

تعیین ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم های آلفا آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز گوارشی در پروانه ابریشم باف پاییزی، *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera:Arctidae)

مولود غلامزاده چیتگر^{۱*}، محمد قدمیاری^۲، بهروز کوچکی^۳ و جلال جلالی سندی^۴

۱- نویسنده مسوول: استادیار بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران (m.gholamzadeh@areeo.ac.ir)

۲- دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴- استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۵

چکیده

در تحقیق حاضر ویژگی های آنزیمی آلفا آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز سیستم گوارشی لاروهای پروانه ابریشم باف پاییزی *Hyphantria cunea* Drury جهت شناخت بهتر فیزیولوژی گوارشی آفت تعیین شد. میانگین فعالیت ویژه آنزیم های آلفا آمیلاز، آلفا و بتا گلوکوزیداز به ترتیب در لوله گوارش لاروهای سن پنجم $0/17 \pm 9/1$ ، $3/6 \pm 0/9$ و $6/8 \pm 0/9$ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین به دست آمد. آنزیم آلفا آمیلاز در غده بزاقی و لوله گوارش لاروهای سن پنجم در pH ۱۰ و آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش و همولنف به ترتیب در pH های ۸، ۷، ۸ و ۸ بیشترین فعالیت را داشتند. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش و غدد بزاقی به ترتیب برابر با ۵۵ و ۴۵ درجه سلسیوس و برای آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش و همولنف به ترتیب برابر با ۳۵، ۴۵، ۴۵ و ۳۵ درجه سلسیوس بود. بیشترین اثر بازدارندگی توسط یون های Na^+ و Co^{2+} (به ترتیب در غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی مولار) روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، Fe^{2+} (غلظت ۲۰ میلی مولار) روی فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز و Mn^{2+} (غلظت ۱۰ میلی مولار) روی فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز ایجاد شد. یون Mn^{2+} (غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی مولار) روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و یون های Ba^{2+} (غلظت ۲۰ میلی مولار) و Mg^{2+} (غلظت ۱۰ میلی مولار) روی فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز بیشترین افزایش معنی دار را ایجاد کردند. طبق نتایج زایموگرام، آنزیم های آلفا آمیلاز، آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش لارو سن پنجم پروانه *H. Cunea* دارای دو ایزوفرم بودند. یافته های حاصل می تواند در تحقیقات تکمیلی راجع به استفاده از مهارکننده های آنزیم های گوارشی در کنترل *H. cunea* مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: *Hyphantria cunea* آلفا آمیلاز، آلفا-بتا گلوکوزیداز، بازدارندگی

مقدمه

در اکثر حشرات وجود کربوهیدرات ها در تولید مواد غذایی مورد نیاز برای رشد، تکامل، بقا و تولیدمثل ضروری است. ارزش غذایی این ترکیبات به آنزیم های هیدرولیز کننده ای بستگی دارد که کربوهیدرات های پیچیده را به ساختارهای مونومری و قابل جذب برای

سلول های پوششی معده تبدیل می کنند (Dadd, 1985). آنزیم آلفا-آمیلاز (1, 4-D- α -D-گلوکان گلوکانو هیدرولاز (E.C.3.2.1.1) جزو کربوهیدرازها بوده و شکستن پیوندهای گلوکوزید داخلی نشاسته و گلیکوژن را بر عهده دارد (Mohamed, 2004). این آنزیم در اغلب گیاهان، جانوران، حشرات و میکروارگانیسم ها وجود

صنوبر، عرعر، نارون و گیلاس در اثر حمله آفت مذکور به‌طور کامل بی‌برگ می‌شوند (Rezaei et al., 2004). جمعیت بالای پروانه ابریشم باف پاییزی به‌ویژه در سال‌های اخیر موجب شده تا تحقیقات جامع‌تری در راستای کنترل آن انجام گیرد (Ajamhasani et al., 2011)؛ (Zibae and Jalali Sendi, 2010). به دلیل تأثیر نامطلوب آفت‌کش‌ها روی سلامت محیط‌زیست و موجودات غیرهدف به کارگیری روش‌های کم‌خطر در کنترل آفت مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این راه‌ها می‌تواند استفاده از بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات در قالب گیاهان تراریخته باشد (Franco et al., 2002). با توجه به اهمیت کربوهیدرازها در هضم غذا و آزادسازی مونوساکاریدهای ضروری رشد حشرات، هر گونه اختلال در فرایند آنزیمی می‌تواند حشره را از دریافت منبع انرژی کربوهیدرات محروم کند. تعداد زیادی ژن از گیاهان و میکروب‌ها شناسایی شده‌اند که وقتی به گیاهان منتقل شوند محصولاتی به وجود می‌آید که برای حشرات گیاه‌خوار سمی بوده و باعث مقاومت یا حفاظت گیاهان در مقابل حشرات گیاه‌خوار می‌شود (Gatehouse and Gatehouse, 1998). از این رو تولید گیاهان تراریخته حاوی ژن بیان‌کننده بازدارنده‌های کربوهیدراز می‌تواند به‌عنوان یکی از روش‌های ایمن جایگزین ترکیبات شیمیایی خطرناک در برابر حشرات گیاه‌خوار مدنظر قرار گیرد. در این روش می‌توان با برهم زدن فعالیت کربوهیدرازها رشد لاروی را به تعویق انداخته و در تکامل حشره اختلال ایجاد کرد. برای مثال گیاه نخود تراریخته حاوی ژن بازدارنده آلفا آمیلاز در برابر سوسک‌های جویبات *Callosobruchus chinensis* و *Bruchus pisorum* موفق عمل کرد (Ishimoto and Kitamura, 1989)؛ (Shade et al., 1994). عصاره پروتئینی ترتیکاله در غلظت ۱۷ میکروگرم پروتئین تا ۷۰ درصد روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در کرم غوزه، *Helicoverpa armigera* اثر مهارکنندگی داشت (Dastjerdi and Bandani, 2012). در این راستا شناخت صحیح ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی در حشرات موردنیاز می‌باشد.

