گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٥، شماره۲، تابستان ١٤٠١

doi 10.22055/ppr.2022.17407

سازوکار مقاومت به فوزالون در شب‌پره پشت‌الماسی
Plutella xylostella(Lep.: Plutellidae)

مریم ذوالفقاری[۱]، محمد قدمیاری[۲]* و هادی مصلی نژاد[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- ***نویسنده مسوول**: استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (mghadamyari@gmail.com)

۳- استادیار موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۶

چکیده

شب‌پره پشت الماسی، *Plutella xylostella* (L.)، آفت مهم و کلیدی گیاهان تیره کلمیان است که سالانه خسارت قابل توجهی به گیاهان این تیره وارد کرده و می‌تواند به سرعت به انواع حشره‌کش‌ها مقاوم شود. در این پژوهش پس از شناسایی مقاومت به فوزالون در یک جمعیت ایرانی شب‌پره پشت الماسی، سازوکار مقاومت و غیر حساس شدن مکان هدف با آزمون‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت . نتایج زیست سنجی به روش غوطه‌وری برگ در محلول سمی نشان داد که جمعیت مقاوم به فوزالون (Esf-R)، در مقایسه با حساس (Ard-S)، ۱۷برابر مقاوم‌تر است. دی‌اتیل‌مالئات(DEM) و تری‌فنیل‌فسفات (TPP) به ترتیب به عنوان بازدارنده گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) و استراز (EST)، سمیت فوزالون را روی جمعیت مقاوم و حساس افزایش دادند، اما نسبت هم‌افزایی در جمعیت مقاوم بالاتر از حساس بود که نشان‌دهنده نقش آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون اس- ترانسفراز در مقاومت به فوزالون است. بررسی سازوکار متابولیکی مقاومت به فوزالون با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که فعالیت ویژه (SA) گلوتاتیون اس-ترانسفراز، آلفا- استراز و بتا- استراز در جمعیت مقاوم به ترتیب ۲/۱، ۲ و ۱/۷ برابر جمعیت حساس بود که نشان‌دهنده بیان بیشتر آنزیم‌های گلوتاتیون اس-ترانسفراز و استراز در جمعیت مقاوم می‌باشد. اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی هیدرولیز استیل کولین استراز (AChE) روی زیرنهشت استیل تیوکولین آیوداید نشان داد که تغییری در میل ترکیبی AChE جمعیت مقاوم به این زیرنهشت وجود ندارد. نتایج نشان می دهد که عامل مقاومت در جمعیت مقاوم به فوزالون، آنزیم‌های غیر سمی‌کننده استرازی و گلوتاتیون اس- ترانسفراز هستند و سازوکار مقاومت به فوزالون مبتنی بر مکان هدف نیست.

کلیدواژه‌ها: مقاومت آفات، شب‌پره پشت الماسی، بازدارنده کولین استراز، استراز، گلوتاتیون اس- ترانسفراز

دبیرتخصصی: دکتر سید علی همتی

Citation: Zolfaghari, M., Ghadamyari, M. & Mosallanejad, H. (2022). Resistance Mechanisms of the Diamond Back Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to Phosalone. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(2), 49-62. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2022.17407.

مقدمه

شب‌پره پشت الماسی[1] یا بید کلم با نام علمی *Plutella xylostella* (L.) (Lep.:Plutellidae) یکی از مخرب‌ترین آفات گیاهان تیره کلمیان در سراسر دنیا است. این آفت دارای پراکنش جهانی بوده و هر جایی که گیاهان تیره کلمیان کشت می‌شوند، وجود دارد (Agboyi et al., 2016). این شب‌پره، چندین‌خوار محدود[2] است و گیاهان میزبان آن کلم‌پیچ، کلم‌گل، کلم‌بروکلی، کلم‌قمری، کلم‌چینی، خردل و کلزا هستند. خسارت آن مربوط به تغذیه لاروها از برگ گیاهان است که در جمعیت بالای آفت می‌تواند به نابودی برگ‌ها به جز رگبرگ منجر شود (Furlong et al., 2013). با توجه به رشد سریع و تداخل نسل، این آفت سبب خسارت جدی به محصولات کشاورزی می‌شود و هزینه‌های مدیریتی و خسارت‌های وارد شده توسط این آفت، به طور متوسط سالانه در دنیا ۴ تا ۵ میلیارد دلار گزارش شده است (Zalucki, 2012).

علی‌رغم پیشنهاد کاربرد روش‌های غیر شیمیایی برای کنترل شب‌پره پشت الماسی، محوریت مدیریت این آفت در ایران و جهان، کنترل شیمیایی است، که متاسفانه عدم کاربرد صحیح و اصولی آفت‌کش‌ها، سبب ایجاد مشکلات فراوان مانند آلودگی‌های آب و خاک، نابود کردن دشمنان طبیعی آفات، راه یافتن باقی‌مانده آفت‌کش‌ها به شبکه غذایی انسان و همچنین بروز پدیده مقاومت آفات به آفت‌کش‌ها شده است. تنوع میزبانی و قدرت پراکنش بالا، تولید مثل زیاد و ویژگیهای ژنتیکی منحصر به فرد باعث شده که شب‌پره پشت الماسی به بسیاری از آفت کش‌ها مقاوم شود (Mohan & Gujar, 2003; Shelton, 2004). بیش‌ترین میزان مقاومت به آفت‌کش‌ها در جهان طی ۵۰ سال گذشته مربوط به *P. xylostella* است (Attique et al., 2006; Agboyi et al., 2016). طبق داده‌های پایگاه مقاومت بندپایان به آفت‌کش‌ها (APRD)[3] ، تا سال ۲۰۱۵، *P. xylostella* به ۹۱ ترکیب با شیوه اثر متفاوت مقاومت نشان داده است. این حشره از اولین آفات گیاهی در جهان است که به آفت‌کش د.د.ت مقاوم شده و همچنین اولین حشره آفت کشاورزی مقاوم به باکتری *Bacillus thuringiensis* می‌باشد (Tabashnik et al., 1990; Shelton et al., 1993).

در ایران، برای مدیریت این آفت، حشره‌کش‌های متعددی نظیر کلرفلوآزورون (آتابرون®)، هگزافلومورون (کنسالت®) (بازدارنده سنتز کیتین) ایندوکساکارب (آوانت®) (مسدود کننده کانال سدیم)، Bt و روی‌اگرو توسط سازمان حفظ نباتات رسما ثبت و یا توصیه شده‌اند (Noorbakhsh, 2020). فوزالون یکی از حشره‌کش‌های پرکاربرد برای کنترل آفات مختلف (توصیه شده توسط سازمان حفظ نباتات برای کنترل پسیل، سوسک کلرادو، خوشه‌خوار انگور و کرم سیب) در ایران است که به دلیل همین کاربرد گسترده آن، جنبه‌های مختلف این حشره‌کش از جمله روش‌های اندازه‌گیری باقیمانده آن (Yaseen et al., 2019; Orouji et al., 2019; Hadian et al., 2019) و همین طور تاثیر آن روی زنبور پارازیتوئید *Trichogramma brassicae* (Bezdenko) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Parsaeyan et al., 2020) در کشورمان مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین این حشره‌کش از ترکیبات موثر روی لارو بال‌پولکداران بوده، به‌طوری که در ایران کاربرد آن روی لاروهای برخی بال‌پولکداران برگ‌خوار توصیه شده است (Talebi Jahromi, 2012) فوزالون،ترکیبی فسفره با کاربرد وسیع است که خاصیت حشره‌کشی و کنه‌کشی داشته و دارای سمیت تماسی و گوارشی روی آفات می‌باشد. این آفت‌کش روی لارو پروانه‌ها موثر بوده و برای بسیاری از دشمنان طبیعی به عنوان ترکیبی کم خطرشناخته شده است (Talebi Jahromi, 2012).

