جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 1, Spring 2010, p. 87-98

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ص ۹۸-۸۷

بررسی فعالیت آنزیمهای پروتئاز و آمیلاز در اووسیت و تخم سن سبز پسته *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera: Pentatomidae)

مهدیه بی غم[۱] - وحید حسینی نوه[۲*] - خلیل طالبی جهرمی[۳] - فاطمه حسینی نوه[۴]

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۲۲

چکیده

سن سبز پسته، *Brachynema germari*، یکی از مهمترین آفات پسته در کشورمان ایران می‌باشد که سالیانه باعث خسارت قابل توجهی به این محصول با ارزش می‌شود. امروزه به منظور کنترل حشرات زیان‌آور، از جمله سن سبز پسته، توجه به ویژگیهای فیزیولوژیک آنها از جمله مراحل رشد و نمو جنین وتخم به عنوان یک راهکار جهت تداخل در فرآیندهای حیاتی حشره از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. بدین منظور وجود دو گروه از آنزیمهای مهم، پروتئاز و آمیلاز، در اووسیت و تخم سن سبز پسته بررسی گردید. بیشینه فعالیت پروتئولیتیک کل تخم و اووسیت با استفاده از سوبسترای هموگلوبین در pH برابر با ۳ بدست آمد که نشان دهنده وجود سیستئین پروتئینازها می‌باشد. سوبستراهای ویژه سیستئین پروتئینازها، Z-Arg-Arg-pNA و Z-Phe-Arg-pNA، بخوبی توسط آنزیمهای موجود در تخم و اووسیت هیدرولیز گردید که به ترتیب نشان دهنده وجود سیستئین پروتئینازهای کاتپسین بی و کاتپسین ال در آنها می‌باشد. مهارکننده E-64 فعالیت سیستئین پروتئینازهای کاتپسین ال و کاتپسین بی را به ترتیب در تخم به میزان ۹۹/۸۵ و ۸۲/۱۴ درصد و در اووسیت به میزان ۶۳/۲۴ و ۷۴/۶۲ درصد کاهش داد. همچنین حضور سیستئین پروتئینازها، با افزایش فعالیت پروتئینازی عصاره آنزیمی تخم توسط فعال کننده DTT و افزایش فعالیت پروتئینازی عصاره آنزیمی اووسیت توسط فعال کننده ال- سیستئین روی سوبسترای ویژه کاتپسین ال و بی به ترتیب به میزان ۹۹/۴۱ و ۷۸/۵۷ در تخم و ۱۸۸/۲۳ و ۲۷/۷۱ در اووسیت به اثبات رسید. بر اساس این نتایج می‌توان وجود کاتپسین ال و کاتپسین بی را در تخم و اووسیت سن سبز پسته ثابت نمود. وجود آنزیم آلفا آمیلاز در تخم و اووسیت این حشره با استفاده از سوبسترای نشاسته مشخص گردید و pH بهینه برای فعالیت این آنزیم برابر با ۶ به دست آمد .

واژه‌های کلیدی: *Brachynema germari*، سیستئین پروتئیناز، کاتپسین بی، کاتپسین ال، آلفا آمیلاز

مقدمه

سن سبز پسته، *Brachynema germari* Kol، یکی از مهمترین سنهای زیان آور باغهای پسته در ایران و از آفات درجه یک پسته محسوب می‌شود. تغذیه سن سبز سبب بدشکلی وایجاد لکه‌های نکروز قهوه ای فرورفته روی مغز میوه می‌شود و مغز میوه‌های مورد تغذیه تلخ و بد مزه می‌شود. همچنین تغذیه سن ها از جنین در حال رشد سبب پوکی و اسفنجی شدن جنین می‌شود و کیفیت و بازار پسندی آنها کاهش می‌یابد. شایان ذکر است که در این مرحله سنهای پسته قادر به انتقال قارچ *Nematospora coryli* نیز بوده و بیماری ماسوی پسته را باعث می‌شوند (۱ و ۲). یکی از وقایع بیوشیمیایی مهم در رشد تخم و اووسیت در حشرات و از جمله سن سبز پسته استفاده از ترکیبات غذایی ذخیره شده در طی اووژنز[5] و ویتلوژنز[6] می‌باشد(۲۰). در واقع ویتلوژنین پیش ساز ویتلوس بود که در بافت چربی تولید شده به همولنف مادری رفته و در اووسیت به عنوان ویتلوس ذخیره می‌شود. ویتلوس به عنوان مهمترین و اصلی ترین ترکیب زرده در بندپایان بوده و در اثر تجزیه آنزیمی، آمینو اسیدهای ضروری و دیگر مواد مورد نیاز را برای جنین در حال رشد فراهم می‌گردد (۱۷، ۲۰ و ۲۹). نیازهای غذایی حشرات بویژه در مراحل رشدی آنها بسیار مهم است، در واقع توانایی استفاده از مواد غذایی در حشرات وابسته به وجود آنزیمهای مختلف از جمله آنزیمهای پروتئاز به منظور هضم پروتئینها و ایجاد اسیدهای آمینه در حشرات می‌باشد.

۱، ۲ و ۳ – به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(* – نویسنده مسئول: Email: vnaveh@ut.ac.ir)
۴- مربی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) ، رفسنجان

5- Oogenesis
6- Vitellogenesis

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آنزیم‌های مسئول هیدرولیز کامل پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه، پروتئازها هستند. پروتئازها شامل پروتئینازها و اگزوپپتیدازها می‌باشند. پروتئینازها براساس مکانیزیم کاتالیتیک با استفاده از معرف‌های ویژه یا تعیین اثر pH بر فعالیت آن‌ها به زیر رده‌های سرین پروتئینازها، سیستئین پروتئینازها، آسپارتیک پروتئینازها و متالوپروتئینازها تقسیم بندی می‌شوند. فعالیت بهینه سرین پروتئینازها در محیط قلیایی، سیستئین پروتئینازها در شرایط اسیدی، آسپارتیک پروتئینازها در pH کمتر از ۵ می‌باشد. متالوپروتئینازها برای فعالیت نیاز به یک یون فلزی در فرایند کاتالیز دارند (۲۸). اگزوپپتیدازها شامل آنزیم‌هایی هستند که یک اسید آمینه را از انتهای آمینی یا از انتهای کربوکسیلی زنجیره پپتیدی هیدرولیز می‌کنند. تعداد متنوعی از آنزیمهای پروتئولیتیک در تجزیه ویتلوس نقش دارند که گستره ای از اندوپپتیدازهای سرین(۱۱) تا اندوپپتیدازهای سیستئین مثل کاتپسین بی و ال (۱۵) را شامل می‌شود. رژیم غذایی کربوهیدراتی که توسط حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل نشاسته که توسط حشرات گیاهخوار بلعیده می‌شود وگلیکوژن که یک ترکیب کربوهیدراتی است و بوسیله حشرات گوشتخوار مورد تغذیه قرار می‌گیرد. معمولترین آنزیم هضم کربوهیدارتهادر حشرات آلفا آمیلاز است که روی مواد کربوهیدراتی خورده شده توسط حشره اثر می‌گذارد. وجود کربوهیدراتهای مورد نیاز برای رشد جنینی در حشرات و بندپایان مختلف توسط برخی پژوهشگران مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است (۱۴، ۱۶، ۲۳ و۲۴).

