تحقیقات آفات گیاهی
۲۹- ۱۷ :(۴) ۶-۱۳۹۵

تاثیر لکتین استخراج‌شده از علف هفت بند *Polygonum persicaria* L. بر متابولیسم حدواسط لاروهای پروانه سفیده بزرگ کلم *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae)

آرش زیبایی[1*]، سمر رمزی[2]، آزاده کریمی‌ملاطی[1] و بابک ربیعی[3]

۱- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان رشت، ایران. ۲- پژوهشکده چای، موسسه علوم باغبانی؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.۳- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۵)

چکیده

لکتین‌ها پروتئین‌هایی با ساختار ناهمگن هستند که با اتصال به قندهای منومر یا اولیگوساکاریدهای موجود در سطح سلول‌ها سبب اختلال در فرآیندهای سلولی و حتی مرگ آن‌ها می‌شوند. در این پژوهش، برای درک بهتر سازوکار حشره‌کشی لکتین علف هفت بند (PPA) *Polygonum persicaria* L.، تاثیر غلظت‌های مختلف آن (۲، ۱، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر متابولیسم حدواسط لاروهای سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* L. ارزیابی شد. تغذیه لاروهای سفیده بزرگ کلم از لکتین مذکور سبب افزایش فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و گاماگلوتامیل ترانسفراز شد، اما فعالیت آلانین آمینوترانسفراز کاهش معنی‌داری را نشان داد. فعالیت آلدولاز به صورت وابسته به غلظت در لاروهای تیمار شده نسبت به شاهد کاهش یافت، اما فعالیت لاکتات دهیدروژناز فقط در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. فعالیت اسیدفسفاتاز تفاوت معنی‌داری بین لاروهای شاهد و تیمار نشان نداد، اما آلکالین فسفاتاز در لاروهای تغذیه شده روی لکتین ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به سایر تیمارها بیشترین فعالیت را داشت. لیپوپروتئین با تراکم بالا در لاروهای تغذیه شده روی لکتین ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کمترین مقدار اما لیپوپروتئین با تراکم کم، بیشترین مقدار را نشان داد. در بین درشت مولکول‌های ذخیره‌ای، گلیکوژن تفاوت معنی‌داری را بین لاروهای شاهد و تغذیه شده با لکتین نشان نداد، اما مقادیر پروتئین و تری‌گلیسرید به طور معنی‌داری کاهش یافتند. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که لکتین گیاه هفت بند در بیشترین غلظت استفاده شده می‌تواند سبب اختلال در متابولیسم حدواسط لاروهای سفیده کلم شود.

واژه‌های کلیدی: لکتین، *Polygonum persicaria*، *Pieris brassicae*، متابولیسم حدواسط

نویسنده مسئول: arash.zibaee@guilan.ac.ir

مقدمه

امروزه پروتئین‌های زیادی با ویژگی‌های حشره‌کشی دارای قابلیت استفاده در قالب برنامه‌های ایجاد ارقام مقاوم گیاهی هستند. این پروتئین‌ها عبارتند از لکتین‌ها[1]، پروتئین‌های غیر فعال کننده ریبوزوم[2]، بازدارنده‌های پروتئاز[3]، بازدارنده های آلفا-آمیلاز[4]، اورئازها[5] و کیتینازها [6] (Franco *et al.*, 2000). در این بین، لکتین‌ها، پروتئین‌های غیر فعال کننده ریبوزوم، بازدارنده‌های پروتئاز و بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز براساس پژوهش‌های متعدد، اثرات منفی قابل توجهی بر پارامترهای زیستی و فیزیولوژیک طیف وسیعی از آفات دارند (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002; Vasconcelos and Oliveira, 2004; Michiels *et al.*, 2010). طبق تعریف، لکتین‌ها گروهی از پروتئین‌ها هستند که با داشتن حداقل یک دومین[7] غیرکاتالیکی به طور اختصاصی و برگشت‌پذیر به مونوساکاریدها و الیگوساکاریدها متصل می‌شوند (Peumans and van Damme, 1995). این ترکیبات یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که به‌عنوان ابزاری دفاعی در برابر حمله حشرات به گیاهان استفاده می‌شوند. لکتین‌های گیاهی به چهار گروه مرولکتین[8]، هولولکتین[9]، سوپرلکتین[10] و کایمرولکتین[11] تقسیم می‌شوند که از نظر داشتن تعداد بخش‌های قابل اتصال به کربوهیدرات‌ها، اتصال سلول‌ها به هم و نوع قند هدف تفاوت دارند (van Damme *et al.*, 1998). لکتین‌های گیاهی در دانه‌ها یا بافت‌های ذخیره‌ای سبز گیاهان مانند غده، پیاز، ریزوم و پوست دیده می‌شود که دلیلی بر نقش دفاعی آن‌ها می‌باشد (Peumans and van Damme, 1995).

