تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گالاکتوزیداز درپروانه‌ی ابریشم باف پاییزی *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera:Arctidae)

مولود غلام‌زاده چیتگر[*1]، محمد قدمیاری[2]، جلال جلالی سندی[2] و بهروز کوچکی[2]

۱-استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

۲- به ترتیب دانشیار، استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

[*]مسئول مکاتبه: b_gh.chitgar60@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۳

چکیده

در تحقیق حاضر ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گالاکتوزیدازدر لوله‌ی گوارش، همولنف و غدد بزاقی لاروهای پروانه‌ی ابریشم باف پاییزی(*Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera:Arctidae مورد بررسی قرارگرفت. طبق نتایج با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در مراحل مختلف لاروی، بیشترین فعالیت آنزیم در لاروهای سن پنج مشاهده شد. میزانpH بهینه برای فعالیت آلفا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش برابر هفت، برای بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش، غدد بزاقی و همولنف به ترتیب هفت، هفت و شش بود. دمای بهینه برای فعالیت آلفا گالاکتوزیدازدر لوله‌ی گوارش برابر ۴۵ درجه‌ی سلسیوس و برای بتا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش، غدد بزاقی و همولنف به ترتیب ۴۵،۴۵ و ۵۵ درجه‌ی سلسیوس به دست آمد. فعالیت آنزیم آلفا گالاکتوزیداز با افزودن یونK^+ (۱۰ میلی‌مولار) نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین بازدارندگی روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیدازبه ترتیب در حضور اوره (چهار میلی‌مولار) وSDS (هشت میلی‌مولار) مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی:آلفا گالاکتوزیداز، بتا گالاکتوزیداز، پروانه‌ی ابریشم باف پاییزی، ویژگی‌های بیوشیمیایی

مقدمه

پروانه‌ی ابریشم باف پاییزی *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera:Arctidae) بومی آمریکای شمالی بوده که به طور تصادفی به برخی از مناطق اروپا و آسیا وارد شده است (وارن و تدیک ۱۹۷۰). این حشره به عنوان یکی از مهمترین آفات درختان جنگلی، میوه و گیاهان زینتی در اغلب مناطق جهان مطرح است (هایچ ۱۹۹۹). پروانه‌ی ابریشم باف پاییزی دارای دامنه‌ی میزبانی بسیار وسیعی می‌باشد و لاروهای آن حداقل از ۶۳۶ گونه‌ی گیاهی متعلق به چندین تیره تغذیه می‌کنند (ورث ۱۹۹۴). لاروهای این آفت در اثر تغذیه از برگها قادرند به سرعت موجب بی‌برگی شده و خسارت جدی به درختان میوه و جنگل‌ها وارد نمایند (جعفری خالجیری ۱۳۸۳).در ایران، آفت مذکور اولین بار از استان گیلان در تابستان ۱۳۸۱ گزارش شده و فعالیت آن در ۱۱ شهرستان و ۲۸۵ روستای این استان مشاهده شده است (رضایی ۱۳۸۳). درختانی از جمله توت، افرای سیاه، سیب، گلابی، انجیر، توسکا، بید، صنوبر، نارون و گیلاس تحت هجوم لاروهای پروانه‌ی مذکور به شدت صدمه دیدند (رضایی ۱۳۸۳). هر چند که در اکثر موارد استفاده از مبارزه شیمیایی مهمترین روش کاهش خسارت آفات به شمار می‌آید، ولی کنترل شیمیایی این آفت با استفاده از حشره‌کش‌ها بدون عوارض جانبی نمی‌باشد. با توجه به حضور این آفت روی درختان توت به کارگیری ترکیبات شیمیایی به تلفات کرم‌های ابریشم منجر خواهد شد (رضایی ۱۳۸۶). همچنین آثار زیان‌آور این ترکیبات روی محیط زیست و مشکلات ناشی از مقاومت آفات به آفت‌کش‌ها، نیاز به روشهای جایگزین در امر کنترل آفات را قوت می‌بخشد. درسال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای

Archive of SID

www.SID.ir

انجام شده است تا شاید بتوان جایگزین مناسبی برای روش شیمیایی کنترل آفات پیدا کرد.

