



دانشگاه میلان

دانشکده علوم کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

مطالعه‌ی کربوهیدرازها و پروتئازهای گوارشی لاروهای مگس زیتون
Bacterocera oleae Gmelin با تغذیه از ارقام مختلف زیتون

از:

سحر دلکش رودسری

استاد راهنما:

دکتر آرش زیبایی

مرداد ۱۳۹۳

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دانشکده علوم کشاورزی

گروه گیاه پزشکی

(گرایش حشره شناسی)

عنوان:

مطالعه‌ی کربوهیدرازها و پروتئازهای گوارشی لاروهای مگس
زیتون *Bacterocera oleae* Gmelin با تغذیه از ارقام
مختلف زیتون

از:

سحر دلکش رودسری

استاد راهنما:

دکتر آرش زیبایی

استاد مشاور:

مهندس محمدرضا عباسی مژده‌ی

مرداد ۱۳۹۳

تقدیم به:

دو شایسته کارآفرین کارم

پدر و مادر عزیزم

که از نگاهشان صلابت

از رفتارشان محبت

و از صبرشان ایستادگی را آموختم.

پاس بی کران یکنه خانم که مراب رفیع ترین روشنی هایدت کرد و راهم راب نور همیشه فزوان دانش، روشن ساخت. پس، از دینگی خاضعانه ستایش می کنم و در ادامه این راه، معرفت نفس خویش را از او طلب می نمایم.

پاس ویژه خود را تقدیم می کنم به خانواده ارجمندم به ویژه پدر و مادرم به واسطه تشویق و حمایت های بی پایان شان که مراد وادی دانش اندوزی پرورش دادند و اول بار با آیین علم آموزی آشنا نمودند. از خداوند همیشه سلامتی و سربلندی شان را طلب می کنم.

در مسیری که برگزیدم به سفرانی راهبرم بودند که حضورشان همچون ستارگانی بر نور، فروزنده راهم بود و از این رو بر خود واجب می دانم مراتب بی پایان پاس و تقدیرم را نثارشان کنم. پیش از همه استاد ارجمند جناب آقای دکتر آرش زیبایی که هدایت ماور، نمودهای ارزنده شان چراغی شد فرارویم که تا پایان راه روشنگر لحظه هایم خواهد بود و اگر نبود این هدایت ماور، نمودها، بی شک طی این راه، بس مثل و چه بسا ناممکن می شد. صبر، سه صدر و نیک اندیشی ایشان درس هایی است که هرگز از یاد نخواهم برد.

از جناب آقای مهندس محمد رضا عباسی مرثوی به واسطه مساعدت و موفقیات ارزشندان کمال تشکر را دارم.

از اساتید ارجمند گروه کیا به سرکشی دانشگاه کیلان که طی دوران تحصیل افتخار نگارویشان را دادم سپاسگزارم.

سحر دلکش

مرداد ۱۳۹۳

فهرست	صفحه
چکیده فارسی	ذ
چکیده انگلیسی	ر
مقدمه	ا

فصل اول: کلیات و بررسی منابع

۱-۱- زیست شناسی مگس زیتون <i>Bactrocera oleae</i> Gmelin	۴
۲-۱- پراکنش	۴
۳-۱- شکل شناسی مگس زیتون	۴
۱-۳-۱- حشره بالغ	۴
۲-۳-۱- تخم	۵
۳-۳-۱- لارو	۵
۴-۳-۱- شفیره	۵
۴-۱- چرخه زندگی مگس زیتون	۷
۵-۱- گیاهان میزبان	۸
۱-۵-۱- میزبان اصلی و جایگزین	۸
۲-۵-۱- تاثیر میزبان	۹
۶-۱- خسارت	۹
۷-۱- ردیابی، مدیریت و کنترل آفت	۹
۸-۱- آنزیم‌های هضم در دستگاه گوارش	۹
۱-۸-۱- آنزیم‌های گوارش پروتئین‌ها	۱۰
۲-۸-۱- آنزیم‌های گوارش کربوهیدرات‌ها	۱۲
۳-۸-۱- آنزیم‌های گوارش چربی‌ها	۱۳
۹-۱- فرایندهای ترشح و تنظیم آنزیم‌های گوارشی	۱۴
۱۰-۱- بررسی کربوهیدرازها و پروتئازهای گوارشی در دوبالان	۱۵

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۱-۲- بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی کربوهیدرازها و پروتئازهای لوله‌ی گوارش <i>B.oleae</i>	۱۹
۱-۱-۲- جمع‌آوری لاروهای مگس زیتون	۱۹

