

تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز گوارشی زنبور برگ‌خوار ثانوی رز (*Allantus viennensis* (Hym.: Tenthredinidae))

فرشید جهانجو^۱، محمد قدمیاری^{۲*}، رضا حسینی^۳ و رضا حسن ساجدی^۴
۱، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان
۲ و ۳ دانشیار و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان
۴، استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸ - تاریخ تصویب: ۹۲/۷/۲)

چکیده

زنبور برگ‌خوار ثانوی رز، *Allantus viennensis* یکی از آفات مهم رز در استان گیلان می‌باشد. لاروهای جوان به‌طور دسته جمعی از پارانثیم برگ‌های جوان تغذیه می‌کنند و با افزایش سن از تمامی برگ تغذیه می‌نمایند و فقط رگبرگ اصلی را باقی می‌گذارند. آلفا- و بتا-گلوکزیدازها آنزیم‌هایی هستند که نقش مهمی در گوارش نهایی کربوهیدرات‌ها در حشرات دارند. در این پژوهش اثر pH (۳ تا ۱۲) و دما (۱۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس) روی فعالیت این آنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که pH بهینه برای فعالیت آلفا- و بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش برابر با ۶ و دمای بهینه نیز به ترتیب ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس بودند. همچنین، فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در لوله‌های گوارش سنین دوم تا پنجم لاروی و سه قسمت لوله‌ی گوارش (روده‌های جلویی، میانی و عقبی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که با افزایش سن لاروی، میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز افزایش یافت. فعالیت ویژه این دو آنزیم در روده‌ی میانی نسبت به روده جلویی و عقبی بیشتر بود. همچنین، مقدار فعالیت ویژه آنزیم آلفا-گلوکزیداز نسبت به بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش لاروهای سنین دوم تا پنجم و سه قسمت لوله گوارش بیشتر بود. طبق نتایج به‌دست آمده، مقدارهای K_M آنزیم‌های آلفا-گلوکزیداز و بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش به ترتیب برابر با ۲/۷۲ و ۲/۰۲ میلی‌مولار به‌دست آمدند. آنالیز زایموگرام روی ژل نشان داد که آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش زنبور برگ‌خوار ثانوی رز هر کدام دارای یک فرم فعال آنزیمی بودند.

واژه‌های کلیدی: آلفا-گلوکزیداز، بتا-گلوکزیداز، زنبور برگ‌خوار ثانوی رز، لوله گوارش

مقدمه

برآورد خسارت به محصولات کشاورزی در دنیا بدون استفاده از آفت‌کش‌ها و دیگر راهبردهای کنترل غیرشیمیایی، حدود ۷۰ درصد از تولید محصولات کشاورزی می‌باشد که در حدود ۴۰۰ میلیارد دلار تخمین زده شده است (Lawrence & Koundal, 2002). امروزه حشره‌کش‌های شیمیایی سهم زیادی را در مبارزه با آفات به خود اختصاص داده‌اند. در حالی که اثرات جانبی ناشی از سموم روی انسان، جانوران، محیط زیست، مقاومت آفات به سموم و اثرات باقی‌مانده سموم در غذاها از آثار مخرب آفت‌کش‌ها می‌باشند، متأسفانه استفاده از حشره‌کش‌ها در مبارزه با آفات به یک شیوه‌ی

کنترل رایج تبدیل شده است (Regnault-Rager et al., 2004; Rodriguez et al., 2003). از طرفی، بسیاری از این سموم انتخابی نیستند و می‌توانند روی انسان اثرات سوئی داشته باشند. استفاده از ارقام مقاوم به آفات یکی از روش‌های مؤثر در کنترل آفات و در جهت کاهش مصرف آفت‌کش‌ها می‌باشد. ارقام مقاوم به طرق مختلف روی زندگی آفت و یا ارتباط متقابل گیاه و حشره تأثیر می‌گذارند و از شدت خسارت می‌کاهند. تغذیه حشره از میزبان یکی از موارد بسیار حیاتی در این ارتباط می‌باشد. غذایی که آفت دریافت می‌کند، می‌تواند این ارتباط را به شدت تحت تأثیر قرار دهد. می‌توان اظهار داشت که وارد کردن ژن‌های بیان‌کننده مهارکننده‌های آنزیم‌های

منوساکاریدی که از زنجیره پلی ساکاریدی جدا می‌شود، بتا - گلوکزیداز نام‌گذاری می‌شوند.

بتا - گلوکزیدازها در تجزیه دی- و الیگوساکاریدهای حاصل از همی سلولز و سلولز و همچنین در برهم‌کنش‌های بین گیاهان و حشرات نقش دارند (Terra & Ferreira, 1994). بتا - گلوکزیدازها دارای نام‌های دیگری همچون جنوبیاز و سلوبیوز نیز می‌باشند. بتا - گلوکزیدازها در همه گیاهان، جانوران، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارند (Esen, 1993).

لاروهای زنبور برگ‌خوار ثانوی رز *Allantus viennensis* (Schr.) (Hym; Tenthredinidae) از برگ‌های رز تغذیه می‌نمایند و به درختچه‌های رز خسارت وارد می‌آورند. این زنبور دارای سه نسل در سال و ۵ سن لاروی است و زمستان را به صورت پیش‌شفییره در محل گره‌های ساقه می‌گذراند (Hosseini & Sahragard, 2003). با توجه به این‌که گل محمدی هم در صنعت گلاب‌گیری مورد استفاده قرار می‌گیرد و هم به عنوان گیاه زینتی در پارک‌ها و باغچه‌های منازل کشت می‌شود.

