تاثیر مهارکننده‌های پروتئینی استخراج شده از دانه‌های ماش، نخود و گندم بر فعالیت آلفا– آمیلاز روده‌ای لاروهای سفیده‌ی بزرگ کلم *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae)

مجتبی اسمعیلی[۱] و علیرضا بندانی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.

۲- استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.

* مسئول مکاتبه: abandani@ut.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۳/۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۵

چکیده

سفیده‌ی بزرگ کلم با نام علمی *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae) یک آفت مخرب همه‌جایی و گسترده‌ی چلیپاییان است. در این تحقیق، تاثیر عصاره‌های پروتئینی استخراج شده از دانه‌های ماش، نخود و دو رقم گندم شامل کویر و البرز بر فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم بررسی شد. عصاره‌ی پروتئینی ارقام ذکر شده با استفاده از محلول ۰/۱ مولار NaCl استخراج گردید. نتایج به دست آمده نشان دادند که تاثیر عصاره‌های استخراج شده بر فعالیت آلفا-آمیلاز وابسته به دز بود، به طوری که با افزایش دز مصرفی عصاره‌ها درصد مهار آنزیم نیز بیشتر شد. همچنین، در بالاترین غلظت عصاره‌های ماش، نخود و ارقام البرز و کویر گندم (به ترتیب ۱/٦٤، ۲، ۱ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، فعالیت آنزیم به ترتیب به میزان ١٦، ٤، ٥١ و ٥٥ درصد مهار شد. به علاوه تاثیرpHروی مهار آنزیم به وسیله‌ی پروتئین‌های ارقام گندم نشان داد که بیشترین مهارکنندگی در pH =۸ رخ می‌دهد که pH بهینه فعالیت آنزیم در شرایط آزمایشگاهی است. نتایج نشان دادند که pH روی مهار آلفا-آمیلاز این حشره توسط عصاره‌ی بذور گندم تاثیر معنی‌داری داشت. طبق نتایج، عصاره‌ی استخراجی از بذور ارقام گندم نسبت به عصاره‌ی استخراج شده از نخود و ماش روی مهار این آنزیم در لاروهای سفیده‌ی بزرگ کلم تاثیر بیشتری داشت. بنابراین، پروتئین‌های موجود در ارقام گندم جهت شناسایی ساختمان و بررسی اختصاصی بودن آن‌ها برای آنزیم آلفا-آمیلاز آفات مختلف از پتانسیل خوبی برخوردار می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم گوارشی، عصاره‌های پروتئینی، مهارکنندگی.

مقدمه

سفیده‌ی بزرگ کلم با نام علمی *Pieris brassicae* Linnaeus (Lep.: Pieridae) یک آفت مخرب همه‌جایی و گسترده‌ی چلیپاییان است (انصاری و همکاران، ۲۰۱۲). این آفت به همه مراحل رویشی و گل‌دهی میزبان حمله می‌کند به طوری که فراوانی بالای آن می‌تواند باعث تخریب برگ‌ها و یا به طور کامل باعث از بین رفتن گیاه شود (سیراج ۱۹۹۹، لال و رام ۲۰۰٤ و حسن ۲۰۰۸). لاروهای سنین اول سفیده‌ی بزرگ کلم رفتاری تجمعی نشان داده و خسارت جدی به میزبان وارد می‌کنند (هیل ۱۹۸۷). علاوه بر کلم، این آفت از گیاهان پنج تیره گیاهی شامل Tropaeolaceae، Capparaceae، Brassicaceae، Resedaceae و Papilinoaceae نیز تغذیه می‌کند (فلتول ۱۹۸۲). روش‌های کنترل زیستی و شیمیایی دو روش اصلی کاهش جمعیت و خسارت این آفت در محصولات

زراعی هستند (بابو و همکاران ۲۰۰۳). اثرات منفی آفت کش‌های شیمیایی موجب شده‌اند که روش‌های جایگزین جهت کنترل آفات مد نظر قرار گیرند (ایسمان ۲۰۰۶).

