بسم الله الرحمن الرحیم

**دانشکده علوم کشاورزی**

**گروه گیاه‌پزشکی**

**( گرایش حشره‌شناسی کشاورزی)**

# خالص‌سازی و بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی گلوتاتیون اس-ترانسفراز پسیل پسته ***Agonoscena pistaciae*** **(Hem.: Psyllidae) حساس و مقاوم به فوزالون**

از:

**سیما زندوکیلی**

استاد راهنما:

**دکتر محمد قدمیاری**

استادان مشاور:

**دکتر علی علیزاده**

**دکتر رضا حسن ساجدی**

دی ۱۳۹۲

تقدیم به پدرم، مظهر صلابت و استواری

او که امروز من آرزوی دیروزش بودم

پیشکش مادرم، مظهر صبر و آرامش

کسی که دعاهایش فردا را برایم آسان می‌کند

و نثار حامی همیشگی‌ام، خواهرم

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت

تحت از پدر و مادر عزیز و خواهر مهربانم که در تمامی مراحل زندگی همراه همیشگی من بودند صمیمانه سپاسگزارم و برایشان بهترین ها را آرزومندم.

از استاد راهنمای گرانقدر جناب آقای **دکتر محمد قدیاری** که با صبر و شکیبایی فراوان، راهنمایی ارزنده ای در جهت بهبود کیفی و تدوین این پایان نامه ارائه فرمودند تشکر و قدردانی می نمایم و از خداوند متعال برای ایشان عزت روز افزون و طول عمر آرزو می نمایم.

از جناب آقایان **دکتر علی علی زاده و دکتر رضا حسن ساجدی** که زحمت مشاوره این پایان نامه را بر عهده گرفتند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از جناب آقای **دکتر محمود رضا آقامعالی** و خانم **دکتر آزاده کریمی** که زحمت باز خوانی متن و داوری این پایان نامه را متقبل شدند سپاسگزارم. همچنین از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی دکتر مجیدیان سپاسگزارم.

از اساتید گرانقدر گروه گیاه پزشکی که افتخار شاگردیشان را داشتم صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از خانم **نازگس معماری زاده، محبوبه شیرینی، بیتا والی زاده** به خاطر کمک های بی دریغشان تشکر و قدردانی می نمایم.

در خاتمه از تمام دوستان و همکلاسی های عزیزم کمال تشکر را دارم.

سیما زندوکیلی

دی ۱۳۹۲

عنوان صفحه

چکیده فارسی ..... ذ
چکیده انگلیسی ..... ر
مقدمه ..... ۱

**فصل اول: کلیات و مرور منابع**

۱-۱- رده بندی، نحوه خسارت و میزبان‌های پسیل پسته ..... ۵
۱-۱-۱- زیست شناسی ..... ۶
۱-۱-۲- کنترل ..... ۷
۱-۱-۲-۱- کنترل بیولوژیکی ..... ۷
۱-۱-۲-۲- کنترل شیمیایی ..... ۹
۱-۲- مقاومت به حشره‌کش‌ها ..... ۱۰
۱-۲-۱- روش‌های تشخیص مقاومت ..... ۱۰
۱-۲-۲- مسیر ایجاد مقاومت ..... ۱۱
۱-۲-۲-۱- مقاومت متابولیکی ..... ۱۱
۱-۲-۲-۱-۱- استرازها ..... ۱۱
۱-۲-۲-۱-۲- مونوکسیژنازها ..... ۱۲
۱-۲-۲-۱-۳- گلوتاتیون اس- ترانسفرازها ..... ۱۲
۱-۲-۲-۲- غیر حساس شدن مکان هدف ..... ۱۳
۱-۲-۲-۳- کاهش نفوذ پذیری کوتیکول حشرات ..... ۱۳
۱-۳- گلوتاتیون اس- ترانسفرازها ..... ۱۳
۱-۳-۱- واکنش‌های متابولیکی وابسته به گلوتاتیون اس- ترانسفرازها ..... ۱۴
۱-۳-۲- توصیف ویژگی سوبسترایی GST ..... ۱۵
۱-۳-۳- متابولیسم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۱۵

