تحقیقات آفات گیاهی
جلد ۲/ شماره ۱/ سال ۱۳۹۱

اثر عصاره پروتئینی تریتیکاله روی فعالیت آلفا آمیلاز گوارشی کرم غوزه *Helicoverpa armigera*

مهدی دسترنج[۱] و علیرضا بندانی*[۲]

۱و ۲ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد حشره شناسی و استادگروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۴)

چکیده

کرم غوزه *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) یک آفت همه‌جایی و چندین‌خوار است که به بسیاری ازگونه های گیاهی حمله می کند. مهم‌ترین روش کاهش خسارت کنترل شیمیایی است، اما صدمه به محیط زیست و بروز مقاومت در حشرات آفت موجب شده است که راه‌های جایگزین برای کنترل آفات به جای استفاده از آفت کش‌های شیمیایی در نظر گرفته شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره پروتیینی تریتیکاله روی فعالیت آلفا آمیلاز کرم غوزه می باشد. برای این منظور لاروهای سن چهار حشره تشریح شده و پس از جداسازی دستگاه گوارش آنزیم آلفا آمیلاز استخراج شد. عصاره پروتیینی تریتیکاله هم با استفاده از کلرید سدیم ۰/۱ مولار استخراج شد. بررسی تاثیر عصاره پروتیینی روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز به دو روش سنجش آنزیمی و سنجش در ژل زایموگرام انجام شد. نتایج نشان داد که روند مهارکنندگی وابسته به غلظت بود. در بالاترین (۱۷ میکرو گرم پروتیین) و پایین ترین غلظت (۱/۰۶۲۵ میکرو گرم) عصاره پروتیینی تریتیکاله به ترتیب حدود ۷۰ درصد و ۳۰ در صد مهار آنزیم آمیلاز مشاهده شد. بیشترین فعالیت مهارکنندگی در اسیدیته ۸ مشاهده شد. در بررسی اثر مهارکننده در ژل نیز روند مهار به صورت وابسته به دز دیده شد. در بالاترین غلظت مهارکننده دو باند فعالیت آنزیم به طور کامل حذف شدند در حالی‌که از شدت باند اصلی کاسته شد. در پایین ترین دز استفاده شده دو باند ذکر شده حذف شدند ولی شدت باند اصلی همچنان زیاد بود.

واژه های کلیدی: کرم غوزه، آنزیم آلفا آمیلاز، عصاره تریتیکاله، مهارکنندگی

* نویسنده مسئول: abandani@ut.ac.ir

مقدمه

کرم غوزه *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) آفتی با پراکنش جهانی است و در آفریقا، خاورمیانه، جنوب اروپا، هند، آسیای مرکزی و جنوب شرقی آسیا، شرق و شمال استرالیا، نیوزیلند و بسیاری ازجزایراقیانوس آرام شرقی خسارت می‌زند (Fitt, 1989). این آفت چندین‌خوار بوده و به بسیاری ازگونه‌های گیاهی حمله می‌کند اما برخی از میزبان ها را ترجیح می‌دهد. بقا و زنده‌مانی لارو به رژیم غذایی و دما بستگی دارد. توانایی دیاپوز اختیاری، مهاجرت، تحرک بالا وترکیبی از باروری زیاد و طول مدت کوتاه هر نسل به بقا این آفت در زیستگاه‌های ناپایدار کمک می‌کند. کنترل شیمیایی این آفت به دلیل ظهور مقاومت به حشره‌کش‌ها خیلی موثر نیست (Fitt, 1989; Kotkar, 2009).

اثرات منفی آفت‌کش‌های شیمیایی موجب شده است که راه‌های جایگزین ازآفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل آفات در نظر گرفته شود (Isman, 2006) در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در مورد ترکیبات یا ژن‌های به‌دست 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 به‌دست آمده از گیاهان و قارچ ها، دلتا اندوتوکسین باکترها دارای پتانسیل خوبی هستند که در کنترل آفات استفاده شوند. (Franco *et al*., 2002) تعداد زیادی ژن از گیاهان و میکروب‌ها شناسایی شده‌اند که این پتانسیل را دارند تا به گیاهان منتقل شده که محصول این ژن/ ژن‌ها برای حشرات گیاهخوار سمی بوده و باعث مقاومت یا حفاظت گیاهان به حشرات گیاهخوار می‌شود (Gatehouse and Gatehouse, 1998).

