مرک (آلمان) و نمک فاست بلو آرآر[4] از شرکت فلوکا (کشور آمریکا) تهیه شد.

اندازه‌گیری فعالیت استرازی

فعالیت استراز به روش ون‌اسپرن (۱۹۶۲) اندازه‌گیری شد. برای انجام این آزمون، ۵۰ کنه‌ی بالغ ماده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار،pH7) حاوی ۰/۱ درصد تراتیون X-100[5] روی یخ هموژنایز شدند. سپس، در ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و محلول رونشین به‌عنوان نمونه آنزیمی (سوپرناتانت) استفاده شد. سپس محلول رونشین برای سوبسترای آلفا-نفتیل استات[6] به نسبت ۱به ۸ و برای سوبسترای بتا-نفتیل استات[7] به نسبت ۱ به ۱ با بافر فسفات رقیق شد. ۱۲/۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی رقیق شده، ۱۱۲/۵ میکرولیتر بافر فسفات با ۲۵ میکرولیتر سوبسترای آلفا-نفتیل استات یا بتا-نفتیل استات درون چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر نمک فاست بلو آر آر[8] (۰/۰۰۸گرم در ۵ میلی لیتر بافر فسفات) به آن اضافه شد و جذب نمونه‌ها هر دقیقه یک‌بار به وسیله میکروپلیت ریدر[9] (Awareness Stat Pax 3200®) در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای سوبسترای آلفا نفتیل استات و طول موج ۵۴۰ نانومتر برای سوبسترای بتا نفتیل استات اندازه‌گیری شد (Van Asperen, 1962). برای محاسبه فعالیت ویژه از نفتول به عنوان ماده استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی آنزیم استراز

تعداد ۵۰ کنه‌ی بالغ ماده در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی ۱٪ تراینون X-100 روی یخ و با استفاده از هموژنایزر دستی شیشه‌ای هموژنایز شد. سپس، مخلوط به‌دست آمده در ۱۱۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس

1. α-Naphthyl acetate
2. β-Naphthyl acetate
3. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
4. Fast Blue RR
5. Triton x-100
6. α-Naphthyl acetate (α-NA)
7. β- Naphthyl acetate (β-NA)
8. Fast Blue RR Salt
9. Microplate – Reader

www.SID.ir

Archive of SID

سانتریفیوژ و محلول رونشین برای اندازه‌گیری ثابت میکائیلیس-متنن[1] به‌کار گرفته شد. ۱۲/۵ میکرولیتر محلول رونشین (رقیق‌شده به نسبت ۱ به ۸) با ۲۵ میکرولیتر سوبسترا (غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۳/۱،۲/۶ و ۶/۴) در دمای ۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. در نهایت، ۵۰ میکرولیتر فاست بلو آرآر اضافه شد و میزان جذب به‌وسیله میکروپلیت‌ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از رسم منحنی پیشرفت واکنش، سرعت اولیه محاسبه شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار هاپیر، V_{max} و K_m آنزیم محاسبه شد (Van Leeuwen and Tirry, 2007 با اندکی تغییرات).

اندازه‌گیری میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز

برای تهیه محلول آنزیمی، ۲۶ کنه در ۱۶۰ میکرولیتر بافر فسفات هموژنایز و سپس در ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس ۱۵ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۱۰۰ میکرولیتر[2] CDNB (۱/۲ میلی مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر گلوتاتیون احیا شده[3] (۱۰ میلی مولار) در پلیت الایزا ریخته شد. جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به وسیله‌ی میکروپلیت ریدر هر دقیقه یک‌بار خوانده شد (Habig *et al*., 1974).

اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی گلوتاتیون-اس-ترانسفراز

برای این منظور، ۱۵ میکرولیتر آنزیم (به ازای هر کنه ۵ میکرولیتر بافر فسفات) به همراه ۱۳۵ میکرولیتر بافرفسفات ۵۰ میکرولیتر CDNB[4] (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶) و ۱۰۰ میکرولیتر GSH (۱۰ میلی‌مولار) در هر تکرار در پلیت ریخته شد و جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به‌وسیله میکروپلیت ریدر هر دقیقه یک‌بار خوانده شد. مقدار V_{max} و K_m به‌وسیله‌ی نرم‌افزار هاپیر اندازه‌گیری شد (Habig *et al*., 1974).

