Archive of SID.ir

مقاله تحقیقی

تأثیر عصاره پروتئینی بذور چند گیاه بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و ویژگی‌های زیستی کرم غوزه پنبه

اسماعیل امجدی نظرلو[۱]، مقصود پژوهنده[۲]، سولماز عظیمی[۳]، رعنا ولیزاده کامران[۴]

۱ و ۴- دانش آموخته، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

۲ و ۳- دانشیار، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

مسئول مکاتبات: سولماز عظیمی، ایمیل: s_azimi2007@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۲ ۹(۱) ۴۷-۵۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۲

چکیده

در پژوهش پیش رو، اثر عصاره پروتئینی بذر اقاقیا (*Robinia pseudoacacia*)، ماشک خوشه‌ای (*Vica villosa*)، یونجه (*Medicago sativa*) و عدس (*Lens culinaris*) در شرایط آزمایشگاهی به‌صورت برون تنی و درون تنی روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و طول دوره لاروی کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner)، بررسی‌شد. چهار غلظت (۱۴، ۱۳/۱۵، ۱۰/۰۵ و ۹/۷ میکروگرم) از عصاره پروتئینی بذر اقاقیا، ماشک خوشه‌ای، یونجه و عدس، عصاره اقاقیا در مقایسه با دیگر عصاره‌های پروتئینی بیشترین اثر مهارکنندگی را نشان داد. بالاترین مهارکنندگی آنزیم تحت تاثیر هر چهار مهارکننده در pH برابر ۹ مشاهده شد.آنالیز زایموگرام در تأیید سنجش کمی آنزیم، مهار آنزیم آلفا-آمیلاز را در کاهش ضخامت باند نشان داد. در بالاترین غلظت از عصاره پروتئینی بذر یونجه، ۴۹٪ مهار آنزیم مشاهده شد. در حضور مهارکننده اقاقیا در غلظت ۴۱ میکروگرم بر میلی لیتر، ۷۶٪ فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز کاهش یافت. آنزیم آلفا آمیلاز با غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی عدس سنجش شد و یک روند مهارکنندگی وابسته به غلظت به دست آمد در بالاترین غلظت، ۵۱٪ مهار آنزیم مشاهده شد. همچنین چهار غلظت مختلف مهارکننده ماشک گل‌خوشه‌ای هم با عصاره آنزیمی سنجش شد و در بالاترین غلظت ماشک گل خوشه‌ای، ۶۱٪ درصد مهار آنزیم مشاهده شد. نتایج به دست‌آمده نشان داد که فعالیت آنزیم آمیلاز از سن دو به بعد و پس از تغذیه از تیمار اقاقیا نسبت به سایر تیمارها کاهش معنی‌داری داشت. همچنین طول دوره لاروی در تیمار اقاقیا (۱/۱۲±۴۹/۰۳ روز) در مقایسه با دیگر تیمارها به طور معنی‌داری طولانی‌تر بود. مطالعات مهارکنندگی نشان داد که عصاره پروتئینی بذر اقاقیا توان مهارکنندگی خوبی برای آنزیم آمیلاز این آفت داشت.

واژه‌های کلیدی: آنزیم گوارشی، روده، بازدارنده آنزیم، کرم غوزه پنبه

مقدمه

کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep: Nouctuidae) آفتی پلی‌فاژ با پراکنش جهانی است که به بسیاری از گونه‌های گیاهی در نقاط مختلف جهان حمله می‌کند (Fathipour & naseri, 2011). دیاپوز اختیاری، تحرک بالا، مهاجرت و طول مدت کوتاه یک نسل توانایی زیستن این آفات در شرایط سخت را افزایش داده است (Kotkar, 2012). همچنین استفاده بی رویه از آفت‌کش‌ها و توسعه سطح زیر کشت گیاهان تراریخته Bt منجر به افزایش مقاومت این آفت در برابر حشره‌کش‌ها و گیاهان تراریخته شده است (Liangxuan *et al*., 2021). بنابراین محققان همواره در حال جستجوی موثرترین روش کنترل جمعیت آفت مذکور هستند. در سال‌های اخیر تلاش‌های بیشماری انجام شد تا روش‌های موثر برای کنترل

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

این آفت جایگزین شود. در این راستا، نقش مهم آنزیم‌ها در تعیین رژیم غذایی، سم‌زدایی و مهار سیستم دفاع گیاه، توجهات را به سوی بررسی آنزیم‌های گوارشی و ارایه راهکار جدید مدیریتی جلب کرد(Da Lage *et al*., 2018).

بازدارنده‌های آنزیمی به عنوان بخشی از مکانیسم‌های دفاع طبیعی در برابر آفات توسط گیاهان تولید می‌شوند و در فرایند هضم دستگاه گوارش حشرات اختلال ایجاد می‌کنند (Ahmed *et al*., 2021; Valencia *et al*., 2000). از این نظر، مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات که از گیاهان و قارچ‌ها استخراج می‌شوند، قابلیت بالایی در کنترل آفات دارند (Mehrabadi *et al*., 2010; Ozgur *et al*., 2015; Qayyum *et al*., 2015). پژوهش‌ها نشان داده بذوری که دارای درصد بالای کربوهیدرات می‌باشند، حاوی بازدارنده آلفا-آمیلاز و بذوری که دارای درصد بالای پروتئین می‌باشند حاوی بازدارنده پروتئاز می‌باشند (Franco *et al*., 2002). هدف اصلی بازدارنده‌های آنزیم‌های کربوهیدراز، اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در حشرات می‌باشند. آنزیم‌های تجزیه‌کننده کربوهیدرات از جمله آلفا آمیلاز و گلوکوزیدازها درصدر مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی هستند که با هیدرولیز نشاسته و دی ساکاریدها نقش اصلی را در گوارش حشرات ایفا می‌کنند (Parry, 1996; Marshal, 1975). این پروتئین‌ها دارای ترکیباتی هستند که با قرار گرفتن در جایگاه فعال آنزیم مانع ایجاد پیوند بین آنزیم و سوبسترا می‌شوند و در نتیجه باعث بازدارندگی فعالیت آنزیم می‌شوند (Esmaeili & Bandani, 2014). تاکنون، بازدارنده‌های آنزیمی از بذور گیاهان مختلف (گندم، جو، حبوبات، ذرت و غیره) استخراج و بعد از شناسایی ژن‌های کدکننده آن‌ها، عامل مقاومت به گیاهان منتقل شده‌اند. این بازدارنده‌ها باعث افزایش میزان مرگ و میر و عدم تمایل حشرات به گیاهان می‌شوند (Sasikiran *et al*., 2002).

