

بررسی فعالیت آنزیمهای پروتئاز و آمیلاز در اووسیت و تخم سن سبز پسته *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera: Pentatomidae)

مهدیه بی غم^۱ - وحید حسینی نوه^{۲*} - خلیل طالبی جهرمی^۳ - فاطمه حسینی نوه^۴

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۲۲

چکیده

سن سبز پسته، *Brachynema germari*، یکی از مهمترین آفات پسته در کشورمان ایران می باشد که سالیانه باعث خسارت قابل توجهی به این محصول با ارزش می شود. امروزه به منظور کنترل حشرات زیان آور، از جمله سن سبز پسته، توجه به ویژگیهای فیزیولوژیک آنها از جمله مراحل رشد و نمو جنین و تخم به عنوان یک راهکار جهت تداخل در فرآیندهای حیاتی حشره از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. بدین منظور وجود دو گروه از آنزیمهای مهم، پروتئاز و آمیلاز، در اووسیت و تخم سن سبز پسته بررسی گردید. بیشینه فعالیت پروتئولیتیک کل تخم و اووسیت با استفاده از سوبسترای هموگلوبین در pH برابر با ۳ بدست آمد که نشان دهنده وجود سیستمین پروتئینازها می باشد. سوبستراهای ویژه سیستمین پروتئینازها، Z-Arg-Arg-pNA و Z-Phe-Arg-pNA، بخوبی توسط آنزیمهای موجود در تخم و اووسیت هیدرولیز گردید که به ترتیب نشان دهنده وجود سیستمین پروتئینازهای کاتپسین بی و کاتپسین ال در آنها می باشد. مهارکننده E-64 فعالیت سیستمین پروتئینازهای کاتپسین ال و کاتپسین بی را به ترتیب در تخم به میزان ۹۹/۸۵ و ۸۲/۱۴ درصد و در اووسیت به میزان ۶۳/۲۴ و ۷۴/۶۲ درصد کاهش داد. همچنین حضور سیستمین پروتئینازها، با افزایش فعالیت پروتئینازی عصاره آنزیمی تخم توسط فعال کننده DTT و افزایش فعالیت پروتئینازی عصاره آنزیمی اووسیت توسط فعال کننده ال - سیستمین روی سوبسترای ویژه کاتپسین ال و بی به ترتیب به میزان ۹۹/۴۱ و ۷۸/۵۷ در تخم و ۱۸۸/۲۳ و ۲۷/۷۱ در اووسیت به اثبات رسید. بر اساس این نتایج می توان وجود کاتپسین ال و کاتپسین بی را در تخم و اووسیت سن سبز پسته ثابت نمود. وجود آنزیم آلفا آمیلاز در تخم و اووسیت این حشره با استفاده از سوبسترای نشاسته مشخص گردید و pH بهینه برای فعالیت این آنزیم برابر با ۶ به دست آمد.

واژه های کلیدی: *Brachynema germari*، سیستمین پروتئیناز، کاتپسین بی، کاتپسین ال، آلفا آمیلاز

مقدمه

وقایع بیوشیمیایی مهم در رشد تخم و اووسیت در حشرات و از جمله سن سبز پسته استفاده از ترکیبات غذایی ذخیره شده در طی اووژنز^۵ و ویتلوژنز^۶ می باشد (۲۰). در واقع ویتلوژنیز پیش ساز ویتلوس بود که در بافت چربی تولید شده به همولنف مادری رفته و در اووسیت به عنوان ویتلوس ذخیره می شود. ویتلوس به عنوان مهمترین و اصلی ترین ترکیب زرده در بندپایان بوده و در اثر تجزیه آنزیمی، آمینو اسیدهای ضروری و دیگر مواد مورد نیاز را برای جنین در حال رشد فراهم می گردد (۱۷، ۲۰ و ۲۹). نیازهای غذایی حشرات بویژه در مراحل رشدی آنها بسیار مهم است، در واقع توانایی استفاده از مواد غذایی در حشرات وابسته به وجود آنزیمهای مختلف از جمله آنزیمهای پروتئاز به منظور هضم پروتئینها و ایجاد اسیدهای آمینه در حشرات می باشد.

سن سبز پسته، *Brachynema germari* Kol، یکی از مهمترین سنهای زیان آور باغهای پسته در ایران و از آفات درجه یک پسته محسوب می شود. تغذیه سن سبز سبب بدشکلی و ایجاد لکه های نکروز قهوه ای فرورفته روی مغز میوه می شود و مغز میوه های مورد تغذیه تلخ و بد مزه می شود. همچنین تغذیه سن ها از جنین در حال رشد سبب پوکی و اسفنجی شدن جنین می شود و کیفیت و بازار پستی آنها کاهش می یابد. شایان ذکر است که در این مرحله سنهای پسته قادر به انتقال قارچ *Nematospora coryli* نیز بوده و بیماری ماسوی پسته را باعث می شوند (۱ و ۲). یکی از

۱، ۲ و ۳ - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(Email: vnaveh@ut.ac.ir)

* - نویسنده مسئول:

۴ - مربی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان

5- Oogenesis

6- Vitellogenesis

اتخاذ تصمیماتی در روشهای متنوع مبارزه و استفاده از تکنیکهای ملکولی مهندسی ژنتیک از جایگاه ارزشمندی برخوردار می‌باشد. در این تحقیق برخی ویژگیهای آنزیمهای پروتئاز و آمیلاز اووسیت و تخم سن سبز پسته، *Brachynema germari*، مورد بررسی قرار گرفته است که در نوع خود از اولین پژوهشهایی است که در ایران و روی این آفت مهم انجام می‌گیرد، می‌باشد.

مواد و روشها

جمع‌آوری سن سبز پسته

همزمان با خروج سن‌های سبز از محل‌های زمستان‌گذرانی و شروع تغذیه روی میزبان‌های وحشی موجود در مناطق زمستان‌گذران داخل و اطراف باغ‌های پسته، حشرات کامل سن سبز پسته از روی گیاهان علفی میزبان، اسپند (*Peganum harmala*) و شورش‌خاردار (*Salsola kali*)، و نیز درختان پسته از باغات اطراف شهرستان رفسنجان جمع‌آوری گردیدند.

