

## آمیلاز و گلوکوزیدازهای گوارشی در لارو سوسک برگخوار نارون، *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomelidae)

محمد وطن پرست<sup>۱</sup>، وحید حسینی نوه<sup>۲\*</sup> و سیده مینو سجادیان<sup>۳</sup>  
۱، ۲، ۳، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و  
منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲)

### چکیده

سوسک برگخوار نارون در مرحله حشره کامل و به ویژه دوره لاروی از آفات مهم نارون می باشد. بدین منظور وجود سه کربوهیدراز مهم درگیر در فعالیت های گوارشی شامل آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی لارو این حشره بررسی شد. بیشترین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز، بتا-گلوکوزیداز و آلفا-آمیلاز به ترتیب در pH های ۵، ۶ و ۶ بدست آمد. در بررسی پایداری آنزیم ها، آلفا-آمیلاز در گستره pH های ۴ تا ۸ بیشترین پایداری را نسبت به pH های خیلی اسیدی و یا خیلی قلیایی داشت. بیشینه پایداری آنزیم های آلفا و بتا-گلوکوزیداز از pH ۴ تا ۶ بدست آمد. دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا و بتا-گلوکوزیداز به ترتیب در ۴۰، ۶۰ و ۴۵ درجه سلسیوس مشخص شد. یون های کلسیم و منیزیم موجب کاهش فعالیت آنزیم های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز شد. پتاسیم سدیم اثر معنی داری روی فعالیت این دو آنزیم نداشت. کلسیم موجب افزایش فعالیت آلفا-آمیلاز گردید و پتاسیم، منیزیم و سدیم تاثیر چندانی روی فعالیت این آنزیم نداشت. بررسی های زایموگرام وجود یک شکل فعال برای هر کدام از آنزیم های آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز را نشان داد.

**واژه های کلیدی:** *Xanthogaleruca luteola*، گوارش، کربوهیدراز، آلفا-آمیلاز، آلفا

گلوکوزیداز، بتا گلوکوزیداز.

### مقدمه

لاروهای سنین بالاتر است که از کل پارانثیم برگ به جز رگبرگ ها تغذیه می کنند. که نهایتا موجب اسکروتیزه شدن و ریزش برگ ها می شود. کاهش سطح سایه اندازی در ماه های تابستان خسارت اقتصادی اصلی از سوی این آفت به حساب می آید (Lystrup et al. 1999). امروزه برای کنترل بیشتر آفات از حشره کش های شیمیایی استفاده می شود (Casey Sclar, 1994). استفاده از حشره کش ها در مبارزه با آفات به یک شیوه کنترل رایج تبدیل شده حال آنکه اثرات جانبی ناشی از سموم روی انسانها، حیوانات، محیط زیست، بحث مقاومت آفات به سموم و اثرات باقی مانده سموم در

سوسک برگخوار نارون در مرحله حشره کامل و بویژه دوره لاروی از آفات جدی و مهم روی درختان نارون می باشد و با توری کردن برگ این درختان نه تنها موجب کاهش سطح فتو سنتز می شود بلکه سطح سایه اندازی را به شدت پایین می آورد. ادامه ی فعالیت شدید این آفت راه را برای آفات و بیماری های دیگر و سایر عوامل استرس زا هموار می کند (Huerta et al. 2010). خسارت حشره کامل به صورت ایجاد نواحی توری مانند و در نهایت سوراخ های کوچکی در برگ می باشد. خسارت اصلی مربوط به مراحل لاروی و خصوصا

روده میانی و غدد بزاقی گزارش شده است (Baker *et al.* 1991; Ghadamyari *et al.* 2010; Ramzi & Hosseininaveh 2010). بتا-گلوکوزیدازها هم در تجزیه دی و الیگو ساکاریدهای حاصل از کربوهیدراتها، همی سلولز و سلولز و همچنین در برهم کنشهای بین گیاه-حشره نقش دارند (Terra & Ferreira 1994). به طور کلی پژوهشهای زیادی در مورد گلوکوزیدازهای گوارشی در حشرات انجام شده است. از آن جمله می توان در راسته‌ی بالپولکداران به *Thaumetopoea pityocampa* اشاره نمود (Pratviel-Sosa *et al.* 1986). هدف از این مطالعه بررسی برخی از ویژگی‌های سه کربوهیدراز مهم در روده میانی مرحله لاروی سوسک برگخوار نارون *X. luteola* می‌باشد. درختان نارون در فضای سبز شهری داری اهمیت بسیار هستند و سوسک برگخوار نارون یکی از مهمترین آفات درختان نارون به شمار می‌رود. امید است یافته‌های این پژوهش در جهت رسیدن به استراتژیهای نوین کنترل آفت مفید واقع گردد.

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری لارو سوسک برگخوار نارون

بدین منظور همزمان با شروع فعالیت‌های این حشره در اوایل تیر ماه، لاروهای سنین بالا در اواسط تیر ماه، از روی درختان نارون موجود در محیط پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران جمع آوری شد و سپس به آزمایشگاه منتقل گردید.

