مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۸۳-۷۵)

مکانیسم‌های مقاومت کنه دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) به آبامکتین

نرگس معماری‌زاده[۱]، محمد قدمیاری[۲]*، رضا حسن ساجدی[۳] و جلال جلالی سندی[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی دکتری، استادیاران و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۵ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۴)

چکیده

کنه دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch از آفات مهم درختان میوه، گیاهان زراعی و زینتی در سراسر جهان می‌باشد. پتانسیل بالای تولیدمثل و کوتاهی دوره زندگی همراه با کاربرد مکرر کنه‌کش‌ها به منظور پایین نگه داشتن جمعیت زیر آستانه اقتصادی، توانایی این کنه را در گسترش مقاومت به کنه‌کش‌ها تسهیل نموده است. در این تحقیق مکانیسم‌های مقاومت کنه دولکه‌ای به آبامکتین مورد بررسی قرار گرفت. آزمون‌های زیست سنجی به روش غوطه وری برگ در مجلول سمی و با استفاده از ماده فرموله شده آبامکتین (EC 25%) انجام شد. به علت ایجاد گیاه‌سوزی توسط آبامکتین در دوزهای بالا (>۳۱۰۰ پی‌پی‌ام)، امکان تخمین دقیق میزان LC_{50} آن روی جمعیت مقاوم وجود نداشت و نسبت مقاومت به آبامکتین بیش از ۳۰۰۰ برابر بود. سنجش آنزیمی نشان داد که با استفاده از سوبستراهای آلفا نفتیل استات و آلفا نفتیل پروپیونات فعالیت‌های استرازی در جمعیت مقاوم به ترتیب ۲/۱۴ و ۱/۳۳ برابر بیشتر از جمعیت حساس است. برآورد پارامترهای سینتیکی و میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز نیز تفاوت مشخص بین دو جمعیت را نشان داد، به طوری که میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت مقاوم ۱/۷۱ برابر بیشتر از جمعیت حساس می‌باشد و مقادیر K_m و V_{max} جمعیت مقاوم با استفاده از سوبسترای CDNB به ترتیب ۱/۴۳ و ۱/۱۵ برابر کمتر و بیشتر از این میزان در جمعیت حساس بود. به علاوه، نتایج نشان داد که میزان سیتوکروم P_{450} در جمعیت مقاوم ۱/۳۷ برابر بیشتر از این میزان در جمعیت حساس می‌باشد. با توجه به بالا بودن نسبت مقاومت، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که به احتمال زیاد غیرحساس شدن مکان هدف نیز یکی از مکانیسم‌های عمده مقاومت باشد.

واژه‌های کلیدی: کنه دولکه‌ای، مقاومت به آبامکتین، استراز، گلوتاتیون اس- ترنسفراز و سیتوکروم P_{450}.

مقدمه

کنه دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch یکی از چندخوارترین گونه‌های خانواده Tetranychidae است. نزدیک به ۲۰۰ گونه گیاهی شامل پنبه، ذرت، گوجه‌فرنگی، فلفل شیرین، درختان میوه و دامنه وسیعی از گیاهان زینتی، به عنوان میزبان‌های این کنه گزارش

* نویسنده مسئول: محمد قدمیاری تلفن: ۰۹۱۱-۱۴۳۸۴۰۰ Email: mghadamyari@gmail.com

شده است (Jeppson *et al.*, 1975). این افت دارای دوره زندگی کوتاه و میزان زادآوری بالا می باشد. مقاومت در اثر فشار گزینشی روی جمعیت‌هایی از جانوران با قدرت تکثیر زیاد و تعداد نسل متعدد در سال بروز می‌کند (Herron *et al.*, 1998). توسعه مقاومت به کنه‌کش‌ها در کنه‌های تارعنکبوتی اغلب آنقدر سریع اتفاق می‌افتد که مدیریت مؤثر آنها در بسیاری از سیستم‌های کشاورزی دشوار است (Jeppson *et al.*, 1975). مقاومت، باعث بوجودآمدن مشکلاتی از قبیل خسارت بیشتر به محصولات کشاورزی، به خطر افتادن سلامتی انسان، کاهش کیفیت محصول، افزایش دفعات سم‌پاشی و افزایش میزان مصرف آفت‌کش‌ها می‌شود (Brown, 2003).

مکانیسم‌های شناخته شده مقاومت مانند مقاومت رفتاری، کاهش نفوذ و جذب، سم‌زدایی، در کاهش مقدار آفت‌کشی که در نهایت به مکان هدف می‌رسد، دخالت دارند و تغییرات مکان هدف به‌طور مستقیم اتصال آفت‌کش به پروتئین مکان هدف را کاهش می‌دهد. شاید بیش از ۹۰٪ کل موارد مقاومت در حشرات و کنه‌ها به واسطه کاهش حساسیت مکان هدف (مقاومت مکان هدف) و یا افزایش سم‌زدایی آفت‌کش (مقاومت متابولیکی) ایجاد شود (Feyereisen, 1995; Roush & Tabashnik, 1990).

