



Investigation on the resistance of different growth stages of cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to spirotetramat

Majid Mohammad Nejad Havestini¹ | Qodatollah Sabahi^{2✉} |
Alireza Bandani³ Aziz Sheikhi Garjani⁴

1. Department of Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: m.mohammadnejad@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: sabahi@ut.ac.ir
3. Department of Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: abandani@ut.ac.ir
4. Iranian Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. E-mail: asheikhi48@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	The cotton whitefly <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is one of the important pests of agricultural products that causes great economic losses. In this research, the effect of spirotetramat on three different developmental stages of the pest was studied in several populations that were collected from different provinces of Iran. Bioassay was done by leaf disk method. The results showed a higher sensitivity of the 2nd nymph stage compared to the adult stage and the egg stage; while the adult stage showed the least sensitivity to spirotetramat. The highest rate of resistance in different developmental stages was observed in the Jiroft population. The LC50 ratios of adults in Karaj, Yazd, Pishwa, and Jiroft populations to sensitive one (Marand) were 7.6, 6.2, 4.2, and 9.6, respectively. For second instar nymphs, the ratios were 2.0, 2.2, 2.1, and 5.5 respectively. The investigation on detoxification enzymes indicated the higher activity of monooxygenase enzyme in the resistant population of Jiroft (3.34-fold) compared to the Marand population, which indicates the effective role of these enzymes in creating resistance. According to the results, to prevent resistance development, it is necessary to use other chemical compounds with different modes of action to prevent the occurrence of cross-resistance while affecting different developmental stages of pests.
Article history: Received: 25 January 2023 Revised: 1 May 2023 Accepted: 2 May 2023 Published online: 18 September 2023	
Keywords: <i>Cotton whitefly,</i> <i>Metabolic detoxification,</i> <i>Resistance,</i> <i>Spirotetramat.</i>	

Cite this article: Mohammad Nejad Havestini, M., Sabahi, Q., Bandani, A., & Sheikhi Garjani, A. (2023). Investigation on the resistance of different growth stages of cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) to spirotetramat. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (1), 59-75. DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.353642.1007017>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.353642.1007017>

Extended Abstract

Introduction

Cotton whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is one of the important pests of agricultural plants that causes great economic loss. The main damages occur by sucking plant sap and transmission of the viral disease which causes severe economic losses to the hosts. Chemical compounds play an important role in controlling the pest. However, it showed high degrees of resistance to different groups of insecticides. Monitoring of the pest resistance to various insecticide compounds is necessary for the application of IPM. In this research, the effect of insecticide spirotetramat, on resistance development of cotton whitefly was studied in samples of populations collected from various provinces of Iran.

Materials and Methods

Adult whitefly samples were collected from five different provinces on different host plants during 2020 and 2021. The plant leaves contain nymphs and adult insects were gathered and placed into cages under controlled conditions. The nymphs and adults were reared on eggplants and then used for bioassay and detoxifying enzyme activity tests at different developmental stages. Data analysis was done using Polo Plus software. Statistical analysis was done using SPSS version 23 software.

Results and Discussion

The results of bioassays showed a higher sensitivity of cotton whitefly at the second nymphal stage. The adult insect stage showed the least sensitivity. The highest rate of resistance in different developmental stages was observed in the Jiroft population. The LC50 ratio for spirotetramat in the populations collected from Karaj, Yazd, Pishva, and Jiroft was 7.6, 6.2, 4.2, and 9.6, in the adult stage and 2, 2.2, 1.2, and 5.5 for 2nd nymphs respectively, compared to the sensitive population (Marand). The investigation on detoxifying enzymes indicated the higher activity of mono-oxygenase enzymes (3.43 fold) in the population of Jiroft compared to the sensitive one.

Conclusion

In this study, we observed a low level of resistance for cotton whiteflies to spirotetramat at different growth stages of various pest populations. We also showed the effective role of mono-oxygenase enzymes in occurring resistance to this insecticide. To prevent the development of resistance, it is necessary to use chemical compounds with different modes of action such as spirotetramat in a rotational program of insecticide use. This approach should prevent the development of resistance of pests at different growth stages.



بررسی مقاومت مراحل مختلف رشدی سفید بالک پنبه (*Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) نسبت به حشره کش اسپیروتترامت

مجید محمد نژاد هاوستین^۱ | قدرت اله صباحی^۲ | علیرضا بندانی^۳ | عزیز شیخی گرجان^۴

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: m.mohammadnejad@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: sabahi@ut.ac.ir

۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: abandani@ut.ac.ir

۴. موسسه تحقیقات گیاهپزشکی، تهران، ایران. رایانامه: asheikhi48@gmail.com

چکیده	اطلاعات مقاله
سفیدبالک پنبه بانام علمی (<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) از آفات مهم محصولات کشاورزی است که خسارت اقتصادی زیادی ایجاد می کند. در این پژوهش اثر ترکیب اسپیروتترامت روی سه مرحله مختلف رشدی آفت در چند جمعیت آن، که از استان های مختلف کشور جمع آوری شده بود، مورد مطالعه قرار گرفت. زیست سنجی به روش غوطه وری دیسک برگی انجام شد. نتایج نشان دهنده حساسیت بیشتر مرحله پوره سن دو نسبت به مرحله حشره بالغ و مرحله تخم بود؛ درحالی که مرحله حشره کامل کمترین حساسیت را نسبت به اسپیروتترامت نشان داد. بیشترین نرخ مقاومت در مراحل مختلف رشدی، در جمعیت جیرفت مشاهده شد، نسبت مقاومت در حشرات کامل جمعیت های کرج، یزد، پیشوا و جیرفت به ترتیب ۷/۶، ۶/۲، ۴/۲ و ۹/۶ و در پوره سن دوم به ترتیب ۲، ۲/۲، ۲/۱ و ۵/۵ محاسبه شد. بررسی آنزیم های سم زدا حاکی از میزان فعالیت بیشتر آنزیم های مونو اکسیژناز (۳/۴۳ برابر جمعیت پایه) در جمعیت مقاوم جیرفت نسبت به جمعیت مرند بود که نشان دهنده نقش مؤثر این آنزیم در ایجاد مقاومت به این حشره کش است. با توجه به نتایج به دست آمده برای جلوگیری از بروز مقاومت استفاده از ترکیبات شیمیایی با شیوه تأثیر متفاوت، که ضمن اثرگذاری بر مراحل مختلف رشدی، بتواند از بروز مقاومت تقاطعی جلوگیری کند، کاملاً ضروری است.	<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله پژوهشی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۵</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۲</p> <p>تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷</p> <p>کلیدواژه ها:</p> <p>اسپیروتترامت، سفیدبالک پنبه، سم زدایی متابولیکی، مقاومت.</p>

استناد: محمد نژاد هاوستین، مجید؛ صباحی، قدرت اله؛ بندانی، علیرضا و شیخی گرجان، عزیز (۱۴۰۲). بررسی مقاومت مراحل مختلف رشدی سفید بالک پنبه *Bemisia*

tabaci (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) نسبت به حشره کش اسپیروتترامت. نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۴ (۱)، ۷۵-۴۷. DOI:

<http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.353642.1007017>



© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.353642.1007017>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

سفیدبالک پنبه بانام علمی (*Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) یکی از آفات مهم محصولات کشاورزی است که در سراسر جهان خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی ایجاد می‌کند. آسیب اصلی این آفت از طریق تغذیه حشرات کامل و پوره‌ها از شیره گیاه و نیز انتقال بیماری‌های ویروسی به گیاهان دیگر توسط حشرات کامل رخ می‌دهد که موجب خسارت‌های اقتصادی شدید در تولیدات کشاورزی می‌شود (Liu et al., 2015, Wang et al., 2020). ترکیبات شیمیایی نقش مهمی در کنترل مؤثر آفت دارند؛ هرچند کاربرد غیرمنطقی این ترکیبات سبب شده که آفت درجه بالایی از مقاومت را نسبت به گروه‌های رایج و جدیدتر حشره‌کش‌ها نشان دهد (Wang et al., 2010, Wang et al., 2020). سفیدبالک پنبه به‌عنوان یک مجموعه گونه با ترکیبی از حداقل ۳۶ گونه ناشناخته در نظر گرفته می‌شود (Wang et al., 2020). در بین آن‌ها گونه *B. tabaci* (Middle East-Asia Minor 1)، (MEAM1 بیوتیپ B) و *B. tabaci* (MED بیوتیپ Q) مهم هستند و تفاوت‌های فیزیولوژیکی و بیولوژیکی متعددی دارند؛ که از جمله سازگاری با میزبان (Morin et al., 2002)، مقاومت در برابر حشره‌کش‌ها (Horowitz, 2005) و انتقال بیماری‌های ویروسی (Valverde et al., 2004, Wang et al., 2020) از اهم این تفاوت‌ها به شمار می‌رود؛ بنابراین شناسایی ترکیبات مناسب و روش‌های مؤثر در بروز مقاومت نقش بسیار مؤثری در کنترل آفت خواهد داشت. هدف از این مطالعه، ارزیابی سطوح مقاومت نسبت به حشره‌کش اسپیروترامات در مراحل مختلف زیستی سفیدبالک پنبه *B. tabaci* و مقایسه سطوح گلوپریپید اس-ترانسفرازها و مونواکسیژناز و کربوکسیل استراز در جمعیت‌های مختلف آن در بعضی نقاط کشور شامل شهرستان‌های کرج، پیشوا، یزد، جیرفت و مرند بوده تا مؤثرترین مکانیسم‌های دخیل در بروز مقاومت آفت در برابر این ترکیب مورد بررسی قرار گیرد.