### تشریح و جداسازی روده میانی

لاروهای سنین آخر درون آب مقطر سرد با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند، به کمک پنس بدن را نگه داشته و برای جدا کردن روده میانی از سیستم گوارشی توسط پنس دیگر قسمت انتهایی بدن را از هم باز کرده که در این حالت لوله گوارش بطور کامل آشکار می‌شود. روده میانی از لوله گوارش جدا شد. بافت‌های جدا شده در داخل میکروتیوب‌های حاوی نیم میلی لیتر آب مقطر سرد قرار داده شدند.

### تهیه عصاره آنزیمی

نمونه‌های بدست آمده از مراحل قبل بوسیله ی یک هموژنایزر دستی شیشه‌ای هموژن گشته، هموژنیت حاصل در شرایط  $g \times 15000$  سانتریفوژ شد و در نهایت

غذاها از آثار مخرب آفت کش هاست (Rodriguez *et al.* 2003; Regnault-Roger *et al.* 2004) کاربرد آنها در محیط‌های شهری با قبول ریسک‌های زیادی امکان پذیر است چرا که بسیاری از این سموم انتخابی نیستند و می‌توانند خطرناک ظاهر شوند (Breuer & De Loof, 2000). اصلاح محصولات مهم بوسیله پروتئین‌های حشره کش یکی از روش‌های جدید کنترل آفات می‌باشد که بدین منظور ژن‌های مربوط به مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی به گیاه منتقل می‌شود. اولین مرحله در تولید گیاه تراریخته‌ی دارای پروتئین‌های مهارکننده آنزیم‌های گوارشی، بررسی بیوشیمیایی این آنزیم‌ها در روده میانی حشرات آفت می‌باشد (Oppert, 2000; Oppert *et al.* 2000). آلفا-آمیلاز ( $\alpha$ -1,4-glucanohydrolases EC.3.2.1.1) یک آنزیم هیدرولیز کننده است که به طور کلی در طبیعت وجود دارد و در میکرو ارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران وجود دارد. این آنزیم عمل هیدرولیز پیوندهای آلفا-۱،۴-گلوکان را در ترکیباتی همچون نشاسته، گلیکوژن و دیگر کربوهیدراتها کاتالیز می‌کند (Franco *et al.* 2000; Strobl *et al.* 1998). وجود این آنزیم در سیستم گوارشی در موارد زیادی مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به راسته‌های راست‌بالان، دوبرالان، بال‌غشاییان، بالپولکداران و سخت‌بالپوشان اشاره نمود (Terra and Ferreira, 1994). بررسی آلفا-آمیلاز در سخت‌بال‌پوشان آفت حتی تا بررسی جزئیات و ساختمان آن صورت گرفته است (Grossi de Sa & Chrispeels 1997; Strobl *et al.*, 1998). در سطوح مولکولی نیز خصوصیات آنزیمی آلفا-آمیلاز در عصاره آنزیمی استخراجی از برخی سوسک‌ها مطالعه شده است (Applebaum & Konjin, 1965). و در برخی موارد گزارشاتی از خالص سازی این آنزیم نیز وجود دارد (Lemos *et al.*, 1990; Terra & Ferreira, 1994). در بحث مهار کننده‌های این آنزیم نیز یکسری پژوهش‌هایی جهت شناسایی ویژگی‌های آنها صورت پذیرفته است (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000; Valencia-Jimenez *et al.* 2000; Silva *et al.* 2001). آلفا-گلوکوزیداز عمل هیدرولیز پیوندهای  $1,4-\alpha$ -glucosidic را کاتالیز می‌کند. وجود این آنزیم در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش حشرات از جمله

هیدروکسید سدیم افزوده شد. تمامی آزمون ها در ۳ تکرار انجام شد.

#### اندازه گیری pH بهینه ی فعالیت

برای این منظور از بافر ۰/۱ مولار یونیورسال بورات-سیترات-فسفات استفاده شد. مقدار pH بهینه فعالیت آنزیم مطابق روش قسمت تعیین فعالیت آمیلولیتیک و تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در گستره pH های ۲ تا ۱۱ اندازه گیری شد.

#### اندازه گیری دمای بهینه فعالیت آنزیم ها

برای بررسی اثر دما بر فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز، آزمایشها مطابق روشهای ارایه شده در قسمت‌های «تعیین فعالیت آمیلولیتیک» و «تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز»، در دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سلسیوس) انجام شد.