1- Diamond back moth
2- Oligophage
3- Arthropod Pesticide Resistance Database

شب‌پره پشت الماسی روی سبزیجات تیره کلمیان و سبزیجاتی که مصرف تازه‌خوری دارند، فعالیت دارد. با توجه به پتانسیل بالای این آفت در بروز مقاومت، اطلاعات مربوط به سازوکار و سطوح مقاومت به حشره‌کش‌ها جهت استفاده در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات ضروری به نظر می‌رسد. پایش پدیده مقاومت در مزرعه به عنوان یک استراتژی منطقی در مدیریت مقاومت به اثبات رسیده است (Scott, 1990). تاکنون سازوکار مقاومت *P. xylostella* به فوزالون مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف از این پژوهش، بررسی وضعیت مقاومت به فوزالون جمعیت *P. xylostella* واقع در مزارع کلم موجود در شهر اصفهان و همچنین تعیین سازوکار مقاومت به این ترکیب است. به دست آوردن اطلاعات لازم از سازوکارهای مقاومت به فوزالون درک ما را از تکامل مقاومت در برابر حشره‌کش‌ها افزایش می‌دهد .

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

حشره‌کش فوزالون (زولون®) (EC ۳۵ درصد) مورد استفاده در آزمون‌های زیست‌سنجی از شرکت گل سم گرگان تهیه شد. آلفا نفتیل استات[1](α-NA) ، بتا نفتیل استات(β-NA) [2]، نمک فاست بلو آر آر[3] از شرکت فلوکا[4] (سوئد)، ۵ و َ۵ دی تیو بیس(DTNB)[5]، استیل تیو کولین آیوداید (ATC[6]) از واکو (ژاپن)[7]، پاپیرونیل بوتوکسیاید(PBO)[8]، دی اتیل مالئات (DEM)[9] و تری فنیل فسفات (TPP)[10] و سایر مواد از شرکت مرک[11] (آلمان) خریداری شد.

جمع‌آوری جمعیت‌های حساس و مقاوم شب‌پره پشت الماسی

به منظور انجام این پژوهش، جمعیتی مشکوک به مقاومت از مزارع کلم واقع در شهر اصفهان جمع‌آوری و به آزمایشگاه سم‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان منتقل و روی گیاه کلم چینی (*Brassica rapa* L.) پرورش داده شد. جمعیت حساس از آزمایشگاه دانشگاه محقق اردبیلی که مدت طولانی بدون سم‌پاشی پرورش داده شده، به گلخانه‌ی گیاه‌پزشکی منتقل و روی گیاه میزبان کلم چینی پرورش داده شد.

پرورش حشرات

حشرات در شرایط گلخانه‌ای (دمای ۳±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) نگهداری و پرورش داده شدند. جهت جلوگیری از اختلاط جمعیت‌های مختلف، شب‌پره‌ها به‌صورت مجزا داخل قفس‌های حاوی گلدان (ابعاد ۰/۵ در یک متر) کلم قرار گرفتند و دیواره قفس‌ها با توری پوشانده شده و بعد از جفت‌گیری و تخم‌ریزی حشرات کامل، لاروها از تخم ها خارج شده و از برگ کلم تغذیه می‌کردند. به منظور تهیه جمعیت همسن، برگ‌های گیاه کلم چینی داخل قفس تخم‌گذاری که حاوی۲۰۰ عدد حشره نر و ماده بود، قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت، برگ‌ها ی حاوی تخم برای ایجاد جمعیت هم‌سن استفاده شدند.

زیست‌سنجی‌ها

آزمایش‌های زیست‌سنجی با حشره‌کش فوزالون روی لارو سن سوم شب پره پشت الماسی با روش فرو بردن دیسک برگی کلم چینی در محلول حشره‌کش صورت گرفت (Tabashnik & Slansky, 1987). در ابتدا برای

1- α-naphtyl acetate (αNA)
2 -ß-naphtyl acetate (ß-NA)
3- Fast blue RR salt
4- Fluka (Fluka, Buchs, Switerland).
5- 5, 5'- dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
6- Acetylthiocholine iodide
7- Wako (www.wako-chem.co.jp)
8- Piperonyl butoxide (PBO)
9- Diethyl maleate (DEM)
10- Triphenyl phosphate (TPP)
11- Merck (Darmstadt, Germany)

تعیین غلظت‌هایی از هر حشره‌کش که باعث مرگ و میری در حدود ۱۰ تا ۹۰ درصد شود، آزمون‌های اولیه انجام شد و پس از تعیین غلظت‌های موثر بالا و پایین، غلظت‌های بینابین این دو دامنه با فواصل لگاریتمی انتخاب شده و در نهایت پنج غلظت از فوزالون در زیست‌سنجی استفاده شد. شاهد نیز با آب مقطر تیمار گردید. ابتدا دیسک‌های برگی گیاه کلم چینی (قطر ۵ سانتی‌متر) به مدت ۳۰ ثانیه در غلظت‌های مختلف حشره‌کش غوطه‌ور و سپس به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا خشک شوند. جهت جلوگیری از خشک شدن برگ‌ها به دم‌برگ پنبه مرطوب پیچیده شده و برگ‌ها به ظروف پلاستیکی حاوی تهویه با نصب توری روی درپوش و به ابعاد۷×۱۰ و ارتفاع ۶ سانتی متری منتقل می‌شدند و لاروها (۱۰ لارو در هر ظرف) به روی برگ‌های تیمار شده منتقل و پس از ۴۸ ساعت تلفات آن‌ها ارزیابی شد. لاروهای که بعد از تحریک با قلم‌مو قادر به راه رفتن به اندازه طول بدن نبودند به عنوان مرده تلقی شدند. تمام آزمایش‌های زیست‌سنجی در پنج تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های زیست‌سنجی، محاسبه LC_{50} و حدود اطمینان ۹۵ درصد از نرم افزار پولو پی‌سی استفاده شد (LeOra Software, 1987).