سه گروه آنزیم مهم درگیر در مقاومت متابولیکی نسبت به حشره‌کش‌ها و کنه‌کش‌ها شامل استرازها، گلوتاتیون اس-ترنسفرازها و مونواکسیژنازها هستند. استرازها گروه نامتجانس و بزرگ آنزیم‌های متابولیزکننده سوبستراهای داخلی و خارجی با پیوند استری هستند، که در مقاومت بیش از ۵۰ گونه از حشرات، کنه‌های دامی و گیاهی شرکت دارند (Devorshak & Roe, 1998). گلوتاتیون اس- ترنسفراز، خانواده‌ای از پروتئین‌ها است که گلوتاتیون (اتم سولفور سیستئین) را به ترکیب‌های الکترون‌دوست مختلف متصل می‌کند. قطبیت گلوتاتیون نقش مهمی در عبور سموم از غشا و بنابراین انتقال سموم متصل شده از سلول و دفع از موجود زنده دارد. به‌طور کلی مونواکسیژنازهای P_{450} که اکسیدازهای با کارکرد ترکیبی نیز گفته می‌شوند، یک گروه آنزیم‌های با عملکرد متفاوت هستند که در واقع در تمام موجودات زنده یافت می‌شوند. این آنزیم‌ها نقش مهمی در متابولیسم مواد شیمیایی داخلی و خارجی ایفا می‌کنند (Pickett & Lu, 1989; Prapanthadara *et al.*, 1993).

یکی از کنه‌کش‌های رایج در ایران که به طور گسترده برای کنترل کنه دولکه‌ای استفاده می‌شود، حشره‌کش و کنه‌کش آبامکتین است (Mosalanejhad *et al.*, 2002)، که به دلیل استفاده مکرر آن در گلخانه‌ها این احتمال وجود دارد که جمعیت‌هایی از این کنه به آبامکتین مقاوم شده باشد. با توجه به این‌که مشخص نمودن سازوکارهای بیوشیمیایی زیربنایی، می‌تواند نقش مهمی در غلبه بر مشکلات ناشی از مقاومت به حشره‌کش‌ها ایفا نماید و علاوه بر کمک در انتخاب منطقی مخلوط حشره‌کش‌ها و تناوب آنها، فرصتی برای گسترش آزمون‌های سریع و کارآ برای تشخیص مقاومت و پایش تغییرات در پاسخ به کاربرد حشره‌کش‌های بعدی فراهم کند (Scott, 1995). از این رو در این تحقیق با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی ویژگی‌های آنزیم‌های درگیر در مقاومت کنه دو لکه ای به آبامکتین مشخص شدند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جمعیت کنه دولکه‌ای

جمعیت مشکوک به مقاومت مورد استفاده در این تحقیق از روی گل رز در گلخانه‌ای واقع در شهر اصفهان، که با مشکل جدی در کنترل مواجه شده بود، جمع‌آوری شد. جمعیت حساس نیز از روی علف‌های هرز *Convolvulus sp.* از مناطق بکر دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان که هیچگونه سابقه سم‌پاشی نداشتند، جمع‌آوری شد. به منظور شناسایی گونه دو جمعیت، از تعدادی کنه‌های نر و ماده هر دو جمعیت اسلاید تهیه شد و به این ترتیب گونه هر دو جمعیت *T. urticae* تشخیص داده شد.

پرورش کنه تارتن دولکه‌ای

به منظور جلوگیری از اختلاط کلنی‌های مقاوم و حساس، این دو جمعیت در دو مکان کاملاً جدا از هم نگهداری شدند و روی گیاه لوبیا چشم بلبلی (*Phaseolus vulgaris*) پرورش داده شدند.

هم‌سن کردن کنه‌ها

به منظور هم‌سن‌سازی سطح رویی برگ لوبیا روی پنبه در داخل پتری دیشی که در ته آن سوراخی تعبیه شده بود قرار می‌گرفت و پتری‌دیش‌ها در داخل سینی آب قرار می‌گرفتند و سپس اطراف برگ نوار باریکی از پنبه برای جلوگیری از فرار کنه‌ها قرار می‌گرفت، بدین ترتیب بستر لازم برای هم‌سن‌سازی در مورد زیست‌سنجی آبامکتین فراهم می‌شد. در این مرحله تعداد ۱۵-۱۰ عدد کنه بالغ ماده روی بستر آماده قرار می‌گرفت، بعد از ۲۴ ساعت کنه‌های بالغ از روی برگ‌ها برداشته می‌شدند و تنها تخم‌ها باقی می‌ماندند. برگ‌ها تا زمان بالغ شدن تخم‌ها در انکوباتور با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره روشنایی ۱۶:۸ (تاریکی : روشنایی) قرار داده می‌شدند و بدین ترتیب کنه‌های هم‌سن برای انجام آزمون‌ها فراهم می‌شدند

آزمون‌های زیست سنجی

آزمون مقدماتی برای تعیین دامنه دوز

ابتدا آزمون‌های مقدماتی برای تعیین محدوده دوزهای مؤثر آفت‌کش بر کنه انجام شد و دوزهایی که بین ۱۰ تا ۹۰ درصد تلفات ایجاد کردند مشخص و در آزمون نهایی استفاده شدند.