#### بررسی اثرات یون های مختلف بر فعالیت آنزیم ها

اثرات یون های  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{MgCl}_2$ ،  $\text{KCl}$ ،  $\text{NaCl}$  و درغلظت های ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی مولار بر فعالیت آنزیم‌ها در بافر با pH بهینه فعالیت که از آزمایش تعیین pH بهینه بدست آمده بود، بررسی گردید. بدین منظور پس از تهیه غلظت های مختلف از یون های مذکور، میزان ۵ میکرولیتر از این یونها به مخلوط واکنش افزوده شد. برای کلیه یون ها نیز یک شاهد در ۳ تکرار انتخاب شد که به جای یون، دارای آب مقطر بود. اثرات یونها و ترکیبات با مقایسه با شاهد بررسی گردیدند.

#### بررسی میزان پایداری آنزیم

پایداری آنزیمها در گستره pH های ۳ تا ۱۱ در دو دوره زمانی مختلف انجام گرفت. ابتدا آنزیم و بافرهای با pH های مختلف را با هم مخلوط نموده و سپس به میزان ۱ و ۱۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه می‌گردند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، سوسترهای مربوطه به مخلوط واکنش اضافه می‌گردد و ادامه آزمایش با توجه به قسمت تعیین فعالیت آمیلولیتیک و تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز انجام می‌گیرد.

#### الکتروفورز و زایموگرام

یکی دیگر از آزمایشها، تعیین وجود فعالیت آنزیم های آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

سوپرناتانت حاصل به عنوان عصاره ی آنزیمی جدا شد و برای آزمون های بعدی در دمای ۲۰ - درجه سلسیوس نگهداری شد.

#### تعیین فعالیت آمیلولیتیکی در روده میانی

جهت تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز از روش بیکر با اندکی تغییرات استفاده شد (Baker, 1991). بدین منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به همراه ۲۰ میکرولیتر سوسترای ۱ درصد نشاسته (Starch-MERCK) در میکروتیوب حاوی ۸۰ میکرولیتر بافر ۰/۱ مولار ریخته می‌شود. مخلوط آزمایش در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه می‌گردد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر معرف رنگی دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) به مخلوط واکنش افزوده می‌شود. نهایتاً میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده می‌شود. جذب نمونه ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر مدل (Elx 808) اندازه گیری می‌شود. نمونه های کنترل همزمان با تیمارها انجام می‌شود با این تفاوت که آنزیم را در نمونه های بلانک بعد از افزودن DNS اضافه می‌گردد. تمامی آزمون ها در ۳ تکرار انجام شد.

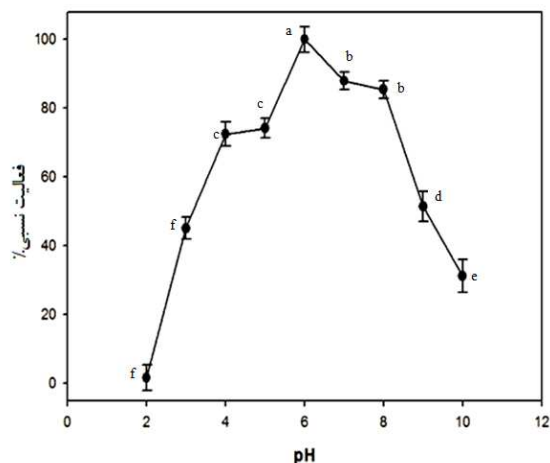
#### تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز بر اساس روش (Siegentaler 1977) و Low (1986) *et al.* با اندکی تغییر در آن روش ها انجام شد. بنابراین مقدار هیدرولیز سوسترهای حاوی پارانیتروفنل،  $(\text{pN}\alpha\text{G})$  برای آلفا-گلوکوزیداز و  $(\text{pN}\beta\text{G})$  برای اندازه گیری فعالیت بتاگلوکوزیداز به دست آمد.

واکنش با ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۸۵ میکرولیتر بافر و ۵ میکرولیتر سوسترای اختصاصی ۵ میلی مولار در مدت زمان ۲۰ دقیقه انجام شد، سپس واکنش با افزودن هیدروکسید سدیم یک مولار متوقف گردید و جذب توسط دستگاه میکروپلیت ریدر مدل (Elx808) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. در نمونه های بلانک آنزیم بعد از اضافه کردن

1. 4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside  
2. 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside

است و بیشینه فعالیت آن در pHهای ۴ تا ۸ می باشد (شکل ۲).



شکل ۱- تغییرات میانگین فعالیت نسبی آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی ( $\pm$ SE) سوسک برگخوار نارون در گستره pHهای ۲ تا ۱۰. میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی داری ندارند ( $p < 0.05$ )