استفاده از هم‌افزاهای PBO، TPP و DEM در تعیین سازوکارهای مقاومت

به منظور بررسی سازوکارهای مقاومت و برای تعیین اثر هم‌افزا روی میزان مقاومت، محلول پایه‌ای از هم‌افزا به غلظت (۱۰ گرم بر لیتر) در استون خالص تهیه شد و این محلول با آب مقطر حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر ترایتون X-100 رقیق شد. جمعیت‌های شب پره پشت الماسی به صورت پیش تیمار در معرض سه هم‌افزا PBO (پایپرونیل بوتوکساید)، DEM (دی اتیل مالئات) و TPP(تری‌فنیل فسفات) به ترتیب به عنوان مهارکننده مونواکسیژنازها، گلوتاتیون اس-ترانسفرازها و استراز قرار داده شده و غلظت هم‌افزاها با استفاده از آزمون مقدماتی تعیین شد. در تیمارها غلظت‌هایی از هم‌افزاها استفاده شد که تلفات ایجاد شده توسط آن‌ها زیر ۱۰ درصد باشد. آزمون‌های مقدماتی نشان داد که غلظت PBO، DEM و TPP برای افراد حساس به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و برای افراد مقاوم ۱۰۰ ، ۱۸۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. برای بررسی تأثیر PBO، DEM و TPP بر سمیت فوزالون، هم‌افزا به هر یک از غلظت‌های مختلف فوزالون اضافه شد. برای هر تکرار یک شاهد که شامل آب مقطر و هم‌افزا و ترایتون X-100 (بدون حشره‌کش) بود، نیز درنظر گرفته شد. تلفات بعد از ۴۸ ساعت ثبت و LC_{50} و حدود اطمینان ۹۵ درصد جمعیت‌ها با نرم افزار پولو پی‌سی برآورد شد (Ninsin and Tanaka, 2005). نسبت هم‌افزایی (SR^1) از فرمول زیر برآورد گردید (Afzal et al., 2015)

$$SR = \frac{\text{LC50 جمعیت تیمارشده باحشره‌کش}}{\text{(LC50 جمعیت تیمارشده باحشره‌کش وهم‌افزا}}$$

آزمون‌های بیوشیمیایی

تعیین غلظت پروتئین کل

غلظت پروتئین هر یک از نمونه‌ها با استفاده از روش بردفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد. ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۵۰۰ میکرو لیتر معرف بردفورد اضافه شده و جذب آن در ۶۳۰ نانومتر بعد از گذشت ۱۵ دقیقه (جهت توسعه رنگ) با دستگاه میکروپلیت ریدر Awareness (statfax 3200) خوانده شد. از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری سامانه‌های غیرسمی‌کننده

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز با استفاده از زیرنهشت ۱-کلرو۲و۴ دی نیتروبنزن (CDNB)، و گلوتااتیون احیا (GSH) مطابق روش Habig (1974)

1- Synergistic ratio

et al. و Alizadeh et al. (2011) با اندکی تغییرات انجام شد. به این صورت که ۵۰ عدد لارو سن سوم در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) در دمای چهار درجه سلسیوس هموژنایز و بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار ۱۵ میکرولیتر از نمونه‌ی آنزیمی داخل چاهک‌های پلیت دستگاه میکروپلیت ریدر ریخته و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط CDNB (یک میلی‌مولار) و گلوتاتیون احیاء شده در بافرفسفات (۰/۱ مولار و اسیدیته ۷) به آن اضافه شد. تغیرات جذب با استفاده از میکروپلیت‌ریدر به مدت پنج دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یکبار در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت استراز

تعداد ۲۰۰ حشره کامل در ۳۰۰ میکرولیتر بافر ۰/۱ مولار فسفات (اسیدیته ۷) حاوی ۰/۱ درصد ترایتون X-100 همگن و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. فعالیت‌های هیدرولیتیکی استرازها با استفاده از آلفا-نفتیل استات و بتا-نفتیل استات به‌عنوان زیرنهشت Van (1962) Asperen et al. و Alizadeh et al. (2011) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. به این صورت که ۵۰ میکرولیتر نمونه آنزیم به ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷) و ۱۰ میکرولیتر زیرنهشت (۱۰ میلی مولار در استون) اضافه شده، سپس ۵۰ میکرولیتر نمک فست بلو آر آر (۰/۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر فسفات) به مخلوط واکنش اضافه و میزان نفتول تولید شده به صورت پیوسته در طول موج‌های ۴۰۵ نانومتر (برای زیرنهشت آلفا-نفتیل استات (α-NA) و ۵۴۰ نانومتر (برای زیرنهشت بتا-نفتیل استات (β-NA) با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر مدل Stat Fax 3200 اندازه‌گیری شد. با استفاده از غلظت‌های مختلف نفتول، منحنی استاندارد تهیه و میزان جذب بدست آمده با دستگاه، بر اساس منحنی استاندارد، به میزان محصول تولید شده تبدیل شد.

اندازه‌گیری فعالیت ویژه و فراسنجه‌های سینتیکی استیل کولین استراز

سنجش آنزیم با استفاده از روش تغییر یافته Ellman et al. (1961) انجام گرفت (Ghadamyari et al., 2008). ۱۰۰۰ عدد لارو سن ۳ حشره در ۳۰ میلی لیتر (۱۵ لارو در ۵۰۰ میکرولیتر) بافر فسفات۰/۱ مولار (pH=۷) حاوی ۰/۰۵درصد ترایتونX-100 با یک هموژنایزر دستی روی یخ هموژنایز شدند. محلول هموژنایز شده با دور g× ۱۱۰۰۰ در یک سانترفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۰ دقیقه سانترفیوژ شده و محلول رونشین به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. فعالیت آنزیم با دو سوبسترای استیل تیوکولین آیودایید[1] و بوتریل تیوکولین آیودایید[2] اندازه‌گیری شد. ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۲۰ میلی مولار با pH=۷/۴)، ۲۰ میکرولیتر محلول دی‌تی‌ان‌بی[3] و ۴۰ میکرولیتر آنزیم درون هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا ریخته و سپس ۴۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (استیل تیوکولین آیودایید- بوتریل تیوکولین آیودایید) به چاهک‌ها اضافه شد. غلظت دی‌تی‌ان‌بی باید در مخلوط نهایی ۱۰ میلی مولار باشد، مقدار استیل تیوکولین تجزیه شده توسط دستگاه میکروپلیت ریدر هر پنج دقیقه به مدت ۳۵ دقیقه در ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد.

برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی کولین استراز از غلظت‌های مختلف سوبسترا شامل ۰/۵-۱/۲۵-۲/۵-۵-۱۲/۵-۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. برای هر غلظت سوبسترا یک کنترل منفی شامل غلظت مورد نظر، بافر، دی‌تی‌ان‌بی، بافر فسفات (فاقد آنزیم) استفاده شد.

1- Acetyl thiocholine
2- Bothryl thiocholine
3- DTNB

ابتدا با استفاده از نرم افزار اکسل سرعت اولیه و سپس با استفاده از نرم افزار هایپر، *Km* و *Vmax* آنزیم برآورد شد.

تجزیه و تحلیل فعالیت آنزیم‌های غیر سمی‌کننده

برای مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌ها در جمعیت‌های حساس و مقاوم از آزمون تی استیودنت در سطح پنج درصد با کمک از نرم‌افزار SAS استفاده شد.

