برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا– آمیلازهای گوارشی *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) و اثرات مهارکنندگی سه عصاره‌ی پروتئینی روی فعالیت آن‌ها

اکرم مقدمی مونقی[۱]، رضا فرشباف پور آباد[۲*] و سیما مجیدیانی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته‌ی حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تبریز.
۲- استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز.
۳- دانشجوی دکتری رشته حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تبریز.
* مسئول مکاتبه rfpourabad@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۳۰

چکیده

شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد، *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lep.; Pyralidae) با تغذیه از آرد سبب کاهش کیفیت نان تولیدی می‌شود. ایجاد اختلال در دستگاه گوارش حشرات با استفاده از مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی که از گیاهان تراژن استخراج می‌شوند، یکی از روش‌های کنترل محسوب می‌شود. در این مطالعه، اثر عصاره‌های پروتئینی گندم ارقام سیوند، سرداری و تریتیکاله روی فعالیت آلفا- آمیلازهای لاروهای سنین چهارم و پنجم شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد بررسی شد. برای استخراج پروتئین از بذرها، آمونیوم سولفات ۷۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. اسیدیته و دمای بهینه‌ی فعالیت آلفا- آمیلاز به ترتیب ۱۰ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد. طبق نتایج حاصل، بالاترین غلظت عصاره‌های پروتئینی ارقام گندم سیوند و سرداری (۱۳میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) و تریتیکاله (۱۶ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) فعالیت آنزیم را به ترتیب ۷۳/۰۸، ۷۱/۰۷ و ۶۵/۸۸ درصد در لاروهای سن پنجم و ۵۸/۱۶، ۴۲/۱۴ و ۵۰/۲۵ درصد در لاروهای سن چهارم کاهش دادند. در پایین‌ترین غلظت عصاره‌های پروتئینی گندم ارقام سیوند و سرداری (۰/۸۱۲ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) و تریتیکاله (یک میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) نیز فعالیت آنزیم را به ترتیب۱۹/۹۳، ۱۷/۸ و ۲۵/۲۶ درصد در لارو سن پنجم و ۱۱/۷۸، ۱۲/۸۱ و ۱۰/۰۹ درصد در لارو سن چهارم کاهش دادند. در ژل زایموگرام بدون استفاده از مهارکننده تنها یک باند مشاهده شد. در بالاترین غلظت عصاره‌ها، در لاروهای سن پنجم، باند آمیلازی ناپدید شد و در لاروهای سن چهارم، وضوح باند کم‌تر شد. با کاهش دز مهارکننده‌ها، وضوح باندها افزایش یافت. طبق نتایج به دست آمده، عصاره‌های پروتئینی ارقام سیوند، سرداری و تریتیکاله پتانسیل خوبی برای کاهش فعالیت آمیلازی در لارو آفت مورد نظر داشته و می‌تواند در برنامه‌های مدیریت این آفت در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد، آلفا- آمیلاز، مهارکننده‌های آنزیم، عصاره پروتئینی.

مقدمه

شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد یکی از مهم‌ترین آفات محصولات انباری در جهان محسوب می‌شود. لاروهای این آفت به آرد گندم و سایر غلات در انبارها، کارخانه‌ها و خانه‌ها حمله کرده و با تغذیه از آرد و تولید تارهای ابریشمی حین تغذیه باعث کاهش کیفیت، افت کمیت غذا و همچنین کاهش کیفیت نان تولیدی می‌شوند (پیتلکووا و همکاران ۲۰۰۹). برای کنترل این آفت از مواد شیمیایی و ضدعفونی کننده‌های انباری مختلف استفاده می‌شود، ولی این روش‌ها رضایت کافی را ایجاد نمی‌کنند. نگرانی‌های عمومی و علمی به جهت استفاده از آفت‌کش‌ها روی محصولات انباری، باقیمانده‌ی سموم آفت‌کش در این

محصولات و طرح مبحث غذای سالم و همچنین مقاومت آفات، نیاز به انتخاب یک روش کنترلی جایگزین را ایجاب می‌نماید (یلدیریم و همکاران ۲۰۰۱ و ایسمان ۲۰۰۶). بدین جهت تلفیق روش‌های غیر شیمیایی مختلف مانند استفاده از گیاهان تراریخته که شامل مهارکننده‌های آنزیمی گوارشی برای اختلال در سیستم گوارشی حشرات هستند، یک روش کنترلی کارآمد محسوب می‌شود (لووی و آرپایا ۲۰۰۵).

آلفا-آمیلازها (α-1,4-glucan-4-glucanohydrolases) گروهی از گلیکوزید هیدرولازها هستند که تجزیه‌ی پیوند glicosidic α-(1,4) را در نشاسته و سایر پلی‌ساکاریدها بر عهده دارند (پیتلکووا و همکاران ۲۰۰۹). این آنزیم‌ها نقش کلیدی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران ایفا می‌کنند (فرانکو و همکاران ۲۰۰۲). مهارکننده‌های آنزیمی به جایگاه فعال آنزیم متصل شده و یا ساختار آن را تغییر می‌دهند و به این ترتیب فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. این مهارکننده‌ها با اختلال در گوارش، باعث افزایش مرگ و میر، افزایش طول دوره‌ی لاروی و کاهش باروری شده و موجب کنترل آفات می‌شوند (کوماری و همکاران ۲۰۱۲).

