اثر مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی بذرهای چند گیاه تیره‌ی باقلا Fabaceae بر فعالیت آنزیم آلفا– آمیلاز حشرات کامل و لاروهای سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

علی محمدی نصرآبادی[۱]، منیژه جمشیدی[۲] و داود محمدی[۳*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد حشره شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز.
۲- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز.
۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.
*مسئول مکاتبه mohamadi@azaruniv.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۳۰

چکیده

سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decelineata* (Say)، آفت کلیدی سیب‌زمینی در سراسر جهان می‌باشد. با توجه به اثرات نامطلوب کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی، استفاده از مهارکننده‌های پروتئینی آنزیم‌های گوارشی به عنوان روش‌های جایگزین، برای کنترل آفات اجتناب‌ناپذیر است. در مطالعه‌ی حاضر تاثیر عصاره‌ی پروتئینی بذر چند گیاه تیره‌ی باقلا Fabaceae بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز لاروهای سن آخر و حشرات کامل این آفت بررسی شد. فعالیت آنزیم به تنهایی و در حضور مهارکننده اندازه‌گیری شد. از بین بذرهای ۱۷ گیاه مورد بررسی (۸ رقم لوبیا، دو رقم نخود، عدس، ماشک، باقلا، تمر هندی، بادام زمینی، اسپرس و یونجه)، پنج بذر شامل چهار نوع بذر لوبیا، *Phaseolus vulgaris* L. (لوبیا چیتی، لوبیا سبز، لوبیا قرمز و لوبیا سفید) و تمر هندی، اثرات مهارکنندگی زیادی را نسبت به بقیه نشان دادند. همچنین، در این بررسی اثر مهارکنندگی سه فراکسیون ۲۰-۰، ۴۰-۲۰ و ۶۰-۴۰ درصد که با کمک ترسیب در نمک آمونیوم سولفات تهیه شده بودند، نیز در سه غلظت مختلف، ۰/۳، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم پروتئین بر میلی لیتر مطالعه شد. در مجموع و در هر پنج نوع بذر مورد بررسی، فراکسیون‌های ۴۰-۲۰ و ۶۰-۴۰ اثرات مهارکنندگی بیشتری را در مقایسه با فراکسیون اول نشان دادند (تقریبا ۷۰ الی ۹۰ درصد مهارکنندگی). اثر مهارکنندگی در تمام موارد وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت مهارکننده، میزان فعالیت آنزیم به‌طور چشمگیر کاهش یافت. در مجموع عصاره‌ی پروتئینی تام و فراکسیون‌های انواع لوبیای بررسی شده در این تحقیق، اثر مهارکنندگی قابل توجهی بر فعالیت آلفا-آمیلاز مراحل زیستی لارو سن آخر و حشرات کامل سوسک برگخوار سیب‌زمینی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: ارقام لوبیا، آمونیوم سولفات، آلفا- آمیلاز، عصاره‌ی پروتئینی، سوسک برگخوار سیب‌زمینی.

مقدمه

سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی *Leptinotarsa decelineata* (Say)، یکی از ۱۵ آفت مهم گیاهی جهان است که مراحل مختلف لاروی و حشره کامل آن از برگ‌های سیب‌زمینی تغذیه می‌کنند. در بین حشرات برگ‌خوار سیب‌زمینی، هیچ حشره‌ای به اندازه این گونه، توان برگ‌خواری و ایجاد خسارت ندارد. این آفت علاوه بر سیب‌زمینی به گوجه‌فرنگی، بادمجان، فلفل، توتون و برخی علف‌های هرز تیره‌ی Solanaceae مانند تاجریزی *Solanum nigrum* L. نیز حمله می‌کند. روش‌های متداول کنترل این آفت اغلب بر استفاده از آفت‌کش‌های مختلف مبتنی هستند که آثار سوء آن‌ها بر دشمنان طبیعی، انسان و محیط زیست، معرفی روش‌های کنترل امن‌تر را ایجاب می‌کند. در مورد این آفت از روش‌های مختلف کنترل میکروبی، زیستی، زراعی و غیره استفاده می‌شود ولی با این حال، هنوز زیان اقتصادی زیادی را موجب می‌شود (گوتی‌یر و همکاران ۱۹۸۱). یکی از راهکارهای مهم در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات، استفاده از گیاهان مقاوم به آفات و یا ترکیبات گیاهی است که برای محیط زیست از امنیت بالایی برخوردار می‌باشند (کارلینی و گراسی ۲۰۰۲، چن ۲۰۰۸). این امر با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و وارد کردن ژن‌های

رمزگذار عامل مقاومت بـه آفـات در گیاهـان امکـان‌پـذیر است (شارما و پامپاپاتی ۲۰۰۶). فناوری انتقـال ژن‌هـای مقاومـت بـه حشـرات از منشـاهای مختلـف (باکتریـایی، گیاهی و یا جانوری) به گیاهان به‌منظـور افـزایش سـطح مقاومت آنها به حشرات به سـرعت توسـعه یافتـه اسـت. گروهی از ژن‌ها که برای مهندسی ژنتیک محصولات مهم حـایز اهمیـت هسـتند، ژن‌هـای رمزگـذار مهارکننـده‌ی آنزیم‌های گوارشی حشرات می‌باشند (لاورنس و کونـدل ۲۰۰۲). مهارکننـده‌هـای آنـزیم‌هـای گوارشـی حشـرات ترکیبات پروتئینی یا غیرپروتئینی هستند که با اتصال بـه جایگاه فعال آنزیم، باعث مهار شدن فعالیت و یـا کـاهش فعالیت آنزیمی می‌شوند (فرانکو و همکاران ۲۰۰۲). اغلب، فعالیـت مهارکننـده‌هـا موجـب تشـکیل ترکیـب پایـدار بـا پروتئازهای هدف، مسدود شدن و یا تغییر شـکل جایگـاه فعال آنـزیم و یـا جلـوگیری از دسترسـی زیرنهشـت بـه جایگاه فعال می‌شود (دلئو و همکـاران ۲۰۰۲ و حبیـب و فاضیلی ۲۰۰۷).