دانه‌ها و اندام‌های رویشی گیاهان عالی حاوی مهارکننده‌های پروتئینی مختلفی هستند که با متصل‌شدن به جایگاه فعال آنزیم هدف، از فعالیت پروتئازها و آمیلازهای حشرات، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، قارچ‌ها و پستانداران جلوگیری می‌کنند اما روی آنزیم‌های خود گیاهان بی‌تأثیرند (Mehrabadi *et al*., 2012). ژن‌های کدکننده‌ی مهارکننده‌های آنزیم‌ها را می‌توان از گیاهان حاوی این ژن‌ها به سایر گیاهان انتقال داد تا مقاومت آن‌ها در برابر آفات و قارچ‌ها افزایش پیدا کند (Franco *et al*., 2002; Medina *et al*., 1993).

کرم غوزه جهت تغذیه از بافت‌های گیاهی به‌ویژه هضم نشاسته به آنزیم‌های آلفا آمیلاز وابسته می‌باشد. بنابراین آنزیم آلفا آمیلاز این حشره پتانسیل کنترل حشرات را دارد. مهارکننده‌های پروتئینی آلفا-آمیلاز در گیاهان زیادی وجود داشته و در درجه‌ی اول در دانه‌ها و ریشه‌های ذخیره‌کننده‌ی نشاسته یافت می‌شوند و از این مواد علاوه بر مهار آلفا-آمیلازهای بذرزاد، به عنوان استراتژی دفاعی در مقابل گیاه‌خواران استفاده می‌کنند. با توجه به این که گیاه‌خواران برای تغذیه روی گونه‌های خاص سازش پیدا کرده‌اند، لذا مهارکننده‌های یک گونه‌ی گیاهی خاص، اغلب در برابر حشراتی که به آن گونه‌ی گیاهی حمله می‌کنند، مؤثر نیستند. مهارکننده‌های بسیار خوبی در گیاهانی نظیر لوبیای معمولی، گندم و تاج‌خروس یافت شده‌اند که در برابر آلفا-آمیلازهای برخی از حشرات و پستانداران فعال هستند (Titarenko and Chrispeels, 2000). برخی از بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز موجود در دانه‌ها و قسمت‌های سبز گیاهان، در تنظیم برخی رفتارهای تغذیه‌ای حشرات گیاه‌خوار دخالت دارند (Bandani, 2005) . این مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز از منابع مختلف مانند گندم، جو ، تریتیکاله و چاودار استخراج شده است. مهارکننده‌های پروتئینی آلفا-آمیلاز بر اساس ساختمان نوع سوم پروتئینی خود، به شش گروه تقسیم می‌شوند که می‌توان از ۱- Lectin-like (از لوبیای معمولی)، ۲- Knotin-like (از تاج‌خروس)، ۳- Cereal-type (از گندم، جو و ارزن)، ۴- Kunitz-like (از گندم، جو و برنج)، ۵- γ-purothionin (از سورگوم) و ۶- Thaumatin-like (از ذرت) نام برد (Franco *et al*., 2002). یک مهارکننده برای مؤثر بودن باید دو ویژگی مهم داشته باشد، اول اینکه مهارکننده بایستی در یک غلظت به حد کافی پایین و در اسیدیته‌های که در معده و یا غدد بزاقی حشره یافت می‌شود، فعالیت آنزیم حشره را به میزان قابل توجهی مهار کند و ویژگی دیگر اینکه، مهارکننده باید در برابر حمله‌ی پروتئازهای معده و غدد بزاقی حشره مقاوم باشد (Valencia *et al*., 2000). بنابراین با توجه به اینکه تا به

حال هیچگونه گزارشی در مورد اثر مهارکننده‌های آنزیم‌های آلفا آمیلاز کرم غوزه وجود ندارد هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره پروتیینی استخراج شده از تریتیکاله روی فعالیت آنزیم های گوارشی آلفا آمیلاز کرم غوزه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