داشته و نقش مهمی در هضم و متابولیسم کربوهیدرات‌ها ایفا می‌کند (Octavio et al., 2000). آنزیم آلفا-آمیلاز از قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش حشرات شامل معده، غدد بزاقی و همولف استخراج و ویژگی‌های آن تعیین شد (Ramzi and Zibae, 2016)؛ (Saber Riseh and Ghadamyari, 2012)؛ (Sharifi et al., 2011). آلفا-آمیلاز اولین بار در سوسک *Tenebrio molitor* استخراج و ویژگی‌های آنزیمی آن بررسی گردید (Applebaum, 1964). علاوه بر آلفا آمیلازها، آلفا و بتا گلوکوزیدازها نیز در هضم کربوهیدرات‌ها در حشرات مهم بوده و در هیدرولیز دی و الیگوساکاریدها نقش دارند (Terra and Ferreira, 1994). آلفا گلوکوزیداز (EC 3.2.1.20) هیدرولیز پیوند 1, 4- α گلوکوزیدی را از آریل گلوکوزیدها مانند دی ساکاریدها یا الیگوساکاریدها و بتا گلوکوزیدها هیدرولیز پیوندهای 1, 4- β گلوکوزیدی بین مونوساکاریدها را کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها در تجزیه دی و الیگوساکاریدهای حاصل از همی سلولز و سلولز و هم‌چنین در برهم کنش‌های بین گیاهان و حشرات نقش دارند (Terra and Ferreira, 1994). پروانه ابریشم باف پاییزی یا سفید اشجار *Hyphantria cunea* Dury (Lep.: Arctiidae) از مهم‌ترین آفات درختان مثمر، غیرمثمر، بوته‌ها و علف‌های هرز است. آفت مذکور اولین بار از استان گیلان در تابستان ۱۳۸۱ گزارش شد و در حال حاضر در ۱۱ شهرستان و ۲۸۵ روستای این استان فعالیت دارد. پروانه ابریشم باف پاییزی بیشترین دامنه میزبانی را در بین حشرات داشته به طوری که لاروها قادرند از ۶۳۶ گونه گیاهی تغذیه کنند. لاروهای سن اول پس از خروج از تخم به‌طور دسته جمعی شروع به تغذیه می‌کنند. سپس تقریباً همگی با هم پوست اندازی کرده و وارد مراحل بعدی لاروی می‌شوند. خسارت لاروهای سنین چهارم و پنجم بیشتر بوده و در این سنین به شکل پراکنده از برگ‌ها تغذیه می‌کنند. درختانی از جمله توت، افرای سیاه، سیب، گلابی، لرگ، انجیر، انگور، زبان گنجشک، توسکا، یید،

شدند. بعد از این مرحله، محلول روشنین از ته نشین جدا شده و به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. از تعداد ۱۰ عدد لارو برای تهیه هر نمونه استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز از روش Bernfeld (1955) استفاده شد. محلول نشاسته ۱ درصد به عنوان سوبسترا به کار رفت. ۵۰ میکرولیتر سوبسترا به ۴۰ میکرولیتر بافر استات سدیم-گلیسین-فسفات ۵۰ میلی مولار و ۱۰ میکرولیتر محلول روشنین افزوده شد و واکنش در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید^۱ واکنش متوقف و مجموعه به مدت ۷ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. بعد از سرد شدن نمونه ها در دمای اتاق به میزان مناسب آب مقطر به آن ها اضافه و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه Microplate reader Stat Fax 3200 قرائت شد. طی این آزمایش فعالیت آنزیم در لوله گوارش سنین مختلف لاروی ۵-۲ و غدد بزاقی لارو سن پنجم اندازه گیری شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز و بر حسب میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم های گلوکوزیداز بر اساس روش Silva and Terra (1995) با اندکی تغییرات و با استفاده از سوبستراهای pNαG^۲ برای آلفا-گلوکوزیداز و pNβG^۳ برای بتا-گلوکوزیداز اندازه گیری شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول روشنین به همراه ۴۵ میکرولیتر سوبسترا (۲۵ میلی مولار) و ۱۱۵ میکرولیتر بافر استات سدیم-گلیسین-فسفات به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس با افزودن ۶۰۰ میکرولیتر NaOH (۰/۲۵ مولار) واکنش متوقف و بعد از ۵ دقیقه جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم گلوکوزیداز با استفاده از منحنی استاندارد

آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز در سیستم گوارشی حشرات مختلف توسط برخی محققین استخراج و مورد بررسی قرار گرفته اند (Ahsaei et al., 2013; Gholamzadeh, Gholamzadeh chitgar et al., 2013; chitgar et al., 2014; Hassani et al., 2014; Jahanjo et al., 2013). تاکنون در مورد کربوهیدرازهای گوارشی در دستگاه گوارش پروانه ابریشم باف پاییزی تحقیقی صورت نگرفته است. بنابراین در تحقیق حاضر ویژگی های آنزیم های آلفا آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز جهت شناخت بهتر فیزیولوژی گوارشی آفت، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه نمونه حشرات

تعدادی دسته تخم پروانه *H. cunea* تابستان ۱۳۹۱ از روی درختان چنار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان جمع آوری و جهت پرورش به آزمایشگاه منتقل شدند. تغذیه و پرورش لاروها روی برگ های شاداب و تازه درخت چنار در شرایط آزمایشگاهی با دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰-۸۰ درصد در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام گرفت.

تشریح حشره و آماده سازی نمونه آنزیمی

به دلیل ریز و نامناسب بودن لارو سن یک جهت تشریح، از سنین ۵-۲ لاروی برای انجام آزمایش ها استفاده شد. برای جدا کردن لوله گوارش ابتدا لاروها روی یخ بی حس شدند و به کمک پنس، سطح شکمی لاروها شکافته شد تا دستگاه گوارش به طور کامل آشکار شود. محتویات دستگاه گوارش خالی شده و بافت های اضافی و لوله های مالپیگی از آن جدا شد. لوله گوارش تشریح شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. برای تهیه نمونه، هر عدد لوله گوارش و غده بزاقی به ترتیب در ۲۰ و ۵ میکرولیتر آب مقطر درون ظرف محتوی یخ به کمک یک هموژنایزر دستی هموژنایز و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس در $14000 \times$ برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ

1- Dinitrosalicylic acid (DNS)

2- p-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside

3- p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside

پی‌نیتروفنول محاسبه گردید.

اثر pH و دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز

برای بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم، pHهای مختلف ۴-۱۲ با استفاده از بافر استات سدیم-گلیسین-فسفات ۵۰ میلی مولار تهیه شدند. آزمایش روی لاروهای سن پنجم پروانه ابریشم باف پاییزی انجام شد. بعد از تهیه نمونه آنزیمی، سوسترا و بافر استات سدیم-گلیسین-فسفات به آن افزوده شد. در این آزمایش همه مراحل کار مطابق روش اندازه گیری فعالیت آنزیم که قبلاً شرح داده شد انجام گرفت. بدین ترتیب اسیدپت بهینه فعالیت هر آنزیم به طور جداگانه تعیین گردید. در بررسی اثر دما، فعالیت آنزیم در دماهای مختلف ۱۵-۷۵ درجه سلسیوس در pH بهینه (به دست آمده از آزمایش اثر pH) روی لاروهای سن پنجم مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از تهیه نمونه آنزیمی، سوسترا و بافر استات سدیم-گلیسین-فسفات به آن افزوده شد. در این آزمایش همه مراحل کار مطابق روش توضیح داده شده در بند اندازه گیری فعالیت آنزیم انجام گرفت. بدین ترتیب دمای بهینه فعالیت هر آنزیم به طور جداگانه تعیین شد.

اثر مواد شیمیایی بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز

در این آزمایش اثریون‌های CaCl_2 ، MnCl_2 ، ZnCl_2 ، CoCl_2 ، FeCl_2 ، MgCl_2 ، KCl ، BaCl_2 و Hg_2Cl_2 با دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی مولار روی فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز بررسی شدند. پس از تهیه غلظت‌های مشخص از ترکیبات مذکور، نمونه آنزیمی، یون و بافر به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس سوسترا افزوده و بقیه مراحل همانند روش کار توضیح داده شده در بند اندازه گیری فعالیت آنزیم در محیط بافری با اسیدپت بهینه فعالیت هر آنزیم انجام شد.

زایموگرام آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

برای انجام این کار از روش Tokuda et al.

