تحقیقات آفات گیاهی
جلد ۲/شماره ۴/سال ۱۳۹۱

بررسی اثر مهارکنندگی عصاره ارقام گندم روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی سوسک کلرادو

احسان برزویی[۱]، علیرضا بندانی*[۲] و علی مسلمی[۳]
۱ و ۲ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ۳، کارشناس ارشد سازمان کشاورزی جنوب کرمان، بخش حفظ نباتات

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۵)

چکیده

سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata*(Say) (Coleoptera:Chrysomelidae)، آفت کلیدی سیب‌زمینی در سراسر جهان می‌باشد. باتوجه به اثرات نامطلوب کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی در کنترل این آفت، نیاز به روش‌های جایگزینی برای کنترل این آفات اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین هدف ازمطالعه حاضر بررسی اثر عصاره پروتیینی ارقام گندم روی آنزیم آلفاآمیلاز سوسک کلرادو می‌باشد. برای استخراج آنزیم از حشره و عصاره پروتیینی ارقام گندم به ترتیب از آب‌مقطر و NaCl ۰/۱ مولار استفاده‌شد. نتایج نشان داد که عصاره‌پروتئینی استخراج‌شده از گندم توانایی بالایی برای مهار آنزیم آلفاآمیلاز سوسک کلرادو دارد. سنجش فعالیت آمیلاز در حضور ۵ غلظت مختلف از عصاره گندم رقم افلاک و اموی‌هفده، یک روند مهار وابسته به غلظت را نشان‌داد. میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز با استفاده از غلظت‌های ۱۷، ۸/۵، ۴/۲۵، ۲/۱۲۵ و ۱/۰۶۲۵ میکروگرم پروتئین عصاره‌گندم رقم اموی‌هفده به به‌ترتیب ۳۰/۱۸، ۴۵/۷۴، ۴۸/۷۴، ۵۸/۳۲ و ۶۰/۷۲ درصد نسبت به فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده (شاهد) بود. نتایج نشان‌داد که رقم افلاک اثر کمتری در مهار فعالیت آنزیم نسبت‌به رقم اموی‌هفده دارد. در بررسی اثر اسیدیته بر قدرت مهارکنندگی عصاره‌پروتئینی گندم نشان‌داد که بیشترین مهارکنندگی آنزیم در حضور بالاترین غلظت مهارکننده در اسیدیته ۵ مشاهده شد. بررسی اثر عصاره روی فعالیت آنزیم در ژل نشان‌داد که شدت باند شاهد در حضور غلظت‌های مختلف از هر دو مهارکننده گندم تغییرکرد و این تغییررنگ باندها وابسته‌به غلظت عصاره استفاده‌شده بود.

واژه‌های کلیدی: سوسک کلرادو، آنزیم آلفا-آمیلاز، عصاره ارقام گندم

*نویسنده مسئول: abandani@ut.ac.ir

مقدمه

سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) آفت کلیدی سیب‌زمینی در سراسر جهان می‌باشد. این حشره الیگوفاژ است که به‌طور انحصاری از خانواده سولاناسه تغذیه می‌کند. لارو و افراد بالغ این سوسک به طور موفق روی گیاهان میزبان خود که اغلب با کرک‌های غیر غده یا غده‌ای پوشیده شده است، مستقر می‌شود و از آن‌ها تغذیه می‌کند (Voigt *et al*., 2008). سیستم‌های مدیریت تقریباً به‌طورانحصاری روی برنامه‌های کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی مصنوعی تکیه می‌کنند، با این حال، این حشره ظرفیت استثنایی را برای مقاومت سریع به حشره‌کش‌های شیمیایی ازخود نشان داده است (Gauthier *et al.,* 1981) و عوامل کنترل جایگزین برای ایجاد برنامه‌های مدیریت یک‌پارچه پایدار مورد نیاز هستند.

حشراتی که از گیاهان تغذیه می‌کنند، به شکستن ماکرومولکول‌های غذایی برای رشد، توسعه و تولیدمثل وابسته هستند (Jongsma and Bolter, 1997). تبدیل ماکرومولکول‌ها به مولکول‌های کوچک‌تر توسط آنزیم‌ها صورت می‌گیرد. آلفا-آمیلاز یک آنزیم موجود در کانال گوارشی و غددبزاقی حشرات می‌باشد (Strobl *et al.,*1998) که نشاسته را به مالتوز تبدیل می‌کند و سپس مالتوز توسط آلفا-گلوکوزیداز به گلوکز تبدیل می‌شود (Terra *et al*., 1996). بنابراین آلفا-آمیلازها برای شکستن و استفاده از نشاسته موجود در منبع‌غذایی ضروری هستند (Valencia-Jimenez *et al.,* 2008).

