تحقیقات آفات گیاهی
۱۳۹۷ -۸ (۳): ۳۱-۴۳

افزایش فعالیت استرازها و گلوتاتیون-اس-ترانسفرازها در جمعیت‌های مقاوم کنه قرمز مرکبات (Acari: Tetranychidae) *Panonychus citri* به آبامکتین

الهه شفیعی علویجه[۱]، محمد قدمیاری*[۱] و جهانگیر خواجه علی[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، ۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۹)

چکیده

کنه قرمز مرکبات *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) یکی از آفات مهم مرکبات در مناطق مرکبات‌خیز جهان و استان‌های شمالی ایران است. به کارگیری آفت‌کش‌های شیمیایی متعدد علیه آفات مرکبات موجب از بین رفتن دشمنان طبیعی، بروز پدیده‌ی مقاومت و طغیان مجدد این آفت شده است. در این تحقیق سازوکارهای مقاومت کنه قرمز مرکبات به آبامکتین در چهار جمعیت نمونه‌برداری شده مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین میزان LC_{50} از روش برج پاشش استفاده شد که در این روش میزان مقاومت در جمعیت گرگان ۶/۴۸ برابر، رامسر ۶/۱۹ برابر و ساری ۵/۱۱ برابر بیشتر از جمعیت حساس تعیین شد. سنجش فعالیت استرازی با استفاده از سوبسترای آلفا-نفتیل استات و بتا-نفتیل استات در جمعیت مقاوم گرگان به ترتیب ۷/۹۶۰و ۳/۵۷۵ برابر بیشتر از جمعیت حساس بود. برآورد فراسنجه‌های سینتیکی و میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز نیز تفاوت معنی‌داری بین چهار جمعیت نشان داد به طوری که میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت مقاوم ۲/۷۹ برابر جمعیت حساس بود و مقادیر *Km* و *Vmax* با استفاده از سوبسترای ۱-کلرو-۲و۴-دی‌نیتروبنزن (CDNB) به‌ترتیب ۱۶/۲۱و ۵/۳۳ برابر بیشتر از جمعیت حساس تعیین شد. با توجه به روند افزایشی مقاومت، نتایج این تحقیق بیانگر نقش آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون-اس-ترانسفرازی در مقاومت به کنه‌کش آبامکتین هستند.

واژه‌های کلیدی: کنه قرمز مرکبات، فعالیت استرازی، گلوتاتیون-اس-ترانسفراز، مقاوم

*نویسنده مسئول: mghadamyari@gmail.com

مقدمه

یکی از گونه‌های مهم زیر رده‌ی Acari، کنه‌ی قرمز مرکبات، *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) است (Gotoh *et al*., 2003; Pan *et al*., 2006; Vassiliou and Papadoulis, 2009) که یکی از آفات مهم مرکبات در ایران و نقاط مختلف جهان محسوب می شود (Arbabi *et al*., 1999). این گونه دامنه‌ی میزبانی گسترده‌ای داشته که می‌توان به بیش از ۱۱۰ گونه‌ی میزبان گیاهی اشاره کرد که البته اغلب آن‌ها مرکبات هستند (Migeon and Dorkeld, 2010). کنه قرمز مرکبات در اثر تغذیه از شیره‌ی برگ، میوه و شاخه‌های سبز به ارقام مختلف مرکبات خسارت رسانده و شدت آن روی برگ‌ها به مراتب بیشتر از خسارت روی میوه‌ها است. مانند سایر کنه‌های گیاهی، این آفت در درجه‌ی اول در سطح رویی برگ‌های بالغ (میوه و شاخه‌های جوان) تغذیه کرده و باعث ایجاد لکه‌های سفید قابل مشاهده، تخریب مزوفیل و در نهایت ریزش برگ‌ها می‌شود (Jones and Parrella, 1984). خسارت بالای این آفت باعث شده تا امروزه از کنه‌کش‌های متعددی متعلق به گروه‌های شیمیایی مختلف برای کنترل این آفت استفاده شود. به کارگیری آفت‌کش‌های شیمیایی دارای معایب متعددی است که از جمله می‌توان به از بین رفتن دشمنان طبیعی، بروز پدیده‌ی مقاومت و طغیان مجدد آفت اشاره نمود. در شمال ایران از آفت‌کش‌های رایج برای کنترل آفات مرکبات از جمله کلروپایریفوس[۱]، اتیون[۲]، دیازینون[۳]، آبامکتین[۴]، ایمیداکلوپرید[۵]، فن پیروکسیمیت[۶]، بروموپروپیلات[۷] استفاده می‌شود (Arbabi, 2005)؛ که این باعث شده تا تعدادی از جمعیت این آفات با کمک سازوکار[۸]های مقاومت، به تعدادی از آفت‌کش‌های مورد استفاده مقاوم شوند. در بین سازوکارهای مقاومت به آفت-کش‌ها، به سه گروه آنزیمی مهم درگیر شامل آنزیم‌های کربوکسیل استراز[۹] (CESs) (Zhang *et al*., 2013)، گلوتاتیون-اس-ترانسفراز[۱۰] (GSTs) (Niu *et al*., 2011) و مونواکسیژنازهای سیتوکروم P450[۱۱] (Ding *et al*., 2013) می‌توان اشاره کرد. درختان مرکبات حاوی ترکیبات سمی از جمله ترپنوئیدها[۱۲] هستند که کنه قرمز مرکبات برای تغذیه روی این درختان نیازمند یک سیستم سم‌زدایی پیشرفته متشکل از تعدادی از آنزیم‌های P450s یا سایر آنزیم‌های سم‌زدا است؛ به همین دلیل در بررسی انجام شده با استفاده از غلظت‌های مختلف پیپرونیل بوتوکساید[۱۳] (PBO) روی لاروها و بالغ‌های پرورش یافته *P. citri* روی نهال‌های مرکبات در مقایسه با گلابی ژاپنی (فاقد ترکیبات سمی گفته شده)، با غیرفعال کردن سیستم آنزیمی اکسیدازی، مرگ و میر بالایی از کنه‌های پرورش یافته روی مرکبات گزارش شد که این بر تکامل سیستم سم‌زدایی P450 و دیگر آنزیم‌های سم‌زدا در کنه قرمز مرکبات دلالت دارد (Takeyama *et al*., 2006).