پیشینه پژوهش

درک سازوکارهای بروز مقاومت در برابر آفت‌کش‌ها، به آسان شدن مدیریت صحیح مقاومت کمک می‌کند. مقاومت متابولیکی یکی از رایج‌ترین مکانیسم‌های مقاومت حشرات در برابر حشره‌کش‌ها است. آنزیم‌های سم‌زدای رایج شامل کربوکسیل استرازها، گلوپریپید اس-ترانسفرازها و اکسیدازهای چندگانه می‌باشند که در مقاومت متابولیکی نقش دارند. سازوکار متابولیکی بروز مقاومت در *B. tabaci* پیچیده است. مشخص شده که آنزیم‌های کربوکسیل استراز، با ایجاد مقاومت در برابر حشره‌کش‌های گروه فسفره آلی و پایروتروئیدی مرتبط هستند و همچنین در افزایش مقاومت نسبت به حشره‌کش ایمیداکلوپرید نقش دارند (Zheng et al., 2018, Wang et al., 2020). همچنین اکسیدازها آنزیم‌های دیگری هستند که باعث مقاومت به گروه‌های مختلف حشره‌کش‌ها، عمدتاً ترکیبات نیکوتینوئیدی، می‌شوند (Feng et al., 2010, Yang et al., 2013). برخی از مطالعات نقش گلوپریپید اس-ترانسفرازها را در بروز مقاومت در *B. tabaci* نشان داده و بیان کرده‌اند که ممکن است در مقاومت به ترکیبات فسفره آلی، نقش مهمی داشته باشند (Rauch & Nauen, 2004, Wang et al., 2020).

در ایران مطالعات قبلی روی سفیدبالک پنبه، *B. tabaci*، مقاومت شدید به ترکیبات نئونیکوتینوئیدی مانند ایمیداکلوپرید و استامی‌پرید را نشان داده است (Basij et al. 2017). همچنین در بررسی دیگر، مشخص شد که فعالیت استراز نقش مهمی در مقاومت سفیدبالک پنبه به آمیتراز و ایمیداکلوپرید ایفا می‌کند (Bahlool zadeh et al., 2012). Salehi et al., (2020). مقاومت به ایمیداکلوپرید و تیاکلوپرید را مورد بررسی قراردادند و نشان دادند که آنزیم‌های مونواکسیژناز و استراز نقش مهمی در سم‌زدایی این حشره‌کش‌ها در جمعیت‌های مقاوم ایفا می‌کنند. در بررسی سمیت اسپیروترامات، سیانترانیل پرول و دینتوفوران در جمعیت‌های مدیریتانه‌ای سفیدبالک پنبه شرق استرالیا، با استفاده از غوطه‌وری برگ یا روش جذب سیستمیک، مشخص شده که همه جمعیت‌های جمع‌آوری شده نسبت به اسپیروترامات (۱۲ مورد آزمایش شده از ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۵)، سیانترانیل پرول (۲۳ مورد آزمایش از

۲۰۱۴ تا ۲۰۱۷) و دینتوفوران (۱۶ مورد آزمایش شده از ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۷) حساس بوده‌اند. بر اساس مقادیر LC_{50} ، یک تفاوت ۲/۱ برابری در پاسخ جمعیت‌های مزرعه‌ای نسبت به اسپیروتترامات و یک تفاوت سه برابری در پاسخ به سیانتراپیل پرول مشاهده شده است، در حالی که پاسخ به دینتوفوران در دو روش زیست‌سنجی متفاوت شامل محلول‌پاشی روی برگ و روش سیستمیک (قرار دادن ساقه داخل محلول سمی)، ۱/۸ برابر در مقابل ۲/۶ برابر بود. آزمایش اسپیروتترامات و سیانتراپیل پرول در برابر سویه مقاوم به پیری پروکسی فن، AY09-IR هیچ مدرکی دال بر مقاومت تقاطعی به پیری پروکسی فن نشان نداد. هنگامی که در برابر دینتوفوران آزمایش شد، AY09-IR دارای ضریب مقاومت دو بود که نشان‌دهنده مقاومت تقاطعی ضعیف احتمالی در برابر پیری پروکسی فن بود، اگرچه ممکن است این سویه با توجه به منشأ خود، انواع دیگری از مقاومت را نیز نشان دهد. هر سه حشره‌کش کارایی خوبی در برابر سفیدبالک پنبه نشان دادند (Hopkinson & Pumpa, 2019). برای ارزیابی اثر حشره‌کش اسپیروتترامات بر سویه‌های مزرعه‌ای *B. tabaci*، بیوتیپ Q، تغییرات مقاومت به حشره‌کش اسپیروتترامات، از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۶ در چین مورد بررسی قرار گرفت. زیست‌سنجی با تخم‌ها و پوره‌ها از پنج منطقه جغرافیایی نشان داد که مراحل پوره‌گی در مقایسه با مرحله تخم، نسبت به اسپیروتترامات بسیار حساس‌تر هستند. مهم‌تر از همه، مقاومت هر پنج جمعیت مزرعه‌ای سفیدبالک، از سطح مقاومت پایین در سال ۲۰۱۲ به سطح مقاومت متوسط تا بالا در سال ۲۰۱۶ افزایش یافته است (Peng et al., 2017). (Bielza et al., 2019). نشان دادند که یک مقاومت تقاطعی ۱۳۰ برابری در سفیدبالک پنبه نسبت به اسپیروتترامات، در جمعیت‌های مقاوم شده به اسپیرومسیفن مشاهده شده است. (مطالعات قبلی اشاره کردند که بیوتیپ MED به شدت در برابر حشره‌کش‌ها مقاوم است؛ بنابراین، استفاده گسترده از ترکیبات شیمیایی ممکن است یکی از دلایلی باشد که باعث شده است MED جایگزین MEAM1 در این زمینه شود (Horowitz et al., 2005, Luo et al., 2010, Wang et al., 2010, Wang et al., 2020).

اسپیروتترامات یک حشره‌کش جدید با قابلیت حرکت دوسویه در درون آوندهای آبکشی و چوبی می‌باشد. این حشره‌کش از گروه تترونیک اسیدها است که در گروه ۲۳ حشره‌کش‌ها توسط (IRAC) (Insecticides Resistance Action Committee) قرار گرفته است. دیگر ترکیبات این گروه شامل: اسپیرومسیفن و اسپیرودایکلوفن می‌باشند که هر دو به‌عنوان بازدارنده بیوستنز چربی عمل می‌کنند و موجب کاهش باروری و زادآوری در هنگام تغذیه به‌وسیله مراحل نابالغ حشرات مکنده مانند شته‌ها، پسیل‌ها، شپشک‌ها، مینوزهای برگی، تریپس‌ها، شپشک‌های آردآلود و سفیدبالک‌ها می‌شوند (Mohammad & Nejad & Sabahi, 2021).

در مطالعه حاضر، پنج جمعیت مختلف سفیدبالک پنبه *B. tabaci* از استان‌های مختلف کشور در سال‌های ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ جمع‌آوری و سطوح مختلف مقاومت به حشره‌کش اسپیروتترامات در مراحل مختلفی زیستی سفیدبالک پنبه بررسی و سطوح کمی و کیفی آنزیم‌های گلوکاتایون اس- ترانسفرازها و مونواکسیژناز و کربوکسیل استراز در جمعیت‌های مختلف این آفت اندازه‌گیری شد.

