نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹، ص ۳۶۲-۳۵۴

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 3, Fall 2010, p. 354-362

بررسی برخی ویژگی های آنزیم آلفا-آمیلاز شب پره هندی *Plodia interpunctella* Hübner (Lep., Pyralidae)

رضا فرشباف پورآباد[1*]- لیلا رشیدی[2]- مصطفی ولیزاده[3]- محسن یزدانیان[4]- داود محمدی[5]

تاریخ دریافت:۸۹/۳/۳۰
تاریخ پذیرش:۸۹/۹/۲

چکیده

در سالهای اخیر استفاده از مهار کننده‌های آنزیمی در گیاهان تراریخته به دلیل بهبود مقاومت گیاهان در برابر حشرات و کاهش اثرات سوء زیست‌محیطی و امنیت بالای آنها نسبت به عوامل کنترل بیولوژیک اهمیت زیادی پیدا کرده است. داشتن اطلاعات در مورد ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی اولین گام در جهت استفاده از مهارکننده‌های آنها برای استفاده در برنامه‌های کنترل آفات می‌باشد. در این مطالعه برخی ویژگی‌های آنزیم آلفا- آمیلاز گوارشی شب‌پره هندی، شامل pH بهینه، دمای بهینه، پایداری آنزیم و همچنین فعالیت آنزیم در سنین مختلف لاروی مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین فعالیت آنزیم در دو جنس نر و ماده حشرات کامل مورد مقایسه قرار گرفت. حشرات در شرایط کنترل شده‌ی دمای۲±۲۶ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی۵۰٪ و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت (تاریکی: روشنایی) پرورش یافتند. تمام آزمایشات در چهار تکرار پیاده شدند. فعالیت آنزیم در محدوده دمایی ۲۵ الی ۴۵ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفتند که دمای بهینه فعالیت آنزیم برای هر دو جنس نر و ماده ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. کمترین میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. روند فعالیت آنزیم در هر دو جنس در دماهای مختلف مورد مطالعه مشابه بود. آنزیم در محدوده pH های ۱۰- ۵ فعال بوده و روند فعالیت آنزیم در محدوده مورد مطالعه برای هر دوجنس نر و ماده مشابه بود. بهینه فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در pH برابر ۵/۵ برای هر دو جنس مشاهده شد. حداقل فعالیت آنزیم برای حشرات نر و ماده در pH های ۸/۵ و ۷/۵ مشاهده شد. فعالیت آنزیم در حشرات نر و ماده متفاوت بوده و در جنس ماده آنزیم فعالتر از جنس نر بود. این مطالعه همچنین نشان داد که نگهداری آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ روز تاثیری در کاهش فعالیت آنزیم نداشت. فعالیت آنزیم در سنین مختلف لاروی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد و بیشترین فعالیت آنزیم در سن پنجم لاروی مشاهده شد و بین سنین سوم و چهارم از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

واژه های کلیدی: آلفا-امیلاز، شب پره هندی، pH، دما، نر و ماده

مقدمه

دستگاه گوارش در حشرات عبارت از لوله طویلی است که از دهان شروع و به مخرج ختم می‌شود. اندازه و شکل آن وابسته به نوع تغذیه حشره و رفتار تغذیه‌ای آن است (۳). تقریباً لارو اکثر بال‌پولک‌داران گیاه‌خوار هستند. این لاروها پی در پی تغذیه می‌کنند و اگر منابع غذایی کافی در دسترس داشته باشند، ممکن است بعضی از گونه‌ها در یک وعده غذایی بیشتر از وزن بدن خود غذا مصرف نمایند، به علت این نوع تغذیه در دستگاه گوارش این لاروها تغییراتی صورت گرفته است تا غذا سریعتر به معده رسیده و هضم و جذب آن آغاز شود (۲۳).

آنزیم‌های گوارشی حشرات بر حسب رژیم غذایی آنها متفاوت است. در حشرات همه‌چیزخوار آنزیم‌های گوناگونی ترشح می‌شود که می‌توانند هر گونه مواد غذایی را در روده میانی هضم کنند (۱). لارو بالپولکداران مجموعه‌ای از آنزیم‌های گوارشی را دارا هستند که به‌وسیله سلول‌های معده میانی ترشح می‌شوند. سطح فعالیت آنزیم در معده میانی لارو بالپولکداران بسیار زیاد و در معده عقبی کم می‌باشد (۱۴). آنزیم‌هایی نظیر تریپسین، آمیلاز، بتاگلیکوزیداز، آمینوپپتیداز و تره‌هالاز در دستگاه گوارش لاروها فعالیت دارند. همچنین مقدار کمی آنزیم آمیلاز، مالتاز و اینورتاز توسط غدد لب پایین و غدد آرواره بالا ترشح می‌شوند.

۱و۲- دانشیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز
(*- نویسنده مسئول: Email: rfpourabad@yahoo.com)
۳- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز
۴- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۵- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان

آلفا- آمیلازها در برگیرنده خانواده‌ای از آندو آمیلازها هستند که هیدرولیز پیوند α -D- (۱/۴)- glucan را در ترکیبات نشاسته‌ای، گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌های وابسته انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها نقش محوری در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها دارند. آلفا آمیلازها در بیوتکنولوژی به ویژه در صنایع غذایی و فرآوری نشاسته یکی از مهمترین آنزیم‌ها گزارش شده اند. بسیاری ازحشرات، به ویژه آنهایی که طی مرحله لاروی و یا حشره‌ی کامل خود بر روی فرآورده‌های غله‌ای زندگی می‌کنند، برای زنده ماندن وابسته به آنزیم آمیلاز هستند (۱۵و۲۵).

ویژگی آنزیم‌های گوارشی در حشرات، متناسب با موقعیت تاکسونومیکی آنها متغیر بوده و تحت تاثیر رژیم‌های غذایی و شرایط زیست‌محیطی محل های فعالیت آنهاست.