اندازه‌گیری مقدار مونواکسیژنازهای[5] وابسته به سیتوکروم P_{450}

در این آزمایش روش Heme-Peroxidase و اندازه-گیری میزان کل پروتئین حاوی آهن مورد استفاده قرار گرفت (Brogdon *et al*., 1997). به این ترتیب که ۲۰ میکرولیتر آنزیم (به ازای هر کنه ۵ میکرولیتر بافر فسفات pH7)، ۸۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۲۰۰ میکرولیتر محلول TMBZ[6] (۰/۰۱ TMBZ در ۵ میلی‌لیتر متانول[7] به‌علاوه‌ی ۱۵ میلی لیتر بافر سدیم-استات ۰/۲۵ مولار) و ۲۵ میکرولیتر آب اکسیژنه[8] (۳٪) به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد و بعد از ۲ ساعت نگهداری در تاریکی، در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار سیتوکروم P_{450} با منحنی استاندارد سیتوکروم C خالص شده محاسبه شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین کل

میزان پروتئین موجود در منبع آنزیمی مورد استفاده در آزمون‌های بیوشیمیایی با استفاده از روش بردفورد محاسبه شد. بدین صورت که ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۷۵۰ میکرولیتر معرف بردفورد اضافه شده و میزان جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد. از آلبومین سرم گاوی برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

تجزیه و تحلیل

LC_{50} حاصل از آزمون زیست‌سنجی به کمک نرم‌افزار POLO-PLUS (LeOra Software, 2003) تخمین زده شد. داده‌های به‌دست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 (2002) تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون T-Student برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. برای محاسبه فعالیت ویژه آنزیمی، ابتدا شیب خط منحنی جذب در واحد زمان تخمین زده شد. سپس، برای اندازه-گیری فعالیت ویژه آنزیم استراز از منحنی استاندارد نفتول (اندازه‌گیری‌شده در طول موج ۶۳۰ نانومتر)، برای گلوتاتیون اس-ترانسفراز از ضریب خاموشی گلوتاتیون M-) CDNB

1. Michaelis–Menten kinetics
2. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
3. L-glutathione (GSH)
4. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
5. Monooxygenase
6. 3,3`,5,5` tetramethyl benzidine
7. Methanol
8. H_2O_2

www.SID.ir

Archive of SID

1 cm-1 6/9) و برای سیستم مونواکسیژناز از منحنی استاندارد سیتوکروم خالص C استفاده شد.

نتایج

نتایج زیست‌سنجی

میزان LC_{50} بروموپروپیلات برای دو جمعیت *P. citri* در جدول شماره ۱ آمده‌است، میزان LC_{50} جمعیت مقاوم ۳۷۹۳ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. میزان سمیت نسبی جمعیت مقاوم ۱۰/۶۳ برابر جمعیت حساس است که نشان‌دهنده‌ی مقاومت کنه قرمز مرکبات به بروموپروپیلات است. مقدار شیب در جمعیت مقاوم ۰/۵۷± ۳/۴۸ و برای جمعیت حساس ۰/۳۲± ۱/۴ به دست آمد که نشان‌دهنده هموژن بودن جمعیت مقاوم و هتروژن بودن جمعیت حساس است.

نتایج سینرژیستی

میزان تاثیر سینرژیست‌های تری‌فنیل‌فسفات، دی‌اتیل-مالئات و پیپرونیل بوتوکساید روی مقاومت دو جمعیت حساس و مقاوم به‌ترتیب ۵/۸۹، ۵/۵۸ و ۴/۵۹ و ۲/۵۱، ۲/۴۴ و ۲/۳۸ برابر سمیت بروموپروپیلات را افزایش داد. این سینرژیست‌ها روی جمعیت حساس نسبت به مقاوم اثرگذارتر بوده و در هر دو جمعیت، تفاوت بالایی بین سه سینرژیست وجود نداشت. در بررسی مقاومت کنه دو لکه‌ای به ترکیبات بازدارنده انتقال الکترون، نتایج نشان داد که نسبت سینرژیستی PBO روی سمیت فن‌پیروکسی‌میت برای استرین حساس و مقاوم به‌ترتیب برابر با ۱۹/۰۹ و ۱/۹۷ بود. همچنین هنگامی که از DEF به عنوان سینرژیست استفاده شد، نسبت سینرژیست برای استرین‌های حساس و مقاوم به ترتیب ۴ و ۱/۳۳ بود. نتایج مشابهی برای DEM نیز به دست آمد (Van Pottelberge *et al*., 2009).

جدول ۱- سمیت بروموپروپیلات با و بدون سینرژیست روی جمعیت ماده بالغ حساس و مقاوم کنه‌ی قرمز مرکبات

Table 1. Toxicity of bromopropylate with and without synergists to female adults of resistant and susceptible populations of *Panonychus citri*

Population	Synergist	N[a]	LC_{50} (mg ai/L) (Confidence limits at 95%)	df	X^2	Slope±SE	SR[b]	RR[c]
Resistant	Without	340	3793.5 (3314.5-4212.75)	4	3.84*	3.48±0.57	---	10.63
	PBO	290	1553.5 (1167.5-1940.25)	3	2.72*	1.67±0.28	2.44	---
	DEM	290	1589.25 (1216.2-1986.4)	3	1.78*	1.57±0.25	2.38	---
	TPP	290	1510.84 (1110.13-1950.25)	3	2.81*	1.76±0.34	2.51	---
Susceptible	Without	490	356.5 (222.15-475.14)	7	6.10*	1.4±0.32	---	---
	PBO	290	63.86 (45-84)	3	0.68*	1.28±0.21	5.58	---
	DEM	290	77.64 (57.45-99.6)	3	0.21*	1.57±0.23	4.59	---
	TPP	290	60.5 (42.7-79.23)	3	1.42*	1.32±0.21	5.89	---

