تاثیر عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزا روی فعالیت آلفا–آمیلاز گوارشی سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say) و برخی مولفه‌های زیستی آن

شبنم عاشوری[۱*] و رضا فرشباف پورآباد[۲]

۱- دانشجوی سابق دکتری حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

* مسئول مکاتبه Sh.ashouri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۹

چکیده

گیاهان دارای مجموعه‌ای از مولکول‌های پروتئینی هستند که قادر به ایجاد اختلال در هضم غذا در حشرات گیاه‌خوار می‌باشند و می‌توانند در کنترل آفات مورد استفاده قرار گیرند. در این تحقیق، مهار آنزیم آلفا–آمیلاز گوارشی سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say) توسط عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزا (*Brassica napus* L. cv. (Karaj3 بررسی شده است. حداکثر اثر مهاری عصاره‌ی پروتئینی روی فعالیت آلفا–آمیلاز در اسیدیته‌ی پنج بود. چهار جزء پروتئینی عصاره‌ی بذر کلزا ۳۰–۰٪، ۵۰–۳۰٪، ۷۰–۵۰٪ و ۱۰۰–۷۰٪ اشباع با نمک سولفات آمونیوم، به ترتیب روی آلفا–آمیلاز گوارشی لارو سن چهار سبب ۰، ۵۲، ۱۲ و ۰٪ مهار گردیدند. جزء پروتئینی ۵۰–۳۰٪ به ترتیب باعث ۸٤، ۸٦، ۷٤، ۵۲ و ۳۷٪ کاهش فعالیت آلفا–آمیلاز سنین ۱، ۲، ۳، ٤ و حشرات کامل شد. سنجش کینتیک مهار آلفا–آمیلاز حشرات کامل توسط جزء پروتئینی ۵۰–۳۰٪ انجام شد و مهار از نوع نارقابتی تعیین گردید. در زایموگرام و بررسی اثر مهارکننده در ژل، مهار آنزیم به صورت کاهش شدت نوارها مشاهده شد. در انجام زیست سنجی، از برگ‌های ارقام سیب‌زمینی آگریا، بورن، پیکاسو و مارکز استفاده گردید. عصاره‌ی پروتئینی زمانی که روی برگ‌های تیمار شده مورد تغذیه لاروها قرار گرفت؛ در هیچ کدام از ارقام، زمان پوست اندازی لاروهای سن سه به چهار نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری مشاهده نشد؛ در ارقام پیکاسو و مارکز سبب کاهش معنی‌دار وزن لارو سن چهار نسبت به شاهد گردید؛ درصد لاروهای سن چهار ظاهر شده در ارقام آگریا، پیکاسو و مارکز نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت و در رقم آگریا، فعالیت آلفا–آمیلاز لارو سن چهار در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد.

واژه‌های کلیدی: رسوب‌دهی پروتئین با سولفات آمونیوم، زایموگرام، زیست سنجی، سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، کینتیک مهار آنزیم.

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از محصولات مهم کشاورزی در سراسر جهان و ایران بوده و علاوه بر مصارف غذایی، کاربردهای صنعتی داشته و در تهیه الکل، نشاسته و چسب مورد استفاده قرار می‌گیرد (خانجانی ۱۳۸٤). سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) مهم‌ترین آفت گیاهان تیره‌ی سیب‌زمینی در بسیاری از مناطق جهان می‌باشد، زیرا حشرات‌کامل و لاروهای این آفت هردو از برگ‌های

Archive of SID

www.SID.ir

سیب‌زمینی تغذیه می‌کنند (کندراک و همکاران ۲۰۰۵). در کشاورزی مدرن کنترل آفات دستخوش تغییرات مهمی گردیده و به طور روزافزون از تکیه بر سموم آفت‌کش-های شیمیایی فاصله گرفته و به سمت روش‌های کم خطر برای محیط زیست سوق پیدا کرده است (گیت-هاوس و همکاران ۲۰۰۲). یکی از روش‌های مهم و نوین کنترل آفات، ایجاد اختلال در سامانه‌ی گوارشی حشرات با استفاده از مهار آنزیم‌های گوارشی می‌باشد (حبیب و فضیلی ۲۰۰۷).

اگر در هضم غذا در سامانه‌ی گوارشی حشرات اختلال ایجاد شود، بیولوژی حشره تحت تاثیر قرار خواهد گرفت. زمانی که فعالیت آنزیم‌ها مهار می‌شود، گوارش در حشرات دچار اختلال شده و سبب کاهش تولید انرژی و سوخت و ساز در آن‌ها می‌گردد (کارلینی و گروسی دسا ۲۰۰۲). از این رو، آنزیم‌های گوارشی در حشرات نقطه‌ی هدف مهمی در کنترل آفات مهم گیاهی محسوب می‌شود. آلفا-آمیلاز یکی از اندوآمیلازها می-باشد که در هیدرولیز پیوندهای بین هیدروکربن‌ها نقش اساسی داشته و سبب تبدیل پلیمرهای قندی به واحدهای کوچک‌تر و قابل استفاده برای موجودات زنده می‌شود (بکر-ریت و کارلینی ۲۰۱۲).

مهارکننده‌های آنزیمی موجود در بذور و سایر اندام‌های گیاهی به عنوان بخشی از سامانه‌ی دفاعی گیاه به‌کار گرفته می‌شوند که در نتیجه تکامل روابط بین گیاه و حشره ایجاد شده‌اند (فرانکو و همکاران ۲۰۰۲). این پروتئین‌ها مولکول‌های کوچکی هستند که ترکیب بسیار پایداری با آنزیم‌ها ایجاد می‌کنند و با بلوک کردن آن‌ها، اختلال در جایگاه فعال آنزیم و جلوگیری از دسترسی زیرنهشت به جایگاه فعال آنزیم (ماکدو و فریر ۲۰۱۱)، فعالیت‌های آنزیمی را کاهش داده و یا آن‌ها را غیر فعال می‌کنند (حبیب و فضیلی ۲۰۰۷).

استفاده از گیاهان تراژن حاوی ژن‌های مهارکننده‌ی آنزیم‌های گوارشی به عنوان یکی دیگر از روش‌های حفاظتی گیاهان علیه حشرات، در حال گسترش بوده (ماکدو و فریر ۲۰۱۱) و در اکثر مواقع سبب بروز اثرات قابل توجه روی نشو و نمای حشره می‌شوند (چن ۲۰۰۸). از این‌رو مطالعات گسترده برای شناسایی پروتئین‌های واجد خاصیت حشره‌کشی علیه آفات مهم اقتصادی موردنیاز می‌باشد (کریمی و همکاران ۲۰۱۰).