۱-۳-۳-۱- نقش گلوتاتیون اس- ترانسفراز در مقاومت به ترکیبات آلی فسفره ..... ۱۶
۱-۳-۳-۲- نقش گلوتاتیون اس- ترانسفراز در مقاومت به ترکیبات آلی کلره ..... ۱۶
۱-۳-۳-۳- نقش گلوتاتیون اس- ترانسفراز در مقاومت به پایروتیروئیدها ..... ۱۷
۱-۳-۳-۴- نقش گلوتاتیون اس- ترانسفراز در مقاومت گیاهان آللوکمیکال ..... ۱۷
۱-۳-۵- سه خانواده از پروتئین‌های غیر وابسته به GST در یوکاریوت‌ها ..... ۱۷
۱-۳-۶-۱- طبقه بندی و نام‌گذاری گلوتاتیون اس- ترانسفرازها ..... ۱۸
۱-۳-۶-۲- راهنمای نام‌گذاری برای گلوتاتیون اس- ترانسفرازها ..... ۱۹
۱-۳-۷- کلاس‌های گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۱۹
۱-۳-۸- نحوه عملکرد گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۲۰
۱-۳-۹- ساختار آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۲۱
۱-۳-۱۰- آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز و مقاومت به حشره‌کش‌ها ..... ۲۱
۱-۳-۱۱- تکنیک‌های مختلف خالص سازی ..... ۲۳
۱-۳-۱۱-۱- رسوب دهی با آمونیوم سولفات ..... ۲۳
۱-۳-۱۱-۲- کروماتوگرافی ستونی ..... ۲۴
۱-۳-۱۱-۲-۱- کروماتوگرافی بر اساس تبادل یونی ..... ۲۴
۱-۳-۱۱-۲-۲- کروماتوگرافی بر اساس اندازه (ژل فیلتراسیون) ..... ۲۴
۱-۳-۱۱-۳-۳- کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی ..... ۲۵
۱-۳-۱۱-۴- فاکتورهای محدود کننده در ارتباط با رویکرد خالص سازی ..... ۲۵

**فصل دوم: مواد و روش‌ها**

۲-۱-۱- مواد شیمیایی ..... ۲۷
۲-۲- آزمون زیست‌سنجی ..... ۲۷
۲-۲-۱- پرورش حشرات ..... ۲۷
۲-۲-۲- آزمون مقدماتی برای تعیین دامنه دوز ..... ۲۷

۲-۲-۳- آزمون نهایی زیست‌سنجی ..... ۲۸
۲-۳- جمع آوری حشرات حساس و مقاوم فرم‌تابستان و زمستان‌گذران پسیل پسته ..... ۲۸
۲-۴- تهیه عصاره آنزیمی ..... ۲۹
۲-۵- تهیه سوبسترا برای سنجش آزمون گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۲۹
۲-۶- سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۲۹
۲-۷- خالص سازی آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۳۰
۲-۷-۱- سانتریفیوژ ..... ۳۰
۲-۷-۲- رسوب دهی با آمونیوم سولفات ..... ۳۰
۲-۷-۳- دیالیز نمونه ..... ۳۰
۲-۷-۴- آماده سازی ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی ..... ۳۰
۲-۸- بافرها ..... ۳۱
۲-۸-۱- بافر فسفات ..... ۳۱
۲-۸-۲- بافر مخلوط استات- گلایسین- فسفات (یونیورسال) ..... ۳۱
۲-۸-۳- بافر تریس ..... ۳۱
۲-۸-۴- بافر Elution ..... ۳۲
۲-۹- آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط به گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۳۲
۲-۹-۱- اندازه گیری غلظت پروتئین ..... ۳۲
۲-۹-۲- اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۳۲
۲-۹-۳- بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۳۳
۲-۹-۴- بررسی اثر دما بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۳۳
۲-۹-۵- بررسی میزان پایداری دمایی بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۳۳
۲-۹-۶- بررسی اثر برخی از مواد شیمیایی بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۳۳

۲-۹-۷- بررسی اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز ..... ۳۴
۲-۹-۸- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز ..... ۳۴
۲-۱۰- الکتروفورز SDS-PAGE ..... ۳۴
۲-۱۰- استوک اکریل آمید (۳۰٪) ..... ۳۴
۲-۱۰-۲- بافر ژل پایین ..... ۳۵
۲-۱۰-۳- بافر ژل بالا ..... ۳۵
۲-۱۰-۴- بافر الکترود ..... ۳۵
۲-۱۰-۵- بافر نمونه (۵ X) ..... ۳۵
۲-۱۰-۶- آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ ..... ۳۵
۲-۱۰-۷- TEMED 10% [V/V] ..... ۳۵
۲-۱۰-۸- محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو ۰/۱ ٪ ..... ۳۶
۲-۱۰-۹- محلول رنگ‌بر ..... ۳۶
۱۰-۱۰- آماده سازی دستگاه الکتروفورز ..... ۳۶
۱۰-۱۱- رنگ آمیزی ژل ..... ۳۶
۲-۱۲- تجزیه و تحلیل ..... ۳۷