بخش مهمی از غذای حشرات را ماکرومولکول‌هایی نظیر پلی‌ساکاریدها تشکیل می‌دهند. این مولکول‌های بزرگ لازم است قبل از جذب در بدن حشرات توسط آنزیم‌های مربوطه در معده به ترکیبات کوچکتر شکسته شوند (چاپمن ۱۹۹۸). آنزیم‌های کربوهیدراز در هضم این ترکیبات نقش دارند و پیوندهای گلیکوزیدی که سبب اتصال مونوساکاریدها به همدیگر شده‌اند را می‌شکنند. آلفا و بتا گالاکتوزیدازها گروهی از کربوهیدرازها هستند که در حشرات در هیدرولیز دی و الیگوساکاریدها اهمیت دارند (ترا و فریرا ۱۹۹۴). آلفا گالاکتوزیداز یک اگزوگلیکوزیداز است که پیوندهای انتهایی D-گالاکتوز را در طیف وسیعی از الیگوساکاریدهای گالاکتوزیدی همچون ملی‌بیوز، استاکیوز و رافینوز هیدرولیز می‌کند (میبر و رید ۱۹۸۲). بتا گالاکتوزیدازها آنزیم‌هایی هستند که زیرنهشت‌های دارای بخش‌های گالاکتوزیدی مانند لاکتوز، گلیکولیپیدها، پروتئوگلیکان‌ها، الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها را می‌شکنند.این آنزیم‌ها هیدرولیز بتا گالاکتوزیدها را به مونوساکاریدها کاتالیز می‌کنند. با توجه به اهمیت هضم کربوهیدرات در حشرات و نیز نقش این ترکیبات در امر تولید مثل و رشد و نمو، هر گونه مداخله در آنزیم‌های کربوهیدراز با استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی، کاهش دهنده فعالیتهای حیاتی در حشرات بوده و رشد را به تعویق می‌اندازد. این مهارکننده‌ها طی تغذیه‌ی حشره وارد بدن شده وبه بلوکه کردن آنزیم منجر می‌شوند (شرما و اورتیز ۲۰۰۰). بنابراین آگاهی از ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی در حشرات حائز اهمیت است. تاکنون تلاش‌هایی در زمینه‌ی بررسی اثر بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیمی پروانه‌ی ابریشم باف پاییزی انجام گرفته است. به طور مثال اثر مهارکننده‌های پروتئینی استخراج شده از بذور چند گیاه بر فعالیت پروتئازی لاروهای پروانه *H. cunea* آزمایش و اثر بذور باقلا *Vicia faba* L. (Fabaceae) و خلر *Lathyrus sativus* L. (Fabaceae) با بیشترین فعالیت بازدارندگی مثبت ارزیابی شد (آقا علی و همکاران ۲۰۱۳). همچنین برگ‌های صنوبر تراریخته حاوی ژن بازدارنده‌ی آنزیم تریپسین که از بذر لوبیا چشم بلبلی، *Vigna unguiculata* L. (Fabaceae) استخراج شده بود، طی تغذیه‌ی لاروها فعالیت آنزیمی را در معده آفت مذکور تحت تأثیر قرار داد (دینگ و همکاران ۲۰۰۱). تاکنون ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گالاکتوزیداز در راسته‌های مختلف حشرات مورد مطالعه قرار گرفته است (کریمی و همکاران ۱۳۹۰، قنبری‌نژاد و همکاران ۱۳۹۴، سیلوا و ترا ۱۹۹۷؛گروسمان و ترا ۲۰۰۱؛ یاپی و همکاران ۲۰۰۷؛ شریفی و همکاران ۲۰۱۱، صابری ریسه و همکاران ۲۰۱۱). ولی بررسی منابع نشان می‌دهد که مطالعه‌ای در زمینه ویژگی‌های گالاکتوزیدازها در سیستم گوارشی لاروهای پروانه *H. cunea* صورت نگرفته است. به همین دلیل در این تحقیق ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش، همولنف و غدد بزاقی این حشره آفت به منظور دستیابی به روش‌های جدید کنترل مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

دسته‌های تخم پروانه *H. cunea* از روی درختان چنار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان جمع‌آوری و جهت پرورش به آزمایشگاه منتقل شدند. تغذیه و پرورش لاروها روی برگ‌های تازه درخت چنار در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و رطوبت ۱۰±۷۰ درصد انجام گرفت. از سنین ۵-۲ لاروی برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

تشریح حشره و تهیه عصاره‌ی آنزیمی

برای جدا کردن لوله‌ی گوارش ابتدا لاروها روی یخ بی‌حس شدند و به کمک پنس، سطح شکمی لاروها شکافته شد تا دستگاه گوارش به طور کامل آشکار شود. بافت‌های اضافی و لوله‌های مالپیگی از آن جدا شد. لوله‌ی گوارش تشریح شده در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند. برای استخراج آنزیم، ۱۰ عدد لوله‌ی گوارش در مقدار معینی آب مقطر درون ظرف محتوی یخ به کمک یک هموژنایزر

Archive of SID

www.SID.ir

دستی هموژنایز و سپس در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس در g×۱۱۰۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، مایع روئی جدا شده و به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. برای استخراج همولنف نیز یکی از پاهای کاذب جلویی لارو را بریده و همولنف خارج شده به کمک سمپلردر داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر جمع‌آوریو تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری گردید (غلام‌زاده چیتگر و همکاران ۲۰۱۳).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز

برای تعیین فعالیت آنزیم‌های گالاکتوزیداز از زیرنهشت‌های p- نیتروفنیل- α- D- گالاکتوپیرانوزید (pNαGa) و p- نیتروفنیل-β- D- گالاکتوپیرانوزید (pNβGa) به ترتیب برای اندازه‌گیری آلفا و بتا گالاکتوزیداز استفاده شد. واکنش در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس با افزودن ۱۰ میکرولیتر آنزیم به ۴۵ میکرولیتر زیرنهشت (۲۵ میلی‌مولار) و ۱۱۵ میکرولیتر بافر استات گلایسین فسفات ۵۰ میلی مولار درpH بهینه (pH = ۷) برای فعالیت آلفا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش وpHهای هفت، هفت و شش برای بتا گالاکتوزیداز به ترتیب در غدد بزاقی، لوله‌ی گوارش و همولنف) انجام شد. بعد از مدت ۳۰ دقیقه، با افزودن ۶۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ نرمال واکنش متوقف شد. پس از ۱۰ دقیقه میزان هیدرولیز زیرنهشت‌های نامبرده بر اساس تشکیل پارا-نیتروفنل در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومترقرائت شد (قدمیاری و همکاران ۲۰۱۰). یک واحد فعالیت آنزیم، مقدار آنزیمی است که بتواند یک میلی‌مول پارانیتروفنل را در یک میلی‌لیتر و طی یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس تولید نماید. برای تعیین فعالیت ویژه، مقدار عددی فعالیت آنزیم بر حسب میلی‌مول پارانیتروفنل بر میلی‌گرم پروتئین در نمونه تقسیم گردید و بر حسب میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. جهت تعیین فعالیت آنزیم از منحنی کالیبراسیون پارانیتروفنل استفاده شد وبرای تهیه این منحنی از غلظت‌های ۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار استفاده گردید (شریفی و قدمیاری ۱۳۹۲).

