

مقاومت به حشره‌کش‌های فسفره و پیریمیکارب ناشی از جابجایی اسیدآمینهی  
 Ser431Phe در آنزیم استیل‌کولین‌استراز شته‌ی سبز هلو، *Myzus persicae*  
 (Hem.: Aphididae)

محمد قدمیاری<sup>۱</sup>، خلیل طالبی جهرمی<sup>۲\*</sup> و یاشیای کونو<sup>۳</sup>

۱- دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه گیلان، ۲- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳- دانشگاه تسوکوبا، ایباراکی- ژاپن.  
 \*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khtalebi@ut.ac.ir

The Ser431Phe substitution in acetylcholinesterase associated with  
 pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the peach-  
 potato aphid, *Myzus persicae* (Hem.: Aphididae)

M. Ghadamyari<sup>1</sup>, Kh. Talebi<sup>2,\*</sup> and Y. Kono<sup>3</sup>

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran, 2. Department of Plant Protection, Faculty of Horticulture and Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, 3. Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572, Japan.

\*Corresponding author, E-mail: khtalebi@ut.ac.ir

چکیده

شته‌ی سبز هلو، *Myzus persicae* Sulzer یکی از آفات مهم گیاهان زراعی و زینتی در سرتاسر جهان می‌باشد. به دلیل استفاده‌ی مکرر و گسترده از ترکیبات شیمیایی، این آفت ساز و کارهای مختلف مقاومت به حشره‌کش‌ها را بروز داده است. آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE) (EC 3.1.1.7) به‌طور وسیع در سیستم عصبی مهره‌داران و بی‌مهره‌گان وجود دارد و محل هدف دو گروه اصلی از حشره‌کش‌ها یعنی ترکیبات آلی فسفره و کاربامات‌هاست. یکی از مکانیسم‌های درگیر در مقاومت به آفت‌کش‌های فسفره و کاربامات، آنزیم استیل‌کولین‌استراز غیرحساس به این ترکیبات است. در این تحقیق احتمال جهش در آنزیم استیل‌کولین‌استراز غیرحساس به پیریمیکارب مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌های رمزگردان کامل ژن استیل‌کولین‌استراز MpAChE2 جمعیت مقاوم و دو جمعیت حساس به پیریمیکارب شناسایی و با هم مقایسه شدند. نتایج نشان داد که در MpAChE2 اسیدآمینهی فنیل‌آلانین جایگزین اسیدآمینهی سرین ۴۳۱ شده و این جابجایی در بخش اسیل آنزیم واقع شده است. بنابراین به نظر می‌رسد که MpAChE2 نقطه‌ی هدف حشره‌کش پیریمیکارب باشد و این جابجایی اسیدآمینه باعث شده اسیل پاکت باریک‌تر شده و پیریمیکارب نتواند در نقطه‌ی هدف جای گیرد. برای بررسی دقیق‌تر هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن جهش ایجادشده، از cDNA از حشرات انفرادی به طور تصادفی تهیه گردید. نتایج نشان داد که MpAChE2 حشرات انفرادی همگی در مکان جهش هتروزیگوت بودند.

واژگان کلیدی: *Myzus persicae*، مقاومت به حشره‌کش‌ها، استیل‌کولین‌استراز غیرحساس، جهش نقطه‌ای

Abstract

The peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer, is a globally distributed, economically important pest of a wide range of field crops and ornamentals. Due to extensive and repeated use of insecticide, this species has developed many different resistance mechanisms to insecticides. The enzyme

acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) (AChE) occurs widely in both vertebrate and invertebrate nervous systems and is the target of organophosphate (OP) and carbamate insecticides. One of resistance mechanisms to OP and carbamate insecticides is the insensitivity of AChE to these insecticides. In this study the possibility of mutation in insensitive AChE was surveyed. The complete coding sequences of acetylcholinesterases (MpAChE2) from susceptible and resistant populations were identified and sequences from resistant and two susceptible populations were compared. Consequently, one amino acid substitution (Ser431Phe) was detected within the resistant population at MpAChE2 gene. The Ser431Phe substitution is located in acyl pocket of acetylcholinesterase. Therefore, it seems that MpAChE2 is important as a target of pirimicarb. This substitution makes the acyl pocket narrower and pirimicarb can not have any access to this site. cDNA was obtained from individual aphids randomly and sequence of MpAChE2 indicated that MpAChE2 of the resistant population was heterozygous.