آلفونزو و همکاران (۷) طی یک بررسی روی فعالیت آلفا-آمیلاز مراحل مختلف رشدی *Spodoptera frugiperda* حداکثر فعالیت در سن آخر لاروی و در محدوده‌ی pH ۹/۵-۸/۵ گزارش کردند. در این بررسی مهارکننده‌های پروتئینی هتروتترامریک حاصله از گندم، فعالیت آلفا- آمیلاز سن آخر لاروی این حشره را کاهش داد، در حالیکه مهارکننده‌های هومودیمریک و منومریک اثر کمی روی فعالیت انزیم آلفا-آمیلاز نشان داد.

ناکونیزئی و همکاران (۲۲) در بررسی آنزیم‌های گلیکوزیداز نشان‌دار بافت و محتوای روده‌ی سنین ۴ و ۵ لاروهای *Paranassius appollo* (L.) (Lep: Papilionidae) گزارش کردند که آلفا- آمیلاز بر خلاف سلولاز نقش بسیار مهمی در هضم کربوهیدراتها دارد.

بیکر (۸) طی یک تحقیق بر روی *Anagasta kuehniella* حداکثر فعالیت آلفا- آمیلاز را در pH ۵ /۹- ۹ گزارش کرده است.

بسیاری از حشرات بخصوص آفات مهم انباری که بر روی رژیم غذایی غنی از ساکارید زندگی می‌کنند برای رشد و زندگی به فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز وابسته هستند. تحقیق بر روی هضم مواد نشاسته‌ای به عنوان یک هدف برای کنترل حشرات، در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است. بخصوص پس از اینکه مهارکننده‌هایی از برخی گیاهان مانند گندم، لوبیا، تاج خروس بدست آمده و بر علیه حشرات به کار گرفته شد (۱۵و۲۱).

مطالعه در زمینه‌ی آنزیم‌های گوارشی اساس مطالعه‌ی فیزیولوژی دستگاه گوارش آن‌ها به شمار می‌رود. با توجه به اهمیت استفاده از مهارکننده‌های گیاهی آنزیم‌های گوارشی و تولید گیاهان تراریخته‌ی حاوی این ترکیبات، اولین قدم در راه استفاده از مهارکننده‌ها در امر کنترل آفات، شناخت کامل ویژگی‌های هر کدام از آنزیم‌های گوارشی می‌باشد. در مورد حشرات مفید استفاده از فعال کننده‌های آنزیم‌های گوارشی می تواند در بهبود احتمالی پرورش‌های آن‌ها نقش داشته باشد. تعیین ویژگی‌های مختلف آنزیم‌های گوارشی که با عنوان Method development شناخته می‌شود، شامل بررسی ویژگی‌هایی از قبیل دما و pH بهینه آنزیم، مدت زمان پایداری آنزیم، اثر غلظت آنزیم و فعالیت آن، اثر محلول‌ها یا حلال‌های مختلف بر فعالیت آنزیم و غیره می‌باشد. در این بررسی، برخی ویژگی‌های آنزیم آلفا- آمیلاز دستگاه گوارش شب‌پره هندی *P. interpunctella* برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره مورد بررسی

لاروهای سنین ۴ و ۵ *Plodia interpunctella* در اسفند ماه ۱۳۸۵ از یک کلنی آزمایشگاهی موجود در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شده و به یکی از واحدهای گلخانه‌ای گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز منتقل شدند. پرورش آزمایشگاهی تمام مراحل مختلف نشو و نمایی شب‌پره هندی در دمای ۲±۲۶ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد و دوره نوری ۸ : ۱۶ ساعت (تاریکی: روشنایی) انجام شد. حشرات به مدت ۲ نسل بر روی پسته خام احمد آقایی خالص‌سازی شدند و از نسل سوم به بعد برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه آزمایش‌های مربوط به سنجش فعالیت آنزیم در ۴ تکرار انجام شد.

تشریح حشرات و آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی

لاروهای مورد استفاده در سنجش فعالیت آنزیم به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشته شدند. لاروها قبل از تشریح به مدت ۵ دقیقه در ظرف حاوی یخ صنعتی قرار داده شدند تا بی‌حس شوند. سپس در داخل یک پتری دیش حاوی بافر فسفات سرد (PH ۶/۹۵) و در زیر استریومیکروسکوپ تشریح شدند.

جهت تشریح و خارج ساختن روده ابتدا سر لارو بوسیله پنس گرفته شده و سپس بوسیله یک قیچی میکروجراحی از سمت پهلوی لارو شکافی ایجاد شد. بوسیله سوزن و نوک قیچی به سمت خارج هدایت شده و از محل اتصال به سر و مخرج کاملاً جدا شده و پس از شستشو در بافرفسفات سرد به داخل میکروتیوپ‌های ۱ml که حاوی ۰/۵ml بافرفسفات بودند، منتقل شدند. نمونه ها با استفاده از هموژنایزر هموژنیزه شده به مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه‌سانتی گراد نگهداری شدند. پس از انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول سطی به عنوان منبع انزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز

فعالیت آلفا-آمیلاز با استفاده از کیت تشخیص (کیت آمیلاز، ساخت شرکت پارس آزمون) اندازه‌گیری شد. جذب نوری که مستقیماً

متناسب با فعالیت آلفا- آمیلاز است، در طول موج ۴۰۵ نانومتر و دمای ۳۷°C توسط دستگاه اتوآنالایزر (مدل Alcyon 300، ساخت شرکت Abbott ، آمریکا) اندازه‌گیری شد (برطبق پروتکل ارایه شده توسط شرکت سازنده‌ی کیت).

