نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹، ص ۱۸۶-۱۷۳

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 2, Summer 2010, p. 173-186

اثر چند ترکیب مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز روی فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی سن *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Scutelleridae)

محسن یزدانیان[1*] - رضا فرشباف پورآباد[2] - محمد رضا رشیدی[3] - مصطفی ولیزاده[4] - نادره رشتچی زاده[5] - امیر منصور وطنخواه[6] - علی اصغر حمیدی[7]

تاریخ دریافت:۸۸/۵/۱۳
تاریخ پذیرش:۸۹/۲/۸

چکیده

مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی ترکیباتی پروتئینی یا غیرپروتئینی هستند که با متصل شدن به جایگاه فعال و یا به سوبسترای آنزیم, فعالیت آن را مهار می‌کنند. ترکیبات مهارکننده‌ی گیاهی به دلیل داشتن اثر بسیار قابل توجه روی آنزیم‌های گوارشی حشرات و در نتیجه روی نشوونمای آن‌ها و نیز بی‌خطر بودن گیاهان تراژن تولید شده, امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در بررسی حاضر, اثر NaCl, Tris, اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستات دی‌سدیم دی‌هیدرات (EDTA), سدیم دودسیل سولفات (SDS) و مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز استحصالی از دانه‌های گندم (WAAI type 1) طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون روی فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل سن *Graphosoma lineatum* (L.) بررسی گردید. آب مقطر نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که اثر نوع ترکیب مهارکننده روی فعالیت کلی آلفا- آمیلاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. به طور کلی, فعالیت آلفا- آمیلاز در NaCl, EDTA و Tris بیش‌ترین مقدار خود را داشت (حدود۵۴ درصد شاهد) و با هم فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. پس از آن, بیش‌ترین فعالیت آنزیم مربوط به SDS (تقریبا ۳۱ درصد شاهد) و سپس WAAI (تقریبا ۱۲/۵ درصد شاهد) بود که با هم و نیز با سه ترکیب قبلی اختلاف معنی‌دار داشتند. همچنین, آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل ماده در مقایسه با آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر در مقابل غلظت‌های پایین ترکیبات مهارکننده‌ی NaCl, EDTA, Tris و SDS (۱ و ۲ میلی مولار) مقاومت بیش‌تری نشان داد و در اوایل دوره‌ی انکوباسیون، توسط آن‌ها به میزان کم‌تری مهار شد.

واژه‌های کلیدی: آلفا- آمیلاز بزاقی، ترکیبات مهارکننده، فعالیت، *Graphosoma lineatum*

مقدمه

مهارکننده‌های آلفا- آمیلازها از نظر کلی به دو گروه مهارکننده‌های غیرپروتئینی و مهارکننده‌های پروتئینی تقسیم می‌شوند. گروه مهارکننده‌های غیرپروتئینی شامل انواع مختلفی از ترکیبات آلی مانند آکاربوز، ایزوآکاربوز، آکارویوزین- گلوکز، هیبیسکوس اسید و سایکلودِکسترین‌ها می‌باشد. مهارکننده‌های پروتئینی در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران یافت می‌شوند. در گیاهان، مهارکننده‌های پروتئینی عمدتا در غلاتی مانند گندم، جو، سورگوم، چاودار و برنج وجود دارند اما در لگومینه‌هایی مانند لوبیای سودانی، باقلا و لوبیای معمولی هم یافت می‌شوند. این مهارکننده‌ها با وزن ملکولی منومری ۵، ۹ و ۱۳، وزن هومودایمری و هترودایمری تقریبا ۲۶، و وزن تترامری ۵۰ کیلودالتون می‌باشند (۷). ژن‌های رمزگذار بالقوه‌ی پروتئین‌های سمی به عنوان یک راهبرد در جهت افزایش مقاومت به آفات حشره‌ای و بیمارگرها، به ژنوم گیاهان زراعی وارد شده‌اند. یکی از اولین مثال‌ها در زمینه‌ی یک گیاه تراژن که یک پروتئین دفاعی هترولوگ را رمزگذاری می‌کند، به سال ۱۹۸۷ میلادی برمی‌گردد که در این سال، مهارکننده‌ی تریپسین گیاه باقلا در برگ‌های توتون حاوی ژن این مهارکننده تجلی یافت. این کار با تلاش‌های بسیار زیاد مشابهی در سایر گونه‌های گیاهی و از طریق استفاده از پروتئین‌های مختلف بالقوه سمی مانند لِکتین‌ها، مهارکننده‌های پروتئینازها، مهارکننده‌های آلفا- آمیلازها و دلتا-

۱- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(* - نویسنده مسئول: Email:mohsenyazdanian@yahoo.com)
۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳و۷- دانشیار گروه شیمی دارویی و کارشناس آزمایشگاه آنالیز افزاری دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز
۵و۶- استادیار آزمایشگاه متابولیسم دارو و بیوشیمی، و کارشناس آزمایشگاه عمومی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

آاندوتوکسین باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner ادامه یافت (۶، ۸، ۱۸، ۲۰ و ۲۱).

یافتن جایگزین‌های جدید برای سموم *Bt* بدین جهت ضروری است که همانند سایر آفت‌کش‌ها، مقاومت به برخی سموم *Bt* ایجاد شده و در نهایت، گسترش خواهد یافت. در این راستا، گروهی از ژن‌هایی که برای مهندسی ژنتیک محصولات مهم ایده‌آل هستند، ژن‌های مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات می‌باشند. در زمینه‌ی مهارکننده‌های آمیلازها و پروتئازها پیشرفت‌های قابل توجهی حاصل شده است. برخلاف سموم *Bt*، این پروتئین‌ها به مدت میلیون‌ها سال در زنجیره‌ی غذایی انسان وجود داشته‌اند چرا که گیاهان، هر دو نوع این مهارکننده‌ها را به عنوان بخشی از سازوکارهای دفاعی طبیعی‌شان دارا می‌باشند. این مهارکننده‌ها اغلب تخصص‌گرایی زیادی نشان می‌دهند. یک مهارکننده‌ی مشخص ممکن است روی آنزیم‌های گوارشی عمده‌ی فقط یک گونه حشره اثر مهارکنندگی داشته باشد و نه روی سایر گونه‌ها (۱۸).

مهارکننده‌های پروتئینی آنزیم‌ها نسبت به آنزیم‌های هدف خود تخصص‌گرایی زیادی نشان می‌دهند (۲۳). به عنوان مثال، در گونه‌ی *Costelytra zealandica* (White)، منومر گندم و دایمر گندم روی فعالیت آلفا- آمیلاز روده به ترتیب ۵۷ و ۵۵ درصد مهارکنندگی نشان دادند اما مهارکننده‌های تترامریک گندم، جو و لوبیای معمولی هیچ‌گونه اثر مهارکنندگی نداشتند (۵). پروتئینی که فعالیت یک آلفا- آمیلاز را مهار می‌کند ممکن است همین اثر را روی یک آلفا- آمیلاز دیگر نداشته باشد (۲۳). مثلا مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز لوبیای معمولی فعالیت آلفا- آمیلازهای گیاهی، قارچی و باکتریایی را مهار نمی‌کند اما روی فعالیت آلفا- آمیلازهای پستانداران و برخی از حشرات، اثر مهارکنندگی دارد (۲۴). در بررسی حاضر، اثر پنج ترکیب که روی آلفا- آمیلازهای بیش‌تر حشرات اثر مهارکنندگی داشته‌اند، روی آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی سن *G. lineatum* برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت. تحقیق در زمینه‌ی فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی می‌تواند در نهایت در امر بهبود پرورش حشرات مفید (با استفاده از فعال‌کننده‌ها) و کنترل آفات (با استفاده از مهارکننده‌ها) مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

حشرات کامل سن نواری چتریان، *G. lineatum*، پس از جمع‌آوری شدن از روی شوید و از محوطه‌ی مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان، به انسکتاریوم گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز منتقل شدند و نسبت به پرورش آن‌ها اقدام گردید. پرورش آزمایشگاهی این حشره با توجه به منابع موجود (۱ و ۲) انجام شد. تمام مراحل مختلف نشوونمایی در دمای ۲±۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد و فتوپریود ۱۶:۸ L:D پرورش داده شدند. حشرات به مدت ۱۰ نسل روی دانه‌های جعفری خالص‌سازی گردیدند و از نسل دهم به بعد برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

خارج ساختن غدد بزاقی حشرات کامل و آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی غده‌ی بزاقی

غدد بزاقی حشرات کامل با توجه به روش یزدانیان و همکاران (۳) از داخل بدن آن‌ها خارج شدند. کمپلکس غدد بزاقی ۴۰ حشره‌ی کامل نر، یا ۴۰ حشره‌ی کامل ماده شامل غده‌ی اصلی، غده‌ی ضمیمه و مجاری مربوط به آن‌ها پس از جدا شدن از بدن حشرات کامل و پوره‌ها، در آب مقطر سرد (دمای حدود ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) شسته شدند و هر ۴۰ جفت با هم در داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر سرد قرار داده شدند. سپس، نمونه‌ها هموژنیزه و با استفاده از یک سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند. محلول‌های روشناور بلافاصله به میکروتیوب‌های دیگری حاوی مشخصات مربوطه منتقل و آزمایش‌های مربوط به سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از آن‌ها انجام شدند.

سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز

فعالیت آلفا- آمیلاز با استفاده از یک کیت تشخیصی (کیت آمیلاز، ساخت شرکت پارس آزمون، ایران) و به روش یزدانیان و همکاران (۳) اندازه‌گیری شد.

ترکیبات مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز

اثرات Tris، اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستات دی‌سدیم دی‌هیدرات[1] (EDTA)، سدیم دودسیل سولفات[2] (SDS)، کلرید سدیم (NaCl)[3] و مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز حاصله از گندم (WAAI type1)[4] روی فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی بررسی گردید. غلظت‌های از یک تا ۵ میلی مولار چهار ترکیب اول و نیز غلظت‌های از یک تا ۵ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر WAAI (۱-۵ µg/۲۱۰µl) در آب مقطر تهیه شدند و pH با استفاده از اسید سیتریک و هیدروکسید سدیم روی ۶/۵ تنظیم گردید (۲۵). محلول آنزیمی حاوی ۴۰ جفت غده‌ی بزاقی به ازای یک میلی‌لیتر آب مقطر بود. حشرات کامل نر و

1- Ethylenediaminetetraacetate disodium dihydrate
2- Sodium dodecyl sulfate
۳- Tris، SDS و NaCl محصول شرکت Merck آلمان و EDTA محصول شرکت Carlo Erba Reagenti ایتالیا بودند.
4- Sigma Catalog No., A-1520, Sigma, St. Louis, MO.

ماده (به صورت جداگانه) بدون توجه به سن از کلنی انتخاب شدند. ۳۰۰µl از هر یک از محلول‌های فوق با ۳۰µl محلول آنزیمی در داخل تیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری مخصوص دستگاه اتوآنالایزر مخلوط شد و فعالیت آنزیم ۵ دقیقه پس از مخلوط شدن محلول‌ها تا ۶۰ دقیقه (از دقیقه‌ی دهم به بعد در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای) اندازه‌گیری گردید. تیمار شاهد متشکل از ۳۰۰µl آب مقطر به اضافه‌ی ۳۰µl محلول آنزیمی نر یا ماده بود. فعالیت آنزیم در هر یک از ترکیبات فوق از طریق مقایسه‌ی فعالیت آنزیم در محلول‌های مهارکننده با فعالیت آن در آب مقطر (شاهد) تعیین شد.

طرح‌های آزمایشی مورد استفاده

در زمینه‌ی اثر Tris، EDTA، SDS، NaCl و WAAI روی فعالیت آنزیم، طرح‌های آزمایشی به صورت زیر اجرا شدند: اثر هر کدام از غلظت‌های مربوط به هر ترکیب به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور: مدت زمان انکوباسیون (در ۷ سطح ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه) و جنسیت حشرات کامل (در ۲ سطح نر و ماده) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این راستا، ۱۴ تیمار در ۴ تکرار بررسی شد. همچنین، فعالیت کلی آنزیم در ترکیبات مختلف به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور: نوع ترکیب (در ۵ سطح) و جنسیت حشرات کامل (در ۲ سطح) در ۴ تکرار بررسی شد. در این زمینه هم فعالیت کلی آنزیم حشرات کامل در هر ترکیب با ۵ تیمار و ۸ تکرار به صورت طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل گردید.

تجزیه‌های آماری

پیش از تجزیه‌ی واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C مورد آزمون قرار گرفت و در صورت نیاز تبدیل مناسب انجام شد. سپس با استفاده از همین نرم‌افزار، تجزیه واریانس‌ها انجام شدند. کلیه‌ی حدود اطمینان و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار فوق و به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد ($P< ۰/۰۱$) مورد اعمال قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه‌ی ۲۰۰۳ استفاده گردید.

نتایج

اثر NaCl روی فعالیت آلفا- آمیلاز

در شکل ۱ روند و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار NaCl طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون نشان داده شده است. در غلظت ۱ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم حشرات کامل ماده تا دقیقه‌ی ۳۰ به طور معنی‌داری بیش‌تر از فعالیت آن در حشرات کامل نر بود (بدین معنی که اثر مهارکنندگی NaCl روی آنزیم حشرات کامل نر بیش‌تر از ماده‌ها بوده است) ولی از دقیقه‌ی ۴۰، اختلاف بین آن‌ها غیرمعنی‌دار گردید. در غلظت ۲ میلی‌مولار نیز همین حالت تا دقیقه‌ی ۲۰ دیده شد، با این تفاوت که علی‌رغم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین فعالیت آنزیم در حشرات کامل نر و ماده، اختلاف بین آن‌ها کم‌تر بود. در این غلظت، فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده از دقیقه‌ی ۳۰ فاقد اختلاف معنی‌دار شد. این امر، دلیل معنی‌دار شدن اثر متقابل دو فاکتور مورد بررسی بوده است. در غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده با هم و نیز در طول دوره‌ی انکوباسیون فاقد اختلاف معنی‌دار بود. مقایسه‌ی شکل‌ها نشان می‌دهد که درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل نر در کلیه‌ی غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار NaCl حدودا ۴۶ تا ۵۱ درصد بوده است اما در حشرات کامل ماده، فعالیت آنزیم در غلظت ۱ میلی‌مولار تا دقیقه ۳۰ حدودا تا ۳۰ درصد و در غلظت ۲ میلی‌مولار تا دقیقه‌ی ۲۰، حدودا تا ۳۸ درصد مهار شد. درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل ماده در سایر مدت زمان‌های انکوباسیون این دو غلظت و در سایر غلظت‌ها (حدودا ۴۸ درصد) مشابه حشرات کامل نر بود. درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل توسط غلظت‌های مختلف NaCl از ۴۰ تا ۴۸ درصد متغیر بود که اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

اثر EDTA روی فعالیت آلفا- آمیلاز

در شکل ۲، روند و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار EDTA طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون نشان داده شده است. در غلظت ۱ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم حشرات کامل ماده تا دقیقه‌ی ۲۰ به طور معنی‌داری بیش‌تر از فعالیت آن در حشرات کامل نر بود (یعنی اثر مهارکنندگی EDTA روی آنزیم حشرات کامل نر بیش‌تر از ماده‌ها بوده است) ولی از دقیقه‌ی ۳۰، اختلاف بین آن‌ها غیرمعنی‌دار شد که همین امر، دلیل معنی‌دار شدن اثر متقابل دو فاکتور بوده است. در غلظت ۲ میلی‌مولار، این حالت فقط در دقیقه‌ی ۵ مشاهده شد و از دقیقه‌ی ۱۰ به بعد، اختلاف در فعالیت آنزیم بین حشرات کامل نر و ماده، غیرمعنی‌دار بود. در غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده با هم و نیز در طول دوره‌ی انکوباسیون اختلاف معنی‌داری نشان نداد. با مشاهده‌ی شکل ۲ مشخص می‌شود که درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل نر در کلیه‌ی غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار EDTA تقریبا از ۴۶ تا ۵۰ درصد متغیر بود اما در حشرات کامل ماده، فعالیت آنزیم در غلظت ۱ میلی‌مولار تا دقیقه‌ی ۲۰ حدودا تا ۲۸ درصد و در غلظت ۲ میلی‌مولار تا دقیقه‌ی ۱۰ حدودا تا ۳۷ درصد مهار شد. درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل ماده در

سایر مدت زمان‌های انکوباسیون این دو غلظت و در سایر غلظت‌ها (حدودا ۴۸ درصد) مشابه حشرات کامل نر بود. درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل توسط غلظت‌های مختلف EDTA از ۳۷ تا ۴۸ درصد متغیر بود که اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