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 مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی شامل آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز، لکتین‌های به دست آمده از گیاهان و قارچ‌ها و دلتا اندوتوکسین باکتری *Bt* از پتانسیل خوبی برخوردار هستند که در کنترل تعداد زیادی از آفات استفاده می‌شوند (فرانکو و همگاران ۲۰۰۲). 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، 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 (مهرآبادی و همکاران ۲۰۱۲). مهارکننده‌های پروتئینی آنزیم‌های گوارشی (آمیلازها و پروتئازها) عموما در اندام‌های تولیدمثلی (دانه) گیاهان، اندام‌های ذخیره‌ای و غالب بافت‌های رویشی گیاهان یافت می‌شوند. اعتقاد بر این است که این مهارکننده‌ها، پروتئین‌های 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 (اسمعیلی و بندانی ۱۳۹۵).

مهارکننده‌های آمیلاز کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند؛ بنابراین، مهارکننده‌ای که فعالیت یک آمیلاز را در یک آفت مهار می‌کند ممکن است روی سایر آمیلازها موثر نباشد (والنسیا- جیمنز و همکاران ۲۰۰۸). نتایج موفقیت‌آمیز مهار آمیلاز و پروتئیناز در چندین سنجش آزمایشگاهی نشان داده شده است. این روش برای محیط، مصرف کننده، تولید کننده، دشمنان طبیعی و سلامت غذایی بی‌زیان خواهد بود (اسمعیلی و بندانی ۱۳۹۵، کوماری و همکاران ۲۰۱۲، مهرآبادی و همکاران ۲۰۱۲). هدف از این مطالعه بررسی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آلفا- آمیلازهای گوارشی لارو شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و سنجش در ژل زایموگرام بود. همچنین اثرات عصاره‌های پروتئینی گندم ارقام سیوند، سرداری و نیز تریتیکاله روی فعالیت این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

برای پرورش شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد از کلنی موجود در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز استفاده شد. لاروها روی آرد گندم در شرایط

آزمایشگاهی ۲±۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۵ درصد در تاریکی بر روی آرد گندم محلی در یکی از واحدهای گلخانه‌ای گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز پرورش یافتند.

استخراج عصاره‌ی آنزیمی

استخراج آنزیم به روش بندانی و همکاران (۲۰۰۹) از لاروهای سنین چهارم و پنجم انجام شد. لاروها در آب مقطر سرد زیر میکروسکوپ تشریح شدند (Stemi Sv6 ZEISS, Germany). ۲۰ عدد لوله گوارش کامل لارو، جداسازی و با استفاده از دستگاه هموژنایزر Ultra turax T8 همگن‌سازی شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. محلول بالایی نمونه‌ها جدا و به عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای سنجش‌های بعدی نگه‌داری شد.

استخراج عصاره‌ی پروتئینی از بذرها

عصاره‌های پروتئینی به روش مجیدیانی و همکاران (۲۰۱۵) از بذور گندم ارقام سیوند، سرداری و تریتیکاله استخراج شدند. بذرها کاملا پودر شده و سپس ۳۰ گرم از پودر به دست آمده با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار NaCl مخلوط و به مدت دو ساعت روی همزن مغناطیسی هم زده شد. مخلوط به دست آمده در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری و به منظور غیرفعال شدن آنزیم‌های درون‌زاد اصلی در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه و مجددا سانتریفیوژ شد. به منظور رسوب پروتئین‌ها، مایع رویی با سولفات آمونیوم ۷۰ درصد به مدت ۴۵ دقیقه مخلوط و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد. رسوبات به دست آمده با بافر فسفات سدیم (۰/۰۲ مولار و اسیدیته‌ی هفت) به صورت محلول درآمدند و در یخچال (دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند. این سوسپانسیون داخل کیسه‌های دیالیز ریخته شد و به مدت ۲۰ ساعت داخل همان بافر، عمل دیالیز انجام گرفت تا نمک‌های اضافی موجود در محلول به داخل بافر آزاد شوند. در نهایت محلول به دست آمده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به عنوان منبع مهارکننده‌ی آنزیمی نگه‌داری شد.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

فعالیت آلفا- آمیلاز گوارشی به روش برنفلد (۱۹۵۵) و بندانی و همکاران(۲۰۰۹) با استفاده از معرف رنگی دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) و محلول نشاسته‌ی یک درصد به عنوان زیرنهشت مورد سنجش قرار گرفت. واکنش با افزودن ۱۰ میکرولیتر آنزیم به ۲۵ میکرولیتر نشاسته یک درصد و ۶۵ میکرولیتر بافر گلایسین (۰/۰۲ مولار، اسیدیته ۱۰) شروع شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معرف DNS به مجموعه اضافه و برای مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. بعد از سرد شدن، جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (ELx 800) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند و هر تیمار نیز دارای سه تکرار بود.