آلفـــا- آمیلازهـــا دربرگیرنـــده‌ی خـــانواده‌ای از آندوآمیلازها هستند که هیـدرولیز پیونـد ۱ و۴-آلفـا-دی گلوکـان را در ترکیبـات نشاسـته‌ای، گلیکـوژن و سـایر کربوهیـدرات‌هـای وابسـته انجـام مـی‌دهنـد (فرانکـو و همکـاران، ۲۰۰۲). آنـزیم آلفـا- آمـیلاز نقـش مهمـی در سوخت و سـاز کربوهیـدرات‌هـا در گیاهـان و جـانوران دارد و حشرات گیاه‌خوار کـه از مـواد نشاسـته‌ای تغذیـه می‌کنند، بـرای ادامـه‌ی حیـات، بـه شـدت بـه ایـن آنـزیم وابسته می‌باشند. آلفا- آمیلازهـا اهـداف مناسـبی بـرای کنتـرل حشـرات از طریـق مهارکننـده‌هـای حاصـل از دانه‌های غلات یـا لگـوم‌هـا هسـتند. سوسـک بـرگ‌خـوار سـیب‌زمینـی نیـز یکـی از آفـات دارای اهمیـت اقتصـادی می‌باشد که برای ادامه‌ی حیات خود بـه آلفـا- آمیلازهـا وابسته می‌باشد. بـه کـارگیری گیاهـان تراریختـه حـاوی مهارکننده‌های آنزیم آلفا- آمـیلاز بـرای کنتـرل سوسـک برگ‌خوار سیب‌زمینی مستلزم شناخت منـابع مهارکننـده است. شناسایی منابع گیاهی کـه حـاوی مهارکننـده‌هـای آنزیم‌های گوارشـی آفـات هـدف هسـتند، اولـین گـام در راستای گسترش روش‌های کنترل مبتنی بر ایجاد اختلال در دستگاه گوارش می‌باشد (کـارلینی و گراسـی ۲۰۰۲ و لاورنس و کوندل ۲۰۰۲).

در مطالعات مختلف، اثر مهـار کننـدگی پـروتئین‌هـای حاصل از بذرهای گیاهـان مختلـف مـورد بررسـی قـرار گرفته و نتایج امیدبخشی نیز بـه دسـت آمـده اسـت. اثـر مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز به دسـت آمـده از نخـودفرنگـی *Pisum sativum* L.، بـر فعالیـت آلفـا- آمـیلاز گوارشـی سوسک نخود فرنگـی *Bruchus pisorum* L.، بررسـی و مشاهده گردید کـه ایـن مهارکننـده فعالیـت آنـزیم را بـه میزان ۸۰ درصد مهار نمود (مورتون و همکـاران ۲۰۰۰). همچنین، مندیولا- اولایا و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی اثر مهارکننده های آلفا- آمیلاز جداسازی شـده از دانـه هـای لوبیا و ذرت دریافتند که این مهارکننـده‌هـا اثـر کمـی بـر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز گوارشی دانه‌خوار بزرگ غلات *Prostephanus truncatus* Horn. داشـتند، در حـالی کـه مهارکننده‌های جداسازی شده از دانـه‌هـای تـاج خـروس *Amaranthus hypochondriacus* L. فعالیت این آنزیم را به میزان ۱۰۰ درصد مهـار کردنـد. برزویـی و همکـاران (۱۳۹۱) اثر مهارکنندگی عصاره‌ی بذر ارقام مختلف گندم را بر فعالیت آلفا- آمیلاز سوسک برگخوار سـیب‌زمینـی بررسی کردند و اثـرات مهارکننـدگی خـوبی را بـه‌دسـت آوردنـد. گیاهـان تیـره‌ی بـاقلا منبـع مناسـبی بـرای مهارکننده‌های آلفا- آمیلاز مـی‌باشـند (جـف و همکـاران ۱۹۷۳). در این بررسی، اثر مهارکننـدگی عصـاره ی چنـد گیاه از تیره‌ی باقلا بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سوسک برگخوار سیب‌زمینی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری حشرات

حشـــرات کامـــل و لاروهـــای سوســـک برگخـــوار سـیب‌زمینـی از مـزارع سـیب‌زمینـی روسـتای ارجـق شهرستان مشکین‌شهر، استان اردبیل جمع‌آوری و جهت انجام مراحل آزمایش به آزمایشگاه منتقـل شـدند. بـرای جلوگیری از اثرات آفت‌کش‌ها، در مزرعه انتخابی به مدت یک ماه از هیچ گونه آفت‌کشی استفاده نشد. از لاروهای سن آخر و حشرات کامل برای مطالعات آنزیمی اسـتفاده شد.

استخراج آنزیم

لاروهای سن آخر ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در داخل فریزر در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس گذاشته شدند تا بی‌حس شوند. سپس، به ازای هر لارو سن چهارم ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سرد با pH = ۷/۵ اضافه شد و لاروها به صورت دستی در یک هاون آزمایشگاهی کاملا له شدند. سپس مخلوط حاصل به دستگاه هموژنایز (Ultraturrax T-18) انتقال یافته و به مدت سه دقیقه کاملا همگن‌سازی شد. محلول حاصل پس از انکوباسیون به مدت چهار ساعت در دمای شش درجه‌ی سلسیوس (یخچال)، در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول روشناور (سوپرناتانت) به عنوان منبع آنزیم حشره برداشته شده و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد تا در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد (محمدی و همکاران ۱۳۹۵).

در مورد حشرات کامل، پس از بی‌حس شدن در فریزر، بدن را از پهلو شکافته، ابتدا و انتهای دستگاه گوارش قطع، و لوله گوارش جدا و از بدن خارج شد. به ازای هر شش لوله گوارش از یک میلی‌لیتر بافر فسفات سرد با pH = ۷/۵ استفاده شد و مراحل همگن‌سازی و استخراج آنزیم مانند مرحله قبل انجام گرفت.