از آن‌جایی که مهارکننده‌های آنزیمی بررسی شده روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی به‌ویژه آلفا-آمیلاز بسیار محدود می‌باشد، در این تحقیق سعی گردید که اثر مهاری عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزا علیه آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی سوسک برگ‌خوار سیب زمینی بررسی شود و همچنین اثرات آن روی مولفه‌های زیستی لاروها و اثر ارقام مختلف سیب‌زمینی، با انجام آزمایش‌هایی در سطح تغذیه‌ای تعیین گردد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

حشرات کامل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی از مزارع سیب‌زمینی منطقه‌ی عجب شیر استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید. حشرات کامل و لاروها در درون ظروف پلاستیکی شفاف حاوی تعدادی برگ تازه سیب‌زمینی، در دمای ۱±۲۷ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۵۵٪ و دوره نوری ۸:۱۶ (روشنایی: تاریکی) ساعت، پرورش داده شدند.

تهیه‌ی نمونه‌ی آنزیم گوارشی

نمونه‌های آنزیمی براساس روش بندانی و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی تغییر تهیه گردید، به این صورت که لوله‌های گوارشی لاروهای سنین سه و چهار و هم‌چنین حشرات کامل در بافر فسفات سرد (اسیدیته‌ی ۷)

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی شدند. جهت تهیه‌ی نمونه‌ی آنزیمی از لاروهای سنین یک و دو نیز از کل بدن لارو استفاده شد. به ترتیب تعداد ۱۵۰ و ۵۰ عدد لاروهای سنین یک و دو و تعداد ۳۰، ۱۲ و ۱۵ عدد لوله‌ی گوارش لاروهای سنین سه، چهار و حشره کامل در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر سرد قرار داده شدند. برای استخراج آنزیم، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه هموژنایزر[1] همگن گردیدند. سپس در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول روشناور به عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس برای آزمایش‌های بعدی نگه‌داری گردید.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز با استفاده از روش برنفلد (۱۹۵۵) با اندکی تغییر انجام شد. ترکیب واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر آنزیم، ٦۵ میکرولیتر بافر یونیورسال[2] (اسیدیته‌ی ۵ حاوی گلایسین[3]، سوکسینات[4] و ۲-مورفولینواتان سولفونیک‌اسید[5] ۰/۰۲ مولار) و ۲۵ میکرولیتر زیرنهشت (نشاسته ۱٪)، در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه[6] شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید[7] (حاوی یک گرم دی‌نیتروسالیسیلیک اسید، ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات تتراهیدرات[8] و ۲۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۲ نرمال، که با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده بود) به مجموعه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. بعد از سرد شدن، میزان جذب نوری با دستگاه جذب خوان میکروپلیت، مدل ELx800^{TM} (BioTek$^{®}$) در طول موج ٥٤٠ نانومتر ثبت گردید. در شاهد به جای آنزیم معادل مقدار آن از بافر یونیورسال استفاده گردید. فعالیت ویژه آنزیم آلفا-آمیلاز به صورت میزان جذب نوری در ٥٤٠ نانومتر در دقیقه در میزان پروتئین موجود در نمونه‌ی آنزیمی (ΔAbs 540nm/min/mg protein) بیان شده است. آزمایش‌ها سه بار تکرار گردیدند.

استخراج عصاره‌ی پروتئینی از بذر کلزا با استفاده از روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم

بذر کلزا (*Brassica napus* L. cv. Karaj3) از مرکز تحقیقات اصلاح و تهیه‌ی نهال و بذر کرج تهیه گردید. استخراج عصاره‌ی پروتئینی طبق روش بیکر (۱۹۸۷)، ملو و همکاران (۱۹۹۹) و مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰) با اندکی تغییر انجام شد. مقدار ۳۰ گرم پودر بذر در ۱۰۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم با مولاریته ۰/۱ مخلوط و به مدت ۱۲۰ دقیقه همزده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. براساس حجم مایع رویی، برای رسوب‌دهی پروتئین مقدار مورد نیاز سولفات آمونیوم جهت ۷۰٪ اشباع محاسبه و به صورت تدریجی به مایع رویی اضافه شد و به مدت ٤٥ دقیقه مخلوط گردید. سپس در همان شرایط قبلی سانتریفیوژ انجام گرفت. رسوبات حاصله با حداقل حجم بافر Tris-HCl (۰/۰۲ مولار با اسیدیته‌ی ۷) به صورت سوسپانسیون درآمد و جهت زدودن نمک، درون کیسه‌های دیالیز (با اندازه‌ی منافذ یک کیلودالتون و قطر ۲۸ میلی‌متر) ریخته و به مدت ۲۰ ساعت در درون آب مقطر دیالیز شد. در این مدت حداقل دوبار آب مقطر تعویض گردید. به منظور غیرفعال‌شدن آنزیم‌های داخلی، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. مخلوط حاصل در همان شرایط سانتریفیوژ

[1] Homogenizer
[2] Universal buffer
[3] Glycine
[4] Succinate
[5] 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES)
[6] Incubation
[7] Dinitro salicylic acid (DNS)
[8] Potassium sodium tartarate tetrahydrate

Archive of SID

www.SID.ir

و مایع روشناور در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد.

سنجش اثر اسیدیته‌ی بر فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی و اثر اجزاء پروتئینی مختلف روی فعالیت آلفا-آمیلاز

به منظور سنجش تاثیر اسیدیته بر فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی به‌دست آمده با اشباع ۷۰٪ سولفات آمونیوم، روی فعالیت آنزیم لارو سن چهار سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، از بافر یونیورسال با اسیدیته‌های مختلف (٤، ٥، ٦، ٧ و ٨) استفاده گردید و فعالیت آلفا-آمیلاز به روش بیان شده بررسی شد. با این تفاوت که قبل از اضافه نمودن زیرنهشت، آنزیم و مهارکننده (۱۰ میکرولیتر) به مدت ۳۰ دقیقه پیش انکوبه گردیدند (مهرآبادی و همکاران ۲۰۱۰).

از روش ترسیب پروتئین با سولفات آمونیوم، برای جدا کردن اجزاء پروتئینی[1] استفاده گردید. به این صورت که با استفاده از درصدهای اشباع مختلف سولفات آمونیوم ۳۰-۰، ۵۰-۳۰، ۷۰-۵۰ و ۱۰۰-۷۰٪، اجزاء پروتئینی[2] مختلف تهیه شد. در هر بار رسوب پروتئین، از از محلول روشناور برای تهیه‌ی جزء یا فرکشن بعدی استفاده گردید. در نهایت اثر مهارکنندگی اجزاء پروتئینی مختلف روی فعالیت آلفا-آمیلاز لارو سن چهار سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. هم‌چنین اثر جزء پروتئینی روی فعالیت آلفا-آمیلاز تمامی سنین لاروی و حشرات کامل بررسی شد.