استفاده از ترکیبات شیمیایی در کنترل این آفت با دشواری‌هایی همراه است. استفاده از گیاهان مقاوم یکی از راه‌های کنترل غیرشیمیایی این آفت می‌باشد. تاکنون ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گلوکزیداز در بعضی از موجودات مورد بررسی قرار گرفته، اما ویژگی‌های این آنزیم‌ها در زیر راسته *Symphyta* و در زنبور برگ‌خوار ثانوی رز تاکنون بررسی نشده است. از این رو، آگاهی از وضعیت این آنزیم‌ها نه تنها برای مطالعات مقایسه‌ای مفید می‌باشد، بلکه اطلاعاتی را در زمینه بیوشیمی حشره فراهم می‌نماید و امید می‌رود که با استفاده از این اطلاعات بتوان در آینده از آن‌ها در مدیریت کنترل این آفت بهره‌برداری نمود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری لاروهای زنبور برگ‌خوار ثانوی رز

لاروهای زنبور برگ‌خوار ثانوی رز از روی بوته‌های گل رز *Rosa hybrid L.* در داخل محوطه دانشگاه گیلان در تابستان ۱۳۸۹ جمع آوری و برای پرورش به آزمایشگاه انتقال داده شد. پرورش در داخل اتاقک پرورش در دمای

حشره به گیاه مورد نظر و بیان ژن‌های مذکور در گیاه باعث تولید مهارکننده‌ها در گیاه می‌شود، در نتیجه، طی تغذیه حشره این مهارکننده‌ها وارد بدن حشره می‌گردند و آنزیم‌های گوارشی را مهار می‌کنند (Sharma & Ortiz, 2000). با شناسایی ترکیبات پروتئینی در ساختار گیاهان تحت عنوان مهارکننده‌های آنزیم‌ها، استفاده از آن‌ها در تولید گیاهان مقاوم به آفات رایج گردید که در این میان مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی دارای اهمیت ویژه‌ای هستند (Nagarju & Abraham, 1995; Parry, 1996). گیاهان با استفاده از مهارکننده‌های آنزیم‌ها و مهار آنزیم‌های موجود در دستگاه گوارش حشرات و جلوگیری از گوارش و جذب مواد غذایی از خود دفاع می‌کنند (Shakiba; Chougule et al., 2008; et al., 2007). بازدارنده‌های آنزیم‌ها با جلوگیری از گوارش پروتئین، باعث گوارش ناقص غذا و مانع جذب اسیدهای آمینه ضروری و در نتیجه موجب کندی رشد و مرگ در اثر گرسنگی می‌شوند (Budatha et al., 2008). متابولیسم کربوهیدرات‌ها در حشرات، هدف اصلی مهارکننده‌های آنزیم‌های کربوهیدراز می‌باشد. کربوهیدرازها از جمله گلوکزیدازها مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی هستند که نقش اصلی را در گوارش کربوهیدرات‌ها ایفا می‌کنند (Parry, 1996; Abraham et al., 1992). آگاهی از بیوشیمی آنزیم‌های کربوهیدراز اولین قدم در ایجاد گیاهان مقاوم به آفات می‌باشد. آلفا - و بتا - گلوکزیداز آنزیم‌هایی گوارشی هستند که در مراحل نهایی گوارش کربوهیدرات‌ها در حشرات نقش دارند. این آنزیم‌ها دی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدهایی مانند ساکارز و مالتوز را هیدرولیز می‌کنند و معمولا بیشتر در لوله گوارش حشرات یافت می‌شوند. گلوکزیدازها معمولا بر اساس منوساکاریدهای تولیدی نام‌گذاری می‌شوند. آلفا-گلوکزیدازها هیدرولیز پیوند α (1,4) گلوکزیدی را از آریل گلوکوزیدها مانند (دی ساکاریدها یا الیگوساکاریدها) کاتالیز می‌نمایند. این آنزیم‌ها به فراوانی در موجودات زنده یافت می‌شوند. اغلب آلفا - گلوکزیدازهای حشرات، دارای pH بهینه بین ۵ تا ۶/۵ می‌باشند (Terra & Ferreira, 1994). بتا - گلوکزیدازها هیدرولیز پیوندهای β (1,4) گلیکوزیدی بین منوساکاریدها را کاتالیز می‌نمایند. از این رو، با توجه به

دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، با افزودن ۶۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکساید ۰/۲۵ مولار واکنش متوقف گردید و بعد از ۱۰ دقیقه، میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه Microplate reader Stat Fax 3200 اندازه‌گیری شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از پی-نیتروفنول به عنوان منحنی کالیبراسیون استفاده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرومول پی-نیتروفنول در طول مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تولید کند.

اثر pH روی فعالیت آلفا- و بتا گلوکزیداز

در این آزمایش از بافر فسفات- گلیسین- استات ۰/۰۴ مولار استفاده شد و اثر pHهای برابر با ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ روی فعالیت آلفا- و بتا-گلوکزیداز لاروسن پنجم بررسی شد. تنظیم pH با استفاده از HCl یا NaOH ۳ مولار صورت گرفت. بقیه مراحل انجام شده همانند اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌ها بودند.

اثر دما روی فعالیت آلفا- و بتا-گلوکزیداز

در این آزمایش، اثر دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سلسیوس روی فعالیت آنزیم مورد نظر در pH بهینه روی سن پنجم لاروی تعیین شده در آزمایش قبلی مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین پارامترهای K_M و V_{max} برای آنزیم‌های آلفا- گلوکزیداز و بتا-گلوکزیداز

برای تعیین پارامترهای سینتیکی (K_M و V_{max}) آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز، ابتدا غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار از زیرنهشت‌های اختصاصی هر کدام از آنزیم‌ها تهیه شدند. سپس در هریک از میکروتیوب‌ها، ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی مربوط به لارو سن پنجم با ۴۵ میکرولیتر زیرنهشت از غلظت‌های تعیین شده و ۱۱۵ میکرولیتر بافر فسفات (۴۰ میلی‌مولار، pH ۶) اضافه شد.

سپس در زمان‌های صفر، ۱۰، ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از واکنش، با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ مولار، واکنش متوقف گردید و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه Microplate reader Stat Fax 3200 اندازه‌گیری شد. مقدار سرعت اولیه آنزیم در غلظت‌های مختلف با

1 ± 25 C دوره روشنایی: تاریکی (۱۶:۸) و رطوبت نسبی دوره شناسایی: تاریکی (۱۶:۸) و رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ انجام شد. شناسایی مراحل مختلف لاروی بر اساس اندازه‌گیری عرض کپسول سر طبق داده‌های Hosseini & Sahragard (2003) صورت گرفت.

