نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 30، شماره 3، پاییز 1395، ص. 459-449

Journal of Plant Protection
Vol. 30, No. 3, Fall 2016, P. 449-459

تأثیر مهارکننده‌های پروتئینی بذر گیاهی بر فعالیت پروتئاز گوارشی شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta Meyrick* (Lep.: Gelechiidae)

مجتبی اسمعیلی[1]- علیرضا بندانی[2*] - قدرت الله صباحی[3]

تاریخ دریافت: 1394/02/01
تاریخ پذیرش: 1394/12/24

چکیده

مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta Meyrick* (Lep.: Gelechiidae) از مهم‌ترین آفات این محصول در جهان محسوب می‌شود که در سال‌های اخیر به کشور وارد شده است. هدف این مطالعه تعیین اثر عصاره‌های پروتئینی استخراجی از دانه‌های 12 گیاه بر فعالیت پروتئاز گوارشی این حشره است. در این مطالعه اسیدیته بهینه فعالیت پروتئازی و تأثیر اسیدیته بر فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ها نیز تعیین گردید. این بررسی نشان داد که ترکیبات استخراج شده از دانه گیاهان نخود، کلزا و دو رقم گندم (البرز و افلاک) به ترتیب با 57، 53، 51 و 50% مهارکنندگی اثر چشمگیری بر فعالیت پروتئاز لارو مینوز گوجه‌فرنگی دارند. همچنین مهارکننده‌های استخراج شده از تریتیکاله، رقم سیوند گندم و باقلا به ترتیب با 44، 43 و 40% مهارکنندگی نیز توانایی خوبی در مهار پروتئاز مینوز گوجه‌فرنگی نشان دادند. اما مهارکننده‌های داتوره، لوبیا و یولاف وحشی به ترتیب با 26، 25 و 24% مهارکنندگی نسبت به سایر مهارکننده‌ها تأثیر کمتری روی پروتئاز لاروی نشان دادند. این مطالعه همچنین نشان داد که بیشینه فعالیت پروتئازی در آفت مذکور در اسیدیته 10 و دمای 40 درجه سلسیوس صورت می‌گیرد. از طرفی بیشترین مهارکنندگی حاصله از دانه‌های نخود، کلزا و دو رقم گندم البرز و افلاک در اسیدیته‌های قلیایی انجام شد. با توجه به قلیایی بودن اسیدیته معده آفت، و اینکه بیشترین فعالیت آنزیم نیز در اسیدیته قلیایی است می‌توان نتیجه گرفت که این مهارکننده‌ها قادرند در شرایط طبیعی (*In vivo*) در مهار پروتئاز آفت مؤثر واقع شوند هر چند برای تحقق این امر انجام آزمایش‌های تکمیلی ضروری خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: پروتئاز، عصاره‌های پروتئینی، مهارکنندگی، مینوز گوجه‌فرنگی

مقدمه

شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی با نام علمی *Tuta absoluta Meyrick* (Lep.: Gelechiidae) به تهدیدی جهانی برای محصول گوجه فرنگی در بیشتر مناطق جهان تبدیل شده است (10 و 17). این آفت بومی آمریکای جنوبی بوده و اولین بار در سال 1964 از آرژانتین گزارش شد (13). این آفت پراکنش گسترده‌ای در جهان دارد به طوری‌که اکنون در قاره‌های آمریکا، اروپا، آسیا و آفریقا انتشار یافته و شدیدترین و اقتصادی‌ترین خسارات را به گوجه‌فرنگی وارد می‌سازد (30). در ایران این آفت برای اولین بار در سال 1389 از آذربایجان غربی گزارش شد و بعد از آن در سایر استان‌های کشور گسترش یافت به طوری‌که در حال حاضر در بیشتر مناطق کشور وجود دارد و در بعضی استان‌ها خسارت اقتصادی وارد می‌کند (18). آفت با تغذیه از برگ، ساقه، گل و میوه باعث خسارت جدی به محصول می‌شود (27) و در صورت عدم کنترل، خسارت آن به 100 درصد نیز می‌رسد (10). به طور معمول حشره‌کش‌های فسفره و پایروتروئیدی برای کنترل آن به کار می‌روند ، البته اخیرا سم با نحوه تأثیر متفاوت اسپینوساد نیز برای کنترل آن به کار می‌رود (28). در بعضی از مناطق، سمپاشی به صورت هفته‌ای یک بار صورت می‌گیرد که این باعث جلوگیری از افزایش جمعیت آفت و در نتیجه باعث افزایش محصول می‌شود، با این وجود افزایش مصرف سموم باعث افزایش مقاومت این آفت شده است (28). مقاومت به حشره‌کش‌ها یک مشکل بزرگ و عامل محدودکننده در کنترل این آفت در مناطق گسترش آن است (28 و 30). بنابراین مشکلات مقاومت و همچنین اثرات منفی آفت‌کش‌های شیمیایی موجب شده است که راه‌های جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل آفات در نظر گرفته شوند (20).

تعداد زیادی ژن در گیاهان و میکروب‌ها شناسایی شده‌اند که

1، 2 و 3- به ترتیب دانشجوی دکتری حشره شناسی، استاد و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: (Email: Abandani@ut.ac.ir

محصول آن‌ها برای حشرات گیاهخوار سمی بوده و این توانایی را دارند تا به گیاهان منتقل شوند و با ایجاد گیاه تراریخته، سبب مقاومت آن‌ها در برابر حشرات گیاهخوار شوند (14). مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی (مانند آمیلازها و پروتئازها) موجود در برخی گونه‌های گیاهی، لکتین‌های استخراج شده از بعضی گیاهان و قارچ‌ها و نیز آندوتوکسین باکتری Bt می‌توانند به این منظور استفاده شوند (12). اولین مثال استفاده از گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های تولیدکننده‌ی پروتئین‌های بازدارنده آنزیم‌ها علیه حشرات، ژن بازدارنده آنزیم تریپسین بود که در گیاه تنباکو برای مقابله با لارو بالپولکداران تولید شد (19 و 31).

لاروهای مینوز گوجه‌فرنگی برای هضم مواد غذایی مورد استفاده‌ی خود که شامل برگ، میوه، گل و ساقه است نیازمند آنزیم‌های مختلف گوارشی به خصوص آمیلاز و پروتئازها هستند و بنابراین این آنزیم‌ها می‌توانند هدف مناسبی برای بسیاری از مهارکننده‌های آنزیمی قرار گیرند تا با از کار افتادن آن‌ها تغذیه حشره مختل و به مرگ آن منجر شود.

