

## تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گالاکتوزیداز در کفشدوزک خربزه *Epilachna chrysomelina* Foure (Col.:Coccinellidae)

روح‌انگیز فنبری نژاد<sup>۱</sup>، محمد قدمیاری<sup>۲\*</sup>، رضا حسن ساجدی<sup>۳</sup> و مولود غلام‌زاده چیتگر<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

\*۲- نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان (ghadamyari@guilan.ac.ir)

۳- دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه گیلان

۴- دانشجوی دکترا، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۹

### چکیده

کفشدوزک خربزه *Epilachna chrysomelina* (F.) یکی از مهم‌ترین آفات گیاهان خانواده کدوئیان است. این آفت در تمام سنین لاروی و حشره کامل از گیاه میزبان تغذیه نموده و خسارت جدی به این محصولات وارد می‌سازد. با بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی کربوهیدرازهای گوارشی اطلاعات لازم برای استفاده از گیاهان مقاوم حاوی بازدارنده‌های مناسب فراهم می‌شود. به همین دلیل در تحقیق حاضر ویژگی‌های بیوشیمیایی-گالاکتوزیدازها در کفشدوزک خربزه مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌ها در لوله گوارش سنین ۲، ۳ و ۴ لاروی و حشرات کامل نر و ماده نشان داد که بیش‌ترین فعالیت این آنزیم در لاروهای سن ۳ بوده و فعالیت آن در حشرات نر و ماده اختلاف معنی‌داری از نظر آماری با یکدیگر نداشت. پی‌اچ و دمای بهینه برای فعالیت هر دو آنزیم آلفا- و بتا-گالاکتوزیدازها در لوله گوارش به ترتیب ۵ و ۴۰ درجه سلسیوس بدست آمد. مقادیر  $K_m$  آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش *E. chrysomelina* به ترتیب برابر با ۰/۱۳ و ۰/۰۲ میلی‌مولار بود. نتایج زایموگرام روی ژل نشان داد که آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش *E. chrysomelina* یک ایزوform داشت.

**کلید واژه‌ها:** کفشدوزک خربزه، آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز- ویژگی‌های بیوشیمیایی

### مقدمه

را قبل از اینکه سفت و سخت شوند، سوراخ می‌کنند که در نتیجه محیط مناسبی برای نفوذ عوامل پوسیدگی و گندیدگی ایجاد می‌شود. این آفت گاهی تمام گیاهچه-های کدو و خربزه‌های دیر کاشت را مورد تغذیه قرار می‌دهد (زاهدی، ۱۳۷۲؛ اسماعیلی و همکاران، ۱۳۸۳). کفشدوزک خربزه یکی از ناقلین ویروس موزاییک کدو نیز می‌باشد (ایزدپناه، ۱۳۶۸). رایج‌ترین روش برای مبارزه با این آفت در بیش‌تر مناطق دنیا استفاده از سموم شیمیایی نظیر دیمتوات، پرمیفوس متیل و آزادیراکتین می‌باشد (شاهین و همکاران، ۱۹۷۳

کفشدوزک خربزه یا کفشدوزک ۱۲ لکه‌ای جالیز *Epilachna chrysomelina* Foure (Col.:Coccinellidae)، یکی از آفات مهم گیاهان خانواده کدوئیان در ایران می‌باشد. این آفت از برگ و میوه گیاه میزبان تغذیه نموده و خسارت جدی وارد می‌سازد (زاهدی، ۱۳۷۲). حشرات کامل و لاروهای این آفت از پارانشیم سطح رویی و زیری برگ تغذیه می‌کنند و برگ را به صورت توری در می‌آورند. در نتیجه برگ‌ها زرد و به تدریج قهوه‌ای روشن و سپس خشک می‌شوند. همچنین لاروها و افراد بالغ گاهی پوست میوه‌های جوان

عبدل منیعم<sup>۱</sup>، ۲۰۰۳). هر چند که استفاده از روش شیمیایی قاطع‌ترین روش کاهش خسارت است، اما صدمه به محیط زیست و بروز مقاومت در حشرات آفت موجب شده است که راه‌های جایگزین برای کنترل آفات در نظر گرفته شود (ایسمان<sup>۲</sup>، ۲۰۰۶). امروزه استفاده از ارقام مقاوم و گیاهان تراریخت یکی از روش‌های نوین کنترل آفات در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی (IPM) به شمار می‌رود. وارد کردن ژن‌های بیان‌کننده مهارکننده‌های آنزیمی حشرات به گیاه و بیان ژن‌های مذکور در گیاه باعث مقاومت گیاهان به آفات می‌شود. در نتیجه طی تغذیه حشره این مهارکننده‌ها وارد بدن شده و به بلوکه کردن آنزیم‌های گوارشی منجر می‌شوند (شرما و اورتیز<sup>۳</sup>، ۲۰۰۰). این نوع استراتژی کنترل آفات در مورد استفاده از بازدارنده‌های کربوهیدرات، با مداخله در هضم این ترکیبات به عنوان روشی کاربردی و امن برای کنترل حشرات گیاهخوار پیشنهاد شده است. گیاهان بیان‌کننده بازدارنده‌های گیاهی می‌توانند بقا و تولید مثل حشرات را کاهش دهند و رشدشان را به تعویق بیندازند. کربوهیدرات‌های موجود در غذا بیشتر به صورت دی و پلی ساکاریدها می‌باشند. آنزیم‌هایی که در هضم این ترکیبات نقش دارند کربوهیدراز نامیده می‌شوند. نقش اصلی این آنزیم‌ها شکستن پیوندهای گلیکوزیدی می‌باشد که سبب اتصال مونوساکاریدها به همدیگر شده‌اند. آلفا- و بتا- گالاکتوزیدازها گروهی از کربوهیدرازهای موجود در معده حشرات هستند که در هیدرولیز دی و الیگوساکاریدها<sup>۴</sup> اهمیت دارند (ترا و فریرا<sup>۵</sup>، ۱۹۹۴). آلفا گالاکتوزیداز یک اگزوگلیکوزیداز<sup>۶</sup> است که پیوندهای انتهایی D-گالاکتوز را در طیف وسیعی از