این نتایج نشان می دهد که بیشترین فعالیت آنزیم در محیط اسیدی و بعد از آن خنثی و در نهایت در محیط های کمی قلیایی است و نسبت به محیط های خیلی اسیدی و یا خیلی بازی میزان فعالیت بسیار بالاتر است. داده های ما در این زمینه با خیلی از مطالعات صورت گرفته در سایر سوسک ها و دیگر حشرات شباهت دارد. به عنوان مثال pH بهینه آمیلاز در *Hypothenemus hampei* (Col.: Scolytidae) ۵ گزارش شده است (Valencia-Jimenez et al. 2000). همچنین pH بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز در *Morimus funereus* (Col.: Cerambycidae) ۵/۲ گزارش شده است. (Biljana Dojnov et al., 2008) مطالعاتی که روی آلفا-آمیلاز روده میانی *Callosobruchus chinensis* (Col.: Curculionidae) (Podoler & Applebaum, 1971) انجام شد pH بهینه فعالیت ۵/۲ بدست آمد. همچنین pH بهینه فعالیت آمیلاز در *Tribolium castaneum* (Col.: Tenebrionidae) در ۵/۴ بدست آمد (Applebaum & Konijn, 1965). مقدار pH مناسب آلفا-آمیلاز در برخی حشرات همانند *Trogoderma granarium* در گستره ۶ تا ۹ و تا حدودی قلیایی بدست آمد (Hosseiniaveh et al. 2007). در بررسی

در روده میانی لارو سوسک برگخوار نارون با استفاده از الکتروفورز است. بدین منظور از الکتروفورز غیراحیایی (PAGE) استفاده شد. شانزده میکرولیتر از نمونه آنزیمی در ۴ میکرولیتر بافر نمونه (متشکل از: ۶۲/۵ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک با pH ۶/۸، گلیسرول ۱۰ درصد و بروموفنول بلو ۰/۰۱ درصد) حل گردید. نمونه حاصل در چاهک های ژل متراکم کننده (۵ درصد) قرار داده شد. پس از برقراری جریان ۸۵ ولت، عصاره آنزیمی در طول ژل جداکننده جهت جداسازی، به حرکت در آمد. تا این مرحله تمامی روش ها برای هر زایموگرامهای آمیلاز و گلوکوزیداز یکسان می باشد. پس از جدا سازی ژل از شیشه ها، ژلهای جداکننده به صورت جداگانه در سوبسترهای مربوطه؛ آلفا آمیلاز در نشاسته ۱ درصد، آلفا-گلوکوزیداز در ۴-متیل-آمبلیفریل-آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید ۳ میلی مولار و بتا-گلوکوزیداز در ۴-متیل-آمبلیفریل-بتا-دی-گلوکوپیرانوزید ۳ میلی مولار قرار داده شدند.

در مورد آلفا آمیلاز ژل مربوطه پس از گذشت ۳۰ دقیقه از غوطه ور شدن و تکان دادن ملایم همزمان آن، در محلول لوگول متشکل از ید ۱۰ میلی مولار و دیور پتاسیم ۱۴ میلی مولار قرار داده می شود تا باند های مربوطه به صورت نواحی روشن در زمینه تیره ظاهر شوند. جهت جلوگیری از ظاهر شدن باندهای مربوط به فسفریلاز سوبسترای نشاسته حاوی کلسیم کلرید ۱۲ میلی مولار است. در مورد گلوکوزیدازها پس از گذشت ۲۰ دقیقه پس از انکوباسیون ژل درون سوبسترهای مربوطه، ژل های مذکور زیر لامپ UV بررسی می گردند و به محض آشکار شدن باندها از آنها عکس تهیه می گردد.

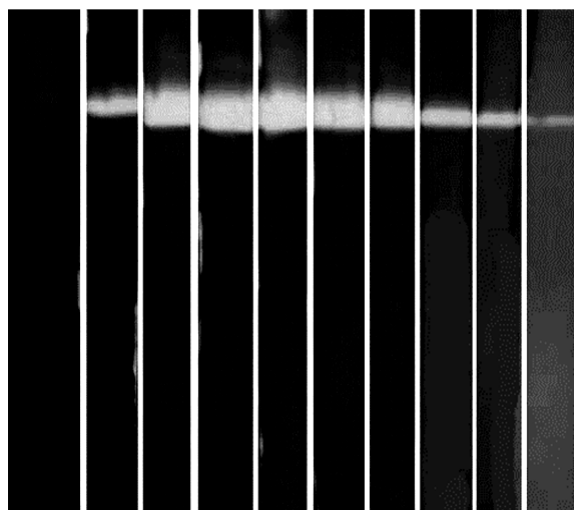
## نتایج و بحث

نتایج مشخص ساخت که آلفا-آمیلاز در گستره پهنای از pH (۳ تا ۱۰) فعالیت می کند. بیشینه فعالیت آلفا-آمیلاز در pHهای ۴ تا ۸ بدست آمد که pH بهینه فعالیت آمیلاز در pH برابر با ۶ مشخص گردید (شکل ۱). نتایج بدست آمده از زایموگرام آمیلاز که وجود یک باند با فعالیت آمیلازی را نشان می دهد نیز مشخص می کند که آنزیم از pH ۳ تا ۱۱ دارای فعالیت