گیاهان در طی تکامل، راهبردهای مختلفی را برای کسب رشد مطلوب که ضامن بقای آن‌ها باشد، توسعه داده‌اند. به عنوان مثال، افزایش سازوکارهای حفاظتی یکی از این راهبردها است که اجازه می‌دهد تا آنها در برابر میکروارگانیسم‌های بیمارگر گیاهی و شرایط نامطلوب دیگر، تحمل خوب و موفقیت‌آمیزی داشته باشند (مالک و دیتریچ ۱۹۹۹). در سال‌های اخیر، تحقیقات گسترده‌ای در مورد ترکیبات و یا ژن‌های به دست آمده از میکروب‌ها و گیاهان انجام شده است. از این طریق می‌توان روش جایگزین مناسبی را برای کنترل آفات پیدا نمود. بنابراین، ترکیباتی مانند مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی (مانند آمیلازها و پروتئازها)، لکتین‌های[1] به دست‌آمده از گیاهان و قارچ‌ها و نیز دلتا-آندوتوکسین باکتریBt برای استفاده در کنترل آفات از پتانسیل خوبی برخوردار می‌باشند (فرانکوو همکاران ۲۰۰۲). استفاده از راهبرد مقاومت گیاهان به حشرات برای کاهش خسارت آفات، از لحاظ اقتصادی می‌تواند یک روش مطلوب باشد. بنابراین، استفاده از این روش می‌تواند در کاهش اتکا به حشره‌کش‌ها بسیار موثر باشد. شایان ذکر است که در سال‌های اخیر به کاربرد مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات که نشو و نمای آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند، توجه زیادی شده است (مهرآبادی و همکاران ۲۰۱۲). در گیاهانی مانند لوبیای معمولی، گندم و تاج خروس مهارکننده‌های مناسبی یافت شده‌اند که در برابر آلفا-آمیلازهای برخی از حشرات و پستانداران فعال بوده اند (فرانکو و همکاران ۲۰۰۲، تیتارنکو و کریسپیلس ۲۰۰۰). همچنین، بذرهای غلات و حبوبات منابع غنی مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی می‌باشند (فرانکو و همکاران ۲۰۰۲). تاکنون تلاش‌های گسترده‌ای صورت گرفته تا بتوان ژن‌های پروتیئن‌های مهارکننده آنزیم‌های گوارشی را شناسایی کرده و از این ژن‌ها با استفاده از علم بیوتکنولوژی در جهت مدیریت آفات گیاهخوار استفاده کرد . برای مثال، وقتی ژن بازدارنده‌ی آلفا-آمیلاز موجود در لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به گیاه نخود فرنگی منتقل شد، آن را به سوسک نخود فرنگی(*Bruchus pisorum*) مقاوم نمود (مورتون و همکاران ۲۰۰۰ و سیلوا و همکاران ۲۰۰۱). همچنین، لوبیای آزوکی (*Vigna angularis*)وقتی ژن مهارکننده‌آلفا-آمیلاز را از لوبیای معمولی دریافت کرد، نسبت به سوسک چینی (*Callosobruchus chinensis*) و سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus*) مقاومت پیدا کرد (ایشیموتو و همکاران ۱۹۹۶). هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر مهارکننده‌های پروتئینی استخراج شده از بذر گندم و حبوبات روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز روده‌ای لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم و نیز تاثیر اسیدیته بر فعالیت این آنزیم و مهارکننده‌های استخراجی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

تخم‌های سفیده‌ی بزرگ کلم در شهریور ماه ۱۳۹۲ از یک مزرعه‌ی کلم در شهرستان ارومیه جمع‌آوری شدند. لاروها روی برگ‌های کلم پیچ در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۱± ۲۷درجه‌ی سلسیوس، دوره‌ی نوری ۱۸:۶ (روشنایی: تاریکی) ساعت و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد) پرورش داده شدند.

[1]Lectins

جداسازی روده میانی

برای جداسازی لوله گوارش از روش حیدروش (۱۳۹۲) استفاده شد، بدین صورت که ابتدا لاروهای سن پنجم روی یخ بی‌حس شدند. سپس، ابتدا و انتهای بدن لارو را با دو پنس گرفته ودردو جهت مخالف کشیده شد تا لوله گوارش از داخل بدن خارج شود. تعداد۱۲عدد روده‌ی میانی حشره درداخل میکروتیوب‌های۱/۵ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر سرد(دمای چهار درجه‌ی سلسیوس) قرارداده شدند.

تهیه محلول آنزیمی

محلول آنزیمی طبق روش کزازی و همکاران (۲۰۰۵) با اندکی تغییر تهیه شد، به این صورت که روده‌های میانی موجود در درون میکروتیوب با استفاده از هموژنایزر دستی بر روی یخ همگن شدند. سپس، نمونه-هابا استفاده از یک سانتریفیوژ یخچال‌دار (Universal 32 R) دردمای چهاردرجه‌ی سلسیوس و با سرعت g ۱۳۰۰۰به مدت۲۰دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از جدا کردن لایه چربی سطحی، بخش رونشین (سوپرناتانت) محلول جداوبه عنوان منبع آنزیم دردمای۲۰-درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

استخراج مهارکننده‌ها از بذور

مهارکننده‌های پروتئینی طبق روش بیکر (۱۹۸۳)، ملو و همکاران (۱۹۹۹) و سعادتی وهمکاران (۲۰۱۱)بااندکی تغییر استخراج شدند. برای استخراج مهارکننده‌ها از بذر-های ماش، نخود، و گندم‌های ارقام کویر و البرز استفاده شد. ابتدا ۳۰ گرم از بذور وزن و سپس کوبیده شدند و به صورت پودر درآمدند. برای استخراج پروتئین‌ها از ۱۰۰میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم با غلظت ۰/۱ مولار استفاده گردید. پس از اضافه کردن محلول کلرید سدیم به هرکدام از نمونه‌ها، هر یک به وسیله‌ی همزن برقی به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط شدند. برای جداسازی پروتئین‌ها از بقیه‌ی اجزای بذر، مخلوط حاصل دردمای چهار درجه‌ی سلسیوس و با سرعت g ۸۰۰۰ به مدت۳۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس برای جداسازی پروتئین‌ها از سولفات آمونیوم با غلظت ۷۰ درصد استفاده گردید. برای رسوب پروتئین‌ها از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Universal 32 R) در دمای چهار درجه‌ی استفاده گردید. پروتئین‌های رسوب داده شده با بافر Tris-HCl (۰/۲ مولار با اسیدیته ۸) برداشته و به مدت ۲۰ ساعت در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس دیالیز شدند. برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌های بذرزاد، رسوب پروتئینی برداشته شده در دمای ۷۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. سپس برای جداسازی رسوبات از محلول پروتئینی، در دمای ٤ درجه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت g۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در نهایت، سوپرناتانت (محلول روشناور) به عنوان محلول پروتئینی حاوی مهارکننده در دمای ۲۰-درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم

به منظور سنجش فعالیت نسبی آلفا-آمیلاز، از روش برنفلد (۱۹۵۵) و بندانی و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی تغییر، و از نشاسته یک درصد که با آب مقطر رقیق شده بود، به عنوان سوبسترا استفاده شد.

بررسی تاثیر pH بر فعالیت نسبی آلفا-آمیلاز

به منظور سنجش اثر pH های مختلف بر فعالیت آلفا-آمیلاز، از روش بندانی و همکاران (۲۰۰۵) و کزازی و همکاران (۲۰۰۵) با اندکی تغییر استفاده شد. بدین منظور، از بافر یونیورسال شامل Mes-[morpholino] (ethansulphonic acid, Glycin, Succinat) با pH های ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ استفاده گردید، به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۲۰ میکرولیتر نشاسته یک

درصد و ۷۰ میکرولیتر بافر با pH مورد نظر مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. سپس، ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن مخلوط، ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در داخل چاهک‌های پلیت ریخته شد و میزان جذب با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (مدل ELX 808) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

بررسی تاثیرمهارکننده‌های پروتئینی بر فعالیت آلفا-آمیلاز

بررسی اثر عصاره‌های پروتئینی مورد نظر روی فعالیت آلفا-آمیلاز بر اساس روش‌های بیکر (۱۹۸۷) و مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. بدین منظور، از غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین مهارکننده ارقام گندم، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین مهارکننده نخود و ۱/۶۴، ۰/۸۲، ۰/۴۱، ۰/۲۰۵ و ۰/۱۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین مهارکننده ماش استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های مهارکننده‌ها با۱۰میکرولیتر عصاره آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد .سپس، نشاسته یک درصد به عنوان سوبسترا به آن اضافه و واکنش در محیط بافری تریس ۰/۰۲ مولار و pH=۸ در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس انجام شد. در مرحله‌ی بعد، ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسیدبه مخلوط اضافه و به مدت۱۰دقیقه در آبجوش قرار داده شد.پس ازسردشدن، میزان جذب ۲۰۰ میکرولیتر ازنمونه توسطدستگاه الایزاریدر (ELX 808) در طول موج ۵۴۰ نانومترخوانده شد. در این آزمایش، هر کدام از تیمارها شامل سه تکرار و یک بلانک بودند. تیمار شاهد، فاقد مهارکننده بود و به جای آن از آب مقطر استفاده شد. بلانک‌های هر کدام از تیمارها نیز فاقد آنزیم بودند و به جای آن از آب مقطر استفاده گردید. فرمول محاسبه درصد مهارکنندگی به صورت زیر می‌باشد (در این رابطه منظور ازI میزان مهار، A میزان جذب، Control جذب در شاهد و Exp جذب در تیمار می‌باشد) (مهرآبادی و همکاران ۲۰۱۱):

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

بررسی تاثیر pH بر بازدارندگی مهارکننده‌های پروتئینی

برای سنجش تأثیر pH های مختلف بر فعالیت مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی، از غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مهارکننده‌های دارای بیشترین درصد مهارکنندگی (مهارکننده‌های استخراجی از گندم) و بافر یونیورسال با pHهای ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ استفاده شد. میزان مهار شدن فعالیت آلفا-آمیلاز پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱۰ میکرولیتر از هر عصاره پروتئینی با تعیین میزان جذب نمونه‌ها توسطدستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۴۰ نانومترمحاسبه گردید. نمونه شاهد هر pHتنها حاوی عصاره آنزیمی بود و مهارکننده به آن افزوده نشد.

سنجش مقدار پروتئین نمونه‌ها

به منظور تعیین مقدار پروتئین مهارکننده‌ها،ازروش بردفورد (۱۹۷۶)، وازآلبومین سرم گاو به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. برای این منظور، ابتدا از پروتئین استاندارد پنج غلظت (۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. پس از این مرحله ۱۰ میکرولیتر از هریک از این غلظت‌ها داخل پلیت ریخته و بعد از اضافه کردن ۱۹۰ میکرولیتر معرف بردفورد، جذب نوری

نمونه‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. برای هریک از غلظت‌ها از سه تکرار استفاده شد. پس از آن با رسم نمودار و قرار دادن میزان جذب نمونه‌های مورد نظر در نمودار، مقدار پروتئین آن‌ها تعیین شد.

