مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٣٤١-٣٣٣

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

مهار فعالیت آنزیم آمیلاز کرم غوزه پنبه، با عصاره پروتئینی بذرهای دو گیاه کهورک و نخود

Inhibition of the boll worm, *Helicoverpa armigera* amyloeletic activity by seed protein extracts of *Prosopis farcta* and *Cicer arietinum*

سولماز عظیمی[1*]، شیما رحمانی[2]، سیما مجیدیانی[3]

Solmaz Azimi[*1], Shima Rahmani[2], Sima Majidianii[3]

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

۲- استادیار، گروه حشره شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

۳- دانشجوی دکتری دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ایران

1- Department of Plant Protection, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz,
2- Department of Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Department of Plant Protection, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s_azimi2007@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ٩٦/٢/٤ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٠/٣)

چکیده

کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)، یکی از آفات همه چیز خوار مهم است که در سراسر دنیا شیوع دارد. امروزه به دلیل اثرات نامطلوب سموم شیمیایی، مطالعه مهارکننده‌های آنزیم آلفا-آمیلاز (E.C. 3.2.1.1) در حشرات، به عنوان روش جایگزین برای برنامه‌های مدیریت آفات مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهش پیش رو، لوله گوارش لاروهای سن چهارم کرم غوزه پنبه جداسازی و عصاره آنزیمی آن استخراج شد تا اثر ٤ غلظت مختلف (٠/٤٢، ٠/٨٧، ١/٢ و ١/٤٨ میکروگرم) از عصاره پروتئینی بذر کهورک (*Prosopis farcta*) و نخود (*Cicer arietinum*) پس از استخراج توسط کلرید سدیم ٠/١ مولار، روی فعالیت آلفا آمیلاز حشره بررسی شود. نتایج نشان داد که پروتئین مهارکننده استخراج شده از کهورک در مقایسه با نخود مهارکنندگی بالایی دارد. سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز در حضور غلظت های مختلف از عصاره کهورک و نخود نشان داد بین افزایش غلظت پروتئین و درصد مهار آنزیم رابطه مستقیم وجود دارد. بالاترین مهارکنندگی آنزیم، تحت تأثیر هر دو مهار کننده، در pH برابر با ٩، مشاهده شد. آنالیز زایموگرام در تأیید سنجش کمی آنزیم، مهار آلفا-آمیلاز را در کاهش ضخامت باند نشان داد. بدین ترتیب، بذر نخود و کهورک می‌توانند به عنوان منابع مؤثر و مهمی از مهار کننده آنزیم آلفا-آمیلاز معرفی شوند و به عنوان جایگزین برای سموم شیمیایی در آینده ن مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

کرم غوزه،
آنزیم آلفا آمیلاز،
کهورک،
نخود،

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

مقدمه

کنترل حشرات یکی از مهم‌ترین مشکلات در کشاورزی امروز است. چرا که علیرغم کاربرد وسیع آفت‌کش‌های شیمیایی که تأثیری قاطع و سریع دارند، حشرات ضمن تکامل مکانیسم‌های مقاومت، به مرور زمان حساسیت خود را نسبت به این ترکیبات از دست می‌دهند و مدیریت آن‌ها با مشکل روبرو می‌شود. بنابراین یافتن استراتژی‌های مؤثر جایگزین لازم است تا این حشرات آفت را مدیریت کند و استفاده بی‌رویه آفت‌کش‌های شیمیایی را که موجب مشکلات زیست محیطی نیز می‌شود، کاهش دهد (Wu *et al*., 1997). مهندسی ژنتیک محصولات کشاورزی از طریق به کارگیری ژن‌هایی با ویژگی حشره‌کشی از جمله توکسین باکتری *Bacillus thuringiensis* و ژن‌هایی نظیر بازدانده‌های آنزیم‌های گوارشی مانند پروتئازها، آمیلازها و نیز لکتین موجود در در بسیاری از گیاهان که منجر به مقاومت به حشرات می‌شوند، می‌توانند جایگزین‌های مناسبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی باشند (Franco *et al*., 2002; Lawrence and Koundal, 2002; Vandenborre *et al*., 2011; Kouser and Qiam, 2013).

