دانشکده کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته حشره شناسی کشاورزی

عنوان

اثر عصاره پروتئینی برخی از ارقام لوبیا و گندم روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز دستگاه گوارش کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hünber (Lepidoptera: Noctuidae)

استاد راهنما
دکتر رضا فرشباف پورآباد

استاد مشاور:
دکتر علیرضا بندانی

پژوهشگر :
سیما مجیدیانی

شهریور ماه ۹۲

نام‌خانوادگی: مجیدیانی **نام:** سیما

عنوان پایان‌نامه: اثر عصاره پروتئینی برخی از ارقام لوبیا و گندم روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز دستگاه گوارش کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hünber (Lepidoptera: Noctuidae)

استاد راهنما: دکتر رضا فرشباف پورآباد

استاد مشاور: دکتر علیرضا بندانی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** حشره‌شناسی کشاورزی **دانشگاه:** تبریز

دانشکده: کشاورزی **تاریخ فارغ‌التحصیلی:** ۹۲/۰۶/۲۰ **تعداد صفحه:** ۱۲۴

کلید واژه: کرم غوزه پنبه، آلفا-آمیلاز، مهارکننده آنزیمی، عصاره پروتئینی

چکیده:

کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hünber (Lepidoptera: Noctuidae) از آفات مهم گیاهان زراعی و باغی در بسیاری از نقاط جهان می‌باشد که سالانه خسارت زیادی به محصولات کشاورزی تحمیل می‌کند. برای کنترل این آفات روش‌های مختلف زراعی، زیستی و شیمیایی پیشنهاد شده اما با این وجود، بروز مقاومت به آفتکش‌ها و اثرات سوء زیست محیطی آن‌ها، نیاز به روش‌های نوین مدیریتی را الزامی کرده است. ایجاد اختلال در فیزیولوژی گوارش حشرات که از روش‌های نسبتاً جدید به شمار می‌رود، معمولاً به صورت بیان ژن‌های مهارکننده سامانه آنزیمی آفات، در گیاهان تراریخت مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای نیل به این هدف، شناخت ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات و نیز منابع مهارکننده آنزیمی جدید گامی اساسی برای گسترش روش های کنترل فیزیولوژیکی محسوب می‌گردد.

در این مطالعه، برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آمیلاز گوارشی با استفاده از زیرنهشت نشاسته مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که دمای بهینه فعالیت آمیلاز این حشره حدود ۴۵°C

بوده و در اسیدیته ۹ بیش‌ترین فعالیت را دارد.

در بررسی‌های اثر مهارکننده‌های آنزیمی، سه رقم لوبیا (درخشان، صدری و شکوفا) و سه رقم گندم (افلاک، سیوند و MV17) روی فعالیت آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه مورد استفاده قرار گرفتند. عصاره پروتئینی بذرها با استفاده از کلرید سدیم ۰/۱ مولار استخراج شدند. نتایج نشان داد که عصاره ارقام مختلف، اثرات متفاوتی روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز حشره دارند و روند مهارکنندگی به صورت وابسته به غلظت بود. به این ترتیب که در بالاترین غلظت از عصاره پروتئینی ارقام صدری و درخشان (۱۳ میکروگرم پروتئین) به ترتیب ۶۴/۹۹ و ۶۹/۵۸ درصد از فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز کاسته شد و در پایین ترین غلظت (۰/۸۱۲ میکروگرم پروتئین بر میلی لیتر) فعالیت مهارکنندگی مشاهده شده ۳۲ و ۴۵ درصد بود. رقم شکوفا اثر مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای روی فعالیت آلفا-آمیلاز حشره نداشت. در پایین‌ترین غلظت عصاره پروتئینی (۱/۰۶۲ میکروگرم پروتئین بر میلی لیتر) در رقم‌های افلاک و سیوند به ترتیب ۳۹/۷۹ و ۲۸/۷۵ درصد و در بالاترین غلظت مهارکننده (۱۷ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) به ترتیب ۵۱/۱۴ و ۳۹/۸۲ درصد مهارکنندگی مشاهده شد. در مورد رقم MV17 در بالاترین غلظت (۱۲/۳ میکروگرم پروتئین بر میلی‌لیتر) ۵۴/۸۶ درصد مهارکنندگی و در پایین‌ترین غلظت (۰/۷۶۹ میکروگرم پروتئین بر میلی لیتر) حدود ۳۵/۸۳ درصد مهارکنندگی مشاهده شد. نتایج به دست آمده نشان داد رقم درخشان تأثیر بیشتری روی کاهش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز داشت.