بررسی‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده ها براساس طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزارSAS انجام شد. گروه‌بندی میانگین‌ها با استفاده ازآزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بررسی شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند و بر اساس آزمون انجام شده، داده‌ها نرمال بودند.

نتایج و بحث

تاثیر pH بر فعالیت نسبی آلفا-آمیلاز

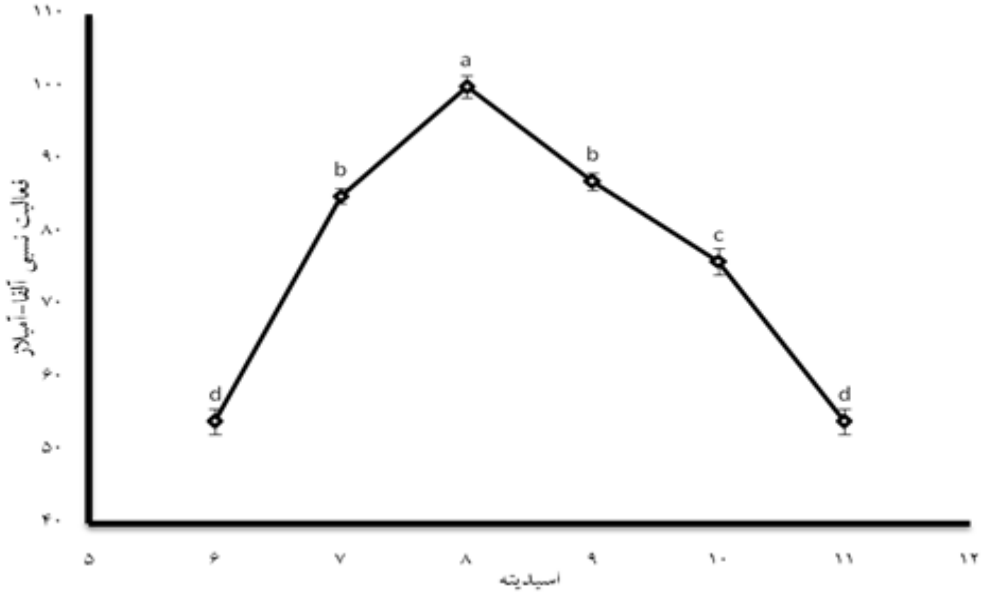
نتایج نشان داد که فعالیت بهینه آلفا-آمیلاز روده‌ی میانی لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم همانند سایر گونه‌های بالپولکداران در محدوده‌ی pH قلیایی بود به طوری که بالاترین میزان فعالیت آنزیم در pH های ۷ تا ۹ مشاهده شد (pH بهینه برابر با هشت) ولی در سایرpH ها فعالیت آنزیم مذکور کم بود (شکل ۱). که با نتایج سایر محققان نیز مطابقت دارد. به طور مثال، pH برابر با ۹ برای فعالیت آلفا-آمیلاز غدد بزاقی کرم گلوگاه انار (برزویی و همکاران، ۲۰۱۳) و pH برابر ۹ برای فعالیت آلفا-آمیلاز روده‌ی میانی شب‌پره *Tecia solanivora* (والنسیا- خیمنز و همکاران ، ۲۰۰۸) گزارش شده است. در واقع، بین pHلوله گوارش حشره و pH بهینه آلفا-آمیلاز آن رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد (ترا و همکاران، ۱۹۹۶). گزارش شده است که pH بالای لوله گوارش در بعضی از حشرات، نوعی سازگاری به رژیم غذایی می‌باشد. برای مثال، درحشراتی که اندام‌های گیاهی میزبان آن‌ها دارای تانن زیادی می‌باشند، تانن‌ها در pH های پایین دستگاه گوارش به پروتئین‌های سلول‌های اپیتلیومی لوله گوارش متصل می‌شوند که در نتیجه، کارایی گوارش در حشره پایین می‌آید (دا، ۱۹۸۶).

تاثیر مهارکننده‌های پروتئینی گندم بر فعالیت آلفا-آمیلاز

سنجش فعالیت آلفا-آمیلاز د ر حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ها، روند مهارکنندگی وابسته به غلظت را نشان داد. هنگامی که اثر عصاره پروتئینیدانه‌ها روی فعالیت آنزیم بررسی شد، بالاترین غلظت هریک از مهارکننده‌های ارقام کویر و البرز گندم (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب باعث ۵۱ و ۵۵ درصد مهار فعالیت آن شدند ولی در کمترین غلظت‌های استفاده شده (۰/۰۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) فعالیت آلفا-آمیلاز ۱۸ و ۱۹ درصد مهار شد (شکل ۲). نتایج به دست آمده نشان دادند که مهارکننده‌های گندم بر فعالیت آلفا-آمیلاز روده‌ای لاروهای سفیده‌ی بزرگ کلم تاثیر قابل توجهی داشته‌اند.

مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰)نشان دادند که مهارکننده استخراج شده از تریتیکاله روی فعالیت آلفا-آمیلاز بزاقی سن گندم اثر وابسته به غلظت داشت. به علاوه، آن‌هاگزارش کردندکه در بالاترین غلظت استفاده شده و درpH بهینه فعالیت آنزیم مذکور به میزان ۸۷ درصد مهار شد. همچنین،دسترنج و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر مهارکننده‌های لوبیا و ارقام مختلف گندم (سیوند، سیمون، افلاک، زارع و MV17) بر روی فعالیت آنزیم-های گوارشی سنین مختلف لاروی و حشرات کاملسوسک زرد آرد (Col. : *Tenebrio molitor* (Tnebrionidae بررسی کرده و نشان دادند که مهارکننده‌های استخراج شده از لوبیا و رقم MV17 گندم باعث بیشترین مهار (به ترتیب ۷۰/۹ و۵۸/۳ در صد

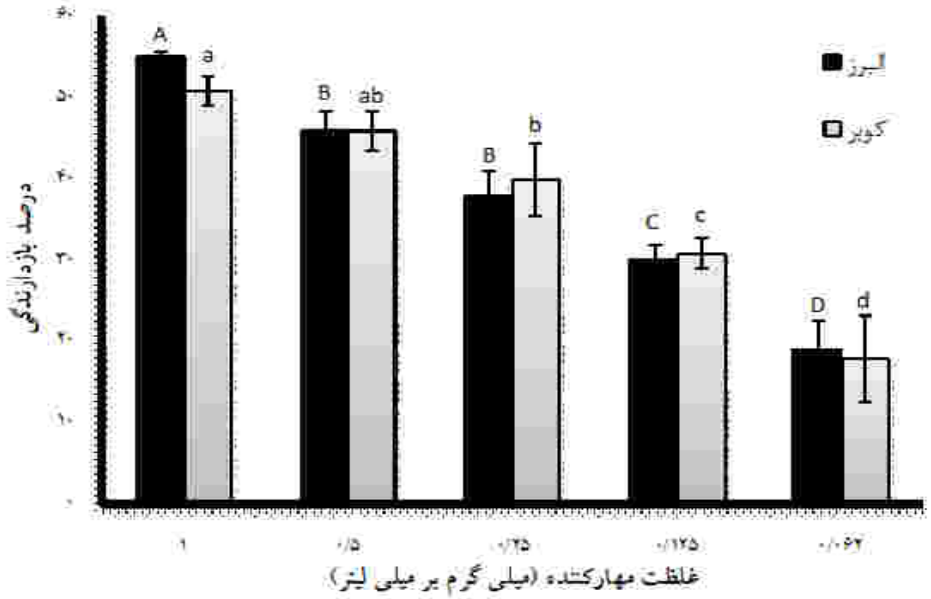
مهار) آلفا-آمیلاز شدند. نتایج آن‌ها نیز وابستگی تاثیر مهارکننده‌ها به غلظت را نشان داد.



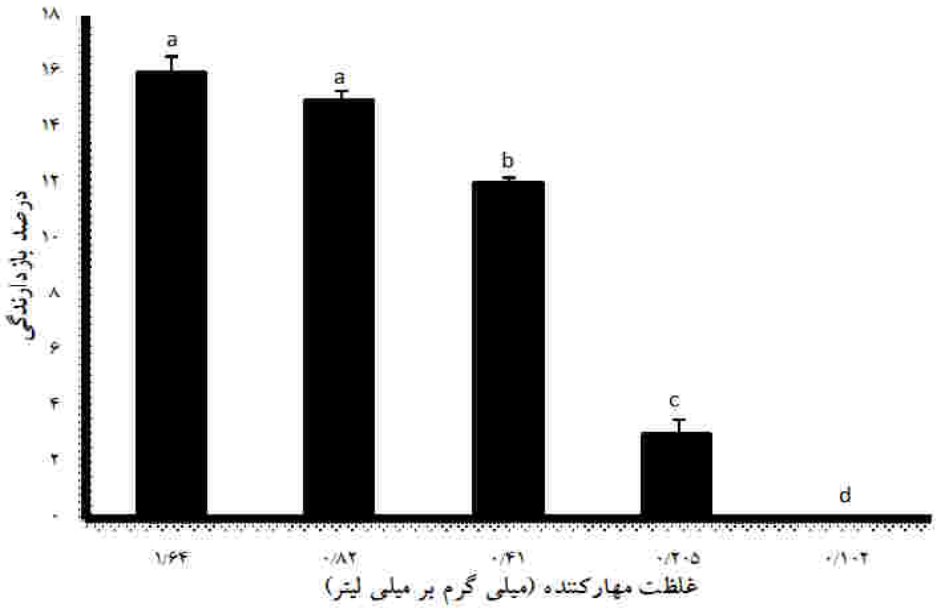
شکل ۱- تاثیر pH بر میزان فعالیت نسبی آلفا-آمیلاز روده‌ی میانی لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم *P.brassicae* (دمای ۳۵ درجه-ی سلسیوس). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشند).

