

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

حمیرا امامی^۱ و محمد قدمیاری*

۱- گروه گیاه پزشکی، 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 نرزیایی باعث شده تا توانایی بالایی در گسترش مقاومت به کنه کش‌ها 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 سینرژست‌ها با برج پاشش انجام شد. نتایج نشان‌دهنده مقاومت ۱۰/۶۳ برابری این کنه نسبت به بروموپروپیلات می‌باشد. پیش‌تیمار جمعیت حساس (SP) کنه قرمز مرکبات با بازدارنده سیتوکروم اکسیداز (PBO)، بازدارنده استراز (TPP) و بازدارنده گلوکوتایون اس-ترانسفراز (DEM) سمیت بروموپروپیلات را به ترتیب ۵/۵۸، ۵/۸۹ و ۴/۵۹ برابر افزایش داد، در حالی که این نسبت‌ها برای جمعیت مقاوم (RP) به ترتیب ۲/۴۴، ۲/۵۱ و ۲/۳۸ برابر بود. نتایج آزمون‌های سینرژستی نشان‌دهنده عدم دخالت آنزیم‌های استرازی، گلوکوتایون اس-ترانسفراز و مونواکسیژناز در مقاومت به بروموپروپیلات می‌باشند. هرچند که میزان فعالیت سیستم مونواکسیژناز، آلفا-، بتا- استراز و گلوکوتایون اس-ترانسفراز در جمعیت مقاوم به ترتیب 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 گلوکوتایون اس-ترانسفراز می‌باشد. دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا ممکن است ناشی از کاربرد کنه کش‌هایی باشد که علیه جمعیت مقاوم در باغ‌های مرکبات به کار برده شده است. 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 کنه کش‌هایی با شیوه تاثیر متفاوت استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: مقاومت، کنه کش، کنه قرمز مرکبات، سینرژست، آنزیم‌های سم‌زدا

مقدمه

تعریف شده‌اند (Chen *et al.*, 2009). هم‌چنین مشخص شده است که کنه قرمز مرکبات توانایی بالایی در توسعه‌ی مقاومت به هگزیتیاژوکس^{۱۲} دارد و طی ۲۰ نسل گزینش با این ترکیب، ۳۵۳۲ برابر مقاومت به این ترکیب افزایش یافت. سطح مقاومت به هگزیتیاژوکس در تمام مراحل رشدی آن بالا است، هم‌چنین تاثیر پیرونیل بوتوکساید روی این آفت-کش نیز بررسی شد و تاثیر سینترژیستی در آن مشاهده نشد (Yamamoto *et al.*, 1995). در آزمایش‌های زیست-سنجی، سمیت کنه کش اسپیرودایکلوفن^{۱۳}، اسپیروتترامات^{۱۴} و اسپیرومسیفن روی کنه قرمز مرکبات بررسی شد و این نتیجه به دست آمد که کنه قرمز مرکبات نسبت به اسپیرودیکلوفن مقاومت ۳/۷ برابری دارد و اسپیرودیکلوفن با دو کنه کش دیگر مقاومت تقاطعی دارند (Hu *et al.*, 2010; Ouyang *et al.*, 2012). سینترژیست^{۱۵} پیرونیل بوتوکساید و گلو تاتیون اس-ترانسفراز مقاومت این کنه را نسبت به اسپیرودیکلوفن کاهش داد (Yu *et al.*, 2011). بیفنازات^{۱۶} از مشتقات هیدرازین است، سیتوکروم B^{۱۷} در مقاومت کنه قرمز مرکبات به بیفنازات نقش دارد و هم‌چنین مقاومت تقاطعی آن به اسکوتینوسیل^{۱۸} نیز گزارش شده است (Dekeyser, 2005; Van Leeuwen *et al.*, 2011). مقاومت کنه قرمز مرکبات نسبت به فن پروپاترین^{۱۹}، اوکس^{۲۰} و فن بوتاتین اکساید^{۲۱} 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 گلو تاتیون اس ترانسفراز معرفی شده است (Liao *et al.*, 2015).

