تحقیقات آفات گیاهی
۱۲- ۱ :(۱) ۶-۱۳۹۵

اثر عصاره پروتئینی تریتیکاله روی فعالیت آلفا آمیلاز گوارشی شب‌پره مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae)

مجتبی اسمعیلی[1] و علیرضا بندانی*[1]
۱- گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۷)

چکیده

شب‌پره مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae) آفتی است چند نسلی و بومی آمریکای جنوبی که تهدیدی جهانی برای محصول گوجه فرنگی شده است. این آفت ابتدا از ارومیه گزارش شد ولی اکنون تقریبا تمامی مناطق گوجه کاری ایران را آلوده کرده است. برای کنترل این آفت از آفت‌کش‌های مختلف از جمله آفت‌کش‌های فسفره و پایروتروئیدی و به طور معمول در مقادیر زیاد استفاده می‌شود که این باعث ایجاد مقاومت، آلودگی محصول به باقیمانده سموم و حتی آلودگی محیط زیست می‌شود. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره نیمه خالص پروتئینی بذر تریتیکاله روی فعالیت آنزیم‌های آمیلاز این حشره می‌باشد. برای این منظور، عصاره بذر با استفاده از محلول نمکی NaCl استخراج شد و با استفاده از آمونیوم سولفات به صورت نیمه خالص درآمد. سنجش آنزیمی نشان داد که روند مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز حشره بسته به غلظت مورد استفاده بود، یعنی با افزایش غلظت مهارکننده میزان درصد بازدارندگی آنزیم افزایش پیدا کرد. برای مثال، در غلظت نیم میکروگرم پروتئین عصاره بذر، میزان مهار آنزیم ۳۱ درصد بود، در حالی که در هشت میکروگرم پروتئین عصاره بذر میزان مهار آنزیم به ۶۶ درصد رسید. در بررسی تاثیر اسیدیته مشاهده شد که بالاترین میزان مهارکنندگی عصاره پروتیینی در اسیدیته هشت می‌باشد و فراسوی این اسیدیته میزان مهارکنندگی کاهش پیدا کرد. سنجش مهار آنزیم در ژل نیز مشاهدات سنجش آنزیم به‌وسیله دستگاه الیزاریدر را تایید کرد، یعنی با افزایش غلظت مهارکننده از شدت باند آمیلازی کاسته شد. این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین‌های موجود در عصاره بذر تریتیکاله دارای پتانسیلی هستند تا در کنترل حشرات بیشتر مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: مینوز گوجه فرنگی، آنزیم آلفا آمیلاز، عصاره بذر تریتیکاله

* نویسنده مسئول: abandani@ut.ac.ir

مقدمه

شب‌پره مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae) آفت بومی آمریکای جنوبی بوده و اولین بار در آرژانتین در سال ۱۹۶۴ ردیابی شد. این آفت تهدیدی جهانی برای محصول گوجه فرنگی در جنوب امریکا، اروپا، شمال آفریقا و به تازگی در خاورمیانه شده است (Desneux *et al*., 2010). این آفت در ایران در آبان ماه ۱۳۸۹ از ارومیه گزارش شد و طی گزارش‌های سازمان حفظ نباتات از استان‌های غربی، جنوب غربی و جنوبی کشور گزارش شده است (حیدروش، ۱۳۹۲). این آفت از مزوفیل برگ و همچنین گل، میوه و ساقه تغذیه می‌کند و باعث خسارت جدی به محصول می‌شود (Desneux *et al*., 2010). سمومی که برای کنترل این آفت استفاده می‌شوند به طور معمول حشره‌کش‌های فسفره و پایروتروئیدی هستند، البته به تازگی سم با نحوه تاثیر متفاوت اسپینوساد نیز برای کنترل آن به کار می‌رود (Reyes *et al*., 2012). در بعضی از مناطق تولید محصول سمپاشی به صورت هفته‌ای یک بار صورت می‌گیرد که این باعث جلوگیری از خسارت آفت و همچنین باعث افزایش محصول می‌شود، با وجود این افزایش مصرف سموم باعث رشد مقاومت، آلودگی محصول به باقیمانده سموم و حتی آلودگی محیط زیست می‌شود (Reyes *et al*., 2012). مقاومت به حشره‌کش‌ها یک مشکل بزرگ و عامل محدودکننده در کنترل مینوز گوجه فرنگی در جنوب امریکا و سایر مناطق گسترش این آفت است (Silva *et al*., 2011; Reyes *et al*., 2012). با توجه به این که لاروها داخل بافت‌های گیاهی می‌باشند تاثیر سموم روی آنها کم بوده و آفت به سموم مقاوم می‌شود، و مقاومت در برابر برخی از حشره کش‌ها در چندین کشور گزارش شده است به عنوان مثال برای ابامکتین و پرمترین در برزیل گزارش شده است (Siqueira *et al*., 2000).