تاثیر مهارکننده‌های پروتئینی ماش و نخود بر فعالیت آلفا-آمیلازی

در این بررسی، نتایج به دست آمده در زمینه‌ی تاثیر مهارکننده‌های گندم بر آنزیم مذکور متفاوت بودند، به-طوریکه در بالاترین غلظت استفاده شده از مهارکننده‌های ماش و نخود (به ترتیب ۱/٦٤ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، فعالیت آنزیم به ترتیب به میزان ١٦ و ٤ درصد مهار شد. همچنین، کمترین غلظت مهارکننده نخود (۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، فعالیت آنزیم را به میزان یک درصد مهار کرد. مهارکننده‌ی ماش در کمترین غلظت مورد استفاده (۰/۱۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) هیچ تاثیری بر آنزیم نداشت. در مورد این مهارکننده‌ها نیز تقریبا روند وابسته بودن تاثیر مهارکننده‌ها به غلظت نشان داده شد (شکل ۳). با توجه به میزان تاثیر مهارکننده‌های ماش، نخود و ارقام گندم بر فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سفیده‌ی بزرگ کلم چنین استباط می‌شود که بر خلاف مهارکننده‌های گندم، مهارکننده‌های ماش و نخود بر آلفا-آمیلازهای فعال در pH قلیایی تاثیر معنی‌داری ندارند و مهارکننده‌های اخیر برای مهار این آنزیم در شرایط حاضر گزینه‌ی مناسبی نیستند. این نظریه با نتایج والنسیا- خیمنز و همکاران (۲۰۰۸)، یعنی مهار ۷۰ و ۸۷ درصدی آلفا-آمیلاز روده‌ی میانی شب‌پره *Tecia solanivora* درpH برابر شش توسط مهارکننده‌های دو رقم لوبیا ولی تاثیر کمتر آن‌ها در pH بهینه این آنزیم یعنی pH قلیایی، همخوانی دارد.



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌های استخراج شده از ارقام گندم (البرز و کویر) بر فعالیت نسبی آلفا-آمیلاز روده‌ی میانی لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم *P.brassicae* (دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس و pH برابر هشت). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشند.



شکل۳- تاثیر غلظت‌های مختلف مهارکننده استخراج شده از ماش بر فعالیت نسبی آلفا-آمیلاز روده‌ی میانی لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم *P.brassicae* (دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس و pH برابرهشت). حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشند.

تاثیر pH بر میزان بازدارندگی مهارکننده‌های پروتئینی

در این بررسی، تاثیر pH بر کارایی مهارکننده‌های پروتئینی استخراج شده از ارقام کویر و البرز گندم که سبب بیشترین مهار آنزیم شدند، مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور از بالاترین غلظت (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مهارکننده‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین مهار آلفا-آمیلاز درpH برابر هشت که pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم مذکور نیز بود، انجام شد. میزان مهار آلفا-آمیلاز در این pH توسط مهارکننده‌های ارقام کویر و البرز به ترتیب ۵۱ و ۵۵ درصد بود،ولی در سایر pH ها میزان مهار آنزیم کاهش یافت (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهند که pH بر میزان مهارکنندگی عصاره‌های استخراجی تاثیر معنی‌داری داشته است.

هنگامی که آنزیم در pHهای غیربهینه قرار می‌گیرد، ساختار پروتئینی آن واسرشته و در نتیجه، جایگاه فعال آن دگرگون می‌شود. از طرف دیگر، اغلب مهارکننده‌ها ساختار سوبسترای طبیعی آنزیم را تقلید می‌کنند و به جای سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شوند. بنابراین،هنگامی که جایگاه فعال آنزیم دچار تغییر می-شود، مهارکننده نیز نمی‌تواند به این جایگاه متصل شود و روی آنزیم تاثیر بگذارد. لذا با توجه به این موضوع، مهارکننده‌های گندم تا زمانی که آنزیم دچار تغییر نشده باشد،آنزیم را به میزان قابل توجهی مهار خواهند کرد. با کاهش و افزایش pH از یک حد معین به دلیل اینکه ساختار آنزیم دچار تغییر می‌گردد، از فعالیت آن نیز کاسته می‌شود.

همچنین پایداری مهارکننده‌ها در pH یک معیار مهم در انتخاب مهارکننده برای کنترل آفات است (هارسولکار و همکاران ۱۹۹۹). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی تاثیر pH بر میزان مهار آنزیم به وسیله مهارکننده‌ها که بیشترین درصد مهار آنزیم در مورد مهارکننده‌های ارقام گندم در pH=۸ بود و به دلیل این که pH بهینه آمیلازی و همچنین pH کانال گوارشی این حشره قلیایی است، این مهارکننده‌ها گزینه‌های مناسبی برای مهار آلفا-آمیلاز آن در نظر گرفته می شوند.