همچنین، سامانه‌های متابولیکی همانند دیگر سامانه‌های فیزیولوژیک، در تعداد کمی از حشرات بررسی شده‌اند. کشف این سامانه‌ها در حشرات، اغلب بر پایه‌ی اندازه‌گیری آنزیم‌های کلیدی، واکنش‌های بیوشیمیایی و محصولات تولید شده، صورت می‌گیرد (23).

بیشتر گیاهان دارای ترکیبات پروتئینی هستند که می‌توانند بسیاری از آنزیم‌های موثر در هضم پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها را مهار کنند. در این بین غلات، حبوبات و گیاهانی مانند کلزا، تاج خروس وحشی و سیب‌زمینی بیش از سایر گیاهان مورد توجه و بررسی قرار گرفته و بر اساس برخی تحقیقات توانسته‌اند آنزیم‌های گوارشی را در حشرات مورد آزمایش مهار کنند (12، 21 و 34).

تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با تأثیر مهارکننده‌های مختلف گیاهی روی پروتئاز گوارشی شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی انجام نشده است. هدف این تحقیق بررسی میزان تأثیر عصاره‌های پروتئینی استخراج شده از دانه‌های سه رقم مختلف گندم *Triticum aestivum* L. (شامل سیوند، افلاک و البرز)، تریتیکاله *Triticosecale wittmack*، تاج خروس *Amaranthus retroflexus* L.، کلزا *Brassica napus* L.، باقلا *Vicia faba* L.، لوبیا *Phaseolus vulgaris* L.، نخود *Pisum sativum* L.، ماش *Vigna radiate* L.، یولاف وحشی *Avena fatua* L. و داتوره *Datura stramonium* L. بر پروتئاز گوارشی این حشره می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

لاروهای سنین مختلف مینوز گوجه‌فرنگی از مزارع شهرستان کرج جمع‌آوری شدند و درون ظروف پرورش روی برگ‌های گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاهی (دمای 1±25 درجه سلسیوس، دوره نوری 8:16 (روشنایی: تاریکی) ساعت و رطوبت نسبی 5±70 درصد) پروش یافتند.

جداسازی اندام گوارشی

برای جداسازی اندام گوارشی ابتدا تعداد 100 لارو سن آخر آفت روی یخ بی‌حس شد. سپس ابتدا و انتهای بدن لارو با دو پنس گرفته و در دو جهت مخالف کشیده شد تا لوله گوارش از داخل بدن خارج شود. لوله گوارش تا زمان آزمایش‌های بعد درون میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر در دمای 4 درجه سلسیوس قرار گرفت.

استخراج آنزیم

استخراج آنزیم به روش بندانی و همکاران (4) با اندکی تغییر انجام شد، به این صورت که لوله‌های گوارشی موجود در درون میکروتیوب با استفاده از هموژنایزر دستی روی یخ همگن شدند. سپس، نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Universal 32 R) در دمای چهار درجه سلسیوس و با سرعت 15000 g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، بخش رونشین محلول جدا و به عنوان منبع آنزیم در دمای 20- درجه سلسیوس نگهداری شد.

استخراج مهارکننده‌ها از دانه‌های گیاهی

مهارکننده‌های پروتئینی به روش بیکر (2)، ملو و همکاران (26) و دسترنج و همکاران (9) با اندکی تغییر استخراج شدند. این مهارکننده‌ها از دانه‌های سه رقم مختلف گندم (سیوند، افلاک و البرز)، تریتیکاله، تاج خروس، کلزا، باقلا، لوبیا، نخود، ماش، یولاف وحشی و داتوره استخراج شدند. به این منظور در ابتدا 30 گرم از هر کدام از دانه‌ها وزن و کوبیده شده و به صورت آرد درآمدند. از 100 میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم با غلظت 0/1 مولار برای استخراج پروتئین‌ها استفاده شد. به این منظور پس از اضافه کردن محلول کلرید سدیم به هر کدام از نمونه‌ها، به وسیله همزن برقی به مدت 90 دقیقه در دمای اتاق اختلاط صورت گرفت. مخلوط حاصل در دمای 4 درجه سلسیوس و با سرعت 8000 g به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس برای جداسازی پروتئین‌ها از بقیه اجزای بذر، از سولفات آمونیوم با غلظت 70 درصد استفاده شد که به نمونه‌ها اضافه شد و بعد از قرار دادن در دمای 4 درجه سلسیوس و با سرعت 8000 g به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شد. پروتئین‌های رسوب شده با بافر Tris-HCl (0/2 مولار با اسیدیته 8) به صورت محلول درآمدند و به مدت 20 ساعت

در دمای 4 درجه سلسیوس دیالیز شدند. برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌های بذرزاد، رسوب پروتئینی برداشته شده به مدت 15 دقیقه در دمای 75 درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس برای جداسازی رسوبات از محلول پروتئینی، در دمای 4 درجه به مدت 15 دقیقه با سرعت 8000g سانتریفیوژ شد و در نهایت محلول رونشین به عنوان محلول پروتئینی حاوی مهارکننده جداسازی و تا زمان آزمایش‌های بعدی در دمای 20– درجه سلسیوس نگهداری شد.

سنجش فعالیت پروتئاز

سنجش فعالیت پروتئاز کل به روش الپیدینا و همکاران (11) و گیت‌هاوس و همکاران (15) با کمی تغییر انجام شد. 10 میکرولیتر آنزیم، 50 میکرولیتر محلول سوبسترا (آزوکازئین 2 درصد) و 40 میکرو لیتر بافر Glycine-NaOH (0/02 مولار، اسیدیته 10) مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای 40 درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس با افزودن 100 میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید 30 درصد به مخلوط، واکنش متوقف شد. به منظور رسوب دادن سوبسترای هیدرولیز نشده، مخلوط واکنش به مدت 30 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس به مدت 15 دقیقه با سرعت g 15000 و در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. در ادامه 100 میکرولیتر از محلول رونشین داخل پلیت ریخته شد و 100 میکرولیتر هیدروکسید سدیم 1 نرمال به آن اضافه شد و میزان جذب نور آن در طول موج 405 نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی تأثیر اسیدیته بر فعالیت نسبی پروتئاز

به منظور سنجش تأثیر اسیدیته‌های مختلف بر فعالیت آنزیم از روش بندانی (3) استفاده شد. بدین منظور از بافر یونیورسال با اسیدیته 6، 7، 8، 9، 10، 11 و 12 استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم در اسیدیته‌های مختلف، مطابق با آنچه برای سنجش فعالیت پروتئاز گفته شد، انجام گرفت.