جداسازی لوله گوارش از بدن

برای جدا کردن لوله گوارش، ابتدا حشرات روی یخ بی‌حس شدند و سپس به کمک پنس، سطح شکمی لاروها را داخل پتری حاوی بافر فسفات سرد شکافته و محتویات لوله گوارش تخلیه شد. تعداد ۱۰ عدد لوله گوارش، در هر میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات قرار داده شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. همچنین لوله گوارش به سه قسمت روده‌های جلوپی، عقبی و میانی تقسیم شدند (شکل یک).

تهیه محلول آنزیمی

برای تهیه نمونه آنزیمی به همگن‌سازی نمونه‌ها نیاز می‌باشد. بدین منظور از یک همگن‌ساز دستی استفاده شد. در این مرحله ۱۰ عدد لوله گوارش در دوپیست میکرو لیتر آب همگن‌سازی شدند. نمونه‌های همگن شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۳۰۰۰ Xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رونشین از بخش ته‌نشین، جدا شدند و به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری فعالیت آلفا- و بتا-گلوکزیداز

فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز بر اساس روش Silva and Terra (1997) تغییر داده شده توسط Ghadamyari et al., (2010) به ترتیب با استفاده از زیرنهشت‌های p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside و p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (خریداری شده از شرکت سیگما) اندازه‌گیری شد.

از غلظت ۲۵ میلی مولار برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد.

آزمایش در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با حجم واکنش برابر با ۱۷۰ میکرولیتر انجام گردید. به این صورت که ۱۰ میکرولیتر از محلول رونشین به اضافه ۴۵ میکرولیتر زیرنهشت و ۱۱۵ میکرولیتر بافر استات سدیم - گلیسین- فسفات ۵۰ میلی مولار به مدت ۳۰ دقیقه در

فعالیت آلفا- و بتا گلوکزیداز ابتداء درصد فعالیت نرمال شده و سپس با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شدند. رسم نمودارها و مرتب کردن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ صورت گرفت.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا- گلوکزیداز فعالیت‌های ویژه آلفا- و بتا- گلوکزیداز در لوله گوارش لاروهای سنین دوم تا پنجم و سه قسمت لوله‌ی گوارش لارو سن آخر (شکل ۱) با استفاده از زیرنهشت اختصاصی اندازه‌گیری شدند.

نتایج نشان دادند فعالیت این آنزیم‌ها در دستگاه گوارش لاروهای سنین مختلف با یکدیگر در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار داشته و با افزایش سن لاروی میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا- و بتا- گلوکزیداز افزایش یافت (شکل ۲ الف و ب). فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در لاروهای سن چهار و پنج با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند و کمترین فعالیت ویژه مربوط به لاروهای سنین دوم بود. میزان فعالیت این دو آنزیم در روده‌ی میانی از دو قسمت دیگر بیشتر بوده و بخش عقبی کمترین فعالیت را نشان داد (شکل ۳ الف و ب). همچنین، مقدار فعالیت ویژه آنزیم آلفا- گلوکزیداز نسبت به بتا- گلوکزیداز در بافت‌های مورد آزمایش بیشتر بود.

استفاده از نرم‌افزار اکسل و مقادیرهای K_M و V_{max} با استفاده از نرم‌افزار Hyper اندازه‌گیری شد.

ژل پلی‌اکریل آمید (native-PAGE) آلفا- و بتا- گلوکزیداز

برای انجام این کار از روش Tokuda et al. (1997) با اندکی تغییر استفاده شد. برای الکتروفورز آنزیم‌های آلفا- و بتا- گلوکزیداز، نمونه‌های مربوط به لارو سن پنجم با بافر نمونه مخلوط و داخل چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. الکتروفورز در ۱۰۰ ولت و دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل به درون ظروف حاوی زیرنهشت اختصاصی $4\text{-MU}\beta\text{Glu}$ و $4\text{-MU}\alpha\text{Glu}$ به ترتیب برای آنزیم‌های بتا- گلوکزیداز و آلفا- گلوکزیداز منتقل شد. با قرار دادن ژل در دستگاه ژل داگ (Uvitec Cambridge)، باندهای مربوطه در زیر نور UV مشاهده شد.

تعیین غلظت پروتئین (روش برادفورد)

غلظت پروتئین موجود در نمونه‌ها بر اساس روش Bradford (1976) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

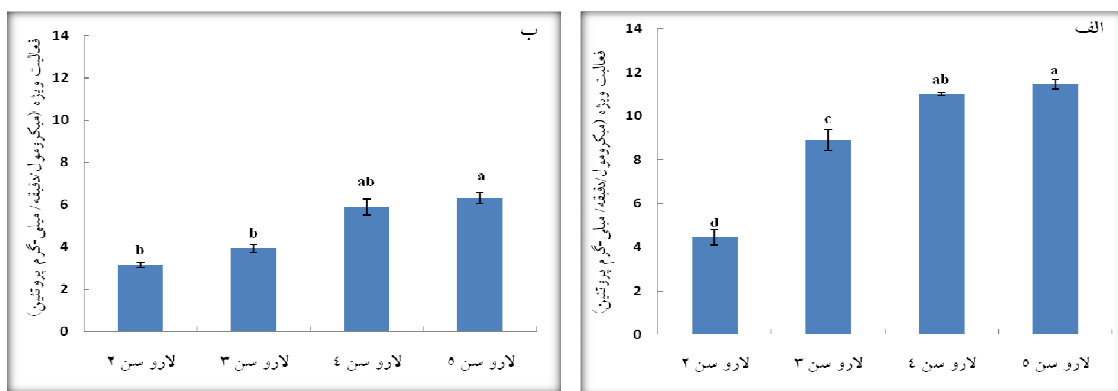
تجزیه و تحلیل آماری نتایج

کلیه آزمایش در سه یا چهار تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد و با نرم‌افزار (۱۹۹۷) SAS انجام شد. در مورد داده‌های اثر pH و دما روی