(2009) با اندکی تغییر استفاده شد. برای الکتروفورز آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز، نمونه‌های به دست آمده از دستگاه گوارش لاروهای سن پنجم با بافر نمونه مخلوط و درون چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. الکتروفورز در ۱۰۰ ولت و در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل به مدت ۱۰ دقیقه درون ظروف حاوی سوسترای اختصاصی $^4\text{-MUBG}$ و $^4\text{-MuoG}$ ۳ میلی مولار در بافر استات سدیم ۰/۱ مولار به ترتیب برای آنزیم‌های بتا گلوکوزیداز و آلفا گلوکوزیداز در دمای اتاق قرار داده شد. با قرار دادن ژل در دستگاه ژل داگ باندهای ظاهر شده در زیر نور UV مشاهده گردید.

اندازه گیری پروتئین موجود در نمونه‌های آنزیمی

اندازه گیری پروتئین با استفاده از روش Bradford (1976) انجام شد و از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS انجام گردید. رسم نمودارها و مرتب کردن داده‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ صورت گرفت.

نتایج و بحث

فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز

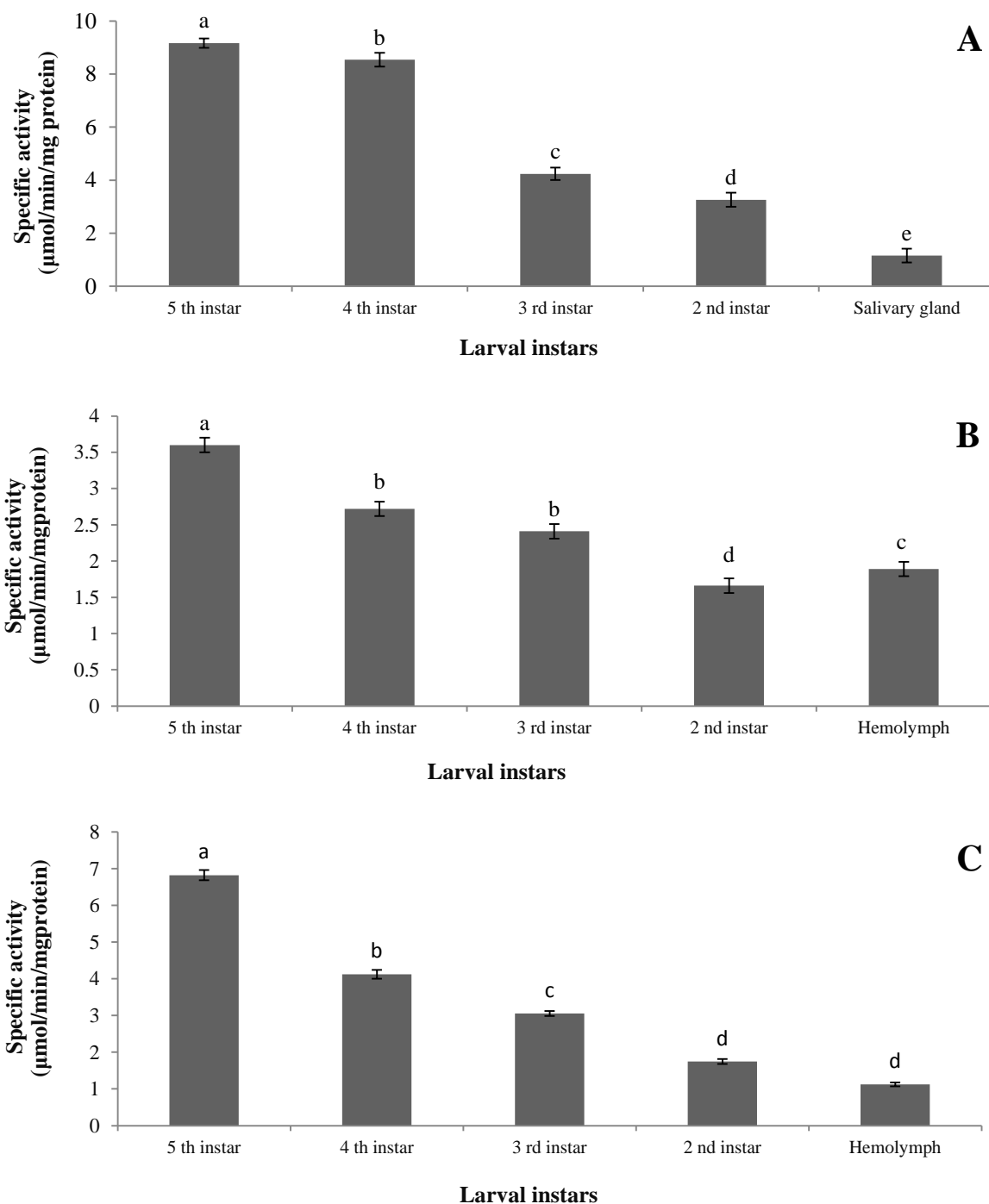
نتایج نشان داد که آنزیم آلفا-آمیلاز در غدد بزاقی و لوله گوارش لاروهای پروانه ابریشم باف پاییزی وجود داشت و میزان فعالیت آن در سنین مختلف لاروی متفاوت بود (شکل ۱، A). به طوری که با افزایش سن لاروی بر میزان فعالیت این آنزیم افزوده و بیشترین میزان فعالیت آن در لاروهای سن ۵ مشاهده شد. هم چنین میزان فعالیت آنزیم در غدد بزاقی نسبت به لوله گوارش بسیار کمتر بوده

2- 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoopyranoside
3- 4-methylumbelliferyl- α -D-glucoopyranoside

1- Ethylene diamine tetra acetic acid

آنزیم‌ها در لاروهای سن پنجم بیشتر از سایر سنین لاروی فعالیت داشتند (شکل ۱، B و C).

و اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد به دست آمد. بررسی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش سنین مختلف لاروی ۲-۵ نشان داد که این



شکل ۱- میانگین فعالیت ویژه (بر حسب میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) آنزیم آلفا آمیلاز (A)، آلفا گلوکوزیداز (B) و بتا گلوکوزیداز (C) در لوله گوارش سنین مختلف لاروی، غدد بزاقی و همولنف لارو سن پنجم *Hyphantria cunea* Figure 1. The specific activities ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) of α -amylase (A), α -glucosidase (B) and β -glucosidase (C) in gut, salivary gland and hemolymph of different larval instar of *Hyphantria cunea* Means followed by the different letters is differ significantly by Tukey's test ($P < 0.05$)

حداکثر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در ۹ PH گزارش شد (Zibaee et al., 2008).