در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات، یکی از ابزارهای مهم، مقاومت گیاهان به آفات می‌باشد که با پیشرفت و استفاده از تکنیکهای مهندسی ژنتیک امکان همسانه سازی و قرار دادن ژنهای جدید و کارا در گیاهان برای ایجاد مقاومت در برابر آفات حشره ای فراهم آمده است (۲۵). استفاده از ارقام مقاوم و گیاهان تراریخته یکی از روشهای موثر کنترل آفات می‌باشد. ارقام مقاوم به طرق مختلف روی زندگی آفت و یا ارتباط متقابل گیاه- حشره تاثیر گذاشته و از شدت خسارت می‌کاهند. یکی از موارد بسیار حیاتی در این ارتباط تغذیه حشره از میزبان می‌باشد. غذایی که آفت دریافت می‌کند، می‌تواند این ارتباط را به شدت تحت تاثیر قرار دهد. می‌توان اظهار داشت که وارد کردن ژنهای بیان کننده مهار کننده‌های آنزیمی حشره به گیاه مورد نظر و بیان ژنهای مذکوردر گیاه باعث تولید مهار کننده ها در گیاه شده، در نتیجه طی تغذیه حشره این مهار کننده ها وارد بدن حشره شده و منجر به بلوکه کردن آنزیم‌های هیدرولیز کننده مواد مورد نیاز برای رشد جنین می‌شوند، بنابراین با استناد به مطالب گفته شده فرآیندهای تولید مثلی اووژنز و جنین زایی ممکن است دید جدیدی را برای استراتژیهای کنترل جمعیت آفات در اختیار ما قرار بدهد. از این رو مطالعه آنزیمهای هیدرولیز کننده مواد مغذی مورد نیاز برای رشد جنینی و شناسایی مهار کننده‌های آنزیمهای مذکور برای اتخاذ تصمیماتی در روشهای متنوع مبارزه و استفاده از تکنیکهای ملکولی مهندسی ژنتیک از جایگاه ارزشمندی برخوردار می‌باشد. در این تحقیق برخی ویژگیهای آنزیمهای پروتئاز و آمیلاز اووسیت و تخم سن سبز پسته، *Brachynema germari*، مورد بررسی قرار گرفته است که در نوع خود از اولین پژوهشهایی است که در ایران و روی این آفت مهم انجام می‌گیرد، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری سن سبز پسته

همزمان با خروج سن‌های سبز از محلهای زمستان‌گذرانی و شروع تغذیه روی میزبان‌های وحشی موجود در مناطق زمستان‌گذران داخل و اطراف باغ‌های پسته، حشرات کامل سن سبز پسته از روی گیاهان علفی میزبان، اسپند (*Peganum harmala*) وشورخاردار (*Salsola kali*)، و نیز درختان پسته از باغات اطراف شهرستان رفسنجان جمع‌آوری گردیدند.

جمع آوری تخمها و تشریح حشره به منظور جداسازی اووسیت ها

به منظور در اختیار داشتن تخمهای همسن، هر۲۴ ساعت آنها را جمع آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جدا کردن اووسیت ها از تخمدان حشرات ماده، پس از بی حس نمودن حشرات روی یخ، حشره درون آب مقطر سرد تشریح شد و با نمایان‌شدن تخمدانها در شکم حشره به کمک پنس به آرامی اووسیتها جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه عصاره آنزیمی از اووسیت و تخم سن سبز پسته

تخم و اووسیتهای خارج شده، درون آب مقطر سرد با یک هموژنایزر دستی شیشه‌ای بطور جداگانه هموژنایزشدند. با توجه به نیاز آزمایش، نمونه‌های هموژنایز شده، با سرعت g × ۱۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از این مرحله بخش رونشین نمونه‌ها به عنوان منبع آنزیمی در سنجشهای آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین فعالیت پرتئولیتیک با استفاده از سوبسترای عمومی هموگلوبین

سنجش فعالیت پروتئینازی کل با استفاده از سوبسترای هموگلوبین مطابق با روش کوهن (۵) با تغییرات جزئی انجام شد. مقدار۱۰۰ میکرولیتر محلول ۲۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر هموگلوبین به ۳۰۰ میکرولیتر بافر استات ـ فسفات ـ بورات سدیم (در pHهای ۲ تا ۱۲) اضافه شد. واکنش آنزیمی با افزودن ۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(تخم و اووسیت) آغاز و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه انجام شد. پپتیدهای آزاد شده حاصل از عمل پروتئینازها روی سوبسترای پروتئینی هموگلوبین با استفاده از معرف فولین–سیوکالتئو اندازه‌گیری شدند (۹).

تعیین فعالیت پروتئولیتیک ویژه با استفاده از سوبستراهای اختصاصی

بررسی وجود و میزان فعالیت اندوپروتئینازهای شبه تریپسین و شبه کیموتریپسین در عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته با استفاده از سوبستراهای تخصصی انجام شد. سوبستراهای BApNA[1] و SAAPFpNA[2] در غلظت نهائی یک میلی مولار به ترتیب برای تشخیص پروتئینازهای شبه تریپسین و شبه کیموتریپسین استفاده شدند. واکنش آنزیمی با اضافه کردن عصاره آنزیمی به محلول سوبسترا در حجم نهائی ۱۰۰میکرولیتر بافر با pH برابر با ۶ آغاز شد. مقدار فعالیت آنزیمی و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر که معرف مقدار پارانیتروآنیلین آزاد شده است، در زمان کل ۶۰ دقیقه ثبت شد.

سیستئین پروتئینازها

دو سوبسترای ویژه سیستئین پروتئینازها، Z-Arg-Arg-pNA[3] ویژه کاتپسین‌های بی و Z-Phe-Arg-pNA[4] ویژه کاتپسین ال به منظور ارزیابی وجود این گروه از اندوپپتیدازها در عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته مورد استفاده قرارگرفت. هیدرولیز غلظت نهائی ۰/۵ میلی مولار این سوبستراها با افزودن عصاره آنزیمی به محلول سوبسترا در حجم نهائی ۱۰۰ میکرولیتر بافر با pH برابر با ۶، در مدت کل۶۰ دقیقه، با اندازه‌گیری مقدار جذب پارانیتروآنیلین در طول موج ۴۰۵ نانومتر بدست آمد. فعالیت پروتئینازهای موجود در عصاره تخم و اووسیت در دامنه‌ای از pHهای اسیدی و قلیایی نیز تعیین شد.