علف هفت بند، *Polygonum persicaria* L. (Polygonaceae) گیاهی یک‌ساله با ساقه خوابیده است که طول آن به ۵۰ سانتی‌متر می رسد. برگ های این گیاه ریز، نوک تیز و گل‌های آن ریز و صورتی هستند. این گیاه بومی اروپا بوده و علف هرز محصولات باغی و نهالستان‌ها می‌باشد و از نظر پزشکی برای کاهش تب، قند خون و اسهال استفاده می‌شود (Simmonds, 1945). در پژوهش‌های پیشین، لکتینی با وزن مولکولی ۱۹/۲ کیلودالتون توسط ستون Sepharose-4B-Galactose از ساقه‌های این گیاه استخراج شد (PPA). این لکتین در مقادیر ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم پروتئین سبب مرگ و میر ۷۰ درصدی، کاهش وزن و توده پروتئینی در لاروها و بدشکلی آن‌ها شد (Zibaee *et al.*, 2014). بیشترین غلظت استفاده‌شده از این لکتین سبب کاهش کارایی تغذیه لاروهای پروانه سفیده بزرگ کلم از طریق تاثیر منفی بر شاخص‌های تغذیه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، پروتئاز و لیپاز شد (Zibaee *et al.*, 2014). در پژوهشی دیگر مشخص شد که این لکتین می‌تواند به طور مستقیم سبب بازدارندگی فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی لاروهای سفیده کلم شده و آن را به روش نارقابتی مهار کند (Zibaee *et al.*, 2015). تاکنون سازوکارهای متفاوتی برای نقش حشره‌کشی لکتین‌ها گزارش شده است که می‌توان به تاثیر کشندگی روی سلول‌ها از طریق شکستن DNA و فعال کردن مسیرهای مرگ سلولی از طریق کاسپازها (Hamshou *et al.*, 2010)، مهار آنزیم‌های گوارشی به ویژه آلفاآمیلازها (Franco *et al.*, 2000) و تاثیر بر پروتئین‌های فریتین همولمف (Sadeghi *et al.*, 2006) اشاره کرد اما تاکنون نتایج روشنی از تاثیر لکتین‌های گیاهی بر متابولیسم حدواسط به‌دست نیامده است.

حشرات نیازمند مصرف پی در پی انرژی هستند که می‌تواند از غذای در حال خوردن یا در صورت عدم تغذیه از

1. Lectins
2. Ribosome inactivating proteins
3. Protease inhibitors
4. a-amylase inhibitors
5. Urease
6. Chitinase
7. Domain
8. Merolectin
9. Hololectin
10. Superlectin
11. Chimerolectin

ذخایر غذایی تامین شود. به مجموعه فرآیندهایی که از یک سو غذای هضم شده به محل ذخیره منتقل می‌شود یا به‌طور مستقیم برای تامین انرژی فرآوری می‌شود و از سوی دیگر ذخایر غذایی برای تامین انرژی مصرف می‌شود، متابولیسم حدواسط گفته می‌شود (Klowden, 2007). ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی متعددی در این سازوکار نقش دارند که می‌توان به انواع آمینوترانسفرازها، فسفاتازها، لیپوپروتئین‌ها و درشت مولکول‌های ذخیره‌ای اشاره کرد. پژوهش حاضر با بررسی فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز، فسفاتاز، آلدولاز و لاکتات دهیدروژناز، ترکیبات ناقل در همولمف و درشت-مولکول‌های ذخیره‌ای چگونگی تاثیر احتمالی لکتین علف هفت بند بر متابولیسم حدواسط لاروهای سفیده بزرگ کلم را مشخص خواهد کرد. علاوه‌براین، نتایج این پژوهش می‌تواند مکان‌های جدید تاثیر لکتین‌ها بر فیزیولوژی حشرات را ارایه دهد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

دسته های تخم سفیده بزرگ کلم از مزارع کلزای ساری در سال ۱۳۹۳ جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پرورش حشرات در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی در اتاقک رشد با دمای ۲± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰± ۷۵ درصد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت (تاریکی: روشنایی) انجام شد. برای پرورش لاروها از ظروف پلاستیکی درپوش‌دار شفاف با ابعاد ۲۰×۱۰ سانتی‌متر پوشانده شده با توری پارچه‌ای سفیدرنگ به منظور جلوگیری از ورورد و خروج حشرات و تهویه مناسب استفاده شد (Zibaee *et al.*, 2014). لاروها با برگ‌های ترب تغذیه شده و سن سوم لاروی برای آزمایش تغذیه از لکتین علف هفت بند در نظر گرفته شد.

تغذیه لاروها از برگ‌های ترب آغشته به لکتین خالص شده از علف هفت بند

سه غلظت از لکتین هفت بند (۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر) در آب مقطر حاوی ۰/۰۲ درصد ترایتون ایکس-۱۰۰[12] تهیه شده و برگ‌های ترب (۳×۳ سانتی‌متر) داخل هر غلظت به‌طور جداگانه فروبرده شد و پس از ۵ دقیقه روی کاغذ صافی قرار داده شد (آب مقطر حاوی ۰/۰۲ درصد ترایتون به عنوان شاهد استفاده شد). پس از خشک شدن قطعات برگی (۲۰ دقیقه)، سه گرم برگ از هر تیمار (به همراه شاهد) در اختیار ۲۰ لارو سن سوم قرار گرفت. پرورش لاروها در تیمارها و شاهد در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی (شرایط پرورش) تا ۲۴ ساعت اول سن پنجم لاروی ادامه یافت. در این مدت محیط پرورش روزانه تمیز شده و برگ-های تازه تیمار و شاهد در اختیار لاروها قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی

لاروهای شاهد و تیمار (۲۴ ساعت اول سن پنجم لاروی) انتخاب شده و ۲۰۰ میلی‌گرم بافت کل بدن از هر تیمار جداگانه در تیوب‌های اپندورف قرار داده شده و به آن ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. نمونه‌ها هموژنایز شده و در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. مایع رونشین جهت بررسی‌های بیوشیمیایی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز[13]

این دو آنزیم با استفاده از روش توماس (Thomas, 1998) اندازه‌گیری شدند. بر اساس این روش، آلانین در اثر فعالیت آنزیم آمینوترانسفراز در حضور ۲- اگزوگلوتامات تولید گلوتامات و پیروات می کند. آنزیم آسپارتات-آمینوترانسفراز، اسیدآمینه آسپارتات را در حضور ۲-اگزوگلوتارات به اگزالواستات وگلوتامات تبدیل می‌کند که خواندن جذب نوری رنگ‌های حاصله در طول موج ۳۴۰ نانومتر نشان‌دهنده فعالیت این آنزیم در نمونه است. برای سنجش فعالیت این دو آنزیم از کیت بیوشیمیایی شرکت

[12] . Triton X-100
[13] . Alanine and Aspartate transferase (ALT)/(AST)

بیوکم (تهران، ایران) استفاده شد. محلول ۱ و ۲ به نسبت ۴ به ۱ مخلوط شده و با اضافه نمودن نمونه آنزیمی و انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه، فعالیت این دو آنزیم در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد (مایکروپلیت ریدر، Awareness, Statfax, 2300).