کینتیک مهار آنزیمی

به منظور تعیین نوع مهار و ثابت مهاری عصاره‌ی پروتئینی، فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) و زیرنهشت (درصد) سنجش شد و کینتیک مهار آنزیمی براساس روش مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰) مورد مطالعه قرار گرفت. ثابت مهاری (K_i)، ثابت میکائیلیس[3] (K_m) و حداکثر سرعت آنزیمی (V_{max}) تعیین شدند. نمودارهای ثانویه (شامل مقادیر K_m/V_{max} و $1/V_{max}$ در برابر غلظت‌های مختلف مهارکننده) رسم گردیدند. نمودار سرعت اولیه در برابر غلظت‌های مختلف زیرنهشت و در حضور چندین غلظت مهارکننده به معادلات انواع مهار برازش داده شد و در قالب نمودار لاین‌ویور- برک[4] رسم رسم گردید (حسینی نوه و قدمیاری ۱۳۹۲).

سنجش مهار فعالیت آلفا-آمیلاز در ژل

زایموگرام[5] فعالیت آنزیمی با استفاده از روش ژل الکتروفورز نیمه واسرشت‌گر[6] دارای سدیم‌دودسیل سولفات (SDS-PAGE)[7] براساس روش لاملی (۱۹۷۰) (۱۹۷۰) و مهرآبادی و بندانی (۲۰۱۰) با اندکی تغییر انجام شد. قبل از الکتروفورز، آنزیم و مهارکننده (جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪) در ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه پیش‌انکوبه گردید، با بافر نمونه ترکیب و در ژل بارگذاری شد، تا میزان فعالیت باقی‌مانده آنزیم تعیین شود. در شاهد به جای مهارکننده از بافر Tris-HCl ۰/۰۲ مولار با اسیدیته ۷ استفاده شد. پلی‌آکریل‌آمید[8] ۱۰٪ برای ژل جداکننده و ٤٪ برای ژل متراکم‌کننده مورد استفاده قرار گرفت. از نشاسته ۱٪ هم درون ژل به عنوان زیرنهشت زایموگرام، استفاده شد. الکتروفورز در چهار درجه‌ی سلسیوس و ۱۲۰ ولت تا رسیدن نوار

[1] Protein Fractionation
[2] Fractions

[3] Michaelis constant
[4] Lineweaver-Burk
[5] Zymogram
[6] Semi-denaturing
[7] Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
[8] Acrylamide

Archive of SID

www.SID.ir

رنگی به انتهای ژل انجام گردید. پس از آن، ژل با آب مقطر شسته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱٪ تریتون[1] X-100 قرار گرفت. سپس به مدت ۱/۵ ساعت در بافر MES ۰/۰۲ مولار اسیدیته‌ی پنج حاوی دو میلی‌مولار کلرید کلسیم[2] و ۱۰ میلی‌مولار کلرید سدیم قرار داده شد. در پایان، ژل با آب مقطر شسته شد و جهت توقف واکنش و رنگ‌آمیزی نشاسته واکنش نداده، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول لگول (۳٪ KI و ۱/۳٪ I_2) قرار گرفت. نوارهای فعالیت آلفا-آمیلازی در زمینه‌ی تیره به صورت روشن مشاهده گردید.

زیست سنجی

جهت انجام زیست‌سنجی، بذور چهار رقم مختلف سیب‌زمینی؛ آگریا[3]، بورن[4]، پیکاسو[5] و مارکز[6] از مرکز مرکز تحقیقات سیب‌زمینی اردبیل تهیه و کشت گردیدند. دو طرف برگ‌های جدا شده از هر رقم به عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزا ۵۰-۳۰٪ (غلظت ۱/٦ میلی‌گرم بر میلی-لیتر) آغشته و در معرض هوا خشک شدند. در شاهد برگ‌های هر رقم با آب مقطر تیمار گردیدند. در داخل لیوان‌های پلاستیکی شفاف، برگ تیمار شده و ۵۰ عدد لارو سن یک تازه تفریخ شده قرار داده شده و با پارچه توری پوشانده شدند. هر روز برگ‌های تازه تیمار شده در اختیار لاروها قرار گرفت. مشاهدات از هر ٢٤ ساعت تا پایان دوره‌ی لاروی ثبت گردید. مولفه‌های زیستی ثبت شده عبارت‌اند از: زمان مورد نیاز برای پوست اندازی لاروهای سن سه به چهار (روز)، وزن لاروهای سن چهار (میلی‌گرم) و میزان لاروهای سن چهار تشکیل شده (درصد). جهت بررسی فعالیت آنزیمی، لوله‌های گوارشی لاروهای سن چهار مرتبط با تیمارها و شاهد جداسازی و عصاره‌های آنزیمی به روش ذکر شده تهیه و در فریزر ۷۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند. آزمایش‌ها سه بار تکرار گردیدند.

اندازه‌گیری میزان پروتئین

میزان غلظت پروتئین در نمونه‌ها براساس روش بردفورد (۱۹۷٦) با ترسیم نمودار استاندارد غلظت پروتئین شاخص (آلبومین سرم گاوی) تعیین شد. به این صورت که ۱۰ میکرولیتر نمونه‌ی پروتئینی با ۱۹۰ میکرولیتر معرف رنگی بردفورد (حاوی ۰/۰۱٪ آبی کوماسی بریلینت بلو G-250، ۸/۵٪ اسید فسفریک، ٤/۷٪ اتانول) در چاهک میکروپلیت مخلوط شدند و میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت گردید. در تمامی نمونه‌های آنزیمی غلظت پروتئین به مقدار ۲ میلی-گرم در میلی‌لیتر تنظیم گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت یکنواختی واریانس‌ها، داده‌ها براساس نوع و پراکنش آن‌ها تبدیل شدند. تجزیه‌ی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. جهت تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به زیست‌سنجی از آزمایش فاکتوریل دو فاکتوره در قالب طرح کاملاً تصادفی و سایر داده‌ها از طرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده گردید. در گروه‌بندی میانگین‌های مربوط به آزمایش‌های مختلف از آزمون دانکن در سطح احتمال آماری ۵٪ استفاده شد. تجزیه‌ی داده‌های مربوط به کینتیک، توسط برنامه‌ی Sigmaplot 12.5 انجام گردید.

