

ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئازهای گوارشی کفشدوزک خربزه

Epilachna chrysolina (Fabricius) (Col.: Coccinellidae)مولود غلام‌زاده‌چیتگر^{۱*}، محمد قدمیاری^۲ و روح‌انگیز قنبری‌نژاد^۲

۱- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران و ۲- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b_gh.chitgar60@yahoo.com; m.gholamzadeh@areeo.ac.ir

چکیده

کفشدوزک خربزه، *Epilachna chrysolina* (Fabricius) (Col.:Coccinellidae) به عنوان یکی از مهم‌ترین آفات گیاهان خانواده کدوئیان قادر است با تغذیه از برگ‌های گیاه در سنین لاروی و حشره کامل خسارت جدی به این محصولات وارد سازد. در تحقیق حاضر ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئازهای گوارشی در کفشدوزک خربزه مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی در لوله گوارش سنین ۲، ۳ و ۴ لاروی و حشرات کامل نر و ماده نشان داد که بیش‌ترین فعالیت آنزیم در لاروهای سن ۳ بوده و فعالیت آن در حشرات نر و ماده اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. مقدار pH و دمای بهینه فعالیت پروتئازی در لوله گوارش به ترتیب ۵ و ۳۰ درجه سلسیوس بدست آمد. بازدارنده‌های EDTA، TLCK، TPCK، PMSF و یدواسنات روی فعالیت پروتئازهای گوارشی *E. chrysolina* به ترتیب ۱۸/۹۳، ۱۹/۰۴، ۲۲/۲۷، ۲۶/۰۵ و ۴۴/۳۲ درصد مهارکنندگی نشان دادند. با توجه به بیشترین میزان بازدارندگی ایجاد شده توسط یدواسنات روی فعالیت پروتئازی، سیستمین پروتئازها به عنوان پروتئازهای غالب در لوله گوارش این حشره معرفی می‌شوند. نتایج زایموگرام روی ژل نشان داد که آنزیم پروتئاز در لوله گوارش *E. chrysolina* یک ایزوفرم دارد. واژگان کلیدی: کفشدوزک خربزه، مهارکننده، پروتئاز

Biochemical properties of digestive proteases of melon ladybird,

Epilachna chrysolina (Fabricius) (Col.: Coccinellidae)Moloud Gholamzadeh-Chitgar^{1&*}, Mohammad Ghadamyari² & Rohangiz Ghanbarinezhad²

1- Plant Protection Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran & 2-Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding author, Email: b_gh.chitgar60@yahoo.com; m.gholamzadeh@areeo.ac.ir

Abstract

Melon ladybird, *Epilachna chrysolina* (Fabricius) (Col.: Coccinellidae) is a major pest of cucurbitaceous plants by feeding on leaves at larval and adult stages. In this study, biochemical properties of digestive proteases of the melon ladybird were studied in its alimentary canal. Enzyme activity in the digestive systems of 2nd, 3rd and 4th larval instars and adults showed that the highest specific enzyme activities occurred in 3rd instar larvae while no significant differences observed in adults. The optimal pH and temperature for protease activity in alimentary canal were found 5 and 30°C, respectively. The inhibitory effect of EDTA, TLCK, TPCK, PMSF and Iodoacetate were determined 44.32, 26.05, 22.27, 19.04 and 18.93% in the gut of *E. chrysolina*, respectively. With respect to the highest inhibition rate in proteolytic activity caused by Iodoacetate, cysteine proteinases are considered as the main proteases in the midgut of the melon ladybird. Zymogram pattern in the native gel indicated that the protease enzyme had one isoform in the alimentary canal of the pest.