الیگوساکاریدهای گالاکتوزیدی همچون ملیبیوز<sup>۷</sup>، استاکیوز<sup>۸</sup> و رافینوز<sup>۹</sup> هیدرولیز می‌کند (میر و رید<sup>۱۰</sup>، ۱۹۸۲). بتا-گالاکتوزیدازها آنزیم‌هایی هستند که سوبستراهای دارای بخش‌های گالاکتوزیدی مانند لاکتوز، گلیکولیپیدها<sup>۱۱</sup>، پروتئوگلیکانها<sup>۱۲</sup>، الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها را می‌شکنند. دلیل استفاده بتا-گالاکتوزیدازها در صنعت غذا و لبنیات، کشاورزی و بیوتکنولوژی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند (اهمینگ و همکاران<sup>۱۳</sup>، ۲۰۰۷؛ بتانکور و همکاران<sup>۱۴</sup>، ۲۰۰۸). بتا-گالاکتوزیدازها آنزیم‌هایی هستند که فعالیتشان به تجزیه گالاکتوز محدود می‌شود (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). اولین گام در طراحی محصولات تراریخته با استفاده از مهارکننده‌ها، شناسایی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌هایی است که در دستگاه گوارش آفات هدف فعالیت می‌کنند (اپرت<sup>۱۵</sup>، ۲۰۰۰؛ ویلهیت و همکاران<sup>۱۶</sup>، ۲۰۰۰). بر این اساس، محققین متعددی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌های گالاکتوزیداز را در راسته سخت بالپوشان مورد مطالعه قرار دادند (گروسمان و ترا<sup>۱۷</sup>، ۲۰۰۱؛ یاپی و همکاران<sup>۱۸</sup>، ۲۰۰۷؛ شریفی و همکاران<sup>۱۹</sup>، ۲۰۱۱؛ صابری ریشه و همکاران<sup>۲۰</sup>، ۲۰۱۲؛ کریمی و همکاران، ۱۳۹۰). تاکنون در زمینه خصوصیات آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در سیستم گوارشی کفشدوزک خربزه *E. chrysomelina*، مطالعه‌ای صورت نگرفته است. به همین دلیل، در این تحقیق

- 
- 7- Melibiose
  - 8- Stachyose
  - 9- Raffinose
  - 10- Meier & Reid
  - 11- Glycolipids
  - 12- Proteoglycans
  - 13- Oehmig *et al.*
  - 14- Betancor *et al.*
  - 15- Oppert
  - 16- Wilhite *et al.*
  - 17- Grossmann & Terra
  - 18- Yapi *et al.*
  - 19- Sharifi *et al.*
  - 20- Saberi Riseh *et al.*

- 
- 1- Abdel-Moniem
  - 2- Isman
  - 3- Sharma & Ortiz
  - 4- Oligosaccharides
  - 5- Terra & Ferreira
  - 6- Exoglycosidase

برای تعیین فعالیت آنزیم‌های گالاکتوزیداز از سوبستراهای p- نیتروفیل -  $\alpha$ -D - گالاکتوپیرانوزید (pNaGa) و p- نیتروفیل -  $\beta$ -D - گالاکتوپیرانوزید (pN $\beta$ Ga) به ترتیب برای اندازه‌گیری آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز استفاده شد. واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با افزودن ۱۰ میکرولیتر آنزیم به ۴۵ میکرولیتر سوبسترا (۲۵ میلی‌مولار) و ۱۱۵ میکرولیتر بافر استات سدیم- بورات- فسفات ۵۰ میلی‌مولار انجام شد. پس از ۳۰ دقیقه، با افزودن ۶۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ نرمال واکنش متوقف شد. پس از ۱۰ دقیقه مقدار هیدرولیز سوبستراهای نامبرده بر اساس تشکیل پارا- نیتروفنل با استفاده از میکروپلیت ریدر Awareness (مدل Stat fax 3200®) در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد (سیلوا و همکاران، ۱۹۹۹).

#### اندازه‌گیری pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز

برای بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز، pHهای مختلف (۲ تا ۱۲) با استفاده از بافر استات سدیم - بورات- فسفات ۵۰ میلی‌مولار تهیه شد. همچنین برای تعیین اثر دما روی فعالیت این آنزیم‌ها، دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سلسیوس) مورد آزمایش قرار گرفت. بقیه مراحل همانند روش کار توضیح داده شده در بند اندازه‌گیری فعالیت آنزیم انجام شد.

#### تعیین پارامترهای سینتیک آنزیم‌های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز

برای تعیین پارامترهای سینتیک ( $V_{max}$  و  $K_m$ ) آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز، ابتدا غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌مولار از سوبستراهای اختصاصی هر کدام از آنزیم‌ها تهیه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر آنزیم به ۴۵ میکرولیتر سوبسترا و ۱۱۵ میکرولیتر بافر استات سدیم - گلیسین - فسفات با pH=۵ اضافه شد.