لاروهای کرم غوزه پنبه برای هضم مواد غذایی مورد استفادهٔ خود که قسمت‌های مختلف گیاهان است نیازمند آنزیم‌های مختلف گوارشی به خصوص آمیلاز و پروتئازها هستند و مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی توانایی اختلال در تغذیه حشره را دارند. زمانی که عصاره پروتئینی یک مهارکننده در یک رژیم غذایی گنجانیده شود، اطلاعات مهمی را در مورد انتخاب موثرترین مهارکننده به‌عنوان فاکتورهای مقاومت در دستکاری ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح گیاهان ارائه می‌دهد. در این باره محققین اثبات کردند که وجود پروتئین مهارکننده در رژیم غذایی آفات صفات فیزیولوژیکی و زیستی آفات را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Azimi *et al*., 2020; Borzoui *et al*., 2017). تا امروز مطالعات زیادی در رابطه با اثر مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی گونه‌های مختلف گیاهی روی آنزیم‌های آمیلاز کرم غوزه پنبه صورت گرفته است، اما مطالعات هدفمند با بررسی اثرات مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی گونه‌های غیرمیزبان خانواده پروانه آساها روی آنزیم آمیلاز و فعالیت‌های زیستی این آفات چون طول دوره نشو و نما صورت نگرفته است. لذا در مطالعه حاضر، فعالیت مهارکنندگی عصاره پروتئینی چهار گونه گیاهی (اقاقیا *Robinia pseudoacacia*، یونجه *Medicago sativa*، عدس *Lenus culinaris* و ماشک گل خوشه‌ای *Vica villosa*) از تیره پروانه آساها روی فعالیت آنزیم آمیلاز لارو سن چهار کرم غوزه پنبه و همچنین هنگام ترکیب در غذای مصنوعی و اثر بر نشو و نمای این آفت بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

تخم‌های کرم غوزه پنبه از دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز گرفته شد. برای پرورش لاروهای کرم غوزه پنبه از غذای مصنوعی مبتنی بر لوبیای چشم بلبلی (۲۰۵ گرم پودر لوبیا چشم بلبلی، ۳۰ گرم پودر جوانه گندم، ۳۵ گرم مخمر، ۱۲ گرم آگار، ۳/۵ گرم اسید آسکوربیک، ۲/۲ گرم نیپاژین، ۱/۱ گرم اسید سوربیک، ۲/۵ میلی‌لیتر فرمالدهید، ۵ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان و ۸۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) استفاده شد. این حشرات در دمای ۳±۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) پرورش یافتند (Shorey & Hale, 1965).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

تشریح و جداسازی دستگاه گوارش

برای انجام آزمایش اثرات آنزیمی، از لاروهای همسن هر کدام از سنین مختلف (لارو سن اول تا ششم) *H. armigera* که زنده مانده‌اند به تعداد ۱۰ عدد ۴۸ ساعت بعد از پوست‌اندازی انتخاب شدند. لاروهای همسن به تفکیک روی یخ بی‌حس شدند، سطح شکمی بدن لارو با قیچی بریده شد و لوله گوارش با استفاده از پنس جدا گردید و درون میکروتیوب‌هایی با حجم ۲ میلی‌لیتر محتوی آب مقطر قرار گرفتند درون هر میکروتیوب تعداد ۱۰ عدد لوله گوارش کامل قرار داده شد.

استخراج آنزیم

برای استخراج عصاره آنزیم دستگاه گوارش، نمونه‌ها در داخل میکروتیوب با دقت له شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند بعد از این مرحله، محلول بالایی نمونه‌ها جدا شده و به‌عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Bandani *et al.*, 2009).

استخراج مهارکننده‌ها

عصاره‌های پروتئینی مورد استفاده از بذر اقاقیا *Robinia pseudoacacia*، یونجه *Medicago sativa*، عدس *Lenus culinaris* و ماشک گل خوشه‌ای *Vica villosa* در شرایط آزمایشگاهی استخراج شدند. استخراج هر یک از این عصاره‌ها بر اساس روش (Mehrabadi *et al.*, 2010) انجام شد. به‌طور خلاصه مقدار ۳۰ گرم بذر از هر کدام از بذرهای ذکر شده در بالا در ۱۰۰ میلی‌لیتربافر NaCl با مولاریتهٔ ۰/۱، مخلوط شد و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. مخلوط حاصل در دمای چهار درجه سلسیوس و به‌مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت g ۸۰۰۰ سانتریفوژ شدند. به‌منظور رسوب-دهی پروتئین با سولفات آمونیوم ۷۰ درصد اشباع مخلوط شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به آرامی هم‌زده شد. مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت g ۸۰۰۰ سانتریفوژ شدند. مخلوط سولفات آمونیوم-پروتئین، به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت g ۸۰۰۰ سانتریفوژ و رسوبات حاصله با دو میلی‌لیتر بافر Tris-Hcl (۰/۲ مولار، اسیدیته ۷) به صورت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۲۰ ساعت در درون آب مقطر دیالیز شد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سلسیوس داخل حمام آب گرم قرار داده شد به منظور اینکه آمیلازهای داخلی غیر فعال شوند.