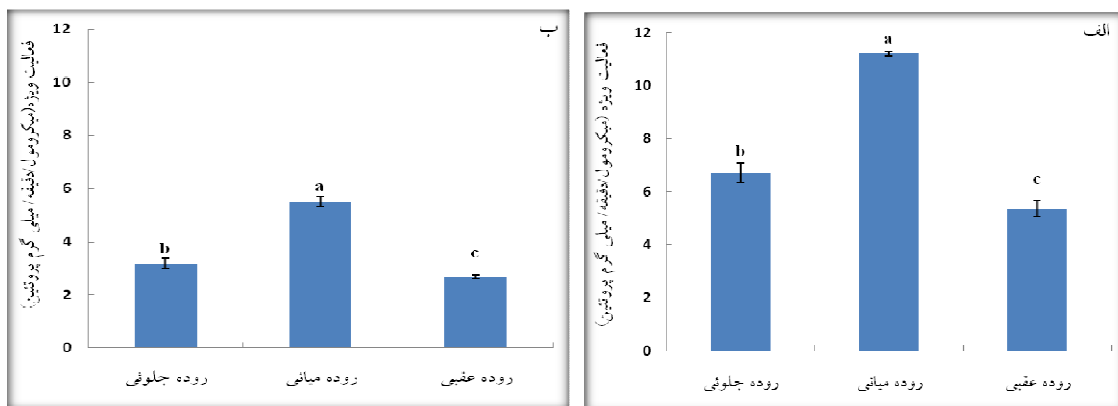


شکل ۱- قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش لارو سن آخر زنبور برگ‌خوار ثانوی رز *Allantus viennensis* (اصلی)

1. 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside
1. 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside



شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا-گلوکزیداز (الف) و بتا-گلوکزیداز (ب) در سنین مختلف لاروی زنبور برگ‌خوار *Allantus viennensis* (دمای ۳۵ درجه سلسیوس و pH برابر با ۶) *میانگین‌هایی دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۰.۰۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا-گلوکزیداز (نمودار الف) و بتا-گلوکزیداز (نمودار ب) در سه قسمت لوله‌ی گوارش لارو سن پنجم زنبور برگ‌خوار *Allantus viennensis* (دمای ۳۵ درجه سلسیوس و pH برابر با ۶) *میانگین‌هایی دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۰.۰۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

بررسی اثر دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز

همان گونه که در شکل ۵ (الف و ب) دیده می‌شود، دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا-گلوکزیداز در لوله گوارش برابر با ۴۰ درجه سلسیوس و برای آنزیم بتا-گلوکزیداز برابر با ۵۰ درجه سلسیوس به دست آمد. نمودارهای حاصل از اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز نشان می‌دهند که فعالیت آلفا-گلوکزیداز در لوله گوارش در محدوده دمایی ۲۰ تا ۳۰ درجه سلسیوس به میزان ۳۰ تا ۵۳ درصد بود و بعد از آن فعالیت آنزیم افزایش یافت و در ۴۰ درجه سلسیوس به بیشترین میزان خود رسید.

فعالیت آلفا-گلوکزیداز لوله گوارش در دمای بالاتر از ۶۰ درجه سلسیوس یک‌باره کاهش یافت و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس، میزان فعالیت به صفر رسید (شکل ۵ الف). فعالیت بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش در

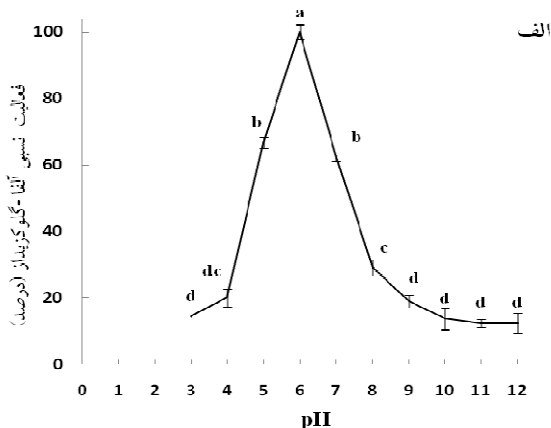
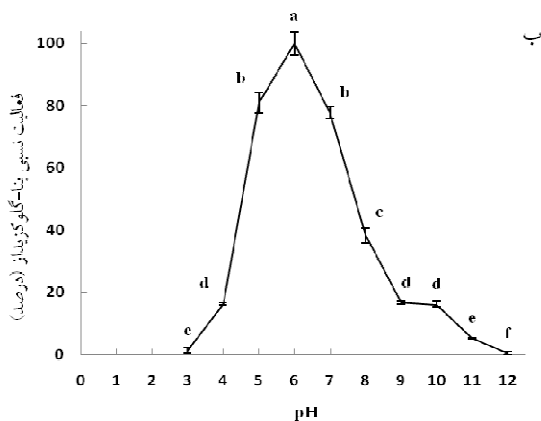
بررسی اثر pH روی فعالیت آلفا- و بتا-گلوکزیداز

نتایج تحقیق حاضر در زمینه بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم آلفا-گلوکزیداز نشان دادند که فعالیت این آنزیم در لوله گوارش در pH برابر با ۴ حدود ۲۰ درصد بود و به تدریج افزایش یافت تا در pH برابر با ۶ به بیشترین فعالیت خود رسید و در pH های از ۸ تا ۱۰ میزان فعالیت کاهش پیدا کرد و به زیر ۲۰ درصد رسید و پس از آن، با افزایش pH میزان فعالیت به تدریج کاهش یافت (شکل ۴ الف).

فعالیت بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش در pH برابر با ۵ به میزان ۸۰ درصد رسید و سپس به تدریج افزایش یافت تا در pH برابر با ۶ به حداکثر فعالیت خود رسید و پس از آن، در pH برابر با ۷ میزان فعالیت تا ۷۷ درصد افزایش یافت و پس از آن فعالیت به تدریج کاهش پیدا کرد تا در pH برابر با ۱۲ میزان فعالیت این آنزیم به صفر درصد رسید (شکل ۴ ب).

گلوکزیداز لوله گوارش به شدت کاهش یافت و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس، فعالیت آن به صفر نزدیک شد (شکل ۵ ب).