اثر فعال‌کننده‌ها بر فعالیت پروتئولیتیک ویژه در تخم و اووسیت

اثر فعال‌کننده‌های ال ـ سیستئین و دی‌تیوترایتول در غلظت‌های نهایی یک میلی مولار نیز بر فعالیت پروتئولیتیک ویژه به منظور بررسی وجود سیستئین پروتئینازها به ترتیب در اووسیت و تخم بررسی شد. همچنین به منظور تعیین وجود سیستئین پروتئینازها در تخم و اوسیت سن سبز پسته، اثر مهارکننده اختصاصی E-64[5] در غلظت نهایی یک میکرو مولار بر فعالیت هیدرولیتیک پروتئینازهای موجود در عصاره بافتهای مذکور انجام گرفت. برای تعیین میزان اثر این ترکیبات بر فعالیت پروتئولیتیک از دو سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA و Z-Phe-Arg-pNA استفاده شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ در فواصل زمانی هر ۵ دقیقه یک بار در مدت تعیین شده، ثبت شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تخم و اووسیت و تعیین اثر pH بر فعالیت آن

فعالیت آلفا آمیلاز با استفاده از روش بیکر (۳) با اندکی تغییر سنجیده شد. واکنش در محیط بافر یونیورسال در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با افزودن عصاره آنزیمی تخم یا اووسیت و نشاسته به عنوان سوبسترا، به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن ماری انجام شد. سپس معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید به مجموعه اضافه و برای مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. در این آزمایش از تمام ترکیبات مورد آزمایش به غیر از آنزیم به عنوان بلانک استفاده شد. با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر(Elx ۸۰۸) جذب محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین به منظور بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، محلول آنزیمی در pH های مختلف (۲ تا ۹) توسط بافر یونیورسال تحت تاثیر قرار گرفت.

تجزیه داده ها

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزارهای Statgraphics و Sigmaplot انجام شد. میانگین داده ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تعیین فعالیت پرتئولیتیک تخم و اووسیت

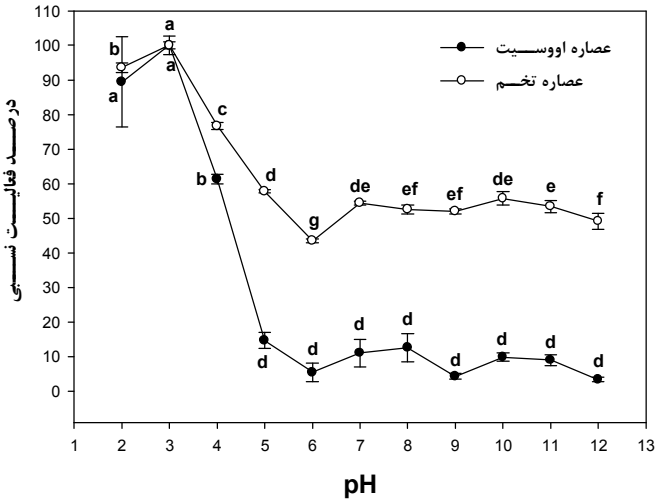
تعیین فعالیت پروتئولیتیک عصاره تخم و اووسیت با استفاده از هموگلوبین در دامنه ای از pH (pHهای ۲ تا ۱۲) انجام شد. این سوبسترا در دامنه ای از pH اسیدی و pHهای قلیائی هیدرولیز می‌گردد، که فعالیت پروتئولیتیک در pHهای مذکور قابل توجه است و بیشینه آن در pH برابر با ۳ مشاهده می‌شود (نمودار۱). مقدار pH بهینه اسیدی، نشان دهنده وجود سیستئین پروتئینازها به عنوان پروتئینازهای غالب در تخم و اووسیت سن سبز پسته می‌باشند.

1- Nα-Benzoyl-L–arginine-*p*-nitroanilide
2-N-Succinyl-alanine-alanine-prolin-phenylalanine-*p*-nitroanilide
3- Carbobenzoxy-L-arginine-L-arginine-*p*-nitroanilide
4- Carbobenzoxy- L-phenylalanin-L-arginine-*p*-nitroanilide
5-L-3-Trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidion)-butane

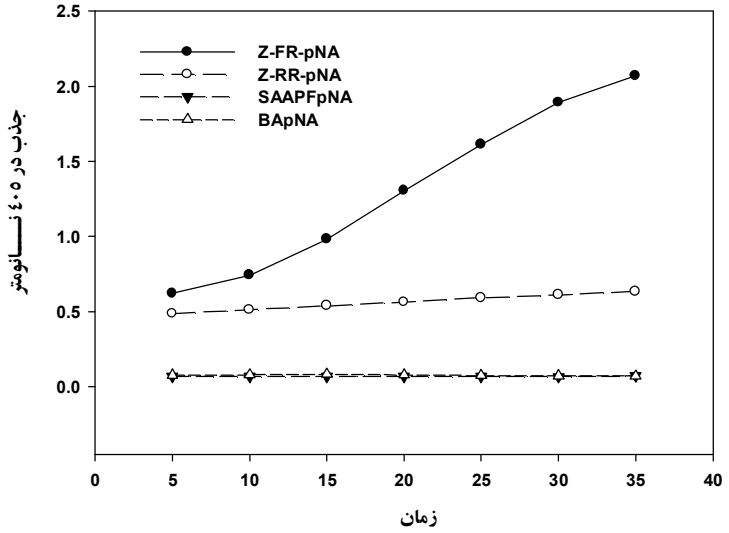
فعالیت در pHهای پایین ممکن است مربوط به وجود کاتپسین‌دی باشد. کاتپسین‌دی پروتئاز اصلی و مهم در تجزیه پروتئین‌های تخم، در طی رشد جنینی در سن خونخوار *Rhodnius prolixus* می‌باشد. همچنین فعالیت کاتپسین‌دی در تخم توسط مهارکننده آسپارتیک پروتئازها، پپستاتین، مهار شد. این نتایج نشان داد که کاتپسین‌دی در تجزیه پروتئینهای تخم در حشرات نقش دارند (۸). عصاره آنزیمی تخم شب پره مدیترانه ای آرد، *Anagasta kuehiella*، نیز مورد بررسی قرار گرفته است و pHهای اپتیموم ۹/۶،۵/۴،۹/۵ در طی رشد جنینی آشکار شد. فعالیت در pHهای پایین دلیلی بر وجود کاتپسین ها و فعالیت در pHهای بالاتر دلیلی بر وجود و فعالیت تریپیسن می‌باشد(۱۳).

