

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و سم‌شناسی آنزیم استیل کولین استراز در کنه‌های دو لکه ای مقاوم و حساس به کلرپایریفوس

پریچهر زمانی^۱، رضا حسن‌ساجدی^۱، محمد قدمیاری^{۲*} و نرگس معماری‌زاده^۲

^۱ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

^۲ رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۷

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱۸

چکیده

غیرحساس شدن آنزیم استیل کولین استراز به ترکیبات فسفره آلی در کنه دو لکه ای *T. urticae*، نقش اساسی در مقاومت به این ترکیبات دارد. در این مطالعه، ویژگی‌های بیوشیمیایی و سم‌شناسی این آنزیم در کنه‌های مقاوم و حساس به کلرپایریفوس مورد بررسی قرار گرفت. کنه‌های مورد مطالعه از اصفهان (ISR)، یزد (YZ) و رشت (GUS2) جمع‌آوری و بر اساس ژن کدکننده آنزیم سیتوکروم اکسیداز I (COI) میتوکندریایی شناسایی شدند. آزمون‌های زیست‌سنجی نشان داده بود که نسبت مقاومت به کلرپایریفوس در جمعیت‌های ISR و YZ در مقایسه با جمعیت GUS2 به ترتیب ۱۷۶/۹ و ۹/۷۸ می‌باشد. تعیین فعالیت ویژه AChE با استفاده از سوبستراهای مختلف نشان داد که جمعیت مقاوم دارای بیشترین و جمعیت حساس دارای کمترین فعالیت ویژه آنزیمی است، همچنین تغییر در تحرک الکتروفورزی استیل کولین استراز ISR و شدت بیشتر باند مربوطه در حضور کلرپایریفوس اکسان در این جمعیت، وجود تغییر در این آنزیم را تأیید کرد. در ادامه، اثر بازدارندگی ۱۱ آفت کش فسفره آلی و کاربامات به منظور تأیید نقش این آنزیم در مقاومت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از این بود که IC₅₀ مهارکننده‌ها در AChE جمعیت مقاوم و نیمه مقاوم به ترتیب از جمعیت حساس بالاتر می‌باشد. در نتیجه نتایج نشان می‌دهد که تغییراتی در مکان هدف این آنزیم و یا در اطراف آن ایجاد شده که موجب تحرک الکتروفورزی متفاوت، تمایل کمتر آنزیم به سوبسترا و به تبع آن حساسیت کمتر به آفت‌کش‌های فوق که به صورت رقابتی با سوبسترا عمل می‌کنند، شده است.

واژه‌های کلیدی: *Tetranychus urticae*، کلرپایریفوس، استیل کولین استراز و مهارکننده‌ها

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۳۳۶۹۰۴۵۳، پست الکترونیکی: mghadamyari@gmail.com

مقدمه

می‌شود و به مرور زمان مقاومت به این آفت‌کش‌ها ایجاد شده است (۱۸). مقاومت علیه این آفت‌کش‌ها به دو دسته مقاومت متابولیکی و مقاومت در جایگاه هدف تقسیم می‌شود. آنزیم‌های استراز، گلوکوتایون‌اس-ترانسفراز و اکسیژنازها در مقاومت متابولیکی نقش عمده ای دارند (۱۹). این آفت‌کش‌ها، برحسب مکان هدف به چند نوع تقسیم می‌شوند. یک گروه از این آفت‌کش‌ها، ترکیبات فسفره آلی و کاربامات‌ها هستند. ترکیبات فسفره آلی (OPs)، از جمله اولین گروه‌های مواد شیمیایی استفاده شده در

کنه تارتن دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch از زیر رده Acari و متعلق به راسته Prostigmata و خانواده Tetranychidae است. این کنه پلی‌فاژ بوده و حدود ۱۲۰۰ گونه گیاهی به عنوان میزبان‌های این کنه گزارش شده است که بیش از ۱۵۰ گونه از این تعداد مانند پنبه، ذرت، گوجه فرنگی، فلفل شیرین، درختان میوه و گیاهان زینتی دارای اهمیت اقتصادی می‌باشند (۱۰). از آنجایی که که قدرت تولید مثل این کنه بسیار زیاد و سیکل زندگی آن کوتاه است، سموم مختلفی به دفعات زیاد علیه این کنه استفاده

شناسی این آنزیم در جمعیت‌های حساس و مقاوم با استفاده از مهارکننده‌های فسفره و کاربامات، سویستراه‌های سنتزی و زایموگرام مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد شیمیایی و آفت کشها: استیل تیوکولین آیوداید (ATC)، بوتیریل تیوکولین آیوداید (BTC)، پروپونیل تیوکولین آیوداید (PTC) و کلرپایرفوس از Wako Pure Chemical Industries Ltd. (ژاپن)، کلرپایرفوس و دیگر مهارکننده‌ها از شرکت سیگما (Sigma, St. Louis, MO, USA) ترایتون X-100، تریس، اکریل آمید، بیس اکریل آمید، تمد، سدیم دودسیل سولفات (SDS) و بقیه مواد از شرکت مرک (Merck, Darmstadt Germany)، کیت استخراج DNA از ژل آگارز از شرکت فرمتاز (MBI Fermetas, Vilnius, lithuania) و PCR master kit از شرکت کیژن (Hilden, Germany) تهیه شدند.

جمع‌آوری جمعیت‌های حساس و مقاوم کنه دولکه‌ای: جمعیت مقاوم در سال ۱۳۸۶ از گلخانه رز واقع در اصفهان جمع‌آوری شد. جمعیت نیمه مقاوم در سال ۱۳۸۷ از گلخانه رز واقع در یزد و جمعیت حساس در سال ۱۳۸۸ از روی بوته‌های رز در شهرستان رشت جمع‌آوری گردید. پرورش جمعیت‌های کنه روی گیاه لوبیای چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* (L.)) در اتاق‌های مجزا به صورت انبوه صورت می‌گرفت.