اندازه‌گیری اسیدیته و دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز

ابتدا اسیدیته‌های ۴ تا ۱۱ با استفاده از بافر استات سدیم – گلایسین- فسفات ۵۰ میلی‌مولار که اسیدیته‌ی آن با افزودن اسیدکلریدریک یا هیدروکسید سدیم (یک نرمال) تنظیم گردید، تهیه شدند (بافر استات سدیم اسیدیته ۵-۴، بافر سدیم فسفات اسیدیته ۷-۶ و بافر گلایسین –هیدروکسید سدیم اسیدیته ۱۱-۸) (چوی و همکاران ۲۰۱۳). سپس اسیدیته‌ی بهینه‌ی فعالیت آنزیم با سنجش فعالیت گالاکتوزیدازها ذکر شده در بند اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، تعیین شد. برای تعیین اثر دما روی فعالیت این آنزیم‌ها، دماهای مختلف ۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵ و ۷۵ درجه‌ی سلسیوس مورد آزمایش قرار گرفت. فعالیت نسبی آنزیم از تقسیم فعالیت ویژه در نمونه‌ی آنزیمی بر فعالیت ویژه در شاهد محاسبه و به صورت درصد بیان شد.

اثر یون‌های مختلف و ترکیبات اوره، EDTA و SDS روی فعالیت آلفا و بتا گالاکتوزیداز

اثر یون‌های مختلف با استفاده از نمک‌های کلراید K^+، Ca^{2+}، Mg^{2+} و Na^+ در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولارو همچنین اثر ترکیباتی نظیر اوره وEDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) با غلظت‌های۰/۵، یک، دو و چهار میلی‌مولار وSDS (sodium dodecyl sulfate) با غلظت های یک، دو، چهار و هشت میلی‌مولارروی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه غلظت‌های مختلف از ترکیبات مذکور، نمونه‌ی آنزیمی، یون و بافر به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس زیرنهشت افزوده و بقیه‌ی مراحل همانند روش کار توضیح داده شده در بند اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در محیط بافری با اسیدیته بهینه (pH =۷ در لوله‌ی گوارش) صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در نمونه‌های آنزیمی

اندازه‌گیری پروتئین با استفاده از روش بردفورد (۱۹۷۶) انجام و از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه‌ی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح پنج درصد صورت گرفت. رسم نمودارها و مرتب کردن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج و بحث

فعالیتآنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز

فعالیت ویژه‌ی آلفا و بتا گالاکتوزیداز دستگاه گوارش سنین ۵-۲ لاروی، غدد بزاقی و همولنف *H. Cunea* اندازه‌گیری و مشخص شد که آنزیم بتا گالاکتوزیداز نسبت به آلفا گالاکتوزیداز در بافت‌های مورد آزمایش فعالیت بیشتری دارد (شکل۱ الف و ب).همچنین میزان فعالیت آنزیم‌ها در لوله‌ی گوارش بیشتر از همولنف و غددبزاقی برآورد شد. بررسی فعالیت ویژه‌ی این آنزیم‌ها در لوله‌ی گوارش نشان می‌دهد که با افزایش سن لاروی، میزان فعالیت آنزیم نیز افزایش یافته و در سن پنج لاروی به بالاترین میزان خود می‌رسد. این وضعیت را می‌توان با میزان زیاد تغذیه این مرحله لاروی نسبت به سنین دیگر توجیه نمود. کریستوفر و ماساوان (۱۹۸۵) اظهار داشتند که بین میزان جذب غذاوفعالیت آنزیم ارتباط مستقیم مشاهده می‌شود، به طوری که با افزایش تغذیه وجذب غذا، فعالیت آنزیم نیزدر بافت معده افزایش می‌یابد. بررسی فعالیت این آنزیم‌ها در همولنف و غدد بزاقی نشان می‌دهد که مقدار آلفا گالاکتوزیداز در این بافت‌ها بسیار ناچیز است که در نتیجه برای این آنزیم فعالیتی محاسبه نشد. در مورد بتا گالاکتوزیداز نیز میزان فعالیت آنزیم در بافت‌های همولنف و غدد بزاقی نسبت به لوله گوارش کمتر بود.