تعیین فعالیت پروتئولیتیک ویژه تخم و اووسیت با استفاده از سوبسترای اختصاصی

فعالیت پروتئولیتیک عصاره تخم و اووسیت با استفاده از سوبستراهای اختصاصی سرین پرتئینازها،BApNA و SAAPFpNA، و سیستئین پرتئینازها، Z-Arg-Arg-pNA و Z-Phe-Arg-pNA، مورد بررسی قرارگرفت. در نمودارهای۲ و۳ فعالیت هیدرولیتیکی عصاره تخم و اووسیت روی دو سوبسترا نشان داده شده است.



(نمودار۱)- اثر pHهای مختلف روی فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته

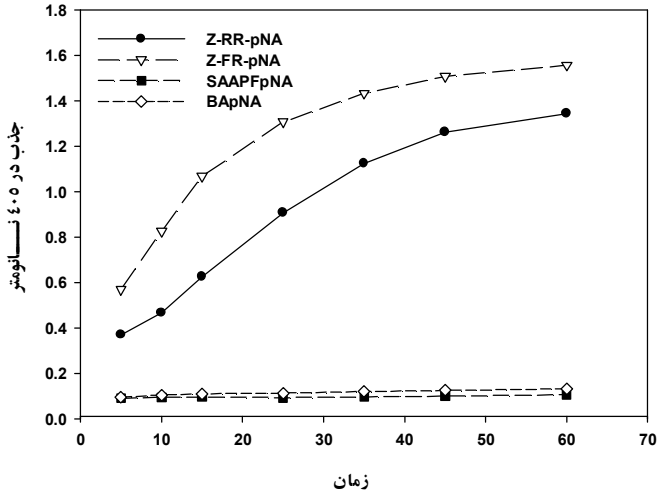


(نمودار۲)- فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز پسته روی سوبستراهای ویژه پروتئینازی

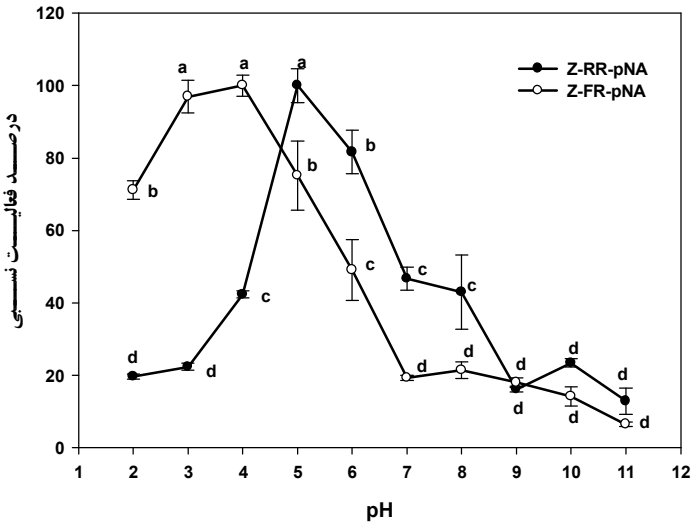
همانگونه که مشخص است سرعت اولیه فعالیت آنزیمی روی چهار سوبسترا متفاوت است. در تخم بیشترین سرعت هیدرولیز توسط عصاره آنزیمی روی سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۵۱ تغییر جذب در دقیقه) و مقداری کمی روی سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۰۴ تغییر جذب در دقیقه) مشاهده شد. فعالیت قابل توجهی با استفاده از دوسوبسترای سرین پروتئینازها بدست نیامد. بر اساس نتایج می‌توان بیان کرد که فعالیت هیدرولیتیک روی سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA (سوبسترای ویژه کاتپسین – ال) بیشتر از فعالیت هیدرولیتیک روی سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA (سوبسترای ویژه کاتپسین–بی) می‌باشد. پس می‌توان اظهار داشت که کاتپسین– ال سیستئین پروتئینازغالب در تخم سن سبز پسته می‌باشد. همچنین در اووسیت نیزسرعت هیدرولیز توسط عصاره آنزیمی روی سوبسترای Z-Arg-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۱۹ تغییر جذب در دقیقه) و روی سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA با سرعت اولیه (۰/۰۱۷ تغییر جذب در دقیقه) مشاهده شد. در عصاره اووسیت نیز فعالیت قابل توجهی با استفاده از دوسوبسترای سرین پروتئینازها بدست نیامد. پس می‌توان اظهار داشت که کاتپسینها پروتئینازهای غالب در اووسیت سن سبز پسته می‌باشد.

در نمودار ۴ و۵ فعالیت سیستئین پروتئینازی عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته در pHهای مختلف با اندازه گیری میزان هیدرولیز سوبستراهای تخصصی Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA نشان داده شده است. هیدرولیز سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA در عصاره تخم در دامنه وسیعی از pH اسیدی (۲ تا ۸) قابل توجه می‌باشد که نشان دهنده وجود سیستئین پروتئینازها به ویژه کاتیسین ال می‌باشد. بیشینه فعالیت پروتئولیتیک با استفاده از سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA به ترتیب در pH برابر با ۴ و ۵ مشاهده می‌شود. در pHهای خیلی قلیایی (pH برابر ۹) فعالیت پروتئولیتیک بسیار کم و تقریباً حدود ۲۰ درصد فعالیت بیشینه می‌باشد (نمودار ۴). هیدرولیز سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA در عصاره اووسیت در بازه وسیعی از pH اسیدی (۲ تا ۷) قابل توجه می‌باشد. بنابراین مشخص شد که pH بهینه برای فعالیت آنزیم هایی که روی سوبسترای Z-Phe-Arg- pNA و Z-Arg-Arg- pNA اثر می‌گذارند به ترتیب حدود ۳ و ۵ می‌باشد (نمودار۵).