[a] Number of the tested mites
[b] synergist ratio: LC_{50} without synergist/ LC_{50} with synergist
[c] resistance ratio: LC_{50} of resistant population/ LC_{50} of susceptible population
*indicates a good fit of the data by the probit analysis model

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بیوشیمیایی

میزان فعالیت آنزیم‌های استرازی، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و مونواکسیژناز در مقاومت کنه قرمز به بروموپروپیلات شامل آلفا-نفتیل و بتا-نفتیل نسبت به دو آنزیم دیگر از فعالیت بیش‌تری در جمعیت مقاوم برخوردار بود. نرخ فعالیت به دست آمده (فعالیت ویژه در جمعیت مقاوم تقسیم بر فعالیت ویژه در جمعیت حساس) برای آنزیم-های بتا نفتیل، آلفا نفتیل، مونواکسیژناز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز به‌ترتیب ۱/۸۳، ۱/۷۰، ۱/۳۴ و ۱/۳۴ برابر به‌دست آمد.

فراسنجه‌های کینتیکی آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز به‌ترتیب با غلظت‌های مختلف زیرنهشت آلفا-نفتیل استات و CDNB تخمین زده شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های سینتیکی آنزیم‌های سم‌زدای استراز و GST دو جمعیت با هم اختلاف دارند. میزان K_m استراز در جمعیت حساس، ۱/۹۵ برابر K_m جمعیت مقاوم است. این مسئله نشان-دهنده میل ترکیبی کم‌تر آنزیم استراز جمعیت حساس به سوبسترا می‌باشد. همچنین میزان K_m گلوتاتیون اس-ترانسفراز جمعیت حساس ۲/۲۴ برابر جمعیت مقاوم کنه قرمز مرکبات بوده که میل ترکیبی کم‌تر گلوتاتیون اس-ترانسفراز جمعیت حساس را به CDNB نشان می‌دهد (جدول ۳).

جدول ۲- میانگین فعالیت ویژه آنزیم‌های سم‌زدا در کنه‌های مقاوم و حساس به بروموپروپیلات

Table 2. Mean specific activities of detoxification enzymes in susceptible and resistant population of *Panonychus citri* to bromopropylate

Activity(nmol/min/mg protein)±SE			Activity ratio[a]
Substrate	Resistant	Susceptible	
α-Na	9.5±0.69	5.58±0.25	1.70*
β-Na	8.53±0.99	4.64±0.63	1.83*
GST	0.47±0.02	0.35±0.01	1.34*
MFO	0.0166±3.34	0.0087±2.44	1.90*

[a] Activity ratio: mean activity of a population of resistant enzymes divided by the mean activity of susceptible population.

* Significant difference ($\alpha \leq 0.05$)

جدول ۳- میانگین فراسنجه‌های کینتیکی آنزیم‌های آلفا- استراز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم کنه قرمز مرکبات

Table 3. The mean ± SE of kinetic parameters of glutathione -s-transferase and α- naphthyl esterase enzyme in resistant and susceptible populations of *Panonychus citri*

Population		K_m (mM)	V_{max} (mM/min)	V_{max}/K_m
Resistant	α-Na	0.1931	11.23	58.15
	GST	0.4053	0.421	1.038
Susceptible	α-Na	0.3776	13.25	35.09
	GST	0.9081	0.629	0.69

بحث

طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، پتانسیل توسعه مقاومت به بروموپروپیلات در کنه قرمز مرکبات وجود دارد. استفاده مکرر از بروموپروپیلات برای مبارزه با کنه قرمز باعث ظهور مقاومت و افزایش LC_{50} از ۳۵۶ به ۳۷۹۳ میلی‌گرم بر لیتر شده است (جدول ۱). شیب خط منحنی دوز-مرگ و میر در جمعیت مقاوم، ۳/۴۸±۰/۵۷ و در جمعیت حساس، ۱/۰±۴/۳۲ به‌دست آمد. نتایج نشان‌دهنده این است که جمعیت حساسی که از صومعه‌سرا و فاقد سابقه سم‌پاشی جمع‌آوری شده بود، هتروزیگوت می‌باشد. در حالی‌که

www.SID.ir

Archive of SID

جمعیت جمع‌آوری شده از رامسر به دلیل شیب تندتر منحنی غلظت-پاسخ هموزیگوت است. نتایج مشابهی برای جمعیت حساس پسیل پسته گزارش شده است. در بررسی مقاومت به فوزالون، در بین جمعیت‌های مورد آزمون پسیل پسته، کم-ترین شیب مربوط به جمعیت BA (جمعیت حساس پایه) بود و این نشان می‌دهد که جمعیت BA در مقایسه با سایر جمعیت‌ها هتروژن‌تر است (Alizadeh *et al*., 2011).