نتایج و بحث

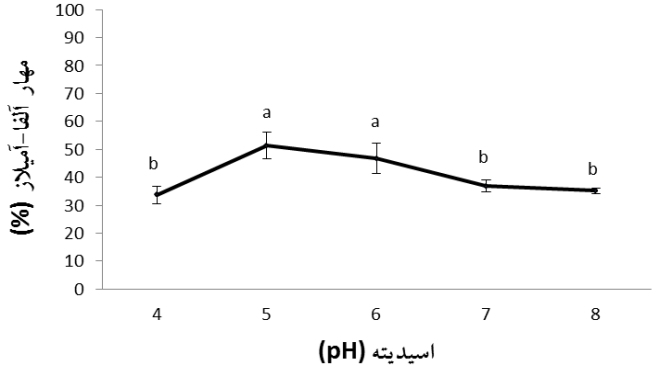
سنجش اثر اسیدیته در مهار فعالیت آلفا-آمیلاز

[1] Triton X-100
[2] Calcium chloride ($CaCl_2$)
[3] Agria
[4] Burren
[5] Picasso
[6] Marx

Archive of SID

www.SID.ir

تاثیر اسیدیته‌های مختلف (٤، ٥، ٦، ٧ و ٨) بر فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی به‌دست آمده با روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم با اشباع ۷۰-۰٪ روی فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سن چهار سوسک برگ‌خوار سیب زمینی در قالب درصد مهار آنزیم در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- تاثیر اسیدیته بر فعالیت مهاری عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزای به‌دست آمده با روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم با اشباع ۷۰-۰٪ روی فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سن چهار سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، حروف غیرمشابه روی میانگین‌ها نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵٪ در آزمون دانکن می‌باشند.

در این آزمایش‌ها فعالیت مهاری وابسته به اسیدیته بود و در کل بیش‌ترین میزان مهار در اسیدیته‌های ٥ و ٦ به دست آمد که با اسیدیته‌ی بهینه فعالیت آنزیم یعنی اسیدیته‌ی برابر٥ که در این تحقیق به دست آمد، تطابق داشت. تطابق بین اسیدیته‌ی روده، اسیدیته‌ی بهینه فعالیت آنزیمی و اسیدیته‌ی بهینه برای مهار آنزیم در سایر مطالعات انجام شده روی حشرات نیز مشاهده شده است (مهرآبادی و همکاران ۲۰۱۰ و ۲۰۱۲؛ برزوئی و همکاران ۲۰۱۳). با وجود این، در مطالعات والنسیا-جیمنز و همکاران (۲۰۰۸) مهارکننده‌های به دست آمده از دو نوع لوبیا، فعالیت آلفا-آمیلاز لارو بید غده‌ی سیب-زمینی (*Tecia solanivora* Povolny) را در اسیدیته‌ی ٦ به ترتیب ۷۰ و ۸۷ ٪ مهار کردند و مهارکننده گیاه آمارانتوس .*Amaranthus* sp (هیبریدی از دو گونه *Amaranthus hypocondriacus* و *A. caudatus*) تا ۸۰٪ مهارکنندگی را در اسیدیته‌ی ۹ سبب گردید که این اسیدیته‌ی قلیایی همان اسیدیته‌ی فعالیت آنزیم گوارشی این حشره می‌باشد. این درحالی است که در اسیدیته‌ی ۹، مهارکننده‌های به دست آمده از لوبیاها فعالیت مهارکنندگی نداشته‌اند و با توجه به این عدم تطابق اسیدیته، این محققین عنوان کردند که مهارکننده‌های لوبیا، گزینه‌ی مناسبی برای استفاده در کنترل این آفت محسوب نمی‌شوند.

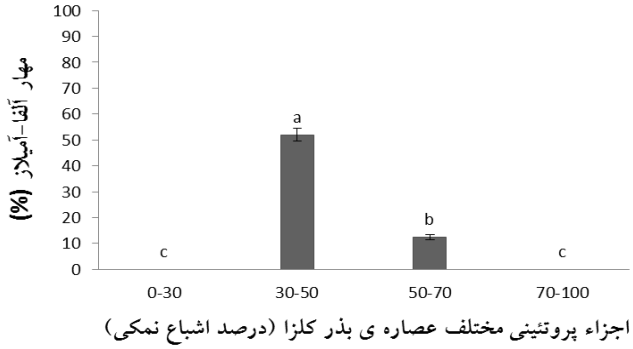
تاثیر اجزاء پروتئینی مختلف عصاره‌ی کلزا روی فعالیت آلفا-آمیلاز

اثر مهارکنندگی چهار جزء پروتئینی به دست آمده با روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم با اشباع ۳۰-۰، ۵۰-۳۰، ۷۰-۵۰ و ۱۰۰-۷۰٪ از بذر کلزا روی فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سن چهار سوسک برگ‌خوار سیب-زمینی در شکل ۲ ارائه شده است. اجزاء پروتئینی به دست آمده، خواص مهارکنندگی متفاوت نشان دادند، که می‌تواند ناشی از متفاوت بودن ترکیب پروتئینی موجود

Archive of SID

www.SID.ir

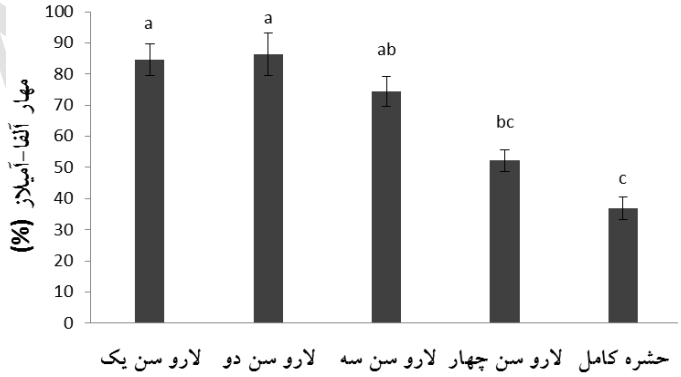
در عصاره‌ها باشد. از بین اجزاء پروتئینی مورد مطالعه، جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪ عصاره بذر کلزا بیش‌ترین میزان مهار را سبب شد و در آزمایش‌های زایموگرامی، کینتیک مهار آنزیمی و زیست سنجی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲- تاثیر اجزاء پروتئینی مختلف عصاره‌ی بذر کلزا روی فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سن چهار سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، حروف غیرمشابه روی میانگین‌ها نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵٪ در آزمون دانکن می‌باشند.

