مهار آلفا- آمیلاز گوارشی سن‌معمولی‌گندم *Eurygaster integriceps* توسط بازدارنده‌های آنزیمی رقم‌های گندم اروند، بهرنگ و هیرمند

Inhibition of *Eurygaster Integriceps* Digestive α-Amylase by Enzyme Inhibitors of the Wheat Varieties; Arvand, Behrang and Hirmand

فاطمه عبدالاحدی[۱]، مجید کزازی[۲*] و توحید نجفی میرک[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۰۱

چکیده

سن‌معمولی‌گندم مهم‌ترین حشره آفت گندم و جو در ایران و بسیاری از کشورهاست. پروتئین‌های گیاهی مهارکننده آلفا- آمیلاز پتانسیل کاربرد بالایی در زمینه مهندسی ژنتیک و در مبحث مقاومت گیاهان در مقابل آفات دارا می‌باشند. در این تحقیق اثرات مهارکنندگی عصاره پروتئینی جدا شده از سه رقم گندم (رقم اروند و هیرمند از گندم نان) و (رقم بهرنگ از گندم دوروم) بر آلفا- آمیلاز گوارشی سن‌معمولی‌گندم مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور سن‌های بالغ تشریح شده و پس از جداسازی دستگاه گوارش، عصاره پروتئینی استخراج شد. پروتئین‌های بازدارنده سه رقم گندم هم استخراج شدند. بررسی تأثیر عصاره پروتئینی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز به دو روش سنجش آنزیمی و سنجش در ژل زایموگرام انجام شد. درصد مهارکنندگی آمیلازی برای رقم‌های هیرمند، بهرنگ و اروند به‌ترتیب، ۱/۰۵± ۳۰، ۲/۲۲± ۵۵ و ۱/۵± ۵۸ درصد به‌دست آمد. زیموگرام آنزیم آلفا- آمیلاز در حضور پروتئین‌های بازدارنده استخراج شده نشان داد که، باندهای فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در حضور پروتئین بازدارنده نسبت به شاهد (عدم حضور پروتئین بازدارنده) در رقم اروند و بهرنگ نسبت به رقم هیرمند فعالیت کمتری دارد که موید فعالیت مهارکنندگی بالا در رقم اروند و بهرنگ می‌باشد. همچنین فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز گوارشی۲/۸۵ U/mg protein به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: سن‌معمولی‌گندم، آلفا- آمیلاز، مهارکنندگی، عصاره پروتئینی

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۳. استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر استان البرز، کرج

*: نویسنده مسوول Email: mkazzazi@gmail.com

مقدمه

سن‌معمولی‌گندم *Eurgaster integriceps* puton (Hemiptera: Scutelleridae) آفت اصلی گندم و جو در مناطق وسیعی از شرق تا غرب آسیا، شمال آفریقا و شرق و جنوب اروپا به حساب می‌آید و آلودگی آفت در بعضی از مناطق، زمانی‌که هیچ روش کنترلی صورت نگیرد، باعث از بین رفتن ۱۰۰ درصد محصول می‌شود *پارکر* و همکاران (Parker *et al.*, 2002). به همین دلیل در حال حاضر سالانه بیش از یک میلیون هکتار از مزارع گندم کشور علیه این آفت سم‌پاشی می‌گردد که متضمن صرف هزینه هنگفتی برای دولت و کشاورزان می‌باشد. اگرچه استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی توانسته مقدار زیادی از صدمه این آفت به مزارع را کاهش دهد، ولی بروز مسائل زیست‌محیطی در ارتباط با کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی و از طرف دیگر ایجاد مقاومت علیه آفت‌کش‌های به‌کار گرفته شده موجب شده است که توجه به سایر روش‌های مبارزه غیرشیمیایی بیشتر گردد *ایسمن* (Isman, 2006). سن‌معمولی‌گندم در طول تغذیه با قطعات دهانی زننده- مکنده بزاق خود را که حاوی آنزیم‌های هضم‌کننده پروتئین می‌باشد از غدد بزاقی به داخل دانه تزریق می‌کند تا غذا را به فرم مایع درآورده و سپس این ترکیب غذایی را می‌مکد و ادامه فرآیند هضم در داخل لوله گوارش انجام می‌شود *بوید* و همکاران (Boyd *et al.*, 2002). یافتن ارقام مقاوم و یا محتمل به این آفت یکی از روش‌های مناسب و سازگار با محیط‌زیست برای محدود کردن جمعیت آفت می‌باشد *لارنس و کوندال* (Lawrence and Koundal, 2002). با توجه به این که سن‌معمولی‌گندم در محیط غذایی سرشار از کربوهیدرات زندگی می‌کند، آلفا- آمیلاز در متابولیسم این حشره نقش بسیار مهمی دارد، به‌طوری‌که این حشره نظر به اهمیت آن، چندین فرم از آن را سنتز می‌کند و در دستگاه گوارش خود به‌کار می‌برد *کزازی* و همکاران (Kazzazi *et al.*, 2005). آلفا- آمیلاز نشاسته و گلیکوژن را به مالتوز تبدیل می‌کند و در مرحله بعدی حشره با استفاده از گلوکزیدازهای خود عمل هضم را کامل می‌کند. در حشرات تنها آمیلاز می‌تواند زنجیره‌های بلند آلفا-۱ و ۴-گلوکان ازجمله نشاسته و گلیکوژن را هیدرولیز کند *ترا* و همکاران (Terra *et al.*, 1999). بازدارنده‌های پروتئینی آلفا- آمیلاز در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران دیده می‌شوند *سیواکومار* و همکاران (Sivakumar *et al.*, 2006). بازدارنده‌های آلفا- آمیلاز به‌طور عمده در حبوبات، گندم، چاودار و ذرت شناخته شده‌اند *فرانکو* و همکاران؛ *دیاس- مندوزا* و همکاران (Franco *et al.*, 2005; Diaz-Mendoza *et al.*, 2003). که به‌عنوان فاکتور مقاومت در برابر حشرات آفت از آن‌ها یاد می‌شود ویژگی بازدارندگی یک گام اصلی و مهم در کشف مولکول‌هایی است که می‌توانند برای تولید گیاهان ترنس ژنتیک مقاوم به حشرات مفید واقع شوند *مرتن* و همکاران (Morton *et al.*, 2000). یک مهارکننده برای مؤثر بودن باید دو ویژگی مهم داشته باشد، اول این‌که مهارکننده بایستی در یک غلظت پایین و در اسیدیته‌های که در معده یا غدد بزاقی حشره یافت می‌شود، فعالیت آنزیم حشره را به میزان قابل توجهی مهار کند و ویژگی دیگر اینکه، مهارکننده باید در برابر حمله‌ی پروتئازهای معده و غدد بزاقی حشره مقاوم باشد *والنسیا* و همکاران (Valencia *et al.*, 2000). بنابراین هدف از مطالعه‌ی حاضر مطالعه بازدارندگی آنزیم آلفا- آمیلاز گوارشی سن‌معمولی‌گندم در دو رقم گندم نان و یک رقم گندم دوروم به نام‌های هیرمند، اروند و بهرنگ می‌باشد. مشخص شدن ارتباط آنزیم‌های گوارشی با میزبان می‌تواند در تعیین واریته‌های برتر از لحاظ مقاومت با این آفت مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری حشرات

