

## نقش مهارکننده پای پرونیل بوتوکساید در میزان فعالیت ویژه آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز پسیل معمولی پسته، *Agonoscena pistaciae*

پویان مصلحی<sup>۱</sup>، علی علیزاده<sup>۲\*</sup> و محمد قدمیاری<sup>۳</sup>

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۱/۱۲)

### چکیده

گلوکاتایون اس ترانسفرازها نقش بسیار مهمی در غیرسمی کردن ترکیبات آفت کش و مقاومت حشرات در برابر حشره کشها ایفا می کنند. در این پژوهش تفاوت فعالیت آنزیم های گلوکاتایون اس ترانسفراز در دو فرم تابستانه و زمستانه پسیل بررسی شده است و اثر غلظت های مختلف پی پرونیل بوتوکساید (PBO) (۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی گرم بر لیتر) روی حشرات کامل پسیل پسته در میزان مهار فعالیت این آنزیم با استفاده از سوبسترای ۱، کلرو ۲ و ۴ دی نیترو بنزن (CDNB) انجام گرفته است. همچنین میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز در زمان های 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 فرم های مختلف پسیل با هم ختلاف معناداری ( $P < 0/05$ ) نداشتند و کمترین میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز، یا به عبارتی بیشترین میزان مهارکنندگی توسط پای پرونیل بوتوکساید در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر دیده شد و بیشترین مهارکنندگی در زمان ۴ ساعت بعد از کاربرد سینرژست (PBO) صورت گرفت. با توجه به نتایج این پژوهش چنین به نظر می رسد که بتوان با کاربرد مناسب دز PBO، آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز را مهار و با در نظر گرفتن زمان حداکثر مهار توسط این سینرژست در مدیریت مقاومت پسیل به آفت کشها سود برد.

**واژه های کلیدی:** پسیل پسته، سینرژست، مدیریت مقاومت به آفت کشها، PBO.

### مقدمه

بسیاری از مطالعات انجام گرفته بر گلوکاتایون اس ترانسفرازهای حشرات به نقش آنها در تجزیه و خنثی سازی ترکیبات خارجی به ویژه حشره کشها، سموم گیاهی و دفع انواع رادیکال های آزاد در مسیر متابولیکی آفت کشها 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). گلوکاتایون اس ترانسفرازها نقش بسیار مهمی در مقاومت حشرات در برابر حشره کشها ایفا می کنند؛ به طوری که

از آنزیم هایی که در سم زدایی آفت کشها نقش مهمی ایفا می کنند می توان به گلوکاتایون اس ترانسفرازها (GST) اشاره کرد (Salinas & Wong, 1999). این آنزیمها اساساً واکنش پیوند بین ترکیبات الکترون دوست با گروه تیول مولکول گلوکاتایون احیاشده را تسهیل می کنند. این عمل معمولاً قابلیت انحلال در آب و دفع شدن محصول واکنش را بیشتر می کند (Habig et al., 1974; Clark et al., 1984).

مهارکننده در استراز مشاهده گردد. مهار استراز در تیمار *Helicoverpa armigera* با PBO و DDA به ترتیب ۴ و ۸ ساعت بعد اتفاق می افتد (Abd El- (Latif & Subrahmanyam, 2010). در پژوهشی دیگر، مطالعات *in vivo* نشان داد که پیوند شدن PBO و مهار آنزیم به کندی صورت می گیرد؛ به نحوی که بیشینه مهار استرازها ۹ تا ۱۰ ساعت بعد از تیمار بیوتیپ بی *Bemisia tabaci* اتفاق می افتد (Young et al., 2006). در مطالعات آمده است که این احتمال وجود دارد که PBO با افزایش انتقال حشره کش ها 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 حشره کش ها مانند دیازینون در مگس اسب بررسی و نشان داده شده است که PBO سمیت دیازینون را زمانی کاهش می دهد که غلظت به کاررفته 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 به طور مؤثری سمیت دیازینون را افزایش داد (Li et al., 2007). با توجه به موارد ذکر شده، PBO تحت شرایطی می تواند نقش مهارکننده آنزیم های سمزدا را داشته باشد که البته این عمل بسته به دز، زمان تیمار (قبل، بعد از کاربرد یا مخلوط با حشره کش) و گونه حشره متفاوت است (Young et al., 2005; Gunning et al., 1999).