گاما گلوتامیل ترانسفراز[14]

از روش ساز (Szasz, 1976) برای تعیین فعالیت این آنزیم در لاروهای شاهد و تیمار استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر محلول بافر، ۲۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (L-ɣ-glutamyl-3-carboxy-4-nitrianilide) و ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی بود (ZiestChem Diagnostic Co., Tehran-Iran). پس از ۳ دقیقه، جذب در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

آلدولاز[15]

فعالیت آنزیم آلدولاز بر اساس روش پینتو و همکاران (Pinto *et al.*, 1969) اندازه‌گیری شد. بر اساس دستورالعمل شرکت زیست‌کم، ۵۰ میکرولیتر محلول بافر، ۲۵ میکرولیتر محلول سوبسترا (Fructose-1,6 di-phosphate)، ۱۰ میکرولیتر محلول کوفاکتور (NADH) و ۲۰ میکرولیتر نمونه به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و جذب در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد.

لاکتات دهیدروژناز[16]

جهت سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز از روش کینگ (King, 1965) استفاده شد. برای استاندارد نمودن مخلوط واکنش، ۲۰۰ میکرولیتر NAD^+ و آب‌مقطر به تیوب‌های اپندورف اصلی و شاهد اضافه شدند. به هر تیوب، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا–بافر (محلول ۱) و ۱۰ میکرولیتر نمونه اضافه شد. انکوباسیون به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگی (۲) (2,4-dinitrophenyl hydrazine) اضافه شده و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از خنک شدن روی یخ، ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسیدسدیم ۴۰۰ میلی مولار اضافه شده و پس از یک دقیقه به میکروپلیت منتقل شده و جذب در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

اسید و آلکالین فسفاتاز[17]

بر اساس روش بسی و همکاران (Bessey *et al.*, 1946) ۵۰ میکرولیتر بافر تریس–هیدروکلرید (۲۰ میلی مولار؛ اسیدیته ۶ برای اسید فسفاتاز و اسیدیته ۹ برای آلکالین فسفاتاز)، ۳۰ میکرولیتر *p*-nitrophenol-phosphate و ۱۰ میکرولیتر نمونه با هم مخلوط و پس از ۵ دقیقه جذب در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

تعیین میزان لیپوپروتئین با تراکم زیاد[18] و کم[19]

روش شافر و مک‌نامار (Schaefer and McNamara, 1997) برای تعیین میزان HDL و LDL استفاده شد. بر اساس دستورالعمل شرکت زیست‌کم (سنجش HDL)، ۵۰ میکرولیتر محلول رسوب‌دهنده (PTA-Magnesium) و ۲۰ میکرولیتر نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. مخلوط واکنش به‌مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از یک ساعت انکوباسیون، جذب در ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. برای سنجش LDL، ۵۰ میکرولیتر محلول بافر (۱) با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم (۲) (H_2O_2; Amino antipyrine) و ۱۰ میکرولیتر نمونه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و سپس جذب در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

گلیکوژن[20]

برای اندازه‌گیری گلیکوژن، ۲۰۰ میلی گرم از بافت کل بدن در یک میلی‌لیتر محلول ۳۰ درصد حاوی هیدروکسیدپتاسیم و سولفات‌سدیم غوطه‌ور شدند. میکروتیوب‌های حاوی نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب

[14] . Gamma-Glutamyl transferase (GGT)
[15] . Aldolase
[16] . Lactate dehydrogenase (LDH)
[17] . Acid and Alkaline phosphatase (ACP)/(ALP)
[18] . High density lipoprotein (HDLp)
[19] . Low density lipoprotein (LDLp)
[20] . Glycogen

جوش قرار داده شده و ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به آن‌ها اضافه شد. سپس اپندورف‌ها تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و یک میلی‌لیتر آب‌مقطر به بخش ته‌نشین اضافه شد. سپس با اضافه نمودن محلول فنل ۵ درصد به نمونه‌ها، انکوباسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انجام شد. استاندارد گلیکوژن نیز در غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در نهایت، استانداردها و نمونه‌ها در ۴۹۲ نانومتر خوانده شدند (Chun and Yin, 1998).

تری‌گلیسرید[21]

برای اندازه‌گیری تری‌گلیسرید از روش فوساتی و پرن-سیپ (Fossati and Prencipe, 1982) استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر معرف و ۲۰ میکرولیتر محلول رونشین حاصل از سانتریفیوژ اجسام چربی (بخش ۲-۷-۱) برای شاهد و تیمارها و ۱۰۰ میکرولیتر معرف و۲۰ میکرولیتر آب‌مقطر به‌عنوان شاهد، جداگانه در پلیت الیزا ریخته شد و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. در نهایت، میزان تری-گلیسرید در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد (کیت Biochem، تهران-ایران).