در مطالعات ژل الکتروفورز، آنزیم در حضور سوبسترا بدون استفاده از مهارکننده، سه باند تشکیل داد. در بالاترین غلظت عصاره استفاده شده، از سه باند مشاهده شده فعالیت آلفا-آمیلاز در شاهد، دو باند حذف شده و فقط یک باند کمرنگ مشاهده گردید.

فهرست عناوین

مقدمه ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- معرفی حشره ۶

۱-۱-۱- پراکنش ۷

۱-۱-۲- دامنه میزبانی ۷

۱-۱-۳- شکل شناسی ۹

۱-۱-۳-۱- حشره کامل ۹

۱-۱-۳-۲- تخم ۱۰

۱-۱-۳-۳- لارو ۱۱

۱-۱-۳-۴- شفیره ۱۲

۱-۱-۴- زیست شناسی ۱۲

۱-۱-۵- کنترل ۱۴

۱-۲- آنزیم‌های گوارشی ۱۵

۱-۲-۱- نحوه عمل آنزیم‌ها ۱۵

۱-۲-۲- طبقه‌بندی و نام‌گذاری آنزیم‌ها ۱۶

۱-۳- ترشح آنزیم های گوارشی در حشرات ۱۶

۱-۳-۱- مکانیسم ترشح آنزیم‌ها ۱۹

۱-۳-۱-۱- ترشح هولوکرینی ۱۹

۱-۳-۱-۲- ترشح آپوکرینی ۱۹

۱-۳-۱-۳- ترشح میکرو آپوکرینی ۲۰
۱-۳-۲- آنزیم‌های هضم کربوهیدراتی ۲۰
۱-۳-۳- آمیلازها ۲۱
۱-۳-۳-۱- آلفا-آمیلازها ۲۳
۱-۳-۴- آلفا گلوکوزیدازها ۲۵
۱-۳-۵- بتا گلوکوزیدازها..... ۲۵
۱-۴- راه‌کارهای جلوگیری از فعالیت آنزیم..... ۲۷
۱-۴-۱- مهارکننده آلفا–آمیلاز..... ۳۰
۱-۴-۱-۱- مهارکننده‌های غیر پروتئینی..... ۳۰
۱-۴-۱-۲- مهارکننده‌های پروتئینی..... ۳۱
۱-۵- گیاه تراریخت..... ۴۰
۱-۶- روش‌های خالص‌سازی پروتئین‌ها ۴۳
فصل دوم: مواد و روش‌ها:
۲-۱- پرورش حشره ۴۷
۲-۱-۱- تهیه غذای مصنوعی کرم غوزه پنبه..... ۴۷
۲-۱-۲- پرورش حشره ۴۸
۲-۱-۳- ظروف مورد استفاده برای پرورش ۴۸
۲-۱-۴- نحوه پرورش کرم غوزه پنبه در شرایط آزمایشگاهی..... ۵۰
۲-۲- مواد ۵۲
۲-۳- دستگاه‌ها ۵۳
۲-۴- روش ها ۵۴

۲-۴-۱- تشریح و جداسازی لوله گوارش..... ۵۴
۲-۴-۲- استخراج عصاره آنزیمی ۵۴
۲-۴-۳- تهیه بافرها و محلول ها ۵۵
۲-۴-۳-۱- بافر Glycin – NaOH..... ۵۵
۲-۴-۳-۲- بافر Universal..... ۵۶
۲-۴-۳-۳- تهیه زیرنهشت برای آلفا – آمیلاز ۵۶
۲-۴-۳-۴- محلول آکریلامید ۵۶
۲-۴-۳-۵- بافر تانک یا بافر الکتروفورز (Running buffer) ۵۶
۲-۴-۳-۶- بافر ژل بالا یا ژل متراکم کننده (Stacking gel buffer)..... ۵۷
۲-۴-۳-۷- بافر ژل پایین یا ژل جدا کننده (Resolving gel buffer) ۵۷
۲-۴-۳-۸- بافر نمونه (Sample buffer) ۵۷
۲-۴-۳-۹- محلول رنگی لوگول ۵۷
۲-۴-۳-۱۰- تهیه معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید ۵۸
۲-۴-۳-۱۱- تهیه معرف Dye ۵۸
۲-۴-۴- گیاهان مورد استفاده..... ۵۸
۲-۴-۵- سنجش فعالیت آنزیم آلفا – آمیلاز ۵۹
۲-۴-۶- اثر اسیدیته روی فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز ۶۰
۲-۴-۷- اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا – آمیلاز ۶۰
۲-۴-۸- بررسی اثر عصاره‌های پروتئینی روی فعالیت آلفا – آمیلاز ۶۰
۲-۴-۸-۱- استخراج عصاره پروتئینی بذرها ۶۱
۲-۴-۸-۲- اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی ۶۲