- ۲-۱-۲- تشریح و جداسازی لوله‌ی گوارش لارو و تهیه‌ی نمونه‌ی آنزیمی ۱۹
- ۳-۱-۲- تهیه نمونه آنزیمی متصل به غشاء ۱۹
- ۴-۱-۲- تهیه‌ی معرف‌ها ۲۰
- ۱-۴-۱-۲- دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) ۲۰
- ۲-۴-۱-۲- تری کلرواستیک اسید ۳۰٪ (TCA) ۲۰
- ۵-۱-۲- تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز عصاره‌ی لوله‌ی گوارش در لاروهای سن سوم ۲۰
- ۶-۱-۲- تعیین اسیدپتت و دمای بهینه برای فعالیت آلفا- آمیلاز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش ۲۰
- ۷-۱-۲- تاثیر یون‌ها و بازدارنده‌های مختلف روی فعالیت آلفا- آمیلاز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش ۲۱
- ۸-۱-۲- تعیین فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز عصاره‌ی لوله‌ی گوارش در لاروهای سن سوم ۲۱
- ۹-۱-۲- تعیین اسیدپتت و دمای بهینه برای فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش ۲۲
- ۱۰-۱-۲- تاثیر یون‌ها و بازدارنده‌های مختلف روی فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش ۲۲
- ۱۱-۱-۲- تعیین فعالیت پروتئازی کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش با استفاده از سوبسترای هموگلوبین ۲۲
- ۱۲-۱-۲- تعیین اسیدپتت و دمای بهینه برای فعالیت پروتئازی کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش ۲۳
- ۱۳-۱-۲- تعیین فعالیت پروتئازهای اختصاصی در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش با استفاده از سوبسترای اختصاصی ... ۲۳
- ۱-۱۳-۱-۲- سرین پروتئینازها ۲۳
- ۲-۱۳-۱-۲- سیستئین پروتئینازها ۲۴
- ۳-۱۳-۱-۲- اگزوپتیدازها ۲۴
- ۱۴-۱-۲- تعیین اسیدپتت بهینه برای هر یک از پروتئازهای اختصاصی در عصاره‌ی لوله‌ی گوارش ۲۴
- ۱۵-۱-۲- تاثیر بازدارنده‌های اختصاصی روی فعالیت پروتئازی عصاره‌ی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون ۲۵
- ۱۶-۱-۲- تعیین مقدار پروتئین در عصاره‌ی لوله‌ی گوارش لارو ۲۵
- ۲-۲- تعیین تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف زیتون بر فعالیت آنزیمی لاروهای سن سوم *B. oleae* ۲۵
- ۱-۲-۲- جمع‌آوری لاروهای مگس زیتون از میوه‌ی رقم‌های مختلف و تهیه‌ی نمونه‌ی آنزیمی ۲۵
- ۳-۲- بررسی اثر بازدارنده‌های پروتئینی بر فعالیت آلفا- آمیلاز لوله‌گوارش *B. oleae* ۲۶
- ۱-۳-۲- تهیه عصاره‌ی آنزیمی ۲۶
- ۲-۳-۲- استخراج مهارکننده‌ی آلفا- آمیلاز از علف هفت بند ۲۷
- ۴-۳-۲- بررسی اثر مهارکننده‌های استخراج شده بر فعالیت آلفا- آمیلاز ۲۷
- ۵-۳-۲- بررسی اثر اسیدپتت بر فعالیت مهارکنندگی آلفا- آمیلاز ۲۷

۲۸	۶-۳-۲- بررسی اثر دما بر فعالیت مهارکنندگی آلفا- آمیلاز
۲۸	۴-۲- تجزیه و تحلیل آماری

فصل سوم: نتایج و بحث

۳۰	۱-۳- بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی کربوهیدرازهای لوله‌ی گوارش <i>B.oleae</i>
۳۰	۱-۱-۳- تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز عصاره‌ی لوله‌ی گوارش در لاروهای سن سوم مگس زیتون
۳۰	۲-۱-۳- تعیین اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت آلفا- آمیلاز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش
۳۲	۳-۱-۳- تاثیر یون‌ها و بازدارنده‌های مختلف روی فعالیت آلفا- آمیلاز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش
۳۶	۴-۱-۳- تعیین فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم <i>B.oleae</i>
۳۷	۵-۱-۳- تعیین اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش
۴۱	۶-۱-۳- تاثیر یون‌ها و بازدارنده‌های مختلف روی فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش
۴۶	۷-۱-۳- بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئازهای لوله‌ی گوارش لارو سن سوم <i>B.oleae</i>
۴۷	۸-۱-۳- تعیین اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت پروتئازی کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش
۵۰	۹-۱-۳- تعیین فعالیت پروتئازهای اختصاصی در بخش‌های محلول و متصل به غشاء در لارو سن سوم <i>B.oleae</i>
۵۱	۱۰-۱-۳- تعیین اسیدیته‌ی بهینه هر یک از پروتئازهای اختصاصی در عصاره‌ی لوله‌ی گوارش
۵۸	۱۱-۱-۳- تعیین تاثیر بازدارنده‌های اختصاصی روی فعالیت پروتئازی عصاره‌ی لوله‌ی گوارش
۶۰	۲-۳- تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف زیتون بر فعالیت آنزیمی لاروهای سن سوم <i>B.oleae</i>
۶۰	۱-۲-۳- تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز عصاره‌ی لوله‌ی گوارش لاروهای تغذیه شده از میوه‌های رقم‌های مختلف زیتون
	۲-۲-۳- تعیین فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لاروهای تغذیه شده از میوه‌های رقم-
۶۱	های مختلف زیتون
	۳-۲-۳- تعیین فعالیت پروتئازی اختصاصی در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لاروهای تغذیه شده از میوه‌های رقم-
۶۲	های مختلف زیتون
۶۴	۳-۳- بررسی اثر بازدارنده‌های پروتئینی بر فعالیت آلفا- آمیلاز لوله‌ی گوارش <i>B.oleae</i>
۶۴	۱-۳-۳- بررسی اثر عصاره‌ی پروتئینی استخراج شده از علف هفت بند بر فعالیت آلفا- آمیلاز لوله‌ی گوارش <i>B.oleae</i>
۶۵	۲-۳-۳- بررسی اثر اسیدیته بر فعالیت مهارکنندگی آلفا- آمیلاز توسط علف هفت بند
۶۶	۳-۳-۳- بررسی اثر دما بر فعالیت مهارکنندگی آلفا- آمیلاز علف هفت بند