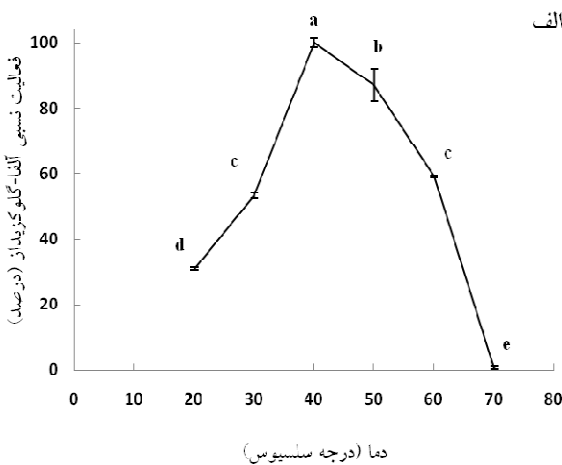
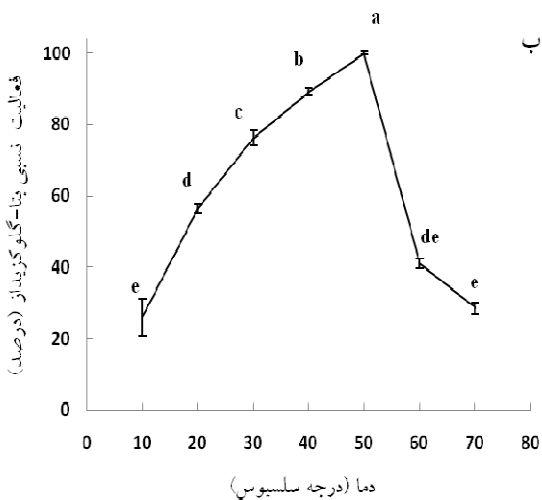
محدوده دمایی ۲۰ تا ۳۰ درجه سلسیوس به تدریج افزایش یافت و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به بیشترین میزان خود رسید. پس از آن، فعالیت بتا--



شکل ۴- اثر pH روی میانگین فعالیت‌های آنزیم‌های آلفا-گلوکزیداز (نمودار الف) و بتا-گلوکزیداز (نمودار ب) لوله‌ی گوارش لارو

سن پنجم زنبور برگ‌خوار ثانوی رز *Allantus viennensis*

* میانگین‌هایی دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۵- اثر دما روی میانگین فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکزیداز (نمودار الف) و بتا-گلوکزیداز (نمودار ب) لوله‌ی گوارش زنبور لارو سن

پنجم برگ‌خوار ثانوی رز *Allantus viennensis* (pH ۶)

* میانگین‌هایی دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

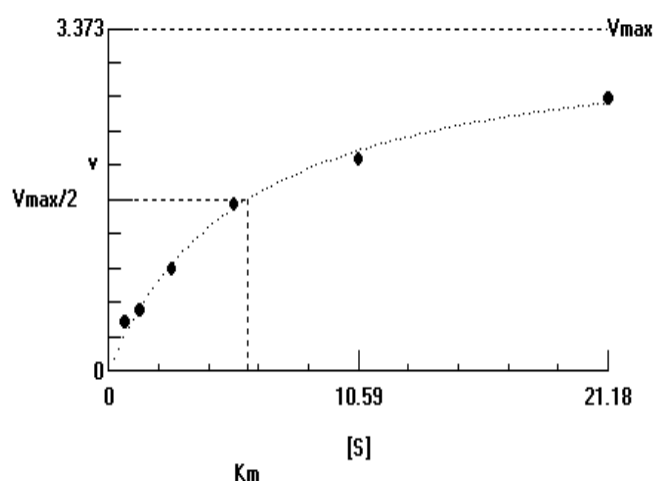
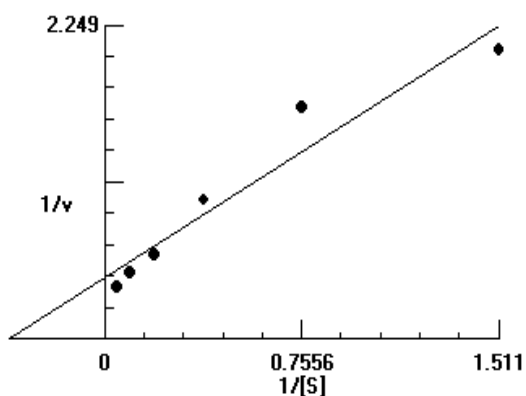
با $2/72 \pm 0/08$ میلی‌مولار و $2/27 \pm 0/07$ میلی‌مولار بر دقیقه بر میلی‌لیتر بود.

مقدارهای K_M و V_{max} آنزیم بتا-گلوکزیداز نیز به ترتیب برابر با $2/02 \pm 0/095$ میلی‌مولار و $2/13 \pm 0/11$

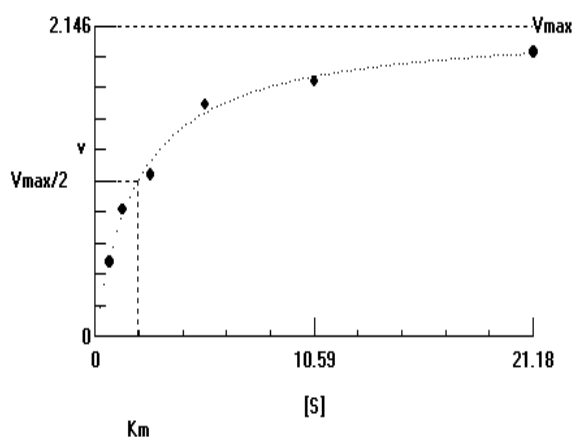
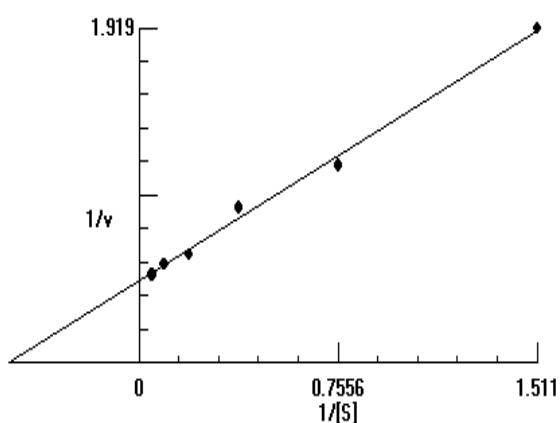
تعیین پارامترهای K_M و V_{max} برای آنزیم‌های آلفا-گلوکزیداز و بتا-گلوکزیداز

طبق نتایج به دست آمده، مقدارهای K_M و V_{max} آنزیم آلفا-گلوکزیداز در لوله گوارش به ترتیب برابر

میلی‌مولار بر دقیقه بر میلی‌لیتر به دست آمد (شکل‌های ۶ و ۷).



