دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (ص ۴۰-۳۳)

نقش مهارکنندهٔ پای‌پرونیل بوتوکساید در میزان فعالیت ویژهٔ آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز پسیل معمولی پسته، *Agonoscena pistaciae*

پویان مصلحی[۱]، علی علیزاده[۲]* و محمد قدمیاری[۳]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان
۳. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۱/۱۲)

چکیده

گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها نقش بسیار مهمی در غیرسمی کردن ترکیبات آفت‌کش و مقاومت حشرات در برابر حشره‌کش‌ها ایفا می‌کنند. در این پژوهش تفاوت فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در دو فرم تابستانه و زمستانه پسیل بررسی شده است و اثر غلظت‌های مختلف پی‌پرونیل بوتوکساید (PBO) (۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر) روی حشرات کامل پسیل پسته در میزان مهار فعالیت این آنزیم با استفاده از سوبسترای ۱، کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB) انجام گرفته است. همچنین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تیمار حشرات کامل با دزی که بیشترین مهارکنندگی را روی این آنزیم داشت، سنجش شده است. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در فرم‌های مختلف پسیل با هم اختلاف معناداری ($P < ۰/۰۵$) نداشتند و کمترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز، یا به عبارتی بیشترین میزان مهارکنندگی توسط پای‌پرونیل بوتوکساید در غلظت ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر دیده شد و بیشترین مهارکنندگی در زمان ۴ ساعت بعد از کاربرد سینرژیست (PBO) صورت گرفت. با توجه به نتایج این پژوهش چنین به نظر می‌رسد که بتوان با کاربرد مناسب دز PBO، آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز را مهار و با در نظر گرفتن زمان حداکثر مهار توسط این سینرژیست در مدیریت مقاومت پسیل به آفت‌کش‌ها سود برد.

واژه‌های کلیدی: پسیل پسته، سینژیست، مدیریت مقاومت به آفت‌کش‌ها، PBO.

مقدمه

از آنزیم‌هایی که در سم‌زدایی آفت‌کش‌ها نقش مهمی ایفا می‌کنند می‌توان به گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها (GST_s) اشاره کرد (Salinas & Wong, 1999). این آنزیم‌ها اساساً واکنش پیوند بین ترکیبات الکترون‌دوست با گروه تیول مولکول گلوتاتیون احیاشده را تسهیل می‌کنند. این عمل معمولاً قابلیت انحلال در آب و دفع شدن محصول واکنش را بیشتر می‌کند (Habig *et al*., 1974; Clark *et al*., 1984).

بسیاری از مطالعات انجام‌گرفته بر گلوتاتیون اس‌ترانسفرازهای حشرات به نقش آنها در تجزیه و خنثی‌سازی ترکیبات خارجی به‌ویژه حشره‌کش‌ها، سموم گیاهی و دفع انواع رادیکال‌های آزاد در مسیر متابولیکی آفت‌کش‌ها اشاره دارد (Fournier *et al*., 1992)، (Clark *et al*., 1986)، (Vontas *et al*., 2001)، (Sawicki *et al*., 2003)، (Enayati *et al*., 2005)، (Ranson *et al*., 2001). گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها نقش بسیار مهمی در مقاومت حشرات در برابر حشره‌کش‌ها ایفا می‌کنند؛ به‌طوری که

* تلفن: ۰۹۱۳۱۹۳۰۹۷۴
E-mail: a.alizadeh@vru.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش فعالیت گلوتاتیون اس‌ترانسفرازها در بسیاری از استرین‌های مقاوم به عنوان عامل مقاومت بیان شده است (Ramoutar *et al*., 2009; Sarkar *et al*., 2009; Zhu *et al*., 2006; Zhu *et al*., 2011; Lumjuan *et al*., 2011; Qin *et al*., 2013).