تکامل مقاومت با ویژگی‌های ژنتیکی موجودات از جمله تعداد، غالبیت و فراوانی ژن‌های مقاومت، میزان تولیدمثل، پویایی جمعیت و ویژگی‌های پراکنش آن‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Anonymous, 1986). کنه قرمز مرکبات با ویژگی‌های ژنتیکی از قبیل داشتن توانایی تولید مثل بالا، تعداد نسل زیاد در سال و همچنین سمپاشی‌های مکرر ممکن است به تعدادی از کنه‌کش‌های رایج مقاوم شده باشد. با توجه به این که دانستن سازوکارهای مقاومت کمک شایانی به مدیریت آفات و توصیه کنه‌کش‌های جدید خواهد کرد؛ در عین حال،

[1]. Chlorpyrifos
[2]. Ethion
[3]. Diazinon
[4]. Abamectin
[5]. Imidacloprid
[6]. Fenpyroximate
[7]. Bromopropylate

[8]. Mechanism
[9]. Carboxyl esterase
[10]. Glutathione-S-Transferase
[11]. Cytochrome P450 monooxygenases
[12]. Terpenoids
[13]. Piperonyl Butoxide

به دلیل هزینه‌های بالا در ارتباط با تحقیق، توسعه و ثبت حشره‌کش/کنه‌کش‌های جدیدی، تعداد آفت‌کش‌های جدیدی که سالانه وارد بازار می‌شوند نیز بسیار کم است (Metcalf, 1980). بنابراین تعیین سازوکارهای مقاومت کنه قرمز مرکبات به کنه‌کش‌های رایج اطلاعات مفیدی برای کنترل این آفت فراهم خواهد کرد. آورمکتین‌ها[1] (آبامکتین) متعلق به گروه لاکتون‌های ماکروسیلیک (گروه شش IRAC[2]) هستند، که از میکروارگانیسم‌های خاکزی *Streptomyces avermitilis* به‌دست آمده‌اند و از لحاظ شیمیایی دارای ۱۶ حلقه‌ی لاکتونی هستند. آورمکتین دارای ویژگی‌های حشره‌کشی، کنه‌کشی و نماتدکشی است (Bloomquist, 1993). آبامکتین در سال ۱۳۷۷ در ایران با نام تجارتی ورتی‌مک®[3] به ثبت رسیده است (Mosallanejad *et al*., 2002). آبامکتین و میلبمکتین[4] در حال حاظر به فراوانی برای کنترل کنه‌های تارعنکبوتی در بسیاری محصول‌ها استفاده می‌شوند و گزارش‌های مربوط به مقاومت آن‌ها کم است (van Leeuwen *et al*., 2009). از این کنه‌کش برای کنترل کنه‌های مرکبات به ویژه کنه زنگار مرکبات در شمال کشور استفاده می‌شود (Mosallanejad *et al*., 2002). در حال حاضر آبامکتین یکی از آفت‌کش‌های با مصرف بالا در کنترل کنه قرمز مرکبات است. با توجه به دوره زندگی کوتاه این کنه و قدرت تولیدمثل بالا، احتمالاً جمعیت‌هایی از این آفت به این آفت‌کش مقاوم شده¬اند (Shen *et al*., 2017). از طرفی تاکنون مطالعه‌ای در زمینه مقاومت کنه قرمز مرکبات به آفت‌کش‌های رایج در شمال کشور انجام نشده است. هدف از این پژوهش بررسی نقش استرازها و گلوتاتیون-اس-ترنسفرازها در مقاومت کنه قرمز مرکبات به آبامکتین بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جمعیت‌های کنه قرمز مرکبات و پرورش آن‌ها

جمعیت‌های مشکوک به مقاومت این آفت از درختان مرکبات آلوده (ارقام نارنج، والنسیا[5]، پرتقال مدیترانه‌ای و پرتقال خونی[6]) موجود در استان مازندران (رامسر و ساری) و گرگان (شهرستان بندر گز) جمع‌آوری شد. باغ‌هایی برای نمونه‌برداری انتخاب شد که حداقل ۳ بار در سال سم‌پاشی می‌شدند. همچنین جمعیت حساس از درختان مرکبات موجود در دانشگاه گیلان (محوطه‌ی دانشکده‌ی علوم کشاورزی) که سابقه‌ی سم‌پاشی با کنه‌کش نداشتند، جمع-آوری شد.

پرورش کنه

برای پرورش جمعیت‌های کنه قرمز مرکبات، از گیاهچه‌های پایه‌ی سیترنج[7] *C. sinensis* × *C. trifoliata* و نارنج *Citrus aurantium* L. استفاده شد. نهال‌ها از گلخانه باغبانی دانشکده و کشت مستقیم بذر نارنج در خاک تهیه شدند. پرورش در شرایط گلخانه‌ای (دمای ۳±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۱۰±۶۰ درصد) انجام شد. جمعیت‌های مختلف کنه به‌صورت مجزا از هم روی نهال‌ها پرورش داده شدند، به طوری‌که امکان اختلاط جمعیت‌های مختلف وجود نداشته باشد.