روش‌شناسی پژوهش

کشت گیاهان

به‌منظور پرورش حشرات، از گیاهان بادنجان رقم قلمی مشکی به‌عنوان میزبان پرورشی استفاده و پس از تهیه نشاء درون گلدان‌های پلاستیکی با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر کشت شد. بستر کشت حاوی کوکو پیت و پرلیت با نسبت ۳ به ۱ مورد استفاده قرار گرفت. همه گیاهان در درون گلخانه پرورشی گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

جمع آوری حشرات

جمعیت‌های سفیدبالک *B. tabaci* از پنج استان مختلف شامل آذربایجان شرقی، کرمان، یزد، البرز و تهران (جدول ۱) از روی گیاهان میزبان متفاوت در سال‌های ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد (جدول ۱). برگ‌های حاوی پوره و حشرات بالغ، جمع‌آوری و در گلخانه درون قفس پارچه‌ای به ابعاد ۶۰×۶۰×۶۰ سانتی‌متر روی گیاهان بادنجان رهاسازی شدند. برای بررسی مقاومت به حشره‌کش پوره‌ها و حشرات کامل روی گیاهان بادنجان پرورش یافته، سپس آزمون‌های زیست‌سنجی انجام شد. پس از پرورش ۳ تا ۵ نسل از هر جمعیت آفت در اتاقک رشد، آزمایش‌های مقاومت به حشره‌کش و بررسی فعالیت آنزیم‌های سم‌زدایی مراحل مختلف زیستی، انجام شد. کلیه آزمایش‌ها، در شرایط دمایی ۲۷±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵±۵ درصد با دوره نوری ۱۶:۸ بود.

جمعیت مرند با توجه به اینکه به مدت طولانی زیر فشار سم‌پاشی نبوده و حساسیت بیشتری نسبت به ترکیب مورد بررسی داشت به‌عنوان جمعیت پایه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- اطلاعات مکانی، زمانی، میزبانی و سابقه مصرف حشره‌کش‌ها برای جمعیت‌های مورد استفاده در زیست‌سنجی

ردیف	نام جمعیت	محل جمع‌آوری	تاریخ جمع‌آوری	میزبان	حشره‌کش‌های مصرفی
۱	مرند	آذربایجان شرقی	۱۳۹۹	گوجه‌فرنگی	*****
۲	جیرفت	کرمان	۱۴۰۰	بادنجان	کنفیدور، اوبرون، آمامکتین
۳	یزد	یزد	۱۴۰۰	خیار	کنفیدور، آمامکتین، دی کلرووس
۴	کرج	البرز	۱۴۰۰	بادنجان	موونتو، دی کلرووس، کنفیدور
۵	پیشوا	تهران	۱۴۰۰	بادنجان	دی کلرووس، آمامکتین

*بدون اطلاعات اولیه در مورد سابقه سم‌پاشی

حشره‌کش شیمیایی

از حشره‌کش اسپیروترامات بانام تجاری موونتو (Movento® EC 10%) ساخت شرکت بایر برای انجام این مطالعه استفاده شد. این حشره‌کش در ایران برای کنترل آفات مکنده به‌ویژه سفیدبالک در سال ۱۳۹۵ ثبت گردیده است.

زیست‌سنجی‌ها

حشرات بالغ

از روش غوطه‌وری دیسک برگی برای زیست‌سنجی حشرات بالغ استفاده شد (He et al., 2018). در ابتدا، با استفاده از روش سری رقت، غلظت‌های مختلف حشره‌کش تهیه شد و سپس همانند آزمایشات اصلی، برگ‌های گیاه بادنجان به مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور شد و بعد از خشک شدن در محیط اتاق، بر روی محیط کشت آگارز در درون ظروف منتقل شدند. برای هر یک از تکرارها ۲۰ عدد حشره بالغ استفاده و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. سپس بر اساس نتایج ثبت‌شده بعد از ۷۲ ساعت، دامنه غلظت کشنده بین ۱۰ و ۹۰ درصد برای ترکیب اسپیروترامات به دست آمد (آزمایش براکتینگ). با استفاده از نرم افزار پولوپلاس و آنالیز پروبیت، مقادیر دز کشنده بین ۲۵ تا ۷۵ درصد مشخص و با استفاده از روش لگاریتمی و رعایت دامنه لگاریتمی مناسب تعداد ۵ غلظت برای ترکیب موردنظر محاسبه شد و در مرحله بعد این غلظت‌ها تهیه شدند. بعد از آماده‌سازی غلظت‌های مورد آزمایش، برگ‌های بادنجان از گیاهانی که در گلخانه رشد کرده بودند، تهیه شدند. برگ‌ها به مدت ۱۰ ثانیه در محلول حشره‌کش اسپیروترامات غوطه‌ور شده و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط اتاق قرار گرفتند تا قطرات و آب سطحی آنها

تبخیر شود. برگ‌های تیمار شده به ظروف آزمایش ادرار با قطر ۳۵ میلی‌متر و ارتفاع ۴۵ میلی‌متر منتقل شد. ۲۰ تا ۳۰ عدد حشره بالغ (نر و ماده) هم سن در هر ظرف رها گردید. برای جلوگیری از خشک شدن برگ‌ها و تأمین رطوبت مورد نیاز درون ظروف از محلول آگارز ۲ درصد استفاده شد و برگ‌ها روی محیط آگارز قرار داده شدند به طوری که سطح رویی برگ‌ها بر روی محیط کشت آگارز و سطح پشتی برگ به سمت بالا بوده و حشرات بالغ بر روی آن‌ها رهاسازی شدند. همه ظرف‌ها به صورت معکوس و در ژرمیناتور با دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. میزان مرگ‌ومیر پس از ۷۲ ساعت ثبت شد. حشراتی که با تحریک قلم مو فاقد حرکت بودند، به عنوان مرده در نظر گرفته شدند. برای هر تیمار و شاهد سه تکرار انجام شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر و توئین استفاده شد.

مرحله پوره سن دو

روش ذکر شده در بالا برای زیست‌سنجی مرحله پورگی هم استفاده شد. گیاهان بادنجان به داخل قفس پرورش حشرات فاقد آلودگی، منتقل شدند. حدود ۱۰۰ عدد حشره بالغ سفیدبالک در قفس رهاسازی شده و به مدت ۲۴ ساعت اجازه داده شد تا تخم‌گذاری کنند و سپس خارج شدند. هنگامی که پوره‌ها وارد سنین مرحله دوم پورگی شدند (۱۳ روز بعد از تیمار)، تعداد پوره‌ها در هر برگ به کمک بینو کولار شمارش شد. برگ‌های شامل پوره‌ها به مدت ۱۰ ثانیه در غلظت‌های تعیین شده حشره‌کش غوطه‌ور شدند و بقیه مراحل مانند زیست‌سنجی حشرات بالغ انجام شد. در این آزمون تعداد ۲۰۶۲ عدد پوره سن دو مورد استفاده قرار گرفت. مرگ‌ومیر پس از گذشت ۶ روز از زمان آزمایش و در هنگامی که پوره‌ها به مرحله شفیرگی رسیده بودند ثبت شد. هر برگ یک تکرار به عنوان یک تکرار و برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر بعلاوه توئین استفاده شد. پوره‌هایی که چروکیده بودند و نمی‌توانستند تبدیل به شفیره شوند مرده به حساب آمد. همه نمونه‌ها تحت شرایط مشابه زیست‌سنجی حشرات بالغ نگهداری شدند.

مرحله تخم

روش غوطه‌وری توصیف شده توسط Horowitz *et al.* (2004) برای زیست‌سنجی مرحله تخم مورد استفاده قرار گرفت. یک گیاه بادنجان کامل با ۲-۳ برگ واقعی در یک قفس پرورش حشره قرار داده شد. حدود ۱۰۰ عدد حشره بالغ سفیدبالک به قفس منتقل شده و پس از ۲۴ ساعت خارج شدند. تعداد تخم‌های حشره در هر برگ شمارش شدند. سپس برگ‌های حاوی حداقل ۲۰ تخم به مدت ۱۰ ثانیه در غلظت‌های تهیه شده از حشره‌کش غوطه‌ور شدند. گیاهان تا زمانی که تخم‌های باقی‌مانده به پوره‌های سن یک تفریح شوند (۱۰ روز)، در قفس نگهداری شدند. تخم‌های تفریح نشده و پوره‌های سن یک بی‌حرکت یا با تحرک کم به عنوان مرده تلقی شدند. سه تکرار (یک برگ) برای هر تیمار و شاهد مورد آزمایش قرار گرفت. کلیه شرایط آزمایشی برای تیمار شاهد همانند سایر تیمارها بود و از آب مقطر بعلاوه توئین به جای ترکیب حشره‌کش برای تیمار شاهد استفاده شد.