شناسایی جمعیت‌های کنه تارتن دولکه‌ای به روش مولکولی: شناسایی جمعیت‌ها بر اساس کلید شناسایی با استفاده از شکل ادیاگوس کنه‌های نر صورت گرفت. همچنین به منظور شناسایی مولکولی جمعیت‌ها، از ژن کدکننده آنزیم سیتوکروم اکسیداز I (COI) میتوکندریایی کنه تارتن دولکه‌ای استفاده شد.

استخراج DNA: استخراج DNA از ۱۰ عدد کنه ماده بالغ با استفاده از روش تغییر یافته CTAB انجام شد بدین

کنترل *T. urticae* هستند که این گونه به آنها مقاوم شده است. اولین مورد مصرف و بروز مقاومت به این ترکیبات به وسیله هل در ۱۹۶۲ گزارش شد (۸). تغییر ساختاری در مکان هدف آنزیم استیل کولین استراز مکانیسم عمده مقاومت در ترکیبات فسفره آلی است (۱۲). ویژگی بیوشیمیایی AChE غیرحساس، ایجاد برخی تغییرات در جایگاه فعال آنزیم را تأیید می‌کند (۲۰). مشخص نمودن سازوکارهای بیوشیمیایی زیر بنایی می‌تواند نقش مهمی در غلبه بر مشکلات ناشی از مقاومت به آفت‌کشها ایفاء نماید و علاوه بر کمک در انتخاب منطقی مخلوط آفت‌کشها و تناوب آنها، فرصتی برای گسترش آزمون‌های سریع و کارآ برای تشخیص مقاومت و پایش (monitoring) تغییرات در پاسخ به کاربرد آفت‌کشهای بعدی فراهم کند. گزارش شده است که مقاومت تقاطعی منفی بین N-دی متیل کاربامات و N-متیل کاربامات در شته سبز هلو (*Myzuspersicae*) وجود دارد (۹). نومورا و همکاران بر اساس مطالعات بازدارندگی استیل کولین استراز زنجیرک سبز برنج، گزارش کردند که مقاومت تقاطعی منفی بین مونوکروتوفوس و MTMC و همچنین مقاومت تقاطعی بین پروپاکسور و MTMC وجود دارد (۱۱). در این تحقیق سعی خواهد شد تا مقاومت تقاطعی منفی بین ترکیبات N-متیل کاربامات (اسرین، آلدیکارب، کاربوفوران، کارباریل و MTMC) و N-دی متیل کاربامات (نئواستیگماین بروماید) در کولین استراز کنه مقاوم به کلرپایرفوس مورد بررسی قرار گیرد.

گزارش مقاومت کنه دولکه‌ای به ترکیبات آلی فسفره از کشورهای یونان، بلژیک، نیوزیلند گزارش شده است (۱، ۱۳، ۱۶ و ۱۷) و این اولین مورد گزارش مقاومت به کلرپایرفوس (ترکیب فسفره) از ایران است.

در این مطالعه، مکانیسم مقاومت مکان هدف (غیرحساس شدن جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز) به کلرپایرفوس در جمعیت‌های ایرانی کنه دولکه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ویژگی‌های بیوشیمیایی و سم

همسن سازی کنه ها: برای انجام آزمونهای بیوشیمیایی باید جمعیتی همسن از کنه فراهم می شد. برای این منظور ساقه سه برگگی لوبیا از در چوب پنبه ای شیشه های حاوی آب عبور داده شد و سپس روی هر برگ ۱۵ عدد کنه ماده بالغ قرار داده و به داخل انکوباتور منتقل شد. ۱۸ تا ۲۴ ساعت به این کنه ها فرصت تخم ریزی داده شد سپس کنه های بالغ از روی برگ حذف و تخمها تا زمان ظاهر شدن جانور بالغ به داخل انکوباتور بادمای 24 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی 10 ± 70 درصد و دوره روشنایی خاص (تاریکی ۸ : روشنایی ۱۶) منتقل شدند. به این ترتیب جمعیت همسن برای آزمونها فراهم گردید.

سنجش فعالیت ویژه استیل کولین استراز: عصاره آنزیمی با استفاده از روش تغییرات یافته خواجه علی و همکاران (۱۲) تهیه شد. بدین ترتیب که ۱۰۰۰ کنه ماده در ۳ میلی لیتر بافر تریس اسیدی (۱۰ میلی مولار، $\text{pH} = 7.5$) حاوی ۰/۱ درصد تریتون X-100 هموژنیزه و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، محلول هموژنیزه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور $10000 \times \text{g}$ سانتیفریوژ گردید سپس فعالیت AChE به روش المان با استفاده از سوبسترای ATC ، BTC ، PTC اندازه گیری شد (۷) و جذب محلول به مدت ۲۰ دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر به صورت کایتیک خوانده شد.

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید و آنالیز زایموگرام آنزیم استیل کولین استراز: الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید غیرتغییر ماهیت دهنده به روش دیویس (Davis) با استفاده از ژل 7.5 درصد انجام شد (۶). لازم به ذکر است که ژل و بافر الکتروفورز، هر دو حاوی ۰/۱ درصد تریتون X-100 بوده و به ژل، ۰/۰۲ میلی مولار ATC افزوده شد. بعد از آماده شدن ژل، ۵ میکرولیتر بافر نمونه و ۲۵ میکرولیتر آنزیم (به ازای هر کنه ۳ میکرولیتر بافر) در داخل چاهکها بارگذاری گردید. الکتروفورز در دمای ۴ درجه سانتی گراد

ترتیب که کنه‌ها در محلولی حاوی ۵ میکرولیتر پروتئیناز K 20 mg/ml و ۱۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (CTAB ۲ درصد (w/v) در تریس اسیدی ۱۰۰ میلی مولار و EDTA ۲۰ میلی مولار و $1/42 \text{ NaCl}$ میلی مولار هموژنایز شدند و بقیه مراحل طبق پروتوکول انجام شد (۱۵).