برای پرورش *H. armigera* از غذای مصنوعی شامل لوبیا (۲۰۵ گرم پودر لوبیا چشم بلبلی، ۳۰ گرم پودر جوانه گندم، ۳۵ گرم مخمر، ۱۲ گرم آگار، ۳/۵ گرم اسید آسکوربیک، ۲.۲ گرم نیپاژین، ۱/۱ گرم اسید سوربیک، ۲/۵ میلی لیتر فرمالدهید، ۵ میلی لیتر روغن آفتاب گردان و ۸۵۰ میلی لیتر آب مقطر) استفاده شد. این حشرات در دمای ۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دوره نوری ۸ :۱۶ (روشنایی: تاریکی) نگهداری شدند (Shorey and Hale, 1965) .

تشریح و جداسازی اندام گوارشی

برای جداسازی لوله‌ی گوارشی لارو *H. armigera*، پس از این که لاروهای سن چهارم حشره‌ی مورد نظر روی یخ بی‌حس شدند، سطح شکمی بدن لارو با قیچی بریده شد و لوله گوارش با استفاده از پنس جدا شد. تعداد ۵ عدد لوله گوارش داخل یک میکروتیوب‌های با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی پانصد میکرولیترآب دوبار مقطر سرد قرار گرفتند.

استخراج آنزیم

برای استخراج آنزیم نمونه‌ها داخل میکروتیوب هموژنایز شدند. برای این منظور از یک هموژنایزر دستی استفاده شد. سپس نمونه‌ها در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت ×g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، بخش بالایی نمونه‌ها (سوپ) 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 ملو و همکاران (Melo *et al.*, 1999) و مهرآبادی (Mehrabadi *et al.*, 2010) با مقداری تغییرات عمل شد. به صورت خلاصه، مقدار ۳۰ گرم بذر تریتیکاله آرد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر NaCl با مولاریته‌ی ۰/۱، مخلوط شد. و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شد. مخلوط حاصله در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ×g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. به منظور رسوب‌دهی پروتئین با سولفات آمونیوم ۷۰ درصد اشباع مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس به آرامی هم زده شد. مخلوط سولفات آمونیوم- پروتئین، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت ×g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و رسوبات حاصله با دو میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۰/۰۲ مولار، اسیدیته ۷)، به صورت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۲۰ ساعت در درون آب مقطر، دیالیز شد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۵ 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.

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

برای بررسی اثر عصاره پروتیینی تریتیکاله روی فعالیت آلفا آمیلاز از غلظت های ۱۷، ۸.۵، ۴.۲۵، ۲.۱۲۵، ۱.۰۶۲۵میکروگرم پروتئین تریتیکاله استفاده شد. غلظت‌های مختلف تریتیکاله با عصاره آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه شد. سپس فعالیت آمیلولیتکی با استفاده از روش برنفلد (Bernfeld, 1955)، بیکر (Baker, 1987) با اندکی تغییرات انجام شد. به این صورت که از نشاسته یک درصد به عنوان سوبسترا استفاده شد. واکنش در محیط بافر Glycine (-NaOH) در دمای ۳۵ درجه 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 میکرو لیتر از نمونه توسط دستگاه الایزا ریدر (ELX 808) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز تریتیکاله

به منظور سنجش تاثیر اسیدیته مختلف بر فعالیت مهارکنندگی تریتیکاله از بافر یونیورسال (گلایسین، مس(-2 morpholinoethan sulfonic acid) ، سوکسینات۰.۰۲ مولار)(Hosseinkhani and Nemat Gorgani, 2003) با اسیدیته ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰و ۱۱ استفاده شد. میزان مهار فعالیت آمیلازی بعد از ۳۰ دقیقه اینکوبه با مهارکننده تریتیکاله محاسبه شد. نمونه کنترل در هر اسیدیته تنها با حضور عصاره آنزیمی و بدون افزودن مهارکننده درنظر گرفته شد.