بررسی مهار کننده‌های استخراج شده بر فعالیت آنزیم آمیلاز

برای بررسی اثر عصاره پروتئینی یونجه، اقاقیا، عدس و ماشک گل خوشه‌ای روی فعالیت آلفا-آمیلاز از غلظت‌های ۱۴، ۱۳/۱۵، ۱۰/۰۵ و ۹/۷ میکروگرم پروتئین هر چهار بذر ذکر شده، استفاده شد. غلظت‌های انتخابی بر اساس روش (Bradford, 1976) از بین غلظت‌های مختلف پروتین بذرها جدا شدند. غلظت‌های مختلف پروتئین هر یک از بذرها با عصاره آنزیمی به‌مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه شد. فعالیت آمیلولیتکی با استفاده از روش (Bernfeld, 1955) و (Baker, 1987) با اندکی تغییرات انجام شد. به این صورت که از نشاسته یک درصد به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. سپس معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) به مجموعه اضافه شد و برای مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. بعد از سرد شدن میزان ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه توسط دستگاه الایزا ریدر (ELX 808) فعالیت آنزیم آمیلاز (بر حسب میکرو مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش مهار کننده در ژل

جهت بررسی فعالیت کیفی آنزیم، و اثبات روند صحیح داده‌های حاصل از فعالیت آنزیم با دستگاه الایزادر، زایموگرام فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از روش ژل الکتروفورز Lameli (1970) با اندکی تغییرات انجام شد. به این صورت که از ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪ برای ژل جداکننده و از ۴٪ برای ژل متراکم کننده استفاده شد. در ژل

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

آمیلاز، ۱۰ میکرولیتر آنزیم و ۱۰ میکرولیتر مهارکننده را به مدت یک ساعت در حمام بن ماری قرار داده و سپس ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه به مخلوط حاصله اضافه و در نهایت در چاهک‌ها ریخته شدند، بارگذاری آنزیم در ولتاژ ۱۰۰ انجام شد پس از رسیدن رنگ آبی به انتها، ژل را از شیشه جدا کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱٪ تریتون X-100 قرار داده و سپس به مدت ۱/۵ ساعت در بافر گلایسین اسیدیته ۹ همراه با NaCl ۱۰ میلی‌مولار، $CaCl_2$ دو میلی‌مولار و نشاسته یک درصد (به عنوان سوبسترا) قرار گرفت. سپس ژل در محلول رنگی لوگول غوطه‌ور گردید. باندهای فعالیت آلفا-آمیلازی در زمینه تیره به‌صورت نوارهای روشن دیده می‌شوند.

تاثیر مهارکننده‌های استخراج شده بر زیست‌شناسی کرم غوزه پنبه

به منظور بررسی اثر عصاره‌های پروتئین‌های مختلف بذور مختلف بر برخی صفات زیستی کرم غوزه پنبه، تخم‌های هم سن از ماده‌های تخمگذار جمع‌آوری شدند و زمانی که تخم‌ها تفریخ شده و سن یک ظاهر شد به پتری دیش‌هایی با قطر هشت سانتی‌متر منتقل شدند و در شرایط محیطی ذکر شده نگهداری شدند. برای شروع آزمایش‌ها از ۱۳۰ لارو زنده هم‌سن به ازای هر تیمار استفاده شد. لاروها در شرایط آزمایشگاهی، دمای ۳±۲۶ درجه سلسیوس رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) مورد بررسی قرار گرفتند. در کف هر پتری دیش یک صافی مرطوب گذاشته شده بود که هر روز مرطوب و با غذای تازه جایگزین شدند. از جیره غذایی مصنوعی با وزن یکسان برای همه تکرارها استفاده شد. عصاره پروتئینی بذور مختلف ۱ درصد از وزن کل جیره غذایی لاروها را تشکیل می‌داد (Azimi *et al.*, 2020). بعد از تشکیل شفیره‌ها هر کدام را در ظرفی جداگانه نگهداری شد تا بر اساس ظهور افراد نر و ماده تفکیک و افراد نر و ماده جفت شدند و هر ۲۴ ساعت بعد میزان تخم‌های قرار داده شده تا زمان مرگ افراد ماده شمارش شدند. بازدیدها روزانه انجام و مشاهدات مربوط به طول دوره نشو و نما و تخمریزی ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این آزمایش چهار غلظت مربوط به عصاره پروتئینی بذرهای مورد آزمایش، بر اساس طرح کامل تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل با SAS 9.1 و گروه‌بندی داده‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Sigma plot 12 استفاده شد.

نتایج

نتیجه مهارکنندگی پروتئین‌های استخراج شده از چهار گیاه مختلف (شکل ۱) یک روند وابسته به غلظت را نشان می‌داد، به طوری در بالاترین غلظت از عصاره پروتئینی بذر یونجه، ۴۹٪ مهار آنزیم مشاهده شد. در حضور مهارکننده اقاقیا در غلظت ۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۷۶٪ فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز کاهش یافت. آنزیم آلفا آمیلاز با غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی عدس سنجش شد و یک روند مهارکنندگی وابسته به غلظت به دست آمد در بالاترین غلظت ۵۱٪ مهار آنزیم مشاهده شد. همچنین چهار غلظت مختلف مهارکننده ماشک گل‌خوشه‌ای هم با عصاره آنزیمی سنجش شد و در بالاترین غلظت ماشک گل خوشه‌ای، ۶۱٪ درصد مهار آنزیم مشاهده شد (شکل ۱). نتایج نشان می‌دهد که این مهارکننده‌ها می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای کنترل آلفاآمیلاز این حشره باشند.

بررسی اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی استخراج شده

میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز حشره توسط عصاره‌های پروتئینی گیاهان مختلف با تغییر اسیدیته تغییر کرد. بیش‌ترین میزان مهارکنندگی مربوط به اقاقیا و در اسیدیته ۹ به دست آمد. در بقیه گیاهان هم در اسیدیته ۹ مهارکنندگی بیش‌تری نسبت به دیگر اسیدیته‌ها به دست‌آمد و در اسیدیته ۶ همه گیاهان کم‌ترین میزان مهار را داشتند (شکل ۲). پایدار بودن یک مهارکننده در اسیدیته معیار

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مهمی برای انتخاب مهارکننده برای کنترل آفات هست. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش تاثیر اسیدیته بر میزان فعالیت و مهارآنزیم توسط مهارکننده‌ها که بیش‌ترین میزان مهار آنزیم توسط اقاقیا در اسیدیته ۹ به دست‌آمد و از آن‌جا که بیش‌ترین فعالیت آنزیم و اسیدیته بهینه فعالیت آمیلاز این حشره و اسیدیته کانال گوارشی این حشره در محدوده قلیایی و اسیدیته ۹ می‌باشد (Valencia *et al.*, 2008; Ozgur *et al.*, 2009)، این مهارکننده می‌تواند گزینه مناسبی برای مهار آلفا آمیلاز باشد.