نتایج

نسبت مقاومت دو جمعیت حساس و مقاوم به فوزالون

مقدار LC_{50} در جمعیت حساس۹۲/۲۸ و در جمعیت مقاوم ۱۵۹۱ میلی‌لیتر بر میلی لیتر بدست آمد . نسبت مقاومت جمعیت مقاوم به حساس۱۷/۲ برابر برآورد گردید (جدول۱). با توجه به این‌که محدوده نسبت مقاومت بدست آمده شامل عدد یک نمی‌باشد، بنابراین LC_{50} جمعیت مقاوم با LC_{50} جمعیت حساس از لحاظ آماری در سطح ۹۵٪ اختلاف معنی‌داری دارد (Hosseininaveh & Ghadamyari, 2014).

اثر هم‌افزایی

اثر هم‌افزاهای TPP، DEM و PBO روی جمعیت‌های حساس و مقاوم مورد بررسی قرار گرفت تا اهمیت و نقش آنزیم‌های غیرسمی‌کننده‌ی استراز، ، گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) و مونواکسیژناز (MFO) در جمعیت مقاوم مشخص شود (جدول۲). نسبت هم‌افزایی در جمعیت مقاوم تیمار شده با DEM و TPP (به ترتیب ۲/۳ و ۱/۸۳) در مقایسه با جمعیت حساس بیشتر بود که نشان می‌دهد در جمعیت مقاوم به فوزالون در مقایسه با جمعیت حساس، آنزیم‌های GST و استراز نقش بیشتری در غیرسمی‌کردن داشته و بنابراین در مقاومت شب‌پره پشت الماسی به فوزالون نقش دارند. هم‌افزای PBO نتوانست در دو جمعیت حساس و مقاوم سمیت فوزالون را افزایش دهد.

فعالیت آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم

فعالیت آنزیم‌های استراز با استفاده از زیرنهشت α-NAو β-NA اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم استراز در جمعیت‌های مقاوم و حساس وجود دارد (جدول ۳). نسبت فعالیت آنزیم استراز جمعیت مقاوم به حساس اندازه‌گیری شده با زیرنهشت آلفا نفتیل استات و بتا نفتیل استات به ترتیب ۲ و ۱/۷ برابر بود. فعالیت آنزیم GST با استفاده از زیرنهشت CDNB در دو جمعیت حساس و مقاوم تفاوت معنی‌داری داشت به صورتی که فعالیت این آنزیم در جمعیت مقاوم در حدود ۲/۱ برابر فعالیت آن در جمعیت حساس بود (جدول۳).

فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در دو جمعیت حساس و مقاوم به فوزالون با استفاده از زیرنهشت استیل تیوکولین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج K_m (میل ترکیبی آنزیم به زیرنهشت) و V_{max} (میزان بیان آنزیم) استیل کولین استراز روی استیل کولین آیوداید به عنوان زیرنهشت مصنوعی نشان داد که استیل کولین استراز جمعیت حساس و مقاوم نسبت به این زیرنهشت میل ترکیبی یکسانی دارند (جدول ۴)

جدول۱- تجزیه پروبیت سمیت فوزالون در جمعیت‌های حساس و مقاوم شب‌پره پشت الماسی، *Plutella xylostella*

Table 1. Probit analysis of phosalone toxicity in susceptible (Ard-S) and resistant (Esf-R) populations of the Diamond back moth, *Plutella xylostella*

Population	N	LC_{50} (µg/ml)	95% CL of LC_{50}	Slope (±SE)	χ2 (df)	[a]RR	P-value
Ard-S	200	28.92	72.44-112.12	3(0.57)	0.29 (3)	1	0.023
Esf-R	200	1591	1177-1974	2.9 (0.64)	0.9 (3)	17.2(11.6-26.3)	0.031

[a] RR: Resistance ratio = LC_{50} of the resistant population/LC_{50} of the susceptible population and their 95% confidence interval

جدول۲- اثر سه ترکیب TPP، DEM و PBO روی سمیت فوزالون در جمعیت‌های حساس و مقاوم شب‌پره پشت الماسی، *Plutella xylostella*

Table 2. Effect of piperonyl butoxide (PBO), diethyl maleate (DEM) and triphenyl phosphate (TPP) on phosalone toxicity in susceptible (Ard-S) and resistant (Esf-R) populations of the Diamond back moth, *Plutella xylostella*

Population	Synergisis	N	LC_{50}(%95CI)[a]	Slope(SE)	X^2 (df)	SR[b](%95CI)
Ard-S	without	200	92.2 (72.44–112.12)	3(0.57)	0.29 (3)	---
	PBO	200	73.4 (48.8–95.3)	3(0.9)	0.5(3)	1.25 (0.85–1.54)
	DEM	200	71.9 (51.3–93)	4(0.9)	0.8(3)	*1.28(1.06–1.67)
	TPP	200	67.7(37.1–84.1)	3 (0.8)	1(3)	*1.36(1.11–1.9)
Esf-R	without	200	1591(1177–1974)	2.9(0.64)	0.9(3)	---
	PBO	200	1130(595.9–1635.1)	2.3(0.7)	0.72 (3)	1.4(1.2–2.1)
	DEM	200	680.4(254–1324)	2 (0.9)	1.8 (3)	*2.3 (1.6–2.9)
	TPP	200	921.5(439.5–1305.4)	2.5(0.7)	0.9 (3)	*1.83(1.1–2.4)

[a] LC_{50}(µg/ml), 95% confidence interval.
[b] Synergistic Ratio (SR) = LC_{50} of insecticide alone/LC_{50} of (synergist + insecticide) and their 95% confidence interval.
* The LC_{50} of insecticide alone statistically different from LC_{50} of (synergist + insecticide) at 95% level ($P < 0.05$).

جدول ۳- فعالیت ویژه آنزیم‌های متابولیکی در جمعیت‌های حساس و مقاوم شب‌پره پشت الماسی، *Plutella xylostella*

Table 3. Specific activity of detoxification enzymes in susceptible (Ard-S) and resistant (Esf-R) populations of the Diamond back moth, *Plutella xylostella.*

Enzyme	Substrate	Special activity (SA)		[a]Ratio
		Esf-R	Ard-S	
EST	α-NA	*0.47±0.005	*0.23±0.009	2
	β-NA	*0.21±0.007	*0.12±0.005	1.7
GST	CDNB	*2.72±0.002	*1.28±0.005	2.1

* Statistically significant at 95% level ($P < 0.05$).
[a] Mean enzyme specific activity ratio (± SE) =specific activity in resistant population/specific activity in susceptible population

و این نشان‌دهنده عدم تغییرات کیفی در مکان هدف آنزیم است. عدم تفاوت V_{max} درجمعیت مقاوم و حساس، بیان یکسان استیل کولین استراز را در هر دو جمعیت نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در دو جمعیت تفاوت آماری معنی‌داری ندارد و در نتیجه این آنزیم در مقاومت جمعیت مقاوم به سم فوزالون نقشی ایفا نمی‌کند.