**فصل سوم- نتایج و بحث**

۳-۱- زیست‌سنجی فوزالون روی جمعیت پسیل پسته‌ی مقاوم (بم) و حساس (رفسنجان) ..... ۳۹
۳-۲- بررسی میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم زمستان و تابستان‌گذران پسیل پسته ..... ۴۲
۳-۳- خالص سازی گلوتاتیون اس- ترانسفراز از جمعیت‌های حساس و مقاوم به فوزالون ..... ۴۳
۳-۴- مقایسه فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز خالص شده در جمعیت‌های حساس و مقاوم ..... ۴۵

۳-۵- SDS-PAGE گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم ..... ۴۹

۳-۶- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز ..... ۵۲

۳-۶-۱- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم ..... ۵۲

۳-۶-۲- تعیین pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم پسیل پسته ..... ۵۷

۳-۶-۳- بررسی اثر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز پسیل پسته حساس و مقاوم ..... ۵۹

۳-۶-۴- بررسی اثر پایداری دمایی در دو جمعیت حساس و مقاوم ..... ۶۰

۳-۶-۵- مقایسه اثر غلظت های مختلف برخی یون‌های فلزی بر فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم پسیل پسته ..... ۶۲

۳-۶-۶- تعیین اثر بازدارندگی آفت‌کش‌ها روی فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم پسیل پسته ..... ۶۴

جدول ۲-۱- اجزای ژل پایین ..... ۳۷

جدول ۲-۲- اجزای ژل بالا ..... ۳۷

جدول ۳-۳- زیست سنجی آفت‌کش‌های فوزالون روی حشرات کامل فرم تابستانه پسیل معمولی پسته ..... ۴۰

جدول۳-۴- مراحل خالص سازی گلوتاتیون اس- ترانسفراز پسیل پسته در جمعیت حساس ..... ۴۴

جدول ۳-۵- مراحل خالص سازی گلوتاتیون اس- ترانسفراز پسیل پسته در جمعیت مقاوم ..... ۴۴

جدول۳-۶- ویژگی‌های سینتیکی آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز روی سوبستراهای GSH و CDNB در پسیل پسته بالغ جمعیت مقاوم و حساس ..... ۵۵

جدول۳-۷- بررسی اثر غلظت‌های متفاوت یون‌های فلزی، EDTA و SDS بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز دو جمعیت حساس و مقاوم پسیل پسته ..... ۶۳

جدول ۳-۸- اثر بازدارنده‌های ایمیداکلوپرید، استامی‌پرید، آمیتراز، فوزالون روی جمعیت حساس پسیل پسته ..... ۶۴

جدول۳-۹- بازدارنده‌های ایمیداکلوپرید، استامی‌پرید، آمیتراز، فوزالون روی جمعیت مقاوم پسیل پسته ..... ۶۴

شکل ۱-۱- دیاگرام بیولوژی و دور نمای مبارزه با پسیل معمولی پسته (اقتباس از مهرنژاد ۱۳۸۱) ..... ۹

شکل۱-۲- واکنش پیوند بین ۱- کلرو ۲ و ۴ دی نیترو بنزن (CDNB) و گلوتاتیون احیا شده که به وسیله آنزیم GST تسهیل می شود (اقتباس از عنایتی ۱۳۸۴) ..... ۲۰

شکل ۲-۳- لوله‌های استفاده شده برای تیمار پسیل پسته در آزمون زیست‌سنجی به روش لوله شیشه‌ای ..... ۲۸

شکل ۳-۴- خطوط دز- پاسخ حشره‌کش فوزالون علیه پوره‌های پسیل پسته. *A. pistaciae* جمعیت بم..... ۴۰

شکل۳-۵- خطوط دز- پاسخ حشره‌کش فوزالون علیه پوره‌های پسیل پسته.*A. pistaciae* جمعیت رفسنجان .....۴۱

شکل ۳-۶- میزان فعالیت ویژه گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس تابستان و زمستان‌گذران پسیل پسته..۴۳