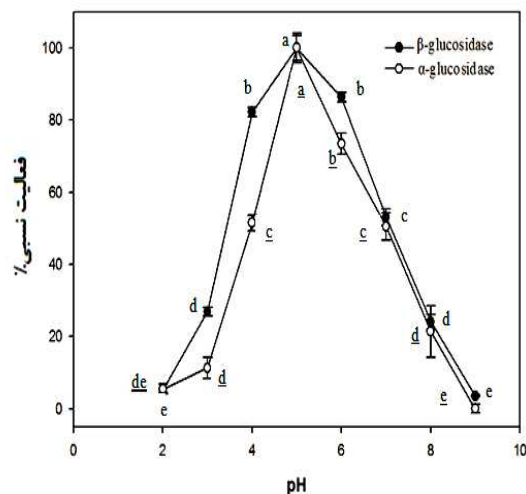
بهینه ۵ بدست آمد (شکل ۳). با توجه به این داده ها و pH بدست آمده از آلفا-آمیلاز، این نکته مشخص می‌گردد که دامنه pH فعالیت آمیلازی (۳ تا ۱۰) گسترده‌تر از گلوکوزیدازها (۴ تا ۷) می‌باشد. گلوکوزیدازها در pH بازی ۸ حدود ۲۰ درصد فعالیت نشان می‌دهند در صورتیکه آلفا-آمیلاز بیش از ۸۰ درصد فعالیت نشان می‌دهد.

در بررسی‌های مشابهی که روی سایر حشرات صورت گرفته است نیز نتایج مشابهی وجود دارد. مقدار pH بهینه فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی *Glyphodes pyloalis* به ترتیب ۷/۵ و ۵/۵ بدست آمد (Ghadamyari et al. 2010). در بررسی دیگری که روی فعالیت روده میانی و غدد بزاقی *B. germari* انجام شد pH بهینه فعالیت به ترتیب برای روده میانی و غدد بزاقی این حشره ۵/۵ و ۶ گزارش شده است (Ramzi & Hosseinaveh, 2010). نتایج زایموگرام گلوکوزیدازی نشان از وجود تنها یک فرم آلفا-گلوکوزیداز و یک فرم بتا-گلوکوزیداز در روده میانی آفت دارد (شکل ۴). در بررسی‌های مشابه که شریفی و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی سوسک برگخوار نارون جمع آوری شده از استان گلستان انجام دادند تفاوت‌ها و شباهت‌هایی با مطالعه حاضر وجود دارد. pH اپتیمم برای آلفا آمیلاز، آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز به ترتیب ۴، ۵ و ۶ بدست آمد. همانطور که از نتایج ما پیداست اختلافات بسیار جزیی بین pH بهینه آلفا-آمیلاز و بتا گلوکوزیداز وجود دارد. هر چند که در بررسی‌های شریفی و همکاران نیز فعالیت این آنزیم‌ها در pH بسیار بالاست به طوری که بیش از ۹۰ درصد فعالیت در این pH برای این دو آنزیم گزارش کردند. اما pH بهینه برای فعالیت آلفا-گلوکوزیداز نیز ۵ گزارش کردند. نتایج ما معقول به نظر می‌رسد چرا که دقیقاً در نتایج حاصل از زایموگرام نیز ۱ باند کاملاً مشهود مشاهده شد و فقط یک پیک در گراف‌های تعیین pH وجود داشت. این گونه می‌شود در مورد این اختلافات اظهار نظر کرد که این تفاوت‌ها ناشی از اختلاف موجود در خصوصیات این آنزیم‌ها در جمعیت‌های مختلف این حشره در دو منطقه استان البرز و استان گلستان می‌باشد (Sharifi et al., 2011).

دیگری که روی *Brachynema germari* (Hem.: Pentatomidae) انجام شد pH بهینه برای فعالیت آمیلاز در روده میانی و غدد بزاقی به ترتیب ۵ و ۶ بدست آمد (Ramzi & Hosseinaveh, 2010).



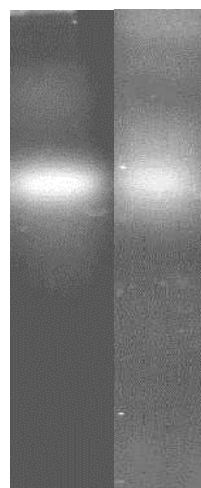
شکل ۲- زایموگرام آلفا-آمیلاز گوارشی سوسک برگخوار نارون در گستره pH های ۲ تا ۱۱.