تعیین نسبت مقاومت (Resistance Ratio)

به منظور تعیین نرخ مقاومت در جمعیت‌های مختلف، از روش (Robertson & Preisler (1992) استفاده شد. بدین ترتیب که میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) جمعیت‌های گلخانه‌ای نسبت به جمعیت پایه با فرمول زیر محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت:

$$\text{غلظت کشنده } 50\% \text{ درصد جمعیت پایه} / \text{غلظت کشنده } 50\% \text{ درصد جمعیت گلخانه‌ای} = \text{نرخ مقاومت}$$

سطح مقاومت به حشره‌کش‌ها بر اساس معیارهای گزارش شده طبقه‌بندی شده است. بدین ترتیب که نرخ مقاومت در جمعیت‌های مختلف، حساس ($RR < 3.0$)، مقاومت جزئی ($3.0 \leq RR < 5.0$)، مقاومت کم ($5.0 \leq RR < 10.0$)، مقاومت متوسط ($10.0 \leq RR < 40.0$) مقاومت بالا ($40.0 \leq RR < 160.0$)، مقاومت بسیار بالا* ($RR \geq 160.0$) را شامل می‌شود. (Shen & Wu, 1995).

سنجش فعالیت آنزیم‌های سمزدا

سنجش فعالیت آنزیم‌های سمزدا با استفاده از نمونه‌های تهیه شده در مرحله بالغ حشره و بدون قرار گرفتن در معرض حشره‌کش برای همه جمعیت‌ها انجام شد.

تعیین غلظت پروتئین

پیش از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سمزدا، غلظت پروتئین موجود در هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین توسط روش (Bradford 1976) با اندکی تغییرات با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد، در جذب نوری ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت استراز کل

استرازها (CarEs) با استفاده از سوبستراهای آلفا-نفتیل استات و بتا نفتیل استات اندازه‌گیری شدند (Van Aspern, 1962). از هر جمعیت، ۵۰ عدد حشره بالغ در ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم سرد (۰/۲ مولار، اسیدیته ۷، حاوی ۰/۱ درصد ترایتون X-100) همگن شدند. نمونه‌های هموژن شده در ۱۲۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از مایع رو نشین به‌عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳۰ میکرولیتر مایع رو نشین به ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، اسیدیته هفت) و ۲۰۰ میکرولیتر از سوبسترا (۶۴ میلی‌مولار در استون) اضافه شد. سپس ۱۲۰ میکرولیتر Fast Blue RR (۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر) به مخلوط واکنش اضافه شد. در نهایت مقدار آلفا نفتول حاصل در ۴۵۰ نانومتر (در مورد سوبسترا آلفا نفتیل استات) و بتا نفتول حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر (در مورد سوبسترا بتا نفتیل استات) در دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت شدند. سنجش استرازهای عمومی به روش مذکور در سه تکرار انجام شد (Wang et al., 2004).

فعالیت گلوکوناتیون اس ترانسفرآزها (GST)

فعالیت گلوکوناتیون اس ترانسفرآزها با استفاده از (CDNB^۱) و گلوکوناتیون کاهش‌یافته به‌عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد (Habig et al., 1974). حجم کل واکنش شامل ۳۰ میکرولیتر مایع رویی که به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده بود و ۲۰۰ میکرولیتر CDNB (۱/۲ میلی‌مولار) و ۲۰۰ میکرولیتر گلوکوناتیون احیاشده (۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر) بود. تغییر جذب به‌طور مداوم به مدت ۵ دقیقه در ۳۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر با حداقل ۳ تکرار برای هر جمعیت تعیین شد. تغییرات جذب در دقیقه با استفاده از ضریب جذب ۹/۶ میلی‌مولار در سانتی‌متر محاسبه شد.

فعالیت مونواکسیژناز وابسته به سیتوکروم P450

فعالیت سیتوکروم P450 با اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز آهن بر اساس روش Pragdon (1967) برآورد شد. حجم کل واکنش ۶۵۰ میکرولیتر، حاوی ۴۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۱۶۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۶۲۵ مولار با اسیدیته هفت، ۴۰۰ میکرولیتر محلول TMBZ^۱ و ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳ درصد) بود. میکرو تیوپ‌ها در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت قبل از خواندن در ۴۵۰ نانومتر به‌عنوان نقطه پایانی در اسپکتروفتومتر، انکوبه شدند. منحنی استاندارد برای سنجش فعالیت پراکسیداز آهن با استفاده از غلظت‌های مختلف سیتوکروم C، رسم شد. سطوح مونواکسیژناز به‌عنوان واحدهای معادل پروتئین سیتوکروم P450 mg⁻¹ با استفاده از منحنی استاندارد سیتوکروم C بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار Polo- Plus ورژن ۲ و نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excell ورژن ۲۰۱۳ صورت گرفت.

یافته‌های پژوهش

نتایج زیست‌سنجی مرحله حشره کامل سفیدبالک

نتایج زیست‌سنجی حشرات کامل در جدول ۲ ارائه شده است. این نتایج نشان داد که در بین جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت جیرفت کمترین حساسیت را نسبت به اسپیروترامات در مقایسه با جمعیت پایه داشت و میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC₅₀) برای جمعیت جیرفت ۲۲۲/۴۷۳ به دست آمد. همچنین مقادیر غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC₅₀) برای جمعیت‌های کرج، یزد و پیشوا به ترتیب ۱۷۶/۰۷۳، ۱۴۴/۹۳۱ و ۱۰۰/۳۷ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. مقایسه نتایج زیست‌سنجی غلظت کشنده ۵۰ درصد با استفاده از نسبت غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC₅₀ Ratio) محاسبه شد. نرخ مقاومت در جمعیت‌های جیرفت، کرج، یزد و پیشوا به ترتیب ۹/۶، ۷/۵۹۸، ۶/۲۵۴ و ۶/۳۳۱ بود که بر اساس طبقه‌بندی گفته شده در بالا، نشان دهنده مقاومت کم، با نرخ مقاومت (۵-۱۰) جمعیت‌های مختلف مورد آزمایش نسبت به ترکیب اسپیروترامات می‌باشد. همه تیمارها در سطح احتمال ۹۵ درصد تفاوت معنی‌داری با جمعیت پایه داشتند.

نتایج زیست‌سنجی مرحله پوره سن دو

نتایج حاصل از زیست‌سنجی پوره سن دو نشان داد که جمعیت جیرفت با غلظت کشنده ۵۰ درصد ۱۸/۳۱ میلی‌گرم ماده مؤثر بر لیتر، کمترین حساسیت را نسبت به ترکیب اسپیروترامات در مقایسه با جمعیت پایه نشان داد. میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد برای جمعیت‌های کرج، یزد و پیشوا نیز به ترتیب ۷/۱۸۵ و ۷/۳۴، ۱۰/۱۵۱ و ۷/۱۸۵ میلی‌گرم ماده مؤثره بر لیتر به محاسبه شد. مقایسه نتایج زیست‌سنجی دز کشنده ۵۰ درصد با استفاده از (LC₅₀ Ratio) صورت گرفت و نرخ مقاومت در جمعیت‌های جیرفت، کرج، یزد و پیشوا به ترتیب ۵/۴۷، ۳/۰۴، ۲/۱۹ و ۲/۱۵ به دست آمد که بیان‌کننده مقاومت کم در جمعیت جیرفت با نرخ مقاومت بین (۵-۱۰) و مقاومت جزئی در جمعیت کرج با نرخ مقاومت (۵-۳) و حساسیت در جمعیت‌های یزد و پیشوا با نرخ مقاومت (کمتر از ۳) در برابر ترکیب اسپیروترامات می‌باشد. همه تیمارها در سطح احتمال ۹۵ درصد تفاوت معنی‌داری با جمعیت پایه داشتند (جدول ۲).