سنجش مهارکننده در ژل

زایموگرام فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از روش ژل الکتروفورز (Lammli, 1970) انجام شد. به این صورت که از پلی اکریل آمید ۱۰٪ برای ژل جداکننده و۴٪ برای ژل متراکم کننده استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ برای ۲ ساعت انجام شد. پس از رسیدن رنگ به انتها، ژل از شیشه جدا شده و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱٪ تریتون X100 قرار گرفت. سپس برای مدت ۱/۵ ساعت در بافر گلیسین ۰/۰۲ مولار (Glycin-NaOH) اسیدیته ۹حاوی ۲ میلی مولار CaCl2 و ۱۰میلی مولار NaCl و ۱٪ نشاسته قرار گرفت و در پایان ژل با آب مقطر شسته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول لگول(۳٪ KI و۱.۳٪ I2) قرار گرفت. باندهای فعالیت آلفا آمیلازی در زمینه تیره به صورت روشن دیده می شوند.

سنجش میزان پروتئین

تعیین میزان پروتئین بر اساس روش برادفورد (Bradford, 1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد انجام شد.

تجزیه و تحلیل دادها داده‌ها

تجزیه و تحلیل دادهابر 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 مهار کننده به این صورت بود که روند مهارکنندگی وابسته به غلظت بود. غلظت های ۱۷، ۸/۵، ۴/۲۵، ۲/۱۲۵، ۱/۰۶۲۵ میکروگرم پروتئین تریتیکاله مورد استفاده قرار گرفت. میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از غلظت های ۱۷، ۸/۵، ۴/۲۵، ۲/۱۲۵، ۱/۰۶۲۵ میکروگرم پروتئین مهارکننده به ترتیب برابر با ۷۱/۶، ۵۵/۹، ۴۵/۲، ۴۱/۲، ۳۵/۵ شد (شکل ۱). نتایج بدست آمده با داده‌های سایر محققین هم تطابق دارد. برای مثال، والنسیا و همکاران (Valencia *et al.*, 2000) گزارش دادند که عصاره پروتئینی *Amaranthus cruentus* با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مهار ۸۰ درصدی فعالیت آلفا آمیلاز *Hypothenemus hamper* شد، در حالی‌که عصاره‌ی پروتئینی *Amaranthus hybrid*، باعث مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز حشره مذکور به میزان حدود ۴۰ درصد شد. مهرآبادی وهمکاران (Mehrabadi *et al.*, 2009) اثر مهارکننده آمیلاز تریتیکاله روی آمیلاز سن گندم بررسی کردند. آنها دریافتند که اثر این مهارکننده روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سن گندم به صورت وابسته به دز است و در دز پایین (۰/۲۵ میلی گرم) تقریبا باعث حدود ۱۰ درصد مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سن گندم گرشددید در حالی‌که در دز بالا (۱/۵ mg) باعث مهار حدود ۸۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سن گندم شد.

تاثیر اسیدیته بر مهارکنندگی تریتیکاله

برای بررسی تاثیراسیدیته روی اثر عصاره پروتیینی روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از اسیدیته برابر 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 پس از آن در اسیدیته‌های ۹ و ۷ مهارکنندگی بیشتری نسبت به بقیه اسیدیته ها دیده شد. اگر چه بین اسیدیته ۸ و ۹ تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در اسیدیته بالاتر و پایین تر از این

محدوده تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌آلفا آمیلاز بین اسیدیته های مختلف مشاهده شد به این صورت که کمترین مهار در اسیدیته ۶ مشاهده شد.