آزمون زیست سنجی

هم‌سن‌سازی کنه‌ها روی بوته‌های نارنج در شرایط آزمایشگاهی دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۱۰±۷۰ درصد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت؛ بدین روش که تعداد ۱۰ کنه‌ی بالغ بارور روی هر بوته‌ی نارنج منتقل و بعد از ۲۴ ساعت از روی بوته‌ها جمع‌آوری و به بوته های دیگر منتقل می‌شدند. بوته-های حاوی تخم‌های هم‌سن به اتاقک کشت منتقل شدند و

[1]. Avermectin
[2]. Insecticide resistance action committee
[3]. Vertimec
[4]. Milbemectin
[5]. Valencia
[6]. Blood Orange
[7]. Citrange

بدین سان بعد از ۱۴ روز کنه‌های بالغ هم سن روی بوته‌ها ظاهر شدند. برای تعیین میزان سمیت آبامکتین (شرکت گل سم گرگان، فرمولاسیون ۱/۸ ٪ EC، آورمکتین[1]®) زیست سنجی‌ها روی مرحله بالغ کنه قرمز مرکبات انجام شد که شامل آزمون‌های مقدماتی و نهایی بود. ابتدا با آزمون مقدماتی محدوده‌ی غلظت‌های مؤثر روی کنه‌ی قرمز مرکبات تخمین زده شد و غلظت‌هایی که پس از ۲۴ ساعت، ۱۰-۹۰ درصد تلفات ایجاد کردند، در آزمون نهایی مورد استفاده قرار گرفتند. برای آزمون زیست‌سنجی از برج پاشش[2] (طراحی و ساخته شده در دانشگاه گیلان) (میزان پاشش ۰/۲ ± ۱/۵ میلی‌گرم بر سانتی‌مترمربع) استفاده شد (Tsagkarakou *et al.*, 2009). بعد از تعیین محدوده غلظت‌های مؤثر، آزمون نهایی با پنج غلظت و در چهار تکرار انجام گرفت. برای این منظور از برگ‌های نارنج دیسک‌هایی در ابعاد ۹ سانتی‌مترمربع تهیه و قسمت پشتی برگ روی ظروف پتری حاوی پنبه مرطوب گذاشته شدند. دیسک‌های تهیه شده با استفاده از غلظت‌های فراهم شده، با استفاده از برج پاشش، به سم آغشته شده و به مدت نیم ساعت برای خشک شدن در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس روی هر دیسک برگی ۲۰ عدد کنه ماده‌های بالغ یک روزه منتقل شد، کلیه آزمایش‌های زیست سنجی داخل انکوباتور (دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت ۱۰±۷۰ درصد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انجام گرفت.

آزمون‌های بیوشیمیایی

مواد شیمیایی

آمونیوم پرسولفات[3]، آلفا-نفتیل استات[4] (α-NA)، بتا-نفتیل استات[5] (β-NA)، سوکروز، برومونفل بلو[6]، تریس[7]، آکریل آمید[8]، بیس آکریل آمید[9]، TEMED، گلایسین[10]، گلوتاتیون احیا شده[11] (GSH) و ۱-کلرو ۲و۴ دی نیتروبنزن[12] (CDNB) از شرکت مرک[13] (آلمان) و نمک فاست بلو آرآر[14] از شرکت فلوکا[15] (کشور آمریکا) تهیه شد.

اندازه‌گیری فعالیت و فراسنجه‌های سینتیکی گلوتاتیون-اس-ترانسفراز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز با استفاده از سوبستراهایCDNB و گلوتاتیون احیا (GSH) مطابق روش هابیگ و همکاران (Habig *et al.*, 1974) با اندکی تغییرات انجام شد. به این صورت که تعداد ۲۵ کنه در ۱۶۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) در دمای ۴ درجه سلسیوس هموژنایز و بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از آن مقدار ۱۵ میکرولیتر از نمونه‌ی آنزیمی داخل چاهک‌های پلیت الایزا ریخته و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط CDNB (۱ میلی‌مولار) و گلوتاتیون احیاء شده در بافرفسفات (۰/۱ مولار و اسیدیته ۷) به آن اضافه شد. تغییرات جذب با استفاده از میکروپلیت ریدر Awareness (Stat Fax 3200®) به مدت پنج دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یک‌بار در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های سینتیکی از مقدار ثابت غلظت گلوتاتیون[16] و مقدار متغیر CDNB استفاده شد. مقدار K_m و V_{max} به وسیله نرم افزار هایپر در سه تکرار اندازه‌گیری و تعیین شد.

---

1. Avermectin
2. Potter tower
3. Ammonium persulfate
4. α-Naphthyl acetate
5. β-Naphthyl acetate
6. Bromophenol blue
7. Tris
8. Acrylamide
9. Bis-acrylamide
10. Glycine
11. Reduced glutathione
12. 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene
13. Merck
14. Fast Blue RR
15. Fluka
16. Glutathione

اندازه‌گیری فعالیت استراز

تعداد ۵۰ کنه در ۱۰۰ میکرولیتر بافر ۰/۱ مولار فسفات (اسیدیته ۷) حاوی ۰/۰۱ درصد ترایتون X-100 همگن و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. فعالیت‌های هیدرولیتیکی استرازها با استفاده از آلفا-نفتیل استات و بتا-نفتیل استات به‌عنوان زیرنهشت طبق روش ون اسپرن (van Asperen, 1962) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. به این صورت که ۵۰ میکرولیتر نمونه آنزیم به ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷) و ۱۰ میکرولیتر سوبسترا (۱۰ میلی‌مولار) اضافه شد. بعد از آن ۵۰ میکرولیتر فست‌بلوآرآر (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر فسفات) به مخلوط واکنش اضافه و میزان نفتول تولید شده به صورت پیوسته در طول موج‌های ۴۰۵ (برای سوبسترای آلفا-نفتیل استات) و ۵۴۰ (برای سوبسترای بتا-نفتیل استات) با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد. بعد از محاسبه شیب خط (سرعت اولیه) و تبدیل آن به محصول (با استفاده از خوانش جذب غلظت‌های مختلف نفتول و تهیه منحنی استاندارد) و محاسبه میزان پروتئین موجود در نمونه، فعالیت ویژه (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) محاسبه شد.

