Archive of SID

JESI

DOI: 10.22117/JESI.2020.351741.1394

نامه انجمن حشره‌شناسی ایران ۳۳۸-۳۲۳ ,(۳)۴۰ ,۱۳۹۹

JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2020, 40 (3), 323-338

ویژگی‌های بیوشیمیایی کربوهیدرازها و پروتئازهای گوارشی سوسک برگ‌خوار گندم، *Lema melanopa* (Coleoptera: Chrysomelidae)

محبوبه شریفی[۱،*]، محمد قدمیاری[۲] و نرگس معماری زاده[۳]

۱- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران و ۳- موسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mahboobehsharifi67@yahoo.com

چکیده

سوسک برگ‌خوار گندم، *Lema melanopa* L.، در دههٔ اخیر به یکی از آفات مهم گندم در استان گلستان تبدیل شده است. لارو و حشره کامل این آفت از برگ بیشتر غلات و همینطور گندم تغذیه و خسارت شدیدی ایجاد می‌کنند. با توجه به کمبود اطلاعات در زمینهٔ فیزیولوژی این آفت، در تحقیق حاضر ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا- آمیلاز، گلوکوزیداز، گالاکتوزیداز، و پروتئازهای دستگاه گوارش حشره کامل این آفت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، بیش‌ترین میزان فعالیت اسیدیته بهینه آنزیم در محدودهٔ ۴ تا ۶ و دمای بهینه ۳۵ درجهٔ سلسیوس مشاهده شد. با انجام الکتروفورز، دو ایزوفرم از آنزیم آلفا- آمیلاز لوله گوارش این حشره مشاهده شد. بیشینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز و آلفا و بتا گالاکتوزیداز لوله گوارش در اسیدیتهٔ ۵ و به ترتیب در محدوده دمایی ۳۵ تا ۴۵ درجهٔ سلسیوس به‌دست آمد. بیشینه فعالیت پروتئاز عمومی از میان انواع پروتئازهای لوله گوارش در اسیدیتهٔ ۶ و دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس نشان داد. نتایج بررسی اثر مهارکننده‌های آنزیمی شامل اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA)، توسیل ال- لیسیل کلرومتان هیدروکلراید (TLCK)، توسیل فنیل آلانین کلرومتیل کتون (TPCK)، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF)، یدواستات سدیم و یدواستیک اسید بر فعالیت آنزیم پروتئاز لوله گوارش نشان داد که مهار کننده‌های سیستئین پروتئازی بیش‌ترین میزان مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم را دارند. از این‌رو می‌توان چنین نتیجه گرفت که این گروه از پروتئازها در لوله گوارش سوسک برگ‌خوار غلات، غالب است. با مشخص شدن ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های مهم گوارشی آفات می‌توان ترکیباتی را سنتز کرد که کارآمدتر بوده و میزان مصرف حشره‌کش را کاهش داده و همچنین خسارت به محیط زیست را نیز کمتر کرد.

واژه‌های کلیدی: آلفا- آمیلاز، آلفا و بتا- گلوکوزیداز، آلفا و بتا- گالاکتوزیداز، بازدارنده‌های پروتئازی، پروتئاز، سوسک برگ‌خوار غلات.

Biochemical properties of digestive carbohydrases and proteases of cereal leaf beetle, *Lema melanopa* (Coleoptera: Chrysomelidae)

Mahboobeh Sharifi[1,*], Mohammad Ghadamyari[2] & Narges Memarizadeh[3]

1. Plant Protection Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran, 2. Department of Plant Protection, Agricultural Science Faculty, University of Guilan, Rasht, Iran & 3. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۱۴، پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۱.

دبیر تخصصی: سعید محرمی‌پور

www.SID.ir

Archive of SID

* Corresponding author, E-mail: mahboobehsharifi67@yahoo.com

Abstract

During recent decade, *Lema melanopa* L. has become one of the most important pests of wheat in Golstan province. Both adults and larvae of this pest feed on the leaves of most cereals and of course wheat and cause severe damage. Due to the lack of information about the physiology of this pest, in the present study, the biochemical properties of alpha amylase, glucosidase, galactosidase and gastro-intestinal proteases from adult stage of this pest were investigated. The results showed that the highest level of optimal enzyme activity was observed in the range of 4 to 6 and the optimum temperature of 35 ° C. Electrophoresis showed two isoforms of alpha-amylase in the gut of the insect. The maximum activity of alpha and beta glucosidase enzymes and alpha and beta galactosidase of the gut was obtained in acidity 5 and in the temperature range of 35 to 45°C, respectively. The highest general protease activity was shown among gut proteases at pH 6 and at 45°C. Obtained results regarding the effect of enzymatic inhibitors including EDTA, TLCK, TPCK, PMSF, sodium Iodo Acetate and Iodoacetic acid protease activity showed that cysteine proteinase inhibitors had the greatest inhibitory effect on enzyme activity. Therefore, it can be concluded that this group of proteases is dominant in the gut of cereal leaf beetle. By determining the biochemical properties of important gut enzymes of pest, compounds can be synthesized that are more efficient and reduce the consumption of insecticides and reduce the amount of damage to the environment.

Key words: alpha-amylase, α- and β- glucosidase, α- and β- galactosidase, protease inhibitor, proteases, cereal leaf beetle

Received: 4 September 2020, *Accepted:* 21 November 2020.

مقدمه

گندم با نام علمی *Triticum aestivum* L. ازتیرهٔ Poaceae، گیاهی تک لپه، خودگشن، یک ساله و روز بلند است و احتمالاً یکی از اولین گیاهانی است که بوسیله انسان زراعت شده است. سطح زیر کشت گندم کشور در سال زراعی ۹۶-۹۷ حدود ۵ میلیون هکتار برآورد شده که ۳۶/۱۶ درصد آن آبی و ۶۳/۸۳ درصد دیم است (Ahmadi *et al*., 2018).