جمع‌آوری تخمها و تشریح حشره به منظور جداسازی

اووسیت‌ها

به منظور در اختیار داشتن تخمهای همسن، هر ۲۴ ساعت آنها را جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جدا کردن اووسیت‌ها از تخمدان حشرات ماده، پس از بی‌حس نمودن حشرات روی یخ، حشره درون آب مقطر سرد تشریح شد و با نمایان شدن تخمدانها در شکم حشره به کمک پنس به آرامی اووسیتها جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه عصاره آنزیمی از اووسیت و تخم سن سبز پسته

تخم و اووسیت‌های خارج شده، درون آب مقطر سرد با یک هموژنایزر دستی شیشه‌ای بطور جداگانه هموژنایز شدند. با توجه به نیاز آزمایش، نمونه‌های هموژنایز شده، با سرعت $16000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از این مرحله بخش روتشین نمونه‌ها به عنوان منبع آنزیمی در سنجشهای آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین فعالیت پرتئولیتیک با استفاده از سوبسترای

عمومی هموگلوبین

سنجش فعالیت پروتئینازی کل با استفاده از سوبسترای هموگلوبین مطابق با روش کوهن (۵) با تغییرات جزئی انجام شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۲۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر هموگلوبین به ۳۰۰ میکرولیتر بافر استات - فسفات - بورات سدیم (در pHهای ۲ تا ۱۲) اضافه شد. واکنش آنزیمی با افزودن ۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی

آنزیم‌های مسئول هیدرولیز کامل پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه، پروتئازها هستند. پروتئازها شامل پروتئینازها و اگزوپپتیدازها می‌باشند. پروتئینازها براساس مکانیزیم کاتالیتیک با استفاده از معرف‌های ویژه یا تعیین اثر pH بر فعالیت آن‌ها به زیر رده‌های سرین پروتئینازها، سیستئین پروتئینازها، آسپارتیک پروتئینازها و متالوپروتئینازها تقسیم بندی می‌شوند. فعالیت بهینه سرین پروتئینازها در محیط قلیایی، سیستئین پروتئینازها در شرایط اسیدی، آسپارتیک پروتئینازها در pH کمتر از ۵ می‌باشد. متالوپروتئینازها برای فعالیت نیاز به یک یون فلزی در فرایند کاتالیز دارند (۲۸). اگزوپپتیدازها شامل آنزیم‌هایی هستند که یک اسید آمینه را از انتهای آمینی یا از انتهای کربوکسیلی زنجیره پپتیدی هیدرولیز می‌کنند. تعداد متنوعی از آنزیمهای پرتئولیتیک در تجزیه ویتلوس نقش دارند که گستره‌ای از اندوپپتیدازهای سرین (۱۱) تا اندوپپتیدازهای سیستئین مثل کاتپسین بی و ال (۱۵) را شامل می‌شود. رژیم غذایی کربوهیدراتی که توسط حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل نشاسته که توسط حشرات گیاهخوار بلعیده می‌شود و گلیکوژن که یک ترکیب کربوهیدراتی است و بوسیله حشرات گوستخوار مورد تغذیه قرار می‌گیرد. معمولترین آنزیم هضم کربوهیدرات‌ها در حشرات آلفا آمیلاز است که روی مواد کربوهیدراتی خورده شده توسط حشره اثر می‌گذارد. وجود کربوهیدرات‌های مورد نیاز برای رشد جنینی در حشرات و بندپایان مختلف توسط برخی پژوهشگران مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است (۱۴، ۱۶، ۲۳ و ۲۴).

در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات، یکی از ابزارهای مهم، مقاومت گیاهان به آفات می‌باشد که با پیشرفت و استفاده از تکنیکهای مهندسی ژنتیک امکان همسانه سازی و قرار دادن ژنهای جدید و کارا در گیاهان برای ایجاد مقاومت در برابر آفات حشره‌ای فراهم آمده است (۲۵). استفاده از ارقام مقاوم و گیاهان تراریخته یکی از روشهای موثر کنترل آفات می‌باشد. ارقام مقاوم به طرق مختلف روی زندگی آفت و یا ارتباط متقابل گیاه- حشره تاثیر گذاشته و از شدت خسارت می‌کاهند. یکی از موارد بسیار حیاتی در این ارتباط تغذیه حشره از میزبان می‌باشد. غذایی که آفت دریافت می‌کند، می‌تواند این ارتباط را به شدت تحت تاثیر قرار دهد. می‌توان اظهار داشت که وارد کردن ژنهای بیان کننده مهار کننده‌های آنزیمی حشره به گیاه مورد نظر و بیان ژنهای مذکور در گیاه باعث تولید مهار کننده ها در گیاه شده، در نتیجه طی تغذیه حشره این مهار کننده ها وارد بدن حشره شده و منجر به بلوکه کردن آنزیم‌های هیدرولیز کننده مواد مورد نیاز برای رشد جنین می‌شوند، بنابراین با استناد به مطالب گفته شده فرآیندهای تولید مثلی اووژنز و جنین زایی ممکن است دید جدیدی را برای استراتژیهای کنترل جمعیت آفات در اختیار ما قرار بدهد. از این رو مطالعه آنزیمهای هیدرولیز کننده مواد مغذی مورد نیاز برای رشد جنینی و شناسایی مهار کننده‌های آنزیمهای مذکور برای

بررسی شد. همچنین به منظور تعیین وجود سیستمین پروتئینازها در تخم و اووسیت سن سبز پسته، اثر مهارکننده اختصاصی E-64^۵ در غلظت نهایی یک میکرو مولار بر فعالیت هیدرولیتیک پروتئینازهای موجود در عصاره بافتهای مذکور انجام گرفت. برای تعیین میزان اثر این ترکیبات بر فعالیت پروتئولیتیک از دو سوسترای Z-Arg-Arg-pNA و Z-Phe-Arg-pNA استفاده شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ در فواصل زمانی هر ۵ دقیقه یک بار در مدت تعیین شده، ثبت شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تخم و اووسیت و تعیین اثر pH بر فعالیت آن

فعالیت آلفا آمیلاز با استفاده از روش بیکر (۳) با اندکی تغییر سنجیده شد. واکنش در محیط بافر یونیورسال در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با افزودن عصاره آنزیمی تخم یا اووسیت و نشاسته به عنوان سوستر، به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن ماری انجام شد. سپس معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید به مجموعه اضافه و برای مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. در این آزمایش از تمام ترکیبات مورد آزمایش به غیر از آنزیم به عنوان بلانک استفاده شد. با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Elx 8۰۸) جذب محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. همچنین به منظور بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، محلول آنزیمی در pH های مختلف (۲ تا ۹) توسط بافر یونیورسال تحت تاثیر قرار گرفت.