شکل ۶- منحنی‌های ترسیم شده برای تعیین پارامترهای V_{max} (پایین) و K_M (بالا) آلفا-گلوکزیداز (دما ۳۵ درجه سلسیوس و pH ۶)



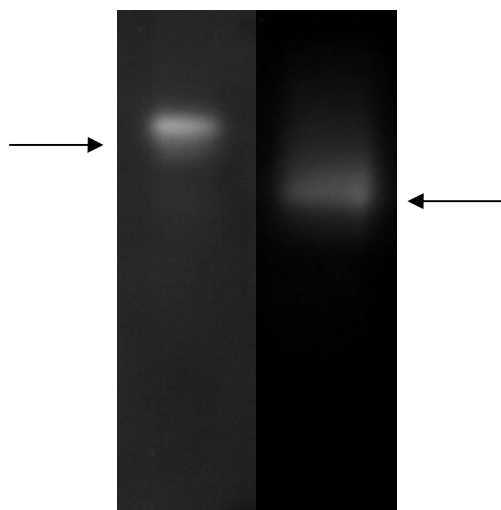
شکل ۷- منحنی‌های ترسیم شده برای تعیین پارامترهای V_{max} (پایین) و K_M (بالا) بتا-گلوکزیداز (دما ۳۵ درجه سلسیوس و pH=۶)

لوله گوارش لاروهای سن پنجم زنبور برگ‌خوار ثانوی رز وجود دارد (شکل ۸). که باند مربوط به آلفا-گلوکزیداز از باند بتا-گلوکزیداز قوی تر بود. این نتیجه تاییدکننده

بررسی فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز روی ژل نتایج حاصل از آنالیز زایموگرامی نشان دادند که یک فرم فعال آنزیمی از آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز در

بتا-گلوکزیداز می‌باشد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت ویژه این دو آنزیم مبنی بر بیشتر بودن فعالیت آلفا-گلوکزیداز از



الف ب

شکل ۸- زایموگرام آنزیم‌های آلفا-گلوکزیداز (الف) و بتاگلوکزیداز (ب)

در محدوده‌ی ۶ تا ۸ و برای بتا-گلوکزیداز ۶ الی ۷، (Asadi et al., 2010) pH بهینه برای آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز در سوسک برگ‌خوار توسکا را ۵ گزارش کرده‌اند. Silva & Terra, (1997) نیز نشان دادند که آلفا-گلوکزیداز روده میانی سن *Dysdercus veruvianus* در pH برابر با ۵ دارای فعالیت بهینه بود. مقدار pH بهینه برای آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش زنبور برگ‌خوار ثانوی رز برابر با ۶ به دست آمد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، گلوکزیدازها در pH اسیدی فعالیت بیشتری دارند. گوارش مواد غذایی در روده حشرات توسط آنزیم‌های پروتئینی انجام می‌شود. هر آنزیمی در دماهای متفاوتی ساختار سه بعدی خود را از دست می‌دهد. واکنش‌های زیستی با افزایش دما سریع‌تر انجام می‌شوند، تا در نقطه‌ای که آنزیم در آن دما از شکل اصلی خود خارج می‌شود و فعالیت آنزیم به سرعت کاهش می‌یابد (Zeng & Cohen, 2001; Agblor et al., 1974). آنزیم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز در زنبور برگ‌خوار ثانوی رز در محدوده‌ی ۳۵ تا ۵۵ درجه سلسیوس دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند. دماهای بالاتر از ۵۵ درجه سلسیوس باعث بروز تغییرات در ساختار سه بعدی آنزیم‌ها شدند و فعالیت آن‌ها را

بحث

وجود آلفا- و بتا-گلوکزیداز در دستگاه گوارش اغلب راسته‌های حشرات به اثبات رسیده است به طوری که این آنزیم‌ها نقش فیزیولوژیک مهمی را در روده میانی آن‌ها ایفا می‌کنند.

از جمله می‌توان به وجود آنزیم‌های مذکور در سامانه گوارشی پشه *Aedes aegypti* Linne (Marinotti & James, 1990)، ملخ *Abraocris flavolineata* De Geer (Ferreira et al., 1999) و سن گندم *Eurygaster integriceps* Puton (Kazzazi, 2007) و بسیاری دیگر از حشرات آفت اشاره کرد. مقدار pH محتویات لوله‌ی گوارش، فاکتور اصلی تاثیرگذار بر آنزیم‌های گوارشی می‌باشد.

اغلب آلفا-گلوکزیدازهای حشرات، در pH بین ۵ تا ۶/۵ دارای فعالیت بهینه می‌باشند (Terra & Ferreira, 1994). Santos et al. (1985) pH بهینه برای *Erinnyis ello* را ۵/۸ و Ghadamyari et al. (2010) pH بهینه برای فعالیت آلفا-گلوکزیداز و بتا-گلوکزیداز موجود در لوله گوارش شب‌پره برگ‌خوار توت را به ترتیب ۷/۵ و ۵/۵، Razavi Tabatabai et al. (2010) pH بهینه برای آلفا-گلوکزیداز *Trogoderma granarium* را

عقبی شاید ناشی از وارد شدن آنزیم‌های مترشحه از روده میانی همراه غذا باشد.