در ایران بیش از ۷۰ گونه حشرهٔ گیاه‌خوار شناسایی شده‌اند که از گندم و جو تغذیه می‌کنند. از جمله این حشرات، سوسک برگ‌خوار گندم، *Lema melanopa* L. (Col.: Chrysomelidae)، است که طی چند سال اخیر میزان خسارت آن افزایش یافته و تبدیل به آفت جدی شده است. این آفت در بیشتر مناطق ایران به‌ویژه در مزارع واقع در کنار دریاچه یا برکه مشاهده شده و همچنین از بیشتر کشورهای اروپایی، آمریکا و بعضی از کشورهای آفریقایی نیز گزارش شده است (Seyyedi Sahebari, 2007). لاروها و حشرات کامل این آفت از پارانشیم رویی برگ به موازات رگبرگ‌های اصلی تغذیه نموده و محل خسارت آن‌ها روی برگ به صورت نوارهای طولی سفید رنگ دیده می‌شود. در بیش‌تر مناطق دنیا از جمله ایران، رایج‌ترین روش کنترل این آفت، استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی است. کنترل شیمیایی علیه پوره‌های سن گندم، *Eurygaster integriceps* (Puton, 1881)، روی این آفت نیز موثر است. در صورت شدت حمله، با مشاهده سه لارو یا سه تخم در هر بوته در مرحلهٔ غلاف و یا یک لارو در هر بوته در مرحلهٔ خوشه، کنترل شیمیایی توجیه خواهد داشت (Seyyedi Sahebari *et al*., 2000). اما استفاده بی‌رویه آفت‌کش‌ها منجر به طغیان آفات، آلودگی‌های زیست محیطی و نابودی دشمنان طبیعی می‌شود. درسال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای انجام شده تا شاید بتوان روش جایگزین مناسبی برای روش کنترل شیمیایی آفات پیدا کرد (Saberi Riseh *et al*., 2014).

بخش مهمی از غذای حشرات از ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها تشکیل شده است. به‌منظور فراهم شدن شرایط جذب این مولکول‌های بزرگ در معده حشرات، شکسته‌شدن آن‌ها توسط آنزیم‌های مربوطه ضروری است (Chapman, 1998). آنزیم‌های گوارشی حشرات بر حسب رژیم غذایی آن‌ها متفاوت است. در مورد حشرات همه چیزخوار، ترشح آنزیم‌های گوناگون، امکان هضم انواع مواد غذایی در روده میانی

www.SID.ir

Archive of SID

را فراهم می‌کند. آلفـــا- آمیلازها متعلق به گروه آنـــدو- آمیـــــلازها می‌باشند که موجب هیـــــدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی ۱ و ۴- آلفا- دی گلوکان گلوکانوهیدرولاز در پلی‌ساکارید (نشاسته و گلیکوژن) می‌شوند. گروه دیگری از کربوهیدرازها آلفا و بتا - گلوکوزیدازها و - گالاکتوزیدازها هستند که در هیدرولیز دی و الیگو- ساکاریدهای حشرات اهمیت دارند (Terra *et al*., 1996). این آنزیم‌ها در جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نقش محوری در سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها ایفا می‌کنند. بسیاری از حشرات، به‌ویژه حشراتی که مراحل لاروی و یا حشرهٔ کامل از فرآورده‌های غله‌ای تغذیه می‌کنند، برای زنده‌ماندن وابسته به آنزیم‌های کربوهیدرازی هستند (Franco *et al*., 2002). پروتئازها، از انواع آنزیم‌هایی هستند که باعث شکسته‌شدن پیوندهای پپتیدی اتصال‌دهنده اسیدهای آمینه می‌شوند. در نتیجه این آنزیم‌ها باعث تجزیه پروتئین‌ها می‌شوند؛ از سوی دیگر مهار این آنزیم‌ها و ممانعت از تشکیل اسیـــــدهای آمینه‌های ضروری، منجر به مـــرگ حشرات و میکروارگانسیم‌ها خواهد شد (Budatha *et al*., 2008).

موادی تحت عنوان بازدارنده‌های آنزیمی در گیاهان شناسایی شده‌اند که منجر به مقاومت در گیاهان نسبت به برخی از آفات می‌شوند. بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات اغلب پروتئینی بوده و به طور عمده در بافت‌های ذخیره‌ای گیاهان وجود دارند. این بازدارنده‌ها ممکن است تا میزان ۱۰ درصد از پروتئین کل این بافت‌ها را تشکیل دهند. این بازدارنده‌ها قادرند از هضم مواد غذایی در حشرات جلوگیری نموده و رشد حشرات را به تعویق بیندازند. بنابراین، این بازدارنده‌های گیاهی در صورت مواجه شدن با آفات و برخی از میکروارگانسیم‌ها، نقش مکانیسم دفاعی را ایفا می‌کنند (Ryan, 1999)، طی دهه‌های گذشته تلاش‌هایی در زمینه ایجاد گیاهان مقاوم به آفات از طریق مهار آنزیم‌های گوارشی صورت گرفته است (Leo *et al*., 2002). اولین قدم در این زمینه تعیین ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی است که تحقیقات متعددی در مورد آنزیم‌های گوارشی راستهٔ سخت‌بالپوشان انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعاتی که روی سرخرطومی ریزوم موز، *Cosmopolites sordidus* Germar؛ شپشه قرمز گندم، *Tribolium castaneum* Herbst؛ سوسک برگ‌خوار نارون، *Xanthogaleruca luteola* Müller و سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* Fabricius اشاره نمود (Montesdeoca *et al*., 2005; Oppert *et al*., 2005; Tatli *et al*., 2010; Sarboland *et al*., 2017).

با توجه به اهمیت هضم کربوهیدرات و پروتئین در حشرات از جمله سوسک برگ‌خوار گندم در امر تولید مثل و نشو و نما، هر گونه مداخله با آنزیم‌های کربوهیدرازی و پروتئازی می‌تواند کاهش‌دهنده فعالیت-های حیاتی در سوسک برگ‌خوار گندم بوده و رشد و نمو آن را به تعویق بیندازند (Sharma & Ortiz, 2000). راهبرد کنترل آفات، در مورد استفاده از بازدارنده‌های کربوهیدارت و پروتئین، با مداخله در هضم این ترکیبات به عنوان روشی کاربردی و امن برای کنترل حشرات گیاه‌خوار پیشنهاد شده است. بنابراین، آگاهی از فیزیولوژی و بیوشیمی آنزیم‌های گوارشی در حشرات حائز اهمیت است.

تاکنون در زمینه خصوصیات آنزیم‌های پروتئاز و کربوهیدراز در سیستم گوارشی سوسک برگ‌خوار گندم مطالعه‌ای صورت نگرفته است. به همین دلیل در این تحقیق ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گوارشی کربوهیدراز و پروتئاز و نیز پروتئاز غالب در دستگاه گوارش این حشره آفت به منظور دستیابی به روش‌های جدید کنترل مورد مطالعه قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری حشرات کامل، جداسازی و استخراج آنزیم از لوله گوارش سوسک برگ‌خوار گندم

حشرات کامل نر و ماده سوسک برگ‌خوار گندم به هنگام ظهر از سطح زیرین برگ‌های گندم از شهرستان گنبد کاووس استان گلستان به طور تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جدا کردن لولهٔ گوارش، ابتدا حشرات کامل روی یخ بی‌حس شدند. به منظور تشریح و خارج ساختن لولهٔ گوارش از حشرات کامل، ابتدا با استفاده از پنس بال‌ها و پاها را جدا کرده، سپس با ایجاد شکاف در سطح شکمی حشره دستگاه گوارش به طور کامل نمایان و از بدن خارج شد. برای مطالعات آنزیم‌ها ابتدا ۱۰ عدد لولهٔ گوارش بوسیلهٔ هموژنایزر دستی در آب مقطر مخلوط شدند. نمونه‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد (Gholamzadeh Chitgar *et al*., 2013).