اثر Tris روی فعالیت آلفا- آمیلاز

فعالیت آنزیم در Tris تا حدود زیادی مشابه فعالیت آن در NaCl و EDTA بود. شکل ۳ روند و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده را در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار Tris طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون نشان می‌دهد. در غلظت ۱ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم حشرات کامل ماده تا دقیقه‌ی ۳۰ به طور معنی‌داری بیش‌تر از فعالیت آن در حشرات کامل نر بود (یعنی اثر مهارکنندگی Tris روی آنزیم حشرات کامل نر بیش‌تر از ماده‌ها بوده است) ولی از دقیقه‌ی ۴۰، اختلاف بین آن‌ها غیرمعنی‌دار شد. در غلظت ۲ میلی‌مولار، این حالت تا دقیقه‌ی ۲۰ مشاهده شد و از دقیقه‌ی ۳۰ به بعد، اختلاف در فعالیت آنزیم بین حشرات کامل نر و ماده غیرمعنی‌دار بود. این روند غیرمعنی‌دار شدن فعالیت آنزیم بین حشرات کامل نر و ماده باعث معنی‌دار شدن اثر متقابل دو فاکتور مورد بررسی شد. در غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار، همانند NaCl و EDTA، فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده با هم و نیز در طول دوره‌ی انکوباسیون اختلاف معنی‌داری نداشت. شکل ۳ نشان می‌دهد که درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل نر در کلیه‌ی غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار Tris، همانند EDTA، تقریبا از ۴۶ تا ۵۰ درصد متغیر بود. در حشرات کامل ماده، فعالیت آنزیم در غلظت ۱ میلی‌مولار تا دقیقه‌ی ۳۰ حدودا تا ۳۵ درصد و در غلظت ۲ میلی‌مولار تا دقیقه‌ی ۲۰ حدودا به میزان ۳۸ درصد مهار شد. درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل در سایر مدت زمان‌های انکوباسیون این دو غلظت و در سایر غلظت‌ها تقریبا ۴۸ درصد و مشابه حشرات کامل بود. درصد مهار شدن فعالیت آنزیم حشرات کامل توسط غلظت‌های مختلف Tris از ۴۱ تا ۴۹ درصد متغیر بود که اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. این میزان تقریبا معادل اثر مهارکنندگی NaCl (۴۰ تا ۴۸ درصد) است ولی با میزان مهارکنندگی EDTA (۳۷ تا ۴۸ درصد) نیز اختلاف بسیار کمی دارد.

اثر SDS روی فعالیت آلفا- آمیلاز

فعالیت آنزیم در SDS با فعالیت آن در NaCl، EDTA و Tris تا حدود زیادی متفاوت بود. شکل ۴ روند و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده را در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار SDS طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون نشان می‌دهد. در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم حشرات کامل ماده فقط در دقیقه‌ی ۵ به طور معنی‌داری بیش‌تر از فعالیت آن در حشرات کامل نر بود (بدین معنی که اثر مهارکنندگی SDS روی آنزیم حشرات کامل نر بیش‌تر از ماده‌ها بوده است) ولی از دقیقه‌ی ۱۰ به بعد، اختلاف بین آن‌ها غیرمعنی‌دار گردید. در این دو غلظت، فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون تا انتهای دقیقه‌ی ۶۰ تقریبا یکسان و فاقد اختلاف معنی‌دار بود. در غلظت‌های ۳ و ۴ میلی‌مولار، بین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده اختلافی وجود نداشت (یعنی برخلاف دو مورد قبلی، آنزیم حشرات کامل ماده در غلظت‌های ۳ و ۴ میلی‌مولار از همان ابتدا توسط SDS همانند آنزیم حشرات کامل نر مهار شد و در برابر آن مقاومت بیش‌تری نشان نداد). در این دو غلظت، فعالیت آنزیم با طولانی‌تر شدن مدت زمان انکوباسیون کاهش یافت به طوری که در غلظت ۳ میلی‌مولار، فعالیت آن تا دقیقه‌ی ۲۰ روندی کاهشی را نشان داد ولی پس از آن، تا دقیقه‌ی ۶۰ ثابت ماند. در غلظت ۴ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم تا دقیقه‌ی ۱۰ روندی کاهشی داشت ولی از دقیقه‌ی ۲۰ تا دقیقه‌ی ۶۰، فعالیت آن ثابت ماند. در غلظت ۵ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم از ابتدای انکوباسیون تا دقیقه‌ی ۶۰ در حشرات کامل نر و ماده یکسان و روند آن نیز ثابت بود. نتایج همچنین نشان دادند که با افزایش غلظت SDS، درصد مهارکنندگی آن نیز افزایش یافت به طوری که از حدود ۵۰ تا ۵۵ درصد در نرها و ۴۲ تا ۵۰ درصد در ماده‌ها در غلظت ۱ میلی‌مولار، به حدود ۸۴ تا ۸۸ درصد در هر دو جنس در غلظت ۵ میلی‌مولار رسید. میزان مهار شدن فعالیت آنزیم به ویژه در غلظت‌های بالای SDS، با NaCl، EDTA و Tris متفاوت و از آن‌ها بیش‌تر بود.

اثر WAAI روی فعالیت آلفا- آمیلاز

فعالیت آنزیم در WAAI با فعالیت آن در NaCl، EDTA و Tris تا حدود زیادی متفاوت، ولی با فعالیت آن در SDS تا حدود زیادی مشابه بود. شکل ۵ روند و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده را در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر WAAI طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون نشان می‌دهد. در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر، فعالیت آنزیم در دقیقه‌ی ۵ بیش‌ترین مقدار خود را داشت (یعنی اثر مهارکنندگی WAAI روی فعالیت آنزیم، کم‌ترین مقدار خود را داشته است) و در حشرات کامل نر و ماده فاقد اختلاف معنی‌دار بود. در این غلظت‌ها، فعالیت آنزیم از دقیقه‌ی ۱۰ تا دقیقه‌ی ۶۰ در حشرات کامل نر و ماده و در مدت زمان‌های مختلف انکوباسیون، یکسان و فاقد اختلاف معنی‌دار بود به طوری که از فعالیت آن در دقیقه‌ی ۵ کم‌تر (تقریبا نصف میزان آن) بود و با آن اختلاف معنی‌داری داشت. در غلظت‌های ۴ و ۵ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر نیز همین حالت مشاهده شد با

این تفاوت که در بعضی موارد، بین فعالیت آنزیم در دقایق از ۱۰ تا ۶۰ و فعالیت آن در دقیقه‌ی ۵ اختلاف غیرمعنی‌دار وجود داشت که علت آن، کاهش فعالیت آنزیم در این دو غلظت نسبت به سه غلظت قبلی می‌باشد (از حدود ۲۲ تا ۲۶ درصد شاهد در سه غلظت ۱، ۲ و ۳ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر به حدود ۱۸ درصد شاهد در غلظت‌های ۴ و ۵ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر). عدم وجود اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده همانند حالت مشاهده شده برای غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار ترکیبات قبلی می‌باشد. در تمام غلظت‌ها، روند کاهش فعالیت آنزیم فقط تا دقیقه‌ی ۱۰ ادامه داشت ولی از آن به بعد، فعالیت آن تا دقیقه‌ی ۶۰ ثابت ماند. نتایج همچنین نشان دادند که با افزایش غلظت WAAI، درصد مهارکنندگی آن نیز افزایش یافت به طوری که از حدود ۷۳ تا ۹۰ درصد در نرها و ۷۳ تا ۸۹ درصد در ماده‌ها در غلظت ۱ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر، به حدود ۸۲ تا ۹۲ درصد در نرها و ۸۲ تا ۹۰ درصد در ماده‌ها در غلظت ۵ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر رسید. میزان مهار شدن فعالیت آنزیم توسط WAAI به طور قابل‌توجهی بیش‌تر از NaCl، EDTA و Tris بود. در مقایسه با این ترکیبات، اثر مهارکنندگی SDS به WAAI شباهت بیش‌تری داشت.

فعالیت کلی آلفا- آمیلاز در NaCl، EDTA، Tris، SDS و WAAI

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به فعالیت کلی آلفا- آمیلاز حشرات کامل نر و ماده و داده‌های مربوط به فعالیت کلی آلفا- آمیلاز حشرات کامل در ترکیبات مهارکننده‌ی مختلف، در شکل ۶ (الف) ارایه شده است. بیش‌ترین میانگین فعالیت آنزیم (یا کم‌ترین درصد مهار شدن آن) مربوط به حشرات کامل ماده در سه ترکیب NaCl، EDTA و Tris بود که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. پس از آن، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به حشرات کامل نر همین سه ترکیب بود که آن‌ها نیز فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. بین میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده در سه ترکیب فوق اختلاف معنی‌دار وجود داشت. فعالیت آنزیم در SDS کم‌تر از NaCl، EDTA و Tris بود ولی همانند آن‌ها، بین میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده اختلاف معنی‌دار وجود داشت. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم (یا بیش‌ترین درصد مهار شدن آن) در WAAI مشاهده شد که به طور قابل توجه و معنی‌داری از ترکیب‌های قبلی و به ویژه سه ترکیب اولی (NaCl، EDTA و Tris) کم‌تر بود، ضمن آن که برخلاف ترکیبات قبلی بین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. فعالیت آنزیم حشرات کامل ماده در NaCl، EDTA و Tris حدودا معادل ۵۶ درصد شاهد و فعالیت آنزیم حشرات کامل نر نیز حدودا معادل ۵۲ درصد شاهد بود. فعالیت آنزیم در SDS کاهش یافت و به حدود ۳۲ درصد شاهد در ماده‌ها و ۳۰ درصد شاهد در نرها رسید. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم نیز همان طور که قبلا گفته شد، در WAAI مشاهده شد که این مقدار در ماده‌ها حدودا ۱۳ درصد و در نرها حدودا ۱۲ درصد شاهد بود.