سنجش مهارکنندگی در ژل

با روش طیف‌سنجی تاثیر عصاره‌های پروتئینی روی فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز مشخص شد. سنجش مهارکننده‌ها هم در ژل جهت بررسی مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی به صورت کیفی انجام‌گرفت (شکل ۳). برای این کار غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ها با آنزیم نگه‌داری شدند. سپس مهارکننده‌ها توسط ژل پلی‌آکریل‌آمید مورد بررسی قرارگرفت. با استفاده از نرم‌افزار Image j شفافیت باندها به صورت کمی و نسبت به شاهد مقایسه شد (شکل ۴).

نتایج کلی از این بررسی نشان می‌دهد که از بین سه باند فعال در تیمار شاهد، در عصاره پروتئینی اقاقیا و ماشک یک باند به طور کامل حذف شده است. همچنین در اقاقیا شدت باندهای اول و دوم در مقایسه با شاهد و بقیه باندها به طور چشم‌گیری کم شده است که نشان می‌دهد مهارکننده‌های استخراج شده از گیاهان مذکور اثر موثری در کاهش فعالیت آنزیم داشته است (شکل ۳). در عدس و یونجه هر سه باند مشاهده می‌شود ولی در مقایسه با شاهد از شدت باندها کم شده است. از آن‌جایی که گاهی کیفیت عکس ژل کاهش پیدا می‌کند و به طور چشمی نمی‌توان تشخیص داد، برای اولین بار از نرم افزار Image J برای کمی نشان دادن کیفیت ژل استفاده شد (شکل ۴). نتایج سنجش کیفی که در عکس ژل زایموگرام مشهود است کاملا با سنجش کمی مهارکننده‌گی آنزیم تطابق دارد، که پروتئین‌های استخراج شده از چهار گونه مربوط به پروانه آساها قادر به کاهش فعالیت آنزیم آمیلاز در مقایسه با شاهد می‌باشند.

اثر تغذیه از جیره غذایی حاوه عصاره پروتئینی بذور مختلف بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

نتایج مربوط به اثر تغذیه لاروهای سنین مختلف کرم غوزه پنبه از تیمارهای مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج آنزیمی نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در هر چهار تیمار از سن دوم تا ششم لاروی روند افزایشی داشت. در لاروهای سن دوم به بعد در تیمار اقاقیا در مقایسه با دیگر تیمارها کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم آمیلاز گوارشی مشاهده می‌شود. فعالیت آنزیمی در سن یک بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود اما از سن دوم بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود به‌طوری‌که تیمار اقاقیا *Robinia pseudoacacia* در مقایسه با سایر تیمارها اثر معنی‌داری در کاهش فعالیت آنزیم آمیلاز داشته است ($f_{58,4}=87.6$, $P<0.0001$).

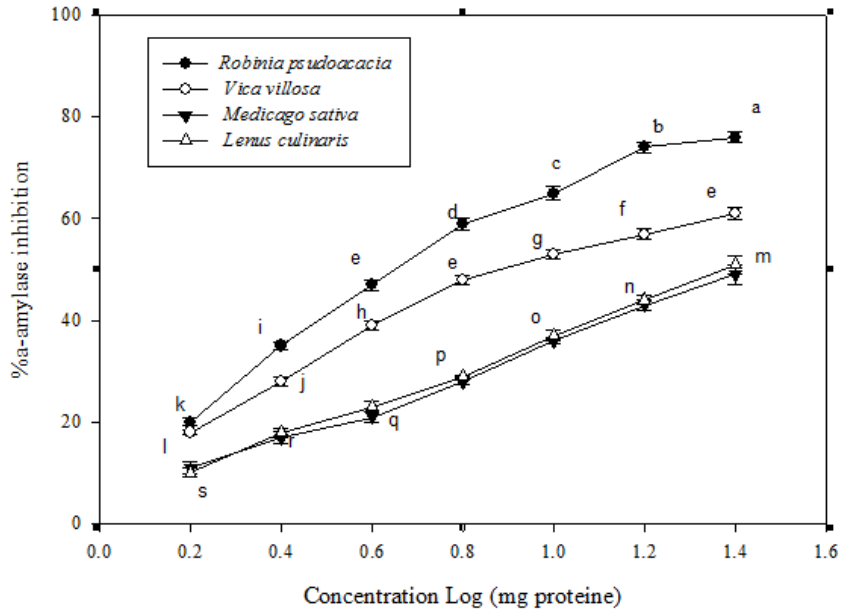
بررسی اثر تغذیه از جیره غذایی حاوه عصاره پروتئینی بذور مختلف بر ویژگی‌های زیستی لاروی

بررسی حاضر نشان داد که لاروهای سن دو با تغذیه از تیمار اقاقیا بعد از چهار روز، حدود ۳۲ درصد مرگ و میر داشتند که در مقایسه با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($f_{120,4}=32.1$, $P<0.0001$). همچنین درصد مرگ میر در بین سه تیمار شاهد، یونجه و عدس به‌ترتیب ۰/۹۵±۱۰، ۱۱/۹۸±۰ و ۰/۹۵±۱۰ ثبت شد که اختلاف تفاوت معنی‌دار بین این تیمار مشاهده نشد. طول دوره رشدی لاروهای غوزه پنبه به تفکیک هر سن ثبت شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تغذیه از تیمار اقاقیا به طور معنی‌داری باعث افزایش طول دوره لاروی در هر سن لاروی شد. طول کل دوره لاروی در تیمار اقاقیا به طور معنی‌داری ($f_{112,4}=35.11$, $P<0.0001$) در مقایسه با سایر تیمارها طولانی‌تر بود. کل دوره لاروی در تیمار اقاقیا ۱/۱۲±۴۹/۰۳ روز ثبت شد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

کوتاهترین طول دوره لاروی مربوط به تیمار شاهد بود که ۲۳/۱±۸۳/۰۹ روز ثبت شد. طول دوره لاروی بین تیمار یونجه و عدس و ماشک خوشه‌ای تفاوت معنی‌داری مشاهد نشد. طول دوره لاروی و میزان تخمریزی افراد ماده مربوط به تیمارهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد میانگین کل تخم‌های گذاشته شده بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($f_{76,4}$=32.1 , P<0.0001). کمترین میزان تخمریزی کل و روزانه مربوط به تیمار اقاقیا بود. بین تیمار یونجه و عدس اختلاف معنی‌دار نبود و تیمار ماشک خوشه‌ای بعد از تیمار اقاقیا کمترین میزان تخمریزی را داشت.