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR): واکنش PCR با استفاده از Master Mix و با پرایمر های ggaggatttggaaattgattgtcc (reverse) و (forward) انجام شد. مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل در دمای ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (واسرشت سازی)، ۱ دقیقه در دمای ۴۹ درجه سانتی گراد (اتصال)، ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (بست) و ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (بست نهایی) انجام گرفت. پس از انجام PCR، الکتروفورز و ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و محصول، توسط کیت استخراج DNA از ژل آگارز استخراج شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدی و آنالیزهای فیلوژنتیکی COI: تعیین ترادف نوکلئوتیدی در هر دو جهت توسط MWG (Eurofins MWG operan, Germany) صورت گرفت. به منظور به دست آوردن توالیهای نوکلئوتیدی مربوط به توالی COI، کاوشهایی در بانکهای اطلاعاتی EBI/GenBank انجام شد (۵) و با استفاده از BLASTN جستجوهای همولوژی به عمل آمد (۳). توالیها به کمک برنامه آنالیز MAFIT (Kyushu university) مقایسه و تطبیق گردیدند. به منظور تعیین ارتباط بین جمعیتهای مورد مطالعه و رسم درخت فیلوژنتیکی، از نرم افزار Maximum Parsimony (version 4.0b10) PAUP (MP) استفاده شد. تعداد تکرار در آنالیز Bootstrapping، ۱۰۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شد.

درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش maximum parsimony و به کمک نرم افزار PAUP (version 4.0b10) رسم شد (شکل ۱). نتایج نشان می‌دهد که هر سه جمعیت مورد مطالعه در یک کلاد خواهری بزرگ (a) که تمام گونه‌های *T. urticae* در آن قرار گرفته‌اند، واقع شده است. همچنین با توجه به درخت فیلوژنتیکی، ارتباط نزدیکی بین توالی DNA گونه‌های شناسایی شده با گونه *T. urticae* (AJ316605) و *T. urticae* (AJ316598) وجود دارد که با نتایج حاصل از multiple alignment مطابقت دارد. نتایج حاصل از تطبیق توالی و رسم درخت فیلوژنتیک نشان می‌دهد که هر سه جمعیت، *T. urticae* هستند.

بررسی فعالیت استیل کولین استراز: نتایج حاصل از فعالیت آنزیم استیل کولین استراز با استفاده از سه سوبسترای ATC، BTC و PTC در جدول ۱ آورده شده است. با استفاده از هر سه سوبسترا به ویژه ATC، مقدار فعالیت ویژه در جمعیت مقاوم و نیمه مقاوم نسبت به جمعیت حساس بالاتر است.

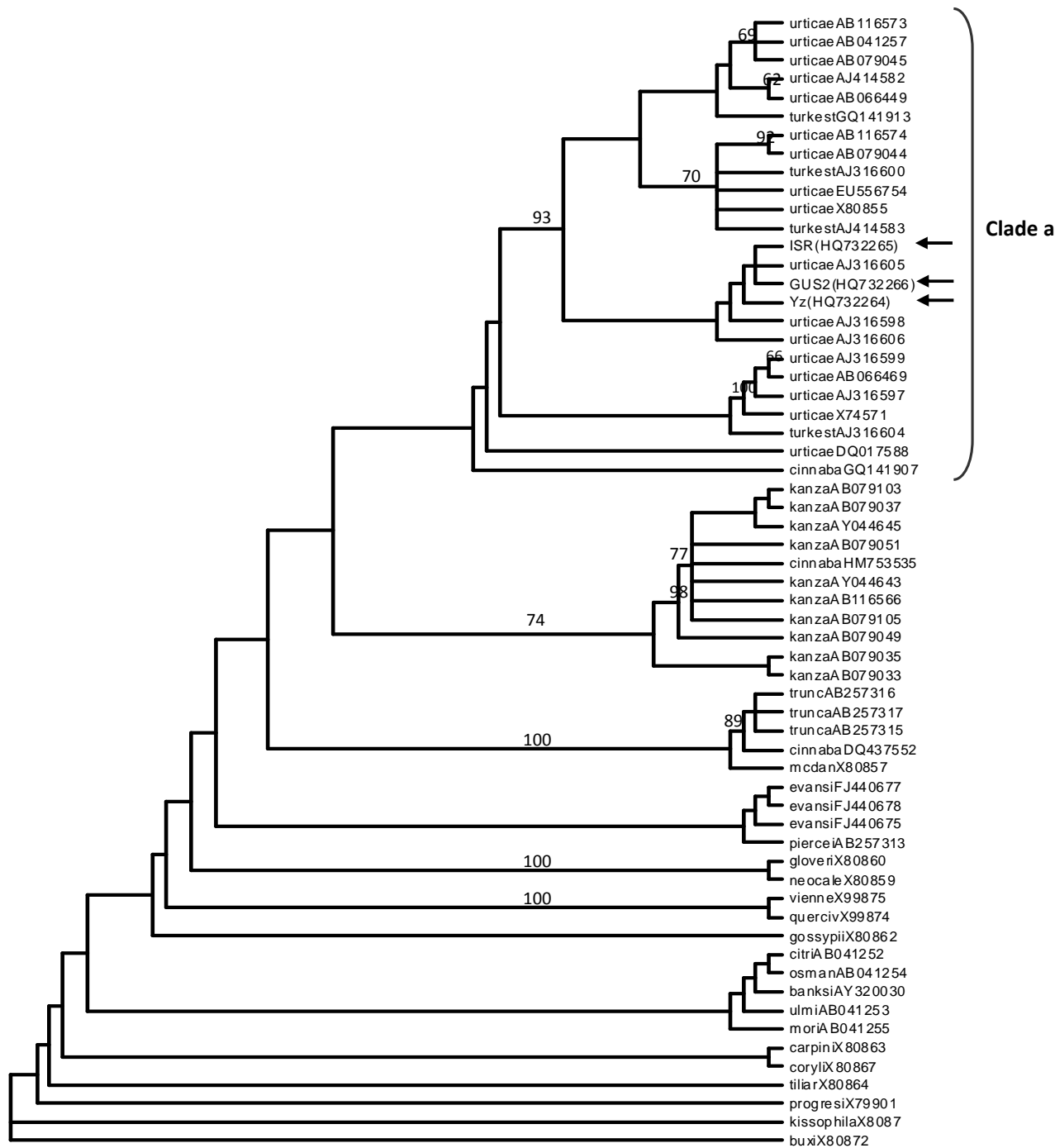
الگوی پراکنش باندهای استیل کولین استراز: الگوی پراکنش باندها در جمعیت‌های مورد آزمایش در شکل ۲ آمده است. در هر سه جمعیت، تنها یک باند دیده می‌شود که مکان قرارگیری آن در جمعیت مقاوم با دو جمعیت دیگر متفاوت است و تحرک الکتروفورزی کمتری در آن مشاهده می‌شود که احتمالاً می‌تواند ناشی از تغییرات ساختاری در جمعیت ISR باشد. اثر مهارکننده کلرپایریفوس بر فعالیت آنزیم AChE، با انکوبه کردن ژل در محلول حاوی کلرپایریفوس در حین رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفت. باندهای دو جمعیت نیمه مقاوم و حساس به طور کامل مهار شدند در حالی که باند استیل کولین استراز جمعیت مقاوم هنوز روی ژل مشاهده می‌شود.