روش‌های موجود برای کنترل آفات که بر استفاده از مواد شیمیایی پایه‌گذاری شده‌اند، در کنار افزایش قیمت تولید، سبب آلودگی محیط‌زیست و انتخاب گونه‌های مقاوم می‌شوند. بنابراین در توسعه کشاورزی پایدار، هدف اصلی علاوه بر کنترل آفات، حفظ طبیعت نیز مد نظر می‌باشد (Paulillo *et al*., 2000). در این میان دستگاه گوارش حشرات مکانی عالی برای ارائه مکانیسم‌های کنترلی است بنابراین مختل‌کردن فیزیولوژی و یا بیوشیمی هضم در کانال گوارشی یک موضوع عمومی در توسعه استراتژی‌های کنترل آفات می‌باشد (Hegedus *et al.,* 2003; Nauen *et al.,* 2001). استفاده از مهارکننده‌های انتخابی آنزیم‌های هضم در حشرات آفت یک جنبه اصلی در کنترل آفات می‌باشد (Alarcon *et al.,* 2002). مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز در گیاهان زیادی وجود دارد که به عنوان بخشی از دفاع طبیعی گیاه علیه حشرات آفت در نظر گرفته می‌شود (Carlini *et al*. 2002). این مهارکننده‌ها به‌ویژه در غلات و حبوبات به فراوانی یافت می‌شوند (Iulek *et al*., 2000; Svensson *et al*., 2004; Bonavides *et al.,* 2007). پروتئین‌های مهارکننده آنزیم‌های گوارشی یا به وسیله سیگنال‌های درون گیاه و به‌طور معمول در پاسخ به حمله حشرات و یا زخم‌های مکانیکی تولید می‌شود یا به صورت طبیعی در گیاه وجود دارند (Chen, 2008) و پس از ورود به کانال‌گوارشی حشره، به‌طور قابل برگشت و یا غیرقابل‌برگشت به جایگاه فعال آنزیم متصل شده که منجر به ناکارآمدی آنزیم‌ها می‌شود. ناتوانی در استفاده از غذای خورده‌شده و بازیافت آنزیم‌های هضم و کمبود ریزمغذی‌ها، روی رشد و بقای حشره تأثیر گذاشته (Chougule *et al.,* 2008) و در نهایت سبب مرگ حشره در اثر گرسنگی می‌شود (Oliveira-Neto *et al.,* 2003).

آنزیم‌های گوارشی آلفاآمیلاز و پروتئینازها می‌توانند هدف خوبی برای کنترل حشرات آفت به‌وسیله مهارکننده‌های پروتیئنی موجود در بافت‌های غیرمیزبان حشره باشند، بنابراین یکی از جنبه‌های مهم کنترل آفات حشره‌ای، استفاده از خاصیت انتخابی بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی است که با اختلال در عملکرد آنزیم‌های آفت هدف و اختلال در رشد و نمو آن، در موجودات غیرهدف و یا خود گیاه اثر نامطلوبی از خود به جا نگذارد. بنابراین همچنان‌که والنسیا و همکاران (Valencia *et al.,* 2000) گزارش‌کرده‌اند یک مهارکننده باید دو ویژگی مهم داشته باشد، اول این‌که مهارکننده باید در یک غلظت به‌اندازه کافی پایین و در اسیدیته‌ای که در معده و یا غدد بزاقی حشره یافت می‌شود، فعالیت آنزیم حشره را به میزان قابل توجهی مهارکند و

ویژگی دیگر این‌که، مهارکننده باید در برابر حمله‌ی پروتئازهای کانال‌گوارشی و غددبزاقی حشره مقاوم باشد.

گروه‌های مختلفی از بازدارنده‌های آلفاآمیلاز در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند این گروه‌ها ساختمان‌های متنوعی داشته و روی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز جانوران مختلف اثرات متفاوتی دارند و به همین دلیل روی آنزیم‌های بعضی از حشرات دارای خاصیت اختصاصی هستند. ویژگی اختصاصی بودن مهم است. به‌خصوص این‌که این ترکیبات نباید روی آلفا-آمیلازهای خود گیاه اثر داشته باشند (Franco *et al.,* 2002). به دلیل وجود اثر نامطلوب آفت‌کش‌های شیمیایی در محیط، بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی به‌خصوص بازدارنده‌های آنزیم آلفا-آمیلاز می‌توانند راهکار مناسبی برای کنترل حشرات آفت باشند (Gatehouse and Gatehouse, 1998). ازآنجائی‌که این فرضیه ارائه شده است که مهارکننده‌های آنزیمی استخراج شده از گیاهان غیرمیزبان، اثر بهتری روی مهار آنزیم‌های گوارشی حشره دارند (Franco, 2002)، بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره‌پروتیینی ارقام گندم روی آنزیم آلفاآمیلاز سوسک کلرادو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

حشرات کامل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی پس از جمع‌آوری از مزارع سیب‌زمینی زنجان به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تغذیه آن‌ها از گیاه سیب‌زمینی (رقم ارگو) استفاده شد. این حشرات در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۵۰ درصد و دوره نوری ۱۴:۱۰ (روشنایی: تاریکی) به مدت یک نسل پروش داده (Safaei Khorram *et al.*, 2010) و سپس برای تست‌های آنزیمی تشریح شدند.

تشریح و جدا سازی اندام گوارشی

تشریح و جداسازی کانال‌گوارشی براساس روش والنسیا-جیمنز و همکاران Valencia-Jimenez *et al.,* (2008) انجام شد. لاروهای سن چهارم سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی انتخاب و روی یخ بی‌حس شدند. سپس زیر استریومیکروسکوپ و روی یخ، لاروها تشریح، لوله گوارش آن با پنس برداشته و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی آب‌مقطر منتقل شد. در هر میکروتیوب تعداد ۶ عدد لوله‌گوارش گذاشته شد.

استخراج آنزیم

استخراج آنزیم به روش مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.,* 2012) انجام‌گرفت. به‌طور خلاصه، لوله‌های گوارشی داخل میکروتیوب، توسط یک هموژنایزر دستی و در بستر یخ هموژنایز شدند. سپس مخلوط هموژنایز شده در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس با دور ۱۵۰۰۰g× و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ بخش بالایی مخلوط (سوپرناتانت) برداشته‌شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد تا سپس به عنوان منبع آنزیمی در آزمایش استفاده شود.