اندازه‌گیری فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های کربوهیدراز و پروتئاز

فعالیت ویژهٔ آلفا- آمیلاز با استفاده از سوبسترای نشاسته یک درصد و با استفاده از روش Bernfeld (1995) اصلاح‌شده توسط Asadi *et al.* (2010)، اندازه‌گیری شد. از منحنی استاندارد مالتوز برای اندازه‌گیری فعالیت آلفا- آمیلاز استفاده شد. فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا- گلوکوزیداز و -گالاکتوزیداز بر اساس روش (Silva & Terra, 1997) اصلاح‌شده توسط Ghadamyari *et al*. (2010) به ترتیب با سوبستراهای پی- نیتروفنیل- آلفا- دی- گلوکوپیرانوزید (p-nitropenyl-α-D-glucopyranoside)، پی- نیتروفنیل- بتا- دی- گلوکوزیداز (p-nitropenyl-ß-D-glucopyranoside)، پی- نیتروفنیل- آلفا-دی- گالاکتوپیرانوزاید (p-nitropenyl-α-D-galactopyranoside) و پی- نیتروفنیل -بتا- دی- گالاکتوزیداز (p-nitropenyl-ß-D-galactopyranoside) (خریداری‌شده از شرکت سیگما) با غلظت ۲۵ میلی‌مولار برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شدند.

سنجش فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای آزوکازئین یک درصد طبق روش Garcia-Carreno *et al.* (1993) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. همچنین، میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها با استفاده ازروش Bradford (1976) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری اسیدیته (pH) و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم

در این آزمایش از بافر فسفات- گلایسین- استات ۴۰ میلی‌مولار استفاده شد و اثر pH های ۳ تا ۱۲ روی فعالیت‌های آنزیم‌های ذکر شده حشرات کامل سوسک برگ‌خوار گندم مورد ارزیابی قرار گرفت. اسیدیتهٔ بهینه برای فعالیت هر آنزیم تعیین شود. هم‌چنین، اثر دماهای ۱۰ تا۸۰ درجهٔ سلسیوس در pH بهینه روی عصاره آنزیمی تهیه شده از مرحله قبلی مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین پراسنجه‌های K_m و V_{max} برای آنزیم‌های آمیلاز

برای توصیف واکنش کاتالیز آنزیم نیاز به تعیین پراسنجه‌های K_m و V_{max} است. برای این منظور باید میزان تجزیه (سرعت واکنش) برای غلظت‌های مختلف سوبسترا اندازه‌گیری شود. به‌منظور اندازه‌گیری این پراسنجه، فعالیت آنزیم آمیلاز در پنج غلظت ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد نشاسته به‌عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار V_0 آنزیم در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار اکسل محاسبه و مقدار K_m و V_{max} با استفاده از نرم‌افزار هایپر اندازه‌گیری شد (Sharifi *et al*., 2011).

www.SID.ir

Archive of SID

ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید (Native PAGE) و زایموگرام آلفا آمیلاز

برای انجام این کار از روش Davis (1964)، اصلاح‌شده توسط Asadi *et al.*(2010) استفاده شد.

اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت پروتئازی

اثر بازدارنده‌های EDTA (۲ میلی‌مولار)، یدواستات (۵ میلی‌مولار)، TLCK، TPCK و PMSF (۱ میلی-مولار) روی فعالیت پروتئازی لوله گوارش بررسی شد. بازدارنده‌های با غلظت‌های ذکر شده نخست با عصاره آنزیمی مخلوط شده و مشابه سایر مراحل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تعیین شد. سپس درصد مهار هر کدام از این مهارکننده‌ها مشخص شد.

تجزیهٔ آماری

کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. باتوجه به اینکه داده‌ها از نظر آماری مورد قبول بودند، هیچ گونه نرمال‌سازی روی آن‌ها انجام نشد و تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده ازآزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت (SAS, 2002). رسم نمودارها و مرتب کردن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل 2007 انجام شد.

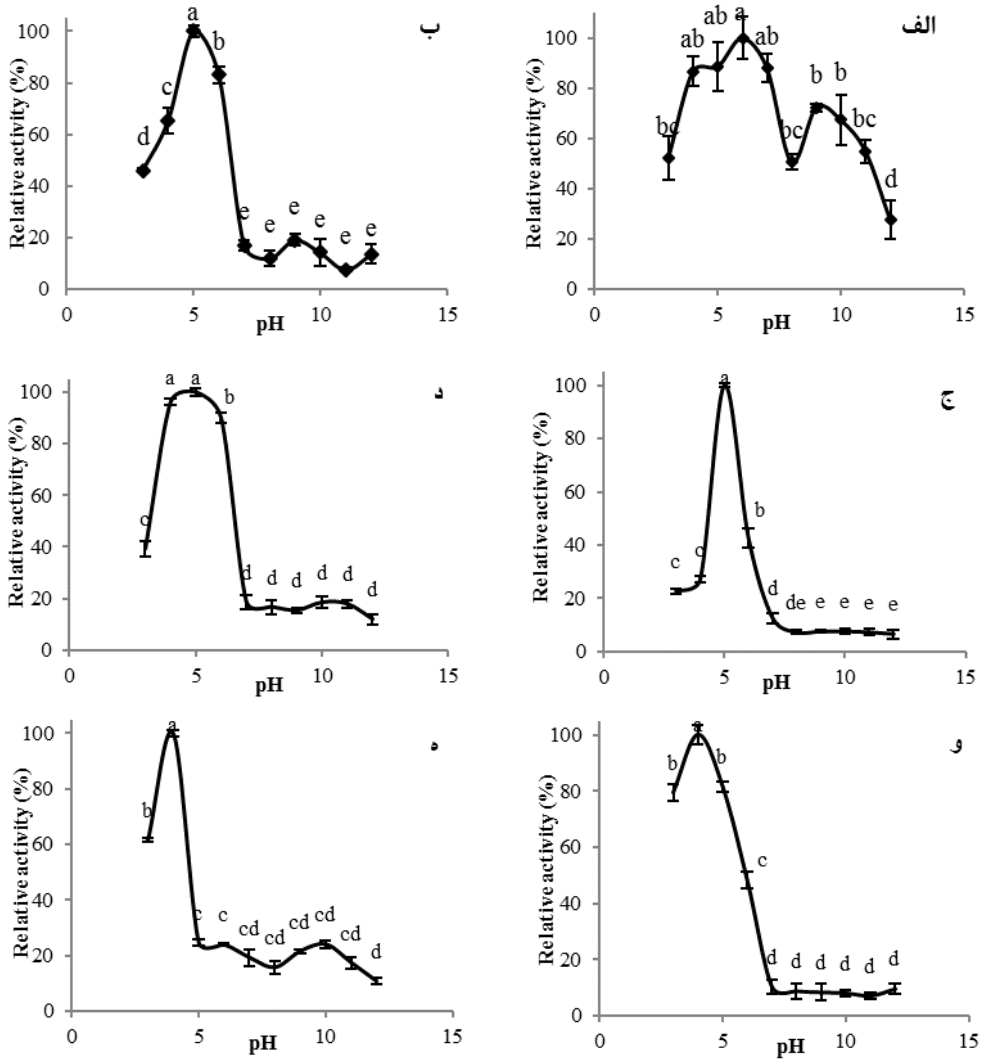
نتایج و بحث

تاثیر اسیدیته روی فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و کربوهیدرازی