و با ولتاژ ۱۸۰ ولت انجام گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ۱۰۰ میلی گرم ATC در ۴ میلی لیتر آب مقطر خنک حل و سپس ۷ میلی لیتر محلول سولفات مس ۰/۱ مولار قطره قطره به آن اضافه گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۷ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و به ۱۰ میلی لیتر از محلول رویی ۵۰ میلی گرم گلايسين افزوده شد و با استات سدیم ۱ مولار به pH=۴/۶ رسید. سپس با سولفات سدیم ۱ مولار محلول حاصل به حجم نهایی ۴۰ میلی لیتر رسانده و فیلتر شد. ژل تا ظاهر شدن کامل باندها در این محلول قرار داده شد (۱۴).

تعیین IC₅₀ تعدادی از سموم روی آنزیم استیل کولین استراز: برای محاسبه IC₅₀ ترکیبات فسفره آلی و کارباماتها، محلول آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه در غلظت‌های ۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۲}، ۱۰^{-۴}، ۱۰^{-۵}، ۱۰^{-۶}، ۱۰^{-۷} و ۱۰^{-۸} مولار از هر یک از آفت کشهای Eserine، Aldicarb، Monocrotophos، Chlorpyrifosoxon، Neostigmine، MTMC، Carbaryl، Carbofuran، Phosphamidon، Dimethoate و Paraoxon انکوبه شد. سپس فعالیت باقیمانده آنزیم اندازه‌گیری گردید و نتایج با نرم افزار POLO-PC (LeOra Software, 1987) آنالیز شد.

نتایج

شناسایی مولکولی جمعیتها: قطعه‌ای از ژن سیتوکروم اکسیداز I (COI) میتوکندریایی به اندازه حدود ۹۰۰bp در جمعیت‌های اصفهان، یزد و رشت با PCR تکثیر گردید. مقایسه توالی‌های به دست آمده در این تحقیق با نمونه‌های موجود در بانک‌های ژنی نشان داد که جمعیت‌های مورد نظر همولوژی بالایی با گونه *T. urticae* دارند (۹۹ درصد مشابهت با *T. urticae* AJ316605 و مشابهت ۹۰ درصد > با *T. urticae* AJ316598). با توجه به مطابقت توالی DNA گونه‌های شناسایی شده با گونه *T. urticae* شناسایی شده در بانک‌های توالی (*T. urticae* AJ316605)، اختلافات بسیار ناچیزی در توالی COI این نمونه‌ها مشاهده شد.



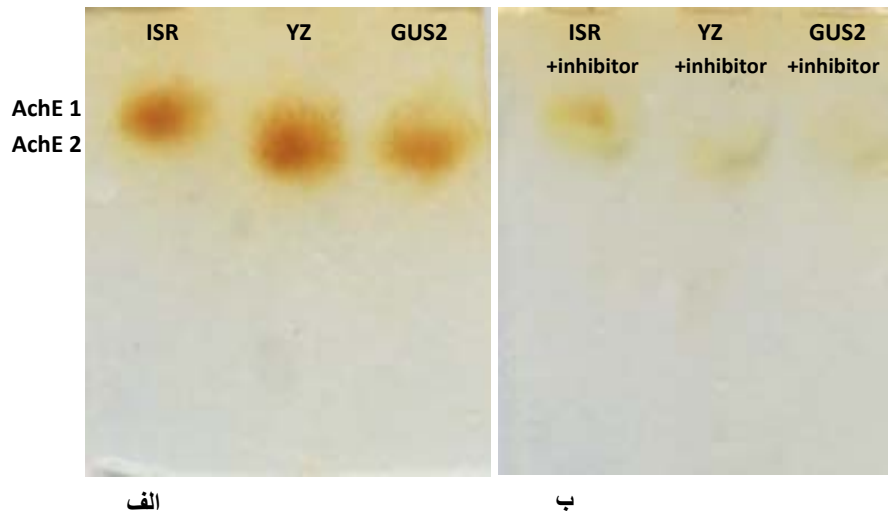
شکل ۱ - شناسایی جمعیت‌های مورد مطالعه با رسم درخت فیلوژنتیکی