Key Words: melon ladybird, inhibitor, protease

Received: 9 March 2017, Accepted: 18 September 2017

مقدمه

کفشدوزک خربزه یا کفشدوزک ۱۲ نقطه‌ای جالیز (*Epilachna chrysolina* (Fabricius) یکی از آفات مهم و کلیدی خانواده کدوئیان در ایران می‌باشد. این آفت از برگ و میوه گیاه میزبان تغذیه کرده و خسارت جدی به محصول وارد می‌سازد (Zahedi, 1993). حشرات کامل و لاروها 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. لاروها و افراد بالغ گاهی پوست میوه‌های جوان 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 گیاهچه‌های کدو و خربزه‌های دیر کاشت را مصرف می‌کند (Esmaili et al., 2004). کفشدوزک خربزه یکی از ناقلین ویروس موزاییک کدو نیز می‌باشد (Izadpanah, 1989). در بین کدوئیان خیار، خربزه، طالبی، کدو و هندوانه بیش‌تر از سایر محصولات مورد حمله این آفت قرار می‌گیرند. این حشره بسته به شرایط آب و هوایی ۳-۵ نسل در سال دارد. در ایران به طور تقریبی در کلیه مناطق جالیزکاری کم و بیش پراکنده بوده و تاکنون از نواحی کرمانشاه، خراسان، استان مرکزی، فارس، کرمان، سواحل دریای خزر، بلوچستان، هرمزگان، اصفهان، رشت و ایلام گزارش شده است (Esmaili et al., 2004). در بیش‌تر مناطق دنیا و از جمله ایران رایج‌ترین روش برای مبارزه با این آفت استفاده از ترکیبات شیمیایی نظیر دیمتوات و پرمفوس متیل است (Shaheen et al., 1973). مصرف این آفتکش‌های شیمیایی می‌تواند باعث آلودگی‌های زیست محیطی و بروز مقاومت در آفات شده و سلامت بشر را به خطر بیندازد. همچنین طغیان آفات و نابودی دشمنان طبیعی از دیگر مضرات ناشی از کاربرد سموم به شمار می‌روند. در چند سال اخیر یکی از روش‌های رایج در کنترل تلفیقی آفات (IPM) استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. مواد تحت عنوان بازدارنده‌های آنزیمی در گیاهان شناسایی شده‌اند که منجر به مقاومت گیاهان نسبت به برخی از آفات می‌شوند. پروتئازها یکی از انواع آنزیم‌هایی هستند که باعث شکسته شدن پیوندهای پپتیدی اتصال دهنده اسیدهای آمینه به یکدیگر و در نتیجه تجزیه پروتئین‌ها می‌شوند. بازدارنده‌های پروتئازی اغلب پروتئینی می‌باشند که به طور عمده در بافت‌های ذخیره‌ای گیاهان وجود دارند و ممکن است تا ۱۰ درصد از میزان پروتئین تمام این بافت‌ها را تشکیل دهند. این مهارکننده‌ها به احتمال زیاد در هنگام مواجهه با حشرات یا میکروارگانیسم‌های پاتوژن در برگ‌های گیاهان ظاهر می‌شوند (Ryan, 1999) و با جلوگیری از پروتئولیز، باعث هضم ناقص غذا و مانع جذب اسیدهای آمینه ضروری در حشرات شده و در نتیجه موجب کندی رشد و مرگ در اثر گرسنگی خواهند شد (Budatha et al., 2008). در چند سال اخیر تلاش‌های زیادی برای افزایش بیان این پروتئین‌ها در گیاهان به منظور مقاوم کردن آنها نسبت به آفات انجام گرفته است (Leo et al., 2002). با توجه به اهمیت استفاده از مهارکننده‌های پروتئینی آنزیم‌های گوارشی و تولید گیاهان تراریخته حاوی این ترکیبات، اولین قدم در راه استفاده از این عوامل در کنترل آفات، شناخت کامل ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی می‌باشد (Chougule et al., 2008). بر این اساس، تحقیقات متعددی در مورد آنزیم‌های گوارشی در راسته سخت‌بالپوشان انجام شده است. از آن جمله می‌توان به مطالعات (Tatli et al., 2010) روی سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* Müller (Oppret et al., 2003) و *Tribolium castaneum* Herbst

Montesdeoca et al. (2005) روی *Cosmopolites sordidus* Germar اشاره کرد. تاکنون در زمینه ویژگی‌های پروتازها در دستگاه گوارش کفشدوزک خربزه *E. chrysolina*، مطالعه‌ای صورت نگرفته است. به همین دلیل در این تحقیق ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتازها و نیز پروتاز غالب در دستگاه گوارش این حشره آفت به منظور دستیابی به روش‌های جدید کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

آزوکازئین، N-p-tosyl-L-lys chloromethyl ketone (TLCK)، N-tosyl-L-phe chloromethylketone (TPCK)، phenyl methane sulfonyl fluoride (PMSF)، پدواستات از شرکت سیگما (آمریکا) و تری کلرواستیک اسید (TCA) و اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (EDTA) از کمپانی مرک (آلمان) تهیه شد.

پرورش حشره

سنین مختلف لاروی و حشرات کامل نر و ماده کفشدوزک خربزه از روی بوته‌های خیار و کدو در استان گیلان، بندر کپاشهر جمع‌آوری و جهت پرورش به آزمایشگاه منتقل شدند. تغذیه و پرورش روی برگ‌های کدو در شرایط آزمایشگاهی با دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۸۰-۶۰٪ انجام گرفت. از سنین ۲، ۳ و ۴ لاروی و حشرات کامل نر و ماده برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