تعداد ۳۰۰ عدد حشره بالغ سن‌معمولی‌گندم (نسل جدید)، در حال تغذیه از مزارع گندم شهرستان قهاوند، استان همدان جمع‌آوری‌گردید. نمونه‌های مزرعه پس از انتقال به آزمایشگاه تحت شرایط آزمایشگاهی در شرایط نوری (۱۶:۸ روشنایی به تاریکی)، دمای ۲+۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰+۵۶ درصد در ظرف محتوی خوشه‌های گندم تا زمان تشریح برای مدت محدود پرورش یافتند.

تهیه عصاره آنزیمی

استخراج پروتئین‌های بازدارنده از آرد گندم

نمونه‌های آنزیمی از معده حشرات بالغ براساس روش کوهن، (Cohen, 2000) با اندکی تغییر، تهیه شد. ابتدا حشره روی یخ بی‌حس شده، سپس معده آن‌ها در زیر استریومیکروسکوپ در محیط آب مقطر سرد جداسازی شده و هر ده عدد از آن‌ها در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری که حاوی یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر بودند قرار داده شدند. نرم کردن نمونه‌ها در هموژنایزر صورت گرفت. در نهایت نمونه‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس با دور g× ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ، و رونشین به‌عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد.

این عمل براساس روش بیکر و *ملو* و همکاران (Baker, 1983; Melo *et al.*, 1999) با اندکی تغییر صورت گرفت. بدین‌منظور مقدار ۵۰ گرم از آرد هر کدام از ارقام گندم در ۶۵ میلی‌لیتر بافر NaCl ۰/۱۵ M به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق در روی همزن به آرامی مخلوط، و در ادامه به‌مدت ۴۵ دقیقه و در دور g×۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به‌منظور حذف آنزیم‌های درون‌زاد به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس در بن‌ماری قرار داده شده و به‌منظور رسوب‌دهی پروتئین با سولفات‌آمونیوم ۲۵٪، ۴۵٪ و ۷۰٪ اشباع مخلوط گردید. لوله‌های آزمایش حاوی مخلوط پروتئین با سولفات-آمونیوم برای مدت ۳۰ دقیقه در دور g×۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. رسوبات حاصل در هر لوله آزمایش با دو میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به‌صورت سوسپانسیون درآمد و سپس به‌مدت ۲۴ ساعت درون بافر سیترات سدیم با pH= ۶/۵ در دمای چهار درجه سلسیوس دیالیز شد. لازم به توضیح است که هر ده ساعت، آب دو بار تخلیه و آب جدید جایگزین شد. پس از انجام دیالیز محتویات لوله دیالیز در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تخلیه و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با دور g×۱۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی شد به‌منظور به حداقل رساندن حجم نمونه‌ها و قابلیت نگهداری طولانی به‌مدت ۱۶ ساعت در دستگاه فریزر درایر قرار داده شد. در زمان استفاده پودر حاصل در دو میلی-لیتر بافر سیترات سدیم با pH= ۶/۵ حل گشته و بعد از سه دقیقه سانتریفیوژ، مایع رویی برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آمیلولیتیکی

فعالیت آلفا- آمیلاز با استفاده از روش *برنفلد*، (Bernfeld, 1955) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. در این آزمایش از دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) به‌عنوان معرف و از محلول یک درصد نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. واکنش در محیط بافر سیترات سدیم با pH= ۶/۵ در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انجام گرفت. بدین‌منظور میکروتیوب‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بافر، ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی و ۱۵ میکرولیتر سوبسترا به‌مدت ۳۰ دقیقه در آون قرار داده شده و سپس ۵۰ میکرولیتر معرف DNS به مجموعه اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. نمونه‌ها بعد از سرد شدن در دستگاه الایزا ریدر (EL-Reader 96X) قرار گرفته و در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شدند. در شاهد، سوبسترا بعد از DNS و قبل از حرارت وارد نمونه گردید. برای تعیین یک واحد فعالیت آلفا- آمیلاز نیاز به مقدار آنزیمی است که بتواند یک میلی‌مول مالتوز را در یک میلی‌لیتر، در مدت یک دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تولید نماید.