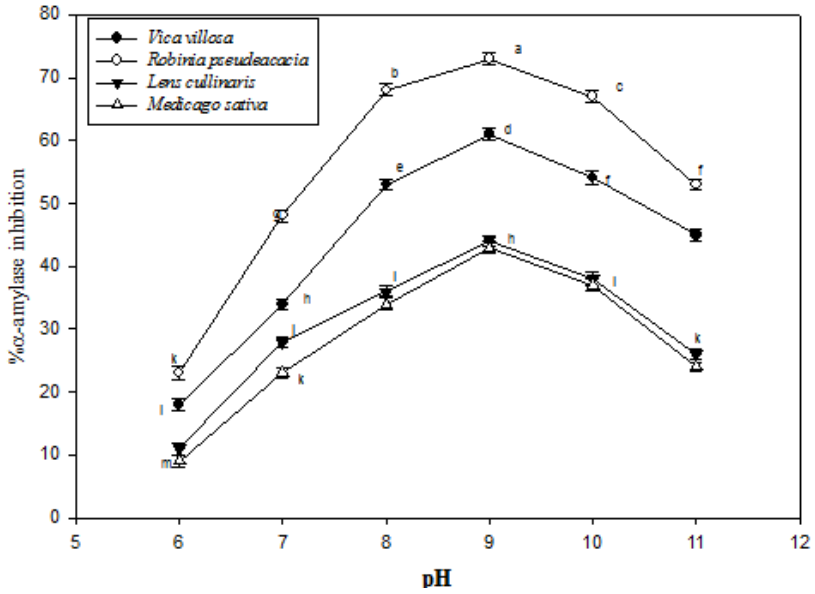


شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف پروتئین اقاقیا *R. pseudoacacia*، یونجه *M. sativa*، عدس *L. culinaris* و ماشک گل خوشه‌ای *V. villosa* برمیزان مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز لوله گوارش لارو سن چهارم کرم غوزه پنبه

Fig. 1. Effect of different concentrations of acacia *R. pseudoacacia*, alfalfa *M. sativa*, lentil *L. culinaris* and *hairy* vetch *V. villosa* on the fourth larvae of *H. armigera* α-amylase activity

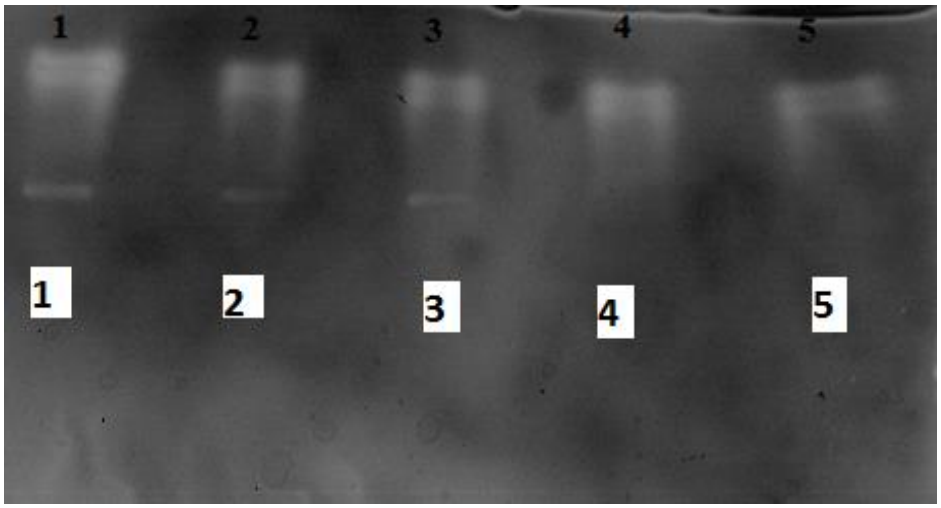
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ۲- اثر pH بر میزان مهارآنزیم آلفا-آمیلاز لوله گوارش لارو سن چهارم کرم غوزه پنبه توسط عصاره پروتئینی اقاقیا *R. pseudoacacia*، یونجه *M. sativa*، عدس *L. culinaris* و ماشک گل خوشه‌ای *V. villosa*

Fig. 2. Effect of different pH values on the fourth larval instars of *H. armigera* α-amylase activity in presence of acacia *R. pseudoacacia*, alfalfa *M. sativa*, lentil *L. culinaris* and *hairy* vetch *V. villosa* extracts

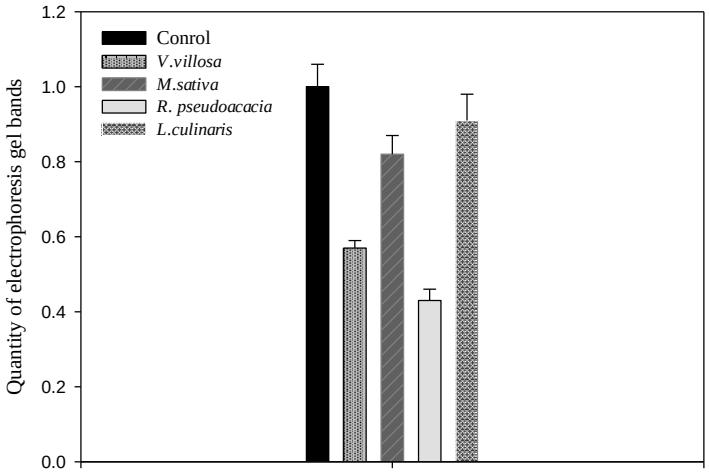


شکل ۳- بررسی اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی به ترتیب از چپ، تیمار (۱)، شاهد (۲)، عدس *L. culinaris* (۳)، یونجه *M. sativa* (۴) ماشک *V. villosa* و (۵) اقاقیا *R. pseudoacacia* روی کرم غوزه پنبه در ژل الکتروفورز