از آنجایی‌که بیش‌ترین خسارت و تحرک سوسک برگ‌خوار غلات مربوط به حشره کامل است، این مرحله از زندگی این آفت برای بررسی و سنجش فعالیت آنزیمی انتخاب شد. گزارش‌های مختلفی در زمینه میزان اسیدیته معده و اثر آن روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات مختلف وجود دارد. دلیل اصلی بررسی اسیدیته بهینه آنزیم‌های گوارشی، در نظر گرفتن این اطلاعات هنگام یافتن مهارکننده‌های مناسب است به طوری‌که بازدارنده بتوانند در آن دامنهٔ مشخص pH فعالیت قابل توجهی داشته باشند. بیش‌ترین فعالیت آنزیم پروتئاز در اسیدیتهٔ ۴ تا ۷ مشاهده شد. اسیدیتهٔ بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز ۵ به دست آمد (نمودار ب در شکل ۱). همان‌طور که در نمودار ج و د در شکل ۱ مشاهده می‌شود، pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا- گلوکوزیداز، به ترتیب ۵ و ۴ تا ۵ می‌باشد. این مقدار برای فعالیت بهینه آنزیم آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز، ۴ به‌دست آمد (شکل ۱ ج).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- اثر اسیدیته روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم‌های پروتئاز (الف)، آلفا- آمیلاز (ب)، آلفا- گلوکوزیداز (ج)، بتا- گلوکوزیداز (د)، آلفا- گالاکتوزیداز (ه) و بتا- گالاکتوزیداز (و) معده میانی *L. melanopa*

* میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 1. The effect of pH on the relative activity of protease (a), alpha-amylase (b), alpha-glucosidase (c), beta-glucosidase (d), alpha-galactosidase (e) and beta-galactosidase (f) extracted from the midgut of *L. melanopa*

* Means with same letters are not statistically significant difference at the probability level of 5%.

مطالعات انجام شده روی لارو سوسک *Alphitobius diaperinus* Panzer نشان داد که فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز این آفت در محدوده pH اسیدی ۵ فعال می‌باشد (Cruz *et al.*, 2018)، Valencia *et al.*(2000) میزان pH بهینه ۵ را برای آلفا- آمیلاز سوسک، *Hypothenemus hampei* Ferrari، گزارش کردند. Silva & Terra (1999) مقدار اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز در سوسک زرد آرد، *Tenebrio molitor* L.، را ۵/۸ به‌دست آوردند. طی تحقیقات Baker (1991) اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا – آمیلاز در حشرات راسته‌های

www.SID.ir

Archive of SID

سخت بالپوشان و جوربالان در محدودهٔ اسیدی متمایل به خنثی و در راسته‌های بال‌پولکداران و بال‌غشاییان در محدودهٔ قلیایی است.

در پژوهشی Riseh *et al.* (2012)، pH بهینه برای آلفا- و بتا- گلوکوزیداز سرخرطومی حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier را ۵ به دست آوردند. نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که pH ۵، برای آنزیم آلفا- و بتا- گلوکوزیداز در لوله گوارش سوسک برگ‌خوار غلات بهینه است. Sharifi *et al.*(2011)، pH بهینه برای آنزیم‌های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز سوسک برگ خوار نارون را به ترتیب ۴ و ۳ گزارش نمودند. در مطالعات Tatli *et al.* (2010) بیش‌ترین فعالیت آنزیم سیستئین پروتئاز در سوسک برگ‌خوار نارون، *X. luteola* در محدوده pH اسیدی در گستره‌ای حدود ۳ تا ۶ به دست آوردند. Safaei Khorram *et al.* (2010) اسیدیته بهینه برای بیشینه فعالیت آلفا- آمیلاز در سوسک کلرادو، *Leptinotarsa decemlineata* Say، را ۶/۴ گزارش کردند. Tabatabaei *et al.* (2011) میزان اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- گلوکوزیداز لمبه گندم *Trogoderma granarium* Everts، را در محدوده ۶ تا ۸ و برای بتا-گلوکوزیداز محدوده ۶ تا ۷ گزارش کردند. Asadi *et al.* (2010)، pH بهینه برای آنزیم آلفا- و بتا- گلوکوزیداز در سوسک برگ‌خوار توسکا، Fabricius *Galerucella lineola*، را ۵ به‌دست آوردند. هم‌چنین Yapi *et al.* (2007)، pH بهینه برای فعالیت آنزیم بتا- گالاکتوزیداز سرخرطومی خرما *Rhynchophorus palmarum* L. را نیز ۵ گزارش نمودند. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازهای لوله گوارش سوسک برگ‌خوار غلات نیز در pH اسیدی فعالیت بهینه دارند.

