

دانش گیاهپزشکی ایران

دوره ۴۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (ص ۵۷-۴۱)

تأثیر لکتین استخراج شده از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* بر  
مرگومیر و پارامترهای فیزیولوژیک لاروهای پروانه سفیده بزرگ کلم،  
*Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae)

زینب البرزی<sup>۱</sup>، آرش زیبایی<sup>۲\*</sup>، جلال جلالی سندی<sup>۳</sup>، آزاده کریمی ملاطی<sup>۴</sup>، بابک ربیعی<sup>۵</sup> و مهدی سلیمی<sup>۶</sup>  
۱، ۲، ۳، ۴ و ۶. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار و استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی،  
دانشگاه گیلان، رشت

۵. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۲۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۲۶)

### چکیده

در این پژوهش، لکتین استخراج شده از قارچ بیماریگر گیاهی *Sclerotinia sclerotiorum*، به رژیم غذایی لاروهای سن سوم پروانه سفیده بزرگ اضافه گردید و پس از ۵ روز تأثیر آن بر مرگومیر، تغذیه و متابولیسم حد واسط آنها بررسی شد. غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین مذکور به مرگومیر ۲۰ تا ۶۶ درصدی در لاروهای تیمار شده منجر شد. شاخص‌های تغذیه لاروهای تیمار شده نسبت به شاهد کاهش معناداری نشان دادند. میزان هزینه متابولیک نیز در لاروهای تیمار شده با لکتین نسبت به شاهد افزایش معناداری را نشان داد. فعالیت آنزیم‌های گوارشی همچون آلفا- آمیلاز، گلوکوزیدازها، لیپاز، پروتئازهای عمومی و اختصاصی (سیرین و اگزوپپتیداز) لاروهای تغذیه شده با غلظت‌های مختلف لکتین نیز کاهش معناداری نسبت به شاهد نشان داد. اگرچه فعالیت آسپارات آمینو ترانسفراز و گاما- گلوتامیل ترانسفراز در لاروهای تغذیه شده روی غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین افزایش معناداری را نشان داد، فعالیت آلانین آمینوترانسفراز کاهش معناداری نسبت به شاهد داشت. فعالیت اسید فسفاتاز تفاوت معناداری را بین لاروهای شاهد و تیمار نداشت، اما فعالیت آلکالین فسفاتاز کاهش معناداری را نشان داد. فعالیت لاکتات دهیدروژناز در لاروهای تغذیه شده روی غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین افزایش معناداری داشت، اما فعالیت آلدولاز در لاروهای شاهد و تغذیه شده از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین بیشتر از دیگر تیمارها بود. میزان درشت مولکول‌های ذخیره‌ای، پروتئین، تری‌گلیسرید و گلیکوژن در لاروهای تغذیه شده با لکتین کمتر از شاهد بود. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که لکتین قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* به مرگومیر و اختلال در فیزیولوژی گوارش و متابولیسم حد واسط لاروهای سفیده بزرگ کلم منجر می‌شود و می‌تواند به عنوان یک مولکول سمی در کنترل این آفت به کار رود.

واژه‌های کلیدی: فیزیولوژی گوارش، لکتین، متابولیسم حد واسط، *Pieris brassicae*

*Sclerotinia sclerotiorum*

## مقدمه

پروانه سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae)، یکی از مهم‌ترین آفات محصولات کشاورزی همچون کلزا، کلم، شلغم، ترب و بعضی از گیاهان زینتی است که به دلیل توانایی مهاجرت، دامنه انتشار گسترده‌ای در نیمکره شمالی دارد (Johnson & Triplehorn, 2004). افراد بالغ به طول ۲۰ میلی‌متر و عرض با بال‌های باز ۶۰-۴۰ میلی‌متر، با بدن خاکستری و بال‌های سفیدرنگ اند که خال‌های سیاه روی آنها قرار دارند. لاروها به طول ۵۰-۴۵ میلی‌متر به رنگ سبز متمایل به خاکستری که سه نوار طولی زرد رنگ به همراه لکه‌های تیره روی بدن اند (Khanjani, 2005). لاروها با تغذیه از برگ باعث توقف رشد، تضعیف گیاه و کاهش بازارپسندی محصول به دلیل باقی گذاشتن مقدار زیادی از فضولات در لابه‌لای بوته‌ها می‌شوند (Khanjani, 2005). از روش‌های کنترل این آفت می‌توان به تناوب زراعی، از بین بردن بقایای آلوده گیاهی، از بین بردن علف‌های هرز، کنترل شیمیایی علیه لاروهای سن اول و استفاده از عوامل بیولوژیک همچون *Apanteles glomeratus* Reinheart اشاره کرد (Khanjani, 2005).

لکتین‌ها پروتئین‌هایی ناهمگن اند که از موجودات زنده مختلف همچون گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و جانوران استخراج شده‌اند. این پروتئین‌ها به قندهای منومر یا اولیگو ساکاریدهای سلول‌ها متصل می‌شوند و منجر به اتصال آنها به هم یا اصطلاحاً آگلوتینه شدن آنها می‌شوند (Komathe et al., 2006). عقیده بر این است که لکتین‌ها از طریق اتصال سلول‌های خونی جانوران در واکنش‌های ایمنی و لخته کردن خون نقش دارند (Chen, 2008). طی سال‌های اخیر، پژوهش‌های متعددی در زمینه فعالیت حشره‌کشی لکتین‌های گیاهی علیه حشرات آفت متعلق راسته‌های مختلف حشرات با استفاده از رژیم‌های غذایی مصنوعی گیاهان تراریخته بیان‌کننده ژن لکتین انجام گرفته است. از آنجا که سلول‌های جانوری به‌ویژه سلول‌های دستگاه گوارش، توسط غشایی متشکل از گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها احاطه شده‌اند، لکتین‌ها با اتصال به این

سلول‌ها باعث بروز مجموعه‌ای از تغییرات در آنها می‌شوند که می‌تواند از کاهش کارایی سلول تا مرگ آن از طریق آپوپتوزیس متغیر باشد (Hamshou et al., 2010).

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary بیماری‌زای گیاهی از راسته Helotiales است که با توجه به علائم ایجادشده روی گیاه می‌تواند به نام‌های بلایت سفید، پوسیدگی سفید، پوسیدگی ساقه، بلایت ساقه، شکستگی ساقه، شانکر ساقه یا شانکر کلزا شناخته شود (Chang & Kozub, 1994). ویژگی بارز این بیمارگر توانایی تولید ساختارهایی به نام اسکلرت در میان میسلیم‌های سفید در محیط کشت یا بافت گیاهی است. این اسکلرت‌ها در بهار به اجسام میوه‌ای تبدیل می‌شوند و اسپورها را به صورت ساک تولید می‌کنند. این قارچ دامنه انتشار گسترده‌ای دارد و در شرایط مطلوب محیطی می‌تواند خسارت زیادی به محصولات کشاورزی وارد کند (Agrios, 2005). لکتینی به صورت پروتئین هومودایمیریک و وزن مولکولی ۱۷ کیلودالتون از اسکلرت‌های این قارچ با استفاده از کروماتوگرافی گلاکتوزان-استیل‌گلاکتوزآمین خالص شده است (Candy et al., 2003). مدل‌های مولکولی پیشنهاد کرده‌اند که این لکتین از نظر ساختاری مشابه بالاخانواده ricin-B است. این لکتین دارای یک مکان اتصال کربوهیدرات در هر منومر است و ساختار دایمیری متفاوت از دیگر لکتین‌های گروه ریسین دارد (Sulzenbacher et al., 2010). Hamshou et al. (2010) دریافتند که لکتین قارچ *S. sclerotiorum* با غلظت ۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی سلول‌های معده *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) Harris کشنده است و با اتصال به میکروبی‌های سلول‌های معده شته منجر به مرگ آنها از طریق Caspase-3 می‌شود (این آنزیم یکی از ۶ کاسپاز مؤثر در مرگ سلولی پروانه‌هاست که باعث حذف سلول مرده می‌شود). با توجه به پتانسیل این لکتین در ایجاد مرگ‌ومیر سلولی، پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر لاروهای سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* L.

دقیقه در محلول‌های حاوی لکتین و محلول آب مقطر حاوی ۰/۰۱ درصد ترایتون ایکس-۱۰۰ به عنوان شاهد غوطه‌ور شدند. سپس برگ‌های هر تیمار جداگانه روی کاغذ صافی (واتمن ۱) قرار گرفتند و در دمای آزمایشگاه خشک شدند. سپس در سه تکرار ۱۰ تایی، برگ‌ها در اختیار لاروهای سن سوم قرار گرفتند. طی ۵ روز، به‌طور روزانه میزان مرگ‌ومیر لاروها ثبت شد و میزان غذای خورده‌شده و فضولات برآورد شد. پارامترهای شاخص‌های تغذیه بر اساس روش Scriber & Slansky (1982) اندازه‌گیری شد. کارایی تبدیل غذای بلع‌شده یا ECI (Efficiency of conversion of the ingested food) به‌صورت نسبت میلی‌گرم وزن تر بر میلی‌گرم وزن خشک غذای خورده‌شده  $\times 100$ ، کارایی تبدیل غذای هضم‌شده ECD (The efficiency of conversion of the digested food) به‌صورت نسبت میلی‌گرم وزن تر بر تفریق وزن خشک غذای خورده‌شده و وزن خشک فضولات (میلی‌گرم)  $\times 100$  و میزان هضم‌پذیری نسبی به‌صورت تفریق وزن خشک غذای بلع‌شده و وزن خشک فضولات (میلی‌گرم) تقسیم بر میلی‌گرم وزن خشک غذای خورده‌شده  $\times 100$  محاسبه شد. هزینه متابولیک یا MC (Metabolic cost) هم به‌صورت 100-ECD محاسبه شد.

