

## فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی مینوز برگ گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae) در حضور برخی عصاره‌های پروتئینی گیاهی

ژاله جعفری<sup>۱</sup>، علی علیزاده<sup>۲\*</sup>، حمزه ایزدی<sup>۳</sup> و نصیر صابری ریشه<sup>۴</sup>

۱. ۳ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

۴. دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۷)

### چکیده

مینوز برگ گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta* از مهم‌ترین آفت سبزی و صیفی‌جات است که به‌طور چشمگیری تولید گوجه‌فرنگی را در جهان تحت تأثیر قرار داده است. با توجه به اثر نامطلوب کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی در کنترل این آفت نیاز به روش‌های جایگزین است. یکی از روش‌هایی که می‌تواند در کنترل این آفت مؤثر باشد استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی است. استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی نیازمند شناخت دقیق آنزیم‌های هدف در حشرات آفت است. در پژوهش حاضر میزان فعالیت، دما و اسیدیته بهینه آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز، بتا-گلوکوزیداز، آلفا-گالاکتوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز و نیز اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی گندم کوبیده، نخود، پیچک، داتوره و تاج‌خروس روی فعالیت این آنزیم‌ها، همراه با محاسبه  $IC_{50}$ ، بررسی شده است. بیشترین میزان فعالیت مربوط به آلفا-گلوکوزیداز بود و میزان اسیدیته بهینه برای فعالیت این آنزیم‌ها به‌جز بتا-گلوکوزیداز برابر با ۶ به دست آمد. آنزیم بتا-گلوکوزیداز علاوه بر فعالیت بالا در اسیدیته ۶، در اسیدیته برابر ۸ بیشترین میزان فعالیت را داشت. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز ۴۰ درجه سلسیوس و برای آلفا و بتا-گالاکتوزیداز به ترتیب ۴۰ و ۴۵ درجه سلسیوس به دست آمد. در بررسی زایموگرام ژل به ترتیب ۲، ۳، ۱ و ۱ باند آنزیمی به ترتیب برای آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز مشاهده شد. بررسی تأثیر مهارکننده‌های استخراج‌شده نشان داد، فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز بیشتر تحت تأثیر مهارکننده‌ها قرار می‌گیرد. عصاره پروتئینی نخود در مقایسه با سایر گیاهان، مهارکنندگی بیشتری را بر فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی داشت.

**واژه‌های کلیدی:** اسیدیته بهینه، دمای بهینه، کربوهیدرازها، مهار آنزیمی، مینوز برگ گوجه‌فرنگی.

## Carbohydrases activity of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae) in the presence of some plant proteinaceous extracts

Zhale Jafari<sup>1</sup>, Ali Alizadeh<sup>2\*</sup>, Hamze Izadi<sup>3</sup> and Nasir Saberi-Riseh<sup>4</sup>

1, 2, 3. M. Sc. Student, Assistant Professor and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Abr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

4. Ph.D. Candidate, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Nov. 1, 2016 - Accepted: Jan. 27, 2018)

### ABSTRACT

The tomato leaf miner, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) significantly affects the production of tomato in the world. The damage is done through the holes created in the leaves mesophile due to the larval feeding. Due to unfavorable effects of insecticides application, search for alternative control measures such as suppression of digestive enzymes using enzyme inhibitors is required. In the present study, we investigated activity, optimum pH and temperature of  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase. Also the inhibitory effect of proteinaceous extracts of wheat, datura, chickpea, ivy and amaranthus, beside  $IC_{50}$  calculation, were investigated. Based on the results,  $\alpha$ -glucosidase had the highest activity followed by  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -glucosidase respectively. The optimum pH of these enzymes activity except of  $\beta$ -glucosidase, was 6.  $\beta$ -glucosidase had high activity in pH 6 with optimal pH 8. The optimal temperatures for  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase enzymes and  $\alpha$  and  $\beta$ -galactosidase were 40, 40, 40 and 45°C, respectively. Zymogram of gel electrophoresis revealed 2, 3, 1 and 1 isoforms respectively for  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$  and  $\beta$ -galactosidase in the digestive system. Results showed that inhibitors more affected activity of  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase. Thus the highest inhibitory rate was related to the pea proteinaceous extract.

**Keywords:** Carbohydrases, enzyme inhibition, tomato leaf miner, optimum pH, optimum temperature.

\* Corresponding author E-mail: alializadeh2004@gmail.com

## مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) یکی از سبزی‌های اصلی و ارزشمند است که به‌صورت گسترده در مزارع و گلخانه‌های جهان کشت می‌شود. ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان گوجه‌فرنگی در جهان به شمار می‌رود و سالانه بیش از ۴/۵ میلیون تن گوجه‌فرنگی در ایران تولید می‌شود (Pahlavan *et al.*, 2011). گوجه‌فرنگی بعد از سیب‌زمینی بیشترین میزان مصرف را به‌صورت تازه خوری و فرآوری شده در رژیم غذایی مردم جهان دارد (Edrisi *et al.*, 2013). گوجه‌فرنگی توسط آفات متعددی مورد حمله قرار می‌گیرد که در سال‌های اخیر مینوز گوجه‌فرنگی از مهم‌ترین این آفات در کاهش تولید این محصول در سطح جهان بوده است. مینوز برگ گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae) مهم‌ترین آفتی است که به‌سرعت در حال گسترش در بسیاری از نقاط جهان است (Haddi *et al.*, 2012). این آفت هم‌اکنون یکی از تهدیدهای اصلی تولید گوجه‌فرنگی در گلخانه‌ها و مزارع دنیا به شمار آمده و این توانایی را دارد که در آینده میزان تولید سالانه گوجه‌فرنگی را به‌شدت کاهش دهد (Desneux *et al.*, 2011). مینوز گوجه‌فرنگی در ایران جز آفات قرنطینه‌ای بوده و اولین بار در سال ۱۳۸۹ در بعضی مناطق کشور گزارش شد (Baniameri & Cheraghian, 2012). پراکنش عمده آن در مناطق غربی و جنوبی کشور است. مینوز گوجه‌فرنگی توان تولیدمثل بالایی دارد و بسته به شرایط محیطی قادر است تا ۱۲ نسل در سال داشته باشد و بدون زمستان‌گذرانی به رشد و نمو خود ادامه دهد. لاروهای این آفت پس از تفریح، برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه‌های جوان را سوراخ کرده و وارد بافت گیاه شده و با تولید دالان‌هایی درون بافت گیاه به تغذیه می‌پردازند. وجود سوراخ‌های ورودی لاروها به درون بافت گیاه و دالان‌های لاروی راه را برای ورود عوامل بیماری‌زا باز کرده و باعث پوسیدگی گیاه به‌ویژه میوه‌ها شده و از ارزش اقتصادی محصول می‌کاهد (Salek Ebrahimi & Gharekhani, 2014).

امروزه روش رایج در کنترل مینوز گوجه‌فرنگی

استفاده از سموم شیمیایی است (Silva *et al.*, 2011). متأسفانه استفاده گسترده از این ترکیب‌ها سبب بروز مقاومت در این حشره به بسیاری از گروه‌های حشره‌کش شده است (Haddi *et al.*, 2012). از طرف دیگر استفاده از سموم شیمیایی همیشه با چالش‌های بزرگی از جمله آلودگی‌های زیست‌محیطی و اثرگذاری ناگوار روی موجودات غیر هدف از جمله انسان مواجه بوده است. مشکلات موجود در زمینه کنترل شیمیایی آفات سبب توجه بیشتر به سایر روش‌های کنترلی از جمله استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی، در کنترل و مدیریت حشرات آفت گشته است.