شکل ۳- بررسی تغییرات میانگین فعالیت نسبی آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز گوارشی سوسک برگخوار (±SE) در گستره pH های ۲ تا ۱۰. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند ( $p < 0.05$ )

در بررسی اثر pH بر فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز روده میانی لارو سوسک برگخوار نارون pH

درجه سلسیوس مشاهده شده است (Vatanparast & Hosseininaveh, 2010). دمای بهینه فعالیت در آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز روده میانی *B. germari* ۴۵ درجه سلسیوس گزارش شده است (Ramzi & Hosseininaveh, 2010). بهترین دما برای فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز در روده میانی *Glyphodes pyloalis* برای هر دو آنزیم ۴۵ درجه سلسیوس بدست آمد (Ghadamyari et al. 2010). در مطالعه ی دیگری که روی بتا گلوکوزیداز روده میانی *Rhynchophorus palmarum* صورت گرفته، دمای بهینه برای بتا-گلوکوزیداز ۵۵ درجه سلسیوس بدست آمده است. (Yapi et al. 2009) شریفی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه ای که روی سوسک برگخوار نارون انجام دادند دمای بهینه برای بتا گلوکوزیداز را ۵۰ درجه سلسیوس بدست آوردند که ۵ درجه سلسیوس با نتایج ما متفاوت بود. که این تفاوت را می توان به اختلاف جمعیت های این گونه در دو استان گلستان و البرز مربوط دانست. با توجه به اختلافات هرچند جزئی که در قسمت تعیین pH بهینه، نتایج زایموگرام و دمای بهینه برای بتا-گلوکوزیداز در بررسی های ما و مطالعات شریفی و همکاران در سال ۲۰۱۱ که روی همین حشره وجود دارد می توان این گونه نتیجه گرفت که آنزیم بتا-گلوکوزیداز دارای خصوصیات متفاوت بسیار جزئی در جمعیت های مختلف جمع آوری شده از این گونه در دو استان البرز و گلستان را دارد (Sharifi et al., 2011).



شکل ۴- زایموگرام آلفا و بتا گلوکوزیداز گوارشی سوسک برگخوار نارون (راست: آلفا گلوکوزیداز چپ: بتا گلوکوزیداز)

دمای بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز روده میانی لارو سوسک برگخوار نارون به ترتیب ۴۰، ۶۰، و ۴۵ درجه سلسیوس بدست آمد (شکل ۵). فعالیت آلفا-آمیلاز و بتا-گلوکوزیداز به ترتیب در دامنه دمای ۳۰ تا ۵۰ و ۳۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس دارای بیشترین مقدار خود می باشد و بعد از این دما فعالیت آنزیمها سیر نزولی پیدا می کند. فعالیت آلفا-آمیلاز هم تا ۴۰ درجه سلسیوس سیر صعودی دارد و پس از آن کاهش تدریجی در فعالیت آنزیم مشاهده می شود. داده هایی که از مطالعات روی سایر حشرات مورد بدست آمده است با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز در روده میانی *Hypera postica* (Col.: Curculionidae) ۳۵

شکل ۵- اثر دما بر فعالیت آنزیمهای آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز گوارشی سوسک برگخوار نارون.

شکل ۶- اثرات یون های مختلف در غلظت های متفاوت بر میانگین فعالیت نسبی سه آنزیم  
آلفا-آمیلاز، آلفا و بتا-گلوکوزیداز گوارشی سوسک برگخوار نارون. ( $\pm$ SE)

اثر افزایشی روی فعالیت این آنزیم داشت اما نمکهای  
NaCl و MgCl<sub>2</sub> موجب کاهش فعالیت آنزیم شدند. آلفا-

فعالیت آلفا-آمیلاز تحت تاثیر یونهای مختلف  
نوسانات مختلفی را نشان داد (شکل ۶). KCl و CaCl<sub>2</sub>

بیشتر از آلفا-گلوکوزیداز می‌باشد. فعالیت آلفا-آمیلاز پس از طی ۱ ساعت از آزمون پایداری در گستره pH ۴ تا ۷ بیش از ۸۰ درصد می‌باشد حال آنکه بعد از گذشت ۱۰ ساعت در همین محدوده کاهش قابل توجهی در فعالیت آمیلاز مشاهده می‌گردد (شکل ۹). نتایج پایداری سه آنزیم نشان می‌دهد که آلفا-آمیلاز پایداری بیشتری نسبت به بتا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز پایداری بیشتری نسبت به آلفا-گلوکوزیداز در pH های مختلف دارد. پایداری آلفا آمیلاز در *Hypera postica* بیشتر در نواحی اسیدی یا مایل به اسیدی رخ داد. و این پایداری تفاوت زیادی را بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت نداشت (Vatanparast & Hosseinaveh, 2010).

شکل ۷- بررسی پایداری آلفا-گلوکوزیداز گوارشی سوسک برگخوار نارون بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت.

شکل ۸- بررسی پایداری بتا-گلوکوزیداز گوارشی سوسک برگخوار نارون بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت.

گلوکوزیداز تحت تاثیر NaCl فعالتر شد و در غلظت های بالاتر فعالیت بیشتری را از خود بروز داد (شکل ۵). افزایش غلظت KCl اثرچندانی بر تغییر فعالیت این آنزیم نداشت. سایر یون ها موجب کاهش فعالیت آلفا-گلوکوزیداز شدند. کلیه یون های مورد استفاده در این آزمایش در مجموع موجب کاهش فعالیت بتا-گلوکوزیداز شدند (شکل ۵) اما غلظتهای مختلف این ترکیبات تاثیرات متفاوتی را روی این آنزیم از خود نشان دادند. غلظت های ۱۵ میلی مولار  $MgCl_2$  و  $CaCl_2$  موجب افزایش فعالیت نسبت به شاهد شد.