تاثیر موثرترین جزء پروتئینی عصاره‌ی کلزا روی فعالیت آنزیم سنین مختلف لاروی و حشرات کامل

اثر مهارکنندگی جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪، روی فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سنین یک تا چهار و حشرات کامل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، در شکل ۳ نشان داده شده است. مهار فعالیت آلفا-آمیلاز سنین لاروی و حشرات کامل توسط این جزء پروتئینی تفاوت معنی‌داری داشته و بیش‌ترین میزان مهار در سنین اول تا سوم لاروی رخ داد. فعالیت آنزیم سن چهار لاروی و حشره کامل به نسبت کم‌تری مهار شدند، این شاید به بالا بودن فعالیت تغذیه‌ای و در نتیجه بیش‌تر بودن میزان فعالیت آنزیم‌ها در این مراحل رشدی، مرتبط باشد. دامل و همکاران (۲۰۰۵) بیان داشتند که مهارکننده‌های پروتئاز گوجه‌فرنگی فعالیت پروتئاز تام شش سن لاروی کرم غوزه‌ی پنبه (*Helicoverpa armigera* Hubner) را مهار می‌کنند، اما در سن چهار کم‌ترین میزان مهارشوندگی مشاهده می‌شود، که آن را به پر اشتهاتر بودن و مخرب‌تر بودن این سن لاروی ارتباط دادند.



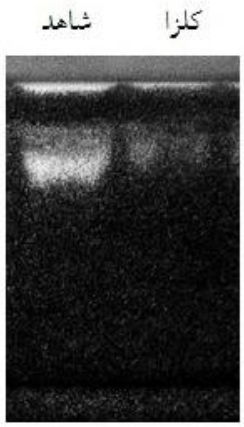
شکل ۳- تاثیر جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪ عصاره‌ی بذر کلزا روی فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سنین یک تا چهار و حشرات کامل سوسک برگ-خوار سیب‌زمینی، حروف غیرمشابه روی میانگین‌ها نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵٪ در آزمون دانکن می-باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

سنجش مهار آنزیم در ژل

جهت تائید کیفی نتایج حاصل از مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی، از جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪ کلزا روی آنزیم حشرات کامل در ژل زایموگرام آلفا-آمیلاز (شکل ٤) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر استفاده شد. در زایموگرام، دو آیزوزیم برای این آنزیم مشاهده شد و در حضور مهارکننده، شدت نوارهای آنزیمی کاهش یافت. در مطالعات زایموگرافی سایر محققین از جمله مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۱۲)، دسترنج و همکاران (۲۰۱۳)، برزوئی و بندانی (۲۰۱۳) و برزوئی و همکاران (۲۰۱۳) نیز مهار آنزیم‌های گوارشی با عصاره-های پروتئینی مختلف به صورت کاهش شدت نوار آنزیمی یا حذف نوار در بیش‌ترین غلظت آزمایش شده مشاهده می‌شود.



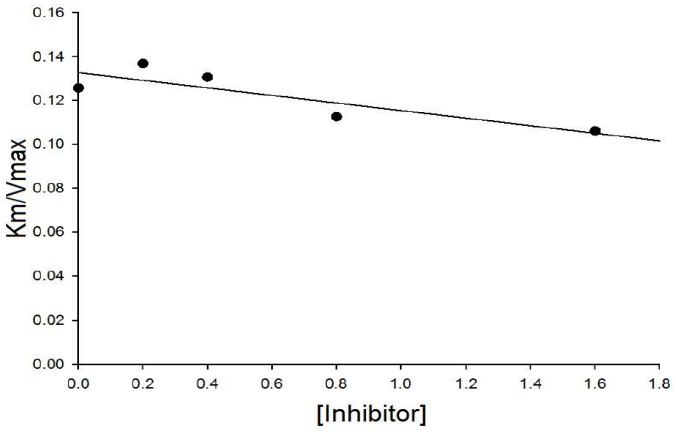
شکل ٤- زایموگرام مهار فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی حشرات کامل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی توسط جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪ عصاره‌ی بذر کلزا در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر. ستون سمت چپ مربوط به فعالیت آنزیم (شاهد) می‌باشد.

کینتیک مهار آنزیمی

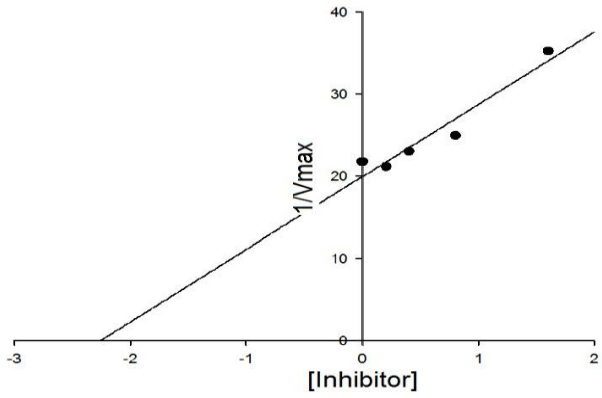
به منظور تعیین ماهیت فرآیند مهار و نیز تعیین ثابت مهاری عصاره‌ی پروتئینی، از غلظت‌های مختلف (میلی-گرم پروتئین در میلی‌لیتر) جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪ کلزا و غلظت‌های مختلف زیرنهشت (درصد) برای بررسی میزان فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی حشرات کامل استفاده شد. با استفاده از برنامه‌ی سیگماپلات، نمودارهای ثانویه که شامل مقادیر K_m/V_{max} در برابر غلظت‌های مختلف مهارکننده (شکل ٥ الف) و همچنین $1/V_{max}$ در برابر غلظت‌های مختلف مهارکننده (شکل ٥ ب) رسم گردید. همان طور که از شکل ٥ مشخص است هر یک از این نمودارها خط مستقیمی می‌باشند که روند متفاوتی در انواع مهار دارند (حسینی نوه و قدمیاری، ۱۳۹۲) و این نوع روند در مهار نارقابتی مشاهده می‌گردد، بنابراین مهار از نوع نارقابتی تعیین شد.

Archive of SID

www.SID.ir



(الف)



(ب)

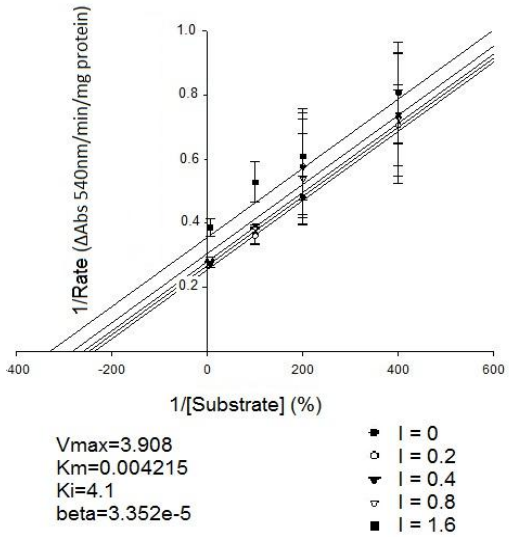
شکل ۵- نمودارهای ثانویه الف) K_m/V_{max} و ب) $1/V_{max}$ در برابر غلظت‌های مختلف جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪ عصاره‌ی بذر کلزا (۰، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۸ و ۱/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) رسم شده توسط برنامه سیگماپلات.