۶۷	۴-۳- نتیجه گیری کلی
۶۸	۵-۳- پیشنهادها
۷۰	منابع

- جدول ۳-۱- تاثیر یون‌های مختلف بر فعالیت آلفا- آمیلاز لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae*..... ۳۴
- جدول ۳-۲- تاثیر بازدارنده‌ی مختلف بر فعالیت آلفا- آمیلاز لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae*..... ۳۵
- جدول ۳-۳- فعالیت ویژه آلفا و بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم *B. oleae*..... ۳۷
- جدول ۳-۴- تاثیر یون‌های مختلف بر فعالیت آلفا- گلوکوزیداز لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae*..... ۴۲
- جدول ۳-۵- تاثیر یون‌های مختلف بر فعالیت بتا- گلوکوزیداز لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae*..... ۴۳
- جدول ۳-۶- تاثیر بازدارنده‌ی مختلف بر فعالیت آلفا- گلوکوزیداز لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae*..... ۴۴
- جدول ۳-۷- تاثیر بازدارنده‌ی مختلف روی فعالیت بتا- گلوکوزیداز لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae*..... ۴۵
- جدول ۳-۸- فعالیت پروتئازهای اختصاصی در بخش‌های محلول و متصل به غشاء در لارو سن سوم *B. oleae*..... ۵۱
- جدول ۳-۹- تاثیر بازدارنده‌ی اختصاصی بر فعالیت پروتئاز کل لوله‌ی گوارش لارو سن سوم *B. oleae*..... ۵۹
- جدول ۳-۱۰- پارامترهای بازدارندگی علف هفت‌بند روی فعالیت آلفا- آمیلاز گوارشی لارو سن سوم *B. oleae*..... ۶۴

- شکل ۱-۱- مراحل مختلف زیستی مگس زیتون و نحوه خسارت آن ۶
- شکل ۱-۲- دستگاه میکروپولیت ریدر ۲۶
- شکل ۱-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت آلفا- آمیلاز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* با استفاده از نشاسته ۱٪ به‌عنوان سوبسترا ۳۱
- شکل ۲-۳- دمای بهینه‌ی فعالیت آلفا- آمیلاز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* با استفاده از نشاسته ۱٪ به‌عنوان سوبسترا ۳۲
- شکل ۳-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت آلفا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* با استفاده از *P-nitrophenyl- α-D-glucopyranoside (pNαG)* به‌عنوان سوبسترا ۳۹
- شکل ۴-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* با استفاده از *P-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNβG)* به‌عنوان سوبسترا ۳۹
- شکل ۵-۳- دمای بهینه‌ی فعالیت آلفا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* با استفاده از *P-nitrophenyl- α-D-glucopyranoside (pNαG)* به‌عنوان سوبسترا ۴۰
- شکل ۶-۳- دمای بهینه‌ی فعالیت بتا- گلوکوزیداز در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* با استفاده از *P-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNβG)* به‌عنوان سوبسترا ۴۰
- شکل ۷-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت پروتئاز کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* در بخش محلول با استفاده از سوبسترای هموگلوبین ۴۷
- شکل ۸-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت پروتئاز کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* در بخش متصل به غشاء با استفاده از سوبسترای هموگلوبین ۴۸
- شکل ۹-۳- دمای بهینه‌ی فعالیت پروتئاز کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* در بخش محلول با استفاده از سوبسترای هموگلوبین ۴۸
- شکل ۱۰-۳- دمای بهینه‌ی فعالیت پروتئاز کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* در بخش متصل به غشاء با استفاده از سوبسترای هموگلوبین ۴۹
- شکل ۱۱-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز تریپسین در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۲
- شکل ۱۲-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کیموتریپسین در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۲
- شکل ۱۳-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز الاستاز در بخش محلول لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۳
- شکل ۱۴-۳- اسیدیتته‌ی بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز الاستاز در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۳