آزمون نهایی زیست‌سنجی آبامکتین

آزمون زیست‌سنجی در مورد آبامکتین به روش غوطه‌وری دیسک برگی (Leaf-Dip Bioassay) در محلول سمی صورت گرفت (Cahill *et al.*, 1995; Morin *et al.*, 2002). در این آزمون پنج غلظت از ماده فرموله شده تهیه شد (ماده سمی به‌وسیله آب مقطر رقیق شد) و در آزمون زیست‌سنجی به‌کار رفت. برای هر غلظت چهار تکرار در نظر گرفته که در هر تکرار ۱۰ عدد کنه بالغ هم‌سن به صورت کاملاً تصادفی استفاده شد. ابتدا غلظت‌های مختلف حشره‌کش و دیسک‌های برگی (به قطر ۳/۵ سانتی‌متر) از گیاه لوبیا آماده شد. هر دیسک برگی به مدت ۴۵ ثانیه و به طور کامل در محلول سمی غوطه‌ور شده پس از خشک شدن سطح برگ، هر دیسک برگی روی پنبه مرطوب داخل پتری دیش قرار گرفت.آزمایش در انکوباتور با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره روشنایی ۱۶:۸ (تاریکی : روشنایی) انجام شد. پس از ۴۸ ساعت میزان تلفات تعیین شد. کنه‌هایی که با تحریک قلم‌مو قادر به حرکت به اندازه بیشتر از طول بدن نبودند، تلف شده در نظر گرفته شدند.

آزمون‌های بیوشیمیایی

مواد شیمیایی

آمونیوم پرسولفات، آلفا نفتیل استات (α-NA)، سوکروز، بروموفنل بلو، تریس، اکریل آمید، بیس اکریل آمید، TEMED ، گلایسین، گلوتاتیون احیا شده (GSH) و (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) CDNB از شرکت مرک (آلمان) و نمک فاست بلو آر آر از شرکت فلوکا (کشور آمریکا) تهیه شد. 3, 3`, 5, 5` tetramethyl benzidine (TMBZ) از شرکت Panreac خریداری شد.

تهیه عصاره آنزیمی

۲۰ عدد کنه ماده بالغ در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر ۰/۱ مولار فسفات با pH ۷ ($NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$) حاوی تریتون X-۱۰۰ به نسبت دو دهم درصد (v/v) برای استراز و بدون ترایتون برای سیستم MFO و گلوتاتیون اس-ترنسفراز با استفاده از همگنه شیشه‌ای همگن شدند، سپس محلول همگن شده در ۱۰۰۰۰g و به مدت ۱۵ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رونشین (Supernatant) به ظروف شیشه‌ای جدید منتقل شده و با بافر فسفات رقیق گردید.

اندازه‌گیری فعالیت استرازی

فعالیت کربوکسیل‌استراز مطابق روش van Asperen (1962) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت استرازها از سوبستراهای آلفا-نفتیل استات و آلفا-نفتیل پروپیونات به غلظت ۱۸×۱۰^{-۴} مولار استفاده گردید. ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول رونشین با سوبسترا و بافر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. بعد از انقضای زمان واکنش، محلول رنگی نمک فاست بلو آر آر اضافه شد و میکرو پلیت به مدت بیست دقیقه در تاریکی نگهداری گردید. بعد از گذشت بیست دقیقه مقدار آلفا نفتول تولید شده بوسیله یک میکرو پلیت ریدر (STAT FAX 3200) در ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آزمایش در سه تکرار انجام گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت استرازی منحنی استاندارد با استفاده از آلفا نفتول رسم شد و فعالیت به صورت

nmol/min/mg protein محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون اس-ترنسفراز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز با استفاده از سوبسترای CDNB و مطابق روش Habig *et al.* (1974) صورت گرفت. در این آزمایش ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۲۵ میکرولیتر GSH (۱۰۰ میلی‌مولار)، ۱۰ میکرولیتر CDNB (۵۰ میلی‌مولار) و ۲۲۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH ۷، ۰/۱ مولار) در چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شد و جذب در ۳۴۰ نانومتر به صورت پیوسته (Kinetic) با فاصله زمانی ۲۰ ثانیه و به مدت پنج دقیقه با استفاده از میکروپلیت ریدر STAT FAX 3200 خوانده شد.