بررسی اثر مهارکنندگی بر فعالیت آلفا- آمیلاز

غلظت‌های مختلف از مهارکننده‌های استخراجی (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئین) به‌مدت ۲۰ دقیقه به محلول آنزیمی و بافر اضافه گشته و سپس فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از روش برنفلد اندازه‌گیری شد.

در شاهد، مهارکننده و سوبسترا بعد اضافه شدن DNS به مخلوط آزمایش اضافه شد.

تعیین اثرات دما و زمان در میزان مهارشدن فعالیت آمیلولیتیکی سن‌گندم توسط بازدارنده‌های استخراجی (اشباع ۲۵٪، ۴۵٪، ۷۰٪)از ارقام گندم

بررسی تأثیر دماهای مختلف بر فعالیت مهارکنندگی بازدارنده‌ها با کنار هم قرار گرفتن عصاره آنزیمی و مهارکننده‌های استخراجی در شرایط آزمایشگاهی کاملاً یکسان و روشی مشابه در دماهای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۸ درجه سلسیوس برای مدت ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ دقیقه انجام گردید.

اثر افزایش مقدار بازدارنده روی میزان درصد بازدارندگی (اشباع ۲۵٪، ۴۵٪، ۷۰٪)

در این آزمایش به‌منظور بررسی اثر مهارکنندگی، پنج غلظت مختلف شامل (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲) میکروگرم بر میلی‌لیتر از مهارکننده‌های هر رقم تهیه و در شرایط آزمایشگاهی کاملاً یکسان با روشی مشابه استفاده گردید.

سنجش مهارکنندگی به روش زیموگرام

زایموگرام فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از روش ژل الکتروفورز *لاملی* (Lammli, 1970) انجام شد. از پلی‌اکریلآمید ۱۰٪ به-عنوان ژل جداکننده و ۴٪ برای ژل متراکم‌کننده استفاده گردید. الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ برای دو ساعت انجام شد. پس از رسیدن رنگ به انتها، ژل از شیشه جدا شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول در آب دوبار تقطیر شسته شد. سپس برای مدت ۱/۵ ساعت در بافر Tris-HCl ۰/۰۲ مولار با pH= ۶/۵ قرار گرفت. در ادامه به‌مدت ۱/۵ ساعت درون محلول نشاسته ۱٪ گذاشته شد، در پایان ژل با آب مقطر شسته و به‌مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از محلول لوگول (۱/۳٪ I_2، ۳٪ KI) رنگ-آمیزی شد. محل‌های حاوی نشاسته به رنگ روشن و محل‌های فاقد نشاسته به رنگ تیره درآمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت. گروه‌بندی داده‌ها با استفاده از آزمون LSD بررسی شد. حروف نامشابه کوچک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند، هر عدد روی نمودار نشان‌دهنده میانگین سه داده و میله‌های کوچک عمودی معرف اشتباه معیار می‌باشد.

نتیجه و بحث

اندازه‌گیری میزان فعالیت آلفا- آمیلاز

در این تحقیق فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز در سن‌معمولی- گندم ۲/۸۵ U/mg protein به‌دست آمد.

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سن‌معمولی‌گندم توسط محققین مختلف اندازه‌گیری شده است. در تحقیقی که توسط *کزازی* و همکاران (2005) صورت گرفت، فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز در سن‌معمولی‌گندم ۱/۷۷ U/mg گزارش شده است. آن‌چه مسلم است سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در حشرات بسیار متنوع و در عین حال وابسته به رژیم غذایی آن‌ها است. به‌طوری‌که حشرات با رژیم غذایی غنی از نشاسته با افزایش قابل توجه در عملکرد این آنزیم روبه‌رو هستند. سن‌معمولی‌گندم به لحاظ تغذیه از گیاهان محدودی از خانواده گرامینه و غنی بودن این دانه‌ها از نشاسته، این حشره در معده و غدد بزاقی دارای سطوح بالایی از آنزیم آلفا آمیلاز می‌باشد. بالا بودن فعالیت این آنزیم، نه تنها اهمیت این حشره را در آسیب‌رسانی به گندم به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تولیدات کشاورزی نشان می‌دهد، بلکه می‌تواند در مطالعات فیزیولوژیکی نیز مورد استفاده قرار گیرد .