یکی از راه‌های تشخیص مقاومت متابولیکی و تعیین میزان مشارکت آنزیم‌های سم‌زدا در مقاومت به سموم، استفاده از سینرژیست‌های مهارکننده استرازی، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و سامانه اکسیدکننده می‌باشد. یکی از سامانه های بلوکه‌کننده سامانه استرازی، تری‌فنیل‌فسفات می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از تأثیر سینرژیست تری‌فنیل-فسفات روی سمیت بروموپروپیلات روی جمعیت‌های حساس و مقاوم کنه قرمز مرکبات، می‌توان گفت که این سینرژیست توانست مقاومت را در جمعیت مقاوم سرکوب کند، اما در مقایسه با جمعیت حساس، نسبت سینرژیستی پایین بود. بنابراین، با وجود افزایش فعالیت سامانه استرازی در جمعیت مقاوم (آلفا-استرازی ۱/۷ و بتا استرازی ۱/۸۳ برابر)، نتایج تیمار با تری‌فنیل فسفات نشان‌دهنده عدم دخالت این سامانه آنزیمی در مقاومت به بروموپروپیلات است. نتایج مشابهی در زمینه مقاومت کنه دو لکه‌ای به ترکیبات بازدارنده انتقال الکترون (MTI) گزارش شده‌است. در کنه دو لکه‌ای مقاوم به فن‌پیروکسی‌میت (MR-VP)، نسبت سینرژیستی DEF[1] (بازدارنده استراز) روی سمیت فن‌پیروکسی‌میت در استرین حساس (GSS) ۴ برابر بود، در حالی که نسبت سینرژیستی روی استرین مقاوم ۱/۳۳ برابر به‌دست آمد. میزان مقاومت در جمعیت مقاوم ۲۷۴ برابر جمعیت حساس گزارش شد (Van Pottelberge *et al*., 2009). همچنین فعالیت استرازی با استفاده از سوبسترای ۴-نیتروفنیل بوتیرات و ۴-نیتروفنیل پروپیونیت، ۱/۲ برابر استرین حساس بود. تاثیر سینرژیست‌ها در مقاومت *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval) به آبامکتین و فن‌پروپاترین نشان داد که تری-فنیل‌فسفات، دی‌اتیل‌مالئات و پیپرونیل بوتوکساید میزان سمیت آبامکتین را به‌ترتیب ۸/۶، ۷/۱ و ۵/۱ برابر و میزان سمیت فن پروپاترین را ۲۸/۷، ۸/۱ و ۵/۶ برابر افزایش داد و طبق بررسی‌های آنزیمی انجام شده، آنزیم‌های کربوکسیل استراز و مونواکسیژناز در مقاومت به آبامکتین نقش دارند، ولی در مقاومت به فن پروپاترین نقشی ندارند و بین مقاومت این کنه به آبامکتین، فن‌پروپاترین و میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز رابطه معنی‌داری وجود دارد. میزان نسبت سمیت به‌ترتیب برای کنه‌کش‌های آبامکتین و فن‌پروپاترین به‌ترتیب ۸/۷ و ۲۸/۷ برابر جمعیت حساس به‌دست آمد (Lin *et al*., 2009). در مقاومت کنه دو لکه‌ای نسبت به کلرپیریفوس[2] آنزیم‌های استرازی نقش مهمی دارند، ولی گلوتاتیون اس-ترانسفراز و آنزیم سیتوکروم P_{450} نقش قابل ملاحظه‌ای ندارند (Ay and Yorulmaz-Salman, 2010). در کنه دو لکه‌ای مقاوم به فن‌پروکسی‌میت، سینرژیست‌های پیپرونیل بوتوکساید، تری‌فنیل‌فسفات و IBP[3] تاثیر معنی داری روی مقاومت نشان ندادند (Ay and Kara, 2011). گزارش شده است که مقاومت کنه دو لکه-ای به پیروتروئیدها ناشی از فعالیت آنزیم‌های استرازی است (Yang *et al*., 2002). میزان بالای مقاومت کنه دو لکه‌ای به آبامکتین ناشی از فعالیت ۲/۱۴ برابری آلفا- استراز، ۱/۳۷ برابری مونواکسیژناز P_{450} و به‌احتمال غیر حساس شدن گیرنده‌ی گابا می‌باشد (Memarizadeh *et al*., 2011). تاثیر سینرژیستی دی‌اتیل‌مالئات روی جمعیت مقاوم و حساس نشان داد که نسبت سینرژیستی این ترکیب با بروموپروپیلات روی جمعیت مقاوم کنه قرمز مرکبات برابر ۲/۳۸ و روی جمعیت حساس ۴/۵۹ است. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز با استفاده از CDNB نشان داد که فعالیت این آنزیم در جمعیت مقاوم ۱/۳۴ برابر جمعیت حساس می‌باشد (جدول ۲). با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمون سینرژیستی، گلوتاتیون اس-ترانسفراز نقشی در