شکل ۳-۷- میزان فعالیت ویژه گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت مقاوم تابستان و زمستان‌گذران پسیل پسته... ۴۳

شکل۳-۸- میانگین فعالیت ویژه گلوتاتیون اس- ترانسفراز در جمعیت‌های حساس و مقاوم .....۴۵

شکل۳-۹- کروماتوگرام فرکشن‌های به دست آمده از عبور هموژنانت کل بدن پسیل از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی در جمعیت مقاوم ..... ۴۸

شکل۳-۱۰- کروماتوگرام فرکشن‌های به دست آمده از عبور هموژنانت کل بدن پسیل از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی در جمعیت حساس ..... ۴۹

شکل ۳-۱۱- SDS-PAGE مراحل مختلف خالص سازی گلوتاتیون اس- ترانسفراز. باندهای حاصله به ترتیب از راست به چپ مربوط به عصاره کل بدن جمعیت مقاوم، فرکشن خالص شده جمعیت مقاوم، مارکر پروتئینی، فرکشن خالص شده جمعیت حساس، عصاره کل بدن جمعیت حساس ..... ۵۰

شکل ۳-۱۲- نمودار RF وزن ملکولی در دو جمعیت حساس و مقاوم به فوزالون ..... ۵۰

شکل ۳-۱۳- نمودارلاینویور- برک آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در جمعیت مقاوم پسیل پسته با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوتاتیون و غلظت ثابت CDNB ..... ۵۳

شکل ۳-۱۴- نمودارلاینویور- برک آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در جمعیت حساس پسیل پسته با استفاده از غلظت-های مختلف گلوتاتیون و غلظت ثابت CDNB..... ۵۳

شکل۳-۱۵- نمودارلاینویور- برک آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در جمعیت مقاوم پسیل پسته با استفاده از غلظت‌های مختلف CDNB و غلظت ثابت گلوتاتیون ..... ۵۴

شکل۳-۱۶- نمودارلاینویور- برک آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در جمعیت حساس پسیل پسته با استفاده از غلظت‌های مختلف CDNB و غلظت ثابت گلوتاتیون ..... ۵۴

شکل ۳-۱۷- بررسی اثر pH های مختلف بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس- ترانسفراز جمعیت حساس پسیل پسته ۵۷

شکل ۳-۱۸- بررسی اثر pH های مختلف بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس- ترانسفراز جمعیت مقاوم پسیل پسته ۵۷

شکل ۳-۱۹- بررسی اثر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس- ترانسفراز پسیل پسته جمعیت حساس ۵۹

شکل ۳-۲۰- بررسی اثر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون اس- ترانسفراز پسیل پسته جمعیت مقاوم .. ۵۹

شکل ۳-۲۱- اثر پایداری دمایی روی GST خالص سازی شده از جمعیت مقاوم در دمای ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس ۶۱

شکل ۳-۲۲- اثر پایداری دمایی روی GST خالص سازی شده از جمعیت حساس در دمای ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس ۶۱

چکیده

**خالص‌سازی و بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی گلوتاتیون اس- ترانسفراز پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* (Hem. : Psyllidae) حساس و مقاوم به فوزالون**