شکل ۶ (ب) نیز نشان می‌دهد که به طور کلی، فعالیت آلفا- آمیلاز حشرات کامل سن نواری چتریان در NaCl، EDTA و Tris بیش‌ترین مقدار را داشت (حدودا ۵۴ درصد شاهد) و با هم فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. پس از آن، بیش‌ترین فعالیت آنزیم مربوط به SDS (تقریبا ۳۱ درصد شاهد) و سپس WAAI (تقریبا ۱۲/۵ درصد شاهد) بود که با هم و نیز با سه ترکیب قبلی اختلاف معنی‌دار داشتند.

بحث

نتایج کلی حاصل از این بررسی نشان دادند که از بین چهار ترکیب مهارکننده‌ی NaCl، EDTA، Tris و SDS، درصد مهارکنندگی SDS بسیار نزدیک به WAAI بود. با توجه به ارقام فوق، درصد مهارکنندگی ترکیبات NaCl، EDTA و Tris تقریبا برابر با ۴۶ درصد و درصد مهارکنندگی SDS و WAAI نیز به ترتیب تقریبا ۶۹ و ۸۷/۵ درصد بود. لذا، قدرت مهارکنندگی NaCl، EDTA و Tris برابر با ۵۲/۵۷ درصد WAAI و قدرت مهارکنندگی SDS نیز برابر با ۷۸/۸ درصد WAAI بود (به عبارت دیگر، قدرت مهارکنندگی SDS حدودا ۱/۵ برابر قدرت مهارکنندگی NaCl، EDTA و Tris بوده است). بررسی ساختمان شیمیایی SDS خواهد توانست به عنوان راهنمایی در جهت تولید احتمالی ترکیبات مهارکننده‌ی مناسب، مورد استفاده قرار بگیرد.

به خوبی معلوم شده است که برخی از آمیلازهای جانوری توسط آنیون‌های خاصی، به ویژه Cl^-، فعال می‌شوند. آمیلاز روده‌ی میانی *Tenebrio molitor* L. توسط Ca^{2+} و Cl^- و نیز آلفا- آمیلاز *Bacillus subtilis* Cohn توسط Cl^- به میزان اندکی فعال می‌شوند (۱۲). غیرفعال شدن آمیلاز از طریق جدا شدن یون کلراید و فعال شدن دوباره‌ی آن بر اثر اضافه شدن دوباره‌ی این یون، در سوسری *Blattella germanica* (L.) مشاهده شده است (۱۲). NaCl آمیلاز بزاقی کرم ابریشم را فعال می‌کند. آمیلاز همولنفی این حشره نیز توسط NaCl به شدت فعال می‌شود (اثر فعال‌کنندگی از غلظت 10^{-4} M شروع می‌شود و در غلظت حدود 10^{-2} M به حداکثر مقدار خود می‌رسد)، در حالی که آنزیم شیره‌ی گوارشی همین حشره تحت تاثیر آن قرار نمی‌گیرد (۱۲). کلراید در بزاق و شیره‌ی روده‌ی جانوران و نیترات نیز به فراوانی در شیره‌های گیاهی وجود دارند. بنابراین، به نظر می‌رسد که اثرات فعال‌کنندگی Cl^- یا NO_3^- یا هر دو روی آنزیم‌های گوارشی ممکن است شرایط هضم غذا را مطلوب‌تر سازد. عنوان شده که نقش یون Cl^- در بزاق انسان به عنوان یک فعال‌کننده یا کاتالیست و یا جزیی از یک کوآنزیم لازم

برای فعالیت آمیلاز بزاقی می‌باشد (۱۰). به نظر می‌رسد که آلفا- آمیلازهای فعال‌شونده توسط Cl^- در میان ناجوربالان و جوربالان پراکنش وسیعی دارند (۲۵). هوری (۱۰) اظهار داشته که NO_3^- (با منشا گیاهی) و Cl^- (با منشا گیاهی یا موجود در بدن خود حشره) ممکن است در هضم غذای حشراتی مانند *Adelphocoris suturalis* Jakovlev و *Lygus disponsi* Linnavuori نقش بسیار مهمی داشته باشند. آنزیم آمیلاز بزاقی *L. disponsi* توسط Cl^- و NO_3^- به شدت فعال شد (۱۱ و ۱۲) و بیش‌ترین فعالیت آن در غلظت‌های $9/2\times10^{-3}$ تا $6/8\times10^{-2}$ مولار مشاهده گردید. سیترات و یون SO_4^- فعالیت آنزیم را اندکی افزایش دادند به طوری که بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت $1/4\times10^{-1}$ M آن‌ها مشاهده گردید (۱۲). NaCl و KNO_3 فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی (L.) *Dolycoris baccarum* را اندکی افزایش دادند در حالی که آنزیم *A. suturalis* توسط NaCl به شدت و توسط KNO_3 به طور متوسطی فعال گردید (۱۰). بنا به گزارش هوری (۱۴)، فعال شدن آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی ناجوربالان توسط Cl^- و NO_3^- تحت تاثیر موقعیت تاکسونومیکی و شرایط زیست‌محیطی آن‌ها قرار دارد.

با توجه به این واقعیت، می‌توان گفت که الگوی فعال شدن آمیلاز بزاقی توسط Cl^- و نیز NO_3^- بیش‌تر وابسته به تغییر عادات تغذیه‌ای ناجوربالان می‌باشد که در طول فرایند تکامل اتفاق افتاده است (۱۳ و ۱۴). NaCl و KNO_3 در غلظت M $2/8\times10^{-2}$، pH ۷ و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، فعالیت آلفا- آمیلاز گونه‌ی *Graphosoma rubrolineatum* (Westwood) را به ترتیب تا ۹۰ و ۹۷ درصد شاهد کاهش دادند (۱۰). یون‌های Cu^{2+} و Hg^{2+} فعالیت آلفا- آمیلاز *L. disponsi* را مهار می‌کنند (۱۱).

بررسی اثر ترکیبات مهارکننده‌ی منومر گندم، دایمر گندم، مهارکننده‌ی لوبیای معمولی، تترامر گندم و تترامر جو بر فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای *C. zealandica* در pH ۸/۵ نشان داد که در این pH، منومر و دایمر گندم در غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۵۷ و ۵۵ درصد مهارکنندگی نشان دادند. با وجود این، مهارکننده‌های تترامری گندم، جو و نیز مهارکننده‌ی لوبیای معمولی هیچگونه اثر مهارکنندگی نشان ندادند، ترکیبات مهارکننده‌ی استخراج شده از سایر گرامینه‌ها مثل گونه‌های *Lolium*، *Festuca* و *Poa* نیز در pH ۸/۵ روی آلفا- آمیلاز روده‌ای گونه‌ی فوق، اثرات مهارکنندگی داشتند (۵). تیتارنکو و کریسپیلز (۲۲) با مطالعه‌ی اثر دو نوع مهارکننده‌ی به خوبی شناخته شده‌ی آلفا- آمیلاز یعنی AI-1 حاصله از لوبیای معمولی و مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز حاصله از گندم (WI) روی فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای سوسک ریشه‌خوار غربی ذرت، *D. virgifera virgifera* LeConte دریافتند که WI در مقایسه با AI-1، در برابر کل آلفا- آمیلاز حشره فعال‌تر بود. در غلظت ۲/۵ µg، مهارکنندگی WI دو برابر AI-1 بود. در غلظت‌های بالاتر (۱۵ µg) مهار شدن فعالیت آلفا- آمیلاز توسط WI، ۷۶ درصد بود در حالی که مهارکنندگی ایجاد شده توسط AI-1، ۴۳ درصد برآورد گردید. غلظت‌های بالاتر مهارکننده‌ها، درصد مهارکنندگی را افزایش ندادند. مخلوط این دو مهارکننده تا حدودی اثر هم‌افزایی (سینرژیستی) نشان داد. از بین چهار نوع مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز حاصله از گندم، نوع A تنها فعالیت را مهار می‌کند و روی آلفا- آمیلازهای حشرات بی‌تاثیر است. برعکس، انواع B، C و D روی آلفا- آمیلاز لوزالمعده‌ی خوک اثر ندارند ولی آلفا- آمیلازهای لاروهای حشراتی مانند *Tribolium confusum* Duval و *Callosobruchus maculatus* (F.) را به شدت مهار می‌کنند (۱۹). مهارکننده‌ی استخراج شده از دانه‌های تاج خروس، فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای سوسک *Prostephanus truncatus* (Horn) را به طور کامل (۱۰۰ درصد) مهار کرد اما مهارکننده‌های استخراجی از دانه‌های ذرت و لوبیای tepary، فعالیت آن را به ترتیب به میزان ۲/۱ و ۷ درصد مهار نمودند (۱۷). در سه گونه از شب‌پره‌های پیچاننده‌ی برگ به نام‌های *Epiphyas postvittana* (Walker)، *Planotortrix octo* Dugdale و *Ctenopseustis obliquana* (Walker)، برای جبران اثرات مهارکنندگی ترکیبات مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز، تولید آنزیم افزایش می‌یابد (۲۶). AI-1 حاصله از لوبیای معمولی، در غلظت‌های بسیار پایین هم فعالیت آلفا- آمیلازهای روده‌ای *C. maculatus* و *C. chinensis* (L.) را به طور کامل (۱۰۰ درصد) مهار می‌کند (۱۶ و ۲۳).