**Key words:** *Myzus persicae*, resistance to insecticide, insensitive acetylcholinesterase, point mutation

### مقدمه

مقاومت به حشره‌کش‌های فسفره و کاربامات یکی از چالش‌های مهم در کنترل آفات کشاورزی و بهداشتی است. این فرآیند اغلب با افزایش سم‌زدایی حشره‌کش‌ها توسط هیدرولازها (استرازاها)، اکسیدازهای میکروزومی یا گلوکوتایون اس- ترانسفراز ایجاد می‌شود. اما ممکن است مقاومت در نتیجه جهش در مکان هدف یعنی در بخش فعال استیل‌کولین‌استراز به وجود بیاید. این فرآیند، حساسیت آنزیم را به بازدارندگی حشره‌کش کاهش می‌دهد و استیل‌کولین‌استراز تغییر یافته (modified acetylcholinesterase) نامیده می‌شود. هنگامی که این فرآیند با ساز و کار متابولیکی همراه شود باعث مقاومت حشره به حشره‌کش در هر غلظتی می‌شود (Jewess, 2003). استیل‌کولین‌استراز تغییر یافته در تعدادی از گونه‌های بندپایان مثل کنه‌ی دونقطه‌ای (*Tetranychus urticae* Koach)، کنه‌ی دامی (*Boophilus microplus* (Canestrini))، زنجرک سبز برنج (*Nephotettix cincticeps* Uhler)، شته‌ی سبز هلو (*Myzus persicae* Sulzer)، شته‌ی جالیز (*Aphis gossypii* Glove)، عسلک پنبه (*Bemisia tabaci* (Gennadius))، مگس سرکه (*Drosophila melanogaster* Meigen)، مگس زیتون، چندین گونه از پشه‌ها، سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say)، پروانه‌ی پشت‌الماسی (*Plutella xylostella* L.)، کرم غوزه‌ی پنبه (*Helicoverpa armigera* Hübner) و مگس‌های Tephritidae شناسایی شده است (Wilson & Turner, 1992; Zhu et al., 1996; Tomita et al., 2000; Vontas et al., 2002; Weill et al., 2002; Nabeshima et al., 2003; Toda et al., 2004; Kakani & Mathiopoulos, 2008). استیل‌کولین‌استراز تغییر یافته به‌طور بالقوه باعث مقاومت به تمام حشره‌کش‌های فسفره و کاربامات می‌شود، اگرچه درجه‌ی غیرحساس شدن ایجاد شده به وسیله‌ی جهش، ممکن است بین ترکیبات مختلف به‌طور قابل ملاحظه‌ای

متفاوت باشد. در واقع، سویه‌ی خاصی از حشرات، ممکن است به بعضی حشره‌کش‌ها حساس اما نسبت به برخی ترکیبات مقاوم باشد. شکل‌های غیرحساسی از آنزیم استیل‌کولین‌استراز در گونه‌های مشابه یافت شده‌اند که میزان مقاومت آن‌ها به سموم فسفره و کاربامات متفاوت است. بعضی اشکال جهش در استیل‌کولین‌استراز باعث ایجاد استرازهای کارآتری در مقایسه با تیپ وحشی می‌شود. اگرچه، بیشتر جهش‌های ایجادشده در نزدیکی جایگاه فعال باعث می‌شود که آنزیم کارآیی کاتالیتیکی کمتری داشته باشد (Km بالا و Kcat پایین) (Jewess, 2003). چهار جهش مشخص در مگس خانگی شناسایی شده‌اند که شامل جایگزینی یک اسیدآمینیه‌ی بزرگ‌تر به جای اسیدآمینیه‌ی کوچک‌تر (والین با لوسین، گلايسين با آلانين و فینیل‌آلانین با تیروزین) است (Devonshire & Moores, 1984; Kozaki *et al.*, 2001, 2002; Nabeshima *et al.*, 2003). در مطالعات (Mutero *et al.* (1994)، پنج جهش نقطه‌ای در مگس سرکه که باعث کاهش حساسیت به حشره‌کش‌ها می‌شود، کشف شد. در چند سویه‌ی مقاوم مگس خانگی مخلوطی از جهش‌ها دیده شده است. جهش‌ها به صورت انفرادی سطوح پایینی از مقاومت را ایجاد می‌کند. اما هنگامی که چند تا از آن‌ها با هم ترکیب شوند سطوح بالایی از مقاومت ایجاد می‌شود. (Mutero *et al.* (1994) فرض نمودند که کاهش حساسیت استیل‌کولین‌استراز ناشی از ترکیبی از چندین جهش است که هر یک از این جهش‌ها مقاومت کمی را ایجاد می‌کند.

شته‌ی سبز هلو، یکی از آفات مهم محصولات گلخانه‌ای می‌باشد. خسارت عمده‌ی ایجادشده به وسیله‌ی این حشره از طریق انتقال بیماری‌های ویروسی است. کشاورزان ایرانی برای کنترل این آفت تنها متکی به کنترل شیمیایی هستند. حشره‌کش‌های پیریمیکارب و اکسی‌دمتون‌متیل (oxydemeton-methyl) برای کنترل این آفت توسط سازمان حفظ نباتات توصیه شده است (Mossalah Nejad *et al.*, 2002). پایین بودن آستانه‌ی اقتصادی به دلیل انتقال ویروس‌های گیاهی، توانایی تولید مثل بالا و طول دوره‌ی رشدی کوتاه در این آفت سبب شده است تا کشاورزان به صورت مکرر و گسترده از این حشره‌کش‌ها برای کنترل آن استفاده نمایند.

با تحقیقات قبلی مقاومت شته‌ی سبز هلو به پیریمیکارب و اکسی‌دمتون‌متیل به اثبات رسیده بود و آزمون‌های بیوشیمیایی نشان‌دهنده‌ی کاهش میل ترکیبی استیل‌کولین‌استراز

جمعیت کرج-R در مقایسه با جمعیت حساس (کرج-S) برای زیرنهشت‌های استیل تیوکلین آیوداید، بوتیریل تیوکلین آیوداید و پروپیونیل تیوکلین آیوداید بود. همچنین نتایج ما نشان داده بود که آنزیم استیل کولین استراز جمعیت کرج-R به اکسی‌دمتون متیل، پیریمیکارب، اتیل، متیل و پروپیل پارااکسان غیرحساس شده است. اما این آنزیم به کاربوفوران، پروپاکسور و MTMC حساس تر شده بود (Ghadamyari, et al., 2008a, 2008b). هدف از تحقیق حاضر بررسی علل تغییر میل ترکیبی آنزیم کولین استراز نوع دوم (MpAChE2) جمعیت مقاوم به سوبستراهای مختلف و غیرحساس شدن این آنزیم به بازدارنده‌ها در سطح ملکولی می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

محل و تاریخ جمع‌آوری جمعیت‌های مورد آزمون در جدول ۱ آمده است. آزمون‌های زیست‌سنجی و بیوشیمیایی قبلاً نشان داده بود که جمعیت کرج-R غیرحساس به پیریمیکارب و برخی از سموم فسفره می‌باشد (Ghadamyari, et al., 2008a, 2008b).