تعیین پارامترهای سینتیکی گلوتاتیون اس-ترنسفراز

برای این منظور ۱۵ میکرولیتر آنزیم (به ازای هر کنه ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH ۷) به همراه ۱۳۵ میکرولیتر بافر فسفات، ۵۰ میکرولیتر CDNB (غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۱/۶ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر GSH (۱۰ میلی‌مولار) در هر تکرار در پلیت ریخته شد و جذب در ۳۴۰ نانومتر به وسیله میکروپلیت ریدر هر ۲۰ ثانیه خوانده شد. مقدار K_m و V_{max} به وسیله نرم‌افزار هایپر اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار مونواکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P_{450}

برای این منظور از روش heme-peroxidase و اندازه‌گیری میزان کل پروتئین حاوی آهن استفاده می‌شود (Brogdon *et al*., 1997). ۲۰ میکرو لیتر آنزیم، ۸۰ میکرو لیتر بافر پتاسیم- فسفات ۰/۶۲۵ مولار (pH ۷/۲)، ۲۰۰ میکرو لیتر محلول 3, 3`, 5, 5` tetramethyl benzidine (TMBZ) و ۲۵ میکرو لیتر H_2O_2 (۰/۳٪) داخل پلیت های الایزا ریخته شد. بعد از ۲ ساعت نگهداری در تاریکی، جذب در طول موج ۴۵۰ خوانده شد. در این روش از سیتوکروم C خالص شده به عنوان استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین

اندازه‌گیری مقدار پروتئین با استفاده از روش Bradford (1976) با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

محاسبات این آزمایش نیز با کمک نرم‌افزار اکسل انجام شد. مقایسه بین مقادیر در دو جمعیت در نرم‌افزار SAS و با آزمون t انجام شد. بررسی آماری مابین تیمارها در هر استرین نیز در طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

نتایج و بحث

زیست‌سنجی آبامکتین روی کنه‌های ماده بالغ دولکه‌ای

در این تحقیق از روش کاربرد غیرمستقیم استفاده شد. در این روش کنه‌ها از طریق تماس با یک سطح تیمار شده یا از طریق تغذیه و یا تنفس بخارات سمی، آفت‌کش را جذب می‌کنند. در زیست‌سنجی حشره‌کش آبامکتین از روش غوطه‌وری دیسک برگی استفاده شد که این روش به وسیله Wang & Wu (2007) در آزمون زیست‌سنجی آبامکتین در مورد *Bemisia tabaci* Genn. به کار رفته است. نتایج حاصل از زیست‌سنجی حشره‌کش آبامکتین روی کنه‌های بالغ با استفاده از برنامه پولو پی سی آنالیز شد. خطوط دوز- پاسخ و LC_{50} آبامکتین روی کنه بالغ در جدول ۱ آمده است. یکی از ویژگی‌های نرم افزار پولو پی سی این است که می‌تواند خطوط پاسخ را با هم مقایسه کرده و در نهایت یکسان بودن و موازی بودن آنها را مشخص نماید (Leora Software, 1978).

سطح مقاومت به آبامکتین در جمعیت مقاوم به حدی بالا بود که تعیین مقدار LC_{50} میسر نشد. چرا که در بالاترین غلظت آبامکتین (که منجر به گیاه‌سوزی جدی در دیسک‌های برگ لوبیای به کار رفته نمی‌شد (۳۱۰۰ ppm))، تلفاتی در کنه‌های مقاوم مورد آزمون مشاهده نشد (لازم به ذکر است گیاه به‌کار رفته در آزمون زیست‌سنجی می‌بایست سالم باشد تا در نتایج زیست‌سنجی خطا ایجاد نشود). بنابراین به دلیل مقاومت بالا و محدودیت در به کارگیری غلظت‌های بیشتر، امکان تخمین غلظتی از ماده سمی که حداقل ۵۰ درصد جمعیت را از بین ببرد، برای جمعیت مقاوم وجود نداشت اما میزان مقاومت این جمعیت حداقل ۳۰۰۰ برابر می‌باشد.

LC_{50} جمعیت حساس، ۱/۰۶ ppm برآورد شد. میزان LC_{50} برآورد شده توسط Stumpf & Nauen (2002) روی لاروهای استرین حساس با روش پاشش مستقیم با دستگاه پاشش، ۰/۰۴ ppm برآورد شد و میزان مقاومت دو استرین مقاوم NL-00 و COL-00 به ترتیب ۵۴ و ۲۶ برابر توسط این پژوهشگران به‌دست آمد.