استخراج عصاره‌ی پروتئینی بذرها

بذرهای گیاهان مورد استفاده برای غربالگری عبارت بودند از: (۱) لوبیا چشم‌بلبلی *Vigna unguiculata* (L.) Walp.، (۲) لوبیا چیتی *Phaseolus vulgaris* L.، (۳) ماش *Vigna radiate* (L.) R. Wilczek ، (۴) لوبیا سیاه *Phaseolus vulgaris* L.، (۵) لوبیا سبز *Phaseolus vulgaris* L.، (۶) لوبیا قرمز *Phaseolus vulgaris* L.، (۷) لوبیا سفید *Phaseolus vulgaris* L.، (۸) لوبیا گوشتی *Phaseolus vulgaris* L. ، (۹) عدس *Lens culinaris* Medikus ، (۱۰) نخود سفید *Cicer arietinum* L.، (۱۱) نخود سیاه *Cicer arietinum* L.، (۱۲) ماشک *Vicia* sp.، (۱۳) باقلا *Vicia faba* L.، (۱۴) تمر هندی *Tamarindus indica* L.، (۱۵) بادام زمینی *Arachis hypogaea* L.، (۱۶) اسپرس *Onobrychis sativa* Scop.، و (۱۷) یونجه *Medicago sativa* L.

برای استخراج عصاره‌ی پروتئینی بذرها از روش تلنگ و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد. ابتدا بذرها پودر شدند و سپس ۱۰۰ گرم از پودر هر بذر دو بار با استون و ان- هگزان شستشو داده شد تا رنگدانه‌ها و روغن‌های موجود در پودر حذف شوند. مقدار ۱۰گرم از پودر هر بذر با ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط و داخل آب یخ به مدت چهار ساعت با استفاده از شیکر هم زده شد تا مهارکننده‌ها استخراج شوند. مخلوط حاصل به مدت نیم ساعت با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول روشناور به مدت هشت دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد تا پروتئین‌های بذرزاد رسوب پیدا کنند. عمل سانتریفیوژ مجددا تکرار شد و محلول روشناور به عنوان منبع مهارکننده تام در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس ذخیره شد. در مورد عصاره‌هایی که اثر مهارکنندگی خوبی داشتند، فراکسیون‌بندی مهارکننده تام با استفاده از تفاوت در میزان حلالیت پروتئین‌ها در آب و ترسیب با نمک آمونیوم سولفات، در سه غلظت ۲۰-۰، ۴۰-۲۰ و ۶۰-۴۰ درصد انجام گرفت. تمام مراحل فراکسیون‌بندی داخل آب یخ انجام شدند.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز و اثر مهارکنندگی عصاره‌ها

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز با استفاده از کیت تشخیصی (کیت آمیلاز، شرکت پارس‌آزمون، ایران) اندازه‌گیری شد. زیرنهشت، ترکیب (Ethylidene-*p*-nitrophenyl-malthoheptaoside) EPS-G7 می‌باشد که پس از هیدرولیز شدن، پارا- نیتروفنل و گلوکز آزاد می‌کند. جذب نوری که مستقیما با فعالیت آلفا- آمیلاز متناسب است، در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه اتوآنالایزر مدل Alcyon 300 اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین نمونه محاسبه شد (محمدی و همکاران ۱۳۹۵).

بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام و فراکسیون‌های مختلف، مانند روش بالا بود با این تفاوت که آنزیم و مهارکننده به مدت ۳۰ دقیقه پیش‌انکوبه شدند و سپس فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. اثر مهارکنندگی از طریق مقایسه‌ی فعالیت آنزیم در تیمار شاهد با تیمار حاوی مهارکننده مشخص گردید. برای اطمینان از تاثیر مهارکننده‌ها از سه غلظت مختلف مهارکننده استفاده شد (۱، ۰/۷ و ۰/۳ میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر) و روند مهارکنندگی با افزایش غلظت مهارکننده مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین غلظت پروتئین کل

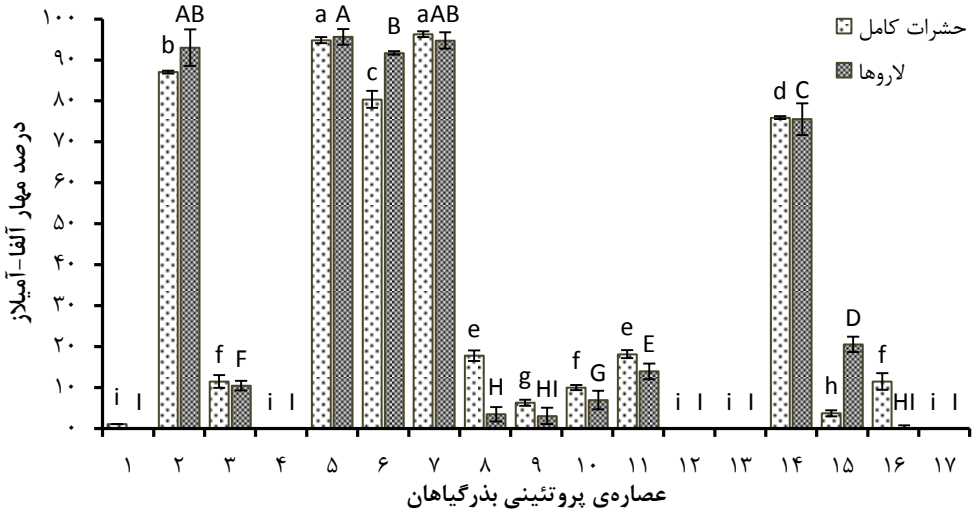
برای تعیین غلظت پروتئین تام نمونه‌ها از روش بردفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. پروتئین آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و پس از ترسیم منحنی استاندارد، غلظت پروتئین نمونه‌ها تعیین شد. بررسی‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

داده‌ها پیش از تجزیه و تحلیل از نظر نرمال بودن مورد آزمون قرار گرفتند. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، بر اساس طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. گروه‌بندی داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