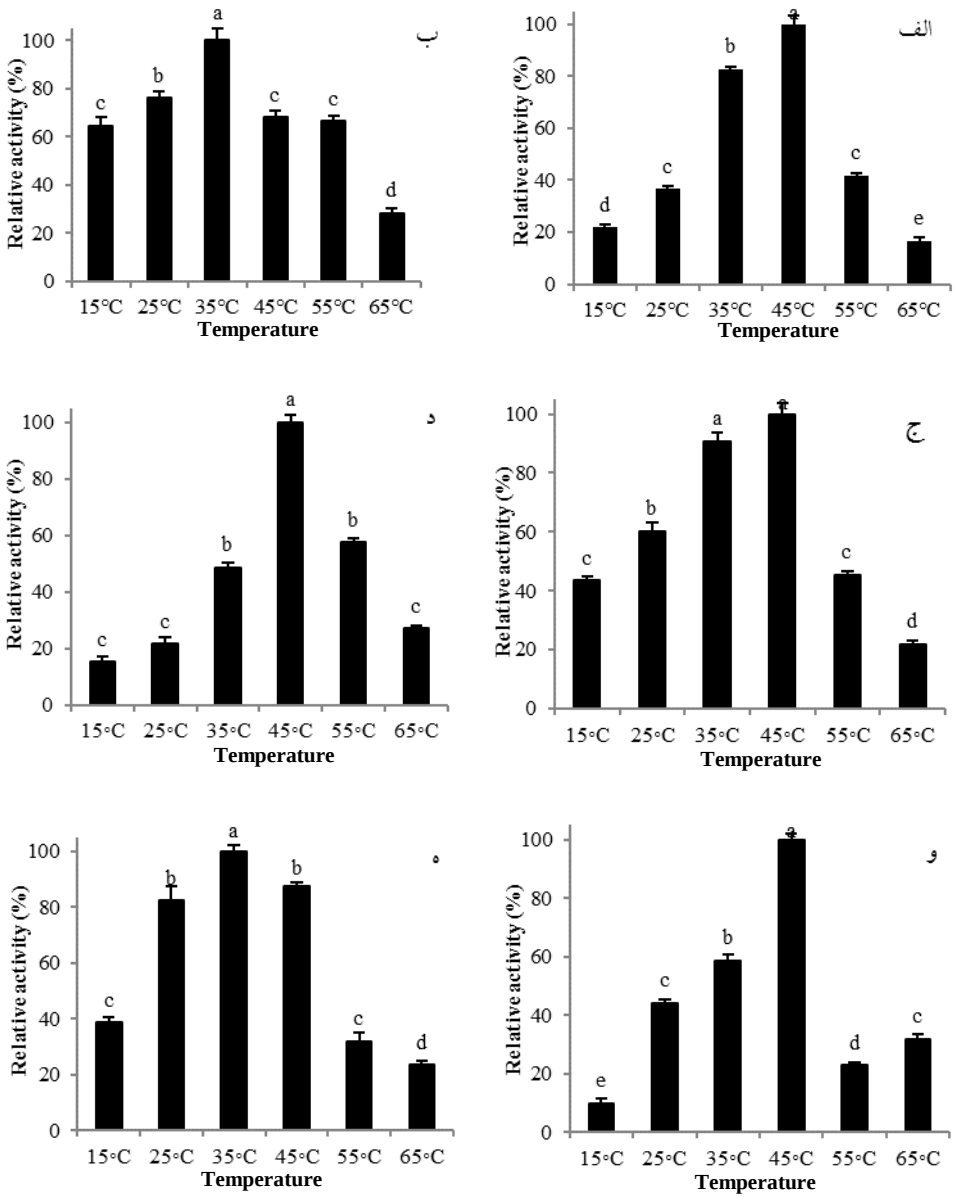
طی تحقیقات انجام شده روی میزان pH بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز روی سوسک *Callosobruchus maculatus* Fabricius در صورتی که سوبسترای آن آزوکازئین باشد در محدوده ۴-۵ محاسبه شد که در مورد این آفت ترکیبی از سیستئین و سرین پروتئازها فعال می‌باشند (Sarboland *et al.*, 2017). Montesdeoka *et al.* (2005)، pH بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز در حضور سوبسترای آزوکازئین در سرخرطومی موز *Cosmopolites sordidus* Germar، ۶ بدست آورد. Oppert *et al.* (2005)، pH بهینه برای بیشینه فعالیت پروتئاز در شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* Herbst را ۴/۲، که در محدوده فعالیت سیستئین پروتئازها می باشد را گزارش نمودند. pH بهینه برای سوسک برگ خوار غلات در این تحقیق ۶ به دست آمد که نشان دهنده ی وجود سیستئین پروتئینازها در لوله گوارش این حشره می باشد.

تاثیر دما روی فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و کربوهیدارزی

هر آنزیم در دمای مطلوب و خاص خود قادر است که بیش‌ترین فعالیت را داشته باشد (Hori, 1973). Tatli *et al.* (2010) بیش‌ترین فعالیت آنزیم پروتئاز سوسک برگ‌خوار نارون، *X. luteola*، در حضور سوبسترای آزوکازئین در دمای بهینه ۳۷ درجه سلسیوس به دست آوردند. Safaei Khorram *et al.* (2010)، دمای بهینه برای بیشینه فعالیت آمیلاز سوسک کلرادو، *L. decemlineta*، در دمای بهینه ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده نمودند، در حالی که این آنزیم در طیف گسترده‌ای دمایی به ترتیب از ۲۵ تا ۴۶ درجه سلسیوس فعال بودند. هم‌چنین، Vatanparast & Hosseininaveh (2010) اظهار داشتند که دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم در سرخرطومی یونجه، *Hypera postica* Gyllenhal، ۳۵ درجه سلسیوس می‌باشد که با نتایج تحقیق حاضر هماهنگ است. به گزارش Josephrajkumar *et al.* (2006) دمای بهینه برای بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در لوله گوارش حشره *Conogethes punctiferalis* Guenée، ۴۰ درجه سلسیوس گزارش کردند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- اثر دما روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم پروتئاز (الف)، آلفا- آمیلاز (ب)،آلفا- گلوکوزیداز (ج)، بتا- گلوکوزیداز (د)، آلفا- گالاکتوزیداز (ه) و بتا- گالاکتوزیداز (و) معده میانی *L. melanopa*

* میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 2. The effect of temperature on the relative activity of protease (a), alpha- amylase (b), alpha-glucosidase (c), beta- glucosidase (d), alpha- galactosidase (e) and beta- galactosidase (f) extracted from the midgut of *L. melanopa*.

* Means with same letters are not statistically significant difference at the probability level of 5%.

دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز در سوسک برگ‌خوار نارون توسط Sharifi *et al.* (2011)، به ترتیب ۶۰ و ۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است. هم‌چنین دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا- گالاکتوزیداز سوسک حنایی خرما توسط Riseh *et al.* (2012) به ترتیب۶۰ و ۴۰ درجهٔ سلسیوس محاسبه شده است. با توجه به تحقیقات صورت گرفته، حدود ۹۰ درصد از ساختار آنزیم‌ها، پروتینی

www.SID.ir

Archive of SID

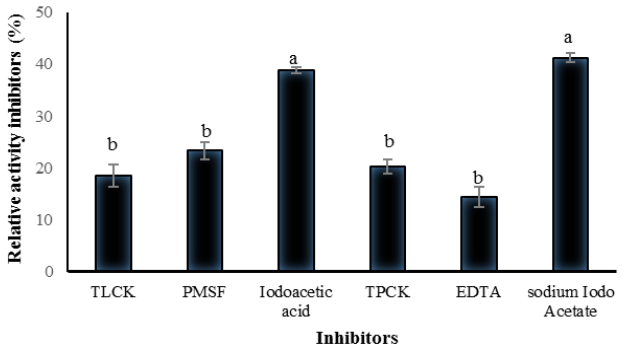
است. از طرفی زمانی این پروتئین‌ها قادر خواهند بود که بیش‌ترین فعالیت خود را نشان دهند که بتوانند به ساختار سه بعدی پایدار خود برسند، اما اگر کوچک‌ترین تغییری در این ساختار، به ویژه در ناحیه فعال آنزیم، ایجاد شود فعالیت آن‌ها به شدت کاهش می‌یابد. دما از جمله فاکتورهایی است که با ایجاد تغییراتی در ترکیب سه بعدی آنزیم فعالیت آن‌را کاهش می‌دهد. بعضی از تغییرات به‌طور کلی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها را متوقف می‌کنند، اما اگر محیط آنزیم‌ها به شرایط عادی برگردد، آنزیم فعالیت خود را دوباره به‌دست خواهد آورد. اگر تغییرات به حدی باشد که آنزیم به حالت اولیه بر نگردد، فعالیت آنزیم کاهش خواهد یافت (Sarboland *et al.*, 2017).