Tetranychus urticae: AB116573, AB041257, AB079045, AJ414582, AB066449, AB116574, AB079044, EU556754, X80855, AJ316605, AJ316598, AJ316606, AJ316599, AB066469, AJ316597, X74571, DQ017588, *Tetranychus turkestanii*: GQ141913, AJ316600, AJ414583, AJ316604, *Tetranychus cinnabarinus*: GQ141907, HM753535, DQ437552, *Tetranychus kanzawai*: AB079103, AB079037, AY044645, AB079051, AY044643, AB116566, AB079105, AB079049, AB079035, AB079033, *Tetranychus truncatus*: AB257315, AB257316, AB257317, *Tetranychus evansi*: FJ440675, FJ440677, FJ440678, *Tetranychus piercei*: AB257313, *Tetranychus gloveri*: X80860, *Tetranychus mcdanieli*: X80857, *Tetranychus neocaledonicus*: X80859, *Amphitetranychus viennensis*: X99875, *Amphitetranychus quercivorus*: X99874, *Panonychus citri*: AB041252, *Panonychus osmanthi*: AB041254, *Panonychus ulmi*: AB041253, *Panonychus mori*: AB041255, *Eotetranychus banksi*: AY320030, *Eotetranychus carpini*: X80863, *Eotetranychus coryli*: X80867, *Eotetranychus tiliarum*: X80864, *Mononychellus progresivus*: X79901, *Oligonychus gossypii*: X79901. Outgroups: *Bryobia kissophila* (X80871) and *Eotetranychus buxi* (X80872)

جدول ۱ - مقایسه فعالیت ویژه آنزیم AChE در سه جمعیت مورد مطالعه

Enzyme	Substrate	Specific activity (nmol/min.mg protein)		
		ISR	Yz	GUS2
AChE	ATC	5.72 ^{a*} ± 0.32	5.28 ^b ± 0.13	4.56 ^c ± 0.09
	BTC	4.56 ^a ± 0.17	4.25 ^b ± 0.09	4.10 ^b ± 0.06
	PTC	5.54 ^a ± 0.01	5.43 ^b ± 0.07	4.63 ^c ± 0.1

^{a*}حروف مختلف نشان دهنده معنی دار بودن اختلافات بر اساس Tukey's test ($p < 0.05$) می باشد.



شکل ۲ - مقایسه الگوی پراکنش باندهای AChE در جمعیت‌های کنه دولکه ای

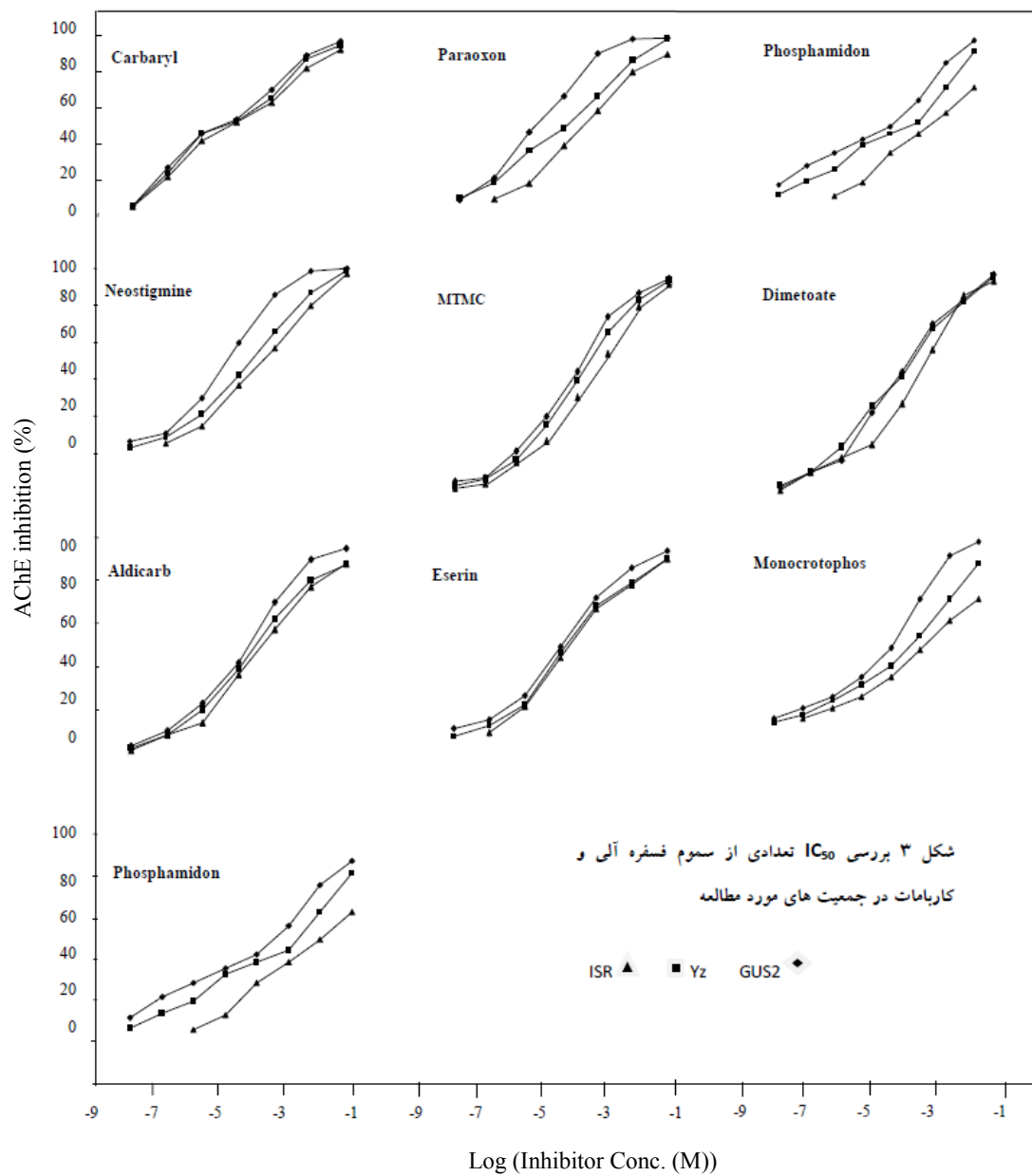
آنزیم استیل کولین استراز نسبت به این سموم به ترتیب در جمعیت مقاوم و نیمه مقاوم کاملاً مشهود می باشد.

