تحقیقات آفات گیاهی
جلد ۲/شماره ۳/سال ۱۳۹۱

مقایسه اثر عصاره پروتئینی استخراج‌شده از بذر سه گونه گیاهی روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز غدد بزاقی سن گندم

وحید رحیمی النگی[۱] و علیرضا بندانی[۲]*

۱ و ۲ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۷)

چکیده

سن معمولی گندم، *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) یکی از آفات مهم گندم و جو است که از دانه‌های آن‌ها تغذیه می‌کند، بنابراین این آفت در محیطی غنی از کربوهیدرات زندگی می‌کند و برای بقای خود، وابستگی بسیار زیادی به آنزیم‌های کربوهیدراز دارد. آنزیم آلفا-آمیلاز نقش مهمی در گوارش سن گندم بر عهده دارد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر عصاره‌ی پروتئینی دانه‌های گیاهان لوبیا، برنج و نخود، روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز می‌باشد. برای این منظور، عصاره‌های پروتئینی دانه‌های ذکر شده، با استفاده از کلرید سدیم ۰/۱ مولار استخراج شد. عصاره‌های استخراج‌شده در پنج غلظت ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر روی فعالیت آلفا-آمیلاز در شرایط *In vitro* آزمایش شدند. نتایج نشان داد که عصاره های لوبیا و نخود، روی فعالیت آلفا-آمیلاز مؤثر بوده و اثر آن‌ها وابسته به دز مصرفی می‌باشد؛ یعنی با افزایش دز، میزان مهار آنزیم آلفا-آمیلاز نیز افزایش می‌یابد. برای مثال در پایین‌ترین غلظت، عصاره‌های لوبیا و نخود به ترتیب باعث مهارآنزیم آلفا-آمیلاز به مقدار ۵ و ۲۰ درصد شدند در حالی که در بالاترین دز مصرفی (دو میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر)، عصاره‌های لوبیا و نخود به ترتیب باعث مهار آنزیم به میزان ۳۰ و ۴۰ درصد شدند. عصاره‌ی استخراج شده از دانه‌ی برنج، هیچ‌گونه اثر معنی‌داری در مهار فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز از خود نشان نداد. این داده‌ها نشان دادند که عصاره‌ی پروتئینی دانه‌های نخود و لوبیا، پتانسیل خوبی برای مهار آنزیم آلفا-آمیلاز سن گندم دارند.

واژه های کلیدی: سن گندم، آنزیم آلفا-آمیلاز، عصاره‌ی پروتئینی دانه‌ها

*نویسنده مسئول: abandani@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

سن معمولی گندم، *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) یکی از آفات مهم گندم و جو می‌باشد که از کلیه‌ی مناطق ایران به جز قسمتی از خوزستان، نوار باریکی از حاشیه‌ی دریای عمان و خلیج فارس و دریای خزر گزارش شده است. این حشره نه تنها در ایران بلکه در سایر نقاط دنیا مانند کشورهای دیگر خاور میانه، غرب آسیا و کشورهای تازه استقلال‌یافته آسیای مرکزی نیز آفت مهم گندم است. این آفت همچنین در کشورهای جنوب اروپا و شمال آفریقا نیز دیده می‌شود (Radjabi, 2000). در مناطقی که آلودگی خیلی زیاد باشد، خسارت به محصول به ۱۰۰ درصد هم می‌رسد (Allahyari *et al*., 2010). سن گندم با تغذیه از برگ‌ها، ساقه‌ها و دانه‌های غلات می‌تواند خسارت کمی و کیفی به محصول وارد کند.

در گذشته‌های دور که استفاده از حشره‌کش‌ها در کنترل سن معمولی گندم متداول نبود، خسارت این آفت در سال-های طغیانی در برخی از نقاط مانند ورامین، لنجان اصفهان و مناطقی از استان‌های کرمانشاه و فارس، به صددرصد می-رسید (Radjabi, 2000). به همین دلیل در حال حاضر سالانه صدها هزار هکتار از مزارع گندم کشور، علیه این آفت سمپاشی می‌شود که متضمن صرف هزینه‌ی هنگفتی برای دولت و کشاورزان می‌باشد؛ اگرچه سمپاشی توانسته مقدار زیادی از صدمه‌ی این آفت به مزارع را کاهش دهد ولی بروز مسائل زیست محیطی در ارتباط با کاربرد سموم شیمیایی و از طرف دیگر ایجاد مقاومت علیه آفت‌کش‌های به کار گرفته شده موجب شده است که توجه به سایر روش‌های کنترل غیر شیمیایی بیشتر شود. در نتیجه از روش‌های دیگر کنترل مانند بازدارنده‌های آنزیم آلفا آمیلاز، بازدارنده‌های آنزیم های پروتئاز، لکتین‌ها و توکسین باکتری استفاده شده تا مصرف حشره‌کش‌ها کاهش یابد.

