

## کربوهیدرازهای گوارشی در لارو کرم خراط *Zeuzera pyrina* (Lep.: Cossidae)

محمد وطن پرست<sup>۱</sup>، وحید حسینی نوه<sup>۲\*</sup>، جاماسب نوذری<sup>۳</sup> و سیده مینو سجادیان<sup>۴</sup>  
۱، ۲، ۳، ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد  
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه گیاهپزشکی  
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲)

### چکیده

کرم خراط یک آفت کلیدی است که به درختان نارون و برخی درختان میوه در مرحله لاروی خسارت وارد می کند. روده میانی لارو در زیر استریومیکروسکوپ جدا شد و به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. اپتیمم فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز استخراج شده از روده میانی لارو به ترتیب در pH های ۸، ۶ و ۶ بدست آمد. دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز به ترتیب ۴۰، ۳۵ و ۳۵ درجه سلسیوس حاصل شد. در بررسی پایداری آنزیم ها، آلفا-آمیلاز در گستره pH های ۷ تا ۹ بیشترین پایداری را نسبت به pH های خیلی اسیدی و یا خیلی قلیایی داشت. بیشینه پایداری آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز از pH ۶ تا ۸ بدست آمد. هر چند که بیشترین پایداری آنزیم های مربوطه به ترتیب ۸ برای آلفا-آمیلاز و ۶ برای آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز می باشد. یون های کلسیم و سدیم دودسیل سولفات (SDS) موجب کاهش فعالیت آنزیم های بتا-گلوکوزیداز شد. در حالی که کلسیم موجب کاهش آلفا-گلوکوزیداز شد. پتاسیم و سدیم اثر معنی داری روی فعالیت بتا-گلوکوزیداز نداشت اما روی آلفا-گلوکوزیداز کمی اثر افزایشی داشت. SDS در ابتدا موجب افزایش و در غلظت نهایی موجب کاهش فعالیت آلفا-گلوکوزیداز شد. کلسیم و پتاسیم موجب افزایش فعالیت آلفا-آمیلاز شد و SDS هم موجب کاهش فعالیت این آنزیم گشت. بررسی های زایموگرام هم وجود دو باند برای آلفا-آمیلاز و ۱ باند برای آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز را به اثبات رساند. امید است یافته های این مقاله کمک شایانی را برای طرح ریزی استراتژی های کنترلی سالم همانند ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم فراهم آورد.

واژه های کلیدی: *Zeuzera pyrina*، گوارش، کربوهیدراز، آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز، بتا-گلوکوزیداز.

### مقدمه

بوده و به شاخه و تنه های بیش از ۱۵۰ گونه درختی و بوتهای حمله می کند (Balachowsky and Mesnil 1935; Carter 1984; Gatwick 1992). گردو و سیب از

کرم خراط در چند سال گذشته تبدیل به آفت مهمی در ایران شده است. لارو این حشره چوب خوار

بالان، دوبالان، بال‌غشاییان، بالپولکداران و سخت-بالپوشان اشاره کرد (Terra and Ferreira, 1994). به عنوان مثال دو ایزوزایم اصلی از آلفا-آمیلاز در *Drosophila melanogaster* (Doane, 1969) و در مقابل تنها یک فرم مولکولی از این آنزیم در حشراتی چون *Podoler and Callosobruchus chinensis* (Applebaum, 1971) توسط *Tenebrio molitor* (Buonocore et al., 1976) طی مطالعات (Kanekatsu, 1978) و *Zabrotes subfasciatus* بوسیله (Campos et al., 1989) گزارش شده است. در مطالعه‌ای خصوصیات آلفا-آمیلاز در *Sitophilus granarius* و *Sitophilus zeamais* نیز مورد بررسی قرار گرفته است. (Baker, 1983) مشاهده کرده است که یون‌های کلرید فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد. Baker همچنین تعداد ایزوفرم‌های فعال این آنزیم را برای *S. zeamais* دو عدد و برای *S. granarius* یک فرم مشاهده کرده است. بررسی‌های انجام شده روی *Sitophilus oryzae* و *Tribolium castaneum* وجود دو ایزوزیم از آلفا-آمیلاز را نشان داد (Chen et al., 1992) ساختار آنزیم‌ها در بسیاری از موجودات شبیه هم است. به عنوان مثال اشعه X نشان داد ساختار آلفا-آمیلاز باکتری *Alteromonas haloplanctis* بسیار شبیه پستانداران می‌باشد (Aghajari et al., 1998). در برخی موارد گزارشاتی حاکی از خالص‌سازی این آنزیم نیز به چشم می‌خورد (Lemos et al., 1990; Terra and Ferreira, 1994). بسیاری از آلفا-آمیلازها از منابع اصلی خود خالص‌سازی شده‌اند و در بعضی موارد ساختارهای ۳بعدی آنها با استفاده از کریستالوگرافی بررسی شده است (MacGregor, 1993). بررسی آلفا-آمیلاز در سخت‌بالپوشان آفت حتی تا سطح بررسی جزئیات و ساختمان آن صورت گرفته است (Grossi de Sa MF et al., 1997; Strobl S et al., 1998). در سطوح مولکولی نیز خصوصیات آنزیمی آلفا-آمیلاز در عصاره آنزیمی استخراجی از برخی سوسک‌ها مطالعه شده است (Applebaum et al., 1965). آلفا-گلوکوزیداز نیز عمل هیدرولیز پیوندهای  $1,4-\alpha$ -glucosidic را کاتالیز می‌کند. وجود این آنزیم در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش حشرات از جمله