کنه قرمز مرکبات، *Panonychus* (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 کنه کش می‌باشد (Feng and Isman, 1995). کاربردهای پیوسته کنه کش برای محدود کردن جمعیت کنه زیر سطح زیان اقتصادی همراه با دوره‌ی زندگی کوتاه، توانایی تولیدمثل بالا و تولیدمثل جنسی هاپلو-دپلوئیدی باعث تسهیل توسعه‌ی مقاومت در این کنه شده است (Gerson and Cohen, 1989). این کنه مقاومت ۲۳ برابری به دیکوفول^۱ نشان داده و هم‌چنین مقاومت به پایرتروئیدها^۲، کنه کش‌های فسفره آلی^۳، آمیتراز^۴، پروپارژیت^۵، دیافتیورن^۶ و مهارکننده‌های انتقال الکترونی میتوکندری^۷ (METI) در این کنه گزارش شده است (Ran *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). پیریدابین^۸ در دهه گذشته به طور گسترده به منظور 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 آفت-کش ناشی از عملکرد گلو تاتیون اس-ترانسفراز^۹ گزارش شده است (Meng *et al.*, 2000; Niu *et al.*, 2011). فوکسیم^{۱۰} از کنه کش‌های فسفره آلی است که به صورت گسترده برای کنترل آفات کنه‌ای استفاده می‌شود و کنه قرمز مرکبات ۱۸/۶ برابر به آن مقاوم شده است، کربوکسیل استراز^{۱۱} و استیل کولین استراز عوامل مقاومت به این ترکیب

12. Hexythiazox
13. Spirodiclofen
14. Spirotetramat
15. Synergist
16. Bifenazate
17. Cytochrome B
18. Acequinocyl
19. Fenpropathrin
20. Ovx
21. Fenbutatinoxid

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

به منظور 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 25 ± 3 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 10 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 طوری که قسمت زیری برگ روی پنبه خیس قرار گرفت. اطراف برگ نیز نوار نازکی از پنبه به منظور جلوگیری از فرار کنه‌ها ایجاد شد، کنه‌های نر و ماده به این برگ‌ها منتقل 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 1 ± 25 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 10 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^۵ (میزان پاشش 0.2 ± 1.5 میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع) 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 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت

یکی از ترکیباتی که در شمال کشور برای کنترل این کنه استفاده می‌شود، بروموپروپیلات^۱ (ایزوپروپیل ۴، ۴۹-دیابروموبنزیلات)^۲ با نام تجارتي نئورون^۳ 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 فن‌پیروکسی میت 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 LC₅₀ بین ۰/۸-۳/۶ گزارش شده است (Kumral and Kovanci, 2007). همچنین گزارش شده است که این کنه‌کش با فن‌پیروکسی میت^۴ مقاومت تقاطعی دارد (Kim et al., 2004). تاکنون پژوهشی در زمینه مقاومت کنه قرمز مرکبات به بروموپروپیلات انجام نشده است. 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

4. Fenpyroximate

5. Potter Tower

1. Bromopropylate

2. Isopropyl 4,49-Dibromobenzylate

3. Neuron

بروموپروپیلات (نام تجاری: نئورون®) از شرکت بهسم، آلفا-نفتیل استات^۱ (α -NA)، بتا-نفتیل استات^۲ (β -NA)، گلوکاتینون احیا شده (GSH) و ۱-کلرو ۲ و ۴ دی نیتروبنزن^۳ (CDNB) از شرکت مرک (آلمان) و نمک فاست بلو آر آر^۴ از شرکت فلوکا (کشور آمریکا) تهیه شد.