سن گندم مانند دیگر حشراتی که از گیاهان غنی از نشاسته تغذیه می‌کند، وابسته به آنزیم آلفا آمیلاز جهت هضم نشاسته است، زیرا این آنزیم باعث هضم نشاسته شده و آن را به قطعات مالتوز و یا دیگر ترکیبات کوچک الیگومری تبدیل می‌کند تا بوسیله آلفا-گلوکوزیدازها به گلوکز تبدیل شده و قابلیت جذب از دیواره کانال گوارشی را پیدا کنند. بنابراین آنزیم آلفا-آمیلاز می‌تواند مولکول هدف خوبی برای بازدارنده‌های آنزیمی باشد (Franco *et al*., 2002; Svensson *et* al., 2003; Sivakumar *et al*., 2006; Mehrabadi *et al*., 2012).

سن گندم از دانه‌های گندم تغذیه می‌کند، بنابراین این آفت در محیطی غنی از کربوهیدرات زندگی می‌کند و وابستگی بسیار زیادی به آنزیم‌های کربوهیداز دارد. آنزیم آلفا-آمیلاز از جمله مهم‌ترین آنزیم‌های کربوهیدراز است که نقش مهمی در گوارش سن گندم بر عهده دارد.

شش گروه مختلفی از بازدارنده های آلفا آمیلاز شناسایی شده‌اند این گروه‌ها ساختمان متنوعی داشته در نتیجه دارای مکانیسم اثر گوناگونی می‌باشند و به همین دلیل دارای خاصیت اختصاصی هم هستند. خاصیت اختصاصی‌بودن مهم زیرا این ترکیبات نباید روی آلفا-آمیلازهای خود گیاه اثر داشته باشند (Franco *et al*., 2002). تحقیقات گسترده‌ای روی بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز انجام گرفته است و مشخص شده است که این ترکیبات در دانه‌ی گیاهان به مقدار فراوان وجود دارند. این ترکیبات به‌ویژه در دانه‌های غلات و حبوبات، فراوان وجود دارند (Mehrabadi *et al*., 2012) ونقش اساسی در دفاع گیاهان علیه آفات دارند (Payan *et al*., 2003). گیاهان دارای مکانیسم‌های دفاعی مختلفی هستند که در دانه آن‌ها متراکم شده‌اند زیرا دانه‌ها وسیله‌ای برای تکثیر و بقای گیاه هستند. این قبیل بافت‌ها تعداد زیادی از ترکیبات دفاعی را در خود جای داده و در نتیجه باعث ایجاد مقاومت گیاه در برابر حشرات گیاه‌خوار می‌شود. به دلیل اینکه آفت‌کشهای شیمیایی اثرات نامطلوبی روی حشرات و دیگر میکروارگانیسم‌های مفید، محیط زیست، سلامتی انسان و حتی حشره‌ی هدف (با ایجاد مقاومت) دارند بنابراین بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی به‌ویژه بازدارنده‌های آنزیم آلفا-آمیلاز می‌توانند راهکار مناسبی برای کنترل حشرات آفت باشند (Gatehouse and Gatehouse, 1998).

Archive of SID

www.SID.ir

اولین مثال استفاده از گیاهان تراریخته‌ی حاوی ژن‌های تولیدکننده‌ی پروتئین‌های سمی گیاهی علیه حشرات، ژن بازدارنده‌ی فعالیت آنزیم تریپسین بود که در گیاه تنباکو برای مقابله با لارو بال‌پولکداران تولید شد (Hilder *et al*., 1987; Silva *et al*., 2001). از آن موقع تا کنون تلاش‌های گوناگونی صورت گرفته تا از ژن‌های تولیدکننده‌ی پروتئین‌های سمی علیه حشرات استفاده شود. وقتی ژن بازدارنده‌ی آلفا-آمیلاز موجود در لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L. (Fabales: Fabaceae)) به گیاه نخود منتقل شد، مقاومت گیاه نخود به سوسک *Bruchus pisorum* L. (Coleoptera: Bruchidae) را ایجاد کرد (Morton *et al*., 2000; Silva *et al*., 2001). همچنین لوبیای ازوکی (*Vigna* (Azuki bean) *anularis* Willd. (Fabales: Fabaceae))، با دریافت ژن بازدارنده‌ی آلفا-آمیلاز از لوبیای معمولی، نسبت به سوسک‌های *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae) و *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) مقاومت پیدا کرد (Ishimoto *et al*., 1996).