تجزیه داده ها

تجزیه و تحلیل داده های آزمایش با استفاده از نرم افزارهای Statgraphics و Sigmaplot انجام شد. میانگین داده ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تعیین فعالیت پروتئولیتیک تخم و اووسیت

تعیین فعالیت پروتئولیتیک عصاره تخم و اووسیت با استفاده از هموگلوبین در دامنه ای از pH (۲ تا ۱۲) انجام شد. این سوستر در دامنه ای از pH اسیدی و pH های قلیائی هیدرولیز می گردد، که فعالیت پروتئولیتیک در pH های مذکور قابل توجه است و بیشینه آن در pH برابر با ۳ مشاهده می شود (نمودار ۱). مقدار pH بهینه اسیدی، نشان دهنده وجود سیستمین پروتئینازها به عنوان پروتئینازهای غالب در تخم و اووسیت سن سبز پسته می باشند.

تخم و اووسیت) آغاز و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه انجام شد. پپتیدهای آزاد شده حاصل از عمل پروتئینازها روی سوسترای پروتئینی هموگلوبین با استفاده از معرف فولین-سیو کالتو اندازه گیری شدند (۹).

تعیین فعالیت پروتئولیتیک ویژه با استفاده از سوسترهای اختصاصی

بررسی وجود و میزان فعالیت اندوپروتئینازهای شبه تریپسین و شبه کیموتریپسین در عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته با استفاده از سوسترهای تخصصی انجام شد. سوسترهای BApNA^۱ و SAAPFpNA^۲ در غلظت نهایی یک میلی مولار به ترتیب برای تشخیص پروتئینازهای شبه تریپسین و شبه کیموتریپسین استفاده شدند. واکنش آنزیمی با اضافه کردن عصاره آنزیمی به محلول سوستر در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر بافر با pH برابر با ۶ آغاز شد. مقدار فعالیت آنزیمی و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر که معرف مقدار پارانیتروانیلین آزاد شده است، در زمان کل ۶۰ دقیقه ثبت شد.

سیستمین پروتئینازها

دو سوسترای ویژه سیستمین پروتئینازها، Z-Arg-Arg-pNA^۳ و ویژه کاتپسین های بی و Z-Phe-Arg-pNA^۴ ویژه کاتپسین ال به منظور ارزیابی وجود این گروه از اندوپپتیدازها در عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته مورد استفاده قرار گرفت. هیدرولیز غلظت نهایی ۰/۵ میلی مولار این سوسترها با افزودن عصاره آنزیمی به محلول سوستر در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر بافر با pH برابر با ۶، در مدت کل ۶۰ دقیقه، با اندازه گیری مقدار جذب پارانیتروانیلین در طول موج ۴۰۵ نانومتر بدست آمد. فعالیت پروتئینازهای موجود در عصاره تخم و اووسیت در دامنه ای از pH های اسیدی و قلیایی نیز تعیین شد.

اثر فعال کننده ها بر فعالیت پروتئولیتیک ویژه در تخم و اووسیت

اثر فعال کننده های ال - سیستمین و دی تیوترایتول در غلظت های نهایی یک میلی مولار نیز بر فعالیت پروتئولیتیک ویژه به منظور بررسی وجود سیستمین پروتئینازها به ترتیب در اووسیت و تخم

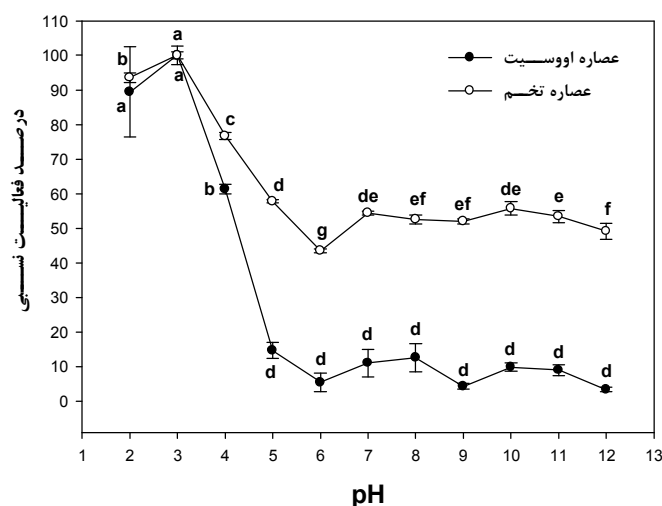
- 1- N α -Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide
- 2-N-Succinyl-alanine-alanine-prolin-phenylalanine-p-nitroanilide
- 3- Carbobenzoxy-L-arginine-L-arginine-p-nitroanilide
- 4- Carbobenzoxy- L-phenylalanin-L-arginine-p-nitroanilide

5-L-3-Trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidion)-butane

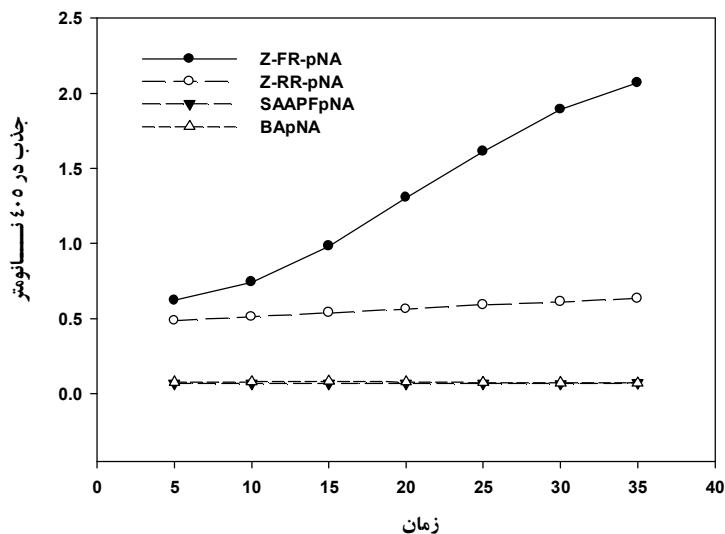
تعیین فعالیت پروتئولیتیک ویژه تخم و اووسیت با استفاده از سوبسترای اختصاصی

فعالیت پروتئولیتیک عصاره تخم و اووسیت با استفاده از سوبستراهای اختصاصی سرین پرتینازها، BApNA و SAAPFpNA، و سیستئین پرتینازها، Z-Arg-Arg-pNA و Z-Phe-Arg-pNA مورد بررسی قرار گرفت. در نمودارهای ۲ و ۳ فعالیت هیدرولیتیکی عصاره تخم و اووسیت روی دو سوبسترا نشان داده شده است.