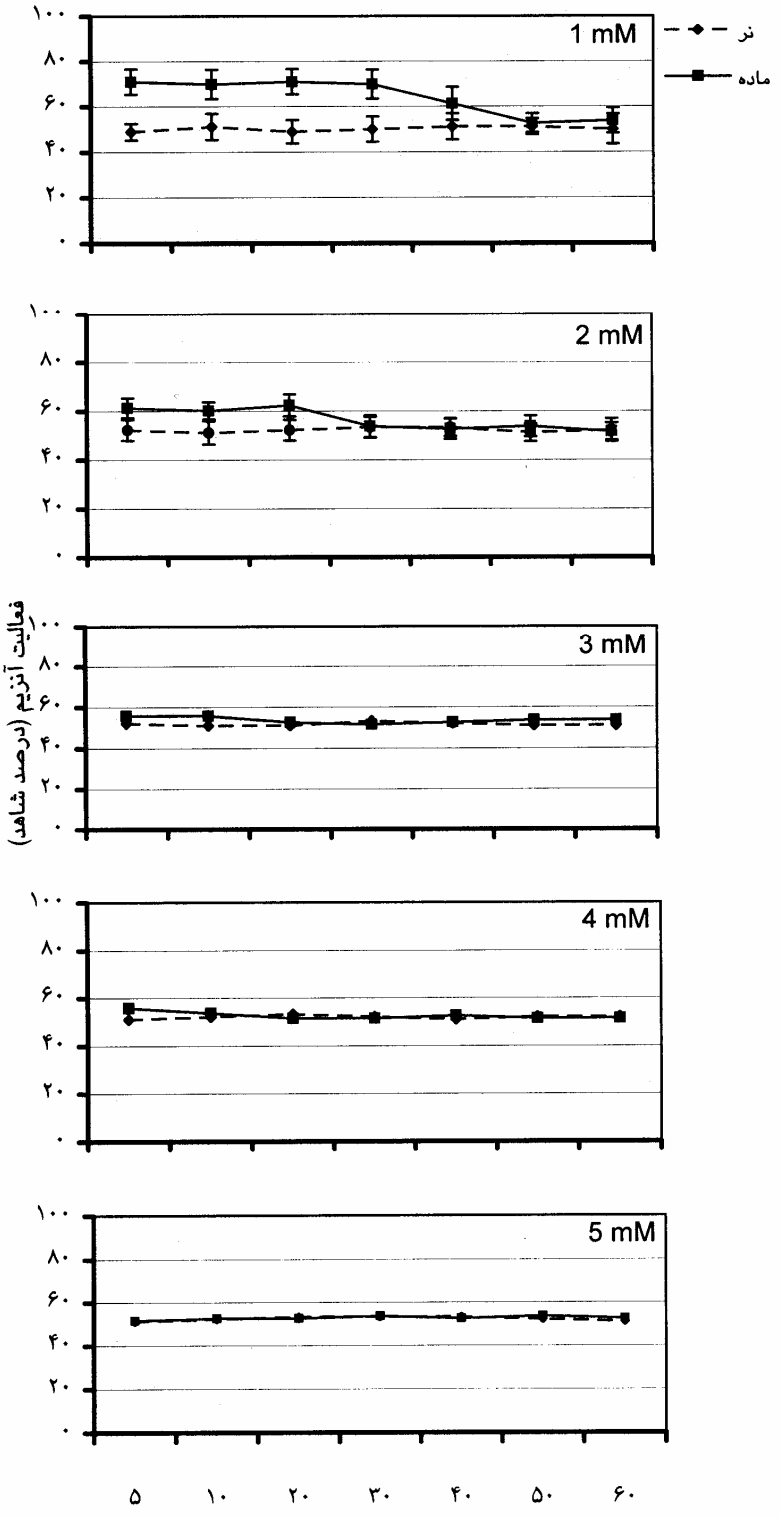
زنگ و کوهن (۲۵) اثر NaCl، EDTA، Tris، SDS و WAAI را روی فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی سن‌های *Lygus hesperus* (Knight) و *L. lineolaris* Palisot de Beauvois بررسی کردند. NaCl فعالیت آنزیم هر دو گونه را نسبت به شاهد (آب مقطر) افزایش داد (به ترتیب به میزان ۱۱۳ و ۱۲۰ درصد شاهد). EDTA، SDS و WAAI فعالیت آنزیم هر دو گونه را به شکل معنی‌داری کاهش دادند (به ترتیب به میزان ۳۸، ۹ و ۹ درصد شاهد در مورد گونه‌ی اول و ۳۳، ۵ و ۵ درصد در مورد گونه‌ی دوم). با گذشت زمان، میزان مهارکنندگی افزایش یافت. نامبردگان دلیل این امر را واسرشته (دناتوره) شدن آنزیم، یا جدا شدن کاتیون‌هایی مانند Ca^{2+} از آنزیم ذکر کرده‌اند. Tris فعالیت آلفا- آمیلاز را به شکل متوسطی کاهش داد (به ترتیب به میزان ۵۵ و ۵۲ درصد شاهد)، هرچند، مهارکنندگی آن نیز با گذشت زمان افزایش یافت. طبق گفته‌ی محققان فوق، دلیل این امر شناخته نشده است. مهارکننده‌های مورد استفاده در این بررسی بدین خاطر انتخاب شدند تا نتایج آن با مقادیر گزارش شده توسط زنگ و کوهن (۲۵) و هوری

(۹) مقایسه شوند. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که NaCl برخلاف اکثر موارد ذکر شده، مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز سن نواری چتریان بود. فعالیت مهارکنندگی این ترکیب روی آلفا- آمیلاز بزاقی گونه‌ی همجنس *G. rubrolineatum* (به میزان ۱۰ درصد) گزارش شده است (۱۰)، هرچند، در مورد *G. lineatum* این اثر بیش‌تر و حدود ۴۶ درصد برآورد گردید. مقایسه‌ی نتایج بررسی حاضر با نتایج زنگ و کوهن (۲۵) نشان می‌دهد که درصد مهارکنندگی Tris روی *L. hesperus* (۴۵ درصد) و *L. lineolaris* (۴۸ درصد) تقریبا معادل آن روی *G. lineatum* (۴۶ درصد) بود ولی در مورد EDTA، درصد مهارکنندگی آن روی دو گونه‌ی اول (به ترتیب معادل ۶۲ و ۶۷ درصد) بیش‌تر از سن نواری چتریان (۴۶ درصد) بود. درصد مهارکنندگی SDS و WAAI روی فعالیت آلفا- آمیلاز دو گونه‌ی اول (در مورد هر دو گونه به ترتیب ۹۱ تا ۹۵ درصد) نیز بیش‌تر از درصد مهارکنندگی آن‌ها روی آلفا- آمیلاز سن نواری چتریان (به ترتیب ۶۹ و ۸۷/۵ درصد) بود. این امر نشان می‌دهد که آلفا- آمیلازهای بزاقی *L. hesperus* و *L. lineolaris* در مقایسه با آلفا- آمیلاز بزاقی سن نواری چتریان، نسبت به SDS و WAAI حساس‌تر می‌باشند. هوری (۱۴) فعال شدن آلفا- آمیلازهای بزاقی چندین گونه از ناجوربالان را توسط NaCl بررسی کرد و دریافت که NaCl فعالیت آلفا- آمیلازهای ۱۴ گونه از ۱۵ گونه سن مورد آزمایش متعلق به خانواده‌ی Miridae را فعال نمود. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده که برای موثر واقع شدن یک مهارکننده در گیاهان تراژن، ممکن است نیازی نباشد که آمیلازهای حشرات آفت به طور کامل مهار شوند (۲۳). درصد مهارکنندگی یون Cl^- روی آلفا- آمیلازهای بزاقی برخی از گونه‌های ناجوربالان به شرح زیر بوده است (اعداد داخل پرانتز درصد مهارکنندگی یون Cl^- را نشان می‌دهند) (۱۰ و ۱۵):