دما و اسیدیته‌ی بهینه‌ی فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی

به منظور سنجش تاثیر اسیدیته‌های مختلف بر فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز از بافر یونیورسال ۰/۰۲ مولار (گلایسین، مس و سوکسینیک اسید) (حسین خانی و نعمت گرگانی، ۲۰۰۳) با اسیدیته‌های ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ استفاده شد. دمای مناسب فعالیت آنزیم نیز با قرار دادن در شرایط دمایی متفاوت ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. میزان جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه

میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

مهار فعالیت آلفا - آمیلاز

طبق روش دسترنج و همکاران (۲۰۱۳)، سنجش‌های مهار عصاره‌ی آنزیمی با مقدار ۱۰ میکرولیتر آنزیم، ۱۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی و ۵۵ میکرولیتر بافر گلایسین در هر میکروتیوب مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از نشاسته‌ی یک درصد به عنوان زیرنهشت اضافه و به مدت نیم ساعت در بن ماری قرار گرفت. به دنبال آن درون هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر محلول DNS افزوده و میکروتوب‌ها به مدت ۱۵دقیقه در آب جوش گذاشته شدند. درصد مهار فعالیت آنزیمی بر اساس میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر طبق فرمول زیر اندازه‌گیری گردید (دسترنج و بندانی ۲۰۱۲).

فرمول ۱-

درصد مهارکنندگی = [(میزان جذب نوری شاهد - میزان جذب نوری نمونه)/ میزان جذب نوری شاهد] ×۱۰۰

اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی

به منظور سنجش تاثیر اسیدیته‌های مختلف بر فعالیت مهارکنندگی، طبق روش حسین خانی و نعمت گرگانی (۲۰۰۳)، سنجش فعالیت آنزیم آلفا – آمیلاز در حضور بافر یونیورسال با اسیدیته‌های ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ به جای بافر گلایسین، اندازه‌گیری شد. میزان مهار فعالیت آلفا- آمیلاز با عصاره‌های پروتئینی بعد از ۳۰ دقیقه انکوبه کردن اندازه‌گیری گردید. نمونه‌ی شاهد تنها با عصاره‌ی آنزیمی و بدون افزودن مهارکننده در نظر گرفته شد.

سنجش مهارکنندگی در ژل

زایموگرام فعالیت آمیلولیتیک با استفاده از روش لاملی (۱۹۷۰) و مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییرات انجام شد. از ژل پلی‌آکریلامید ۱۰ درصد حاوی نشاسته‌ی ۰/۲ درصد به عنوان ژل جدا کننده و ژل پلی‌آکریلامید چهار درصد به عنوان ژل متراکم کننده استفاده شد. ژل الکتروفورز در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد و ولتاژ ۱۲۰ بارگذاری شد تا رنگ آبی به انتها رسید. ژل ابتدا با آب مقطر و سپس با محلول یک درصد تریتون X-100 به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد. ژل مجدداً با آب مقطر شستشو و سپس به مدت ۴۵ دقیقه درون بافر گلایسین اسیدیته‌ی ۱۰ حاوی ۱۰ میلی مولار سدیم کلراید و دو میلی مولار کلسیم کلراید قرار گرفت. در نهایت برای توقف واکنش و رنگ گرفتن زمینه‌ی واکنش نداده با نشاسته، در محلول رنگی لوگول غوطه‌ور شد.

تعیین غلظت پروتئین

به منظور تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها، طبق روش بردفورد (۱۹۷۶) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