گیاهان به طور معمول، دارای درجاتی از مقاومت به حشراتی هستند که از آن‌ها تغذیه می‌کنند. این مقاومت در نتیجه مکانیسم‌های دفاعی گیاهان است که در طی تکامل شکل گرفته است. از بین این ترکیبات، مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی که بر هیدرولازهای گوارشی معده حشرات اثر می‌گذارند، دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند. انواع مختلفی از مهارکننده‌های آلفا-آمیلازها و پروتئینازها در بذر و سایر اندام‌های گیاهی وجود دارند، تا مقاومت گیاه در برابر حشرات گیاه‌خوار را تضمین کنند. این ترکیبات که اغلب ساختاری پروتئینی دارند، می‌توانند کاندیداهای مناسبی برای کنترل حشرات گیاه‌خوار باشند (Franco *et al*., 2002).

آلفا-آمیلاز (E.C. α-1,4-glucan-4-glucanohydrolases; 3.2.1.1) گروه مهمی از آنزیم‌های گوارشی کاتالیز کننده اتصالات α-D-(1,4)-glucan موجود در کربوهیدرات‌هایی نظیر نشاسته هستند. الیگوساکاریدهای پدید آمده، نهایتا توسط α-glucosidase به واحدهای گلوکز تجزیه می‌شوند تا جذب شوند (Kaur *et al*., 2014). تاکنون مطالعه زیادی روی بازدارنده‌های آلفا آمیلاز در گیاهان مختلف از جمله در غلات و حبوبات انجام شده است (Altabella and Chrispeels, 1990; Valencia-Jimenez *et al*., 2000; Valencia-Jimenez *et al*., 2008; Esmaeily *et al*., 2016; Li-Byarlay *et al*., 2016). بازدارنده‌های پروتئینی آلفا-آمیلاز در درجه‌ی اول در بذرها و ریشه‌های ذخیره‌کننده نشاسته یافت می‌شوند و گیاه از این مواد علاوه بر مهار آلفا-آمیلازهای بذرزاد، به عنوان استراتژی دفاعی در مقابل گیاه‌خواران استفاده می‌کند. مهارکننده‌های بسیار خوبی در گیاهانی نظیر لوبیای معمولی، گندم و تاج‌خروس یافت شده‌اند که در برابر آلفا-آمیلازهای برخی از حشرات و پستانداران فعال هستند (Franco *et al*., 2002; Titarenko and Chrispeels, 2000).

کرم غوزه، *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)، آفتی با پراکنش جهانی است و در آفریقا، خاورمیانه، جنوب اروپا، هند، آسیای مرکزی و جنوب شرقی آسیا، شرق و شمال استرالیا، نیوزیلند و بسیاری از جزایراقیانوس آرام شرقی خسارت می‌زند (Fitt, 1989). این آفت پلی فاژ بوده و به بسیاری ازگونه‌های گیاهی در جهان حمله می‌کند اما برخی از میزبان‌ها را ترجیح می‌دهد. بقا و زنده‌مانی لارو به رژیم غذایی و درجه حرارت بستگی دارد. توانایی دیاپوز اختیاری، مهاجرت، تحرک بالا و ترکیبی از باروری زیاد و طول مدت کوتاه هر نسل به بقای این آفت در زیستگاه‌های ناپایدار کمک می‌کند. کنترل شیمیایی این آفت به دلیل ظهور مقاومت به حشره‌کش‌ها خیلی مؤثر نیست (Fitt, 1989; Kotkar *et al*., 2009).

اثرات منفی آفت‌کش‌های شیمیایی موجب شده است که راه‌های جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل آفات از جمله کرم غوزه نیز در نظر گرفته شود (Isman, 2006). در زمینه مهار آنزیم‌های گوارشی این آفت مطالعات متعددی در ارتباط با اثر ارقام مختلف گیاهی ضمن تغذیه آفت (Kotkar *et al*., 2009; Naseri *et al*., 2010; Sarate *et al*., 2012) و اثرات مهار کننده‌های استخراج شده از گیاهان بر لاروهای این حشره به صورت in vivo و یا in vitro انجام گرفته است (Kotkar *et al*., 2009; Gadge *et al*., 2015).