پروتئین[22]

اندازه‌گیری میزان پروتئین با استفاده از روش لوری و همکاران (Lowry *et al.*, 1951) انجام شد. بر اساس کیت شرکت زیست‌کم (ZiestChem Co., Tehran-Iran)، ۵۰ میکرولیتر معرف با ۱۰ میکرولیتر استاندارد (پروتئین سرم گاو به غلظت ۵۰ میلی‌گرم) و ۵۰ میکرولیتر معرف با ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه جداگانه به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شده و جذب در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد. سپس جذب نمونه بر جذب استاندارد تقسیم شده و در عدد ۵۰ به عنوان غلظت استاندارد ضرب شد (بر اساس دستورالعمل زیست‌کم). مقدار حاصل به‌عنوان میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تجزیه‌ی داده‌ها با استفاده از برنامه‌ی نرم‌افزاری SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

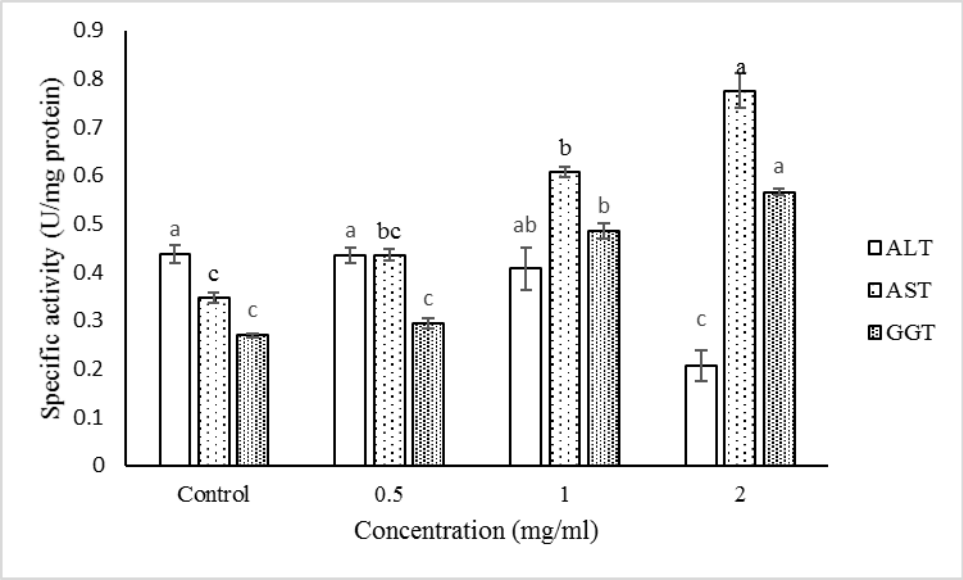
نتایج و بحث

تاثیر لکتین علف هفت بند بر فعالیت آمینوترانسفرازها

تغذیه لاروها روی غلظت‌های مختلف لکتین سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به شاهد شد، اما سایر غلظت‌های لکتین کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند (شکل ۱؛ $p\leq0.0002$، Pr>F=26.81). فعالیت دو آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) لاروهای تغذیه شده از لکتین علف هفت بند افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند که این افزایش در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱؛ $p\leq0.0003$، Pr>F=32.11؛ $p\leq0.0008$، Pr>F=21.48). ترانس‌آمیناسیون یکی از مهم‌ترین فرآیندهای فیزیولوژیک در بدن حشرات است که از یک‌سو با تبدیل اسیدهای آمینه به هم سبب تامین بلوک‌های پروتئینی لازم برای بافت‌سازی یا سنتز پروتئین شده و از سوی دیگر در فرآیندهای انرژتیک حشرات مثل تبدیل آلانین به پرولین نقش دارد (Klowden, 2007). آلانین و آسپارتات آمینوترانسفرازها دو آنزیم درگیر در ترانس‌آمیناسیون هستند که در همولمف و اجسام چربی حشرات یافت شده و به ترتیب در فرآوری آلانین جهت متابولیسم پرولین و تبدیل آسپارتات و آلفا-کتوگلوتارات به اگزالات و گلوتامات طی چرخه کربس اهمیت دارند (Klowden, 2007). گاما-

[21] . Triglyceride
[22] . Protein

گلوتامیل ترانسفراز نیز در انتقال گلوتاتیون به گیرنده‌های سلولی و ایجاد گلوتامات اهمیت دارد که می‌تواند در سم-زدایی ترکیبات وارد شده به بدن از طریق چرخه گاما-گلوتامیل و مزدوج نمودن آن‌ها با گلوتاتیون موثر باشد (Tate and Meister, 1985). کاهش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در لاروهای تیمار می‌تواند به دلیل عدم تامین انرژی از طریق پرولین و یا نیاز به اسیدهای آمینه به دلیل تخریب بافتی ایجاد شده توسط لکتین باشد. افزایش فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز و گاماگلوتامیل ترانسفراز هم در نتیجه تامین انرژی از طریق چرخه کربس به واسطه تبدیل آسپارتات و آلفا-کتوگلوتارات به اگزالات و گلوتامات و سم‌زدایی لکتین وارد شده به بدن لارو می‌تواند ایجاد شود (Klowden, 1997).



شکل ۱- تاثیر لکتین *Polygonum persicaria* بر فعالیت آمینوترانسفرازها در لاروهای *Pieris brassicae*. تفاوت‌های آماری بین غلظت‌ها در هر آنزیم توسط حروف مختلف نشان داده شده است (آزمون توکی، در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد)

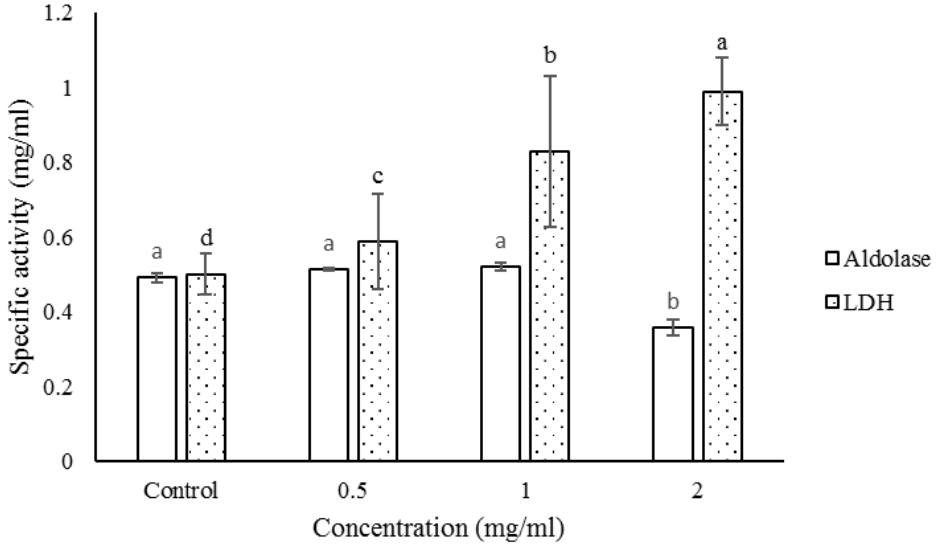
Figure 1. Effect of *Polygonum persicae* lectin on activities of amino transferases in *Pieris brassicae* larvae. Different letters have been used to show statistical differences between different concentrations of each enzyme (Tukey test, $p \leq 0.05$).