- شکل ۳-۱۵- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کاتپسین D در بخش محلول لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۴
- شکل ۳-۱۶- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کاتپسین D در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۴
- شکل ۳-۱۷- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کاتپسین B در بخش محلول لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۵
- شکل ۳-۱۸- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کاتپسین B در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۵
- شکل ۳-۱۹- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کاتپسین L در بخش محلول لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۶
- شکل ۳-۲۰- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کاتپسین L در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۶
- شکل ۳-۲۱- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز آمینوپپتیداز در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۷
- شکل ۳-۲۲- اسیدیت‌های بهینه‌ی فعالیت پروتئیناز کربوکسی‌پپتیداز در بخش متصل به غشاء لوله‌ی گوارش لارو مگس زیتون *B. oleae* ۵۷
- شکل ۳-۲۳- تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف بر فعالیت آلفا- آمیلاز لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم *B. oleae* ۶۰
- شکل ۳-۲۴- تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف بر فعالیت آلفا- گلوکوزیداز لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم *B. oleae* ۶۱
- شکل ۳-۲۵- تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف بر فعالیت بتا- گلوکوزیداز لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم *B. oleae* ۶۱
- شکل ۳-۲۶- تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف روی فعالیت سرین پروتئینازهای لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم *B. oleae* ۶۲
- شکل ۳-۲۷- تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف روی فعالیت سیستئین پروتئینازهای لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم *B. oleae* ۶۳
- شکل ۳-۲۸- تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف روی فعالیت سیستئین پروتئیناز کاتپسین D لوله‌ی گوارش لاروهای سن سوم *B. oleae* ۶۳
- شکل ۳-۲۹- تاثیر غلظت‌های مختلف مهارکننده بر فعالیت آلفا- آمیلاز گوارشی لاروهای سن سوم *B. oleae* ۶۵
- شکل ۳-۳۰- تاثیر اسیدیت‌های مختلف بر فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی علف هفت‌بند ۶۵
- شکل ۳-۳۱- تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ی پروتئینی علف هفت‌بند ۶۶

چکیده:

مطالعه‌ی کربوهیدرازها و پروتئازهای گوارشی لاروهای مگس زیتون *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) با تغذیه از ارقام مختلف زیتون

سحر دلکش

در این پژوهش، ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا-آمیلاز، گلوکوزیدازها، پروتئازها، تاثیر تغذیه از رقم‌های مختلف زیتون و تاثیر مهارکننده پروتئینی بر فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی (*Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) مورد بررسی قرار گرفت. اسیدپتید و دمای بهینه‌ی فعالیت آمیلولیتیکی در لوله‌ی گوارش لارو مگس به ترتیب ۵ و ۴۵-۲۰ درجه-ی سلسیوس تعیین شد. از میان یون‌ها و بازدارنده‌های اختصاصی استفاده شده؛ کلسیم، PMSF و EGTA به‌طور معنی-داری بر فعالیت آمیلولیتیکی تاثیر داشتند که نشان‌دهنده‌ی حضور بنیان اسیدآمین‌های سه‌تایی (سرین، هستیدین و اسید آسپارتیک) و یون کلسیم در مکان فعال آنزیم است. فعالیت گلوکوزیدازها نیز در فرکشن محلول بیشتر از فرکشن متصل به غشاء بود که فعالیت ویژه‌ی آلفا و بتا- گلوکوزیداز به ترتیب ۰/۲۲۵ و ۰/۰۶۷ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین بدست آمد. اسیدپتیدی بهینه‌ی آلفا و بتا- گلوکوزیداز به ترتیب ۶-۵ و ۵، دمای بهینه‌ی نیز به ترتیب ۴۵ و ۲۵ درجه‌ی سلسیوس تعیین شد. یون‌های کلسیم، مس، آهن، سدیم و فعالیت آلفا- گلوکوزیداز را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند اما یون‌های پتاسیم و منیزیم تاثیر معکوس داشتند. یون‌های مس، منیزیم، روی، پتاسیم و سدیم فعالیت بتا- گلوکوزیداز را افزایش دادند اما سایر یون‌ها منجر به کاهش فعالیت آنزیمی در لوله‌ی گوارش لاروها شدند. از میان بازدارنده‌های اختصاصی، Phenanthroline و DTC فعالیت آلفا- گلوکوزیداز و EGTA، Phenanthroline و EDTA فعالیت بتا- گلوکوزیداز را کاهش دادند. اسیدپتیدی بهینه‌ی فعالیت پروتئازی کل برای فرکشن‌های محلول و متصل به‌غشاء به ترتیب ۴ و ۱۰ و دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیمی به ترتیب ۲۵ و ۲۵ درجه سلسیوس بدست آمد. با استفاده از سوبستراها و بازدارنده‌های اختصاصی وجود سرین پروتئینازها، سیستمین پروتئینازها و اگزوپتیدازها در لوله‌ی گوارش لارو اثبات شد. تغذیه لاروها روی رقم‌های میوه‌ی زیتون نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آلفا- آمیلاز به ترتیب در لاروهای تغذیه شده از رقم‌های آرکین و ماری، بیش‌ترین فعالیت آلفا و بتا- گلوکوزیداز به ترتیب در لاروهای تغذیه شده از رقم‌های فرانگیونتو و فیشمی، کم‌ترین فعالیت آلفا- گلوکوزیداز در لاروهای تغذیه شده از رقم‌های آمیگدالیفولیا، زرد و کنسروالیا و کم‌ترین فعالیت بتا- گلوکوزیداز در لاروهای تغذیه شده از رقم‌های زرد، کالاماتا و آرکین بود. بیش‌ترین فعالیت تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، کاتپسین B، کاتپسین L و کاتپسین D به ترتیب روی رقم‌های آمیگدالیفولیا، کراتینا، بلیدی، ماری، کنسروالیا، بلیدی و آرکین و کم‌ترین فعالیت به ترتیب روی رقم‌های روغنی- کالاماتا، زرد، مانزانیا، کالاماتا، کراتینا- کنسروالیا- کالاماتا و روغنی مشاهده شد. نتایج نشان دادند که عصاره‌ی پروتئینی علف هفت‌بند اثر مهارکنندگی روی آلفا- آمیلاز دارد و مقدار IC₅₀ آن ۰/۰۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برآورد شد. نتایج این پژوهش حضور آنزیم‌های گوارشی آلفا- آمیلاز، گلوکوزیدازها و پروتئازها را در لوله‌ی گوارش لارو مگس نشان دادند. همچنین تغذیه روی ارقام مختلف زیتون بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی اثر داشت.