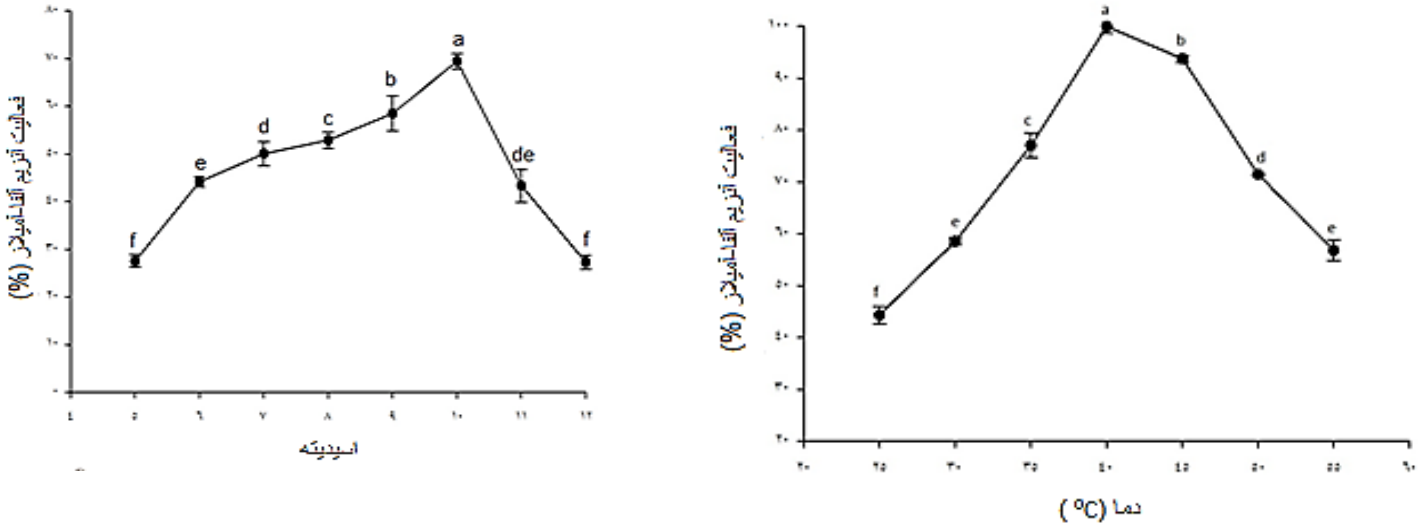
تجزیه‌ی آماری

تجزیه‌ی داده‌ها بر اساس طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال آماری ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

اثر اسیدیته و دما روی فعالیت آلفا- آمیلاز

طبق آزمایش‌های انجام شده، بیش‌ترین فعالیت آلفا- آمیلاز در اسیدیته‌ی ۱۰ (شکل ۱) و دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (شکل ۱) به دست آمد.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر اسیدیته و دما روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز گوارشی لاروهای شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد (سمت راست: اثر دما؛ شکل چپ: اثر اسیدیته) (حروف مشترک نشان‌دهنده‌ی نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون دانکن است).

اثر عصاره‌های پروتئینی روی فعالیت آلفا-آمیلاز

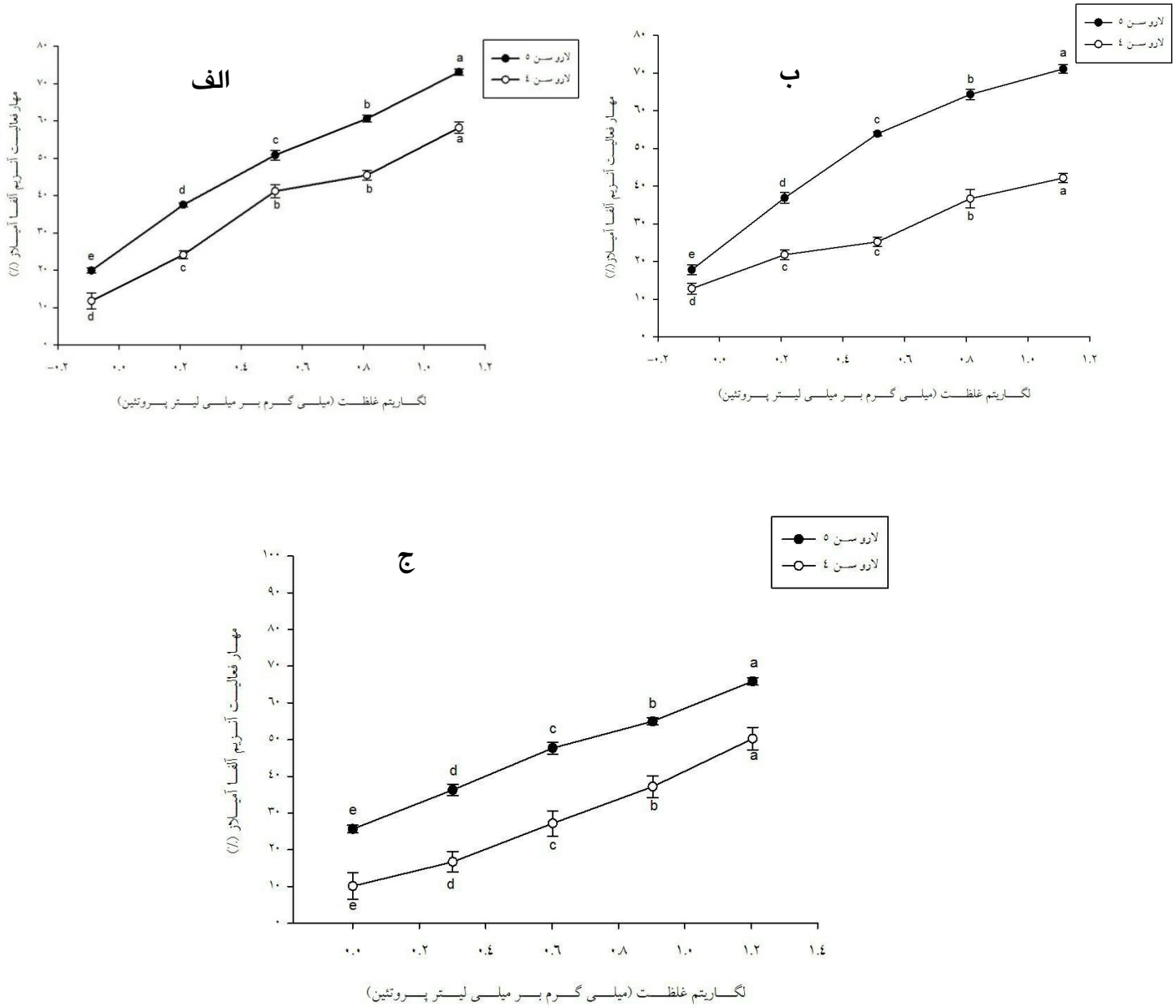
اثر مهارکنندگی روی فعالیت آنزیم در هر دو سن لاروی کاملا معنی دار بود، به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ی پروتئینی، درصد مهار شدن فعالیت آنزیم به طور معنی داری افزایش یافت. بالاترین غلظت از عصاره‌های پروتئینی گندم ارقام سیوند و سرداری (۱۳ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) و (۱۶ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) به ترتیب ۷۳/۰۸، ۷۱/۰۷ و ۶۵/۸۸ درصد در لارو سن پنج و ۵۸/۱۶، ۴۲/۱۴ و ۵۰/۲۵ درصد در لارو سن چهار فعالیت آنزیم را کاهش دادند. در پایین‌ترین غلظت از عصاره‌های پروتئینی گندم ارقام سیوند و سرداری (۰/۸۱۲میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) و تریتیکاله (یک میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) به ترتیب۱۹/۹۳، ۱۷/۸ و ۲۵/۲۶ درصد در لارو سن پنج و ۱۱/۷۸، ۱۲/۸۱ و ۱۰/۰۹ درصد در لارو سن چهار فعالیت آنزیم را کاهش دادند (شکل ۲).

اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی

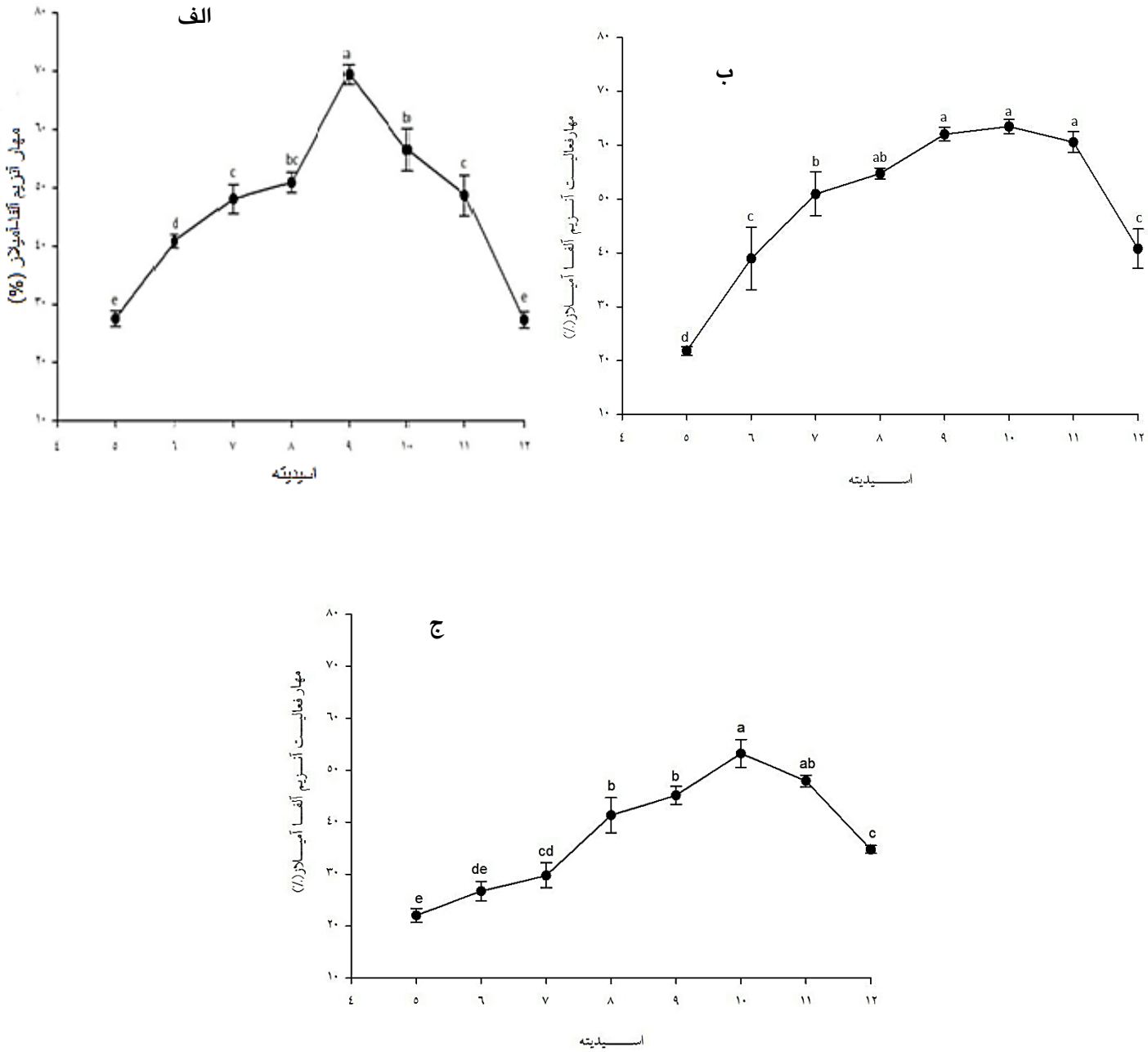
فعالیت مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی در اسیدیته‌های مختلف متغیر بود. بیشترین میزان مهار آمیلاز به وسیله‌ی عصاره‌های پروتئینی گندم ارقام سیوند و سرداری و تریتیکاله به ترتیب در اسیدیته‌های ۹، ۱۰ و ۱۰ مشاهده شد (شکل ۳).