Native PAGE کربوکسیل استرازی

الکتروفورز با ژل ۷/۵ درصد با استفاده از روش دیویس (Davis, 1964) در جریان ۱۰۰ ولت و دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. از محلول سوکروز حاوی ۰/۰۲ درصد بروموفنل بلو به عنوان بافر نمونه استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۰/۱ مولار اسید بوریک در دمای ۱۰ درجه سلسیوس خوابانده شد. سپس برای رنگ‌آمیزی در محلول (۰/۰۲ درصد آلفا-نفتیل استات + ۰/۰۲ درصد بتا-نفتیل استات + نمک فاست بلو آرآر) به مدت یک ساعت نگهداری شد (Kono and Tomita, 1992)

اندازه‌گیری مقدار پروتئین نمونه‌ها

با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) مقدار پروتئین هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری و از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان نمونه استاندارد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقادیر LC_{50} حاصل از آزمون زیست‌سنجی با روش پروبیت و به کمک نرم‌افزار POLO-PC تخمین زده شد. میزان مقاومت در جمعیت‌ها نسبت به جمعیت حساس، با فراسنجه نرخ مقاومت[1] محاسبه شد. داده های به دست آمده از آزمون های بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 (2002) در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون توکی برای مقایسه میانگین داده‌ها در سطح احتمال آماری ۵٪ استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از زیست‌سنجی کنه قرمز مرکبات با آبامکتین نشان داد که سطح مقاومت در جمعیت گرگان بیشتر از جمعیت رامسر و ساری است. نسبت مقاومت برای جمعیت گرگان، ساری و رامسر به ترتیب ۶/۴۸ ، ۶/۱۹ و ۵/۱۱ برآورد شد. میزان LC_{50} جمعیت رشت در مقایسه با دیگر جمعیت‌ها ۲۴/۴۰۲ میلی‌گرم بر لیتر برآورد شد که بر این اساس پایین‌ترین میزان LC_{50} را نشان داد (جدول ۱).

فعالیت استرازی

بررسی فعالیت استرازی جمعیت های حساس و مقاوم با استفاده از سوبسترای آلفا-نفتیل استات (α-NA)، بتا-نفتیل استات (β-NA) نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ با استفاده از سوبسترای α-NA (F =۱۳۱/۳۷، df =۴، $P < ۰/۰۰۰۱$) و β-NA (F =۴۴/۴۴، df =۳، $P < ۰/۰۰۰۱$) است. همچنین اختلاف معنی‌داری بین چهار جمعیت در هر دو

[1]. Resistance Ratio= RR

سوبسترا وجود داشت و بالاترین فعالیت استرازی مربوط به جمعیت گرگان بود، به طوری که به‌ترتیب میزان فعالیت آلفا- و بتا استرازی در این جمعیت ۷/۹۶۰ و ۳/۵۷۵ برابر جمعیت رشت می‌باشد (جدول ۲).

الگوهای پراکنش باندهای استرازی

در بررسی الکتروفورز ژل استرازی، ۵ نوار ثبت شد که میزان تراکم باند E1 در جمعیت‌های مقاوم بیشتر از جمعیت حساس بود (شکل ۱).

جدول ۱- آنالیز پروبیت جمعیت‌های مختلف کنه قرمز مرکبات (*Panonycus citri*) تیمار شده با آبامکتین

Table 1. Probit analysis of citrus red mite (*Panonycus citri*) treated with abamectin

Population	Number	LC_{50}[a] (95% confidence)	Slop±SE	X^2(df)	Resistance Ratio(RR)
Rasht	240	24.4(17.27-33.89)	2.34±0.45	2.94(3)	----
Gorgan	240	159.65(116.11-251.98)	4.22±1.01	2.01(3)	6.48(4.03-12.31)
Ramsar	240	151.75(136.56-216.72)	6.73±1.24	1.11(3)	6.19(3.40-10.24)
Sari	240	130.8(112.87-176.19)	4.90±0.88	0.59(3)	5.11(3.13-8.31)

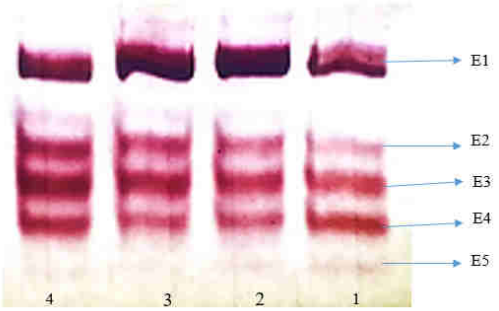
[a] mg L^{-1}

جدول ۲- میانگین ± خطای معیار فعالیت استرازی (سوبستراهای آلفا- نفتیل استات و بتا- نفتیل استات) و گلوتاتیون اس-ترانسفرازی جمعیت های حساس و مقاوم کنه قرمز مرکبات (*Panonycus citri*)

Table 2. The mean ± SE of esterase activity (α-naphthyl acetate and β-naphthyl acetate substrates) and glutathione-s-transfer in susceptible and resistant populations of *Panonychus citri*