آنزیم‌های گوارشی، به‌ویژه آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز می‌توانند هدف خوبی برای کنترل حشرات آفت باشند، بنابراین یکی از جنبه‌های مهم کنترل آفات حشره‌ای، استفاده از خاصیت انتخابی بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی است که با اختلال در عملکرد این آنزیم‌ها، در رشد و نمو حشره اثرات نامطلوب ایجاد می‌کنند، زیرا این بازدارنده‌ها موجب اختلال در هضم و جذب مواد غذایی می‌شوند.

هدف از این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های پروتئینی استخراج‌شده از دانه‌ی گیاهان لوبیا، نخود و برنج روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز غده‌ی بزاقی سن گندم در شرایط آزمایشگاهی و همچنین رابطه غلظت عصاره‌ها با میزان مهارکنندگی آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری سن معمولی گندم

حشرات بالغ سن معمولی گندم، در فصل زمستان از پناهگاه‌هایشان در ارتفاعات و از زیر بوته‌های گیاهی درمنه و گون، واقع در منطقه‌ی شمال غربی کرج (ارتفاعات خور) جمع‌آوری شدند. در فصل زراعی نیز نمونه‌ها از مزارع اطراف کرج به‌ویژه از مزارع منطقه‌ی اشتهارد و شهرستان نظرآباد جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، این حشرات روی دانه‌های گندم در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و شرایط نوری ۸ : ۱۶ ساعت (تاریکی : روشنایی) نگهداری شدند (Allahyari *et al*., 2010).

جداسازی غدد بزاقی از بدن سن گندم

برای جداسازی این اندام‌ها، طبق روش کوهن (Cohen, 1993)، بعد از بی‌حس‌کردن حشرات روی یخ، با قیچی، پاها را از بدن جدا کرده و سپس به کمک پنس، بدن را نگه داشته و اطراف بدن، با قیچی برش داده می‌شود. در این حال، به وسیله‌ی پنس، پیش‌گرده از قسمت عقبی به سمت سر حرکت داده شد. سپس مجموعه‌ی غدد بزاقی در زیر پیش‌گرده به شکل سفیدرنگ پدیدار شد. غدد بزاقی بعد از جداسازی، داخل لوله‌های آزمایش پلاستیکی (میکروتیوب) با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر، قرار داده شدند. برای این کار، در هر میکروتیوب، تعداد ۱۰ جفت غده‌ی بزاقی در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر، قرار داده شد.

استخراج آنزیم از نمونه‌ها

برای استخراج آنزیم‌ها از محتویات غدد بزاقی نیاز به هموژنایزکردن نمونه‌ها می‌باشد. برای این منظور از یک هموژنایزر دستی استفاده شد. در این مرحله، ۱۰ جفت غده‌ی بزاقی در یک میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد، سپس نمونه، درون ظرف محتوی یخ، هموژنایز (Homogenize) شد. نمونه‌های هموژنایزشده در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس بخش بالایی نمونه‌ها (Supernatant) از قسمت رسوب شده (Pellet) جدا شد و به عنوان منبع آنزیمی در نظر گرفته شد و برای انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

استخراج مهارکننده‌های آنزیمی از دانه‌های گیاهان

برای استخراج بازدارنده‌ها، طبق روش بیکر (Baker, 1987) و ملو و همکاران (Melo *et al*., 1999) با تغییرات

Archive of SID

www.SID.ir

جزئی عمل شد. بدین منظور از هر کدام از بذور مقدار ۳۰ گرم برداشته و آرد شد و برای استخراج بازدارنده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سپس به منظور استخراج بازدارنده‌ها از آردها، از کلرید سدیم (۰/۱ مولار) استفاده شد که این عمل به مدت یک و نیم ساعت در دمای چهاردرجه‌ی سلسیوس انجام گرفت.

سپس مایع رونشین با انجام سانتریفیوژ برداشته و برای غیرفعال کردن آنزیم‌های داخلی مایع، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. سپس پروتئین‌های موجود در مایع، با سولفات آمونیوم ۸۰ درصد رسوب داده شدند. دیالیز پروتئین‌های رسوب داده شده به منظور حذف نمک‌های اضافی انجام گرفت و در نهایت، محلول دیالیزشده‌ی پروتئین، فریزدرای (Freeze dry) شد. از هر یک از مهارکننده‌ها، پنج‌سری غلظت تهیه شد. بالاترین غلظت، دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پایین‌ترین آن، ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). تمامی غلظت‌ها بر اساس میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها تهیه شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

به منظور سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز، از روش برنفلد (Bernfeld *et al.*, 1955) و بندانی و همکاران (Bandani *et al.*, 2009) استفاده شد. در این روش از نشاسته ۱٪ به عنوان سوبسترا و بافر فسفات سدیم (۰/۰۲ مولار، pH ۶/۵) استفاده شد.