نتایج این تحقیق نشان دادند که آلفا-گلوکزیداز در مقایسه با بتا-گلوکزیداز تمایل کمتری را به زیرنهشت‌اش نشان می‌دهد. مقدار K_M گزارش شده برای این آنزیم در حشرات مختلف، متفاوت می‌باشد و اغلب بین ۰/۲۴ تا ۳ میلی‌مولار متغیر است. به عنوان مثال مقدار V_{max} بتا-گلوکزیداز *Sitophilus oryzae* استفاده از زیرنهشت پارا-نیتروفنل بتا-گلوکوپیرانوزید برابر ۸/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین و مقدار K_M برای *E. ello* با همین زیرنهشت برابر با ۰/۱۸ میلی‌مولار می‌باشد (Terra & Ferreira, 1994). مقدار K_M محاسبه شده برای آنزیم بتا-گلوکزیداز روده میانی لارو سن آخر برگ‌خوار توت برابر با ۰/۹۹ میلی‌مولار و مقدار V_{max} نیز ۰/۳ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شده است (Ghadamyari et al., 2010). مقدار K_M محاسبه شده برای آنزیم بتا-گلوکزیداز روده میانی موربانه *Nasutitermes koshunensis* ۲/۵ میلی‌مولار گزارش شده است (Tokuda et al., 2002).

همچنین، مقدار K_M آنزیم بتا-گلوکزیداز روده میانی گونه‌های *Diatraea saccharalis*, *Tenebrio molitor*، *Pheropsophus aequinoctialis*، و *bipunctata* به ترتیب ۱/۳۱، ۰/۵۶، ۰/۵۷ و ۷ میلی‌مولار و مقدار V_{max} آن در این حشرات نیز به ترتیب برابر با ۰/۴۱/۶، ۰/۲۷/۲، ۱۳۰ و ۱۷۴ نانومول بر ثانیه گزارش شده است (Ferreira et al., 1999). تخمین واسنجه‌های آلفا-و بتا-گلوکزیداز کرم سبز برگ‌خوار برنج نشان داد که مقدار K_M آلفا-گلوکزیداز در لوله گوارش کرم سبز برگ‌خوار برنج برابر با ۳/۹۶ میلی‌مولار بود. همچنین، مقدار K_M بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش این آفت ۱/۹۲ میلی‌مولار برآورد گردید (Asadi et al., 2012).

در لوله گوارش لاروهای سن پنجم زنبور برگ‌خوار رز یک ایزوفرم از آنزیم‌های آلفا- و بتا- گلوکزیداز مشاهده شد که باند مربوط به آلفا-گلوکزیداز قوی تر از

کاهش دادند. Takenaka & Echigo (1978) نشان دادند که دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم‌ها در محدوده دمایی ۲۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس قرار دارد. Razavi Tabatabai et al. (2010) دمای بهینه را برای فعالیت آنزیم آلفا-گلوکزیداز لوله‌ی گوارش لمبه گندم ۳۵ تا ۵۰ درجه‌ی سلسیوس و برای بتا-گلوکزیداز ۴۰ درجه‌ی سلسیوس، Mahboobi et al. (2011) دمای بهینه را برای آنزیم‌های آلفا-و بتا-گلوکزیداز در لوله‌ی گوارش سن *Aelia acuminata* ۳۵ درجه‌ی سلسیوس، Asadi et al. (2010) درجه حرارت بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- و بتا-گلوکزیداز در لوله‌ی گوارش سوسک برگ‌خوار توسکا را به ترتیب ۵۵ و ۳۵ درجه‌ی سلسیوس، Ghadamyari et al. (2010) دمای بهینه آنزیم‌های گلوکزیداز در برگ‌خوار توت را برابر با ۴۵ درجه سلسیوس، Ramzi & Hosseininaveh (2010) دمای بهینه فعالیت آلفا- و بتا-گلوکزیداز روده‌ی میانی *Brachynema germari* را ۴۵ درجه سلسیوس محاسبه کردند و نشان دادند که این آنزیم‌ها در محدوده ۲۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند. کلیه‌ی گزارش‌های فوق، فعالیت بیشتر این دو آنزیم را در محدوده‌ی ۳۰ تا ۵۰ درجه‌ی سلسیوس نشان می‌دهند. نتایج حاصل از این تحقیق، این موضوع را نیز تایید می‌کنند. در این تحقیق همچنین نشان داده شد که آنزیم‌های آلفا-و بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش زنبور برگ‌خوار ثانوی رز وجود دارند و با افزایش سن لاروی، میزان فعالیت ویژه این آنزیم‌ها افزایش می‌یابد. همچنین، نتایج نشان دادند که میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا-و بتا-گلوکزیداز در روده میانی بیشتر از روده اول و روده عقبی بود. Sharifi et al. (2011) نشان دادند که میزان فعالیت ویژه آلفا-و بتا-گلوکزیداز روده میانی سوسک برگ‌خوار نارون از روده جلویی و روده عقبی بیشتر بود. تحقیقات نشان داده است که غدد بزاقی حشرات از اندامهای ترشح کننده گلوکزیدازها هستند (Asadi et al., 2012). به نظر می رسد شاید فعالیت این آنزیم‌ها در روده جلویی مربوط به ترشحات غدد بزاقی این حشره باشد که همراه غذا وارد روده جلویی می‌شود. منبع اصلی ترشح آنزیم‌های گوارشی روده میانی می باشد، منبع فعالیت این آنزیم‌ها در روده

تحقیق، اطلاعات پایه‌ای در مورد آنزیم‌های موجود در دستگاه گوارشی این حشره به دست آمدند که این نتایج هم برای مطالعات مقایسه‌ای مفید هستند و هم امیدواریم که در آینده بتوان با بررسی مهارکننده‌های گلوکزیدازها از جمله آلفا- و بتا-گلوکزیدازها بتوان باعث اختلال در زندگی آفت شد و در جهت کنترل این حشره گام مثبتی برداشت.