اندازه گیری فعالیت استرازی

فعالیت استراز به روش ون اسپرن (۱۹۶۲) اندازه گیری شد. برای انجام این آزمون، ۵۰ کنه‌ی بالغ ماده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH7) حاوی ۰/۱ درصد ترایتون X-100^۵ روی یخ هموژنایز شدند. سپس، در ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و محلول روشنین به عنوان نمونه آنزیمی (سوپرناتانت) استفاده شد. سپس محلول روشنین برای سوبسترای آلفا-نفتیل استات^۶ به نسبت ۱ به ۸ و برای سوبسترای بتا-نفتیل استات^۷ 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 الیزا ریخته شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر نمک فاست بلو آر آر^۸ (۰/۰۰۸ گرم در ۵ میلی لیتر بافر فسفات) به آن اضافه شد و جذب نمونه‌ها هر دقیقه یک بار به وسیله میکروپلیت ریدر^۹ (Awareness Stat Pax 3200®) در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای سوبسترای آلفا نفتیل استات و طول موج ۵۴۰ نانومتر برای سوبسترای بتا نفتیل استات اندازه گیری شد (Van Asperen, 1962). برای محاسبه فعالیت ویژه از نفقوتل به عنوان ماده استاندارد استفاده شد.

اندازه گیری فراسنجه‌های سینتیکی آنزیم استراز

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

نسبی 70 ± 10 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 برگه، 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 سینرژیک‌ها

آزمون سینرژیک‌ها 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 سینرژیک پیرونیل بوتوکساید (PBO)، دی اتیل مالتات (DEM) و تری فنیل فسفات (TTP) تخمین زده شد. غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر برای هر سینرژیک که بر اساس آزمون مقدماتی، بیشترین غلظتی است که تلفات آن از ده درصد تجاوز نمی‌کند، به کار گرفته شد. سینرژیک‌ها با استفاده از برج پاشش، روی دیسک‌های برگه نارنج بر اساس روش توضیح داده شده در آزمون‌های زیست‌سنجی 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 برگه دیگری نیز با استفاده از برج پاشش و با کنه کش سم‌پاشی شده و کنه‌ها از روی دیسک‌های تیمار شده با سینرژیک‌ها به دیسک‌های تیمار شده با کنه کش منتقل شدند. دیسک‌ها در دستگاه پرورش حشرات با دمای 1 ± 25 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 10 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

۶. α -Naphthyl acetate (α -NA)

۷. β -Naphthyl acetate (β -NA)

۸. Fast Blue RR Salt

۹. Microplate – Reader

۱. α -Naphthyl acetate

۲. β -Naphthyl acetate

۳. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

۴. Fast Blue RR

۵. Triton x-100

اندازه‌گیری مقدار مونواکسیژنازهای^۵ وابسته به

سیتوکروم P₄₅₀

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^۶ (۰/۰۱ TMBZ در ۵ میلی‌لیتر متانول^۷ به‌علاوه‌ی ۱۵ میلی‌لیتر بافر سدیم-استات ۰/۲۵ مولار) و ۲۵ میکرولیتر آب اکسیژنه^۸ (۳٪) به چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد و بعد از ۲ ساعت نگهداری در تاریکی، در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار سیتوکروم P₄₅₀ 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

LC₅₀ 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 (اندازه‌گیری شده در طول موج ۶۳۰ نانومتر)، برای گلوکاتایون اس-ترانسفراز از ضریب خاموشی گلوکاتایون M-CDNB

سانتریفیوژ و محلول رونشین برای اندازه‌گیری ثابت میکائلیس-متن^۱ به کار 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، ۰/۱۶، ۰/۳۲ و ۰/۶۴) در دمای ۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. در نهایت، ۵۰ میکرولیتر فاست بلو آر آر اضافه شد و میزان جذب به-وسیله میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از رسم منحنی پیشرفت واکنش، سرعت اولیه محاسبه شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار هایپر، V_{max} و K_m آنزیم محاسبه شد (Van Leeuwen and Tirry, 2007) با اندکی تغییرات).