۲-۴-۸-۳- اثر عصاره‌های پروتئینی روی فعالیت آلفا–آمیلاز در شرایط آزمایشگاهی ۶۳
۲-۴-۸-۴- سنجش عصاره‌های پروتئینی در ژل الکتروفورز ۶۴
۲-۴-۹- منحنی استاندارد پروتئین و تعیین غلظت پروتئین ۶۵
۲-۴-۱۰- منحنی استاندارد پروتئین ۶۶
فصل سوم: نتایج و بحث
۳-۱- اندازه گیری میزان فعالیت آلفا-آمیلاز ۷۱
۳-۲- اثر اسیدیته روی فعالیت آمیلاز ۷۲
۳-۳- اثر دما روی فعالیت آنزیم آمیلاز ۷۶
۳-۴- اثر غلظت های مختلف عصاره پروتئینی روی فعالیت آمیلاز گوارشی لارو کرم غوزه پنبه ۷۹
۳-۴-۱- ارقام لوبیا ۷۹
۳-۴-۲- ارقام گندم ۸۳
۳-۵- بررسی اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی آلفا-آمیلاز گیاهی: ۹۱
۳-۶- سنجش مهارکننده در ژل ۹۷
نتیجه‌گیری کلی ۱۰۳
پیشنهادات ۱۰۵
منابع مورد استفاده ۱۰۸

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱: حشرات کامل کرم غوزه پنبه ۱۰
شکل ۱-۲: تخم کرم غوزه پنبه ۱۰
شکل ۱-۳: سنین مختلف لاروی کرم غوزه پنبه ۱۱
شکل ۱-۴: شفیره کرم غوزه پنبه ۱۲
شکل ۲-۱: ظروف پرورش لاروهای کرم غوزه پنبه ۴۹
شکل ۲-۲: الف: پیش شفیره جداشده درون قوطی فیلم. ب: شفیره ۵۱
شکل ۲-۳: ظروف تخم‌گیری حشرات کامل کرم غوزه پنبه ۵۱
شکل ۲-۴: دستگاه هموژنایزر برای همگن سازی نمونه‌ها ۵۵
شکل ۲-۵: دستگاه الایزا ریدر مدل ELx 800 ..... ۵۹
شکل ۳-۱: مهارشدن آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه توسط عصاره پروتئینی گندم رقم MV17 به‌صورت زایموگرام ۹۸
شکل ۳-۲: مهارشدن آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه توسط عصاره پروتئینی گندم رقم افلاک به‌صورت زایموگرام ۹۹
شکل ۳-۳: مهارشدن آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه توسط عصاره پروتئینی گندم رقم سیوند به‌صورت زایموگرام ۹۹
شکل ۳-۴: مهارشدن آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه توسط عصاره پروتئینی لوبیا رقم درخشان به‌صورت زایموگرام ۱۰۰
شکل ۳-۵: مهارشدن آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه توسط عصاره پروتئینی لوبیا رقم صدری به‌صورت زایموگرام ۱۰۰
شکل ۳-۶: مهارشدن آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه توسط عصاره پروتئینی لوبیا رقم صدری به‌صورت زایموگرام. A: شاهد. B: رقم شکوفا ۱۰۱

فهرست نمودارها

نمودار ۲-۱: منحنی استاندارد پروتئین در طول موج ۶۳۰ نانومتر ۶۶

نمودار ۳-۱: میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی لارو کرم غوزه پنبه در سنین مختلف ۷۱