بحث

نتایج آزمایش‌های زیست‌سنجی روی جمعیت‌ها نشان داده بود که نسب مقاومت به کلرپایریفوس در جمعیت‌های ISR و Yz به ترتیب برابر ۱۷۶/۹ و ۹/۷۸ می باشد (۲۳). همچنین نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که میزان فعالیت استرازی و گلوکوتایون اس ترنسفرز در جمعیت‌های ISR و Yz بالاتر از حساس است (۲۳). لیکن میزان فعالیت این آنزیم‌ها در حدی نبود تا میزان مقاومت بالا به کلرپایریفوس را توجیه نماید (۲۳). به همین دلیل در این تحقیق ویژگی‌های بیوشیمیایی کولین استراز در این جمعیت‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

تعیین IC_{50} تعدادی از سموم مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز: نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری IC_{50} ۱۱ مهارکننده مختلف برای سه جمعیت در جدول ۲ و نمودارهای دز پاسخ آنها در شکل ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که میزان IC_{50} در جمعیت مقاوم و نیمه مقاوم برای سموم chlorpyrifosoxon, phosphamidon, monocrotophos و paraoxon بیشتر از جمعیت حساس بود. نسبت غیرحساس شدن (IR) به آفت کش کلرپایریفوس به ترتیب ۲۳/۳۰ و ۲/۹۶ برابر به ترتیب برای جمعیت‌های مقاوم و نیمه مقاوم تخمین زده شد.

نتایج نشان می دهد که جمعیت مقاوم، در مقایسه با دو جمعیت دیگر حساسیت کمتری به سموم مورد مطالعه دارد و در دز بالاتری مهار می شود و به عبارتی حساسیت کمتر



شکل ۳- بررسی IC_{50} تعدادی سموم فسفره آلی و کاربامات در جمعیت‌های مورد مطالعه

جدول ۲ - بررسی IC₅₀ تعدادی از سموم فسفره آلی و کاربامات

Inhibitor	IC ₅₀ (M)				
	ISR	Yz	GUS2	IR ^a	IR ^b
Eserine	3.96 (1.8-5.20) × 10 ⁻⁶	3.01 (1.8-6.7) × 10 ⁻⁵	1.25 (1.03-2.5) × 10 ⁻⁵	3.16	2.4
Aldicarb	6.82 (5.27-8.56) × 10 ⁻⁵	4.69 (3.87-5.21) × 10 ⁻⁵	3.07 (2.38-4.21) × 10 ⁻⁵	2.2	1.52
monocrotophos	8.04 (6.05-10.8) × 10 ⁻³	2.73 (1.3-6.8) × 10 ⁻⁴	5.29 (3.9-6.1) × 10 ⁻⁴	15.19	5.16
Chlorpyrifos	7.26 (5.9-9.12) × 10 ⁻⁵	9.23 (7.01-13.5) × 10 ⁻⁶	3.11 (1.9-6.11) × 10 ⁻⁶	23.3	2.96
Neostigmine	4.74 (3.5-9.5) × 10 ⁻⁵	2.5 (1.7-3.2) × 10 ⁻⁵	7.71 (<9.03) × 10 ⁻⁶	6.14	3.24
MTMC	2.8 (>1.7) × 10 ⁻⁴	8.61 (5.9-12.4) × 10 ⁻⁵	6.35 (<8.2) × 10 ⁻⁵	4.4	1.35
Dimetoate	4.49 (1.9-7.9) × 10 ⁻⁴	8.8 (7.13-10.2) × 10 ⁻⁵	8.76 (>4.6) × 10 ⁻⁵	5.12	1.004*
phosphamidon	9.83 (6.3-14.5) × 10 ⁻³	2.02 (1.2-6.31) × 10 ⁻³	3.95 (1.7-5.2) × 10 ⁻⁴	24.88	5.11
carbofuran	8.95 (6.32-11.1) × 10 ⁻⁷	8.32 (6.5-10.13) × 10 ⁻⁷	8.47 (6.1-9.5) × 10 ⁻⁷	1.05*	0.98*
carbaryl	8.21 (>6.98) × 10 ⁻⁶	8.15 (>5.2) × 10 ⁻⁶	8.12 (5.6-9.49) × 10 ⁻⁶	1.01*	1.003*
paraoxon	8.48 (5.4-11.23) × 10 ⁻⁵	2.39 (1.41-6.5) × 10 ⁻⁵	4.36 (3.5-9.3) × 10 ⁻⁶	19.4	5.48

IR (Insensitivity Ratios)^a = IC₅₀ of ISR population / LC₅₀ of GUS2 population

IR^b = IC₅₀ of Yz population / LC₅₀ of GUS2 population

* اختلاف‌ها معنی‌دار نمی‌باشند.