صفات مورد بررسی

دمای بهینه فعالیت آنزیم

نظر به اینکه دمای تنظیم شده‌ی دستگاه اتوآنالایزر قابل تغییر نبود، جهت سنجش فعالیت آنزیم در دماهای مختلف و تعیین دمای بهینه فعالیت آن، از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VS (مدل ULTROSPEC 2000 ساخت شرکت Pharmacia Biotech آمریکا و روش دستی استفاده گردید. نمونه‌های آنزیمی لاروهای سن پنجم نر و ماده بصورت جداگانه تهیه شدند. لاروهای تا ۲۴ ساعته از کلونی انتخاب شده و بعد از ۲۴ ساعت گرسنه نگه‌داشته شدن، بلافاصله تشریح شدند. دماهای مورد بررسی شامل ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد بودند. محلول زیرنهشت به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری (در دماهای فوق) نگه‌داری شد تا دمای آن به حد تعادلی مورد نظر برسد. سپس، ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی با ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول زیرنهشت در داخل کووت‌های پلاستیکی یک میلی‌لیتری مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه در بن ماری قرار داده شدند. دو دقیقه پس از مخلوط شدن زیر نهشت و محلول آنزیمی، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت گردید. برای تعیین فعالیت آنزیم، اختلاف‌های جذب نوری پس از ۱، ۲و۳ دقیقه تعیین شده با هم جمع و بر ۳ تقسیم شدند. با ضرب کردن میانگین‌های بدست آمده در عدد ۱۱۰۷۷ فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر لیتر (U/L) محاسبه گردید (برطبق پروتکل ارایه شده توسط شرکت سازنده‌ی کیت).

pH بهینه فعالیت آنزیم

برای تهیه محلول آنزیمی، ۱۵ عدد لوله کامل گوارشی لاروهای سن پنجم نر و ماده در یک میلی‌لیتر آب مقطر، هموژنیزه و سانتریفیوژ شد. لاروها بدون توجه به سن آنها از کلونی انتخاب شده و بدون گرسنه نگه‌داشتن بلافاصله تشریح گردیدند. pH بافرفسفات مورد استفاده با اسید سیتریک و هیدروکسید سدیم از ۵ تا ۱۰ (به فواصل ۰/۵ واحد) تغییر داده شد و از هر کدام، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر در داخل میکروتیوپ‌های ۱/۵ml ریخته شد. به ازای هر میکروتیوپ ۵۰ µl از محلول آنزیمی اضافه و فعالیت آنزیم پس از ۳۰ دقیقه نگه‌داری در دمای اتاق (۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری گردید.

پایداری محلول آنزیمی

برای تهیه محلول آنزیمی از لاروهای سن پنجم نر و ماده استفاده شد. فعالیت آنزیم پس از تهیه شدن (به صورت تازه) و در فواصل ۱۰ روزه تا ۳۰ روز پس از تهیه شدن اندازه‌گیری گردید. محلول‌های آنزیمی در داخل یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

اثر طول دوره گرسنگی بر روی فعالیت آنزیم

لاروهای سن پنجم نر و ماده تا ۲۴ ساعته بطور جداگانه و همزمان از کلونی انتخاب شده در ظروف جداگانه‌ای فاقد آب و مواد غذایی به مدت صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی گرسنه نگهداشته شدند.

فعالیت آنزیم سنین مختلف لاروی و جنس‌های مختلف

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لاروهای سنین سوم، چهارم و پنجم و همچنین جنس‌های نر و ماده سن پنجم (تا ۲۴ ساعته) مورد بررسی قرار گرفت. اثر سنین مختلف لاروی و جنسیت بر روی آنزیم به صورت مجزا مطالعه گردید.

فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز

لاروهای سن پنجم نر و ماده (تا ۲۴ ساعته) در ساعات ۶، ۸، ۱۲، ۱۸ در طول شبانه روز از ظروف پرورشی انتخاب شده و بلافاصله بدون گرسنه نگه داشتن تشریح شدند. فعالیت آنزیم در طول شبانه روز در جنس‌های نر و ماده به صورت مجزا مورد مقایسه قرار گرفتند.

تجزیه آماری

داده‌های حاصل از کلیه آزمایش‌ها از نظر نرمال بودن توزیع داده‌ها بررسی شده سپس بر اساس طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام و نتایج به صورت نمودار با استفاده از نرم افزار Excel ارایه گردید.

نتایج و بحث

دمای بهینه فعالیت آنزیم

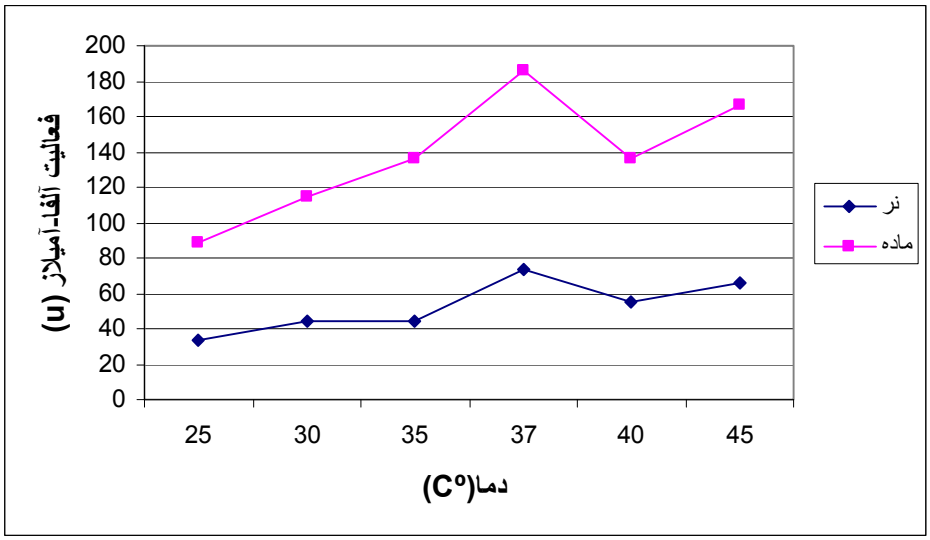
نتیجه‌ی تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آلفا- آمیلاز لاروهای سن پنجم نر و ماده در دماهای مختلف نشان داد که دماهای مختلف از نظر آماری تاثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم دارند ($P < ٪۵$). در بین جنس‌های نر و ماده اختلاف معنی‌داری از نظر دمای بهینه مشاهده نشد. روند فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لاروهای

سن پنجم در دماهای ۲۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، مشابه و آنزیم در این طیف دمایی فعالیت داشت. فعالیت آنزیم در هر دو جنس نر و ماده از ۲۵ تا ۳۷ درجه سیر صعودی داشته و سپس در ۴۰ درجه سانتی‌گراد نزولی و در ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز مقداری افزایش داشته است. در هر دو جنس نر و ماده بیشترین فعالیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و کمترین فعالیت نیز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. روند فعالیت آنزیم در دماهای مختلف در هر دو جنس مشابه بود. با توجه به شکل ۱ مشخص می‌شود که فعالیت کلی آنزیم‌ها بین ۴۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد بوده و در دماهای پایین فعالیت آن کم می‌باشد (شکل ۱).