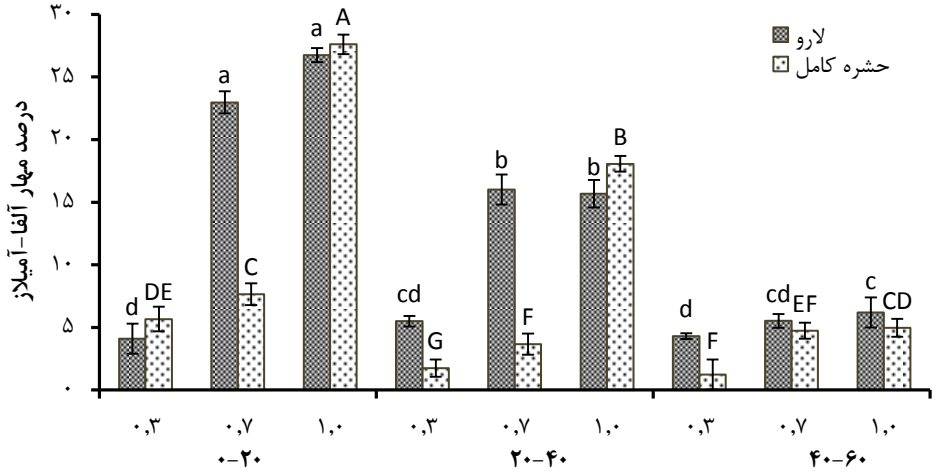
شکل ۱ نتیجه غربالگری اولیه‌ی اثر مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی بذر ۱۷ گیاه مورد مطالعه را نشان می‌دهد. عصاره‌های پروتئینی بذرهای لوبیا چیتی، لوبیا سبز، لوبیا قرمز، لوبیا سفید و تمرهندی بیشترین اثر مهارکنندگی را بر آنزیم آلفا- آمیلاز لاروهای سن آخر و حشرات کامل سوسک برگخوار سیب‌زمینی دارا بودند و بین ۷۰ تا ۹۵ درصد فعالیت آنزیم را مهار کردند. برخی از عصاره‌ها مانند لوبیا سیاه، لوبیا چشم‌بلبلی، ماشک، باقلا و یونجه هیچ‌گونه اثر مهارکنندگی را نشان ندادند.



شکل ۱- اثر مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی گیاهان مورد مطالعه بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سوسک برگخوار سیب‌زمینی. (۱: لوبیا چشم‌بلبلی، ۲: لوبیا چیتی، ۳: ماش، ۴: لوبیا سیاه، ۵: لوبیا سبز، ۶: لوبیا قرمز، ۷: لوبیا سفید، ۸: لوبیا گوشتی، ۹: عدس، ۱۰: نخود سفید، ۱۱: نخود سیاه، ۱۲: ماشک، ۱۳: باقلا، ۱۴: تمر هندی، ۱۵: بادام زمینی، ۱۶: اسپرس، ۱۷: یونجه). حروف بزرگ و کوچک مشابه به ترتیب در لاروها و حشرات کامل نشان‌دهنده‌ی فقدان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ می‌باشند.

اسپرس و ماش تنها فعالیت آنزیم حشرات کامل را حدود ۱۰ درصد مهار کردند و لوبیا گوشتی، عدس و نخود سیاه و سفید نیز در مقایسه با حشرات کامل، تاثیر کمتری بر آنزیم مرحله لاروی نشان دادند. تمر هندی حدود ۲۰ درصد اثر مهارکنندگی در مرحله لاروی نشان داد ولی کمتر از ۵ درصد آنزیم آلفا-آمیلاز حشرات کامل را مهار کرد.

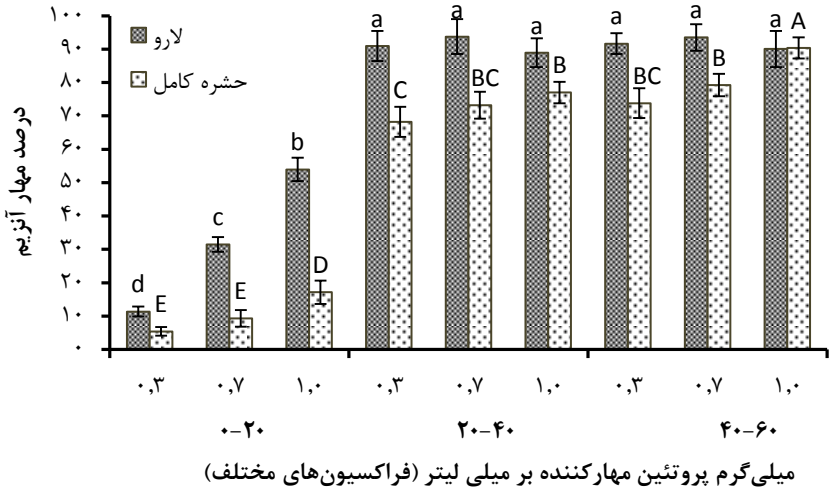
مطالعات تکمیلی روی پنج گیاه که اثر مهارکنندگی بیشتری در مقایسه با سایر گیاهان داشتند انجام شد. اثر مهارکنندگی سه فراکسیون ۲۰-۰، ۴۰-۲۰ و ۶۰-۴۰ درصد تمر هندی (شکل ۲) نشان داد که در غلظت‌ها و فراکسیون‌های مختلف، اثرات مهارکنندگی متفاوت بودند. مهارکنندگی در فراکسیون ۲۰-۰ (۲۷-۴ درصد) و ۴۰-۲۰ (۱۸-۲ درصد) بیشتر از فراکسیون سوم بود (۶-۱ درصد). نتایج نشان داد که تاثیر مهارکننده‌ها با افزایش غلظت (در غلظت ثابتی از آنزیم آلفا- آمیلاز هر دو مرحله نشوونمایی) افزایش یافت.



شکل ۲- اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) سه فراکسیون عصاره‌ی بذر تمرهندی بر دو مرحله نشوونمایی سوسک برگخوار سیب‌زمینی. حروف کوچک و بزرگ مشابه به ترتیب در لاروها و حشرات کامل نشان‌دهنده‌ی فقدان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ می‌باشند.