واژه‌های کلیدی: آلفا-آمیلاز، آلفا و بتا- گلوکوزیداز، پروتئاز گوارشی، زیتون، مهارکننده

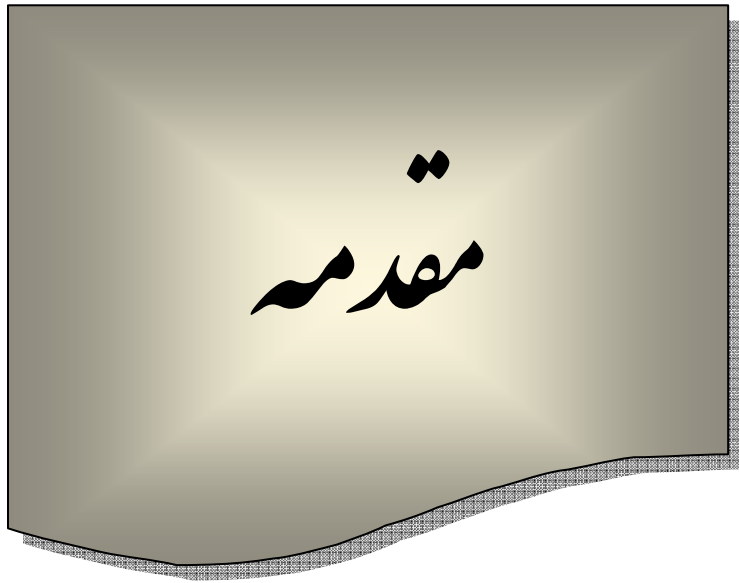
Abstract:

A study on digestive carbohydrases and proteases in the larvae of *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) by feeding on different olive varieties