pH بهینه فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در لوله گوارش و همولنف لاروهای سن پنجم پروانه ابریشم باف پاییزی به ترتیب برابر با ۸ و ۷ به دست آمد (شکل ۳، A). طبق نتایج، فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در لوله گوارش در ۴ pH کمتر از ۲۰ درصد بوده که به تدریج افزایش یافت تا به بیشترین میزان خود در ۸ pH رسید. میزان فعالیت آنزیم مذکور در ۹-۱۰ pH کاهش یافته و از آن به بعد با افزایش pH، میزان فعالیت به تدریج کاهش تا در ۱۱-۱۲ PH به حداقل رسید. pH بهینه فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش و همولنف لاروهای سن پنجم برابر با ۸ به دست آمد (شکل ۳، B). فعالیت بتا-گلوکوزیداز در لوله گوارش در ۴ pH به میزان ۶۰ درصد بود. این آنزیم در محدوده pHهای ۶-۸ دارای حداکثر فعالیت بوده و در pHهای بالای ۸ فعالیت آن به شدت کاهش یافت. آنزیم مذکور در همولنف در دامنه بسیار وسیعی از pH فعال بود، به طوری که بیشتر از ۸۰ درصد فعالیت آن بین pHهای ۶-۱۰ مشاهده شد. اسیدیته یکی از خواص داخلی بسیار مهم معده است که روی آنزیم‌های گوارشی تأثیرگذار می‌باشد. آنزیم‌ها دارای دامنه‌ای از pH مطلوب می‌باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در pH بالاتر و پایین‌تر از آن فعالیت‌شان کاهش می‌یابد (Franco et al., 2002). اسیدیته می‌تواند روی پایداری آنزیم و بهبود فعالیت بهینه آن تأثیرگذار باشد. اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم با اسیدیته معده حشره در برخی گونه‌ها هم‌خوانی داشته و تحت تأثیر فاکتورهای نظیر غذا، pH غذا و جمعیت میکروارگانسیم‌های معده قرار دارد (Dow, 1984). در تشابه با نتایج تحقیق حاضر، pH بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش کرم ساقه خوار برنج برابر ۸ گزارش شد (Zibaee et al., 2008). در لوله گوارش لارو پروانه برگ‌خوار توت pH بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز به ترتیب ۷/۵ و ۵/۵

میانگین فعالیت ویژه آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش لاروهای سن پنجم پروانه ابریشم باف پاییزی ۹/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین به دست آمد. در تشابه، میانگین فعالیت ویژه آنزیم مذکور در لوله گوارش لارو سن آخر زنبور برگ‌خوار رز، *Arge rosae* ۹/۴ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین گزارش شده است (Gholamzadeh Chitgar et al., 2013). میانگین فعالیت ویژه آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز در لاروهای سن پنجم پروانه ابریشم باف پاییزی به ترتیب ۳/۶ و ۶/۸ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. این نشان می‌دهد که مقدار فعالیت ویژه آنزیم بتا گلوکوزیداز نسبت به آلفا گلوکوزیداز در بافت‌های مورد آزمایش بیشتر بود. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق با افزایش سن لاروی میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته و بیشترین میزان فعالیت در لاروهای سن پنجم مشاهده شد. این وضعیت را می‌توان به میزان تغذیه و تحرک بیشتر این مرحله نسبت به سنین دیگر مربوط دانست. نتیجه مشابهی توسط Jahanjo et al. (2013)، Ghanbarinezhad et al. (2014) و Ghanbarinezhad et al. (2015) گزارش شده است.

اثر pH روی فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز

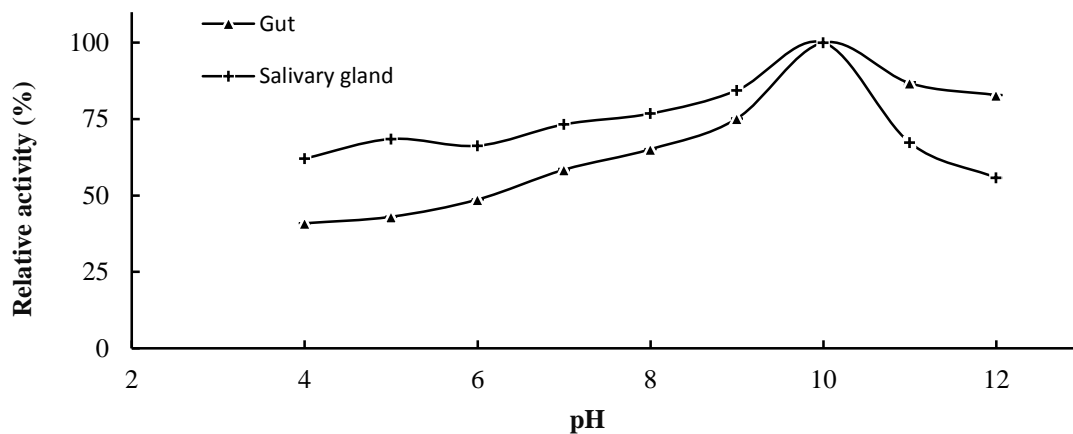
طبق نتایج، آنزیم آلفا آمیلاز در هر دو نمونه غده بزاقی و لوله گوارش لاروهای سن پنجم *H. cunea* در دامنه وسیعی از pH فعالیت داشت (شکل ۲). pH بهینه فعالیت آنزیم مذکور در غده بزاقی و لوله گوارش برابر ۱۰ به دست آمد.

pH بهینه فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در راسته‌های بالپولکداران در محدوده قلیایی گزارش شده است (Valencia et al., 2000). نتیجه مشابهی برای فعالیت آنزیم مذکور در لوله گوارش لاروهای پروانه *Lasiocampa quercus* (Sphingidae) و *Manduca sexta* (Sphingidae) (Dow, 1984) در لوله گوارش لارو کرم ساقه‌خوار برنج

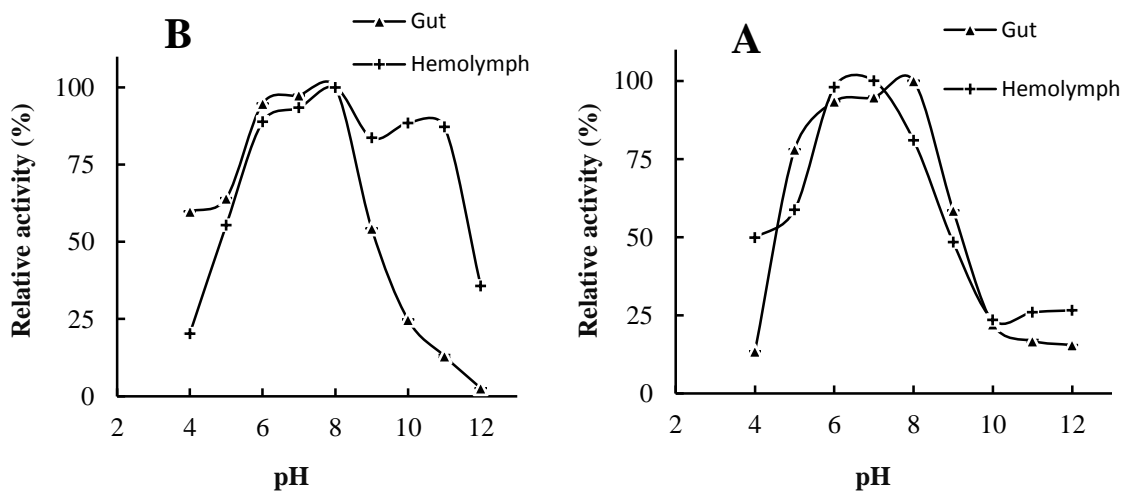
اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز

دمای بهینه فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش و غدد بزاقی لاروهای سن پنجم به ترتیب برابر با ۵۵ و ۴۵ درجه سلسیوس به دست آمد (شکل ۴). در تشابه، آنزیم مذکور در لوله گوارش لارو پروانه برگخوار انجیر در ۵۵ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت را نشان داد (Gholamzadeh Chitgar et al., 2014).