ویژگی‌های بیوشیمیایی این آنزیم‌های گوارشی در دستگاه گوارش این حشره آفت به منظور دستیابی به روش‌های جدید کنترل مورد مطالعه قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

#### پرورش حشره

در این مطالعه سنین مختلف لاروی و حشرات کامل نر و ماده کفشدوزک خربزه از روی بوته‌های کدو در استان گیلان (بندر کیشهر) جمع‌آوری و جهت پرورش به آزمایشگاه منتقل شدند. تغذیه و پرورش روی گیاهان کدو مسماهی (*Cucurbita pepo L.*) در شرایط آزمایشگاهی با دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت ۸۰-۶۰ درصد انجام گرفت. از سنین ۲، ۳ و ۴ لاروی و حشرات کامل نر و ماده (۰-۱۲ ساعته) برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

#### تشریح حشره و تهیه عصاره آنزیمی

برای جدا کردن لوله گوارش ابتدا حشرات کامل و لاروهای سنین مختلف روی یخ بی‌حس شدند. جهت تشریح و خارج ساختن لوله گوارش از حشرات کامل، ابتدا بالها و پاها به کمک پنس جدا شد و سطح شکمی شکافته شده و دستگاه گوارش برداشته شد. در مورد لاروها نیز پاها جدا شده و پس از شکافتن سطح شکمی، دستگاه گوارش جدا و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان آزمایش نگهداری شدند (شکل ۱). همگن نمودن نمونه‌ها با استفاده از یک هموژنایزر دستی، درون ظرف محتوی یخ انجام شد. پس از آن نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی از بخش ته نشین شده جدا و به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد.

لازم به ذکر است که برای تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی این آنزیم از روده میانی (شکل ۱) استفاده شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا - گالاکتوزیداز

قنبری نژاد و همکاران: تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های...

اندازه‌گیری پروتئین با استفاده از روش برادفورد<sup>۵</sup> (۱۹۷۶) انجام و از آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. هر تکرار شامل ۱۰ روده میانی حشرات هم‌سن بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS انجام گردید. رسم نمودارها و مرتب کردن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ انجام شد.

### نتایج و بحث

#### اثر pH روی فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز

در این آزمایش pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش ۵ بدست آمد. فعالیت آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز تا pH ۳ کمتر از ۴۰٪ بود که به تدریج افزایش یافت و به بیش‌ترین مقدار خود در pH ۵ رسید. سپس به تدریج از فعالیت آن کاسته شد و در pH ۱۰ و ۱۱ به کم‌تر از ۴۰٪ رسید (شکل ۲، الف). فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در pH ۳ حدود ۲۰٪ بود که با افزایش pH میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت تا به بیش‌ترین مقدار خود در pH ۵ رسید. سپس میزان فعالیت آن به تدریج کاسته شده و به کم‌ترین مقدار خود در pH ۱۱ رسید (شکل ۲، ب). پی‌اچ یکی از خواص داخلی بسیار مهم معده است که روی آنزیم‌های گوارشی تأثیرگذار می‌باشد. آنزیم‌ها دارای یک یا دامنه‌ای از pH مطلوب می‌باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در pH بالاتر و پایین‌تر از آن فعالیت‌شان کاهش می‌یابد. pH می‌تواند روی پایداری آنزیم و بهبود فعالیت بهینه آن تأثیرگذار باشد. pH بهینه برای فعالیت آنزیم با پی‌اچ معده حشره در برخی گونه‌ها هم‌خوانی داشته و تحت تأثیر فاکتورهای نظیر غذا، pH غذا و جمعیت



شکل ۱- دستگاه گوارش لارو کفشدوزک خرپزه *E. chrysomelina*

واکنش در زمان‌های، صفر، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه از شروع، با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ مولار متوقف شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. مقدار  $V_0$  آنزیم در غلظت‌های مختلف با استفاده از نرم افزار اکسل و مقدار  $K_m$  و  $V_{max}$  با استفاده از نرم افزار هایپر اندازه‌گیری شد (فریرا و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۸).

#### الکتروفورز Native PAGE و زایموگرام آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز

برای انجام این کار از روش دیویس<sup>۲</sup> (۱۹۶۴) استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با بافر نمونه مخلوط و داخل چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. پس از اتمام، ژل به درون ظروف حاوی سوبسترای اختصاصی هر یک از آنزیم‌ها که به طور جداگانه در بافر استات سدیم ۰/۱ مولار حل شده بودند، منتقل شد. از سوبستراهای ۴-MU $\alpha$ Ga و MU $\beta$ Ga به ترتیب برای آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز استفاده شد. با قرار دادن ژل در دستگاه ژل داگ باندهای تشکیل شده در زیر اشعه فرابنفش (UV) مشاهده شد.