استخراج عصاره‌پروتئینی گندم

برای استخراج عصاره پروتئینی، از روش بیکر (Baker, 1983) و ملو و همکاران (Melo *et al.,* 1999) با اعمال کمی تغییرات، استفاده شد. بدین‌صورت که از دو رقم گندم افلاک و اموی هفده (MV-17) مقدار ۳۰ گرم بذر به‌صورت جداگانه پودرشده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر NaCl ۰/۱ مولار، ریخته شد. سپس به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق و روی همزن‌مغناطیسی قرار داده شد تا به‌طورکامل هم بخورد و پروتئین‌های آن جداشود. مخلوط حاصل در دمای ۴درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ g× سانتریفیوژ شد. به‌منظور رسوب‌دهی پروتئین از سولفات‌آمونیوم با درجه خلوص ۷۰ درصد اشباع استفاده شد. مخلوط حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس توسط همزن مغناطیسی، به‌آرامی هم زده شد. سپس مخلوط به لوله‌های فالکون منتقل‌شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۸۰۰۰ g× سانتریفیوژ شدند و رسوبات حاصله با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-Hcl (۰/۰۲ مولار، اسیدیته ۷)، به صورت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۲۰ ساعت درون آب‌مقطر، دیالیز شد. به‌منظور غیرفعال کردن و رسوب دادن آمیلازهای گیاهی و پروتئین‌های بزرگ، مخلوط دیالیزشده به مدت ۱۰ دقیقه در داخل حمام آب‌گرم با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرارداده‌شد. مخلوط به‌دست‌آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۷۵۰۰ g×

سانتریفیوژشد. مایع رونشین جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری‌شد تا بعد در آزمایش مورد استفاده قرارگیرد.

سنجش میزان پروتئین

تعیین مقدار پروتئین عصاره پروتئینی براساس روش برادفورد (Bradford, 1976) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام شد.

بررسی اثر عصاره پروتئینی استخراج‌شده از گندم روی فعالیت آلفا- آمیلاز

فعالیت آمیلولیتیکی، با استفاده از روش برنفلد (Bernfeld, 1955) و بیکر و همکاران (Baker *et al.,* 1987) با کمی تغییرات، سنجش‌شد. به‌این‌صورت که از نشاسته یک درصد به عنوان سوبسترا استفاده‌شد. واکنش در محیط بافر مس(۲-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid) با اسیدیته ۵ و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (Safaei Khorram *et al.,* 2010) انجام شد. جذب نوری توسط دستگاه الایزاریدر (ELX 808) در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

به منظور تعیین اثر عصاره پروتئینی گندم روی فعالیت آلفا-آمیلاز از غلظت‌های ۱۷، ۸/۵، ۴/۲۵، ۲/۱۲۵، ۱/۰۶۲۵ میکروگرم پروتئین گندم استفاده شد. غلظت‌های ذکر شده از گندم با عصاره‌آنزیمی حشره به مدت ۱۵ دقیقه پیش- اینکوبه (Pre-incubate) شدند و پس از اضافه‌کردن نشاسته، به عنوان سوبسترا، به مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه شدند. فعالیت آنزیم در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تیمارشده با همدیگر مقایسه شدند.

بررسی اثر اسیدیته بر میزان مهارکنندگی توسط عصاره پروتئینی گندم

به‌منظور سنجش تاثیر اسیدیته‌های مختلف برفعالیت مهارکنندگی عصاره‌پروتئینی گندم از بافر یونیورسال (گلایسین، مس(۲-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) ، سوکسینات۰/۰۲ مولار) (Hosseinkhani and Nemat-Gorgani, 2003) با اسیدیته ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ استفاده شد. میزان مهار فعالیت آلفا-آمیلاز بعد از ۳۰ دقیقه اینکوبه با مهارکننده گندم تعیین شد. نمونه شاهد برای هر اسیدیته در حضور آنزیم و بدون افزودن مهارکننده می‌باشد.

سنجش مهارکنندگی در ژل

نمایش زایموگرام فعالیت آمیلولیتیکی در حضور و عدم حضور عصاره پروتئینی گندم با استفاده از ژل الکتروفورز (Lammli, 1970) و (Mehrabadi *et al,* 2010) انجام شد. برای این کار از ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ برای ژل جداکننده و ۴٪ برای ژل متراکم‌کننده استفاده شد. نمونه آنزیمی و عصاره گندم استخراج شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه اینکوبه شدند. سپس بافر نمونه به آن اضافه و در ژل بارگذاری و رانده شد. پس از رسیدن رنگ به انتها، ژل برداشته شده و برای ۱۵ دقیقه در محلول ۱٪ تریتون X100 قرارگرفت. سپس با آب‌مقطر شسته شد و به مدت ۱/۵ ساعت در بافر مس ۰/۰۲ مولار با اسیدیته ۵ حاوی ۲ میلی‌مولار $CaCl_2$، ۱۰ میلی‌مولار NaCl و ۱٪ نشاسته به آرامی تکان داده شد. ژل دوباره با آب مقطر شسته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول لگول (۳٪ KI و۱.۳٪ I_2) قرار داده شد. باندهای روشن در زمینه تاریک نشان دهنده فعالیت آلفا-آمیلاز است.

تجزیه آماری

داده‌ها بر اساس طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. گروه‌بندی داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام‌شد.