بحث

تاکنون مقاومت دو آفت مهم یعنی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (Malekmohammadi et al., 2010) و پسیل پسته (*Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer) (Alizadeh et al., 2014) به فوزالون در ایران گزارش شده است. در این پژوهش مقاومت شب‌پره پشت الماسی به فوزالون برای اولین بار در دنیا گزارش می‌شود. بر اساس نتایج زیست‌سنجی، نسبت مقاومت در جمعیت مقاوم به حساس ۱۷/۲برابر برآورد شد، این نسبت برای جمعیت سوسک کلرادو و پسیل پسته مقاوم به فوزالون در ایران به ترتیب ۲۵۲ و ۱۱/۳ برابر گزارش شده است. که دلیل مقاومت بالای سوسک کلرادو به فوزالون، مبتنی بر سامانه اکسیدکننده و غیرحساس شدن مکان هدف است، در حالی‌که مقاومت ۱۷/۲ برابری به فوزالون در شب‌پره پشت الماسی، ناشی از سامانه استرازی و گلوتاتیون اس_ترانسفرازی است و مکان

هدف نقشی در مقاومت ندارد. تشخیص سازوکارهای مقاومت نه تنها برای کنترل مقاومت این آفت، بلکه برای به تاخیر انداختن توسعه مقاومت نیز مهم است (Miyata et al., 1982). مطالعه سازوکارهای غیر سمی کردن با استفاده از سه هم‌افزا TPP، DEM و PBO روی جمعیت‌های حساس و مقاوم نشان داد DEM و TPP مقاومت به فوزالون را در جمعیت مقاوم تا حدود دو برابر کاهش دادند، اما PBO در جمعیت حساس و مقاوم تقریبا یکسان عمل کرد که احتمالا نشان‌دهنده عدم دخالت آنزیم‌های مونواکسیژناز در مقاومت شب‌پره به این ترکیب است. Alizadeh et al. (2011) گزارش کردند که کاربرد دو هم‌افزا TPP، DEM سمیت این حشره‌کش را در جمعیت پسیل پسته مقاوم به فوزالون به میزان ۳/۴ و ۱/۴ برابر افزایش دادند که بیانگر دخالت آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس_ترانسفراز در مقاومت پسیل پسته به این ترکیب است. در بررسی که روی جمعیت سوسک کلرادو مقاوم به فوزالون انجام شد، DEF و DEM در مقایسه با PBO، نقش کمتری در کاهش مقاومت داشته است (Malekmohammadi et al., 2010) . نتایج آزمون‌های هم‌افزای دو آفت پسیل پسته و سوسک کلرادو مطابق با نتایج پژوهش حاضر است و نشان‌دهنده نقش آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون اس-ترانسفراز در مقاومت به فوزالون در آفات متعلق به راسته‌های مختلف می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس فعالیت استرازی در دو جمعیت حساس و مقاوم شب‌پره پشت الماسی با استفاده از زیرنهشت‌های آلفا- نفتیل استات و بتا- نفتیل استات نشان داد که فعالیت ویژه آنزیم (SA) در هر دو مدل زیرنهشت در جمعیت مقاوم و جمعیت حساس با هم اختلاف معنی‌داری دارند و میزان فعالیت استرازی با زیرنهشت آلفا-نفتیل استات در جمعیت مقاوم،دو برابر و با زیرنهشت بتا نفتیل استات، ۱/۷ برابر جمعیت حساس بود. فعالیت آنزیم استرازی با زیرنهشت آلفا- نفتیل استات در جمعیت‌های حساس و مقاوم بیشتر از فعالیت استرازی با زیرنهشت بتا-نفتیل استات بدست آمد (جدول ۳).همچنین این نتایج حاکی از آن است که یکی از سازوکارهای مقاومت شب‌پره پشت الماسی مقاوم، افزایش فعالیت استرازهای غیرسمی‌کننده است. نتایج فعالیت آنزیمی همسو با میزان اثر هم‌افزا TPP (هم‌افزای استرازی) روی سمیت فوزالون بود (جدول ۲) که در جمعیت مقاوم TPP توانست مقداری سمیت فوزالون را افزایش دهد و این افزایش در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار بود. اما در جمعیت حساس، TPP به میزان کمتری سمیت فوزالون را افزایش داد. افزایش تولید این آنزیم‌ها بر اساس ازدیاد ساختمان ژن‌های کد کننده آنهاست. این ژن‌ها عامل مقاومت بالایی به حشره کش‌های فسفره و پایروترئیدی هستند (Field et al., 1988). در پژوهش انجام شده روی پسیل پسته مقاوم به فوزالون هم در مطالعه هم‌افزایی و هم مطالعه بیوشیمیایی آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس-ترنسفراز از عوامل موثر در مقاومت جمعیت‌های مقاوم بودند که فعالیت آنزیم استراز تا ۳ برابر و

جدول٤- فعالیت ویژه و فراسنجه‌های سینتیکی آنزیم استیل کولین استراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم شب پره پشت الماسی، *Plutella xylostella*

Table 4. Substrate specificities and kinetic parameters (mean ± SE) of AChE from susceptible (Ard-S) and resistant (Esf-R) populations of the diamond back moth, *Plutella xylostella*

Enzyme	Substrate	Ard-S				Esf-R			
		Mean ± SE							
		SA	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	*SA*	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
AChE	ATC	0.57 ±0.08	0.6 ±0.04	0.058 ±0.01	0.096 ±0.018	*0.52 ±0.1	*0.57 ±0.02	*0.051 ±0.005	*0.089 ±0.085

* Statistically significant at 95% level (P < 0.05),
ATC: Acetylthiocholine Iodide
SA :Specific activity ± SE (nmol/min.mg protein)

گلوتاتیون اس-ترنسفراز تا ۲/۵ برابر در جمعیت‌های مقاوم نسبت به حساس افزایش یافت (Alizadeh et al., 2014).

در گزارش Zolfaghari et al. (2019) میزان مقاومت جمعیت مقاوم جمع‌آوری شده از کرج (Kar-R) به فوزالون ۱۰ برابر و به کلرپایریفوس ٦۹ برابر گزارش شد در حالی جمعیت جمع‌آوری شده از اصفهان (جمعیت مقاوم(Esf-R) در پژوهش حاضر)، مقاومت ۱۷ برابر به فوزالون نشان داد. در هر دو پژوهش آنزیم‌های استراز و گلوتاتیون اس‌ترنسفراز در جمعیت مقاوم فعالیت بیشتری نسبت به جمعیت حساس داشت اما در جمعیت Kar-R سازوکار اصلی مقاومت به ترکیبات فسفره مبتنی بر غیرحساس شدن مکان هدف بود، در حالی‌که در جمعیت Esf-R سازوکار مقاومت متابولیکی است و مکان هدف نقشی در مقاومت ندارد. سازوکار مقاومت به سموم، بسته به سابقه و الگوی استفاده از آفت‌کش‌ها می‌تواند متفاوت باشد. در مزرعه‌ای که جمعیت Kar-R جمع‌آوری شده بود، سابقه مصرف ترکیبات فسفره بالا بود، اما در مزارع کلم اصفهان علاوه بر فوزالون، ترکیباتی مثل ایمیداکلوپرید نیز برای کنترل استفاده شده بود.