### مطالعات مولکولی

برای استخراج RNA کل از حشرات کامل بدون بال، هم به صورت انفرادی (۷ عدد شته‌ی مقاوم و ۷ عدد شته‌ی حساس که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند) و هم در دسته‌های پانزده‌تایی، از کیت Isogen (ساخت شرکت Nippon Gene)، کلروفورم، ایزوپروپانول و اتانول استفاده شد. بعد از استخراج RNA، اولین رشته‌ی cDNA با استفاده از SuperScript™ II RT (ساخت شرکت Invitrogen) سنتز گردید.

برای طراحی آغازگر از نرم‌افزار Primer 3 استفاده شد. مشخصات آغازگرهای استفاده‌شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (polymerase chain reaction (PCR)) در جدول ۲ آمده است. بعد از طراحی پرایمر و سنتز cDNA، واکنش PCR انجام شد. در این تحقیق از PCR آشیانه‌ای (nested PCR) استفاده گردید. برای بررسی اینکه PCR با موفقیت انجام شده، و همچنین خالص کردن محصول آن برای انجام مرحله‌ی دوم PCR، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. چون اندازه‌ی محصول‌های PCR در این آزمایش‌ها ۱۰۰۰ تا ۲۲۰۰ جفت باز بود، به همین دلیل ژل

آگارز ۱٪ مورد استفاده قرار گرفت. از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی اسیدهای نوکلئیک در ژل‌های آگارز استفاده گردید. خالص‌سازی محصول PCR از ژل برای انجام واکنش مربوط به تعیین توالی نوکلئوتیدها با استفاده از کیت Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (ساخت شرکت Promega) صورت گرفت.

در این مطالعه، ژن استیل‌کولین‌استراز نوع دوم (MpAChE2) جمعیت‌های کرج-R، کرج و رشت در دسته‌های پانزده‌تایی و نمونه‌های انفرادی تعیین توالی شدند.

**جدول ۱.** محل، فصل و سال جمع‌آوری، و گیاهان میزبان جمعیت‌های شته‌ی سبز هلو.

**Table 1.** Area, season and year of collecting, and hosts of the peach-potato aphid.

Population	Locality	Date	Host
Rasht	Tobacco Research Center, Rasht, Iran	Summer 2004	Tobacco
Karaj-S	The Research Greenhouse, Department of Horticulture, University of Tehran, Karaj, Iran	Spring 2005	Pepper
Karaj-R	The Virology Greenhouse, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran	Autumn 2004	Sugar beet

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

کروماتوگرام به دست‌آمده از دستگاه توالی‌یاب با استفاده از نرم‌افزار Chromas به اسیدآمینه‌ی مربوطه ترجمه شد. بازها و اسیدهای آمینه با استفاده از نرم‌افزارهای Gen doc و Clustal W تنظیم (alignment) شدند.

**جدول ۲.** آغازگرهای مورد استفاده‌شده برای تکثیر استیل‌کولین‌استراز نوع دوم (MpAChE2).

**Table 2.** Primers used for amplifying MpAChE2 gene.

Primer	Primer length	Primer sequence
MP <sub>2</sub> S <sub>1</sub> (Forward)	19	ATTAGCAGTGGTTGGCGAA
MP <sub>2</sub> S <sub>2</sub> (Forward)	20	CTGATTGGTTCAGCCCAAAT
MP <sub>2</sub> S <sub>3</sub> (Forward)	20	ATTTGGGCTGAACCAATCAG
MP <sub>2</sub> S <sub>4</sub> (Forward)	20	AATTAGGCCAGTGGTTGGTC
MP <sub>2</sub> AS <sub>1</sub> (Reverse)	23	TAATACGACTCACTATAGGGAGA
MP <sub>2</sub> AS <sub>2</sub> (Reverse)	20	GTAAAATCCTCCCCGAAAA
MP <sub>2</sub> AS <sub>3</sub> (Reverse)	20	ATTTGGGCTGAACCAATCAG
MP <sub>2</sub> AS <sub>4</sub> (Reverse)	20	TCAAAAACGGCAGTTGTGCATC

## نتایج و بحث

در این تحقیق از PCR آشیانه‌ای استفاده گردید و مشخصات آغازگرهای مرحله‌ی اول و مرحله‌ی دوم همراه با اندازه‌ی محصول PCR در جدول‌های ۳ و ۴ آمده است. مقایسه‌ی بازهای استیل‌کولین‌استراز نوع دوم (MpAChE2) با داده‌های موجود در بانک ژن با شماره‌ی دسترسی AY147797 نشان داد که بازهای تعیین توالی شده در این تحقیق با شماره‌های ۱۵۴۵، ۱۸۷۶، ۱۸۷۹، ۱۸۸۱ و ۱۸۸۳ با بازهای موجود در بانک ژن به شماره‌های ۱۵۹۹، ۱۸۸۶، ۱۸۸۹، ۱۹۹۱ و ۱۹۹۳ تفاوت دارند.