نتایج و بحث

تعیین اثر عصاره پروتئینی گندم بر فعالیت آلفا- آمیلاز گوارشی

در این مطالعه مشخص شد که عصاره پروتئینی استخراج شده از گندم توانایی بالایی برای مهار آنزیم آلفا-آمیلاز سوسک کلرادو دارد. سنجش فعالیت آمیلاز درحضور ۵ غلظت مختلف از عصاره گندم رقم افلاک و ام وی هفده، یک روند مهار وابسته به غلظت را نشان‌داد. میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز با استفاده از غلظت‌های ۱۷، ۸/۵، ۴/۲۵، ۲/۱۲۵ و ۱/۶۲۵ میکروگرم پروتئین عصاره گندم (رقم افلاک)، به ترتیب برابر با ۳۳/۶، ۵۵/۲، ۷۰/۳، ۸۰/۸ و ۸۲/۶ درصد نسبت به فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده (شاهد) بود (شکل ۱). فعالیت آنزیم درحضور همین غلظت‌ها از پروتئین

مهارکننده گندم رقم اموی‌هفده، به ترتیب ۳۰/۱۸، ۴۵/۷۴، ۴۸/۷۴، ۵۸/۳۲ و ۶۰/۷۲درصد نسبت به فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده (شاهد) بود. نتایج نشان می‌دهد که عصاره رقم گندم اموی‌هفده اثر بیشتری روی مهار آنزیم آلفاآمیلاز سوسک کلرادو دارد یعنی در غلظت ۱۷ میکروگرم عصاره پروتیینی رقم اموی‌هفده حدود ۷۰ درصد اثر مهارکنندگی روی آنزیم آلفاآمیلاز سوسک دارد درصورتی‌که در غلظت مشابه (۱۷ میکروگرم پروتیین) عصاره پروتیینی رقم افلاک در حدود ۶۶ درصد آنزیم آلفاآمیلاز سوسک را مهارکرده است که این تفاوت بین قدرت مهارکنندگی توسط دو عصاره اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (شکل ۱).

نتایج ما با سایر تحقیق‌هایی که تأثیر مهارکننده‌های گندمیان را بر آنزیم آلفا-آمیلاز حشرات بررسی‌کرده‌بودند، مطابقت داشت. فرانکو و همکاران (Franco *et al.*, 2000)، ۹۸ درصد مهار فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز *Acanthoscelides obtectus* را در حضور عصاره پروتئینی گندم گزارش کردند. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.,* 2010)، تأثیر عصاره پروتئینی استخراج‌شده از تریتیکاله را روی فعالیت آلفا-آمیلاز *Eurygaster integriceps* بررسی کردند و مهارکنندگی حدود ۸۰ درصد را برای این آنزیم در حضور عصاره پروتئینی گزارش کردند. گزمان-پارتیدا و همکاران (Guzman-Partida *et al.,* 2007) تأثیر مهارکننده استخراجی از گیاه وحشی *Olneya tesota* را بر آلفاآمیلاز پانکراس خوک و *Zabrotes subfasciatus* بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند که عصاره پروتئینی استخراج شده از گیاه توانست تا ۸۰ درصد فعالیت آمیلاز پانکراس خوک و حدود ۴۰ درصد آمیلاز *Zabrotes subfasciatus* را مهار کند. کلوه و همکاران (Kluh *et al.,* 2005) اثر مهارکننده لوبیا را روی گونه‌های متنوعی از حشرات راسته‌های مختلف سنجش‌کردند. آن‌ها دریافتند که این مهارکننده می‌تواند در اسیدیته ۷-۴ فعالیت مهارکنندگی خود را ایفاکند. این مهارکنندگی روی آنزیم *Tribolium castaneum* بیش از ۸۰ درصد بود. آن‌ها همچنین دریافتند که وقتی مهارکننده با آنزیم پیش‌اینکوبه می شود میزان مهار آنزیم بسیار بالاتر می‌رود. سیلوا و همکاران (Silva *et al.,* 2007) پروتئین‌های مهارکننده استخراج شده از *Pterodon pubescens* را خالص‌سازی کردند. خواص مهارکنندگی پروتئین خالص شده روی آمیلاز *Callosobruchus maculates* در شرایط In-vitroitro تا حدود ۷۰ درصد فعالیت آنزیم را کاهش‌داد. نتایج نشان می‌دهد که مهارکننده‌های گیاهی قدرت بالایی برای مهار فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز حشره در محیط In-vitro دارد.

تاثیر اسیدیته بر میزان مهارکنندگی عصاره پروتئینی

به منظور تعیین اثر اسیدیته بر قدرت مهارکنندگی عصاره پروتئینی گندم، از اسیدیته‌های ۲ تا ۹ استفاده شد (شکل ۲). میزان مهار آلفا-آمیلاز با تغییر اسیدیته، تغییرکرد. در اسیدیته ۲و ۳ عصاره‌پروتیینی هر دو رقم گندم هیچ‌گونه اثری روی فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز نداشتند اما در اسیدیته‌های بالاتر میزان مهار آنزیم بوسیله عصاره‌ها به‌صورت معنی‌داری افزایش پیداکرد. کم‌ترین فعالیت آنزیم در حضور بالاترین غلظت مهارکننده از هر دو رقم گندم در اسیدیته ۵ مشاهده شد. در رقم افلاک تفاوت معنی‌داری در میزان مهار آنزیم در اسیدیته‌های ۴، ۵ و ۶ مشاهده نشد اگر چه بعد از اسیدیته ۶ میزان مهار آنزیم به‌وسیله عصاره پروتیینی کاهش پیدا کرد بدین‌صورت که در اسیدیته‌های ۷، ۸ و ۹ میزان مهار آنزیم به‌وسیله عصاره پروتیینی رقم افلاک تقریبا به‌یک اندازه بودند. در رقم اموی‌هفده میزان مهار آنزیم به‌وسیله عصاره پروتیینی در اسیدیته‌های ۵، ۶، ۷، ۸، و ۹ تقریبا به یک اندازه بودند و تفاوت معنی‌داری در میزان مهارکنندگی آنزیم به-وسیله عصاره پروتیینی مشاهده نشدند (شکل ۲).