Fig. 3. Gel electrophoresis assay of the effect of control (1) and lentil *L. culinarys* (2), alfalfa *M. sativa* (3), hairy vetch *V. villosa* (4), acacia *R. pseudoacacia* (5) extracts on the of the bollworm α-amylase activity

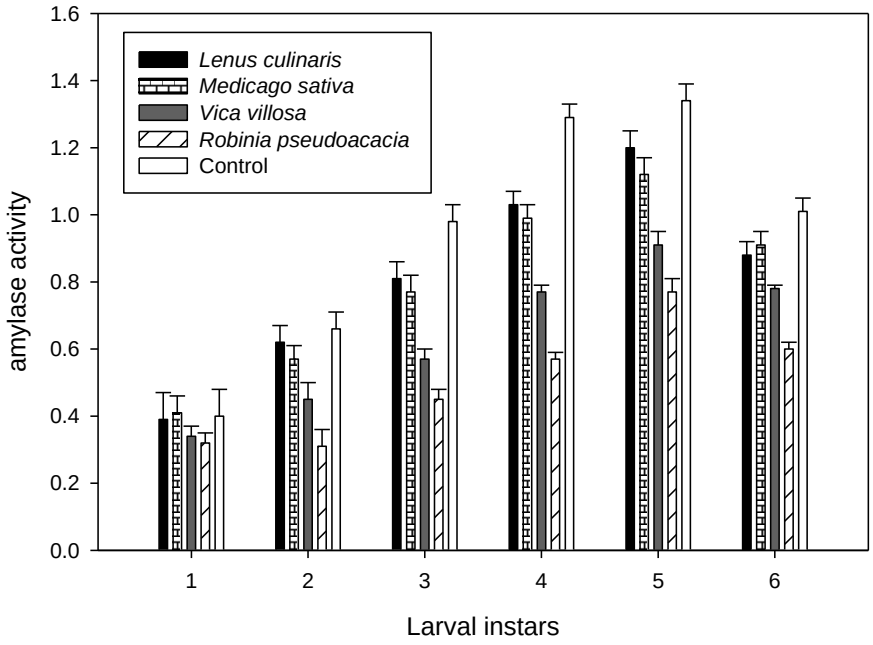
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ۴- مقایسه اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی پنج تیمار مختلف، اقاقیا *R. pseudoacacia*، یونجه *M. sativa*، عدس *L. culinaris*، ماشک گل خوشه‌ای *V. villosa* و شاهد به‌صورت کمی‌سازی باندهای ژل الکتروفورز با استفاده از نرم افزار Image j

Fig. 4. Comparison of the inhibitory effect of protein extract on five different treatments, acacia *R. pseudoacacia*, alfalafa *M. sativa*, lentil *L. culinaris* and hairy vetch *V. villosa* extracts and control by quantification of gel electrophoresis bands using Image j software



شکل ۵- فعالیت آنزیم آمیلاز (بر حسب میکرو مول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) سنین مختلف لاروهای *H. armigera* که از تیمارهای اقاقیا *R. pseudoacacia*، یونجه *M. sativa*، عدس *L. culinaris* و ماشک گل خوشه‌ای *V. villosa* تغذیه کرده‌اند.

Fig. 5. Amylase enzyme activity (µmol min-1 mgr-1 protein) of different larval instar of *H. armigera* feed on acacia *R. pseudoacacia*, alfalfa *M. sativa*, lentil *L. culinaris* and hairy vetch *V. villosa* extracts.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۱- طول دوره (SE ± میانگین) لاروی سنین مختلف و درصد مرگ و میر لارو سن دوم و تعداد تخم کل (SE±میانگین) حشره ماده روی تیمارهای مختلف

Table 1. Mortality percentage of second instar larvae and developmental period (day) (Mean ±SE) of different larval stages and total oviposition (mean±SE) *H. armigera* reared on different treatments

Traetment	First instar (day)	Second Instar (day)	Third instar (day)	Fourth instar (day)	Fifth instar (day)	Sixth instar (day)	Total larval period (day)	Mortality%	Total number of eggs
Robinia pseudoacacia	5.3±0.51 a	8.17±0.43 a	9.06±1.01 a	11.4±1.01 a	8.25±0.23 a	7.12±0.43 a	49.30±1.12 a	3.1a±32	19.14±1.04 c
Vica villosa	3.46±0.31 b	5.37±0.17 b	6.7±0.87 b	10.46±0.54 b	7.01±0.23 b	5.32±0.31 b	38.23±2.98 b	3.7b±14	21.20±0.96 b
Medicago sativa	2.7±0.61 c	3.34±0.36 c	5.01±0.16 c	8.42±0.48 c	4.5±0.14 c	3.47±0.14 c	27.26±0.92 c	0.98c±11	32.57±1.43 a
Lenus culinarys	2.95±0.43 c	3.33±0.63 c	5.11±0.32 c	8.32±0.74 c	4.31±0.42 c	3.33±0.36 c	27.25±1.83 c	1.56c±10	31.86±2.01 a
Control	3.15±0.43 c	3.12±1.12 c	5.11±0.32 c	7.45±1.03 c	4.56±0.69 c	3.46±0.28 c	23.83±1.09 d	0.95c±10	34.01±2.67 a
f	0.88	0.41	1.21	0.75	0.48	0.58	35.11	32.1	15.48
p	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

بحث

بررسی این تحقیق روی مهار آنزیم آلفاآمیلاز نشان داد که روند مهار وابسته به غلظت است به‌عنوان مثال در مطالعات پیشین عصاره پروتئینی بذر تریتیکاله بر روی کرم غوزه پنبه را بررسی و مشاهده کردند که در بالاترین غلظت از عصاره پروتئینی (۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ۷۰٪ مهارکنندگی مشاهده شد و در پایین‌ترین غلظت (۱/۰۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) ۳۰٪ مهار آنزیم آلفاآمیلاز مشاهده شد (Dastranj & bandani, 2014). همچنین عصاره پروتئینی بذر تریتیکاله را روی آنزیم آلفا آمیلاز سن گندم مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد که در بالاترین غلظت مهارکننده، فعالیت آنزیم تا ۸۰٪ مهارشد و روند مهارکنندگی وابسته به غلظت بود (Mehrabadi *et al.*, 2010).