مرحله تخم

نتایج حاصل از زیست‌سنجی مرحله تخم نشان داد که جمعیت جیرفت با میزان LC_{50} ۴۶/۹۴۷ میلی گرم ماده مؤثر بر لیتر، کمترین حساسیت را نسبت به ترکیب اسپیروتترامات در مقایسه با جمعیت پایه دارد. میزان LC_{50} برای جمعیت‌های کرج، یزد و پیشوا نیز به ترتیب ۲۷/۵۲۹، ۳۸/۴۱۶ و ۲۳/۲۸۲ میلی گرم ماده مؤثره بر لیتر به دست آمد. مقایسه نتایج زیست‌سنجی با استفاده از نسبت غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50} Ratio) صورت گرفت و نرخ مقاومت در جمعیت‌های جیرفت، کرج، یزد و پیشوا به ترتیب ۴/۲۵۹، ۳/۴۸۵، ۲/۴۹۸ و ۲/۱۱۲ به دست آمد که بیان‌کننده مقاومت جزئی (نرخ مقاومت بین ۵-۳) در جمعیت‌های جیرفت و کرج، حساسیت (نرخ مقاومت کمتر از ۳) در جمعیت‌های یزد و پیشوا نسبت به ترکیب اسپیروتترامات می‌باشد. همه تیمارها در سطح احتمال ۹۵ درصد تفاوت معنی‌داری با جمعیت پایه داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج زیست‌سنجی اسپیروتترامات سه مرحله رشدی سفیدبالک پنبه *B. tabaci* در جمعیت‌های انتخابی ایران

مرحله زیستی	جمعیت	تعداد حشرات	غلظت کشنده ۵۰ درصد (میلی گرم ماده مؤثره بر لیتر)	شیب \pm خطای استاندارد	کای اسکوئر (درجه آزادی)	نسبت غلظت کشنده ۵۰ درصد
حشره بالغ	مرند	۳۷۰	۲۰/۷۹ - ۲۵/۶۷	۴/۳۲۶ \pm ۰/۵۳	۳/۳۳ (۱۳)	۱
	کرج	۳۵۴	۱۷۶/۰۷۳	۲/۷۹۶ \pm ۰/۳۶	۲/۴۸۷ (۱۳)	۷/۵۹۸**
	یزد	۳۶۰	۱۴۴/۹۳۱	۳/۱۲۹ \pm ۰/۴	۲/۱۴۸ (۱۳)	۶/۲۵۴**
	پیشوا	۳۶۸	۱۰۰/۳۷	۱/۹۴۱ \pm ۰/۲۸	۲/۱۸۶ (۱۳)	۴/۳۳۱**
	جیرفت	۳۶۰	۲۲۲/۴۷۳	۲/۵۷ \pm ۰/۲۶	۵/۸۸ (۱۳)	۹/۶**
	۱۹۱/۲۶ - ۲۶۰/۸۱					
پوره سن ۲	مرند	۴۲۵	۳/۳۴۴	۲/۷۷۵ \pm ۰/۳	۲/۳۵۷ (۱۳)	۱
	کرج	۴۱۸	۱۰/۱۵۱	۲/۲۵۴ \pm ۰/۳۹	۷/۷۹ (۱۳)	۳/۰۳۶**
	یزد	۳۸۷	۷/۳۴	۲/۵۳۳ \pm ۰/۳۴	۱/۶۵ (۱۳)	۳/۱۹۵**
	پیشوا	۴۷۲	۷/۱۸۵	۲/۸۷۷ \pm ۰/۳۵	۲/۳۳ (۱۳)	۲/۱۴۹**
	جیرفت	۳۶۰	۱۸/۳۱	۳/۰۱۸ \pm ۰/۳۵	۷/۹۲ (۱۳)	۵/۴۷۶**
	۱۶/۰۹ - ۲۰/۹۸					
مرحله تخم	مرند	۳۶۰	۱۱/۰۲	۴/۵۰۸ \pm ۰/۵	۳/۹۳ (۱۳)	۱
	کرج	۳۶۰	۳۸/۴۱۶	۶/۴۷ \pm ۰/۷۹	۶/۹۳ (۱۳)	۳/۴۸۵**
	یزد	۳۶۰	۲۷/۵۲۹	۴/۷۱۹ \pm ۰/۶۲	۵/۷۵ (۱۳)	۳/۴۹۸**
	پیشوا	۳۶۰	۲۳/۲۸۲	۵/۱۷۶ \pm ۰/۶۸	۵/۱۷ (۱۳)	۲/۱۱۲**
	جیرفت	۳۶۰	۴۶/۹۴۷	۴/۶۴۱ \pm ۰/۴۶	۶/۴ (۱۳)	۴/۲۵۹**
	۴۳/۱۴ - ۵۱/۳۱					

** نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد می‌باشد.

* نرخ مقاومت در جمعیت پایه برابر ۱ می‌باشد.

نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا

فعالیت کربوکسیل استرازهای کل

فعالیت کربوکسیل استراز کل در حشرات بالغ سفیدبالک با استفاده از دو سوبسترای آلفا و بتا نفتیل استات مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود ($F_{4,14}=5.135, P=0.016$). (شکل ۱). بیشترین میزان فعالیت آنزیم برای سوبسترا آلفا نفتیل استات مربوط به جمعیت کرج به میزان 0.1917 نانو مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود. همچنین نرخ فعالیت این آنزیم در مقایسه با جمعیت پایه $1/493$ بود. میزان فعالیت آنزیم کربوکسیل استراز برای سوبسترا بتا نفتیل استات نیز در جمعیت‌های مختلف متفاوت بوده و تیمارها دارای تفاوت معنی‌دار بودند ($F_{4,14}=11.197, P=0.001$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم نیز مربوط به جمعیت کرج به مقدار 0.617 بود و نرخ فعالیت آن در مقایسه با جمعیت پایه نیز $1/71$ برابر بود. نتایج فعالیت‌های آنزیمی در جدول شماره سه ارائه شده است. مقایسه میزان فعالیت آنزیم کربوکسیل استراز با دو سوبسترای متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار ($F_{9,29}=15.209, P=0.000$) بین دو سوبسترا در تیمارهای مختلف بود (شکل ۱).

فعالیت گلوکوناتیون اس ترانسفرآز

بررسی نتایج آنزیمی فعالیت گلوکوناتیون اس ترانسفرآزها در حشرات بالغ جمعیت‌های مختلف سفیدبالک نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بود ($F_{4,14}=50.231, P=0.000$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به جمعیت جیرفت با میزان فعالیت $1/045433$ میکرو مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود و همچنین نرخ فعالیت آن برای جمعیت جیرفت $1/014$ بود. در بین جمعیت‌های مختلف، تیمارهای مرنده و کرج با سایر جمعیت‌ها تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ۳).

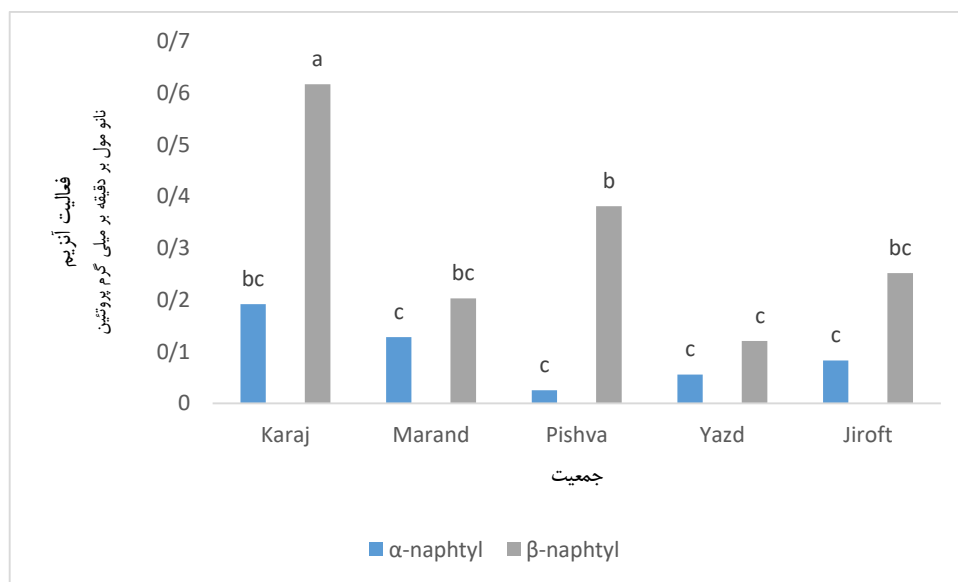
فعالیت مونواکسیژناز وابسته به سیتوکروم P450

نتایج میزان فعالیت مونواکسیژناز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد ($F_{4,14}=9.605, P=0.002$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به جمعیت جیرفت با مقدار 0.050834 میلی مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود. همچنین نرخ فعالیت آنزیم برای جمعیت جیرفت $3/427$ میلی مول بر میلی‌گرم بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. نتایج فعالیت‌های آنزیمی در جدول ۳ ارائه شده است.