میزبان‌های ترجیحی این حشره می‌باشند (Hristina Kutinkova et al., 2006). این آفت در مرحله لاروی با ورود به شاخه و تنه درختان و گیاهان بوته‌ای موجب ضعف گیاه شده و همچنین در برخی موارد مرگ گیاه را به دنبال دارد (Hristina Kutinkova et al., 2006). در کشور بلغارستان این حشره تبدیل به آفت جدی برای درختان سیب شد. به طوری که در ناحیه پلودیو این کشور از سه سال قبل به دلیل عدم توجه به این آفت حدود ۳۰ درصد از درختان سیب این منطقه نابود شد (Hristina Kutinkova et al., 2006). امروزه حشره‌کش‌های شیمیایی سهم زیادی را در مبارزه با آفات به خود اختصاص داده اند (Ascher KRS, 1993). در حالی که اثرات جانبی ناشی از سموم روی انسان‌ها، حیوانات، محیط زیست، بحث مقاومت آفات به سموم و اثرات باقی‌مانده سموم در غذاها از آثار مخرب آفت کش‌هاست، اما متأسفانه امروزه استفاده از حشره‌کش‌ها در مبارزه با آفات به یک شیوه کنترل رایج تبدیل شده است (Rodriguez et al., 2003; Regnault-Roger et al., 2004) از طرفی بسیاری از این سموم انتخابی نیستند و می‌توانند خطرناک ظاهر شوند (Breuer M et al., 2000) بسیاری از حشرات از جمله کرم خراط برای زنده‌مانی در رژیم غذایی خود به پلی‌ساکاریدها و از آن جمله کربوهیدرات‌ها نیازمند می‌باشند (Mendiola-Olaya et al., 2000). کربوهیدرات‌ها تحت تاثیر کربوهیدرازها به واحدهای دی و مونومری تبدیل شده و نهایتاً برای حشره قابل جذب خواهند شد. از جمله مهمترین این کربوهیدرازها می‌توان به آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز اشاره کرد. آلفا-آمیلاز ( $\alpha$ -1,4-glucanohydrolase EC.3.2.1.1) یک آنزیم هیدرولیز کننده است که به طور کلی در طبیعت وجود دارد و در میکرو ارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران وجود دارد. این آنزیم عمل هیدرولیز پیوندهای  $\alpha$ -D-(1,4)-glucan در ترکیباتی همچون نشاسته، گلیکوژن و دیگر کربوهیدرات‌ها را کاتالیز می‌کند (Janecek S., 1997; MacGregor EA et al., 2001). در مورد حشرات نیز وجود این آنزیم در سیستم گوارشی در موارد زیادی مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به راسته‌های راست-

گوارشی حشرات می‌باشند (Oppert, 2000, Oppert *et al.*, 2000)

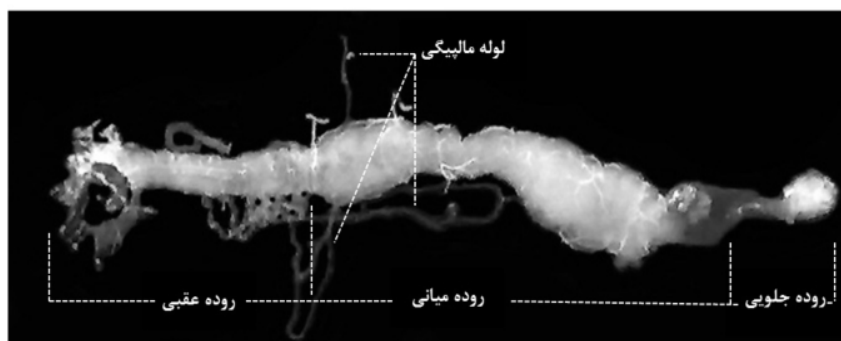
امروزه انتقال ژن پروتیین‌های مهارکننده به گیاهان و تولید گیاهان مقاوم بر پایه مختل‌کننده فیزیولوژی گوارش حشرات از روش‌های جدید کنترل آفات می‌باشد (Oppert, 2000, Oppert *et al.*, 2000).

این مقاله بررسی سه آنزیم مهم آلفا-آمیلاز، آلفا و بتا-گلوکوزیداز را در روده میانی لارو کرم خراط بررسی می‌کند. امید است که داده‌های موجود در این مقاله کمک شایانی به مدیریت کنترل این آفت را فراهم آورد.

### مواد و روش‌ها

#### جمع آوری لارو کرم خراط

شاخه‌های آلوده به خسارت کرم خراط به آزمایشگاه منتقل و پس از شکافتن شاخه‌ها، لارو در حال فعالیت به ظرف تشریح منتقل شد. عموماً در هر شاخه‌ی آلوده یک لارو فعال وجود داشت. تشریح و جداسازی روده میانی لاروها درون آب مقطر سرد با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند، سپس به کمک پنس بدن لارو را نگه داشته و برای جدا کردن روده میانی از سیستم گوارشی توسط پنس دیگر، قسمت انتهایی بدن از هم باز می‌گردد که در این حالت روده میانی بطور کامل آشکار می‌شود. بافت‌های جدا شده در داخل میکروتیوب‌های حاوی نیم میلی لیتر آب مقطر سرد قرار داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱- بخش‌های مختلف دستگاه گوارش لارو پروانه فری

روده میانی و غدد بزاقی گزارش شده است. که از این حشرات می‌توان به *Apis mellifera* به وسیله‌ی (Terra *et al.*, 1994; R.J. Baker *et al.*, 1972) *Glyphodes* *al.*, 1996; و *pyloalis* طی مطالعات (Ghadamyari *et al.*, 2010)، و *Brachynema germari* با بررسی‌های (Ramzi and Hosseinineveh, 2010) اشاره کرد. بتا-گلوکوزیدازها هم در تجزیه کردن دی و الیگو ساکاریدهای حاصل از همی سلولز و سلولز و همچنین در برهم‌کنش‌های بین گیاه-حشره نقش دارند (W.R. Terra *et al.*, 1994). به طور کلی روی گلوکوزیدازهای گوارشی در حشرات مطالعات زیادی انجام شده است. از آن جمله می‌توان در راسته‌ی بالپولکداران به *Thaumetopoea pityocampa* (F. Pratviel-Sosa *et al.*, 2006) (Lep.: Notodontidae) که توسط (F. Pratviel-Sosa *et al.*, 1986) و *apollo* L. (Lep.: Papilionidae) و *Parnassius* نیز توسط (M. Nakonieczny *et al.*, 2006) اشاره کرد. البته می‌توان به بررسی این آنزیم روی برخی از سوسک‌ها نظیر (Yapi, *et al.*, 2009) *Rhynchophorus palmarum* L. (Col.: Curculionidae) و لارو *Rhagium inquisitor* (Col.: Curculionidae) (Chipoulet *et al.*, 1985) Cerambycidae، (Silva *et al.*, 2001) *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae) و نهایتاً (Ferreira *et al.*, 2001) *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae) اشاره کرد. این بررسی‌ها در واقع اولین مرحله در تولید گیاهان تراریخته‌ی دارای پروتیین‌های مهارکننده آنزیم‌های

منظور آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

#### تعیین فعالیت آمیلولیتیکی در روده میانی

جهت تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز از روش بیکر با اندکی تغییرات استفاده شد (Baker J.E. 1991). بدین

#### تهیه عصاره آنزیمی

روده‌های میانی جدا شده از بدن لارو توسط یک همگنه‌ساز دستی شیشه‌ای همگن شد. همگنه‌های حاصل در شرایط  $16000 \times g$  سانتریفوژ شد و در نهایت رونسین حاصل به عنوان عصاره‌ی آنزیمی جدا شد و به

بتا-گلوکوزیداز، در گستره‌ی pHهای ۳ تا ۱۱ برای آلفا-آمیلاز و ۲ تا ۱۲ برای آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری دمای بهینه آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

برای بررسی اثر دما بر فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز، آزمایش‌ها مطابق روش‌های ارایه‌شده در قسمت‌های «تعیین فعالیت آمیلولیتیک» و «تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز»، در دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سلسیوس) انجام شد.