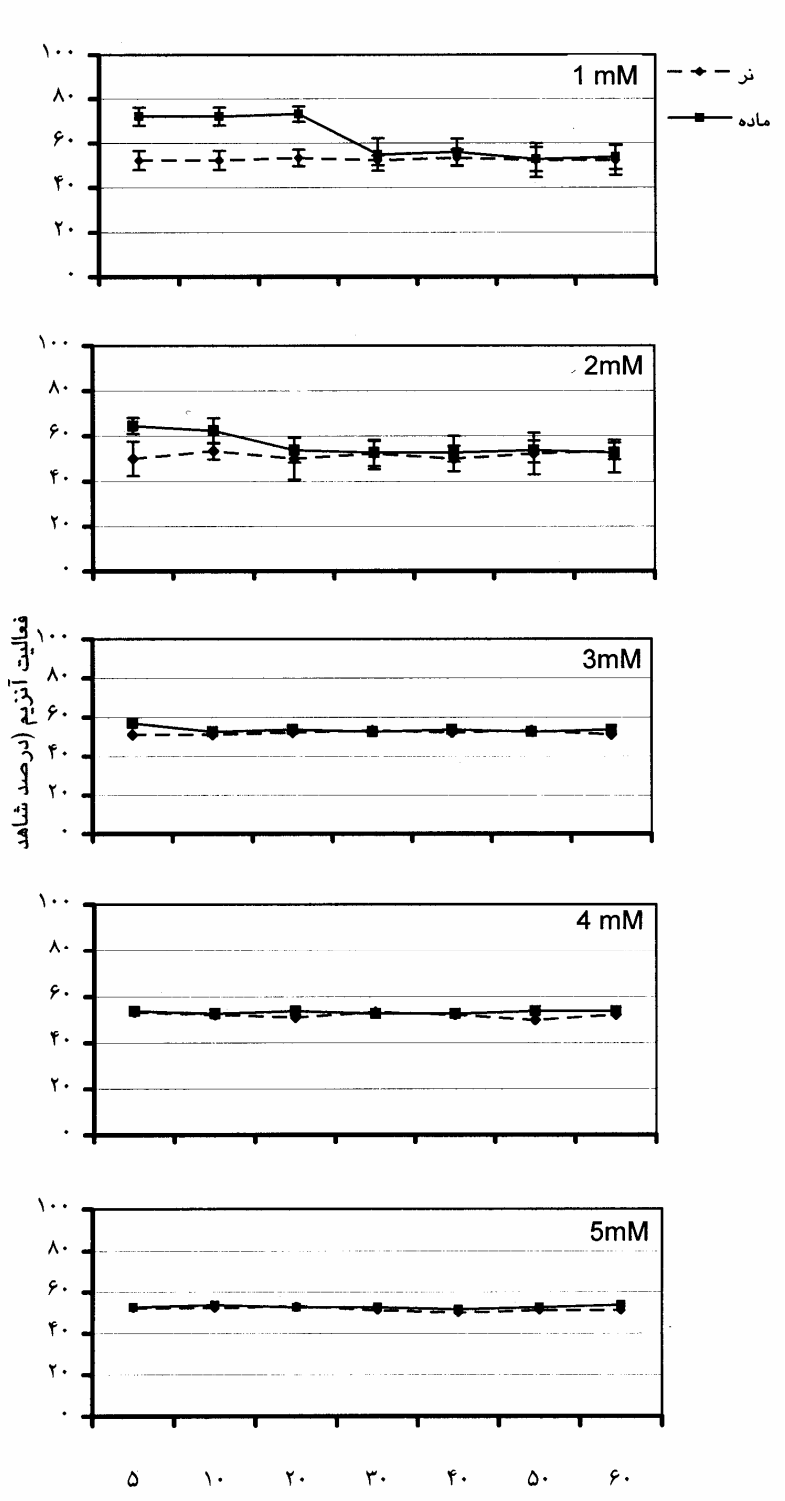
الف) خانواده‌ی Pentatomidae: *Carbula humerigera* (Uhler) (۳)؛ *Carpocoris purpureipennis* (De Geer) (۱۱)؛ *Palomena angulosa* Motschulsky (۸)؛ *Eysarcoris guttiger* (Thunberg) (۰)؛ *E. ventralis* (Westwood, 1837) (۱)؛ *Pentatoma rufipes* (L.) (۲۸)؛ *Elasmucha dorsalis* (Jakovlev) (۸۷)؛ *E. putoni* Scott (۲)؛ و *Elasmostethus humeralis* Jskovlev (۰)؛ ب) خانواده‌ی Lygaeidae: *Heterogaster urticae* (F.) (۲۷)؛ ج) خانواده‌ی Miridae: *Lygus nigronasutus* Stal (۲۲).

با توجه به درصد فعال‌کنندگی یون Cl^- (اعداد داخل پرانتز) روی آلفا- آمیلازهای بزاقی گونه‌های *Pentatoma japonica* (Distant) (۱۰)؛ *Elasmucha signoreti* Scott (۴۵)؛ *L. disponsi* (۲۵۷)؛ *L. nigritulus* (Linnavuori) (۶۱۰)؛ *L. campestris* (L.) (۲۱۰)؛ و *L. saundersi* Reuter (۱۹۴)، معلوم می‌شود که در گونه‌های متعلق به یک جنس، اثر Cl^- ممکن است متفاوت باشد (۱۰ و ۱۵). کشف مستمر مهارکننده‌های جدید نشان می‌دهد که این عرصه‌ی تحقیقاتی هنوز ناشناخته است و بررسی در زمینه‌ی آن ممکن است باعث اکتشافات بسیار هیجان‌انگیزی شود (۴).

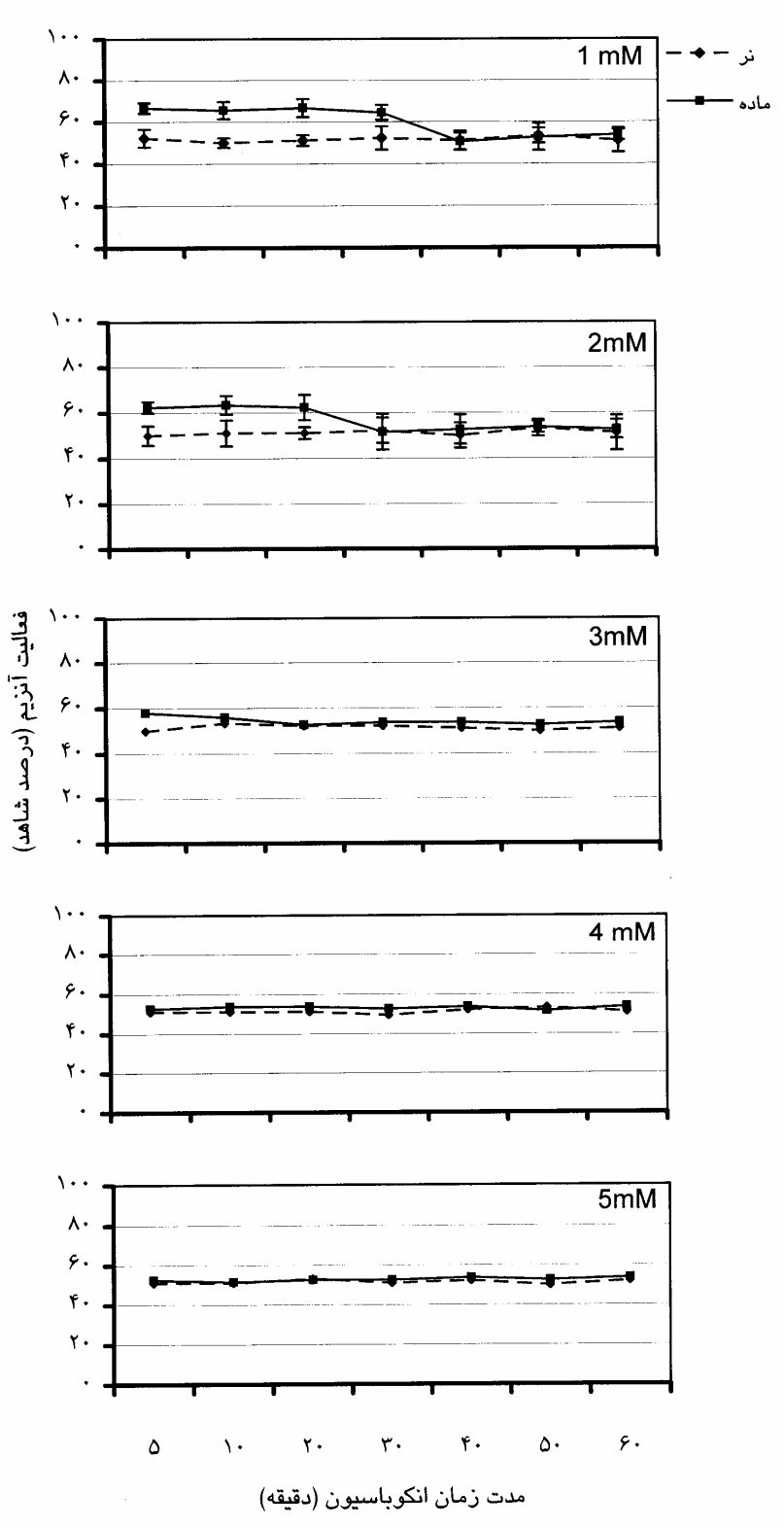
نتایج بررسی حاضر نشان داد که آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل ماده‌ی سن نواری چتریان در مقایسه با آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر، در مقابل غلظت‌های پایین ترکیبات مهارکننده‌ی NaCl، EDTA، Tris و SDS مقاومت بیش‌تری نشان داد و در اوایل دوره‌ی انکوباسیون توسط آن‌ها به مقدار کم‌تری مهار شد. دلیل این امر را شاید بتوان به وجود یک اختلاف جزیی در ساختمان آنزیم‌های حشرات کامل نر و ماده نسبت داد ولی برای اثبات و تایید دوباره‌ی این اختلافات و نیز درک علت اصلی آن، باید تحقیقات بیش‌تری انجام شود. نکته‌ی قابل توصیه در این جا این است که به دلیل اثر مهارکنندگی NaCl روی فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی *G. lineatum*، توصیه می‌شود که در پرورش‌های انبوه این حشره‌ی مفید حتما از آب مقطر استفاده گردد تا از مهار شدن آلفا- آمیلازهای آن توسط کلرید سدیم و سایر املاح احتمالی موجود در آب شرب جلوگیری گردد. در اینجا لازم به ذکر است که الگوی فعال یا مهار شدن آلفا- آمیلازهای بزاقی توسط یون‌هایی مانند Cl^- و NO_3^-، در طول فرایند تکامل روی رفتارهای تغذیه‌ای ناجوربالان اثراتی داشته و دارد (۱۵).