اهمیت و نقش مقاومت متابولیسمی (درگیر بودن آنزیم‌های سم‌زدا در مقاومت) را با به‌کار بردن برخی ترکیبات سینرژیست که قادرند این سامانه‌ها را مهار کنند به‌خوبی می‌توان شناخت. به‌طور کلی در آزمایش‌های معمول از پی‌پرونیل بوتوکساید (PBO) برای مهار آنزیم‌های سامانهٔ مونواکسژناز، دی اتیل مالئات (DEM)، سولفات سدیم سولفوبرموفتالین (BSP) و اتاکرینیک اسید (EA) برای مهار سامانهٔ گلوتاتیون اس‌ترانسفراز استفاده می‌شود (Zhu *et al*., 2011). لازم به ذکر است که این سینرژیست‌ها همگی به شکل اختصاصی عمل نمی‌کنند و بسته به شرایط آزمایش ویژگی مهارکنندگی متفاوتی خواهند داشت. سینرژیست DEF که به عنوان یکی از مهارکننده‌های استراز شناخته می‌شود، در برخی دزها نیز مهارکنندهٔ سیتوکروم P_{450} است (Valles *et al*., 1997; Scott, 1990; Liu & Yue, 2000; Sanchez-Arroyo *et al*., 2001). همچنین این سینرژیست می‌تواند مهارکنندهٔ آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز نیز باشد (Tsagkarakou *et al*., 2002).

یکی از مهم‌ترین ترکیبات مهارکننده که مطالعات زیادی روی آن انجام گرفته است، پی‌پرونیل بوتوکساید از مشتقات متیلن دی‌اکسی فنیل است. متابولیسم حشره‌کش‌ها را می‌توان با افزایش سمیت حشره‌کش‌ها در زمان استفاده از سینرژیست‌هایی که مسیر ویژه‌ای را مهار می‌کنند، یا با مخلوط کردن حشره‌کش‌هایی که دارای مسیر متابولیکی مشابهی نیستند مشخص کرد (Scott, 1999). سینرژیست PBO برای بررسی نقش آنزیم‌های استراز در سم‌زدایی و تشخیص سازوکار مقاومت نیز به‌کار می‌رود. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مهار شدن استراز بی‌درنگ بعد از کاربرد حشره‌کش‌ها یا توأم با آنها در زمان استفاده از این سینرژیست‌ها اتفاق نمی‌افتد. به عبارت دیگر، بایستی ساعتی پس از کاربرد PBO حشره‌کش تحت نظر را به‌کار برد تا تأثیرات مهارکننده در استراز مشاهده گردد. مهار استراز در تیمار *Helicoverpa armigera* با PBO و DDA به‌ترتیب ۴ و ۸ ساعت بعد اتفاق می‌افتد (Abd El-Latif & Subrahmanyam, 2010). در پژوهشی دیگر، مطالعات *in vivo* نشان داد که پیوند شدن PBO و مهار آنزیم به‌کندی صورت می‌گیرد؛ به‌نحوی که بیشینهٔ مهار استرازها ۹ تا ۱۰ ساعت بعد از تیمار بیوتیپ بی *Bemisia tabaci* اتفاق می‌افتد (Young *et al*., 2006). در مطالعات آمده است که این احتمال وجود دارد که PBO با افزایش انتقال حشره‌کش‌ها در طول کوتیکول حشره ویژگی سینرژیستی خود را بروز دهد (Li *et al*., 2007). البته این ویژگی عمل PBO وابسته به دز است. نقش PBO در سمیت برخی حشره‌کش‌ها مانند دیازینون در مگس اسب بررسی و نشان داده شده است که PBO سمیت دیازینون را زمانی کاهش می‌دهد که غلظت به‌کاررفتهٔ PBO بالا باشد (۰.۵٪) و زمانی که غلظت در حد متوسط (۰.۲٪) بود، هیچ تأثیری مشاهده نشد. همچنین در دزهای پایین (۰.۱٪) PBO به‌طور مؤثری سمیت دیازینون را افزایش داد (Li *et al*., 2007). با توجه به موارد ذکرشده، PBO تحت شرایطی می‌تواند نقش مهارکنندهٔ آنزیم‌های سم‌زدا را داشته باشد که البته این عمل بسته به دز، زمان تیمار (قبل، بعد از کاربرد یا مخلوط با حشره‌کش) و گونهٔ حشره متفاوت است (Young *et al*., 2005; Gunning *et al*., 1999; Gunning *et al*., 1997).