سنجش مهارکنندگی در ژل

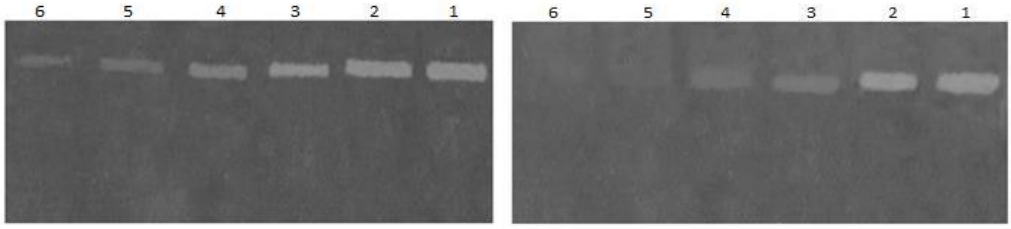
در ژل زایموگرام، برای آنزیم در ترکیب با زیرنهشت و بدون استفاده از مهارکننده تنها یک باند مشاهده شد. در بالاترین غلظت از عصاره‌های پروتئینی در لاروهای سن پنجم، باند آمیلازی ناپدید شد و در لاروهای سن چهارم، وضوح باند کم شد (اشکال ۴، ۵ و ۶). با کاهش غلظت مهارکننده‌ها وضوح باندها افزایش یافت.



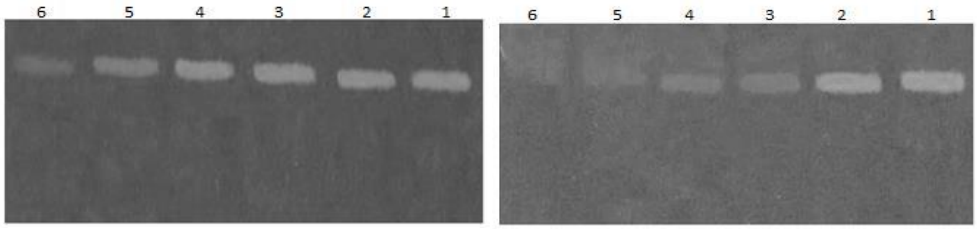
شکل۲- مقایسه میانگین اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی لارو سنین چهارم و پنجم شب پره ی مدیترانه‌ای آرد (الف: رقم سرداری؛ ب: رقم سیوند؛ ج: تریتیکاله) (حروف مشترک در هر سن لاروی نشان‌دهنده‌ی نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است).



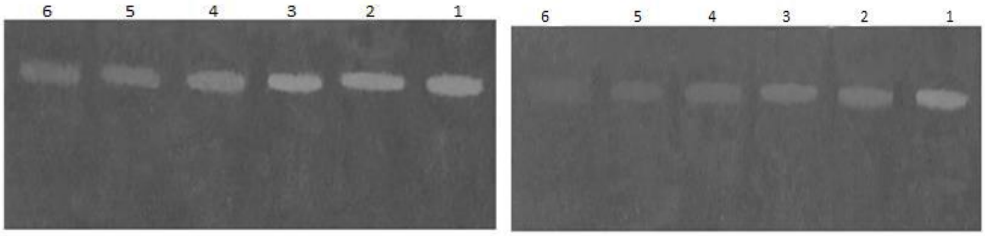
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر اسیدیته روی میزان مهار آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی لارو سن پنج شب پره ی مدیترانه‌ای آرد توسط عصاره‌ی پروتئینی گندم رقم سرداری (الف)، سیوند (ب) و تریتیکاله (ج). (حروف مشترک نشان دهنده‌ی نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است).



شکل ۴- زایموگرام اثر مهارکنندگی وابسته به غلظت عصاره‌ی پروتئینی گندم رقم سیوند روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی لارو سن پنجم (سمت راست) و چهارم (سمت چپ) شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد. ستون۱: شاهد، ستون۲: غلظت ۰/۸۱۲ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر، ستون ۳: غلظت ۱/۶۲ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر ، ستون ۴: غلظت ۳/۲۵ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر ، ستون ۵: غلظت ۶/۵ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر ، ستون ۶: غلظت ۱۳ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر.



شکل ۵- زایموگرام اثر مهارکنندگی وابسته به غلظت عصاره‌ی پروتئینی گندم رقم سرداری روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی لارو سن پنجم (سمت راست) و چهارم (سمت چپ) شب پره ی مدیترانه‌ای آرد. ستون۱: شاهد، ستون۲: غلظت ۰/۸۱۲ میکروگرم پروتئین، ستون ۳: غلظت ۱/۶۲ میکروگرم پروتئین، ستون ۴: غلظت ۳/۲۵ میکروگرم پروتئین، ستون ۵: غلظت ۶/۵ میکروگرم پروتئین، ستون ۶: غلظت ۱۳ میکروگرم پروتئین.