گزارش شده است که یون های  $Mg^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  به ترتیب موجب افزایش و عدم تاثیر بر فعالیت هر دو آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز در سن *Lygus hesperus* (Hem.: Miridae) می شوند (Zeng & Cohen et al., 2001). در بررسی دیگری حضور KCl و NaCl افزایش محسوسی در فعالیت آلفا-آمیلاز در روده میانی سرخرطومی برگ یونجه *Hypera postica* را سبب شد (Vatanparast & Hosseinaveh., 2010). در بررسی های صورت گرفته روی *Glyphodes pyloalis* یون  $Ca^{2+}$  فعالیت آلفا-گلوکوزیداز را افزایش می دهد (Ghadamyari et al. 2010) در مطالعات اثر یون هایی که روی *Rhynchophorus palmarum* صورت گرفت یون های  $ZnCl_2$ ،  $CuCl_2$  و  $FeCl_3$  روی بتا گلوکوزیداز اثر مهارکنندگی روی بتا- گلوکوزیداز داشته است در حالی که  $BaCl_2$ ،  $MgCl_2$ ،  $MnCl_2$ ،  $SrCl_2$  و  $CaCl_2$  تاثیر زیادی روی فعالیت این آنزیم نداشتند (Yapi et al. 2009).

با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی های پایداری آنزیمی، آلفا گلوکوزیداز در pH ۵ بیشترین فعالیت را بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت داشت و این در حالی است که در pH های ۴ و ۶ فعالیت آنزیم به شدت کاهش یافته است (شکل ۷). بتا-گلوکوزیداز هم بیشترین پایداری را در گستره pH ۴ تا ۶ نشان داد حال آنکه بیشترین فعالیت این دو آنزیم پس از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت در pH ۵ رخ داد (شکل ۸). روی هم رفته نتایج نشان داد که مدت زمان انکوباسیون در pH های مختلف، کاهش قابل توجهی در فعالیت این آنزیمهای ایجاد نمی‌کند و پایداری بتا-گلوکوزیداز در pH های مختلف



تغذیه، اولین قدم شناسایی خصوصیات شیمیایی آنزیم های گوارشی می باشد (Strobl et al 1998).

بنابراین شناسایی بیوشیمیایی آنزیم های دخیل در گوارش، فهم ما را جهت طراحی سیستم های کنترلی با استفاده از پروتیین های مهار کننده این آنزیم ها با منشاء گیاهی، به طور بالقوه بالا می برد. امروزه مهارکننده های آنزیمی در پیکره گیاهان شناسایی شده اند که اغلب پروتیینی اند و از آنها به عنوان عامل مقاومت گیاه به آفات یاد می شود. این ترکیبات جزو پروتیین های ذخیره ای ساخته شده در گیاه هستند. مهارکننده های آنزیم های گوارشی در این میان از جایگاه ویژه ای برخوردارند. اختلال در عمل کربوهیدرازها در حشرات هدف اصلی مهارکننده ی آنزیم های کربوهیدراز است. اما قبل از مهار این آنزیم ها لازم است برخی از خصوصیات بیوشیمیایی آنها مورد مطالعه قرار بگیرد. در مطالعه حاضر ما حضور و فعالیت آلفا- آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا- گلوکوزیداز را در روده میانی سوسک برگخوار نارون نشان دادیم و به بررسی برخی از خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم ها پرداختیم. امید است این مطالعات راه های تازه ای را در جهت کنترل سالم این آفت فراهم آورد.

شکل ۹- بررسی پایداری آلفا-آمیلاز گوارشی سوسک برگخوار نارون بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت.

#### نتیجه گیری

تولید گیاهان مقاوم تراریخته کمک می کند تا مواد شیمیایی سمی کمتری علیه آفات مصرف شود. نهایتا محیط زیست سالمتری نیز خواهیم داشت. خصوصا در مورد آفات شهری مانند سوسک برگخوار نارون این موضوع اهمیت بیشتری را پیدا می کند. چرا که مصرف سموم در محیط شهری بسیار خطرناک می باشد. برای برقراری یک استراتژی کنترلی بر پایه مهار کنندگی در