#### اندازه‌گیری پروتئین موجود در نمونه‌های آنزیمی

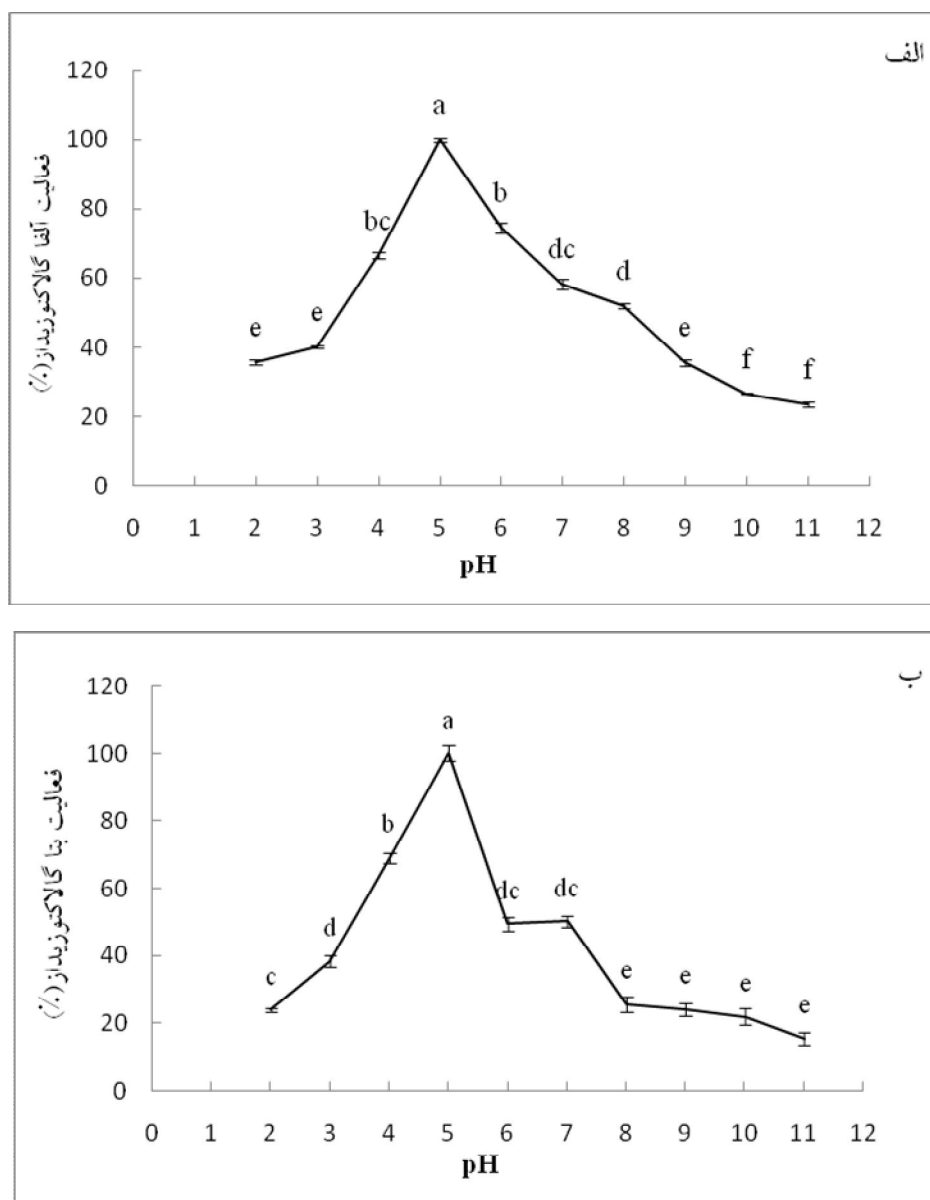
1- Ferreira *et al.*

2- Davis

3- 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

4- 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside

5- Bradford



شکل ۲- اثر pH روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز (الف) و بتا-گالاکتوزیداز (ب) در روده میانی لارو سن سوم کفشدوزک خریزه *E. chrysomelinae*

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

همکاران، ۲۰۱۱). همچنین شریفی و همکاران (۲۰۱۱) همکاران (۲۰۰۷) pH ۵ را به عنوان pH بهینه فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در سوسک برگخوار نارون *Xanthogaleruca luteola* (Müller) به ترتیب ۴ و ۳ گزارش نمودند. فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در لارو سن ۴ سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) نشان داد که این آنزیم در pH ۵/۵-۴ فعالیت

میکروارگانسیم های معده می باشد (داو<sup>۱</sup>، ۱۹۸۶). یابی و همکاران (۲۰۰۷) pH ۵ را به عنوان pH بهینه فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در سرخرطومی خرما *Rhynchophorus palmarum* L. گزارش کردند. pH بهینه فعالیت آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در سرخرطومی حنایی خرما ۴ گزارش شد (صابری ریشه و

1- Dow

*palmarum* دمای ۳۷ درجه سلسیوس گزارش کردند. شریفی و همکاران (۲۰۱۱) دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز را در سوسک برگخوار نارون *X. luteola* به ترتیب ۶۰ و ۴۰ درجه سلسیوس گزارش نمودند. همچنین دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در سوسک حنایی خرما *R. ferrugineus* در طیف ۶۰-۴۰ درجه سلسیوس و برای فعالیت بتا گالاکتوزیداز در ۴۰ درجه سلسیوس محاسبه شده است (صابری ریشه و همکاران ۲۰۱۲).

### فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز

فعالیت ویژه آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در سنین مختلف لاروی، حشرات کامل نر و ماده و سه قسمت لوله گوارش کفشدوزک خربزه اندازه‌گیری شد. همان طوری که در شکل‌های ۴ و ۵ (الف) مشاهده می‌شود، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در سنین مختلف لاروی *E. chrysolina* تفاوت معنی‌داری داشت. بیش‌ترین فعالیت این آنزیم‌ها در لاروهای سن سوم به دست آمد. این وضعیت را می‌توان با میزان زیاد تغذیه و تحرک این مرحله لاروی نسبت به سنین دیگر توجیه نمود (مشاهدات شخصی). کریستوفر و ماساوان (۱۹۸۵) اظهار داشتند که بین میزان جذب غذا و فعالیت آنزیم ارتباط مستقیم مشاهده می‌شود، به طوری که با افزایش تغذیه و جذب غذا، فعالیت آنزیم نیز در بافت معده افزایش می‌یابد. بررسی میزان فعالیت این آنزیم‌ها بین حشرات نر و ماده اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. مقدار فعالیت ویژه آلفا-گالاکتوزیداز در قسمت میانی لوله گوارش به ترتیب ۵/۱۱ و ۱۱/۵ برابر بیش‌تر از فعالیت آن در قسمت‌های جلویی و عقبی لوله گوارش بدست آمد. همچنین مقدار فعالیت ویژه بتا-گالاکتوزیداز در قسمت میانی لوله گوارش به ترتیب ۴ و ۵/۷ برابر بیش‌تر از فعالیت آن در قسمت‌های جلویی و عقبی لوله گوارش اندازه‌گیری شد (شکل‌های ۴ و ۵ (ب)). این نتایج نشان می‌دهند که فعالیت این آنزیم‌ها در قسمت میانی دستگاه