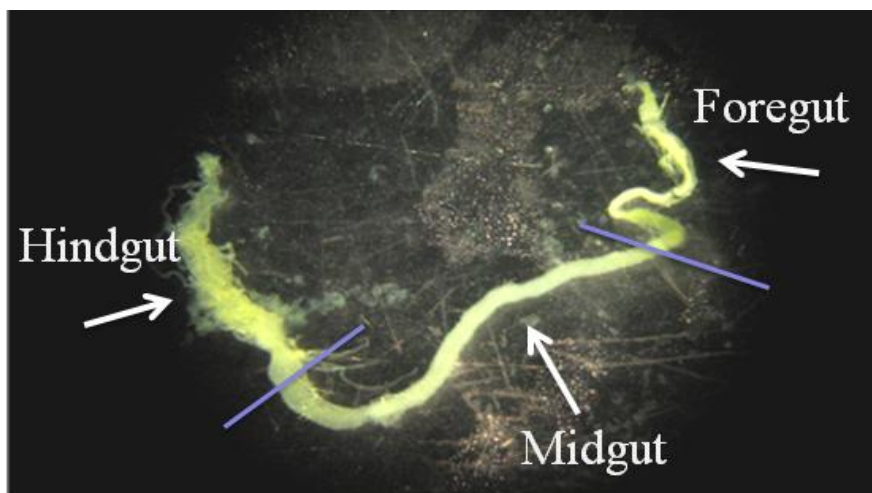
تشریح حشره و تهیه عصاره آنزیمی

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی از حشرات هم‌سن استفاده شد. ابتدا حشرات کامل و لاروهای سنین مختلف ۲، ۳ و ۴ روی یخ بی‌حس شدند. جهت تشریح و خارج ساختن لوله گوارش از حشرات کامل، ابتدا بالها و پاها به کمک پنس جدا شده و بعد از اینکه سطح شکمی شکافته شد، دستگاه گوارش به طور کامل آشکار 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). جهت استخراج آنزیم برای اندازه‌گیری فعالیت پروتازی در سه قسمت لوله گوارش کفشدوزک خربزه، هر قسمت جلویی لوله گوارش در پنج میکرولیتر، معده میانی در هفت میکرولیتر و قسمت عقبی در پنج میکرولیتر آب مقطر، لوله گوارش حشره کامل نر و ماده هر کدام در ده میکرولیتر و سنین مختلف لاروی ۲، ۳ و ۴ به ترتیب در پنج، هشت و هشت میکرولیتر آب مقطر با استفاده از یک هموژنایزر دستی، درون ظرف محتوی یخ هموژنایز و در دمای ۴ درجه سلسیوس در $13000 \times g$ برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع روپی از بخش ته نشین شده، جدا شد و به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد.

تعیین فعالیت پروتازی

فعالیت پروتازی با استفاده از روش گارسیا-کارنو و همکاران (Garcia-Carreño et al., 1993) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری از سوبسترا آزوکازئین ۱٪ استفاده شد. واکنش در دمای ۳۵ درجه

سلسیوس با مقدار ۱۰ میکرولیتر آنزیم، ۱۸ میکرولیتر آزوکازین ۱٪ به عنوان سوپسترا و ۴۸/۳ میکرولیتر بافر اسید سیتریک با pH ۵، به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انجام شد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۳۰٪ اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در $13000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم یک نرمال به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه شد و جذب نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.



شکل ۱- لوله گوارش لارو کفشدوزک خربزه *Epilachna chrysomelina*

Fig. 1. Digestive tract of larvae of *Epilachna chrysomelina*

اثر pH و دما بر فعالیت پروتئازی

برای بررسی اثر pH روی فعالیت پروتئازی، pHهای مختلف ۱۲-۳ با استفاده از بافر استات سدیم - گلايسین- فسفات ۵۰ میلی مولار تهیه شد. همچنین برای تعیین اثر دما روی فعالیت پروتئاز دماهای مختلف (۲۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس) مورد آزمایش قرار گرفت. بقیه مراحل کار همانند روش کار توضیح داده شده در بند تعیین فعالیت پروتئازی انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت تریپسین

سنجش فعالیت آنزیم تریپسین مطابق روش Erlanger *et al.* (1961) انجام شد. در این روش از BApNA (N- α - بنزویل - DL- آرژینین پارانیتروآنیلید) به عنوان سوپسترا استفاده شد. این سوپسترا در دی متیل سولفاکساید (DMSO) حل و سپس با بافر تریس ۰/۰۵ مولار رقیق شد. یک واحد فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین (U) برابر است با یک میکرومول پارانیتروآنیلین که در مدت یک دقیقه و به ازای یک میلی گرم پروتئین محلول در دمای ۲۵ درجه سلسیوس آزاد می‌شود. برای اندازه‌گیری فعالیت تریپسین، ۱۰ میکرولیتر آنزیم با ۸۵ میکرولیتر بافر تریس ۲۵ میلی مولار در pH بهینه و ۵ میکرولیتر سوپسترای BApNA مخلوط شد و تغییرات جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر به صورت پیوسته و در بازه زمانی ۶ دقیقه خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم تریپسین از طریق فرمول زیر محاسبه و بر حسب میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

$$\text{میزان پروتئین (mg/ml)} \times \text{زمان واکنش (min)} \times \text{ضریب خاموشی} = \frac{\text{حجم واکنش (ml)} \times 1000 \times \text{میزان جذب در 405 نانومتر}}{\text{فعالیت ویژه آنزیم}}$$

اندازه‌گیری فعالیت کیموتریپسین

برای سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین از روش Hummel (1959) استفاده گردید. در این روش از BTEE (N-بنزویل - L- تیروزین - اتیل استر) به عنوان سوبسترا استفاده شد. یک واحد فعالیت اختصاصی آنزیم کیموتریپسین (U) برابر است با یک میکرومول N-بنزویل - DL- تیروزین که در مدت یک دقیقه و به ازای یک میلی‌گرم پروتئین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس محلول آزاد می‌شود. برای اندازه‌گیری فعالیت کیموتریپسین، ۱۰ میکرولیتر آنزیم با ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترا به همراه ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس pH ۷/۸ مخلوط و تغییرات جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین با استفاده از فرمول ذکر شده جهت محاسبه میزان فعالیت آنزیم تریپسین بدست آمد.

اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت پروتئازی

اثر بازدارنده‌های EDTA (۲ میلی مولار)، یدواستات (۵ میلی مولار)، TLCK، TPCK و PMSF (۱ میلی مولار) روی فعالیت پروتئازی لوله گوارش بررسی شد. برای بررسی اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت پروتئازی، مقدار ۱۵ میکرولیتر آنزیم به همراه ۱۰ میکرولیتر از هر یک از بازدارنده‌ها و ۳۳ میکرولیتر بافر در pH بهینه به مدت ۱۰ دقیقه اینکوبه شد. سپس ۱۷ میکرولیتر سوبسترای آزوکازین ۱٪ به هر یک از میکروتیوب‌ها اضافه و نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در بن ماری قرار داده شد. بعد از آن ۵۰ میکرولیتر TCA ۳۰٪ برای توقف واکنش به نمونه‌ها اضافه گردید. بقیه مراحل همانند روش تعیین فعالیت پروتئازی انجام شد.

آنالیز زایموگرام پروتئازی

برای این منظور از SDS PAGE طبق روش Davis (1964) استفاده گردید. از پلی اکریل آمید ۱۲/۵٪ برای ژل جداکننده و ۵٪ برای ژل متراکم کننده استفاده شد. برای مشاهده فعالیت پروتئازی روی ژل مقدار ۲۰ میکرولیتر از آنزیم همراه با ۵ میکرولیتر بافر نمونه بعد از مخلوط کردن به داخل چاهک بارگذاری شد. همچنین در بررسی اثر بازدارنده‌ها آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه با بازدارنده‌ها اینکوبه شد. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل به درون ظرف حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول تریتون ۲/۵ درصد در بافر فسفات (pH ۸) منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه ژل در این محلول تکان داده شد (این عمل ۲ بار تکرار شد). سپس ژل را چندین بار با بافر فسفات شستشو داده و ۱۰۰ میلی لیتر محلول کازین ۱ درصد روی ژل ریخته شد و ژل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر قرار گرفت. بعد از این مرحله ژل با آب مقطر شستشو و ۱۰۰ میلی لیتر محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو به آن اضافه شد و به مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر قرار گرفت. سپس داخل محلول رنگ بر قرار داده شد و عمل رنگ بری به مدت ۴۵ دقیقه تا ۲ ساعت ادامه یافت تا زمانی که باندهای پروتئازی به رنگ روشن در زمینه آبی رنگ ژل نمایان شوند.

اندازه‌گیری پروتئین موجود در نمونه‌های آنزیمی

اندازه‌گیری پروتئین با استفاده از روش Bradford (1971) انجام و از آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد صورت گرفت. رسم نمودارها و مرتب کردن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ صورت گرفت.