اثر pH روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز

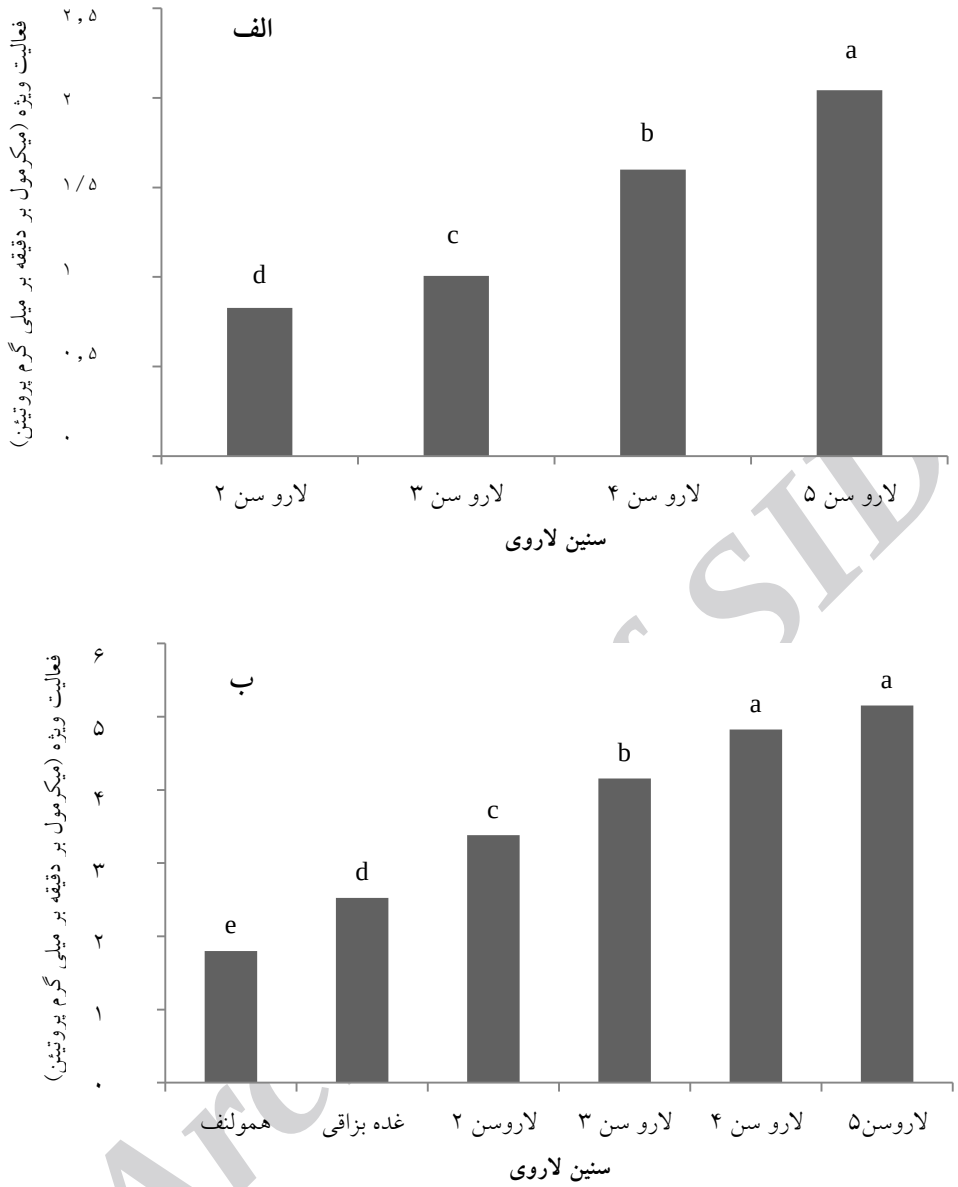
در این آزمایشpH بهینه فعالیت آنزیم در لوله‌ی گوارش، غدد بزاقی و همولنف لارو سن پنج اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، pH بهینه برای فعالیت آلفا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش برابر با هفت و برای بتا گالاکتوزیداز در غدد بزاقی، لوله‌ی گوارش و همولنف به ترتیب برابر با هفت، هفت و شش بدست آمد (شکل ۲). آنزیم‌ها دارای یک و یا دامنه‌ای از pH مطلوب می‌باشند که درآن حداکثرفعالیت را نشان داده ودر مقادیر بالاتر و پایین‌تر از آن فعالیت‌شان کاهش می‌یابد.

pH می‌تواند روی پایداری آنزیم وبهبود فعالیت بهینه آن تأثیرگذار باشد. اسیدیته‌ی بهینه برای فعالیت آنزیم با اسیدیته‌ی معده حشره در برخی گونه‌ها هم‌خوانی داشته و تحت تأثیر فاکتورهایی نظیر نوع غذا، اسیدیته‌ی غذا وجمعیتمیکروارگانیسم‌های معده می‌باشد (داو ۱۹۸۶). همانطور که از نمودارها مشخص می‌شود فعالیت آنزیم در همولنف نسبت به لوله‌ی گوارش و غدد بزاقی در محدوده‌ی نسبتاً وسیعی از pH فعال است. نتیجه‌ی مشابهی در بررسی ویژگی‌های آنزیم بتا گلوکوزیداز در سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) گزارش و مشخص شد که آنزیم مذکور در دامنه‌ی وسیعی از pH فعالیت دارد (دهقانی‌خواه و همکاران ۲۰۱۴).

یکی از دلایل این وضعیت به وجود ایزوفرم‌های آنزیمی نسبت داده شد. منشأ استخراج آنزیم یعنی لوله‌ی گوارش، غدد بزاقی و همولنف ممکن است روی pH آنزیم تعیین کننده باشد (اسدی و همکاران ۲۰۱۲). زیرا اسیدیته‌ی معده می‌تواند pH یک آنزیم گوارشی را تحت تأثیر قرار دهد (ترا و فریرا ۱۹۹۴) و بین pH آنزیم و pH حفره لومن روده در حشرات ارتباط وجود دارد (اپلباوم ۱۹۸۵).

Archive of SID

www.SID.ir



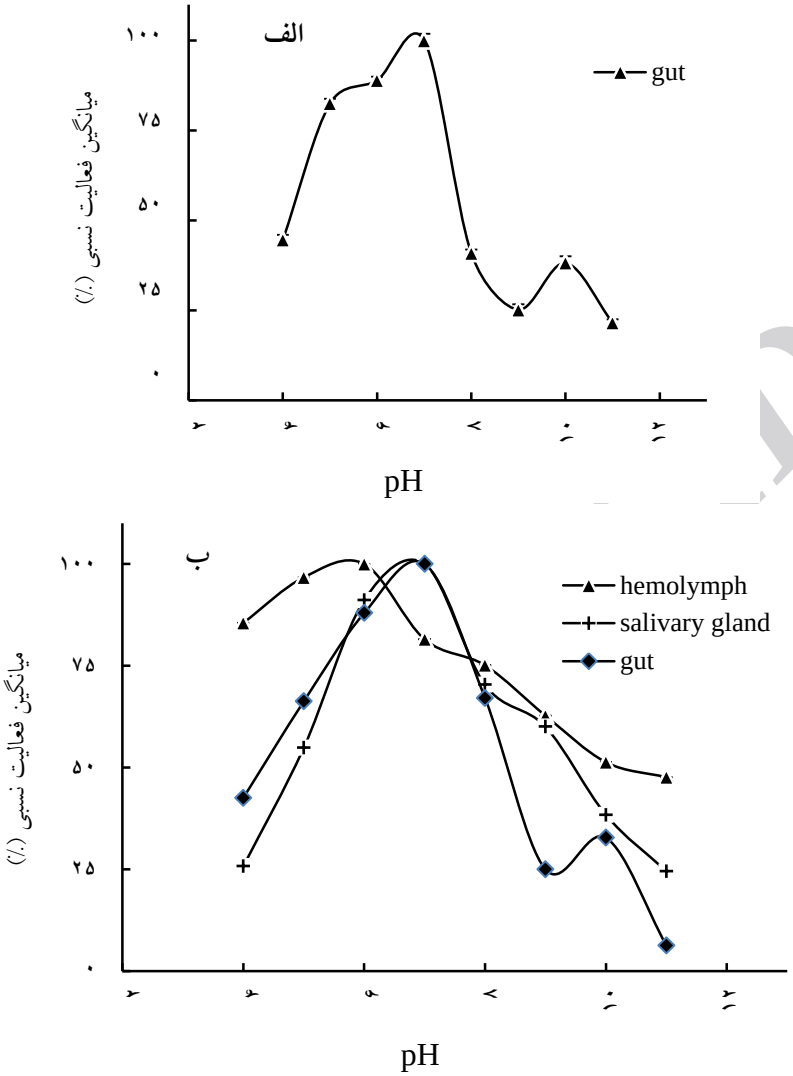
شکل ۱- فعالیت ویژه آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش سنین مختلف لاروی (الف) و بتا گالاکتوزیداز (ب) در لوله‌ی گوارش سنین مختلف لاروی، غدد بزاقی وهمولنف لاروهای *H. cunea*