Campos *et al.* (1995) میزان LC_{50} استرین حساس را با به کارگیری روش باقیمانده ماده سمی (Leaf Residue Assay)، ۰/۱ ppm و میزان نسبت مقاومت را برای دو استرین مورد بررسی مقاوم به آبامکتین ۱۲۵ و ۲۴۲ برابر نشان دادند.

جدول ۱- برآورد غلظت کشنده ۵۰ درصد، محدوده اطمینان ۹۵ درصد و پارامترهای خطوط دوز- پاسخ جمعیت‌های حساس و مقاوم کنه دولکه‌ای به آبامکتین

جمعیت	تعداد کنه با شاهد	LC_{50} [a] (محدوده اطمینان ۹۵٪)	شیب خط±SE	χ^2 [c] (df)	سمیت نسبی [b] (محدوده اطمینان ۹۵٪)
مقاوم	-	محاسبه نشد [d]	-	-	>>۳۰۰۰
حساس	۲۹۰	۱/۰۶ (۰/۷۲- ۲/۰۶)	۰/۲۲ ± ۱/۰۸	۰/۵۶(۳)	-

[a] مقدار LC_{50} بر حسب قسمت در میلیون (ppm) و محدوده اطمینان ۹۵٪

[b] سمیت نسبی (Relative Potency)= مقدار LC_{50}جمعیت مشکوک به مقاومت تقسیم بر LC_{50}جمعیت حساس و محدوده اطمینان ۹۵٪

[c] مقدار χ^2 در سطح ۵٪ از مقدار χ^2جدول کمتر است.

[d] LC_{50} به خاطر گیاه‌سوزی غیر قابل برآورد می باشد.

فعالیت آنزیم استراز

فعالیت استرازی جمعیت‌های حساس و مقاوم با استفاده از سوبستراهای آلفا- نفتیل استات (α-NA)، آلفا- نفتیل پروپیونات (α-NP) اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس فعالیت استرازی در دو جمعیت کنه نشان داد که فعالیت استرازی جمعیت‌های مقاوم و حساس با استفاده از هر دو سوبسترا در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری دارند (جدول ۲). این نتیجه نشانگر آن است که یکی از مکانیسم‌های مقاومت کنه مقاوم مورد آزمایش افزایش فعالیت استرازهای غیرسمی‌کننده است. مطالعه Lin *et al.* (2009) روی مکانیسم مقاومت *T. cinnabarinus* به آبامکتین نشان داد که میزان فعالیت آنزیم استراز در استرین مقاوم ۲/۷ برابر بیشتر از استرین حساس است. اما بررسی Wang & Wu (2006) روی مکانیسم مقاومت آبامکتین در *B. tabaci* درگیری این سیستم آنزیمی در این مقاومت را تأیید نکرد. نتایج بیوشیمیایی Stumpf & Nauen (2002) نیز در مطالعه مکانیسم مقاومت کنه دولکه‌ای به آبامکتین، نقش بارزی برای آنزیم استراز نشان نداد چرا که پس از کاهش سطح مقاومت در استرین مقاوم مورد مطالعه، میزان فعالیت این آنزیم کاهش نیافت. البته میزان مقاومت گزارش شده کنه دو لکه‌ای به آبامکتین توسط Stumpf & Nauen (2002) بسیار پایین‌تر از میزان مقاومت گزارش شده در این تحقیق می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که آنزیم استراز به عنوان یکی از مکانیسم‌های درگیر در مقاومت بوده، اما نقش کمی در مقاومت داشته، به طوری که نمی‌تواند بالا بودن نسبت مقاومت را به تنهایی توجیه نماید.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم کنه دولکه‌ای

در این تحقیق فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز دو جمعیت مقاوم و حساس به آبامکتین با استفاده از

جدول ۲- میانگین فعالیت استرازی جمعیت‌های حساس و مقاوم با استفاده از سوبستراهای آلفا نفتیل استات و آلفا نفتیل پروپیونات

سوبسترا	فعالیت ±SE (nmol/min/mg protein)		نسبت فعالیت
	حساس	مقاوم	(حساس/ مقاوم)
α-NA	۲۸۹/۱۶± ۲۷/۸۲	۶۰۹/۸± ۸/۳۵	۲/۱۴±۰/۱۸۷**
α-NP	۴۲۸/۹۲± ۴/۸۱	۵۶۹/۶۴± ۱۰/۶۰	۱/۳۳±۰/۰۰۱**