[1]. S, S, S-tributylphosphorotrithioate
[2]. Chlorpyrifos
[3]. S-benzyl O, O-diisopropyl phosphorothioate

www.SID.ir

Archive of SID

مقاومت کنه قرمز مرکبات به بروموپروپیلات ندارد. وان-پاتلبرگ و همکاران (Van Pottelberge *et al*., 2009) با بررسی تاثیر سینرژیست دی‌اتیل‌مالئات همراه با فن‌پیروکسی-میت روی کنه دو لکه‌ای حساس و مقاوم به ترکیبات بازدارنده انتقال الکترون (MTI) نشان دادند که در کنه دو لکه‌ای مقاوم (MR-VP) ، نسبت سینرژیستی دی‌اتیل‌مالئات ۰/۹۶ به‌دست آمد، در حالی‌که این نسبت در استرین حساس (GSS) ۱/۵۹ برابر بود. همچنین میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز در استرین مقاوم با استفاده از سوبستراهای CDNB و MCB[1] به‌ترتیب ۱/۲ و ۲/۵ برابر استرین حساس بود. بنابراین، علی‌رغم فعالیت بالای گلوتاتیون اس-ترانسفراز، این سامانه آنزیمی نقشی در مقاومت کنه دو لکه-ای به فن‌پیروکسی‌میت ندارد. با توجه به آزمایش‌های انجام شده در مورد تاثیر سینرژیستی تری‌فنیل‌فسفات، دی‌اتیل-مالئات و پیپرونیل بوتوکساید روی مقاومت کنه قرمز مرکبات به پیریدابن، آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز در این مقاومت نقش داشته (Liu *et al*., 2010)، ولی در مورد کنه دولکه‌ای عامل مقاومت به پیریدابن مونواکسیژنازها است (Kim *et al*., 2006). بر اساس بررسی‌های سینرژیستی انجام شده روی استرین مقاوم به پروپارژیت *T. cinnabarinus* (با مقاومت ۳۷/۷۸ برابری)، نسبت سینرژیستی دی‌اتیل‌مالئات، پیپرونیل بوتوکساید و تری‌فنیل-فسفات به‌ترتیب ۲/۲۸، ۱/۴۷ و ۱/۰۶ به‌دست آمد و عامل مقاومت به پروپارژیت فعالیت آنزیمی گلوتاتیون اس-ترانسفراز گزارش شده است (Luo *et al*., 2014). مقاومت *N. californicius* به هگزیتیازوکس با استفاده از روش دیسک برگی و برج پاشش نسبت مقاومت ۶۰/۰۴ برابر را گزارش دادند. نسبت سینرژیستی IBP، پیپرونیل بوتوکساید و دی‌اتیل‌مالئات به ترتیب ۱/۷۱، ۳/۲۵ و ۱/۹۸ بود. فعالیت آنزیم‌های استراز، گلوتاتیون اس-ترانسفراز، P_{450} و استیل کولین استراز در جمعیت مقاوم به ترتیب ۳/۲۲، ۲/۰۲، ۲/۳۵ و ۳/۳۴ برابر جمعیت حساس به دست آمد (Yorulmaz-Salman and Ay, 2014). آزمون‌های سینرژیستی با پیپرونیل بوتوکساید نشان داد که نسبت سینرژیستی این ترکیب همراه با بروموپروپیلات روی استرین حساس ۵/۵۸ و روی جمعیت مقاوم ۲/۴۴ است. با وجود افزایش ۱/۳۹ برابری سیستم مونواکسیژناز در جمعیت مقاوم، داده‌های آزمون سینرژیستی نشان‌دهنده عدم نقش این آنزیم در مقاومت به بروموپروپیلات می‌باشد. نسبت سینرژیستی بالاتر برای کنه دو لکه‌ای حساس به ترکیبات بازدارنده انتقال الکترون در مقایسه با استرین مقاوم گزارش شده است، به‌طوری‌که نسبت سینرژیستی پیپرونیل بوتوکساید روی استرین مقاوم ۱/۹۷ و همین نسبت روی استرین حساس ۱۹/۰۹ برابر بود که نشان-دهنده‌ی عدم دخالت سامانه مونواکسیژناز در مقاومت به فن-پیروکسی‌میت است، هرچند که میزان فعالیت سامانه مونواکسیژناز در استرین مقاوم ۲۳/۵ برابر استرین حساس به-دست آمد (Van Pottelberge *et al*., 2009). در این تحقیق با آن‌که فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در استرین مقاوم بالا است، اما نتایج سینرژیستی حاکی از عدم نقش این آنزیم‌ها در مقاومت به بروموپروپیلات است. گزارش شده است که سینرژیست پیپرونیل بوتوکساید و آنزیم مونواکسیژناز در مقاومت کنه دو لکه‌ای به مهارکننده‌های انتقال الکترونی میتوکندری نقش دارد (Stumpf and Nauen, 2001). در مطالعه‌ای مقاومت کنه دولکه‌ای به اسپیرودیکلوفن بررسی شده و طبق نتایج به‌دست آمده، مقاومت ۱۳ برابر بوده و بررسی‌های سینرژیستی با پیپرونیل بوتوکساید و افزایش فعالیت آنزیمی سیتوکروم P_{450} (آزمون بیوشیمیایی) نشان-دهنده نقش این آنزیم در مقاومت به این ترکیب است (Rauch and Nauen, 2003).