گزارش شده است که یک مهارکننده خوب باید بتواند قدرت مهارکنندگی خود را در طیفی از اسیدیته‌های مختلف حفظ کند. مهارکننده‌های استفاده شده در این آزمایش قادر بودند در اسیدیته بالاتر و پایین‌تر از اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم، میزان مهار بالایی از فعالیت آنزیم را داشته باشند. وابستگی میزان مهارکنندگی با اسیدیته در چندین مطالعه بررسی شده است (Valencia *et al.,* 2000; Biggs and McGregor, 1996; Marshall and Lauda, 1975;

Powers and Whitaker, 1977; Lajolo and Finardi-Filho, 1985). گزارش‌ها حاکی از آن است که مقدار مهارکنندگی به شدت وابسته به اسیدیته‌ای است که آنزیم در آن فعالیت می‌کند. والنسیا-جیمنز و همکاران (Valencia-Jimenez *et al.,* 2008) تأثیر مهارکنندگی تاج خروس و چند رقم لوبیا را بر کاهش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز لارو *Tecia solanivora* بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که این هیچ‌کدام از مهارکننده ها در اسیدیته ۶ قادر نبودند تأثیری بر فعالیت آنزیم داشته باشند. همچنین بیشترین میزان مهار به‌دست آمده توسط این گروه از مهارکننده‌ها در اسیدیته ۹ بود که این اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم است. کتکار و همکاران (Kotkar *et al.,* 2009) گزارش کردند که اسیدیته لومن تقریباً برابر با اسیدیته‌ای است که آنزیم در آن فعالیت می‌کند. اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در بیشتر سوسک‌ها، اسیدی است و بنابراین مهارکننده‌ای می‌تواند در داخل لومن حشره کارا باشد که بتواند در این اسیدیته تأثیر بالای مهارکنندگی خود را داشته باشد. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.,* 2012) تأثیر اسیدیته بر میزان مهار آنزیم آلفاآمیلاز بزاقی و معده‌میانی سن گندم توسط عصاره پروتئینی تریتیکاله را مورد بررسی قراردادند و نشان‌دادند که در اسیدیته بین ۷-۳ مهار آنزیم بالای ۴۰ درصد بود.

سنجش فعالیت آنزیم در ژل

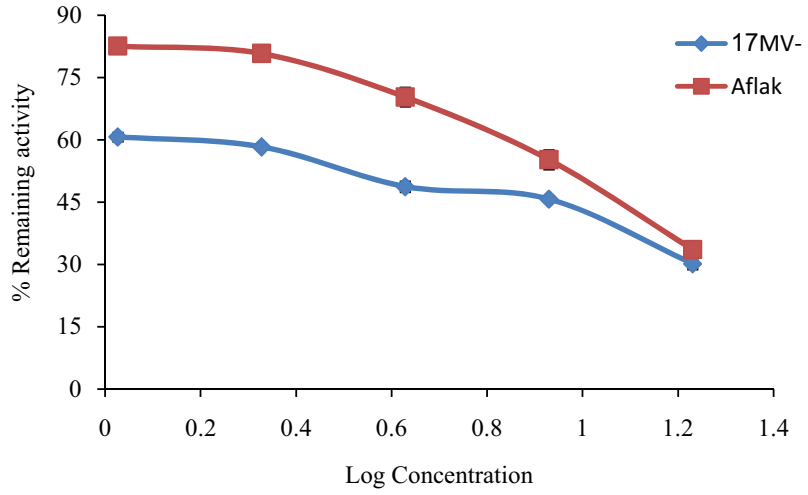
بررسی فعالیت آنزیم در ژل نشان‌داد که یک باند فعال آمیلازی در کانال‌گوارشی حشره وجود دارد (شکل‌های ۳ و ۴). شدت رنگ باند شاهد در حضور غلظت‌های مختلف از هر دو مهارکننده گندم تغییرکرد. مشاهده شد که با افزایش غلظت پروتئین مهارکننده، باندها کمرنگ‌تر می‌شود. این تغییر در شدت رنگ یک وابستگی فعالیت آنزیم به غلظت مهارکننده را نشان می‌دهد که مشابه نتایج حاصل از سنجش با دستگاه الایزا می‌باشد. در کم‌ترین غلظت (۱/۰۶۲۵ میکروگرم پروتئین)، باند پررنگ است و در بالاترین غلظت (۱۷ میکروگرم پروتئین)، باند تقریباً حذف شد. همچنین شدت رنگ باندها در حضور بالاترین غلظت مهارکننده رقم افلاک کمتر از رقم اموی-۱۷ بود که نتایج حاصل از ژل الکتروفورز، داده‌های به‌دست‌آمده از سنجش آنزیمی به-وسیله دستگاه الایزا را تأییدکرد. همچنان‌که در شکل ملاحظه می‌شود تاثیر رقم افلاک روی فعالیت آلفاآمیلاز بیشتر از رقم ام-وی‌هفده می‌باشد زیرا در غلظت‌های مشابه میزان مهار آنزیم در ژل به‌وسیله رقم افلاک بیشتر از رقم اموی‌هفده بود.

سیلوا و همکاران (Silva *et al.,* 2009) بیان کردند که حضور چندین ایزوفرم آمیلاز در حشرات آفت روشی کارا برای غلبه آن‌ها بر مهارکننده‌های آمیلاز تولیدشده در گیاهان مورد تغذیه می‌باشد. در نتیجه، وجود یک ایزوفرم آنزیمی باعث می‌شود که حشره نتواند به سرعت به مهارکننده‌ها مقاوم شود. کتکار و همکاران (Kotkar *et al.,* 2009) تأثیر مهارکننده استخراج‌شده از سورگوم بر فعالیت آلفا-آمیلاز کرم غوزه (*Helicoverpa armigera* Hubner) را در ژل پلی‌اکریل‌آمید موردبررسی قراردادند. آمیلاز این حشره پنج ایزوفرم آنزیمی را در غیاب مهار-کننده نشان داد که در حضور مهارکننده، ایزوفرم های ۴ و ۵ به طور کامل حذف‌شدند و ازشدت رنگ ایزوفرم‌های ۱، ۲ و ۳ نیز کاسته شد. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.,* 2010) تأثیر غلظت‌های مختلف از عصاره پروتئینی تریتیکاله را بر آمیلاز گوارشی سن گندم بررسی کردند. آن ها دریافتند با افزایش غلظت مهارکننده شدت رنگ باندها کاهش یافت و در بالاترین غلظت، باندها تقریباً به‌طورکامل حذف شدند.

بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که گیاهان دارای ترکیباتی هستند که خاصیت مهارکنندگی فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات را دارند. با توجه‌به‌این‌که آمیلاز، نقش بیوشیمیایی مهمی در تغذیه حشرات ایفا می‌کند، هر استراتژی که فعالیت این آنزیم را مختل-کند باید مورد توجه قرار گیرد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ترکیبات موجود در دانه های غلات نقش مهمی در مهار آنزیم حشرات غیرمیزبان دارند به‌ویژه که این ترکیبات در طیف وسیعی از اسیدیته قادر به مهار آنزیم هدف می‌باشند که عدم‌تأثیرپذیری مهار آنزیم از اسیدیته محیط می‌تواند از مزیت‌های این مهارکننده ها باشد. به‌علاوه نتایج نشان داد که این ترکیبات حتی در غلظت-های پایین دارای اثرات قابل‌توجه می‌باشند که نقش آن‌ها را در کاربرد عملی آن‌ها بیشتر نمایان می‌کند.

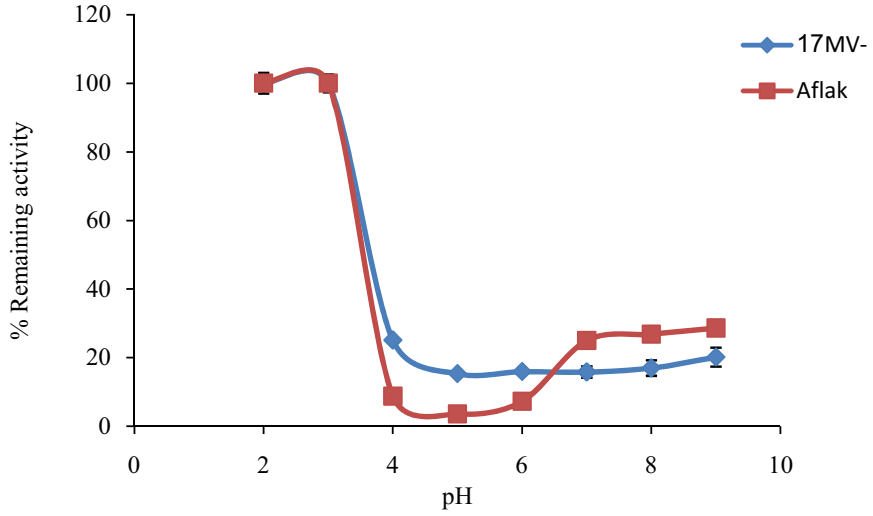
سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران جهت تأمین هزینه‌های این‌پژوهش‌قدردانی‌می‌شود.



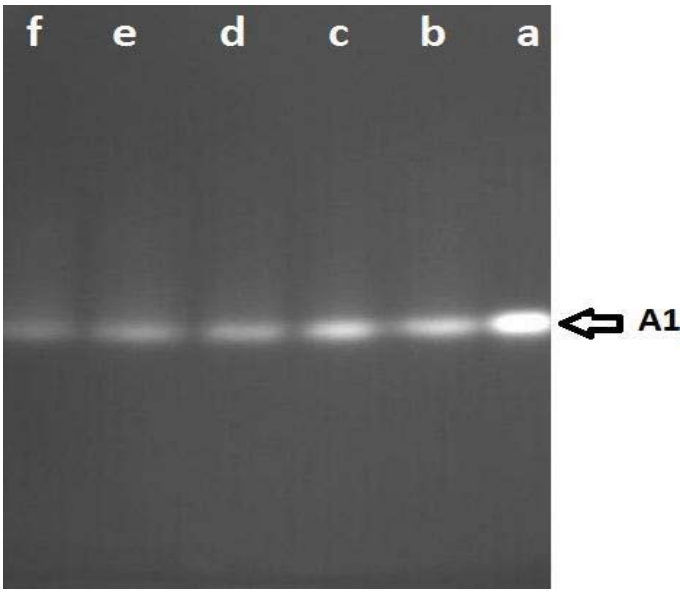
شکل۱- تأثیر غلظت های مختلف عصاره های پروتئینی ارقام افلاک و ام وی هفده گندم بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز سوسک برگ‌خوار سیب زمینی.

Figure 1. The effect of different concentrations of wheat proteinaceous extracts on the colorado potato beetle α-amylase activity



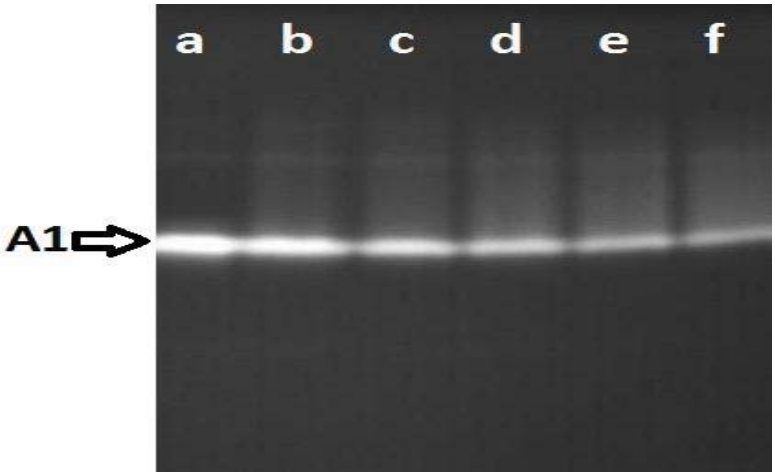
شکل۲- تأثیر اسیدیته بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز سوسک برگ‌خوار سیب زمینی در حضور عصاره‌های پروتئینی گندم