بررسی پراسنجه‌های K_m و V_{max} آنزیم آلفا – آمیلاز

مقدار K_m آنزیم آلفا– آمیلاز در لوله گوارش سوسک برگ‌خوار غلات برابر با ۰/۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و مقدار V_{max} در لوله گوارش برابر ۰/۱۳۷ میکرومول بر دقیقه به‌دست آمد. طبق بررسی Sharifi *et al.* (2011)، مقدار K_m و V_{max} آمیلاز سوسک برگ‌خوار نارون به ترتیب برابر با ۳۴/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵۲/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شده است. در پژوهش دیگری مقدار K_m برای آنزیم آلفا– آمیلاز در سوسک دانه غلات، *Rhysopertha dominica* Fabricius، ۰/۹۸ میلی‌گرم بر میلی‌متر گزارش شده است (Priya *et al.*, 2010). طی بررسی‌های Asadi *et al.* (2010) مقدار K_m برای معده میانی، غدد بزاقی و همولمف کرم سبز برگ‌خوار برنج *Naranga aenescens* Moore به ترتیب برابر با ۰/۰۹۷۲، ۰/۱۴۸ و ۰/۱۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و مقدار V_{max} در لوله گوارش، همولمف و غدد بزاقی را به ترتیب برابر با ۰/۲، ۰/۲ و ۰/۰۸ میکرومول بر دقیقه گزارش شده بود.

اثر بازدارنده‌های اختصاصی پروتئازها

مهارکننده‌های پروتئاز، پروتئازهای معده میانی حشرات را مهار می‌کنند. در نتیجه جذب مواد مغذی موثر در حشرات دچار مشکل می‌شود. پروتئینازهای گوارشی در حشرات گیاه‌خوار هدف مهارکننده‌های پروتئیناز موجود در گیاهان هستند.



شکل ۳– اثر بازدارنده‌های عمومی و اختصاصی روی فعالیت آنزیم پروتئاز *L. melanopa*

* میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig. 3. The effect of general and specific inhibitors on the protease enzyme activity of *L. melanopa*
* Means with same letters are not statistically significant differences at the probability level of 5%.

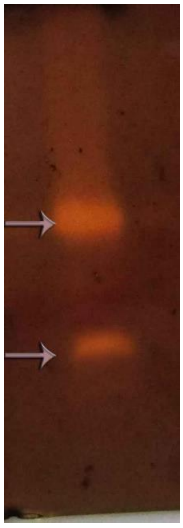
www.SID.ir

Archive of SID

در تحقیق حاضر اثر مهارکننده‌های آنزیمی مانند EDTA، TLCK، TPCK، PMSF، یدواستات سدیم و یدواستیک اسید روی فعالیت آنزیم پروتئاز لوله گوارش نشان داد که این بازدارنده‌ها به ترتیب ۱۳/۳۲، ۱۷/۱۴، ۱۹/۹۸، ۲۴/۱۲، ۳۹/۹۵ و ۳۴/۵۳ درصد فعالیت پروتئاز موجود در لوله گوارش را کاهش داده‌اند. بازدارنده‌های گیاهی پروتئاز به‌طور وسیعی در سرتاسر سلسله گیاهان یافت می‌شوند و این یک عمل‌کرد درونی و استراتژی دفاعی گیاهان در مقابل پروتئازهای خارجی موجود در حشرات و سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است (Ferry *et al*., 2005). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که بهره‌وری از بازدارنده‌های پروتئیناز در برابر آنزیم‌های گوارشی حشرات به خصوص سخت‌بال‌پوشان و بال‌پولک‌داران در مهندسی ژنتیک برای طراحی گیاهان مقاوم به آفت، اقتصادی و مهم است (Franco *et al*., 2002; Franco *et al*., 2004).

بررسی فعالیت آلفا– آمیلاز و پروتئاز روی ژل

در بررسی‌های Dojnov *et al.* (2010) روی لاروهای سوسک *Cerambyx cerdo* L. و سن *Eurygaster amura* L. سه ایزوفرم از آلفا– آمیلاز را در معده میانی گزارش کردند. در سوسک *Callosobruchus chinensis* L. تعداد ایزوفرم‌های آنزیم بیش‌تر از ۵ عدد است، در حالی‌که در سوسک‌های *Sitophilus oryzae* L. و *Tribolium castaneum* Herbst فقط یک ایزوفرم مشاهده شده است (Sivakumar *et al*., 2006; Wiseeing *et al*., 2008). نتایج تحقیق حاضر زایموگرام روی ژل، وجود دو باند فعالیت آمیلازی را در لوله گوارش سوسک برگ‌خوار غلات مشخص ساخت (شکل ۴).



شکل ۴– فعالیت آلفا– آمیلاز *L. melanopa* روی ژل

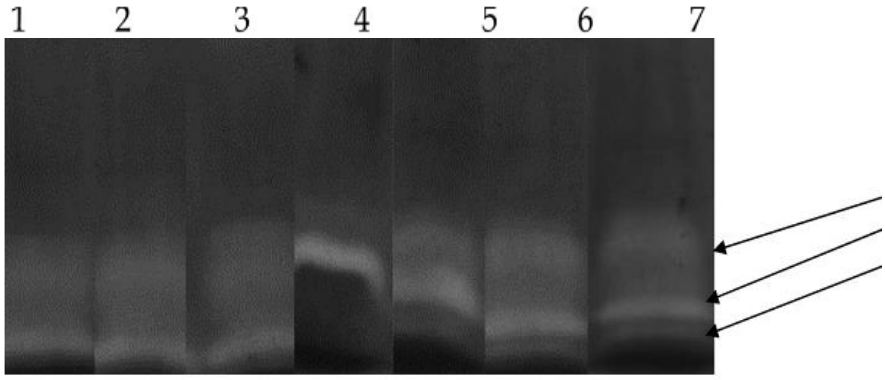
Fig. 4. The alpha- amylase activity of *L. melanopa* on the gel

.