تاثیر لکتین علف هفت بند بر فعالیت آلدولاز و لاکتات دهیدروژناز

غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین علف هفت‌بند سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آلدولاز نسبت به شاهد شد (شکل ۲؛ $p \leq 0.0001$، Pr>F=71.91). برعکس فعالیت لاکتات دهیدروژناز (LDH) به طور وابسته به غلظت در لاروهای تغذیه شده از غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت بند افزایش یافت که بیشترین فعالیت در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۲؛ $p \leq 0.0001$، Pr>F=89.97).

آلدولاز آنزیمی است که در مراحل اولیه چرخه گلیکولیز سبب شکستن قندهای مشخص جهت تامین انرژی می‌شود. به عبارت دیگر، این آنزیم نوعی ایزومراز است که قند مورد نظر را با گروه عاملی هدف در اختیار چرخه قرار می‌دهد (Pinto *et al.*, 1994). لاکتات دهیدروژناز در تبدیل پیرووات به لاکتات و استفاده از الکترون‌ها درتبدیل NADH به NAD^+ نقش داشته و می‌تواند شاخصی برای تخریب بافتی در لاروهای تیمار باشد (Kaplan and Pesce, 1996). این آنزیم به‌هنگام کمبود اکسیژن در بافت، پیرووات را که

محصول نهایی گلیکولیز است به لاکتات تبدیل می‌کند. این آنزیم شاخص وجود تنش شیمیایی و تخریب بافتی ناشی از آن در بافت‌های جانوری است (Kaplan and Pesce, 1996). کاهش فعالیت آلدولاز در لاروهای تیمار شده با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که تامین انرژی برای لاروهای تیمار از طریق گلیکولیز نیست و مسیر انرژی‌زا تری مثل کربس یا بتااکسیداسیون چربی‌ها برای تامین انرژی در حال انجام است. اما فعالیت بیشتر لاکتات دهیدروژناز در لاروهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف لکتین نشان‌دهنده احتمال تخریب بافتی یا تنش ایجاد شده در بدن است (Klowden, 2007).

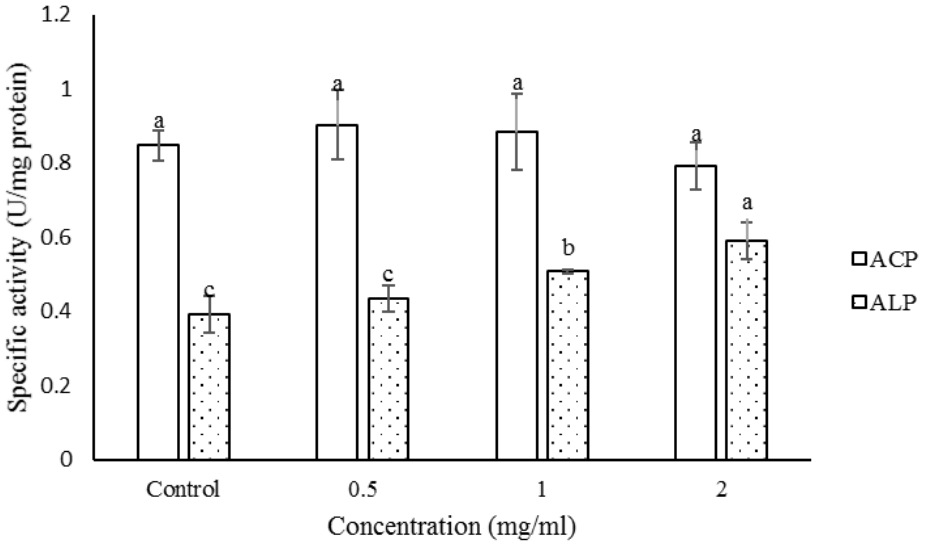


شکل ۲- تاثیر لکتین *Polygonum persicaria* بر فعالیت آلدولاز و لاکتات دهیدروژناز در لاروهای *Pieris brassicae*. تفاوت‌های آماری بین غلظت‌ها در هر آنزیم توسط حروف مختلف نشان داده شده است (آزمون توکی، در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد)

Figure 2. Effect of *Polygonum persicaria* lectin on activities of aldolase and lactate dehydrogenase (LDH) in *Pieris brassicae* larvae. Different letters have been used to show statistical differences between different concentrations of each enzyme (Tukey test, p≤0.05).