نمودار ۳-۲: اثر اسیدیته روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۷۲

نمودار ۳-۳: اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۷۸

نمودار ۳-۴: اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی لوبیا رقم درخشان روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۰

نمودار ۳-۵: اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی لوبیا رقم صدری روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۱

نمودار ۳-۶: اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی لوبیا رقم شکوفا روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۲

نمودار ۳-۷: اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی گندم رقم افلاک روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۳

نمودار ۳-۸: اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی گندم رقم سیوند روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۴

نمودار ۳-۹: اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی گندم رقم MV17 روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۵

نمودار ۳-۱۰: اثر اسیدیته روی میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز توسط عصاره پروتئینی گندم رقم سیوند ۹۲

نمودار ۳-۱۱: اثر اسیدیته روی میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز توسط عصاره پروتئینی گندم رقم MV17 ..... ۹۳

نمودار ۳-۱۲: اثر اسیدیته روی میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز توسط عصاره پروتئینی گندم رقم افلاک ۹۴

نمودار ۳-۱۳: اثر اسیدیته روی میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز توسط عصاره پروتئینی لوبیا رقم درخشان ۹۵

نمودار ۳-۱۴: اثر اسیدیته روی میزان فعالیت مهارکنندگی آنزیم آلفا-آمیلاز توسط عصاره پروتئینی لوبیا رقم صدری ۹۶

فهرست جداول

جدول ۱-۱: طبقه بندی آنزیم های گوارشی ۱۶

جدول۳-۱: تجزیه واریانس سنجش اثر اسیدیته روی فعالیت آنـزیم آلفـا-آمـیلاز لارو سـن ششـم کـرم غـوزه پنبـه ۷۳

جدول۳-۲: تجزیه واریانس سنجش اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۷۸

جدول۳-۳: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر مهارکنندگی لوبیا رقم درخشان در ۵ غلظت مختلف روی آنزیم آلفـا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۰

جدول۳-۴: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر مهارکنندگی لوبیا رقم صدری در ۵ غلظت مختلـف روی آنـزیم آلفـا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۱

جدول۳-۵: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر مهارکنندگی لوبیا رقم شکوفا در ۵ غلظت مختلـف روی آنـزیم آلفـا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۲

جدول ۳-۶: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر مهارکنندگی گندم رقم افلاک در ۵ غلظت مختلف روی آنـزیم آلفـا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۳

جدول ۳-۷: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر ۵ غلظت از عصاره پروتئینی گندم رقـم سـیوند در روی آنـزیم آلفـا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۴

جدول ۳-۸: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر ۵ غلظت از عصاره پروتئینی گندم رقم MV17 در روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۸۵

جدول ۳-۹: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی گندم رقم سـیوند در ۸ اسـیدیته مختلف روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۹۲

جدول ۳-۱۰: تجزیه واریانس آزمایش سـنجش اثـر اسـیدیته روی فعالیـت مهارکننـدگی گنـدم رقـم MV17 در ۸ اسیدیته مختلف روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۹۳

جدول ۳-۱۱: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی گندم رقم افلاک در ۸ اسیدیته مختلف روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۹۴

جدول ۳-۱۲: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثـر اسـیدیته روی فعالیـت مهارکننـدگی لوبیـا رقـم درخشـان در ۸ اسیدیته مختلف روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۹۵

جدول ۳-۱۳: تجزیه واریانس آزمایش سنجش اثر اسیدیته روی فعالیت مهارکنندگی لوبیا رقم صدری در ۸ اسیدیته مختلف روی آنزیم آلفا-آمیلاز لارو سن ششم کرم غوزه پنبه ۹۶