با توجه به اهمیت موضوع مقاومت حشرات به حشره‌کش‌ها و به اثبات رسیدن آن در نمونهٔ پسیل معمولی پسته، *Agonoscena pistacia*، به عنوان یکی از آفات مهم و کلیدی پسته و مشخص شدن سازوکارهای مقاومت متابولیکی این حشره در ایران، انجام پژوهش‌هایی در ارتباط با شکستن مقاومت و به عبارت دیگر افزایش حساسیت جمعیت مقاوم به آفت‌کش‌های معمول ضروری به نظر می‌رسد. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که سازوکار مقاومت در جمعیت‌های مقاوم پسیل پسته به فوزالن و آمیتراز، افزایش استراز و گلوتاتیون اس‌ترانسفراز است (Alizadeh *et al*., 2011-2013). یکی از سینرژیست‌هایی که برای مهار آنزیم‌های سم‌زدا به‌کار می‌رود ترکیب پی‌پرونیل بوتوکساید است. حال با توجه

Archive of SID

www.SID.ir

به اینکه تاکنون نقش PBO در مهار آنزیم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در فرم‌های مختلف پسیل پسته ارزیابی نشده است و مبحث مقاومت دربارهٔ پسیل معمولی پسته اهمیت زیادی دارد، انجام پژوهش‌هایی در این زمینه ضروری است. در این راستا، تفاوت فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در فرم‌های تابستانه و زمستانهٔ پسیل و همچنین تأثیر پی‌پرونیل بوتوکساید بر فعالیت این آنزیم در پسیل پسته ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

ابتدا برگ‌های آلوده به حشرات کامل فرم تابستانه پسیل پسته در فصل تابستان و فرم زمستانه در فصل پاییز از باغ تحت نظر واقع در قسمت مرکزی شهرستان رفسنجان و به مختصات جغرافیایی "۴۲/۳۱۶۴ '۲۳ °۳۰ شمال و "۵۱/۱۱۷۷ '۵۶ °۵۵ که گزارش مقاومت به فوزالن و آمیتراز برای آن به ثبت رسیده بود (Alizadeh *et al.*, 2011-2013) جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از حذف حشرات کامل از روی آنها، برگ‌ها در اتاق رشد با دمای ۲۶±۲ سلسیوس، رطوبت ۵ ± ۴۵ درصد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از طی شدن این زمان از پوره‌های سنین ۵، حشرات کامل ظاهرشده کمتر از ۲۴ ساعت با هم اختلاف داشتند و بدین ترتیب هم‌سن‌سازی انجام گرفت.

مواد شیمیایی

سینرژیست پای‌پرونیل بوتوکساید، آلفا نفتیل استات از شرکت واکو، ۱ کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB) و گلوتاتیون احیاشده (GSH) از شرکت سیگماکم تهیه شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی

تیمار حشرات کامل پسیل با دزهای مختلف PBO

تیمار حشرات کامل با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از PBO و شاهد (استون) از روش باقی‌مانده در لولهٔ شیشه‌ای (RCV) مطابق روش Bues *et al.* (2003)، و با کمی تغییرات توسط Alizadeh *et al.* (2011)، که برای پسیل پسته معرفی شده است، انجام گرفت. پس از در معرض قرار دادن حشرات با دزهای مختلف PBO، در زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت، ۲۰۰ حشرهٔ زنده در ۳ تکرار به میکروتیوب منتقل شد و تا زمان سنجش آنزیم‌های GST، در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری گردید. همچنین ۲۰۰ حشرهٔ کامل در ۳ تکرار نیز در زمان شروع آزمایش به عنوان زمان صفر فریز شد.