** در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار است.

سوبسترای CDNB، بررسی شد. نتایج فعالیت این آنزیم در دو جمعیت مذکور اختلاف معنی‌داری داشته و فعالیت آن در جمعیت مقاوم ۱/۷۱ برابر بیشتر از جمعیت حساس است (شکل ۱). در مطالعه‌ای که روی یک استرین هلندی کنه دولکه‌ای مقاوم به آبامکتین توسط Stumpf & Nauen (2002) صورت گرفت، سم‌زدایی متابولیکی به عنوان یک مکانیسم عمده در مقاومت استرین‌ها به آبامکتین شناخته شد و فعالیت‌های آنزیمی P_{450}ها و GSTها در استرین مقاوم به ترتیب ۱۳ و ۱۱ بار بیشتر از استرین حساس به دست آمد. اما نتایج ما نشان دهنده اهمیت کمتر این آنزیم در مقاومت به آبامکتین در مقایسه با مطالعه Stumpf & Nauen (2002) می‌باشد. هرچند که میزان مقاومت به آبامکتین در تحقیق حاضر بیشتر از استرین مورد مطالعه Stumpf & Nauen (2002) بود. همچنین افزایش ۳/۴ برابری فعالیت GST در استرین *T. cinnabarinus* مقاوم به آبامکتین مطالعه شده توسط Lin *et al.* (2009) نسبت به استرین حساس این کنه گزارش شد. بررسی‌های بیوشیمیایی Wang & Wu (2006) نیز بیان‌کننده افزایش ۲ برابری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز استرین مقاوم به آبامکتین *B. tabaci* نسبت به استرین حساس است.

پارامترهای سینتیکی آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز

به منظور بررسی‌های کمی و کیفی آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز، K_m و V_{max} آنزیم‌ها برای دو جمعیت با استفاده از رسم منحنی‌های لاینویر-برک اندازه‌گیری و مقایسه شد. مقادیر K_m، V_{max} و V_{max}/K_m جمعیت‌های مقاوم و حساس برای سوبسترای CDNB در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد که پارامترهای سینتیکی این آنزیم در دو جمعیت مقاوم و حساس متفاوت است. مقدار K_m جمعیت مقاوم ۱/۴۳ برابر کمتر از K_m جمعیت حساس بود که این امر بیانگر وجود تفاوت کیفی آنزیم و تمایل بیشتر آنزیم به سوبسترا، در جمعیت مقاوم نسبت به حساس است. علاوه بر این، مقدار V_{max} در جمعیت مقاوم برای این سوبسترا ۱/۸۱±۹۲/۴۷ میلی‌مولار بر دقیقه به دست آمد که ۱/۱۵ برابر بیشتر از این فاکتور در جمعیت حساس است. افزایش معنی‌دار مقدار V_{max} درجمعیت مقاوم نشان می‌دهد که گلوتاتیون اس-ترنسفراز از نظر کمی نیز با جمعیت حساس تفاوت دارد.

بررسی انجام شده به منظور توصیف ویژگی‌های آنزیمی گلوتاتیون اس- ترنسفراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم *Sitophilus zeamais* نسبت به پیروتروئیدها نشان داد که مقدار K_m این آنزیم زمانی که از مقادیر مختلف سوبسترا CDNB و مقدار ثابت GSH استفاده می‌شود در جمعیت مقاوم حدود ۲ برابر بیش از جمعیت حساس است. همچنین میزان V_{max} این آنزیم با استفاده از سوبستراهای CDNB و GSH بیش از ۲ برابر جمعیت حساس به دست آمد. اگرچه اختلاف معنی‌داری بین پارامترهای سینتیکی این آنزیم، زمانی که از DCNB و GSH به عنوان سوبسترا استفاده شد، در دو جمعیت حساس و مقاوم دیده نشد. این نتایج شواهدی برای درگیری آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز در مقاومت برخی از جمعیت‌های *Sitophilus zeamais* به پیروتروئیدها را فراهم می‌کند (Fragoso *et al.*, 2007).

در مطالعه Konanz & Nauen (2004)، مقادیر K_m و V_{max} آنزیم GST خالص‌سازی شده از دو استرین حساس (WI و GSS) و استرین مقاوم به آبامکتین (NL-00) کنه دولکه‌ای با به کارگیری سوبستراهای CDNB و GSH محاسبه شد. نتایج این محققین نشان داد که مقدار K_m با به کارگیری غلظت‌های مختلف CDNB و غلظت ثابت GSH برای استرین‌های WI و GSS و NL-00، به ترتیب ۷۹، ۷۵ و ۹۰ میکرومولار و میزان V_{max} استرین مقاوم نزدیک به ۲ برابر استرین حساس (GSS) است که این امر نشان‌دهنده بیان بیش از حد این آنزیم در استرین مقاوم می‌باشد (Konanz & Nauen, 2004).