اثر مهارکننده آلفا- آمیلاز استخراج شده از ارقام گندم هیرمند وارونده (گندم نان) و بهرنگ از گندم دوروم بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز معده سن‌معمولی‌گندم (اشباع ۲۵٪، ۴۵٪، ۷۰٪)

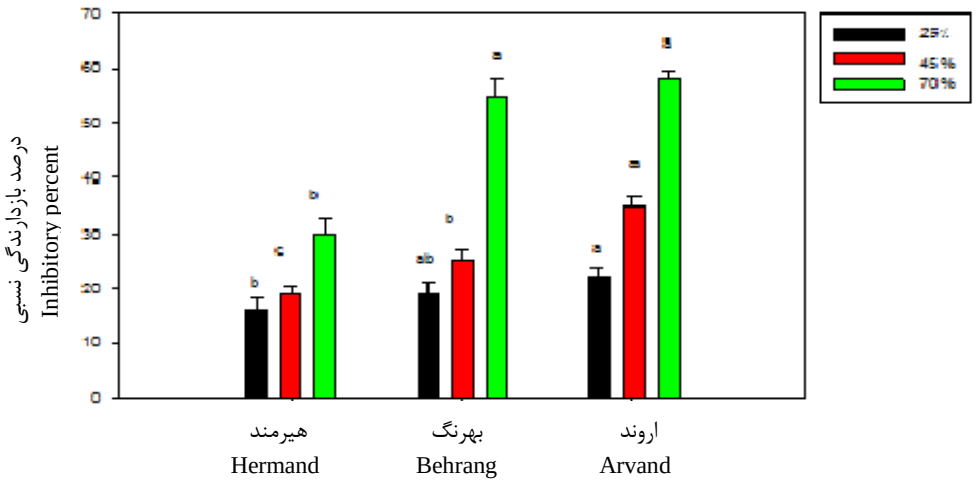
مهارکننده‌های استخراجی از ارقام گندم: هیرمند، بهرنگ وارونده به ترتیب در اشباع ۲۵٪ دارای ۱۶، ۱۹ و۲۲ درصد خاصیت بازدارندگی، در اشباع ۴۵٪، ۱۹، ۲۵ و۳۵ درصد و در اشباع ۷۰٪ دارای قدرت بازدارندگی چشم‌گیری به‌ترتیب به میزان ۳۰، ۵۵ و ۵۸ درصد بر فعالیت آمیلولیتیکی حشره سن- معمولی‌گندم بودند (شکل ۱).

بیشترین میزان بازدارندگی در هر سه اشباع برای رقم اروند و کمترین میزان بازدارندگی برای رقم هیرمند مشاهده شد. *صناعی و نجفی‌میرک* (Sanaey and Najafi Mirak, 2012) تحقیقی به‌منظور شناسایی منابع ژنتیکی مقاومت به پوره‌های سن روی ۷۹ رقم و لاین امید بخش گندم دوروم و نان انجام دادند، در تحقیق فوق‌الذکر گندم هیرمند با داشتن تراکم بالا سن بالغ نسل جدید و بالا بودن درصد سن‌زدگی دانه به‌عنوان رقم گندم نان حساس به پوره‌های سن‌معمولی‌گندم و رقم گندم اروند با تعداد دو و نیم عدد سن‌معمولی‌گندم در مترمربع و پایین بودن درصد سن‌زدگی دانه جزء رقم‌های مقاوم گندم نان گزارش شدند.

چنانچه ملاحظه می‌شود نتایج فوق با آن‌چه در این تحقیق آمده، همخوانی دارد و به نظر می‌رسد که یکی از مهم‌ترین عوامل مقاومت در رقم‌های گندم تأثیر بازدارنده‌های آنزیمی است.

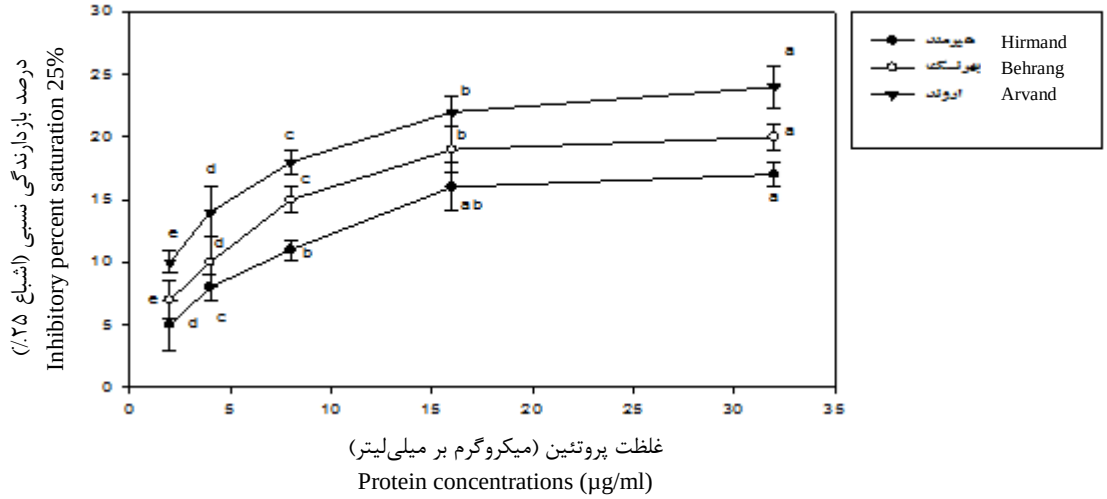
ارتباط درصد مهارکنندگی و غلظت‌های مختلف پروتئین مهارکننده (اشباع ۷۰٪، ۴۵٪، ۲۵٪) استخراجی از رقم- های گندم بهرنگ، اروند و هیرمند بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سن‌معمولی‌گندم

نتیجه به‌دست آمده همان‌طور که در شکل‌های (۲، ۳، ۴) مشاهده می‌کنید به این صورت بود که از غلظت ۲ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر با افزایش غلظت مهارکننده به محیط واکنش درصد مهارکنندگی افزایش می‌یابد. اما پس از آن درصد مهارکنندگی تقریباً ثابت می‌ماند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت بازدارنده، درصد فعالیت بازدارندگی تا جایی‌که همه سایت‌های فعال آنزیم بلوکه نشده باشند، افزایش یافته و سپس مقدار آن ثابت می‌ماند.