گزارش‌های متعددی مبنی بر وابستگی خاصیت مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی روی فعالیت آلفا آمیلاز وجود دارد. برای مثال، مهرآبادی (Mehrabadi *et al*., 2010) مشاهده کرد که شدت مهارکنندگی آلفا-آمیلاز توسط مهارکننده‌ی تریتیکاله، با مقادیر مختلف اسیدیته تغییر کرد. یکی از شرایط بسیار تأثیرگذار در برهم کنش بین آنزیم‌های گوارشی کربوهیدراز حشرات با مهارکننده‌های گیاهی، شرایط لومن حشره، به خصوص اسیدیته لومن حشره است. شرایط لومن در لارو پروانه‌ها، بازی (آلکالینی) گزارش شده است. علاوه بر آن نشان داده شده است که آلفا-آمیلاز این حشره نیز در همین شرایط (یعنی اسیدیته بازی)، دارای فعالیت بهینه است (Kotkar *et al*., 2009). بنابراین می‌توان چنین انتظار داشت که در شرایط لومن معده‌ی کرم غوزه، اگر غلظت مناسبی از این مهارکننده‌ها وجود داشته باشد، میزان مهارکنندگی قابل قبولی حاصل شود. همخوانی و تطابق اسیدیته بهینه در لومن حشره، اسیدیته بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز حشره و همچنین اسیدیته بهینه برای فعالیت مهارکننده، در دیگر مطالعات نیز گزارش شده است (Biggs and McGregor, 1996; Valencia *et al*., 2000)

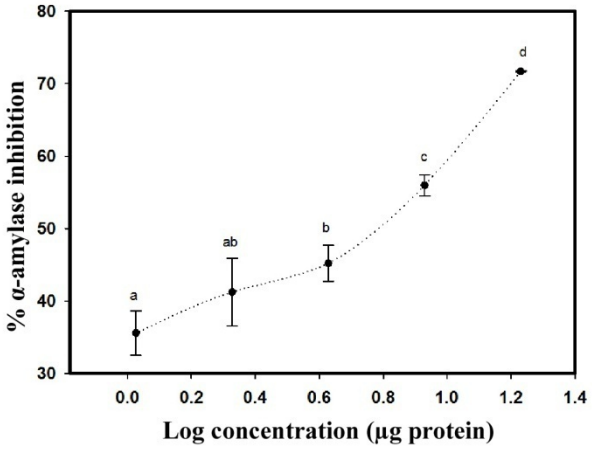
سنجش مهارکنندگی در ژل

با توجه به سنجش فعالیت مهارکننده با روش طیف سنجی (الیزاریدر) و اثرات مهارکنندگی تریتیکاله روی آمیلاز گوارشی کرم غوزه، خاصیت مهارکنندگی در ژل نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور غلظت‌های مختلف مهارکننده با آنزیم انکوبه شدند. سپس زایموگرام توسط ژل پلی اکریل آمید مورد بررسی قرار گرفت. همچنانکه در شکل ۳ دیده می‌شود روند مهار وابسته به دز است. به این صورت که در بالا ترین غلظت مهارکننده (۱۷ میکروگرم پروتئین) دو باند فعالیت آنزیم (یعنی باندهای A2 و A3) به صورت کامل حذف شدند در حالی‌که باند A1 هم از شدت باند کاسته شد. در پایین ترین دز، دو باند ذکر شده حذف شدند ولی شدت باند اصلی همچنان زیاد بود. گزارش شده است که حضور تعدادی ایزوفرم آمیلاز در حشرات آفت راهکار کارا برای فائق آمدن حشرات بر مهارکننده‌های آمیلاز تولید شده در گیاهان است. در این حشره هم همچنانکه در شکل دیده می‌شود سه ایزوآنزیم مختلف دیده می‌شود.

سیواکومار و همکاران (۲۰۰۶) مهار شدن آمیلاز حشرات *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus) (Coleoptera: Bruchidae), *Corcyra cephalonica* (Stainton) (Lepidoptera: Galleriidae), *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Achaea janata* (Linnaeus) (Lepidoptera: Noctuidae) را توسط مهارکننده‌های ارزن به روش سنجش در ژل بررسی کردند. مطالعه زایموگرام نشان داد که تعداد ایزوزایم‌های آنزیم از یک تا هشت عدد متغیر بودند. *H. armigera* ، *S. litura*، *C. chinensis* و *C cephalonica* بیش از پنج ایزوزایم را نشان دادند و در حالی که سایرین دارای یک تا چهار ایزوزایم بودند. مطالعه الکتروفورز مهار کننده 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* به‌دست آمد. در *S. oryzae* منجر به حذف دو آمیلاز شد. مهارکننده آمیلاز ارزن به صورت معنی‌داری فعالیت آمیلازی *A. janata*، *C. cephalonica*، *S. oryzae* و *T. castaneum* را کاهش داد، که نشان‌دهنده این است که این مهارکننده‌های آمیلاز می‌تواند بر علیه آفات محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد.