شکل ۶- زایموگرام اثر مهارکنندگی وابسته به غلظت مختلف عصاره‌ی پروتئینی رقم تریتیکاله روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی لارو سن پنجم (سمت راست) و چهارم (سمت چپ) شب پره ی مدیترانه‌ای آرد. ستون۱: شاهد، ستون۲: غلظت ۱ میکروگرم پروتئین، ستون ۳: غلظت ۲ میکروگرم پروتئین، ستون ۴: غلظت ۴ میکروگرم پروتئین، ستون ۵: غلظت ۸ میکروگرم پروتئین، ستون ۶: غلظت ۱۶ میکروگرم پروتئین.

بحث

طبق نتایج، فرآیند مهار فعالیت آمیلولیتیک وابسته به غلظت مهارکننده بود. مطالعات متعددی روی مهار شدن فعالیت آنزیم آمیلاز توسط حبوبات و غلات انجام گرفته و روند مهار فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز به صورت وابسته به غلظت گزارش شده است که موافق نتایج به دست آمده در این بررسی است (دسترنج و بندانی ۲۰۱۲، دسترنج و همکاران ۲۰۱۳، مجیدیانی و همکاران ۲۰۱۵). کوکیلادوی و

همکاران (۲۰۰۵) با مطالعه روی چند گونه حبوبات از جنس *Vigna* دریافتند که گونه‌های مختلف به کار برده شده، مهارکنندگی متفاوتی روی سوسک *Callosobruchus analis* (F.) دارند. مهارکننده‌ی حاصل از گونه‌ی *Vigna umbellate* میزان فعالیت آنزیم آمیلاز حشره را به طور کامل (۱۰۰ درصد) مهار کرد در حالی‌که گونه *V. radiate*، ۱۰/۶۵ درصد فعالیت مهارکنندگی روی فعالیت این آنزیم داشت.

مهارکننده‌ها ساختار سوبسترای طبیعی را تقلید کرده و به جای سوبسترا، به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شوند. بنابراین زمانی که ساختارجایگاه فعال آنزیم دچار تغییر شود مهارکننده نیز نمی تواند به این جایگاه متصل شده و روی آنزیم تاثیر بگذارد. یکی از شرایط بسیار تاثیرگذار در کنش بین آمیلاز حشرات و مهارکننده‌های گیاهی شرایط روده‌ی حشره است. میزان pH لوله‌ی گوارش شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد، مانند دیگر بال پولک‌داران، قلیایی است و آنزیم آلفا-آمیلاز این پروانه هم در بازه‌ی قلیایی بیشترین فعالیت را نشان داد. بنابراین مهارکننده‌ای که در این pH بیشترین مهار را دارد، می‌تواند با وجود غلظت مناسب در فضای داخلی معده‌ی حشره، آمیلاز را کنترل کند (دسترنج و همکاران ۲۰۱۳، مجیدیانی و همکاران ۲۰۱۵). پروتئین‌های بازدارنده آلفا - آمیلاز در تمام سلسله‌ی گیاهی یافت می‌شوند، به ویژه بذرهای حبوبات دارای مقدار فراوانی از این پروتئین‌ها می‌باشند. دانه‌های گندم *Triticum aestivum* L. نیز دارای بازدارنده آلفا - آمیلاز می‌باشد، که این بازدارنده در برابر آلفا - آمیلاز حشرات آفتی که از دانه‌های گندم یا سایر غلات تغذیه می‌کنند اثر بازدارندگی دارند (مجیدیانی و همکاران ۲۰۱۵، اسمعیلی و بندانی ۱۳۹۵).

نتایج این تحقیق با داده‌ها و نتایج موجود در مقالات دیگر نشان می‌دهند که پروتئین‌های دفاعی گیاهان می‌توانند به‌صورت بازدارنده‌های آنزیمی با قدرت در کنترل حشرات آفت مورد استفاده قرارگیرند. گیت هاوس و همکاران (۱۹۷۹) 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 (یوسف ۱۹۹۹). 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 (سیلوا ۲۰۰۱). از آن زمان تاکنون تلاش‌های گوناگونی صورت گرفته تا از ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های سمی علیه حشرات استفاده شود. وقتی ژن بازدارنده‌ی آلفا - آمیلاز موجود در لوبیای معمولی به گیاه نخود منتقل شد، مقاومت گیاه نخود به سوسک *Bruchus pisorum* را ایجاد کرد (سیلوا ۲۰۰۱). بنابراین با توجه به بررسی‌های صورت گرفته از منابع مختلف و هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از این تحقیق می‌توان عنوان کرد که ارقام مختلف گندم سرشار از بازدارنده‌ی آلفا - آمیلاز مقاوم در برابر آفات انباری می‌باشند که با استفاده از علم مهندسی ژنتیک می‌توان با انتقال این بازدارنده به گیاهان، مقاومت آن را در برابر حشرات آفت بالا برد.

سپاسگزاری

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

منابع

اسمعیلی، م. و بندانی، ع. ۱۳۹۵. اثر عصاره پروتئینی تریتیکاله روی فعالیت آلفا آمیلاز گوارشی شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae) . تحقیقات آفات گیاهی. شماره دو. صفحه‌های ۱۲-۱.