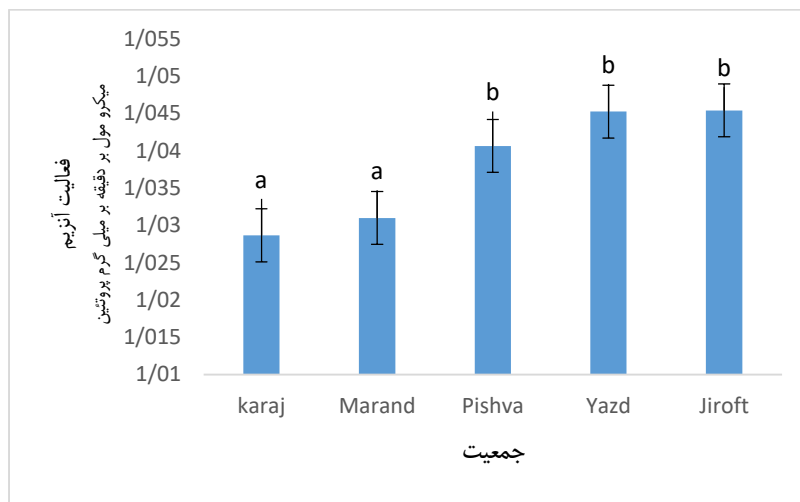
جدول ۳- میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در حشرات بالغ جمعیت‌های مختلف *B. tabaci*

جمعیت	فعالیت کربوکسیل استراز (نانو مول / دقیقه / میلی گرم پروتئین) ^B		فعالیت گلوکوتایون اس- ترانسفراز ^C		فعالیت مونواکسیژناز P450 ^D	
	نسبت	بتا نفتیل استات	نسبت	(میکرو مول / دقیقه / میلی گرم پروتئین)	نسبت	میلی مول / دقیقه / میلی گرم پروتئین
مرند	۱*	± / ۰.۴۲۲b ۰.۳۶۰۱۸	*۱	۱/۰۲۱ ± / ۰.۱۲۵a	*۱	۰/۱۴۸ ± / ۰.۰۱۵c
کرج	۱/۴۹۳	± / ۰.۴۳a ۰/۶۱۷۰۰۹	۱/۷۱	۱/۰۲۸ ± / ۰.۰۵۵a	۰/۹۹	۰/۰۳۷۵ ± / ۰.۰۱۱ab
پیشوا	۰/۲	± / ۰.۷ab ۰/۳۸۰۹	۱/۰۵	۱/۰۴۰ ± / ۰.۱۵۱b	۱/۰۰۹	۰/۰۲۶۸ ± / ۰.۰۱۱bc
یزد	۰/۴۳	± / ۰.۱۳b ۰/۱۲۰۸	۰/۳۳	۱/۰۴۵ ± / ۰.۱۱۹b	۱/۰۱۳	۰/۰۲۳۵ ± / ۰.۰۱۸bc
جیرفت	۰/۶۵	± / ۰.۴۶b ۰/۲۵۲	۰/۶۹	۱/۰۴۶ ± / ۰.۰۰۰۴b	۱/۰۱۴	۰/۰۵۰۸۳ ± / ۰.۰۷۷a

a حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.
 B فعالیت هیدرولیزی آلفا نفتیل و بتا نفتیل استات برحسب (nmol/min/mg protein).
 C فعالیت اتصال گلوکوتایون با سوبسترای CDNB برحسب (μmol/min/mg protein).
 D فعالیت او-دمتیلاسیون TMBZ به‌وسیله MFO برحسب (mmol/min/mg proteins).
 E نسبت فعالیت آنزیمی در جمعیت‌های مختلف نسبت به فعالیت در جمعیت پایه
 * نرخ فعالیت آنزیم در جمعیت پایه که برابر یک می‌باشد.

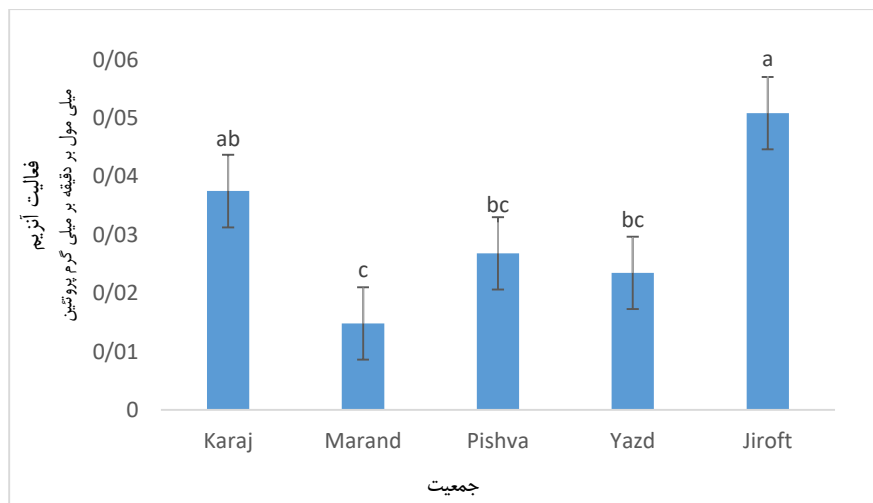


شکل ۱. مقایسه فعالیت آنزیم‌های استراز با استفاده از دو سوبسترای آلفا و بتا نفتیل استات- *حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار و حروف مشابه نشان‌دهنده اختلاف غیر معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از آزمون توکی



شکل ۲. فعالیت آنزیم گلووتاتیون اس - ترانسفراز با استفاده از سوبسترا CDNB

*حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار و حروف مشابه نشان دهنده اختلاف غیر معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از آزمون توکی



شکل ۳. فعالیت آنزیمهای P450 با استفاده از سوبسترا TMBZ-

*حروف متفاوت نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار و حروف مشابه نشان دهنده اختلاف غیر معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از آزمون توکی

بحث

استفاده بی رویه از ترکیبات شیمیایی آفت کش، سبب افزایش سریع مقاومت آفات نسبت به گروه های وسیعی از آفت کش ها شده و از میزان اثربخشی این ترکیبات در کنترل آفات کلیدی کاسته است. این امر به ویژه در کشورهای در حال توسعه، که از ترکیبات با توانمندی بالا در القاء مقاومت بیشتر استفاده می شود و در بسیاری از موارد غلظت های بالای آفت کش در تکرارهای متعدد بکار می رود، حادث تر است (Wilson & Otsuki, 2004). از این رو معرفی ترکیبات شیمیایی جدید که بتواند در کنترل آفات کلیدی یک منطقه مؤثر باشد از اهمیت زیادی برخوردار است. اسپیروترامات یک ترکیب شیمیایی جدید از گروه تترونیک

اسید می‌باشد که دارای خاصیت سیستمیک بوده و دارای شیوه تأثیر جدید برای کنترل حشرات مکنده در مرحله جوانی و نابالغ شامل شپشک‌ها، شته‌ها و سفیدبالک‌ها می‌باشد (Saleem et al., 2021). در سال‌های اخیر کاربرد حشره کش اسپیروتترامات به عنوان یک ترکیب مناسب برای مبارزه با آفات مکنده به خصوص سفیدبالک‌ها مورد استقبال قرار گرفته است؛ با این وجود استفاده مکرر از این ترکیب، موجب بروز مقاومت در جمعیت‌های آفات شده است.