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون اس‌ترانسفراز (GST)

حشرات کامل پسیل در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سرد ۱۰ میلی‌مولار (pH ۷) هموژنایز شدند. بعد از هموژنایز کردن، نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شدند. فعالیت گلوتاتیون اس‌ترانسفراز با استفاده از زیرنهشت ۱، کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB) و گلوتاتیون احیاشده (GSH) طبق روش Habig *et al.* (1974)، با کمی تغییرات سنجش شد. ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط واکنش که شامل CDNB (۱ میلی‌مولار) و گلوتاتیون احیاشده در بافرفسفات (۰/۱ مولار و pH ۷) و۱۰ میکرولیتر نمونهٔ حاوی آنزیم بود، داخل کیووت ریخته و با طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Analytica Spect 250 سنجش شد. حداقل چهار بار تکرار سنجش برای هر یک از تیمارها صورت گرفت. از ضریب جذب ۱ ۲،۴ دی‌نیتروفنیل گلوتاتیون[2] (ε340nm= 9.6 mM-1 cm-1) برای تبدیل تغییرات جذب در فعالیت گلوتاتیون اس‌ترانسفراز به محصول واکنش استفاده شد. سنجش پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش Bradford (1976) انجام گرفت.

تجزیهٔ داده‌ها

مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن توسط نرم‌افزار SPSS 19 و رسم نمودارها با نرم‌افزار SigmaPlot 10.0 انجام گرفت.

1. Extinction coefficient
2. 2,4-dinitrophenylglutatione

Archive of SID

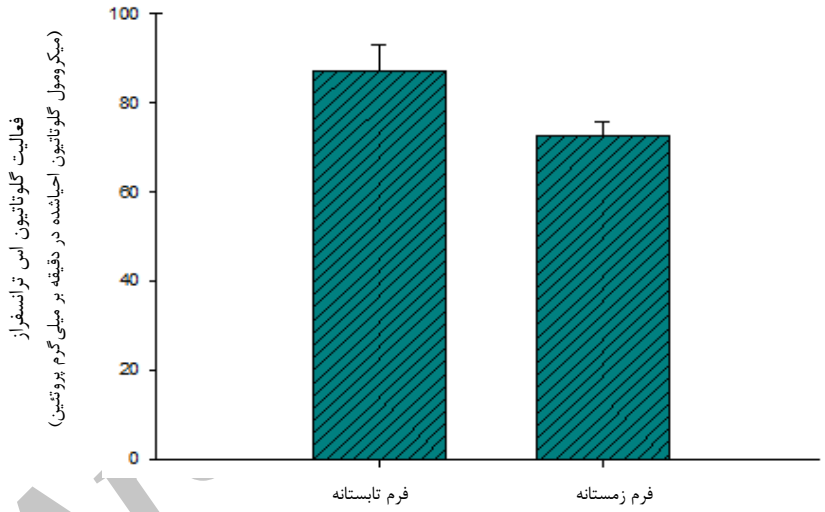
www.SID.ir

نتایج و بحث

میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در فرم‌های تابستانه و زمستانه پسیل پسته

فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز فرم تابستانه و زمستانه پسیل با استفاده از سوبسترای ۱، کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB) سنجش شد و با توجه به شکل ۱، فعالیت GST مربوط به فرم تابستانه و زمستانه به‌ترتیب ۸۷/۳ و ۷۲/۲ میکرومول گلوتاتیون احیاشده در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد که اختلاف معناداری ($P<۰/۰۵$) در فعالیت گلوتاتیون اس‌ترانسفراز بین فرم‌ها وجود نداشت.