علاوه براین، نمودار سرعت اولیه در برابر غلظت‌های مختلف زیرنهشت و در حضور چندین غلظت مهارکننده به معادلات انواع مختلف مهار برازش داده شد. نتایج به دست آمده در قالب نمودار لاین‌ویور- برک (یکی از روش‌های متداول در تعیین نوع مهار) که شامل معکوس سرعت اولیه در برابر معکوس غلظت زیرنهشت است، ارائه گردید (شکل ٦).

در نتیجه مهار نارقابتی، V_{max} و K_m هر دو کاهش می‌یابند. همان طور که در نمودار لاین‌ویور- برک مشاهده می‌شود، در نبود مهارکننده، بیش‌ترین میزان فعالیت و در حضور حداکثر غلظت مهارکننده، کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده گردید. کمپلکس آنزیم- زیرنهشت در حضور مهارکننده، مقداری فعالیت کاتالیزی نشان داد و فعالیت آنزیم به صفر نرسید، که به اصطلاح، مهار جزئی[1] می‌باشد. در مهار جزئی واحد β که نشان دهنده تغییر در سرعت تولید محصول به علت حضور مهارکننده است، بین صفر و یک می‌باشد که در زیر نمودار لاین‌ویور- برک ارائه شده است.

[1]Partial inhibition

www.SID.ir



شکل ٦- نمودار لاین‌ویور- برک، فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی حشرات کامل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی در حضور غلظت‌های ثابت جزء پروتئینی ۵۰-۳۰٪ عصاره‌ی بذر کلزا (I) (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) و غلظت‌های مختلف نشاسته (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲٪). حداکثر سرعت آنزیمی (V_{max}) (ΔAbs 540nm/min/mg protein)، ثابت میکائیلیس (K_m) (درصد زیرنهشت)، ثابت مهاری (K_i) (میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) و مقدار β در زیر نمودار ارائه شده است.

ثابت مهاری (K_i) ٤/١ میلی‌گرم پروتئین مهارکننده در میلی‌لیتر به دست آمد که این مقدار هر چه قدر برای مهارکننده‌ای کوچک‌تر باشد، آن مهارکننده از نظر قدرت اتصال به آنزیم، مهارکننده‌ی قوی‌تری خواهد بود. داشتن اطلاعات درباره ثابت مهاری برای انتخاب مهارکننده‌های موثر جهت انتقال به گیاهان دیگر، دارای اهمیت می‌باشد (هیلدر و بولتر ۱۹۹۹).

در مهار نارقابتی که در این تحقیق مشاهده گردید، مهارکننده‌ها منحصراً به کمپلکس آنزیم- زیرنهشت در جایگاه دیگری غیر از جایگاه فعال آنزیمی متصل می‌شوند. افزایش تمایل ظاهری آنزیم به زیرنهشت به دلیل اتصال بی‌حاصل زیرنهشت است که به کاهش غلظت آنزیم آزاد منجر می‌گردد. بنابراین، نصف سرعت بیشینه در غلظت نسبتاً پائین‌تری از زیرنهشت به دست می‌آید (کاهش K_m) (حسینی نوه و قدمیاری ۱۳۹۲).

مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۱۲) نوع مهار فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی و بزاقی سن گندم (*Eurygaster integriceps* Puton) را توسط عصاره‌ی پروتئینی بذر تریتیکاله، چندگانه جزئی شناسایی کردند. در مهار چندگانه نیز مهارکننده هم به آنزیم آزاد و هم به کمپلکس آنزیم-زیرنهشت (با تمایل متفاوت) در محلی غیر از جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود (حسینی نوه و قدمیاری ۱۳۹۲). پریا و همکاران (۲۰۱۰) نیز نوع مهارکننده‌ی گندم را روی فعالیت آلفا-آمیلاز سوسک کشیش (*Rhyzopertha dominica* F.) از نوع رقابتی تعیین نمودند. در مهار رقابتی هم مهارکننده فقط به آنزیم آزاد متصل شده و هرگز به کمپلکس آنزیم-زیرنهشت متصل نمی‌شود (حسینی نوه و قدمیاری ۱۳۹۲).

زیست سنجی

نتایج مربوط به مولفه‌های رشدی به دست آمده از زیست سنجی در جدول ۱ آورده شده است و تمامی مولفه‌ها در تیمار با شاهد مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مولفه‌های رشدی و فعالیت آلفا-آمیلاز لاروهای سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی در برگ‌های تیمار شده با آب مقطر (شاهد) و با عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزا روی ارقام مختلف سیب‌زمینی.

مولفه‌ها	آزمایش	ارقام سیب‌زمینی			
		آگریا	بورن	پیکاسو	مارکز
زمان پوست اندازی لاروهای سن سه به چهار (روز)	شاهد	۸/۳۱ ab	۸/۹۱ a	۷/۳۳ b	۸/۰۲ ab
	عصاره	۸/۷۳ ab	۸/٦۰ ab	۸/۰٤ ab	۸/۷٦ ab
وزن لاروهای سن چهار (میلی‌گرم)	شاهد	۱۱۲/۳۳ bc	۱۱۰/۳۳ bc	۱۲٦ a	۱۲۲ ab
	عصاره	۱۱۰/۳۳ bc	۱۱۰/۳۳ bc	۱۰۸ bc	۱۰٤ c
لاروهای سن چهار تشکیل شده (درصد)	شاهد	٤۲/٦۷ ab	۲۹/۳۳ bc	۵۷/۳۳ a	۵۱/۳۳ a
	عصاره	۲۰ c	۱۸/٦۷ c	۲۸ bc	۲۲ c
فعالیت آلفا-آمیلاز (ΔAbs 540 nm/min/mg protein)	شاهد	۲/۱۸ a	۲/۲۵ a	۲/۲٤ a	۲/۲٦ a
	عصاره	۱/۸۵ b	۱/۹۷ ab	۲/۱٤ ab	۲/۱۵ ab

حروف غیرمشابه مربوط به هر مولفه، نشان‌دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵٪ در آزمون دانکن می‌باشند.

عصاره‌ی پروتئینی بذر کلزا زمانی که روی برگ‌های تیمار شده مورد تغذیه لاروها قرار گرفت؛ در هیچ کدام از ارقام زمان پوست اندازی لاروهای سن سه به چهار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نیافت؛ در ارقام پیکاسو و مارکز در مقایسه با شاهد، سبب کاهش معنی-دار وزن لارو سن چهار گردید؛ درصد لاروهای سن چهار تشکیل شده در ارقام آگریا، پیکاسو و مارکز نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت و فقط در رقم آگریا، فعالیت آلفا-آمیلاز لارو سن چهار در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد، که دلیل آن می‌تواند مناسب بودن این ارقام برای تغذیه لاروها باشد. از جمله دلایل عدم موفقیت مهارکننده در مهار آنزیم در شرایط زیستی، می‌تواند غلظت ناکافی مهارکننده به نسبت شرایط آزمایشگاهی و تجزیه شدن مهارکننده در بدن حشره باشد (بولتر و جونگسما ۱۹۹۵).