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

در راستای ارزیابی کمی و کیفی مهار شوندگی آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی در لاروهای کرم غوزه پنبه، *H. armigera*، در بررسی پیش رو، اثر عصاره پروتیینی استخراج شده از بذر کهورک، *Prosopis farcta*، و نخود، *Cicer arietinum*، روی فعالیت این آنزیم مستخرج از لوله گوارشی لاروهای سن چهارم، مورد مطالعه قرار گرفت. گیاه کهورک و نخود هر دو متعلق به تیره‌ی نخودیان (Fabaceae) هستند. کهورک یا جغجغه علف هرزی چند ساله است که در اغلب مناطق خشک ایران انتشار دارد و نخود یک منبع غذای پروتئینی است که در اغلب مناطق دنیا قابل کشت است (Farah vash and Mobasher, 2007).

مواد و روش‌ها

پرورش حشره: برای پرورش آزمایشگاهی کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)، از غذای مصنوعی مبتنی بر لوبیا (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، ۵ میلی لیتر روغن آفتاب گردان و ۸۵۰ میلی لیتر آب مقطر) با تغییراتی استفاده شد (Shorey and Hale, 1965). این حشرات در دمای ۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) نگهداری شدند.

تشریح و جدا سازی اندام گوارشی: برای جداسازی لوله گوارشی، پس از این که لارو های سن چهار یک روزه (از روی اندازه کپسول سر و باقیمانده جلد حاصل از پوست اندازی شخیص انجام گرفت) کرم غوزه روی یخ بی‌حس شدند، سطح شکمی بدن لارو با قیچی بریده شد و لوله گوارش با استفاده از پنس جدا شد. تعداد پنج عدد لوله گوارش در داخل هر یک از میکروتیوب‌های با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی پانصد میکرولیتر آب دو بار تقطیر سرد قرار داده شدند.

استخراج عصاره آنزیمی: برای استخراج عصاره آنزیمی، نمونه‌ها در داخل میکروتیوب هموژنایز شدند. برای این منظور از یک هموژنایزر دستی استفاده شد. سپس نمونه‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، بخش رونشین جدا و به عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج مهارکننده کهورک و نخود: برای استخراج بازدارنده-ها، از روش بیکر (Baker, 1983) و مهرآبادی (Mehrabadi, 2010) با اندکی تغییرات استفاده شد. به طور خلاصه، مقدار ۳۰ گرم بذر کهورک و نخود در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر NaCl با مولاریته ۰/۱، مخلوط شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق همزده شد. مخلوط حاصله در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به منظور رسوب‌دهی پروتئین، رونشین با سولفات آمونیوم ۷۰ درصد اشباع مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ٤٥ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس به آرامی هم زده شد. مخلوط سولفات آمونیوم- پروتئین، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با سرعت g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد و رسوبات حاصله با دو میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۰/۰۲ مولار، اسیدیته ۷)، به صورت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۲۰ ساعت در درون آب مقطر، دیالیز شد و در نهایت به منظور غیرفعال شدن آمیلازهای درون‌زاد، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سلسیوس در داخل حمام آب گرم قرار داده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ١٤ درجه سلسیوس و با سرعت g ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رونشین جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