مهارکننده‌های آنزیمی نامزدهای مناسبی برای حفاظت گیاهان و محصولات آن‌ها در مقابل خسارت حشرات گیاه‌خوار و دانه‌خوار هستند. این مهارکننده‌ها در بسیاری از گیاهان به‌طور طبیعی به‌عنوان بخشی از دفاع ذاتی حضور دارند و به‌ویژه در غلات و حبوبات به فراوانی یافت می‌شوند و پتانسیل حشره‌کشی بالایی دارند (Franco *et al.*, 2002). مهارکننده‌های آنزیمی می‌توانند یکی از شاخص‌های معرفی رقم‌های مقاوم گیاهی در مقابل آفات باشند (George *et al.*, 2008). این ترکیب‌ها با جلوگیری از عمل آنزیم‌ها، سبب هضم ناقص غذا و مانع جذب اسیدهای آمینه و مواد غذایی ضروری شده و در نتیجه موجب کندی رشد و مرگ در اثر گرسنگی می‌شوند (Budatha *et al.*, 2008). قبل از استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی، باید شناخت دقیقی از خود آنزیم‌های مورد هدف داشت. طیف وسیعی از آنزیم‌های گوارشی از جمله کربوهیدرازهای مختلف در سیستم گوارشی حشرات حضور دارند که شناخت ویژگی‌های آن‌ها بسیار اهمیت دارد. آنزیم‌های کربوهیدرازی از جمله گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها از جمله آنزیم‌های دخیل در هضم نهایی کربوهیدرازها به شمار می‌روند و در روده میانی بسیاری از حشرات فعالیت دارند (Terra *et al.*, 1996). گلوکوزیدازها شامل آنزیم‌هایی هستند که الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کنند. آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز (EC 3.2.1.20) و بتا-گلوکوزیداز (EC 3.2.1.21) و نیز ویژگی‌های آن‌ها مانند اسیدیتة بهینه، دمای بهینه،

کربوهیدرآزی از جمله اسیدیته، دمای بهینه و نیز نوع زایموگرام ژل این آنزیم‌ها در شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی و نیز بررسی اثر برخی از مهارکننده‌های پروتئینی گیاهی روی فعالیت این آنزیم‌ها است.

## مواد و روش‌ها

### پرورش حشره

حشرات بالغ *Tuta absoluta* از مزارع شهرستان کرمان گردآوری شدند. این حشرات روی گیاه گوجه‌فرنگی در اتاقک رشد با شرایط محیطی دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $65 \pm 10$  درصد و دوره نوری ۱۶:۸ مستقر شدند. پس از چند نسل تغذیه و تخم‌گذاری، لاروهای سن چهار گردآوری و به‌منظور انجام آزمون‌های بیوشیمیایی به آزمایشگاه منتقل شدند.

### تشریح و جداسازی اندام گوارشی

به‌منظور تشریح و جداسازی لوله گوارش از روش Esmaily & Bandani (2015) استفاده شد. لاروها ابتدا روی یخ بی‌حس شدند. سپس درون محلول ۱ درصد سدیم کلرید (NaCl) با استفاده از دو عدد پنس ابتدا انتهای بدن لاروها گرفته شده و در دو جهت مخالف کشیده شد تا لوله گوارش جدا شود. در ادامه تعداد چهل عدد لوله گوارش به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل شد.

### استخراج آنزیم

استخراج آنزیم به روش Mehrabadi *et al.* (2012) انجام گرفت. به‌طور خلاصه، نمونه‌های داخل میکروتیوب، توسط یک هموژنایزر دستی و در بستر یخ همگن شدند. سپس مخلوط همگن‌شده در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور  $15000 \times g$  و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت بخش بالایی مخلوط برداشته شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد تا به‌عنوان منبع آنزیمی در آزمایش‌های بعدی استفاده شود.

### استخراج عصاره پروتئینی بذرها مختلف

برای استخراج عصاره پروتئینی، از روش Baker

شکل زایموگرام ژل و ... در حشرات مختلف مانند Ramzi & *Brachynema germari* K. Zeuzera pyrina L. (Hosseininaveh, 2010) *Rhynchophorus* (Vatanparast *et al.*, 2012) *Riseh et al.*, *ferrugineus* O. Sharifi *et al.* (2012) *Xanthogaleruca luteola* M. *Ectomyelois ceratoniae* Z. (al., 2011) *Chilo suppressalis* W. (Tabatabaei *et al.*, 2011) *Bacterocera oleae* G. (Zibaei *et al.*, 2009) *Naranga* (Delkash-Roudsari *et al.*, 2015) *aenescens* M. (Asadi *et al.*, 2012) بررسی شده‌اند. همچنین برخی از ویژگی‌های آنزیم‌های آلفا-گالاکتوزیداز (EC 3.2.1.22) و بتا-گالاکتوزیداز (EC 3.2.1.23) در حشراتی مانند *Osphranteria coerulea* R. (Aghaali *et al.*, 2012) *Choreutis nemorana* H. (Gholamzadeh Chitgar *et al.*, 2014) پژوهش شده است. آلفا و بتا-گالاکتوزیدازها، هیدرولیز پیوندهای آلفا-دی-گالاکتوزیدی انتهای غیر کاهشی الیگوساکاریدها و گالاکتولیپیدها را کاتالیز می‌کنند (Terra & Ferriar, 1994; Mohammadzadeh & Izadi, 2016). پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهند، این آنزیم‌ها به‌طور معمول در اسیدیته‌های نزدیک به خنثی (۷-۵) و دمای بین ۴۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت را دارند و در یک‌گونه مشخص حشره ممکن است چندین ایزوفرم از هر کدام از آن‌ها وجود داشته باشند (Terra *et al.*, 1996).

اثر مهارکننده‌های گیاهی روی فعالیت آنزیم‌های پروتئازی و آلفا-آمیلاز در بسیاری از حشرات از جمله شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی (Esmaily & Bandani, 2015 & 2016) بررسی شده است. در مورد تأثیر مهارکننده‌های پروتئینی استخراج‌شده از گیاهان که فعالیت آنزیم‌های گوارشی از جمله کربوهیدرازها را مختل می‌کنند، پژوهش‌های معدودی صورت گرفته است و شناخت دقیقی از تأثیر مهارکننده‌های مختلف مؤثر روی فعالیت آنزیم‌هایی مانند آلفا-آمیلاز بر فعالیت این آنزیم‌ها وجود ندارد. هدف از این بررسی مشخص کردن برخی از ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی

آنزیم‌های گلوکوزیداز و گالاکتوزیداز در دمای بهینه و با استفاده از بافر استات سدیم-گلیسین-فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH بهینه در حجم ۱۷۰ میکرولیتر شامل: ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۴۵ میکرولیتر زیرنهشت و ۱۱۵ میکرولیتر بافر انجام شد. پس از ۳۰ دقیقه، واکنش با افزودن ۶۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ مولار متوقف و بعد از ده دقیقه، پارا-نیتروفیل تولیدشده با دستگاه میکروپلیت‌ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. در نمونه‌های بلانک آنزیم بعد از افزودن هیدروکسید سدیم افزوده شد.

#### اندازه‌گیری دما و اسیدیته بهینه آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز و آلفا و بتاگالاکتوزیداز

برای بررسی اثر دما روی فعالیت آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز با روش ارائه‌شده برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌ها «اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز» عمل شد. در این آزمایش دوره انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه سلسیوس) بود. برای بررسی اسیدیته روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز همانند اندازه‌گیری دمای بهینه عمل شد با این تفاوت که به‌جای متغیر دما، از اسیدیته متغیر استفاده شد. بدین منظور از سری بافر استات سدیم-گلیسین-فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۴ تا ۱۱ استفاده شد.