اثرات منفی آفت‌کش‌های شیمیایی موجب شده است که از راه‌های جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل آفات مورد بررسی قرار گیرند (Isman, 2006). در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در مورد ترکیبات یا ژن‌های به دست آمده از میکروب‌ها و گیاهان انجام شده است تا شاید بتوان جایگزین مناسبی برای کنترل آفات پیدا کرد. بنابراین ترکیباتی مانند مهارکنندهای آنزیم‌های گوارشی شامل آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز، لکتین‌های به دست آمده از گیاهان و قارچ‌ها و دلتا اندوتوکسین باکتری Bt دارای پتانسیل خوبی هستند که در کنترل تعداد زیادی از آفات استفاده شوند (Franco *et al*., 2002). استفاده از راهبرد مقاومت در کاهش زیان آفات از لحاظ اقتصادی می‌تواند یک روش مطلوب باشد. بنابراین استفاده از این روش جدید که شامل به کار بردن مهارکننده‌های آمیلاز، پروتئاز و لکتین و احتمالا دلتا اندوتوکسین می‌تواند در کاهش اتکا به حشره‌کش‌ها بسیار موثر واقع شود و شایان ذکر است که در سال‌های اخیر توجه زیادی در به کار‌برد آنزیم‌های گوارشی شده است که رشد و نمو گونه‌های آفت را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Mehrabadi *et al*., 2012). مهارکننده‌های پروتیینی آنزیم‌های گوارشی (آمیلازها و پروتئازها) عموما در اندام‌های تولیدمثلی (دانه) گیاهان، اندام‌های ذخیره‌ای و غالب بافت‌های رویشی گیاهان یافت می‌شوند (Ryan, 1990; Richardson, 1991; Shewry and Lucas, 1997). اعتقاد بر این است که این مهارکننده‌ها، پروتیین‌های ذخیره‌ای و یا تنظیم کننده‌های آنزیم‌های داخلی هستند که در دفاع گیاه در مقابل گیاه‌خواران نقش دارند. بنابراین آن‌ها قادرند که در عملکرد آنزیم‌های گوارشی گیاه‌خواران (حشرات) اختلال ایجاد کنند. به همین دلیل از این پروتئین‌ها برای حفاظت گیاهان در برنامه‌های مدیریت آفات استفاده می‌شود (Moslov *et al*., 2001; Srinivasan *et al*., 2005). برای مثال، مهارکننده آنزیم‌های تریپسین به نام مهارکننده کونیتز تریپسین وقتی به رژیم غذایی لاروها اضافه شود می‌تواند در زیست‌شناسی تعداد زیادی از لاروهای بال‌پولکداران اختلال ایجاد کند (Broadway and Duffey, 1985). اولین مثال استفاده از گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های

تولیدکننده پروتئین‌های سمی گیاهی علیه حشرات، ژن بازدارنده آنزیم تریپسین بود که در گیاه تنباکو برای مقابله با لارو بال‌پولکداران تولید شد (Hilder *et al*., 1987; Silva *et al*., 2001). تاکنون تلاش‌های گسترده‌ای صورت گرفته است تا بتوان ژن پروتئین‌های مهارکننده آنزیم‌های گوارشی را شناسایی و از این ژن‌ها با استفاده از علم بیوتکنولوژی در گیاهان جهت مدیریت آفات گیاه‌خوار استفاده کرد. برای مثال، وقتی ژن بازدارنده آلفاآمیلاز موجود در لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به گیاه نخود منتقل شد، مقاومت گیاه نخود به سوسک *Bruchus pisorum* را ایجاد کرد (Morton *et al*., 2000; Silva *et al*., 2001). همچنین لوبیای آزوکی (*Vigna angularis*) وقتی ژن مهارکننده آلفا آمیلاز از لوبیای معمولی دریافت کرد نسبت به سوسک چینی (*Callosobruchus chinensis*) و سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus*) مقاومت پیدا کرد (Ishimoto *et al*., 1996).

اعتقاد بر این است که پروتیین‌های ذخیره‌ای در دانه‌های گیاهان غیرمیزبان حشره آفت دارای اثرات مهارکنندگی بالاتری روی آنزیم‌های گوارشی حشره آفت هستند زیرا این پروتئین‌ها در طول دوره تکاملی حشره در معرض حشره نبوده‌اند تا حشره بتواند مقاومت موجود در آنها را بشکند. بنابراین بدلیل اینکه آنزیم آمیلاز مهم‌ترین آنزیم گوارشی حشرات گیاه‌خوار می‌باشد و اختلال در فعالیت این آنزیم می‌تواند باعث اختلال در زیست‌شناسی حشره شود، در نتیجه هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره پروتیینی استخراج شده از بذرهای تریتیکاله روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز لوله گوارشی لاروهای مینوز گوجه فرنگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

لاروهای *Tuta absoluta* از مزارع شهرستان کرج جمع‌آوری شدند و در شرایط آزمایشگاهی ۱±۲۵ درجه سلسیوس با دوره نوری ۸:۱۶ (روشنایی:تاریکی) ساعت و در رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد روی برگ‌های جدا شده از بوته گوجه فرنگی درون ظروف پرورش (۲۰×۱۵×۸ سانتی‌متر) نگه‌داری شدند.