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند

نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که در pHهای اسیدی و خنثی، آنزیم فعالیت بهتری داشته است. مشابه نتیجه‌ی حاضر، در لاروهای کرم سبز برگخوار برنج، *Naranga aenescens* (Lepidoptera: Noctuidae) اسیدیته‌ی بهینه برای آلفا و بتا گالاکتوزیداز به ترتیب در لوله‌ی گوارش ۷-۵ و ۵-۴، در غدد بزاقی چهار و ۷-۵ و در همولنف ۵-۴ و پنج به دست آمد (اسدی ۱۳۸۹). یاپی و همکاران (۲۰۰۷) pH=۵ را به عنوان pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز در سرخرطومی خرما *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) گزارش کردند. شریفی و همکاران (۲۰۱۱) pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز را در سوسک برگخوار نارون *Xanthogaleruca luteola*(Coleoptera: Chrysomelidae) به ترتیب چهار و سه گزارش نمودند.

www.SID.ir

فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز درسوسک شاخک بلند رزاسه، (Coleoptera: Cerambycidae) *Osphanteria coerulescens* در pH=۴ اندازه‌گیری شد (آقا علی و همکاران ۲۰۱۲).



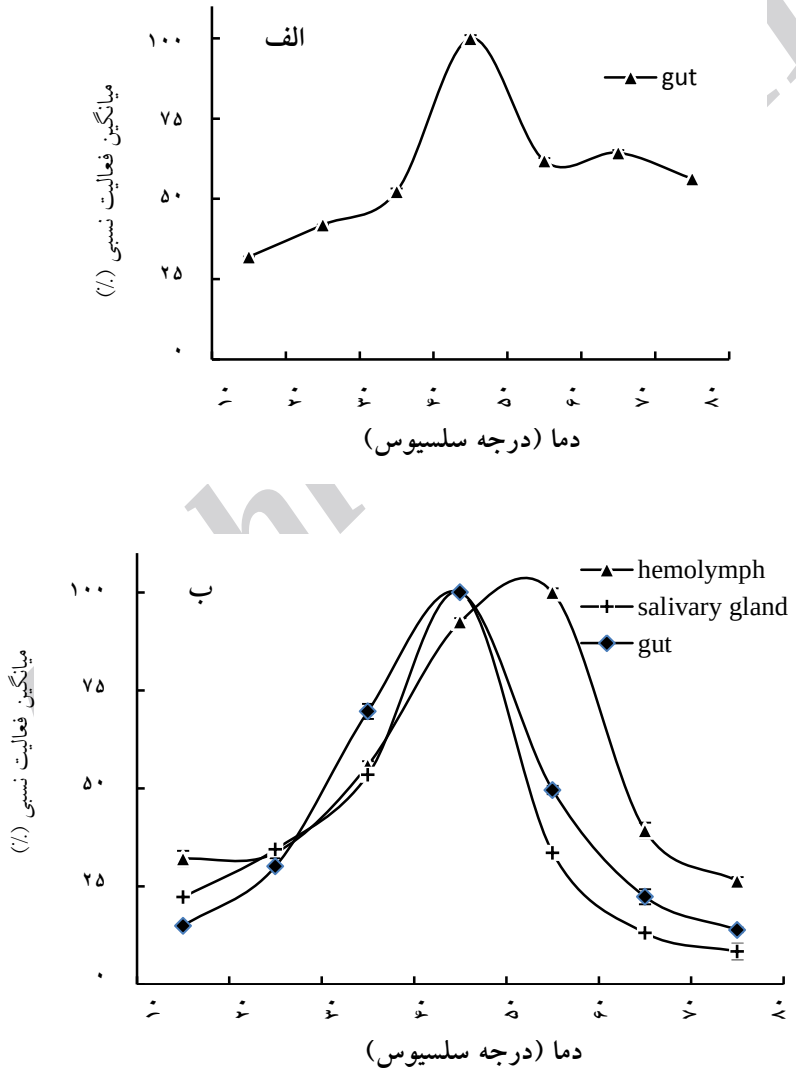
شکل ۲- اثر pH روی فعالیت نسبی آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش (الف) و بتا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش، غدد بزاقی و همولنف (ب) لارو سن پنج *H. cunea*

اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز

بیشترین فعالیت آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش لارو سن پنج *H. Cunea* در دمای ۴۵درجه‌ی سلسیوس به دست آمد. فعالیت این آنزیم تا دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس افزایش تدریجی می‌یابد اما با افزایش دما، افزایش ناگهانی داشته و در دمای ۴۵ درجه‌ی سلسیوس دارای فعالیت بهینه است. پس از این دما فعالیت آنزیم کاهش ناگهانی می‌یابد (شکل ۳ الف). این کاهش در فعالیت آنزیم در دمای بالا به این صورت قابل توجیه است که افزایش دما باعث جذب انرژی زیاد توسط آنزیم و از هم گسیختن ساختمان سه بعدی آن و متعاقب آن کاهش فعالیت آنزیم می‌شود (بوید و همکاران ۲۰۰۲). فعالیت آنزیم‌ها به طور معمول با افزایش دما از صفر تا ۴۰ درجه‌ی سلسیوس افزایش می‌یابد، در محدوده‌ی دمایی ۶۰-۴۰ درجه‌ی سلسیوس کاهش سریع در فعالیت آنزیمی رخ می‌دهد که این به واسطه افزایش آشفتگی مولکول‌های آنزیم و زیرنهشت، و افزایش آهسته‌ی دناتوراسیون دمایی آنزیم‌ها می‌باشد (برد و هاپکین ۱۹۵۴).

www.SID.ir

طبق نتایج، آنزیم بتا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش در دمای ۴۵ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت را دارد. بعد از این دما از میزان فعالیت آنزیم کاسته می‌شود و در دمای ۷۵ درجه‌ی سلسیوس میزان فعالیت به حدود ۱۵٪ می‌رسد (شکل ۳ ب). روند مشابهی برای فعالیت این آنزیم در غدد بزاقی مشاهده شده است. دمای بهینه برای فعالیت بتا گالاکتوزیداز در همولنف ۵۵ درجه‌ی سلسیوس اندازه‌گیری شد. در لاروهای کرم سبز برگخوار برنج دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز به ترتیب در لوله‌ی گوارش ۴۵ و ۵۵، در غدد بزاقی ۵۵ و ۵۵-۳۵ و در همولنف ۳۵ و ۵۵-۴۵ درجه‌ی سلسیوس بدست آمد (اسدی ۱۳۸۹). دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در سوسک حنایی خرما *R. ferrugineus* در طیف ۶۰-۴۰ درجه‌ی سلسیوس گزارش شده است (صابری ریسه و همکاران ۲۰۱۱). این دما در سوسک شاخک بلند رزاسه، *O. coerulescens* برای فعالیت آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در ۶۰ درجه‌ی سلسیوسو برای بتا گالاکتوزیداز در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس به دست آمد (آقا علی و همکاران ۲۰۱۲).



شکل ۳- اثر دما روی فعالیت نسبی آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش (الف) و بتا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش، غدد بزاقی و همولنف (ب) لارو سن پنج *H. cunea*

www.SID.ir

اثر یون‌های مختلف و ترکیبات اوره، EDTA و SDS روی فعالیت آلفاو بتا گالاکتوزیداز

اثر برخی مواد شیمیایی روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز آزمایش و نتایج در جدول یک ذکر شده است. فعالیت آنزیم در نمونه‌ی شاهد به صورت ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم‌های گالاکتوزیداز در حضور یون‌ها و ترکیبات مذکور نسبت به شاهد ارزیابی گردید. با توجه به نتایج، اثر افزایشی و کاهشی معنی‌داریروی فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد مشاهده شد. بیشتر یون‌ها و ترکیبات اوره، SDS و EDTA فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز را نسبت به شاهد کاهش دادند. EDTA یک عامل کلات‌کننده فلزات بوده که یون فلزی را از ترکیبات دارنده آن جدا می‌کند. بنابراین کاهش فعالیت آنزیم‌های گالاکتوزیداز در نتیجه‌ی کاربرد ترکیب مذکور می‌تواند نشان‌دهنده‌ی نیاز ضروری به حضور یون فلزی در جایگاه فعال آنزیم باشد. یون K^+ در غلظت ۱۰ میلی‌مولار و اوره در غلظت چهار میلی‌مولار به ترتیب بیشترین اثر افزایشی و کاهشی را روی فعالیت آنزیم آلفا گالاکتوزیداز ایجاد کردند. بر این اساس احتمال می‌رود که یون K^+ برای فعالیت مطلوب آنزیم مورد نیاز باشد. در همه‌ی غلظت‌های به کار برده شده Mg^{2+} و نیز Na^+ و Ca^{2+} در اکثر غلظت‌ها روی فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز اثر معنی‌داری نداشتند. SDSدر غلظت هشت میلی‌مولار بیشترین اثر کاهشی را روی فعالیت این آنزیم ایجاد کرد. طبق نتایج یاپی و همکاران (۲۰۰۷) SDS به طور کامل از فعالیت بتاگالاکتوزیداز در لاروهای سرخرطومی خرما ممانعت کرد. SDS یک سورفکتانت آنیونی بوده که به علت داشتن ۱۲ اتم کربن متصل به گروه سولفات در فرمول شیمیایی، دارای ویژگی‌های دوگانه دوستی است که می‌تواند به عنوان یک شوینده عمل کند. این ماده می‌تواند با تخریب ساختار فضایی آنزیم به کاهش یا عدم فعالیت آن منجر شود (فالکسکی و همکاران ۲۰۰۶).