#### بررسی اثر عصاره‌های پروتئینی استخراج‌شده روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز و آلفا و بتاگالاکتوزیداز

برای بررسی اثر عصاره‌های پروتئینی استخراج‌شده روی فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی، ابتدا غلظت‌های مختلف هر یک از مهارکننده‌های گندم رقم کویر، داتوره، پیچک صحرایی، نخود و تاج‌خروس (۵/۰، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با عصاره آنزیمی همراه با بافر به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد و سپس

(1983) و (1999) Melo *et al.* با اندکی تغییر استفاده شد. به‌طور خلاصه ۲۵ گرم از بذر گیاهان گندم رقم کویر، داتوره، پیچک صحرایی، نخود و تاج‌خروس آرد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار و اسیدیته ۴/۹ غوطه‌ور شده و به مدت سه ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس روی همزن قرار گرفت. مخلوط‌های حاصل به مدت دو ساعت در دمای اتاق هم زده‌شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور  $9000 \times g$  سانتریفوژ شدند. فاز رویی حاصل جدا و به آن سولفات آمونیوم جامد افزوده شد تا به غلظت ۴/۲۵ مولار (۸۰ درصد اشباع) برسد. سپس به مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس روی همزن قرار داده شد. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت  $9000 \times g$  سانتریفوژ شدند تا پروتئین رسوب کند. پروتئین رسوب داده‌شده حاصل داخل کیسه دیالیز ریخته شده و داخل بافر Tris-HCL ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۸/۸ قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس روی همزن قرار گرفت. طی ۲۴ ساعت، یک‌مرتبه بافر تعویض شد. در نهایت محتویات کیسه دیالیز به مدت پنج دقیقه و با سرعت  $8000 \times g$  دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رو نشین گردآوری و در ۲۰- درجه سلسیوس به‌عنوان منبع مهارکننده آنزیم‌های کربوهیدرازی نگهداری شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی با روش Ramzi & Hosseinaveh (2010) با اندکی تغییر انجام شد. از زیرنهشت‌های پارانیتروفنیل آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید (pNP $\alpha$ Glu) و پارانیتروفنیل آلفا-دی-گالاکتوپیرانوزید (pNP $\alpha$ Gal) به‌ترتیب برای سنجش میزان فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و آلفا-گالاکتوزیداز و همچنین زیرنهشت‌های پارانیتروفنیل بتا-دی-گلوکوپیرانوزید (pNP $\beta$ Glu) و پارانیتروفنیل بتا-دی-گالاکتوپیرانوزید (pNP $\beta$ Gal) به‌ترتیب برای سنجش میزان فعالیت بتا-گلوکوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت

Bradford (1976) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام شد.

### تجزیه آماری

همه آزمایش‌های بیوشیمیایی حداقل در سه تکرار صورت پذیرفت. داده‌ها بر پایه طرح کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند. محاسبه IC<sub>50</sub> با نرم‌افزار Polo plus صورت گرفت. گروه‌بندی داده‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

### نتایج و بحث

#### فعالیت گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازهای گوارشی لارو مینوز گوجه‌فرنگی

نتایج این آزمایش وجود فعالیت بالای آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز و آلفا و بتاگالاکتوزیداز را در معده میانی مینوز گوجه‌فرنگی نشان می‌دهد. بر پایه مقادیر سنجش شده فعالیت آنزیم‌ها، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز فعالیت (بر پایه واحد میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین) بالاتری را نسبت به سه آنزیم دیگر داشته است. پس از آلفا-گلوکوزیداز، آنزیم‌های بتا-گالاکتوزیداز، آلفا-گالاکتوزیداز و بتا-گلوکوزیداز بیشترین فعالیت را داشته‌اند (جدول ۱). گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها در بسیاری از راسته‌های حشرات به عنوان آنزیم‌های مهم در گوارش کربوهیدرات‌ها در روده میانی حضور دارند (Terra et al., 1996). آنزیم آلفا گلوکوزیداز به‌طور معمول در بسیاری از حشرات فعالیت بالاتری نسبت به سایر آنزیم‌های گلیکوزیدی دارد (Nakonieczny et al., 2006). پژوهش‌های صورت گرفته روی بالپولکداران مانند *C. nemorana* (Gholamzadeh Chitgar et al., 2015) و *Parnassius apollo* L. (Nakonieczny et al., 2006) نشان می‌دهند که آنزیم آلفا-گلوکوزیداز فعالیت به مراتب بالاتری را نسبت به سه آنزیم دیگر دارد.

#### اسیدیتته بهینه فعالیت گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازهای گوارشی لارو مینوز گوجه‌فرنگی

فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی در سری اسیدیتته (۱۰-۴) در شکل ۱ نشان داده شده است. بنا بر نتایج

سوبسترای مورد نظر به واکنش اضافه شد. پس از طی شدن زمان انکوباسیون به مخلوط واکنش NaOH اضافه شد و پس از ده دقیقه میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### سنجش مهارکنندگی در ژل

برای نشان دادن فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی در ژل پلی‌آکریل‌امید از روش Davis (1964) با تغییراتی استفاده شد. به‌طور خلاصه عصاره ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی استخراج شده با ۵ میکرولیتر بافر نمونه (متشکل از بافر Tris-HCl با اسیدیتته ۶/۸، گلیسرول ۱۰ درصد و بروموفنول بلو ۰/۰۱ درصد) مخلوط شده و در چاهک‌های ژل پلی‌آکریل‌امید (ژل متراکم‌کننده ۵ درصد و ژل جداکننده ۸ درصد) بارگذاری شد. الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس صورت پذیرفت. بعد از پایان زمان پایین آمدن، ژل از شیشه‌ها جدا شده و در محلول استات سدیم ۰/۱ مولار با اسیدیتته ۵ که دارای سوبسترای اختصاصی (محلول ۳ میلی مولار ترکیب‌های 4-MUαG<sup>۱</sup>، 4-MUβG<sup>۲</sup>، 4-MUβGa<sup>۳</sup> و 4-MUαGa<sup>۴</sup> به ترتیب برای آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز و آلفا و بتاگالاکتوزیداز) هر یک از آنزیم‌ها برای سنجش فعالیت در ژل بود، قرار گرفت تا باندهای آنزیمی مشخص شوند. پس از مدت کوتاهی باندهای فلورسنت آبی در زیر نور UV مشخص شدند.

به‌منظور ارزیابی تأثیر مهارکنندگی در ژل الکتروفورز ابتدا عصاره آنزیمی با مهارکننده‌های استخراج شده در بالاترین غلظت (۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) مخلوط شد و بعد از بیست دقیقه با بافر نمونه در ژل پلی‌آکریل‌امید بارگذاری شد. بقیه مراحل همانند توضیحات داده شده برای زایموگرام ژل، انجام گرفت.

### سنجش میزان پروتئین

تعیین مقدار پروتئین عصاره پروتئینی با روش

1. 4-methylumbelliferyl-α-d-glucopyranoside
2. 4-methylumbelliferyl-β-d-glucopyranoside
3. 4-methylumbelliferyl-β-d-galactopyranoside
4. 4-methyl-umbelliferyl-β-d-galactopyranoside

در بررسی‌های مشابه که در دیگر حشرات صورت گرفته است تا حدودی نتایج مشابهی به‌دست آمده است. به‌طور کلی آلفا-گلوکوزیدازهای حشرات اسیدیته بهینه بین ۴/۵ تا ۶/۵ دارند ( Terra & Ferreira, 1994). میزان اسیدیته بهینه برای آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در *Z. pyrina* برابر با ۶ ( Vatanparast et al., 2012) و در *Glyphodes pyloalis* W. ( Ghadamyari et al., 2010) به ترتیب برابر با ۷/۵ و ۵/۵ بوده است. همچنین پژوهش‌های دیگر صورت گرفته روی حشرات بالپولکداران نشان می‌دهند، اسیدیته بهینه برای فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز در *E. ceratoniae* Z. برابر با ۷ برای هر دو آنزیم بوده است (Tabatabaei et al., 2011). همچنین در *C. suppressalis* W. اسیدیته بهینه ۸ برای هر دو آنزیم به‌دست آمده است که متفاوت از نتایج این تحقیق است (Zibae et al., 2009).

نمودار میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گالاکتوزیداز در شکل ۲ نشان داده شده است. بنا بر نتایج آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در اسیدیته برابر با ۵ تا ۷ فعالیت بالایی داشته است. با این حال بالاترین میزان فعالیت یا همان اسیدیته بهینه برابر با ۶ بوده است. در اسیدیته ۸ فعالیت آنزیم نزدیک به نصف کاهش یافته است. بالاترین فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در اسیدیته برابر با ۶ به‌دست آمده است. فعالیت این آنزیم در اسیدیته برابر با ۴ نزدیک به صفر بوده است که با افزایش اسیدیته میزان فعالیت افزایش محسوسی داشته و تا اسیدیته برابر با ۷ بالا بوده است. از اسیدیته ۸ تا ۱۱ میزان فعالیت با شیب تندی کاهش یافته است (شکل ۲). تحقیقات صورت گرفته روی حشرات راسته بالپولکداران نتایج به‌کلی مشابهی با داده‌های این رساله را نشان می‌دهند. به‌طور مثال اسیدیته بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا-گالاکتوزیداز در کرم گلوگاه انار برابر به ترتیب برابر با ۵ و ۶ ( Tabatabaei et al., 2011) و در برگ‌خوار انجیر به ترتیب برابر با ۵ و ۶ (Gholamzadeh Chitgar et al., 2014) بوده است.