در این مطالعه نشان داده شد که جمعیت مقاوم ۱۰/۶۳ برابر نسبت به بروموپروپیلات مقاوم است. آزمون‌های سینرژیستی نشان داد که هیچ کدام از سامانه های سم‌زدای متابولیکی نقشی در مقاومت کنه قرمز مرکبات به این ترکیب ندارند. هرچند که نسبت فعالیت آلفا-استرازی، بتا استرازی، گلوتاتیون اس-ترانسفراز و سامانه اکسید کننده در جمعیت مقاوم به‌ترتیب ۱/۷، ۱/۸۳، ۱/۳۴ و ۱/۳۹ برابر جمعیت حساس

[1]. Monochlorobimane

www.SID.ir

Archive of SID

بود. همچنین اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز نشان‌دهنده تغییرات کیفی و جهش در این آنزیم‌های سم زداست (جدول ۳). البته با کمک روش‌های مولکولی و مقاومت این کنه به ترکیبات دیگر کنه‌کش بررسی بیشتر باید مورد توجه قرار گیرد. جمعیت مقاوم، سابقه سم‌پاشی با کنه کش‌های دیگر که علیه کنه قرمز مرکبات توصیه شده را نیز دارد. تاکنون، ترکیباتی مانند فن‌پیروکسی‌میت، هگزیتیازوکس و آبامکتین روی این جمعیت در برنامه کنترلی به‌کار برده شده است. افزایش فعالیت سیستم‌های سم‌زدا در این کنه را می‌توان ناشی از فشار سم‌پاشی این ترکیبات روی کنه قرمز دانست. تاکنون مکان هدف مشخصی برای این کنه‌کش در کنه‌ها تعیین نشده است (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC). همچنین پژوهشی در زمینه ساز و کار مقاومت کنه-ها به این ترکیب وجود ندارد. به احتمال دلیل مقاومت به بروموپروپیلات در کنه قرمز مرکبات، درگیر بودن مکان هدف یا کاهش نفوذ باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. با توجه به مقاومت کنه قرمز مرکبات به کنه‌کش‌ها توصیه می-شود که فشار سم‌پاشی با بروموپروپیلات کاهش یافته و در برنامه مدیریت مقاومت این آفت از کنه‌کش‌های با شیوه تاثیر متفاوت استفاده شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه گیلان برای تامین اعتبار این پژوهش و خانم‌ها مهندس الهه شفیعی و مهندس مریم ذوالفقاری برای همکاری در این پژوهش قدردانی می‌شود.

References

Alizadeh, A., Talebi, K., Hosseininaveh, V. and Ghadamyari, M. 2011. Metabolic resistance mechanisms to phosalone in the common pistachio psyllid, *Agonoscena pistaciae* (Hem.: Psyllidae), **Pesticide Biochemistry and Physiology** 101: 59–64.

Ay, R. and Kara, F. E. 2011. Toxicity, inheritance of fenpyroximate resistance, and detoxification-enzyme levels in a laboratory-selected fenpyroximate-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Crop Protection** 30: 605-611.

Ay, R. and Yorulmaz-Salman, S. 2010. Inheritance and detoxification enzyme levels in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) strain selected with Chlorpyrifos. **Journal of Pest Science** 83: 85–93.

Behdad, A. 2009. Primary Entomology and Plant Pests of Iran. Memorial Publication, 840 p. (in Farsi).

Brogdon, W. G., McAllister, J. C. and Vulule, J. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. **Journal of American Mosquito Control Association** 13 (3): 233-237.

Chen, Z. Y., Ran, C., Zhang, L., Dou, W. and Wang, J. J. 2009. Susceptibility and esterase activity in citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) after selection with Phoxim. **International Journal of Acarology** 35: 33–40.