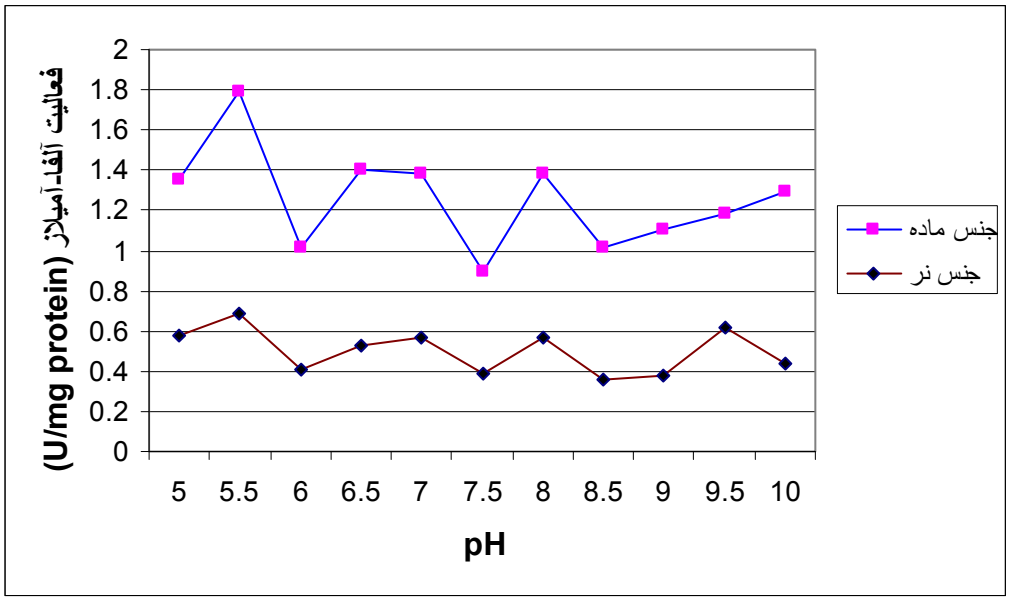
با توجه به نظر برخی محققین، مبنی بر این که دمای بهینه آنزیم‌های مختلف حشرات بستگی به pH واکنش دارد، دمای بهینه، متناسب با مدت زمان واکنش تغییر می‌کند. بنابراین، بین نتایج به دست آمده در شرایط مختلف هیچ‌گونه مقایسه‌ای نمی‌توان انجام داد (هوری ۱۹۷۳). مندیولا- اولایا و همکاران (۲۰۰۰) دمای بهینه فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای سوسک *Prostephanus truncatus* Horn را ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند و نشان دادند که از دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به بالا سرعت فعالیت آن کاهش یافته است. کاهش سریع فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر از ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان دهنده‌ی عدم پایداری آن در دماهای بالا می‌باشد.

دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز *Callosobruchus chinensis* ما بین ۴۰-۳۶ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آلفا- آمیلاز همولنف کرم ابریشم *Bombyx mori* ۳۵ درجه سانتی‌گراد و آلفا- آمیلاز بزاقی *Lygus* sp. ۳۷ درجه سانتی‌گراد بوده (۲۰) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. بنا به گزارش والنسیا و همکاران (۲۰۰۰)، آلفا- آمیلاز روده‌ای *Hypothenemus hampei* تا ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد فعال است. دمای بهینه فعالیت آلفا- آمیلاز *Adelphocoris suturalis* حدوداً ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در *Dolycoris baccarum* حدود ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گزارش شده است. در گونه *A. suturalis* آنزیم در دماهای ۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد از خود فعالیت نشان داده است (۱۶).

پایداری آنزیم‌های پروتئینی وابسته به ترکیب سه بعدی و ساختمان مولکولی‌های اسید آمینه آنها می‌باشد. یک تغییر کوچک در این ساختمان، مخصوصاً در جایگاه فعال، ممکن است شدت واکنش کاتالیزوری آنها را به طور قابل توجهی تغییر دهد. بعضی از تغییرات به طور کلی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها را متوقف می‌کنند، اما اگر محیط آنزیم به شرایط عادی برگردد، آنزیم فعالیت خود را دوباره به دست خواهد آورد. اگر تغییرات به حدی باشد که آنزیم به حالت اولیه بر نگردد، فعالیت آنزیم کاهش خواهد یافت. دما از جمله فاکتورهایی است که با ایجاد تغییراتی در ترکیب سه بعدی آنزیم فعالیت آن را کاهش می‌دهد (۴).



شکل ۱- روند تغییرات فعالیت آلفا-آمیلاز شب پره هندی در دماهای مختلف



شکل ۲- روند تغییرات فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لاروهای نر و ماده سن پنجم شب پره هندی در pH های مختلف

pH بهینه فعالیت آنزیم

شکل ۲ روند و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم را در pH های مورد بررسی نشان می‌دهد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت کلی آلفا- آمیلاز در pH های مختلف نشان داد که فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در هر دو جنس نر و ماده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است. روند فعالیت آنزیم در pHهای مختلف در هر دو جنس تقریباً مشابه بود. بیشترین فعالیت آنزیم در هر دو جنس نر و ماده در pH ۵/۵ مشاهده شد که این pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در نظر گرفته شد. در جنس نر در pH ۹/۵ فعالیت آنزیم مقداری کمتر از بهینه به دست آمد ولی از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین میزان فعالیت آلفا- آمیلاز در جنس نر در pH ۸/۵ و در جنس ماده نیز در pH ۷/۵ مشاهده شد. بطور کلی در هر دو جنس نر و ماده کمترین میزان فعالیت آنزیم در pH های ۶، ۷/۵ و ۹ به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با همدیگر نداشتند (شکل ۲).