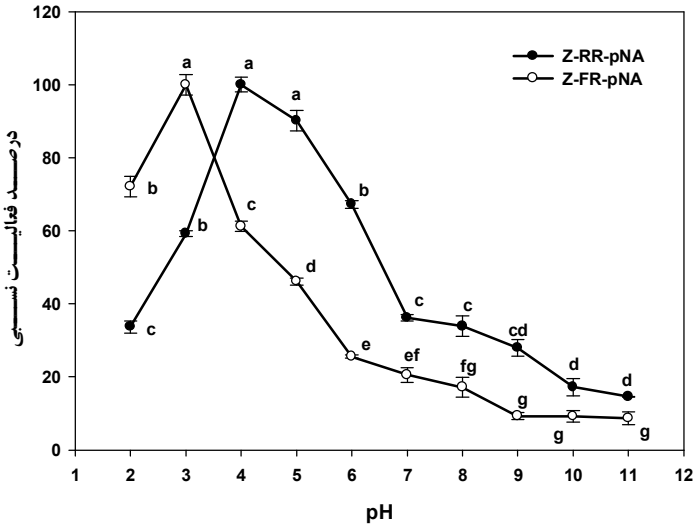
اسید آمینه ال– سیستئین و DTT به عنوان ترکیبات احیاکننده و فعال‌کننده سیستئین پروتئینازها اثر افزایشی در فعالیت پروتئولیتیک کل نشان دادند که تایید کننده وجود سیستئین پروتینازها در عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته می‌باشد. دراین سنجش از دو سوبسترای تخصصی Z-Phe-Arg-pNA (سوبسترای کاتپسین – ال) و Z-Arg-Arg-pNA (سوبسترای کاپتیسین–بی) استفاده شد. فعال کننده ویژه سیستنین پروتئینازها، DTT اثر فعال کنندگی قابل توجهی روی فعالیت هیدرولیتیک سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA توسط عصاره تخم نشان داد که بیان کننده وجود سیستئین پروتئینازها مخصوصاً کاتپسین ال می‌باشد (جدول ۱).



(نمودار۳)- فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت سن سبز پسته روی سوبستراهای ویژه پروتئینازی



(نمودار٤)- فعالیت پروتئینازی عصاره تخم سن سبز پسته در pHهای مختلف



(نمودار٥)- فعالیت پروتئینازی عصاره اووسیت سن سبز پسته در pHهای مختلف

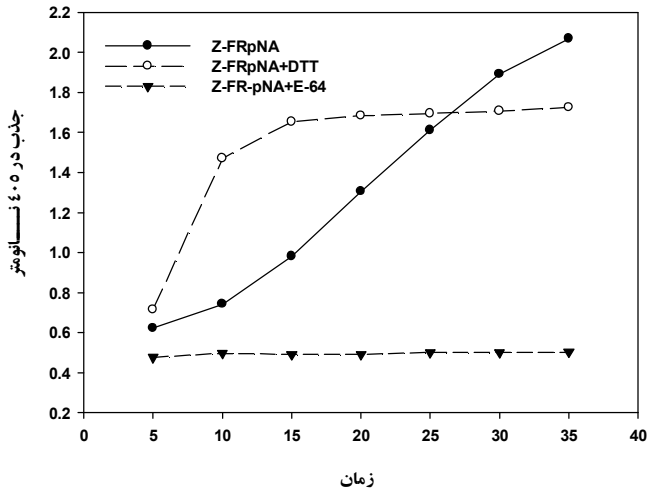
(جدول۱)- اثر فعال کننده و مهار کننده سیستئین پروتئینازها بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز

مهارکننده/فعال کننده (غلظت نهایی ۱ mM)	درصد فعال کنندگی و مهارکنندگی (خطای معیار ± میانگین)	
	Z-Arg-Arg-pNA	Z-Phe-Arg-pNA
مهار کننده E-64	۸۲/۱۴±۰/۰۱۴	۹۹/۸۵±۰/۰۰۲
فعال کننده DTT	۷۸/۵۷±۰	۹۹/۴۱±۰/۰۰۳

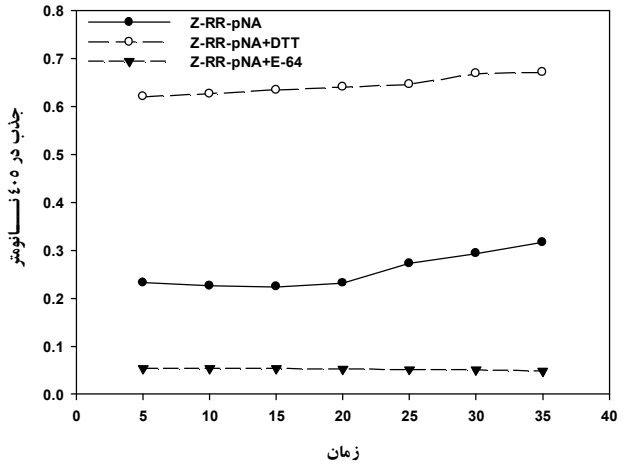
وجود سیستئین پروتئینازها در تخم سن سبز پسته بـا اسـتفاده از مهار کننده E-۶۴ روی دو سوبسـترای ویـژه سیسـتئین پروتئینازهـا بررسی گردید (نمودار ۶ و۷). بر اساس داده‌های موجـود در جـدول۱، مهارکننده ویژه سیستئین پروتئینازها، E-۶۴، اثر مهارکننـدگی قابـل

توجهی روی فعالیت هیدرولیتیک سوبسترای Z-Phe-Arg-pNA و Z-Arg-Arg-pNA توسط عصاره تخم نشان داد.

فعال‌کننده ویژه سیستنین پروتئینازها، ال-سیستئین، نیز اثر فعال کنندگی قابل توجهی روی فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت نشان داد(نمودار۸ و ۹)، که بیان‌کننده وجود سیستئین پروتئینازها می‌باشد(جدول ۲). با توجه به نمودار ۹، مهارکننده ویژه سیستئین پروتئینازها، E-۶۴، اثر مهارکنندگی قابل توجهی روی فعالیت سیستئین پروتئینازی عصاره اووسیت نشان داد (جدول ۲).



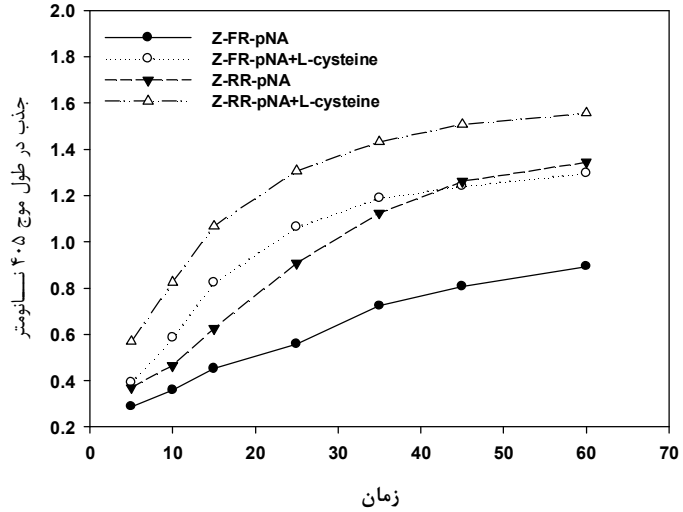
(نمودار٦)- اثر فعال کننده و مهارکننده بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز پسته با استفاده ازسوبسترای Z-Phe-Arg-pNA