مقدمه

خسارت به محصولات گیاهی توسط آفات (حشرات، بیماری‌ها و علف‌های هرز) قدمتی به اندازه خود گیاهان دارد، اما از آن‌جا که کشاورزی توسعه یافته و الگوهای کشت در طول زمان تغییر یافته‌اند، خسارت آفات نیز به شدت مورد توجه قرار گرفته است. به علاوه کمتر از ۱۰۰۰ گونه از حشرات (تقریباً ۸۰۰ – ۶۰۰ گونه)، ۲۰۰۰ – ۱۵۰۰ گونه گیاهی، گونه‌های مختلف قارچ، باکتری و نماتد و ویروس به عنوان آفات جدی کشاورزی مورد توجه هستند. اگر این آفات کنترل نشوند، کاهش کمی و کیفی محصولات کشاورزی را به دنبال داشته و در عین حال هزینه‌های تولید به همراه قیمت مواد غذایی افزایش خواهد یافت. در طول تکامل[1]، گیاهان راه‌کارهای متنوعی را برای داشتن رشد مناسب و تضمین بقای خود گسترش داده‌اند. افزایش سازوکارهای دفاعی یکی از این راهکارها می‌باشد که به گیاهان این اجازه را می‌دهد که به صورت موفقیت آمیز نسبت به حشرات، عوامل بیماری‌زای گیاهی، میکرواورگانیسم‌ها و دیگر شرایط نامناسب، متحمل و یا مقاوم شوند. مولکول‌های پروتئینی مانند مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز، مهارکننده‌های پروتئیناز، لکتین‌ها، برخی آنزیم‌های تجزیه کننده مانند کیتینازها، هم‌چنین پپتیدهای ضدمیکروبی بخش مهمی از سازوکارهای دفاعی در گیاهان می‌باشند. مقاومت گیاهان میزبان و تولیدات طبیعی گیاه به عنوان روش‌هایی برای کنترل حشرات آفت مورد توجه قرار گرفته‌اند. این مواد برای موجودات مفید غیر هدف و انسان ایمن هستند. این بخش از مقاومت گیاهی می‌تواند به عنوان روشی اقتصادی برای کاهش خسارت در حال افزایش حشرات آفت مورد توجه قرار بگیرد (بندانی، ۲۰۱۲).

[1] evolution

کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep: Noctuidae)، از مهم‌ترین آفات در بسیاری از نقاط جهان می‌باشد که اهمیت آن به دلیل قابلیت سازگاری سریع با شرایط محیطی و نیز قدرت چندین‌خواری[۱] آن است، به طوری‌که از آفات اصلی محصولات زراعی، دانه‌های روغنی، علوفه و محصولات گلخانه‌ای به شمار رفته (بهداد، ۱۳۸۱؛ مانجونات[۲] و همکاران، ۱۹۸۹) و می‌تواند قسمت‌های مختلف گیاه از جمله ساقه، برگ، گل و میوه را در مراحل مختلف رشدی مورد حمله قرار دهد (اوزگور[۳] و همکاران، ۲۰۰۹؛ ناصری و همکاران، ۲۰۱۰). برای کنترل این آفت از روش‌های مختلف زراعی، بیولوژیکی و شیمیایی استفاده می‌شود. با این حال وجود دامنه میزبانی وسیع، رشد سریع جمعیت در فصل رشدی و افزایش مقاومت آن در برابر حشره کش‌ها موجب عدم موفقیت در کنترل بوده است (اوزگور و همکاران، ۲۰۰۹). توسعه روش‌های جایگزین برای کنترل این آفت از جمله تولید گیاهان میزبان مقاوم با استفاده از پروتئین‌های سمی B.t.[۴] (B.t. - Cry genes) و مهارکننده‌های آنزیمی مانند مهارکننده‌های پروتئاز و آلفا - آمیلاز، پروتئین‌های گیاهی حشره‌کش (VIPs[۵]) و ترکیبات ثانویه گیاهی (SPMs[۶]) ضروری به نظر می‌رسد (آرورا[۷] و همکاران، ۲۰۰۵). مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی می‌توانند جایگزینی مؤثر برای سموم شیمیایی در کنترل آفات گیاه‌خوار محسوب شوند (سیواکومار[۸] و همکاران، ۲۰۰۶). مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی به آنزیم‌ها متصل شده، جایگاه فعال آنزیم را اشغال می‌کنند و یا ساختمان آن را تغییر می‌دهند و سرانجام موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌شوند. این مهارکننده‌ها در گوارش حشره اختلال ایجاد کرده

---

۱ polyphagy
۲ Manjunath
۳ Özgür
۴ *Bacillus thuringiensis*
5 vegetative insecticidal protein
۶ Secondary Metabolites in Plants
۷ Arora
۸ Sivakumar