به دست آمد (Ghadamyari et al., 2010). در آزمایش حاضر pH در لوله گوارش لاروهای پروانه ابریشم باف پاییزی مانند سایر بالپولکداران قلیایی بود (Gholamzadeh Chitgar et al., 2014). احتمال می رود که pH بالا در حشرات جهت سازگاری آن‌ها برای تغذیه از گیاهان دارای تانن باشد (Chapman, 1998). زیرا تانن‌ها در pHهای پایین در معده حشرات به پروتئین‌ها باند شده و میزان تجزیه و هضم غذا را کاهش می دهند (Dow, 1984).

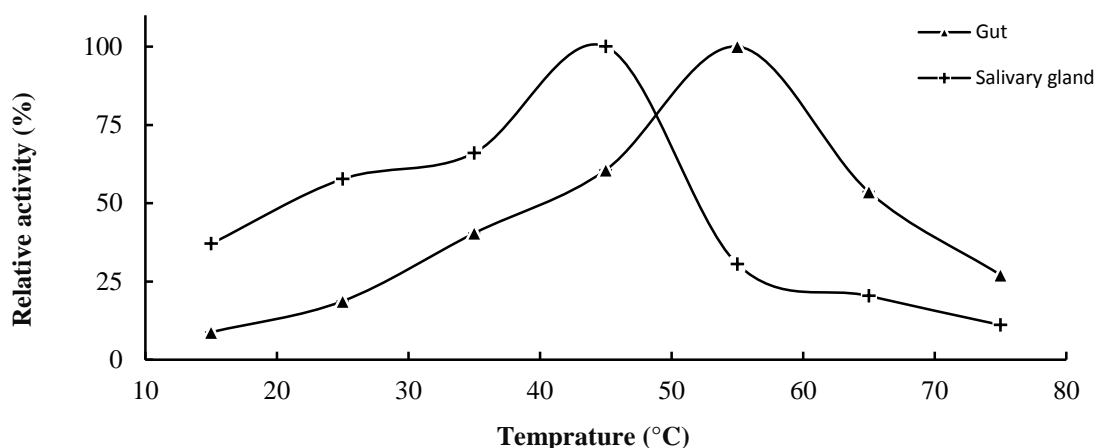


شکل ۲- اثر pH روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش و غدد بزاقی لارو سن پنجم *Hyphantria cunea*
Figure 2. The effect of pH on the mean activity of α -amylase in gut and salivary gland of fifth larval instar of *Hyphantria cunea*



شکل ۳- اثر pH روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم آلفا گلوکوزیداز (A) و بتا گلوکوزیداز (B) در لوله گوارش و همولف لاروهای سن پنجم *Hyphantria cunea*

Figure 3. The effect of pH on the mean activities of α -glucosidase (A) and β -glucosidase (B) in gut and hemolymph of fifth larval instar of *Hyphantria cunea*



شکل ۴- اثر دما روی فعالیت نسبی آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش و غده بزاقی لارو سن پنجم *Hyphantria cunea*
 Figure 4. The effect of temperature on the relative activity of α -amylase in gut and salivary gland of fifth larval instar of *Hyphantria cunea*

جذب انرژی زیاد توسط آنزیم، از هم گسیخته شدن ساختمان سه بعدی و کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. به طور مشابه، دمای بهینه برای فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش سن قرمز پسته، *Lygaeus pandurus* برابر با ۴۵ درجه سلسیوس گزارش شد (Hassani et al., 2014). آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در اکثر حشرات در محدوده دمایی ۲۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس فعالیت دارند (Huber and Mathison, 1976). دمای بهینه آنزیم گلوکوزیداز در لوله گوارش و غدد بزاقی کرم ساقه خوار برنج (Zibae et al., 2008) و در لوله گوارش پروانه برگخوار توت (Ghadamyari et al., 2010) برابر با ۴۵ درجه سلسیوس گزارش شده که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد.

اثر مواد شیمیایی روی فعالیت آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و آلفا- بتا گلوکوزیداز

برخی از یون‌ها افزایش و برخی دیگر کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ایجاد کردند (جدول ۱). یون‌های Mg^{2+} ، Mn^{2+} ، Fe^{2+} ، K^+ ، Ba^{2+} و Na^+ در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار فعالیت آلفا آمیلاز را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش دادند. از این میان یون Mn^{2+} بیشترین اثر افزایشی را روی فعالیت آلفا آمیلاز ایجاد کرد. بیشترین اثر کاهشی روی فعالیت آنزیم مذکور توسط یون‌های Co^{2+} و Na^+ به ترتیب در

دمای بهینه برای بیشترین فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در لوله گوارش و همولنف به ترتیب برابر با ۳۵ و ۴۵ درجه سلسیوس به دست آمد (شکل ۵، A). فعالیت آلفا گلوکوزیداز در لوله گوارش در محدوده دمایی ۱۵-۲۵ درجه سلسیوس به میزان ۶۰-۸۰ درصد بوده و بعد از آن فعالیت آنزیم افزایش یافته و به بیشترین حد خود در ۳۵ درجه سلسیوس رسید. فعالیت آنزیم مذکور در لوله گوارش در دماهای بالاتر از دمای ۴۵ درجه سلسیوس کاهش ناگهانی داشته و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به حداقل رسید. آنزیم آلفا گلوکوزیداز در همولنف در دامنه دمایی کمتری نسبت به لوله گوارش فعالیت داشت.

آنزیم بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش و همولنف به ترتیب در ۴۵ و ۳۵ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت خود را داشت (شکل ۵، B). فعالیت آنزیم مذکور در لوله گوارش در محدوده دمایی ۱۵-۳۵ درجه سلسیوس به تدریج افزایش یافته و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به بیشترین میزان خود رسید. بعد از آن فعالیت آنزیم مذکور کاهش ناگهانی یافته و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به حداقل رسید. دمای زیاد باعث تغییرات در ترکیب سه بعدی آنزیم شده و فعالیت آن را کاهش می‌دهد. طبق مطالعات Boyd et al. (2002) افزایش دما در محیط واکنش آنزیمی باعث افزایش انرژی سینتیکی واکنش دهنده‌ها (سوبسترا و آنزیم) می‌گردد. در نتیجه باعث

کاهشی را روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز ایجاد کردند. یون‌های Ba^{2+} در غلظت ۲۰ میلی‌مولار و Mg^{2+} در غلظت ۱۰ میلی‌مولار بیشترین افزایش معنی‌دار را روی فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز داشتند. EDTA در غلظت ۲۰ میلی‌مولار فعالیت آلفا گلوکوزیداز را نسبت به شاهد کاهش داد ولی در غلظت ۱۰ میلی‌مولار روی فعالیت آلفا گلوکوزیداز و در هر دو غلظت روی فعالیت بتا گلوکوزیداز اثر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت.