با توجه به اهمیت موضوع مقاومت حشرات به حشره کش ها و به اثبات رسیدن آن در نمونه پسیل معمولی پسته، *Agonoscyta pistacia*، به عنوان یکی از آفات مهم و کلیدی پسته و مشخص شدن سازوکارهای مقاومت متابولیکی این حشره در ایران، انجام پژوهش هایی در ارتباط با شکستن مقاومت و به عبارت دیگر افزایش حساسیت جمعیت مقاوم به آفت کش های معمول ضروری به نظر می رسد. پژوهش های پیشین نشان داده است که سازوکار مقاومت در جمعیت های مقاوم پسیل پسته به فوزالن و آمیتراز، افزایش استراز و گلوکاتایون اس ترانسفرز است (Alizadeh et al., 2011-2013). یکی از سینرژیست هایی که برای مهار آنزیم های سمزدا به کار می رود ترکیب پی پرونیل بوتوکساید است. حال با توجه

افزایش فعالیت گلوکاتایون اس ترانسفرزها در بسیاری از استرین های 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 متابولیکی (درگیر بودن آنزیم های سمزدا در مقاومت) را با به کار بردن برخی ترکیبات سینرژیست که قادرند این سامانه ها را مهار کنند به خوبی می توان شناخت. به طور کلی در آزمایش های معمول از پی پرونیل بوتوکساید (PBO) مالئات (DEM)، سولفات سدیم سولفورموفتالین (BSP) و اتاکرینیک اسید (EA) برای مهار سامانه گلوکاتایون اس ترانسفرز استفاده می شود (Zhu et al., 2011). لازم به ذکر است که این سینرژیست ها همگی به شکل اختصاصی عمل نمی کنند و بسته به شرایط آزمایش ویژگی مهارکنندگی متفاوتی خواهند داشت. سینرژیست DEF که به عنوان یکی از مهارکننده های استراز شناخته می شود، در برخی دزها نیز مهارکننده سیتوکروم P<sub>450</sub> است (Valles et al., 1997; Scott, 1999; Liu & Yue, 2000; Sanchez-Arroyo et al., 2001). همچنین این سینرژیست می تواند مهارکننده آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفرز نیز باشد (Tsagkarakou et al., 2002).

یکی از مهم ترین ترکیبات مهارکننده که مطالعات زیادی روی آن انجام گرفته است، پی پرونیل بوتوکساید از مشتقات متیلن دی اکسی فنیل است. متابولیسیم حشره کش ها را می توان با افزایش سمیت حشره کش ها در زمان استفاده از سینرژیست هایی که مسیر ویژه ای را مهار می کنند، یا با مخلوط کردن حشره کش هایی که دارای مسیر متابولیکی مشابهی نیستند مشخص کرد (Scott, 1999). سینرژیست PBO برای بررسی نقش آنزیم های استراز در سم زدایی و تشخیص سازوکار مقاومت نیز به کار می رود. پژوهش ها نشان می دهد که مهار شدن استراز بی درنگ بعد از کاربرد حشره کش ها یا توأم با آنها در زمان استفاده از این سینرژیست ها اتفاق نمی افتد. به عبارت دیگر، بایستی ساعتی پس از کاربرد PBO حشره کش تحت نظر را به کار برد تا تأثیرات

انجام گرفت. پس از در معرض قرار دادن حشرات با دزهای مختلف PBO، در زمان‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت، ۲۰۰ حشره زنده در ۳ تکرار به میکروتیوب منتقل شد و تا زمان سنجش آنزیم‌های GST، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. همچنین ۲۰۰ حشره کامل در ۳ تکرار نیز در زمان شروع آزمایش به عنوان زمان صفر فریز شد.

**اندازه‌گیری فعالیت گلوکوتایون اس ترانسفراز (GST)**  
حشرات کامل پسپیل 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 درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. فعالیت گلوکوتایون اس ترانسفراز با استفاده از زیرنهیشت ۱، کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB) و گلوکوتایون احیاشده (GSH) طبق روش *Habig et al.* (1974)، با کمی تغییرات سنجش شد. ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط واکنش که شامل CDNB (۱ میلی‌مولار) و گلوکوتایون احیاشده در بافر فسفات (۱/۱) مولار و (pH ۷) و ۱۰ میکرولیتر نمونه 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 دی‌نیترو فنیل گلوکوتایون ۲-  $\epsilon_{340\text{nm}} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  برای تبدیل تغییرات جذب در فعالیت گلوکوتایون اس ترانسفراز به محصول واکنش استفاده شد. سنجش پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش *Bradford* (1976) انجام گرفت.

#### تجزیه داده‌ها

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

به اینکه تاکنون نقش PBO در مهار آنزیم‌های گلوکوتایون اس ترانسفراز در فرم‌های مختلف پسپیل پسته ارزیابی نشده است و مبحث مقاومت درباره پسپیل معمولی پسته اهمیت زیادی دارد، انجام پژوهش‌هایی در این زمینه ضروری است. در این راستا، تفاوت فعالیت آنزیم گلوکوتایون اس ترانسفراز در فرم‌های تابستانه و زمستانه پسپیل و همچنین تأثیر پی‌پرونیل بوتوکساید بر فعالیت این آنزیم در پسپیل پسته ارزیابی شد.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع‌آوری نمونه

ابتدا برگ‌های آلوده به حشرات کامل فرم تابستانه پسپیل 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 دوره 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 ظاهر شده کمتر از ۲۴ ساعت با هم اختلاف داشتند و بدین ترتیب هم‌سن‌سازی انجام گرفت.