اندازه‌گیری میزان فعالیت گلوکاتایون اس-ترانسفراز

برای تهیه محلول آنزیمی، ۲۶ کنه در ۱۶۰ میکرولیتر بافر فسفات هموزنایز 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^۲ CDNB (۱/۲ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر گلوکاتایون احیا شده^۳ (۱۰ میلی‌مولار) در پلیت الایزا ریخته شد. جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به وسیله میکروپلیت ریدر هر دقیقه یک‌بار خوانده شد (Habig *et al.*, 1974).

اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی گلوکاتایون-اس-ترانسفراز

برای این منظور، ۱۵ میکرولیتر آنزیم (به ازای هر کنه ۵ میکرولیتر بافر فسفات) به همراه ۱۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میکرولیتر^۴ CDNB (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 به وسیله میکروپلیت ریدر هر دقیقه یک‌بار خوانده شد. مقدار V_{max} و K_m به-وسیله نرم‌افزار هایپر اندازه‌گیری شد (Habig *et al.*, 1974).

۵. Monooxygenase

۶. 3,3',5,5' tetramethyl benzidine

۷. Methanol

۸. H₂O₂

۱. Michaelis-Menten kinetics

۲. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

۳. L-glutathione (GSH)

۴. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

میزان تاثیر سینرژیست‌های تری‌فیل‌فسفات، دی‌اتیل-مالئات و پیرونیل بوتوکساید روی مقاومت دو جمعیت حساس و مقاوم به ترتیب ۵/۸۹، ۵/۵۸، 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 فن‌پیروکسی میت برای استرین حساس و مقاوم به ترتیب 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).

6/9 1 cm-1) 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 آمده است، 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 $0.57 \pm 3/48$ و برای جمعیت حساس $0.32 \pm 1/4$ به دست آمد که نشان‌دهنده هموزن بودن جمعیت مقاوم و هتروزن بودن جمعیت حساس است.

نتایج سینرژیستی

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: LC₅₀ without synergist/ LC₅₀ with synergist

^c resistance ratio: LC₅₀ of resistant population/ LC₅₀ of susceptible population

*indicates a good fit of the data by the probit analysis model

نتایج بیوشیمیایی

فراسنجه‌های کینتیکی آنزیم‌های استراز و گلوکاتیون اس-ترانسفراز به ترتیب 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، $1/95$ برابر K_m جمعیت مقاوم است. این مسئله نشان‌دهنده میل ترکیبی کم‌تر آنزیم استراز جمعیت حساس به سوبسترا می‌باشد. همچنین میزان K_m گلوکاتیون اس-ترانسفراز جمعیت حساس $2/24$ برابر جمعیت مقاوم که قرمز مرکبات بوده که میل ترکیبی کم‌تر گلوکاتیون اس-ترانسفراز جمعیت حساس را به CDNB نشان می‌دهد (جدول ۳).

میزان فعالیت آنزیم‌های استرازی، گلوکاتیون اس-ترانسفراز و مونواکسیژناز در مقاوم کهنه 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 گلوکاتیون اس-ترانسفراز به ترتیب $1/83$ ، $1/70$ ، $1/34$ و $1/34$ برابر به دست آمد.

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

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

Substrate	Activity(nmol/min/mg protein)±SE		Activity ratio ^a
	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 گلوکاتیون اس-ترانسفراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم کهنه 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

لیتر شده است (جدول ۱). شیب خط منحنی دوز-مرگ و میر در جمعیت مقاوم، $3/48 \pm 0/57$ و در جمعیت حساس، $1/0 \pm 4/32$ به دست آمد. نتایج نشان‌دهنده این است که جمعیت حساسی که از صومعه‌سرا و فاقد سابقه سم‌پاشی جمع‌آوری شده بود، هتروزیگوت می‌باشد. در حالی که