Population	α-NA (µmol.min^{-1}mg protein^{-1}) ±SE	β-NA (µmol.min^{-1}mg protein^{-1}) ±SE	GST (CDNB) (µmol.min^{-1}mg protein^{-1}) ±SE
Rasht	0.128±0.024^{c}	0.205±0.037^{b}	0.169±0.023^{b}
Gorgan	1.019±0.036^{a}	0.733±0.054^{a}	0.547±0.028^{a}
Ramsar	0.219±0.040^{b}	0.214±0.020^{b}	0.302±0.035^{b}
Sari	0.212±0.017^{b}	0.656±0.049^{a}	0.249±0.025^{b}

Means with different letters in each column are significantly different at 5% level (Tuckey's test)



شکل ۱- زایموگرام فعالیت استرازی در جمعیت‌های مختلف کنه قرمز مرکبات (*Panonycus citri*). از راست به چپ: رشت (۱)، گرگان (۲)، رامسر (۳) و ساری (۴)

Figure 1. Zymogram of esterase activity in different populations of citrus red mite (*Panonycus citri*). From right to left: Rasht (1), Gorgan (2), Ramsar (3) and Sari (4)

فعالیت GST

بررسی فعالیت GST با استفاده از سوبسترای CDNB نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت گرگان ۲/۷۹ برابر بیشتر از جمعیت حساس است (۳۰/۶۳= F، ۳= df، ۰/۰۰۰۱ > P) (جدول ۲). نتایج نشان می‌دهند که جمعیت گرگان اختلاف معنی‌داری با سه جمعیت دیگر از نظر آماری دارد (جدول ۲).

تعیین فراسنجه‌های سینتیکی گلوتاتیون-اس-ترانسفراز

برای بررسی کمی و کیفی آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در چهار جمعیت مورد نظر، *Km* و *Vmax* این آنزیم با استفاده از منحنی‌های لاینویر-برک اندازه‌گیری و مقایسه شد. مقادیر *Km*، *Vmax* و *Vmax/Km* چهار جمعیت با سوبسترای CDNB در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان-دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در فراسنجه‌های سینتیکی *Vmax* (F=۱۳/۷۶، df=۳ ، P= ۰/۰۰۱۶) و *Km* (F=۱۵/۹۱، df=۳ ، P= ۰/۰۰۱) این آنزیم در چهار جمعیت مورد بررسی است. مقدار *Km* جمعیت گرگان ۱۶/۲۱ برابر بیشتر از جمعیت رشت بود که این امر بیانگر وجود تفاوت کیفی آنزیم و تمایل کم آنزیم به سوبسترا، در جمعیت مقاوم نسبت به حساس است. علاوه براین، مقدار *Vmax* در جمعیت مقاوم برای این سوبسترا ۴۹/۹۵ میلی‌مولار بر دقیقه به دست آمد که ۵/۳۳ برابر بیشتر از این فاکتور در جمعیت حساس است.

جدول ۳- میانگین ± خطای معیار فراسنجه‌های سینتیکی آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز چهار جمعیت مورد بررسی کنه قرمز مرکبات (*Panonycus citri*)

Table 3. The mean ± SE of kinetic parameters of glutathione-s-transferase enzyme in four populations of *Panonychus citri*

Population	*Km* (mM)	*Vmax* (mM/min)	*Vmax/Km*
Rasht	0.088±0.011^{c}	9.356±0.902^{c}	106.935 ± 4.272^{a}
Gorgan	0.64 ± 0.089^{b}	25.23 ± 2.844^{b}	39.787 ±1.380^{c}
Ramsar	0.328 ± 0.02^{b}	15.291± 0.562^{b}	58.218 2.± 172^{b}
Sari	1.427 ± 0.277^{a}	49.95 ±8.828^{a}	35.323 ± 1.923^{d}

Means with different letters in each column are significantly different at 5% level (Tuckey's test)

بحث

بررسی مقاومت به آبامکتین بین چهار جمعیت مورد بررسی نشان داد که جمعیت رشت حساس‌ترین جمعیت کنه قرمز مرکبات به آبامکتین بوده و جمعیت گرگان (۶/۴۸ برابر مقاوم‌تر از جمعیت رشت) و پس از آن جمعیت‌های رامسر (۶/۱۹ برابر مقاومت) و ساری (۵/۱۱ برابر مقاومت) دارای بالاترین سطح مقاومت به این ترکیب بودند. نتایج نشان داد که در این مقاومت، آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون-اس-ترانسفراز نقش دارند؛ شاید یکی از دلایل کاهش حساسیت به آبامکتین، استفاده بسیار زیاد از سموم مختلف روی کنه قرمز مرکبات و دیگر آفات مرکبات در استان‌های شمالی کشور باشد. از طرفی بررسی‌ها نشان داد جمعیت‌های *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) به آبامکتین روند رو به رشد مقاومت را نشان داده‌اند (Memarizadeh *et al.*, 2011b).

در پایش مقاومت جمعیت‌های مختلف کنه تارتن دو لکه-ای به آبامکتین، آکریناترین[1]، فنازاکوین[2]، پریمیفوس متیل[3] و بیفنزیت[4]، بیشترین مقدار LC_{50} مربوط به آبامکتین و در جمعیت گلخانه‌ای (نسبت مقاومت= ۳۸۲۲ برابر) گزارش شد.