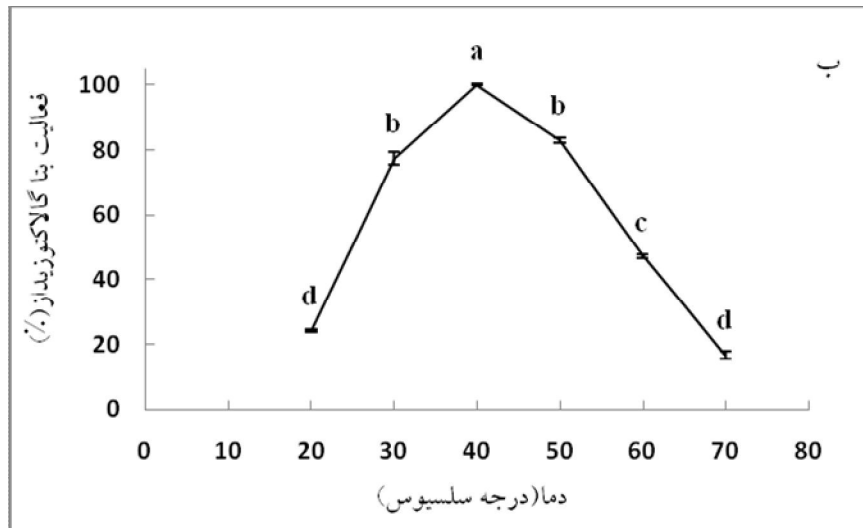
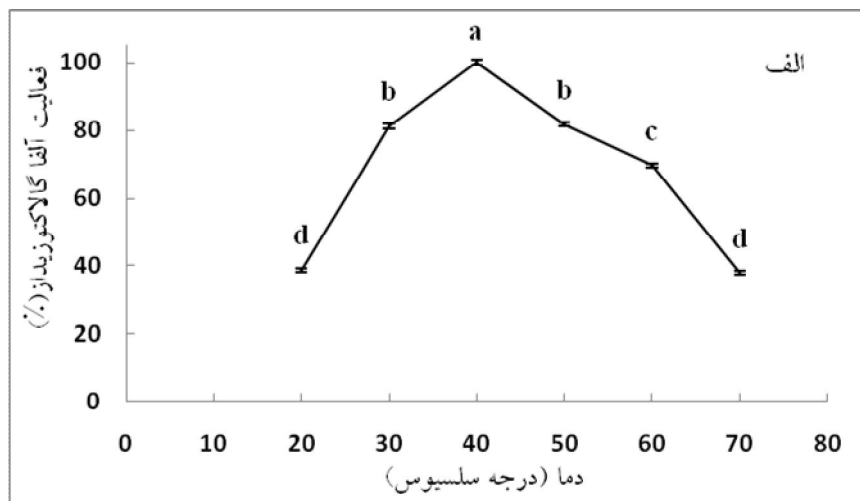
بالایی داشت اما حداکثر فعالیت در pH ۴/۵ رخ داد. بعد از این نقطه pH فعالیت آنزیم به تدریج کاهش یافت (کریمی و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به تفاسیر می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز فعالیت مناسبی را در محیط‌های اسیدی از خود نشان می‌دهند.

### اثر دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز

در این بررسی دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش ۴۰ درجه سلسیوس بدست آمد. با توجه به شکل ۳، فعالیت هر دو آنزیم در دمای ۲۰ درجه سلسیوس حدود ۳۰-۲۰ درصد بود که این میزان به شدت افزایش یافته تا به مقدار بیشینه خود در دمای ۴۰ درجه سلسیوس رسید. سپس در دمای بالاتر فعالیت آنزیم به تدریج کاهش یافته تا اینکه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به کمتر از ۲۵٪ می‌رسد. 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<sup>۱</sup>، ۲۰۰۲). فعالیت آنزیم‌ها به طور معمول با افزایش دما از صفر تا ۴۰ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد، در محدوده دمایی ۶۰-۴۰ درجه سلسیوس کاهش سریع در فعالیت آنزیمی رخ می‌دهد که این به واسطه افزایش آشفستگی مولکول‌های آنزیم و سوبسترا و افزایش آهسته دنا تورا سیون دمایی آنزیم‌ها می‌باشد. اثر دما روی فعالیت بتا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش لارو سن ۴ سوسک کلرادوی سیب زمینی *decemlineata* L. نشان داد که این آنزیم در طیف دمایی ۶۰-۴۵ درجه سلسیوس فعالیت بالایی داشت و حداکثر فعالیت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس رخ داد (کریمی و همکاران، ۱۳۹۰). یابی و همکاران (۲۰۰۷) دمای بهینه فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز را در سرخرطومی خرما *R.*

مربوط به غدد موجود در سر یا برگشت مواد غذایی از روده میانی به روده جلویی باشد. در مورد فعالیت در روده عقبی، ممکن است این آنزیم‌ها از روده میانی همراه غذا وارد روده عقبی شده باشند.