نتایج و بحث

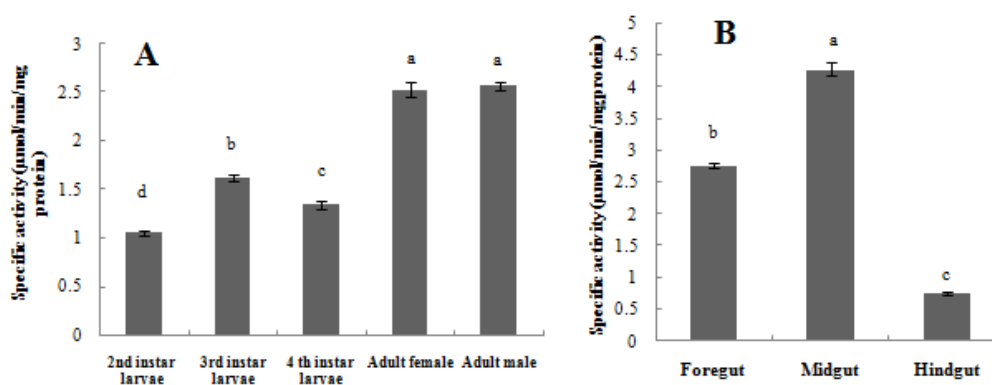
فعالیت پروتئازی کل

فعالیت پروتئاز در لوله گوارش لاروهای سنین ۲، ۳ و ۴، حشرات کامل نر و ماده و قسمت‌های مختلف لوله گوارش با استفاده از سوبسترای آزوکازئین اندازه‌گیری شد. همان طوری که در شکل ۲ (A) و (B) مشاهده می‌شود میزان فعالیت پروتئاز در سنین مختلف لاروی *E. chrysolina* تفاوت دارد. میزان فعالیت ویژه این آنزیم در سن دو کم‌تر و در سن سوم بیش‌تر از دو سن دیگر می‌باشد. همچنین بیش‌ترین فعالیت این آنزیم در لاروهای سن ۳ مشاهده شد. این وضعیت را می‌توان با میزان زیاد تغذیه و تحرک این مرحله لاروی نسبت به سنین دیگر توجیه نمود. (Christopher & Mathavan, 1985) 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. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت پروتئاز در حشرات کامل نر و ماده بیش‌تر از فعالیت آن در مراحل لاروی است. (Patankar et al., 2001) فعالیت آنزیم پروتئاز را در سنین مختلف لاروی (*Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidopeta:Noctuidae) بررسی و مشاهده کردند که فعالیت پروتئولیتیک از لارو سن یک به طور مداوم تا سن پنجم افزایش یافت ولی در سن ششم کاهش پیدا کرد. بیش‌ترین میزان فعالیت پروتئولیتیک در لارو سن پنجم و کم‌ترین میزان آن در سن یک و شش مشاهده شد. این کاهش فعالیت ممکن است در نتیجه تجزیه بیش‌تر یا سنتز کم‌تر پروتئازهای گوارشی به واسطه اینکه لاروها در زمان نزدیک شدن به مرحله شفیرگی، غذای کمتری مصرف می‌کنند، بنا بر این کاهش در فعالیت‌های آنزیمی می‌تواند با برخی تغییرات آناتومیکی و فیزیولوژیکی در دستگاه گوارش لاروها مرتبط باشد (Alarcon et al., 2002). نتایج مشابهی روی سرخرطومی *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier به دست آمد (Alarcon et al., 2002). در این تحقیق فعالیت آنزیم پروتئاز در حشرات نر و ماده اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. همچنین مقدار فعالیت ویژه پروتئاز در قسمت میانی لوله گوارش به ترتیب ۱/۵ و ۶۰ برابر فعالیت آن در قسمت‌های جلویی و عقبی لوله گوارش بدست آمد که نشان می‌دهد فعالیت این آنزیم در قسمت میانی دستگاه گوارش بیش‌تر از قسمت جلویی و عقبی آن می‌باشد. الگوهای مشابهی از فعالیت پروتئازهای گوارشی در طول مراحل لاروی بال‌پولکداران (Broadway & Duffey, 1985) و گروه‌های دیگری از بندپایان مانند سخت‌پوستان (Lemos et al., 1991) گزارش شده است. در این تحقیق مقدار فعالیت ویژه تریپسین و کیموتریپسین با استفاده از سوبسترای اختصاصی اندازه‌گیری و فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در لوله گوارشی این حشره به ترتیب ۰/۱۴ و ۰/۳۶۷ میکرومول/دقیقه/میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

اثر pH بر فعالیت پروتئازی

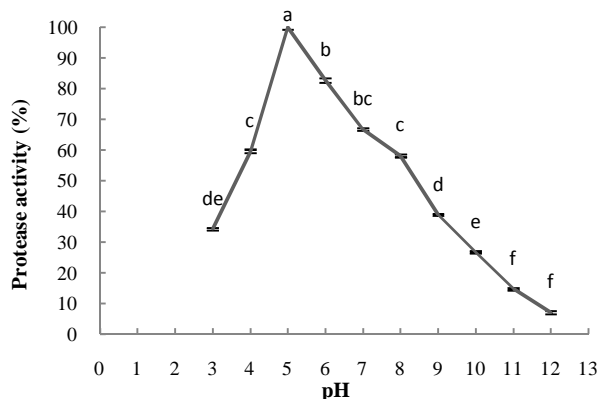
در این آزمایش pH بهینه برای بیشینه فعالیت پروتئازی در لوله گوارش ۵ به دست آمد. با توجه به (شکل ۳) مقدار فعالیت این آنزیم در ۳ pH، ۳۷٪ بود و با افزایش pH میزان فعالیت آن نیز افزایش یافت تا به مقدار

بیشینه خود در pH ۵ رسید. سپس با افزایش pH میزان فعالیت آن به تدریج کاسته شد و در pH ۱۲ به کم‌ترین میزان خود (حدود ۸٪) رسید. مقدار pH 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 pH معده حشره در برخی گونه‌ها هم‌خوانی داشته و تحت تأثیر فاکتورهای نظیر غذا، pH غذا و جمعیت میکروارگانیسم‌های معده می‌باشد (Dow, 1986). مقدار pH بهینه برای بیشتر پروتئازهای روده به موقعیت فیلوژنتیکی گونه مربوط است (Zang et al., 2002). در این تحقیق pH بهینه فعالیت پروتئازی در کفشدوزک خربزه در محدوده pH اسیدی (pH ۵) به دست آمد که محدوده فعالیت آنزیم سیستمین پروتئینازها می‌باشد. مطابق با نتایج ما، pH مناسب برای فعالیت آنزیم پروتئاز در سوسک برگ‌خوار نارون *X. luteola* حدود ۳ تا ۶ به دست آمد که نشان‌دهنده وجود آنزیم پروتئاز سیستمین است (Tatli et al., 2010). pH بهینه فعالیت آنزیم پروتئاز در سوسک *Zabrotes subfasciatus* Boheman برابر با ۵/۵، و پروتئاز غالب در دستگاه گوارش این حشره، سیستمین پروتئازها گزارش شد (Lemos et al., 1990). همچنین pH بهینه فعالیت پروتئاز در شپشه قرمز آرد *T. castaneum* ۴/۲ بدست آمد که در محدوده فعالیت سیستمین پروتئازها می‌باشد (Oppert et al., 2003). طی تحقیقات (Fabrick et al., 2002) pH بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز در سوسک ریشه ذرت *Diabrotica undecimpunctata* howardi (Col.,: Chrysomelidae) در محدوده pH بین ۵-۶ بدست آمد و وجود سیستمین و سرین پروتئازها در روده میانی این سوسک گزارش شدند. pH بهینه در چندین گونه از سخت‌بالپوشان در محدوده ۵-۷ گزارش شده است (Kuroda et al., 1996; Terra & Cristofolletti, 1996; Novilla et al., 1997) در سرخرطومی موز حضور سوبسترای آزوکازئین یافت شد (Montesdeoka et al., 2005).