pH یکی از خواص بسیار مهم داخلی معده است که در آنزیم‌های گوارشی حشرات تاثیرگذار می‌باشد. گزارشات مختلفی مبنی بر میزان pH معده و pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات مختلف وجود دارد. آنزیم‌ها دارای یک pH یا دامنه pH مطلوب می‌باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در pH بالاتر یا پائین‌تر از آن، فعالیت آنزیم‌ها کاهش می‌یابد. pH می‌تواند بر روی پایداری آنزیم و بهبود فعالیت بهینه آن تاثیرگذار باشد. اثر pH روی فعالیت آنزیم را معمولاً به یونیزاسیون گروههای زنجیرهای جانبی در جایگاه فعال پروتئینی نسبت می‌دهند که سبب می‌شود زنجیرهای جانبی به صورت اسید یا باز ضعیف عمل کنند. ضمناً زنجیرهای جانبی سایر اسیدهای آمینه موجود در محل‌های دیگر ساختمان پروتئین نیز در واکنش‌های متقابلی شرکت می‌نمایند که برای ایجاد و حفظ ساختمان پروتئین موثر هستند (۲).

pH بهینه برای فعالیت آنزیم با pH معده حشره در برخی از گونه‌ها همخوانی داشته و تحت تاثیر فاکتورهایی نظیر غذا و pH غذا و جمعیت میکروارگانیسم‌های معده می‌باشد (۱۴). بیشترین فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای حشرات گوشتخوار در pH ۷- ۵ مشاهده می‌شود در حالیکه در حشرات گیاهخوار و همه‌چیزخوار، pH بهینه این آنزیم بیشتر متمایل به سمت قلیایی است (۱۶). pH بهینه کربوهیدراتازهای روده‌ای حشرات بیشتر تحت تاثیر رژیم غذایی آنها قرار دارد تا موقعیت تاکسونومی آنها، در حالی‌که در مورد پروتئازهای روده‌ای، pH بهینه کم و بیش وابسته به موقعیت فیلوژنتیکی حشره می‌باشد (۱۹).

نظر به اینکه pH اندامهای مختلف بدن حشرات اغلب ناشناخته می‌باشد، لذا شرایط آزمایشی غالب با در نظر گرفتن pH بهینه فعالیت آنزیم مورد مطالعه، یا با توجه به شرایط مورد استفاده برای سایر آنزیم‌ها یا ارگانیسم‌های مشابه انتخاب می‌شوند. با وجود این، مشخص کردن pH بهینه فعالیت آنزیم خیلی ضروری می‌باشد. با مطالعه‌ی pH قسمت‌های مختلف معده(white) *Zealandica cotellytra* بخش جلوی معده، معده میانی و انتهایی به ترتیب ۸/۴، ۱۰/۹ و ۹/۳ به دست آمد. با این بررسی هر چند آنزیم آلفا- آمیلاز در سرتاسر روده میانی وجود دارد اما در pHهای بالا که در بیشتر قسمت‌های روده میانی دیده می‌شود، غیر فعال است. لذا، آنزیم در

قسمت‌های خاصی از روده و در درجه اول در ناحیه جلویی لوله‌های کور فعالیت قابل توجهی دارد. دلیل اصلی شناخت pH قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش حشرات، شناسایی مهارکننده‌های مناسبی است که بتوانند در آن دامنه‌ی مشخص pH فعالیت قابل توجهی داشته باشند (۱۱).

زنگ و کوهن (۲۷) با بررسی اثر pH بر روی فعالیت آلفا- آمیلازهای بزاقی سن، *Lygus hesperus* knight، pH بهینه را برای این حشره ۵/۶ به دست آوردند. آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی *Eurydema rugosa* Matsch. در pH بین ۵ تا ۸ فعال بود و بهینه فعالیت آن در pH بین ۶ تا ۷ مشاهده گردید. فعالیت آنزیم در pH ۳ غیر فعال و در pH ۴ نیز بسیار کم گزارش شده است (۱۷).

pH بهینه آلفا- آمیلاز شب‌پره هندی (۵/۵) با pH بهینه آلفا - آمیلاز روده‌ای *Diabrotica virgifera virgifera* (pH ۵/۷) ، مشابهت نشان داد (۲۶). pH آلفا- آمیلاز گوارشی *Callosobruchus maculatus* ۵/۵ (۲۴) و آلفا- آمیلاز معده *Sitophilus granarius* نیز توسط بیکر (۹) pH ۵ گزارش شده که نتایج این محققین نیز کم‌وبیش با نتایج ما مشابهت دارد. با مطالعه بر روی بعضی از آفات انباری توسط محققین مختلف pH بهینه آلفا- آمیلاز گوارشی *Rhizoperta dominica* (۱۰) pH ۷ و آلفا- آمیلاز روده‌ای *S. frugiperds* بین ۹/۵- ۸/۵ (۱۲) بیشتر از pH بهینه آلفا- آمیلاز شب‌پره هندی بود. بیکر (۱۰) عصاره حاصل از بدن حشرات کامل *R. dominica* را مورد مطالعه قرار داد. نتایج این محقق حداکثر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز را در pH ۷ نشان داد. این محقق گزارش کرد که در pH ۵-۴ نیز فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز وجود دارد. بیکر این موضوع را به وجود آیزوزایم‌ها نسبت داد. در مورد شب‌پره هندی نیز علاوه بر pH ۵/۵ در نقاط دیگر فعالیت آنزیم مشاهده شد که احتمالاً به علت وجود آیزوزایم‌ها می‌باشد.