اثر غلظت مهارکننده روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

برای بررسی اثر بازدارنده‌ی پروتئینی روی آنزیم، از روش مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.*, 2010) استفاده شد. بدین صورت که در ابتدا پنج میکرولیتر مهارکننده (با غلظت معین در هر تیمار) به همراه پنج میکرولیتر آنزیم، درون ۶۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس در حمام آب گرم (بن‌ماری) انکوبه شدند. سپس فعالیت آنزیمی در هر یک از نمونه‌ها بررسی شد. در این آزمایش‌ها، هر کدام از تیمارها شامل سه تکرار و یک بلانک (شاهد) بودند. تیمار شاهد، فاقد مهارکننده بوده و به جای آن از آب مقطر استفاده شد.

تعیین مقدار پروتئین

به منظور تعیین مقدار پروتئین نمونه‌ها، از روش بردفورد (Bradford, 1976) و از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

بررسی‌های آماری

برنامه‌ی آماری استفاده‌شده، نرم‌افزار SAS 9.1 بوده و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها، از روش آزمون LSD در سطح معنی‌داری پنج‌درصد استفاده شد.

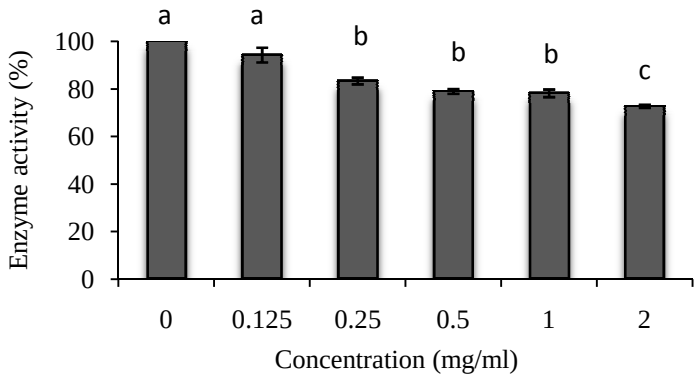
نتایج

اثر عصاره‌ی پروتئینی بذر لوبیا روی فعالیت آلفا-آمیلاز

اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی لوبیا با غلظت-های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر روی فعالیت آلفا-آمیلاز در شرایط غیر زنده ، در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنان که در شکل۱ دیده می‌شود تقریباً اثر عصاره‌ی پروتئینی روی فعالیت آلفا-آمیلاز وابسته به دز می‌باشد؛ به این صورت که با افزایش دز عصاره‌ی پروتئینی لوبیا، میزان فعالیت آنزیم کمتر شد. برای مثال وقتی که از دز ۰/۱۲۵ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه-ی لوبیا استفاده شد، میزان مهار آنزیم آلفا-آمیلاز حدود پنج درصد بود درحالی که در بالاترین دز مصرفی یعنی ۲ میلی-گرم پروتئین در میلی‌لیتر عصاره‌ی لوبیا، حدود ۳۰ درصد، از فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز مهار شد. همچنان که در شکل دیده می‌شود، اختلاف معنی‌داری ($F= 37.48, P < 0.05$) بین شاهد و بعضی از تیمارها مشاهده می‌شود. تیمار یک (غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نسبت به شاهد، اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهد. همچنین سه تیمار دو، سه و چهار (غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهند؛ ولی تیمار آخر (غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با سایر تیمارها و همچنین با شاهد، اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد.

Archive of SID

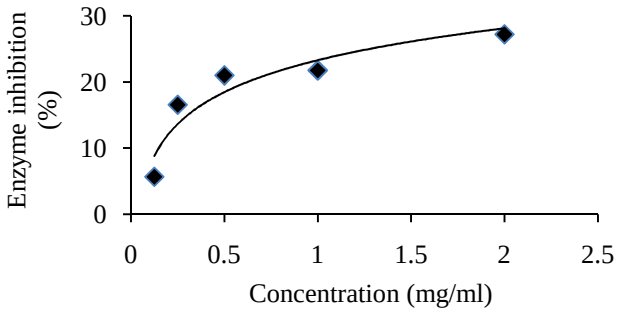
www.SID.ir



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی لوبیا روی آنزیم آلفا-آمیلاز غدد بزاقی.

تیمارهای دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار ندارند. مقایسه میانگین ها با استفاده LSD در سطح معنی‌داری ۵٪ انجام گرفت.

Figure 1. Effect of various concentrations of bean inhibitor on activity of salivary glands α-amylase. The treatments that have same particles are not different significantly. LSD (5%) experimental design was used for analysis of data.