عصاره‌ی پروتئینی بذر گیاه لوبیا سبز در مقایسه با تمر هندی اثرات مهارکنندگی خوبی را نشان داد (شکل ۳). فراکسیون اول (۲۰-۰) در مقایسه با دو فراکسیون بعدی، هر چند رابطه‌ی مستقیمی با غلظت مهارکننده داشت، ولی به طور معنی‌داری اثر مهارکنندگی کمتری را نشان داد. این فراکسیون در مقایسه با حشرات کامل، روی آلفا- آمیلاز لاروها به‌طور معنی‌داری تاثیر بیشتری داشت. فراکسیون‌های ۴۰-۲۰ و ۶۰-۴۰ اثرات مهارکنندگی بسیار خوبی را نشان دادند ولی، به‌خصوص برای مرحله‌ی لاروی، افزایش مهارکنندگی وابستگی زیادی به غلظت مهارکننده نداشت و تقریبا در هر سه غلظت مطالعه شده بین ۹۰ الی۹۷ درصد مهارکننده بودند. مانند فراکسیون اول، دو فراکسیون بعدی نیز در مقایسه با لاروها بر فعالیت آلفا- آمیلاز حشرات کامل اثرات مهارکنندگی کمتری داشتند.

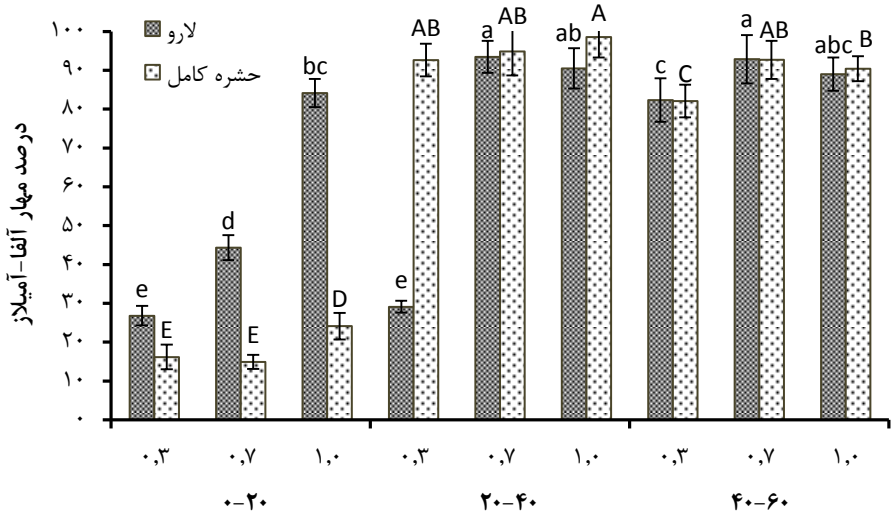
نتایج به‌دست آمده در مورد بذر لوبیا چیتی نیز روندی مشابه لوبیا سبز داشتند (شکل ۴). فراکسیون اول اثر مهارکنندگی کمتری را نشان داد (۲۶ درصد در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره مهارکننده به ازای ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم) و فعالیت آلفا- آمیلاز لاروی را بیشتر از حشرات کامل مهار کرد.



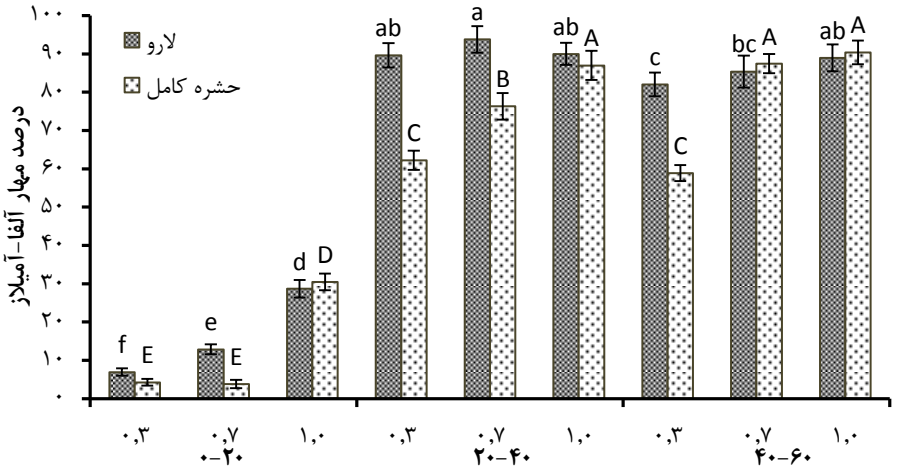
شکل ۳- اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) سه فراکسیون عصاره لوبیا سبز بر دو مرحله‌ی نشوونمایی سوسک برگخوار سیب‌زمینی. حروف کوچک و بزرگ مشابه به ترتیب در لاروها و حشرات کامل نشان‌دهنده‌ی فقدان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ می‌باشند.

در این مورد نیز اثرات مهارکنندگی با غلظت مهارکننده‌ها رابطه‌ی مستقیم داشتند. غلظت‌های بالای فراکسیون‌های ۴۰-۲۰ و ۶۰-۴۰، بین ۸۲ الی ۹۳ درصد اثر مهارکنندگی نشان دادند.

عصاره‌ی پروتئینی بذر لوبیا قرمز نیز در فراکسیون‌های ۴۰-۲۰ و ۶۰-۴۰ و روی آنزیم‌های هر دو مرحله‌ی نشوونمایی اثرات مهارکنندگی خوبی را در مقایسه با فراکسیون ۲۰-۰ نشان داد (۶۰ الی ۹۲ درصد در مقایسه با ۵ الی ۳۰ درصد). در این مورد نیز آلفا-آمیلاز لاروی با اختلاف معنی‌داری بیشتری نسبت به حشرات کامل مهار شد (شکل ۵).

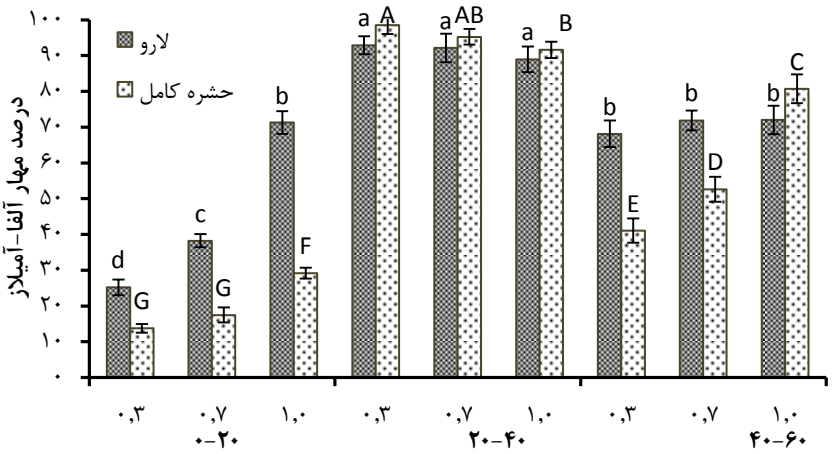


شکل ۴- اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) سه فراکسیون عصاره‌ی لوبیا چیتی بر دو مرحله‌ی نشوونمایی سوسک برگخوار سیب‌زمینی. حروف کوچک و بزرگ مشابه به ترتیب در لاروها و حشرات کامل نشان‌دهنده‌ی فقدان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ می‌باشند.