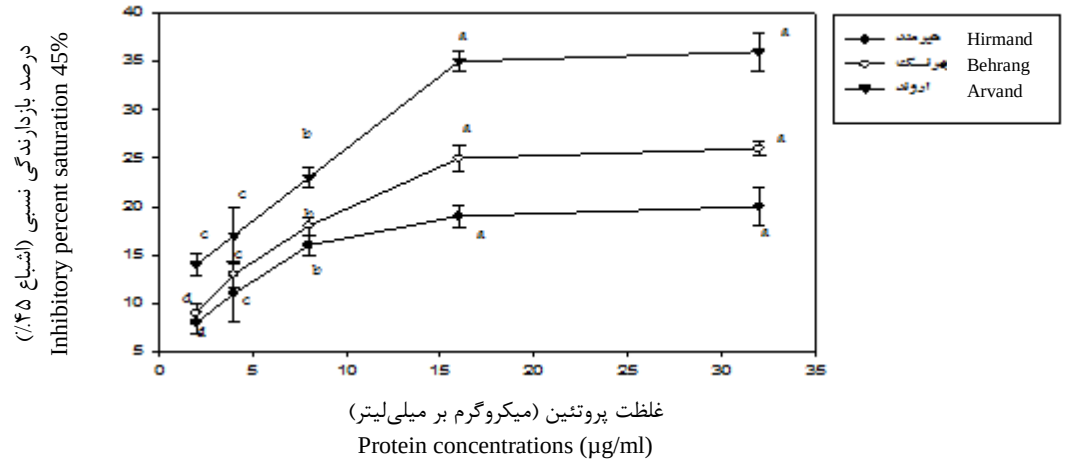
شکل ۱: تأثیر بازدارنده‌های رقم‌های گندم در میزان مهارکنندگی آلفا- آمیلاز سن معمولی گندم (اشباع ۲۵٪، ۴۵٪، ۷۰٪)

Fig. 1: The effect of wheat varieties extracts on the inhibition of the Sunn pest α-amylase activity (Saturation 25%, 45%, 70%)



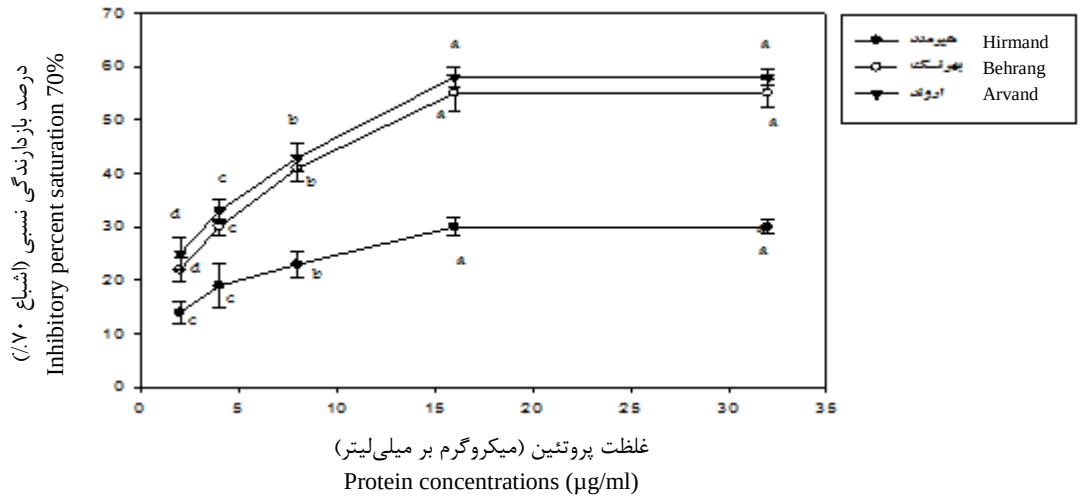
شکل ۲: غلظت‌های مختلف عصاره گندم بر میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا آمیلاز سن‌معمولی‌گندم در اشباع (۲۵٪)

Fig. 2: The effect of different concentrations of wheat extract on inhibition of Sunn pest α-amylase activity (Saturation 25%)



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف گندم بر میزان مهارکنندگی انزیم الفا امیلاز سن‌معمولی‌گندم اشباع (۴۵٪)

Fig. 3: The effect of different concentrations of wheat extract on inhibition of Sunn pest α-amylase activity (Saturation 45%)



شکل ۴: اثر غلظت‌های مختلف گندم بر میزان مهارکنندگی انزیم الفا امیلاز سن‌معمولی‌گندم اشباع (۷۰٪)

Fig. 4: The effect of different concentrations of wheat extract on inhibition of Sunn pest α-amylase activity (Saturation 70%)

یکی از عوامل مهم که بر سرعت انجام واکنش‌های شیمیایی تأثیر می‌گذارد، غلظت مواد دخیل در واکنش می‌باشد. در این بخش از آزمایش غلظت یکی از مواد دخالت‌کننده در واکنش که بازدارنده آلفا- آمیلاز استخراجی می‌باشد را افزایش داده‌ایم و چون در صورتی که غلظت مواد دخیل در واکنش بالا باشد، ممکن است تعداد مولکول‌هایی که انرژی کافی برای انجام واکنش دارند و هم تعداد دفعات برخورد آن‌ها افزایش یابد. به این ترتیب انجام واکنش با غلظت مولکول‌های واکنش‌کننده متناسب است .