در حشرات مختلف بر پایه روابط فیلوژنتیک و رژیم‌های غذایی، فعالیت بهینه آنزیم‌های گوارشی ممکن است در اسیدیته‌های مختلفی روی دهد

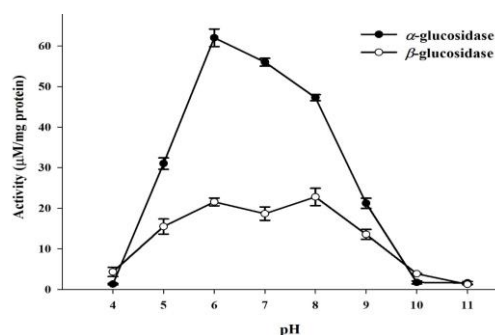
فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در اسیدیته برابر با ۶ بهینه است. فعالیت این آنزیم از اسیدیته ۴ تا ۶ افزایش یافته است و تا اسیدیته ۸ فعالیت مناسبی داشته است. از اسیدیته ۸ به بعد فعالیت با شیب تندی کاهش یافته است. به‌طور کلی مشاهده می‌شود که این آنزیم در اسیدیته خنثی فعالیت بالاتری دارد و در اسیدیته اسیدی و قلیایی فعالیت آن به‌شدت کاهش می‌یابد. فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز در اسیدیته ۴ کم است اما با افزایش اسیدیته به ۵ فعالیت آن به‌شدت افزایش یافته است. این فعالیت بالا در اسیدیته‌های ۵ تا ۷ ادامه داشته و در اسیدیته برابر با ۸ با بالاترین میزان خود رسیده است. البته در اسیدیته ۷ یک کاهش در فعالیت مشاهده می‌شود. این بالا و پایین رفتن نمودار احتمال دارد به دلیل وجود ایزوفرم‌های مختلف از این آنزیم باشد که هرکدام در یک اسیدیته مشخص فعالیت بهینه دارند. در ادامه و با افزایش اسیدیته فعالیت کاهش یافته است.

جدول ۱. میزان فعالیت (میانگین  $\pm$  خطای معیار)

آنزیم‌های گلوکوزیداز و گالاکتوزیداز گوارشی مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Table 1. Digestive glucosidase and galactosidase activities (Mean  $\pm$  SE) of tomato leaf miner (*Tuta absoluta*)

Enzyme	Substrate	Activity ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ )
$\alpha$ -glucosidase	pNP $\alpha$ Glu	62.3 $\pm$ 1.14
$\beta$ -glucosidase	pNP $\beta$ Glu	26.5 $\pm$ 0.65
$\alpha$ -galactosidase	pNP $\alpha$ Gal	40.1 $\pm$ 0.72
$\beta$ -galactosidase	pNP $\beta$ Gal	48.2 $\pm$ 0.49

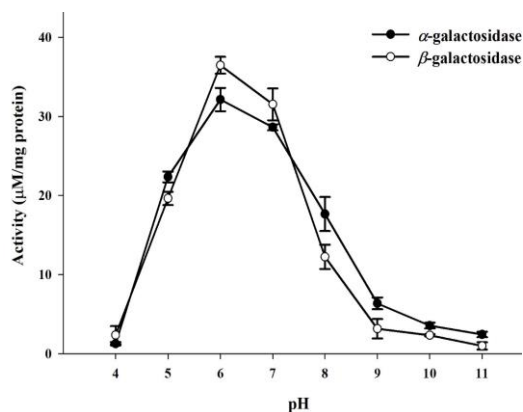


شکل ۱. تأثیر اسیدیته‌های مختلف بر فعالیت آلفا-

گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز گوارشی لارو مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Figure 1. Effect of different pH on digestive  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase activity of the tomato leaf miner larvae (*Tuta absoluta*)

گلوکوزیداز در *Z. pyrina* ۳۵ درجه سلسیوس بوده است (Vatanparast *et al.*, 2012)، در *N. aenescens* به ترتیب برابر با ۴۵ و ۵۵ درجه سلسیوس (Asadi *et al.*, 2012) و در *C. nemorana* به ترتیب برابر با ۴۵ و ۳۵ درجه سلسیوس (Gholamzadeh Chitgar *et al.*, 2014) بوده است.



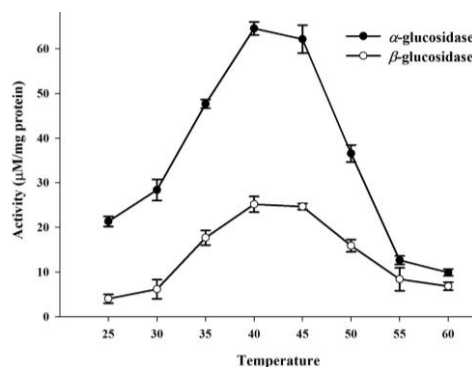
شکل ۳. تأثیر دماهای مختلف بر فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز گوارشی لارو مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Figure 3. Effect of different temperatures on digestive  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase activity of the tomato leaf miner larvae (*Tuta absoluta*)

با توجه به شکل ۴ آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز در دما ۴۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت را دارد. بهینه فعالیت هم در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به دست آمده است. در دمای ۳۵ درجه فعالیت به نصف کاهش پیدا کرده و دماهای پایین‌تر از ۳۰ و بالاتر ۵۵ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم را به طور محسوسی کاهش داده‌اند. در آنزیم بتا-گالاکتوزیداز با افزایش دما از ۳۰ درجه سلسیوس فعالیت به طور صعودی افزایش یافته و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به بالاترین حد خود رسیده و بعد از آن سیر کاهشی یافته است. در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه فعالیت آنزیم به شدت کاهش یافته و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس آنزیم تا حدودی غیرفعال شده است (شکل ۴).

دما بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گالاکتوزیداز در برگ‌خوار انجیر ۴۵ درجه سلسیوس گزارش شده است که متناظر با نتایج این پژوهش است (Gholamzadeh Chitgar *et al.*, 2014). دمای

(Terra & Ferreira, 1994). البته به طور معمول آنزیم‌های گوارشی در اسیدیت‌های نزدیک به حالت خنثی فعالیت بالاتری دارند. بر پایه بررسی‌های Zeng & Cohen (2000)، در محیط‌های خیلی اسیدی یا قلیایی، تأثیر آنزیم‌ها روی سوبسترا کاهش می‌یابد و در نتیجه از میزان فعالیت آنزیم‌ها کاسته می‌شود.



شکل ۲. تأثیر اسیدیت‌های مختلف بر فعالیت آلفا-

گالاکتوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز گوارشی لارو مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

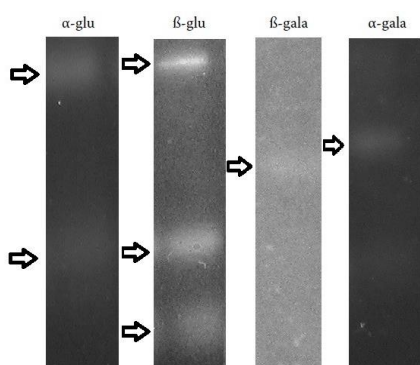
Figure 2. Effect of different pH on digestive  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase activity of the tomato leaf miner larvae (*Tuta absoluta*)

### دمای بهینه فعالیت گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازهای گوارشی لارو مینوز گوجه‌فرنگی

اثر دماهای مختلف بر میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز در شکل ۳ نشان داده شده است. آلفا-گلوکوزیداز در طیف دمایی ۳۵ تا ۴۵ درجه سلسیوس فعالیت بهینه‌ای دارد. فعالیت بهینه هم در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به دست آمد. در دماهای کمتر از ۳۰ و بالاتر از ۵۰ درجه سلسیوس فعالیت کاهش یافته است. در مورد آنزیم بتا-گلوکوزیداز بیشترین میزان فعالیت در دماهای ۴۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس مشاهده شد. همانند آنزیم آلفا-گلوکوزیداز میزان فعالیت بتا-گلوکوزیداز هم در دماهای پایین‌تر از ۳۰ و بالاتر از ۵۰ درجه سلسیوس کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد (شکل ۳).