شکل ۲-اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی لوبیا روی درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز غدد بزاقی

Figure 2. Effect of various concentrations of bean inhibitor on inhibitory percentage of salivary glands α-amylase

شکل ۲، نشان‌دهنده‌ی اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده، روی درصد مهارکنندگی است که روند افزایشی درصد مهارکنندگی با افزایش غلظت مهارکننده مشهود است. بیشترین درصد مهارکنندگی، مربوط به تیمار آخر (غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است که حدود ۳۰ درصد، مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز را نشان می‌دهد.

اثر عصاره‌ی پروتئینی بذر نخود روی فعالیت آلفا-آمیلاز

شکل ۳، نشان‌دهنده‌ی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی نخود روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز را نشان می‌دهد. کلیه‌ی تیمارها نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داده و باعث کاهش فعالیت آنزیمی شده‌اند. بیشترین کاهش فعالیت آنزیمی، مربوط به تیمار آخر (غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر) است که باعث مهار حدود ۴۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز شده است. همچنان که در شکل ۳ دیده می‌شود، اثر عصاره‌ی پروتئینی نخود روی فعالیت آلفا-آمیلاز، وابسته به دز می‌باشد به این صورت که با افزایش دز عصاره‌ی مصرفی، آنزیم، بیشتر مهار می‌شود. برای مثال، وقتی که از دز ۰/۱۲۵ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر عصاره‌ی دانه‌ی نخود استفاده شد، میزان مهار آنزیم آلفا-آمیلاز حدود ۲۰ درصد بود در حالی که در بالاترین دز مصرفی یعنی ۲ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر، حدود ۴۰ درصد از فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز مهار شد. همچنان که در شکل دیده می‌شود، اختلاف معنی‌داری ($F= 74.97, P < 0.05$) بین شاهد وبعضی از تیمارها

Archive of SID

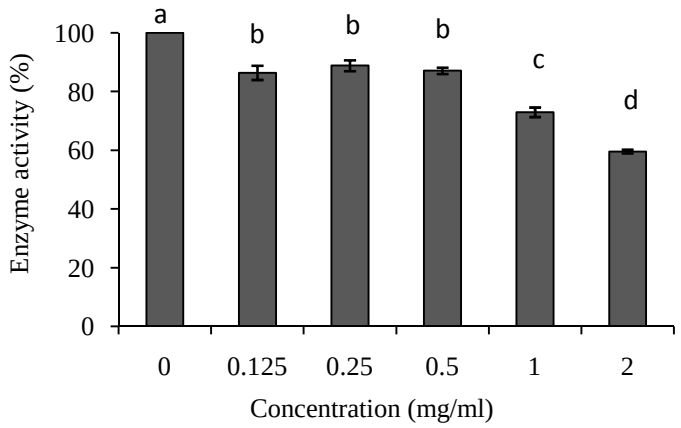
www.SID.ir

مشاهده می‌شود. تیمار یک (غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر) نسبت به شاهد، اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد. همچنین سه تیمار یعنی غلظت های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان نمی‌دهند؛ ولی تیمار ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با سایر تیمارها و همچنین با شاهد، اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد و تیمار ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هم با بقیه‌ی تیمارها و شاهد، اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد و در یک گروه جداگانه قرار گرفت.

شکل ۴، اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی استخراج-شده از نخود، روی درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز را نشان می‌دهد. همچنان که در شکل مشاهده می‌شود، روند افزایشی و خطی در درصد مهارکنندگی با افزایش غلظت مهارکننده دیده می‌شود. بیشترین درصد مهارکنندگی، مربوط به تیمار آخر (غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است که حدود ۴۰ درصد، مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز را نشان می‌دهد.

اثر عصاره‌ی پروتئینی دانه‌ی برنج روی فعالیت آلفا-آمیلاز

غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پروتئینی استخراج‌شده از دانه‌ی برنج، شامل غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر، هیچ گونه کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز غده‌ی بزاقی، ایجاد نکردند (شکل ۵).



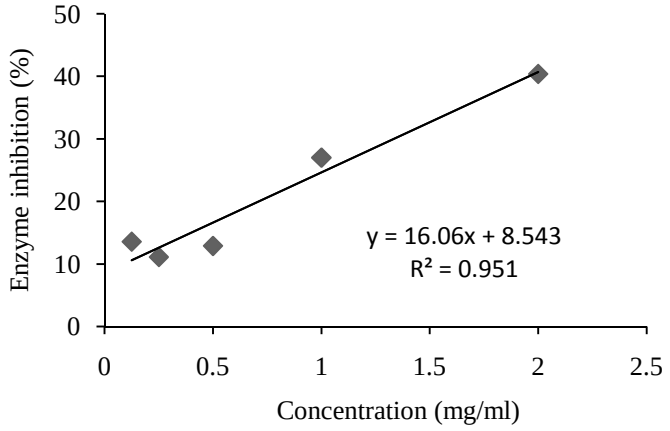
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی نخود روی آنزیم آلفا-آمیلاز غدد بزاقی

تیمارهای دارای حرف مشترک، اختلاف معنی‌دار ندارند. مقایسه میانگین ها با استفاده از روش LSD در سطح معنی‌داری ۵٪ انجام شد.