باناکان و همکاران (Bannakan *et al.*, 2007) اثر بازدارنده آلفا- آمیلاز *Vingna radiata* (L.) را روی آلفا- آمیلاز سوسک، چهار نقطه‌ای حبوبات و همچنین *والنسیا* و همکاران (2000) که اثر بازدارنده لوبیا *Phaseolus vulgaris* (L.) را روی آنزیم آلفا- آمیلاز کرم دانه قهوه آزمایش کردند، دریافتند که با افزایش حجم بازدارنده به‌ترتیب درصد فعالیت بازدارندگی تا ۸۰ و ۱۰۰٪ افزایش می‌یابد.

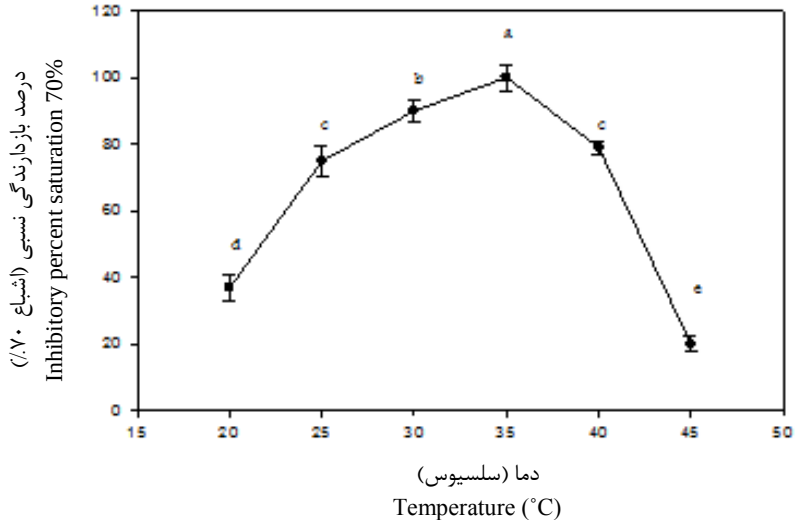
ورنیکو و همکاران (Veronique *et al.*, 1997) بازدارنده آلفا- آمیلاز *Ph. vulgaris* را روی آنزیم آلفا- آمیلاز پانکراس خوک آزمایش کردند، مقادیر متفاوتی از بازدارنده را در حضور آنزیم آلفا- آمیلاز قرار دادند، نتیجه به این گونه بود که با افزایش حجم بازدارنده درصد فعالیت بازدارندگی نیز افزایش یافت تا حجمی که مقدار بازدارنده دو برابر حجم آنزیم به کار رفته بود و پس از آن شیب خط ثابت شد. بنابراین دریافتند که نسبت آنزیم: بازدارنده از نسبت ۲:۱ تبعیت می‌کند.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مقدار کافی از پروتئین بازدارنده که بهترین میزان مهار آنزیم را داشته باشد بسته به نوع پروتئین بازدارنده، گیاه حاوی این ترکیب و گونه حشره و حتی در مورد ایزوزایم‌های مختلف یک آنزیم نیز متفاوت است.

تعیین اثرات دما در مهار شدن فعالیت پروتئولیتیک سن‌معمولی‌گندم توسط بازدارنده‌های استخراجی از ارقام گندم (اشباع ۷۰٪)

اثر دماهای مختلف بر مهار آلفا- آمیلاز سن معمولی‌گندم توسط مهارکننده‌های استخراجی از ارقام گندم نشان داد که دما نقش معناداری بر میزان بروز خاصیت مهارکنندگی دارد. در این محدوده دمایی ۳۵-۳۰ درجه سلسیوس هر دوی مهارکننده و آنزیم دارای بهینه فعالیت است (شکل ۵).

با افزایش دما، سرعت واکنش به دلیل افزایش حرکت مولکول‌ها افزایش می‌یابد این افزایش ممکن است تا دماهای بالا نیز ادامه یابد، اما اگر دما از حد معینی تجاوز کند اثر مخربی روی آنزیم داشته و موجب تغییر ماهیت آنزیم‌ها می‌گردد و آنزیم غیرفعال می‌شود. *کزازی* و همکاران (2005) نیز دمای بهینه را برای فعالیت آلفا- آمیلاز معده سن‌معمولی‌گندم ۳۵ درجه سلسیوس گزارش کردند و در مورد پایداری دمایی آلفا- آمیلاز، فعالیت این آنزیم را در ۴۰-۲۰ درجه سلسیوس قابل توجه دانستند.