شکل ۲- میانگین فعالیت ویژه پروتئازی (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در سنین مختلف لاروی و حشرات کامل نر و ماده (A) و سه قسمت لوله‌گوارش لاروسن سه کفشدوزک خربزه (B)

Fig. 2. Mean proteolytic specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) in the gut of the larval different instars and adults (A) and foregut, midgut and hindgut of *Epilachna chrysomelina* (B) Means followed by the different letters is differ significantly by Tukey's test ($P < 0.05$).

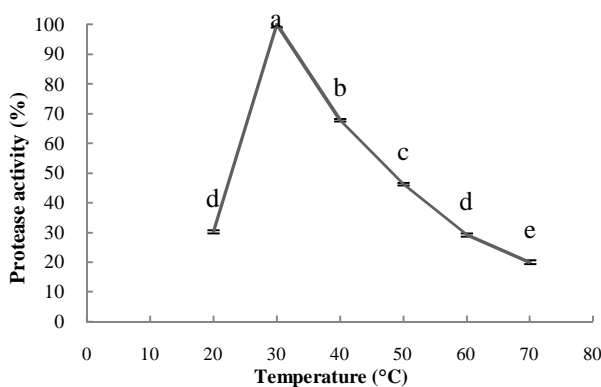


شکل ۳- اثر pH روی فعالیت پروتئازی لوله گوارش *Epilachna chrysolina*

Fig. 3. Effect of pH on the protease activity of gut extracts from *Epilachna chrysolina*. Different letters indicate that the activity of enzyme at different pH are significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

اثر دما بر فعالیت پروتئازی

دمای بهینه برای بیشینه فعالیت پروتئازی در لوله گوارش کفشدوزک خربزه ۳۰ درجه سلسیوس به دست آمد. نتایج تجزیه واریانس میانگین فعالیت نسبی این آنزیم در دماهای مختلف نشان می‌دهد که اختلاف دماهای مختلف روی فعالیت این آنزیم معنی‌دار می‌باشد. با توجه به شکل ۴ فعالیت آنزیم پروتئاز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس حدود ۳۰٪ می‌باشد که این میزان به شدت افزایش یافته تا به مقدار بیشینه خود در دمای ۳۰ درجه سلسیوس می‌رسد. سپس در دمای بالاتر فعالیت آنزیم به تدریج کاهش یافته تا اینکه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به کمتر از ۲۱٪ 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 (Boyd *et al.*, 2002). 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 سوستر، و افزایش آهسته دنا تورا سیون دمایی آنزیم‌ها می‌باشد (Bird & Hopkin, 1954). (Tatli *et al.* (2010). (Bird & Hopkin, 1954). برای فعالیت آنزیم پروتئاز سوسک برگ‌خوار نارون *X. luteola* را در حضور سوسترای آزوکازئین ۳۷ درجه سلسیوس به دست آوردند.

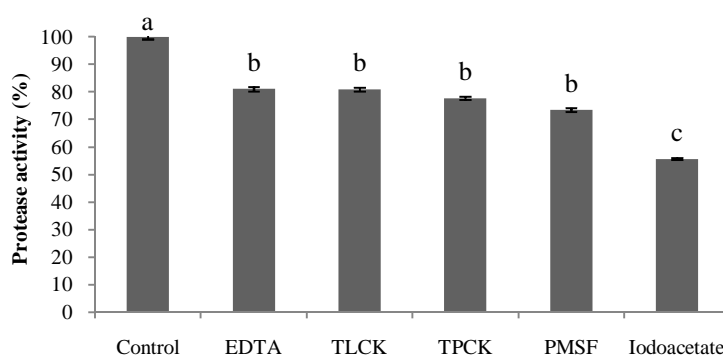


شکل ۴- اثر دما روی فعالیت پروتئازی لوله گوارش *Epilachna chrysolina*

Fig. 4. Effect of temperature on the protease activity of gut extract from *Epilachna chrysolina*. Different letters indicate that the activity of enzyme at different temperatures are significantly different by Tukey's test ($p < 0.05$).