فعالیت در pH های پایین ممکن است مربوط به وجود کاتپسین دی باشد. کاتپسین دی پروتئاز اصلی و مهم در تجزیه پروتئین های تخم، در طی رشد جنینی در سن خونخوار *Rhodnius prolixus* می باشد. همچنین فعالیت کاتپسین دی در تخم توسط مهارکننده آسپارتیک پروتئازها، پپستاتین، مهار شد. این نتایج نشان داد که کاتپسین دی در تجزیه پروتئین های تخم در حشرات نقش دارند (۸). عصاره آنزیمی تخم شب پره مدیترانه ای آرد، *Anagasta kuehliella* نیز مورد بررسی قرار گرفته است و pH های ایتیموم ۹/۶، ۵/۴، ۹/۵ در طی رشد جنینی آشکار شد. فعالیت در pH های پایین دلیلی بر وجود کاتپسین ها و فعالیت در pH های بالاتر دلیلی بر وجود و فعالیت تریپسین می باشد (۱۳).



(نمودار ۱) - اثر pH های مختلف روی فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته



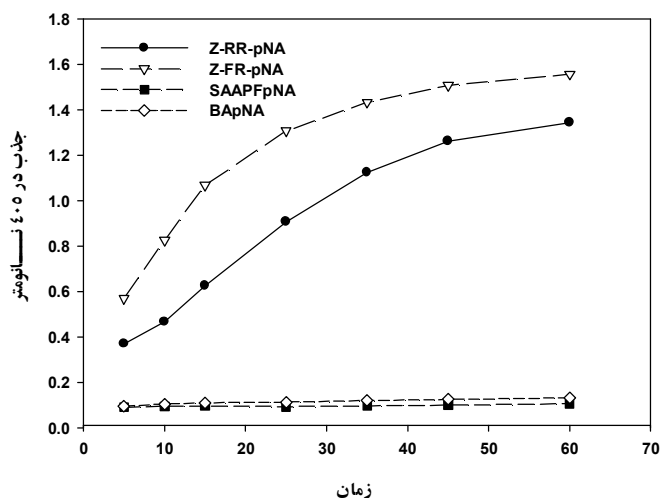
(نمودار ۲) - فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز پسته روی سوبستراهای ویژه پروتئینازی

همانگونه که مشخص است سرعت اولیه فعالیت آنزیمی روی چهار سوبسترا متفاوت است. در تخم بیشترین سرعت هیدرولیز توسط عصاره آنزیمی روی سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۵۱) تغییر جذب در دقیقه) و مقداری کمی روی سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۰۴) تغییر جذب در دقیقه) مشاهده شد. فعالیت قابل توجهی با استفاده از دوسوبسترای سرین پروتئینازها بدست نیامد. بر اساس نتایج می توان بیان کرد که فعالیت هیدرولیتیک روی سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA (سوبسترای ویژه کاتپسین - ال) بیشتر از فعالیت هیدرولیتیک روی سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA (سوبسترای ویژه کاتپسین - بی) می باشد. پس می توان اظهار داشت که کاتپسین - ال سیستمین پروتئیناز غالب در تخم سن سبز پسته می باشد. همچنین در اووسیت نیز سرعت هیدرولیز توسط عصاره آنزیمی روی سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۱۹) تغییر جذب در دقیقه) و روی سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۱۷) تغییر جذب در دقیقه) مشاهده شد. در عصاره اووسیت نیز فعالیت قابل توجهی با استفاده از دوسوبسترای سرین پروتئینازها بدست نیامد. پس می توان اظهار داشت که کاتپسینها پروتئینازهای غالب در اووسیت سن سبز پسته می باشد.

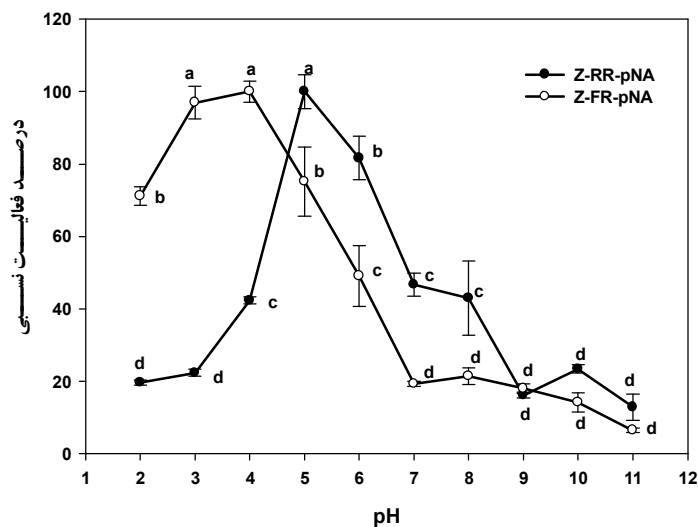
در نمودار ۴ و ۵ فعالیت سیستمین پروتئینازی عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته در pHهای مختلف با اندازه گیری میزان هیدرولیز سوبستراهای تخصصی Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-pNA نشان داده شده است. هیدرولیز سوبسترای Z-Phe-

Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA در عصاره تخم در دامنه وسیعی از pH اسیدی (۲ تا ۸) قابل توجه می باشد که نشان دهنده وجود سیستمین پروتئینازها به ویژه کاتپسین ال می باشد. بیشینه فعالیت پروتئولیتیک با استفاده از سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA به ترتیب در pH برابر با ۴ و ۵ مشاهده می شود. در pHهای خیلی قلیایی (pH برابر ۹) فعالیت پروتئولیتیک بسیار کم و تقریباً حدود ۲۰ درصد فعالیت بیشینه می باشد (نمودار ۴). هیدرولیز سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA در عصاره اووسیت در بازه وسیعی از pH اسیدی (۲ تا ۷) قابل توجه می باشد. بنابراین مشخص شد که pH بهینه برای فعالیت آنزیم هایی که روی سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA اثر می گذارند به ترتیب حدود ۳ و ۵ می باشد (نمودار ۵).