Sahar Delkash

In the current study, digestive processes of *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) larvae were determined via biochemical properties of α -amylase, α - and β -glucosidases, proteases and feeding of larvae on different olive varieties as well as effects of proteinaceous inhibitor on digestive α -amylase. An optimal pH of 5 and optimal temperature of 20-45 °C were found for amylolytic activity in the larval gut. Among ions and specific inhibitors, Ca^{2+} , PMSF and EGTA had statistical effects on amylolytic activity indicating presence of amino acid triad (Serine, Histidine and Aspartic acid) and Ca^{2+} in active site of the enzyme. According to the results, the glucosidase activities were higher in soluble fraction rather than membrane-bound one by specific activities of 0.225 and 0.067 U/mg protein in soluble fraction for α - and β -glucosidases, respectively. The results showed the optimal activities of α - and β -glucosidases at pHs 5-6 and temperatures 45°C and 25°C, respectively. Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ and Zn^{2+} significantly increased activity of α -glucosidase but K^+ and Mg^{2+} had opposite effects. While, Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , K^+ and Na^+ increased β -glucosidase activity, other ions decreased it in the gut of *B. oleae* larvae. Among specific inhibitors, Phenanthroline and DTC significantly decreased activity of α -glucosidases but EGTA, Phenanthroline and EDTA decreased β -glucosidases activity. The optimal pH for general proteolytic activity was obtained at pH values of 4 and 10 for soluble and membrane-bound fractions of larvae while optimal temperatures were 25°C and 25°C, respectively. Presence of serine, cysteine and exopeptidases were verified using specific substrates and inhibitors. Feeding of larvae on fruits of olive varieties showed the highest and the lowest α -amylase activity in the larvae fed on Arbequina and Mari varieties, respectively. The highest activities of α - and β -glucosidase were found in Frangivento and Fishomi varieties, respectively. The lowest activities of α -glucosidase was in the larvae fed on Amigdalifolia, Zard and Conservalia varieties but the lowest activities of β -glucosidase was determined in the larvae fed on Zard, Kalamata and Arbequina varieties. The highest activities of trypsin-like, chymotrypsin-like, elastase, cathepsin B, cathepsin L and cathepsin D were observed on Amigdalifolia, Coratina-Balidi, Mari, Conservalia, Balidi and Arbequina varieties, respectively while the enzymatic activities were the lowest in the larvae fed on Roghani-Kalamata, Zard, Manzanilla, Kalamata, Coratina-Conservalia-Kalamata, Roghani varieties, respectively. Finally, it was found that proteinaceous extract of knotweed has inhibitory effect on α -amylase. IC_{50} value of the extract was estimated 0.062 mg/ml. The results of the current study showed presence of digestive enzymes of α -amylase, glucosidases and proteases in the larval gut of olive fruit fly. Also, feeding of larvae on different olive varieties affected activities of digestive enzymes.

Key words: α -Amylase, α - and β -glucosidase, digestive protease, Olive, inhibitor



درخت زیتون یکی از گونه‌های گیاهی قدیمی در مناطق مدیترانه‌ای است که اهمیت اقتصادی زیادی دارد [Zohary and Hopf, 2000; Loumou and Giourga, 2003; Barbera and Dettori, 2006]. *Olea (O. europaea)* با انواع زراعی و وحشی است که در آفریقا، آسیا، اروپا و اقیانوسیه رشد می‌کند [Besnard et al., 2002; Sheidai et al., 2010]. بیشترین سطح زیر کشت زیتون در کشورهای اسپانیا با ۲/۴۲ میلیون هکتار، ایتالیا با ۱/۴ میلیون هکتار، تونس و یونان با ۱/۰۳ میلیون هکتار می‌باشد [Vossen, 2007]. زمان دقیق ورود زیتون به ایران به‌طور کامل مشخص نیست ولی شواهد نشان می‌دهد، کشت زیتون در حدود ۲۰۰۰ سال قبل در ایران انجام می‌شده است [Sadeghi, 1992]. در حال حاضر، زیتون بیشتر در شمال ایران کشت می‌شود که ۸۵ درصد تولید زیتون مربوط به این منطقه است [Sadeghi, 1992]. سطح زیر کشت باغ‌های زیتون در ایران بیشتر از صد هزار هکتار بوده و در سال ۲۰۰۵ تولید آن در حدود ۶۰۰۰۰ تن برآورد شد [Zeinanloo, 2006]. در سال‌های اخیر کشت زیتون در ایران گسترش یافته و از ۹۵۰۰۰ هکتار باغ زیتون سالانه ۶۵۰۰ تن روغن زیتون بدست می‌آید [Samaee et al., 2003; Hosseini-Mazinani et al., 2004; Noormohammadi et al., 2007; Omrani-Sabbaghi et al., 2007; Sheidai et al., 2007].

درخت زیتون مانند سایر گیاهان، دارای آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز مختلف است که مگس زیتون *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) یکی از مخرب‌ترین آنها می‌باشد. لاروها با تغذیه از گوشت میوه و افزایش ریزش میوه قبل از برداشت سبب ورود عوامل بیماری‌زا، کاهش کیفیت روغن و افزایش اسیدیته روغن زیتون نیز می‌شوند [Zalom et al., 2009]. پوره‌های پسپیل یا عسلک زیتون *Euphyllura olivina* (Homoptera: Psyllidae) با تغذیه از جوانه، گل و شاخه‌های نازک، سبب ریزش گل‌ها، تشکیل میوه‌های کوچک و ریزش میوه‌های جوان می‌شوند [Zalom et al., 2009]. تریپس زیتون *Liothrips oleae* Casta (Thysanoptera: Phlaeothripidae) با مکیدن شیره جوانه، گل، برگ و میوه باعث زردی و خشکیدگی مناطق آسیب دیده می‌شود [Alford, 2007]. تغذیه لاروهای بید زیتون *praysae oleae* Bernard (Lepidoptera: Yponomeutidae) از جوانه و میوه‌های کوچک زیتون باعث ریزش میوه‌ها می‌شود [Kavallieratos et al., 2005]. پوره های شپشک سیاه زیتون *Saissetia oleae* Bernard (Homoptera: Coccidae) با تغذیه از شیره گیاهی موجب ضعیف شدن درخت، کاهش محصول و کاهش کیفیت روغن و با ترشح عسلک موجب جذب قارچ فوماژین می‌شود [Zalom et al., 2009]. کنه زیتون *Oxycenus maxwelli* Keifer (Acari: Eriophyidae) با تغذیه از جوانه و شاخه‌های آبدار باعث داسی شکل شدن برگ‌ها، از بین رفتن جوانه، بی‌رنگی گل‌ها و جوانه‌ها و ریزش جوانه‌ها می‌شود [Zalom et al., 2009]. سپردار بنفش زیتون *Parlatoria oleae* Clovee (Homoptera:

[Zalom et al., 2009] نیز با مکیدن شیره‌ی گیاهی از قسمت‌های مختلف درخت به آن صدمه می‌زند. (Diaspididae)

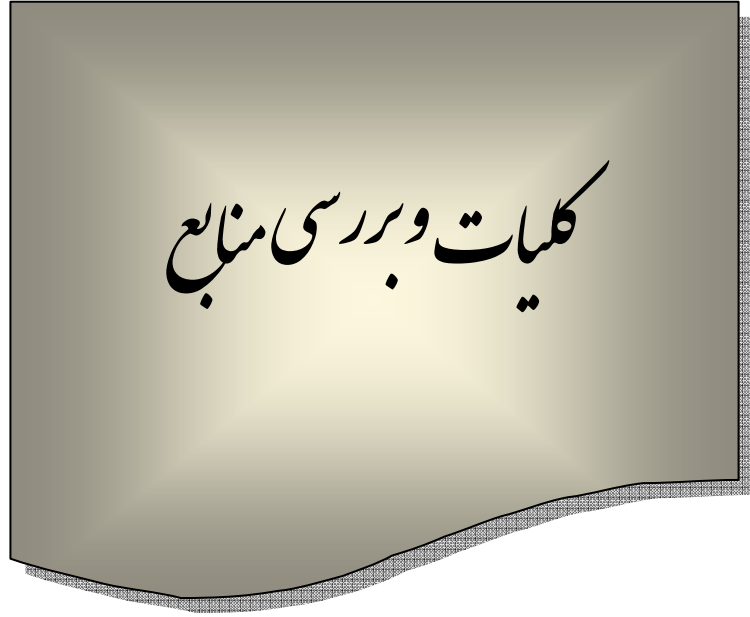
سلول‌های جانوری باید بتوانند انرژی موجود در محیط را به انرژی الکتریکی (سامانه عصبی)، مکانیکی (حرکت)، اسمزی (سامانه دفعی) و اشکال مختلف انرژی شیمیایی تبدیل کنند. منبع این انرژی‌های تغییر یافته از غذای خورده شده و گوارش یافته حاوی کربوهیدرات، چربی و پروتئین است که در لوله‌ی گوارش به ترکیبات ساده‌تری شکسته شده و توسط دیواره‌ی روده‌ی میانی به همولنف جذب می‌شوند [Klowden, 2007]. در فرایند گوارش، مواد غذایی به مولکول‌های کوچک‌تر شکسته شده و توسط سلول‌های پوششی لوله‌ی گوارش جذب می‌شوند [Klowden, 2007]. گوارش غذا شامل سه مرحله‌ی گوارش ابتدایی، میانی و نهایی است که پلیمرهای غذایی به الیگومر، دایمر و مونومر شکسته می‌شوند [Terra and Ferreira, 2012]. پروتئین‌ها توسط آنزیم‌های پروتئاز به اسید آمینه شکسته شده و از دیواره لوله‌ی گوارش جذب می‌شوند. کربوهیدرات‌ها جهت جذب از دیواره‌ی لوله‌ی گوارش توسط آمیلازها و گلوکوزیدازها به مونوساکارید تبدیل می‌شوند. چربی‌ها نیز توسط آنزیم‌های لیپازی تجزیه شده و به صورت اسید چرب و دی‌آسیل گلیسرول جذب می‌شوند [Klowden, 2007]. لوله‌ی گوارش شامل سه بخش جلوپی، میانی و عقبی است و بیشترین هضم در بخش میانی جایی که آنزیم‌ها ترشح می‌شوند، انجام می‌شود. تولید و ترشح آنزیم به الگوی تغذیه‌ی حشره وابسته بوده و توسط مواد شیمیایی موجود در غذا تنظیم می‌شود.

بررسی و مطالعه‌ی ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات اساس مطالعه‌ی فیزیولوژی دستگاه گوارش آنها است. در سال‌های اخیر استفاده از مهارکننده‌های گیاهی آنزیم‌های گوارشی و تولید گیاهان تراریخته‌ی دارای این مواد بازدارنده، اهمیت زیادی یافته است. برای رسیدن به چنین اهدافی شناخت ویژگی‌های بیوشیمیایی هر کدام از آنزیم‌های گوارشی لازم است [یزدانیان و همکاران، ۱۳۸۷].