و از این طریق موجب مرگ، طولانی شدن دوره رشد لاروی و کاهش زادآوری شده و به این ترتیب موجب ایجاد مقاومت گیاه به آفت می‌شود (کوماری[۱] و همکاران، ۲۰۱۲). آلفا-آمیلازها مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی در حشراتی هستند که طی دوره لاروی یا بلوغ منحصراً از محصولات دانه‌ای تغذیه می‌کنند. در صورتی‌که فعالیت آنزیم‌های آمیلاز مهار شود، تغذیه موجود مختل شده و تولید انرژی کاهش می‌یابد. بسیاری از لاروهای پروانه‌ها از مواد نشاسته‌دار تغذیه می‌کنند، بنابراین برای تجزیه و استفاده از نشاسته موجود در منابع غذایی، به آلفا-آمیلازهای گوارشی خود وابسته هستند (سیواکومار و همکاران، ۲۰۰۶؛ مهرآبادی و همکاران، ۲۰۱۰). آلفا-آمیلاز ها (α-1,4-glucan-4-glocanohydrolases EC 3.2.1.1) گروهی از اندوآمیلازها می‌باشند که پیوندهای α-D-(1,4) – glucan را در ترکیبات نشاسته‌ای، گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌ها تجزیه می‌کنند و نقش مهمی را در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در گیاهان، میکرواورگانیسم‌ها و جانوران دارند (فرانکو[۲] و همکاران، ۲۰۰۲). مطالعه روی گوارش نشاسته به عنوان هدفی برای کنترل حشراتی که از نشاسته تغذیه می‌کنند، پس از مشاهده اثر بالای مهارکنندگی آلفا - آمیلاز دانه های لوبیای معمولی روی سوسک چینی حبوبات و سوسک چهار نقطه‌ای افزایش یافت (فرانکو و همکاران ، ۲۰۰۱).

توجه ویژه‌ای برای استفاده از مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز برای کنترل حشرات آفت و نیز استفاده از آن‌ها برای تولید گیاهان تراریخت مقاوم به آفات معطوف شده است (گتهوس[۳] و همکاران، ۱۹۹۸؛ والنسیا و همکاران، ۲۰۰۰؛ یامادا[۴] و همکاران، ۲۰۰۱). بیان مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز تأثیر

[۱] Kumari
[۲] Franco
[۳] Gatehouse
[۴] Yamada

گیاهان تراریخت را نشان داده است. بیان cDNA رمزکننده مهارکننده آلفا-آمیلاز نوع یک در برخی گیاهان مانند نخود(*Pisum sativum* L.) و لوبیای آزوکی (*Vigna anguralis* L.) در برابر سوسک‌های حبوبات[۱] (Coleoptera: Bruchidae) مدرک مناسبی برای نشان دادن توانایی این مهارکننده‌ها به عنوان فاکتورهای مقاومت گیاهان در برابر برخی گونه‌های آفات می‌باشد (ایشیموتو[۲] و همکاران، ۱۹۸۹؛ کلو[۳] و همکاران، ۲۰۰۵). علی‌رغم وجود ترکیبات دفاعی در گیاهان، دفاع گیاهان کامل نیست و حشرات روی دانه‌ها و بافت‌های گیاهان مختلف خسارت ایجاد می‌کنند (فرانکو و همکاران، ۲۰۰۲). اما بررسی خصوصیات آنزیم‌های گوارشی حشرات و عکس‌العمل آن‌ها به مهارکننده‌های مختلف، در نتیجه استفاده برای تولید گیاهان تراریخت[۴] می‌تواند کلیدی برای ایجاد مقاومت مورد انتظار در گیاهان هدف و کاهش خسارت آفت باشد، به نحوی که برای محیط زیست، مصرف کننده‌ها و تولیدکننده‌ها سودمند خواهد بود (گرینگورتنا[۵] و همکاران، ۱۹۹۳؛ کوماری و همکاران، ۲۰۱۲).

هدف از این تحقیق تعیین برخی ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم آلفا-آمیلاز دستگاه گوارش لارو سن ششم کرم غوزه پنبه و سپس مشاهده تأثیر برخی از عصاره های پروتئینی روی فعالیت این آنزیم جهت دست‌یابی به اطلاعاتی است که بتوان در تحقیقات تکمیلی بعدی به ارقام مقاوم با اثر قابل توجه روی سیستم آنزیم های گوارشی این آفت دست یافت.