جدول ۳- مقایسه پارامترهای سینتیکی آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم کنه دولکه‌ای

جمعیت	K_m (mM)	V_{max} (mM/min)	V_{max}/K_m
حساس	۰/۰۴۳± ۰/۰۰۲	۸۰/۰۹± ۲/۲۲	۱۸۴۴/۴± ۱۲۰/۹
مقاوم	۰/۰۳۰±۰/۰۰۱*	۹۲/۴۷± ۱/۸۱*	۳۰۶۴/۵± ۱۷۴/۱۳**

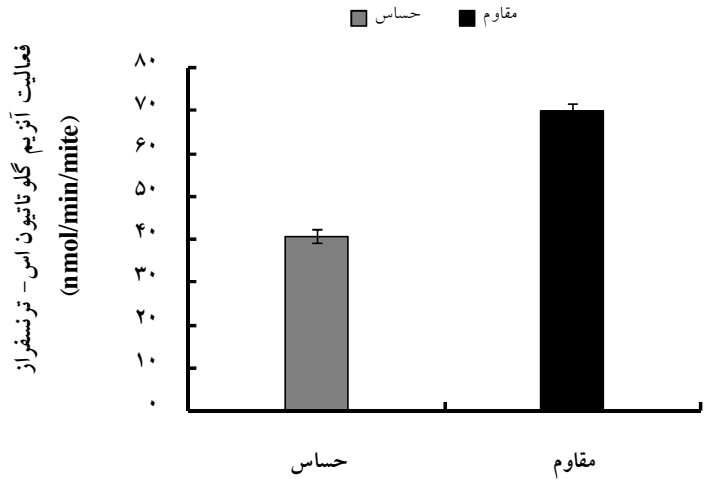
* اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار است.

اندازه‌گیری میزان مونواکسیژنازهای سیتوکروم P_{450}

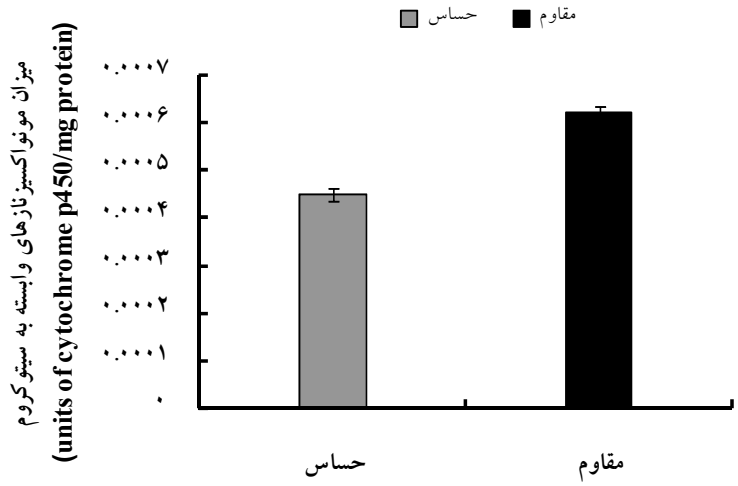
در این بررسی که به روش تیتراسیون انجام شد، میزان کل پروتئین حاوی آهن به دست آمده در دو جمعیت حساس و مقاوم، در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری دارند (شکل ۲). این میزان که در جمعیت مقاوم ۱/۳۷برابر از جمعیت حساس بیشتر است، بیانگر واحدهای سیتوکروم‌های P_{450} مونواکسیژنازها است. Enayati *et al.* (2007) با به کارگیری این روش در مورد دو جمعیت سوسری آلمانی *Blattella germanica* L.، مقاوم به پیروتروییدها نشان دادند که میزان مونواکسیژنازهای سیتوکروم P_{450} جمعیت مقاوم بیمارستان ایمان ۴/۶ و بیمارستان بوعلی سینا ۱/۵۸ برابر از جمعیت حساس آزمایشگاهی بیشتر است. در بررسی دیگری که روی جمعیت‌های مقاوم به کلرفناپیر و حساس کنه دولکه‌ای توسط van Leeuwen *et al.* (2006) انجام شد، ۲ برابر کاهش در فعالیت TMBZ پراکسیداز جمعیت مقاوم به دست آمد و این مقدار کمتر به صورت بازتابی از کاهش فعالیت کلرفناپیر در این استرین توجیه شد.

نتیجه‌گیری کلی

آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های استراز جمعیت مقاوم با استفاده از سوبسترای آلفا- نفتیل استات ۲/۱۴ برابر جمعیت حساس است. برآورد پارامترهای سینتیکی و میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترنسفراز نیز تفاوت مشخص بین دو جمعیت و دخالت این سیستم آنزیمی در مقاومت به



شکل ۱- مقایسه فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم کنه دولکه‌ای



شکل ۲- مقایسه میزان مونواکسیژنازهای سیتوکروم P_{450} در دو جمعیت حساس و مقاوم کنه دولکه‌ای

آبامکتین را نشان داد. اندازه‌گیری میزان مونواکسیژنازهای سیتوکروم P_{450}، نشان داد که این میزان در جمعیت مقاوم به آبامکتین، ۱/۳۷ برابر از جمعیت حساس بیشتر است. با توجه به بالا بودن میزان مقاومت، احتمالاً علاوه بر مقاومت متابولیکی یکی از مکانیسم‌های مهم درگیر در مقاومت، غیرحساس شدن گیرنده گابا می‌باشد که منجر به مقاومت بالایی به آبامکتین می شود.