اثر پایداری آنزیم

نتایج تجزیه آماری و مقایسه میانگین مربوط به اثر تازگی محلول آنزیم بر روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز لاروهای سن پنجم (نر و ماده) نشان داد که نگهداری انزیم به مدت ۳۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد تاثیری در کاهش فعالیت آنزیم نداشت. هوری (۱۹۷ ۳)، با مطالعه بر روی آنزیم آلفا- آمیلاز *L. disponsi* نشان داد که با نگهداری این آنزیم در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا یک سال فعالیت آنزیم ثابت باقی می‌ماند. یزدانیان و همکاران (۶) در بررسی سن *G. lineatum* گزارش کردند که فعالیت آنزیم تا ۴۰ روز پس از تهیه شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فعال باقی می‌ماند. این مطالعه و نتایج مشابه حاصله از بررسی پایداری آنزیم آلفا- آمیلاز شب‌پره هندی نشان می‌دهد که آنزیم آلفا- آمیلاز، آنزیمی پایدار است و در دمای مناسب می‌توان آن را به مدت طولانی، بدون تغییر در فعالیت آن، نگهداری نمود.

اثر طول دوره گرسنگی بر روی فعالیت آنزیم

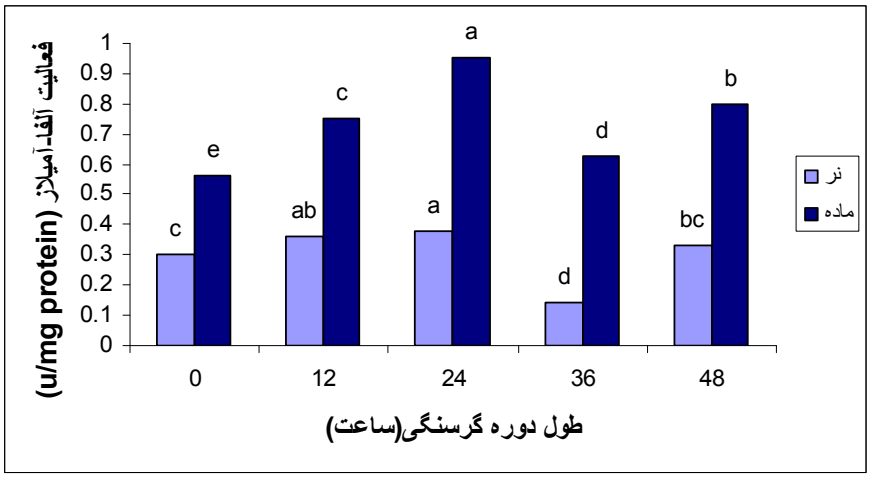
نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اثر طول دوره گرسنگی بر فعالیت آنزیم نشان داد که در هر دو جنس، نر و ماده، در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (شکل۳). با توجه به شکل ۳ در افراد نر بیشترین میزان فعالیت آنزیم پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت گرسنگی مشاهده شد و کمترین میزان فعالیت آنزیم نیز در تیمار ۳۶ ساعت گرسنگی به دست آمد. در لاروهای سن پنجم ماده بیشترین فعالیت در ۲۴ ساعت گرسنگی و کمترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد (بدون گرسنگی) به دست آمد. روند فعالیت آنزیم در هر دو جنس نر و ماده تقریباً مشابه بود. ماتومورا (به نقل از هوری ۱۹۷۳) در مورد آلفا- آمیلاز روده‌ای *B. mori* گزارش کرد که گرسنگی کوتاه مدت سبب افزایش فعالیت آنزیم و گرسنگی طولانی مدت سبب کاهش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز شد. گرسنگی کمتر از ۲۴ ساعت فعالیت آنزیم را به میزان کمی تحت تاثیر قرار داد. یزدانیان (۵) گزارش نمود که افزایش طول دوره گرسنگی حشرات کامل سن نواری چتریان به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم و در نتیجه تجمع آنزیم در لومن غده بزاقی شده است.

فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز

اثر این تیمار بر روی فعالیت آنزیم در هر دو جنس نر و ماده در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. روند فعالیت آنزیم در هر دو جنس مشابه یکدیگر بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در ساعت ۱۲ ظهر در هر دو جنس نر و ماده و پس از آن در ساعت ۸ صبح مشاهده شد که اختلاف معنی داری با یکدیگر داشتند. کمترین میزان فعالیت در ساعت ۶ صبح و ۱۸ عصر مشاهده شد. روند فعالیت آنزیم نشان می‌دهد که در هر دو جنس تا ۱۲ ظهر میزان فعالیت آنزیم افزایش و سپس کاهش می‌یابد. همچنین بین میانگین فعالیت آنزیم در ساعت ۸ صبح و ۶ عصر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۴).

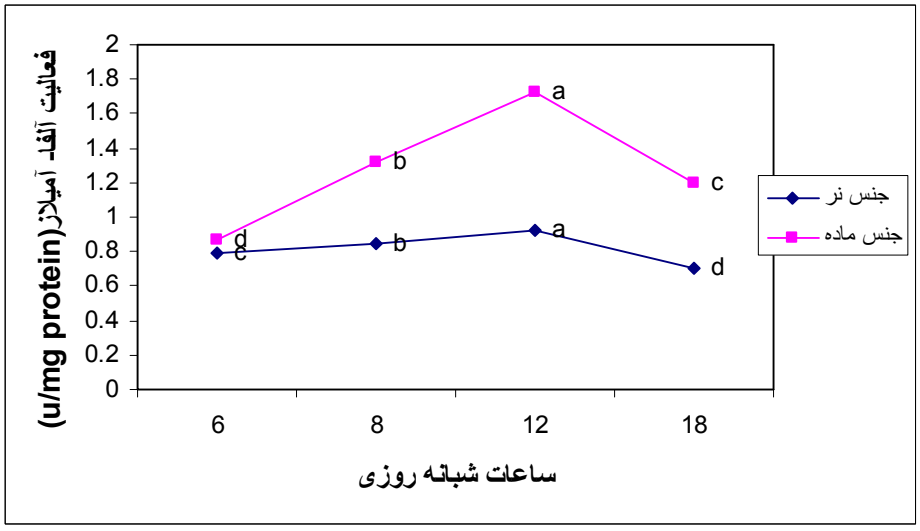
در زمینه تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات در شبانه‌روز تاکنون به آن صورت تحقیقی انجام نشده است. یزدانیان (۵) در مورد سن *G. lineatum* گزارش کرد که در حشرات نر بیشترین فعالیت در ساعت ۱۲ ظهر و در حشرات ماده ۱۲ شب، ۸ صبح و ۶ صبح مشاهده گردید که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند.