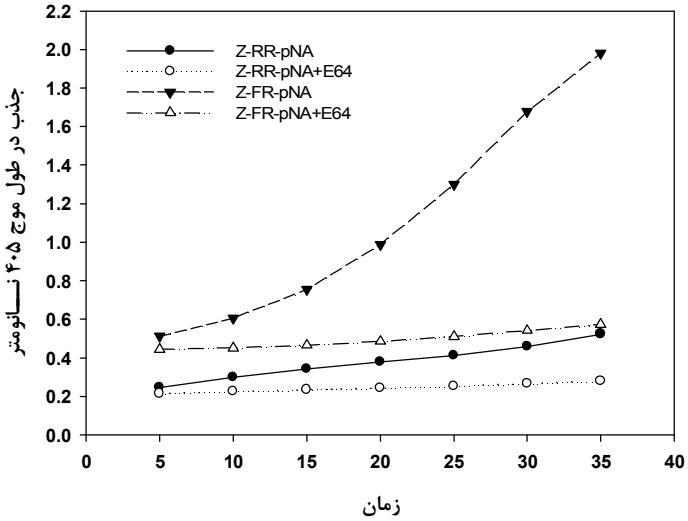
(نمودار۷)- اثر فعال کننده و مهارکننده بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره تخم سن سبز پسته با استفاده ازسوبسترای Z-Arg-Arg-pNA

(جدول۲)- اثر فعال کننده و مهار کننده سیستئین پروتئینازها بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت سن سبز

مهارکننده/فعال کننده (غلظت نهایی ۱ mM)	درصد فعال کنندگی و مهارکنندگی (خطای معیار ± میانگین)	
	Z-Arg-Arg-pNA	Z-Phe-Arg-pNA
مهارکننده E-64	۷۴/۶۲±۰/۰۷۴	۶۳/۲۴±۰/۰۱۷
فعال کننده ال- سیستئین	۲۷/۷۱±۱/۲	۱۸۸/۲۳±۰/۶۳



(نمودار۸)- اثر فعال کننده ال- سیستئین بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت سن سبز پسته



(نمودار۹)- اثر مهارکننده E-٦٤ بر فعالیت هیدرولیتیک عصاره اووسیت و سن سبز پسته

پروتئینها جزء بسیار مهمی از رژیم غذایی حشرات را تشکیل می‌دهند و محصولات هضم آنها در بسیاری از فرایندهای زیستی نقش حیاتی ایفا می‌کند. یک پروتئین جدید تیروزین فسفاتاز از تخم مگس *Sarcophaga peregrina* خالص سازی شده است، این پروتئین در طی اووژنز و اوایل جنین زایی بیان می‌شود و در اواسط جنین زایی توسط کاتپسین- ال لیزومی تجزیه می‌شود. همچنین وجود پروتئین تیروزین فسفاتاز در مگس *Drosophila melanogaster* به اثبات رسیده است. نتایج تحقیقات نشان داده است که حذف ژن مذکور باعث مرگ در طی جنین زایی می‌شود، پس می‌توان نتیجه گرفت که بیان این پروتئین نقش مهم و اساسی در اووژنز و جنین زایی دارد (۳۰). سنتز پروتئین در طی جنین زایی در سیرسیرک نیز مورد بررسی قرار گرفته است نتایج تحقیقات نشان داده است که این توده پروتئین در طول دوره ویتلوژنز به وجود می‌آید (۱۰). همچنین وجود پروتئینهای تخم درشب پره *Plodia interpunctella* (۴) نشان داده شده است و بدون شک آنزیمهای پروتئاز در تجزیه این‌گونه پروتئینها در حشرات نقش مهمی دارند. سیستئین پروتئازها مخصوصاً کاتپسین بی و ال، هیدرولازهای عمومی هستندکه مسئول تجزیه پروتئینها در جانداران تخم گذار مثل نماتدها، کنه ها، قورباغه ها وحشرات می‌باشند (۱۵). آنزیمهای پروتئولیتیک در مراحل مختلف جنینی تخم ملخ *Locusta migratoria* مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج مشخص شد

کـه حـداقل دو نـوع اندوپپتیـداز در تخـم در حـال رشـد در *L. migratoria* دیده شده است. یکی از آنها احتمالاً جزء کاتپسین ها بوده که آنزیم مسئول هیدرولیز پروتئینها در pH حدود ۵/۶ می‌باشد و دیگری تریپسین بوده که آنزیم مسئول هیـدرولیز پروتئینهـا در pH حدود ۷/۸ می‌باشـد (۲۶). هیـدرولیز سوبسـترای BApNA توسـط عصاره تخـم *Bombyx mori* (۱۱) و *Musca domestica* (۲۲) نشان دهنده وجود وفعالیت آنزیمهای تریپسین سرین پروتئـازدرطول دوره جنینی در کرم ابریشم و مگس خانگی می‌باشد. حضـور سـرین پروتئینازها در تجزیه زرده تخم *Periplaneta americana* (۱۸) و *Drosophila melanogaster* (۱۲) به اثبات رسیده است.

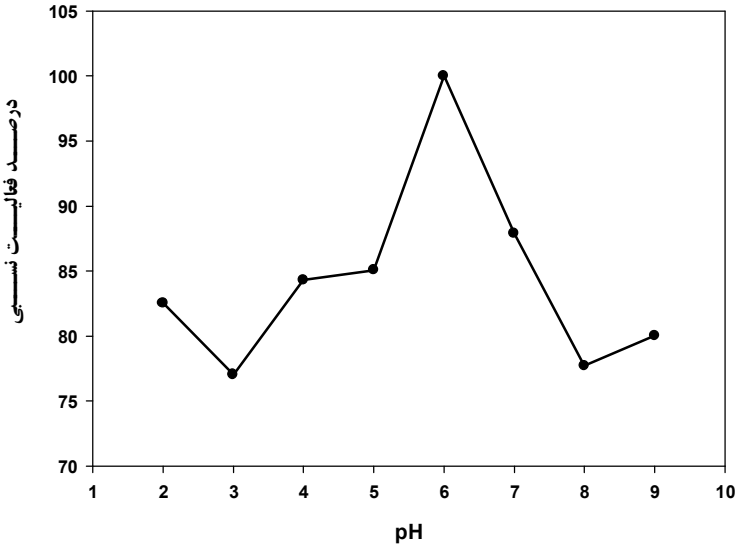
با هیدرولیز سوبسترای هموگلوبین توسط عصـاره اووسـیت کـرم غوزه پنبه فعالیت پروتئولیتیکی بـالایی در pHهـای ۳ و۴ مشـاهده شده است، این فعالیت پروتئولیتیکی توسط مهارکننده E-۶۴ مهار شد که نشان دهنده احتمال وجود سیستئین پروتئینازها می‌باشد. فعالیـت پروتئینازی مذکور توسط مهار کننده‌های سرین پروتئینازی هم مهـار شـد کـه نشـان دهنـده وجـود سـرین پروتئینازهـا نیـز در اووسـیت *Helicoverpa armigera* می‌باشد (۳۱).