هدف از این پژوهش:

- تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا-آمیلاز و گلوکوزیدازهای گوارشی لاروهای مگس زیتون.
- تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئازهای گوارشی لاروهای مگس زیتون.
- بررسی تغییر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای مگس زیتون تغذیه شده از ارقام مختلف.
- بررسی مهارکننده‌ی گیاهی بر فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی لاروهای مگس زیتون.

فصل اول



۱-۱- زیست شناسی مگس زیتون *Bactrocera oleae*

مگس زیتون (*Bactrocera oleae* (Gmelin) از راسته‌ی دیپلانا (Diptera) و خانواده‌ی Tephritidae است که آفت مخرب زیتون بوده و منشأ آن کشورهای حاشیه‌ی دریای مدیترانه می‌باشد. [Richard et al., 2003; Vossen et al., 2006]. لاروها مونوفاژ بوده و فقط از میوه‌ی زیتون تغذیه می‌کنند. حشرات بالغ نیز از شهد، عسلک، غذاهای مایع و نیمه جامد تغذیه می‌کنند. در مناطقی که مگس زیتون به خوبی مستقر شده است سبب از بین رفتن ۱۰۰٪ میوه‌ی زیتون و کاهش ۸۰٪ میزان روغن زیتون می‌شود [Zalom et al, 2009; Weems and Nation, 2009]. مگس زیتون از سایر مگس‌های میوه توسط لکه‌های کوچک تیره رنگ در نوک بال و نداشتن نوارهای عرضی روی بال تفکیک می‌شوند [Collier and Steenwyk, 2003; Zalom et al., 2009]. و یکی از کوچک‌ترین گونه‌ها در این جنس است [Weems and Nation, 2009].

۱-۲- پراکنش

از نظر تاریخی، حضور مگس زیتون در مناطق مدیترانه‌ای به قرن سوم قبل از میلاد برمی‌گردد [Vossen et al., 2006]. این آفت از هند، آفریقای شمالی، مکزیک، خاورمیانه و مناطق مدیترانه جنوب اروپا گزارش شد [Rice et al., 2003]. بنابراین مگس زیتون محدود به مناطقی است که درخت‌های زیتون اهلی و وحشی در آن یافت می‌شود [Daane and Johnson, 2010].

۱-۳- شکل شناسی مگس زیتون *Bactrocera oleae*

۱-۳-۱- حشره بالغ

طول افراد بالغ مگس زیتون ۴ تا ۵ میلی‌متر است [Vossen et al., 2004]. بدن به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز با خطوط زرد مایل به سفید در هر طرف قفسه سینه است [Vossen et al., 2006]. شاخک کوتاه و قهوه‌ای مایل به قرمز بوده و چشم‌های مرکب قهوه‌ای رنگ با درخشش سبز متالیک است [AL-Zaghal, 1985]. قفسه سینه سیاه رنگ پوشیده از موهای نقره‌ای در سطح پشتی با سه خط موازی سیاه رنگ است [Weems and Nation, 2009]. شکم به رنگ قهوه‌ای و در حاشیه جانبی بندها قسمتهایی تیره‌تر با اندازه‌های متفاوت مشاهده می‌شود [Rice, 2000; Vossen et al., 2004]. ماده‌ها با داشتن تخم‌ریز نوک تیز و تیره رنگ در انتهای شکم از نرها متمایز می‌شوند [Zalom et al., 2003].

۱-۳-۲- تخم

تخم مگس زیتون به شکل کشیده و سفید شیری است. متوسط طول تخم ۰/۸ میلیمتر با عرض ۰/۱۸ میلیمتر است [Avidov and Harpaz, 1969; Mustafa and Sharaf, 1994]. ماده‌ها با تخم‌ریز خود تخم‌ها را زیر پوست میوه در عمق ۱ میلیمتری می‌گذارند [AL-Momane and AL-A'ntare, 2008].

۱-۳-۳-۱- لارو

لاروهای مگس زیتون سفید مایل به زرد، بدون پا و دارای ۳ سن لاروی هستند [Mustafa and Sharaf, 1994; Zaloam et al., 2003]. لاروهای سن اول کوچک بوده و به سختی دیده می‌شود. کل مراحل لاروی درون میوه سپری شده [Zaloam et al., 2003; 2009] و لاروها در بیش‌ترین رشد به ۷ تا ۸ میلیمتر می‌رسند [AL-Zaghal, 1985; AL-Momane and AL-A'ntare, 2008].

۱-۳-۴- شفیره

شفیره‌ی مگس زیتون قهوه‌ای مایل به زرد به طول ۴ میلیمتر و عرض ۲ میلیمتر است [AL-Zaghal, 1985]. شفیره با داشتن غلاف اطرافش استوانه‌ای شکل به نظر می‌رسد [Mustafa and Sharaf, 1994; AL-Momane and AL-A'ntare, 2008]. (شکل ۱-۱).