Figure 3. Effect of various concentrations of chikpea inhibitor on activity of salivary glands α-amylase

The treatments that have same letters are not different significantly. LSD (5%) was used for analysis of data

www.SID.ir



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی نخود روی درصد مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز غدد بزاقی

Figure 4. Effect of various concentrations of chikpea inhibitor on inhibitory percentage of salivary glands α-amylase

بحث

بررسی اثر سه عصاره‌ی استخراج‌شده از لوبیا، نخود و برنج، نشان‌دهنده‌ی تأثیر مناسب مهارکننده‌های استخراجی از گیاه لوبیا و نخود روی آنزیم آلفا-آمیلاز غده‌ی بزاقی سن معمولی گندم در شرایط غیر زنده است. نکته‌ی دیگر این که اثر این مهارکننده‌های آنزیمی، به صورت وابسته به دز می‌باشد؛ یعنی با افزایش دز مصرفی عصاره‌ی استخراج‌شده، اثر آن روی مهار آنزیم به همان نسبت بیشتر است. برای مثال، عصاره پروتئینی نخود در غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر، باعث مهار آنزیم آلفا-آمیلاز به میزان حدود ۲۰ درصد بود در حالی که در بالاترین دز مصرفی یعنی ۲ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر، حدود ۴۰ درصد، از فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز مهار شد. در مورد لوبیا، غلظت پایین یعنی دز ۰/۱۲۵ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر، باعث مهار آنزیم آلفا-آمیلاز به میزان حدود پنج درصد شد در حالی که در بالاترین دز مصرفی یعنی ۲/۰ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر، حدود ۳۰ درصد، از فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز مهار شد. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.*, 2010) در بررسی اثر مهارکننده‌ی استخراج شده از تریتیکاله نشان دادند که عصاره‌ی استخراج شده از این گیاه، اثر مهارکنندگی روی آمیلاز سن گندم دارد. به علاوه، این اثرات مهارکنندگی وابسته به دز می‌باشد، بدین صورت که استفاده از ۰/۲۵ میلی‌گرم عصاره‌ی تریتیکاله باعث ۱۰ درصد مهار آنزیم آلفا-آمیلاز شد ولی وقتی که دز ۱/۵ میلی‌گرم استفاده شد، باعث مهار ۸۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز سن گندم شد. والنسیا و همکاران (Valencia *et al.*, 2000) نشان دادند که غلظت یک میلی‌گرم پروتئین استخراج‌شده از گیاه *Amaranthus cruentus* L. (Caryophyllales: Amaranthaceae) باعث مهار فعالیت آنزیم آمیلاز *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae)) به میزان ۸۰ درصد شد. به علاوه، آن‌ها نشان دادند که غلظت یک میلی‌گرم عصاره‌ی پروتئینی لوبیا، باعث مهار آنزیم آلفا-آمیلاز حشره‌ی مذکور به میزان حدود ۸۰ درصد شد. ملو و همکاران (Melo *et al.*, 1999) نشان دادند که عصاره‌ی پروتئینی استخراج‌شده از گیاه نخود *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabales: Fabaceae) باعث مهار آنزیم آلفا-آمیلاز سوسک *Callosobruchus maculatus* به میزان ۵۰ درصد شد.

نکته‌ی جالب این که عصاره‌ی استخراج‌شده از دانه‌ی برنج، روی فعالیت آلفا-آمیلاز، بدون تأثیر بود و یا به عبارتی دیگر، بدون اثر مهارکنندگی معنی‌داری بود. گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد مهارکننده‌های آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز در گیاهانی که میزبان حشرات هستند، روی آنزیم‌های مذکور تأثیر چندانی ندارند و این به علت آن است که این حشرات توانسته‌اند در طول دوره‌ی تکاملی خود، اثر این گونه پروتئین‌ها را از بین