**جدول ۳.** اندازه‌ی محصول PCR، و آغازگرهای مورد استفاده در مرحله‌ی اول PCR آشیانه‌ای.

**Table 3.** Size of PCR product, and used primers in the first step of nested PCR.

Primers	PCR product size	Population
MP <sub>2</sub> S <sub>4</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>4</sub>	2109 bp	Karaj-R
MP <sub>2</sub> S <sub>4</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>4</sub>	2109 bp	Rasht
MP <sub>2</sub> S <sub>4</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>4</sub>	2109 bp	Karaj-S
MP <sub>2</sub> S <sub>1</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>1</sub>	2100 bp	Karaj-R
MP <sub>2</sub> S <sub>1</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>1</sub>	2100 bp	Rasht
MP <sub>2</sub> S <sub>1</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>1</sub>	2100 bp	Karaj-S

**جدول ۴.** اندازه‌ی محصول PCR، و آغازگرهای مورد استفاده در مرحله‌ی دوم PCR آشیانه‌ای.

**Table 4.** Size of PCR product, and used primers in the second step of nested PCR.

Primers	PCR product size	Population
MP <sub>2</sub> S <sub>3</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>3</sub>	801 bp	Karaj-R
MP <sub>2</sub> S <sub>3</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>3</sub>	801 bp	Rasht
MP <sub>2</sub> S <sub>3</sub> and MP <sub>2</sub> AS <sub>3</sub>	801 bp	Karaj-S

شکاف پپتید نشانه در MpAChE2 بین Gly17 و Leu18 قرار دارد. بعد از شکاف پپتید نشانه، پیوندهای دی‌سولفیدی درون‌ملکولی (intramolecular disulphide bounds) (Cys169، Cys196، Cys355، Cys368، Cys503 و Cys625)، سه‌تایی کاتالیزگر (Ser301، Glu427 و His541)، زیرجایگاه آنیونیک (Trp186)، آسیل پاکت (Trp334، Phe392 و Ser431) و حفره‌ی اکسی‌آنیون (Gly220، Gly221 و Ala302) قرار دارد (شکل ۱)، که با نتایج Nabeshima *et al.* (2003) هم‌خوانی دارد. جهش در بازهای ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ nonsynonymous می‌باشد (tca به ttt)، که باعث می‌شود در

MpAChE2 جمعیت کرج-R، اسیدآمینهای فنیل‌آلانین جایگزین سرین گردد. همچنین، سوبه‌های ژاپنی، اروپایی و چینی شته‌ی جالیز مقاوم به پیریمیکارب دارای جابجایی اسیدآمینهای فنیل‌آلانین (Phe431) در Ace1 هستند، درحالی‌که شته‌ی جالیز حساس به پیریمیکارب (سوبه‌ی ژاپن) دارای اسیدآمینهای سرین (Ser431) در این موقعیت می‌باشد (Toda et al., 2004).

نتایج نشان داد که MpAChE2 جمعیت کرج-R هتروزیگوت بوده و بازهای ۱۳۸۹، ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ به ترتیب tca می‌باشند. این سه باز، کدکننده‌ی اسیدآمینهای سرین هستند. همچنین، این مکان بازهای ۱۳۸۹، ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ به ترتیب ttt می‌باشند که کدکننده‌ی اسیدآمینهای فنیل‌آلانین است؛ درحالی‌که MpAChE2 جمعیت‌های رشت و کرج-S هموزیگوت هستند و بازهای ۱۳۸۹، ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ به ترتیب tca می‌باشند (کدکننده‌ی اسیدآمینهای سرین) (شکل ۱). بنابراین، جمعیت کرج-R دو آلل متفاوت در مکان ژن (gene locus) دارد که این دو آلل به‌طور هم‌زمان بیان می‌شوند (شکل ۳).

نتایج ما نشان می‌دهد که ممکن است MpAChE2 در شته‌ی سبز هلو جایگاه هدف حشره‌کش‌های کارباماتی و فسفره باشد. جایگزینی اسیدآمینهای فنیل‌آلانین به جای سرین در جمعیت مقاوم به پیریمیکارب (کرج-R) در آسیل پاکت آنزیم MpAChE2 واقع شده است. آسیل پاکت جهت‌گیری لیگاند در مرکز فعال را با استفاده از پیوندهای هیدروفوبیک جلب‌کننده‌ی لیگاند در طی فرآیند هیدرولیز تعیین می‌کند. ساختمان سه بعدی استیل‌کولین‌استراز با استفاده از کریستالوگرافی پرتو ایکس نشان داده است که آسیل پاکت به وسیله‌ی زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینهای آروماتیک هیدروفوبیک احاطه شده است (Millard et al., 1999; Viragh et al., 2000; Massiah et al., 2001). هنگامی که جابجایی تعدادی از اسیدهای آمینه، فضا و هیدروفوب بودن را برهم می‌زند، خواص آنزیمی استیل‌کولین‌استراز در قابلیت چسبیدن و ویژه (ligand specificity) تغییر می‌یابد. تصور می‌شود، جایگزینی فنیل‌آلانین به جای سرین باعث می‌شود که آسیل پاکت هیدروفوب‌تر و باریک‌تر گردد (شکل ۲) و در نتیجه دسترسی گروه الکوکیل زیرنهشت‌ها و بازدارنده‌ها به این مکان را محدود سازد (Nabeshima et al., 2003). زنجیره‌ی جانبی متصل به کربن  $\alpha$  در فنیل‌آلانین از گروه آروماتیک