وارچالسکی و همکاران (۲۰۰۲) اثر ترکیبات غذایی مختلف به همراه مهارکننده‌ی آلفا-آمیلاز گندم را روی فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی لارو شپشه‌ی گندم (*Sitophilus granarius* L.)، شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد (*Anagasta kuehniella* Zeller) و شپشه‌ی زرد آرد (*Tribolium confusum* Duval) در شرایط آزمایشگاهی و زیستی بررسی و بیان کردند که فعالیت مهارکنندگی در هر گونه حشره‌ی آفت و بسته به نوع ترکیب غذایی آن متفاوت می‌باشد. بیش‌ترین میزان مهارکنندگی روی شپشه‌ی زرد آرد و کم‌ترین آن روی شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد بوده است. وجود این مهارکننده در رژیم‌های غذایی مختلف برای شپشه‌ی

Archive of SID

www.SID.ir

گندم سبب تلفات معنی‌دار نسبت به شاهد بوده و لارو شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد روی این رژیم غذایی به هیچ وجه رشد نمی‌کند و دوره‌ی رشدی لارو شپشه‌ی زرد آرد تا ٤٨٪ به تاخیر می‌افتد. پیاسکا-کیتکوسکا و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت‌های مهاری ارقام سه گونه‌ی مختلف از تیره‌ی غلات یعنی گندم، چاودار و تریتیکاله را علیه فعالیت آلفا-آمیلاز سه گونه‌ی آفات انباری یعنی شپشه‌ی گندم، شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد و شپشه‌ی زرد آرد بررسی و عنوان کردند که بیش‌ترین میزان مهاری این آنزیم در شپشه‌ی زرد آرد و کم‌ترین آن در شب‌پره-ی مدیترانه‌ای آرد بوده و از میان بذور مختلف، ارقام گندم بیش‌ترین میزان مهارکنندگی را داشته‌اند. پریا و همکاران (۲۰۱۰) مهارکننده‌ی آلفا-آمیلاز گندم را خالص-سازی نموده و به غذای سوسک کشیش اضافه کردند که سبب کاهش معنی‌داری در رشد و نمو حشره گردید. مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که اثر مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی بذر تریتیکاله در غلظت ۱/٥ میلی‌گرم پروتئین، روی فعالیت آلفا-آمیلاز سن گندم تا ۸۰ ٪ بوده است. هم‌چنین مهرآبادی و همکاران (۲۰۱۱) عصاره‌ی چند گونه‌ی گیاه دارویی را روی فعالیت آلفا-آمیلاز سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus* F.)، سوسک کشیش، شپشه‌ی گندم و لمبه‌ی گندم (*Trogoderma granarium* E.) بررسی کرده و بیان داشتند که این عصاره‌ها طیف وسیع مهارکنندگی یعنی از ٤ تا ٩٥٪ روی فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی آفات انباری داشته‌اند. خان (۲۰۱۱) مهارکننده‌های پروتئینی از بذور نخود، لوبیا، ذرت و گندم استخراج و بیان کرد که این عصاره‌ها به ترتیب می‌توانند ٤۲/۸، ٦۷/۸، ۸۲/۱ و ۷٥٪ فعالیت آلفا-آمیلاز شپشه‌ی قرمز آرد (*T. castaneum* Herbst) را مهار کنند. برزویی و همکاران (۲۰۱۳) اثر مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی بذر گندم را روی فعالیت آلفا-آمیلاز پروانه‌ی پشت الماسی (*Plutella xylostella* L.) وابسته به غلظت شناسایی کردند، به‌طوری‌که در بالاترین غلظت (٦/۸ میکروگرم پروتئین) حدود ۹۱٪ فعالیت آنزیم مهار گردیده است. دسترنج و همکاران (۲۰۱۳) اثر عصاره‌ی پروتئینی بذور چند رقم گندم و لوبیا را روی فعالیت آلفا-آمیلاز و پروتئاز سوسک آرد (*Tenebrio molitor* L.) بررسی کرده و عنوان نمودند که در غلظت ١٤ میکروگرم پروتئین به ترتیب رقم MV17 گندم سبب ۷۱ و ۷۲ ٪ و هم‌چنین لوبیا سبب ٥۸ و ٥٤٪ مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌شوند. نتایج برزویی و بندانی (۲۰۱۳) نشان داد که فعالیت آلفا-آمیلاز و پروتئاز کرم گلوگاه انار (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller) در حضور عصاره‌ی پروتئینی بذور تریتیکاله و گندم مهار می‌گردد، به طوری‌که عصاره‌های پروتئینی بذور گندم و تریتیکاله در غلظت ۱/۷ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر روی فعالیت آلفا-آمیلاز به ترتیب ۸۲ و ۷٥٪ مهار و روی فعالیت پروتئاز ٦۲ و ٥۷٪ مهار را سبب شده‌اند.

مهندسی مقاومت که سبب دفاع القائی و غیرمستقیم می‌شود و ترکیب آن با حشره‌کش‌های دیگر مانند حشره‌کش‌های میکروبی (مثل *Bacillus thuringiensis*) فعالیت‌هایی می‌باشند که در آینده می-توانند مدنظر محققین باشند (چن ۲۰۰۸). در کل درباره اثرات مهارکننده‌های نسل جدید که توان بهتری علیه آنزیم‌های آفات گیاه‌خوار داشته باشند و یا چند عملکردی بوده و روی آنزیم‌های مختلف تاثیر داشته باشند، مطالعات بیش‌تری بایستی صورت بگیرد. علاوه براین، برای تائید توان استفاده از مهندسی پروتئین گیاهان در گیاهپزشکی، بایستی روی آنزیم‌های گیاه‌خواران هدف و غیرهدف تمرکز شود. بدین منظور، توجه به مهارکننده-های آنزیمی در سطح مولکولی و شناسایی انواع

Archive of SID

www.SID.ir

مهارکننده‌ها با بیش‌ترین میزان مهار روی آنزیم‌های موجود هدف، از قدم‌های اساسی می‌باشد. اگرچه تاثیر اصلی گیاهان تراژن ممکن است اغلب در مقایسه با حشره‌کش‌های شیمیایی تجاری کم‌رنگ‌تر شود، اما بررسی اثرات مهم مثبت و یا منفی این گیاهان در کنار طراحی مهارکننده‌های موثر و بیان آن‌ها در گیاهان تراژن، در آینده دور از انتظار نمی‌باشد (شلوتر و همکاران ۲۰۱۰). بنابراین باتوجه به خواص مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی کلزا روی آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی و اثرات سوء آن در مولفه‌های رشدی لاروها که در این تحقیق حاصل شد، شناسایی این پروتئین مهارکننده و استفاده از آن در تولید گیاهان تراژن، می‌تواند روش مناسبی برای کنترل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز تحقیقات اصلاح و تهیه‌ی نهال و بذر کرج و مرکز تحقیقات سیب‌زمینی اردبیل از بابت تامین بذور کلزا و سیب‌زمینی قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

حسینی نوه و و قدمیاری م، ۱۳۹۲. مبانی و مفاهیم روش‌های آزمایشگاهی در بیوشیمی، فیزیولوژی و سم‌شناسی حشرات. انتشارات دانشگاه تهران.