تاکنون اطلاعاتی دربارهٔ تفاوت فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در فرم‌های مختلف پسیل پسته وجود نداشته است؛ در حالی که در حشرات دیگر مانند پسیل گلابی *Psylla piricolla* و *Cacopsyllid pyri* افزایش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا مانند سیتوکرم P450 در فرم زمستانه نسبت به فرم تابستانه دیده شده است (Vandebaan *et al.*, 1989; Hugo *et al.*, 2006). دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا با حساسیت کمتر فرم‌های زمستانه نسبت به آفت‌کش‌ها بیان شده است(Hugo *et al.*, 2006). با وجود اینکه اطلاعات چندانی در زمینهٔ حساسیت کمتر فرم‌های زمستانه پسیل به آفت‌کش‌ها وجود ندارد، اما این احتمال وجود دارد که فعالیت دیگر آنزیم‌های سم‌زدا در فرم زمستانه پسیل بیشتر از فرم تابستانه باشد که پژوهش‌های بیشتر در این زمینه ضرورت دارد.



شکل ۱. نمودار مقایسهٔ فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز با سوبسترا ۱، کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن در فرم‌های تابستانه و زمستانهٔ حشرات کامل *Agonoscena pistaciae*

میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز دراثر دزهای مختلف PBO

اثر غلظت‌های مختلف PBO (۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم بر لیتر) با استفاده از سوبسترای ۱،کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB) روی حشرات کامل فرم تابستانه پسیل پسته در میزان مهار فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز (GST) در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به این نتایج بیشترین میزان مهارکنندگی آنزیم توسط PBO در این فرم در پایین‌ترین غلظت ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر صورت گرفت. با افزایش غلظت، میزان فعالیت GST افزایش می‌یابد.

میزان فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در زمان‌های مختلف پس از تیمار حشرات کامل با PBO

پس از تعیین غلظت مناسب PBO (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) که کمترین فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز را نشان داد، میزان فعالیت این آنزیم در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تیمار حشرات کامل با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر PBO به‌ترتیب ۸۷/۳، ۹۲/۱، ۶۵/۲، ۳۱/۴ و ۳۸/۱

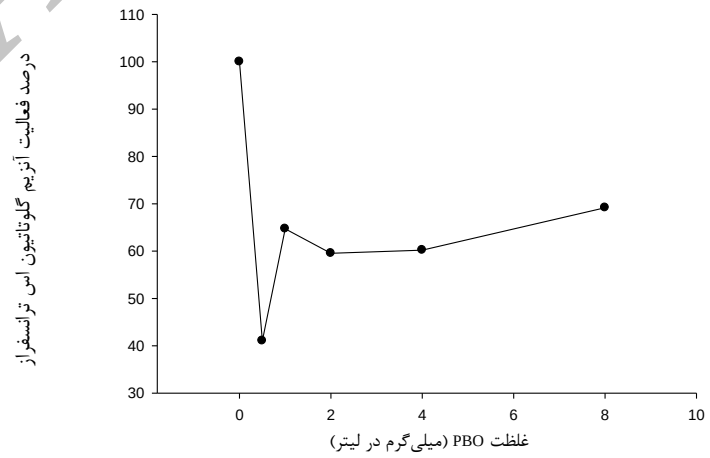
www.SID.ir

میکرومول گلوتاتیون احیاشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به‌دست آمد. با توجه به شکل ۲ نتایج این بخش نشان داد که در ساعت اول بعد از کاربرد سینرژیست افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد دیده شد و با گذشت زمان این فعالیت، روند ثابتی را نشان داد.

افزایش فعالیت گلوتاتیون اس‌ترانسفراز یکی از سازوکارهای مقاومت حشرات به حشره‌کش‌ها است و توسط مهارکنندهٔ اختصاصی دی‌اتیل مالئات (DEM) به عنوان سینرژیست در شناسایی نقش این آنزیم به‌کار می‌رود (Zhu *et al.*, 2011). با وجود این، چنین به نظر می‌رسد که PBO هم توانسته فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز را نزدیک به ۶۰٪ کاهش دهد (شکل ۳).