تشریح و جداسازی اندام گوارشی

برای جداسازی لوله گوارش از لاروهای سن چهارم استفاده شد زیرا لاروهای سن چهارم بیشترین خسارت را به گیاه وارد می‌کنند و همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم را دارند. ابتدا لاروهای مورد نظر روی یخ بی‌حس شدند، سپس به وسیله دو پنس ابتدا و انتهای بدن لارو گرفته شد در دو جهت مخالف کشیده شد و لوله گوارش جدا شد. تعداد ۵۰ عدد لوله گوارش داخل میکروتیوب‌های با حجم ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۷۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر سرد قرار گرفتند.

استخراج آنزیم

استخراج آنزیم طبق روش کزازی و همکاران (Kazzazi *et al*., 2005) با کمی اصلاحات صورت گرفت. به این صورت که نمونه‌ها توسط یک هموژنایزر دستی روی یخ هموژنایز شدند. سپس نمونه‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت g ×۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، بخش رویی نمونه‌ها جدا شده و به عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج مهارکننده تریتیکاله

برای استخراج بازدارنده‌ها، طبق روش بیکر (Baker, 1983) و سعادتی و همکاران (Saadati *et al*., 2011) با مقداری اصلاحات عمل شد. به صورت خلاصه، مقدار ۳۰ گرم بذر تریتیکاله آرد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر NaCl با مولاریته ۰/۱ مخلوط شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. مخلوط حاصل در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت g×۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. به منظور رسوب‌دهی پروتئین با سولفات

آمونیوم ۷۰ درصد اشباع مخلوط شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۴۵ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس به آرامی هم زده شد. مخلوط سولفات آمونیوم–پروتئین، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس و با سرعت ×g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد و رسوب حاصله با دو میلی‌لیتر بافر Tris-HCL (۰/۰۲مولار و اسیدیته ۸) به صورت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۲۰ ساعت درون آب مقطر، دیالیز شد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس داخل حمام آب گرم قرار داده شد به منظور این‌که آمیلازهای داخلی غیرفعال شوند. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۴ درجه سلسیوس و با سرعت ×g ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رونشین جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد و به عنوان منبع مهارکننده آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثر عصاره پروتئینی استخراج شده از تریتیکاله روی فعالیت آلفا آمیلاز

برای بررسی اثر عصاره پروتئینی تریتیکاله روی فعالیت آلفا آمیلاز طبق روش بیکر (Baker, 1987) و مهرابادی و همکاران (Mehrabadi *et al.*, 2010) انجام شد. بدین منظور از غلظت‌های ۸، ۴، ۲، ۱ و ۰/۵ میکروگرم پروتئین تریتیکاله استفاده شد. غلظت‌های مختلف تریتیکاله با عصاره آنزیمی به‌دست آمده از کانال گوارشی حشره به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس فعالیت آمیلولیتکی آن با استفاده از نشاسته یک درصد به عنوان سوبسترا محاسبه شد. واکنش در محیط بافری (Tris-HCL) با اسیدیته ۸ در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انجام شد. سپس معرف DNS به مجموعه اضافه شد و برای مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. بعد از سرد شدن میزان ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه توسط دستگاه الایزا ریدر (ELX 808) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

تاثیر اسیدیته بر مهارکنندگی تریتیکاله

به منظور سنجش تاثیر اسیدیته‌های مختلف بر مهارکنندگی عصاره تریتیکاله از بافر یونیورسال گلایسین، مس (2-morpholinoethan sulfonic acid) و سوکسینات (Hosseinkhani and Nemat-Gorgani, 2003) با اسیدیته‌های ۶ تا ۱۱ استفاده شد. بدین صورت که بیشترین غلظت مهارکننده تریتیکاله به مدت ۳۰ دقیقه در هر اسیدیته انکوبه شد. سپس میزان مهار فعالیت آمیلاز بعد از ۳۰ دقیقه اینکوبه با مهارکننده تریتیکاله محاسبه شد. نمونه کنترل در هر اسیدیته تنها با حضور عصاره آنزیمی و بدون افزودن مهارکننده در نظر گرفته شد. فرمول محاسبه درصد مهارکنندگی به صورت زیر می‌باشد (Mehrabadi *et al.*, 2011):

$$\%I = 100 \times [(A540\ control - A540\ Exp) / A540\ control]$$

سنجش مهارکننده در ژل

زایموگرام فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از روش ژل الکتروفورز لاملی (Laemmli, 1970) با کمی اصلاحات انجام شد. به این صورت که از پلی‌اکریل‌آمید ۱۰٪ برای ژل جداکننده و ۵٪ برای ژل متراکم‌کننده استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت تا رسیدن رنگ به انتهای ژل انجام شد. پس از رسیدن رنگ به انتها، ژل از شیشه جدا شده و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ۱٪ تریتون X100 قرار گرفت. سپس برای مدت ۱/۵ ساعت در بافر تریس (Tris-HCL) ۰/۰۲ مولار با اسیدیته ۸ حاوی ۲ میلی‌مولار Cacl2 و ۱۰ میلی‌مولار Nacl و ۱٪ نشاسته قرار گرفت و در پایان ژل با آب مقطر شسته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول لوگول (۳٪ KI و ۱,۳٪ I2) قرار گرفت. باندهای فعالیت آلفا آمیلازی در زمینه تیره به صورت روشن دیده می‌شوند.