بررسی pH بهینه برای فعالیت مهارکننده‌های گیاهی آلفا آمیلاز کرم غوزه: به منظور سنجش میزان فعالیت مهارکنندگی عصاره های پروتئینی کهورک و نخود در pHهای مختلف بر آنزیم آلفا-آمیلاز، از بافر یونیورسال (گلایسین، مس(2-morpholinoethan sulfonic acid) ، سوکسینات ۰,۰۲ مولار) (Hosseinkhani and nematgorgani, 2003) با طیف اسیدیته ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰و ۱۱ استفاده شد. میزان مهار فعالیت آمیلازی بعد از ۳۰ دقیقه اینکوبات با مهارکننده کهورک و نخود محاسبه شد. نمونه کنترل در هر اسیدیته تنها با حضور عصاره آنزیمی و بدون افزودن مهارکننده در نظر گرفته شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره پروتیینی استخراج شده از کهورک و نخود روی فعالیت آلفا-آمیلاز: برای بررسی اثر عصاره پروتیینی کهورک و نخود روی فعالیت آلفا-آمیلاز از غلظت‌های ۰/۴۲، ۰/۸۷، ۱/۲ و ۱/۴۸ میکروگرم پروتئین کهورک و نخود استفاده شد. غلظت‌های مختلف کهورک و نخود با عصاره آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه شد. سپس فعالیت آمیلولیتکی با استفاده از روش برنفیلد (Bernfeld, 1955) و بیکر (Baker, 1987) با اندکی تغییرات انجام شد. به این صورت که از نشاسته یک درصد به عنوان 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 میکرو لیتر از نمونه توسط دستگاه الایزا ریدر (ELX 808) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش مهارکننده در ژل: زایموگرام فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از روش ژل الکتروفورز (Lammli, 1970) انجام شد. به این صورت که از پلی اکریل آمید ۱۰٪ برای ژل جداکننده و ٪۴ برای ژل متراکم کننده استفاده شد. الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ برای ۲ ساعت انجام شد. پس از رسیدن رنگ به انتها، ژل از شیشه جدا شده و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱٪ تریتون X100 قرار گرفت. سپس برای مدت ۱/۵ ساعت در بافر گلیسین ۰/۰۲ مولار (Glycin-NaOH) اسیدیته ۹ حاوی ۲ میلی مولار $CaCl_2$ و ۱۰ میلی مولار NaCl و ۱٪ نشاسته قرار گرفت. و در پایان ژل با آب مقطر شسته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در محلول لگول (۳٪ KI و ۱/۳ ٪ I_2) قرار گرفت تا باندهای فعالیت آلفا آمیلازی در زمینه تیره به صورت روشن دیده شوند.

سنجش میزان پروتئین: تعیین میزان پروتئین بر اساس روش برادفورد (Bradford, 1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin) به عنوان استاندارد انجام شد.

تجزیه و تحلیل دادها داده ها: برای انجام این آزمایش، ٤ غلظت از هرکدام عصاره پروتئینی مربوط به کهورک و نخود بر اساس طرح بلوک کامل تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. گروه بندی داده ها با استفاده از آزمون توکی بررسی شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۱ و Sigma plot 12 استفاده شد.