پژوهش‌های صورت گرفته در مورد حشرات راسته بالپولکداران نشان می‌دهند، آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیدازی در دمای ۳۵ تا ۵۵ درجه سلسیوس فعالیت بهینه دارند. فعالیت بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا

در *Rhynchophorus ferrugineus* را نشان داده‌اند. در اغلب حشرات گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها ممکن است ایزوفرم‌های مختلف داشته باشند. برای نمونه تحقیقات Tabatabaei *et al.* (2011) به ترتیب وجود ۲ و ۱ باند آنزیمی را در زایموگرام آنزیم آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز کرم گلوگاه انار نشان داده است در بررسی زایموگرام آنزیم‌های کربوهیدراری *C. nemorana* و *O. coerulescens* نتایج جالبی به دست آمده است: بر پایه پژوهش صورت گرفته هر یک از آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز در *C. nemorana* به ترتیب ۳، ۲، ۴ و ۲ باند یا ایزوفرم آنزیمی (Gholamzadeh Chitgar *et al.*, 2014) و در *O. coerulescens* به ترتیب ۳، ۴، ۱ و ۶ باند آنزیمی را نشان داده‌اند (Aghaali *et al.*, 2012).

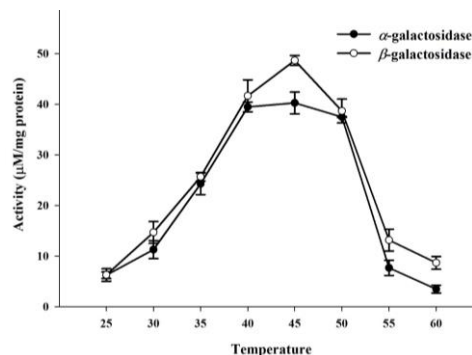


شکل ۵. زایموگرام ژل آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز ( $\alpha$ -glu)، بتا-گلوکوزیداز ( $\beta$ -glu)، آلفا-گالاکتوزیداز ( $\alpha$ -gala) و بتا-گالاکتوزیداز ( $\beta$ -gala) گوارشی لاروهای مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Figure 5. Digestive  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase zymogram of the tomato leaf miner larvae (*Tuta absoluta*)

آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی که به‌طور عمده در روده میانی حشرات حضور دارند ممکن است در لومن روده و یا در غشا روده میانی و متصل به میکروویلی‌ها فعالیت کنند. باید توجه کرد آنزیم‌های اتصالی به غشاء لوله گوارش متفاوت از آنزیم‌هایی هستند که در لومن حضور دارند و در واقع ایزوفرم‌های متفاوتی هستند. همین عامل سبب می‌شود که در

بهینه فعالیت این دو آنزیم در *X. luteola* برابر با ۴۰ درجه سلسیوس بوده است (Sharifi *et al.*, 2011). طبق اظهار Price & Stevens (1989)، هر آنزیم در یک طیف دمایی فعالیت مناسبی دارد و در دماهای بالاتر یا پایین‌تر از این طیف ممکن است تغییرات برگشت‌ناپذیری در ساختار آنزیم ایجاد شود و در نتیجه فعالیت آن‌ها کاهش یابد. البته این نکته را باید در نظر داشت که دمای بهینه فعالیت این آنزیم‌ها در حالت *In vitro* اندازه‌گیری شده است و در واقعیت ممکن است فعالیت بهینه این آنزیم‌ها در بدن حشره در دماهای متفاوتی (به‌طور معمول پایین‌تر) رخ دهد.



شکل ۴. تأثیر دماهای مختلف بر فعالیت آلفا-گالاکتوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز گوارشی لارو مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Figure 4. Effect of different temperatures on digestive  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase activity of the tomato leaf miner larvae (*Tuta absoluta*)

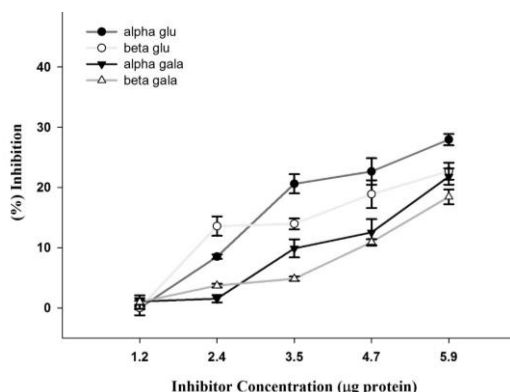
#### بررسی زایموگرام آنزیم‌های کربوهیدراری (گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها)

نتایج حاصل از زایموگرام آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی در شکل ۵ نشان داده شده است. بر این اساس برای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز دو باند یا ایزوفرم، برای آنزیم بتا-گلوکوزیداز سه باند و برای هر یک از آنزیم‌های بتا-گالاکتوزیداز و آلفا-گالاکتوزیداز یک باند آنزیمی به دست آمده است. نتایج زایموگرام نشان می‌دهند، فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی بیشتر از آنزیم‌های گالاکتوزیدازی است.

در پژوهشی مشابه Riseh *et al.* (2012) وجود ۲، ۳، ۱ و ۱ ایزوفرم را به ترتیب برای آلفا گلوکوزیداز، بتا-گلوکوزیداز، آلفا-گالاکتوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز را

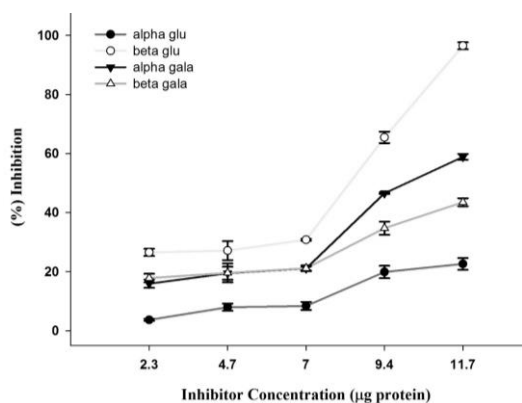


مهارکننده تاجخروس تنها توانسته است فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز را تحت تأثیر قرار دهد و در غلظت‌های مختلف هیچ تأثیری بر فعالیت بتا-گلوکوزیداز و آلفا-گالاکتوزیداز نداشته است. البته میزان مهارکنندگی کل تاجخروس در بالاترین غلظت به حدود ۲۵ درصد رسیده است.



شکل ۶. اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی گندم رقم کویر بر فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی (آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز) مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Figure 6. Inhibitory effect of different concentrations of wheat (Kavir cultivar) proteinaceous extracts on the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) carbohydrases activity ( $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase &  $\alpha$  and  $\beta$ -galactosidases)



شکل ۷. اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی نخود بر فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی (آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز) مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

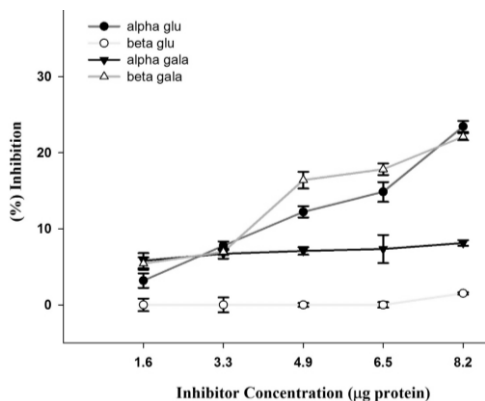
Figure 7. Inhibitory effect of different concentrations of chickpea proteinaceous extract on the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) carbohydrases activity ( $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase &  $\alpha$  and  $\beta$ -galactosidases)

بررسی‌های زایموگرام چندین باند یا ایزوفرم آنزیمی مشاهده شود (Terra & Ferreira, 1994).