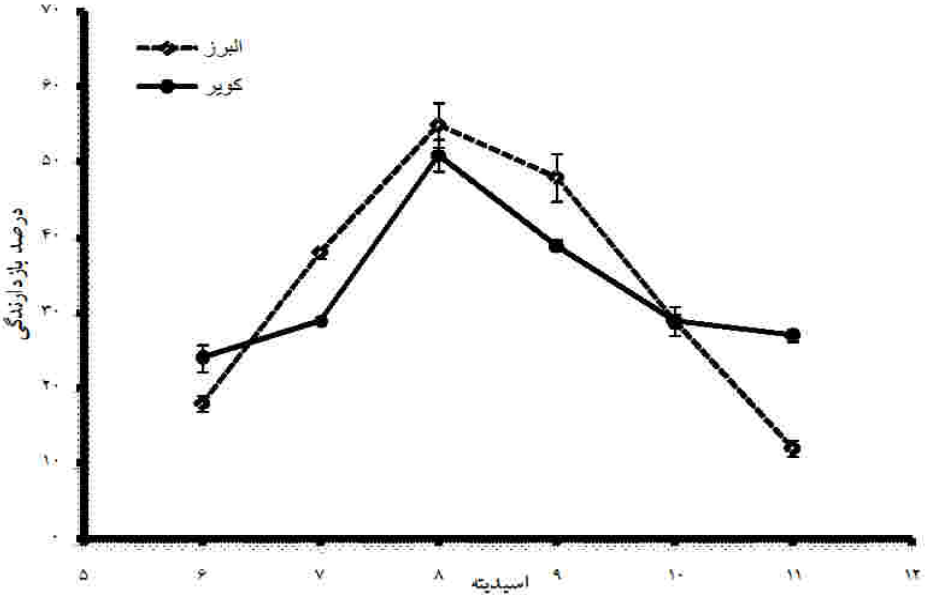
در گزارش‌های متعدد، وابستگی میزان مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی گیاهی به pH روی فعالیت آلفا-آمیلازدیده می‌شود. برای مثال، مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که شدت مهار آلفا- آمیلاز گوارشی سن گندم توسط مهارکننده‌ی تریتیکاله در pH های مختلف تغییر نمود. همچنین، مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۲) اثر pH را بر میزان مهارکنندگی آلفا-آمیلاز بزاقی سن گندم به وسیله‌ی عصاره‌ی پروتئینی استخراج شده از تریتیکاله بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان دادکه بیشترین مهار آنزیم درpH=۵ مشاهده شد که pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم بود. همچنین مجیدیانی و همکاران (۲۰۱٤) تاثیر pH را بر فعالیت بازدارندگی مهارکننده‌ی پروتئینی لوبیا علیه آلفا- آمیلاز کرم غوزه‌ی پنبه بررسی کرده و نشان دادند که بیشترین میزان مهارکنندگی در pH=۹ که pH بهینه‌ی فعالیت این آنزیم است، به دست آمد.

بر اساس نتایج به دست آمده، از بین مهارکننده‌های استفاده شده در این تحقیق، پروتئین‌های موجود در ارقام گندم بر خلاف پروتئین‌های موجود در حبوبات روی فعالیت آلفا- آمیلاز این حشره تاثیر بهتری داشتند. در بین مهارکننده‌های دو رقم گندم نیز میزان متفاوتی از مهار آنزیم مشاهده شد و مهارکننده‌ی رقم البرز مهار بیشتری را ایجاد کرد، ولی مهارکننده‌ی کویر نیز به طور قابل توجهی باعث مهار آنزیم در pH بهینه آن شد. همچنین، این مهارکننده‌ها نسبت به مهارکننده‌های نخود و ماش، در غلظت‌های کمتر درصد مهارکنندگی بالاتری

داشتند به طوری که I_{50} (غلظتی از پروتئین که فعالیت آنزیم را به میزان ۵۰ درصد مهار می‌کند) مهارکننده‌های کویر و البرز به ترتیب ۰/۷٤۸ و ۰/٦٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در مقایسه با حبوبات، مهارکننده‌های غلات به دلیل این که در pH بهینه‌ی روده‌ی حشره و همچنین pH بهینه‌ی فعالیت آلفا-آمیلاز می‌توانند آنزیم را به میزان بیشتری مهار کنند، برای مهار، گزینه مناسب‌تری می‌باشند. می‌توان چنین انتظار داشت که در شرایط لومن کانال گوارشی لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم، اگر غلظت مناسبی از مهارکننده‌های ارقام گندم وجود داشته باشد، میزان مهارکنندگی قابل قبولی حاصل شود و نشو و نمای حشره را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، مطالعات بیشتر و شناسایی ژن‌های رمزگذار این مهارکننده‌ها، بیان این ژن‌ها در شرایط آزمایشگاهی و بررسی تاثیر پروتئین‌های تولید شده از این ژن‌ها روی حشره یا حشرات آفت می‌تواند قدم موثری در امر استفاده از این بیومولکول‌ها برای کنترل آفات مختلف باشد.

سپاسگزاری

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



شکل٤- تاثیر pH بر مهارکنندگی غلظت یک میلی گرم بر میلی‌لیتر از مهارکننده‌های استخراجی دو رقم گندم بر آلفا-آمیلاز روده‌ی میانی لاروهای سن پنجم سفیده‌ی بزرگ کلم *P.brassicae* (دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس).

منابع

حیدروش ث، ۱۳۹۲. بررسی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پروتئاز گوارشی شب‌پره مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta*. پایان نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.

Ansari MS, Hasan F and Ahmad N, 2012. Influence of various host plants on the consumption and utilization of food by *Pieris brassicae* (Linn.). Bulletin of Entomological Research 102 (2): 231–237.