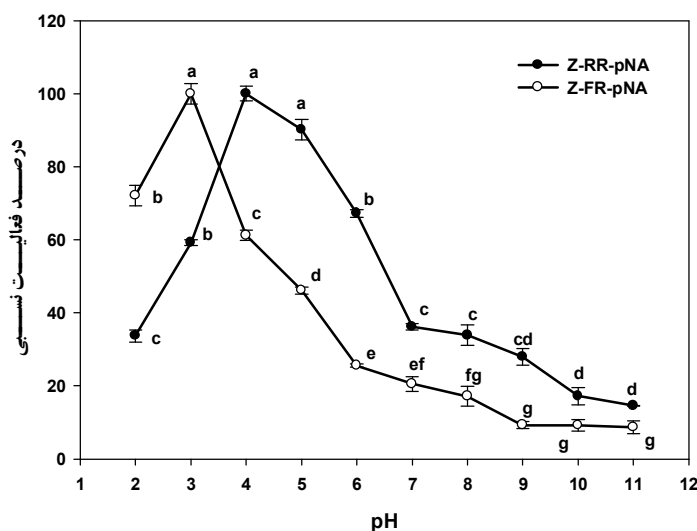
اسید آمینه ال - سیستمین و DTT به عنوان ترکیبات احیاکننده و فعال کننده سیستمین پروتئینازها اثر افزایشی در فعالیت پروتئولیتیک کل نشان دادند که تایید کننده وجود سیستمین پروتئینازها در عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته می باشد. در این سنجش از دو سوبسترای تخصصی Z-Phe-Arg-pNA (سوبسترای کاتپسین - ال) و Z-Arg-Arg-pNA (سوبسترای کاتپسین - بی) استفاده شد. فعال کننده ویژه سیستمین پروتئینازها، DTT اثر فعال کنندگی قابل توجهی روی فعالیت هیدرولیتیک سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA توسط عصاره تخم نشان داد که بیان کننده وجود سیستمین پروتئینازها مخصوصاً کاتپسین ال می باشد (جدول ۱).



نمودار ۳- فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت سن سبز پسته روی سوبستراهای ویژه پروتئینازی



(نمودار ۴) - فعالیت پروتئینازی عصاره تخم سن سبز پسته در pH های مختلف



(نمودار ۵) - فعالیت پروتئینازی عصاره اووسیت سن سبز پسته در pH های مختلف

(جدول ۱) - اثر فعال کننده و مهار کننده سیستئین پروتئینازها بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز

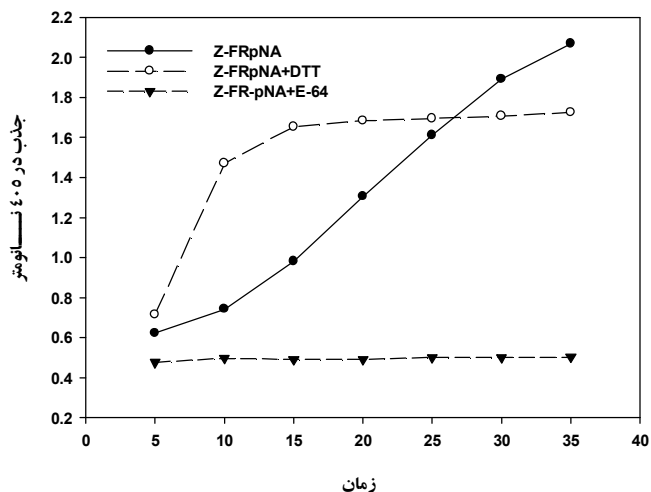
مهار کننده/فعال کننده		درصد فعال کنندگی و مهار کنندگی (خطای معیار ± میانگین)
Z-Phe-Arg-pNA	Z-Arg-Arg-pNA	(غلظت نهایی ۱ mM)
۹۹/۸۵±۰/۰۰۲	۸۲/۱۴±۰/۰۱۴	مهار کننده E-64
۹۹/۴۱±۰/۰۰۳	۷۸/۵۷±۰	فعال کننده DTT

بررسی گردید (نمودار ۶ و ۷). بر اساس داده‌های موجود در جدول ۱، مهار کننده ویژه سیستئین پروتئینازها، E-۶۴، اثر مهار کنندگی قابل

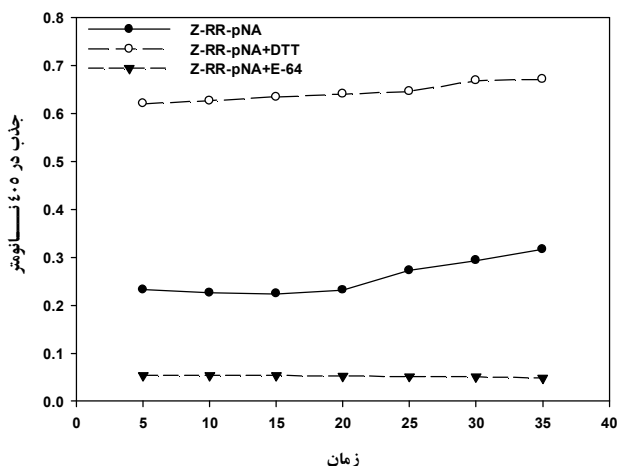
وجود سیستئین پروتئینازها در تخم سن سبز پسته با استفاده از مهار کننده E-۶۴ روی دو سوبسترای ویژه سیستئین پروتئینازها

داد(نمودار ۸ و ۹)، که بیان کننده وجود سیستمین پروتئینازها می باشد(جدول ۲). با توجه به نمودار ۹، مهارکننده ویژه سیستمین پروتئینازها، E-64، اثر مهارکنندگی قابل توجهی روی فعالیت سیستمین پروتئینازی عصاره اووسیت نشان داد (جدول ۲).

توجهی روی فعالیت هیدرولیتیک سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA توسط عصاره تخم نشان داد. فعال کننده ویژه سیستمین پروتئینازها، ال-سیستئین، نیز اثر فعال کنندگی قابل توجهی روی فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت نشان



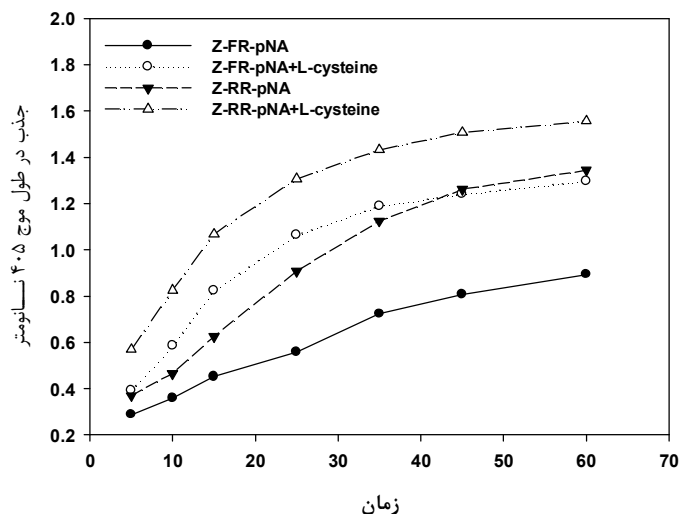
(نمودار ۶) - اثر فعال کننده و مهارکننده بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز پسته با استفاده از سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA



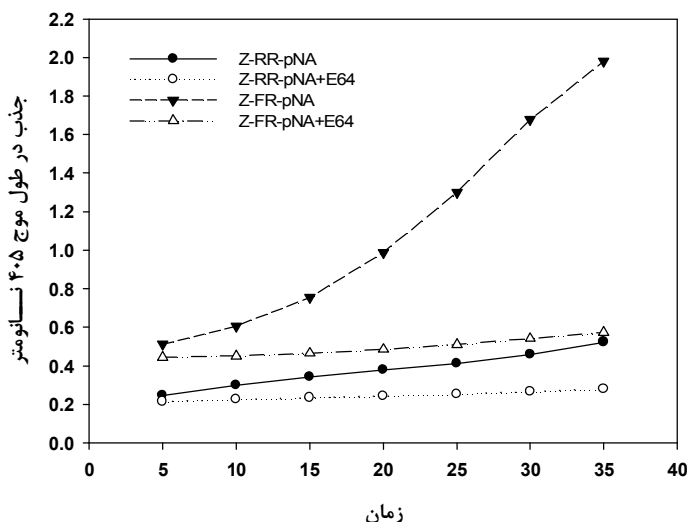
(نمودار ۷) - اثر فعال کننده و مهارکننده بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز پسته با استفاده از سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA

(جدول ۲) - اثر فعال کننده و مهار کننده سیستمین پروتئینازها بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت سن سبز

درصد فعال کنندگی و مهارکنندگی (خطای معیار ± میانگین)		مهارکننده/فعال کننده
Z-Phe-Arg-pNA	Z-Arg-Arg-pNA	(غلظت نهایی ۱ mM)
۶۳/۲۴±۰/۰۱۷	۷۴/۶۲±۰/۰۷۴	مهارکننده E-64
۱۸۸/۲۳±۰/۰۶۳	۲۷/۷۱±۱/۰۲	فعال کننده ال-سیستئین



(نمودار ۸) - اثر فعال کننده ال - سیستین بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت سن سبز پسته



(نمودار ۹) - اثر مهارکننده E-64 بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت و سن سبز پسته

پروتئین در طی جنین زایی در سیرسیرک نیز مورد بررسی قرار گرفته است نتایج تحقیقات نشان داده است که این توده پروتئین در طول دوره ویتلوژنز به وجود می آید (۱۰). همچنین وجود پروتئینهای تخم در شب پره *Plodia interpunctella* (۴) نشان داده شده است و بدون شک آنزیمهای پروتئاز در تجزیه این گونه پروتئینها در حشرات نقش مهمی دارند. سیستین پروتئازها مخصوصاً کاتپسین بی و ال، هیدرولازهای عمومی هستند که مسئول تجزیه پروتئینها در جانداران تخم گذار مثل نماتدها، کنه ها، قورباغه ها و حشرات می باشند (۱۵). آنزیمهای پروتئولیتیک در مراحل مختلف جنینی تخم ملخ *Locusta migratoria* مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج مشخص شد

پروتئینها جزء بسیار مهمی از رژیم غذایی حشرات را تشکیل می دهند و محصولات هضم آنها در بسیاری از فرایندهای زیستی نقش حیاتی ایفا می کند. یک پروتئین جدید تیروزین فسفاتاز از تخم مگس *Sarcophaga peregrina* خالص سازی شده است، این پروتئین در طی اووژنز و اوایل جنین زایی بیان می شود و در اواسط جنین زایی توسط کاتپسین - ال لیزومی تجزیه می شود. همچنین وجود پروتئین تیروزین فسفاتاز در مگس *Drosophila melanogaster* به اثبات رسیده است. نتایج تحقیقات نشان داده است که حذف ژن مذکور باعث مرگ در طی جنین زایی می شود، پس می توان نتیجه گرفت که بیان این پروتئین نقش مهم و اساسی در اووژنز و جنین زایی دارد (۳۰). سنتز

توسط مهارکننده E-64 در غلظت ۵ میکرو مولار به طور ۱۰۰٪ مهار شده و حتی کاربرد دی تیوترایتول فعالیت آنزیم مذکور را افزایش داد (۲۲). همچنین نقش کاتپسین ال در تجزیه پروتئین تخم در کنه *Ornithodoros moubata* و حشرات *Bombyx mori* و *Musca domestica* به اثبات رسیده است (۶، ۲۱ و ۲۷)

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تخم و اووسیت سن سبز پسته

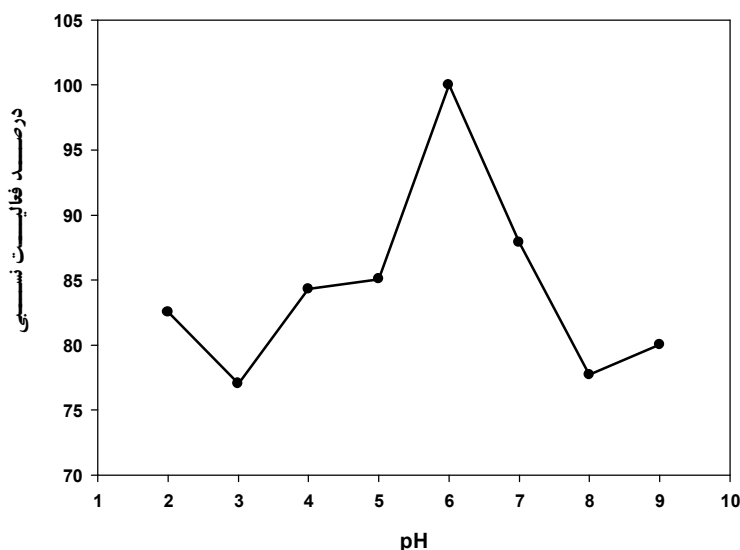
در نمودارهای ۱۰ و ۱۱ فعالیت آمیلولیتیکی عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته روی سوبسترای نشاسته نشان داده شده است. استفاده از سوبسترای نشاسته برای مشخص نمودن وجود آلفا آمیلاز در عصاره آنزیمی بافتهای مذکور نشان داد که مقدار این آنزیمها در تخم و اووسیت سن قابل توجه می باشد. بر طبق این بررسی فعالیت بهینه آمیلاز در سن سبز پسته در دامنه گسترده ای از pH های ۲ تا ۹ صورت گرفت. مقدار pH بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز در تخم و اووسیت در سن سبز پسته برابر با ۶ بدست آمد.