#### مهار آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز

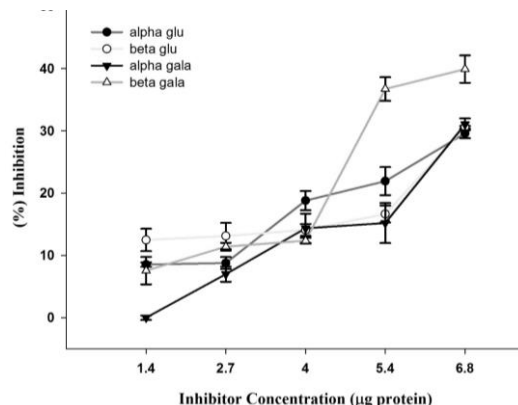
میزان مهار فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی توسط عصاره پروتئینی استخراج‌شده از بذر گیاهان مختلف (گندم کویر، پیچک صحرائی، نخود، داتوره و تاجخروس) در شکل‌های ۶ تا ۱۰ نشان داده شده است. تأثیر مهارکننده گندم رقم کویر در شکل ۶ مشاهده می‌شود. با افزایش غلظت مهارکننده در واکنش از فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی کاسته شده است (مهار آنزیم افزایش یافته است) ولی به‌طور کلی میزان مهارکنندگی در بالاترین غلظت روی هر چهار آنزیم مورد بررسی، از ۳۰ درصد فراتر نرفته است. در شکل ۷ که نمودار مربوط به مهار آنزیم‌های کربوهیدرازی با عصاره نخود است، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت مهارکننده در واکنش غلظت از ۲/۳ تا ۷ میکروگرم در میلی‌لیتر هیچ‌گونه مهارکنندگی مشاهده نمی‌شود. ولی افزایش غلظت از ۷ میکروگرم به ۹/۴ میکروگرم سبب افزایش چشمگیر در میزان مهارکنندگی گشته است. عصاره پروتئینی نخود در بالاترین غلظت بیشترین مهارکنندگی را روی فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز و کمترین میزان مهارکنندگی را روی آلفا-گلوکوزیداز داشته است.

تأثیر مهارکننده پیچک روی آنزیم‌های کربوهیدرازی نشان می‌دهد، با افزایش غلظت مهارکننده، میزان مهارکنندگی افزایش یافته است (شکل ۸). در بالاترین غلظت، بیشترین میزان مهارکنندگی روی آنزیم بتا-گالاکتوزیداز بوده است ولی در حالت کلی میزان مهار هیچ‌کدام از آنزیم‌ها بالای ۴۰ درصد نبوده است. همچنین در شکل ۹ مشاهده می‌شود که یک رابطه تا حدودی خطی بین افزایش غلظت مهارکننده و میزان مهار آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی وجود دارد. در بالاترین غلظت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز حدود ۴۰ درصد مهار شده که نشان می‌دهد از دو آنزیم دیگر به نسبت بیشتری مهار شده‌اند. همچنین



شکل ۹. اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی تاج‌خروس بر فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی (آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز) مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Figure 9. Inhibitory effect of different concentrations of amaranth proteinaceous extract on the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) carbohydrases activity ( $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase &  $\alpha$  and  $\beta$ -galactosidases)



شکل ۸. اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی پیچک صحرائی بر فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی (آلفا و بتا-گلوکوزیداز و آلفا و بتا-گالاکتوزیداز) مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

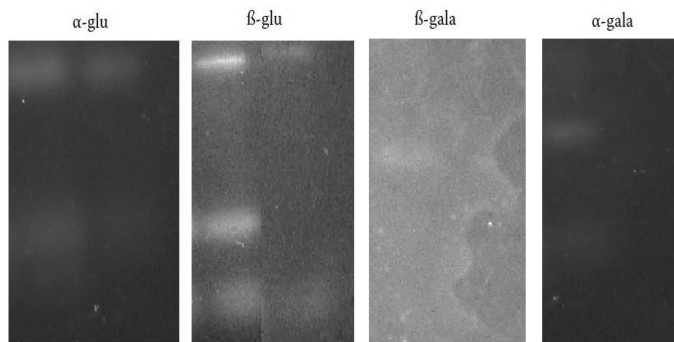
Figure 8. Inhibitory effect of different concentrations of ivy proteinaceous extract on the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) carbohydrases activity ( $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase &  $\alpha$  and  $\beta$ -galactosidases)

جدول ۲. غلظت مهارکننده ۵۰ درصد ( $IC_{50}$ ) نخود، داتوره، پیچک، گندم کویر و تاج‌خروس روی آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی در مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Table 2. Inhibitor concentration 50 ( $IC_{50}$ ) of Chickpea, Datura, Ivy, Wheat and Amaranthus on glucosidases and galactosidases activity of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*)

Enzyme	Inhibitor extract	$IC_{50}^a$ (LCL <sup>b</sup> - UCL)	Slope $\pm$ SE	$X^2$ (df) <sup>c</sup>
$\alpha$ -glucosidase	Chickpea	1681(1018-6953) a	0.26 $\pm$ 1.78	46.15(13)
	Datura	1498(1030-2990) a	0.17 $\pm$ 1.26	14.47(13)
	Ivy	1579(947-6256) a	0.19 $\pm$ 1.44	51.63(13)
	Wheat	990.2(802-1403) a	0.25 $\pm$ 2.43	18.21(13)
	Amaranthus	1706(1215-3095) a	0.25 $\pm$ 1.77	7.26(13)
$\beta$ -glucosidase	chickpea	351(224-648) a	0.15 $\pm$ 2.39	331.15(13)
	Wheat	1365(951-2867) b	0.23 $\pm$ 1.92	18.21(13)
$\alpha$ -galactosidase	chickpea	550(426-925) a	0.16 $\pm$ 1.94	87.91(13)
	Datura	1205(610-1304) a	0.2 $\pm$ 0.78	3.26(13)
	Ivy	1193(811-3274) a	0.24 $\pm$ 2.06	42.9(13)
	Wheat	1105(856-1917) a	0.47 $\pm$ 3.03	16.71(39)
$\beta$ -galactosidase	chickpea	1059(662-4398) a	0.15 $\pm$ 1.14	45.25(13)
	Wheat	1220(922-2306) a	0.56 $\pm$ 3.1	13.55(13)
	Amaranthus	2094(1327-5187) a	0.22 $\pm$ 1.42	13.82(13)

a. Concentration of inhibitor to inhibit 50% of enzyme activity.  
 b. LCL: lower confidence limit at 95%; UCL: upper confidence limit at 95%.  
 c. Values of  $x^2$ , lower than ( $p \leq 0.05$ ) indicate a significant fit between the observed and expected regression lines.



شکل ۱۰. زایموگرام ژل تأثیر مهارکننده موجود در عصاره نخود روی آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز ( $\alpha$ -glu)، بتا-گلوکوزیداز ( $\beta$ -glu)، آلفا-گالاکتوزیداز ( $\alpha$ -gala) و بتا-گالاکتوزیداز ( $\beta$ -gala) گوارشی مینوز برگ گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*)

Figure 10. Gel electrophoresis assay of the effect of chickpea extract on the  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -galactosidase of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*).