در یک بررسی عصاره پروتئینی سه رقم لوبیا و سه رقم گندم را بر روی آلفاآمیلاز کرم غوزه بررسی و گزارش کردند که رقم لوبیای صدری و درخشان به ترتیب ۶۴/۹۹٪ و ۶۹/۵۸٪ باعث مهار آنزیم حشره شدند ولی رقم شکوفا مهارکنندگی قابل توجهی نداشت. در بین عصاره‌های پروتئینی ارقام گندم هم رقم MV17 در بالاترین غلظت ۵۴/۸۶ ٪ مهارکنندگی داشت و دو رقم سیوند و افلاک به ترتیب ۲۸/۷۵٪ و ۳۹/۷۹٪ مهارکنندگی داشتند (Majidiani *et al.*, 2014). ویژگی‌های زیستی حشرات از قبیل نشو و نما مراحل نابالغ، بقا، طول دوره بلوغ و تولید مثل و به طور کلی مؤلفه‌های رشد جمعیت حشرات تحت تأثیر نوع غذای دریافتی می باشد و عوامل متعددی مطلوبیت گیاه میزبان را برای تغذیه، نشو و نما و ایجاد جمعیت نسل بعد توسط حشرهٔ آفت تحت تأثیر قرار میدهند که از آن جمله می‌توان به نوع و میزان عناصر غذایی گیاه، ترکیبات اولیه و ترکیبات شیمیایی ثانوی گیاه، سختی بافت‌های مورد تغذیه و توانایی هضم و جذب غذای خورده شده توسط حشره اشاره نمود (Majd-Marani *et al.*, 2017). بنابراین حشرات آفاتی که دامنه میزبانی وسیع دارند، در برابر ترکیبات مهارکنندگی بسیاری از گیاهان مقاوم هستند بنابراین محققان به دنبال یافتن ترکیبات مهار کننده در گیاهانی هستند که میزبان یا ترجیح میزبانی حشره همه چیزخوار نباشد.

تا امروز تحقیقات اندکی در مورد اثر مهارکننده‌های گیاهی روی آنزیم‌های گوارشی حشرات در شرایط درون تنی (*in vivo*) صورت گرفته است. در تحقیقی که اخیرا انجام شده است نشان داده شد که لارو بید غلات *Sitotroga cerealella* دارای فعالیت آمیولیتیتیک است که در شرایط آزمایشگاهی توسط گیاه مریم گلی *Salvia*

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

officinalis مهار شد. مطابق با این مطالعات، نتایج این مطالعه نشان داد که مهارکننده بذر گیاه مریم گلی در کاهش بقا، رشد و نمو لارو مؤثر است (Borzooui *et al.*, 2017). در تحقیق مشابه نشان داده شد که تغذیه لاروهای *S. cerealella* با غلظت ۱ و ۵ درصد عصاره پروتئینی سویا، به‌ترتیب منجر به افزایش ۱۲ و ۲۱ درصد زمان رشد تغذیه شد (Shukle & Wu, 2003). براساس گزارش‌های اخیر سطح مهارکننده‌ها و اندازه بذر تأثیر مهمی در طول دوره رشدی و بقای بید غلات دارد و همچنین نشان دادند که رژیم‌های غذایی با سطح مهارکننده‌ها بالاتر و اندازه بذر کوچک‌تر میزبان نامناسبی برای آفت بودند (Borzooui & naseri., 2017).

وجود غلظت ۴۱ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از مهارکننده اقاقیا، در کانال گوارشی لارو سنین مختلف کرم غوزه پنبه یا معادل ۱ درصد از وزن کل جیره می‌تواند ۷۱ درصد آلفاآمیلاز حشره را مهار و میزان مرگ و میر و میزان زنده‌مانی لاروها را تحت تاثیر قراردهد. بنابراین با مطالعات بیش‌تر و شناسایی ژن‌های رمزکننده این مهارکننده‌ها و با بیان و بررسی پروتئین‌های تولید شده از این ژن ها در شرایط آزماشگاهی و با بررسی تاثیر این پروتئین‌های تولید شده بر روی حشرات می‌توان قدم موثری برای استفاده از این بیومولکول‌ها در کنترل حشرات و آفات برداشت.

در بررسی‌هایی که انجام شده است نشان داده شده که کیفیت و کمیت غذای خورده شده نقش مهمی در نشو و نما، زنده‌مانی، تولیدمثل و افزایش جمعیت نسل بعد حشره ایفا می‌کند (Borzoui *et al.*, 2013). براساس گزارش‌های محققین سطح مهارکننده‌ها و اندازه بذر تأثیر مهمی در طول دوره رشدی و بقای بید غلات دارد (Borzoui & Naseri, 2016). آن‌ها بیان کردند که رژیم‌های غذایی با سطح مهارکننده‌ها بالاتر و اندازه بذر کوچک‌تر میزبان نامناسبی برای آفت بودند. در این بررسی‌ها به نظر می‌رسد پروتئین مهارکننده اقاقیا تاثیر بیشتری بر ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژیک لاروهای کرم غوزه پنبه دارد، اگر چه حساسیت لارو کرم غوزه پنبه ممکن است به علت تفاوت در ویژگی‌های فردی باشد و نمی‌توان به طور قطع نظر داد و مستلزم بررسی‌های بیشتری است (Yoshinori & Harryk, 1993).

References

Ahmed, S., Zi, A., Mehmood, S.A., Panhawar, W.A., Khan, W., Shah, M. & Ullah, I. 2021. Change in malate dehydrogenase and alpha amylase activities in *Rubus fruticosus* and *Valeriana jatamansi* treated granary weevil, *Sitophilus granarius*. Brazilian Journal of Biology, 81(2): 387–391.

Azimi, S., Rahmani, Sh. & Pazhouhandeh, M. 2020. Effect of protein extracts of *Amaranthus retroflexus* (Amaranthaceae) and *Cuminum cyminum* (Apiaceae) on digestive proteinases and biological characters of *Helicoverpa* (Heliothis) *armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Canadian Entomologist, 16: 1–17.