با توجه به آثار مخرب سموم شیمیایی روی محیط زیست و مقاومت آفات به آفت‌کش‌ها، کاربرد روش‌های جایگزین کم خطر در کنترل آفات ضروری به نظر می‌رسد. آنزیم‌های دخیل در گوارش می‌توانند به عنوان یک نقطه هدف در برنامه‌های کنترل حشرات آفت با استفاده از مهارکننده‌های گیاهی مورد توجه قرار گیرند. امید است اطلاعات حاصل از تحقیق حاضر در مطالعات تکمیلی مانند اثر مهارکننده‌های گیاهی بر فعالیت گالاکتوزیدازهای گوارشی آفت پروانه‌ی ابریشم باف پاییزی مورد استفاده قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اثر یون‌های مختلف و ترکیبات اوره، EDTA و SDS بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله‌ی گوارش لارو سن پنج *H. cunea*

ترکیبات	غلظت (میلی مولار)	فعالیت (درصد) ±SE	
		آلفا گالاکتوزیداز	بتا گالاکتوزیداز
شاهد	-	۱۰۰	۱۰۰
Ca^{2+}	۵	۱۰۲/۱±۰/۴۴	۹۸/۶±۰/۵۴
	۱۰	۶۸/۴±۰/۵۲*	۹۷/۲±۱/۱۷
	۲۰	۸۵/۷±۱/۳*	۹۸/۲±۰/۸۴
	۴۰	۷۵/۵±۱/۲*	۹۳/۸±۰/۸۷*
K^{+}	۵	۹۱/۸±۰/۳۹*	۷۹/۳±۱/۲۳*
	۱۰	۱۴۵/۶±۰/۶۲*	۸۵/۴±۰/۵۸*
	۲۰	۸۲/۲±۰/۹۲*	۶۱±۰/۹۱*
	۴۰	۹۶/۶±۰/۸۹	۷۷/۲±۰/۹۵*
Na^{+}	۵	۶۹/۲±۰/۸۱*	۸۵/۹±۰/۴۵*
	۱۰	۹۰/۴±۰/۷۱*	۹۷/۴±۰/۸۳
	۲۰	۸۸/۲±۰/۷۸*	۹۹/۲±۰/۷۳
	۴۰	۸۶/۲±۰/۶۸*	۹۸±۰/۵۲
Mg^{2+}	۵	۷۰/۴±۰/۵۴*	۹۷/۳±۰/۶۹
	۱۰	۶۴/۳±۱/۱*	۹۷/۹±۰/۷۶
	۲۰	۸۶/۴±۰/۶۴*	۹۸/۴±۰/۹
	۴۰	۸۴/۶±۰/۶۵*	۹۶/۴±۰/۳۷
EDTA	۰/۵	۶۶/۷±۰/۳۳*	۸۸/۹±۱/۱۴*
	۱	۷۵/۶±۱/۴*	۸۹/۲±۰/۴۲*
	۲	۹۳/۷±۰/۵۱*	۹۹±۰/۴۱
	۴	۹۸/۷±۰/۹۴	۸۸±۰/۴۲*
Urea	۰/۵	۶۴/۵±۱/۵*	۶۳/۲±۰/۹۶*
	۱	۷۶/۸±۰/۹۳*	۷۱/۸±۰/۵۱*
	۲	۷۲/۲±۰/۳۶*	۹۸/۲±۰/۳۹
	۴	۳۹/۸±۰/۴۵*	۹۳/۲۸±۱/۰۸*
SDS	۱	۱۰۰/۷±۰/۹۴	۹۶/۱±۰/۹۸*
	۲	۶۶/۱±۰/۹*	۹۹/۲±۰/۶۳
	۴	۶۷/۱±۰/۴۲*	۷۸±۰/۴۸*
	۸	۶۵/۲±۰/۸۲*	۴۳/۴±۱/۲*

*دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نسبت به شاهد

Archive of SID

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

اسدی الف، ۱۳۸۹. ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی کرم سبز برگخوار برنج، *Naranga aenescens M.* (Lep.:Noctuidae). پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان.

جعفری خالجیری ی، ۱۳۸۳. وضعیت پروانه ابریشم باف پاییزی *Hyphantria cunea* (Lepidopter: Arctidae) در استان گیلان در سال ۱۳۸۳. سازمان جهاد کشاورزی استان گیلان (مدیریت حفظ نباتات). صفحه‌های ۱ تا ۸.

رضایی و، ۱۳۸۳. زیست شناسی شب پره شفید آمریکایی *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae)، فون دشمنان طبیعی و کارایی زنبور پارازیتوئید آن *Chouioia cunea* در استان گیلان. رساله‌ی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. صفحه‌های ۱۲ تا ۲۵.

رضایی و، ۱۳۸۶. دستورالعمل شناسایی و ردیابی شب پره سفید آمریکایی *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). وزارت جهاد کشاورزی. سازمان حفظ نباتات. ۱۹ صفحه.

شریفی م و قدمیاری م، ۱۳۹۲. بررسی ویژگی‌های آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا – گلوکوزیداز در دستگاه گوارشی *Agriolimax agrestis* L. (Stylommatophora: Lomacidae). گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۶، شماره ۲. صفحه‌های ۲۳ تا ۳۹.

قنبری‌نژاد ر، قدمیاری م، ساجدی ر و غلام‌زاده چیتگر م، ۱۳۹۴. تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گالاکتوزیداز در کفشدوزک خربزه *Epilachna chrysomelina* Foure (Col.: Coccinellidae). گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۸، شماره ۳. صفحه‌های ۱۳ تا ۲۴.

کریمی ر، کزازی م و حسینی نوه و، ۱۳۹۰. اثر دما و pH بر فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز لارو سن ۴ سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata*(Col. Chrysomelidae). صفحه ۵ اولین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه.

Aghaali N, Ghadamyari M and Ajamhasani M, 2012. Biochemical characterization of glucosidases and galactosidases from rosaceae branch borer, *Osphranteria coerulescens* Redt. (Col.: Cerambycidae). Romanian Journal of Biochemistry 49(2): 125–137.

Aghaali N, Ghadamyari M, Hosseininaveh V, SaberiRiseh N, 2013. Protease inhibitor from crude extract of plant seeds affects the digestive protease in *Hyphantria cunea*. Journal of Plant Protection Research 53 (4): 338-346.