بررسی تأثیر دما بر فعالیت نسبی پروتئاز

به منظور سنجش تأثیر دما بر فعالیت آنزیم از روش کزازی و همکاران (22) استفاده شد. بدین منظور فعالیت آنزیم در دماهای مختلف (20، 25، 30، 35، 40، 45 و 50 درجه سلسیوس) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در دماهای مختلف، به روش مورد اشاره در بالا انجام شد.

بررسی تأثیر مهارکننده‌های پروتئینی بر فعالیت نسبی پروتئاز

بررسی تأثیر مهارکننده‌های پروتئینی بر فعالیت پروتئاز مینوز گوجه‌فرنگی به روش سعادتی و همکاران (29) و دسترنج و همکاران (9) انجام شد. بدین منظور، از غلظت‌های 10، 5، 2/5، 1/25و 0/625 میکروگرم پروتئین مهارکننده‌های ارقام گندم و یولاف وحشی، 14/2، 7/1، 3/5، 1/75، 0/87 میکروگرم پروتئین داتوره و کلزا، 14، 7، 3/5، 1/75، 0/87 میکروگرم پروتئین باقلا و تاج خروس، 8، 4، 2، 1، 0/5 میکروگرم پروتئین تریتیکاله، 13، 6/5، 3/25، 1/6 و 0/6 میکروگرم پروتئین لوبیا، 20، 10، 5، 2/5 و 1/2 میکروگرم پروتئین نخود و 16، 8، 4، 2 و 1 میکروگرم پروتئین ماش استفاده شد. 10 میکرولیتر آنزیم با 10 میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های مهارکننده‌ها همراه 30 میکرولیتر بافر Glycine-NaOH (0/02 مولار، اسیدیته 10) مخلوط شده و به مدت 60 دقیقه در دمای 40 درجه سلسیوس پیش‌اینکوباسیون صورت پذیرفت. سایر مراحل مشابه سنجش فعالیت پروتئاز انجام شد. در این آزمایش، هر کدام از تیمارها شامل سه تکرار و یک بلانک بودند. تیمار شاهد فاقد مهارکننده و بلانک در هر تیمار فاقد آنزیم بود که به جای آن از بافر استفاده شد. فرمول محاسبه‌ی درصد مهارکنندگی به صورت زیر می‌باشد (در این رابطه منظور از I میزان مهار آنزیم، A میزان جذب، Control شاهد و Exp تیمار می‌باشد، هم چنین 405 به طول موجی که جذب در آن انجام شده است اشاره دارد) (25):

$$\%I = 100 \times [(A_{405\ control} - A_{405\ Exp})/A_{405\ control}]$$

بررسی تأثیر اسیدیته بر میزان بازدارندگی پروتئاز توسط مهارکننده‌های پروتئینی

برای سنجش تأثیر اسیدیته‌های مختلف بر میزان بازدارندگی مهارکننده‌های پروتئینی از بافر یونیورسال با اسیدیته 6، 7، 8، 9، 10، 11 و 12 استفاده شد. در این بررسی از مهارکننده‌های ارقام البرز و افلاک گندم، یولاف وحشی، ماش، باقلا، کلزا و نخود که همگی مهار به نسبت بالایی در اسیدیته بهینه فعالیت آنزیم (9) نشان داده بودند استفاده شد. مهارکننده‌های پروتئازی (با بالاترین غلظت) به مدت 60 دقیقه با عصاره آنزیمی اینکوبه شدند. فعالیت پروتئولیتیکی در غیاب مهارکننده و حضور آن محاسبه شد. نمونه کنترل در هر اسیدیته تنها با حضور عصاره آنزیمی و بدون افزودن مهارکننده در نظر گرفته شد. و همچنین برای هر اسیدیته یک بلانک که شامل مهارکننده و فاقد آنزیم بود، استفاده شد.

سنجش مقدار پروتئین نمونه‌ها

به منظور تعیین مقدار پروتئین نمونه‌ها، از روش بردفورد (6) و از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. برای این منظور، ابتدا از پروتئین استاندارد پنج غلظت (2، 1، 0/5، 0/25 و 0/125 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. پس از این مرحله 10

میکرولیتر از هر یک از این غلظت‌ها داخل پلیت ریخته و بعد از اضافه کردن 190 میکرولیتر معرف بردفورد، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 630 نانومتر خوانده شد. برای هر یک از غلظت‌ها از سه تکرار استفاده شد. پس از آن با رسم نمودار و قرار دادن میزان جذب نمونه‌های مورد نظر در نمودار، مقدار پروتئین آن‌ها تعیین شد.

بررسی‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. گروه‌بندی داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری 5 درصد بررسی شد.

نتایج

اسیدیته و دمای بهینه فعالیت پروتئاز

در بررسی تأثیر اسیدیته بین 6 تا 12 بر فعالیت آنزیم پروتئاز در لارو مینوز گوجه فرنگی، بیشینه‌ی فعالیت آنزیم با استفاده از سوبسترای آزوکازئین در اسیدیته 10 مشاهده شد، به‌نحوی‌که فعالیت آنزیم در این اسیدیته با بقیه اختلاف معنی‌دار داشت. فعالیت آنزیم به تدریج با افزایش اسیدیته از 6 تا 10 افزایش و بعد از آن کاهش یافت. علاوه بر اسیدیته 10، فعالیت آنزیم در اسیدیته‌های 9 و 11 نیز بالا بود و بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ($P<0.05$) (شکل 1).

همچنین تأثیر دمای بین 20 تا 50 درجه سلسیوس بر فعالیت پروتئاز این حشره نشان داد که بیشینه فعالیت این آنزیم در دمای 40 درجه است که با دمای 35 درجه اختلاف معنی‌داری نداشت. در سایر دماها (20، 25، 30، 45 و 50 درجه سلسیوس) فعالیت آنزیم کمتر و اختلاف حاصله معنی‌داری بود ($P<0.05$) (شکل 2).

اثر مهارکننده‌های پروتئینی بر فعالیت نسبی پروتئاز

بیشترین غلظت مهارکننده‌های استخراج شده از دانه‌های گیاهان داتوره، لوبیا و یولاف (به ترتیب 14/2، 13 و 10 میکروگرم پروتئین) به ترتیب باعث 26، 25 و 24 درصد مهار پروتئاز حشره شد. این مهارکننده‌ها در کمترین غلظت (به ترتیب 0/8، 0/8 و 0/6 میکروگرم پروتئین) 11، 4 و 6 درصد از فعالیت آنزیم را مهار کردند (شکل 3).