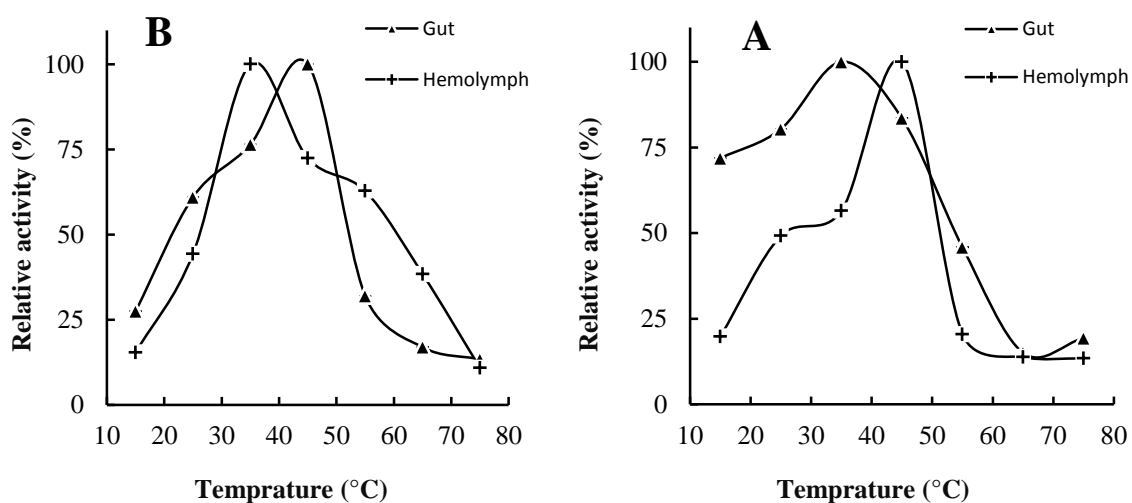
$CaCl_2$ در غلظت ۴۰ میلی‌مولار فعالیت بتا گلوکوزیداز را کاهش و فعالیت آلفا گلوکوزیداز را در لوله گوارش لارو پروانه برگ‌خوار توت افزایش داده است. هم‌چنین با افزایش غلظت EDTA فعالیت آلفا گلوکوزیداز افزایش ولی فعالیت بتا گلوکوزیداز کاهش یافت (Ghadamyari et al., 2010).

فعالیت آنزیم‌های آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گلوکوزیداز روی ژل

طبق نتایج حاصل از آنالیز زایموگرام، دو ایزوفریم از هر یک از آنزیم‌های آلفا آمیلاز، آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش لارو سن پنجم پروانه ابریشم باف پاییزی نمایان شد (شکل ۶). مشابه این نتایج تعداد ۲ ایزوفریم از

غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار ایجاد شد. EDTA نیز در غلظت ۲۰ میلی‌مولار فعالیت آلفا-آمیلاز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در بررسی اثر یون‌ها روی فعالیت آلفا آمیلاز در لوله گوارش لارو زنبور برگ‌خوار رز مشابه تحقیق حاضر Mg^{2+} و EDTA به‌ترتیب اثر افزایشی و کاهشی داشته ولی برعکس Na^+ فعالیت آنزیم را افزایش داده و یون K^+ نیز اثری روی آن نداشت (Gholamzadeh Chitgar et al., 2013). یون‌های K^+ ، Fe^{2+} و Mg^{2+} اثر افزایشی روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش کرم سبز برگ‌خوار ایجاد کردند در حالی که Mn^{2+} باعث کاهش فعالیت آنزیم شد (Asadi et al., 2010). در آزمایشی دیگر، یون‌های Na^+ ، K^+ ، Mg^{2+} و EDTA روی آنزیم آلفا آمیلاز بازدارنده بوده در حالی که یون Ca^{2+} اثر افزایشی روی فعالیت آنزیم داشت (Zibae et al., 2008).

یون‌های Hg^+ ، Fe^{2+} و Mn^{2+} در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش دادند (جدول ۲). در این میان یون Fe^{2+} در غلظت ۲۰ میلی‌مولار و Mn^{2+} در غلظت ۱۰ میلی‌مولار به‌ترتیب بیشترین اثر



شکل ۵- اثر دما روی فعالیت نسبی آنزیم آلفا گلوکوزیداز (A) و بتا گلوکوزیداز (B) در لوله گوارش و همولنف لاروهای سن پنجم *Hyphantria cunea*

Figure 5. The effect of temperature on the relative activities of α -glucosidase (A) and β -glucosidase (B) in gut and hemolymph of fifth larval instar of *Hyphantria cunea*

جدول ۱- اثر ترکیبات شیمیایی روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش لاروهای سن پنجم *Hyphanteria cunea*
Table 1. The effect of chemical compounds on α -amylase relative activity in gut of fifth larval instar of *Hyphanteria cunea*

Compounds	Concentration (m molar)	α -amylase activity (%)	Compounds	Concentration (m molar)	α -amylase activity (%)
Control	-	100	EDTA	10	105.87 \pm 1.72*
	-	100		20	71.22 \pm 1.35*
FeCl ₂	10	128.07 \pm 1.35*	NaCl	10	56.84 \pm 0.44*
	20	150.7 \pm 2.11*		20	128.50 \pm 1.13*
CoCl ₂	10	158.24 \pm 1.47*	CaCl ₂	10	113.33 \pm 1.21*
	20	50.19 \pm 1.23*		20	103.85 \pm 3.2
MnCl ₂	10	184.56 \pm 0.79*	KCl	10	92.28 \pm 1.56*
	20	210.17 \pm 0.98*		20	121.45 \pm 1.84*
ZnCl ₂	10	143.15 \pm 0.94*	BaCl ₂	10	112.05 \pm 0.72*
	20	185.96 \pm 3.1*		20	135.78 \pm 1.63*
Hg ₂ Cl ₂	10	63.15 \pm 1.41*	MgCl ₂	10	96.84 \pm 2.54
	20	92.28 \pm 2.25*		20	122.45 \pm 0.89*

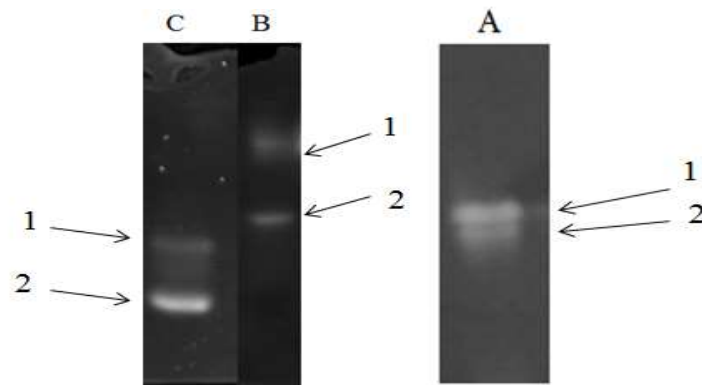
* Shows significant difference with the control p<0.05 (Tukey test).