بحث

طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش، پتانسیل توسعه مقاومت به بروموپروپیلات در کهنه قرمز مرکبات وجود دارد. استفاده مکرر از بروموپروپیلات برای مبارزه با کهنه قرمز باعث ظهور مقاومت و افزایش LC_{50} از 356 به 3793 میلی‌گرم بر

(Boiduval) به آبامکتین و فن پروپاترین نشان داد که تری-فنیل فسفات، دی اتیل مالئات و پیپرونیل بوتوکساید میزان سمیت آبامکتین را به ترتیب $۸/۶$ ، $۷/۱$ و $۵/۱$ برابر و میزان سمیت فن پروپاترین را $۲۸/۷$ ، $۸/۱$ و $۵/۶$ برابر افزایش داد و طبق بررسی های آنزیمی انجام شده، آنزیم های 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، فن پروپاترین و میزان فعالیت گلوکاتایون اس-ترانسفراز رابطه معنی داری وجود دارد. میزان نسبت سمیت به ترتیب برای کنه کش های آبامکتین و فن پروپاترین به ترتیب $۸/۷$ و $۲۸/۷$ برابر جمعیت حساس به دست آمد (Lin *et al.*, 2009). در مقاومت کنه دو لکه ای نسبت به کلرپیریفوس^۲ آنزیم های استرازی نقش مهمی دارند، ولی گلوکاتایون اس-ترانسفراز و آنزیم سیتوکروم P450 نقش قابل ملاحظه ای ندارند (Ay and Yorulmaz-Salman, 2010). در کنه دو لکه ای مقاوم به فن پروکسی میت، سینرژسیت های پیرونیل بوتوکساید، تری فنیل فسفات و IBP^۳ تاثیر معنی داری روی مقاومت نشان ندادند (Ay and Kara, 2011). گزارش شده است که مقاومت کنه دو لکه ای به پیروترونیدها ناشی از فعالیت آنزیم های استرازی است (Yang *et al.*, 2002). میزان بالای مقاومت کنه دو لکه ای به آبامکتین ناشی از فعالیت $۲/۱۴$ برابری آلفا-استراز، $۱/۳۷$ برابری مونواکسیژناز P450 و به احتمال غیر حساس شدن گیرنده ی گابا می باشد (Memarizadeh *et al.*, 2011). تاثیر سینرژستی دی اتیل مالئات روی جمعیت مقاوم و حساس نشان داد که نسبت سینرژستی این ترکیب با بروموپروپیلات روی جمعیت مقاوم کنه قرمز مرکبات برابر $۲/۳۸$ و روی جمعیت حساس $۴/۵۹$ است. اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز با استفاده از CDNB نشان داد که فعالیت این آنزیم در جمعیت مقاوم $۱/۳۴$ برابر جمعیت حساس می باشد (جدول ۲). با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون سینرژستی، گلوکاتایون اس-ترانسفراز نقشی در

جمعیت جمع آوری شده از رامسر به دلیل شیب تندتر منحنی غلظت-پاسخ هموزیگوت است. نتایج مشابهی برای جمعیت حساس پسپل پسته گزارش شده است. در بررسی مقاومت به فوزالون، در بین جمعیت های مورد آزمون پسپل پسته، کم-ترین شیب مربوط به جمعیت BA (جمعیت حساس پایه) بود و این نشان می دهد که جمعیت BA در مقایسه با سایر جمعیت ها هتروژن تر است (Alizadeh *et al.*, 2011).