شکل ۵- اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) سه فراکسیون عصاره‌ی لوبیا قرمز بر دو مرحله‌ی نشوونمایی سوسک برگخوار سیب‌زمینی. حروف کوچک و بزرگ مشابه به ترتیب در لاروها و حشرات کامل نشان‌دهنده‌ی فقدان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ می‌باشند.

عصاره‌ی بذر لوبیا سفید نیز اثرات مهارکنندگی خوبی را در هر دو مرحله‌ی نشوونمایی سوسک برگخوار سیب‌زمینی (به خصوص در فراکسیون ۴۰-۲۰ درصد) نشان داد و فعالیت آلفا- آمیلاز را بیش از ۹۰ درصد مهار کرد (شکل ۶). در مقایسه با چهار گیاه قبلی، در فراکسیون ۶۰-۴۰ اثر مهارکنندگی کمتر بود و به‌ویژه در مرحله‌ی حشره کامل، حداکثر بین ۴۰ الی ۸۰ درصد مهارکنندگی مشاهده شد. در مورد فراکسیون‌های مختلف لوبیا سفید نیز اثرات مهارکنندگی با غلظت مهارکننده‌ها رابطه مستقیم داشتند.



شکل ۶- اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) سه فراکسیون عصاره‌ی لوبیا سفید بر دو مرحله‌ی نشوونمایی سوسک برگخوار سیب‌زمینی. حروف کوچک و بزرگ مشابه به ترتیب در لاروها و حشرات کامل نشان‌دهنده‌ی فقدان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ می‌باشند.

بحث

پروتئین‌های مهارکننده‌ی آلفا- آمیلازها در تمام سلسله گیاهی یافت می‌شوند، به‌ویژه بذرهای گیاهان تیره‌ی باقلا دارای مقادیر فراوانی از این پروتئین‌ها می‌باشند (ریان و همکاران ۱۹۹۰). بازدارنده‌های آلفا- آمیلازها، پروتئین‌های دفاعی گیاهی هستند و فراتر از یک پروتئین متابولیسمی محسوب می‌شوند. بررسی‌های قبلی نشان داده‌اند که لوبیا چیتی *Ph. vulgaris* L. حاوی مهارکننده‌های آلفا- آمیلازهای تعدادی از پستانداران و حشرات می‌باشد (پاورس و ویتاکر a,b ۱۹۷۷). نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر با سایر تحقیق‌هایی که تاثیر مهارکننده‌های تیره‌ی باقلا را بر آلفا- آمیلازهای حشرات بررسی کرده بودند، مطابقت دارند. اثر مهارکننده‌ی استخراج شده از بذر گیاه لوبیا روی آلفا- آمیلاز روده‌ی لارو سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* (fabricius, 1775) و سوسک مکزیکی لوبیا *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) توسط ایشیموتو و کیتامورا (۱۹۸۹) بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر مهارکننده روی فعالیت آلفا- آمیلاز سه گونه متفاوت بود. کمترین اثر مهارکنندگی روی آلفا-آمیلاز سوسک مکزیکی لوبیا بود که از جمله آفات بسیار مهم لوبیا نیز محسوب می‌شود. تاثیر کم، شاید به‌دلیل رابطه میزبانی حشره با لوبیا باشد. همچنین، میزان مهارکنندگی در لارو و حشره کامل تفاوت معنی‌داری را نشان داد که مطابق با نتایج این پژوهش (تفاوت مهارکنندگی در دو مرحله نشوونمایی) است. همچنین در مطالعه دیگری تاثیر مهار کنندگی عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزا بر مراحل مختلف زیستی سوسک برگخوار سیب‌زمینی بررسی و مشاده شد که میزان مهار آنزیم آلفا-آمیلاز لاروها بیشتر از حشرات کامل بود (عاشوری و فرشباف پورآباد، ۱۳۹۵). تغذیه لاروهای سوسک برگخوار سیب‌زمینی از برگهای سیب‌زمینی آغشته به مهار کننده لوبیا قرمز، پارامترهای زیستی این حشره را تحت تاثیر قرار داده و کاهش وزن لاروها، افزایش نسبی طول دوره‌ی رشدی لاروی و بخصوص کاهش شدید فعالیت آلفا-آمیلاز را در پی داشت (عاشوری و همکاران ۲۰۱۷). آزمایش‌های ایشیموتو و کیتامورا (۱۹۹۱) و ایشیموتو و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که یکی از دلایل فقدان خاصیت مهارکنندگی، هضم خود مهارکننده توسط پروتئازهای دستگاه گوارش می‌باشد. از نتایج قابل تامل دیگر این تحقیق آن است که آلفا- آمیلاز سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات به شدت توسط مهارکننده استخراج شده از لوبیای معمولی مهار شد. آزمایش‌ها منتهی به این نتیجه شدند که مهارکننده آلفا- آمیلاز فاکتور مهمی است، به‌طوری که حتی شاید مهم‌ترین عامل در مقاومت گیاهان لوبیا به سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات باشد. این نتایج به‌وسیله آزمایش با غذای مصنوعی حاوی مهارکننده آلفا- آمیلاز استخراج شده از لوبیای چشم‌بلبلی نیز تایید شده‌اند (ایشیموتو و کیتامورا ۱۹۸۹). هم‌چنین، مشخص شد که در اثر تغذیه لاروهای سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات از غذای مصنوعی حاوی مهارکننده‌های آلفا- آمیلاز لوبیا چیتی و لوبیای چشم‌بلبلی، لاروها از نشوونما بازماندند و از ظهور حشرات کامل این سوسک و سوسک چینی حبوبات تغذیه کرده از غذای مصنوعی تولید شده با آرد این لوبیا جلوگیری شد. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که اثر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت مهارکننده، میزان مهارکنندگی نیز افزایش پیدا کرد. همچنین، آلفا- آمیلازهای حشرات کامل و لاروهای سوسک برگخوار سیب‌زمینی به‌طور متفاوتی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف فراکسیون‌های پروتئینی مختلف بذر گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند. این نتایج با نتایج تحقیق برزویی و همکاران (۱۳۹۱) قابل مقایسه می‌باشند که نشان دادند عصاره پروتئینی استخراج شده از گندم توانایی بالایی برای مهار آنزیم آلفا- آمیلاز سوسک برگخوار سیب‌زمینی داشت. سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز در حضور پنج غلظت مختلف عصاره‌ی گندم رقم‌های افلاک و ام وی هفده، یک روند مهار وابسته به غلظت را نشان داد. میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز با استفاده از غلظت‌های ۱۷، ۸/۵، ۴/۲۵، ۲/۱۲۵ و ۱/۰۶۲۵ میکروگرم پروتئین عصاره گندم رقم ام وی هفده به ترتیب ۳۰/۱۸، ۴۸/۷۴، ۵۸/۳۲ و ۶۰/۷۲ درصد فعالیت آنزیم در غیاب مهارکننده (۱۰۰٪) بود. نتایج نشان داد که اثر رقم افلاک