با توجه به نتایج این بخش، افزایش فعالیت آنزیم GST، ۱ ساعت پس از تیمار پسیل با PBO صورت گرفته است، این عملکرد احتمالاً به این دلیل است که در ساعات اولیه زمانی که آفت تحت استرس مواد خارجی از جمله سینرژیست‌ها و حشره‌کش‌ها قرار می‌گیرد، فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا از جمله گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در جهت کاهش سمیت مواد خارجی مانند PBO افزایش می‌یابد (Hassall, 1990). تاکنون اطلاعاتی در زمینهٔ وابستگی مهار آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز با دز مهارکننده و زمان پس از تیمار پسیل با مهارکننده وجود نداشته است. در حالی‌که مطالعات زیادی در رابطه با اهمیت سینرژیست‌ها و نقش آنها در مهار آنزیم‌های سم‌زدا در حشرات دیگر انجام گرفته است. در پژوهش‌های پیشین نشان داده شده است که افزایش درصد مهارکنندهٔ آنزیم استیل کولین استراز در غلظت‌های پایین PBO روی *Helicoverpa armigera* اتفاق می‌افتد و اینکه PBO تحت شرایطی می‌تواند نقش مهارکنندهٔ استراز را داشته باشد که البته این عمل بسته به دز، زمان تیمار (قبل، بعد از کاربرد یا مخلوط با حشره‌کش) و گونهٔ حشره متفاوت است (Gunning, 2006).

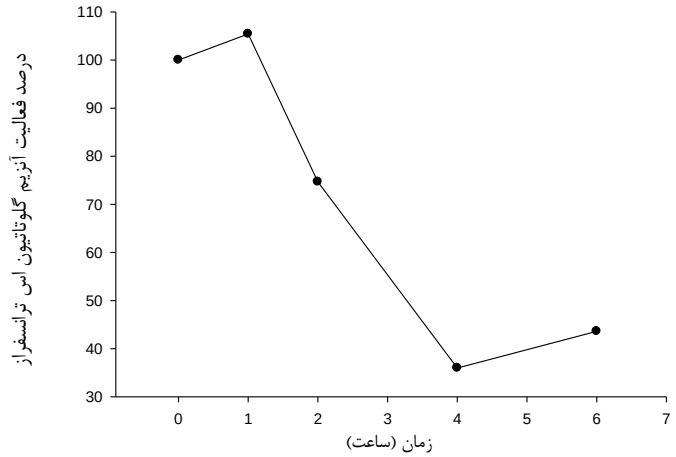
پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مهارشدن آنزیم‌های سم‌زدا مانند استرازها با سینرژیست‌ها بی‌درنگ بعد از کاربرد حشره‌کش‌ها یا توأم با آنها در زمان استفاده از این سینرژیست‌ها اتفاق نمی‌افتد. به عبارت دیگر، بایستی ساعتی پس از کاربرد PBO حشره‌کش تحت نظر را به‌کار برد تا تأثیرات مهارکننده را در آنزیم سم‌زدا مشاهده گردد. برای مثال مهار استراز در تیمار *H. armigera* با PBO و DDA به‌ترتیب ۴ و ۸ ساعت بعد اتفاق می‌افتد (Abd El-Latif & Subrahmanyam, 2010). همهٔ این گزارش‌ها تأییدکنندهٔ این است که مدت زمانی لازم است تا فعالیت آنزیم سم‌زدا رخ دهد. در نتایج پژوهش حاضر نیز این فرضیه ثابت شد که ویژگی مهارکنندهٔ PBO روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز وابسته به زمان است. با توجه به بررسی‌های Alizadeh *et al.* (2013)، روی این جمعیت، یکی از عوامل مقاومت، افزایش فعالیت گلوتاتیون اس ترانسفراز است. به نظر می‌رسد که با به‌کار بردن این نتیجه بتوان مقاومت را با استفاده از این سینرژیست مدیریت کرد.