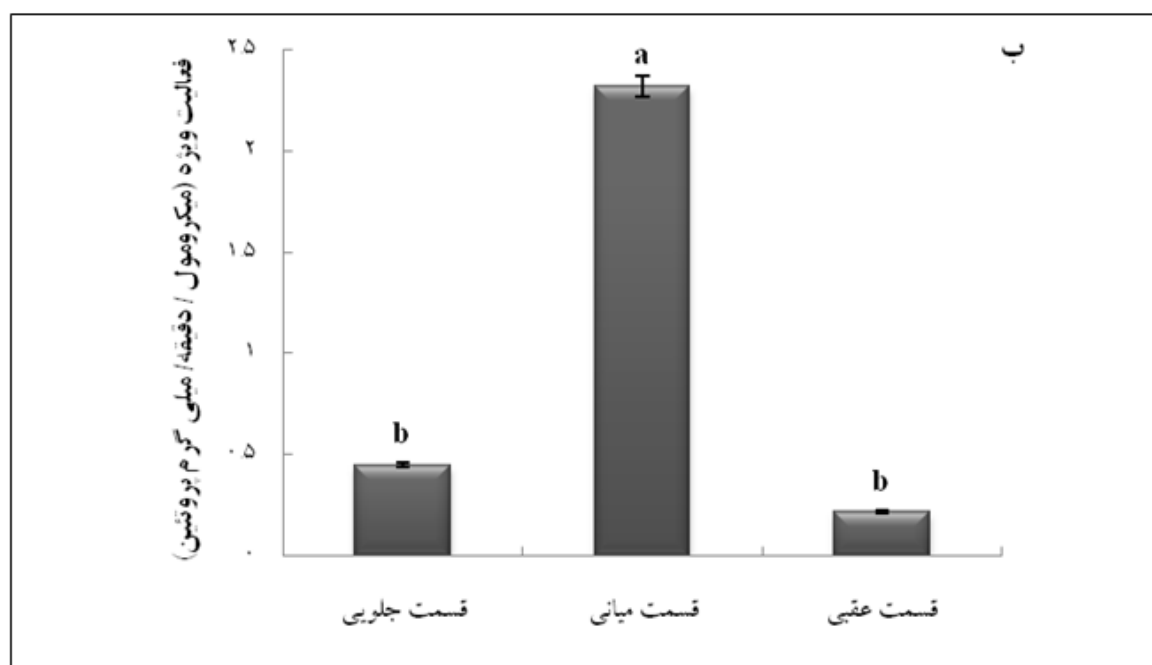
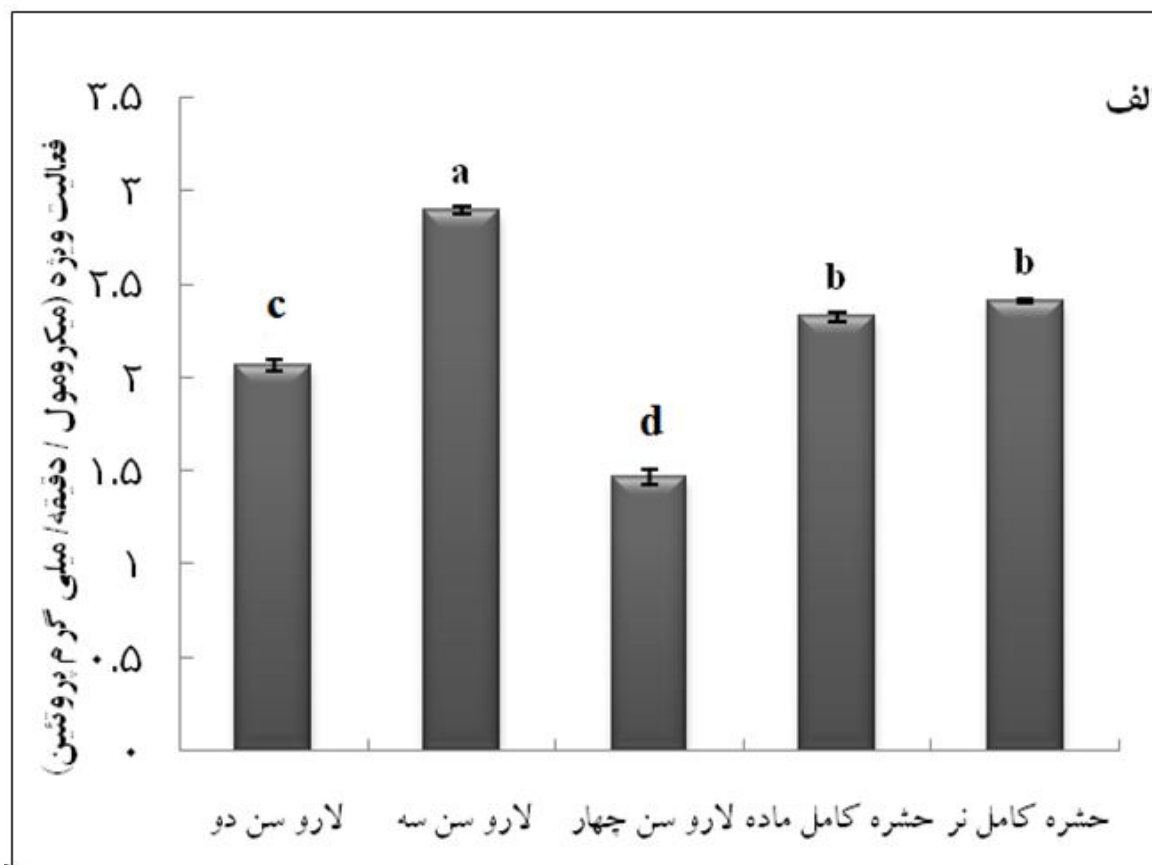
گوارش بیش‌تر از قسمت جلویی و عقبی آن می‌باشد. همچنین مقدار فعالیت ویژه آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز نسبت به بتا-گالاکتوزیداز در بافت‌های مورد آزمایش بیش‌تر بود. بخش هضم و جذب مواد غذایی روده میانی می‌باشد. احتمالاً منشا آنزیم‌های موجود در روده جلویی



شکل ۳- اثر دما روی میانگین فعالیت آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز (الف) و بتا-گالاکتوزیداز (ب) روده میانی لارو سن سوم کفشدوزک خربزه *E. chrysolina*