تاثیر لکتین علف هفت بند بر فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز

در لاروهای تغذیه کرده از غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت‌بند تفاوت معنی‌داری در فعالیت اسید فسفاتاز (ACP) مشاهده نشد (شکل ۳؛ $p\leq0.65$، Pr>F=60.65)، اما فعالیت آلکالین فسفاتاز به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت (شکل ۳؛ $p\leq0.0001$، Pr>F=39.76). اسید و آلکالین‌فسفاتاز نوعی از آنزیم‌های هیدرولیتیک هستندکه به‌ترتیب در محیط‌های شیمیایی اسیدی و بازی گروه‌های فسفات را از انواع مولکول‌ها مثل نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها و آلکالوییدها در شرایط اسیدی و قلیایی جدا می‌کنند (Senthil-Nathan *et al.*, 2006). فعالیت این دو آنزیم نشان‌دهنده کارایی هضم و جذب مواد غذایی در معده و انتقال آن‌ها به اجسام چربی است (Senthil-Nathan *et al.*, 2006). اگرچه فعالیت اسیدفسفاتاز تفاوت معنی‌داری بین لاروهای شاهد و تیمار نداشت اما افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌تواند به استفاده از چربی‌ها در فرآیندهای انرژتیک مرتبط باشد که با فعالیت پروتئین‌های ناقل چربی‌ها در همولمف مرتبط است (بخش پایین).

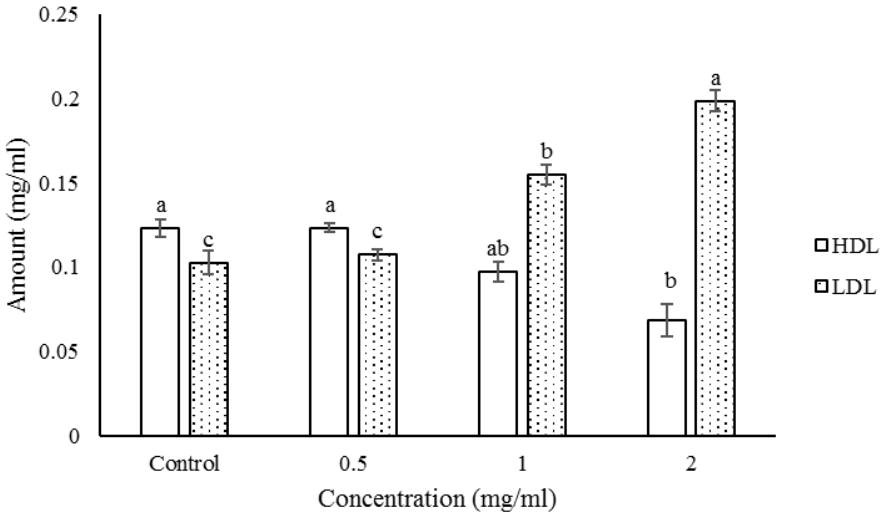


شکل ۳- تاثیر لکتین *Polygonum persicaria* بر فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز در لاروهای *Pieris brassicae*. تفاوت‌های آماری بین غلظت‌ها در هر آنزیم توسط حروف مختلف نشان داده شده است (آزمون توکی، در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد)

Figure 3. Effect of *Polygonum persicaria* lectin on activities of Acid phosphatase (ACP) and Alkaline phosphatase (ALP) in *Pieris brassicae* larvae. Different letters have been used to show statistical differences between different concentrations of each enzyme (Tukey test, $p \leq 0.05$).

تاثیر لکتین علف هفت بند بر مقدار لیپوپروتئین با تراکم زیاد و کم

مقدار لیپوپروتئین با تراکم زیاد در لاروهای تیمار شده با لکتین علف هفت بند نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴؛ $p \leq 0.0008$، $Pr>F=16.73$)، اما مقدار لیپوپروتئین با تراکم کم افزایش داشت که در هر دو مورد کمترین و بیشترین مقدار در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین مشاهده شد (شکل ۴؛ $p \leq 0.0001$، $Pr>F=59.03$). لیپوپروتئین با تراکم زیاد اسیدهای چرب ناشی از هضم چربی‌ها در معده را به اجسام چربی منتقل می‌کند، اما لیپوپروتئین با تراکم کم در انتقال منو و دی آسیل گلیسرول‌ها از اجسام چربی به بافت‌های هدف مثل ماهیچه‌ها یا اندام تولیدمثلی نقش دارد (Klowden, 2007). کاهش مقدار لیپوپروتئین با تراکم زیاد به دلیل کمبود اسید چرب در دسترس از معده برای انتقال به اجسام چربی است که می‌تواند در نتیجه اختلال در هضم چربی‌ها باشد. زیبایی و همکاران (Zibaee *et al.*, 2014) گزارش کردند که تغذیه لاروهای سفیده بزرگ کلم از غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت بند سبب کاهش فعالیت لیپاز گوارشی شد. افزایش مقدار لیپوپروتئین با تراکم کم نشان‌دهنده استفاده مکرر از منو و دی‌آسیل گلیسرول‌ها برای تامین انرژی در لاروهای تیمار شده است که این نتیجه با فعالیت بیشتر آلکالین فسفاتاز و کم شدن مقدار تری‌گلیسرید ذخیره‌ای لاروها قابل توجیه است (پایین).