[1]. Acrinathrin
[2]. Fenazaquin
[3]. Pirimiphos-methyl
[4]. Bifenzate

همچنین جمعیت‌های جمع‌آوری شده از مزرعه لوبیا (نسبت مقاومت= ۱۳۵۶ برابر) و مزرعه گوجه فرنگی (نسبت مقاومت= ۱۳۲۰) نیز نسبت به این ترکیب مقاوم بودند (Vassiliou and Kitsis, 2013). همچنین در بررسی مقاومت سه جمعیت *T. urticae* نسبت به آبامکتین، نسبت مقاومت ۲۲۳ و ۴۰۴ برابری در مقایسه با جمعیت حساس به دست آمد و فعالیت آنزیم‌های استرازی، GST و P450 در جمعیت‌های مقاوم در مقایسه با جمعیت حساس بالاتر بود. همچنین آزمون‌های زیست سنجی با استفاده از سینرژیست‌های PBO، دی‌اتیل مالات[1] DEM و ایزوبوتیل پارابن[2] (IBP) بر درگیر بودن سیستم استرازی در مقاومت سه جمعیت دلالت داشت (Cagatay *et al*., 2018).

در بررسی فعالیت استرازی بین جمعیت‌های کنه قرمز مرکبات، جمعیت گرگان فعالیت استرازی بالاتری با استفاده از سوبسترای α-NA در مقایسه با β-NA نشان داد. با این حال، در بررسی فعالیت استرازی در زیموگرام با استفاده از native PAGE مختصر تفاوتی در الگوی باندها بین جمعیت‌های حساس و مقاوم مشاهده شد و استراز E1 در جمعیت های مقاوم تراکم باند قوی‌تری نشان داد. بررسی فعالیت آنزیم استراز نشان داد که فعالیت کاتالیزوری CarE روی سوبسترای آلفا -نفتیل استات در جمعیت مقاوم *P. citri* بالاتر از جمعیت حساس بود (Ran *et al*., 2009). سنجش فعالیت استرازی در جمعیت کنه دو لکه‌ای با استفاده از سوبستراهای آلفا -نفتیل استات و آلفا -نفتیل پروپیونات به‌ترتیب بیانگر ۲/۱۴ و ۱/۳۳ برابری در جمعیت مقاوم به آبامکتین بود (Memarizadeh *et al*., 2011b). در این مطالعه، فعالیت گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در جمعیت گرگان ۲/۷۹ برابر بیشتر از جمعیت حساس بود، که می‌تواند یکی از سازوکارهای مقاومت به آبامکتین در *P. citri* باشد. همچنین بررسی فراسنجه‌های سینتیکی این آنزیم بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین جمعیت‌های مورد بررسی و فعالیت بیشتر آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در جمعیت گرگان نسبت به جمعیت ساری و رامسر در مقایسه با جمعیت رشت است. ثابت میکالیس-منتن نشان‌دهنده تمایل آنزیم به سوبسترا می‌باشد؛ نتایج این تحقیق نشان داد که مقدار *Km* جمعیت گرگان ۱۶/۲۱ برابر بیشتر از جمعیت رشت است که نشان‌دهنده تمایل کم‌تر آنزیم گلوتاتیون اس ترنسفراز جمعیت گرگان به سوبسترای CDNB در مقایسه با جمعیت رشت است. به عبارتی این آنزیم در دو جمعیت فوق تفاوت کیفی دارد. علاوه بر این، مقدار *Vmax* آنزیم GST در جمعیت مقاوم ۵/۳۳ برابر بیشتر از جمعیت حساس بود. افزایش معنی‌دار مقدار *Vmax* در جمعیت مقاوم نشان می‌دهد که گلوتاتیون-اس-ترانسفراز از نظر کمی در جمعیت مقاوم بیشتر از جمعیت حساس است. همچنین نتایج بررسی ویژگی‌های آنزیمی گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم *Sitophilus zeamais* Motschulsky به پیرتروئیدها[3] (دلتامترین[4] و دیگر سموم پیرتروئیدی) نشان داد که مقدار *Km* این آنزیم (زمانی که از مقادیر مختلف سوبسترا CDNB و مقدار ثابت GSH استفاده می‌شود)، در جمعیت مقاوم دو برابر بیش از جمعیت حساس است. همچنین میزان *Vmax* این آنزیم با استفاده از سوبستراهای CDNB و GSH بیش از ۲ برابر جمعیت حساس به دست آمد (Fragoso *et al*., 2007). در بررسی مقاومت کنه تارتن نسبت به آبامکتین در استرین هلندی (NL-00)، کلمبیایی (COL-00) و برزیلی (BR3-00)، مقاومت در این استرین‌ها به شکل معنی‌داری با افزایش فعالیت سیتوکروم مونواکسیژناز P450 و گلوتاتیون-اس-ترانسفراز همراه بود. در مقایسه با استرین NL-00، مقاومت به آبامکتین در استرین برزیلی در شرایط آزمایشگاهی بعد از شش ماه پرورش در شرایط عاری از آفت‌کش پایدار نبود و کاهش مقاومت با کاهش فعالیت