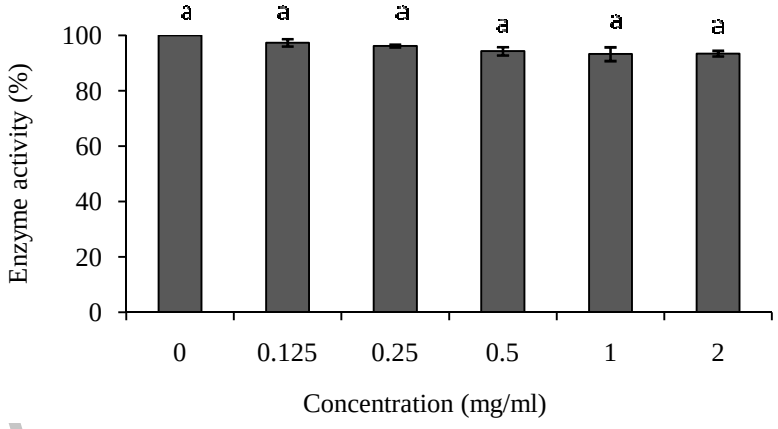
Archive of SID

www.SID.ir

ببرند (Chrispeels, 1996; Jongsma and Boutler 1997) در صورتی که عصاره‌ی همین گونه‌های گیاهی، برای حشراتی که از این گونه‌ها تغذیه نمی‌کنند سمی می-باشد. بنابراین برای افزایش مقاومت گیاهان به یک گونه‌ی خاص حشرات، نیاز هست که دنبال ژن یا ژن‌هایی بگردیم که از گیاهان غیرمیزبان باشند. شاید به همین دلیل باشد که عصاره‌های پروتئینی موجود در دانه‌ی لوبیا و یا نخود، اثر بازدارندگی روی فعالیت آنزیم آمیلاز سن گندم دارند ولی عصاره‌ی پروتئینی دانه‌ی برنج، اثر مهارکنندگی روی آنزیم آلفا-آمیلاز سن گندم ندارد چون گیاه برنج هم در زمره‌ی غلات می‌باشد و سن گندم قادر به تغذیه از غلات دیگر مانند گندم، جو و حتی گرامینه‌های دیگر است. بازدارنده-های آلفا-آمیلاز یا دیگر آنزیم‌های گوارشی، ترکیباتی هستند که با اتصال به آنزیم‌های گوارشی در عملکرد طبیعی آنها اختلال ایجاد می‌کنند. گیت هاوس (Gatehouse *et al*., 1979) اولین فردی بود که اعلام کرد که بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی می‌توانند باعث مقاومت گیاهان به آفات شوند، بنابراین، انتخاب این ویژگی‌ها در ابتدا به وسیله‌ی روش‌های سنتی اصلاح گیاهان انجام می‌گرفت ولی امروزه با توسعه‌ی روش‌های بیوتکنولوژی، ژن یا ژن‌های مورد نظر به گیاهان منتقل می‌شوند تا در گیاه مورد نظر بیان شوند (Redden *et al*., 1983; Lecardonnel *et al*., 1999; Yussuf *et al*., 2001). بنابراین انتقال ژن‌های کدکننده‌ی مهارکننده‌ها به گیاهان مختلف و در نتیجه ایجاد گیاهان تراریخته می‌تواند یکی از روش‌های مؤثر در ایجاد مقاومت گیاهان مختلف به آفات مورد نظر و در نتیجه کنترل این آفات باشد هر چند که هنوز مطالعات صورت‌گرفته در مورد انتقال ژن‌های کدکننده‌ی مهارکننده‌ها و تولید گیاهان تراریخته اندک است و بایستی مطالعات و بررسی‌های بسیار بیشتری در این زمینه انجام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه تهران جهت فراهم‌نمودن هزینه‌های این طرح، قدردانی می‌کنند.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ی برنج روی آنزیم آلفا-آمیلاز غدد بزاقی
مقایسه میانگین با استفاده از روش LSD در سطح معنی‌داری ۵٪ انجام شد.

Figure 5. Effect of various concentrations of rice inhibitor on activity of salivary glands α-amylase. LSD (5%) experimental design was used for analysis of data

www.SID.ir

References

Allahyari, M., Bandani, A. R., and Habibi-Rezaei, M. 2010. Subcellular fractionation of midgut cells of the sunn pest *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae): Enzyme markers of microvillar and perimicrovillar membranes. **Journal of Insect Physiology** 56: 710–717.

Baker, J. E. 1987. Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus orizae* L. by HPLC and their interaction with paratially-purified amylase inhibitor from wheat. **Insect Biochemistry and molecular biology** 17(1): 37−44.

Bandani, A. R., Kazzazi, M., and Mehrabadi, M. 2009. Purification and characterization of midgut a-amylases of *Eurygaster integriceps*. **Entomological Science** 12: 25-32.

Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β. **Methods in Enzymology** 1: 149-158.