سنجش میزان پروتئین

به منظور تعیین مقدار پروتئین نمونه‌ها، از روش بردفورد (Bradford, 1976) و از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

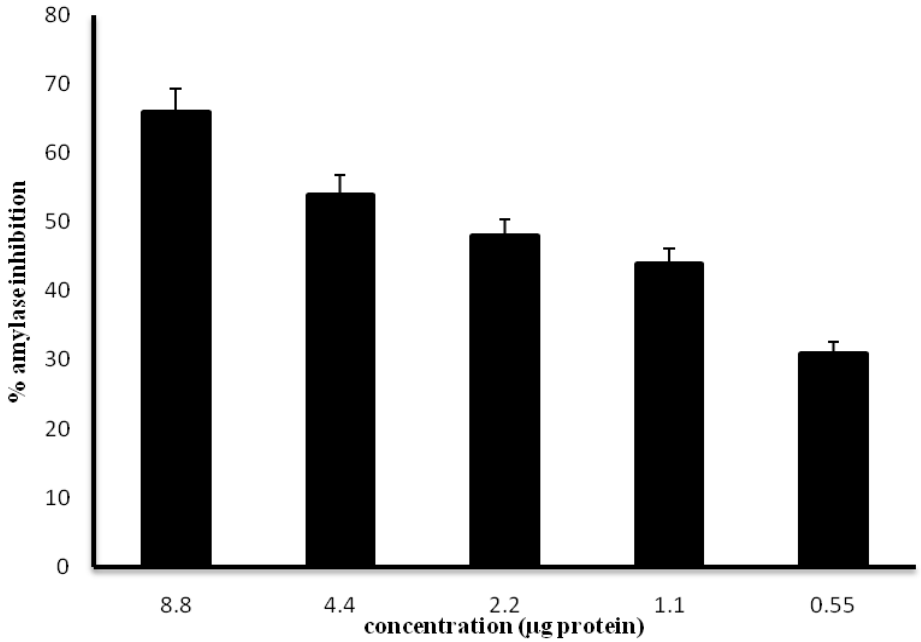
بررسی‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. گروه‌بندی داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن بررسی شد.

نتایج و بحث

اثر مهارکننده تریتیکاله بر آنزیم آلفا آمیلاز

سنجش فعالیت آمیلازی در حضور غلظت‌های مختلف از مهارکننده به این صورت بود که روند مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز وابسته به غلظت استفاده شده از مهارکننده بود. غلظت‌های ۸، ۴، ۲، ۱ و ۰/۵ میکروگرم از عصاره بذر تریتیکاله مورد استفاده قرار گرفت. میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از غلظت‌های ۸، ۴، ۲، ۱ و ۰/۵ میکروگرم پروتئین مهارکننده به‌ترتیب برابر با ۶۶، ۵۴، ۴۸، ۴۴ و ۳۱ درصد شد (شکل ۱). نتایج به‌دست آمده با نتایج سایر محققین هم تطابق دارد. برای مثال، دسترنج و همکاران (Dastranj *et al.*, 2013) تاثیر مهارکننده‌های لوبیا و ارقام مختلف گندم را روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی سنین مختلف لاروی سوسک آرد بررسی کردند. در این برررسی مهارکننده استخراج شده از لوبیا و رقم MV17 گندم به‌ترتیب باعث ۷۰/۹ و ۵۸/۳ درصد مهارکنندگی آمیلاز شد. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.*, 2012) مهارکننده استخراج شده از تریتیکاله را روی آمیلاز غدد بزاقی سن گندم اثر دادند که تاثیر مهارکننده روی آنزیم وابسته به دز بود به طوری که نتایج آن‌ها نشان داد در بالاترین غلظت استفاده شده از مهارکننده در اسیدیته بهینه فعالیت آنزیم، فعالیت آنزیم مذکور ۸۷ درصد مهار شد. همچنین سیواکومار و همکاران (۲۰۰۶) مهار شدن آمیلاز حشرات *Sitophilus oryzae, Tribolium castaneum, Callosobruchus chinensis, Corcyra cephalonica, Spodoptera litura, Plutella xylostella, Helicoverpa armigera, Achaea janata* را توسط مهارکننده‌های ارزن به روش سنجش در ژل بررسی کردند. مطالعه زایموگرام نشان داد که تعداد ایزوزایم‌های آنزیم از یک تا هشت عدد متغییر بودند. *S. litura*، *H. armigera*، *C. chinensis* و *C. cephalonica*، بیش از پنج ایزوزایم را نشان دادند، درحالی‌که سایرین دارای یک تا چهار ایزوزایم بودند. مطالعه الکتروفورز مهارکننده ارزن نشان داد که این مهارکننده قادر به کاهش فعالیت آمیلاز *H. armigera*، *P. xylostella*، *S. litura* و *C. cephalonica* است. در *T. castaneum* میزان مهار کمی دیده شد و داده‌های مشابهی در مورد *A. janata* به دست آمد. در *S. oryzae* منجر به حذف دو باند آمیلاز شد. محمدزاده و همکاران (Mohammadzadeh *et al.*, 2013) تاثیر مهارکننده‌های استخراج شده از گندم و تریتیکاله را روی فعالیت آمیلاز زنبور *Arge rosae* Linnaeus (Hym.: Argidae) بررسی کردند، که نتایج آن‌ها نشان داد که مهارکننده گندم و تریتیکاله به‌ترتیب ۷۴ و ۶۲ درصد از فعالیت آمیلاز گوارشی این حشره را مهار کردند.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف تریتیکاله بر میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta*