---

۱ bruchid beetle
۲ Ishimoto
۳ Kluh
۴ transgenic plant
۵ Gringortena

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- معرفی حشره:

کرم غوزه پنبه در منابع اسامی مختلفی از جمله (Hübner) *Heliothis armigera*، *Chloridea armigera* (Hübner)، *Heliothis obsoleta* Auctorum، *Chloridea obsoleta*، *Helicoverpa obsoleta* Auctorum، *Heliothis fusca* Cockerell و *Noctua armigera* Hübner دارد (لامرز[۱] و مک لود[۲]، ۲۰۰۷). به دلیل تعداد فراوان محصولاتی که مورد حمله *H. armigera* قرار می‌گیرند، دارای اسامی عمومی زیادی می‌باشد که می توان به Scarce bordered straw worm، Corn earworm، African cotton bollworm، Pod borer، Tobacco budworm، American bollworm و Tomato worm اشاره کرد (ونت[۳] و همکاران، ۲۰۰۳؛ لامرز و مک لود، ۲۰۰۷). موقعیت سیستماتیکی حشره مورد بررسی در این تحقیق به صورت زیر می‌باشد (تبادکانی ۱۳۸۹):

سلسله:	جانوری	Kingdom:	Animalia
شاخه:	بندپایان	Phylum:	Arthropoda
زیر شاخه:	شاخک داران	Sub-phylum:	Atelocerata
رده:	شش پایان (حشرات)	Class:	Hexapoda (=Insecta)
زیر رده:	بال‌داران	Sub-class:	Pterygota
بالا راسته:	درون بالان	Super-order:	Endopterygota
راسته:	بال‌پولک‌داران	Order:	Lepidoptera
زیر راسته		Sub-order:	Ditrysia
بالا خانواده		Super-family:	Noctuoidea
خانواده		Family:	Noctuidae
زیر خانواده		Sub-family:	Noctuinae
جنس		Genus:	*Helicoverpa*
گونه		Species:	*armigera*

۱ Lammers
۲ MacLeod
۳ Venette

کرم غوزه پنبه از نظر تاکسونومیکی با سایر گونه‌های *Helicoverpa* اشتباه گرفته می‌شود. در گذشته برخی محققین *Helicoverpa* را به عنوان زیر جنس *Heliothis* تلقی می‌کردند (کامن[۱]، ۱۹۵۳). تا اینکه طبق اظهارات ونت و همکاران (۲۰۰۳)، هاردویک[۲] در سال ۱۹۶۵ با توجه به اختلاف اعضای تناسلی حشرات نر و ماده، جنس *Helicoverpa* را از *Heliothis* جدا کرد.

۱-۱-۱- پراکنش:

کرم غوزه پنبه از آفات چندخوار محصولات مهم اقتصادی در بسیاری از نقاط آفریقا، آسیا، اقیانوسیه و اروپا می‌باشد (ونت و همکاران، ۲۰۰۳). در کشورهای اروپایی مانند اسپانیا، بلغارستان، یونان، پرتغال، رومانی گسترش وسیعی داشته و در فرانسه، ایتالیا و قبرس نیز با پراکنش کمتر گزارش شده است. این آفت در تمام قسمت‌های آفریقا پراکندگی گسترده دارد (جوبن[۳] و همکاران، ۲۰۱۲). در آسیا از ایران، چین، پاکستان، هند و تایلند گزارش شده است (مارتین[۴] و همکاران، ۲۰۰۰). در ایران اولین بار در سال ۱۳۱۷ توسط افشار گزارش شد (بهداد، ۱۳۸۱) و در اکثر مناطق پنبه‌کاری نظیر گرگان، گنبد، دشت مغان، کرمان و فارس انتشار دارد (خانجانی، ۱۳۸۷).