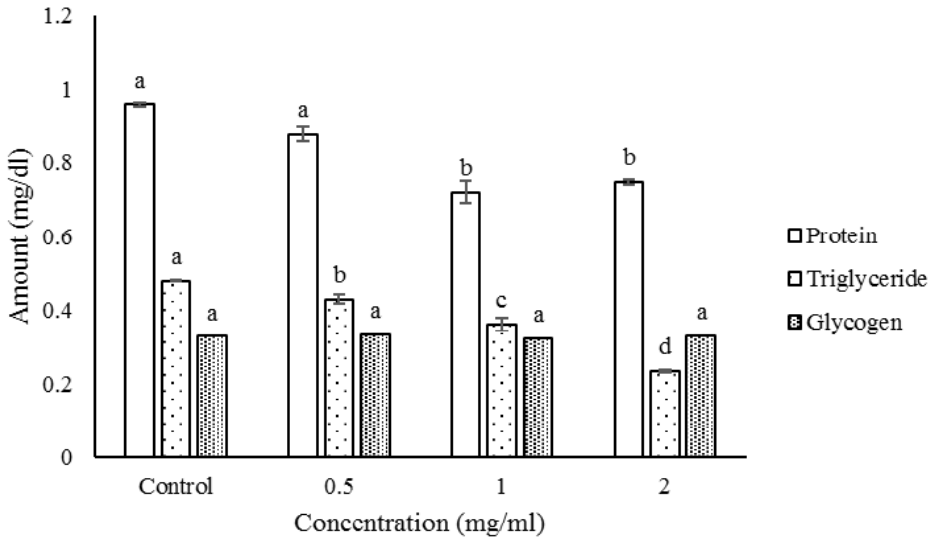


شکل ۴- تاثیر لکتین *Polygonum persicaria* بر مقادیر لیپوپروتئین با تراکم زیاد و کم در لاروهای *Pieris brassicae*. تفاوت‌های آماری بین غلظت‌ها در هر آنزیم توسط حروف مختلف نشان داده شده است (آزمون توکی، در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد)

Figure 4. Effect of *Polygonum persicaria* lectin on amounts of high density lipoproteib (HDLP) and low density lipoprotein (LDLP) in *Pieris brassicae* larvae. Different letters have been used to show statistical differences between different concentrations of each compound (Tukey test, $p\leq0.05$).

تاثیر لکتین علف هفت بند بر مقدار درشت‌مولکول‌های ذخیره‌ای

تغذیه لاروهای سفیده بزرگ کلم از غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت‌بند سبب کاهش معنی‌دار مقدار درشت‌مولکول‌های ذخیره‌ای پروتئین ($p\leq0.0024$، Pr>F=47.69) و تری‌گلیسرید ($p\leq0.0001$، Pr>F=96.15) به جز گلیکوژن ($p\leq0.05$، Pr>F=98.53) شد که این کاهش در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشهود بود (شکل ۵). گلیکوژن، تری‌گلیسیرید و پروتئین به‌عنوان درشت ملکول‌های ذخیره‌ای در اجسام چربی حشرات وجود دارند. پلی‌ساکارید گلیکوژن یکی از درشت ملکول‌های ذخیره‌ای است که به‌طور عمده از منابع غذایی حاوی کربوهیدرات تامین می‌شود. کاهش سطح تری‌هالوز خون به دلیل استفاده آنی آن در فرآیندهای انرژتیک سبب فسفریله شدن گلیکوژن در اجسام چربی می‌شود. تری‌گلیسرید درشت ملکول ذخیره‌ای دیگری است که به‌عنوان محصول واکنش بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب برای تولید انرژی در بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Klowden, 2007). این مولکول از کربوهیدرات‌ها، اسیدهای‌چرب و پروتئین‌ها سنتز می‌شود. اسیدهای‌چرب وارد شده به همولمف به سرعت توسط اجسام چربی جذب شده و به صورت تری‌گلیسرید ذخیره می‌شوند (Nation, 2008). پروتئین نیز ماده ذخیره‌ای مهم در حشرات است که هنگام نیاز به اسیدهای‌آمینه تجزیه می‌شود. بلوک‌های پروتئینی حاصل از اسیدهای آمینه می‌توانند پروتئین‌های ساختاری جلد، هورمون‌ها و آنزیم‌های مختلف را تشکیل دهند. در این پژوهش، عدم تغییر معنی‌دار گلیکوژن در لاروهای تیمار نسبت به شاهد می‌تواند با کمتر بودن فعالیت آلدولاز مربوط بوده و نشان می‌دهد که لاروهای تیمار شده از چرخه‌هایی غیر از گلیکوژن برای تامین انرژی خود استفاده می‌کنند. اما کاهش مقدار پروتئین و تری‌گلیسرید ذخیره‌ای احتمالا با استفاده از پروتئین‌ها برای تامین انرژی بافت‌سازی و استفاده از چربی‌ها برای تامین انرژی مرتبط است. هر دو استدلال با فعالیت آمینوترانسفرازها، آلکالین فسفاتاز و مقدار لیپوپروتئین با تراکم کم مطابقت دارد.



شکل ۵- تاثیر لکتین *Polygonum persicaria* بر مقادیر درشت مولکول‌های لاروهای *Pieris brassicae*. تفاوت‌های آماری بین غلظت‌ها در هر آنزیم توسط حروف مختلف نشان داده شده است (آزمون توکی، در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد)

Figure 5. Effect of *Polygonum persicaria* lectin on amounts of macromolecules in *Pieris brassicae* larvae. Different letters have been used to show statistical differences between different concentrations of each compound (Tukey test, $p \leq 0.05$)

نتیجه‌گیری

یکی از مشکلات کلیدی در امنیت غذایی و تولید محصولات کشاورزی خسارت‌های حشرات است. در میان راه‌کارهای غلبه بر خسارت‌های آفات و بیماری‌های محصولات کشاورزی، استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی به دلیل مخاطرات خاص خود با احتیاط انجام می‌شود، اما به‌نژادی گیاهان و مهندسی ژنتیک جهت ایجاد ارقام مقاوم گیاهی می‌تواند یکی از روش‌های امیدوار کننده باشد. لکتین بیان شده در گیاهان تراریخته مقاومت بالایی در برابر حشرات آفت داشته و به‌عنوان بخشی از برنامه‌های تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفات می‌تواند در نظر گرفته شود. اما قبل از پرداختن به چنین برنامه‌هایی باید از ویژگی حشره‌کشی آن‌ها در مقدار کم و نحوه عمل آن‌ها در بدن حشره هدف آگاهی کافی داشت تا احتمال غلبه آفت به لکتین و شکستن مقاومت در ارقام گیاهی کاهش یابد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که لکتین علف هفت بند علاوه بر اختلال در هضم و جذب مواد غذایی لاروهای سفیده بزرگ کلم می‌تواند در سازوکار متابولیسم حدواسط اثر گذاشته و سبب اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک و متعاقب آن اکولوژیک شود. علاوه براین، ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی متابولیسم حدواسط حشرات می‌توانند مکان هدف دیگر لکتین‌ها علاوه بر مرگ سلولی، پروتئین فریتین و مهار آنزیم‌های گوارشی باشند.