نتایج

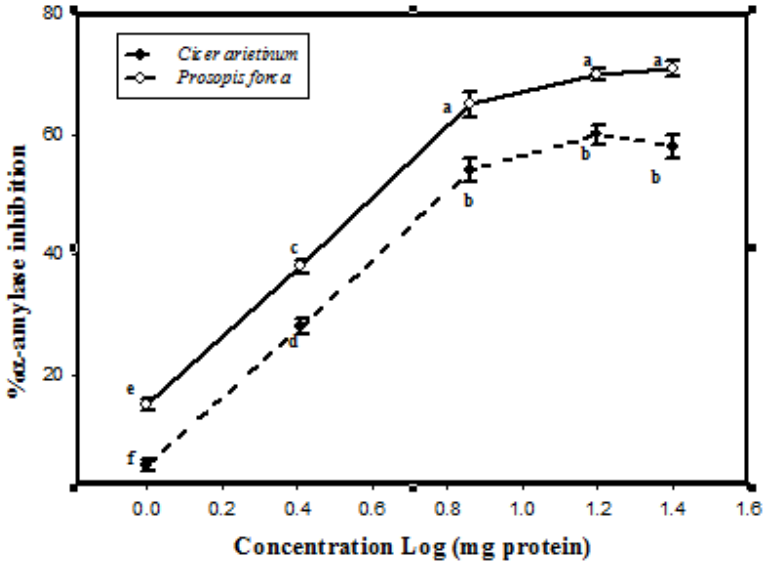
فعالیت آمیلازی در حضور ۰/۴۲، ۰/۸۷، ۱/۲، ۱/۴۸ میکروگرم غلظت عصاره‌های پروتئینی کهورک و نخود مورد قرار سنجش گرفت. میزان مهار آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از غلظت ۱/۴۸ میکروگرم پروتئین کهورک و نخود مهارکننده به ترتیب برابر با ۷۰ و ٥٦ درصد بود (شکل ۱). همچنین، بهینه فعالیت بازدارندگی آنزیم تحت تأثیر هر دو مهار کننده، در محدوده pH بین ۸ تا ۹/۵ مشاهده شد و بیشترین میزان مهار، در pH برابر با ۹ انجام گرفت که به ترتیب در تیمارهای *C. arietinum* و *P. farcta*، ٦٠ و ۷۰ درصد آنزیم مهار شد (شکل ۲). نتایج بدست آمده در این بررسی با داده های سایر محققین هم تطابق دارد. والنسیا و همکاران (Valencia *et al.*, 2000) گزارش دادند که عصاره‌ی پروتئینی *Amaranthus cruentus* با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مهار ۸۰ درصدی فعالیت آلفا آمیلاز *Hypothenemus hamper* شد، در حالی‌که عصاره‌ی پروتئینی *Amaranthus hybrid*، باعث مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز حشره مذکور به میزان حدود ٤٠ درصد شد. مهرآبادی و همکاران (Mehrabadi *et al.*, 2009) اثر مهارکننده آمیلاز تریتیکاله روی آمیلاز سن گندم بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که اثر این مهارکننده روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سن گندم، وابسته به دز است و در دز پایین (۰/۲۵ میلی گرم) تقریبا باعث حدود ۱۰ درصد مهار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سن گندم شد، در حالی‌که در دز بالا (۱/۵ mg) باعث مهار حدود ۸۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سن گندم گردید. در سال ۲۰۱٦، اثر مهارکننده تریتیکاله روی مینوز گوجه فرنگی بررسی شد، مشاهده‌ها نشان داد ۸ میکروگرم پروتئین استخراج شده از بذر تریتیکاله، ٦٦ درصد قابلیت مهار آنزیم آمیلاز مینوز گوجه فرنگی را دارد (Esmaeily and Bandani, 2016).

افزون بر سنجش کمی با استفاده از روش طیف سنجی، کیفیت مهار آنزیم آلفا-آمیلاز در ژل پلی اکریل آمید نیز مورد بررسی قرار گرفت. چنان‌که در شکل ۳ دیده می‌شود روند مهار وابسته به نوع

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

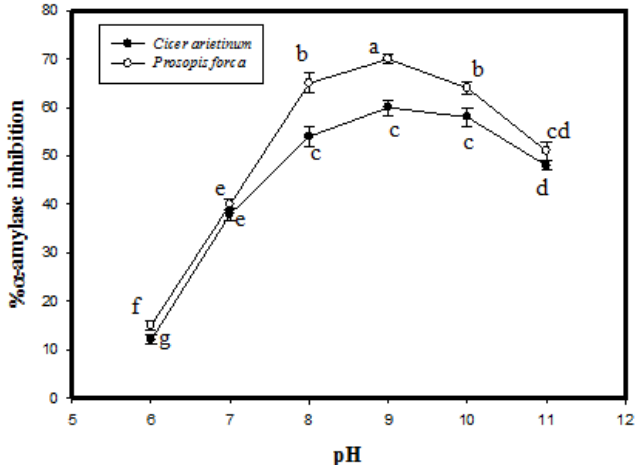
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

پروتئین است. به این صورت که در بالاترین غلظت مهارکننده (۱۰/۶۲۵ میکروگرم پروتئین) دو باند فعالیت آنزیم (یعنی باندهای A_2 و A_3) به صورت کامل حذف شدند در حالی که باند A_1 هم از شدت باند کاسته شد. در پایین‌ترین دز، دو باند ذکر شده حذف شدند ولی شدت باند اصلی هم‌چنان زیاد بود. گزارش شده است که حضور تعدادی ایزوفرم آمیلاز در حشرات آفت راهکاری کارا برای فائق آمدن حشرات بر مهارکنندهای آمیلاز تولید شده در گیاهان است (Esmaeily and Bandani, 2016). در این حشره همچنان‌که در شکل دیده می‌شود سه ایزوآنزیم مختلف دیده می‌شود. همچنین محققین مهار شدن آمیلاز حشرات *Sitophilus oryzae, Tribolium castaneum, Callosobruchus chinensis, Corcyra cephalonica, Spodoptera litura, Plutella xylostella, Helicoverpa armigera, Achaea janata* را توسط مهارکننده‌های ارزن به روش سنجش در ژل بررسی کردند (Sivakumar *et al*., 2006). مطالعه زایموگرام نشان داد که تعداد ایزوزایم‌های آنزیم از یک تا هشت عدد متغییر بودند. *H. armigera*، *S. litura*، *C. chinensis* و *C. cephalonica* بیش از پنج ایزوزایم را نشان دادند و در حالی که سایرین دارای یک تا چهار ایزوزایم بودند.