در بالاترین غلظت مهارکننده حاصل از باقلا، تاج خروس و ماش (به ترتیب 14، 14 و 16 میکروگرم پروتئین) به ترتیب 40، 37 و 33 درصد از فعالیت آنزیم مهار شد. در پایین‌ترین غلظت این مهارکننده‌ها (به ترتیب 0/8، 0/8 و 1 میکروگرم پروتئین) به ترتیب 15، 8 و 8 درصد مهار گنندگی صورت گرفت (شکل 4).

مهارکننده‌های ارقام مختلف گندم مهار قابل توجهی از آنزیم پروتئاز را سبب شدند به طوری‌که بالاترین غلظت مهارکننده‌های ارقام سیوند، افلاک و البرز گندم (10 میکروگرم پروتئین) به ترتیب باعث ایجاد 43، 50 و 51 درصد مهار فعالیت آنزیم شدند. همچنین این مهارکننده‌ها در پایین‌ترین غلظت استفاده شده (0/625 میکروگرم پروتئین) به ترتیب 9، 13 و 16 درصد فعالیت آنزیم را مهار کردند (شکل 5).

در بررسی تأثیر مهارکننده‌های نخود، کلزا و تریتیکاله بر این آنزیم مشخص شد که این مهارکننده‌ها در بالاترین غلظت (به ترتیب 20، 14/2 و 8 میکروگرم پروتئین) به ترتیب 57، 53 و 44 درصد از فعالیت آنزیم را مهار کرده‌اند و در پایین‌ترین غلظت (به ترتیب 1/2، 0/8 و 0/5 میکروگرم پروتئین) نیز 16، 22 و 11 درصد از فعالیت آن مهار شد. بیشترین مهار پروتئاز کل توسط نخود و کلزا حاصل شد (شکل 6). وابسته بودن مهارکنندگی به غلظت تقریبا در همه مهارکننده‌های پروتئینی مشاهده شد به طوری‌که با افزایش غلظت مهارکننده، میزان مهار پروتئاز بیشتر شد.

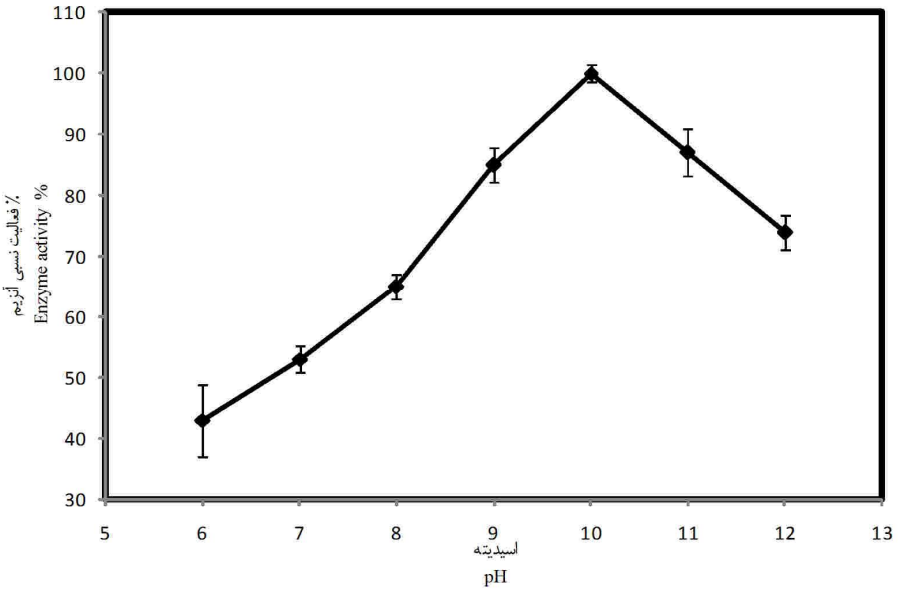
تأثیر اسیدیته بر بازدارندگی مهارکننده‌ها

نتایج نشان داد که اسیدیته تأثیر قابل توجهی بر میزان مهارکنندگی دارد. برای مثال مهارکننده‌های استخراج شده از گندم ارقام افلاک و البرز که در اسیدیته بهینه آنزیم (10)، به ترتیب 50 و 51 درصد از فعالیت آنزیم را مهار کردند در اسیدیته‌های بالا و پایین‌تر از بهینه میزان مهار متفاوتی را نشان دادند. مهارکننده افلاک بیشترین مهار را در اسیدیته بهینه فعالیت آنزیم ایجاد کرد اما مهارکننده البرز بیشترین مهار را در اسیدیته 9 ایجاد کرد و در اسیدیته بهینه میزان مهار از این مقدار کمتر بود. همچنین تأثیر اسیدیته بر مهارکننده نخود نشان داد که بیشترین مهار (57 درصد) در اسیدیته 10 ایجاد شد که اسیدیته بهینه فعالیت آنزیم بود هر چند میزان مهار آنزیم در اسیدیته 11 نیز بالا بود به‌طوری‌که در این اسیدیته 55 درصد از فعالیت آنزیم مهار شد که با میزان مهار در اسیدیته 10 اختلاف معنی‌داری نداشت ($P<0.05$) (شکل 7).

مهارکننده ماش در اسیدیته 10 بیشترین سطح مهار را ایجاد کرد که البته میزان مهار آنزیم در این اسیدیته با اسیدیته 11 اختلاف معنی‌داری نداشت ($P<0.05$). بیشترین مهارکنندگی بذرهای کلزا، باقلا و یولاف وحشی به ترتیب در اسیدیته‌های 10، 11 و 9 ایجاد شد که میزان مهار آنزیم به ترتیب 53، 41 و 27 درصد به دست آمد. در مورد مهارکننده باقلا بیشترین مهار در اسیدیته 11 بود هر چند این میزان با اسیدیته بهینه آنزیم اختلاف معنی‌دار نداشت. در مورد مهارکننده یولاف وحشی که بیشترین مهار در اسیدیته 9 به دست آمد این میزان با اسیدیته 8 اختلاف معنی‌دار نداشت ($P<0.05$) (شکل 8).