تفاوت در فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز را شاید بتوان به طور جزئی به تغییر در میزان تولید آنزیم بر اثر دمای محیطی و شرایط گرسنگی و به طور عمده به تفاوت‌های موجود در فعالیت آنزیم بسته به مراحل مختلف نشو و نمایی و رشدی نسبت داد.



شکل ۳- اثر طول دوره گرسنگی بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز شب پره هندی

(مقایسه میانگین ها برای هر دو جنس به طور جداگانه انجام شده است)



شکل ٤- فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در ساعات مختلف شبانه روز

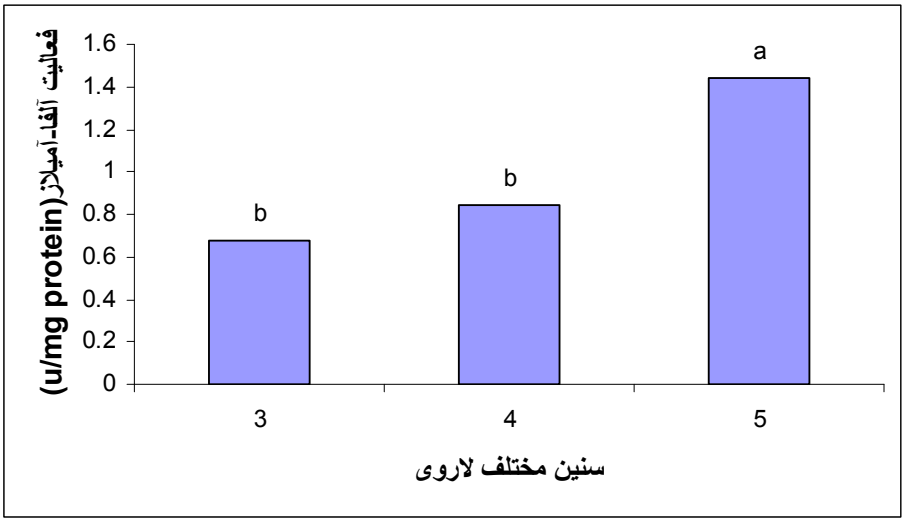
(مقایسه میانگین ها برای هر دو جنس به طور جداگانه انجام شده است). حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار از نظر آماری در سطح احتمال ۵٪ می باشد.

فعالیت آنزیم در سنین مختلف لاروی

فعالیت آنزیم در سنین مختلف لاروی در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین فعالیت آنزیم در سن پنجم لاروی مشاهده شد. اختلاف بین فعالیت آنزیم در سنین سوم و چهارم لاروی معنی‌دار نبود (شکل ۵).

تفاوت فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در مراحل مختلف نشو و نمایی را می‌توان به عواملی همچون نوع و میزان تغذیه نسبت داد (۲۰). در مورد شب‌پره هندی نیز با افزایش میزان تغذیه و جذب غذا فعالیت آلفا- آمیلاز افزایش یافت، که این امر مشابهت با سایر تحقیقات انجام یافته در این زمینه را نشان می‌دهد. هوری (۱۷)، با مطالعه فعالیت آنزیم در مراحل مختلف نشو ونمایی سن بدبوی کلم *Eurydema rugusa* ، نشان داد که فعالیت آنزیم در پوره‌های سن دوم بسیار کم، اما در پوره‌های سنین سوم، چهارم و پنجم نسبتاً بالا بود و در سن چهارم به حداکثر مقدار خود رسید.

هوری (۱۹۷۰) با مطالعه بر روی سن *L. disponsi* دریافت که در یک مرحله رشدی، فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی در پوره‌های جوان‌تر پایین بود اما با رشد پوره‌ها و مسن‌تر شدن آنها و درست قبل از تعویض جلد به بیشترین مقدار خود رسید. فعالیت آنزیم در پوره‌های سن دوم تقریباً برابر پوره‌های سن سوم بود در حالیکه فعالیت آنزیم پوره‌های سنین چهارم و پنجم به ترتیب حدوداً ۳ و ۱۰ برابر فعالیت آن در پوره‌های سن دوم بود.



شکل ۵- فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در سنین مختلف لاروی شب پره هندی

فعالیت آنزیم در بافت معده میانی لار و پروانه *C. crocale* به طور معنی‌داری با افزایش سن لاروی افزایش یافت. همچنین بین میزان جذب غذا و فعالیت آنزیم ارتباط مستقیم مشاهده شد، به طوری که با افزایش تغذیه و جذب غذا، فعالیت آنزیم نیز در بافت معده افزایش یافت (۱۳).

نوع و غلظت آنزیم متناسب با مرحله نشو و نمایی آفت تغییر می‌کند. در طول مرحله لاروی *Drosophila* sp.، فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز از سن لاروی اول تا سن آخر لاروی به تدریج افزایش می یابد. هر چند که هنگام تعویض جلد کاهش نشان می‌دهد. در سن پنجم لاروی، فعالیت آنزیم در لاروهای سن پنجم تازه ظاهر شده بسیار کمتر از لاروهای مسن همین مرحله بوده و بیشترین مقدار آن در حشرات کامل ۴ روزه مشاهده شد. فعالیت پروتئاز روده‌ای *Galleria mellonella* با پیشرفت سنین لاروی افزایش می‌یابد (۲۰).