قرار گرفت (شکل ۲). آنالیز زایموگرام نشان داد که تحرک الکتروفورزی در جمعیت ISR با جمعیت حساس کمی متفاوت است که حاکی از این است که جمعیت مقاوم دارای AChE ای است که به طور کیفی تغییر یافته است. همچنین مهارکننده کلرپایریفوس، سبب مهار باندهای جمعیت حساس شده در حالی که این باند در جمعیت مقاوم همچنان باقی است. در نهایت برای اثبات غیرحساس شدن آنزیم استیل کولین استراز، IC₅₀ چندین مهارکننده این آنزیم، اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در همه این ترکیبات، جمعیت مقاوم در غلظت بالاتری از مهارکننده، مهار می‌شود. به خصوص در تعدادی از این ترکیبات فسفره آلی، تفاوتها آشکارتر می‌باشد (جدول ۲). بیشترین و کمترین نسبت غیرحساس شده (IR) به ترتیب در phosphamidon و carbaryl برای جمعیت مقاوم و phosphamidon و carbofuran برای جمعیت نیمه مقاوم به دست آمد. مقدار IC₅₀ کلرپایریفوس در جمعیت‌های ISR، Yz و GUS2 به ترتیب ۷/۲۶ × ۱۰^{-۵}، ۹/۲۳ × ۱۰^{-۶} و ۳/۱۱ × ۱۰^{-۶} مولار تخمین زده شد. فعالیت بالای AChE در جمعیت مقاوم و نیمه مقاوم و همچنین نتایج حاصل از زایموگرام و تعیین IC₅₀ مهارکننده روی این آنزیم، ایجاد

استیل کولین استراز آنزیمی منحصر به فرد با ویژگیهای خاص می‌باشد که تفاوت‌های بارزی با دیگر هیدرولازها دارد. این تفاوتها منجر به کارایی بالای این آنزیم شده است. از آن جمله می‌توان به وجود یک پیوند هیدروژنی بیشتر بین آنزیم و سوبسترا در جایگاه فعال اشاره کرد. همچنین وجود اسید آمینه‌های آروماتیک اضافی، در دهانه جایگاه فعال و نیروهای الکترواستاتیک بیشتر آن در طی مسیر، منجر به کارایی بالای آنزیم در اتصال به سوبسترای خود شده است (۲۴). غیر حساس شدن جایگاه فعال AChE، به برخی از ترکیبات فسفره آلی و کارباماتها در آفات مختلف از جمله کنه دو لکه ای گزارش شده است (۲، ۴ و ۱۸). در این تحقیق، به منظور مطالعه غیر حساس شدن آنزیم AChE و تعیین نقش آن در مکانیسم مقاومت، فعالیت ویژه این آنزیم، همچنین پراکنش باندهای الکتروفورزی و اثر مهارکنندگی ۱۱ آفت کش از جمله کلرپایریفوس مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ویژه این آنزیم با تمام سوبستراها در جمعیت مقاوم و نیمه مقاوم به ترتیب بیشتر از جمعیت حساس مشاهده شد که نشان‌دهنده نقش آنزیم AChE در مقاومت به کلرپایریفوس است. در ادامه زایموگرام استیل کولین استراز مورد بررسی

شدن استیل کولین استراز نسبت به کلرپایریفوس وجود دارد (جدول ۲). نسبت مقاومت و نسبت غیرحساس شدن به ترتیب ۱۷۶/۹ و ۲۳/۳ در جمعیت مقاوم و ۹/۷۸ و ۲/۹۶ در جمعیت نیمه مقاوم برآورد شد. داده‌ها نشان دهنده استیل کولین استراز تغییر در جمعیت مقاوم (ISR) و نیمه مقاوم (YZ) می‌باشد که به احتمال زیاد مکان جهش در این دو جمعیت متفاوت می‌باشد. بنابراین مطالعات مولکولی تکمیلی روی مکان جهش می‌تواند اطلاعات با ارزشی در مورد برهمکنش بازدارنده‌ها با مکان فعال در اختیار بگذارد.

برخی تغییرات ساختاری در آنزیم را تأیید می‌کند. مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که غیرفعال شدن جایگاه هدف، مکانیسم عمده مقاومت در این آفت، نسبت به تعدادی از ترکیبات فسفره آلی می‌باشد (۱۹) و تاکنون در ژاپن و نیوزیلند و بلژیک و آلمان گزارش شده است (۲، ۴، ۲۱ و ۲۲). مطالعات مولکولی نشان داد جایگزینی یک یا تعدادی اسید آمینه در جایگاه کاتالیتیک آنزیم و یا اطراف آن رخ داده که این جهشها منجر به حساسیت کمتر به سموم و مهارکننده‌ها و در نتیجه ایجاد مقاومت در *T. urticae* می‌شود (۲ و ۱۲).