جدول ۲- اثر ترکیبات شیمیایی روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش لاروهای سن پنجم *Hyphanteria cunea*

Table 2. The effect of chemical compounds on α and β -glucosidase relative activities in gut of fifth larval instar of *Hyphanteria cunea*

Compounds	Concentration (m molar)	α -glucosidase activity (%)	β -glucosidase activity (%)
Control	-	100	100
	-	100	100
FeCl ₂	10	80.5 \pm 0.86*	74.3 \pm 0.47*
	20	53.02 \pm 0.62*	50.5 \pm 0.5*
CoCl ₂	10	98.4 \pm 0.54	98.2 \pm 0.81
	20	84.8 \pm 1.1 *	83.3 \pm 1.21
MnCl ₂	10	64.6 \pm 0.5 *	26.95 \pm 0.62*
	20	60.5 \pm 0.58*	32.37 \pm 0.66*
ZnCl ₂	10	104.8 \pm 0.62*	109.5 \pm 0.93
	20	99.3 \pm 0.88	101.9 \pm 0.62
Hg ₂ Cl ₂	10	63.15 \pm 1.41*	107.8 \pm 0.58
	20	92.28 \pm 2.25*	106.2 \pm 0.71
EDTA	10	97.5 \pm 1.16	104.3 \pm 0.74
	20	89.3 \pm 0.42*	102.7 \pm 0.91
HgCl	10	66.6 \pm 0.81 *	60.07 \pm 0.31*
	20	87.4 \pm 0.51*	76.27 \pm 0.89*
CaCl ₂	10	93.6 \pm 1.36	108.6 \pm 0.63
	20	103.85 \pm 3.2	83.93 \pm 0.38*
KCl	10	104.2 \pm 0.94	102.0 \pm 1.02
	20	102.8 \pm 0.74	106.06 \pm 0.42
BaCl ₂	10	104.07 \pm 0.41	104.04 \pm 0.65
	20	113.2 \pm 0.49*	118.7 \pm 0.73
MgCl ₂	10	125.8 \pm 0.22*	110.1 \pm 0.56
	20	87.7 \pm 0.78 *	86.58 \pm 0.29*

* Shows significant difference with the control p<0.05 (Tukey test).



شکل ۶- زایموگرام آنزیم‌های آلفا آمیلاز (A)، آلفا گلوکوزیداز (B) و بتا گلوکوزیداز (C) در لوله گوارش لاروهای سن پنجم *Hyphantria cunea*

Figure 6. Zymogram of α -amylase (A), α -glucosidase (B) and β -glucosidase (C) in gut of fifth larval instar of *Hyphantria cunea* (1 and 2 show the numbers of bands)

شیوه‌های ایمن در حال گسترش است. به دلیل نقش حیاتی آنزیم‌های گوارشی در تغذیه حشرات، این آنزیم‌ها می‌توانند مورد هدف قرار گیرند. مهارکننده‌های پروتئینی دارای منشأ گیاهی با مداخله در فعالیت آنزیم‌های گوارشی، به سوء تغذیه در حشرات منجر می‌شوند. بنابراین شناسایی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌های دخیل در گوارش حشرات جهت دستیابی به این روش کنترل، ضروری به نظر می‌رسد. طبق نتایج، آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز، آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش لاروهای پروانه *H. cunea* وجود دارند. یافته‌های حاصل می‌تواند در تحقیقات تکمیلی راجع به استفاده از مهارکننده‌های آنزیمی در کنترل آفت مذکور مورد استفاده قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه گیلان به دلیل حمایت مالی سپاس‌گذاری می‌شود.

آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش لارو شب‌پره *Anagasta kuhniella* گزارش شد (Baker, 1989). چنانچه مشاهده می‌شود باندهای مربوط به آنزیم بتا گلوکوزیداز روی ژل قوی‌تر از باندهای آنزیم آلفا گلوکوزیداز است. این مطلب تأییدکننده نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیمی می‌باشد. آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش لارو زنبور برگ‌خوار رز دارای یک ایزوفرم و در لوله گوارش لارو پروانه برگ‌خوار انجیر به ترتیب دارای ۳ و ۲ ایزوفرم بودند (Gholamzadeh Chitgar et al., 2013; 2014). هم‌چنین تعداد ۲ و ۱ ایزوفرم به ترتیب برای آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش لارو کرم سبز برگ‌خوار برنج گزارش شد (Asadi et al., 2012).

با توجه به اهمیت استفاده از روش‌های غیرشیمیایی در کنترل آفات کشاورزی در راستای حفظ و حمایت از محیط‌زیست و موجودات غیرهدف، تلاش برای تکامل

REFERENCES

Ahsaei, S.M., Hosseinaveh, V., and Bigham, M. 2013. Biochemical properties of digestive carbohydrases from the sugar beet weevil, *Lixus incanescens* (Coleoptera: Curculionidae). *Arthropods*, 2(3): 126-136.

Ajamhasani, M., Jalali Sendi, J., Farsi, M.J., and Mehrabi, A. 2011. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae* on fourth instar larval of *Hyphantria cunea*

(Lep.: Arctiidae). Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 9(1): 1-13. (In Farsi).

Applebaum, S.W. 1964. The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase. Journal of Insect Physiology, 10: 897-906.

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

Asadi, A., Ghadamyari, M., Sajedi, R.H., Jalali, J., and Tabari, M. 2012. Biochemical characterization of α - and β -glucosidases in alimentary canal, salivary glands and haemolymph of the rice green caterpillar, *Naranga aenescens* M. (Lepidoptera Noctuidae). Biologia, 67(6): 1186-1194.

Baker, J.E. 1989. Interaction of partially-purified amylase from larval *Anagastia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) with amylase inhibitors from wheat. Comparative Biochemistry and Physiology, 93B: 239-246.

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

Boyd, D.W., Cohen, A.C., and Alverson, D.R. 2002. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a predacious plant bug. Annals of the Entomological Society of America, 95: 395-401.

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.

Chapman, R. F. 1998. The Insects Structure and function (4th edition). Cambridge University Press, Cambridge.

Dadd, R.H. 1985. Nutrition: Organisms. In G.A. Kerkut, and L.L. Gilbert (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 4, Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion, Pergamon Press, Oxford. pp. 313-390.

Dastjerdi, M., and Bandani, A. 2012. Effect of proteinaceous extract of triticale seed extract on α -amylase activity of *Helicoverpa armigera*. Plant Pests Research, 2(1): 49-51. (In Farsi with English abstract).

Dow, J.A. 1984. Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. American Journal of Physiology, 246: 633-635.

Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., and 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: 397-412.

Gatehouse, A.M.R., and Gatehouse, J.A. 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. Pesticide Science, 52: 165-175.

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

Ghanbarinezhad, R., Ghadamyari, M., Sajedi, R., and GholamzadehChitgar, M. 2015. Biochemical characterization of galactosidases in *Epilachna chrysomelina* (Col.: Coccinellidae). Journal of Plant Protection, 38(3): 13-24. (In Farsi).

Ghanbarnezhad, R., Ghadamyari, M., and Sajedi, R. 2014. Biochemical characterization of α -amylase in *Epilachna chrysomelina* (Col.: Coccinellidae). Iranian Journal of Plant Protection Science, 45(2): 251-263. (In Farsi).

Gholamzadeh Chitgar, M., Ahsaei, S.M., Ghadamyari, M., Sharifi, M., Hosseini Naveh, V., and Sheikhnjad, H. 2013. Biochemical characterization of digestive carbohydrases in the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae). Journal of Crop Protection, 2(3): 305-318.

Gholamzadeh Chitgar, M., Ghadamyari, M., Sharifi, M., and Hassan Sajedi, R. 2014. Partial characterization of digestive carbohydrases in the midgut of fig tree skeletonizer moth, *Choreutis nemorana* Hubner (Lepidoptera: Choreutidae). Trakia Journal of Sciences, 1: 27-37.