Baker, J. 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, AR., Kazzazi, M. & 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, 149–158.

Bird, L. J. 2017. Genetic, cross-resistance and synergism of indoxocarb resistance in Helicoverpa armigera (Lep: Nocttouidae) pest management science, 73: 575–581.

Borzoui, E., Bandani, A.R. & Goldansaz, S.H. 2013. Effect of cereal seed proteinaceous extracts on α-amylase and protease activity of salivary glands of Carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Crop Protection, 2(3): 285–296.

Borzoui, E., Naseri, B. & Namin, FR. 2015. Different diets affecting biology and digestive physiology of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). Journal of Stored Products Research, 62: 1–7.

Borzoui, E., Nouri Ganbalani, G. & Naseri, B. 2017. In Vitro and In Vivo Effects of α-Amylase Inhibitor From Avena sativa Seeds on Life History and Physiological Characteristics of Sitotroga cerealella (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Insect Science, 17(6): 13–28.

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.

Da Lage, J. 2018. The Amylases of Insects. International Journal of Insect Science, 10: 1–14.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Dastranj, M., Bandani, AR. & 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.

Dastranj, M. & Bandani, A. 2012. Effect of proteinaceous extract of triticale seed extract on α-amylase activity of *Helicoverpa armigera*. Plant Pests Reaserch, 2(1): 49–57. (In Persian with English summary).

Esmaeili, M., Bandani, AR. 2016. Effect of Mung bean, Pea and Wheat Proteinaceous Seed Extracts on Amylase Activity of the *Pieris brassicae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae). Journal of Applied researches in Plant Protection. 4(2): 1–14. (In Persian with English summary).

Fathipour, Y. & Naseri, B. 2011. Soybean Cultivars Affecting Performance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). In: Ng, T. B. (Ed.), Soybean Biochemistry, Chemistry and Physiology. InTech, Rijeka, Croatia, 599–630.

Kotkar, H.M., Bhide, A.J., Gupta, V.S. & Giri, AP. 2012. Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. Gene, 501: 1–7.

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

Liangxuan, Q., Hanyang, D.J., Huiwen, Sh., Fang, G., Yihua, Y., Tabashnik, B. & Yidong, Wu. 2021. Evaluating Cross-Resistance to Cry and Vip Toxins in Four Strains of *Helicoverpa armigera* With Different Genetic Mechanisms of Resistance to Bt Toxin Cry1Ac. Frontiers in Microbiology, 17: 1–9.

Majidiani, S., Farshbaf, R. & Bandani, AR. 2014. 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.

Majd-Marani, S., Naseri, B., Nouri-Ganbalani, G. & Borzoui, E. 2017. The effect of maize hybrid on biology and life table parameters of the *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). Journal of Economic Entomology, 110: 1916–1922.

Marshall, J.J. & Lauda, C.M. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α-amylase, from the *kidney bean, Phaseolus vulgaris*. Journal of Biological Chemistry, 250(20): 8030–8037.

Mehrabadi, M., Bandani, AR. & Saadati, F. 2010. Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, α-amylases by α-amylase inhibitors (T-αAI) from Triticale. Journal of Insect Science, 10: 1–13.

Mehrabadi, M., Bandani, AR. & Alizadeh, H. 2012. Inhibition activity of proteinaceaus amylase inhibitors from triticale seeds against *Erygaster integriceps* salivary amylase: Interaction of the inhibitors and the insects. Pesticides Biochemistry and physiology, 102(3): 220–228.

Özgür, E., Yücel, M. & Öktem, HA. 2009. Identification and characterization of hydrolytic enzymes from the midgut of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 33: 285–294.

Parry, M. 1996. A study of the interaction of some fungal metabolites with the insect species *Drosophila melanogaster*" Birkeck college. University of London, 215.

Qayyum, M.A., Wakil, W., Arif, M.J., Sahi, S.T., Saeed, N.A. & Russell, D.A. 2015. Multiple resistances against formulated organophosphates, pyrethroids, and newer-chemistry insecticides in populations of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. Journal of Economic Entomology, 108: 286–293.

Valencia, A., Bustillo, AE, Ossa, G.E. & Chrispeels, MJ. 2000. α-Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect biochemistry and molecular biology, 30: 207–213.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Effect of some plant seeds protein extract on α-amylase activity and some biological parameters of cotton bollworm

Esmaeil Amjadi Nazarlo[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2], Solmaz Azimi[3], Rana Valizadeh Kamran[4]

1, 4. Graduate student, Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
2, 3. Associate Professor, Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
Corresponding author: Solmaz Azimi, email: s_azimi2007@yahoo.com

Received: Sept., 12, 2020 9(1) 47–58 Accepted: Feb., 11, 2022

Abstract

In the present study, effect of seed protein extracts of *Robinia pseudoacacia*, *Medicago sativa*, *Lens culinaris* and *Vica villosa* were studied (*in vitro* and *in vivo*) on alpha-amylase activity of boll worm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). Effect of 4 concentrations (14, 13.15, 10.05 and 9.7 µg) of protein extract of the mentioned plants showed the greatest inhibitory effect. The highest inhibition of the enzyme was observed under the influence of all four inhibitors at pH value equal to 9. Zymogram analysis in confirmation of enzyme quantification showed inhibition of alpha-amylase in reducing band thickness. At the highest concentration of alfalfa seed protein extract, 49% enzyme inhibition was observed. In the presence of acacia inhibitor at a concentration of 41 µg / ml, 76% of alpha-amylase activity was reduced. Alpha-amylase was assayed at different concentrations of lentil protein extract and a concentration-dependent inhibitory process was obtained at the highest concentration of 51% enzyme inhibition. Also, four different concentrations of hairy vetch inhibitor were measured with enzymatic extract and in the highest concentration of hairy vetch, 61% of enzyme inhibition was observed. Amylase activity in digestive lumen after the second larval instar in acacia treatment showed significant reduction. Total larval longevity in acacia treatment (49.03±1.12) had significantly longer life time in comparison with other treatments. Thus, the seed extract of *R. pseudoacacia* had high inhibitory activity for the α-amylase of this pest.

Keywords: digestive enzyme, cotton bollworm, gut, enzyme inhibitor

Archive of SID.ir