Dekeyser, M. 2005.Acaricides mode of action. **Pest Management Science** 61: 103–110.

Doker, I. and Kazak. C. 2012. Detecting acaricides resistance in Turkish populations of *Panonychus citri* McGregor (Acari: Tetranychidae). **Systematic and Applied Acarology** 17(4): 368–377.

Feng, R. and Isman, M. B. 1995. Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*. **Cellular and Molecular Life Sciences** 51: 831-833.

Gerson, U. and Cohen, E. 1989. Resurgences of spider mites (Acari: Tetranychidae) induced by synthetic Pyrethroid. **Experimental and Applied Acarology** 6: 29–46.

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S- transferase, the first step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry** 249: 7130-7139.

Hu, J., Wang, C., Wang, J., You, Y. and Chen, F. 2010. Monitoring of resistance to Spirodiclofen and five other acaricides in *Panonychus citri* collected from Chinese citrus orchards. **Pest Management Science** 66(9): 1025-1030.

Kasap, I. 2009. The biology and fecundity of the citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) at different temperatures under laboratory conditions. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 33(6): 593-600.

www.SID.ir

Archive of SID

Khajehali, J., Van Leeuwen, T., Grispou, M., Morou, E., Alout, H., Weill, M., Tirry, L., Vontasc, J. and Tsagkarakou, A. 2010. Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. **Pest Management Science** 66: 220- 228.

Kim, Y. J., Park. H. M., Cho, J. R. and Ahn, y. j. 2006. Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology** 99(3): 954-958.

Kim, Y. J., Si-Hyeock, L., Si-Woo, L. and Ahn, Y. J. 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. **Pest Management Science** 60: 1001- 1006.

Kumral, N. A. and Kovanci, B. 2007. Susceptibility of female populations of *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) to some acaricides in apple orchards. **Journal of Pesticide Science** 80:131–137.

LeOra Software, 2003. In: Robertson, J. L., Preisler, H.K., Russel, R. M. (Eds.), Polo Plus Probit and Logit Analysis, User's Guide. Berkeley, p. 36.

Liao, C. Y., Xia, W. K., Feng, Y. C., Li, G., Liu. H., Dou, W. and Wang, J. J. 2015. Characterization and functional analysis of a novel Glutathione-S-transferases gene potentially associated with the abamectin resistance in *Panonychus citri* (McGregor). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 132: 72-80.

Lin, H., Chuan-Hua, X., Jin-Jun, W., Ming, L., Wen-Cai, L. and Zhi-Mo, Z. 2009. Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 93: 47-52.

Liu, Y. H., Jiang, H. B., Yuan, M. L., Fan, F. H., Yang, L. H., Chen, J. and Wang, J. J. 2010. Resistance monitoring and synergism on four acaricides against *Panonychus citri*. **Journal of Fruit Science** 27(4): 570-574.

Luo, Y. J., Yang, Z. G., Xie, D. Y., Ding, W., Da, A. S., Ni, J., Chai, J. P., Huang, P., Jiang, X. J. and Li, S. X. 2014. Molecular cloning and expression of Glutathione-S-transferases involved in propargite resistance 396 of the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 114: 44-51.

Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Sajedi, R. H. and Jalali Sendi, J. 2011. Resistance mechanisms of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to abamectin. **Journal of Plant Protection Sciences** 42(1): 75-83. (in Farsi).

Meng, H. S., Wang, K. Y. and Jiang, X. Y. 2002. Studies on resistance selection by abamectin and Fenpropathrin and activity change of DE toxicant enzymes in *Panonychus citri*, **Acta Entomological Sinica** 45: 58–62.

Meng, H. S., Wang, K. Y., Jiang, X. Y. and Yi, M. Q. 2000. Studies on the resistance of *Panonychus citri* to several acaricides. **Pesticides** 39: 26–28.

Niu, J. Z., Liu, G. Y., Dou, W. and Wang, J. J. 2011. Susceptibility and activity of Glutathione-S-transferases in nine field populations of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) to Pyridabine and azocyclotin. **Florida Entomologist** 94: 321–329.

Norbakhsh, S. 2017**.** List of Important Pests, Diseases and Weeds of Major Agricultural Products, Recommended Methods and Pesticides for Their Control. Plant Protection Organization of Iran. 206 pp.

Ouyang, Y., Montez, G. H., Liu. L. and Grafton-Cardwell, E. E. 2012. Spirodiclofen and Spirotetramat bioassays for monitoring resistance in citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). **Pest Management Science** 68(5): 781-787.

Ran, C., Chen, Y. and Wang, J. J. 2009. Susceptibility and carboxylesterase activity of five field populations of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) to four acaricides. **International Journal of Acarology** 35: 115–121.

Rauch, N. and R. Nauen. 2003. Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 74: 91–101.

Rodrigues, A. R. S., Torres, J. B., Siqueira, H. A. A. and Lacerda, D. P. A. 2013. Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). **Biological Control** 64: 217– 224.