هیدرولیز سوبسترای اختصاصی کاتپسین بی توسط عصاره تخـم *Antheraea pernyi* انجام گرفته است. مهار این آنزیم توسط مهار کننده E-۶۴ نیز صورت گرفته است. بر اساس این نتایج مشخص شد که سیستئین پرتئینازها در تخـم حشـرات مـذکور ذخیـره شـده و در تجزیه زرده تخم نقـش مهمـی دارد (۳۲). فعالیـت پروتئـولیتیکی در جنین *D. melanogaster* و *Musca domestica* یافت شده که در تجزیه پروتئینها نقش دارد. این فعالیت پروتئولیتیکی را بـه وجـود کاتپسین بی در جنین حشرات مذکور نسبت داده انـد. آنـزیم مـذکور توسط مهارکننده E-64 در غلظت ۵ میکـرو مـولار بـه طـور ۱۰۰٪ مهارشده و حتی کاربرد دی تیوترایتول فعالیت آنزیم مذکور را افزایش داد (۲۲). همچنین نقش کاتپسین ال در تجزیه پروتئین تخم در کنه *Ornithodoros moubata* و حشـرات *Bombyx mori* و *Musca domestica* به اثبات رسیده است (۶، ۲۱ و ۲۷)

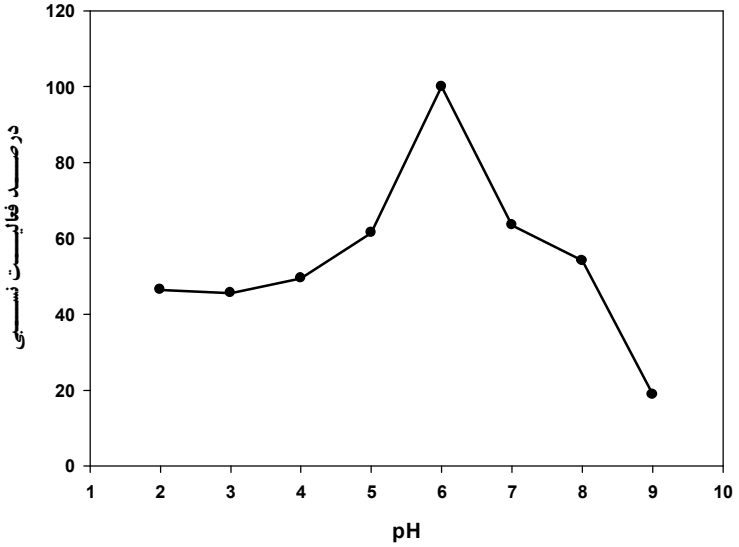
فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در تخم و اووسیت سن سبز پسته

در نمودارهای ۱۰و ۱۱ فعالیت آمیلولیتیکی عصاره تخم و اووسیت سن سبز پسته روی سوبسترای نشاسته نشان داده شده است. استفاده از سوبسترای نشاسته برای مشخص نمودن وجود آلفا آمیلاز در عصاره آنزیمی بافتهای مذکور نشان داد که مقـدار ایـن آنزیمهـا در تخـم و اووسیت سن قابل توجه می‌باشد. بر طبق این بررسی فعالیـت بهینـه آمیلاز در سن سبز پسته در دامنـه گسـترده ای از pHهـای ۲ تـا ۹ صورت گرفت. مقدار pH بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز در تخم و اووسیت در سن سبز پسته برابر با ۶ بدست آمد.

کربوهیدرات ها از مهمترین مواد غذایی مورد استفاده در حشـرات می‌باشند. که عموماً به‌صورت منوساکارید جذب می شوند، از این میان نشاسته و گلیکوژن، پلی ساکاریدهای اصلی ذخیره ای در گیاهـان و حشرات بوده که توسط آنزیمهای کربوهیـدرازی تجزیـه مـی‌گردنـد. آنزیم آلفا آمیلاز در بدن جانوران از جمله حشرات نشاسته و گلیکوژن را مورد حمله قرار می‌دهد و در نتیجه شکستن زنجیره کربوهیدرات در نشاسـته و گلیکـوژن مخلـوطی از الیگوسـاکاریدها و دگسـترین آزاد می‌گردد.



(نمودار ۱۰) - فعالیت آمیلولیتیکی عصاره تخم سن سبز پسته در pHهای مختلف



(نمودار ۱۱) - فعالیت آمیلولیتیکی عصاره اووسیت سن سبز پسته در pHهای مختلف

گلوکز نقش اساسی و مهم در طی اوژنز و جنین زایی دارد و به صورت گلیکوژن ذخیره شده و در متابولیسم و تولید انرژی در تخم و اووسیت نقش دارد (۳۲). فرایند تجمع کربوهیدراتهای ذخیره شده در تخم سن خونخوار *Rhodnius prolixus* مورد بررسی قرار گرفته است، نتایج نشان داده است که در طی اووژنز مقدار نهایی گلیکوژن، گلوکز وتری هالوز افزایش پیدا می‌کند در حالی که بعد از تخم گذاری محتویات گلیکوژن در تخم بارور شده کاهش یافته در صورتی که محتویات گلوکز در حال افزایش می‌باشد (۲۴). بدون شک این مواد کربوهیدراتهای ضروری موجود در ویتلوس برای رشد جنین در حال رشد می‌باشند و آنزیمهای مسئول هیدرولیز کربوهیدراتها در تجزیه این پلی ساکاریدها و تبدیل آنها به مونوساکاریدها نقش اساسی و مهمی ایفا می‌کنند. در گونه *Anopheles atroparvus* وقتی ماده ها به مقدار کافی از ترکیبات قندی کربوهیدراتی تغذیه کنند تمام تخمها بارور شده و به نظر می‌رسد که در این پشه ترکیبات کربوهیدراتها برای اووژنز ضروری هستند (۷). وجود گلیکوژن به عنوان یک منبع کربوهیدراتی موردنیاز در طی ویتلوژنز در سن پنتاتومیده *Halys dentata* به اثبات رسیده است (۱۹). بررسی تغییر محتویات گلیکوژن در تخم کرم ابریشم در طی جنین زایی نشان داده است که محتویات گلیکوژن به صورت تدریجی در طی ۵ تا ۶ روز بعد از تخم گذاری کاهش پیدا می‌کند و حتی کاهش بسیار سریع گلیکوژن تا زمان تفریخ دیده می‌شود (۱۶). وجود الیگوساکاریدها در ویتلوس *Blatella germanica* مورد بررسی قرار گرفته است و ترکیبی از گلیکوپپتید مشتق شده از ویتلوس سوسری آلمانی توسط بتا-ان-استیل گلیکوآمینیداز H هیدرولیز شده است (۱۴). وجود آلفا آمیلاز در اووسیت و تخم سن سبز پسته نیز بدون شک در تجزیه گلیکوژن و تامین نیاز انرژی و کربوهیدراتی جنین نقش اساسی دارد.