#### آماده‌سازی نمونه‌ها برای تعیین فعالیت آنزیم‌های گوارشی

پس از پایان آزمایش لاروهای ۴۸ ساعته، سن چهارم لاروی انتخاب شد و معده آنها در محلول نمکی کلریدسدیم ۱۰ میلی‌مول تشریح شد و هر ۳۵ میلی‌گرم بافت معده از هر تیمار جداگانه در تیوب‌های اپندورف قرار داده شد و به آن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها با هموژنایزر شیشه‌ای هموژنایز شدند و در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند. مایع روشن‌شده به عنوان منبع آنزیمی محلول در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای آماده‌سازی نمونه‌های متصل به غشا برای برآورد آنزیم‌های گلوکوزیداز و اگزوپپتیداز، ماده ته‌نشین سانتریفیوژ اول با ترایتون ایکس-۱۰۰ (Merck, 108643) (۱۰)

(Lepidoptera: Pieridae)، انجام گرفت. سفیده بزرگ کلم یکی از مهم‌ترین آفات محصولات همچون چلیپاییان و کلزاست که می‌تواند در شرایط مطلوب خسارت شدیدی وارد کند. در کشور ما عمده روش کنترل استفاده از ترکیبات شیمیایی است که مخاطرات خاص خود را دارد. بنابراین ایجاد ارقام مقاوم با استفاده از ترکیبات طبیعی که خاصیت سمی روی این آفت دارند و همکاری چندین مرکز تحقیقاتی می‌تواند کارا باشد. در ابتدا، لکتین مذکور با استفاده از ستون کروماتوگرافی Sepharose 4B-Galactose استخراج و خالص‌سازی شد (Alborzi & Zibae, 2014) و سپس در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر همراه برگ ترب به لاروها خوراندند. پس از بازه زمانی ۷۲ ساعت، تأثیر لکتین بر مرگ‌ومیر، شاخص‌های تغذیه، آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم حد واسط تعیین شد. نتایج این پژوهش می‌تواند پتانسیل حشره‌کشی و اختلال در فیزیولوژی لکتین قارچ مذکور را بر سفیده بزرگ کلم نشان دهد و به عنوان مولکولی بالقوه برای ایجاد گیاهان تراریخته به‌کار رود.

#### مواد و روش‌ها

##### پرورش حشرات

دسته‌های تخم سفیده بزرگ کلم از مزارع کلزای شهر ساری جمع‌آوری شد و برای پرورش در شرایط  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $80 \pm 5$  درصد و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶ به ۸ به آزمایشگاه منتقل گردید. لاروهای تفریح‌شده روی برگ‌های ترب تا رسیدن به سن سوم لاروی در شرایط آزمایشگاهی مذکور پرورش داده شد. شرایط پرورش به‌طور روزانه بررسی شد و برگ‌های تازه در اختیار لاروها قرار گرفت (Zibae, 2012).

##### زیست‌سنجی و شاخص‌های تغذیه لاروهای سفیده بزرگ

کلم تغذیه‌شده روی غلظت‌های لکتین *S. sclerotiorum* غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از لکتین *S. sclerotiorum* در آب مقطر حاوی ۰/۰۱ درصد ترایتون ایکس-۱۰۰ تهیه شدند. برگ‌های ترب (۳ گرم به ازای ۱۰ لارو بر اساس آزمون مقدماتی) به‌مدت ۱۰

پس از توقف واکنش با هیدروکسید سدیم (۱ مولار) جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. آزمایش در سه تکرار انجام گرفت و بلانک شامل مخلوط واکنش و فاقد آنزیم بود.

#### تعیین فعالیت TAG-Lipase

اندازه‌گیری فعالیت تری‌آسیل‌گلیسرید - لپاز (TAG-Lipase) با استفاده از روش (Tsuji et al., 1989) انجام گرفت. بیست میکرولیتر از عصاره آنزیمی معده و ۴۰ میکرولیتر پارانیتروفنیل بوتیرات [p-nitrophenyl butyrate] (۲۷ میلی‌مولار به عنوان سوبسترا) (Sigma-Aldrich, N9876) با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (اسیدیته ۸، ۲۰ میلی‌مولار) ترکیب شد و به مدت ۱۲ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. پس از این مدت، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم (Merck, 106469) یک مولار به هر میکروتیوب برای توقف واکنش اضافه گردید و جذب در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

#### تعیین فعالیت پروتازکل

سنجش فعالیت پروتازکل با استفاده از سوبسترای آزوکازئین (Sigma-Aldrich, A2765) طبق روش (Elpidina et al., 2001) انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر بافر تریس - هیدروکلرید (۲۰ میلی‌مولار اسیدیته ۹) (Chem Lab, Belgium, CI00.2042.1000)، ۵۰ میکرولیتر آزوکازئین ۲ درصد و ۲۰ میکرولیتر نمونه بود. بعد از ۶۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید (۳۰ درصد) (Sigma-Aldrich, T4885) اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت، حجم مساوی از هیدروکسید سدیم (۴ مولار، ۲۷۰ میکرولیتر) اضافه گردید و جذب در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

#### تعیین فعالیت پروتازهای اختصاصی

##### سرین پروتئینازها (اندوپیتیدازها)

فعالیت پروتئینازهای تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز

میلی‌گرم تریپتون ایکس-۱۰۰ به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و مایه روشن به عنوان منبع آنزیمی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. به منظور حذف تأثیر میزان پروتئین اضافه، غلظت پروتئین در نمونه‌ها یکنواخت شد (Ferreira & Terra, 1983; Zibae, 2011).

#### تعیین فعالیت آلفا - آمیلاز

فعالیت آلفا - آمیلاز با استفاده از روش معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (Sigma-Aldrich, D0550) و محلول نشاسته ۱٪ (Merck, 101253) به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد (Bernfeld, 1955). بیست میکرولیتر از هر نمونه آنزیمی با ۷۰ میکرولیتر بافر یونیورسال [اسیدیته ۹، گلیسین (Merck, 816013)، سوکسینات (Merck, 820131) و ۲- مورفولینو اتان سولفوریک اسید (Sigma-Aldrich, M5287)؛ ۲۰ میلی‌مولار] و ۴۰ میکرولیتر نشاسته به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DNS و حرارت دادن مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش متوقف شد و جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

فعالیت آلفا و بتا - گلوکوزیداز با استفاده از روش (Ferreira & Terra, 1983) با استفاده از p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoopyranoside (pN $\alpha$ G) (Sigma-Aldrich, N1377) به عنوان سوبسترای آلفا- گلوکوزیداز و p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside (pN $\beta$ G) (Sigma-Aldrich, N7006) به عنوان سوبسترای بتا- گلوکوزیداز اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های آنزیمی محلول و متصل به غشا به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰ میکرولیتر بافر یونیورسال<sup>۲</sup> (اسیدیته ۷) و ۱۰ میکرولیتر سوبسترای آلفا و بتا- گلوکوزیداز به طور جداگانه انکوبه شدند و

1. Dinitrosalysilic acid
2. Universal buffer (Glycin, Succinate and 2-Morpholinoethan sulfuric acid)

در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد نشاسته، کلرید کلسیم ۲ میلی‌مولار و کلرید سدیم ۱۰ میلی‌مولار قرار داده شد و در نهایت با محلول لوگول (یدیپتاسیم ۱/۳ درصد و ید ۳ درصد) رنگ‌آمیزی گردید. باندهای سفید آلفا- آمیلاز در زمینه قهوه‌ای نشان‌دهنده فعالیت این آنزیم بودند. برای زایموگرام پروتئاز، ژل به مدت ۳ ساعت در محلول ۲ درصد کازئین قرار داده شد و سپس به مدت یک شب در محلول رنگ‌آمیزی شامل ۱۰ واحد آب مقطر، ۱ واحد اسیداستیک و ۵ واحد اتانول که به آن ۰/۲ گرم کوماسی‌بلو R-250 (Sigma-) Aldrich, 27816) اضافه شده بود قرار گرفت. در نهایت، رنگ‌بری با محلول ۱۰ واحد آب مقطر، ۱ واحد اسیداستیک و ۱۰ واحد اتانول انجام گرفت. باندهای سفید پروتئاز در زمینه آبی مشاهده شد. برای زایموگرام لیپاز، ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۵ میلی‌مولار 4-methylumbelliphenyl-butyrat (Sigma-Aldrich, N9876) قرار داده شد و توسط ژل‌داکت با نور ماورای بنفش، باندهای سفید لیپازی در زمینه آبی مشاهده شد (Zibae, 2011).