شکل۱– اثر غلظت‌های مختلف پروتئین کهورک و نخود بر میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا–آمیلاز لوله گوارشی لارو سن چهارم کرم غوزه.

Fig. 1- The effect of different concentrations of *C. arietinum* and *P. farcta* protein extracts on inhibition of the fourth instar larvae of bollworm α-amylase activity.

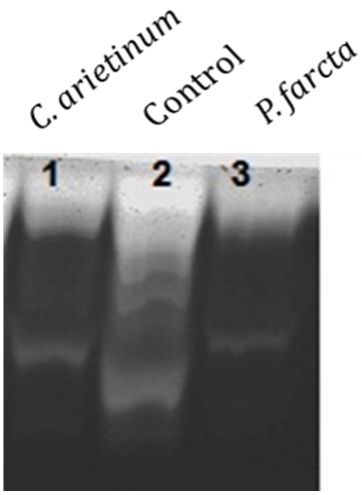


شکل۲– اثر pH بر میزان مهار آنزیم آلفا–آمیلاز لوله گوارشی لارو سن چهارم کرم غوزه توسط عصاره پروتئینی نخود و کهورک.

Fig. 2. The effect of different pHs on inhibition of the α-amylase activity in the fourth instar larvae of bollworm using *C. arietinum* and *P. farcta* protein extracts.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

مطالعه الکتروفورز مهار کننده ارزن نشان داد که این مهارکننده قادر به کاهش فعالیت آمیلاز *H. armigera*، *P. xylostella*، *S. litura* و *C. cephalonica* است. در *T. castaneum* میزان ناچیزی از مهار شوندگی دیده شد و دادهای مشابهی در مورد *A. janata* بدست آمد (Sivakumar *et al*., 2006). هم‌چنین تأثیر مهارکننده‌های استخراج شده از گندم و تریتیکاله روی فعالیت آمیلاز زنبور *Arge rosae* Linnaeus (Hym.: Argidae) بررسی شد، که نتایج نشان داد که مهارکننده گندم و تریتیکاله، به ترتیب، ۱۱ و ۶۱ درصد از فعالیت آمیلاز گوارشی این حشره را مهار کردند(Mohammadzadeh *et al*., 2013). آنزیم آمیلاز نقش مهمی در تغذیه حشرات گیاه‌خوار ایفا می‌کند. بنابراین بررسی فعالیت آنزیم آمیلاز در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. ترکیبات موجود در بذرهای متعلق به گیاهان پروانه آسا نقش مهمی در مهار آنزیم‌های گوارشی از جمله آمیلاز دارد. نتایج نشان داد مهار آنزیم آمیلاز توسط عصاره پروتئینی مستخرج از کهورک و نخود از اسیدیته محیط تاثیر زیادی نمی‌گیرد که این یک مزیت برای استفاده از این مهارکننده‌ها می‌باشد. همچنین عصاره پروتئینی مربوط به کهمرک و نخود در غلظت پایین اثر مهارکنندگی خود را از دست نمی‌دهند که در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات اهمیت زیادی خواهند داشت. با شناسایی پروتئین‌های بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی، محققین اعلام کردند که این پروتئین‌ها یکی از عوامل مهم ایجاد مقاومت گیاهان به آفات است (Gatehouse *et al*., 1979).



شکل ۳- بررسی اثر مهارکنندگی کهورک و نخود بر روی آمیلاز گوارشی لارو سن چهارم کرم غوزه در ژل الکتروفورز. تیمار نخود ستون سمت چپ (شماره ۱) ستون دوم تیمار شاهد و ستون سوم مربوط به تیمار کهورک است.