سپاس‌گزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برای حمایت مالی در قالب طرح ۹۰۰۰۸۰۰۲ سپاس‌گزاری می شود.

References

Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **Journal of Biological Chemistry** 164: 321–329.

Carlini, C. R. and Grossi-de-Sa, M. F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon** 40: 1515-1539.

Chun, Y. and Yin, Z. D. 1998. Glycogen assay for diagnosis of female genital *Chlamydia trachomatis* Infection. **Journal of Clinical Microbiology** 36: 1081-1082.

Fossati, P. and Prencipe, L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry** 28: 2077-2080.

Franco, O. L., Riggen, D. J., Melo, F.R., Bloch, C., Silva, C. and Grossi de sa, M. F. 2000. Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry** 267: 2166–2173.

Hamshou, M., Smagghe, G., Shahidi-Noghabi, S., De Geyter, E., Lannoo, N. and van Damme, E. J. M. 2010. Insecticidal properties of *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin and its interaction with insect tissues and cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 40: 883-890.

Kaplan, L. A. and Pesce, A. J. 1996. Clinical chemistry-theory analysis and correlation. Mosby-Year Book, MO, pp 609-610.

King, J. 1965. The dehydrogenases or oxidoreductases. lactate dehydrogenase, in: D. Van Nostrand (Ed.), Practical clinical enzymology. London, pp 83–93.

Klowden, M. J. 2007. Physiological Systems in Insects. 2nd edn. Academic press, New York, pp 688.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Molecular Biology** 193: 265–275.

Michiels, K., van Damme, E. J. M. and Smagghe, G. 2010. Plant-Insect interactions: What can we learn from plant lectins? **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 73: 193–212.

Peumans, W. J. and van Damme, E. J. M. 1995. The role of lectins in plant defense. **Journal of Histochemistry** 27: 253-271.

Pinto, P. V. A., Kaplan, A. and Dreal, P. A. 1969. Aldolase: I. Colorimetric Determination. **Clinical Chemistry** 15: 349-360.

Sadeghi, A., van Damme, E. J. M., Peumans, W. J. and Smagghe, G. 2006. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.). **Phytochemistry** 67: 2078–2084.

Schaefer, E. J. and McNamara, J. 1997. Overview of the diagnosis and treatment of lipid disorders", In: Rifia, N., Warnick, G. R., Dominiczak, M. H., ed. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC press, pp 25-48.

Senthil Nathan, S., Chunga, P. G. and Muruganb, K. 2006. Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (the rice leaffolder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 64: 382–389.

Simmonds N. W. 1945. *Polygonum persicaria* L. **Journal of Ecology** 33: 121–131.

Szasz, G. 1976. Reaction-rate method for gamma-glutamyltransferase activity in serum. **Clinical Chemistry** 22: 2051-2055.

Tate, S. S. and Meister, A. 1985. Gamma-Glutamyl transpeptidase from kidney. **Methods in Enzymology** 113: 400–419.

Thomas, L. 1998. Clinical laboratory diagnostic", first ed. TH Books Verlasgesellschaft, Frankfurt, pp 89–94.

van Damme E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A. and Rouge, P. 1998. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 17: 575-692.

Vasconcelos, I. M. and Oliveira, J. T. A. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon** 44: 385-403.

Zibaee, A., Alborzi, Z., Karimi-Malati, A. and Salimi, M. 2014. Effects of a lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). **Journal of Plant Protection Research** 54: 250-257.

Zibaee, A., Karimi-Malati, A. and Janghorbani, A. 2015. In vitro interaction of digestive a-mylase from *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) with a lectin extracted from *Polygonum persicariae* (Polygonaceae). **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences** 85: 113-120.

Plant Pest Research
2017- 6(4): 17-29

Effect of a lectin extracted from *Polygonum persicaria* L. on some compounds involved in intermediary metabolism of *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae) larvae

A. Zibaee[1*], S. Ramzi[2], A. Karimi-Malati[1] and B. Rabaei[3]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, 2. Tea Research Center, Horticulture Science Research Institute; Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran, 3. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

(Received: February 16, 2016- Accepted: July 5, 2016)

Abstract

Lectins are the proteins with the heterogenous structure that bind to mono- or oligosaccharides of cell surfaces leading to interference in cellular processes or even death. In the current study, effects of the different concentrations (0.5, 1 and 2 mg/ml) of *Polygonum persicaria* L. lectin were assessed on the intermediary metabolism of *Pieris brassicae* L. larvae to better understanding of its entomotoxic mechanism. Feeding of the larvae on the *Polygonum persicaria* lectin increased activities of aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transferase but the activity of alanine aminotransferase statistically decreased. Activity of aldolase increased in the treated larvae in a dose-dependent manner. Also, activity of acid phosphatase showed no statistical differences between treated and control larvae, but alkaline phosphatase in the larvae fed on 2 mg/ml of lectin had the highest activity in comparison with other treatments. High density lipoprotein in the larvae fed on 2 mg/ml of lectin, had the lowest amount but low density lipoprotein showed the highest amount. Among storage macromolecules, glycogen showed no statistical difference between control and treated larvae but the amounts of protein and triglyceride statistically decreased. Results of the current study showed that *P. persicaria* lectin can cause disturbance in intermediary metabolism of *P. brassicae* larvae in its highest use dose which may lead lower biological and reproductive efficiencies.

Key words: Lectin, *Polygonum persicaria*, *Pieris brassicae*, Intermediary metabolism

*Corresponding author: arash.zibaee@guilan.ac.ir