SAS Institute. 2001. SAS users guide: Statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC.

www.SID.ir

Archive of SID

Sato, M. E., Silvs, M. Z. D., Raga, A. and Filo, M. F. D. S. 2005. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. **Neotropical Entomology** 34(6): 991-998.

Sterk, G. and Versmissen, C. 1992. Recent developments with pyridaben for mite control on top fruit. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent** 44: 941– 943.

Stumpf, N. and Nauen, R. 2001. Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricides resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae**). Entomological Society of America** 94(6): 1577-1583.

Talebi Jahromi, Kh. 2011. Toxicology of Pesticides. Tehran University Press. 507 p.

Tsagkarakou, A., van Leeuwen, T., Khajehali, J., Ilias, A., Grispou, M., Williamson, S., Tirry, L. and Vontas, J. 2009. Identification of Pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Insect Molecular Biology** 18(5): 583-593.

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

Van Leeuwen, T., Van Nieuwenhuyse, P., Vanholme, B., Dermauw, W., Nauen, R. and Tirry, L. 2011. Parallel evolution of cytochrome b mediated bifenazate resistance in the citrus red mite *Panonychus citri*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 20: 135–140.

Van Pottelberge, S., Van Leeuwen, T., Nauen, R. and Tirry, L. 2009. Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Bulletin of Entomological Research** 99: 23-31.

Villanueva, R. T. and Walgenbach, J. F. 2006. Acaricidal properties of spinosad against *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology** 99(3): 843-849.

Yamamoto, A., Yoneda, H., Hatano, R. and Asada, M. 1995. Laboratory selections of populations in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor), with Hexythiazox and their cross resistance spectrum. **Journal of Pesticide Science** 20: 493-501.

Yang, X., Lawrent, L., Buschman, 1., Zhu, K. Y. and Margolies, D. C. 2002. Susceptibility and detoxifying enzyme activity in two spider mite species (Acari: Tetranychidae) after selection with three insecticides. **Journal of Economic Entomology** 95(2): 399-406.

Yorulmaz-Salman, S. and Ay, R. 2014. Determination of the inheritance, cross resistance and detoxifying enzyme levels of a laboratory-selected, spiromesifen-resistant population of the predatory mite *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae), **Pest Management Science** 94(6): 1577-1583.

Yu, D. Y., Wang, C. F., Yu, Y., Huang, Y. Q., Yao, J. A. and Hu, J. F. 2011. Laboratory selection for spirodiclofen resistance and cross-resistance in *Panonychus citri*. **African Journal of Biotechnology** 10(17): 3424-3429.

www.SID.ir

Archive of SID

Plant Pest Research
2019- 9 (2): 25-37

Survey on bromopropylate acaricide resistance in the citrus red spider mite, *Panonychus citri* and the effect of three synergists on its resistance

H. Emami[1] and M. Ghadamyari[1*]
1- Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht-Iran

(Received: February 18, 2019- Accepted: July 23, 2019)

Abstract

Biological characteristics of *Panonychus citri* such as life cycle, abundant progeny and arrhenotoky, have provided the pest a high potential to develop acaricidal resistance. Bromopropylate is recommended by Iranian Plant Protection Organization to control *P. citri*. In this study, resistance of *p. citri* to bromopropylate was investigated. Bioassay and synergists tests were performed with a Potter spray tower method. Results showed a resistance of 10.63 fold to bromopropylate in resistant population (RP). Pre-treatment of susceptible population (SP) of *P. citri* adult with the cytochrome P_{450} monooxygenase inhibitor, PBO, the esterase inhibitor, TPP, and glutathione-S-transferases inhibitor, DEM, increased bromopropylate toxicity by 5.58, 5.89 and 4.59-fold, respectively, while, these ratios were as 2.44, 2.51 and 2.38-fold, respectively, for RP. The overall lower synergism in RP compared with susceptible population by DEM, PBO and TPP suggests that glutathione-S-transferases, esterases and monooxygenase are not an important factor in resistance. The results of biochemical tests revealed that the activities of monoxygenase, α-naphthyl, β-naphthyl esterases and glutathione-S-transferase in the resistant population was 1.39, 1.70, 1.83, and 1.34- fold higher than that of susceptible population, respectively. Estimation of kinetic parameters showed qualitative changes in esterase and GST. The increased activities of detoxification enzymes may be caused by application of different acaricides which are used for control of this pest in citrus gardens. Therefore, other resistance mechanisms such as reduced penetration and target site insensitivity likely is involved in the resistance. Reduced bromopropylate application as well as application of acaricides with different mode of actions are necessary for avoiding resistance development.

Key words: Resistance, Acaricides, Citrus red mite, Synergist, Detoxification enzymes

*Corresponding author: mghadamyari@gmail.com

www.SID.ir