GAATGATTTAAATTAGGCCAGTGGTTGGTCGAACATTTACCACTGAT	47
TTGTAGTTTGATGATCGAATTCACCTGGGAATTTGAAAATCTGCTTT	94
AAAAATGGACCAGTGGTTGCTGTGGTTTAGCTACTTAGTAGCTTCTA	141
M D Q W L L W F S Y L V A S T	15
↓	
CTTATGGACTTTCATTGCGCCAGCCAGGCACCAAAGCGTTGGGAC	187
Y G L S L R H A R H Q S V G T	30
ACCAACTGCCGAAGAAATACTGGAACACAGATTCTAATTGAAGAC	233
P T A E E I L E P Q I L I E D	45
ACCGATCATGTATTACAGACAACGAGCGTCAGATATGTTGCCCAAG	279
T D H V F R Q R A L D M F A Q E	61
AGCCAGAATACACAGAGAAGCGAAACCTTAATCATAGACGGAGGT	324
P E Y T E K R R N L N H R R R S	76
CCGAATTTAGTGAAACCAGGATAATGATTTTTCGAATCTTCTGGGGA	370
E F S G N Q D N D F E S S G E	91
GACATACAGTGCCTATAAATCGGATGATCCGTTGGTAATTCACACG	416
T Y S A Y K S D D P L V I H T	106
AACAAGGTAAGATCAGAGGAATCACACAGGCAGCGTCGACTGGG	461
N K G K I R G I T Q A A S T G	121
AAGTTAGTTGATGCATGGCTAGGAATACCTACGCAAAAAACCAA	507
K L V D A W L G I P Y A K K P I	137
TAGGTGATCTTAGGTTTAGGCACCCTCGCCAATTGACCGTTGGGAC	554
G D L R F R H P R P I D R W D	152
AATACAAACCAGAGACCATTCTTAACCTGCACTACTCCACCAAATA	600
N T N P E T I L N C T T P P N T	168
CATGTGTTCAAATATTCGACACGCTTTTTGGTGATTTTCCCGGTGCT	647
Ⓢ V Q I F D T L F G D F P G A	183

شکل ۱. نوکلئوتید و توالی‌های اسیدآمینه‌ی MpAChE2 جمعیت‌های شته‌ی سبز هلوی مقاوم (کرج-R) و حساس (رشت و کرج-S) به حشره‌کش. شمارش توالی‌های اسیدآمینه از اولین متیونین شروع می‌شود. شکاف پپتید نشانه، سیستم‌های تشکیل‌دهنده‌ی پیوندهای دی‌سولفیدی درون‌مولکولی، سه‌تایی کاتالیزگر، آسیل پاکت، زیرجایگاه آنیونیک، شکاف اکسی‌آنیون و محل جهش در سویه‌ی کرج-R به ترتیب با فلش، دایره، مربع، کروشه، مثلث، □ و ستاره مشخص شده است.

**Fig 1.** The nucleotide and deduced amino acid sequences of MpAChE2 from resistant (Karaj-R) and susceptible (Karaj-S and Rasht) populations of the peach-potato aphid to insecticides. The amino acids are numbered from the first methionine. Cleavage sites of signal peptides are indicated by arrows. The cysteines that form intramolecular disulphide bonds are encircled. The catalytic triads are boxed. Acyl pocket residues located in crochet. Anionic subsites are indicated by triangles. The oxianion holes located at □. The mutation in Karaj-R is indicated by an asterisk.



ACAATGTTGGAATCCGAATTCCTCCGGTATCTGAAGATTGCCTCTACAT	694
T M $\triangle$ W N P N S P V S E D $\odot$ L Y I	199
TAACGTAGTAGTGCCAAAGCCTAGACCACAAAACGCAGCAGTGATG	740
N V V V P K P R P Q N A A V M	214
GTATGGATTTTCGGAGGAGGATTTTACTCCGGGTCTGCTACTTTGGA	787
V W I F G $\square$ $\square$ F Y S G S A T L D	230
TATTTACGACCCTAAAGTACTCGTATCGGAAGAAAATGTGATTTTGG	834
I Y D P K V L V S E E N V I L V	246
TATCCATGCAGTACAGAGTTGCATCTTTAGGCTTTTTATACTTTGAC	881
S M Q Y R V A S L G F L Y F D	261
ACTGAAGATGTTCCGGGAAACGCTGGACTTTTTGATCAGCTAATGGC	928
T E D V P G N A G L F D Q L M A	277
TCTACAGTGGGTACACGAAAACATTAATAATTTGGCGGCAACCCA	974
L Q W V H E N I K L F G G N P	292
AACAACGTGACACTTTTCGGTGAGTACGCCGGCGCCGTTTCAGTTTC	1021
N N V T L F G E $\square$ $\square$ G A V S V S	308
ACTGCACTTACTGTCTCCACTGAGTAGAAACCTTTTTAATCAAGCC	1067
L H L L S P L S R N L F N Q A	323
ATCATGGAATCAGGATCCTCAACAGCACCTTGGGCAATTTTATCAA	1113
I M E S G S S T A P $\{w\}$ A I L S R	339
GAGAAGAGAGTTATAGTAGAGGACTTAGGCTGGCAAGGCAATGGG	1159
E E S Y S R G L R L A R A M G	354
TTGTCCAGATGACAGAAACGAAATACATAAAACGGTCGAGTGCTTA	1205
$\odot$ P D D R N E I H K T V E $\odot$ L	369
AGGAAGGCGAATAGTTCAACAATGGTCGAGAAAGAATGGGACCAC	1250
R K A N S S T M V E K E W D H	384
GTGGCTATATGTTTTTCCCGTTTGTCCCGGTGGTGGATGGCGCTTTT	1298
V A I C F F P $\{F\}$ V P V V D G A F	400
CTTGACGATTATCCTCAAAAATCGCTGTCAACAAACAATTTTAAAA	1344
L D D Y P Q K S L S T N N F K K	416

شکل ۱. ادامه.

Fig 1. Continued.