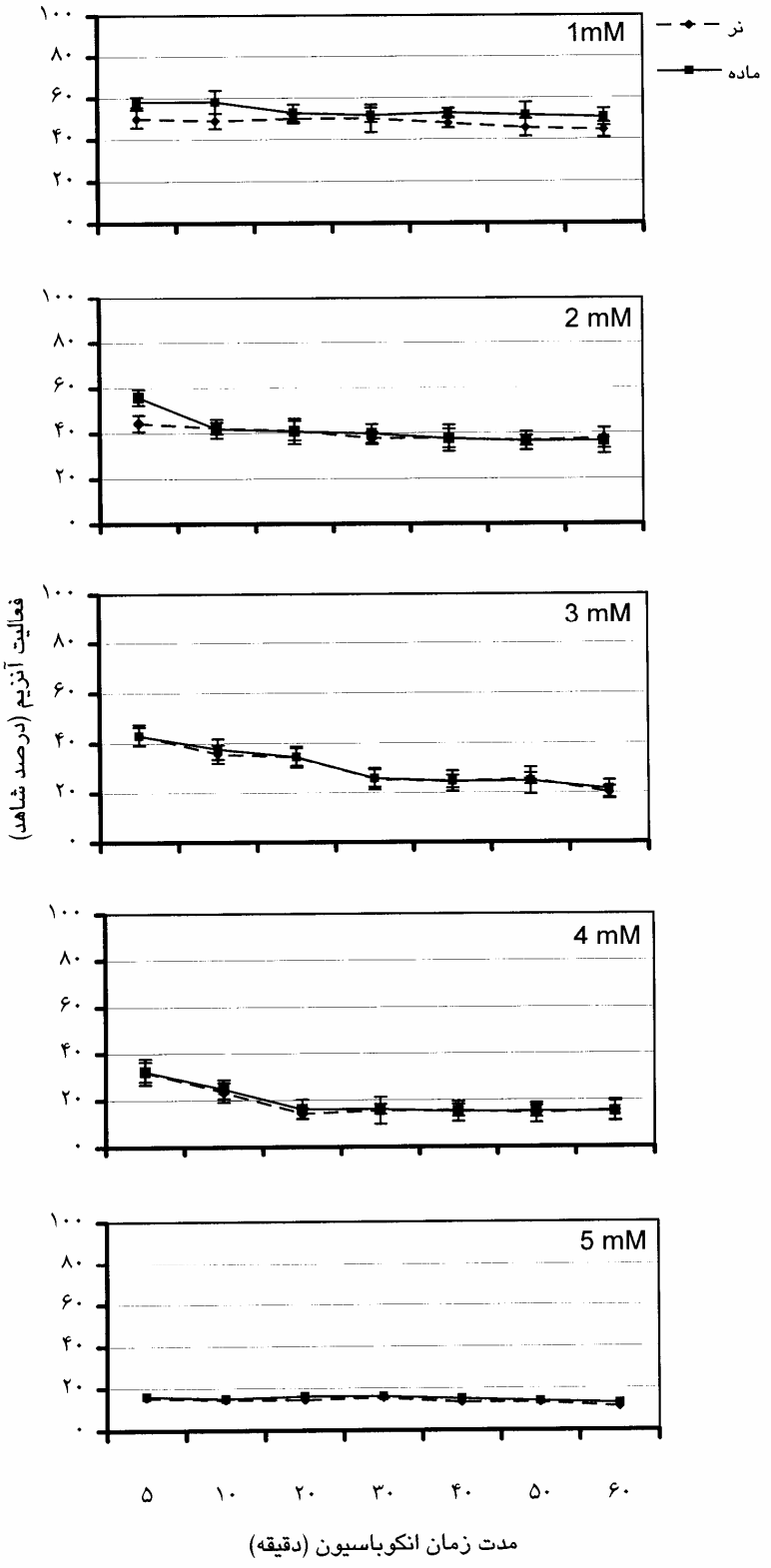
شکل ۱- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار NaCl طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد)



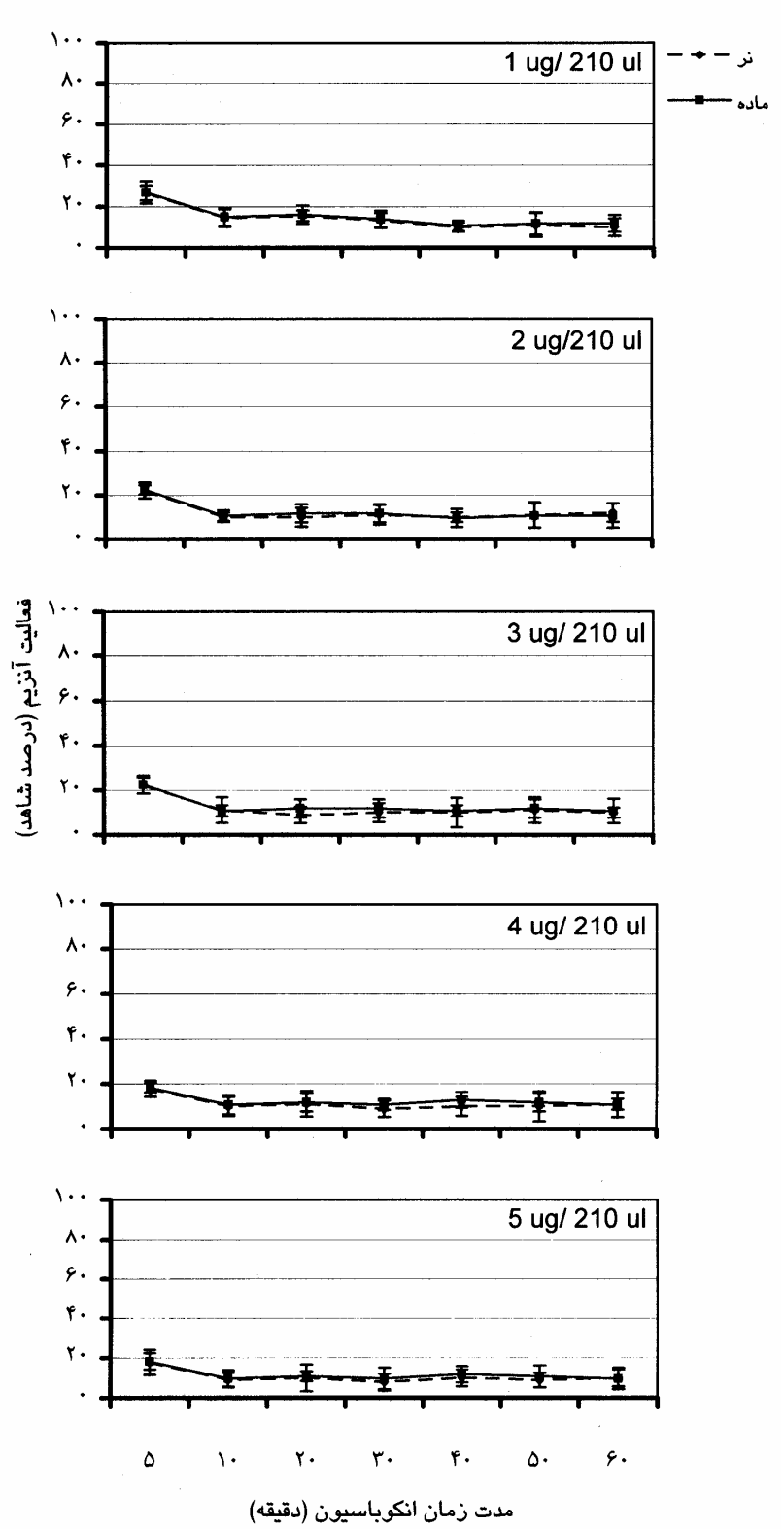
شکل ۲- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار EDTA طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد)