کربوهیدرات ها از مهمترین مواد غذایی مورد استفاده در حشرات می باشند. که عموماً به صورت منوساکارید جذب می شوند، از این میان نشاسته و گلیکوژن، پلی ساکاریدهای اصلی ذخیره ای در گیاهان و حشرات بوده که توسط آنزیمهای کربوهیدرازی تجزیه می گردند. آنزیم آلفا آمیلاز در بدن جانوران از جمله حشرات نشاسته و گلیکوژن را مورد حمله قرار می دهد و در نتیجه شکستن زنجیره کربوهیدرات در نشاسته و گلیکوژن مخلوطی از الیگوساکاریدها و دگسترین آزاد می گردد.

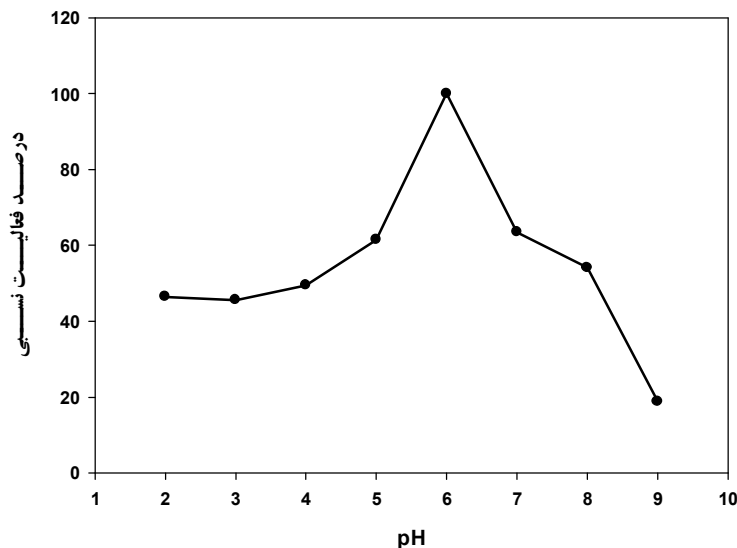
که حداقل دو نوع اندوپپتیداز در تخم در حال رشد در *L. migratoria* دیده شده است. یکی از آنها احتمالاً جزء کاتپسین ها بوده که آنزیم مسئول هیدرولیز پروتئینها در pH حدود ۵/۶ می باشد و دیگری تریپسین بوده که آنزیم مسئول هیدرولیز پروتئینها در pH حدود ۷/۸ می باشد (۲۶). هیدرولیز سوبسترای BAPNA توسط عصاره تخم *Bombyx mori* (۱۱) و *Musca domestica* (۲۲) نشان دهنده وجود و فعالیت آنزیمهای تریپسین سرین پروتئاز در طول دوره جنینی در کرم ابریشم و مگس خانگی می باشد. حضور سرین پروتئینازها در تجزیه زرده تخم *Periplaneta americana* (۱۸) و *Drosophila melanogaster* (۱۲) به اثبات رسیده است.

با هیدرولیز سوبسترای هموگلوبین توسط عصاره اووسیت کرم غوزه پنبه فعالیت پروتئولیتیکی بالایی در pH های ۳ و ۴ مشاهده شده است، این فعالیت پروتئولیتیکی توسط مهارکننده E-۶۴ مهار شد که نشان دهنده احتمال وجود سیستئین پروتئینازها می باشد. فعالیت پروتئینازی مذکور توسط مهار کننده های سرین پروتئینازی هم مهار شد که نشان دهنده وجود سرین پروتئینازها نیز در اووسیت *Helicoverpa armigera* می باشد (۳۱).

هیدرولیز سوبسترای اختصاصی کاتپسین بی توسط عصاره تخم *Antheraea pernyi* انجام گرفته است. مهار این آنزیم توسط مهار کننده E-۶۴ نیز صورت گرفته است. بر اساس این نتایج مشخص شد که سیستئین پرتئینازها در تخم حشرات مذکور ذخیره شده و در تجزیه زرده تخم نقش مهمی دارد (۳۲). فعالیت پروتئولیتیکی در جنین *D. melanogaster* و *Musca domestica* یافت شده که در تجزیه پروتئینها نقش دارد. این فعالیت پروتئولیتیکی را به وجود کاتپسین بی در جنین حشرات مذکور نسبت داده اند. آنزیم مذکور



(نمودار ۱۰) - فعالیت آمیلولیتیکی عصاره تخم سن سبز پسته در pH های مختلف



(نمودار ۱۱) - فعالیت آمیلولیتیکی عصاره اووسیت سن سبز پسته در pH های مختلف

تخمها بارور شده و به نظر می‌رسد که در این پشه ترکیبات کربوهیدراتها برای اووژنز ضروری هستند (۷). وجود گلیکوژن به عنوان یک منبع کربوهیدراتی مورد نیاز در طی ویتلوژنز در سن پنتاتومیده *Halys dentata* به اثبات رسیده است (۱۹). بررسی تغییر محتویات گلیکوژن در تخم کرم ابریشم در طی جنین زایی نشان داده است که محتویات گلیکوژن به صورت تدریجی در طی ۵ تا ۶ روز بعد از تخم گذاری کاهش پیدا می‌کند و حتی کاهش بسیار سریع گلیکوژن تا زمان تفریح دیده می‌شود (۱۶). وجود الیگوساکاریدها در ویتلوس *Blatella germanica* مورد بررسی قرار گرفته است و ترکیبی از گلیکوپپتید مشتق شده از ویتلوس سوسری آلمانی توسط بتا-ان-استیل گلیکوآمینیداز H هیدرولیز شده است (۱۴). وجود آلفا آمیلاز در اووسیت و تخم سن سبز پسته نیز بدون شک در تجزیه گلیکوژن و تامین نیاز انرژی و کربوهیدراتی جنین نقش اساسی دارد.