AAACGAATATACTCATGGGTAGTAACTCCGAAGAGGGTTACTATTCA	1391
T N I L M G S N S E <b>E</b> G Y Y {S}	431
	TT
	F
ATATTTTATTATTGACGGAGCTTTTCAAAAAGGAGGAAAACGTG	1436
I F Y Y L T E L F K K E E N V	446
GTGGTGTCTCGTGAAAAATTTGTTAAAGCTATTGGACAACCTTAATCC	1483
V V S R E N F V K A I G Q L N P	462
GAACGCAGATGCGGCGGTTAAATCGGCTATAGAGTTTGAATACACT	1529
N A D A A V K S A I E F E Y T	477
GATTGGTTCAGCCAAATGACCCAGAAAAAATCGAAATGCCTCTGG	1575
D W F S P N D P E K N R N A L D	493
ACAAAATGTTTCGGCGACTATCAGTTTACATGCAACGTCAATGAAT	1620
K M V G D Y Q F T <b>C</b> N V N E F	508
TCGCACATAAATATGCACTTACTGGAAACAACGTGTACATGTATTAT	1697
A H K Y A L T G N N V Y M Y Y	523
TTTAAACATCGTTCTTTTAAACAATCCATGGCCGAAATGGACAGGGG	1713
F K H R S L N N P W P K W T G V	539
TGATGCACGGTGTATGAAATCAGTTATGTATTTGGAGATCCTTTAAAT	1760
M <b>H</b> G D E I S Y V F G D P L N	554
CCAAATAAACGCTACGAAATCGAAGAAATCGAACTTAGCAAGAAA	1805
P N K R Y E I E E I E L S K K	569
ATGATGAGATACTGGACCAATTTTGCAAAAACAGGAAATCCAAGCA	1851
M M R Y W T N F A K T G N P S K	585
AAACATTGAAGGGTCTTGGGTCACGCCAAGTGGCCCGTACACAC	1897
T F E G S W V T P K W P V H T	600
GGCGTATGAAAAGAGTTTCTAACATTAGATACAAATAACACTTCT	1943
A Y G K E F L T L D T N N T S	615

شکل ۱. ادامه.

Fig 1. Continued.

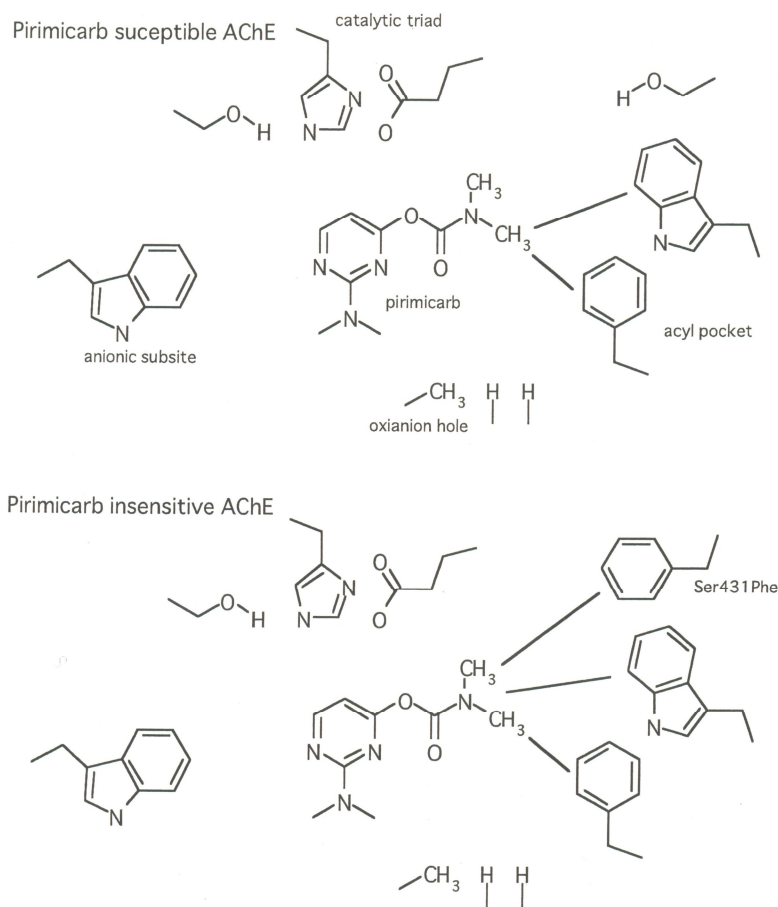
ATCGCGTTGGGCCAAGACTAGAACAAATGTGCTTTTGGAAAAACT	1989
I G V G P R L E Q <b>Q</b> A F W K N Y	631
ACGTTCTGTATCTTATGGCCATTTCAAAGAGTATGAAGTCTGACAAA	2036
V P D L M A I S K S M K S D K	646
AACTGTACAACCATAAGTGGAGGGACCAAAACTTACATGATTGAGT	2082
N C T T I S G G T K T Y M I E L	662
TATCGCTTTGGACAATTGTGATGACAACCTGCCG	2116
S L W T I V M T T A	672

شکل ۱. ادامه.

Fig 1. Continued.