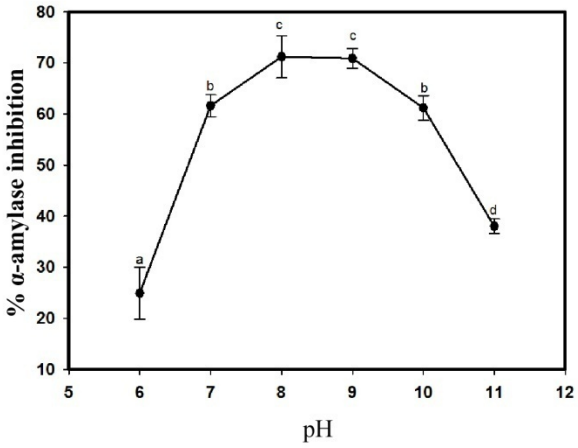
سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه تهران جهت فراهم نمودن هزینه‌های این پژوهش قدردانی می‌کنند.



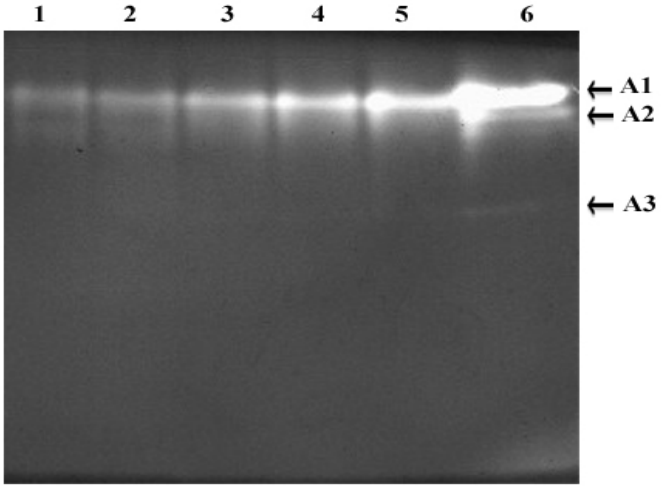
شکل۱- اثر غلظت‌های مختلف تریتیکاله بر میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز کرم غوزه.

Figure 1. The effect of different concentrations of triticale extract on inhibition of the bollworm α-amylase activity



شکل۲- اثر اسیدیته‌های مختلف بر فعالیت مهارکنندگی تریتیکاله بر روی آنزیم آلفا آمیلاز کرم غوزه.

Figure 2. The effect of different pHs on the inhibition of the bollworm α-amylase activity



شکل ۳- بررسی اثر مهارکنندگی تریتیکاله بر روی آمیلاز گوارشی در ژل مهارکننده با عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت انکوبه شدند و سپس در ژل بارگذاری شدند. تیمار کنترل در سنجش آمیلاز گوارشی ستون اول از سمت راست می باشد. با افزایش غلظت مهارکننده، میزان فعالیت مشاهده شده کاهش یافت. غلظت های مهارکننده به ترتیب ۱۷ میکروگرم پروتئین(۱)، ۸/۵ میکروگرم پروتئین(۲)، ۴/۲۵ میکروگرم پروتئین(۳)، ۲/۱۲۵ میکروگرم پروتئین(۴)، ۱/۰۶۲۵ میکروگرم پروتئین (۵) وکنترل بدون مهار کننده(۶)

Figure 3. In gel assay of the effect of triticale extract on the of the bollworm α-amylase activity.The extract was pre-incubated with enzyme for an hour, and then loaded in the gel. First column of the right hand side shows control. With increasing the inhibitor concentrations the amount of the enzyme activity decreases. 17 µg protein (1), 8.5 µg protein (2), 4.25 µg protein (3), 2.125 µg protein (4), 1.0625 µg protein (5) and control without inhibitor (6).