عبدالاحدی ف.، کزاری م. نجفی میرک و. ۱۳۹۵. مهار آلفا- آمیلاز گوارشی سن‌معمولی‌گندم *Eurygaster integriceps* توسط بازدارنده‌های آنزیمی رقم‌های گندم اروند، بهرنگ و هیرمند. فنآوری زیستی در کشاورزی. جلد پانزدهم.شمارهٔ یک . صفحه‌های ۴۲-۳۵.

Bandani AR, Kazzazi M and Mehrabadi M, 2009. Purification and characterization of midgut α-amylases of *Eurygaster integriceps*. Entomological Science 12: 25–32.

Bernfeld P, 1955. Amylases, alpha and beta. Methods in Enzymology 1: 149-158.

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Dastranj M and Bandani AR, 2012. Effect of proteinaceous extract of triticale seed extract on α-amylase activity of *Helicoverpa armigera*. Plant Pests Research 2: 49–57.

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

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR and Grossi De Sa MF, 2002. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases. European Journal of Biochemistry 269: 397-412.

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

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 thermo inactivation. Enzyme and Microbial Technology 33: 179-184.

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

Kokiladevi E, Manickam A and Thayumanavan B. 2005. Characterization of alpha-amylase inhibitor in *Vigna sublobata*. Botanical Bulletin of Academia Sinica 46: 189-196.

Kumari B, Sharma P and Nath AK, 2012. Alpha-amylase inhibitor in local Himalyan collections of *Colocasia*: isolation, purification, characterization and selectivity towards α-amylases from various sources. Pesticide Biochemistry and Physiology 103: 49–55.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lovei GL and Arpaia S, 2005. The impact of transgenic plants on natural enemies a critical review of laboratory studies. The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata 114: 1-14.

Majidiani S, Farshbaf Pourabad R and Bandani AR, 2015. Inhibitory effect of proteinaceous extracts of wheat seeds against gut α-amylase activity of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lep.: Noctuidea). Archives of Phytopathology and Plant Protection 48 (2): 171-180.

Mehrabadi M, Franco OL and Bandani AR, 2012. Plant proteinaceous α-amylase and proteinase inhibitors and their use in insect pest control. New Perspectives in Plant Protection 11: 229-246.

Pytelková J, Hubert J, Lepšík M, Šobotník J, Šindelka R, Křížková I, Horn M and Mareš M, 2009. Digestive α-amylases of the flour moth *Ephestia kuehniella* adaptation to alkaline environment and plant inhibitors. FEBS Journal 276: 3531-3546.

Silva CP, Terra WR, Samuels RI, Isejima EM, Bifano TD and Almeida JS, 2001. Induction of digestive α-amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α-amylase inhibitor. Journal of Insect Physiology 47: 1283-1290

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-Jiménez A, Arboleda Valencia JW and Grossi De Sa MF, 2008. Activity of α-amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive α-amylases of the coffee berryborer. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 2315-2320.

Yildirim A, Mavi A and Kara A, 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 4083-4089.

Some Biochemical Characters of Gut α-amylases of *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) and Inhibitory Effects of Three Proteinaceous Extracts on Their Activities

A Moghadam Monaghi[1], R Farshbaf Pourabad[2*] and S Majidiani[3]

[1]Former MSc. Student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Aagriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[3]Ph.D. Student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding author: rfpourabad@tabrizu.ac.ir

Received: 6 November 2018 Accepted:20 January 2019

Abstract

Anagasta kuehniella Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) causes the quality loss of the bread by feeding on flour. Disruption in insect's digestive enzymes through transgenic plants, expressing enzyme inhibitors, is a methods of pest control. So, the aim of the current study was to investigate the inhibitory effects of proteinaceous extracts of two varieties of wheat (Sivand, Sardari) and Triticale against activity of digestive α-amylase of fourth (L4) and fifth (L5) instars larvae of *A.kuehniella*. Ammonium sulfate (70%) was used to extract proteins from seeds. The optimal temperature and pH of α-amylase activity was found 40°C and 10, respectively. The results showed that the highest dose of proteinaceous extracts of Sivand and Sardari (13 µg ml^{-1} protein) and Triticale (16 µg ml^{-1} protein) reduced the enzyme activity, 73.08%, 71.07% and 65.88% of L5 and 58.16%, 42.14% and 50.25% of L4, respectively. The lowest dose of proteinaceous extracts of Sivand and Sardari (0.812 µg ml^{-1} protein) and Triticale (1 µg ml^{-1} protein) inhibited the enzyme activity, 19.93%, 17.8% and 25.26% of L5 and 11.78%, 12.81% and 10.09% of L4, respectively. In the gel electrophoresis of enzyme without usage of inhibitors, one band was observed. At the highest dose of extracts, in the L5, amylase band disappeared and in the L4, waned band clearly. Band resolution was increased by reducing inhibitor dose. It was concluded that Sivand, Sardari and Triticale proteinaceous extracts can be used for management of *A.kuehniella*.

Keywords: α-amylase; *Anagasta kuehniella;* Enzyme Inhibitors; Proteinaceous Extract.