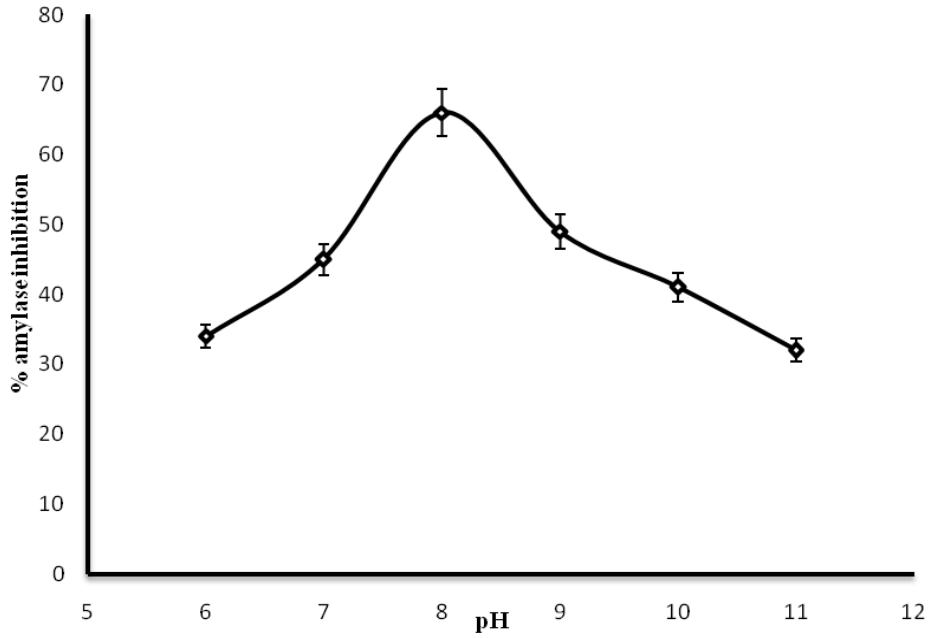
Figure 1. Effect of different concentrations of triticale extract on inhibition of *Tuta absoluta* α-amylase activity

تاثیر اسیدیته بر مهارکنندگی تریتیکاله

برای بررسی تاثیر اسیدیته روی اثر عصاره پروتیینی تریتیکاله (با غلظت ۸ میکروگرم پروتئین) روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از اسیدیته‌های ۶ تا ۱۱ استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود میزان مهارکنندگی عصاره پروتیینی در اسیدیته‌های مختلف تغییر می‌کند. بیشترین فعالیت مهارکنندگی در اسیدیته ۸ مشاهده شد که با مقدار مهار در سایر اسیدیته‌ها تفاوت معنی‌دار داشت. در واقع بیشترین درصد مهارکنندگی در اسیدیته کانال گوارشی حشره اتفاق افتاد زیرا کانال گوارشی حشره هم دارای اسیدیته قلیایی می‌باشد. پس از آن در اسیدیته‌های ۹ و ۷ مهارکنندگی بیشتری نسبت به سایر اسیدیته‌ها دیده شد، گرچه بین این دو اسیدیته تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

گزارش‌های متعددی مبنی بر وابستگی خاصیت مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی گیاهی روی فعالیت آلفا آمیلاز وجود دارد. برای مثال، والنسیا خیمنز و همکاران (Valencia-Jime´nez *et al.*, 2008) اثر مهارکننده‌های پروتئینی گیاهی را روی آمیلاز لارو پروانه *Tecia solanivora* در اسیدیته‌های مختلف بررسی کردند. نتایج آن-ها نشان داد که در بهترین شرایط ۸۰ درصد از فعالیت آمیلاز در اسیدیته ۹ توسط مهارکننده استخراج شده از تاج خروس وحشی مهار شد که اسیدیته بهینه فعالیت آنزیم نیز بود و همچنین تاثیر مهارکننده‌های دو رقم لوبیا روی آمیلاز باعث ۷۰ و ۸۷ درصد مهار فعالیت آن در اسیدیته ۶ شد. آن‌ها نتیجه گرفتند که تاج خروس به دلیل اینکه در اسیدیته بهینه فعالیت آمیلاز باعث بیشترین مهارکنندگی می‌شود، مهارکننده بسیار مناسبی برای مهار فعالیت آمیلاز این حشره می‌باشد و بنابراین به عنوان گیاه مناسب برای تولید گیاه تراریخت سیب‌زمینی انتخاب شد. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.*, 2010) مشاهده کردند که شدت مهارکنندگی آلفا آمیلاز توسط مهارکننده تریتیکاله، با مقادیر مختلف اسیدیته تغییر کرد. همچنین مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.*,