Yu and Nguyen (1992) در پژوهشی نشان دادند که فعالیت استرازی با استفاده از زیرنهشت آلفا نفتیل استات در شب‌پره پشت الماسی مقاوم به ترکیبات فسفره و پایریتروئیدی ۱/۱ برابر استرین حساس است، بنابراین برخلاف نتایج پژوهش حاضر، این آنزیم نقشی در مقاومت به پایریتروئیدها و برخی سموم فسفره ندارد. در مطالعه دیگر که روی سازوکار مقاومت *P. xylostella* به ترکیبات پایریتروئیدی، ایندوکساکارب و فسفره (کلرپایریفوس، متیل پاراتیون، مالاتیون، متامیدفوس و دیازینون) انجام شد، میزان فعالیت آنزیم استراز در استرین مقاوم ۱/۹ برابر بیش‌تر از استرین حساس بود. در این پژوهش آیزوزایم‌های استرازها در حشرات حساس و مقاوم مقایسه شد که تفاوت‌هایی در الگوی باندها نداشتند در حالی‌که باندها در جمعیت مقاوم پررنگ‌تر از حساس بودند (Eziah et al., 2009). بررسی Gong et al. (2012) روی سازوکار مقاومت شب پره پشت الماسی به کلرپایریفوس نشان داد که نسبت مقاومت به این ترکیب در مقاوم‌ترین جمعیت‌ها حداکثر دو برابر بود و همبستگی مثبت بین فعالیت استرازی و میزان مقاومت به ترکیبات فسفره، اسپینوساد، سایپرمترین و آبامکتین مشاهده شد. گزارش‌ها نشان داده است که آنزیم‌های استراز در مقاومت این آفت به سایر حشره‌کش‌های فسفره هم نقش دارند. نتایج بیوشیمیایی توسط Xie et al. (2017) نیز بیان دو ژن استرازی یعنی (Pxae18 and Pxae28) را در شب‌پره پشت الماسی مقاوم به کلرپایریفوس نشان داد که این دو ژن در حشره مقاوم بیشتر از حشره حساس بیان می‌شوند.

گلوتاتیون ترانسفرازها، خانواده متنوعی از آنزیم‌ها هستند که در همه جانداران هوازی یافت می‌شوند. نقش اصلی آن‌ها در غیرسمی‌کردن ترکیبات درون‌زاد و خارجی و همچنین در انتقال درون سلولی و محافظت در برابر استرس اکسیداتیو می‌باشد (Ketterman et al., 2011). آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز به طور معمول ترکیبات کاهنده گلوتاتیون را به ترکیبات الکترون‌دوست مختلف کاتالیز کرده و این مولکول‌های واکنش‌پذیر را به ترکیبات محلول‌تر در آب و غیرسمی تبدیل می‌کند که به‌راحتی از بدن دفع می‌شوند (Oppenoorth, 1985). افزایش بیان آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز مسئول مقاومت به حشره‌کش‌های فسفره‌آلی، پایریتروئیدی، دی‌آمیدی و همچنین ایندوکساکارب می‌باشد (Kao & sun,1991; Hu et al., 2014) . در این مطالعه فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز جمعیت مقاوم ۲/۱ برابر بیشتر از جمعیت حساس بود و در آزمون‌های هم‌افزایی، DEM، LC_{50} فوزالون را درجمعیت مقاوم نسبت به جمعیت

حساس بیشتر کاهش داد. همچنین فعالیت این آنزیم در دو جمعیت مذکور اختلاف معنی‌داری داشت و بنابراین به نظر می‌رسد GST یک عامل مهم در مقاومت این حشره در برابر فوزالون باشد. در مطالعه‌ای که توسط (Zandvakili et al., 2019) و با خالص‌سازی GST از جمعیت حساس و مقاوم به فوزالون پسیل پسته صورت گرفت، نشان دادند که فعالیت GST در استرین مقاوم شش برابر بیش‌تر از استرین حساس می‌باشد و فعالیت ویژه آنزیم خالص شده در دو جمعیت حساس و مقاوم به ترتیب ۱۰/۲۶و ۱۳/۰۴ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بود. Yu and Nguyen (1992)، افزایش ۱/۴ برابریGST را در جمعیت شب‌پره پشت الماسی مقاوم به حشره‌کش‌های فسفره کلرپایریفوس، متیل پاراتیون، مالاتیون، دیازینون و متامیدوفوس گزارش کرده است. بررسی‌های بیوشیمیایی (Gong et al. (2012 نیز بیان کننده‌ی عدم دخالت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز در مقاومت شب پره پشت الماسی، *P. xylostella* به کلرپایریفوس، ساپیرمترین، اسپینوساد، آبامکتین و امامکتین بنزوات است، با این وجود بین مقاومت به کلرپایریفوس و فعالیت استرازی همبستگی وجود داشت. به طور کلی، میزان بیان آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز ممکن است تحت تاثیر تنش‌های اکسیداتیو قرار گیرد و در برخی موارد رابطه مستقیمی بین افزایش گلوتاتیون اس-ترنسفراز و مقاومت وجود ندارد. در پژوهش حاضر، با توجه به داده‌های آزمون هم‌افزایی DEM و با توجه به فعالیت آنزیم می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گلوتاتیون اس-ترانسفراز در مقاومت به کلرپایریفوس نقش دارد.

تعیین فعالیت استیل کولین استراز در دو جمعیت حساس و مقاوم نشان داد که فعالیت این آنزیم و همچنین فراسنجه‌های سینتیکی در هر دو جمعیت نزدیک به یکدیگر بوده و لذا استیل کولین استراز در جمعیت مقاوم به فوزالون تغییرات کمی و کیفی نداشت و این آنزیم نمی‌تواند در مقاومت نقشی داشته باشد. در مطالعه (Alizadeh et al., 2011)، نتایج K_m و V_{max} استیل کولین استراز اندازه‌گیری شده با استیل تیوکولین آیوداید به عنوان زیرنهشت مصنوعی نشان داد که استیل کولین استراز جمعیت مقاوم به فوزالون نسبت به این زیرنهشت میل ترکیبی پایین‌تری در مقایسه با جمعیت حساس دارد و V_{max} بالا در جمعیت مقاوم پسیل‌پسته در مقایسه با جمعیت حساس، بیان بیش از حد استیل کولین استراز را نشان می‌دهد.

نتیجه این پژوهش حاکی از آن است که رفتار استیل کولین استراز در دو جمعیت متفاوت بوده و مکان هدف در مقاومت نقش دارد. ترکیبات فسفره پیوندهای مختلفی را در ساختمان شیمیایی برای حمله آنزیم‌های حشرات در اختیار می‌گذارند (Talebi, 2012)، بنابراین سازوکار مقاومت به این ترکیبات بسته به سابقه سمپاشی می‌تواند متفاوت باشد. در مزارعی که جمعیت مقاوم مورد مطالعه، جمع‌آوری شده بود، علاوه بر فوزالون، سابقه استفاده از ایمیداکلوپرید برای کنترل نیز وجود داشت. شاید استفاده از سازوکار مقاومت متابولیکی به این دلیل باشد که حشره از سامانه غیرسمی‌کننده‌ی استرازی و گلوتاتیون اس-ترانسفرازی برای غیرسمی‌کردن فوزالون و ایمیداکلوپرید بهره برده است.