Figure 2. The effect of different pHs on the colorado potato beetle α-amylase activity in the presence of wheat proteinaceous extracts



شکل ۳- تأثیر مهارکنندگی عصاره پروتئینی گندم (رقم افلاک) روی آلفا- آمیلاز در ژل. عصاره آنزیمی به تنهایی و در حضور غلظت های مختلف مهارکننده به مدت یک ساعت اینکوبه شدند و پس از آن در ژل بارگذاری شدند. تیمار شاهد، ستون اول از سمت راست می باشد. با افزایش غلظت مهارکننده، میزان فعالیت مشاهده شده کاهش یافت.

Figure 3. Inhibitory effect of wheat (Cultivar Aflak) proteinaceous extract on the α-amylase activity in-gel. Enzyme extract alone and in the presence of various concentrations of inhibitors were pre-incubated for an hour and then loaded in the gel. Control is the first column on the right. With increasing inhibitor concentration, decreased activity was observed



شکل ۴- تأثیر مهارکنندگی عصاره پروتئینی گندم (رقم MV-17) روی آلفا- آمیلاز در ژل. عصاره آنزیمی به تنهایی و در حضور غلظت های مختلف مهارکننده به مدت یک ساعت اینکوبه شدند و پس از آن در ژل بارگذاری شدند. تیمار شاهد، ستون اول از سمت راست می-باشد. با افزایش غلظت مهارکننده، میزان فعالیت مشاهده شده کاهش یافت.

Figure 4. Inhibitory effect of wheat (Cultivar MV-17) proteinaceous extract on the α-amylase activity in-gel. Enzyme extract alone and in the presence of various concentrations of inhibitors were pre-incubated for an hour and then loaded in the gel. Control is the first column on the right. With increasing inhibitor concentration, decreased activity was observed.

References

Alarcon, F. J., Martinez, T. F., Barranco, P., Cabello, T., Diaz, M. and Moyano, F. J. 2002. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32: 265–274.

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., Amiri, B., Butt, T. M. and Gordon-Weeks, R. 2001**.** Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. **Biochemistry Biophysics Acta** 1510: 367–377.

Bannakan, I., Hormchan1, P., Wongpiyasatid, A. and Engkakul, A. 2007. Effects of amylase Inhibitor on Mungbean Weevil, *Callosobruchus maculatus*, in vivo and in vitro and on Barley Malt amylase in vitro. **Kasetsart Journal** 41: 451 - 460

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 (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 26: 69–75.

Bonavides, K. B., Pelegrini, P. B., Laumann, R. A., Grossi-de-Sa, M. F., Bloch, C. J. R., Melo, J. A. T., Quirino, B. F., Noronha, E. F. and Franco, O. L. 2007. Molecular identification of four different a-amylase inhibitors from baru (*Dipteryx alata*) seeds with activity towards insect enzymes. **Journal Biochemistry and Molecular Biology.** 40: 4, 494-500.

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.

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

Chen, M. S. 2008. Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review**. Insect Science** 15: 101-114.

Chougule, N. P., Doyle, E., Fitchesb, E. and Gatehouse, J. A. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth, Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays**. Journal of Insect Physiology** 54: 563–572.

Coelho, A. A. M. De Paula, J. E. and Espindola, L. S. 2006. Insecticidal Activity of Cerrado Plant Extracts on Rhodnius milesi Carcavallo, Rocha, Galvao & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under Laboratory Conditions. **Neotropical Entomology** 35(1):133-138

Da Silva, M. C. M., Mello, L. V., Coutinho, M. V., Rigden, D. J., Neshich, G., Chrispeels, M. J. and Grossi-de-Sa, M. F. 2004. Mutants of common bean alpha-amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to alpha-amylases. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 39: 201–208.

Franco, A. V. L., Rigden, D, J., Melo, F. R., J. R, C. B., Silva, C. P., Maria, F. and Grossi de Sa, M. F. 2000. Activity of wheat a-amylase inhibitors towards bruchid a-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal Biochemistry** 267: 2166±2173.

Gauthier, N. L., Hofmaster, R. N., and Semel, M. 1981. History of Colorado potato beetle control. In Lashomb J. H. and Casagrande R. (Eds.)**.** Advances in Potato Pest Management. Hutchinson Ross, Stroudsburg. pp: 13–33.

Guzman-Partida , A. M., Jatomea-Fino , O., Robles-Burgueno , M. R., Ortega-Nieblas, M. and Vazquez-Moreno, L. 2007. Characterization of a-amylase inhibitor from Palo Fierro seeds. **Plant Physiology and Biochemistry** 45: 711-715.

Hegedus, D., Baldwin, D., O'Grady, M., Braun, L., Gleddie, S., Sharpe, A., Lydiate, D. and Erlandson, M. 2003. Midgut Proteases From *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae: Characterization, cDNA Cloning, and Expressed Sequence Tag Analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 53:30–47.

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.

Iulek J., Franco O. L., Silva M., Slivinski C. T., Bloch C. J. r., Rigden D. J. and Grossi-de-Sa M. F., 2000. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new a-amylase inhibitor from Secale cereale (rye). **International Journal of Biochemistry and Cell Physiology** 32: 1195-1204.

Jongsma, M. A. and Bolter, C. J. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology** 43: 885–896.