در تحقیق حاصل سه ایزوفرم از آنزیم‌های پروتئازی در لوله گوارش سوسک برگ‌خوار غلات مشاهده می‌شود. با توجه به شکل ۵، بازدارنده یدواستات بیش‌ترین درصد بازدارندگی را روی پروتئازهای این حشره داشته داشته، بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از این باند ضخیم از نوع سیستئین پروتئاز است به‌طوری که این بازدارنده منجر به کم رنگ شدن باند پروتئازی شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- زایموگرام مربوط به اثر بازدارنده‌ها روی فعالیت پروتئازی لوله گوارش *L. melanopa*.
به ترتیب؛ ۱- PMSF، ۲- TLCK، ۳-یدواستیک اسید، ۴- یدو استات سدیم، ۵- TPCK، ۶-EDTA و ۷- شاهد.

Fig. 5. Zymogram related to the effect of inhibitors on protease activity of *L. melanopa*
1. PMSF, 2. TLCK, 3. iodoacetic acid, 4. sodium iodoacetate, 5. TPCK, 6. EDTA and 7. Control; respectively.

محدوده pH بهینه فعالیت آنزیم سیستئین پروتئاز، یعنی محدوده اسیدیته ۶ نیز این مطلب را اثبات می‌کند. Tatli *et al.* (2010) با استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی E-64، TLCK، TPCK، EDTA، PMSF و تقویت کننده‌هایی مانند ال- سیستئین در سوسک برگ‌خوار نارون، *X. luteola*، نشان دادند که بیش‌ترین فعالیت پروتئولتیکی دستگاه گوارش مربوط به سیستئین پروتئازها است. PMSF، بازدارنده سرین پروتئازها، TLCK بازدارنده تریپسین، TPCK بازدارنده کیموتریپسین، EDTA غیرفعال‌کننده متالو-پروتئازها (Patankar *et al.*, 2001) و یدواستات، یدواستامید و E-64 بازدارنده‌های سیستئین پروتئازها هستند (Grudkowska & Zagdanska, 2004). در تحقیقی دیگر Alarcon *et al.* (2002)، اثر بازدارنده‌های پروتئاز روی سرخرطومی حنایی خرما، *R. ferrugineus*، نشان دادند که بازدارنده‌های سرین پروتئاز SBTI، OVO، PMSF و سایر بازدارنده‌های TLCK، TPCK و EDTA به ترتیب ۷۸، ۸۳، ۶۱، ۱۷/۷، ۲/۹ و ۳۹ درصد فعالیت پروتئازی را کاهش می‌دهند.

سرخرطومی برگ یونجه، *H. postica*، سرخرطومی مو *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius و سرخرطومی غوزه پنبه *Anthonomus grandis* Boheman دارای روده میانی اندکی اسیدی بوده و سیستئین پروتئازها فعالیت اصلی هضم پروتئین ها را انجام می‌دهند. با این وجود، آسپارتیک و سرین پروتئازها در برخی از این گونه‌ها شناسایی شده‌اند (Wilhite *et al.*, 2000; Michaud *et al.*, 1995). در بررسی دیگر توسط Zhu-Salzman *et al.* (2003) اثر مهارکنندهٔ سیستئین پروتئاز استخراج شده از سویا (scN) نشان دادند که (scN) تاثیر منفی روی نشو و نما سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، *Callosobruchus maculates* Fabricius، دارد و با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز در حشراتی که از این رژیم غذایی استفاده نمودند، مشخص شد که فعالیت آنزیم پروتئاز در آن‌ها کاهش یافته است. همچنین برخی از گونه‌های سرخرطومی‌ها از جمله سرخرطومی برنج، *S. oryzae*، و سرخرطومی *Lissorhoptrus brevirostris* Kuschel، دارای پروتئازهای مختلف مانند سرین، سیستئین و آسپارتیک پروتئازها هستند (Alfonso *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2003).

با توجه به زایموگرام پروتئازی، انواع پروتئازها در لوله گوارش وجود دارد. اما با توجه به این‌که مهارکننده‌های سیستئین پروتئازی بیش‌ترین میزان مهارکنندگی را از خود نشان دادند، می‌توان نتیجه گرفت که

www.SID.ir

Archive of SID

این نوع پروتئاز، پروتئاز غالب در لوله گوارش سوسک برگ‌خوار غلات است. شناسایی جزئی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های موجود در لوله گوارش حشره آفت مورد بررسی در این مطالعه، تا حدی اطلاعات پایه برای شناخت و تولید بازدارنده‌های گیاهی در راستای کاهش سوء مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی را فراهم می-کند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان و همچنین گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان به جهت مساعدت‌های صورت گرفته برای انجام این پروژه کمال قدردانی را دارند.

References

Ahmadi, M., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Abedshahei, H. & Kazemiyan, A. (2018) *Agricultural statistics of the crop year 2017-2018*. Vol. 1, 2th ed. 99 pp. Ministry of Jahad Agriculture, Deputy of Planning and Economy, Information and Communication Technology Center press. [In Persian].

Alarcon, F. J., Martýnez, T. F., Barranco, P., Cabello, T., Dýaz, M. & Moyano, F. J. (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 265-274.

Alfonso, J. F., Ortego, F., Sanchez-Monge, R., Garcia-Casado, G., Pujol, M., Castanera, P. & Salcedo, G. (2003) Wheat and barley inhibitors active towards α-amylase and trypsin- like actives from *Spodoptera frgiperda*. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1729-1741.

Asadi, A., Ghadamyari, M., Sajedi, H. R., Jalali, J. & Tabari, M. (2010) Biochemical characterization of midgut, salivary glands and haemolymph α-amylases of *Naranga aenescens*. *Bulletin of Insectology* 63 (2), 175-181.

Baker, J. E. (1991) Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Insect Biochemistry* 21(6), 615-621.

Bernfeld, P. (1955) Amylase, α and β. *Methods in Enzymology* 1, 149-151.

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.

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.

Chapman, R. F. (1998) *The Insects Structure and function*. Vol. 1, 4th ed. 782 pp. Cambridge University Press.

www.SID.ir

Archive of SID

Cruz, W. O., Sinhori, G. G. C., Lima, C. A. R. & Pontes, E. G. (2018) Biochemical Properties of α-Amylase from Midgut of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) Larvae. *Neotropical Entomology* 47 (5), 698-708.

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.

Dojnov, B., Loncar, N., Bozic, N., Nenadovic, V., Ivanovic, J. & Vujcic, Z. (2010) Comparison of α-amylase isoforms from the midgut of *Cerambyx cerdo* L. (Coleoptera: Cerambycidae) larvae developed in the wild and on an artificial diet. *Archives of Biological Science Belgrade* 62 (3), 575-583.