نتایج موید آن است که شب‌پره پشت الماسی مقاومت به فوزالون را بروز داده و سازوکار اصلی مقاومت به فوزالون متابولیکی بوده و مکان هدف نقشی در این مقاومت ندارد. بنابراین یکی از راه‌کارهای مدیریت مقاومت به فوزالون می‌تواند استفاده از هم‌افزا جهت مدیریت مقاومت باشد. همچنین در برنامه‌های تناوب سموم بایستی از ترکیبات دارای پیوند استری به دلیل بالا بودن فعالیت استرازی حتی‌الامکان اجتناب گردد.

سپاس‌گزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به خاطر حمایت های مالی تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

Afzal, M. B. S., Ijaz, M., Farooq, Z., Shad, S. A., & Abbas, N. (2015). Genetics and preliminary mechanism of chlorpyrifos resistance in Phenacoccus solenopsis Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae *Pesticide Biochemistry and Physiology, 119*: 42–47. http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.02.008.

Agboyi, L. K., Ketoh, G. K., Martin, T., Glitho, I. A., & Tamò, M. (2016). Pesticide resistance *in Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations from Togo and Benin. *International Journal of Tropical Insect Science, 36*: 204-210. https://doi.org/10.1017/S1742758416000138

Alizadeh, A., Talebi, K. H., Hosseininaveh, V., & Ghadamyari, M. (2011). Metabolic resistance mechanisms to phosalone in the common pistachio psyllid, *Agonoscena pistaciae* (Hem.: Psyllidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology, 101*: 59–64. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.07.005

Alizadeh, A., Talebi, K. H., Hosseininaveh, V., & Ghadamyari, M. (2014). Toxicological and biochemical characterizations of AChE in phosalone-susceptible and resistant populations of the common pistachio psyllid, *Agonoscena pistaciae*. *Journal of Insect Science, 14*(1): 18. https://doi.org/10.1093/jis/14.1.18

APRD. (2015). Arthropod Pesticide Resistance Database www.pesticideresistance.com. Date of access: 23/08/2015.

Attique, M. N. R., Khaliq, A., & Sayyed, A. H. (2006). Could resistance to insecticides in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) be overcome by insecticide mixtures. *Journal of Applied Entomology, 130*: 122-127. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01035.x

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andres, V., & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7 (2): 88-95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9

Eziah, V. Y., Harley, A. R., Meredith, W., & Clift, A. D. (2009). Biochemical mechanisms of insecticide resistance in the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* L. (Lepidopterata:Yponomeutidae), in the Sydney region, Australia. *Australian Journal of Entomology, 48*: 321–327. https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2009.00723.x

Field, L. M., Devonshire, A. L., & Forde, B. G. (1988). Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.) result from amplification of an esterase gene. *Biochemistry Journal, 251*: 309-315. https://doi.org/10.1042/bj2510309

Furlong, M. J., Wright, D. J., & Dosdall, L. M. (2013). Diamondback moth ecology and management: Problems, progress, and prospects. *Annual Review of Entomology, 58*: 517-541. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153605

Ghadamyari, M., Talebi, K., Mizuno, H., & Kono, Y. (2008). Oxydemeton-methyl resistance, mechanisms, and associated fitness cost in green peach aphids (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology, 101*(4):1432-8. https://doi.org/10.1093/jee/101.4.1432

Gong, Y. J., Wang, C. L., Yang, Y. H., & Wu, S. (2010). Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. *Journal of Invertebrate Pathology, 104*: 90-96. https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.02.003

Gong, Y., Wang, Z., Shi, B., Zong-Jiang, K., Liang, Z., Gui-Hu, J., & Shu-Jun, W. (2012). Correlation between pesticide resistance and enzyme activity in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Insect Science, 13*(1):135p. https://doi.org/10.1673/031.013.13501

Habig, W. H., Pabst, M. J ., & Jacoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249:7130-7139. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8

Hadian, Z., Eslamizad, S., & Yazdanpanah, H. (2019). Pesticide residues analysis in Iranian fruits and vegetables by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 18*(1): 275. https://doi.org/ 10.22037/IJPR.2019.2333

Hosseininaveh, V., & Ghadamyari, M. (2014). Principles and Concepts of Experimental Methods in *Insect Physiology and Toxicology*. University of Tehran Press. 577 p. (in farsi)

Hu, Z. D., Feng, X., Lin, S. Q., Chen, H. Y., Li, Z. Y., Yin, F., Liang, P., & Gao, X. W. (2014). Biochemical mechanism of chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linnaeus. *Journal of Integrative Agriculture, 13*: 2452-2459. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60748-6

Hu, Z. D., Lin, S. Q., Chen, H. Y., Li, Z. Y., Yin, F., & Feng, X. (2014). Identification of a novel cytochrome P450 gene, CYP321E1 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and RNA interference to evaluate its role in chlorantraniliprole resistance, *Bulletin of Entomological Research, 104*: 716-723. https://doi.org/10.1017/S0007485314000510

Kao, C. H., & Sun, C. N. (1991). In vitro degradation of some organophosphorus insecticides by susceptible and resistant diamondback moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 41*(2): 132-141. https://doi.org/10.1016/0048-3575(91)90067-V.

Ketterman, A. J., Saisawang, C., & Wongsantichon, J. (2011). Insect glutathione transferases. Drug Metabolism Reviews, *43*: 253–265. doi/abs/10.3109/03602532.2011.552911

LeOra Software. (1987). POLO-PC: A users guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Barkeley California.

Malekmohamadi, M., Mossadegh, M. S., Hejazi, M. J., Goodarzi, M.T., Khanjani, M., & Galehdari, H. (2010). Synergism of resistance to phosalone and comparison of kinetic properties of acetylcholinesterase from four field populations and a susceptible strain of Colorado potato beetle, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *98*(2): 254–262. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.06.016

Miyata, T., Saito, T., & Noppun, V. (1982). Studies on the mechanism resistance to insecticides. Laboratory of Applied Entomology and Nematology, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464, Japan pp.347-357.

Mohan, M., & Gujar, G.T. (2003). Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. *Crop Protection*, *22*: 495-504. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00201-6

Ninsin, K., & Tanaka, T. (2005). Synergism and stability of acetamiprid resistance in a laboratory colony of *Plutella xylostella*. Pest management science, 61(8):723-727. https://doi.org/10.1002/ps.1043

Noorbakhsh, S. 2020. List of important pests, diseases and weeds of major agricultural products, pesticides and recommended methods for their control (revised Feb. 2020). *Plant Protection Organization Publications*, 197 p. (in Farsi)

Oppenoorth, F. J. (1985). Biochemistry genetics of insecticide resistance. In: Kerkul GA & Gilbert Li (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology(pp. 731-773)*. Pergamon press, Oxford.