در مطالعه حاضر مقاومت نسبت به اسپیروتترامات در سه مرحله زیستی و در پنج جمعیت مختلف از سفیدبالک پنبه *B. tabaci* مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه جمعیت مرند به‌عنوان جمعیت پایه در نظر گرفته شد زیرا دارای کمترین میزان غلظت کشنده پنجاه درصد (LC_{50}) و بیشترین میزان حساسیت نسبت به اسپیروتترامات در مراحل مختلف رشدی بود. بر این اساس سطوحی از مقاومت نسبت به اسپیروتترامات در مراحل مختلف رشدی سفیدبالک و در جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده شد که در این بین جمعیت جیرفت بیشترین نرخ مقاومت را در مراحل مختلف زیستی سفیدبالک در مقایسه با جمعیت پایه نشان داد. در کلیه جمعیت‌های مورد مطالعه، مرحله پوره سن دوم نسبت به مراحل تخم و حشره کامل حساسیت بسیار بیشتری در برابر اسپیروتترامات از خود نشان داد که با توجه به نحوه تأثیر ترکیب، از طریق اثر بر گیرنده‌های استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز در بیوسنتز بافت چربی، مورد انتظار بود. همچنین میزان LC_{50} برای مرحله تخم در همه جمعیت‌های مورد مطالعه نسبت به دیگر مراحل رشدی بیشتر بود که به نظر می‌رسد به وجود لایه کوریون در اطراف تخم، که از نفوذ ترکیب به درون آن جلوگیری می‌کند، مرتبط است. حساسیت پوره سن دوم می‌تواند به عدم توسعه کافی سامانه مقاومت در این مرحله رشدی از حشره آفت مرتبط باشد.

یافته‌های دیگر محققین نیز نتایجی همسو با یافته‌های این تحقیق داشته است. (Gong et al., 2016) در بررسی‌های خود نشان دادند که بیشترین تأثیر اسپیروتترامات بعد از روز چهارم سم‌پاشی اتفاق می‌افتد، تأثیر بسیار آرامی دارد و بیشترین تأثیر آن در مراحل نابالغ اتفاق می‌افتد. این ترکیب موجب مرگ‌ومیر مراحل نابالغ شته‌ها و سفیدبالک‌ها در فاصله زمانی دو الی ۱۰ روز بعد از سم‌پاشی شده و حساسیت مراحل نابالغ بیشتر از مراحل بالغ بوده است (Gong et al., 2016). Bruck et al. (2009) گزارش کرده‌اند که سرعت عمل اسپیروتترامات بستگی به مرحله زیستی حشره هدف و برخی عوامل خارجی دارد و مراحل پورگی حشرات دو الی پنج روز بعد از تیمار کردن از بین می‌روند. بررسی انجام‌شده با استفاده از روش‌های زیست‌سنجی با تخم‌ها و پوره‌ها از پنج منطقه جغرافیایی نشان داده که پوره‌ها نسبت به تخم‌ها به اسپیروتترامات بسیار حساس‌تر هستند. مهم‌تر از همه، سطوح مقاومت هر پنج جمعیت از سطح پایین در سال ۲۰۱۲ به سطح متوسط تا بالا در سال ۲۰۱۶ افزایش یافت (Peng et al., 2017). در مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققان، سطح خیلی پایینی از مقاومت به اسپیروتترامات در پنجاب پاکستان مشاهده شده است که به همراه نتایج (Bielza et al., 2019) نشان‌دهنده این است که مقاومت به اسپیروتترامات توسعه‌یافته نیست (Saleem et al., 2021). یکی از مهم‌ترین دلایل در عدم وجود مقاومت بالا نسبت به اسپیروتترامات، نحوه عملکرد بسیار متفاوت این ترکیب در مقایسه با ترکیبات فسفره و نئونیکوتینوئیدی می‌باشد که روی سیستم عصبی تأثیر می‌گذارند و باعث ایجاد مقاومت گروهی و تقاطعی در طیف وسیعی از ترکیبات حشره‌کش می‌شوند. در بررسی صورت گرفته در اسپانیا، مقاومت تقاطعی به اسپیروتترامات (۱۳۰ برابر) در جمعیت‌های مقاوم به اسپیرومسیفن سفیدبالک پنبه مشاهده شد که این اولین گزارش مقاومت تقاطعی نسبت به اسپیروتترامات در دنیا بود (Bielza et al., 2019). مقاومت متابولیکی یکی از مؤثرترین روش‌ها برای دفع سموم در حشرات و مقاومت نسبت به حشره‌کش‌ها و آفت‌کش‌ها می‌باشد که به‌طور کلی دربرگیرنده سه آنزیم دخیل در سم‌زدایی می‌باشند که عبارت‌اند از سیستم اکسیدازی چندکاره، کربوکسیل استرازها و گلوکاتایون اس ترانسفرازها. در مطالعه پیش رو میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در حشرات بالغ سفیدبالک اندازه‌گیری شد. بیشترین نرخ فعالیت آنزیم استراز با سوبسترای آلفا نفتیل استات مربوط به جمعیت کرج بود و با سایر جمعیت‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P>0/05$). در مورد سوبسترای بتا نفتیل استات نیز بیشترین میزان مربوط به جمعیت کرج بود و سایر جمعیت‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. اندازه‌گیری فعالیت گلوکاتایون اس ترانسفرازها با استفاده از سوبسترا CDNB

انجام شد و بالاترین نرخ فعالیت آنزیمی مربوط به جمعیت جیرفت با مقدار ۱/۰۱۴ بود که با جمعیت یزد و پیشوا تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$) ولی با سایر جمعیت‌ها تفاوت معنی‌داری داشت. در مورد میزان فعالیت مونواکسیژناز، بالاترین نرخ فعالیت مربوط به جمعیت جیرفت و سپس جمعیت کرج بود که با سایر جمعیت‌ها تفاوت معنی‌داری داشتند. در مطالعه حاضر نیز میزان فعالیت آنزیم مونواکسیژناز در جمعیت مقاوم بیشتر از سایر جمعیت‌ها بود. مونواکسیژنازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های مؤثر در غیر سمی کردن ترکیبات شیمیایی و بروز مقاومت به حشره‌کش‌ها می‌باشند. مطالعات متعددی میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در سفیدبالک پنبه رو مورد بررسی قرار دادند. میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در جمعیت‌های مقاوم و حساس سفیدبالک پنبه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که افزایش فعالیت مونواکسیژنازها تا ۱۷ برابر در جمعیت مقاوم (جیرفت) اتفاق افتاده است. بیشترین فعالیت مونواکسیژناز وابسته به سیتوکروم P450 با مقاومت به ایمیداکلوپرید و استامی‌پراید در ارتباط بود و نتایج نشان داد که سیتوکروم P450 تنها سیستم آنزیمی دخیل در مقاومت به نئونیکوتینوئیدها است (Basij et al., 2017). Salehi et al., (2020) میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در جمعیت‌های مختلف سفیدبالک پنبه (شامل مونواکسیژناز وابسته به سیتوکروم P450، کربوکسیل استراز و گلوکوتایون اس- ترانسفرازها را اندازه‌گیری کردند. افزایش در فعالیت سیتوکروم P450 تا سه برابر در جمعیت گرگان و فعالیت کربوکسیل استراز در جمعیت کاشان تا دو برابر در مقایسه با جمعیت حساس مشاهده شد. بر اساس نتایج، سیتوکروم P450 و کربوکسیل استراز احتمالاً سیستم‌های آنزیمی مسئول مقاومت به ایمیداکلوپرید در جمعیت‌های مورد آزمایش *B. tabaci* هستند. Balkan, (2020) بررسی‌های خود میزان فعالیت آنزیم مونواکسیژناز در جمعیت‌های مقاوم سفیدبالک را ۴/۳۷ تا ۳/۷۹ برابر گزارش کرد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که مونواکسیژنازها نقش مهمی در غیر سمی کردن ترکیبات شیمیایی و مقاومت به اسپروتترامات در حشرات ایفا می‌کنند (Mohammad Nejad and Sabahi, 2022). در مطالعه حاضر سطوح فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در جمعیت‌های مختلف در مقایسه با جمعیت پایه زیاد بود و تفاوت معنی‌داری داشت که خود یکی از دلایل اصلی بروز مقاومت نسبی در این جمعیت‌ها تلقی می‌شود. همچنین به دلیل اینکه میزان فعالیت این آنزیم‌ها در حشرات بالغ از سایر مراحل زیستی بیشتر است، این موضوع یکی از مهم‌ترین دلایل بروز مقاومت نسبی شدید در مرحله حشره کامل نسبت به سایر مراحل زیستی می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی‌های صورت گرفته نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به ترکیب اسپروتترامات در جمعیت جیرفت اتفاق افتاده و در هر سه مرحله زیستی سفیدبالک پنبه، جمعیت جیرفت بیشترین میزان مقاومت نسبت به جمعیت پایه را نشان داده است. نتایج زیست‌سنجی نشان داد که در بین جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت جیرفت کمترین حساسیت را نسبت به اسپروتترامات در مقایسه با جمعیت پایه داشت و میزان (LC_{50}) برای جمعیت جیرفت ۲۲۲/۴۷۳ میلی‌گرم ماده مؤثر بر لیتر به دست آمد. همچنین مقادیر (LC_{50}) برای جمعیت‌های کرج، یزد و پیشوا به ترتیب ۱۷۶/۰۷۳، ۱۴۴/۹۳۱ و ۱۰۰/۳۷ به دست آمد. در بین مراحل زیستی مورد مطالعه، مرحله پورگی بیشترین حساسیت را نسبت به ترکیب اسپروتترامات در مقایسه با جمعیت پایه نشان داد در حالی که مرحله حشره کامل، کمترین حساسیت را نسبت به این ترکیب داشت. همچنین در بررسی فعالیت‌های آنزیم‌های سم‌زدا بیشترین نرخ فعالیت آنزیمی در جمعیت مقاوم، برای مونواکسیژناز مشاهده شد که نشان‌دهنده نقش این آنزیم در غیر سمی کردن ترکیبات شیمیایی می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده مدیریت استفاده از دیگر ترکیبات شیمیایی با نحوه تأثیر متفاوت که بتواند هم بر روی کلیه مراحل زیستی سفیدبالک پنبه تأثیرگذار باشد و هم از بروز مقاومت تقاطعی جلوگیری کند، کاملاً ضروری می‌باشد. با توجه به گزارش‌های قبلی صورت گرفته که مقاومت تقاطعی بین اسپروتترامات و اسپروتترامات مشاهده شده است، برنامه‌های مدیریت تلفیقی این آفت نیازمند توجه بیشتر به این موضوع می‌باشد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر، مستخرج از رساله دکتری می‌باشد که در گروه گیاهپزشکی دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی تهران انجام شده است. بدین وسیله از همکارانی که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