#### تأثیر لکتین *S. sclerotiorum* بر متابولیسم حد واسط لاروهای سفیده بزرگ کلم

پس از پایان آزمایش لاروهای ۴۸ ساعته، سن چهارم لاروی انتخاب شد و ۲۰۰ میلی‌گرم بافت کل بدن از هر تیمار جداگانه در تیوب‌های اپندورف قرار داده شد و به آن ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها هم‌وزن‌نیز شدند و در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. مایع روشن‌شده برای بررسی‌های بیوشیمیایی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

#### آلانین و آسپاراتات آمینوترانسفراز

این دو آنزیم با استفاده از روش Thomas (1998) اندازه‌گیری شدند. بر اساس این روش، آلانین در اثر فعالیت آنزیم آمینوترانسفراز در حضور ۲- اگزوگلوتامات تولید گلوتامات و پیرووات می‌کند. آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز، اسید آمینه آسپاراتات را در حضور ۲- اگزوگلوکوتارتارات به اگزوالواستات و گلوکوتامات تبدیل

به عنوان سه زیرگروه از سرین پروتئینازها با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار از (Sigma-Aldrich, B4875) BApNA (Na-benzoyl-L-arginine-*p*- nitroanilide) به عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین، SAAPPpNA (N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg- *p*- nitroanilide) به عنوان سوبسترای اختصاصی کیموتریپسین (Sigma-) Aldrich, B2133) SAAApNA (N- succinyl- alanine- alanine- *p*- nitroanilide) به عنوان سوبسترای اختصاصی الاستاز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۳۵ میکرولیتر بافر تریس- هیدروکلراید (اسیدیته ۹)، ۲۰ میکرولیتر از سوبستراهای ذکر شده و ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی بود (Oppert *et al.*, 1997). مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد و در نهایت در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

#### اگزوپپتیدازها

فعالیت دو اگزوپپتیداز با استفاده از دو ترکیب Hippuryl- Arginine (Sigma-Aldrich, H2508) و Hippuryl- Phenilalanine (Sigma-Aldrich, H6875) به ترتیب به عنوان سوبستراهای اختصاصی کربوکسی و آمینوپپتیداز اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از سوبستراهای ذکر شده و ۵ میکرولیتر محلول آنزیمی به ۳۵ میکرولیتر بافر تریس - هیدروکلراید (اسیدیته ۷) اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه جذب در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد (Oppert *et al.*, 1997).

#### الکتروفورز زایموگرام (غیراحیایی یا Native-PAG)

الکتروفورز ژل اکریل آمید با استفاده از ژل‌های متراکم‌کننده و جداکننده با غلظت اکریل‌آمید ۴ و ۱۰ درصد، طبق روش لیملی (Laemmli, 1970) انجام گرفت. الکتروفورز در دمای ۴ درجه سلسیوس و در ولتاژ ثابت ۷۵ میلی‌ولت انجام گرفت. پس از این که رنگ (برم‌فنل‌بلو) به انتها رسید، ژل به آرامی از شیشه‌ها جدا شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱ درصد تریتون قرار داده شد.

برای زایموگرام آلفا - آمیلاز، ژل به مدت ۲ ساعت

می‌کند که خواندن جذب نوری رنگ‌های حاصل در طول موج ۳۴۰ نانومتر نشان‌دهنده فعالیت این آنزیم در نمونه است. برای سنجش فعالیت این دو آنزیم از کیت بیوشیمیایی شرکت بیوکم (تهران، ایران) استفاده شد. محلول ۱ و ۲ به نسبت ۴ به ۱ مخلوط شد و با اضافه کردن نمونه آنزیمی و انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه، فعالیت این دو آنزیم در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد.

#### اسید و آلکالین فسفاتاز

بر اساس روش Bessey *et al.* (1946)، ۵۰ میکرولیتر بافر تریس-هیدروکلرید (۲۰ میلی‌مولار؛ اسیدیت ۶ برای اسید فسفاتاز و اسیدیت ۹ برای آلکالین فسفاتاز)، ۳۰ میکرولیتر *p*-nitrophenol-phosphate و ۱۰ میکرولیتر نمونه با هم مخلوط و پس از ۵ دقیقه جذب در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

#### تعیین میزان لیپوپروتئین با تراکم زیاد<sup>۱</sup> (HDL) و کم<sup>۲</sup> (LDL)

روش Schaefer & McNamara (1997) برای تعیین میزان HDL و LDL استفاده شد. براساس دستورالعمل شرکت زیست‌کم (سنجش HDL)، ۵۰ میکرولیتر محلول رسوب‌دهنده (PTA-Magnesium) و ۲۰ میکرولیتر نمونه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. مخلوط واکنش به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از یک ساعت انکوباسیون، جذب در ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. برای سنجش LDL، ۵۰ میکرولیتر محلول بافر (۱) با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم (۲) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Amino antipyrine) و ۱۰ میکرولیتر نمونه به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید و سپس جذب در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

#### تعیین میزان ذخایر غذایی

##### گلیکوژن

برای اندازه‌گیری گلیکوژن، ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت کل بدن در نیم میلی‌لیتر محلول ۳۰ درصد حاوی هیدروکسیدپتاسیم و سولفات سدیم غوطه‌ور شدند. اپندورف‌های حاوی نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به آنها اضافه شد. سپس اپندورف‌ها تکان داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۳۰

گاماگلوتامیل ترانسفراز از روش Szasz (1976) برای تعیین فعالیت این آنزیم در لاروهای شاهد و تغذیه‌شده روی لکتین ۲ درصد استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر محلول بافر، ۲۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide) و ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی بود (ZiestChem Diagnostic Co., Tehran-Iran). پس از ۳ دقیقه، جذب در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

#### گاماگلوتامیل ترانسفراز

فعالیت آنزیم آلدولاز بر اساس روش Pinto *et al.* (1969) اندازه‌گیری شد. بر اساس دستورالعمل شرکت زیست‌کم، ۵۰ میکرولیتر محلول بافر، ۲۵ میکرولیتر محلول سوبسترا (Fructose-1,6 di-phosphate)، ۱۰ میکرولیتر محلول کوفاکتور (NADH) و ۲۰ میکرولیتر نمونه به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید و جذب در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد.

#### آلدولاز

برای سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز از روش King (1965) استفاده شد. برای استاندارد کردن مخلوط واکنش، ۲۰۰ میکرولیتر NAD<sup>+</sup> و آب مقطر به تیوب‌های اپندورف اصلی و بلانک اضافه شد. به هر تیوب، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا-بافر (محلول ۱) و ۱۰ میکرولیتر نمونه اضافه شد. انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انجام گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگی (۲) (2,4-dinitrophenylhydrazine) اضافه گردید و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از خنک شدن روی یخ، ۱۰۰ میکرولیتر

#### لاکتات دهیدروژناز

۱. High density lipoprotein  
2. Low density lipoprotein

## نتایج و بحث

تأثیر غلظت‌های مختلف لکتین *S. sclerotiorum* بر مرگ‌ومیر لاروهای سفیده بزرگ کلم

در این پژوهش مشخص شد که لکتین قارچ *S. sclerotiorum* منجر به مرگ‌ومیر لاروهای سفیده بزرگ کلم می‌شود (شکل ۱). مرگ‌ومیر لاروها در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین به ترتیب ۱۸ و ۲۳ درصد بود، اما در بالاترین غلظت (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ۶۶ درصد رسید ( $F=12/36$ ،  $Pr>F=0/004$ ،  $Df=3, 4$ ). علاوه بر این، لاروهای تغذیه شده روی لکتین نسبت به شاهد چثه کوچک‌تری داشتند (شکل ۱،  $F=16/69$ ،  $Pr>F=0/032$ ،  $Df=3, 4$ ). کاهش جثه و وزن لاروی به همراه مرگ‌ومیر در بسیاری از پژوهش‌های مشابه گزارش شده است. مشخص شد که غلظت ۱ درصد لکتین قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn (Cantharellales: Ceratobasidiaceae) منجر به مرگ‌ومیر ۸۱ درصدی در لاروهای *Spodoptera littoralis* F. (Lepidoptera: Noctuidae) شده است (Hamshou *et al.*, 2010b). در پژوهش دیگر غلظت ۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر لکتین *S. sclerotiorum* منجر به مرگ‌ومیر ۴۹ تا ۸۸ درصدی شته نخود شد (Hamshou *et al.*, 2010a). غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت‌بند نیز مرگ‌ومیر لاروهای سفیده بزرگ کلم را به کمتر از ۷۰ درصد کاهش داد (Zibae *et al.*, 2014). Macedo *et al.* (2007) مشخص کردند که لکتین *Bauhinia monandra* Kurz روی شب‌پره بید آرد، سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات و سوسک سیاه گندم تأثیر حشره‌کشی دارد. لکتین استخراج شده از هندوانه ابوجهل منجر به مرگ‌ومیر ۶۰ درصدی در لاروهای کرم گلوگاه انار شد (Ramzi *et al.*, 2013). نتایج مختلف مشاهده شده بر اساس نوع لکتین، غلظت آن و حشره تحت نظر متفاوت است. از طرف دیگر، تأثیر حشره‌کشی و کاهش‌دهنده وزن لاروی لکتین استخراج شده از *S. sclerotiorum* و *R. solani* نشان‌دهنده حضور پروتئین‌های سمی و متابولیت‌های ثانوی در بافت‌های آنها به‌ویژه اسکلت است که در مقادیر کم می‌تواند منجر به مرگ‌ومیر شود.

دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و یک میلی‌لیتر آب مقطر به بخش ته‌نشین اضافه شد (مایع رونشین حذف شد). سپس با اضافه کردن محلول فنل ۵ درصد به نمونه‌ها، انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انجام گرفت. استاندارد گلیکوژن نیز در غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و در نهایت، استانداردها و نمونه‌ها در ۴۹۲ نانومتر خوانده شدند (Chun & Yin, 1998).

## تری‌گلیسرید

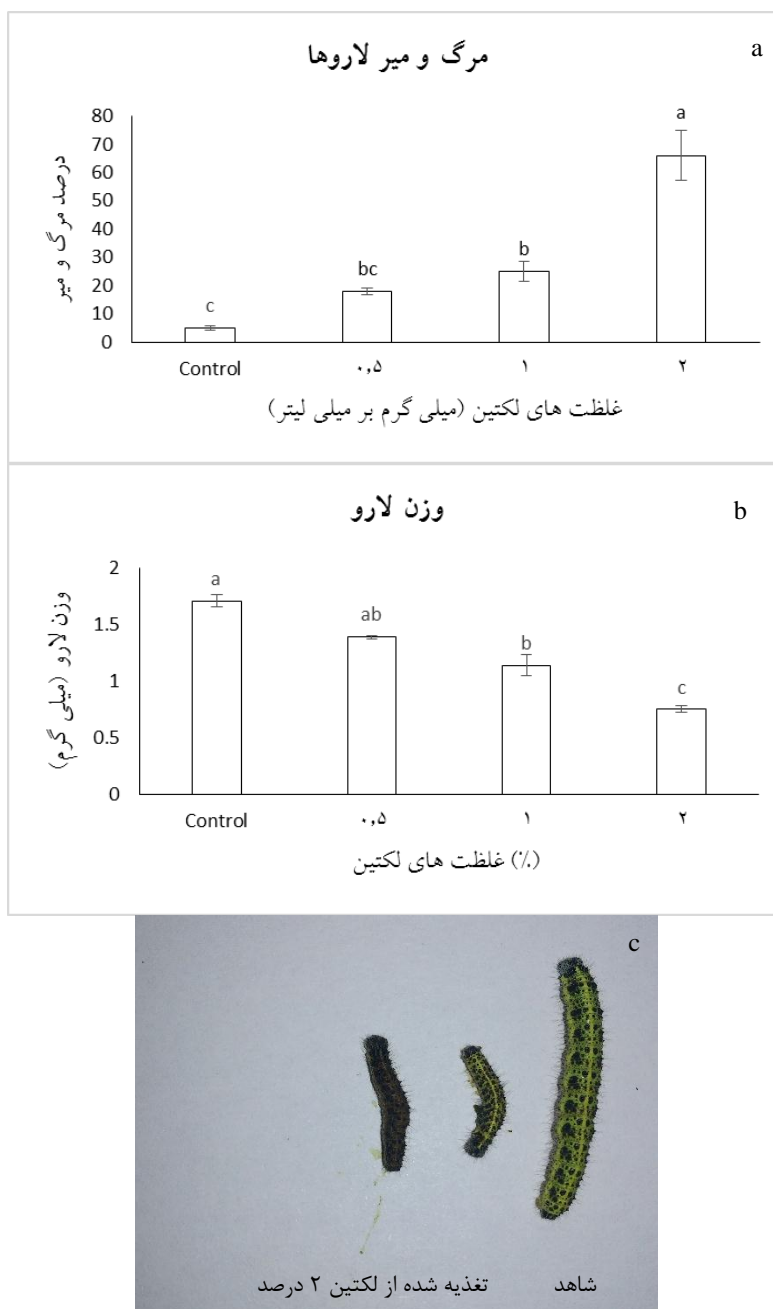
برای اندازه‌گیری تری‌گلیسرید از روش Fossati & Prencipe (1982) استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر معرف ۲۰ میکرولیتر محلول رونشین حاصل از سانتریفیوژ اجسام چربی برای شاهد و تیمارها و ۱۰۰ میکرولیتر معرف و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر به عنوان بلانک، جداگانه در پلیت الیزا ریخته شد و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. در نهایت، میزان تری‌گلیسرید در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد (کیت Biochem، تهران-ایران).

## پروتئین

اندازه‌گیری میزان پروتئین با استفاده از روش Lowry *et al.* (1951) انجام گرفت. بر اساس کیت شرکت زیست‌کم (ZiestChem Co., Tehran-Iran)، ۵۰ میکرولیتر معرف با ۱۰ میکرولیتر استاندارد (پروتئین سرم گاو به غلظت ۵۰ میلی‌گرم) و ۵۰ میکرولیتر معرف با ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه جداگانه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و جذب در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد. سپس جذب نمونه بر جذب استاندارد تقسیم گردید و در عدد ۵۰ به عنوان غلظت استاندارد ضرب شد (بر اساس دستورالعمل زیست‌کم). مقدار حاصل به عنوان میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. همه داده‌ها در ۳ تکرار به دست آمد و با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹ تجزیه و تحلیل گردید.



شکل ۱. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر مرگومیر (a)، وزن لارو (b) و شکل لاروهای *P. brassicae* (c). تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

درصد کاهش یافت و تفاوت معناداری را نشان داد ( $F=24/02$ ،  $Df=3, 4$ ،  $Pr>F=0/0051$ ). شاخص تبدیل غذای هضم‌شده نیز در شاهد  $78/31$  درصد بود که در تیمارها بین  $58 - 56$  درصد متغیر بود و کاهش معناداری را نشان می‌داد ( $F=45/81$ ،  $Df=3, 4$ ،  $Pr>F=0/0015$ ). شاخص هضم‌پذیری نسبی در شاهد با مقدار  $94$  درصد بیشترین مقدار را نشان داد و در غلظت‌های  $1$  و  $2$

تأثیر غلظت‌های مختلف لکتین *S. sclerotiorum* بر شاخص‌های تغذیه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سفیده کلم

شاخص‌های تغذیه لاروهای سفیده بزرگ کلم تغذیه‌شده روی غلظت‌های مختلف لکتین *S. sclerotiorum* در جدول ۱ نشان داده شده است. شاخص تبدیل غذای بلع‌شده در شاهد  $73/25$  درصد بود، اما در تیمارها به  $53$



درصد لکتین *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) نیز شاخص‌های تغذیه را کاهش داد. کاهش مقادیر شاخص‌های تغذیه لاروهای سفیده بزرگ کلم تیمار شده با لکتین قارچ *S. sclerotiorum* می‌تواند دلیلی بر مرگ‌ومیر و کاهش اندازه لاروها باشد؛ زیرا کاهش این شاخص‌ها منجر به کاهش رشد لاروها و طولانی‌تر ماندن غذا در دستگاه گوارش لاروها برای افزایش هضم‌پذیری است. از طرف دیگر، بیشتر بودن مقدار هضم‌پذیری نسبی نشان‌دهنده افزایش تقاضای حشره برای مواد مغذی و جبران نقصان تبدیل غذا است (de Oliveira et al., 2011). از طرف دیگر، کمتر بودن مقدار شاخص‌های تبدیل غذای بلع شده و هضم شده می‌تواند نشان‌دهنده سمیت مزمن و استفاده از انرژی حاصل از غذا برای سم‌زدایی لکتین وارد شده به بدن باشد (Coelho et al., 2007).

میلی گرم بر میلی لیتر لکتین به ترتیب ۷۵ و ۷۳ درصد بود (DF=۳، ۴،  $P>F=0/0005$ ،  $F=81/55$ ) اگرچه مقدار این شاخص در غلظت ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر کمترین بود (جدول ۱). میزان هزینه متابولیک در لاروهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف لکتین ۴۱-۴۳ درصد بود که در مقایسه با مقدار ۲۱ درصد شاهد، افزایش معناداری را نشان داد (جدول ۱،  $P>F=0/0015$ ،  $F=45/77$ ، DF=۳). تغذیه لاروهای سفیده بزرگ کلم روی غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت‌بند نتایج مشابه پژوهش حاضر را نشان داد (Zibae et al., 2014). تغذیه لاروهای شب‌پره *Corcyra cephalonica* Stainton و شب‌پره برنج، *Annona* (Lepidoptera: Pyralidae)، روی لکتین *coriacea* Martin (Annonaceae) منجر به کاهش معنادار شاخص‌های تغذیه آنها شد (Coelho et al., 2007). تغذیه لاروهای شب‌پره بید آرد روی غلظت ۱

جدول ۱. شاخص‌های تغذیه لاروهای *P. brassicae* روی غلظت‌های مختلف لکتین قارچ *S. sclerotiorum*

تیمار	ECI (%)	ECD (%)	AD (%)	MC (%)
شاهد	۷۳/۲۵±۱/۰۲a	۷۸/۳۱±۰/۷۶a	۹۴/۰۰±۰/۱۲a	۲۱/۶۸±۰/۷۶b
غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۵۳/۲۵±۱۳/۲۶b	۵۶/۷۵±۲/۳۰b	۸۴/۶۱±۰/۸۵b	۴۳/۲۵±۲/۳۰a
غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر	۵۳/۵۰±۰/۴۰b	۵۸/۲۵±۰/۶۰b	۷۵/۰۹±۰/۴۳c	۴۱/۷۴±۰/۶۰a
غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۵۳/۶۵±۰/۵۳b	۵۶/۹۲±۰/۴۳b	۷۳/۷۳±۱/۲۹c	۴۳/۰۷±۰/۴۳a