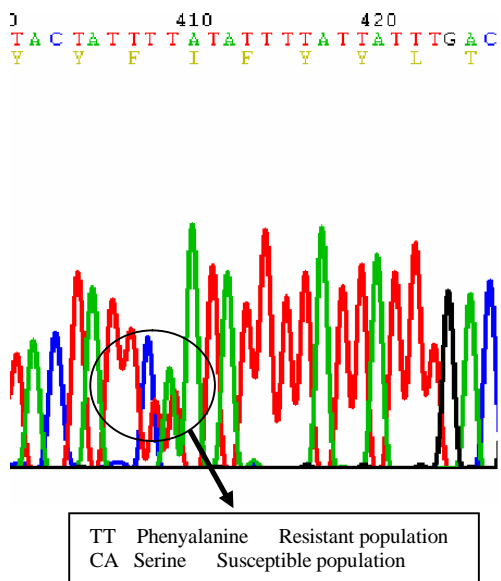
می‌باشد، درحالی‌که زنجیره‌ی جانبی متصل به کربن  $\alpha$  در سرین  $\text{CH}_3\text{OH}$  است. جایگزینی زنجیره‌ی جانبی بزرگ فنیل‌آلانین به جای  $\text{CH}_2\text{OH}$  سرین باعث می‌گردد که اتصال پیریمیکارب و برخی از سموم فسفره به این مکان محدود شود. این تغییرات در مرکز کاتالیتیکی آنزیم منجر به پاسخ‌های متفاوت استیل‌کولین‌استراز کرج-R به زیرنهشت‌های مختلف و بازدارنده‌ها می‌شود. چنین تغییر ساختمانی در استیل‌کولین‌استراز سوسک کلرادوی مقاوم به ترکیبات آلی فسفره به اثبات رسیده است (Zhu *et al.*, 1996). این جهش باعث غیرحساس شدن آنزیم به پیریمیکارب، اکسی‌دی‌متون‌متیل، مشتقات پارااکسان، مونوکروتوفوس و فسفامیدون، و حساس‌تر شدن آن به کاربوفوران، پروپاکسور و MTMC می‌شود (Ghadamyari *et al.*, 2008b). همچنین، تحقیقات قبلی ما روی جمعیت مقاوم و حساس نشان داده بود که هرچه اندازه‌ی ملکولی ترکیب بزرگ‌تر باشد،  $I_{50}$  آن بزرگ‌تر خواهد بود. علاوه بر این، ترکیبات حجیم‌تر اثر کمتری روی استیل‌کولین‌استراز جمعیت کرج-R داشتند؛ به‌طوری‌که افزودن یک گروه متیل به ساختمان ترکیب باعث شده بود تا نسبت مقاومت از  $2/76$  برابر به  $6/1$  برابر تغییر پیدا کند. افزودن یک گروه اتیل به متیل‌پارا اکسان نیز نسبت مقاومت را از  $2/76$  برابر به  $38/3$  برابر تغییر داد (Ghadamyari *et al.*, 2008a). بنابراین، به نظر می‌رسد که این جهش منجر به حذف فضایی جایگاه فعال شده و از دسترسی بازدارنده‌های بزرگ‌تر به جایگاه فعال جلوگیری می‌نماید، درحالی‌که دسترسی مولکول زیرنهشت کوچک‌تر را حفظ می‌کند. همچنین، در محلی که جهش نقطه‌ای در MpAChE2 شته‌ی سبز هلو صورت گرفته است (یعنی

کنه‌ها و بقیه‌ی حشرات (غیر از شته‌ی سبز هلوی مقاوم و شته‌ی جالیز مقاوم به پیریمیکارب) در این مکان دارای اسیدهای آمینه‌ی فنیل‌آلانین و تریپتوفان هستند که این اسیدهای آمینه دارای گروه R آروماتیک می‌باشند. این جهش ممکن است توضیح دهد که چرا



شکل ۲. مدل شماتیک برهمکنش بین پیریمیکارب و زیرجایگاه‌ها در شکاف آروماتیک استیل‌کولین‌استراز جمعیت‌های حساس (کرج-S و رشت) و مقاوم (کرج-R). اصل.

Fig 2. Schematic model of interaction between pirimicarb and subsites in aromatic gorge of susceptible (Karaj-S and Rasht) and insensitive (Karaj-R) acetylcholinesterase. Original.



شکل ۳. کروماتوگرام توالی نوکلئوتیدی مکان جهش استیل‌کولین‌استراز نوع دوم (MpACHE2) جمعیت شته‌ی سبز هلوی مقاوم و حساس به حشره‌کش.

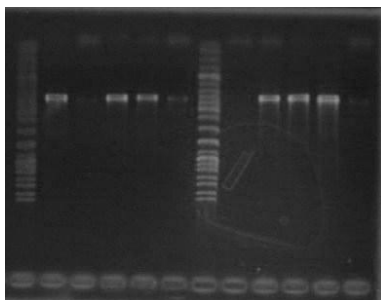
Fig. 3. Chromatogram of nucleotide sequences of mutation site in MpACHE2 of resistant and susceptible populations of the peach-potato aphid to insecticides.

پیریمیکارب و دیگر دی‌متیل‌کاربامات‌ها سمیت انتخابی نسبت به شته دارند، زیرا حشرات دیگر و مهره‌داران اغلب در این موقعیت دارای فنیل‌آلانین هستند.

جایگزینی سرین به جای Phe431 در MpACHE2 باعث از دست دادن یک حلقه‌ی آروماتیک می‌گردد و احتمالاً برهمکنش  $\pi$ -cation بین آسپیل پاکت و His541 کاتالیتیک را برهم می‌زند، و باعث تغییر فضایی زنجیره‌ی جانبی His541 می‌گردد که ligand specificity را تغییر می‌دهد. همچنین، زمینه‌ی الکترواستاتیک آسپیل پاکت برای ligand specificity مهم می‌باشد. آسپیل پاکت در انتهای شکاف آروماتیک مجاور مرکز فعال قرار دارد (Nabeshima *et al.*, 2003). کریستالوگرافی پرتو ایکس نشان داد هنگامی که اسیدآمینه‌ی خطی در اسپیل پاکت جایگزین

Phe334 شود، جهت‌گیری His443 در استیل‌کولین‌استراز تیپ وحشی و نو ترکیب آن متفاوت خواهد بود (Fournier *et al.*, 1989; Kaplan *et al.*, 2001).