2012) عصاره پروتئینی استخراج شده از تریتیکاله را روی آمیلاز غدد بزاقی سن گندم اثر دادند که تاثیر مهارکننده روی فعالیت آنزیم وابسته به دز بود، به طوری‌که نتایج آن‌ها نشان داد در بالاترین غلظت استفاده شده از مهارکننده فعالیت آنزیم مذکور ۸۷ درصد مهار شد. بیشترین فعالیت مهارکنندگی آنزیم در اسیدیته ۵ مشاهده شد که بهینه فعالیت آنزیم غدد بزاقی بود. بنابراین می‌توان چنین انتظار داشت که در شرایط داخل کانال گوارشی مینوز گوجه‌فرنگی، اگر غلظت مناسبی از این مهارکننده‌ها وجود داشته باشد، میزان مهارکنندگی قابل قبولی حاصل شود و با مهار آمیلاز رشد و نمو آن نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد.



شکل ۲- اثر اسیدیته بر فعالیت مهارکنندگی تریتیکاله بر آنزیم آلفا آمیلاز مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta*

Figure 2. The effect of pH on the inhibition of the *Tuta absoluta* α-amylase activity

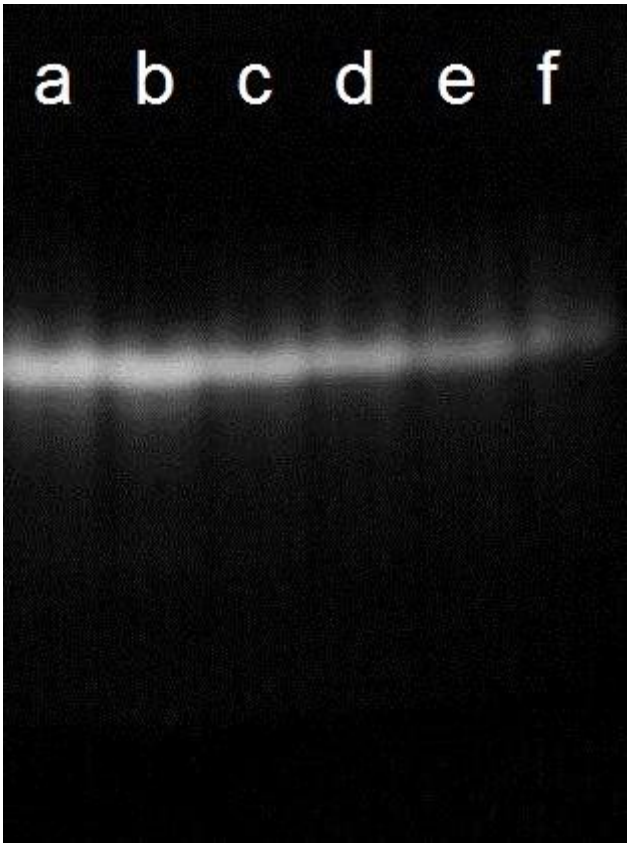
سنجش مهارکنندگی در ژل

با توجه به سنجش فعالیت مهارکننده با روش طیف-سنجی (الایزا ریدر) تاثیر عصاره پروتئینی تریتیکاله روی آمیلاز گوارشی مینوز گوجه فرنگی، خاصیت مهارکنندگی آن در ژل نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۵ غلظت مختلف از مهارکننده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۰/۵ ساعت با آنزیم انکوبه شدند. سپس زایموگرام توسط ژل پلی اکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود روند مهارکنندگی وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت مهارکننده شدت باند کاهش می‌یابد به طوری که در بالاترین غلظت (۸ میکروگرم پروتئین) عصاره، باند آمیلاز به شدت کاهش یافت ولی در پایین‌ترین غلظت (۰/۵ میکروگرم پروتئین) با شاهد تفاوت نداشت. این نتایج با نتایج سایر محققان هم‌خوانی دارد برای مثال، والنسیا و همکاران (Valencia *et al*., 2000) دو مهارکننده لوبیا و تاج خروس را خالص‌سازی کردند و تأثیر آن را روی آلفا آمیلاز *Hypothenemus hampei* مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که مهارکننده لوبیا قادر است میزان بالایی از فعالیت آنزیم را مهار کند. آن‌ها آنزیم را همراه این مهارکننده‌ها در ژل الکتروفوز بارگذاری کردند. تصویر ژل نیز نتایج حاصل از نورسنجی را تأیید کرد و شدت رنگ باند در حضور مهارکننده لوبیا در مقایسه با شاهد