اثر بازدارنده‌های اختصاصی روی فعالیت پروتئازی

در تحقیق حاضر برخی از مهمترین بازدارنده‌ها شامل PMSF (بازدارنده اختصاصی سرین پروتئازها)، TLCK (مهارکننده تریپسن)، TPCK (بازدارنده کیموتریپسین)، یدواستات (بازدارنده سیستئین پروتئاز) و EDTA (بازدارنده متالو پروتئازها) روی فعالیت پروتئازی لوله گوارش لارو کفشدوزک خربزه ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بازدارنده‌های EDTA، TLCK، TPCK، PMSF و یدواستات به ترتیب ۱۸/۹۳، ۱۹/۰۴، ۲۲/۲۷، ۲۶/۰۵ و ۴۴/۳۲ درصد فعالیت پروتئازی موجود در لوله گوارش را کاهش دادند (شکل ۵). بیش‌ترین اثر بازدارندگی روی فعالیت پروتئازی لوله گوارش کفشدوزک خربزه مربوط به بازدارنده یدواستات بود. بعد از آن، PMSF بیش‌ترین اثر بازدارندگی روی فعالیت پروتئازی نشان داد و سایر بازدارنده‌ها بازدارندگی قابل توجهی ایجاد نکردند. بر این اساس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که طیف وسیعی از پروتئازها در لوله گوارش کفشدوزک خربزه وجود دارد. با توجه به بیشترین درصد مهارکنندگی پروتئاز کل توسط بازدارنده یدواستات و نیز فعالیت در pH اسیدی (۵) که محدوده فعالیت آنزیم پروتئاز سیستئین است می‌توان نتیجه گرفت که قسمت اعظم فعالیت پروتئولیتیکی دستگاه گوارش لارو کفشدوزک خربزه مربوط به وجود این نوع از پروتئازها است. با این وجود مقدار کمی از فعالیت سرین پروتئازها و متالوپروتئازها هم در دستگاه گوارش حشره دیده می‌شود که نتایج اندازه‌گیری فعالیت تریپسین و کیموتریپسین تأیید کننده نتایج زایموگرام است. (Alarcon *et al.* (2002). بررسی اثر بازدارنده‌های پروتئاز روی سرخرطومی حنایی خرما *R. ferrugineus* نشان دادند که بازدارنده‌های سرین پروتئاز SBTI، OVO، PMSF و سایر بازدارنده‌های TPCK، TLCK، EDTA به ترتیب ۷۸٪، ۸۳٪، ۶۱٪، ۱۷/۷٪، ۲/۹٪ و ۳۹٪ فعالیت پروتئازی را کاهش می‌دهند. در بررسی اثر مهارکننده سیستئین پروتئاز استخراج شده از سویا (scN) گزارش شد که این بازدارنده تأثیر منفی روی رشد و نمو و فعالیت آنزیم پروتئاز در سوسک‌های *Callosobruchus maculatus* Fabricus (Col.: Chrysomelidae) دارد (Zhu-Sluzman, 2003).



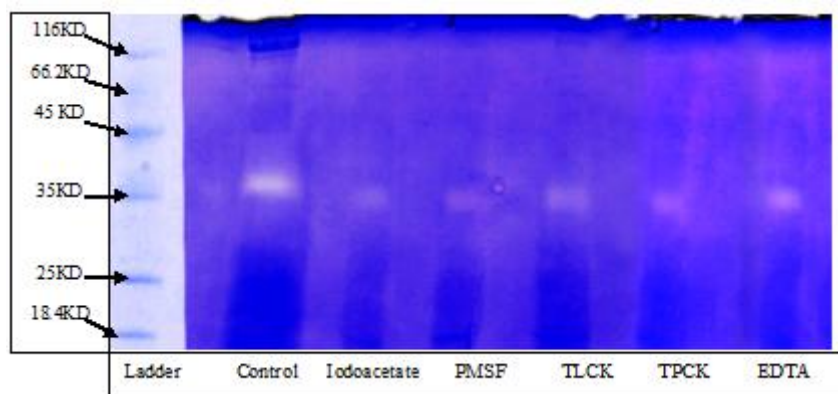
شکل ۵- اثر بازدارنده‌های اختصاصی روی فعالیت پروتئازی *Epilachna chrysomelina*

Fig. 5. Effect of proteinase inhibitors on the protease activity of gut extract from *Epilachna chrysomelina*. Means followed by the different letters is differ significantly by Tukey's test ($P < 0.05$).

فعالیت پروتئازهای گوارشی روی ژل الکتروفورز

نتایج حاصل از آنالیز زایموگرامی با استفاده از SDS-PAGE نشان می‌دهد که پروتئازهای گوارشی در لوله گوارش لاروهای *E. chrysomelina* وجود داشته و حداقل تعداد یک ایزوفرم از آنزیم‌های پروتئازی مشاهده

می‌شود (شکل ۶). این نتیجه تأیید کننده نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و اثر بازدارنده‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت پروتئازی، بازدارنده یدواستات بیش‌ترین درصد بازدارندگی را روی پروتئازهای این حشره داشته و روی ژل نیز منجر به کمرنگ شدن باند پروتئازی شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از باند ضخیم مشاهده شده روی ژل می‌تواند از نوع سیستئین پروتئاز باشد. *Tatli et al.* (2010) با استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی E-64، TPCK، TLCK، EDTA، PMSF و تقویت‌کننده‌ها مانند ال سیستئین در سوسک برگ‌خوار نارون *X. luteola* نشان دادند که قسمت بیش‌تر فعالیت پروتئولیتیکی دستگاه گوارش مربوط به آنزیم پروتئاز سیستئین است. اگر چه مقادیر کمی از فعالیت سایر پروتئازها مثل سرین پروتئازها هم در دستگاه گوارش این حشره دیده می‌شود.