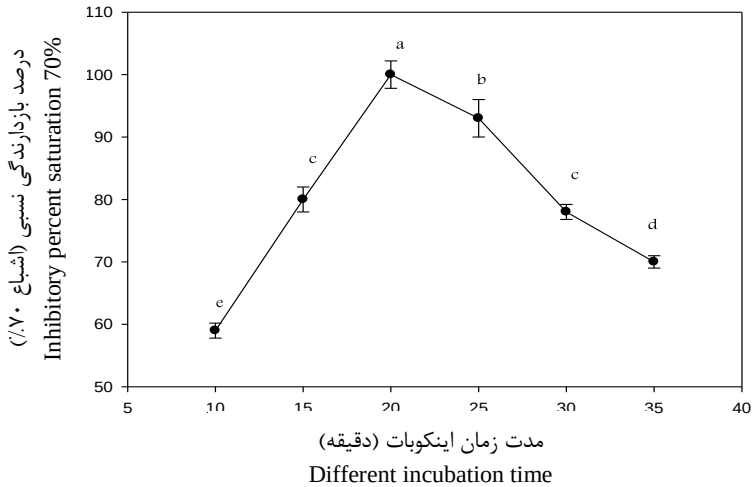


شکل ۵: اثر دماهای مختلف بر فعالیت مهارکنندگی روی آنزیم آلفا- آمیلاز سن‌معمولی‌گندم در اشباع ۷۰٪

Fig. 5: The effect of different temperatures on the inhibition of the Sunn pest α-amylase activity (Saturation 70%)

تأثیر مدت تماس مهارکننده آنزیم در میزان خاصیت مهارکنندگی آنزیم‌ها

نتاج نشان می‌دهد که بیشترین میزان مهارکنندگی پس از ۲۰ دقیقه از شروع انوکوبه شدن مهارکننده آنزیم صورت می‌گیرد (شکل ۶). می‌توان گفت در دقایق اولیه اینکوبات پروتئین‌های مهارکننده، آنزیم آلفا- آمیلاز سن-معمولی‌گندم را شناسایی کرده و بلوکه می‌کنند و از فعالیت این آنزیم جهت تجزیه و هضم سوبسترا (نشاسته یک درصد) ممانعت به عمل می‌آورند، و با گذشت زمان، از فعالیت پروتئین مهارکننده کاسته می‌شود. این نتایج مشابه با گزارشات سایر محققین این زمینه می‌باشد. به عنوان مثال *مارشال و لادا* (Marshall and Lauda, 1975)، ۷۰-۶۰٪ مهار شدن آمیلاز پانکراس خوک را پس از ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گزارش کردند. *لیبر-آنتون* و همکاران (LeBerre-Anton *et al.*, 1997) بیشترین میزان مهار آمیلاز پانکراس خوک توسط مهارکننده‌های لوبیا را پس از ۱۰ دقیقه گزارش کردند.



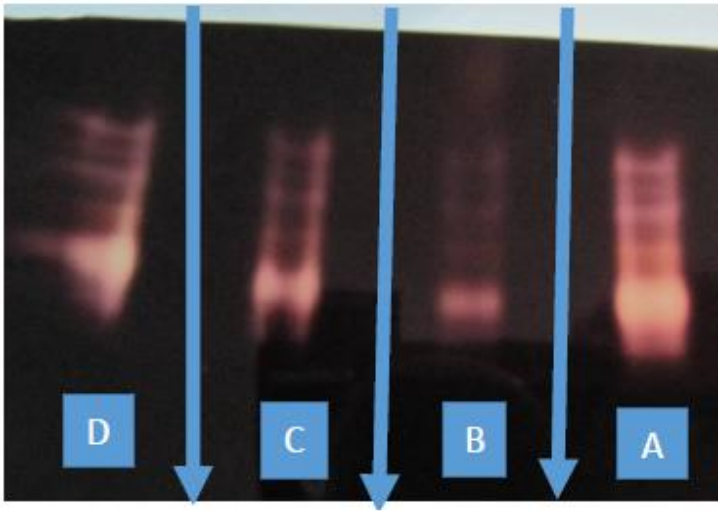
شکل ۶: تأثیر مدت زمان اینکوبات آنزیم– بازدارنده در میزان مهارکنندگی آلفا- آمیلاز سن‌معمولی‌گندم در اشباع ۷۰٪

Fig. 6: The effect of different incubation time on the inhibition of the Sunn pest α-amylase activity (Saturation 70%)

سنجش در ژل

همان‌طورکه در شکل۷ مشاهده می‌کنیم تعدادی ایزو آنزیم فعال دارای خاصیت آمیلولیتیکی در معده میانی سن‌معمولی-گندم مشاهده گردید. تعداد باندهای ایزوزایم می‌تواند سند قابل قبولی باشد که در همه درجات اشباع از سولفات‌آمونیوم (۲۵٪، ۴۵٪، ۷۰٪) مقداری واکنش فعالیت آنزیم را داریم. چنان‌چه از شکل مشخص می‌باشد بازدارنده استخراجی از رقم اروند بیشترین تأثیر را بر فعالیت آمیلولیتیکی کل عصاره روده میانی

داشته است. این درحالی است کـه عصـاره اسـتخراجی از رقـم هیرمند کمترین میزان بازدارندگی را برفعالیت آمیلولیتیکی کل عصاره روده میانی نشان می‌دهد. این نتایج داده‌هـای حاصـل از سنجش میزان بازدارندگی روی فعالیـت آمیلـولیتیکی را تأییـد می‌کند.