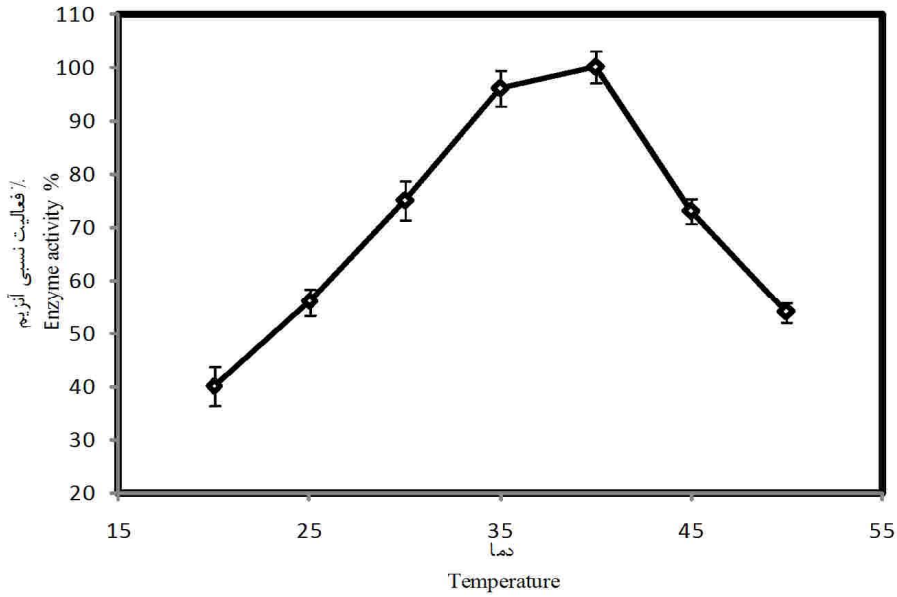
بحث

این بررسی به روشنی نشان داد که ترکیبات پروتئینی استخراج شده از دانه‌های کلزا، نخود و دو رقم البرز و افلاک گندم اثر مهارکنندگی چشمگیری بر آنزیم پروتئاز در معده لارو مینوز گوجه‌فرنگی دارند. مهارکننده‌های استخراج شده از دانه‌های گیاهانی مانند کلزا و تاج خروس نیز توانایی بالایی در مهار پروتئاز مینوز گوجه‌فرنگی نشان دادند.



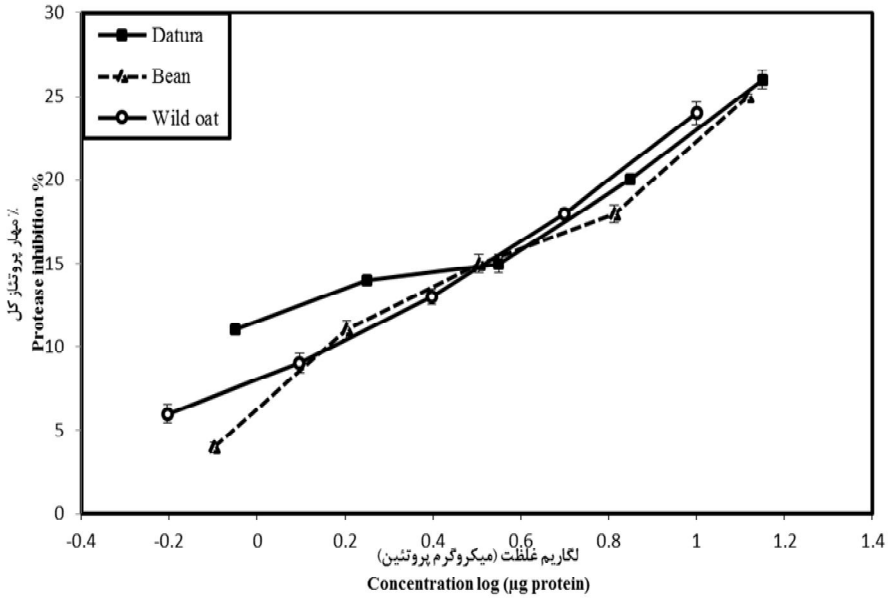
شکل 1- تأثیر اسیدیته بر میزان فعالیت نسبی پروتئاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*

Figure 1- Effect of pH on protease activity of tomato leaf miner *T. absoluta*



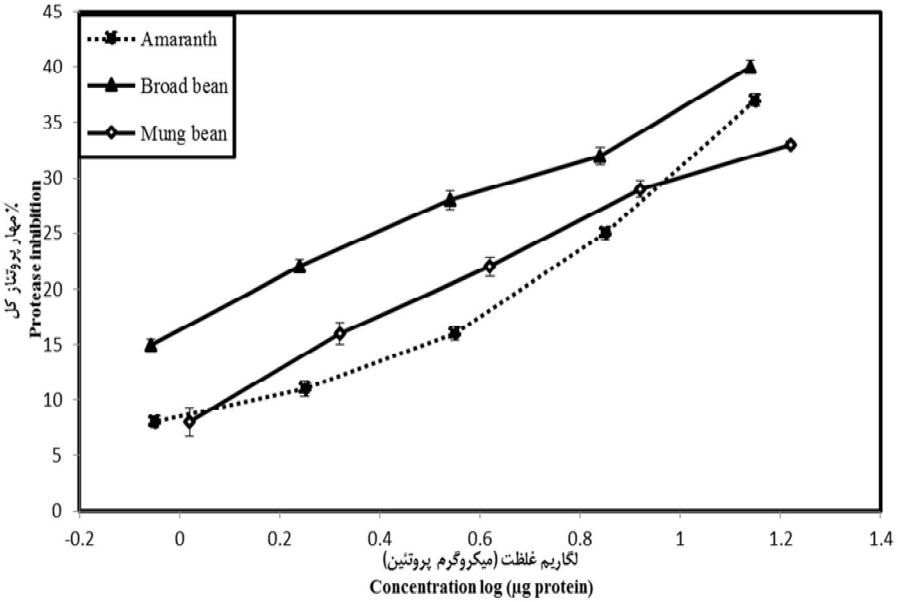
شکل 2- تأثیر دما بر میزان فعالیت نسبی پروتئاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*

Figure 2- Effect of temperature on protease activity of tomato leaf miner *T. absoluta*