**سیما زندوکیلی**

گلوتاتیون اس- ترانسفرازها (GSTs, EC 2.5.1.18) نقش مهمی را در سم‌زدایی فاز دوم ترکیبات خارجی (داروها، حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها) و ترکیبات درونی اکثر موجودات زنده بازی می‌کنند. در این مطالعه آنزیم GST از دو جمعیت پسیل پسته حساس و مقاوم به فوزالون با استفاده از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی سفارز ۴B خالص‌سازی شد و خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم خالص شده با استفاده از سوبستراهای مصنوعی مثل ۱-کلرو ۲ و ۴- دی نیتروبنزن (CDNB) و گلوتاتیون احیا شده (GSH) اندازه‌گیری شد. ابتدا جهت اثبات مقاومت، آزمون‌های زیست‌سنجی به‌روش تماس با باقیمانده سم در لوله آزمایش (RCV) با استفاده از ماده‌ی تکنیکال فوزالون انجام شد. نتایج زیست سنجی نشان داد میزان $LC_{50}$ای فوزالون روی جمعیت رفسنجان و بم به‌ترتیب ۱۴۵ و ۹۳۵/۶۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میزان مقاومت در جمعیت بم ۶/۴ برابر جمعیت حساس به‌دست آمد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت تابستان و زمستان‌گذران نشان‌دهنده فعالیت بالاتر این آنزیم در جمعیت تابستان‌گذران بود. به‌طوری‌که میزان فعالیت ویژه این آنزیم در جمعیت تابستان‌گذران بم ۱/۴۶ برابر فعالیت این آنزیم در جمعیت زمستان‌گذران آن بود. هم‌چنین میزان فعالیت ویژه این آنزیم در جمعیت زمستان‌گذران بم ۲/۵۴ برابر فعالیت آن در جمعیت زمستان‌گذران رفسنجان می‌باشد. در این تحقیق آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی از دو جمعیت رفسنجان و بم خالص و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. فعالیت ویژه آنزیم خالص شده در دو جمعیت حساس و مقاوم به‌ترتیب ۱۰/۲۶ و ۱۳/۰۴ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بود. آنالیزهای سینتیکی نشان داد هنگامی‌که از غلظت‌های مختلف CDNB و غلظت ثابت GSH استفاده شد، آنزیم خالص شده در جمعیت مقاوم، $K_m$ و $V_{max}$ بالاتری نسبت به جمعیت حساس دارد. pH و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در هر دو جمعیت حساس و مقاوم به‌ترتیب ۷ و ۳۰ درجه سلسیوس به‌دست آمد. آنزیم GST خالص شده روی SDS-PAGE یک باند با وزن ملکولی ۲۱ کیلودالتون نشان داد. آنزیم GST در هر دو جمعیت به‌طور کامل توسط $ZnCl_2$ و SDS و تاحدودی توسط اوره، KCl، $MnCl_2$، $MgCl_2$ و $Hg_2Cl_2$ مهار می‌شود. آزمون‌های بازدارندگی با حشره‌کش‌های رایج در کنترل پسیل پسته (آمیتراز، ایمیداکلوپرید، استامی‌پرید و فوزالون) نشان داد که این ترکیبات اثرات بازدارندگی روی GST هر دو جمعیت دارند. نتایج این مطالعه اطلاعات پایه‌ای در مورد GST پسیل پسته فراهم نموده و مطالعات بیشتر در فهم مکانیسم‌های مقاومت پسیل پسته به آفت‌کش‌ها، کمک خواهد کرد.

**کلمات کلیدی**: گلوتاتیون اس- ترانسفراز، *Agonoscena pistaciae*، اثرات بازدارندگی، مقاومت، فوزالون

**Abstract**

**Purification and biochemical characterization of glutathione S. transferase in phosalone-sensitive and resistant populations of pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae* (Hem.: Psyllidae)**

**Sima Zandvakili**

Glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) play important roles in phase II detoxification of both xenobiotics (drugs, insecticides, and herbicides) and endogenous compounds in majority of living organisms. In this study, GST was purified from phosalone-resistant and susceptible populations of *Aganoscna pistaciae* by glutathione-agarose affinity chromatography Sepharose 4B, and then characterized using artificial substrates, 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) and reduced glutathione (GSH). For documentation of resistance, bioassay tests were conducted using residual contact vial (RCV) test using technical grade of phosalone. Results of bioassay showed that the $LC_{50}$ values of phosalone on Rafsanjan and Bam populations were 145 and 935.66 mg/l, respectively. Resistance ratio was obtained 6.4 for Bam population. The estimation of specific activity of GST in both summer and overwintering populations showed higher activity in summer populations. The activity of GST in summer population of Bam was 1.46- fold higher than that of its overwintering population. Also, the activity of GST in overwintering population of Bam was 2.54-fold higher than that of overwintering Rafsanjan population. In this research, the GSTs were purified from Rafsanjan and Bam populations using affinity chromatography and their biochemical properties were compared. Specific activities of the purified enzyme in both sensitive and resistant populations were 10/26 and 13/04, µmol $min^{-1}$.mg $protein^{-1}$, respectively. Kinetic analysis showed that the $K_m$ and $V_{max}$ of purified enzyme from the resistant population is higher than that of susceptible population, when different CDNB concentrations and fixed concentration of GSH were used. The optimum temperature and pH for activity of GST from resistant and susceptible population were 37 °C and 7, respectively. The purified GST showed a single band on SDS-PAGE with a molecular weight of about 21 kDa. The enzyme was completely inhibited by the addition of $ZnCl_2$, and SDS partially inhibited by $CaCl_2$, $BaCl_2$, $CoCl_2$, KCl, $MnCl_2$, Urea, $MgCl_2$ and $Hg_2Cl_2$. The *in vitro* inhibition studies of GSTs indicated that all kinds of conventional insecticides (i.e. imidacloprid, acetamiprid, phosalone, and amitraz) possessed inhibitory effects on purified GST. Our study broadens the biochemical information on *A. pistaciae* GST and further investigations will help to understand the mechanisms of insecticide resistance in *A. pistaciae*.