[1]. Diethyl maleate
[2]. Isobutyl paraben
[3]. Pyrethroid
[4]. Deltamethrin

GST و MFO همراه بود. همچنین درگیری GST و MFO در مقاومت به آبامکتین در *T. urticae* توسط سینرژیست‌های PBO و DEM تأیید شد (Stumpf and Nauen, 2002). بررسی مقادیر *Km* و *Vmax* آنزیم GST خالص‌سازی شده از دو استرین حساس و مقاوم به آبامکتین کنه دو لکه‌ای نشان-دهنده بیان بیش از حد این آنزیم در استرین مقاوم بود که نتایج تحقیق حاضر با این نتایج مطابقت دارد (Konanz and Nauen, 2004). برآورد فراسنجه‌های سینتیکی و میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در کنه دو لکه‌ای مقاوم و حساس به آبامکتین تفاوت مشخص بین دو جمعیت نشان داد، به طوری که میزان فعالیت در جمعیت مقاوم ۱/۷۱ برابر بیشتر از جمعیت حساس می باشد و مقادیر *Km* و *Vmax* جمعیت مقاوم با استفاده از سوبسترای CDNB به‌ترتیب ۱/۴۳ و ۱/۱۵ برابر کم‌تر و بیشتر از این میزان در جمعیت حساس بود (Memarizadeh *et al*., 2011a). در بررسی سه نوع آنزیم GST در *T. urticae*، دو آنزیم از کلاس دلتا[1] (TuGSTd10, TuGSTd14) و یک آنزیم کلاس مو[2] (TuGSTm09) توانایی کاتالیز کردن ترکیبات CDNB و DCNB به گلوتاتیون (GSH) را دارا بودند. TuGSTd14 بیشترین تمایل و بالاترین بازدارندگی را نسبت به آبامکتین نشان داد (Pavlidi *et al*., 2015). با این حال، فعالیت بالای GSTs و مشارکت آن در مقاومت به آفت‌کش‌ها، به ویژه در جمعیت *T. urticae* مقاوم به آبامکتین (Stumpf and Nauen, 2002) و جمعیت *P. citri* مقاوم به پیریدابن (Niu *et al*., 2011) گزارش شده است. از طرفی در بررسی جمعیت‌های آزمایشگاهی کنه تارتن دولکه‌ای مقاوم به آبامکتین (نسبت مقاومت **۳۴۲** برابر نسبت به جمعیت حساس)، مقاومت تقاطعی این کنه با کلرفناپیر ، فن‌پروپاترین و میلبمکتین گزارش شده است (Sato *et al*., 2005) که ناشی از مقاومت متابولیکی به آبامکتین است. افزایش فعالیت آنزیم-های سم‌زدا که در تحقیق حاضر به دست آمد، ممکن است منجر به ایجاد مقاومت تقاطعی به دیگر سموم کنه‌کش در کنه قرمز مرکبات شود. تحلیل پروتئومیکس *P. citri* تیمار شده با آبامکتین به شناسایی ۱۶ پروتئین مختلف با اثر بر سوخت و ساز و سم‌زدایی منجر شد؛ که این نشان‌دهنده درگیر بودن یک سازوکار فیزیولوژیکی پیچیده در پاسخ *P. citri* به استرس مواجهه با آبامکتین بود (Shen *et al*., 2017). جهش‌های یافت شده در زیرواحدهای مختلف کانال GluCl (TuGluCl1 و TuGluCl3) با سطح بالایی از مقاومت به آبامکتین در *T. urticae* همراه هستند (Dermauw *et al*., 2012). با این حال، این سازوکار مولکولی مقاومت به آبامکتین در *P. citri* به اثبات نرسیده است (Liao *et al*., 2016). احتمال وجود جهش در کانال GluCl در جمعیت-های مقاوم بعید به نظر می‌رسد چون این جهش با مقاومت بسیار بالای کنه‌ها به آبامکتین ارتباط دارد.

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده افزایش مقاومت به آبامکتین در جمعیت‌های ایرانی کنه قرمز مرکبات می‌باشد. به نظر می‌رسد که آنزیم‌های سم‌زدا مانند استراز و گلوتاتیون-اس-ترنسفراز در این مقاومت سهیم می‌باشند. بنابراین توصیه می-شود برای کنترل این آفت بایستی ترکیباتی توصیه شوند که تحت تاثیر افزایش بیان و تغییر کیفیت این آنزیم‌های سم-زدا قرار نگیرند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان در جهت فراهم کردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق قدردانی می‌شود.

[1]. Delta class
[2]. Mu class

References

Arbabi, M., Asadi, Y., Mirhosseini, M. R. and Zaghi, A. 1999. Acaricide activity of fenpyroximate against citrus red mite in Mazandaran province. **National Congress of Fertilizer and pesticide in Agriculture** 56 p. (In Farsi).

Arbabi, M. 2005. The results of one-decade research of acaricides on mites causing damage in Iran. **The First National Conference of the Half a Century of Use of Chemical Industry and Plant Pesticides. 12-16 June. Iran** 61-67 pp. (In Farsi)

Anonymous, A. 1986. Compounding polysulfide for resistance to biodegradation, Thiokol Chemicals Limited, Coventry, United Kingdom. From Web http://books.google.com/books?id=rcfbAAAA QBAJ&pg= PA89&lpg=PA89&dq= anonymous+1986.

Bloomquist, J. R. 1993. Toxicology, mode of action, and target-site mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. **Comparative Biochemistry and Physiology** 106(2): 301-314.

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.

Cagatay, N. S., Menault, P., Riga, M., Vontas, J. and Ay, R. 2018. Identification and characterization of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch populations from greenhouses in Turkey. **Crop Protection** 112: 112-117.

Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Science** 121: 404-427.

Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbc, M. and Tirry, L. 2012. The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance, **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 42: 455-465.

Ding, T. B., Niu, J. Z., Yang, L. H., Zhang, K., Dou, W. and Wang, J. J. 2013. Transcription profiling of two cytochrome P450 genes potentially involved in acaricide metabolism in citrus red mite *Panonychus citri*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 106: 28-37.

Fragoso, D. B., Narciso, R., Guedes, C., Goreti, M. and 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.

Gotoh, T., Ishikawa, Y. and Kitashima, Y. 2003. Life-history traits of the six *Panonychus* species from Japan (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology** 29(3-4): 241-252.

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry** 249: 7130-7139.

Jones, V. P. and Parrella, M. P. 1984. The sublethal effects of selected insecticides on life table parameters of *Panonychus citri* (Acari, Tetranychidae). **Canadian Entomologist** 116: 1033-1040.

Konanz, S. and 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.

Kono, Y. and Tomita, T. 1992. Characteristics of highly active carboxylesterases in insecticide-resistant *Culex pipiens quinquefasciatus***. Japanese Journal of Sanitary Zoology** 43 (4): 297-305.