#### REFERENCES

1. Applebaum, S. W. & Konijn, A. M. (1965). The utilization of starch by larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Nutrition*, 85, 275–282.
2. Baker, J. E. (1991) Purification and partial characterization of  $\alpha$ -amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry*, 21(3), 303–313.
3. Breuer, M. & De Loof, A. (2000). In: Kleeberg H, Zebitz CPW, (2000). Practice oriented results on use and production of neem ingredients and pheromones VIII. Giessen: Druk and Graphic; 2000. p. 23.
4. Casey Sclar, D. (1994). Neem: Mode of Action of Compounds Present in Extracts and Formulations of *Azadirachta indica* Seeds and their Efficacy to Pests of Ornamental Plants and to Non-target Species. Retrieved October 12, 2005 from [http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/Courses/en570/Papers\\_1994/sclar.html](http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/Courses/en570/Papers_1994/sclar.html).
5. Dojnov, B., Bozic, N., Nenadovic, V., Ivanovic, J., & Vujcic, Z. (2008). Purification and properties of midgut  $\alpha$ -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149 (B), 153-160.
6. Franco, O.L., Riggen, D. J., Melo, F. R., Bloch, C., Silva, C., & Grossi, M. F. (2000). Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towardsbruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2166-2173
7. Ghadamyari, M., Hosseinaveh, V. & Sharifi, M. (2010). Partial biochemical characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.:Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies*, 333, 197–204.
8. Grossi De Sa, M. F. & Chrispeels, M. J. (1997). Molecular cloning ofbruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4), 271–281.
9. Hosseinaveh, V., Bandani, A., Azmayeshfard, P., Hosseinkhani, S., Kazzazi, M. (2007). Digestive

- proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*, 43, 515–522.
10. Huerta, A., Chiffelle, I., Puga, K., Azua, F. & Araya, J.E. (2010) Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Crop Protection*, 29, 1118-1123.
  11. Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P. & Xavier-Filho, J. (1990) Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 56 (3), 219–227.
  12. Low, N. H., Vong, V. & Spornest, P. (1986). A new enzyme,  $\beta$ -glucosidase, in honey. *Journal of Apical Research*, 25, 178-181.
  13. Lystrup, J., Fitch, M. J. and Department of Neighborhood Services.(1999). *Implementation of integrated pest management for the elm leaf beetle, Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomelidae), in a large urban area (Sacramento), prepared for California Department of Pesticide Regulation. 14pp.
  14. Mendiola-Olaya, E., Valencia-Jimenez, A., Valdes-Rodrigues, S., Delano-Frier, J. & Blanco-Labra, A. (2000) Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncates* Horn. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 126, 425–433.
  15. Oppert, B. (2000). Transgenic plants expressing enzyme inhibitors and the prospects for biopesticide development. In: Koul O, Dhaliwal GS (eds) *Advances in biopesticide research*, pp.83–95. Hardwood Academic, Amsterdam
  16. Oppert, B., Hartzler, K., Smith, C. M. (2000). Digestive proteinases of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera; Curculionidae). *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)*, 103 (3/4), 99–110
  17. Pratiel-Sosa, F., Clemont, S., Percheron, F. & Chararas, C. (1986). Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumatococcus pycnocampa* larvae. Part1. Purification and some properties of the  $\alpha$ -glucosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 84, 77–81.
  18. Podoler, H., & Applebaum, S. W. (1971). The  $\alpha$ -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. *Biochemistry Journal*, 121, 321–325.
  19. Ramzi, S., & Hosseinaveh, V., (2010). Biochemical characterization of digestive  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase in pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3), 215–219.
  20. Regnault-Roger, C., Staff, V., Philogene, B., Terrón, P. & Vincent, C. (2004). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
  21. Rodriguez, C., Silva, G. & Djair, V., (2003). *Bases para el manejo racional de insecticidas: Insecticidas de origen vegetal*. Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, y Fundación para la Innovación Agraria, Concepción, Chile.
  22. Sharifi, M., Ghadamyari, M., Mahdavi moghadam, M. & Saiidi, F., (2011). Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its  $\alpha$ -amylase by inhibitors extracted from the common bean. *Archives of Biological Sciences* 63( 3), 705-716
  23. Siegentaler, U. (1977). Eine einfache and rasche methode zur bestimmung de  $\alpha$ -glucosidase (saccharase) in honing. *Mitt Gebiere Lebensmittelunters Hyg.* 68, 251 – 258
  24. Silva, C. P., Terra, W. R., Grossi de Sa, M. F. G., Samuels, R. I., Isejima, E. M., Bifano, T. D. et al. (2001a). Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1. *Journal of Insect Physiology*, 47 (11), 1283–1290.
  25. Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F. & Glockshuber, R. (1998). A novel strategy for inhibition of  $\alpha$ -amylases: Yellow meal worm  $\alpha$ -amylase in complex with Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure*, 6, 911-921.
  26. Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 109, 1–62.
  27. Valencia-Jimenez, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. A. & Chrispeels, M. J. (2000)  $\alpha$ -amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 207–213.
  28. Vatanparast, M., Hosseinaveh, V., (2010). Digestive amylase and pectinase activity in the larvae of alfalfa weevil *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). *Entomological Research*, 40, 6, 328-335.
  29. Zeng, F., & Cohen, A.C. (2001). Induction of elastase in a zoophagous heteropteran, *Lygus hesperus*, *Annals of the Entomological Society of America* 94, 146-151