**Keywords**: Glutathione S-transferase; Purification; *Aganosena pistaciae*; Inhibitory effect, Resistance, Phosalone

# مقدمه

**مقدمه**

پسته *Pistacia vera* L ، یکی از مهم‌ترین محصولات باغی کشور است که در حال حاضر با آغاز صادرات، ارزش اقتصادی و تجاری ویژه‌ای پیدا کرده است و ایران در جایگاه اولین و مهم‌ترین صادر کننده‌ی پسته دنیا قرار دارد. این گیاه از دیر باز در نقاط مختلف ایران مورد کشت و ازدیاد قرار گرفته است. در حال حاضر استان کرمان و در این استان، شهرستان رفسنجان، مهم‌ترین منطقه پسته کاری ایران و جهان محسوب می‌شود [رضوی، ۱۳۸۳] .

پسته آفات زیادی دارد که از قسمت‌های مختلف گیاه تغذیه می‌کنند و باعث صدمه به درختان پسته و کاهش شدید عملکرد آن‌ها می‌شوند. پسیل پسته اولین بار روی درختان پسته زراعی و وحشی در ایران توسط کریوخین گزارش شد [Kiriukhin, 1946].

پسیل معمولی پسته *Aganoscena pistaciae* یکی از آفات جدی درختان پسته است که از شیره گیاهی تغذیه می‌کند و از این طریق سبب کاهش کمی و کیفی محصول می‌شود و در تمام مناطق تولید پسته‌ی ایران خسارت ایجاد می‌کند [Alizade et al., 2011].

یکی از جدی‌ترین مشکلات در مدیریت کشاورزی و بهداشت عمومی پدیده‌ی مقاومت است که با طولانی شدن سابقه‌ی مصرف یک حشره‌کش علیه یک آفت به‌وجود می‌آید. پسیل پسته پتانسیل بالایی برای توسعه مقاومت در برابر حشره‌کش‌ها دارد. با توجه به فشار انتخابی بیش از حد و به‌دلیل استفاده گسترده از حشره کش‌ها روی پسته در ایران، بعضی از جمعیت‌های این آفت به حشره‌کش‌های مصنوعی مقاوم شده‌اند [طالبی و همکاران، ۲۰۰۱]. مقاومت بر اثر فشار گزینشی روی جمعیت‌هایی از جانوران که دارای قدرت تکثیر زیاد و تعداد نسل زیادی در سال هستند، بروز می‌کند و با کاسته شدن این قابلیت احتمال بروز مقاومت نیز کاهش می یابد [Herron et al., 1998] .

مقاومت باعث به‌وجود آمدن مشکلاتی از قبیل خسارت بیشتر به محصولات کشاورزی، به خطر افتادن سلامتی انسان، کاهش کیفیت محصول، افزایش تعداد دفعات سم‌پاشی و افزایش میزان مصرف آفت‌کش‌ها می‌شود [ Brown et al., 2003].

فوزالون(زولون®) یکی از معمولی‌ترین حشره‌کش‌های مورد استفاده برای کنترل پسیل پسته است. این آفت‌کش از گروه ترکیبات فسفره آلی است که حدود ۲۰ سال روی پسیل پسته استفاده شده و به‌عنوان یکی از پر سابقه‌ترین و پر مصرف-

ترین آفت‌کش‌ها، در باغ‌های پسته است. استفاده از سموم شیمیایی، به‌خصوص فوزالون، برای کنترل پسیل پسته، باعث گسترش بروز مقاومت در بسیاری از مناطق کشت پسته در ایران شده است [طالبی و همکاران، ۱۳۸۰].