۱-۱-۲- دامنه میزبانی:

دامنه میزبانی این حشره بسیار وسیع می‌باشد، به طوری‌که بیش از ۳۰۰ گونه گیاهی از تیره‌های مختلف را مورد تغذیه قرار می‌دهد. اگر این آفت در منطقه‌ای ظاهر شود، موجب ایجاد خسارت جدی به محصولات می‌شود. از مهم‌ترین میزبان‌های آفت می‌توان به گوجه فرنگی، ذرت،

---

۱ Common
۲ Hardwick
۳ Joußen
۴ Martin

پنبه، بادام زمینی، بامیا، نخود، لوبیای سودانی، سورگوم، لوبیا چشم بلبلی، سویا، یونجه و دیگر بقولات، توتون، سیب‌زمینی، کتان، گیاهان زینتی مانند رز، میخک، داوودی، برخی درختان میوه (مرکبات و گوجه سبز) و طیف وسیعی از سبزیجات اشاره کرد (لامرز و مک لود، ۲۰۰۷). به دلیل حضور این آفت، محصول مزارع پنبه در چین از سال ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ هر ساله ۵۰ تا ۶۰ درصد گزارش شده است (زایو[۱] و همکاران، ۲۰۰۲). ترجیح میزبانی از جمله غذای مصنوعی این آفت، در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. لوبیای سودانی[۲] (*Cajanus cajan*) و به دنبال آن غذای مصنوعی، ذرت، سورگوم و لوبیا چشم بلبلی بهترین میزبان برای این آفت محسوب می‌شوند (گو[۳] و همکاران، ۲۰۰۱). بر اساس مطالعات آزمایشگاهی، توتون، ذرت و گل آفتابگردان مناسب‌ترین میزبان‌ها بوده و سویا، پنبه و یونجه نیز به عنوان میزبان‌هایی با ارجحیت متوسط شناخته شده‌اند. این آفت روی کلم، کتان و خرفه کمترین رغبت را برای تغذیه نشان داده است (ونت و همکاران، ۲۰۰۳). هم‌چنین بررسی‌های گو و والتر[۴] (۱۹۹۸) نشان داده است که تخم‌ریزی پروانه بالغ کرم غوزه پنبه روی علف هرز شیرتیغی بیشتر از پنبه بوده و بقای لاروها نیز روی این علف هرز در مقایسه با پنبه بیشتر می‌باشد. به طور کلی گندم مهم‌ترین میزبان برای لاروهای نسل اول این آفت به شمار می‌آید. پنبه، ذرت، بادام زمینی، سبزیجات و سویا نیز مهم‌ترین میزبان‌ها برای نسل‌های بعدی است (وو[۵] و همکاران، ۲۰۰۷). قدرت چندین‌خواری بالا، پراکنش جغرافیایی وسیع، باروری

---

۱ Xiao
۲ Pigeon pea
۳ Gu
۴ Walter
۵ Wu

زیاد، دیاپوز اختیاری و بروز مقاومت به حشره کش‌ها موجب شده است که این حشره از مهم‌ترین آفات محصولات کشاورزی به شمار آید (فیت[۱]، ۱۹۸۹).

۱-۱-۳- شکل شناسی:

۱-۱-۳-۱- حشره کامل:

حشره کامل پروانه‌ای به طول ۲۰ – ۱۰ میلی‌متر و عرض بدن با بال‌های باز ۴۰ – ۳۵ میلی‌متر است (خانجانی، ۱۳۷۸، بهداد، ۱۳۸۱). سر و قفس سینه در افراد نر به رنگ زیتونی مایل به زرد تا خاکستری مایل به زرد و پالپ‌های لبی و شاخک‌های آن‌ها به رنگ صورتی روشن می‌باشد. پاها قهوه‌ای مایل به خاکستری، گاهی کاملاً به رنگ صورتی روشن می‌باشد. بال‌های جلویی حشره نر زیتونی مایل به زرد با خطوط متقاطع قهوه‌ای مایل به نارنجی است. بال‌های عقبی آن سفید مایل به زرد می‌باشد که به سمت قاعده خاکستری رنگ می‌شوند (شکل ۱-۱ الف). افراد ماده دارای سر، قفس سینه و بال‌های قهوه‌ای مایل به قرمز روشن می‌باشد. بال‌های جلویی ماده‌ها دارای خطوط متقاطع قهوه‌ای مایل به قرمز کاملاً مشخص است. لکه گرد روی بال نر به شکل یک نقطه سیاه رنگ مایل به قهوه‌ای با یک حلقه قهوه‌ای مایل به خاکستری است و لکه لوبیایی شکل در مرکز به رنگ سیاه مایل به قهوه‌ای است که حاشیه آن با یک لکه مربعی قهوه‌ای مایل به خاکستری احاطه شده است (کامن، ۱۹۵۳) (شکل ۱-۱ ب).

[۱] Fitt