شکل ۷: بررسی اثر مهارکنندگی بازدارنده‌های استخراجی از ارقام گندم در اشباع ۷۰٪ بر روی آمیلاز گوارشی سن‌معمولی‌گندم. مهارکننده با عصاره آنزیمی به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند وسپس در ژل بارگذاری شدند. تیمار کنترل در سنجش آمیلاز گوارشی ستون اول از سمت راست می‌باشد، A: کنترل، B: اثر مهارکننده پروتئینی استخراج شده از گندم رقم اروند بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز، C: اثر مهارکننده پروتئینی استخراج شده از گندم رقم بهرنگ بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز، D: اثر مهارکننده پروتئینی استخراج شده از گندم رقم هیرمند بر فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

Fig. 7: In gel assay of the effect wheat varieties extracts on the of the Sunn pest α-amylase activity. The extracts were pre-incubated with enzyme for a twenty minutes, and then loaded in the gel. First column of the right hand side shows control. A-Control, B- The effect of Arvand extract on the inhibition of the Sunn pest α-amylase activity (saturation 70%), C- The effect of Behrang extract on the inhibition of the Sunn pest α-amylase activity (saturation 70%) D- The effect of Hirmand extract on the inhibition of the Sunn pest α-amylase activity (saturation 70%)

تولید بیش از یک ایزوآنزیم آمیلاز در سایر حشرات ازجملـه *Sitophilus zeamais* Most، *Callosobruchus maculates* F و *Acanthoscelides obtectus* Say نیـز مشـاهده شـده اسـت (بیکر، 1983؛ *فرانکو* و همکاران، 2005).

سیواکومار و همکاران (2006)، مهار شـدن آمـیلاز حشـرات *Plutella xylostella* (L.)، *Sitophilus oryzae* (L.)، *Callosobruch chinesis* (L.)، *Achaea Janata* (L.)، *Spodoptera litura* (F) و *Helicoverp armigera* را توسـط پـروتئین‌هـای مهارکننـده اسـتخراجی از سـه رقـم $LMCO_3$، $FMCO_{11}$ و $FMCO_{13}$ از غلات دانـه‌ریـز را مـورد بررسـی قـرار دادند بالاترین مهارکننـدگی ۶۹/۹۲ درصـد توسـط مهارکننـده اسـتخراجی از $LMCO_3$ روی آلفـا- آمـیلاز *Callosobruchus chinensis* و کمترین مهارکننـدگی نیـز ۸/۰۳ درصـد از همـان پروتئین مهارکننده در مقابل *Spodoptera litura* مشاهده شـد. در سـایر حـالات مهارکننـدگی بـین ۱۰ تـا ۵۰ درصـد نوسـان داشت.

بررسـی‌هـای *آلفونسـو* (Alfonso, 1997) نشـان داد کـه پروتئین‌های مهارکننده هتروتترامر استخراجی از گندم توانـایی مهـار آلفـا- آمـیلاز گوارشـی لاروسـن چهـارم *Spodoptora frugiperda* را دارد در حالی‌که مهارکننده‌های منـومر و دایمـر فعالیت مهارکنندگی کمتری نشـان دادنـد. ایـن نتـایج حاصـل آزمایشات و آنالیزهای تیپ‌های مختلف بازدارنده خالص شـده و تأثیر آن بر ایزوزایم‌های آنـزیم حشـره مـوردنظر بـا اسـتفاده از Native PAGE بوده است.

فعالیت آمیلولیتیکی عصاره روده میـانی سـن‌معمـولی‌گنـدم روی سوبسترای نشاسته نشان داد، که مقدار این آنـزیم در روده میانی قابل توجه می‌باشد. مهارکننده اسـتخراجی از رقـم اروند اثر مهارکنندگی قابل توجهی (۵۸٪) روی فعالیت آمیلـولیتیکی عصاره روده میانی داشـت. همچنـین در اثـر کـاربرد مهارکننـده استخراجی از رقم بهرنگ مهـار قابـل توجـه (۵۵٪) دیـده شـد. بیشترین فعالیت مهارکنندگی در محدوده دمایی ۳۵-۳۰ درجه سلسیوس بعـد از مـدت زمـان ۲۰ دقیقـه از اینکوبـات آنـزیم– بازدارنده مشاهده شـد. وجـود مکانیسـم‌هـای سـازگارکننده در

حشرات باعث شده است که بازدارنده‌های گیاهی دارای اثرات متفاوتی بر حشرات مختلف باشند که این عامل خود تحت تأثیر استرسی است که مهارکننده‌های پروتئازی در گیاهان، ایجاد می‌کنند. البته انتظار می‌رود که این گونه مکانیسم‌ها بیشتر در حشرات همه‌چیزخوار، به‌دلیل پاسخ بیشتری که به بازدارنده-های پروتئازی در گیاهان مختلف می‌دهند، وجود داشته باشد.

بنابراین یک مهارکننده واحد نمی‌تواند در برابر همه گیاه‌خواران استفاده شود و هم‌چنین ممکن است توانایی یک بازدارنده به دلیل تغییر در نسبت آنزیم‌های گوارشی در روده میانی کاهش یابد. بنابراین در مورد گیاهان تراریخت باژن کدکننده بیش از یک مهارکننده پروتئینی می‌توان نتایج بهتری در دفاع از گیاه در برابر حشرات گیاه‌خوار حاصل کرد *دورا* (Dorrah, 2004).

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱۱-۱۰ متن انگلیسی مراجعه شود.