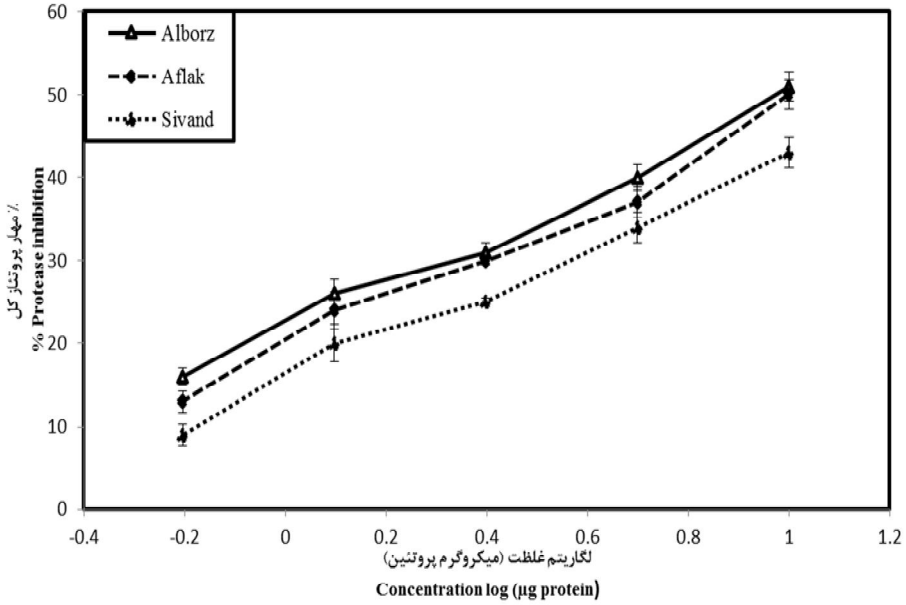
شکل 3- تأثیر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌های استخراج شده از دانه‌های داتوره، لوبیا و یولاف وحشی بر میزان فعالیت نسبی پروتئاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*

Figure 3- Effect of different concentration of Datura, Bean and Wild oat inhibitors on protease activity of tomato leaf miner *T. absoluta*



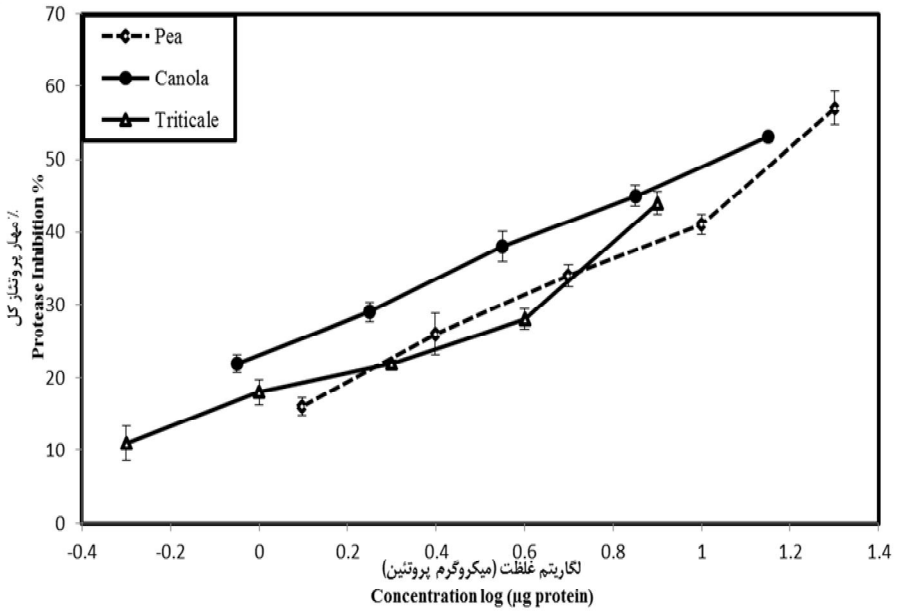
شکل 4- تأثیر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌های استخراج شده از دانه‌های تاج‌خروس، باقلا و ماش بر میزان فعالیت نسبی پروتئاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*

Figure 4- Effect of different concentration of Amaranth, Broad bean and Mung bean inhibitors on protease activity of tomato leaf miner *T. absoluta*



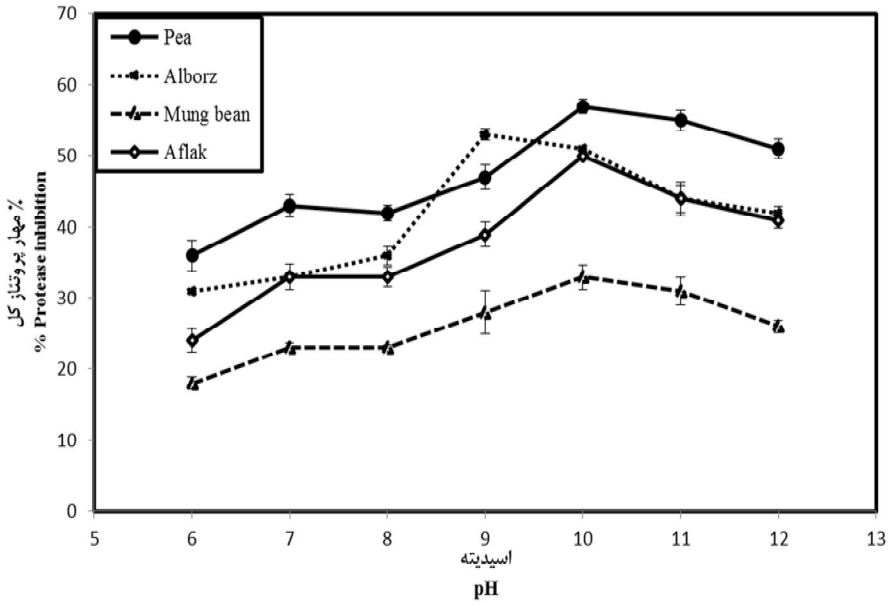
شکل 5- تأثیر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌های استخراج شده از دانه‌های ارقام گندم (سیوند، افلاک و البرز) بر میزان فعالیت نسبی پروتئاز شب-پره مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*

Figure 5- Effect of different concentration of Wheat cultivars (Sivand, Aflak and Alborz) inhibitors on protease activity of tomato leaf miner *T. absoluta*