در نهایت، نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که ارتباط منطقی بین نسبت مقاومت و نسبت غیرحساس

منابع

1. Ay, R. and Yorulmaz, ES. (2010) Inheritance and detoxification enzyme levels in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) strain selected with chlorpyrifos. *Journal of Pest Science*. 83: 85-96.
2. Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, T., Kozaki, T. and Kono, Y. (2003) Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33: 509-514.
3. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
4. Ballantyne, G. H., Harrison, R. A. (1967) Genetic and biochemical comparisons of organophosphate resistance between strains of spider mites (*Tetranychus* species: Acari). *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 10: 231-239.
5. Benson, D. A., Mizrachi, I. K., Lipman, D. J., Ostell, J., Rapp, B. A. and Wheeler, D. L. (2004) GenBank. *Nucleic Acids Research*. 32: 23-26.
6. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121: 404-427.
7. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Anres, V. and Featherstone R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
8. Georghiou, G. P., Lagunes-Tejeda, A. (1991) The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods: an Index of Cases Reported through 1989. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome, Italy. 318p.
9. Ghadamyari, M., Talebi, K., Mizuno H. and Kono, Y. (2008) Oxydemeton-methyl resistance, mechanisms, and associated fitness cost in green peach aphids (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*. 101: 1432-1438.
10. Hiroi, T., Miyazaki, Y., Kobayashi, Y., Imaoka, S. and Funae, Y. (1995) Induction of hepatic P₄₅₀s in rat by essential wood and leaf oils. *Xenobiotica*. 25: 457-467.
11. Kato, Y., Nomura, M. and Miyata, T. (1999) Negatively correlated cross-resistance between N-Methyl carbamate and monocrotophos in green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. Uhler. *Journal of Pesticide Science*, 24: 364-368.
12. Khajehali, J., van Leeuwen, T., Grispou, M., Morou, E., Alout, H., Weill, M., Tirry, L., Vontas, J. and Tsagkarakou, A. (2009) Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. *Pest Management Science*. 66: 220-228.

13. Kwon, DH., Choi, JY., Je, YH. and Lee, SH. (2012) The overexpression of acetylcholinesterase compensates for the reduced catalytic activity caused by resistance-conferring mutations in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.42: 212-21
14. Lewis, P. R. and Shute, C. C. (1966) The distribution of cholinesterase in cholinergic neurons demonstrated with the electron microscope. *Journal of Cell Science*. 1: 381-390.
15. Ros, V. I. D. and Breeuwer, J. A. J. (2007) Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Experimental and Applied Acarology*. 42: 239-262.
16. Stumpf, N. and Nauen, R. (2001) Cross-resistance, inheritance and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*. 94: 1577-1583.
17. Tsagkarakou, A., Navajas, M., Cuany, A., Chevillon, C. and Pasteur, N. (2002) Mechanisms of resistance to organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greece. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 417-424.
18. van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A. and Tirry, L. (2009) Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. pp. 347-393. In: Ishaaya, I. and Horowitz, A. R. (eds.). *Biorational Control of Arthropod Pests*, Springer Science and Business Media.
19. van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauwa and L. Tirry. (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40: 563-72.
20. Voss, G. and Matsumura, F. (1964) Resistance to organophosphorus compounds in the two-spotted spider mite: two different mechanisms of resistance. *Nature*. 202: 319-320.
21. Voss, G. and Matsumura, F. (1964) Resistance to organophosphorus compounds in the two-spotted spider mite: two different mechanisms of resistance. *Nature*. 202: 319-320.
22. Zahavi, M. and Tahori, A. S. (1970) Sensitivity of acetylcholinesterase in spider mites to organophosphorous compounds. *Biochemistry and Pharmacology*. 19: 219-225.
23. Zamani, P., H. Sajedi, R., Ghadamyari, M. and Memarizadeh, N. (2014). Resistance mechanisms to chlorpyrifos in Iranian populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Agricultural Science and Technology*. 16: 277-289.
24. Zhang, Y., Kua, J. and McCammon, A. (2002) Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis. *Journal of American chemical society*. 124: 10572-10577.

Toxicological and biochemical characterizations of acetylcholinesterases in chlorpyrifos-susceptible and resistant populations of two spotted spider mite, *Tetranychusurticae* Koch

Zamani P.^a, H. Sajedi R.^a, Ghadamyari M.^{*b}, Memarizadeh N.^b

¹ Biochemistry Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

² Plant Protection Dept., Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

The enzyme acetylcholinesterase insensitivity plays a major role in organophosphate insecticides resistance in *T. Urticae* (Acari: Tetranychidae). In this study, toxicological and biochemical resistant mechanisms to chlorpyrifos in three populations of spider mites were surveyed. Mites were first collected in Isfahan (ISR), Yazd (Yz) and Guilan (GUS2) provinces and identified based on mitochondrial cytochrome oxidase sequences. The bioassay results showed that resistance ratios of ISR and Yz populations to chlorpyrifos were 176.9- and 9.78-fold compared to the GUS2 population, respectively. Determination of acetylcholinesterase activity with different substrates showed that resistant and susceptible strains have the highest and the lowest specific activity, respectively. In addition, AChE zymogram analyses were investigated in all populations. Lower acetylcholinesterase electrophoretic mobility in ISR population and high acetylcholinesterase band intensity of ISR population in presence of chlorpyrifos-oxon showed that resistance population has altered AChE. For determining the role of acetylcholinesterase insensitivity in resistant mechanism, inhibitory effect of 11 inhibitors including OPs and carbamates on this enzyme were investigated in this study. IC_{50} of all inhibitors on acetylcholinesterase from ISR and Yz populations were higher than GUS2 population respectively. The results suggest that some modification occurred at the active site of the enzyme that reduces the AChE affinity to substrates and subsequently led to differences in electrophoretic mobility and insensitivity of enzyme to OPs and carbamate inhibitors as competitive inhibitors.

Key words: *Tetranychus urticae*, chlorpyrifos, acetylcholinesterase, inhibitors