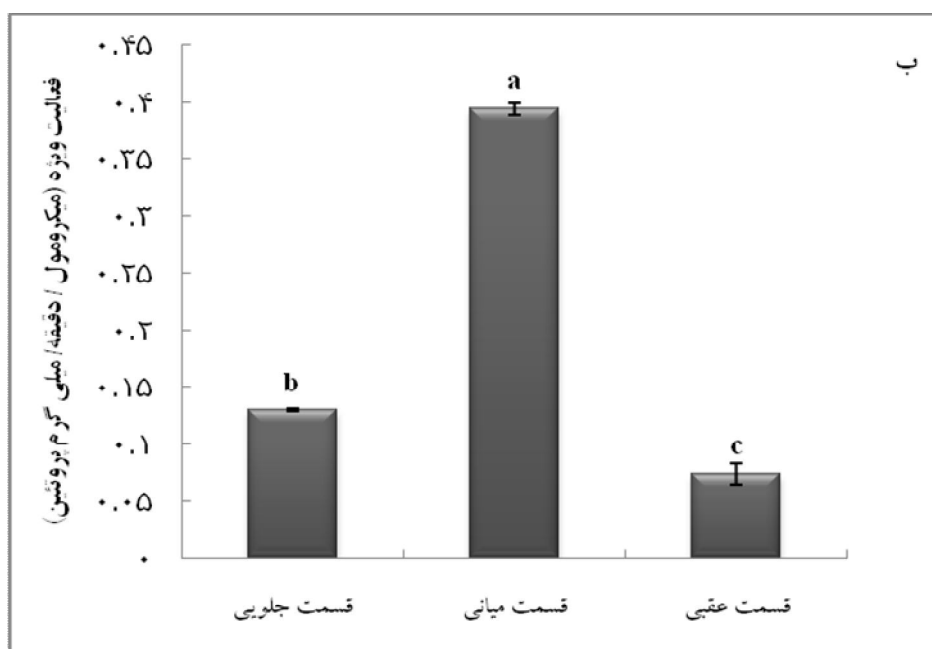
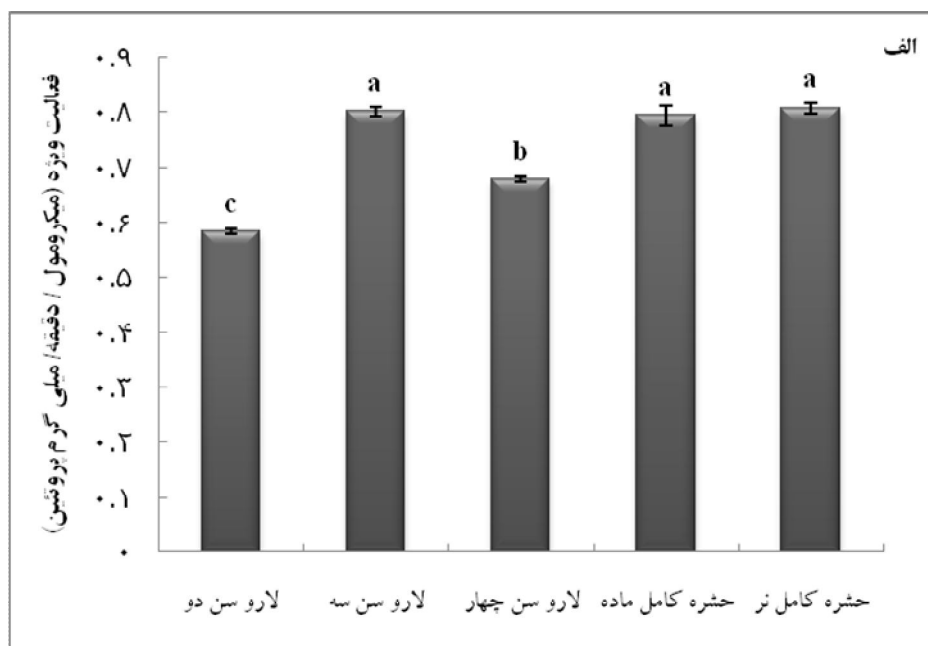
\* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری در سطح ۰.۰۵ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

قنبری نژاد و همکاران: تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های...



شکل ۴- نمودار فعالیت ویژه آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز در سنین مختلف لاروی و حشره کامل نر و ماده کفشدوزک خربزه *E. chrysomelina* (الف) و سه قسمت لوله گوارش لارو سن سه (ب) \* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری در سطح ۰.۰۵ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.





شکل ۵- نمودار فعالیت ویژه آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در سنین مختلف لاروی و حشره کامل نر و ماده کفشدوزک خریزه *E. chrysolina* (الف) و سه قسمت لوله گوارش لارو سن سه (ب) میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

میلی مولار بر دقیقه بر میلی لیتر محاسبه شد. همچنین مقدار این پارامترها برای آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش به ترتیب برابر با ۰/۰۲ میلی مولار و ۵/۳۴ میلی مولار بر دقیقه بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد که مقدار

مقدار پارامترهای سینتیکی  $V_{max}$  و  $K_m$  آنزیم های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز

مقدار پارامتر  $V_{max}$  آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش به ترتیب برابر با ۰/۰۱۳ میلی مولار و ۵/۶

قنبری نژاد و همکاران: تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های...

با توجه به مشکلات ناشی از آفت‌کش‌ها مانند بروز مقاومت در آفات و خطرات استفاده از این ترکیبات شیمیایی بر موجودات غیر هدف که در عین حال نیز دارای بقایای خطرناک برای محیط زیست هستند، نیاز به معرفی روش‌های جایگزین کنترل شیمیایی بیش از پیش احساس می‌شود. هر چند این روش‌ها باید بقایای کمی در محیط داشته و در عین حال دارای تأثیر قابل قبولی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی باشند. امروزه این امکان وجود دارد که با مطالعات گسترده در زمینه شناسایی بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی موجود در پیکره گیاهان و به کارگیری این ترکیبات در تولید گیاهان تراریخته، بتوان با ایجاد اختلال در هضم غذا و جلوگیری از جذب مواد غذایی ضروری در حشرات آفت، گام مؤثری در راستای گسترش روش‌های نوین کنترل آفات برداشت. بر این اساس، آگاهی از ویژگی‌ها و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌های گوارشی در حشرات آفت هدف می‌تواند مفید واقع شود. با توجه به نتایج ارائه شده در این تحقیق، با آگاهی از خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌های گالاکتوزیداز در کفشدوزک خربزه *E. chrysomelina* این امکان می‌تواند فراهم شود که با شناسایی مهارکننده‌های این آنزیم بتوان از خسارت جدی این آفت کاست.