### بررسی اثرات یون‌های مختلف بر فعالیت آنزیم‌ها

اثرات یون‌های  $\text{NaCl}$ ،  $\text{KCl}$ ،  $\text{MgCl}_2$  و  $\text{CaCl}_2$  در غلظت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی مولار بر فعالیت آنزیم‌ها در بافر با pH بهینه فعالیت که از آزمایش تعیین pH بهینه بدست آمده بود، بررسی گردید. بدین منظور پس از تهیه غلظت‌های مختلف از یون‌های مذکور، میزان ۵ میکرولیتر از این یون‌ها به مخلوط واکنش افزوده شد. برای کلیه یون‌ها نیز یک شاهد در ۳ تکرار انتخاب شد که به جای یون، دارای آب مقطر بود. اثرات یون‌ها و ترکیبات با مقایسه با شاهد بررسی گردیدند.

### بررسی میزان پایداری آنزیم با گذشت زمان

پایداری آنزیم‌ها در گستره‌ی pHهای ۳ تا ۱۱ در دو دوره زمانی مختلف انجام می‌گیرد. ابتدا آنزیم و بافرهای با pHهای مختلف را با هم مخلوط نموده و سپس به میزان ۱ و ۱۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه می‌گردند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، سوبستراهای مربوطه به مخلوط واکنش اضافه می‌گردد و ادامه آزمایش با توجه به قسمت تعیین فعالیت آمیلولیتیک و تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز انجام می‌گیرد.

### اندازه‌گیری پارامترهای کینتیکی

در این مطالعه اندازه‌گیری ثابت میکائلیس منتن ( $K_m$ ) و بیشترین سرعت واکنش ( $V_{max}$ ) اندازه‌گیری شد. سوپرناتانت مذکور در بافر مناسب فعالیت هر کدام از آنزیم‌ها (که برای هر دو آنزیم از بافر سترات-فسفات ۰/۱ مولار با pH ۶ استفاده شد) در دمای ۳۰ درجه

منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به همراه ۲۰ میکرولیتر سوبسترای ۱ درصد نشاسته در میکروتیوب حاوی ۸۰ میکرولیتر بافر ریخته شد. مخلوط آزمایش در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر معرف رنگی دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) به مخلوط واکنش افزوده شد. نهایتاً میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر مدل (Elx 808) اندازه‌گیری گردید. نمونه‌های کنترل همزمان با تیمارها انجام شد با این تفاوت که آنزیم در نمونه‌های شاهد بعد از افزودن DNS اضافه می‌گردید. تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

### تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز بر اساس روش سیگن تالر (۱۹۷۷) و لوو و همکاران (۱۹۸۶) با اندکی تغییر در آن روش‌ها انجام شد. بنابراین مقدار هیدرولیز سوبستراهای حاوی پارانیتروفنل،  $(pN\alpha G)$  برای آلفا-گلوکوزیداز و  $(pN\beta G)$  برای اندازه‌گیری فعالیت بتا-گلوکوزیداز به دست آمد. واکنش با ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۸۵ میکرولیتر بافر و ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی ۵ میلی مولار در مدت زمان ۲۰ دقیقه انجام شد، سپس واکنش با افزودن هیدروکسید سدیم یک مولار متوقف گردید و جذب توسط دستگاه میکروپلیت ریدر مدل (Elx808) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه‌های بلانک آنزیم بعد از اضافه کردن هیدروکسید سدیم افزوده شد. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

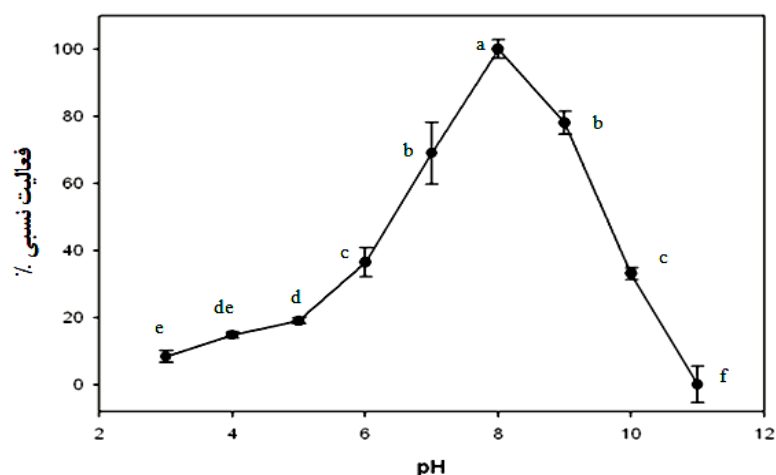
### اندازه‌گیری pH بهینه‌ی فعالیت

برای این منظور از بافر ۰/۱ مولار یونیورسال بورات-سیترات-فسفات استفاده شد. مقدار pH بهینه فعالیت جهت تعیین فعالیت این ۳ آنزیم (آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز) مطابق روش قسمت تعیین فعالیت آمیلولیتیک و تعیین فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و

آمیلاز و گلوکوزیداز یکسان می‌باشد. پس از جدا سازی ژل از شیشه‌ها، ژل‌های جداکننده به صورت جداگانه در سوبستراهای مربوطه؛ آلفا-آمیلاز در نشاسته ۱ درصد، آلفا-گلوکوزیداز در ۴-متیل-آمبلیفزیل-آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید ۳ میلی‌مولار و بتا-گلوکوزیداز در ۴-متیل-آمبلیفزیل-بتا-دی-گلوکوپیرانوزید ۳ میلی‌مولار قرار داده شدند. در مورد آلفا-آمیلاز ژل مربوطه پس از گذشت ۳۰ دقیقه از غوطه ور شدن و تکان دادن ملایم هم زمان آن، در محلول لوگول متشکل از ۱۰ میلی مولار و یدور پتاسیم ۱۴ میلی مولار قرار داده شد تا باندهای مربوطه به صورت نواحی روشن در زمینه تیره ظاهر شوند. جهت جلوگیری از ظاهر شدن باندهای مربوط به فسفریلاز سوبسترای نشاسته حاوی کلسیم کلرید ۱۲ میلی مولار است. در مورد گلوکوزیدازها پس از گذشت ۲۰ دقیقه پس از آنکوباسیون ژل درون سوبستراهای مربوطه، ژل‌های مذکور زیر لامپ UV بررسی می‌گردند و به محض آشکار شدن باندها از آنها عکس تهیه می‌گردد.

### نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌ها نشان داد که pH بهینه برای آنزیم آلفا-آمیلاز، ۸ می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی تغییرات میانگین فعالیت نسبی (±SE) آلفا-آمیلاز در گستره‌ی pH های ۳ تا ۱۰. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند ( $p < 0.05$ )

اسیدی بسیار کم است که این عامل می‌تواند به شرایط اسیدیته محیط روده میانی در بالپولکداران که عمدتاً

سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه روی گستره‌ی غلظت‌های ۰/۱۵۹ میلی‌مولار تا ۲/۵۴۴ میلی‌مولار از سوبستراهای pNβG و pNαG به ترتیب برای سنجش پارامترهای کینتیکی آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز به طور جداگانه برای هر آنزیم مورد آنکوباسیون قرار گرفت. کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار صورت گرفت. داده‌های نهایی بوسیله نرم افزار Sigmaplot<sup>®</sup> 10 مورد آنالیز قرار گرفت.

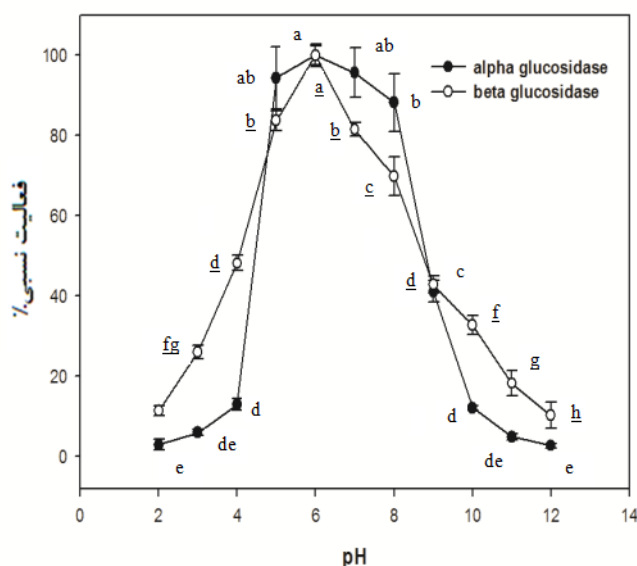
### الکتروفورز و زایموگرام

یکی دیگر از آزمایش‌ها، تعیین وجود فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی لارو سوسک برگ‌خوار نارون با استفاده از الکتروفورز است. بدین منظور از الکتروفورز غیراحیایی (PAGE) استفاده شد. شانزده میکرولیتر از نمونه آنزیمی در ۴ میکرولیتر بافر نمونه (متشکل از: ۶۲/۵ میلی‌مولار تریس-اسید کلریدریک با pH ۶/۸، گلیسرول ۱۰ درصد و بروموفنول بلو ۰/۰۱ درصد) حل گردید. نمونه حاصل در چاهک‌های ژل متراکم‌کننده (۵ درصد) قرار داده شد. پس از برقراری جریان ۸۵ ولت، عصاره آنزیمی در طول ژل جداکننده جهت جداسازی، به حرکت در آمد. تا این مرحله تمامی روش‌ها برای هر یک از ژل‌های الکتروفورز

این نتایج نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت آلفا-آمیلاز در محیط قلیایی است. فعالیت آنزیم در محیط

بدست آمد. اگرچه در برخی مطالعات pH مناسب آلفا-آمیلاز در برخی حشرات همانند *Trogoderma granarium* در گستره ۶ تا ۹ و تا حدودی قلیایی بدست آمده است (Hosseiniaveh et al., 2007). مسلماً اسیدیته روده میانی نقش مهمی را در ایجاد این اختلافات دارد که موجب بوجود آمدن گروهی از ایزوآنزیم‌هایی از آلفا-آمیلاز در این گروه از حشرات شده که جهت فعالیت در pH های قلیایی مناسب شده است. در بررسی pH بهینه در خصوص آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز روده میانی دستگاه گوارش لارو کرم خراط مناسب‌ترین pH بدست آمده ۶ بود. با توجه به این داده‌ها و pH بدست آمده از آلفا-آمیلاز، می‌توان این برداشت را داشت که احتمالاً اکثر کربوهیدرازهای گوارشی روده میانی این حشره در محیط‌های مایل به قلیایی تمایل به فعالیت بیشتری دارند زیرا که در pH های ۷ و ۸ نیز بیشتر از ۶۰ درصد فعالیت برای بتا و بیش از ۸۰ درصد برای آلفا-گلوکوزیداز بدست آمده است (شکل ۳).

قلیایی است هم برگردد. لازم به ذکر است که فعالیت آلفا-آمیلاز در اسیدیته‌ی بسیار قلیایی و محیط اسیدی نسبتاً زیاد (۶ به پایین) بسیار پایین است طوری که در pH ۱۰ میزان فعالیت به زیر ۴۰ درصد می‌رسد و در pH ۱۱ این فعالیت به صفر می‌رسد. در طرف دیگر از pH ۳ تا ۶ میزان فعالیت به زیر ۴۰ درصد کاهش یافته است. نهایتاً در pH ۸ بالاترین فعالیت را از خود بروز داده است. داده‌های ما در این زمینه با برخی از مطالعات صورت گرفته قرابت نزدیکی ندارد. به عنوان مثال pH بهینه برای *Hypothenemus hampei* ۵ بدست آمد (Valencia-Jimenez et al., 2000). یا در بررسی دیگری که روی *Brachynema germari* انجام شد pH بهینه برای روده میانی و غدد بزاقی به ترتیب ۵ و ۶ بدست آمد (Ramzi and Hosseiniaveh, 2010). همچنین برای *Tribolium castaneum* طی مطالعات (Applebaum and Konijn, 1965) محاسبه شد. مطالعاتی که روی آلفا-آمیلاز روده میانی *Callosobruchus chinensis* بوسیله‌ی (Podoler and Applebaum, 1971) انجام شد pH مناسب فعالیت ۵/۲



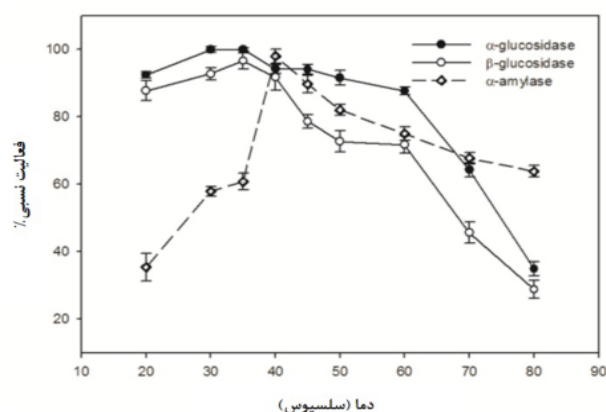
شکل ۳- بررسی تغییرات میانگین فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز ( $\pm$  SE) در گستره pH های ۲ تا ۱۲. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی داری ندارند ( $p < 0.05$ )

در معده *Glyphodes pyloalis* به ترتیب ۷/۵ و ۵/۵ بدست آمد (Ghadamyari et al., 2010). اما به طور کلی با توجه به شکل ۳ بیشترین فعالیت گلوکوزیدازهای

در بررسی‌های مشابه که در سایر حشرات صورت گرفت نیز نتایج مشابه با این نتایج بدست آمد. به عنوان مثال pH اپتیمم برای آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

حشره ۵/۵ و ۶ بود (Ramzi and Hosseinaveh, 2010) بهترین دمای فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی لارو پروانه فری به ترتیب ۴۰، ۳۵ و ۳۵ بدست آمد (شکل ۴).