در مهار فعالیت آنزیم نسبت به رقم ام وی هفده کمتر بود. همچنین، هوری (۱۹۶۸) ، جعفرلو و همکاران (۱۳۹۰) و آلارکون و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیقات خود به این نتیجه دست یافتند که فعالیت آنزیم به غلظت آنزیم وابسته بوده و در مراحل مختلف نشوونمایی حشرات تفاوت دارد. این امر در تحقیق عاشوری و همکاران (۲۰۱۷) نیز تایید شده است طوری که فعالیت آلفا- آمیلاز توسط عصاره‌ی پروتئینی لوبیای قرمز (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Goli) در مرحله زیستی لاروی بیشتر از حشره‌ی کامل سوسک برگخوار سیب‌زمینی مهار شد.

ارقام مختلف گیاهان از نظر محتوای مهارکننده‌های موثر متفاوت هستند و استفاده از غلظت‌های مختلف مهارکننده می‌تواند وابسته به غلظت بودن اثر مهار کنندگی را اثبات کند که یکی از فاکتورهای مهم در انتخاب مهارکننده برای کارهای تکمیلی‌تر شناسایی و انتقال ژن می‌باشد. هر چقدر رابطه میزبانی گیاه- حشره تنگ‌تر باشد، طبیعتا احتمال عدم مهار و یا مهار شدن اندک آنزیم توسط مهارکننده‌ی استحصال شده از گیاهان میزبان وجود دارد، مهارکننده‌ی گیاهان غیرمیزبان به‌دلیل تفاوت ساختاری، ساختمانی و مولکولی مهارکننده، اثر مطلوب‌تری خواهد داشت (ایشیموتو و کیتامورا ۱۹۹۱).

در بررسی حاضر، تاثیر عصاره‌های ۱۷ نوع بذر مختلف از تیره‌ی باقلا بر فعالیت آلفا- آمیلاز یک حشره‌ی غیرمیزبان (سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی) مورد بررسی قرار گرفت و بررسی‌های تکمیلی اثر مهارکنندگی بسیار خوبی را نشان دادند به طوری که در مجموع تا ٪۸۰ از فعالیت آنزیم این حشره مهار شد. با وجود این، در یک بررسی مشخص شد که دانه‌های گندم نیز دارای مهارکننده آلفا- آمیلاز می‌باشند که در برابر آلفا- آمیلاز حشرات آفت تغذیه کننده از دانه‌های گندم یا سایر غلات اثر مهارکنندگی داشت ولی روی فعالیت آلفا- آمیلاز حشراتی که از گندم تغذیه نکردند، اثر مهارکنندگی نشان نداد (سیلانو و همکاران ۱۹۷۵، یتر و همکاران ۱۹۷۸). این بدان معنی است که تئوری استفاده از گیاهان غیرمیزبان به عنوان منبع مهارکننده همیشه درست نیست و میزان فعالیت آنزیم مورد نظر در روده میانی حشره و وابسته بودن فیزیولوژی گوارش به آن آنزیم، به عنوان موثرترین آنزیم نیز اهمیت دارند. هر چند سوسک برگخوار سیب‌زمینی از لوبیا به عنوان منبع غذایی اصلی استفاده نمی‌کند، ولی فعالیت آنزیم به‌ویژه توسط رقم‌های مختلف لوبیا به خوبی مهار شد.

با توجه به این که آلفا- آمیلازها نقش بیوشیمیایی مهمی در تغذیه‌ی اغلب حشرات ایفا می‌کنند، هر راهبردی که فعالیت این آنزیم را مختل کند، باید مورد توجه قرار گیرد. نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که ترکیبات موجود در دانه‌های بقولات نقش مهمی در مهار آنزیم آلفا- آمیلاز سوسک برگخوار سیب‌زمینی داشتند و پروتئین‌های دفاعی این گیاهان می‌توانند به عنوان مهارکننده‌های آنزیم‌ها در کنترل این حشره آفت مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله قدردان همکاری‌های آزمایشگاه عمومی مرکز تحقیقات دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز هستند.

منابع مورد استفاده

برزویی ا، بندانی ع و مسلمی ع، ۱۳۹۱. بررسی اثر مهارکنندگی عصاره ارقام گندم روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز گوارشی سوسک کلرادو. تحقیقات آفات گیاهی، جلد دوم، شماره ۴، صفحه‌های ۱۶ تا ۲۶.

جعفرلو م، فرشباف پورآباد ر، ولیزاده م، محمدی د و ضیائی مدبونی م ع، ۱۳۹۰. بررسی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* Zeller. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار، جلد بیست و دوم، شماره ۳، صفحه‌های ۱۱۵ تا ۱۲۶.