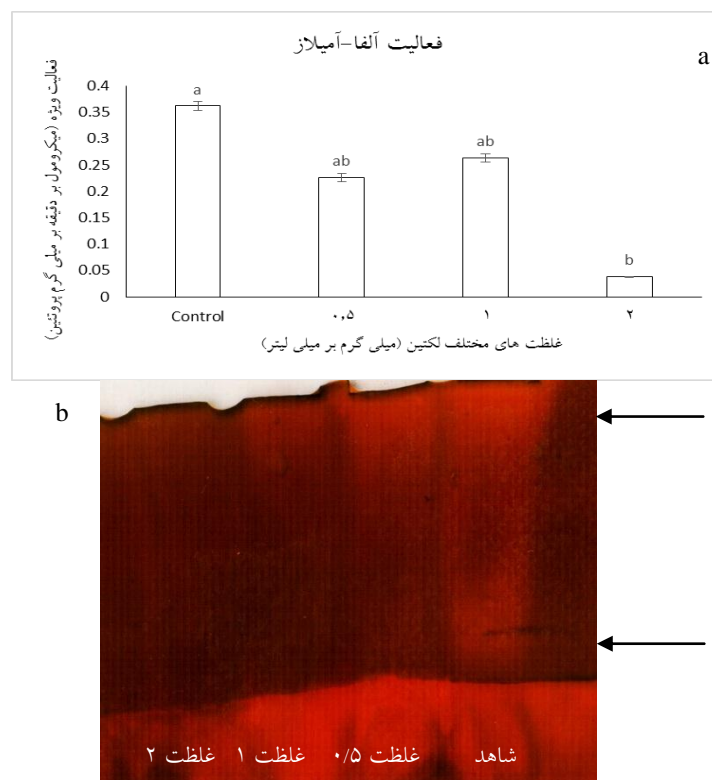
۱. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

بود (شکل ۳،  $F=8/47$ ،  $P>F=0/0072$ ،  $DF=3$ ، ۸). فعالیت لیپاز گوارشی لاروهای سفیده بزرگ کلم تیمار شده با غلظت‌های مختلف لکتین *S. sclerotiorum* کاهش معناداری نسبت به شاهد در بررسی‌های بیوشیمیایی و ژل الکتروفورز (با حذف باند و کاهش درخشندگی آن) نشان داد (شکل ۴). فعالیت پروتئاز کل لاروهای تغذیه شده روی غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر لکتین کاهش معناداری را نسبت به لاروهای شاهد نشان داد (شکل ۵،  $F=6/92$ ،  $P>F=0/013$ ،  $DF=3$ ، ۸). فعالیت پروتئازهای تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، آمینو- و کربوکسی پپتیداز نیز در لاروهای شاهد بیشتر از تیمار بود، اگرچه تفاوت معناداری از نظر فعالیت پروتئازهای تحت نظر بین لاروهای شاهد و غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده نشد (جدول ۲،  $F=8/81$ ،

تأثیر غلظت‌های مختلف لکتین *S. sclerotiorum* بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سفیده بزرگ کلم فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سفیده بزرگ کلم شاهد و تیمار تفاوت‌های معناداری را نشان داد. اگرچه تفاوت چندانی در فعالیت آلفا - آمیلاز لاروهای شاهد با لاروهای تغذیه شده روی غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر لکتین مشاهده نشد، کاهش فعالیت در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر مشهود بود (شکل ۲،  $F=12/78$ ،  $P>F=0/0002$ ،  $DF=3$ ، ۸). در ژل الکتروفورز نیز دو باند واضح در شاهد مشاهده شد که در دو غلظت اول یکی از باندها حذف شد و در غلظت سوم بند واضحی مشاهده نشد (شکل ۲). فعالیت آلفا- و بتا- گلوکوزیداز لاروهای شاهد و تیمار نیز تفاوت معناداری را با هم نشان دادند که فعالیت این دو آنزیم در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر لکتین کمتر

غیرزنده نشان‌دهنده این موضوع است (Ramzi & Sahragard, 2013; Zibae et al., 2015). دلیل دوم بر اساس پژوهش Hamshou et al. (2010a) است. شته نخود روی رژیم غذایی حاوی لکتین *S. sclerotiorum* فلورسنت‌دار شده تغذیه شد. مشخص شد که ناحیه میکروویلی سلول‌های معده محل اولیه اتصال لکتین مذکور است. سپس با اضافه کردن غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین این قارچ به محیط کشت سلول‌های معده شته مرگومیر سلولی و قطعه‌قطعه شدن DNA سلولی مشاهده شد. از آنجا که آنزیم‌های گوارشی توسط سلول‌های معده حشرات تحت سازوکار Secretagogue ترشح می‌شوند (Nation, 2008; Sorkhabi-Abdolmaleki & Zibae, 2013)، مرگومیر این سلول‌ها منجر به کاهش ترشح آنزیم‌های گوارشی و اختلال در هضم مواد غذایی می‌شود. در پژوهش دیگر مشخص شد که غلظت ۲ درصد لکتین هندوانه ابوجهل منجر به افزایش بیان ژن‌های کاسپاز مؤثر در مرگ سلولی لاروهای کرم گلوگاه انار می‌شود (Ramzi Jahroumi, 2014).

$Pr>F=0/0065$ ،  $Df=3$ ،  $F=7/53$ ؛  $Pr>F=0/0102$ ،  $Df=3$  و  $F=7/24$ ،  $Pr>F=0/0114$ ،  $Df=3$ ). تغذیه لاروهای سفیده بزرگ کرم روی غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت‌بند نیز منجر به کاهش معنادار فعالیت آنزیم‌های گوارشی یادشده نسبت به شاهد شد. در این میان، غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین علف هفت‌بند منجر به کاهش بیشتری نسبت به شاهد شد، اما فعالیت آنزیم آمینوپپتیداز تفاوت معناداری را بین لاروهای شاهد و تیمار نشان نداد (Zibae et al., 2014). تغذیه لاروهای کرم گلوگاه انار روی غلظت‌های مختلف لکتین علف هفت‌بند منجر به کاهش معنادار فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ارزیابی بیوشیمیایی و ژل الکتروفورز شد (Ramzi et al., 2013). کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در حشرات تغذیه‌شده روی لکتین‌ها می‌تواند به دو دلیل نسبت داده شود؛ اول اینکه، لکتین‌ها با اتصال به آنزیم یا سوبسترای آن از طریق مهار رقابتی یا نارقابتی به کاهش فعالیت آنزیم منجر می‌شوند که بررسی‌ها روی آلفا-آمیلاز تعدادی از حشرات تحت تأثیر لکتین‌های مختلف در شرایط



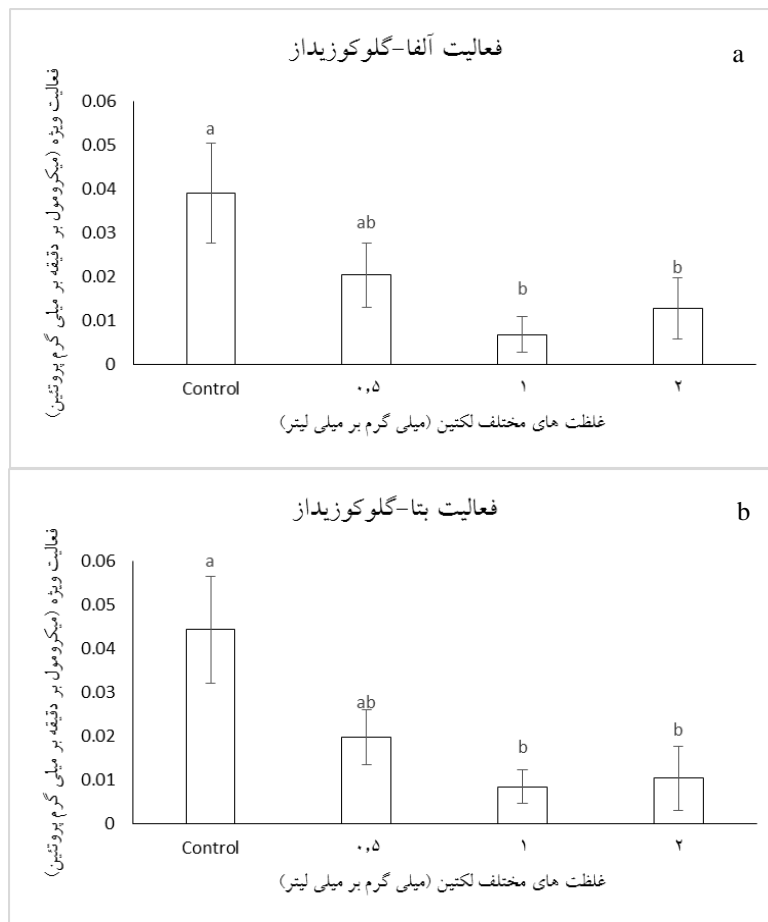
شکل ۲. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی لاروهای *P. brassicae* در آزمون بیوشیمیایی (a) و ژل الکتروفورز آکریل آمید (b). تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