Fig. 3. Inhibition effect of *P. farcta* and *C. arietinum* seed extracts on the digestive α-amylase of the fourth instar larvae of bollworm in electrophoresis gel. First column of left hand shows *C.arietinum*, second column shows Control and third column shows *P.farcta*

در ابتدا اصلاح گیاهان به صورت سنتی می‌گرفت. امروزه با توسعه روش‌های زیست‌فناوری، ژن‌های عامل مقاومت به گیاهان منتقل می‌شوند تا علیه آفات بیان شوند. اولین مثال استفاده از گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های سمی گیاهی علیه حشرات، ژن بازدارنده آنزیم تریپسین بود که در گیاه تنباکو برای مقابله با لارو بالپولکداران تولید شد (Hilder *et al*., 1987; Silva *et al*., 2001). از زمان اولین انتقال ژن به گیاهان تا به امروز، تلاش‌های زیادی صورت گرفته است تا موثرترین ژن‌های عامل مقاومت به آفات شناسایی شود، تا گیاهان مقاوم به آفات تولید شود. بیش از هر چیز محققین در تلاش‌اند تا ژن‌هایی را انتخاب کنند که منشا گیاهی داشته باشند تا سازگار با محیط زیست باشند. چنان‌چه تحقیقات نشان داده انتقال ژن‌های ناسازگار مشکلات زیست محیطی و اثرات نامطلوب بر سایر موجودات غیر هدف نشان می‌دهد. در این میان ژن‌های پروتئین‌های بازدارنده آنزیم‌های گوارشی، از بذور گیاهان مختلف انتخاب می‌شود و منشا گیاهی دارند. بنابراین یکی از راه‌کارهای تولید گیاهان تراریخته، انتقال ژن-

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

های کد کننده پروتئین‌های بازدارنده آنزیم‌های گوارشی است. امید است بتوان با شناسایی توالی اسید آمینه‌های مهارکننده آنزیم آمیلاز و با انتقال ژن مرتبط به گیاهان زراعی، گیاهان مقاوم به آفات را تولید کرد.

منابع

AltabelIa T, and Chrispeels MJ. 1990. Tobacco Plants Transformed with the Bean a Gene Express an Inhibitor of Insect a-Amylase in Their Seeds. Plant Physiology 93: 805–810.

Baker JE. 1983. Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeama* is and *Sitophilus granaries*. Insect Biochemistry 13:421-428.

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. 2005. Effect of plant α-amylases inhibitors on sun pest, *Eurygaster integriceps* Puton. α-amylase activity. Communications in agricultural and applied biological sciences 70(4): 869–873.

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

Biggs DR. and McGregor P.G. 1996. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (Costelyrazealandica; Coleoptera: Carabidae) as a basis for selecting inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 26: 69–75.

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.

Dias SC0, Silva MC. Teixeira FR. Figueira EL. Oliveira-Neto, OB. Lima LA. Franco OL. Grossi-de-Sa MF. 2010. Investigation of insecticidal activity of rye a-amylase inhibitor gene expressed in transgenic tobacco *(Nicotiana tabacum*) toward cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). Pesticide Biochemistry and Physiology 98: 39–44.

Esmaeily M, Bandani AR, Farahani S and Amini S. 2016. Effect of seed proteinaceous extracts on a-amylase activity of Carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Entomology and Zoology Studies 4(4): 129–134.

Farrah Vash F. and Mobasher M. 2007. Plant production modern technology (translation).Islamic Azad University Tabriz Branch Publication p: 631. (In Persian).

Fitt GP. 1989. The ecology of Heliothis species in relation to agroecosystems. Annual Review of Entomology 34, 17–52.

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

Gadge PP. Wagh SK. Shaikh FK. Tak RD. Padul MV. Kachole MS. 2015. A bifunctional α-amylase/trypsin inhibitor from pigeonpea seeds: Purification, biochemical characterization and its bio-efficacy against Helicoverpa armigera. Pesticide Biochemistry Physiology 125:17–25.