عاشوری ش، فرشباف پورآباد ر، ۱۳۹۵. تاثیر عصاره پروتئینی بذر کلزا روی فعالیت آلفا- آمیلاز گوارشی سوسک برگخوار سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say) و برخی مولفه‌های زیستی آن. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی، جلد پنجم، شماره ۲، صفحه‌های ۲۰۵ تا ۲۲۰.

محمدی د ، فرشباف پور آباد ر، رشیدی م و محمدی س‌ا، ۱۳۹۵. اثر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی تلخ‌بیان *Goebelia alopecuroides* L. و گاودانه *Vicia ervilia* L. بر فعالیت تریپسین و کیموتریپسین گوارشی کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hb. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی، جلد پنجم ، شماره ۱، صفحه‌های ۱۶۹ تا ۱۸۲.

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

Ashouri Sh, Farshbaf Pourabad R, Zihnioglu F, Kocadag Kocazorbaz E, 2017. Influence of red kidney bean seed proteins on development, digestive α-amylase activity and gut protein pattern of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Journal of Entomological Research Society 19: 69-83.

Bradford MM, 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 CR, Maria F and Grossi-de-Sa MF, 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 40: 1515-1539.

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

De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R and Ceci LR, 2002. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. Nucleic Acid Research 30: 347-348.

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR and Grossi-de-sa MF, 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase-structure, function and potential for crop protection. European Journal of Biochemistry 269: 397-412.

Gauthier NL, Hofmaster RN and Semel M, 1981. History of Colorado potato beetle control. In Lashomb JH and Casagrande R, (Eds.). Advances in Potato Pest Management. Hutchinson Ross, Stroudsburg. pp: 13-33.

Habib H and Fazili KhM, 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants, Biotechnology and Molecular Biology Reviews 2: 68-85.

Hori K, 1968. Feeding Behavior of the Cabbage Bug, *Eurydema rugosa* Mutschulsky (Hemiptera: Pentatomidae) on the Cruciferous Plants. Applied Entomology and Zoology 3: 26-36.

Ishimoto M and Kitamura K, 1989. Growth inhibitory effects of an α-amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). Applied Entomology and Zoology 24: 281-286.

Ishimoto M and Kitamura K, 1991. Effect of absence of seed α-amylase inhibitor on the growth inhibitory activity to azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Japanese Journal of Breeding 41: 231-240.

Ishimoto M, Sato T, Chrispeels MJ and Kitamura K, 1997. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α-amylase inhibitor of common bean. Entomologia Experimentalis et Applicata 79: 309-315.

Jaffe WG, Moreno R and Wallis V, 1973, Amylase inhibitor in legume seeds. Nutrition Reports International 7: 169-174.

Lawerence PK and Koundal KR, 2002. Plant proteinase inhibitors in control of phytophagous insects. European Journal of Biotechnology 5: 93-109.

Mendiola-Olaya E, Valencia-Jimenez A, Valdes-Rodriguez S, Delano-Frier J and Blanco-Labra A, 2000. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncates* Horn. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 126: 425-433.

Morton RL, Schroeder HE, Bateman KS, Chrispeels MJ, Armstrong E and Higgins TJ, 2000. Bean alpha-amylase inhibitor I in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(8): 3820-3825.

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

Powers JR and Whitaker JR, 1977b. Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) α-amylase inhibitor. Journal of Food Biochemistry 1: 217-238.

Ryan C, 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Review of Phytopathology 28: 425-449.

Sharma HC and Pampapathy G, 2006. Influence of transgenic cotton on the relative abundance and damage by target and non-target insect pests under different protection regimes in India. Crop Protection 25: 800-813.

Silano V, Furia M, Gianfreda L, Macri A, Palescandolo R, Rab A, Scardi V, Stella E and Valfre F, 1975. Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. Biochimistry and Biophysiology 391: 170-178.

Telang M, Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, Damle A, Deshpande V, Sainani M, Ranjekar P, Gupta G, Birah A, Rani S, Kachole M, Giri A and Gupta V, 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Phytochemistry 63: 643-652.

Yetter MA, Saunders RM and Boles HP, 1978. α-amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects. Cereal Chemistry 56: 243-244.

Inhibitory Effects of Proteinaceous Extracts of Some Leguminous Plant Seeds on α-amylase Activity of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)

A Mohammadi Nasrabadi[1], M Jamshidi[2] and D Mohammadi[3*]

[1]MSc Student of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Tabriz-Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Tabriz branch, Tabriz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz-Iran.
*Corresponding author : mohamadi@azaruniv.ac.ir
Received: 28 February 2018 Accepted: 20 May 2018

Abstract

Leptinotarsa decemlineata (Say) is a key pest of potatoes worldwide. Need for the new control methods are inevitable regarding undesirable effects of chemical pesticides. In this study inhibitory activities of seed extracts of some legume plants were investigated on α-amylase activity of Colorado potato beetle larvae and adults. Enzyme and inhibitory activities were measured by using diagnostic α-amylase Kit (Pars Azmon, Iran). Percent of inhibition was calculated by comparing activity in control and inhibitor incubated enzyme solutions. Among 17 legumes seeds (8 bean and 2 pea genotypes, lentil, vetches, broad bean, peanut, tamarind, sainfoin and alfalfa), four genotypes of *Phaseolus vulgaris* L. (Pinto bean, green bean, kidney bean and white bean) as well as tamarind, had high inhibitory activity against the enzyme in comparison with the other studied legumes. In this study three fractions of five effective legumes prepared by precipitation of proteins in 0-20, 20-40 and 40-60% Ammonium sulfate. Three concentrations of inhibitors (1, 0.7 and 0.3 mg protein/ml) were compared for inhibitory activity. Overall 20-40 and 40-60% fractions of all five selected legumes had more inhibitory activity compared to 0-20 fraction (70-90% inhibition *vs.* 5-30%). In the studied range of concentrations, the inhibitory activity was concentration dependent and increased by increasing the concentration of inhibitors in constant concentration of enzyme. Crude proteinaceous extracts and fractions of different types of beans evaluated in this study showed high inhibitory activity against alpha-amylase of last larval instar and adults of *Leptinotarsa decemlineata* (Say).

Keywords: α-amylase, Ammonium sulfate, Bean genotypes, *Leptinotarsa decemlineata*, Protein extract.