یکی از راه های تشخیص مقاومت متابولیکی و تعیین میزان مشارکت آنزیم های سم زدا در مقاومت به سموم، استفاده از سینرژسیت های مهارکننده استرازی، گلوکاتایون اس-ترانسفراز و سامانه اکسیدکننده می باشد. یکی از سامانه های بلوکه کننده سامانه استرازی، تری فنیل فسفات می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از تأثیر سینرژسیت تری فنیل-فسفات روی سمیت بروموپروپیلات روی جمعیت های حساس و مقاوم کنه قرمز مرکبات، می توان گفت که این سینرژسیت توانست مقاومت را در جمعیت مقاوم سرکوب کند، اما در مقایسه با جمعیت حساس، نسبت سینرژستی 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 تری فنیل فسفات نشان دهنده عدم دخالت این سامانه آنزیمی در مقاومت به بروموپروپیلات است. نتایج مشابهی در زمینه مقاومت کنه دو لکه ای به ترکیبات بازدارنده انتقال الکترون (MTI) گزارش شده است. در کنه دو لکه ای مقاوم به فن پروکسی میت (MR-VP)، نسبت سینرژستی DEF^۱ (بازدارنده استراز) روی سمیت فن پروکسی میت در استرین حساس (GSS) ۴ برابر بود، در حالی که نسبت سینرژستی روی استرین مقاوم $۱/۳۳$ برابر به دست آمد. میزان مقاومت در جمعیت مقاوم ۲۷۴ برابر جمعیت حساس گزارش شد (Van Pottelberge *et al.*, 2009). همچنین فعالیت استرازی با استفاده از سویسترای ۴-نیتروفیل بوتیرات و ۴-نیتروفیل پروپیونیت، $۱/۲$ برابر استرین حساس بود. تاثیر سینرژسیت ها در مقاومت *Tetranychus cinnabarinus*

³. S-benzyl O, O-diisopropyl phosphorothioate

¹. S, S, S-tributylphosphorotrithioate
². Chlorpyrifos

پیرونیل بوتوکساید نشان داد که نسبت سینرژستی 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 سینرژستی نشان‌دهنده عدم نقش این آنزیم در مقاومت به بروموپروپیلات می‌باشد. نسبت سینرژستی بالاتر برای کنه دو لکه‌ای حساس به ترکیبات بازدارنده انتقال الکترون در مقایسه با استرین مقاوم گزارش شده است، به طوری که نسبت سینرژستی پیرونیل بوتوکساید روی استرین مقاوم ۱/۹۷ و همین نسبت روی استرین حساس ۱۹/۰۹ برابر بود که نشان‌دهنده عدم دخالت سامانه مونواکسیژناز در مقاومت به فن-پیروکسی میت 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 آن که فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در استرین مقاوم بالا است، اما نتایج سینرژستی حاکی از عدم نقش این آنزیم‌ها در مقاومت به بروموپروپیلات است. گزارش شده است که سینرژست پیرونیل بوتوکساید و آنزیم مونواکسیژناز در مقاومت کنه دو لکه‌ای به مهارکننده‌های انتقال الکترونی میتوکندری نقش دارد (Stumpf and Nauen, 2001). در مطالعه‌ای مقاومت کنه دو لکه‌ای به اسپیرودیکلوفن بررسی شده و طبق نتایج به دست آمده، مقاومت ۱۳ برابر بوده و بررسی‌های سینرژستی با پیرونیل بوتوکساید و افزایش فعالیت آنزیمی سیتوکروم P₄₅₀ (آزمون بیوشیمیایی) نشان‌دهنده 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 سینرژستی نشان داد که هیچ کدام از سامانه‌های سم‌زدای متابولیکی نقشی در مقاومت کنه قرمز مرکبات به این ترکیب ندارند. هرچند که نسبت فعالیت آلفا-استرازی، بتا استرازی، گلوکوتایون اس-ترانسفراز و سامانه اکسید کننده در جمعیت مقاوم به ترتیب ۱/۷، ۱/۸۳، ۱/۳۴ و ۱/۳۹ برابر جمعیت حساس