منابع

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

Baker, J. E. 1987. Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus orizae* L. by HPLC and their interaction with partially purified amylase inhibitor from wheat **Insect Biochemistry** 17: 37-44.

Bandani, A. R., 2005. Effect of plant α-amylase inhibitors on sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton. α-amylase activity**. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences** 70(4): 869-873.

Bernfeld P., 1955. Amylases, α and β. **Methods in Enzymology** 1: 149-158.

Biggs D. R. and McGregor P. G., 1996. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelyra zealandica*; Coleoptera: Carabidae) as a basis for selecting inhibitors. **. Insect Biochemistry and Molecular Biology** 26: 69-75

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.

Fitt, G. P. 1989. The ecology of Heliothis species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology** 34: 17–52.

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

Gatehouse, A. M. R. and Gatehouse, J. A. 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops**. Pesticide Science** 52: 165-175.

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

Isman, M. B. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents In Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. **Annual Review of Entomology** 51: 45–66.

Kotkar, H. M., Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Gupta, V. S. and Giri, A. P. 2009. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigerato* feeding on various host plants. **Journal of Insect Physiology** 55: 663-670.

Lammli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680–685.

Melo, F. R., Sales, M. P., Silva, L. S., Franco, O. L., Bloch, J. R. C. and Ary, M. B. 1999. α-amylase inhibitors from cowpea seeds. **Protein and Peptide Letter** 6: 387-392.

Medina, J., Hueros, G., and Carbonero, P. 1993. Cloning of cDNA, Expression, and chromosomal location of genes encoding the three of subunits of the barley tetrameric inhibitor of insect α-amylase. **Plant Molecular Biology** 23: 535-542.

Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Saadati, F. and Ravan, S. 2009. Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae), digestive α-amylase, α-glucosidase and β-glucosidase. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 12: 79-83.

Mehrabadi, M., Bandani A. R. and Saadati, F. 2010. Inhibition of Sunn pest, *Eurygasterintegriceps*, α-amylases by α-amylase inhibitors (T- αAI) from Triticale. ***Journal of Insect science*** 10:179 available online: insectscience.org/10.179.

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.

Sivakumar, S., Mohan, M., Franco, O. L. and Thayumanavan, B. 2006. Inhibition of insect pest α-amylases by little and finger millet inhibitors. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 85: 155-160.

Shorey, H. H. and Hale, R .L. 1965. Mass–rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 58: 522-524.

Titarenko, E. and Chrispeels M. J. 2000. C DNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α-amylase of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera.* **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30: 979−990.

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. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30: 207-213.

Effect of proteinaceous extract of triticale seed extract on α-amylase activity of *Helicoverpa armigera*

M. Dastjerdi[1], A. Bandani*[2]

1, 2. MSc Student and Professor, respectively, Department of Plant Protection, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran

(Received: May 30, 2012- Accepted: July 4, 2012)

Abstract

Boll worm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is a cosmopolitan and polyphagous pest that attacks many plant species. The most important control method is based on the use of pesticides which is a concern to environment as well as insects' resistance, thus alternative ways to chemical ones are required. The aim of the current study is to investigate the effect of protein extract of triticale against boll worm amylase. To do so, fourth instar larvae were dissected, their gut removed and their amylase were extracted. Protein of triticale was extracted using 0.1 M NaCl. Effect of proteinaceous extracts on amylase activity in both enzymatic assay and in gel assay using zymogram was performed. Results showed that the inhibitory process was dose dependant. The highest (17 µg protein) and the lowest concentration (1.0625 µg protein) of triticale extracts produced 70 and 30% inhibition activity, respectively. The highest inhibitory activity was observed at pH 8. Dose dependant manner of inhibition also was observed in gel assay. At the highest concentration of the inhibitor, two bands were completely eliminated while the intensity of major band was reduced. When the lowest dose was used two bands was removed but intensity of major band was still high.

Key words: Boll worm, Alpha amylase, Triticale extract, Inhibition

*Corresponding author: abandani@ut.ac.ir