بهلول زاده، مهدی، طالبی چهرمی، خلیل و حسینی نوه، وحید (۲۰۱۲). ارزیابی حساسیت سه جمعیت عسلک پنبه *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae) به حشره کش‌های ایمیداکلوپرید و آمیتراز. *دانش گیاهپزشکی ایران*، (۲)، ۴۳-۳۴۵-۳۵۶.
محمد نژاد هاوستین، مجید و صباحی، قدرت اله (۱۴۰۰). بررسی آنزیمی حساسیت جمعیت‌های مختلف شته جالیز *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) نسبت به دو حشره کش اسپیروتترامت و فلونیکامید. *دانش گیاهپزشکی ایران*، (۱)، ۵۲-۱۳۵-۱۴۷.

REFERENCES

- Balkan, T. (2020). Neonicotinoid resistance in adults and nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn., 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations in tomato fields from Tokat, Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 44(3), 319-331.
- Basij, M., Talebi, K., Ghadamyari, M., Hosseinaveh, V., & Salami, S. A. (2017). Status of resistance of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to neonicotinoids in Iran and detoxification by cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Neotropical Entomology*, 46(1), 115-124.
- Bielza, P., Moreno, I., Belando, A., Grávalos, C., Izquierdo, J., & Nauen, R. (2019). Spiromesifen and spirotetramat resistance in field populations of *Bemisia tabaci* Gennadius in Spain. *Pest Management Science*, 75(1), 45-52.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brück, E., Elbert, A., Fischer, R., Krueger, S., Kühnhold, J., Klueken, A. M., & van Waetermeulen, X. (2009). Movento®, an innovative ambimobile insecticide for sucking insect pest control in agriculture: biological profile and field performance. *Crop Protection*, 28(10), 838-844.
- Feng, Y., Wu, Q., Wang, S., Chang, X., Xie, W., Xu, B., & Zhang, Y. (2010). Cross-resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in B-biotype *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 66(3), 313-318.
- Gong, Y., Shi, X., Desneux, N., & Gao, X. (2016). Effects of spirotetramat treatments on fecundity and carboxylesterase expression of *Aphis gossypii* Glover. *Ecotoxicology*, 25(4), 655-663.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- He, C., Xie, W., Yang, X., Wang, S. L., Wu, Q. J., & Zhang, Y. J. (2018). Identification of glutathione S-transferases in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and evidence that GSTd7 helps explain the difference in insecticide susceptibility between *B. tabaci* Middle East-Minor Asia 1 and Mediterranean. *Insect Molecular Biology*, 27(1), 22-35.
- Hopkinson, J. E., & Pumpa, S. M. (2019). Baseline susceptibility of *Bemisia tabaci* MEAM 1 (Hemiptera: aleyrodidae) in Australia to spirotetramat, cyantraniliprole and dinotefuran, with reference to pyriproxyfen cross-resistance. *Austral Entomology*, 58(4), 762-771.
- Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., & Ishaaya, I. (2004). Dynamics of resistance to the neonicotinoids acetamiprid and thiamethoxam in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(6), 2051-2056.
- Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., Khasdan, V., & Ishaaya, I. (2005). Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 58(4), 216-225.
- Liu, Y. (2015). Biotype, the ratio of vector-bone disease and insecticide resistance status of *Bemisia*

- tabaci* populations in China. *Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China.*
- Luo, C., Jones, C. M., Devine, G., Zhang, F., Denholm, I., & Gorman, K. (2010). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* biotype Q (Hemiptera: Aleyrodidae) from China. *Crop Protection*, 29(5), 429-434.
- Mohammad Nejad Havestini, M., & Sabahi, Q. (2021). Enzymatic susceptibility evaluation of different populations of melon aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) to two insecticides: spirotetramat and flonicamid. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 52(1), 135-147. (In Persian).
- Morin, S., Williamson, M. S., Goodson, S. J., Brown, J. K., Tabashnik, B. E., & Dennehy, T. J. (2002). Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(12), 1781-1791.
- Peng, Z., Zheng, H., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., & Zhang, Y. (2017). Field resistance monitoring of the immature stages of the whitefly *Bemisia tabaci* to spirotetramat in China. *Crop Protection*, 98, 243-247.
- Rauch, N., & Nauen, R. (2004). Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase from the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(4), 321-329.
- Robertson, J. L., & Preisler, H. K. (1992). Pesticide bioassays with arthropods CRC Press. Boca Raton, FL.
- Salazar-López, N. J., Aldana-Madrid, M. L., Silveira-Gramont, M. I., & Aguiar, J. L. (2016). Spirotetramat—An alternative for the control of parasitic sucking insects and its fate in the environment. *Insecticides Resistance. InTech*, 41-54.
- Salehi-Sedeh, F., Khajehali, J., Nematollahi, M. R., & Askari-Saryazdi, G. (2020). Imidacloprid resistance status and role of detoxification enzymes in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) populations from Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(5), 1267-1277.
- Saleem, M., Sagheer, M., & Atiq, M. (2021). Determination of insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) populations from Punjab, Pakistan. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(2), 1799-1808.
- Shen, J. L., & Wu, Y. D. (1995). Insecticide resistance in cotton bollworm and its management. *Đ280. China Agricultural Press, Beijing, China*, 259.
- Valverde, R. A., Sim, J., & Lotrakul, P. (2004). Whitefly transmission of sweet potato viruses. *Virus Research*, 100(1), 123-128.
- Van Asperen, K. (1962). A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8(4), 401-416.
- Wang, Z., Yan, H., Yang, Y., & Wu, Y. (2010). Biotype and insecticide resistance status of the whitefly *Bemisia tabaci* from China. *Pest Management Science*, 66(12), 1360-1366.
- Wang, F., Liu, J., Chen, P., Li, H. Y., Ma, J. J., Liu, Y. J., & Wang, K. (2020). *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Insecticide resistance in Shandong Province, China. *Journal of Economic Entomology*, 113(2), 911-917.
- William, G. B., & Janet, C. (1997). Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13(3), 233-237.
- Wilson, J. S., & Otsuki, T. (2004). To spray or not to spray: pesticides, banana exports, and food safety. *Food policy*, 29(2), 131-146.
- Yang, N., Xie, W., Yang, X., Wang, S., Wu, Q., Li, R. & Zhang, Y. (2013). Transcriptomic and proteomic responses of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, to thiamethoxam. *PLoS One*, 8(5), e61820.
- Zheng, Y., Yao, F., Ding, X., Zhao, J., & He, Y. (2018). Developmental trend of resistance of *Bemisia tabaci* to imidacloprid in laboratory and its biochemical mechanism. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 30(1), 70-73.