اثر مهارکنندگی تاجخروس، گندم و نخود روی آنزیم‌های گوارشی در حشرات در تحقیقات متعددی بررسی شده است. به‌طور مثال (Dastranj *et al.* 2013) تأثیر مهارکننده‌های لوبیا و رقم‌های مختلف گندم را روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی سنین مختلف لاروی سوسک آرد را بررسی کرده‌اند. نتایج بررسی‌های آنان نشان داد، مهارکننده استخراج‌شده از لوبیا و رقم MV17 گندم به ترتیب باعث مهار ۷۰/۹ و ۵۸/۳ درصد فعالیت آلفا-آمیلاز می‌شود. همچنین (Mohammadzadeh *et al.* 2013) تأثیر مهارکننده‌های استخراج‌شده از گندم و تریتیکاله را روی فعالیت آمیلاز زنبور *Arge rosae* بررسی کرده‌اند. نتایج بررسی‌های آنان نشان داد، مهارکننده گندم و تریتیکاله به ترتیب ۱۱ و ۶۱ درصد از فعالیت آمیلاز گوارشی این حشره را مهار می‌کنند. در پژوهشی دیگر تأثیر مهارکنندگی عصاره پروتئینی تاجخروس روی فعالیت آمیلازی حشرات مختلف بررسی شده است (Valencia *et al.*, 2000). تأثیر مهارکننده‌های گیاهی مختلف روی آنزیم آلفا-آمیلاز شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی توسط Esmaily & Bandani (2015) بررسی شده است. نتایج بررسی‌های آنان نشان می‌دهد، مهارکننده تاجخروس به نسبت مهارکنندگی بالاتری را نسبت به داتوره، جو، تاجخروس و ماش روی فعالیت آمیلازی داشته است. همچنین در بررسی دیگر مهارکنندگی بالای عصاره پروتئینی گندم روی فعالیت آمیلازی مینوز گوجه‌فرنگی نشان داده شده است (Esmaily & Bandani, 2016). مهارکننده‌هایی که اثر آنها روی فعالیت آلفا-آمیلاز نشان داده شده است به‌صورت بالقوه می‌توانند مهارکننده‌های مناسبی برای مهار آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی در حشرات مختلف باشند. پژوهش‌های صورت گرفته روی سایر ترکیب‌های گیاهی نشان می‌دهند، آلکالوئیدهای گیاهی توانایی بالایی در مهار آنزیم‌های گلیکوزیدازی حشرات آفت دارند. تأثیر مهارکنندگی این ترکیب‌ها که به‌عنوان جزئی از دفاع طبیعی گیاهان علیه گیاهخواران شناخته می‌شوند در تعدادی از پژوهش‌ها ارزیابی شده است. به‌طور مثال آلکالوئید کاستانوسپرمین که از گیاه *Castanospermum australe* جداسازی شده است توانایی بالایی در مهار فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-

افزون بر اندازه‌گیری درصد مهار نسبی فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی، غلظت مهارکننده ۵۰ درصد (IC<sub>50</sub>) مهارکننده‌های پروتئینی مورد بررسی روی فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی نیز محاسبه شده است که نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. بنا بر نتایج به‌رغم وجود مهارکنندگی نسبی روی فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به‌وسیله هر پنج مهارکننده، تفاوت معنی‌داری بین مهارکننده‌های مختلف مشاهده نمی‌شود. در مورد آنزیم بتا گلوکوزیداز IC<sub>50</sub> نخود و گندم کویر بررسی شده‌اند که بین مقادیر به‌دست‌آمده برای دو مهارکننده تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود و نخود فعالیت ۵۰ درصد این آنزیم را در غلظت پایین‌تری مهار کرده است. روی آنزیم آلفا-گالاکتوزیداز تفاوت معنی‌داری بین غلظت مهارکننده ۵۰ درصد مهارکننده‌های مورد بررسی، مشاهده نشد. در نهایت اینکه روی آنزیم بتا-گالاکتوزیداز IC<sub>50</sub> عصاره گیاهان نخود، گندم کویر و تاجخروس از نظر آماری تفاوتی وجود نداشت. به‌طور کلی IC<sub>50</sub> معیاری است که توانایی یک مهارکننده یا یک ترکیب را در مهار فعالیت آنزیمی، نشان می‌دهد (Cheng *et al.*, 1973).

در مورد تأثیر مهارکننده‌های گیاهی روی فعالیت گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازهای حشرات نسبت به آنزیم آلفا-آمیلاز و آنزیم‌های پروتئینی پژوهش‌های کمتری صورت گرفته است. مهارکننده‌های پروتئینی کربوهیدرازها در گیاهان زیادی وجود دارند و در درجه اول در دانه‌ها و ریشه‌های ذخیره‌کننده نشاسته یافت می‌شوند. مهارکننده‌های بسیار خوبی در گیاهان مانند لوبیای معمولی، گندم، تاجخروس و نخود یافت شده‌اند که به‌طور عمده روی آلفا-آمیلاز مؤثر هستند (Titarenko & Chrispeels, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005). به‌طور کلی مهارکننده‌های آلفا-آمیلازی ممکن است سایر آنزیم‌های کربوهیدرازی را نیز مهار کنند (Masoumzadeh *et al.*, 2014). در کنار این‌ها باید به گیاه داتوره اشاره کرد که لکتین‌های متعددی از این گیاه جداسازی و شناسایی شده است که می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیم‌های کربوهیدرازی عمل کنند (Crowley *et al.*, 1984).

گلوکوزیداز دارد (Saul et al., 1984). این ترکیب‌های هتروسیکلیک نیتروژن‌دار آنالوگ سوبستراهای آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی هستند (Li & Byers, 1989). در کنار آلکالوئیدها، ترکیب‌های فنولی هم می‌توانند به‌عنوان مهارکننده آنزیم‌های گلیکوزیدازی عمل کنند. تحقیقات صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهند که ترکیب‌های فنولی موجود در عصاره استخراج‌شده از قارچ *Cladosporium velox* G. توانایی مهار فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را در *Spodoptera litura* را به‌صورت *In vivo* دارند (Singh et al., 2016).

در کل باید گفت که مهارکننده‌های گلیکوزیدازی افزون بر مهار آنزیم‌های گوارشی توانایی مهار فعالیت گلیکوزیدازهای فعال در کاتابولیسم و آنابولیسم تعداد زیادی از فرآیندهای زیستی را نیز دارند (Asano, 2003) و بنابراین باید بیش‌ازپیش به نقش و اهمیت آن‌ها پرداخته شود.

تأثیر مهارکنندگی عصاره نخود روی فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی و گالاکتوزیدازی در ژل الکتروفورز نیز بررسی شده است. بنابر نتایج که در شکل ۱۰ نشان داده شده است، فعالیت هر چهار آنزیم یادشده تحت تأثیر مهارکننده‌های موجود در عصاره بذر نخود قرار گرفته است. بر این اساس باندهای ژل در مورد دو آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز کم‌رنگ‌تر شده‌اند و حتی در مورد بتا-گلوکوزیداز یکی از باندها به‌طور کامل ناپدید شده است. همچنین باندهای آنزیمی آلفا و بتا-گالاکتوزیداز به‌طور کامل محو شده‌اند که نشان از مهار کامل این آنزیم‌ها در ژل الکتروفورز است (شکل ۱۰). سنجش مهار آنزیم‌های گوارشی در حشرات به روش ژل الکتروفورز در حشرات مختلف بررسی شده است که بسیاری از آن‌ها به مهار شونده‌گی پروتئازها و آلفا-آمیلاز پرداخته‌اند. اثر مهارکننده تریپتیکاله در ژل روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز سن گندم (Mehrabadi et al., 2010).

### نتیجه‌گیری کلی

بنابر نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش می‌توان گفت این آنزیم‌ها در اسیدپتت‌های تا حدودی خنثی فعالیت دارند. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که دمای بهینه‌ای که آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز در آن فعالیت دارند، ۴۵ درجه سلسیوس است. در این دما آنزیم‌های آلفا و بتا-گالاکتوزیداز هم فعالیت حداکثری دارند. آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز، بتا-گلوکوزیداز، آلفا-گالاکتوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز در سیستم گوارش مینوز گوجه‌فرنگی حضور داشته و فعالیت قابل توجهی دارند. البته در میان این آنزیم‌ها، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز فعالیت بیشتری داشته و اهمیت بیشتری دارد که باید در بررسی‌های آینده توجه بیشتری به این آنزیم صورت گیرد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد، آنزیم آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گالاکتوزیداز توسط مهارکننده‌های گیاهی مورد بررسی به نسبت بیشتری مهار گشته‌اند. از بین گیاهان مورد بررسی، نخود نسبت به سایر گیاهان مهارکنندگی بیشتری روی این آنزیم‌ها داشته است. افزون بر اینکه عصاره گیاه نخود آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را کمتر مهار کرده است ولی روی سایر آنزیم‌ها بیشترین مهارکنندگی را داشته است. در مجموع، گیاهان نخود و گندم کویر پتانسیل بالاتری دارند و باید در بررسی‌های آینده برای شناسایی و کاربرد ترکیب‌های مهارکننده عصاره این گیاه پژوهش‌های تکمیلی صورت گیرد.

### سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان به خاطر حمایت مالی این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### REFERENCES

1. Aghaali, N., Ghadamyari, M. & Ajamhasani, M. (2012). Biochemical characterization of glucosidases and galactosidases from Rosaceae branch borer, *Osphranteria coerulescens* Redt. (Col.: Cerambycidae). *Romanian Journal of Biochemistry*, 49(2), 125-137.
2. Asadi, A., Ghadamyari, M., Sajedi, R. H., Sendi, J. J. & Tabari, M. (2012). Biochemical characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases in alimentary canal, salivary glands and haemolymph of the rice green caterpillar, *Naranga aenescens* M. (Lepidoptera: Noctuidae). *Biologia*, 67(6), 1186-1194.

3. Asano, N. (2003). Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*, 13(10), 93-104.
4. Baker, J. E. (1983). Properties of amylase from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*. *Insect Biochemistry*, 13, 421-428.
5. Baniamiri, V. & Cheraghian, A. (2012). The first report and control strategies of *Tuta absoluta* in Iran. *EPPO Bulletin*, 42(2), 322-324.
6. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, 72, 248-254.
7. 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.
8. Cheng, Y. C. & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Molecular Pharmacology*, 32, 2497-503.
9. Crowley, J. F., Goldstein, I. J., Arnarp, J. & Lonngren, J. (1984). Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 231(2), 524-533.
10. Dastranj, M., Bandani, A. R. & Mehrabadi, M. (2013). Age-specific digestion of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) and inhibition of proteolytic and amylolytic activity by plant proteinaceous seed extracts. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16(3), 309-315.
11. Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis—II method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121(2), 404-427.
12. Desneux, N., Luna, M. G., Guillemaud, T. & Urbaneja, A. (2011). The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *Journal of Pest Science*, 84(4), 403-408.
13. Edrisi, B., Azimi, M. H. & Khosravi, K. 2013. *Vegetable Production in Garden and Home*. (2<sup>nd</sup> Ed.). Agriculture and Natural Resources Research Publisher. (In Farsi)
14. Esmaeily, M. & Bandani, A. R. (2016). The effect of proteinaceous extract of triticale on  $\alpha$ -amylase activity of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae). *Plant Pest Research*, 6(1), 1-12.
15. Esmaeily, M. & Bandani, A. R. (2015). Interaction between larval  $\alpha$ -amylase of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) and proteinaceous extracts from plant seeds. *Journal of Plant Protection Research*, 55(3), 278-286.
16. Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R. & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. *European Journal of Biochemistry*, 269(2), 397-412.
17. George, D., Ferry, N., Beak, E. and Gatehouse, A. (2008). Characterization of midgut digestive proteases from the maize stem borer, *Busseola fusca*. *Pest Management Science*, 64, 1151-1158.
18. Ghadamyari, M., Hosseininaveh, 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(3), 197-204.
19. Gholamzadeh Chitgar, M., Ahsaei, S. M., Ghadamyari, M., Sharifi, M., Hosseini Naveh, V. and Sheikhnejad, H. (2013). Biochemical characterization of digestive carbohydrases in the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae). *Journal of Crop Protection*, 2(3), 305-318.
20. Haddi, K., Berger, M., Bielza, P., Cifuentes, D., Field, L. M., Gorman, K., Rapisarda, C., Williamson, M. S. & Bass, C. (2012). Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(7), 506-513.
21. Li, Y. K. & Byers, L. D. (1989). Inhibition of  $\beta$ -glucosidase by imidazoles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 999, 227-232.
22. Masoumzadeh, A., Hosseininaveh, V., Ghamari, M., Goldansaz, S. H., Allahyari, H. & Shojaei, A. (2014). Digestive  $\alpha$ -amylase inhibition negatively affects biological fitness of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hub.) (Lep: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research*, 59, 167-171.
23. Mehrabadi, M., Bandani, A. R. & Saadati, F. (2010). Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*,  $\alpha$ -amylases by  $\alpha$ -amylase inhibitors (T- $\alpha$ AI) from Triticale. *Journal of Insect Science*, 10(1), 179.
24. Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Mehrabadi, R. & Alizadeh, (2012). H. Inhibitory activity of proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary  $\alpha$ -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, 220-228.
25. Melo, F. R., Sales, M. P., Pereira, L. S., Bloch, C., Franco, O. L. & Ary, M. B. (1999).  $\alpha$ -Amylase inhibitors from cowpea seeds. *Protein and Peptide Lett*, 6(6), 385-390.
26. Mohammadzadeh, M. & Izadi, H. (2016). Enzyme activity, cold hardiness, and supercooling point in developmental stages of *Acrosternum arabicum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Insect Science*, 16(1), 1-6.

27. Mohammadzadeh, M., Bandani, A. R. & Borzoui, E. (2013). The effect of cereal seed extracts on amylase activity of the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(20), 2476-2485.
28. Nakonieczny, M., Michalczyk, K. & Kędzierski, A. (2006). Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. frankenbergeri. *Comptes Rendus Biologies*, 329(10), 765-774.
29. Pahlavan, R., Omid, M. & Akram, A. (2011). Energy use efficiency in greenhouse tomato production in Iran. *Energy*, 36(12), 6714-6719.
30. Price, N. C. & Stevens, L. (1989). *Fundamentals of Enzymology* (Vol. 205). Oxford University Press.
31. Ramzi, S. and Hosseiniaveh, V. (2010). Biochemical characterization of digestive  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase in pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3), 215-219.
32. Riseh, N. S., Ghadamyari, M. & Motamediniya, B. (2012). Biochemical characterisation of  $\alpha$ -and  $\beta$ -glucosidases and  $\alpha$ -and  $\beta$ -galactosidases from red palm weevil, *Plant Protection Science*, 48(2), 85-93
33. Salek Ebrahimi, H. & Gharekhani, GH. H. (2014). Effect of generation and tomato plant cultivar on development of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep.: Gelechiidae). *Agricultural Pest Management*, 1(2), 52-58.
34. Saul, R., Molyneux, R. J. & Elbein, A. D. (1984). Studies on the mechanism of castanospermine inhibition of  $\alpha$ -and  $\beta$ -glucosidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 230(2), 668-675.
35. Sharifi, M., Ghadamyari, M., Moghadam, M. M. & Saiidi, F. (2011). Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its  $\alpha$ -amylase by inhibitors extracted from the common bean. *Archives of Biological Sciences*, 63(3), 705-716.
36. Silva, G. A., Picanço, M. C., Bacci, L., Crespo, A. L. B., Rosado, J. F. & Guedes, R. N. C. (2011). Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Management Science*, 67(8), 913-920.
37. Singh, B., Kaur, T., Kaur, S., Manhas, R. K. & Kaur, A. (2016). Insecticidal potential of an endophytic *Cladosporium velox* against *Spodoptera litura* mediated through inhibition of alpha glycosidases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 131, 46-52.
38. Srinivasan, A., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Gatehouse, J. A. & Gupta, V. S. (2005). A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. *Plant Molecular Biology*, 57(3), 359-374.
39. Tabatabaei, P. R., Hosseiniaveh, 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(2), 187-194.
40. Terra, W. R. & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109, 1-62.
41. Terra, W. R., Ferreira, C., Jordao, B. P. & Dillon, R. J. (1996). Digestive enzymes. In Lehane, M., Billingsley, P. (Eds.), *Biology of the insect midgut* (pp. 153-194). Springer.
42. Titarenko, E. & Chrispeels, M. J. (2000). cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the  $\alpha$ -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(10), 979-990.
43. Valencia, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E. & 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(3), 207-213.
44. Vatanparast, M., Hosseiniaveh, V., Nozari, J. & Sajadian, S. M. (2012). Digestive carbohydrases in the larva of the leopard moth, *Zeuzera pyrina* (Lep.: Cossidae). *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 43 (1), 97-109. (in Farsi)
45. Zeng, F. & Cohen, A. C. (2000). Comparison of  $\alpha$ -amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126(1), 101-106.
46. Zibae, A., Bandani, A. R. & Ramzi, S. (2009). Enzymatic properties of  $\alpha$ -and  $\beta$ -glucosidases extracted from midgut and salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies*, 332(7), 633-641.