Applebaum SW, 1985. Biochemistry of digestion.Pp. 279-311 In: Kerkut GA and Gilbert LI (eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 4, Pergamon Press, New York.

Asadi A, Ghadamyari M, Sajedi RH, Jalali J and Tabari M, 2012.Biochemical characterization of α- and β-glucosidases in alimentary canal, salivary glands and haemolymph of the rice green caterpillar, *Naranga aenescens* M. (Lepidoptera: Noctuidae). Biologia 67 (6): 1186-1194.

Bird R and Hopkin S RH, 1954. β-Amylolysis: Union of Enzyme and Substrate.Biochemical Journal 57 (1): 162-165

Boyd DW, CohenAC and Alverson DR, 2002. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a predacious plant bug. Annals of the Entomological Society of America 95: 395–401.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248- 254.

Chapman RF, 1998. The Insects Structure and function. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 782 pp.

Archive of SID

www.SID.ir

Choi GH, Jo MN, Kim J, Kim C, Kim K and Paik H, 2013. Purification and characterization of heat-tolerant protease produced by *Bacillus polyfermenticus* SCD. Journal of Microbiology and Biotechnology 23(11):1554–1559.

Christopher MSM and Mathavan S, 1985. Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale*. Journal of Insect Physiology 31: 217-221.

Dehghanikhah F, Kazzazi M, Madadi H and Hosseini Naveh V, 2014. Biochemical characterization of digestive β-glucosidase from midgut of *Leiptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Crop Protection 3 (2): 181-189.

Ding S, Li H, Li X, Zhang Zh, 2001. Effects of two kinds of transgenic poplar on protective enzymes system in the midgut of larvae of American white moth. Journal of Forestry Research 12 (2): 119–122.

Dow JAT, 1986. Insect midgut function. Advances in Insect Physiology 19: 187-329.

Falkoski DL, Guimaraes VM, Callegari CM, Reis AP, De Barros EG, De Rezende ST, 2006. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial α-galactosidases. Journalof Agriculture and Food Chemistry 54:10184-10190.

Ghadamyari M, Hosseininaveh V and Sharifi M, 2010. Partial biochemical characterization of α- and β-glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*Walker (Lep.: Pyralidae). Comptes Rendus Biologies 333: 197-204.

Gholamzadeh Chitgar M, Ghadamyari M and Sharifi M, 2013. Identification and characterization of gut proteases in the fig tree skeletonizer moth, *Choreutisnemorana*Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). Plant Protection Science 49: 19–26.

Grossmann GA and Terra WR, 2001.α-Galactosidases from the Larval midgut of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 128:109-122.

Hyche LL, 1999. Fall webworm (*Hyphantria cunea* Drury), a guide torecognitionand habits in Alabama. Depatment of EntomologyAuburnUniversity,4p. http://www.ag.auborn.edu/dept/ent/hyche.

Meier H and Reid G, 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. Pp. 418-471 In: Loewus FA and Tanner W (eds.), Encyclopedia of plant physiology. Springer Verlag, New York.

Saberi Riseh N, Ghadamyari M and MotamedniaB, 2011. Biochemical characterization of some digestive carbohydrases from digestive system and haemolymph of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col.: Curculionide). P 351. Global Conference on Entomology. Chiang Mai, Thailand.

Sharifi M, Gadamyari M, Mahadavi M and Fetemeh S, 2011. Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its α-amylase by inhibitors extracted from the common bean. Archive Biological Sciences Belgrade 63 (3): 705-716.

Sharma HC and Ortiz R, 2000.Transgenics, pestmanagement, and the environment. Current Science 79: 421–437.

Silva CP and TerraWR, 1997. α- Galactosidase activity in ingested seeds and in the midgut of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae).Archives of Insect Biochemistry and Physiology 34: 443–460.

Terra WR and Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Physiology and Biochemistry, 109: 1-62.

Warren LO and Tadic M, 1970. The fall webworm, *Hyphantria cunea* (Drury) , in Arkansas. University of Arkansas Agricultural Experiment Station Bulletin 759: 1–106.

Worth RA, 1994. Book of insect record, chapter 2: gereatest host range. http://afbir.ufl.edu.chap2.pdf.

Yapi DYA, Niamke SL and Kouame LP, 2007. Biochemical characterization of a strictly specific beta-galactosidase from the digestive juice of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* larvae. Entomological Science 10: 343-352.

Archive of SID

www.SID.ir

Biochemical Characterization of Galactosidases in the Fall WebWorm, *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera:Arctidae)

M Gholamzadeh-Chitgar[1*], M Ghadamyari[2], J Jalali Sendi[2] and B Kochaki[2]

[1]Assistant Professor of Plant Protection Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran.
[2]Associate Professor, Professor and Former MSc Student Respectively, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
*Corresponding authour: b_gh.chitgar60@yahoo.com

Received:16 March 2017 Accepted: 25 July 2017

Abstract

In this research, the biochemical properties of galactosidase enzymes in the gut, salivary glands and hemolymph of the fall web worm, *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) larvae were studied. The results revealed that with the measuring of the enzyme activity in different larval instar,the maximum activity was observed in 5th instar larvae. The optimal pH for α-galactosidase in the gut of *H. cunea* was 7 and for β-galactosidase in the gut, salivary glands and hemolymph were 7, 7 and 6 respectively. The optimal temprature for α–galactosidase activity in the gut of *H. cunea* was 45°C and for β-galactosidase in the gut, salivary glands and hemolymph were 45, 45 and 55°C, respectively. The activity of α-galactosidase was significantly increased by adding K^+ ion (10 mM) compared with the control. Urea (4 mM) and SDS (8 mM) showed the greatest inhibition of α- and β-galactosidase activities, respectively.

Keywords: α galactosidase, β galactosidase, Biochemical properties, Fall web worm.

Archive of SID

www.SID.ir