مقاومت کنه قرمز مرکبات به بروموپروپیلات ندارد. وان-پاتلبرگ و همکاران (Van Pottelberge et al., 2009) با بررسی تاثیر سینرژست دی‌اتیل مالئات 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 سینرژستی دی‌اتیل مالئات ۰/۹۶ به دست آمد، در حالی که این نسبت در استرین حساس (GSS) ۱/۵۹ برابر بود. همچنین میزان فعالیت گلوکوتایون اس-ترانسفراز در استرین مقاوم با استفاده از سوبستراهای CDNB^۱ و MCB^۱ به ترتیب ۱/۲ و ۲/۵ برابر استرین حساس بود. بنابراین، علی‌رغم فعالیت بالای گلوکوتایون اس-ترانسفراز، این سامانه آنزیمی نقشی در مقاومت کنه دو لکه‌ای به فن‌پیروکسی میت ندارد. با توجه به آزمایش‌های انجام شده در مورد تاثیر سینرژستی تری‌فنیل فسفات، دی‌اتیل-مالئات و پیرونیل بوتوکساید روی مقاومت کنه قرمز مرکبات به پیریدابن، آنزیم گلوکوتایون اس-ترانسفراز در این مقاومت نقش داشته (Liu et al., 2010)، ولی در مورد کنه دو لکه‌ای عامل مقاومت به پیریدابن مونواکسیژنازها است (Kim et al., 2006). بر اساس بررسی‌های سینرژستی انجام شده روی استرین مقاوم به پروپارزیت *T. cinnabarinus* (با مقاومت ۳۷/۷۸ برابری)، نسبت سینرژستی دی‌اتیل مالئات، پیرونیل بوتوکساید و تری‌فنیل-فسفات به ترتیب ۲/۲۸، ۱/۴۷ و ۱/۰۶ به دست آمد و عامل مقاومت به پروپارزیت فعالیت آنزیمی گلوکوتایون اس-ترانسفراز گزارش شده است (Luo et al., 2014). مقاومت *N. californicus* به هگزیتیاژوکس با استفاده از روش دیسک برگی و برج پاشش نسبت مقاومت ۶۰/۰۴ برابر را گزارش دادند. نسبت سینرژستی IBP، پیرونیل بوتوکساید و دی‌اتیل مالئات به ترتیب ۱/۷۱، ۳/۲۵ و ۱/۹۸ بود. فعالیت آنزیم‌های استراز، گلوکوتایون اس-ترانسفراز، P₄₅₀ 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 et al., 2014). آزمون‌های سینرژستی با

^۱. Monochlorobimane

IRAC). همچنین پژوهشی در زمینه ساز و کار مقاومت کنه-ها به این ترکیب وجود ندارد. به احتمال دلیل مقاومت به برومپروپیلات 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 کنه کش ها توصیه می-شود که فشار سم پاشی با برومپروپیلات کاهش یافته و در برنامه مدیریت مقاومت این آفت از کنه کش های 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.

بود. همچنین اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی آنزیم‌های استراز و گلوکاتایون 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 کنه کش بررسی بیشتر باید مورد توجه قرار گیرد. جمعیت مقاوم، سابقه سم پاشی با کنه کش‌های دیگر که علیه کنه قرمز مرکبات توصیه شده را نیز دارد. تاکنون، ترکیباتی مانند فن‌پیروکسی میت، هگزیتازوکس و آبامکتین روی این جمعیت در برنامه کنترلی به کار برده شده است. افزایش فعالیت سیستم‌های سم‌زدا در این کنه را می‌توان ناشی از فشار سم پاشی این ترکیبات روی کنه قرمز دانست. تاکنون مکان هدف مشخصی برای این کنه کش در کنه‌ها تعیین نشده است (Insecticide Resistance Action Committee,)

References

- Alizadeh, A., Talebi, K., Hosseinaveh, V. and Ghadamyari, M. 2011. Metabolic resistance mechanisms to phosalone in the common pistachio psyllid, *Agonoscaena 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.

- 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* (Boisduval). **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 Entomologica 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.

- 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 spiroadiclofen resistance and cross-resistance in *Panonychus citri*. **African Journal of Biotechnology** 10(17): 3424-3429.

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

H. Emami¹ 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 P₄₅₀ 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 monooxygenase, 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