Kluh, I., Horn, M., Hyblova, J., Hubert, J., kova-Maresova, L. D., Voburka, Z., Kudlikova, I., Kocourek, F. and Mares, M. 2005**.** Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of a-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry** 66: 31–39

Kotkar, H. M., Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Gupta, V. S. and Giri, A. P. 2009. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to 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.

Lwalaba, D., Hoffmann, K. H. and Woodring, J. 2010. Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Archives Insect Biochemistry and physiology** 73: 1-14–29.

Marshall, J. J. and Lauda, C. M. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of amylase, from the kidney bean *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry** 250: 8030–8037.

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

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

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.

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.

Nauen, R., Sorge, D., Sterner, A. and Borovsky, D. 2001. TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. **Archives Insect Biochemistry and Physiology** 47: 169–180.

Oliveira-Neto, O., Batista, J. A. N. and Rigden, D. J. 2003. Molecular cloning of α-amylase from the cotton ball weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance. **Journal Protein Chemistry** 22: 77–87.

Paulillo, L. C. M. S., Lopes, A. R., Cristofoletti, P. T., Parra, J. R. P., Terra, W. R. and Silva-Filho, M. 2000. Changes in Midgut Endopeptidase Activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology** 93(3): 892-896.

Podoler, H. and Applebaum, S. W. 1971. The alpha-amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. **Journal Properties Biochemistry** 121: 321–325.

Powers, J. R. and Whitaker, J. R. 1977. Effect of several experimental parameters on combination of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) amylase inhibitor with porcine pancreatic amylase. **Journal of Food Biochemistry** 1: 239-260.

Safaei Khorram, M., Farshbaf Pour Adab, R., yazdaniyan, M. and Jafarnia, S. 2010. Digestive α-amylase from *Leptinotarsa decemlineta* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): response to pH, Temperature and some mineral compounds. **Advances in Environmental Biology** 4(1): 101-107

Silva, D. P., Casado-Filho, E. L., Correoa, A. S. R., Farias, L. R., Bloch JR. C., Grossi, D. S. M. F., Mendes, P. A. M., Quirino, B. F., Noronha, E. F. and Franco, O. L. 2007. Identification of an amylase Inhibitor from *Pterodon pubescens* with ability to inhibit Cowpea Weevil digestive enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55: 4382-4387

Silva, E. M., Valencia, A., Grossi-de-Sa, M. F., Rocha, T. L., Freire, E., de Paula, J. E. and Espindola, L. S. 2009**.** Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect a-amylases. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 95: 141–146.

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

Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F. and Glockshuber, R. 1998. A novel strategy for inhibition of a-Amylase: yellow meal worm a-Amylase in complex with Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 A resolution. **Structure** 6: 911–921.

Svensson, B., Fukuda, K., Nielsen, P. K. and Bonsager, B. C. 2004. Proteinaceous alpha-amylase inhibitors. **Biochemistry Biophysics Acta** 1696: 145-156.

Terra, W. R., Ferreia, C. and Baker, J. E. 1996. Compartmentalization of digestion, in : M.J. Lehane, P.F. Billingsley (Eds.). Biology of the Insect Midgut, Chapman and Hall, London pp. 207–235.

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.

Valencia-Jimenez, A., Arboleda V. J. W., Avila, A. L. and Grossi-de-Sa, M. F. 2008. Digestive a-amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. **Bulletin of Entomological Research** 98, 575–579

Voigt, D., Schuppert, J. M., Dattinger, S. and Gorb, S. N. 2008. Sexual dimorphism in the attachment ability of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) to rough substrates. **Journal of Insect Physiology** 54: 765–776**.**

Warchalewski, J. R., Gralik, J., Winiecki, Z., Nawrot, J. and Piasecka-Kwiatkowska, D. 2002. The effect of wheat amylase inhibitors incorporated into wheat-based artificial diets on development of *Sitophilus granarius* L., *Tribolium confusum* Duv. and *Ephestia kuehniella* Zell. **Journal of Applied Entomology** 126: 161-168.

Plant Pests Research
Vol. 2, No. 4, 2013

Inhibitory effect of wheat seed cultivars extract s on digestive alpha amylase activity of Colorado potato beetle

E. Borzouei[1], A. R. Bandani[2]* and A. Moslemi[3]
1, 2. M.Sc. Student and Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. 3, Senior Researcher, Agriculture Organization of South Kerman, Plant Protection section

(Received: October 31, 2012- Accepted: February 3, 2013)

Abstract

Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chyrsomelidae) is a key pest of potato worldwide. Given the adverse effect of the pesticides applied against this pest, alternative method for the pest control is unavoidable. Thus, the aim of the current study was to study the effect of wheat cultivars proteinaceous extract against the beetle α-amylase. The enzyme extraction from the beetle and proteinaceous extract from the wheat seeds were done using distilled water and 0.1 M NaCl, respectively. The results showed that proteinaceous extracts of wheat seeds have great ability to inhibit Colorado potato beetle α-amylase. Enzyme assays in the presence of five concentrations of Aflak and MV-17 wheat seed cultivars showed a dose dependant manner of enzyme inhibition. Remaining activity of the enzyme when concentrations of 17, 8.5, 4.25, 2.125 and 1.06 µg protein of extract were used was 18, 30, 45.74, 48.74, 58.32, and 60.72%, respectively compared to control. The results showed that Aflak cultivar is less effective in the enzyme inhibition than MV-17 cultivar. Studying the effect of pHs on the inhibition showed that the greatest inhibition in the presence of the highest amount of inhibitor was observed at pH 5. Gel assays showed that bands intensity was decreased in the presence of different concentrations of both cultivars extracts and the changes of the bands intensities was dose dependant.

Keywords: Colorado potato beetle, α-amylase, Wheat seed cultivars extracts

*Corresponding author: abandani@ut.ac.ir