Toda *et al.* (2004) نشان دادند که در شته‌ی جالیز (سویه‌ی H16) جابجایی Ser431Phe هتروزیگوت، ولی در سویه‌ی مقاوم GSM، این جابجایی هموزیگوت بود. به عبارت دیگر، تنها اسیدآمینوی فنیل‌آلانین در این موقعیت وجود دارد. به همین دلیل برای بررسی دقیق هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن cDNA، RNA از حشرات انفرادی استخراج گردید و ژن MpACHE2 با استفاده از آغازگرهای MP<sub>2</sub>S<sub>3</sub> و MP<sub>2</sub>AS<sub>3</sub> تکثیر شد (شکل ۴). نتایج نشان داد که حشرات انفرادی همگی هتروزیگوت بودند. بنابراین، بر اساس نتایج تحقیق حاضر، جهشی که باعث غیرحساس شدن استیل‌کولین‌استراز به حشره‌کش پیریمیکارب و برخی سموم فسفره می‌شود، هتروزیگوت می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۴. ژل الکتروفورز محصول PCR ژن MpACHE2 در هفت عدد شته‌های انفرادی جمعیت مقاوم.

**Fig. 4.** Gel electrophoresis of PCR product MpACHE2 gene in seven individual of resistant population.

### سپاس‌گزاری

این تحقیق با همکاری دانشگاه تسوکوبای ژاپن انجام شده است که بدین‌وسیله سپاس‌گزاری می‌شود.

## منابع

- Devonshire, A. L. & Moores, G. D.** (1984) Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house fly (*Musca domestica*). *Pesticide Biochemistry Physiology* 21, 336-340.
- Fournier, D., Karch, F., Bride, J. M., Hall L. M. C., Berge J. B. & Spierer, P.** (1989) *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene structure, evolution and mutation. *Journal of Molecular Biology* 210, 15-22.
- Ghadamyari, M., Talebi, K., Mizuno, H. & Kono, Y.** (2008a) Oxydemeton-methyl resistance, mechanisms, and associated fitness cost in green peach aphids (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 101(4), 1432-1438.
- Ghadamyari, M., Mizuno, H., Oh, S., Talebi, Kh. & Kono, Y.** (2008b) Studies on pirimicarb resistance mechanisms in Iranian populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Applied Entomology and Zoology* 43 (1), 149-157.
- Jewess, P.** (2003) Acetylcholinesterase. pp. 8-15 in Plimer, J. R., Gammon, D. W. & Ragsdale, N. N. (Eds). *Encyclopedia of agrochemicals*. 1638 pp. John Wiley and Sons Inc.
- Kakani, E. G. & Mathiopoulos, K. D.** (2008). Organophosphosphate resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of Tephritidae. *Journal of Applied Entomology* 132(9-10), 762-771.
- Kaplan, D., Ordentlich, A., Barak, D., Ariel, N., Kroman, C., Velan, B. & Shafferman, A.** (2001) Dose "butyrylization" of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active center gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase? *Biochemistry* 40(25), 7433-7445.
- Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T. & Kono, Y.** (2001) Fenitroxon insensitive acetylcholinesterase of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 991-997.
- Kozaki, T., Tomita, T., Taniani, K., Yamakawa, M. & Kono, Y.** (2002) Expression of two acetylcholinesterase gene from organophosphate sensitive and insensitive houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) using a baculovirus insect cell system. *Applied Entomology and Zoology* 37, 213-218.
- Massiah, M. A., Viragh, C., Reddy, P. M., Kovach, I. M., Johnson, J., Rosenberry, T. L. & Mildvan, A. S.** (2001) Short, strong hydrogen bonds at the active site of human acetylcholinesterase: proton NMR studies. *Biochemistry* 40, 5682-5690.

- Millard, C. B., Kryger, G., Ordentlich, A., Greenblatt, H. M., Harel, M., Raves, M. L., Segall, Y., Barak, D., Shafferman, A., Silman, I. & Sussman, J. L.** (1999) Crystal structure of aged phosphorylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochemistry* 38, 7032-7039.
- Mossalah Nejad, H., Nowroozian, M. & Mohammad Beighi, A.** (2002). *List of pests, plant diseases, weeds and recommended pesticides*. 1<sup>st</sup> ed. 112 pp. Nashre Amozeshe Keshavarzi Press.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J. M. & Fournier, D.** (1994) Resistance associated point mutation in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5922- 5926.
- Nabeshima, T., Kozaki, T., Tomita, T. & Kono, Y.** (2003). An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 307, 15-22.
- Toda, S., Komazaki, S., Tomita, T. & Kono, Y.** (2004) Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase gene associated with carbamate and organophosphate resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 13(5), 549-553.
- Tomita, T., Hidoh, O. & Kono, Y.** (2000). Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 325-333.
- Viragh, C., Harris, T. K., Reddy, P. M., Massiah, M. A., Mildvan, A. S. & Kovach, I. M.** (2000) NMR evidence for a short, strong hydrogen bond at the active site of a cholinesterase. *Biochemistry* 39, 16200-16205.
- Vontas, J. G., Hejazi, M. J., Hawkes, N. J., Comidis, N., Loukas, M. & Hemingway, J.** (2002) Resistance associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* 11, 329-336.
- Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M. P., Pasteur, N., & Raymond, M.** (2002) A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 269, 2007-2016.



- Wilson, T. G. & Turner, C.** (1992) Molecular analysis of Methoprene-tolerant, a gene in *Drosophila* involved in resistance to juvenile hormone analog insect growth regulators. pp. 99-112 in Mullin, C. A. & Scott, J. G. (Eds). *Molecular mechanisms of insecticide resistance: diversity among insects*. 322 pp. Oxford University Press.
- Zhu, K. Y., Lee, S. H. & Clark, J. M.** (1996) A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 55, 100-108.