گلوکز نقش اساسی و مهم در طی اووژنز و جنین زایی دارد و به صورت گلیکوژن ذخیره شده و در متابولیسم و تولید انرژی در تخم و اووسیت نقش دارد (۳۲). فرایند تجمع کربوهیدراتهای ذخیره شده در تخم سن خونخوار *Rhodnius prolixus* مورد بررسی قرار گرفته است، نتایج نشان داده است که در طی اووژنز مقدار نهایی گلیکوژن، گلوکز و تری هالوز افزایش پیدا می‌کند در حالی که بعد از تخم گذاری محتویات گلیکوژن در تخم بارور شده کاهش یافته در صورتی که محتویات گلوکز در حال افزایش می‌باشد (۲۴). بدون شک این مواد کربوهیدراتهای ضروری موجود در ویتلوس برای رشد جنین در حال رشد می‌باشند و آنزیمهای مسئول هیدرولیز کربوهیدراتها در تجزیه این پلی ساکاریدها و تبدیل آنها به مونوساکاریدها نقش اساسی و مهمی ایفا می‌کنند. در گونه *Anopheles atroparvus* وقتی ماده ها به مقدار کافی از ترکیبات قندی کربوهیدراتی تغذیه کنند تمام

منابع

- ۱- هاشمی راد ج. ۱۳۸۳. سن‌های زیان آور باغهای پسته در استان کرمان. انتشارات مؤسسه تحقیقات پسته کشور.
- ۲- نیمان ا. ۱۳۴۵. بیماری ماسو و پیدایش قارچ در *Nematospora* میوه درختان پسته. نشریه مؤسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی ۲۵: 66-58.
- 3- Baker J.E. 1991. Purification and partial characterization of alpha-amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry*, 21(3): 303-311.
- 4- Bean D.W., Shirk P.D., and Brookes V.J. 2003. Characterization of yolk proteinase from the eggs of the Indian meal moth, *Plodia punctella*. *Insect Biochemistry*, 18: 199-210.
- 5- Cohen A.C. 1993. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzyme in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. *Journal of Insect Physiology*, 39: 823-829.
- 6- Faggoto F. 1990. Yolk degradation tick eggs: Occurance of a cathepsin L-like acide proteinase in yolk

- spheres. Archives of Insect Biochemistry and physiology, 14:217-235.
- 7- Fernandes L., and Briegel H. 2005. Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. Journal of Vector Ecology, 30: 11-26.
 - 8- Fialho F., Nakamura A., Juliano L., Masuda H., and Silva-Neto M.A.C. 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. Archives of Biochemistry and Biophysics, 436: 246-253.
 - 9- Folin O., and Ciocalteu V. 1927. On tyrosin and tryptophan determination in proteinase. Journal of Biological Chemistry ,73:627-650.
 - 10- Handley H.L., Estridge B.H., and Bradley J.T. 1998. Vitellin processing and protein synthesis during cricket embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28: 259-264.
 - 11- Ikeda M., Sasaki T., and Yamashita O. 1990. Purification and characterization of proteases responsible for vitellin degradation of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry, 20: 725-734.
 - 12- Indrasith L.S., Sasaki T., and Yamashita O. 1988. A unique protease responsible for selective degradation of a yolk protein in *Bombyx mori*. Puri-Fication, characterization, and cleavage profile. Journal of Biological Chemistry, 263: 1045-1051.
 - 13- Kucera M., and Turner R.B. 1973. Changes in acti of proteases during embryogenesis of *Anagasta kuehniella* (insect). Comparative Biochemistry and Physiology – Part B, 44: 577-585.
 - 14- Kunkel J.G., Shepard G.L., McCarthy R., Ethier D.B., and Nordin J.H. 2003. Concanavalin a reactivity and carbohydrate structure of *Blattella germanica* vitellin. Insect Biochemistry, 10: 703-714.
 - 15- Medina M., Leon P., and Vallejo C.G. 1988. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 263: 355-363.
 - 16- Miura K., and Shimizu I. 2003. Changes of triglyceride and glycogen content in the silkworm (*Bombyx mori*) eggs during diapause and embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology, 85: 719-723.
 - 17- Nation J.L. 2002. Insect physiology and biochemistry. CRC Press, 485pp.
 - 18- Olivera D.M.P., Ramos I.B., Reis F.C.G., Lima A.P.C.A., and Machado E. 2008. Interplay between acid phosphatase and cystein proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. Journal of Insect Physiology, 54: 883-891.
 - 19- Pathak J.P. 1971. Occurrence of glycogen during Vitellogenesis in *Halys dentate* (Hemiptera-Pentatomidae). Folia histochemica et cytochemica, 9: 273-276.
 - 20- Pohl P.C., Sorgine M.H.F., Leal A.T., Logullo C., Oliveira P.L., Silva Vaz Jr I., and Masuda A. 2008. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin – degradation activity. Comparative Biochemistry and Physiology, part B, 151: 392-399.
 - 21- Ribolla P.E.M., and Bianchi A.G. 1995. Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 25:1011-1017.
 - 22- Ribolla P.E.M., Daffre S., and Bianchi A.G. 1993. Cathepsin B and acid phosphatase activities during *musca domestica* embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 23: 217-223.
 - 23- Richardo A.J., Oliveira P.R., Bechara G.H., and Mathias M.I.C. 2007. Ultrastructural detection of proteins, Lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) during the vitello genesis process. Tissue and cell, 39: 203-215.
 - 24- Santos R., Mariano A.C., Rosas – Oliveira R., Pascare B., Machando E.A., Meyer-Fernandes J.R. and Gondim K.C. 2008. Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 67: 55-62.
 - 25- Sharma H.C., Sharma k.k., Seetharama N., and Ortiz R. 2000. Prospects for using transgenic resistance to insect in crop improvement. Electric Journal of Biotecnology, 3(2): 1-20
 - 26- Shulov A., Pener M.P., Kuk-Meiri S., and Lichtensteir N. 1957. Proteolytic enzymes in various embronic stages of the eggs of *locusta migratoria migratorioides*. Journal of Insect Physilogy, 1: 279-285.
 - 27- Takahashi S.Y., Yamamoto Y., Shionoya Y., and Kageyama T. 1993. Cystein proteinase from the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in vivo and in vitro. Journal of Biochemistry, 114: 267-272.
 - 28- Terra W.R., and Ferrira C. 1994. Insect digestive enzymes:properties, compartmentalization and function. Comperative Biochemistry and Physiology, 109:1-62.
 - 29- Wang Z., and Davey K.G. 1992. Characterization of yolk protein and its receptor on the oocyte membranc in *Rodnius prolixus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 22: 757-767.

- 30- Yamaguchi S., Katagiri S., Sekimizu K., Natori S., and Homma K. J. 2005. Involvement of EDTP, an egg-derived tyrosine phosphatase, in the early development of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biochemistry*, 138: 721-728.
- 31- Zhao X., Wang J., Xu X, Schmid R., and Wieczorek H. 2002. Molecular cloning and characterization of the cathepsin B-like proteinase from the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 11(6): 567-575.
- 32- Zhao X., Wang J., Yagi N., Yamamoto Y., Watabe S., and Takahashi S.Y. 1996. Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of silkworm moth, *Antheraea pernyi*. *Comparative Biochemistry and Molecular Biology*, 113: 95-103.
- 34- Zheng P., Vassena R., and Latham K. E. 2007. Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos. *Molecular human reproduction*, 13: 361-371.