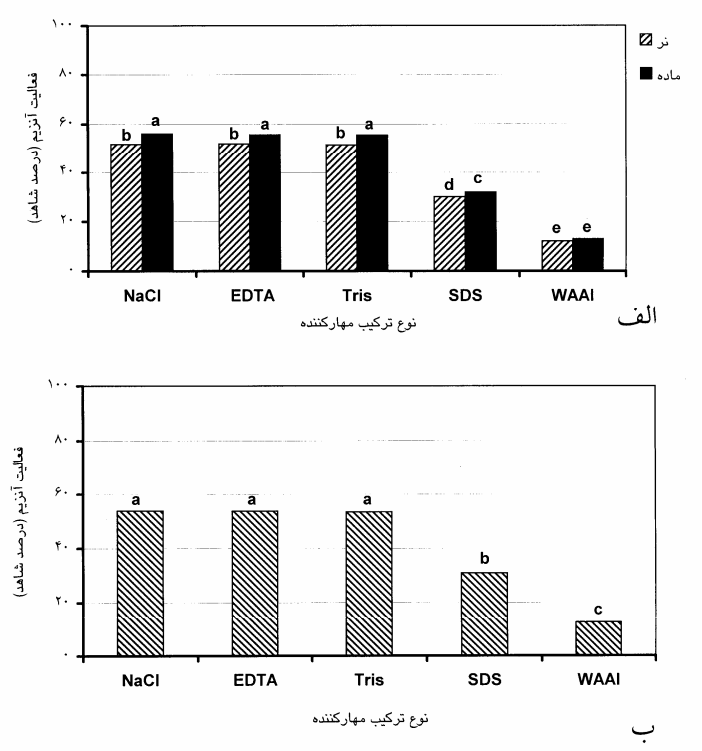
شکل ۳- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار Tris طی ٦٠ دقیقه انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد)



شکل ٤- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میلی‌مولار SDS طی ٦٠ دقیقه انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد)



شکل ۵- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان در غلظت‌های از ۱ تا ۵ میکروگرم بر ۲۱۰ میکرولیتر WAAI طی ۶۰ دقیقه انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد)



شکل ٦- مقایسه میانگین فعالیت کلی آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده (الف) و حشرات کامل (ب) سن نواری چتریان در پنج ترکیب مهارکننده‌ی مورد بررسی (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد)

منابع

۱- شاهرخی خانقاه ش. ۱۳۷۶. پرورش انبوه و کنترل کیفی زنبورهای *Trissolcus grandis* (Hym., Scelionidae) با استفاده از میزبان واسط *Graphosoma lineatum* برای کنترل سن *Eurygaster integriceps* (Hem., Scutelleridae). پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تهران. ۱۱۰ صفحه.

۲- عسگری ش. ۱۳۷۴. بررسی امکان تکثیر انبوه زنبورهای پارازیتوییید تخم سن، *Trissolcus spp.*، روی میزبان واسط آزمایشگاهی *Graphosoma lineatum*. پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تهران. ۲۲۰ صفحه.

۳- یزدانیان م.، فرشباف پورآباد ر. رشیدی م.ر.، ولیزاده م. و رشتچی‌زاده ن. ۱۳۸۵. فعالیت آلفا- آمیلاز در معده و غده‌ی بزاقی سن نواری چتریان (Het., Scutelleridae) *Graphosoma lineatum*. مجله‌ی دانش کشاورزی ،۱۶(۲): ۱۰۶-۹۱.

4- Bellincampi D., Camardella L., Delcour J.A., Desseaux V., D'Ovidio R., Durand A., Elliot G., Gebruers K., Giovane A., Juge N., Sorensen J.F., Svensson B., and Vairo D. 2004. Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. Biochim. Biophys. Acta, 1696: 265-274.

5- Biggs D.R., and McGregor P.G. 1996. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. Insect Biochem. Molec. Biol, 26: 69-75.

6- Botter C.J., and Jongsma M.A. 1995. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. J. Insect Physiol, 41: 1071-1078.

7- Cabral K.M.S., Almeida M.S., Valente A.P., Almeida F.C.L., and Kurtenbach E. 2003. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd 1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE 13 protease. Protein Express. Purif, 31: 115-122.

8- Hinks C.F., and Hupka D. 1995. The effect of feeding leaf sap from oats and wheat with and without soybean trypsin inhibitor on feeding behavior and digestive physiology of adult males of *Melanoplus sanguinipes*. J. Insect Physiol, 41: 1007-1015.

9- Hori K. 1969a. Effect of various activators on the salivary amylase of the bug *Lygus disponsi* . J. Insect

Physiol, 15: 2305-2317.
10- Hori K. 1969b. Some properties of salivary amylases of *Adelphocoris suturalis* (Miridae), *Dolycoris baccarum* (Pentatomidae), and several other heteropteran species. Ent. Exp. Appl, 12: 454-466.
11- Hori K. 1970a. Carbohydrases in the gut and the salivary gland, and the nature of the amylase in the gut homogenate of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hemiptera: Miridae). Appl. Entomol. Zool, 5: 13-22.
12- Hori K. 1970b. Some properties of amylase in the salivary gland of *Lygus disponsi*. J. Insect Physiol, 16: 373-386.
13- Hori K. 1971. Physiological conditions in the midgut in relation to starch digestion and the salivary amylase of the bug *Lygus disponsi*. J. Insect Physiol, 17: 1153-1167.
14- Hori K. 1972. Comparative study of a property of salivary amylase among various heteropterous insects. Comp. Biochem. Physiol, 42B: 501-508.
15- Hori K. 1973. Studies on enzymes, especially amylases, in the digestive system of the bug *Lygus disponsi* and starch digestion in the system. Res. Bull. Obihiro Univ, 8: 173-260.
16- Ishimoto M., and Kitamura K. 1989. Growth inhibitory effects of α-amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). Appl. Entomol. Zool, 24: 281-286.
17- Mendiola-Olaya E., Valencia-Jimenez A., Valdes-Rodriguez S., Delano-Frier J., and Blanco-Labra A. 2000. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. Comp. Biochem. Physiol, 126B: 425-433.
18- Morton R.L., Schroeder H.E., Bateman K.S., Chrispeels M.J., Armstrong E., and Higgins T.J.V. 2000. Bean α-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. Proc . Natl. Acad. Sci, 97: 3820-3825.
19- Rekha M.R., Sasikiran K., and Padmaja G. 2004. Inhibitor potential of protease and α-amylase inhibitors of sweet potato and taro on the digestive enzymes of root crop storage pests. J. Stored Prod. Res, 40: 461-470.
20- Schroeder H.E., Gollash S., Moore A., Tabe L.M., Craig S., Hardie D., Chrispeels M.J., Spencer D., and Higgins T.J.V. 1995. Bean α-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum*). Plant Physiol, 107: 1233-1239.
21- Silva C.P., Terra W.R., de-Sa M.F.G., Samuels R.I., Isejima E.M., Bifano T.D., and Almeida J.S. 2001. Induction of digestive α-amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α-amylase inhibitor 1. J. Insect Physiol, 47: 1283-1290.
22- Titarenko E., and Chrispeels M.J. 2000. cDNA Cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α-amylases of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. Insect Biochem. Molec. Biol, 30: 979-990.
23- Valencia A., Bustillo A.E., Ossa G.E., and Chrispeels M.J. 2000. α-amylase of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect Biochem. Molec. Biol, 30: 207-213.
24- Yamada T., Hattori K., and Ishimoto M. 2001. Purification and characterization of two α-amylase inhibitors from seeds of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). Phytochem, 58:59-66.
25- Zeng F., and Cohen A.C. 2000. Partial characterization of α-amylase in the salivary glands of *Lygus hesperus* and *L. lineolaris*. Comp. Biochem. Physiol, 126B: 9-16.
26- Zeng F., and Cohen A.C. 2001. Induction of elastase in a zoophytophagous heteropteran, *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). Ann. Ent. Soc. Am, 94: 146-151.