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

Chrispeels, M. J. 1996. Transfer of bruchid resistance from the common bean to other starchy grain legumes by genetic engineering with the a-amylase inhibitor gene. In Carozzi N, Koziel M. (Eds.). Transgenic Plants for Control of Insect Pests, Taylor Francis, London. pp. 1-10.

Cohen, A. C. 1993. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. **Journal of Insect physiology** 39: 823−829.

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., and Grossi-de-Sa, M. F. 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.

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

Gatehouse, A. M. R., and Gatehouse, J. A. 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Journal of Pesticide Science** 52: 165–175.

Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Baker, R. F., and Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature** 300: 160□163.

Ishimoto, M., Sato. T., Chrispeels, M. J., and Kitamura, K. 1996. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha amylase inhibitor of common bean. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 79: 309-315.

Jongsma, M. A., and Boutler. C. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology** 43: 885-895.

Lecardonnel, A., Chauvin, L., Jouanin, L., Beaujean, A., Prevost, G., and Sangwan-Norreel, B. 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. **Plant Science** 140: 71-79.

Mehrabadi, M., Bandani, A. R. and Saadati, F. 2010. Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, a-amylase by the triticle a-amylase inhibitor (T-aAI). **Journal of Insect Science** 10: 179.

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

Melo, F. R., Sales, M. P., Silva, L. S., Franco, O. L., Bloch, J. C., and Ary, M. B. 1999. α-Amylase inhibitors from from cowpea seeds. **Protein & Peptide Letters** 6: 387−392.

Morton, R. L., Schroeder, H. E., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J., Armstrong E., and Higgins, T. J. V. 2000. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under Weld conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97: 3820–3825.

Payan, F. 2003. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α-amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta** 1696: 171–180.

Archive of SID

www.SID.ir

Radjabi, G. 2000. Ecology of Cereal Sunn Pests in Iran. Agricultural Research, Education, Extension and Organization Publication, Tehran, Iran.

Redden, R. J., Dobie, P., and Gatehouse, A. M. R. 1983. The inheritance of seed resistance to Callosobruchus maculates F. in cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.). I Analyes of parental, f1, F2, F3 and backcross seed generations. **Australian Journal of Agricultural Research** 34: 681-695.

Silva, C. P., Terra, W. R., Samuels, R. I., Isejima, E. M., Bifano, T. D., and Almeida, J. S. 2001. Induction of digestive α-amylase in larvae of *Zebrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α-amylase inhibitor 1. **Journal of Insect physiology** 47: 1283−1290.

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

Svensson, B., Fukuda, K., Nielsen, P. K., and Bonsager, B. C. 2003. Proteinaceous α-amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta** 1696: 145–156.

Ussuf, K. K., Laxmi, N. H., and Mitra, R. 2001. Proteinase inhibitors: Plantderived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science** 80: 847-853.

Valencia, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E., and Chrispeels, M. J. 2000. α-amylase of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 30: 207−213.

Archive of SID

www.SID.ir

Plant Pests Research
Vol. 2, No. 3, 2012

Comparison of the effect of proteinaceous extracts of three plant species on alpha amylase activity of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*

V. Rahimi-Alangi[1], A. R. Bandani[2*]
1, 2. M.Sc. Student and Professor, Plant Protection Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karj, Iran.

(Received: May 30, 2012- Accepted: Jun 27, 2012)

Abstract

Sun pest (*Eurygaster integriceps* Puton (Coleoptera: Scutelleridae) is one of the most important pests of wheat and barley that feeds on grains. So, this pest lives in carbohydrate-rich environment and its survival depends on carbohydrase enzymes. α-Amylase plays an important role in the Sun pest digestion. The aim of the current research was to study the effects of proteinaceous extracts of bean, rice and chickpea seeds on α-amylase activity. So, the proteinaceous extractions of the seeds were extracted using 0.1 M Sodium chloride. The extractions were tested on α-amylase activity at 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg of proteins/ml in *In vitro* conditions. The results showed that the bean and chickpea extracts were effective on α-amylase activity and their effects were dose-dependent meaning that with increasing of the dose, inhibition of the enzyme increases. For example, at the lowest dose (0.125 mg of proteins/ml), the bean and chickpea extracts inhibited 5 and 20% of the amylase activity, respectively. While at the highest dose (2 mg of proteins/ml) the inhibitory effects was 30 and 40%, respectively. Rice seed extraction did not produce any significant effect on α-amylase activity. These data showed that the proteinaceous extractions of chickpea and bean have the good potential for inhibition of sun pest α-amylase.

Key words: Sun pest, α-amylase, seeds proteinaceous extractions

Archive of SID

*Corresponding author: abandani@ut.ac.ir

www.SID.ir