شکل ۲. نمودار فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در غلظت‌های متفاوت PBO در حشرات کامل فرم تابستانهٔ پسیل پسته

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. نمودار فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در زمان‌های مختلف همراه با PBO در حشرات کامل فرم تابستانهٔ پسیل پسته

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش نتایج مقایسهٔ فرم‌های تابستانه و زمستانهٔ پسیل پسته نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز در دو فرم تفاوتی با هم ندارد. با وجود اینکه حساسیت فرم‌های مختلف نسبت حشره‌کش‌ها متفاوت است، این احتمال وجود دارد که فعالیت دیگر آنزیم‌های سم‌زدا در این دو فرم متفاوت باشد. نقش مهارکنندهٔ PBO در فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز نشان داد که PBO دارای نقش مهارکننده در فعالیت این آنزیم است و این ویژگی وابسته به دز و زمان پس از تیمار است. به‌نحوی که بیشترین درصد مهارکنندگی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر PBO و ۴ ساعت پس از تیمار حشرات کامل پسیل با PBO اتفاق می‌افتد. با توجه به اینکه جمعیت تحت مطالعه به برخی آفت‌کش‌ها مقاوم شده است و افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس‌ترانسفراز به عنوان یکی از سازکارهای مقاومت در این جمعیت شناخته شده است، به نظر می‌رسد که بتوان با استفاده از این راهبرد، مدیریت مقاومت را تا اندازه‌ای عملی کرد. در فرمولاسیون آفت‌کش‌های میکروکپسول این قابلیت وجود دارد که ابتدا سینرژیست و پس از ساعتی مشخص آفت‌کش رها شود و از این طریق از نقش مهارکنندهٔ سینرژیست حداکثر بهره‌برداری صورت گیرد.