بتا-گلوکزیداز بودند. Sharifi et al. (2011) نشان دادند که بتا-گلوکزیداز سوسک برگ‌خوار نارون سه ایزوفرم داشتند. همچنین Riseh et al. (2012) تعداد ایزوفرم‌های آلفا- و بتا-گلوکزیداز سرخرطومی حنایی خرما را به ترتیب دو و سه ایزوفرم گزارش نمودند. همچنین Asadi et al. (2012) نیز نشان دادند که آلفا- و بتا-گلوکزیداز در لوله گوارش کرم سبز برگ‌خوار برنج به ترتیب دارای دو و یک ایزوفرم بودند. در این

REFERENCES

1. Abraham, E.G., Nagaragu, J. & Datta, R.K. (1992). Biochemical study of amylase in the silkworm, *Bombyx mori* L.: Comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 867-873.
2. Agblor, H., Henerson, M. & Madrid, F.J. (1974). Characterization of α -amylase and polygalacturonase from *Lygus* spp. (Heteroptera: Miridae). *Food Research*, 27, 321-326.
3. Asadi, A., Ghadamyari, M., Sajedi, R.H., Jalali, J. & Kouchaki, H. 2010. Biochemical characterization of midgut and salivary glands α - and β -glucosidases of the alder beetle, *Agelastica alni* (Col.: Chrysomelidae). 19th Iranian Plant Protection Congress. 31 July-3 August 2010, Tehran, Iran. p. 502.
4. Asadi, A., Ghadamyari, M., Sajedi, R.H., Jalali, J. & Tabari, M. 2012. Biochemical characterization of α - and β -glucosidases in alimentary canal, salivary glands and haemolymph of the rice green caterpillar, *Naranga aenescens* M. (Lepidoptera: Noctuidae). *Biologia*, 67(6), 1186-1194.
5. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
6. Budatha, M., Meur, G. & Datta-Gupta, A. (2008). Identification and characterization of midgut proteases in *Achaeta janata* and their implication. *Biotechnology Letters*, 30, 305-310.
7. Chougule, N.P., Doyle, E., Fiches, E. & Gatehouse, J. A. (2008). Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (Lep.: Noctuidae) and effect of soybean inhibitor (SKTI) in feeding assay. *Journal of Insect Physiology*, 54, 563-572.
8. Esen, A. (1993). Beta glucosidases: overview. In A. Esen (Ed). *Beta Glucosidase, Biochemistry and Molecular Biology*. American Chemical Society, Washington, pp. 1-14.
9. Ferreira, C., Marana, S.R., Silva, C. & Terra, W. R. (1999). Properties of digestive glycosidase and peptidase and the permeability of the peritrophic membranes of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123, 241-250.
10. 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(3), 197-204.
11. Hosseini, R. & Sahragard, A. (2003). Study on morphological characters and some features of biology and spatial distribution pattern of rose minor leaf eating sawfly, *Allantus viennensis* (Schr.) (Hym.; Tenthredinidae) in Guilan University. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 10(2), 103-115 (In Persian).
12. Huber, R.E. & Mathison, R.D. (1976). Physical, chemical and enzymatic studies on the major sucrose on honey bees (*Apis mellifera*). *Canadian Journal of Biochemistry*, 54, 153-164.
13. Kazzazi, M. (2007). *Study of digestive amylase and glucosidase in Eurygaster integriceps (Hemiptera: Scutelleridae) and of alpha-amylase inhibitor in wheat dominant*. Ph.D. Dissertation. Faculty of Horticulture Science and Plant Protection, University of Tehran. pp: 142.
14. Lawrence, P.K., Koundal, K. R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 (1), 93-109.
15. Mahboobi, M., Kazzazi, M. & Hosseinaveh, V. (2011). Biochemical characterisation of β -glucosidase from the midgut of *Aelia acuminata* L. (Hemiptera: Pentatomidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44 (14), 1356-1364.
16. Marinotti, O. & James, A. A. (1990). An α -glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry*, 20, 619-623.

17. Nagarju, J. & Abraham, E.C. (1995). Purification and characterization of digestive amylase from the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110, 201-209.
18. Parry, W.W. (1996). A study of the interaction of some fungal metabolites with the insect species *Drosophila melanogaster*. *Birbeck College, University of London*. 215 pp.
19. Ramzi, S. & Hosseinaveh, V. (2010). Biochemical characterization of digestive α -amylases, α -glucosidase and β -glucosidases in pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Asia- Pacific Entomology*, 13(3), 215-219.
20. Razavi Tabatabai, P., Shirafkan, Kh., Bigham, M. & Hosseinaveh V. (2010). Digestive α - and β -glucosidase activity in khapra beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). 19th Iranian Plant Protection Congress. 31July-3 August 2010, Tehran, Iran. P. 464.
21. Regnault-Roger, C., Staff, V., Philogène, B., Terron, P. & Vincent, C. (2004). Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
22. Riseh, N.S., Ghadamyari, M. & Motamediniya, B. (2012). Biochemical characterization of α and β -glucosidases and α - and β -galactosidases from red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col.: Curculionide). *Plant Protection Science*. 48, 85-93.
23. Rodriguez, C., Silva, G. & Djair, V. (2003). Bases para el Manejoracional de insecticidas: Insecticidas de origen vegetal. Faculated de Agronomia, Universidad de Concepcion, Fundacionpara la Innovacion Agraria, Concepcion, Chile.
24. Santos, C.D. & Terra, W.R. (1985). Physical properties substrate specificities and a probable mechanism for a β -D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 831, 179-185.
25. Shakiba, Y., Mostafaie, A. & Parvaneh, S. H. (2007). Purification of Kunitz soybean trypsin inhibitor using affinity chromatography. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 12 (2), 77-83.
26. Sharifi, M., Gadamyari, M., Mahadavi, M. & Saiidi, F. (2011). Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its α -amylase by inhibitors extracted from the common bean. *Archives of Biological Sciences*, Belgrade, 63 (3), 705-716.
27. Sharma, H.C. & Ortiz, R. (2000). Transgenics, pest management and the environment. *Current Science*, 79, 421-437.
28. Silva, C.P. & Terra, W.R. (1997). α -Galactosidase activity in ingested seeds and in the midgut of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34, 443-460.
29. Takenaka, T. & Echigo, T. (1978). *Properties and transglucosidation action of a glucosidase of honey bee*. Tamagawa University Press, 18, 22-31.
30. Terra, W.R. & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: Properties compartmentalization and function, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 109, 1-62.
31. Tokuda, G., Watanabe, H., Matsumoto, T. & Noda, H. (1997). Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo-b-1, 4-glucanase. *Zoological Science*, 14, 83-93.
32. Zeng, F. & Cohen, A.C. (2001). Induction of elastase in a zoophilous heteropteran, *Lygus hesperus*. *Annual of Entomological Society of America*, 94, 146-151.