##### مواد شیمیایی

سینرژست پای پرونیل بوتوکساید، آلفا نفتیل استات از شرکت واکو، ۱ کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB) و گلوکوتایون احیاشده (GSH) از شرکت سیگماکم تهیه شد.

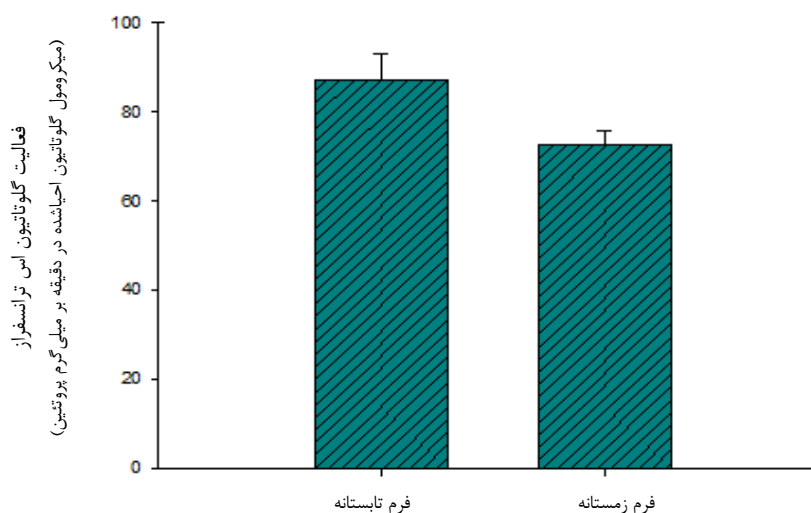
##### آزمون‌های بیوشیمیایی

**تیمار حشرات کامل پسپیل 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 لوله شیشه‌ای (RCV) مطابق روش *Bues et al.* (2003)، و با کمی تغییرات توسط *Alizadeh et al.* (2011)، که برای پسپیل پسته معرفی شده است،

## نتایج و بحث

میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون اس‌ترانسفراز در فرم‌های تابستانه و زمستانه پسیل پسته فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون 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 به ترتیب ۸۷/۳ و ۷۲/۲ میکرومول گلوکاتایون احیاشده در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد که اختلاف معناداری ( $P < 0.05$ ) در فعالیت گلوکاتایون اس‌ترانسفراز بین فرم‌ها وجود نداشت. تاکنون اطلاعاتی درباره تفاوت فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در فرم‌های مختلف پسیل پسته وجود نداشته

است؛ در حالی که در حشرات دیگر مانند پسیل گلابی *Cacopsyllid pyri* و *Psylla piricolla* 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 زمینه 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 مقایسه فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس‌ترانسفراز با سوبسترای ۱، کلرو ۲ و ۴ دی‌نیترو بنزن *Agonoscaen pistaciae* در فرم‌های تابستانه و زمستانه حشرات کامل

پایین‌ترین غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر صورت گرفت. با افزایش غلظت، میزان فعالیت GST افزایش می‌یابد. میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون 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 گلوکاتایون 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 به ترتیب ۸۷/۳، ۹۲/۱، ۶۵/۲، ۳۱/۴ و ۳۸/۱

میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس‌ترانسفراز در اثر دزهای 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 گلوکاتایون اس‌ترانسفراز (GST) در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به این نتایج بیشترین میزان مهارکنندگی آنزیم توسط PBO در این فرم در