روده میانی در لارو کرم خراط بین گستره‌ی pH ۵ تا ۸ می‌باشد. در بررسی دیگری که روی فعالیت معده و غدد بزاقی *Brachynema germari* انجام شد pH اپتیمم فعالیت به ترتیب برای روده میانی و غدد بزاقی این



شکل ۴- بررسی اثرات دما و مشخص نمودن دمای بهینه ی فعالیت آنزیم های آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

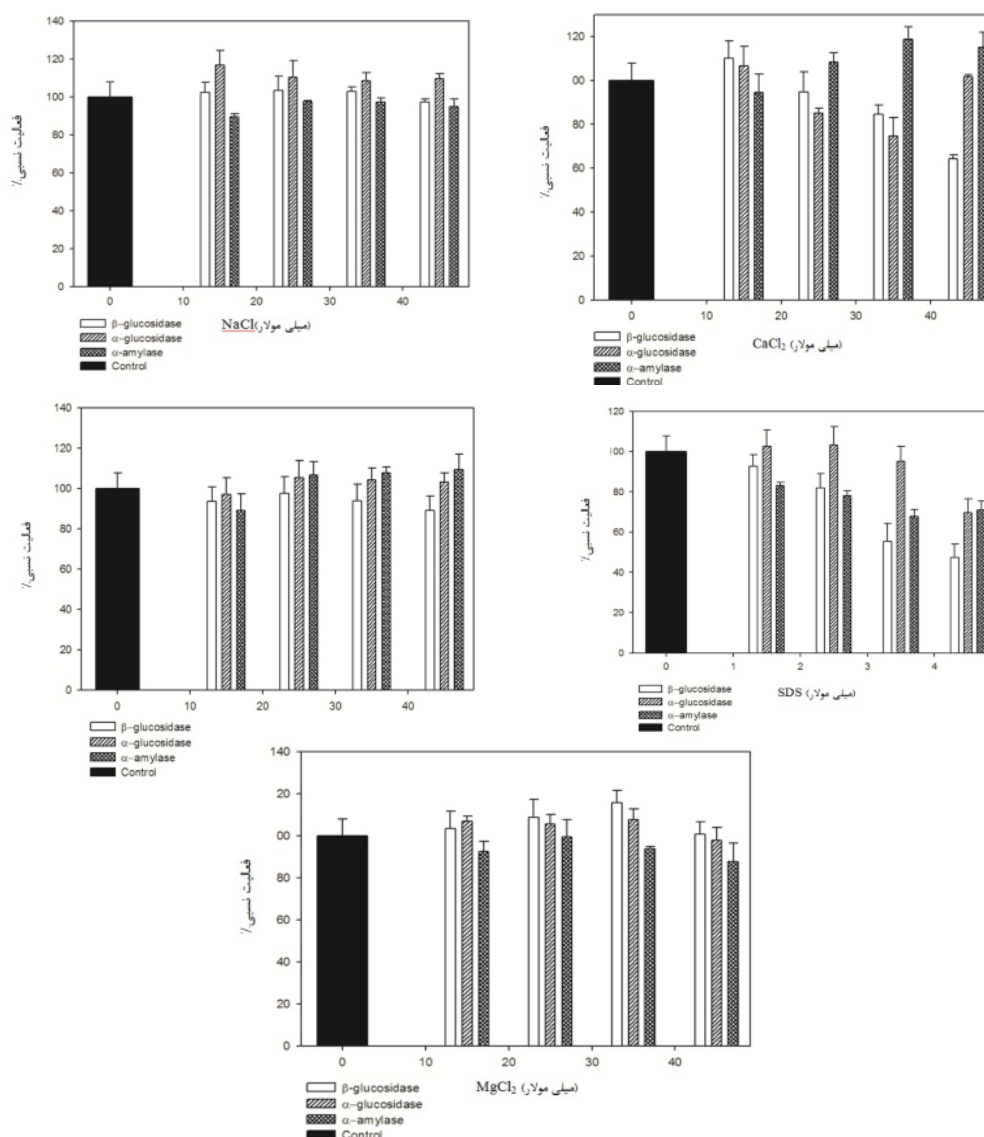
آمد. هرچند با افزایش دما فعالیت آنزیم سیر نزولی پیدا کرد (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000).

بررسی اثر یون‌های مختلف بر فعالیت این ۳ آنزیم نشان داد ( شکل ۵). فعالیت آلفا-آمیلاز تحت تاثیر یون‌های مختلف نوسانات مختلفی را بروز داد. KCl و CaCl<sub>2</sub> موجب افزایش فعالیت این آنزیم شدند. دیگر یون‌ها مانند MgCl<sub>2</sub>، NaCl و از همه بیشتر SDS موجب کاهش فعالیت آنزیم شدند. آلفا-گلوکوزیداز تحت تاثیر CaCl<sub>2</sub> فعالیت آن کاهش یافت. SDS هم در نهایت موجب کاهش فعالیت آنزیم شد. به طوری که در سه غلظت ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ میلی مولار تاثیر بسیار کمی بر فعالیت آنزیم داشت ولی در غلظت ۴/۵ میلی مولار، فعالیت به حدود ۷۰ درصد رسید. NaCl و MgCl<sub>2</sub> اثر افزایشی بر فعالیت آلفا-گلوکوزیداز نشان دادند. افزایش غلظت KCl اثرچندانی بر فعالیت آلفا-گلوکوزیداز نداشت. بتا-گلوکوزیداز ابتدا تحت غلظت ۱۵ میلی مولار از CaCl<sub>2</sub> روند صعودی در فعالیت را داشت. اما سایر غلظت‌های مختلف این یون با افزایش غلظت، موجب کاهش فعالیت روی این آنزیم شدند. KCl و SDS موجب کاهش فعالیت بتا-گلوکوزیداز شدند. NaCl تاثیر چندانی بر فعالیت این آنزیم نداشت. اما MgCl<sub>2</sub> نیز در مجموع تا حدودی موجب افزایش فعالیت این آنزیم شد.