منابع

۱- هاشمی راد ح. ۱۳۸۳. سن‌های زیان آور باغهای پسته در استان کرمان. انتشارات موسسه تحقیقات پسته کشور.

۲- نیمان ا. ۱۳۴۵. بیماری ماسو و پیدایش قارچ در *Nematospora* میوه درختان پسته. نشریه مؤسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی ۲۵: 58-66.

3- Baker J.E. 1991. Purification and partial characterization of alpha-amylase allozymes from the lesser grain borer , *Rhyzopertha dominica*. Insect Biochemistry, 21(3): 303-311.

4- Bean D.W., Shirk P.D., and Brookes V.J. 2003. Characterization of yolk proteinase from the eggs of the Indian meal moth, *Plodia punctella*. Insect Biochemistry, 18: 199-210.

5- Cohen A.C. 1993. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzyme in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. Journal of Insect Physiology, 39: 823-829.

6- Faggoto F. 1990. Yolk degradation tick eggs: Occurance of a cathepsin L-like acide proteinase in yolk

spheres. Archives of Insect Biochemistry and physiology, 14:217-235.
7- Fernandes L., and Briegel H. 2005. Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. Journal of Vector Ecology, 30: 11-26.
8- Fialho F., Nakamura A., Juliano L., Masuda H., and Silva-Neto M.A.C. 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. Archives of Biochemistry and Biophysics, 436: 246-253.
9- Folin O., and Ciocalteo V. 1927. On tyrosin and tryptophan determination in proteinase. Journal of Biological Chemistry ,73:627-650.
10- Handley H.L., Estridge B.H., and Bradley J.T. 1998. Vitellin processing and protein synthesis during cricket embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28: 259-264.
11- Ikeda M., Sasaki T., and Yamashita O. 1990. Purification and characterization of proteases responsible for vitellin degradation of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry, 20: 725-734.
12- Indrasith L.S., Sasaki T., and Yamashita O. 1988. A unique protease responsible for selective degradation of a yolk protein in *Bombyx mori*. Puri-Fication, characterization, and cleavage profile. Journal of Biological Chemistry, 263: 1045-1051.
13- Kucera M., and Turner R.B. 1973. Changes in acti of proteases during embryogenesis of *Anagasta kuehniella* (insect). Comparative Biochemistry and Physilogy – Part B, 44: 577-585.
14- Kunkel J.G., Shepard G.L., McCarthy R., Ethier D.B., and Nordin J.H. 2003. Concanavalin a reactivity and carbohydrate structure of *Blattella germanica* vitellin. Insect Biochemistry, 10: 703-714.
15- Medina M., Leon P., and Vallejo C.G. 1988. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation, Archives of Biochemistry and Biophysics, 263: 355-363.
16- Miura K., and Shimizu I. 2003. Changes of triglyceride and glycogen content in the silkworm (*Bombyx mori*) eggs during diapause and embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology, 85: 719-723.
17- Nation J.L. 2002. Insect physiology and biochemistry. CRC Press, 485pp.
18- Olivera D.M.P., Ramos I.B., Reis F.C.G., Lima A.P.C.A., and Machado E. 2008. Interplay between acid phosphatase and cystein proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. Journal of Insect Physiology, 54: 883-891.
19- Pathak J.P. 1971. Occurrence of glycogen during Vitellogenesis in *Halys dentate* (Hemiptera-Pentatomidae). Folia histochemica et cytochemica, 9: 273-276.
20- Pohl P.C., Sorgine M.H.F., Leal A.T., Logullo C., Oliveira P.L., Silva Vaz Jr I., and Masuda A. 2008. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin – degradation activity. Comparative Biochemistry and Physiology, part B, 151: 392-399.
21- Ribolla P.E.M., and Bianchi A.G. 1995. Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 25:1011-1017.
22- Ribolla P.E.M., Daffre S., and Bianchi A.G. 1993. Cathepsin B and acid phosphatase activities during *musca domestica* embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 23: 217-223.
23- Richardo A.J., Oliveira P.R., Bechara G.H., and Mathias M.I.C. 2007. Ultrastructural detection of proteins, Lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) during the vitello genesis process. Tissue and cell, 39: 203-215.
24- Santos R., Mariano A.C., Rosas – Oliveira R., Pascare B., Machando E.A., Meyer-Fernandes J.R. and Gondim K.C. 2008. Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 67: 55-62.
25- Sharma H.C., Sharma k.k., Seetharama N., and Ortiz R. 2000. Prospects for using transgenic resistance to insect in crop improvement. Electeric Journal of Biotecnology, 3(2): 1-20
26- Shulov A., Pener M.P., Kuk-Meiri S., and Lichtensteir N. 1957. Proteolytic enzymes in various embronic stages of the eggs of *locusta migratoria* migratorioides. Journal of Insect Physilogy, 1: 279-285.
27- Takahashi S.Y., Yamamoto Y., Shionoya Y., and Kageyama T. 1993. Cystein proteinase from the eggs of the silkmoth, *Bombyx mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in vivo and in vitro. Journal of Biochemistry, 114: 267-272.
28- Terra W.R., and Ferrira C. 1994. Insect digestive enzymes:properties, compartmentalization and function. Comperative Biochemistry and Physiology, 109:1-62.
29- Wang Z., and Davey K.G. 1992. Characterization of yolk protein and its receptor on the oocyte membranc in *Rodnius prolixus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 22: 757-767.

30- Yamaguchi S., Katagiri S., Sekimizu K., Natori S., and Homma K. J. 2005. Involvement of EDTP, an egg-derived tyrosine phosphatase, in the early development of *Drosophila melanogaster*. Journal of Biochemistry, 138: 721-728.
31- Zhao X., Wang J., Xu X, Schmid R., and Wieczorek H. 2002. Molecular cloning and characterization of the cathepsin B-like proteinase from the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. Insect Molecular Biology, 11(6): 567-575.
32- Zhao X., Wang J., Yagi N., Yamamoto Y., Watabe S., and Takahashi S.Y. 1996. Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of silkworm moth, *Antheraea pernyi*. Comparative Biochemistry and Molecular Biology, 113:
33- 95-103.
34- Zheng P., Vassena R., and Latham K. E. 2007. Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos. Molecular human reproduction, 13: 361-371.