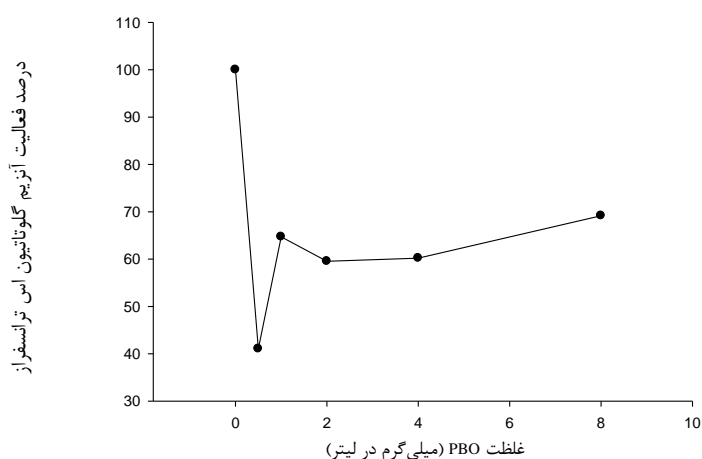
شده است که افزایش درصد مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز در غلظت‌های پایین PBO روی *Helicoverpa armigera* اتفاق می‌افتد و اینکه PBO تحت شرایطی می‌تواند نقش مهارکننده استراز را داشته باشد که البته این عمل بسته به دز، زمان تیمار (قبل، بعد از کاربرد یا مخلوط با حشره‌کش) و گونه حشره متفاوت است (Gunning, 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 به کار برد تا تأثیرات مهارکننده را در آنزیم سم‌زدا مشاهده گردد. برای مثال مهار استراز در تیمار *H. armigera* با PBO و DDA به ترتیب ۴ و ۸ ساعت بعد اتفاق می‌افتد (Abd El-Latif & Subrahmanyam, 2010). همه این گزارش‌ها تأییدکننده این است که مدت زمانی لازم است تا فعالیت آنزیم سم‌زدا رخ دهد. در نتایج پژوهش حاضر نیز این فرضیه ثابت شد که ویژگی مهارکننده PBO روی فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز وابسته به زمان است. با توجه به بررسی‌های Alizadeh *et al.* (2013)، روی این جمعیت، یکی از عوامل مقاومت، افزایش فعالیت گلوکوتاتیون اس ترانسفراز است. به نظر می‌رسد که با به کار بردن این نتیجه بتوان مقاومت را با استفاده از این سینرژیست مدیریت کرد.

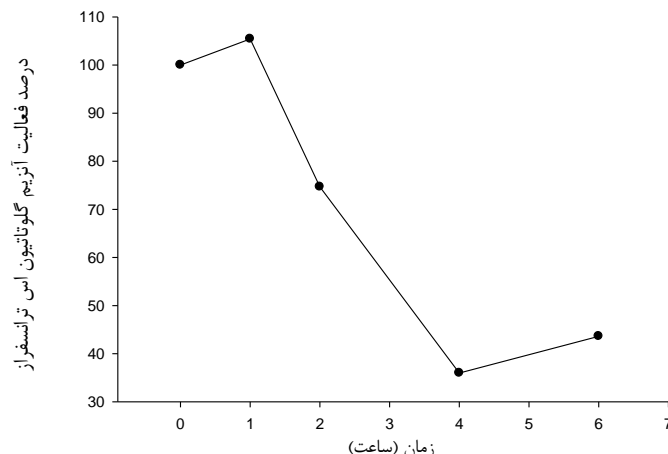
میکرومول گلوکوتاتیون احیاشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. با توجه به شکل ۲ نتایج این بخش نشان داد که در ساعت اول بعد از کاربرد سینرژیست افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد دیده شد و با گذشت زمان این فعالیت، روند ثابتی را نشان داد.

افزایش فعالیت گلوکوتاتیون اس ترانسفراز یکی از سازوکارهای مقاومت حشرات به حشره‌کش‌ها است و توسط مهارکننده اختصاصی دی‌اتیل مالئات (DEM) به عنوان سینرژیست در شناسایی نقش این آنزیم به کار می‌رود (Zhu *et al.*, 2011). با وجود این، چنین به نظر می‌رسد که PBO هم توانسته فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز 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 گلوکوتاتیون اس ترانسفراز در جهت کاهش سمیت مواد خارجی مانند PBO افزایش می‌یابد (Hassall, 1990). تاکنون اطلاعاتی در زمینه وابستگی مهار آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز با دز مهارکننده و زمان پس از تیمار پسیل با مهارکننده وجود نداشته است. در حالی که 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



شکل ۲. نمودار فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز در غلظت‌های متفاوت PBO در حشرات کامل فرم تابستانه پسیل پسته



شکل ۳. نمودار فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز در زمان‌های مختلف همراه با PBO در حشرات کامل فرم تابستانه پسیل پسته

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش نتایج مقایسه فرم‌های تابستانه و زمستانه پسیل پسته نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس ترانسفراز 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 مهارکننده PBO در فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون اس ترانسفراز نشان داد که PBO دارای نقش مهارکننده در فعالیت این آنزیم است و این ویژگی وابسته به دز و زمان پس از تیمار است. به نحوی که بیشترین درصد مهارکنندگی در غلظت ۰/۵

میلی گرم 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 گلوکوتاتیون اس ترانسفراز 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 مهارکننده 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, *Agonosceca 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, *Agonosceca 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 S-transferases 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.

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*. 2<sup>nd</sup> 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. & Orтели, 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<sub>450</sub> and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 757-777.
28. Tsagakarakou, 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 (Diptoptera: 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.

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: Noctuidae) and *Bemisia tabaci*(Stenorrhyncha: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.