با توجه به نمودار منحنی دما در ۳ آنزیم، فعالیت در آلفا-گلوکوزیداز از دمای ۲۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد. در این مورد گستره ی مشابهی برای بتا-گلوکوزیداز در دامنه ی دمای ۲۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس بدست آمد. دمای بالاتر از ۷۰ درجه سلسیوس فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز را به زیر ۵۰ درصد کاهش می‌دهد و سیر نزولی پیدا می‌کند. در آلفا-آمیلاز افزایش فعالیت از ۳۵ درجه به بعد شروع شده و در ۴۰ درجه سلسیوس به بیشترین مقدار خود می‌رسد و افزایش فعالیت کاملاً مشهود است. بررسی این داده در حشرات زیادی اندازه گیری شده است. داده‌هایی که از مطالعات روی سایر حشرات بررسی شد با داده‌های بدست آمده در این تحقیق مشابهت دارد. دمای بهینه فعالیت در آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز روده میانی *Brachynema germari* ۴۵ درجه سلسیوس بدست آمده است (Ramzi and Hosseinaveh, 2010). در بررسی دیگر دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز در روده میانی *Hypera postica* ۳۵ درجه سلسیوس محاسبه شده است (Vatanparast and Hosseinaveh, 2010). در بررسی‌های انجام شده روی *Prostephanus truncates* دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز بین ۳۰-۴۰ درجه سلسیوس بدست

در فعالیت آلفا-آمیلاز در روده میانی سرخرطومی برگ یونجه *Hypera postica* را سبب شد (Vatanparast and Hosseininaveh, 2010) مطالعاتی که روی *Rhynchophorus palmarum* صورت گرفت یون‌هایی همچون  $\text{CuCl}_2$ ،  $\text{ZnCl}_2$ ،  $\text{FeCl}_3$ ، DTNB و pCMB اثر مهارکنندگی روی بتا-گلوکوزیداز داشته اند. از طرفی  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{SrCl}_2$ ،  $\text{MnCl}_2$ ،  $\text{MgCl}_2$ ،  $\text{BaCl}_2$  این آنزیم نداشتند (Yapi et al., 2009).

اثر بازدارندگی SDS در آزمون‌های مختلف به اثبات رسیده است به عنوان مثال اثر این یون روی آلفا-آمیلاز موجود در روده میانی و غدد بزاقی سن *Brachynema germari* موجب کاهش فعالیت این آنزیم شد (Ramzi and Hosseininaveh, 2010) یون‌های  $\text{Cu}^{2+}$  و  $\text{Mg}^{2+}$  به ترتیب موجب افزایش و عدم تاثیر بر فعالیت هر دو آنزیم آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در سن *Lygus hesperus* شدند (Zeng and Cohen et al., 2001). در بررسی دیگری حضور  $\text{NaCl}$  و  $\text{KCl}$  افزایش محسوسی



شکل ۵- بررسی اثرات یون‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت سه آنزیم آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

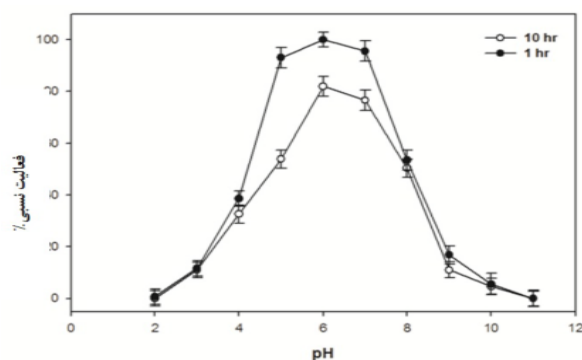
فعالیت را بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت داشت این در حالی است که در گستره‌ی pHهای ۵ تا ۷ فعالیت آنزیم

با توجه به داده‌های بدست آمده از نمودارهای پایداری آنزیم، آلفا-گلوکوزیداز در pH ۶ بیشترین

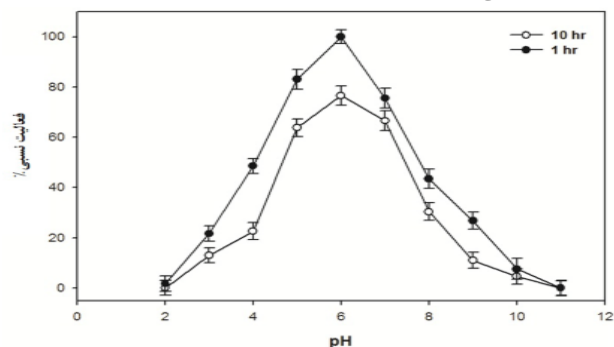


حالت خود در pH ۶ به ۸۰ درصد رسید (شکل ۸). در بررسی های مشابه بیشترین فعالیت آلفا-آمیلاز روده میانی در *Hypera postica* بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت در pH ۵ رخ داد و بعد از این روند نزولی پیدا کرد (Vatanparast and Hosseinaveh, 2010). بیشترین پایداری بتا-گلوکوزیداز روده میانی *Rhynchophorus palmarum* در گستره‌ی pH بین ۵ تا ۶ بدست آمد (Yapi et al., 2009).

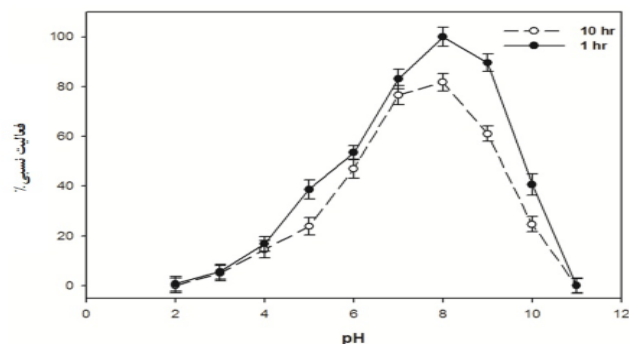
به بیشترین مقادیر خود رسیده است (شکل ۶). بتا-گلوکوزیداز هم بیشترین پایداری را در گستره‌ی pH ۴ تا ۶ دارد (شکل ۷). حال آنکه بیشترین فعالیت این دو آنزیم پس از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت در pH ۶ رخ داد. فعالیت آلفا-آمیلاز پس از طی ۱ ساعت از آزمون پایداری در گستره‌ی pH ۷ تا ۹ به بیش از ۸۰ درصد رسید حال آنکه بعد از گذشت ۱۰ ساعت در همین محدوده به بیش از ۱۰ درصد نزول یافت و در بیشترین



شکل ۶- بررسی پایداری آلفا-گلوکوزیداز بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت



شکل ۷- بررسی پایداری بتا-گلوکوزیداز بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت

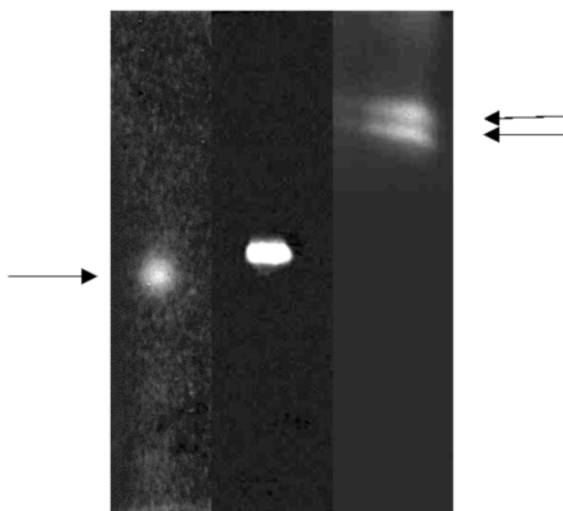


شکل ۸- بررسی پایداری آلفا-آمیلاز بعد از گذشت ۱ و ۱۰ ساعت

گلوکوزیداز به ترتیب ۲/۲۴ میلی‌مولار و ۰/۰۲۸ میکرومول بر دقیقه بر میلی-گرم پروتیین بدست آمد. نتایج حاصل از مطالعات این قسمت با برخی نتایج

مقدار  $V_{max}$  و  $K_m$  مورد محاسبه در این واکنش برای آلفا-گلوکوزیداز به ترتیب ۳/۵۲ میلی‌مولار و ۰/۰۴۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتیین و برای بتا-

ترتیب ۰/۰۲۷ و ۰/۰۱۲ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتیین برای سرعت بیشینه و مقادیر ۴/۷۱ و ۰/۳۵ را به ترتیب برای  $K_m$  حاصل از روده میانی و غدد بزاقی نشان داد (Ramzi and Hosseinaveh, 2010).  $V_{max}$  و  $K_m$  بتا-گلوکوزیداز روده میانی *Glyphodes pyloalis* به ترتیب ۰/۹۹ میلی مولار و ۰/۳ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتیین بدست آمد (Ghadamyari et al., 2010). در شکل ۹ گراف مربوط به آلفا-آمیلاز به وضوح وجود دو ایزوفرم از آنزیم را نشان می دهد. فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز هم تنها طی یک باند ظاهر شد که حاکی از وجود یک ایزوفرم فعال برای هر کدام از این آنزیمهاست.



شکل ۹- آلفا-آمیلاز (سمت راست)، آلفا-گلوکوزیداز (سمت چپ) و بتا-گلوکوزیداز (وسط)

نتایج در جهت کنترل مفید و موثر این آفت، مورد استفاده قرار گیرد.

#### نتیجه گیری کلی

تولید گیاهان مقاوم تراریخته کمک می کند تا آفت-کشهای شیمیایی کمتری علیه آفات مصرف شود. نهایتاً محیط زیست سالم تری نیز خواهیم داشت. برای برقراری یک استراتژی کنترلی بر پایه مهارکنندگی در تغذیه، اولین قدم شناسایی خصوصیات شیمیایی آنزیم-های گوارشی می باشد (Strobl et al., 1998).

بنابراین شناسایی بیوشیمیایی آنزیمهای دخیل در گوارش، فهم ما را جهت طراحی سیستمهای کنترلی با استفاده از پروتیینهای مهارکننده این آنزیمها با منشاء

حاصل از بررسیهای مشابه، همخوانی دارد. به عنوان مثال  $V_{max}$  آلفا-آمیلاز حاصل از روده میانی و غدد بزاقی *Brachynema germari* به ترتیب ۰/۰۶۴ و ۰/۰۳۶ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتیین محاسبه شده است.  $K_m$  مربوط به این آنزیم در روده میانی و غدد بزاقی *B. germari* نیز به ترتیب ۰/۷۷ و ۰/۴۱ میلی مولار بدست آمد.

اما در خصوص آلفا-گلوکوزیداز  $V_{max}$  برای روده میانی و غدد بزاقی به ترتیب ۰/۰۳۶ و ۰/۰۲۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتیین و  $K_m$  حاصل به ترتیب ۶/۲۳ و ۲/۰۷ میلی مولار بدست آمد. بررسیها روی بتا-گلوکوزیداز نیز در روده میانی و غدد بزاقی مقادیر به

در فرآیند خالص سازی بتا-گلوکوزیداز *Rhynchophorus palmarum* تنها یک باند از این آنزیم در سیستم SDS-PAGE مشاهده شد (Yapi et al., 2009). تعداد باندهای مشاهده شده زایموگرام آلفا-آمیلاز غدد بزاقی و روده میانی سنین مختلف پورگی در *Brachynema germari* ۱ عدد بود (Ramzi and Hosseinaveh, 2010). در نهایت اینکه یک ایزوفرم حاصل بررسی زایموگرام فعالیت آلفا-آمیلاز روده میانی سرخرطومی برگ یونجه *Hypera postica* بود (Vatanparast and Hosseinaveh, 2010). یافتههای حاصل از این پژوهش، اولین بررسی صورت گرفته در این زمینه روی کرم خراط بود. در پایان امید است این

بررسی‌های بیوشیمیایی روی تغذیه آفات می باشد بسیار مهم است. در مطالعه حاضر حضور و فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز را در روده میانی کرم خراط نشان داده شد و همچنین به بررسی برخی از خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم‌ها پرداخته شده است. امید است این مطالعات راه‌های تازه‌ای را در جهت کنترل سالم این آفت فراهم آورد.

گیاهی، به طور بالقوه بالا می‌برد. به نظر ما بررسی‌های این گونه برای این حشره و حشرات مشابه که نحوه خسارت آنها مانند کرم خراط است، بسیار لازم است. چرا که اگر حتی بخواهیم از آخرین راهکارها و تاکتیک‌ها که همان مبارزه شیمیایی با آفات است هم استفاده کنیم، اجرای آنها برای این آفات به دلیل بیولوژی و نحوه خسارت آنها بسیار سخت می باشد. لذا استفاده از ارقام مقاوم که در راس رسیدن به آنها