جدول ۲. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر فعالیت پروتئازهای اختصاصی (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین)

*P. brassicae* لاروهای

تیما	تریپسین	کیموتریپسین	الاستاز	آمینوپپتیداز	کربوکسی پپتیداز
شاهد	۰/۰۷۱±۰/۰۰۷a	۰/۰۶۹±۰/۰۲۶	۰/۰۷۴±۰/۰۱۵a	۰/۰۷۹±۰/۰۱۶a	۰/۰۶۵±۰/۰۱۴a
غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۰۲۶±۰/۰۱۲b	۰/۰۶۸±۰/۰۲۸a	۰/۰۴۰±۰/۰۰۷ab	۰/۰۳۰±۰/۰۱۵ab	۰/۰۳۵±۰/۰۱۸ab
غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۰۲۳±۰/۰۱۱b	۰/۰۱۷±۰/۰۰۵b	۰/۰۲۵±۰/۰۱۰b	۰/۰۲۲±۰/۰۱۶ab	۰/۰۴۳±۰/۰۱۵ab
غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۰۲۰±۰/۰۱۱b	۰/۰۱۹±۰/۰۱۱b	۰/۰۱۰±۰/۰۰۵b	۰/۰۰۹±۰/۰۰۵b	۰/۰۱۲±۰/۰۰۶b

۱. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

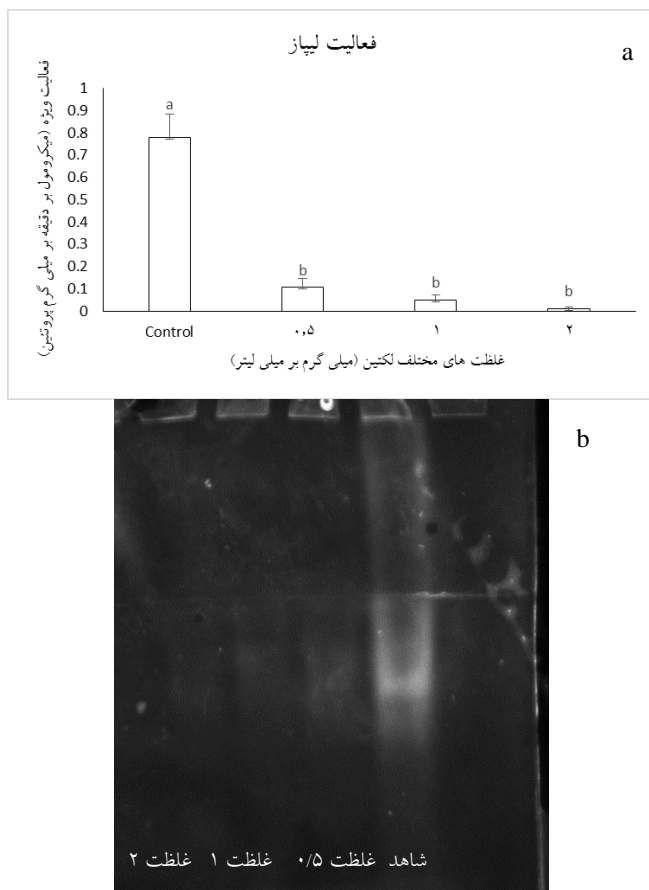


شکل ۳. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر فعالیت آلفا (a) و بتا- گلوکوزیداز (b) گوارشی لاروهای *P. brassicae*. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

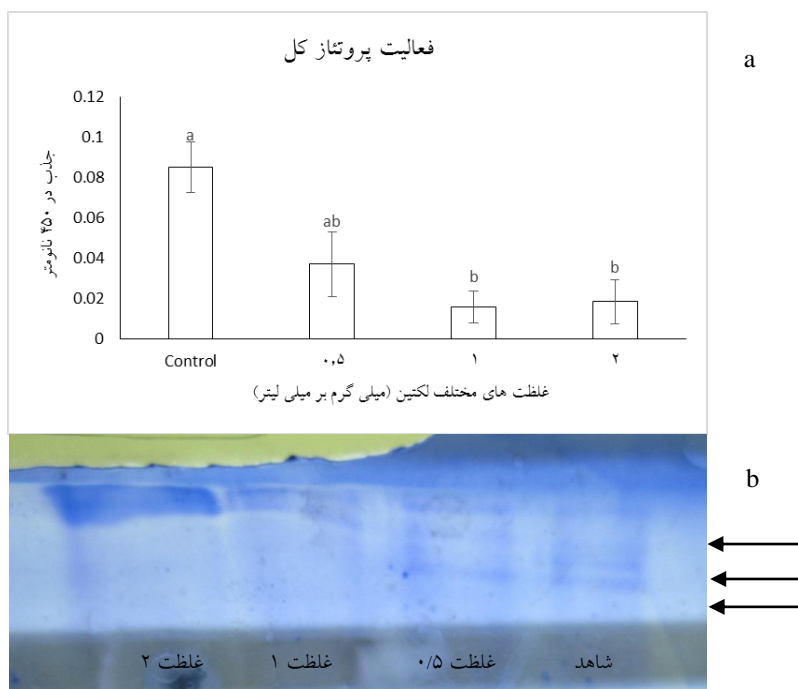
مختلف لکتین نشان داد، اما فعالیت آلانین آمینوترانسفراز کاهش یافت (شکل ۶،  $F=5/03$ ،  $Pt>F=0/0301$ ،  $Df=8.3$ ،  $F=9/94$ ،  $Pt>F=0/0045$ ،  $F=8/92$  و  $Df=8.3$ ، آلانین آمینوترانسفراز در فرآوری آلانین برای متابولیسم پرولین نقش دارد، اما اسپاراتات آمینوترانسفراز تبدیل اسپاراتات و آلفا-کتوگلاتارات را به اگزالات و گلاتامات طی چرخه کربس بر عهده دارد (Nation, 2008).

### تأثیر لکتین *S. sclerotiorum* بر متابولیسم حد واسط لاروهای سفیده بزرگ کلم

بررسی تغییرات متابولیسم حد واسط لاروهای سفیده بزرگ تغذیه شده روی غلظت‌های مختلف لکتین *S. sclerotiorum* با ارزیابی چندین عامل آنزیمی و غیرآنزیمی انجام گرفت. درباره آنزیم‌های آمینوترانسفراز، فعالیت اسپاراتات آمینوترانسفراز و گلاتامیل ترانسفراز افزایش معناداری در لاروهای تغذیه شده روی غلظت‌های



شکل ۴. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر فعالیت لیپاز گوارشی لاروهای *P. brassicae* در آزمون بیوشیمیایی (a) و ژل الکتروفورز اکریل آمید (b). تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

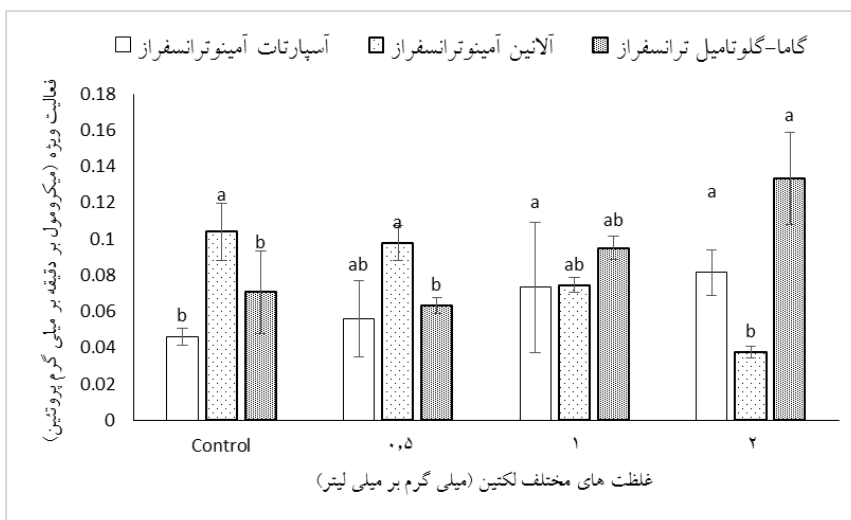


شکل ۵. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر فعالیت پروتئاز گوارشی لاروهای *P. brassicae* در آزمون بیوشیمیایی (a) و ژل الکتروفورز اکریل آمید (b). تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