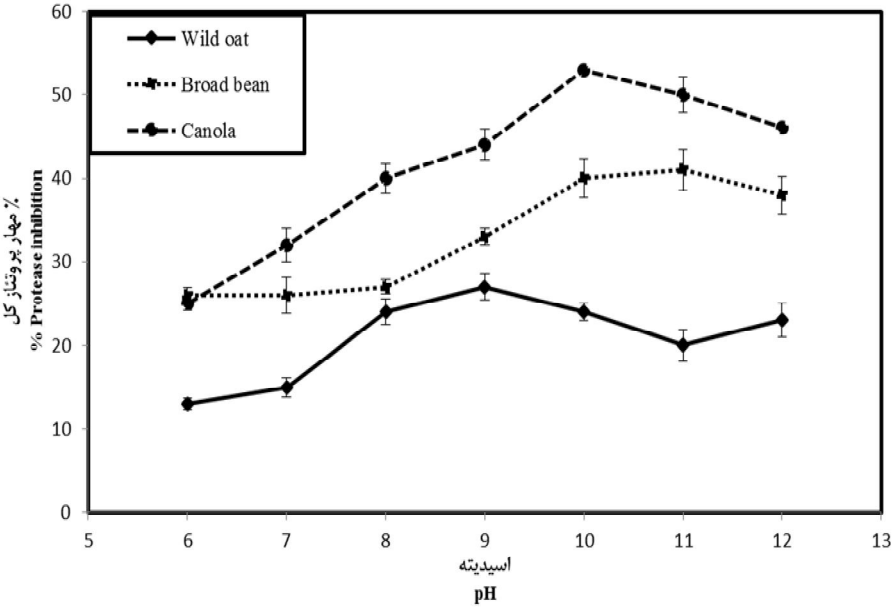
شکل 6- تأثیر غلظت‌های مختلف مهارکننده‌های استخراج شده از دانه‌های نخود، کلزا و تریتیکاله بر میزان فعالیت نسبی پروتئاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*

Figure 6- Effect of different concentration of Pea, Canola and Triticale inhibitors on protease activity of tomato leaf miner *T. absoluta*



شکل 7- تأثیر اسیدیته بر میزان مهارکنندگی پروتئاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی به وسیله مهارکننده‌های نخود، ماش، البرز و افلاک

Figure 7- Effect of pH on inhibitory activity of Pea, Mung bean, Alborz and Aflak inhibitors towards *T. absoluta* protease



شکل 8- تأثیر اسیدیته بر میزان مهارکنندگی پروتئاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی به وسیله مهارکننده‌های کلزا، باقلا و یولاف وحشی

Figure 8- Effect of pH on inhibitory activity of Canola, Broad bean and Wild oat inhibitors towards *T. absoluta* protease

اما مهارکننده‌های استخراج شده از دانه‌های داتوره، لوبیا و یولاف وحشی نسبت به بقیه مهارکننده‌ها کمترین تأثیر را روی پروتئاز لارو مینوز داشتند.

سنجش فعالیت پروتئازی در حضور غلظت‌های مختلف مهارکننده‌ها نشان داد که روند مهارکنندگی وابسته به غلظت است به طوری‌که در همه مهارکننده‌ها این روند مشاهده شد و با افزایش غلظت مهارکننده‌ها، میزان مهار آنزیم افزایش یافت. نتایج به دست آمده در این تحقیق با مطالعات مشابه روی دیگر گونه‌ها هم‌خوانی

دارد. به طور مثال برزویی و همکاران (5) که تأثیر مهارکننده‌های ارقام گندم را بر فعالیت پروتئاز کل غدد بزاقی کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* (Lep.: Pyralidae) بررسی کردند، نشان دادند که مهارکننده‌های استخراج شده از ارقام زارع و MV17 به ترتیب باعث 43 و 11 درصد مهار در فعالیت پروتئاز کل آفت می‌شوند. چوگل و همکاران (7) نیز در یک بررسی اثر مهارکنندگی تریپسین سویا را بر پروتئاز گوارشی معده لارو *Mamestra brassicae* (Lep.: Noctuidae) نشان دادند. دسترنج (8) تأثیر مهارکننده‌های پروتئینی گندم، لوبیا، کلزا و کنجد را روی پروتئاز بید کلم *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) و سفیده کوچک کلم *Pieris brassicae* (Lep.: Pieridae) بررسی کرد. نتایج نشان داد این مهارکننده‌ها پروتئاز بید کلم را به ترتیب 30، 40، 55 و 40 درصد و پروتئاز سفیده کوچک کلم را به ترتیب 50، 50، 30 و 60 درصد مهار کردند. در تحقیق مذکور همانند نتایج ما تأثیر مهارکننده‌ها بر آنزیم وابسته به اسیدیته و غلظت بود.

بررسی ما نشان داد که اسیدیته بهینه فعالیت پروتئازی لارو مینوز گوجه‌فرنگی قلیایی است که این امر به دلیل وجود سرین پروتئازها در دستگاه گوارش این حشره است. این نتایج با نتایج سایر محققین تطابق داشت، از جمله عجم حسنی و همکاران (1) که میزان بهینه برای پروتئاز *Utetheisa pulchella* (Lep.: Arctiidae) را با استفاده از سوبسترای آزوکازئین 8 گزارش کردند. چوگل و همکاران (7) پروتئاز گوارشی معده *Mamestra brassicae* را بررسی کردند که در تحقیقات آن‌ها فعالیت بالایی از سرین پروتئازها گزارش شد.

در بررسی ما دمای بهینه فعالیت پروتئازی برای این حشره 40 درجه سلسیوس بود که با سایر تحقیقات هم‌خوانی داشت، به طور مثال غلامزاده چیتگر و همکاران (16) دمای بهینه برای فعالیت پروتئاز گوارشی *Choreutis nemoranareutis* (Lep.: Choreutidae) را 45 درجه سلسیوس گزارش کردند. مهدوی و همکاران (23) دمای بهینه فعالیت پروتئاز *Glyphodes pyloalis* (Lep.: Pyralidae) را با استفاده از سوبسترای آزوکازئین 50 درجه سلسیوس گزارش کردند. تاتلی و همکاران (33) دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی سوسک برگخوار نارون *Xanthogalerucella luteola* (Col.: Chrysomelidae) را 35 درجه سلسیوس گزارش کردند.

پایداری مهارکننده در اسیدیته معین یک معیار مهم در انتخاب مهارکننده پروتئاز برای کنترل آفات است. با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی که بیشترین درصد مهار آنزیم در مورد همه مهارکننده‌ها در اسیدیته قلیایی بود و به دلیل این که اسیدیته بهینه پروتئازی این حشره و همچنین اسیدیته معده آن قلیایی است این مهارکننده‌ها می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای مهار آنزیم پروتئاز حشره باشند. در صورتی که این مهارکننده‌ها به هنگام تغذیه لارو آفت به مقدار کافی در معده حشره وجود داشته باشند می‌تواند باعث مهار قابل توجه در فعالیت آنزیم و در نتیجه کاهش رشد و کنترل آفت شود.