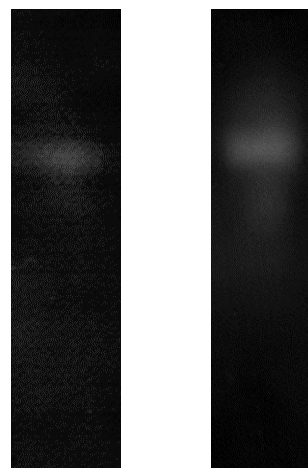
### سیاس‌گذاری

این تحقیق با استفاده از امکانات پژوهشی دانشگاه گیلان انجام شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می‌شود.

$K_m$  آنزیم آلفا- گالاکتوزیداز بیشتر از مقدار  $K_m$  بتا- گالاکتوزیداز در لوله گوارش بود که نشان‌دهنده گیرایی بیش‌تر آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز به سوبسترای خود می‌باشد.

### فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز روی ژل

نتایج حاصل از آنالیز زایموگرامی با استفاده از SDS-PAGE نشان داد که آنزیم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز در لوله گوارش لاروهای *E. chrysomelina* وجود داشتند. باندهای قابل مشاهده در ژل الکتروفورز این موضوع را تایید کردند. یک ایزوفرم از آنزیم آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش مشاهده شد (شکل ۶). مشابه نتایج ما، شریفی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که بتا-گالاکتوزیداز موجود در دستگاه گوارش لارو سوسک برگ‌خوار نارون دارای یک ایزوفرم بود. همچنین صابری ریس و همکاران (۲۰۱۱) تعداد ایزوفرم‌های آلفا- و بتا-گالاکتوزیداز را در سرخرطومی حنایی خرما تعداد یک ایزوفرم گزارش نمودند.



شکل ۶- فعالیت آنزیم آلفا گالاکتوزیداز (سمت راست) و بتا گالاکتوزیداز (سمت چپ) موجود در روده میانی کفشدوزک خربزه *E. chrysomelina* در روی ژل الکتروفورز

منابع

۱. اسماعیلی، م.، میرکریمی، ا. و آزمایش فرد، پ. ۱۳۸۳. حشره شناسی کشاورزی (حشرات، کنه‌ها، جوندگان و نرم‌تنان زیان آور) و مبارزه با آن‌ها. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ هشتم، ۵۰۰ ص.
۲. ایزدپناه، ک. ۱۳۶۸. تعیین خصوصیات ویروس مولد موزائیک کدو. مجله بیماری‌های گیاهی، ۲۵: ۱-۴.
۳. زاهدی، ک. ۱۳۷۲. آفات سبزی و گیاهان زینتی در ایران و روش‌های کنترل در برابر آنها. مرکز انتشارات دانشگاه تهران، ۱۴۳ ص.
۴. 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) اولین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه. ۵ ص.
5. Abdel-Moniem, A.S.H. 2003. Efficacy of some neem products against adults of the melon ladybird beetle, *Epilachna chrysomelina* F. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 36(1): 53-57.
6. Betancor, L., Luckarift, H.R., Seo, J.H., Brand, O., and Spain, J.C. 2008. Three-dimensional immobilization of  $\beta$ -galactosidase on a silicon surface. Biotechnology and Bioengineering, 99: 261-267.
7. Boyd, D.W., Cohen, A.C., and Alverson, D.R. 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.
8. Bradford, M.M. 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.
9. 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.
10. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences. 121: 404-427.
11. Dow J.A.T. 1986. Insect midgut function. Advances in Insect Physiology, 19: 187-329.
12. Ferreira, C., Torres, B.B., and Terra, W.R. 1998. Substrate specificities of midgut  $\beta$ -glycosidases from insects of different orders. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 119(1): 219-225.
13. Grossmann, G.A., and Terra, W.R. 2001.  $\alpha$ -Galactosidases from the Larval midgut of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 128:109-122.

قنبری نژاد و همکاران: تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های...

14. Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51: 45–66.
15. Meier, H., and Reid, G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In Loewus, F.A., Tanner, W. (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer Verlag, New York. pp: 418 -471.
16. Oehmig, A., Cortes, M.L., Perry, K.F., Sena-Esteves, M., Fraefel, C., and Breakefield, X.O. 2007. Integration of active human  $\beta$ -galactosidase gene (100 kb) into genome using HSV/AAV amplicon vector, *Gene Therapy*, 14: 1078-1091.
17. Oppert, B. 2000. Transgenic plants expressing enzyme inhibitors and the prospects for biopesticide development. In Koul, O., Dhaliwal, G.S. (eds.), *Advances in biopesticide research*, Hardwood Academic, Amsterdam. pp: 83-95.
18. SAS Institute. 1999. PROC user's manual, version. 5th ed. Cary (NC): SAS Institute.
19. Saberi Riseh, N., Ghadamyari, M., and Motamediniya, B. 2012. Biochemical characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases and  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases from red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Col.: Curculionidae). *Plant Protection Science*, 48(2): 85-93.
20. Shaheen, A.H., Elezz, A.A., and Assem, M.A. 1973. Chemical control of cucurbit pests at Komombo. *Agricultural Research Review*, 51 (1): 103-107.
21. Sharifi, M., Gadamyari. M., Mahadavi, M., and Fetemeh, S. 2011. Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its  $\alpha$ -amylase by inhibitors extracted from the common bean. *Archive Biological Sciences Belgrade*, 63 (3): 705-716.
22. Sharma, H.C., and Ortiz, R. 2000. Transgenics, pest management, and the environment. *Current Science*, 79: 421-437.
23. Silva, C. P., Terra, W. R., Xavier-Filho, J., Grossidesa, M. F., Lopes, A. R., and Pontes, E. G. 1999. Digestion in larvae of *Calosobruchus maculates* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on alpha amylase and oligosaccharidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 355-366.
24. Terra, W.R., and Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Physiology and Biochemistry*, 109: 1-62.
25. Wilhite, S.E., Elden, T.C., Brzin, J., and Smigocki, A.C. 2000. Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1181-1188.
26. Yapi, D.Y.A., Niamke S.L., and Kouame L.P. 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.