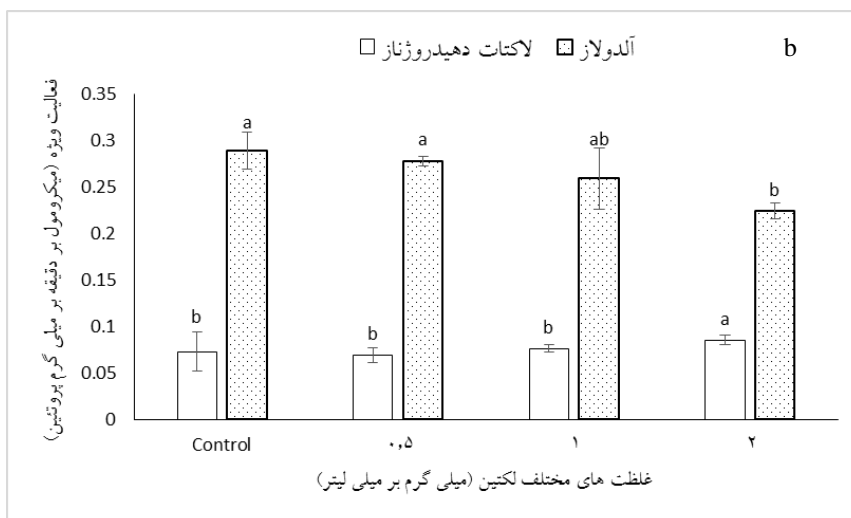
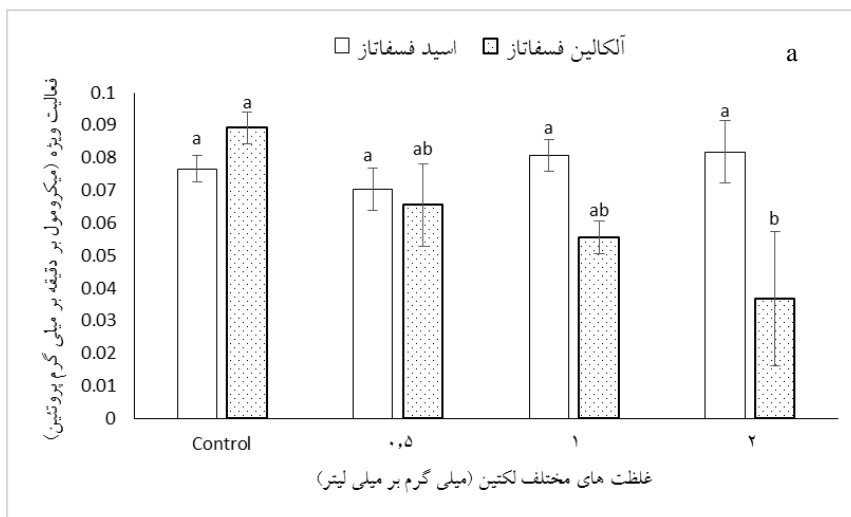
گاما- گلوتامیل ترانسفراز از طرفی در انتقال گلوکاتیبون به گیرنده‌های سلولی و ایجاد گلوکاتامات و از طرف دیگر در سم‌زدایی ترکیبات سمی وارد شده به بدن از طریق مزدوج کردن آنها با گلوکاتیبون نقش دارد (Tate & Meister, 1985). بنابراین کاهش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در لاروهای تیمار نشان‌دهنده عدم تأمین انرژی از طریق پرولین یا نیاز به اسیدهای آمینه در تخریب بافتی ایجاد شده توسط لکتین است. از طرف دیگر، افزایش فعالیت دو آمینوترانسفراز دیگر می‌تواند به افزایش تأمین انرژی از طریق چرخه کربس یا سم‌زدایی لکتین‌های وارد شده به هموسل مربوط باشد. اگرچه فعالیت اسیدفسفاتاز در لاروهای شاهد و تیمار تفاوت معناداری را نشان نداد ( $F=2/13$ ,  $Df=8,3$ ,  $Pr>F=1751$ )، با افزایش غلظت لکتین کاهش معناداری در فعالیت آلکالین فسفاتاز دیده شد (شکل ۷،  $F=8/8$ ,  $Pr>F=0/065$ ,  $Df=8,3$ ). فعالیت این دو آنزیم با کارایی هضم و جذب مواد غذایی در معده و انتقال آنها به اجسام چربی رابطه مستقیم دارد، زیرا آنها در هیدرولیز گروه‌های فسفات موادی همچون پروتئین‌ها، چربی‌ها، آلکالوئیدها و نوکلئوتیدها نقش مهمی دارند (Senthil-Nathan *et al.*, 2006). بنابراین کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز در لاروهای تیمار شده با کاهش شاخص‌های تغذیه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی مرتبط است؛ زیرا کاهش کارایی هضم منجر به کاهش گروه‌های مواد غذایی در دسترس برای فعالیت آلکالین فسفاتاز شده است. لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که در تبدیل پیرووات به لاکتات و همین‌طور NADH به  $NAD^+$  نقش دارد و می‌تواند شاخصی برای ایجاد تخریب بافتی در لاروهای تیمار باشد (Kaplan & Pesce, 1996). اگرچه فعالیت این آنزیم در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت داشت، افزایش معنادار این آنزیم در لاروهای تغذیه شده روی غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۷،  $F=7/69$ ,  $Pr>F=0/036$ ,  $Df=8,3$ ). آنزیم آلدولاز در شکستن قندهای مشخص برای تأمین انرژی نقش دارد و در مراحل اولیه چرخه گلیکولیز مؤثر است (Pinto *et al.*, 1994). در پژوهش حاضر فعالیت این آنزیم در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش معناداری را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۷،  $F=6/03$ ,

$Df=8,3$ ,  $Pr>F=0/0189$ ). به نظر می‌رسد که لکتین در این غلظت منجر به افزایش تقاضای انرژی در لاروها می‌شود و گلیکوژن پاسخ‌گوی این افزایش تقاضای انرژی نیست. در نتیجه، فرایند گلیکولیز کاهش می‌یابد و با اکسیداسیون چربی‌ها جایگزین می‌شود (Ramzi *et al.*, 2014). اگرچه این تحلیل قطعی نیست، با ارزیابی میزان هورمون آدیپوکائنتیک که در این فرایند مؤثر است، می‌تواند مفید باشد. میزان لیپوپروتئین با تراکم زیاد و لیپوپروتئین با تراکم کم در لاروهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف لکتین به ترتیب کاهش و افزایش معناداری را نسبت به شاهد نشان می‌دهند (شکل ۸،  $F=45/22$ ,  $Df=8,3$ ,  $Pr>F=0/0001$  و  $F=6/19$ ,  $Df=8,3$ ,  $Pr>F=0/0176$ ). این دو مولکول در انتقال منو- و دی‌آسل گلیسرول‌ها از معده به اجسام چربی (لیپوپروتئین با تراکم زیاد) و از اجسام چربی به بافت هدف (لیپوپروتئین با تراکم کم) نقش دارند (Nation, 2008). کاهش میزان لیپوپروتئین با تراکم زیاد با کاهش فعالیت لیپاز گوارشی و آلکالین فسفاتاز مرتبط است که نشان‌دهنده کاهش چربی در دسترس برای انتقال به اجسام چربی است. از طرف دیگر، افزایش میزان لیپوپروتئین با تراکم کم هم نشان‌دهنده تقاضای زیاد چربی برای تأمین انرژی مرتبط است که با نتایج فعالیت آنزیم آلدولاز قابل توجیه است.

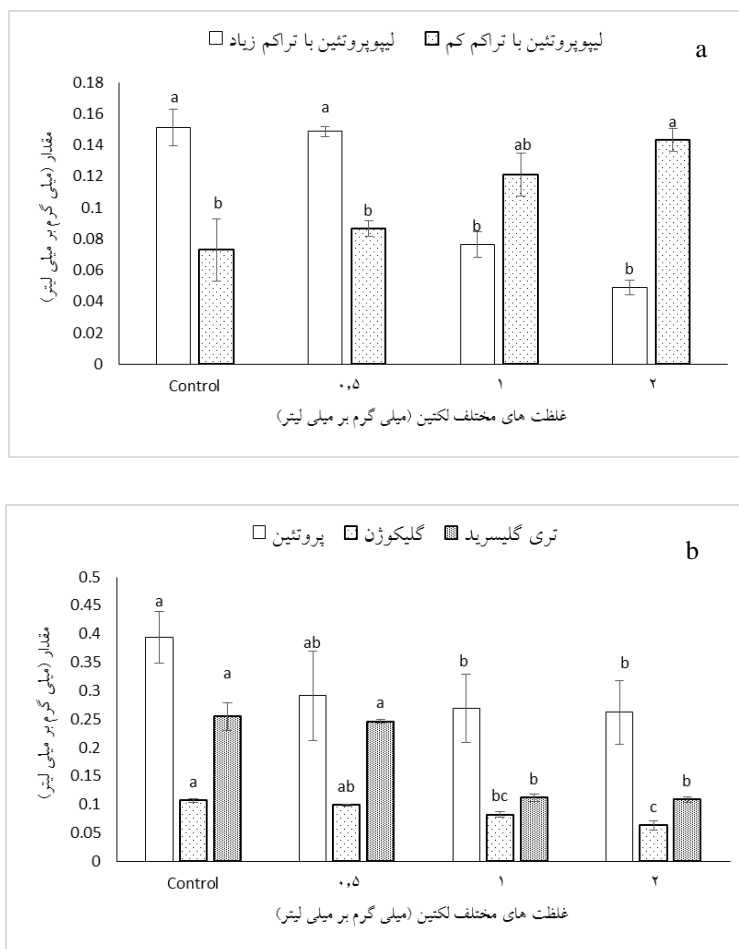
ذخایر غذایی شامل پروتئین، تری‌گلیسرید و گلیکوژن در لاروهای شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف لکتین اندازه‌گیری شد (شکل ۸). نتیجه نشان‌دهنده کاهش معنادار هر سه مولکول در لاروهای تیمار شده بود که در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین کاهش را نشان داد (شکل ۸،  $F=5/57$ ,  $Pr>F=0/0016$ ,  $F=13/66$ ;  $Df=3,8$ ,  $Pr>F=0/0233$  و  $Df=3,8$ ,  $Pr>F=0/0001$ ,  $F=38/37$ ). این نتایج نشان‌دهنده اختلال در فیزیولوژی گوارش و متابولیسم حد واسط لاروهای تیمار شده با غلظت‌های مختلف لکتین است. در واقع کاهش جذب مواد غذایی از یک طرف منجر به استفاده لارو از ذخایر غذایی شده و از طرف دیگر تأثیر منفی لکتین بر بافت‌ها و تأمین انرژی منجر به استفاده مجدد از این ذخایر شده است.