REFERENCES

1. 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.
2. Brogdon, W. G., McAllister, J. C. & Vulule, J. (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.
3. Brown, T. M. (2003). Insect resistance to insecticide. In J. R. Plimer, D. W. Gammon & N. N. Ragsdale (Eds.), *Encyclopedia of Agrochemicals*. (pp. 913-924). John Wiley and Sons.
4. Cahill, M., Byrne, F. J., German, K., Denholm, I. & Devonshire, A. L. (1995). Pyrethroid and organophosphate resistance in the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 85, 181-187.
5. Campos, F., Dybas, R. D. & Krupa, D. A. (1995). Susceptibility of twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in California to abamectin. *Journal of Economic Entomology*, 88, 225-231.
6. Cranham, J. E. (1974). Resistance to organophosphates in red spider mite, *Tetranychus urticae* from English hop gardens. *Annals of Applied Biology*, 78, 99–111
7. 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.
8. Devonshire, A. L. (1989). The role of electrophoresis in the biochemical detection of insecticide resistance. In D. L. Hugh & J. D. Hollander (Eds.), *The Systematics Association special volume. Electrophoretic studies on agricultural pests*, (pp. 363-374). vol. 39, Oxford University Press.
9. Devorshak, C. & Roe, R. M. (1998). The role of esterases in insecticide resistance. *Reviews in Toxicology*, 2, 501-537.
10. Enayati, A. A. & Motevalli Haghi, F. (2007). Biochemistry of Pyrethroid Resistance in German Cockroach (Dictyoptera, Blatellidae) from Hospitals of Sari, Iran. *Iranian Biomedical Journal*, 11(4), 251-258. (In Farsi).
11. Feyereisen, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology letters*, 82/83, 83-90.
12. Fragoso, D. B., Narciso, R., Guedes, C., Goreti, M. & Oliveira, A. (2007). Partial characterization of glutathione S-transferases in pyrethroid- resistant and susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, 43, 167-170.
13. Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathion S-transferase, the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
14. Herron, G. A., Edge, V. E., Wilson, L. J. & Rophail, J. (1998). Organophosphate resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae) from cotton in Australia. *Experimental and Applied Acarology*, 22, 17-30.
15. Jeppson, L. R., Keifer, H. H. & Baker, E. W. (1975). *Mites injurious to economic plants*. University of California Press, Berkeley.
16. Konanz, S. & Nauen, R. (2004). Purification and partial characterization of a glutathione S-transferase from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 79, 49–57.
17. Kono, Y. & Tomita, T. (1992). Characteristics of highly active carboxylesterases in insecticide-resistant *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 43(4), 297-305.
18. LeOra Software. (1987). POLO-PC: *A users guide to probit or logit analysis*. LeOra Software, Barkeley California.
19. Lin, H., Xue, C. H., Wang, J. J., Li, M., Lu, W. C. & Zhao, Z. M. (2009). Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two Acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 47-52.
20. Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Sajedi, R. H. & Jalali Sendi, J. (2010). Characterization of esterases from abamectin-resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*. (In Press).
21. 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, 1781-1791.

22. Mosallah nejad, H., Nowrozian, M. & Mohammad beighi, A. (2002). *List of pests, plant diseases, weeds and recommended pesticides*. (1st ed.). 112pp. Nashre Amozeshe Keshavarzi press. (In Farsi).
23. Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C. P. W. & Kraus, W. (2001). Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science*, 57, 253-261.
24. Pickett, C. B. & Lu, Y. H. (1989). Glutathione S-transferases: gene structure, regulation and biological function. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 743-764.
25. Prapanthadara, L., Hemingway, J. & Ketteran, A. J. (1993). Partial purification and characterization of glutathione S-transferase involved in DTT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 47, 119-133.
26. Roush, R. T. & Tabashnik, B. (1990). *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall, 303 pp.
27. Scott, J. G. (1995). The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Florida Entomologist*, 78, 399- 414.
28. Stumpf, N. & Nauen, R. (2002). Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72, 111-121.
29. van Asperen, K. (1962). A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology*, 8, 401-416.
30. van Leeuwen, T., van Pottelberge, S. & Tirry, L. (2005). Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 61, 499-507.
31. van Leeuwen, T., van Pottelberge, S. & Tirry, L. (2006). Biochemical analysis of a chlorfenapyr selected strain of *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 62, 425-433.
32. Wang, L. & Wu, Y. (2007). Cross-resistance and biochemical mechanisms of abamectin resistance in the B-type *Bemisia tabaci*. *Journal of Applied Entomology*, 131(2), 98-103.