خانجانی م، ۱۳۸٤. آفات سبزی و صیفی ایران. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا.

Baker JE, 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 and Mehrabadi M, 2009. Purification and characterization of midgut α-amylases of *Eurygaster integriceps*. Entomological Science 12: 25-32.

Becker-Ritt AB and Carlini CR, 2012. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. Biopolymers (Peptide Science) 98: 367-384.

Bernfeld P, 1955. Amylases, α and β. Method Enzymology 1: 149-158.

Bolter CJ and Jongsma MA, 1995. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. Journal of Insect Physiology 41: 1071-1078.

Borzoei E, Bandani AR, Dastranj M and Belbasi M, 2013. Effect of proteinaceous extract of wheat seeds on α-amylase activity of diamondback moth, *Plutella xylustella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). SOAJ Entomological Studies 2: 1-10.

Borzoui E and Bandani AR, 2013. Wheat and triticale proteinacious seed extracts inhibit gut α-amylase and protease of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*. Molecular Entomology 4: 13-21.

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

Damle MS, Giri AP, Sainani MN and Gupta VS, 2005. Higher accumulation of proteinase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree). Phytochemistry 66: 2659-2667.

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

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

Gatehouse LN, Christeller JT, Gatehouse HS and Zou XY, 2002. A strong inhibitor of chymotrypsin/elastase is highly antimetabolic to *Helicoverpa armigera* larvae. New Zealand Plant Protection 55: 421-428.

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

Hilder VA and Boulter D, 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance, a critical review. Crop Protection 18: 177-191.

Karimi J, Haubruge E and Francis F, 2010. Development of entomotoxic molecules as control agents: illustration of some protein potential uses and limits of lectins (Review). Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 14: 225-241.

Khan N, 2011. In vitro effects of protienaceous alpha amylase inhibitors on red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Science Research Reporter 1: 101-104 .

Kondrak M, Kutas J, Szenthe B, Patthy A, Banfalvi Z, Nadasy M, Graf L and Asboth B, 2005. Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato. Biotechnology Letters 27: 829-834.

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

Macedo MLR and Freire MDGM, 2011. Insect digestive enzymes as a target for pest control. Invertebrate Survival Journal 8: 190-198.

Mehrabadi M and Bandani AR, 2010. New approach toward α-amylase electrophoresis and isoamylase detection. Munis Entomology and Zoology 5: 1085-1087.

Mehrabadi M, Bandani AR and Saadati F, 2010. Inhibition of sunn pest, *Eurygaster integriceps*, α-amylases by α-amylase inhibitors (T-αAI) from triticale. Journal of Insect Science 10: 179-191.

Mehrabadi M, Bandani AR, Saadati F and Mahmudvand M, 2011. Alpha-amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 1173-1182.

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

Piasecka-Kwiatkowska D, Madaj D and Warchalewski JR, 2007. The biological activity of wheat, rye and triticale varieties harvested in four consecutive years. Acta scientiarum Polonorum/Technologia alimentaria 6: 55-65 .

Priya S, Kaur N and Gupta AK, 2010. Purification, characterization and inhibition studies of α-amylase of *Rhyzopertha dominica*. Pesticide Biochemistry and Physiology 98: 231-237.

Schluter U, Benchabane M, Munger A, Kiggundu A, Vorster J, Goulet M, Cloutier C and Michaud D, 2010. Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective. Journal of Experimental Botany 15: 4169-4183.

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

Warchalewski JR, Gralik J, Winiecki Z, Nawrot J and Piasecka-Kwiatkowska D, 2002. The effect of wheat α-amylase inhibitors incorporated into wheat-based artificial diets on development of *Sitophilus granarius* L., *Tribolium confusum* Duv., and *Ephestia kuehniella* Zell. Journal of Applied Entomology 126: 161-168 .

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of Proteinaceous Extract of Rapeseed on the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Digestive Alpha-Amylase Activity and Some Biological Parameters

Sh Ashouri[1*] and R Farshbaf Pourabad[2]

[1]Former Ph.D. Student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Porfessor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Corresponding author: Sh.ashouri@yahoo.com

Received:5 Mar 2016 Accepted:8 Jun 2016

Abstract

Plants have a set of protein molecules that are able to interfere with the digestion of herbivore insects and can be used as an approach to pest control. In this study, digestive alpha-amylase inhibition of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), by proteinaceous seed extract of rapeseed, *Brassica napus* L. cv. Karaj3 was investigated. The most inhibitory effect of proteinaceous extracts on the alpha-amylase activity was at pH 5. Four precipitated rapeseed proteinaceous fractions; 0-30, 30-50, 50-70, and 70-100% saturation by ammonium sulfate, caused 0, 52, 12 and 0% inhibition on the gut alpha-amylase activity of the fourth instar larvae, respectively. Fraction 30-50% resulted in 84, 86, 74, 52 and 37% reduction in the L1, L2, L3, L4 and adult's gut alpha-amylase activity, respectively. The enzyme inhibition kinetic test was conducted by the fraction 30-50% on the alpha-amylase of adults and the type of inhibition was determined uncompetitive. In the zymogram and studying inhibition on the gel, the inhibitory effect was seen as a reduction in intensity of the bands. In bioassays, different cultivars of potato; Agria, Burren, Picasso and Marx were used. Potato leaves were treated with extract and fed by larvae. No significant difference was observed in the duration of molting from third to fourth-instar larvae on any cultivars. But, weight of fourth-instar larvae was declined on Picasso and Marx and the percentage of fourth instar larval evaluation was decreased on Agria, Picasso and Marx. The alpha-amylase activity of fourth instar larvae declined on Agria, significantly compared to the control.

Keywords: Ammonium sulfate protein precipitation, Bioassay, Enzyme inhibition kinetic, *Leptinotarsa decemlineata*, Zymogram.

Archive of SID

www.SID.ir