شکل ۶. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر فعالیت آمینوترانسفرازهای لاروهای *P. brassicae*. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).



شکل ۷. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر فعالیت فسفاتازها (a)، لاکتات دهیدروژناز و آلدولاز (b) لاروهای *P. brassicae*. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).



شکل ۸. تأثیر لکتین قارچ *S. sclerotiorum* بر میزان لیپوپروتئین‌ها (a) و درشت مولکول‌های ذخیره‌ای (b) لاروهای *P. brassicae*. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف نشان داده شده‌اند (آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد).

ژنتیک در مقدار کم (کمتر از ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در بافت‌های گیاهی بیان می‌شود، می‌تواند یکی از روش‌های ایمن در کنترل آفت کشاورزی باشد. این مولکول‌ها ضمن بی‌تأثیر بودن (تأثیر ناچیز) روی دشمنان طبیعی (Wakefield et al., 2006) یکی از کاندیداهای تأمین ارقام مقاوم گیاهی می‌توانند باشند.

### سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برای حمایت مالی در قالب طرح ۹۰۰۰۸۰۰۲ سپاسگزاری می‌شود.

### نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که لکتین استخراج شده از قارچ *S. sclerotiorum* ضمن ایجاد مرگ‌ومیر بر لاروهای سفیده بزرگ کلم منجر به کاهش زیست‌توده لاروی، کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تغییر در متابولیسم حد واسط می‌شود. در واقع این مولکول با تغییر در فیزیولوژی لاروها منجر به اعمال اثرات منفی خود می‌شود. امروزه استفاده از ترکیبات شیمیایی ضمن داشتن بقایا در محصولات کشاورزی منجر به آلودگی محیط زیست و تأثیر روی موجودات غیرهدف می‌شود. استفاده از مولکول‌های طبیعی همچون لکتین‌ها که توسط مهندسی

### REFERENCES

1. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. (5<sup>th</sup> ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press. 546-550.
2. Alborzi, Z. & Zibae, A. (2014). Purification of *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin via affinity chromatography. *Austin Chromatography* (IN PRESS).
3. Bernfeld, P. (1955). Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*, 1, 149-158.

4. Bessey, O.A., Lowry, O.H. & Brock, M.J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, 164, 321-329.
5. Candy, L., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Menu-Bouaouiche, L., Erard, M. & Rougé, P. (2003). Structural and functional characterization of the GalNAc/Galspecific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, 308, 396-402.
6. Chang, H. H. & Kozub, G. C. (1994). Germination of immature and mature sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 84, 246-250.
7. Chen, C. M. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15, 101-114.
8. Chun, Y. & Yin, Z.D. (1998). Glycogen assay for diagnosis of female genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1081-1082.
9. Coelho M.B., Marangoni S. & Macedo M.L.R. (2007). Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 146, 406-414.
10. de Oliveira C.F.T., Luz L.A., Paiv P.M.G., Coelho L.C.B.B., Marangoni S. & Macedo M.L.R. (2011). Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry*, 46, 498-504.
11. Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Gromenko, V.A., Rudenskaya, Y.A., Dunaevsky, Y.E. & Zhuzhikov, D.P. (2001). Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 48, 206-216.
12. Ferreira, C. & Terra, W.R. (1983). Physical and kinetic properties of a plasma-membrane-bound P-Dglucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana* larva). *Biochemistry Journal*, 213, 43-51.
13. Fossati, P. & Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry*, 28, 2077-2080.
14. Hamshou, M., Smagghe, G. & Van Damme, E.J.M. (2010b). Entomotoxic effects of fungal lectin from *Rhizoctonia solani* towards *Spodoptera littoralis*. *Fungal Biology*, 114, 34-40.
15. Hamshou, M., Smagghe, G., Shahidi-Noghabi, S., De Geyter, E., Lannoo, N. & van Damme, E. J. M. (2010a). Insecticidal properties of *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin and its interaction with insect tissues and cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 883-890.
16. Johnson, N. F. & Triplehorn, C. A. (2004). *Borror and DeLong's introduction to the study of insects*. 7th ed. Belmont, CA: Thomson/Brooks Cole publisher. 866 pp.
17. Kaplan, L.A. & Pesce, A.J. (1996). *Clinical Chemistry - Theory Analysis and Correlation*. Mosby-Year Book, MO.
18. Khanjani, M. (2005). Vegetable pests in Iran. Bu'Ali Sina university press. Pages 281-285.
19. King, J. (1965). *The dehydrogenases or oxidoreductases*. Lactate dehydrogenase. In: Van Nostrand, D. (Ed.), *Practical Clinical Enzymology*. Elsevier, London, pp. 83-93.
20. Komathe, S. S., Kavitha, M., & Swamy, M. J. (2006). Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4, 973-988.
21. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
22. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
23. Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R. & Coelho, L.C.B.B. (2007). Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 146, 486-498.
24. Oppert, B., Kramer, K.J. & McGaughey, W.H. (1997). Rapid microplate assay of proteinase mixtures. *Biotechniques*, 23, 70-72.
25. Pinto, P.V.A., Kaplan, A. & Dreal, P.A. (1969). Aldolase: I. Colorimetric determination. *Clinical Chemistry*, 15, 349-360.
26. Ramzi Jahroumi, S. (2014). Effect of *Citrullus colocynthis* L. agglutinin on demographic and physiological characteristics of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) and gene expression of caspase. Ph. D dissertation in Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan. Pages 95-98.
27. Ramzi S., Sahragard A., Sendi J.J. & Aalami, A. (2013). Effects of an extracted lectin from *Citrullus colocynthis* L. (Cucurbitaceae) on survival, digestion and energy reserves of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Frontiers in Physiology*, 12 (4), 328. DOI: 10.3389/fphys. 2013.00328.



28. Ramzi, A., Sahragard, A. & Zibae, A. (2014) Effects of *Citrullus colocynthis* agglutinin on intermediary metabolism of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, 273-279.
29. Ramzi, S. & Sahragard, A. (2013). A lectin extracted from *Citrullus colocynthis* L. (Cucurbitaceae) inhibits digestive  $\alpha$ -amylase of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Entomological and Acarological Research*, 45, 110-116.
30. Schaefer, E.J. & McNamara, J. (1997). *Overview of the diagnosis and treatment of lipid disorders*. In: Rifia, N., Warnick, G.R., Dominiczak, M.H. (Eds.), *Handbook of lipoprotein testing*. AACC Press, Washington, pp. 25-48.
31. Scriber, J. M. & Slansky, Jr F. (1982). The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review of Entomology*, 26, 183-211.
32. Senthil Nathan, S., Chunga, P.G. & Muruganb, K. (2006). Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (the rice leaffolder) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 382-389.
33. Sorkhabi-Abdolmaleki, S. & Zibae, A. (2013). Secretagogue Mechanism of Digestive Enzyme Secretion in the Midgut of *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). *Proceedings of National Academy of Science India, Section B: Biological Sciences*, 82, 373-379.
34. Sulzenbacher, G., Roig-Zambonia, V., Peumans, W.J., Rougé, P., Van Damme, E.J.M. & Bourne, Y. (2010). Crystal structure of the GalNAc/Gal-specific agglutinin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* reveals novel adaptation of a b-trefoil domain. *Journal of Molecular Biology*, 400, 715-723.
35. Szasz, G. (1976). Reaction-rate method for gamma-glutamyltransferase activity in serum. *Clinical Chemistry*, 22, 2051-2055.
36. Tate, S.S. & Meister, A. (1985). Gamma-glutamyl transpeptidase from kidney. *Methods in Enzymology*, 113, 400-419.
37. Thomas, L. (1998). *Clinical Laboratory Diagnostic*, first ed. TH Books Verlagsesellschaft, Frankfurt. 89-94.
38. Tsujita, T., Ninomiya, H. & Okuda, H. (1989). p-Nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 30, 997-1004.
39. Wakefield, M., Fitches, E. C., Bell, H. A. & Gatehouse, A. M. R. (2010). The snowdrop lectin *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) and a fusion protein ButaIT/GNA have a differential affect on a pest noctuid *Lacanobia oleracea* and the ectoparasitoid *Eulophus pennicornis*. *Physiological Entomology*, 35, 334-342.
40. Zibae, A. (2012). Digestive enzymes of large cabbage white butterfly, *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) from developmental and site of activity perspectives. *Italian Journal of Zoology*, 79, 13-26.
41. Zibae, A., Alborzi, Z., Karimi-Malati, A. & Salimi, M. (2014). Effects of a lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Journal of Plant Protection Research* 54, 250-257.
42. Zibae, A., Karimi-Malati, A. & Janghorbani, A. (2015). In Vitro Interaction of Digestive  $\alpha$ -Amylase from *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) with a Lectin Extracted from *Polygonum persicariae* (Polygonaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. DOI 10.1007/s40011-014-0337-4.