در کل بررسی حاضر نشان داد که دمای بهینه فعالیت انزیم آلفا-آمیلاز شب پره هندی برای هر دو جنس نر و ماده حدود ۳۷ °C می باشد هر چند فعالیت آنزیم در جنس ماده بیشتر از جنس نر بود. همچنین در این بررسی مشخص شد که آنزیم در pHهای مختلف فعالیت متفاوتی نشان داد و پیک های مختلفی از فعالیت آنزیم در pH های مختلف مانند ۵/۵، ۷ و ۸ مشاهده شد که در کل در شرایط نسبتا اسیدی فعالیت انزیم بیشترین مقدار خود را داشت. در بررسی دیگری مشاهده شد که نگهداری آنزیم به مدت یک ماه در دمای یخچال تاثیری در کاهش فعالیت آنزیم نداشت. تاثیر گرسنگی بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز نیز معنی دار بود به طوری که بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی در هر دو جنس فعالیت آنزیم افزایش یافت و پس از آن سیر نزولی پیدا کرد. در ساعات مختلف شبانه روز فعالیت آنزیم متفاوت بوده و اوج فعالیت انزیم در ساعت ۱۲ ظهر بود و همچنین مشخص شد که با افزایش سنین لاروی فعالیت آنزیم نیز افزایش معنی داری نشان میدهد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر و همچنین مطالعات تکمیلی‌تر امید است گام‌های موثری در راستای گسترش روش‌های نوین کنترلی برای آفات برداشته شود.

منابع

۱- باقری زنوز.۱۳۷۲. تکنولوژی نگهداری محصولات کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۴۱ صفحه.

۲- رسولیان ب.، واحد و خشوری ع.، آذری یام آ.، رقابی ن.، و قره حسنلو ح. ۱۳۸۲. بیوشیمی هارپر (ترجمه). نشر طبیب. ۶۵۸ صفحه.

۳- شجاعی م. ۱۳۷۴. حشره شناسی (مرفولوژی و فیزیولوژی). جلد اول. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۲۸ صفحه.

۴- محمدی ر. ۱۳۸۲. بیوشیمی لنینجر (ترجمه). انتشارات آییژ. ۱۳۷۱ صفحه.

۵- یزدانیان م. ۱۳۸۵، مطالعه برخی خصوصیات آنزیم آلفا-آمیلاز در غده بزاقی سن *Graphosoma lineatum* (Hem: scutelleridae). پایان‌نامه دکتری حشره شناسی کشاورزی. دانشگاه تبریز. ۱۸۶ صفحه.

۶- یزدانیان م.، فرشباف پورآباد ر.، رشیدی م.ر.، ولیزاده م.، رشتچی زاده ن.، وطنخواه ا.م.، و حمیدی ع. ا. ۱۳۸۷. برخی ویژگی‌های آلفا-آمیلاز

بزاقی سن *Graphosoma lineatum* (L.) (Het., Scutelleridae). دانش کشاورزی. ۱۸ (۳): ۲۵۹-۲۴۳.

7- Alfonso J. F., Ortego F., Sanchez- Monge R., Garcia- Casado G., Pujol M., Castanera P., and Salcedo G. 1997. Wheat and barley inhibitors active towards α-amylase and Trypsin- like actives from *Spodoptera frgiperda* , Journal of Chemical Ecology, 23: 1729-1741.
8- Baker J. E. 1989. Interaction of partially- purified amylases from larval *Anagasta*, *kuehniella* (Lep.:pyralidae), Comparative Biochemistry and Physiology, part B, 93: 239- 246.
9- Baker J. E. 1983. Properties of amylase from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*, Insect Biochemistry, 13: 421-428.
10- Baker J. E. 1991. Purification and partial characterization of α-amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, Insect Biochemistry, 21: 303-311.
11- Biggs D. R., and Mc Gregor P. G. 1996. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the Newzeland Grass Grub (*Costelytra zealandica*; Col: scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26: 69-75.
12- Buonocore V., Poerio E., Silano V., and Tomasi M. 1976. Physical and catalytic properties of α-amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae, Biochemical Journal, 153: 621-625.
13- Christopher M. S. M., and Mathavan S. 1985. Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale*, Journal of Insect Physiology, 31: 217-221.
14- Dow J. A. T. 1986. Insect midgut function, Advances in Insect Physiology, 19: 187-329.
15- Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., and Grossi- de- sa M. F. 2002. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with Insect α- amylases, structure, function and potential for crop protection, European Journal of Biochemistry, 269: 397-412.
16- Hori K. 1969. Some properties of salivary amylases of *Adelphocoris suturalis* (Miridae), *Dolycoris baccarum* (Pentatomidae), and several other heteropteran species. Entomologia Experimentalis et Applicata, 12: 454-466.
17- Hori K. 1968. Feeding behavior of the cabbage bug, *Eurydema rugosa* Motschulsky (Hemiptera: Pentatomidae) on the cruciferous plants, Applied Entomology and Zoology, 3: 26-36.
18- Hori K. 1970. Some variations in the activities of salivary amylase and protease of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hem., Miridae), , Applied Entomology and Zoology, 5: 51-61.
19- Hori K. 1972. Comparative study of a property of salivary amylase among various heteropterous insects. Compararive Biochemstry and Physiology, 42B: 501-508.
20- Hori K. 1973. Studies on enzymes, especially amylases, in the digestive system of the bug *Lygus disponsi* and starch digestion in the system, Research Bulletin Onihiro university, 8: 173-260.
21- 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, Compararive Biochemistry and physiology, 126: 425-433.
22- Nakonieczny M., Michalczy K., and Kediorski A. 2006. Midgut glycosidases activities in monophagus of Appollo butterfly, *Parnassius apollo* Frankenbergeri, Comptes Rendus Biologies, 329: 754-774.
23- Nation J.L. 2002. Insect physiology and biochemistry, CRC press. 485pp.
24- Podoler H., and Applebaum S. W. 1971. The α-amylase of the Beetle *Callosobruchus chinensis*, Bichemichal Journal, 121: 317- 320.
25- Strobl S., Maskos K., Betz M., Wiegand G., Huber R., Gomis-Ruth F. X., and Glockshuber R. 1998. Crystal structure of yellow meal worm α-amylase at $1.64A^0$ resolution, Journal of Molecular Biology, 278: 617-628.
26- Titarenko E., and Chrispeels M. J. 2000. CDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α-amylases of the western corn root worm, *Diabrotica virgifera virgifera*, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30: 979-990.
27- Zeng F., and Cohen A. C. 2000. Comparison of α-amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytophagus Heteroptera, Comparative Biochemistry and Physiology, part A, 126: 101-106.