بسیار کاهش یافت، در صورتی که در حضور مهارکننده تاج خروس، رنگ باند تغییر چندانی نکرد. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al*., 2012) در بررسی‌های ژل الکتروفورز نشان دادند که همه ایزوفرم‌های آنزیم آمیلاز غدد بزاقی به مهارکننده استخراج شده از تریتیکاله در درجات متفاوت حساس می‌باشند. برزویی و همکاران (Borzoui *et al*., 2013) تاثیر مهارکننده‌های استخراج شده از غلات را بر آمیلاز غدد بزاقی کرم گلوگاه انار بررسی کردند که نتایج آن‌ها نشان داد مهارکننده گندم در بالاترین غلظت استفاده شده باعث حذف کامل باندهای آمیلازی در ژل شد. گیت هاوس و همکاران (Gatehouse *et al*., 1979) اولین افرادی بودند که اعلام کردند بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی می‌توانند باعث مقاومت گیاهان به آفات شوند، که انتخاب این ویژگی‌ها در ابتدا به وسیله روش‌های سنتی اصلاح گیاهان انجام می‌گرفت ولی امروزه با توسعه روش‌های بیوتکنولوژی ژن یا ژن‌های مورد نظر به گیاهان منتقل می‌شوند تا در گیاهان بیان شوند (Redden *et al*., 1983; Lecardonnel *et al*., 1999; Ussuf *et al*., 2001). اولین مثال استفاده از گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های سمی گیاهی علیه حشرات، ژن بازدارنده آنزیم تریپسین بود که در گیاه تنباکو برای مقابله با لارو بالپولکداران تولید شد (Hilder *et al*., 1987; Silva *et al*., 2001). از آن زمان تاکنون تلاش‌های گوناگونی صورت گرفته تا از ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های سمی علیه حشرات استفاده شود. وقتی ژن بازدارنده آلفاآمیلاز موجود در لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris*) به گیاه نخود منتقل شد، مقاومت گیاه نخود به سوسک *Bruchus pisorum* را ایجاد کرد (Morton *et al*., 2000; Silva *et al*., 2001)، بنابراین یکی از راه‌های ایجاد گیاهان مقاوم به آفات انتقال ژن‌های کد کننده مهارکننده‌های آمیلاز و پروتئاز به گیاهان مختلف و تولید گیاهان تراریخته می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم آوردن هزینه‌های انجام این طرح قدردانی می‌نمایند.



شکل ۳- بررسی اثر مهارکنندگی تریتیکاله روی آمیلاز گوارشی مینوز گوجه فرنگی ***Tuta absoluta*** در ژل. تیمار شاهد در سنجش آمیلاز گوارشی ستون اول از سمت چپ (a) می‌باشد. با افزایش غلظت مهارکننده فعالیت آمیلاز کاهش یافت. غلظت‌های مهارکننده به‌ترتیب ۸ میکروگرم پروتئین (f)، ۴ میکروگرم پروتئین (e)، ۲ میکروگرم پروتئین (d)، ۱ میکروگرم پروتئین (c)، ۰/۵ میکروگرم پروتئین (b) و شاهد بدون مهارکننده (a).

Figure 3. In gel assay of the effect of triticale extract on the of *Tuta absoluta* α-amylase activity. First column of the left hand side shows control. With increasing the inhibitor concentrations the amount of the enzyme activity decreases. 8 µg protein (f), 4 µg protein (e), 2 µg protein (d), 1 µg protein (c), 0.5 µg protein (b) and control without inhibitor (a).

References

Heidarvash, S. 2013. Study of amylase and proteinase enzymes of tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). Msc. thesis. University of Tehran.

Baker, J. 1983. Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*. **Insect Biochemistry** 13: 421-428.

Baker, J. 1987. Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae), by high-performance liquid chromatography and their interaction with partially-purified amylase inhibitors from wheat. **Insect Biochemistry** 17: 37-44.

Borzoui, E., Bandani, A. R. and Goldansaz, S. H. 2013. Effect of cereal seed proteinaceous extracts on α-amylase and protease activity of salivary glands of Carob moth, Ectomyelois ceratoniae (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Crop Protection** 2 (3): 285-296.

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.

Broadway, R. M. and Duffey, S. S. 1985. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology** 32: 673-680.

Dastranj, M., Bandani, A. R. and Mehrabadi, M. 2013. Age-specific digestion of *Tenebrio molitor* (Coleoptare: Tenebrionidae) and inhibition of proteolytic and amylolytic activity by plant proteinaceous seed extracts. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 16: 309-315.

Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., González-Cabrera, J., Ruescas, D. C., Tabone, E. and Frandon, J. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. **Journal of Pest Science** 83: 197-215.

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R. and Grossi-de-Sá, M.F. 2002 .Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases. **European Journal of Biochemistry** 269: 397-412.

Gatehouse, A. M., Gatehouse, J. A., Dobie, P., Kilminster, A. M. and Boulter, D. 1979. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 30: 948-958.

Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Scheerman, S. E., Baker, R. F. and Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature** 300: 160-163.

Hosseinkhani, S. and Nemat-Gorgani, M. 2003. Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. **Enzyme and Microbial Technology** 33: 179-184.

Ishimoto, M., Sato. T., Chrispeels, M. J. and Kitamura, K. 1996. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha amylase inhibitor of common bean. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 79: 309-315.

Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review Entomology** 51: 45-66.

Kazzazi, M., Bandani, A. R. and Hosseinkhani, S. 2005. Biochemical characterization of α-amylase of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. **Entomological Science** 8: 371-377.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature** 227: 680-685.