Hassani, M.R., Sajadian, S.M., Vatanparast, M., and Hosseini Naveh, V. 2014. Biochemical characterization of α -amylase and digestive Glucosidase in the pistachio red bug, *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae). Entomology and Phytopathology, 82(1): 53-66. (In Farsi with English abstract).

Huber R.E., and Mathison, R.D. 1976. Physical, chemical and enzymatic studies on the major sucrose on honey bees (*Apis mellifera*). Canadian Journal of Biochemistry, 54: 153-164.

Ishimoto, M., and Kitanura, K. 1989. Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). Applied Entomology and Zoology, 24: 281-286.

Jahanjo F., Ghadamyari, M., Hosseini, R., and Sajedi, R. 2013. Biochemical characterization of digestive α - β glucosidases *Allantus viennensis* (Hym.: Tenthredinidae). Iranian Journal of Plant Protection Science, 44(1): 141-151. (In Farsi with English abstract).

Mohamed, M.A. 2004. Purification and characterization of α -amylase from the infective juveniles of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 139: 1-9.

Octavio, L.F., Daniel, J.R., Francislete, R.M., Carlos Bloch, J.r., Carlos, P.S., and Maria F.G. 2000. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards burchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. European Journal of Biochemistry, 267: 2166-2173.

Ramzi, S., and Zibae, A. 2016. α -amylase activity in the salivary glands and the midgut of *Apodiphus amygdali* Germar (Hemiptera: Pentatomidae). Trakia Journal of Sciences, 2: 183-189.

Rezaei, V. 2004. Biological study of American white webworm: *Hyphantria cunea* Dury (Lep.: Arctiidae), natural enemies and efficiency of parasitoid, *Chouioia cunea* in Guilan province. Ph.D. Thesis, Tarbiat Modares University, Iran. pp. 12-35.

Saberi Riseh, N., and Ghadamyari, M. 2012. Biochemical characterization of α -amylases from gut and hemolymph of *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col.: Curculionidae)

and their inhibition by extracts from the legumes *Vigna radiata* L. and *Phaseolus vulgaris* L. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 72-81.

Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.L., Murdock, T.J.V., Higgins, M.J., and Chrispeels, M.J. 1994. Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Nature Biotechnology*, 12: 793-796.

Sharifi, M., Ghadamyari, M., Mahdavi Moghadam, M., and Saiidi, F. 2011. Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its α -amylase by inhibitors extracted from the common bean. *Archive of Biological Science Belgrade*, 63: 705-716.

Silva, C.P., and Terra, W.R. 1995. An α -glucosidase from perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells: Purification and properties. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25: 487-494.

Terra, W.R., and Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B: 1-62.

Tokuda, G., Miyagi, M., Makiya, H., Watanabe, H., and Arakawa, G. 2009. Digestive beta-glucosidases from the wood-feeding higher termite, *Nasutitermes takasagoensis*: intestinal distribution, molecular characterization, and alteration in sites of expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 931-937.

Valencia, A., Bustillo, A.E., Ossa, G.E., and 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.

Zibae, A., and A.R. Bandani. 2009. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) on the digestive enzymatic profiles and the cellular immune reactions of the sun pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauvaria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*, 12: 1-11.

Zibae, A., Bandani, A.R., Kafil, M., and Ramzi, S. 2008. Characterization of α -amylase in the midgut and salivary glands of rice stiped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11: 201-205.

Zibae, I., and Jalali Sendi, J. 2010. Identification, differential and total count on haemocytes of *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae) and *Glyphodes pyloalis* (Lep.: Crambidae), and investigation on the effect of juvenile hormone on these cells. *Journal of Entomological Society of Iran*, 30(2): 47-67. (In Farsi with English abstract).

Biochemical characterization of digestive α -amylase and α -/ β -glucosidases in the fall web worm, *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctidae)

M. Gholamzadeh-Chitgar^{1*}, M. Ghadamyari², B. Kochaki³ and J. Jalali Sendi⁴

1. ***Corresponding Author:** Assistant Professor of Plant Protection Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran (m.gholamzadeh@areeo.ac.ir)
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Former M.Sc. student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 2 May 2017

Accepted: 26 November 2017

Abstract

Background and Objectives

Amylases and glucosidases are the major enzymes for carbohydrate digestion in herbivorous insects. Any interruption in enzymatic carbohydrate digestion and blocking of carbohydrases by inhibitors can deprive insect from utilizing the sources of carbohydrate energy efficiently. It can reduce insects' survival and reproduction and retard their growth. The control strategies interfering with carbohydrate digestion are known to have been proposed as a practical and safe method for control of herbivorous pests. Therefore, in this research, enzymatic properties of α -amylase and α -/ β -glucosidases from digestive system of larvae of the fall web worm, *Hyphantria cunea* Drury were determined in order to better understand the nutritional physiology of the pest.

Materials and Methods

The α -amylase activity was determined with 1% (w/v) starch as substrate. Absorbance of product was measured at 540 nm with a Microplate Reader Model Stat Fax® 3200. The activities of α -/ β -glucosidases were measured with pN α G (p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside) and pN β G (p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside) as substrates, respectively. P-nitrophenol absorbance was measured at 405 nm. To obtain the optimal pH and temperature for the enzyme activity, various pH 4.0 to 12.0 and different temperatures ranging from 15 to 75°C were examined. The enzymes activity was assayed in the presence of chemicals including EDTA, Hg₂Cl₂, ZnCl₂, CoCl₂, FeCl₂, MgCl₂, KCl, BaCl₂, CaCl₂ and MnCl₂ at two concentrations of 10 and 20 mM. Electrophoresis was performed and the realized bands in the native gel were observed.

Results

The mean specific activities of α -amylase and α -/ β -glucosidases in gut of fifth larval instar were obtained as 9.1, 3.6 and 6.8 μ mol/min/mg protein, respectively. Maximum activity of α -amylase in salivary gland and gut of fifth instar larvae was at pH 10.0 and α -/ β -glucosidases in gut and hemolymph was at pH of 8, 7, 8 and 8, respectively. The optimal temperature of α -amylase in gut and salivary gland was at 55 and 45°C. The values for α and β -glucosidases in gut and hemolymph were 35, 45, 45 and 35°C, respectively. The highest inhibition effect of enzyme activity was caused by Na⁺ and Co²⁺ ions (at concentrations of 10 and 20 mM, respectively) on α -amylase activity, Fe²⁺ (concentration of 20 mM) on α -glucosidases activity and Mn²⁺ (concentration of 10 mM) on β -glucosidases activity. Mn²⁺ (at concentrations of 10 and 20 mM), Ba²⁺ (at concentration of 20 mM) and Mg²⁺ (at concentration of 10 mM) significantly increased the activity of α -amylase, α -glucosidase and β -glucosidase, respectively. The zymogram pattern showed the presence of 2 bands for α -amylase and α -/ β -glucosidases in gut of fifth instar larvae of *H. cunea*.

Discussion

According to the results, α -amylase, α and β glucosidases are present in gut of larvae of *H. cunea*. These findings can be used in future research about using digestive enzymes inhibitors for management of *H. cunea*.

Keywords: *Hyphantria cunea*, α -amylase, α -/ β -glucosidases, Inhibition