آفت‌کش‌های فسفره و سیکلودین‌ها توسط گلوتاتیون اس- ترانسفراز غیر سمی می‌شوند این آنزیم‌ها در حشرات از نظر بیوشیمیایی و ملکولی کمتر از سیتوکروم P450ها و استرازها مورد بررسی قرار گرفته‌اند. افزایش فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز در برخی موارد منجر به ایجاد مقاومت می‌شود [Haffman and Fisher, 1994]. اما در بعضی جمعیت-های مقاوم افزایش فعالیت گلوتاتیون اس- ترانسفراز مقاومت ایجاد نمی‌کند [Bush et l., 1993] و حقیقت این است که مقاومت ایجاد شده توسط گلوتاتیون اس- ترانسفراز به‌علت تغییر در بیان ژن‌ها و یا تغییرات ساختاری آن‌هاست.

با توجه به گسترش مقاومت پسیل پسته به فوزالون و از آنجایی‌که یکی از آنزیم‌های درگیر در مقاومت، گلوتاتیون اس- ترانسفراز است [Alizade et al., 2011] به‌همین دلیل در این تحقیق این آنزیم در دو جمعیت از پسیل پسته، یعنی جمعیت مقاوم و حساس به فوزالون خالص شد و پارامترهای بیوشیمیایی و سم‌شناسی این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس بررسی منابع، بیشتر تحقیقات در زمینه‌ی آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در هموژنانت کل بدن حشره مورد بررسی قرار گرفته و این تحقیقات شامل مقایسه فعالیت و پارامترهای سینتیکی این آنزیم در جمعیت‌های حساس و مقاوم بوده است. این آنزیم در تعدادی از حشرات و کنه‌ها خالص و پارامترهای بیوشیمیایی آن بررسی شده است. اما اطلاعاتی در زمینه خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم در پسیل‌ها وجود ندارد. با توجه به این دلایل، تعیین خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم می‌تواند دانش ما را درخصوص مکانیسم‌های مقاومت افزایش داده و اطلاعات پایه برای مدیریت مقاومت را فراهم آورد. اهداف این تحقیق شامل:

۱- زیست‌سنجی فوزالون روی جمعیت‌های حساس و مقاوم به فوزالون
۲- خالص سازی و تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در دو جمعیت حساس و مقاوم و بررسی مهار این آنزیم توسط آفت‌کش‌های رایج در کنترل پسیل پسته
۳- مقایسه فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس- ترانسفراز در جمعیت‌های زمستان‌گذران و تابستان‌گذران این حشره.

# فصل اول

## کلیات و بررسی منابع

## ۱-۱- رده بندی، نحوه خسارت و میزبان‌های پسیل پسته

پسیل معمولی پسته، *Agonoscena pistaciae* Burckardt and lauterer 1989 از راسته‌ی Hemiptera، از بالا خانواده‌ی Psylloidea، خانواده‌ی Aphalaridae و زیرخانواده‌ی Rhinocolinae، یکی از مهم‌ترین آفات درختان پسته است که در بسیاری از کشورهای جهان شامل ایران، ترکیه، عراق، آمریکا و ترکمنستان و علاوه بر این مناطق مدیترانه‌ای هم‌چون سوریه و یونان خسارت وارد می‌کند [Burckardt and Lauterer ,1998; Anagnou-Veroniki et al., 2008].

در بین پسیل‌های پسته ایران، این‌گونه غالب بوده و به‌سبب پراکنش زیاد و خسارت فراوان آن در کشور، پسیل معمولی پسته نامیده شده است. این آفت بین پسته‌کاران استان کرمان به‌نام شیره خشک مشهور است. پسیل پسته یکی از آفات کلیدی است که به‌تمام باغ‌های پسته ایران صدمه می‌زند و هم‌چنین روی درختان پسته‌ی وحشی مانند کسور (*P. khinjuk*) و بنه (*P. mutica*) نیز وجود دارد [Mehrnejad, 2002.2003].

پسیل پسته از زمان فعال شدن درختان پسته در اسفند ماه فعالیت خود را شروع کرده و تا پس از برداشت محصول در اوایل پاییز فعالیت دارد و خسارت قابل توجهی به محصول پسته وارد می‌کند. پوره و حشرات کامل این آفت در سطح پشت و روی برگ درختان از شیره آن‌ها تغذیه کرده و علاوه بر تغذیه از برگ‌ها، عسلک فراوانی نیز ترشح می‌کنند که در مجاورت هوا تبدل به پودر سفید رنگی می‌شود، از این رو این آفت را شیره خشک می‌نامند. هم‌چنین بزاق پوره‌های پسیل پسته دارای موادی با خاصیت گیاهسوزی است که سبب از بین رفتن سلول‌های برگ و ایجاد سوختگی و لکه‌های رنگ پریده در سطح برگ‌ها و اختلال در عمل فتوسنتز می‌شود [مهر نژاد، ۱۳۸۱]. از دیگر خسارت‌های این حشره پوک شدن، نیم مغز شدن، نا خندانی، کاهش وزن و اندازه میوه است. پوره این حشره با تغذیه از برگ‌ها موجب ریزش قبل از موعد آن‌ها می‌شود. هم‌چنین این حشره علاوه بر خسارت به‌محصول همان سال، باعث ریزش جوانه‌های میوه سال آینده و کاهش محصول در سال آتی نیز می‌شود [حسنی و همکاران، ۱۳۸۸؛ اسماعیلی، ۱۳۷۰].