REFERENCES

1. Abd El-Latif, A.O. & Subrahmanyam, B. (2010). Pyrethroid synergists suppress esterase-mediated resistance in Indian strains of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97, 279-288.
2. Alizadeh, A., Talebi, Kh., Hosseininaveh, V. & Ghadamyari, M. (2011). Metabolic resistance mechanisms to phosalone in the common pistachio psyllid, *Agonoscena pistaciae* (Hem.: Psyllidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101, 59-64.
3. Alizadeh, A., Talebi, Kh., Hosseininaveh, V. & Ghadamyari, M. (2013). Susceptibility of the common pistachio psyllid, Agonoscena pistaciae (Hem.: Psyllidae) to amitraz and imidacloprid in Kerman province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 1, 153-161. (in Farsi)
4. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding, *Analytical Biochemistry*, 7, 248-254.
5. Bues, R., Boudinhon, L. & Toubon, L. (2003). Resistance of pear psylla (*Cacopsylla pyri* L.; Hom:Psyllidae) to deltamethrin and synergism with piperonyl butoxide. *Journal of Applied Entomology*, 127, 305-312.
6. Clark, A.G., Shamaan, N.A. & Sinclair, M.D. (1986). Insecticide metabolism by multiple glutathione Stransferases in two strains of the house fly, Musca domestica (L). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 25, 169-175.
7. Clark, A.G. & Shamaan, N.A. (1984). Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22, 249-261.
8. Enayati, A.A., Ranson, H. & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance, *Insect Molecular Biology*, 14, 3-8.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Fournier, D., Bride, J.M., Hoffman, F. & Karch, F. (1992). Acetylcholinesterase two types of modifications confer resistance to insecticides. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 14270-14274.
10. Gunning, R.V. (2006). Inhibition of carbamate- insensitive acetylcholinesterase by piperonyl butoxide in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Molecular Neuroscience*, 30, 21-22.
11. Gunning, R.V., Moores, G.D. & Devonshire, A.L. (1997). Esterases and fenvalerate resistance in a Weld population of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 58, 155-162.
12. Gunning, R.V., Moores, G.D. & Devonshire, A.L. (1999). Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63, 50-62.
13. Habig, W.H., M.J. Pabst, & W.B. Jakoby. (1974). Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
14. Hassall, K. A. (1990). *The biochemistry and uses of pesticides*. 2nd ed. Macmillan Press.
15. Hugo, E., Baan, V.D. & Croft, A. (2006). Resistance to insecticides in winter and summer forms of pear psylla, *Psylla pyricola. Pesticide Science*, 32, 225-235.
16. Li, A.L., Guerrero, F.D. & Pruett, J.H. (2007). Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 147-155.
17. Liu, N. & Yue, X. (2000). Insecticide resistance and crossresistance in the house fly (Diptera: Muscidae), *Journal of Economic Entomology*, 93, 1269.
18. Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wicheer, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L.A., Somboon, P., Lycett, G. & Ranson H. (2011). The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 203-209.
19. Qin, G., Jia, M., Liu, T., Zhang, X. & Guo, Y. (2013). Characterization and Functional Analysis of Four Glutathione *S*-Transferases from the Migratory Locust, *Locusta migratoria*. *PloS one Journal*, 67, 609-740.
20. Ramoutar, D., Cowles, R.S. & Alm, S.R. (2009). Pyrethroid resistance mediated by enzyme detoxification in *Listronotus maculicollis* (Coleoptera: Curculionidae) from Connecticut. *Journal of Economic Entomology*, 102, 1203-1208.
21. Ranson, H., Rossiter, L. & Ortelli, F. (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 359, 295-304.
22. Salinas, A.E. & Wong, M.G. (1999). Glutathione S-Transferases. A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 6, 279-309.
23. Sanchez-Arroyo, H., Koehler, P.G. & Valles, S.M. (2001). Effects of the synergists piperonyl butoxide and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate on propoxur pharmacokinetics in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae), *Journal of Economic Entomology*, 94, 1209.
24. Sarkar, M., Bhattacharyya, I.K., Borkotoki, A., Goswami, D., Rabha, B., Baruah, I. & Srivastava, R.B. (2009). Insecticide resistance and detoxifying enzyme activity in the principal bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*, in northeastern India. *Medical and Veterinary Entomology*, 23, 122-131.
25. Sawicki, R., Singh, S.P. & Mondal, A.K. (2003). Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Deltaclass (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochemical Journal*, 370, 661-669.
26. Scott, J.G. (1990). Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, strategies and pitfalls. In: *Pesticides resistance in arthropods*, R. T. Roush and E. Tabashnik (Eds.). Chapman and hall Newyork and Landon, 39-57.
27. Scott, J.G. (1999). Cytochromes P_{450} and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 757-777.
28. Tsagkarakou, A., Pasteur, N., Cuany, A., Chevillon, C. & Navajas, M. (2002). Mechanisms of resistance to organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greece, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 417-424.
29. Valles, S.M., Koehler, P.G. & Brenner, R.J. (1997). Antagonism of fipronil toxicity by piperonyl butoxide and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate in the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), *Journal of Economic Entomology*, 90, 1254-1258.
30. Vandebaan, H., Westigard, P., Burts, E. & Croft, B. (1989). Seasonal susceptibility to insecticides in insecticide-resistant pear psylla, (Homoptera: Psyllidae). *Crop Protection*, 8, 122-126.
31. Vontas, J.G., Small, G.J. & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in Nilaparvata lugens. *Biochemical Journal*, 357, 65-72.

Archive of SID

www.SID.ir

32. Young, S.J., Gunning, R.V. & Moores, G.D. (2005). The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 61, 397-401.
33. Young, S.J., Gunning, R.V. & Moores, G.D. (2006). Effect of pretreatment with piperonyl butoxide on pyrethroid efficacy against insecticide resistance *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctoidae) and *Bemisia tabaci*(Stenorryncha:Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 62, 111-119.
34. Zhu, Y.C., Snodgrass, G. & Chen, M.S. (2006). Comparative study on glutathione s-transferase activity, cDNA, and gene expression between malathion susceptible and resistant strains of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 62-72.
35. Zhu, Y.C., West, S., Snodgrass, G. & Luttrell, R. (2011). Variability in resistance-related enzyme activities in field populations of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 265-274.

Archive of SID

www.SID.ir