Lecardonnel, A., Chauvin, L., Jouanin, L., Beaujean, A., Prévost, G. and Sangwan-Norreel, B. 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. **Plant Science** 140: 71-79.

Mehrabadi, M., Bandani, A. R,. Mehrabadi, R. and Alizadeh, H. 2012. Inhibitory activity of proteinaceous α-amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary α-amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 102: 220-228.

Mehrabadi, M., Bandani, A., Saadati, F. and Mahmudvand, M. 2011. α-Amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. **Journal of Agricultural Science & Technology** 13: 1173-1182.

Mehrabadi, M., Bandani, A. R. and Saadati, F. 2010. Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, α-amylases by α-amylase inhibitors (T-αAI) from Triticale. **Journal of Insect Science** 10: 179.

Mohammadzadeh, M., Bandani, A. R. and Borzoui, E. 2013. The effect of cereal seed extracts on amylase activity of the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae). **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 46: 1-10

Morton, R. L., Sschroeder, H. E., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J., Armstrong. and Higgins, T. J. V. 2000. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under Weld condition. **proceedings of the national academy of sciences of the united states of america** 97: 3820-3825.

Mosolov, V. V., Grigor'eva, L. I. and Valueva. T. A. 2001. Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins. **Applied Biochemical Microbiology** 37: 545-551.

Redden, R., Dobie, P. and Gatehouse, A. 1983. The inheritance of seed resistance to *Callosobruchus maculatus* F. in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). I. Analyses of parental, F1, F2, F3 and backcross seed generations. **Crop and Pasture Science** 34: 681-695.

Reyes, M., Rocha, K., Alarcón, L., Siegwart, M. and Sauphanor, B. 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absolut* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 102: 45-50.

Richardson, M. J. 1991. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors In: Richardson., M. J, ed. Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, New York. pp. 259-305.

Ryan, C. A. 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 28: 425-449.

Saadati, F., Bandani, A. R. and Moslemi, A. 2011. Effect of plant seeds protein extract on the Sunn pest, *Eurygaste integriceps* Puton, growth and development and its gut serine protease activity. **African Journal of Biotechnology** 10: 11502-11510.

Shewry, P. R. and Lucas, J. A., 1997. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. **Advances in Botanical Research** 26:135-192.

Silva, C. P., Terra, W. R., Samuels, R. I., Isejima, E. M., Bifano, T. D. and Almeida, J. S. 2001. Induction of digestive α-amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α-amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology** 47: 1283-1290

Silva, G. A., Picanço, M. C., Bacci , L., Crespo, A. L. B., Rosado, J. F. and Guedes, R. N. C. 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science** 67: 913-920.

Siqueira, H. Á. A., Guedes, R. N. C. and Picano, M. C. 2000 .Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology** 2: 147-153.

Srinivasan, A., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Gatehouse, J. A. and Gupta. V. S. 2005. A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. **Plant Molecular Biology** 57: 359-374.

Ussuf, K., Laxmi, N. and Mitra, R. 2001. Proteinase inhibitors: plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science** 80: 847-853.

Valencia, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E. and Chrispeels, M. J. 2000. α-amylase of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. I**nsect Biochemistry and Molecular Biology** 30: 207–213.

Valencia-Jime´nez, A., Arboledav, J. W., Avila, A. L. and Grossi-de-Sá, M. 2008. Digestive α-amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. **Bulletin of Entomological Research** 98: 575-579.

Plant Pest Research
2016- 6(1): 1-12

The effect of Proteinaceous extract of triticale on α-amylase activity of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae)

M. Esmaeily[1] and A. R. Bandani [2*]
1. Plant Protection Department, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: April 28, 2014 - Accepted: March 8, 2015)

Abstract

The Tomato leaf miner is a polyvoltine pest native to South America and is a universal threat to tomato. This pest was first reported from Orumieh but nowadays it has been reported from all tomato fields of Iran. In order to control this pest, various pesticides including organophosphorous and pyrithroid insecticides are used continuously which caused the insect to develop resistance, contamination of products to pesticides residue and contamination of the environment. Thus, the aim of the current study was to study the effect of semi-purified proteinaceous extract of triticale seeds on α-amylase activity of the insect. Seed proteinaceous extract was obtained by NaCl solution and it was semi-purified using ammonium sulfate. Enzyme assay indicated that the insect amylase inhibition is dependant to the extract dose which is used i.e. with increasing inhibitor dose the amount of enzyme inhibition increased. For example, when 0.5 µg seed extract protein was used only 31% enzyme inhibition was achieved and when 8.0 µg seed extract protein was used 66% enzyme inhibition was obtained. In monitoring pH it was found that the highest inhibition was obtained at pH 8.0 and beyond this pH the amount of enzyme inhibition reduced. Gel assay confirmed our enzyme assay results which were done by Elisa reader instrument i.e. with increasing inhibitor concentration amylase band intensity decreased.

Key words: Tomato leaf miner, amylase enzyme, Triticale seed extract

*Corresponding author: abandani@ut.ac.ir