Ferry, N., Jouanin, L., Ceci, L. R., Mulligan, E. A., Emami, K., Gatehouse, J. A. & Gatehouse, A. M. (2005) Impact of oilseed rape expressing the insecticidal serine protease inhibitor, mustard trypsin inhibitor on the beneficial predator *Pterostichus madidus*. *Molecular Ecology* 14, 337–349.

Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R. & Grossi- de- sa M. F. (2002) Plant α-amylase inhibitors and their interaction with Insect α- amylases, structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry* 269(2), 397-412.

Franco, O. L., Dias, S. C., Magalhes, C. P., Monteiro, A. C., Bloch, C., Melo, F. R., Oliveira-Neto, O. B., Monnerat, R. G. & Grossi-de-Sa, M. F. (2004) Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry* 65, 81–89.

Garcia-Carreno, F. L., Dimes, L. E. & Haard, N .F. (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases orproteinaceous protease inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214, 61- 69.

Ghadamyari, M., Hosseininaveh, V. & Sharifi, M. (2010) Partial biochemical characterization of α- and s-glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.: Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies* 333, 197–204.

Gholamzadeh Chitgar, M., Ghadamyari, M. & Sharifi, M. (2013) Identification and characterization of gut proteases in the fig tree skeletonizer moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). *Plant Protection Science* 49, 19–26.

Grudkowska, M. & Zagdanska, B. (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases, *Acta biochimica Polonica* 51(3), 609-624.

Hernandez, C. A., Pujol, M., Alfonso-Rubi, J., Armas, R., Coll, Y., Perez, M., Gonzalez, A., Ruiz, M., Castanera, P. & Ortego, F. (2003) Proteolytic gut activities in the rice water weevil, *Lissorhoptrus brevirostris* suffrian (Coleoptera: Curculionidae). *Archive of Insect Biochemistry and Physiology* 53, 19–29.

Hori, K. (1973) Comparative study of property of salivary amylase among various Heteropterous insects. *Comparitive Biochemestry and Physiology Part B* 42, 501-508.

www.SID.ir

Archive of SID

Josephrajkumar, A., Chakrabarty, R. & Thomas, G. (2006) Midgut proteases of the cardamom shoot and capsule borer *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and their interaction with aprotinin. *Bulletin of Entomological Research* 96, 91–98.

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.

Michaud, D., Bernier-Vadnais, N., Overney, S. & Yelle, S. (1995) Constitutive expression of digestive cysteine protease forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25, 1041–1048

Montesdeoca, M., Lobo, M. G., Casaas, N., Carnero, A., Castaera 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.

Oppert, B., Morgan, T. D., Hartzer, K., Lenarcic, B., Galesa, K., Brzin, J., Turk, V., Yoza, K., Ohtsubo, K. & Kramer K. J. (2005) 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.

Priya, S., Kaur, N. & Gupta, A. K. (2010) Purification, characterization and inhibition studies of a-amylase of *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 231-237.

Riseh, N. S., Ghadamyari, M. & Motamediniya, B. (2012) Biochemical characterization of á and â- glucosidases and á- and â-galactosidases from red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col.: Curculionide). *Plant Protection Science* 48, 85-93.

Ryan, C. A. (1999) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual* Review of *Phytopathology* 28, 425-449.

Saberi Riseh, N., Ghadammyari, M., Hosseininaveh, V., Motamedinia, B. & Aghaali, N. (2014) Effect of Inhibitors from Plant Seeds on Digestive Proteolytic Activities in Larvae of Date Palm Fruit Stalk Borer, *Oryctes elegans* Prell (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16: 981- 992.

Safaei Khorram, M., Farshbaf Pour Adab, R., Yazdaniyan, M. & Jafarnia, S. (2010) Digestive α-amylase from *Leptinotarsa decemlineta (Say)* (Coleoptera: Chrysomeli-

www.SID.ir

Archive of SID

dae): response to pH, temperature and some mineral compounds. *Advances in Environmental Biology* 4(1), 101-107.

Sarboland, S., Mehrkhou, F. & Imani, M. (2017). Gut Proteolytic Profile of Larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Response to Feeding on Different Fabaceous Host Plants. *Journal of Agriculture and Science Technology* 19, 121-132.

SAS (2002) PROC User's Manual. Version 9.0. 5th Ed. SAS Institute, Inc., Cary.

Seyyedi Sahebari, F., Talebi Chaichi, P. & Maliki Mialni, H. (2000) Biological study of cereal leaf beetle *Oulema melanopus* on wheat, pp. 14 in: *Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress.* Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran [in Persian]

Seyyedi Sahebari, F. (2007) Investigation on the life cycle of cereal leaf beetle, *Oulema melanopus* (L.) on wheat under field and laboratory conditions. *Pajouhesh and Sazandegi* 76, 142-147. [In Persian].

Sharifi, M., Gadamyari. M., Mahadavi, M. & Fetemeh, S. (2011) Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its α-amylase by inhibitors extracted from the common bean. *Archives of Biological Science Belgrade* 63 (3), 705-716.

Sharma, H. C. & Ortiz, R. (2000) Transgenics, pest management, and the environment. *Current Science* 79, 421–437.

Silva, C. P. & Terra, W. R. (1997) α- Galactosidase activity in ingested seeds and in the midgut of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 34, 443–460.

Sivakumar, S., Mohan, M., Franco, O. L. & Thayumanavan, B. (2006) Inhibition of insect pest α-amylases by little and winger millet inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 155-160.

Tabatabaei P. R., Hosseininave V., Goldansaz S. H. & Talebi K. (2011) Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14, 187–194.

Tatli, A., Bandani, A. & Naghdi, M. (2010) Study of the digestive protease in the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomylidae), 300 pp In: *Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress,* Tehran University, Karaj, Iran.

Terra, W. R., Ferreira, C., Jordao, B. P. & Dillon, R. J. (1996) Digestive enzymes, In: M. J. Lehane, Billingsley, P. F. (Eds), *Biology of the Insect Midgut*, pp. 153–193.Chapman and Hall, London.

www.SID.ir

Archive of SID

Valencia, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E. & Chrispeels, M. J. (2000) α-amylase of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 207-213.

Vatanparast, M. & Hosseininaveh, V. (2010) Digestive amylase and pectinase activity in the larvae of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of the Entomological Research Society* 40, 328-335.

Wilhite, S. E., Elden, T. C., Brzin, J. & Smigocki, A. C. (2000) Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 1181–1188.

Wiseeing, A., Engkagula, A., Wongpiyasatida, A. & Chuwongkomon, K. (2008) Purification and characterization of *Callosobruchus maculatus* α-amylase. *Kasetsart Journal: Natural Scienc* 42, 240-244.

Yapi, D. Y., Niamke, S. L. & Kouame, L. P. (2007) Biochemical characterization of a strictly specific beta-galactosidase from the digestive juice of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* larvae. *Entomological Science* 10, 343-352.

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.

www.SID.ir