مهارکننده‌های مختلف تأثیر متفاوتی روی آنزیم‌های گوارشی حشرات برجای می‌گذارند. با توجه به این موضوع لازم است مطالعات بیشتری روی آنزیم‌های گوارشی آفت و برهم کنش آن‌ها با مهارکننده‌های موجود در گیاهان مختلف صورت گیرد تا مهارکننده‌های مناسب شناسایی و در کنترل آفت مورد استفاده قرار گیرد. شناسایی ژن‌های رمزگذار این مهارکننده‌ها، و بیان این ژن‌ها در شرایط آزمایشگاهی و بررسی تأثیر پروتئین‌های تولید شده از این ژن‌ها برروی حشره یا حشرات آفت نیز می‌تواند قدم مؤثری در استفاده از این ترکیبات در کنترل آفت باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم آوردن هزینه‌های انجام این طرح قدردانی می‌نمایند.

منابع

1- Ajamhassani M., Zibaee A., Sendi J.J., Askary H., and Farrar N. 2012. Proteolytic Activity in the Midgut of the Crimson Speckled Moth *Utethesia pulchella* L.(Lepidoptera: Arctiidae). Journal of Plant Protection Research, 52: 368-373.

2- Baker J.E. 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.

3- Bandani A.R. 2005. Effect of plant α-amylase inhibitors on sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton. α-amylase activity. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 70(4): 869-873.

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

5- Borzoui E., Bandani A.R., and Goldansaz S.H. 2013. Effect of cereal seed proteinaceous extracts on α-amylase and proteinase activity of salivary glands of Carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lep.: pyralidae). Journal of Crop Protection, 285-296.

6- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
7- Chougule N.P., Doyle E., Fitches and Gatehouse J.A. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assay. Journal of Insect Physiology, 54: 563–572.
8- Dastranj M. 2012. Effect of plant inhibitors extracted from wheat, pea and bean on amylase and proteinase activity of *Plutella xylostella* and *Pieris rapae*. Msc. Thesis. University of Tehran. (in Persian)
9- Dastranj M., Bandani A.R., and Mehrabadi M. 2013. Age-specific digestion of *Tenebrio molitor* (Coleoptare: Tenebrionidae) and inhibition of proteolytic and amylolytic activity by plant proteinaceous seed extracts. Journal of Asia-Pacific Entomolog, 16: 309-315.
10- Desneux N., Wajnberg E., Wyskhuys K.A.G., Burgio G., Arpaia S., Narváez-Vazquez C.A., Cabrera J.G., Ruescas D.C., Tabone E., Frandon J., Pizzol J., Poncet C., Cabello T., and Urbaneja A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. Journal of Pest Science, 83: 197-215.
11- Elpidina E.N., Tsybina T.A., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Zhuzhikov D.P., and Oppert B. 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of Tenebrio molitor larvae. Biochimie 87: 771–779.
12- Franco O.L., Rigden D.J., Melo F.R., and Grossi-de- Sa M.F. 2002. Plant α-amylase. Structure, function and potential for crop protection. European Journal of Biochemistry, 269: 397-412.
13- Garcia M.F., and Espul J.C. 1982. Bioecology of the tomato moth (*Scrobipalpul absoluta)* in Mendoza, Argentine Republic. Revista de Investi Investigation's Agropecuarias, 17: 135-146.
14- Gatehouse A.M.R., and Gatehouse J.A. 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. Pesticide Science, 52: 165-175.
15- Gatehouse A.M.R., Norton E., Davison G.M., Babbe S.M., Newell C.A., and Gatehouse J.A. 1999. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*, effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. Journal of Insect Physiology, 45: 545–558.
16- Chitgar M.G., Ghadamyari M., and Sharifi M. 2013. Identification and Characterisation of Gut Proteases in the Fig Tree Skeletoniser Moth, *Choreutis nemorana* Hubner (Lepidoptera: Choreutidae). journal of Plant Protection Science, 49: 19-26.
17- Guedes R.N.C., and Picanço M.C. 2012. The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. EPPO Bull, 42: 211-216.
18- Heidarvash S. 2013. Study of amylase and proteinase enzymes of tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). Msc. Thesis. University of Tehran. (in Persian)
19- 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.
20- Isman M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review Entomology, 51: 45-66.
21- Jamal F., Pandey P.K., Singh D., and Khan M. 2013. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. Phytochemistry Reviews, 12: 1-34.
22- Kazzazi M., Bandani A.R., and Hosseinkhani S. 2005. Biochemical characterization of α-amylase of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. Entomolical Science, 8: 371-377.
23- Klowden M.J. 2007. Physiological system in insects. Elsevier, UK.
24- Mahdavi A., Ghadamyari M., Sajedi R.H., Sharifi M., and Kouchaki B. 2012. Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. Journal of Insect Science, 1536-2442.
25- Mehrabadi M., Bandani A., Saadati F., and Mahmudvand M. 2011. α-Amylase activity of Stored Products Insects and Its Inhibition by Medicinal Plant Extracts. Journal of Agricultural Science & Technology, 13,1173-1182.
26- Melo F.R., Sales M.P., Silva L.S., Franco O.L., Bloch J.R.C., and Ary M.B. 1999. α-amylase inhibitors from cowpea seeds. Protein and Peptide Letter, 6: 387-392.
27- Picanco M., Leite G.L.D., Guedes R.N.C., and Silva E.A. 1998. Yield loss in trellised tomato affected by insecticidal sprays and plant spacing. Crop Protection, 17: 447-452.
28- Reyes M., Rocha K., Alarcón L., Siegwart M., and Sauphanor B. 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. Pesticide Biochemistry and Physiology, 102: 45-50.
29- Saadati F., and Bandani A.R. 2011. Effects of serine protease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*. Journal of Insect Science, 2: 72.
30- Silva C.C., Jham G.N., Picanco M., and Leite G.L.D. 1998. Comparison of leaf chemical composition and attack patterns of *Tuta absoluta* in three tomato species. Agron. Lus, 46: 61–71.
31- 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. Journal of Insect physiology, 47: 1283–1290.

32- Silva G.A., Picanço M.C., Bacci L., Crespo A.L.B., Rosado J.F., and Guedes R.N.C. 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. Pest Management Science, 67: 913-920.
33- Tatli I., Bandani A.R., and Moslemi A. 2013. The elm leaf beetle α-amylase and its activity relationship with insect feeding. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 46, 917-926.
34- Volpaciella M., Leoni C., Costanza A., De leo F., Gallerani R., and Ceci Lr. 2011. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants. Current protein peptid science, 12: 386-395.