Babu MR, Sajeena A, Seetharaman K and Reddy MS, 2003.Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – An overview. Crop Protection 22:107–1086.

Baker JE, 1987. Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. by HPLC and their interaction with partially purified amylase inhibitor from wheat. Insect Biochemistry and Molecular Biology 17:37 – 44.

Bandani AR, 2005. Effect of plant α-amylase inhibitors on sunn pest, *Eurygaster integriceps* Put on.α-amylase activity. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences70(4): 869-873.

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, α and β. Methods in Enzymology,1: 149-158.

Borzoui E, Bandani AR and Goldansaz SH, 2013. Effect of cereal seed proteinaceous extracts on α-amylase and proteinase activity of salivary glands of Carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lep.: pyralidae). Journal of Crop Protection 285-296.

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

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 Entomology16(3), 309-315.

Dow JAT, 1986. Insect midgut function. Advanced Insect Physiology 19, 187-328.

Feltwell J, 1982. Large White Butterfly, the Biology, Biochemistry and Physiology of *Pieris brassicae* (Linn.). The Hague, the Netherlands. Dr. W. Junk Publishers, 535 pp.

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR and Grossi-de-Sa MF, 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.

Harsulkar AM, Giri AP, Patankar AG, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar PK and Deshpande VV, 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. Plant Physiology 121, 497-506.

Hasan F, 2008. Studies on the Bionomics of *Pieris brassicae* (Linn.). M.Sc. Thesis. AMU, Aligarh, India.

Hill DS, 1987.Agricultural Insect Pests of Temperate Regions and their Control.Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Isman MB, 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. Annual Review of Entomology 51, 45–66.

Kazzazi M, Bandani AR and Hosseinkhani S, 2005.Biochemical characterization of α–amylase of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*.Entomological Sciences 8:371 – 377.

Lal MN and Ram B, 2004. Cabbage butterfly, *Pieris brassicae* L.An upcoming menance for Brassicae oilseed crop in Northern India. Cruciferae Newsletter 25:83-86.

Majidiani S, Pour Abad RF and Bandani A, 2014. Effect of protein extracts of three bean varieties against gut α-amylase activity of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep.: Noctuidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection 47, 259-267.

Malek K and Dietrich Ra, 1999. Defence on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? Trends Plant Sience 4, 215-219.

Mehrabadi M, Bandani AR and Saadati F, 2010.Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps* α-amylases by α-amylase inhibitors (T- αAI) from Triticale.Journal of Insect Sciences10.179.

Mehrabadi M, Bandani A, Saadati F and Mahmudvand M, 2011. α-Amylase activity of Stored Products Insects and Its Inhibition by Medicinal Plant Extracts. Journal of Agricultural Science & Technology 13,1173-1182.

Mehrabadi M, Bandani AR, 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.

Melo FR, Sales MP, Silva LS, Franco OL, Bloch JRC and Ary MB, 1999.α-Amylase inhibitors from cowpea seeds. Protein Peptid Letter 6:387 –392.

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

Siraj Q, 1999. Chemical Control and Estimation of Loses Caused by *Pierris brassicae* on Cauliflower (Seed Crop) in Swat.M.Sc. Thesis, NWFP Agriculture University, Peshawar, Pakistan, P. 40.

Tera WR, Ferreira C and Baker JE, 1996. Compartmentalization of digestion. In: Lehane MJ, Billingsley PF, (Eds), Biology of the insect midgut. Chapman and Hall, London, pp, 207-235.

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

Effect of Mung bean, Pea and Wheat Proteinaceous Seed Extracts on Amylase Activity of the *Pieris brassicae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae)

M Esmaeily[1] and AR Bandani[2*]

[1]MSc Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2]Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
*Corresponding author: abandani@ut.ac.ir

Received:27 Jul 2014 Accepted: 24 Feb 2015

Abstract

The Cabbage butterfly, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae), is a cosmopolitan and a destructive cruciferous pest that has been widely distributed. The aim of the current study was to investigate the effect of proteinaceous extracts of mung bean, pea and two wheat cultivars against the *Pieris brassicae* midgut α-amylase. Results showed that effects of obtained extracts on amylolytic activity of *Pieris brassicae* was as a dose dependent manner namely with increasing dose, the amylase activity decreased. Also, the results showed highest dose (1/64, 2, 1 and 1 $mg.ml^{-1}$) of mung bean, cowpea, Alborz, Kavir caused 16, 4, 51, and 55% inhibition of the insect amylase, respectively. Effect of pH on amylase showed that the greatest inhibition of amylase was observed at pH 8 which is the optimum pH for the activity of the enzyme in in-vitro condition. The results revealed that pH had significant effect on inhibition of wheat seed cultivars on this insect α-amylase. It is concluded that extraction obtained from seeds of wheat cultivars affected more α-amylase of the *pieris brassica* than pea and mung bean seeds. Thus, proteins present in the wheat cultivars have a good potential to be studied further in order to purify them, indentify their structures and investigate their specificity for α-amylase of different animals.

Keywords: Digestive enzyme, Inhibition, Proteinaceous extracts.