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

Hemati SA. Naseri B, Ganbalani GN. Dastjerdi HR. Golizadeh A. 2012. Effect of different host plants on nutritional indices of the pod borer, *Helicoverpa armigera*. Journal of Insect Science 12–55.

Hosseinkhani S. andNemat-Gorgani M. 2003. Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilizationon hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. Enzyme and Microbial Technology 33: 179–184.

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

Kaur R, Kaur N, Gupta AK. 2014. Structural features, substrate specificity, kinetic properties of insect α-amylase and specificity of plant α-amylase inhibitors. Pesticide Biochemistry Physiology 116:83–93.

Kotkar HM. Sarate PJ. Tamhane VA. Gupta VS. Giri AP. 2009. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigerato* feeding on various host plants. Journal of Insect Physiology 55: 663-670.

Kouser Sh. and Matin Q. 2013. Bt cotton, damage control and optimal levels of pesticide use in Pakistan. Environment and Development Economics 19(6): 704–723.

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

Lawrence PK. and Koundal KR. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Electronic Journal of Biotechnology 5 (1): 1–17.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

Li-Byarlay H, Pittendrigh BR. and Murdock L.L. 2016. Plant Defense Inhibitors Affect the Structures of Midgut Cells in *Drosophila melanogaster* and *Callosobruchus maculatus*. InternatIonal Journal of Insect science 8: 71–79.

Marshall JJ, Lauda C.M. 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*.The Journal of Biological Chemistry 250: 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 10:179.

Mehrabadi M, Bandani AR, Saadati F. and Ravan S. 2009. Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae), digestive α-amylase, α-glucosidase and β-glucosidase. Journal of Asia-Pacific Entomology 12: 79–83.

Naseri B, Fathipour Y, Moharramipour S, Hosseininaveh V, Gatehouse AM. 2010. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. Pest Management Science. 66(12):1316–23.

Shorey HH, Hale RL. 1965. Mass–rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. Journal of Economic Entomology 58: 522–524.

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

Titarenko E, and chrispeels MJ. 2000. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α-amylase of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30: 979–990.

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

Valencia-Jimenez A, Arboleda JW, Lopez Avila A, and Grossi-de-Sa M F. 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.

Vandenborre G, Smagghe G, Els JM. 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochemistry 72 (13): 1538–1550.

Wu Y, Lewellyn D, Mathews A, and Elizabeth SD, 1997. Adaptation of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to a proteinase inhibitor expressed in transgenic tobacco. Molecular Breeding 3: 371–380.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

Inhibition of the boll worm, *Helicoverpa armigera* amyloeletic activity by seed protein extracts of *Prosopis farcta* and *Cicer arietinum*

Solmaz Azimi[1*], Shima Rahmani[2], Sima Majidianii[3]

1- Department of Plant Protection, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

2- Department of Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of Plant Protection, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Email corresponding author: s_azimi2007@yahoo.com

Abstract

Cotton boll worm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is an important polyphagous pest throughout the world. Due to the adverse effects of chemical pesticides, alpha-amylase enzyme inhibitors in insects have been noticed as an alternative method for the pest management programs. In this project, whole gut of the fourth instar larva was dissected and the enzyme extract was pulled out. After removing seed protein extracts of *Prosopis farcta* and *Cicer arietinum* by sodium chloride 0.1 M, the effect of four different concentrations of both seed extracts (1.48, 1.2, 0.87 and 0.42 µg) were studied on alpha-amylase activity of boll worm. According to the data, the protein extract of *P. farcta* had greater ability to inhibit cotton boll worm amylase. Enzyme assays in the presence of different concentrations of *C. arietinum* and *P. farcta* extracts showed enzyme inhibition in a dose-dependent manner. The maximum enzyme inhibition was in pH 9. Zymogram analysis confirmed quantitative enzyme assay and showed a sharp reduction in the band thickness during the amylase inhibition. Consequently, the seeds of both *P. farcta* and *C. arietinum*, had the potential to be considered as effective and important sources of alpha-amylase inhibitors and noticed as substitutes for chemical pesticides in the near future.

Keywords: Boll worm, alpha-amylase, *Prosopis farcta*, *Cicer arietinum*

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8]