شکل ۶- زایموگرام اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت پروتئازی *Epilachna chrysomelina*

Fig. 6. Zymogram of the effect of inhibitors on protease activity of gut extract from *Epilachna chrysomelina* larvae

در مجموع نتایج نشان داد که آنزیم گوارشی پروتئاز در لوله گوارش کفشدوزک *E. chrysomelina* وجود داشته و مناسب‌ترین pH برای فعالیت آن در محیط اسیدی (pH ۵) و مناسب‌ترین دما برای بیش‌ترین فعالیت آن ۳۰ درجه سلسیوس است. یک ایزوفرم از آنزیم فوق در لوله گوارش مشاهده شد و به نظر می‌رسد که سیستئین پروتئازها، پروتئازهای غالب لوله گوارش این حشره باشند. با توجه به اینکه امروزه آلودگی‌های ناشی از مصرف بی‌رویه سموم شیمیایی علیه آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز و عوارض زیان بار آن بر محیط زیست و موجودات غیر هدف، زندگی دشمنان طبیعی آفات و حتی انسان را مورد تهدید قرار داده، امید است اطلاعات حاصل در این تحقیق در مطالعات تکمیلی مانند اثر مهارکننده‌های گیاهی بر فعالیت پروتئازهای گوارشی آفت کفشدوزک خربزه مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

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

References

Alarcon, F.J., Martinez, T.F., Barranco, P., Cabello, T., Diaz, M. & Moyano, F.J. (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm

- weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 265–274.
- Bird, R. & Hopkin, R. H.** (1954) p-Amylolysis: Union of Enzyme and Substrate. *Biochemisry Journal* 57, 162–165.
- Boyd, D. W., Cohen, A. C. & 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.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Broadway, R. M., Duffey, S. S., Pearce, G. & Ryan, C. A.** (1986) **Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects.** *Entomologia Experimentalis et Applicata* 41, 33–38.
- Budatha, M., Meur, G. & Datta-Gupta, A.** (2008) Identification and characterization of midgut proteases in *Achaeta janata* and their implication. *Biotechnology Letters* 30, 305–310.
- Chougule, N. P., Doylea, E., Fitchesb E. & Gatehouse, J. A.** (2008) Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology* 54, 563–572.
- Christopher, M. S. M. & Mathavan, S.** (1985) Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale*. *Journal of Insect Physiology* 31, 217–221.
- Davis, B. J.** (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 12, 404–427.
- Dow J. A. T.** (1986) Insect midgut function. *Advances in Insect Physiology* 19, 187–329.
- Erlanger, B., Kokowsky N. & Cohen, W.** (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archive Biochemistry and Biophysics* 95, 271–278.
- Esmaili, M., Mirkarimi, A. & Azmayeshfard, P.** (2004) Agricultural entomology. 500 pp. Tehran University Press. [In Persian].
- Fabrick, J., Behnke, C., Czapla, T., Bala, K., Rao, A.G., Kramer, K.J. & Reeck, G.R.** (2002) Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern cornrootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 405–415.
- Garcia-Carreno, F. L., Dimes, L. E. & Haard, N.F.** (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous protease inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214, 61–69.
- Hummel, B. C. W.** (1959) A modified spectrophotometric determinations of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 1393–1399.
- Izadpanah, K.** (1989) Characterization of squash mosaic virus. *Journal of Plant Pathology* 25, 1–4. [In Persian].
- Kuroda, M., Ishimoto, M., Suzuki, K., Kondo, H., Abe, K., Kitamura, K. & Arai, S.** (1996) Oryzacystatins exhibits growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insects pest, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60, 209–212.
- Lemos, F. J. A. & Terra, W. R.** (1991) Properties and interacellular distribution of cathepsin D-like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochemistry* 21, 457–412.

- Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P. & Xavier-Filho, J.** (1990) Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56, 219–227.
- Leo, F. D., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R. & Ceci, L. R.** (2002) PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research* 30, 347–348.
- Montesdeoca, M., Lobo, M. G., Casañas, N., Carnero, A., Castañera P. & Ortego, F.** (2005) Partial characterization of the proteolytic enzymes in the gut of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on larval performance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 116, 227–236.
- Novillo, C., Castanera, P. & Ortego, F.** (1997) Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology* 36, 181–201.
- Oppert, B., Morgan, T. D., Hartzer, K., Lenarcic, B., Galesa, K., Brzin, J., Turk, V., Yoza, K., Ohtsubo, K. & Kramer, K. J.** (2003) Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 134, 481–490.
- Patankar, A. G., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Sainani, M. N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K. & Gupta, V. S.** (2001) Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 453–464.
- Ryan, C. A.** (1999) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28, 425–449.
- Shaheen, A. H., Elezz, A. A. & Assem, M. A.** (1973) Chemical control of cucurbits pests at Komombo. *Agricultural Research Review* 51 (1), 103–107.
- Tatli, A., Bandani, A. & Naghdi, M.** (2010) Study of the digestive protease in the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Col.,: Chrysomylidae). *Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress*, 9-12 Aug., Tehran, Iran, p. 300. [In Persian].
- Terra, W. R. & Cristofolletti, P. T.** (1996) Midgut proteases in three divergent species of Coleoptera. *Comparative Physiology and Biochemistry* 113B, 725–730.
- Zahedi, K.** (1993) Vegetable and ornamental plants pests in Iran and methods of control. University Press. 143pp. [In Persian].
- Zang, F., Zhu, Y. & Cohen, A. C.** (2002). Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus Hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 455–464.
- Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R. A., Shade R. E. & Ahn, J. E.** (2003) Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12, 135–145.