### ۱-۱-۱- زیست شناسی *Aganoscena pistacia*e

پسیل پسته دارای دو شکل تابستانه و زمستانه است که از دید ویژگی‌های شکل شناسی به‌ویژه حشرات کامل با هم متفاوت می‌باشند. شکل تابستانه از نیمه اردیبهشت ماه در باغ‌ها پدیدار شده و تا مهر دیده می‌شود. افراد زمستانی دارای دیاپوز جنسی هستند در حالی که افراد تابستانه بی درنگ جفت‌گیری و تخم‌گذاری می‌کنند.

افراد فرم زمستانه پسیل پسته، در نیمه دوم اسفند ماه به‌سوی درختان پسته پرواز می‌کنند. جوانه‌های درختان پسته از پایان اسفند متورم شده و سپس نوک سبز رنگ جوانه‌ها پدیدار می‌شود و از ابتدای فروردین ماه این آفت روی درختان مستقر می‌شوند. این حشرات نسبت به حشرات کامل تابستانه توان پرواز بیش‌تری داشته و آلودگی بیشتری در باغ ایجاد می‌کنند. پس از جفت‌گیری بی درنگ با باز شدن جوانه‌های خوشه و برگ روی آن‌ها تخم‌ریزی می‌کنند به‌گونه‌ای که تا ۵۰۰ تخم نیز روی برگچه‌های تازه روییده پسته در ابتدای بهار دیده می‌شود. آن دسته از ارقام پسته که در بهار زودتر رشد می‌کنند پذیرای جمعیت زیادتری از پسیل هستند. باز شدن جوانه‌های درختان بنه در مناطق دشت ۱۲ روز زودتر از درختان پسته است و مکان فرود آمدن جمعیت بالایی از فرم زمستانه هستند. حشرات زمستان‌گذران تنها تا پایان فروردین ماه در باغ دیده می‌شوند. تخم‌هایی که روی برگ‌ها گذاشته می‌شود تبدیل به پوره شده و نسبت به تخم‌های گذاشته شده روی خوشه‌ها برای ایجاد نسل بعدی موفق تر هستند [سمیع و همکاران، ۱۳۸۴].

تخم پسیل معمولی پسته دارای یک پایه‌ی کوچک و باریک است. حشرات در هنگام تخم‌گذاری، پایه‌ی تخم را در داخل اپیدرم برگ قرار می‌دهند. پایه تخم به جذب آب کمک می‌کند که برای رشد جنین لازم است [Mehrnejad, 2002]. پوره‌های پسیل پس از خروج از تخم بی‌درنگ تغذیه می‌کنند از همان زمان نیز عسلک تراوش می‌کنند. پوره‌های سنین نخست جنب و جوش زیادی ندارند. پنج سن پورگی در این حشره دیده می‌شود. پوره‌های سن پنجم پس از رشد پایانی به حشرات کامل تبدیل می‌شوند [Mehrnejad, 1998].

حشرات کامل نسل اول از نیمه اردیبهشت ماه در شمار کم و از پایان دهه دوم اردیبهشت به جفت‌گیری و تخم‌ریزی ادامه می‌دهند. پوره‌های نسل دوم از ابتدای خرداد و دهه دوم خرداد ماه کوشش‌های تغذیه خود را آغاز می‌کنند. پایداری درختان در برابر خسارت پوره‌ها در این زمان نسبت به سایر نسل‌ها کمتر است زیرا رشد رویشی درختان پایان یافته و میوه شروع به‌مغز رفتن را کرده است و جوانه‌هایش شکل کامل گرفته‌اند. در نتیجه خسارت آفت سبب پوکی و ریزش برگ و جوانه‌ها می‌شود. بنابر این جلوگیری از خسارت این نسل به درختان پسته بسیار مهم است. از نیمه دوم شهریور ماه به -