## REFERENCES

1. Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C.h., & Haser, R. (1998). Crystal structures of the psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Science*, 7, 564–572.
2. Ascher, K. R. S. (1993). Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22, 433- 449.
3. Applebaum, S. W. & Konijn, A. M. (1965). The utilization of starch by larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Nutrition*, 85, 275–282.
4. Baker, J. E. (1983). Properties of amylases from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*. *Insect Biochemistry*, 13 (4), 421–428.
5. Baker, J. E. (1991) Purification and partial characterization of  $\alpha$ -amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry*, 21(3), 303–313.
6. Balachowsky, A., & Mesnil L.(1935). *Les insects nuisibles aux plantes cultivées*. Paul Lechevalier, Paris, 697 pp.
7. Breuer, M. & De Loof, A. (2000). In: Kleeberg H, Zebitz CPW, (2000). *Practice oriented results on use and production of neem ingredients and pheromones* VIII. Giessen: Druk and Graphic; p. 23.
8. Buonocore, V., Poerio, E., Silano, V., & Tomasi, M. (1976). Physical and catalytic properties of  $\alpha$ -amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae. *Biochemistry Journal*, 153, 621–625.
9. Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P., & Ary, M.B. ( 1989). Resolution and partial characterization of proteinases and  $\alpha$ -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92, 51–57.
10. Carter D.J. (1984). Pest Lepidoptera of Europe with special reference to the British Islands (Series Entomologica). *Springer*, 31, 438 pp.
11. Casey Sclar, D. (1994). Neem: Mode of action of compounds present in extracts and formulations of *Azadirachta indica* seeds and their efficacy to pests of ornamental plants and to non-target species. Retrieved October 12, 2005 from [http://www.colostate.edu/Depts Entomology/Courses/en570/Papers\\_1994/sclar.html](http://www.colostate.edu/Depts Entomology/Courses/en570/Papers_1994/sclar.html)
12. [http://www.colostate.edu/Depts Entomology/Courses/en570/Papers\\_1994/sclar.html](http://www.colostate.edu/Depts Entomology/Courses/en570/Papers_1994/sclar.html)
13. Chen, M.S., Feng, G., Zen, K.C., Richardson, M., Valdes-Rodriguez, S., Reeck, G.R., & Kramer, K.J. (1992).  $\alpha$ -amylases from three species of stored grain Coleoptera and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitors. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 22 (3), 261–268.
14. Doane, W.W. (1969). Amylase variants in *Drosophila melanogaster*: linkage studies and characterization of enzyme extracts. *Journal of Experimental Zoology*. 171, 321–342
15. Gatwick J. (1992). Crop pests in the UK. p. 126–127. In: Chapman, Hall (eds) *Collected Edition of MAFF Leaflets*, London.
16. Ghadamyari, M., Hosseiniaveh, V. & Sharifi, M. (2010). Partial biochemical characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.:Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies*, 333, 197–204.
17. Grossi, D.S. M., & Chrispeels, M.J. (1997). Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27 (4), 271–281.
18. Huerta, A., Chiffelle, I., Puga, K., Azua, F. & Araya, J.E. (2010). Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from Schinusmolle on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Crop Protection*, 29, 1118-1123.
19. Janecek, J.(1997).  $\alpha$ -Amylase family: *Molecular Biology and Evolution*, 67(1), 67-97.

20. Kanekatsu, R., (1978). Studies on further properties for an alkaline amylase in the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biocontrol Science and Technology*. (Series E) 76 (9), 1–21.
21. Kutinkova, H., Andreev, R., Arnaudov, V. (2006). The leopard moth borer, *Zeuzera pyrina* L. (*lep.: cossidae*) important pest in bulgaria. *Journal of Plant Protection Research*, 46(2), 111-116.
22. Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P. & Xavier-Filho, J. (1990) Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 56 (3), 219–227.
23. Low, N. H., Vong, V. & Spornest, P. (1986). A new enzyme,  $\beta$ -glucosidase, in honey. *Journal of Apical Research*, 25, 178-181.
24. Lystrup, J., Sacramento Tree Foundation Martin J. Fitch, City of Sacramento Department of Neighborhood Services.(1999). Implementation of integrated pest management for the Elm Leaf Beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomelidae), in a large urban area (Sacramento), prepared for California Department of Pesticide Regulation.
25. MacGregor, E. A. (1993). Relationships between structure and activity in the  $\alpha$ -amylase family of starchmetabolizing enzymes. *Starch*, 45, 232–237.
26. MacGregor, E.A., Janecek, S., &Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1546, 1–20.
27. Mendiola-Olaya, E., Valencia-Jimenez, A., Valdes-Rodrigues, S., Delano-Frier, J. & Blanco-Labra, A. (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncates* Horn. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 126, 425–433.
28. Nakonieczny, M., Michalczyk, K., & Kedzierski, A. (2006). Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *Frankenbergeri*, *Cell Biology*, 329, 765–774.
29. Oppert, B. (2000). Transgenic plants expressing enzyme inhibitors and the prospects for biopesticide development. In: Koul O, Dhaliwal GS (eds) *Advances in Biopesticide Research*, pp.83–95. Hardwood Academic, Amsterdam
30. Oppert, B., Hartzer, K., Smith, C. M. (2000). Digestive proteinases of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera; Curculionidae). *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)*, 103 (3/4), 99–110.
31. Pratviel-Sosa, F., Clemont, S., Percheron, F. & Chararas, C. (1986). Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopoea pityocampa* larvae. Part1. Purification and some properties of the  $\alpha$ -glucosidase. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 84, 77–81.
32. Podoler, H., & Applebaum, S. W. (1971). The  $\alpha$ -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. *Biochemistry Journal*, 121, 321–325.
33. Yapi, Assoi. Y., Gnakri, D., Lamine, L., & Patrice, N. I. (2009). Purification and biochemical characterization of a specific  $\beta$ - glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *Journal of Insect Science*, 9(4), 1-13.
34. Ramzi, S., & Hosseinaveh, V., (2010). Biochemical characterization of digestive  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase in pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hem.: Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3), 215–219.
35. Regnault-Roger, C., Staff, V., Philogene, B., Terron, P., Vincent, C.(2004). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
36. Rodriguez, C., Silva, G. & Djair, V., (2003). Bases para el manejo racional de insecticidas: Insecticidas de origen vegetal. Facultad de Agronomia, Universidad de Concepcion,yFundacionpara la InnovacionAgraria, Concepcion, Chile.
37. Siegentaler, U. (1977). Eine einfache and rasche methode zur bestimmung de  $\alpha$ -glucosidase (saccharase) in honing. *Mitt. Gebiere Lebesm. Hyg*, 68, 251 – 258.
38. Silva, C. P., Terra, W. R., Grossi de Sa, M. F. G., Samuels, R. I., Isejima, E. M., Bifano, T. D. et al. (2001a). Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Col.: Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor I. *Journal of Insect Physiology*, 47 (11), 1283–1290.
39. Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F. & Glockshuber, R. (1998). A novel strategy for inhibition of  $\alpha$ -amylases: Yellow meal worm  $\alpha$ -amylase in complex with Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure*, 6, 911-921.
40. Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 109, 1–62.
41. Valencia-Jimenez, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. A. & Chrispeels, M. J. (2000).  $\alpha$ -amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 207–213.

42. 41. Vatanparast, M., Hosseinaveh, V., (2010). Digestive amylase and pectinase activity in the larvae of alfalfa weevil *Hypera postica* (Col.: Curculionidae). *Entomological Research*, 40 (6), 328-335.
43. Zeng, F., & Cohen, A.C. (2001). Induction of elastase in a zoophagous heteropteran, *Lygus hesperus*, *Annals of the Entomological Society of America*, 94, 141-156.