Liao, C. Y. W. K., Xia, Y. C., Feng, G., Li, H., Liu, W., Dou, J. and Wang, J. 2016. Characterization and functional analysis of a novel glutathione S-transferase gene potentially associated with the abamectin resistance in *Panonychus citri* (McGregor). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 132: 72-80.

Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Sajedi, R. H., Jalali Sendi, J. 2011a. Characterization of esterases from abamectin-resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **International Journal of Acarology** 37(4): 271–281.

Memarizadeh, N., Ghadamyaria, M., Sajedi, R. H. and Jalali Sendi, J. 2011b. Mechanism of resistance of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to abamectin. **Iranian Journal of Plant Protection Science** 42(1): 75-83. (In Farsi)

Metcalf, R. L. 1980. Changing role of insecticides in crop protection. **Annual Review of Entomology** 25: 219-256.

Mosallanejad, H., Noroozian, M. and Mohamadbeigi, A. 2002. A guide booklet of important crop pests, diseases and weeds and the recommended control chemicals. **Crop Protection Organization** 110 pp. (In Farsi).

Migeon, A. and Dorkeld, F. 2010. From Spider Mites Web: http: //www.montpellier.inra.fr/CBGP/ spmweb.

Niu, J. Z., Liu, G. Y., Dou, W. and Wang, J. J. 2011. Susceptibility and activity of glutathione S-transferases in nine field populations of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) to pyridaben and azocyclotin. **Folia Entomologica Hungarica** 94: 321-329.

Pavlidi, N., Tseliou, V., Riga, M., Nauen, R., van Leeuwen, T., Labrou, N. and Vontas, J. 2015. Functional characterization of glutathione S-transferases associated with insecticide resistance in *Tetranychus urticae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 121: 53–60.

Pan, W. G., Luo, P., Fu, R. B., Gao, P., Long, Z. F., Xu, F. Y., Xiao, H. B. and Liu, S. G. 2006. Acaricidal activity against *Panonychus citri* of a ginkgolic acid from the external seed coat of *Ginkgo biloba*. **Pest Management Science** 62(3): 283-287.

Ran, C., Chen Y. and Wang, J. J. 2009. Susceptibility and carboxylesterase activity of five field populations of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) to four acaricides. **International Journal of Acarology** 35: 115-121.

Sato, M. E., Silva, M. Z. D., Raga, A. and Raga, F. D. S. 2005. Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. **Neotropical Entomology** 34(6): 991-998.

SAS 9.1.3. 2002. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Shen, X. M., Zhong, R., Xia, W. K., Wei, D., Ding, T. B., Liao, C. Y., Niu, J. Z., Dou, W. and Wang, J. J. 2017. Identification of responsive proteins in *Panonychus citri* exposed to abamectin by a proteomic approach. **Journal of Proteomics** 158: 9-19.

Stumpf, N. and Nauen, R. 2002. Biochemical Markers Linked to Abamectin Resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 72: 111–121.

Takeyama, K., Mori, N. and Osakabe, M. 2006. Effect of cytochrome P450 inhibitor, piperonyl butoxide, on survival of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on citrus leaves. **Applied Entomology and Zoology** 41: 487-491.

Tsagkarakou, A., van Leeuwen, T., Khajehali, J., Ilias, A., Grispou, M., Williamson, S., Tirry, L. and Vontas, J. 2009. Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Insect Molecular Biology** 18(5): 583-593.

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

Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A. and Tirry, L. 2009. Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae***.** In Ishaaya, I. and Horowitz, A. R. (Eds.). **Biorational Control of Arthropod Pests Springer, Dordrecht** pp. 347-393.

Vassiliou, V. A. and Kitsis P. 2013. Acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations from Cyprus. **Journal of Economic Entomology** 106(4): 1848-1854.

Vassiliou, V. A. and Papadoulis, G. 2009. First record of the citrus red mite *Panonychus citri* in Cyprus. **Phytoparasitica** 37(1): 99-100.

Zhang, K., Niu, J. Z., Ding, T. B., Dou, W. and Wang, J. J. 2013. Molecular characterization of two carboxylesterase genes of the citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 82 (4): 213-226.

Plant Pest Research
2018- 8(3): 31-43

Enhanced activity of esterases and glutathion-s-transferases in abamectin resistante populations of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae)

E. Shafiei Alavijeh[1], M. Ghadamyari[1*] and J. Khajeali[2]
1. Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, 2. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

(Received: August 8, 2018-Accepted: November 10, 2018)

Abstract

Citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) is one of the most important pest of citrus in the citrus regions of the world and Northern provinces of Iran. Application of various chemical pesticides against citrus pests has destroyed natural enemies, the occurrence of resistance and the resurgence of the pests. In this research, resistance mechanisms of citrus red mite to abamectin were investigated in four populations. To determine the LC_{50}, the spray potter tower method was used. In this method, the resistance level in Gorgan, Ramsar, and Sari populations was 6.48, 6.19 and 5.11 times higher than the susceptible population. The measurement of esterase activity in Gorgan's resistant population using α-naphthyl acetate and β-naphthyl acetate substrate was 7.960 and 3.575 times more than that of the susceptible population. Estimation of kinetic parameters and glutathione-s-transferase activity level using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate also showed a significant difference between the four populations, so that the activity of this enzyme in resistance population was 2.79 fold higher than that of resistant population. Also, *Km* and *Vmax* in resistant population were 16.12 and 5.33 fold than susceptible population, respectively. Due to the increasing trend of resistance, the results of this study indicated the role of esterase and glutathione-s-transferase enzymes in resistance mechanism to abamectin.

Kay words: Citrus red mite, Esterase Activity, Glutathione S-transferas, Resistant

*Corresponding author: mghadamyari@gmail.com