Orouji, A., Abbasi-Moayed, S., & Hormozi-Nezhad, M. R. (2019). ThThnated Development of a pH assisted AgNP- based colorimetric sensor array for simultaneous identification of phosalone and azinphosmethyl pesticides. Spectrochimica Acta Part A: *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *219*: 496-503. https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.04.074

Parsaeyan, E., Saber, M., Safavi, S. A., Poorjavad, N., & Biondi, A. (2020). Side effects of chlorantraniliprole, phosalone and spinosad on the egg parasitoid, *Trichogramma brassicae*. *Ecotoxicology*, pp.1-10. https://doi.org/10.1007/s10646-020-02235-y

Scott, J. G. (1990). Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, strategies and pitfalls. *In: pesticides resistance in arthropods*, Roush, R. T., & Tabashnik, E. (Eds.), (pp. 39- 57). Chapman and hall Newyork and Landon

Shelton, A. M. (2004). Management of the diamondback moth: de´ja` vu all over again. The management of diamondback moth and other crucifer pests. Melbourne, Australia:Department of Natural Resources and Environment. pp. 3-8.

Shelton, A. M., Robertson, J. L., Tang, J. D., Perez, C., Eigenbrode, S. D., Preisler, H. K., Wilsey, W. T., & Cooley, R. J. (1993). Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *Journal of Economic Entomology*, *86:* 697-705. https://doi.org/10.1093/jee/86.3.697

Tabashnik, B. E., & Slansky, F. J. (1987). Nutritional ecology of forb foliage-c hewing insects. In *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates*, eds. (pp. 71-103). Wiley, New York

Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N., & Johnson, M. W. (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology, 83:* 1671-1676. https://doi.org/10.1093/jee/83.5.1671

Talebi Jahromi, K. (2012). Pesticides toxicology (5th ed). University of Tehran Press, Iran, Tehran 500 p. (in Farsi).

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

Xie, M., Ren, N. N., You , Y. C., Chen, W. J., Song, Q. S., & You, M. S. (2017). Molecular characterization of two α-esterase genes involving chlorpyrifos detoxification in the diamondback moth, *Plutella xylostella. Pest Management Science, 73*(6): 1204-1212. https://doi.org/10.1002/ps.4445

Yaseen, T., Pu, H., & Sun, D. W. (2019). Effects of ions on core-shell bimetallic Au@ Ag NPs for rapid detection of phosalone residues in peach by SERS. *Food Analytical Methods, 12*(9): 2094-2105. https://doi.org/10.1007/s12161-019-01454-2

Yu, S. J., & Nguyen, S. N. (1992). Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the Diamondback Moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 44*: 74-81. https://doi.org/10.1016/0048-3575(92)90011-N

Zalucki, M. P. (2012). Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology, 105*: 1115–1129. https://doi.org/10.1603/EC12107

Zandvakili, S., Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., & Hassan Sajedi, R. (2019). Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from common pistachio psyllid, *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Entomological Society of Iran, 38*(4): 409-421. https://doi.org/10.22117/jesi.2019.124035.1277

Zolfaghari, M., Ghadamyari, M., & Hassan Sajedi, R. (2019). Resistance mechanisms of a field population of diamond back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to current organophosphate pesticides**.** *Journal of Crop Protection, 8*(4):403-418. http://jcp.modares.ac.ir/article-3-36150-en.html

© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)
45(2), Summer, 2022

doi 10.22055/ppr.2022.17407

Resistance Mechanisms of the Diamond Back Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to Phosalone

M. Zolfaghari[1], M. Ghadamyari[2*], H. Mosallanejad[3]

1. PhD, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. ***Corresponding Author:** Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran (mghadamyari@gmail.com)
3. Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Entomology Research Department, Tehran, Iran

Received: 27 November 2021 Accepted: 25 February 2022

Abstract

Background and Objectives

Diamond back moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera,Plutellidae), is the cosmopolite insect pest of cruciferous plants causing significant injury to the plants of this family. Although many integrated approaches have been proposed and developed for DBM management, the most common method of controlling this pest is chemical control. Organophosphates (OPs) are mainly used to control the agricultural pests in Iran, especially DBM. This study was performed to determine and compare some toxicological and biochemical properties of detoxification enzymes (ESTs and GST) and cholinesterase between two resistant (Esf-R) and susceptible (Ard-S) field populations of *P. xylostella.*

Materials and Methods

The phosalone-susceptible (Ard-S) population was collected from Ardabil, Ardabil province, Iran and the phosalone –resistant (Esf-R) population from Esfehan, Esfehan province, Iran. The toxicity of insecticides was measured using a standard leaf-dip bioassay. To determine the role of metabolic degradation as a mechanism for phosalone resistance in DBM, PBO (piperonyl butoxide), TPP (triphenyl phosphate) and DEM (diethyl maleate) were bioassayed for synergistic activity with phosalone (Kodwo and Tanaka, 2005). EST and GST assays were determined based on the method of Van Asperen (1962) and Habig *et al.* (1974) with minor modifications. AChE activity and its kinetic parameters were measured with two artificial substrates, ATC and BTC, along with the modified method of Ellman *et al.* (1961). Statistical analyses were evaluated by LeOra software (1978) through ANOVA followed by Tukey test.

Results

According to the bioassay results, the (Esf-R) population showed a significantly high resistance to phosalone compared with Ard-S population (17-fold). Diethyl maleate (DEM) and triphenyl phosphate (TPP), as glutathione S-transferase (GST) and esterase inhibitors,

increased phosalon toxicity on both resistant and susceptible populations, but the synergistic ratio in the resistant population was higher than that of susceptible one. This confirms the greater role of esterase and GST enzymes in phosalone resistance. Metabolic resistance mechanisms to phosalone were surveyed by biochemical assays. The results indicated that specific activities (SA) of GST, α-esterase and ß-esterase were 2.1-, 2- and 1.7-fold higher in the resistant populations than those of susceptible population, suggesting higher expression of GST and esterase enzymes in resistant population. Furthermore, target site insensitivity was surveyed by biochemical assay. Kinetic parameters of acetylcholinesterase (AChE) on the hydrolysis of acetylthiocholine iodide (ATC) showed no change in the affinity of AChE of resistant population to this substrate and the phosalone resistance mechanism was not related to altered AChE active site.

Conclusion

The results distinctly indicated that metabolic detoxification mechanisms such as GST, esterases created phosalone resistance in the Esf-R and AChE structure were not involved in resistance. According to the result, use of synergists can be helpful for suppressing the phosalone resistance.

Keywords*: *Pesticide resistance, Plutella xylostella, AChE inhibitor, Esterase, Glutathione S-transferase

Associate editor: S. A. Hemmati (Ph.D.)

Citation: Zolfaghari, M., Ghadamyari, M. & Mosallanejad, H. (2022). Resistance Mechanisms of the Diamond Back Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to Phosalone. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(2), 49-62. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2022.17407.