تاثیر برخی از ویژگی‌های زیستی سن نواری چتریان، *Graphosoma lineatum* (L.) (Hem., Scutelleridae) روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی آن

محسن یزدانیان[1*]، رضا فرشباف پورآباد[2]، محمد رضا رشیدی[3]، مصطفی ولی‌زاده[4] و نادره رشتچی‌زاده[5]

[1*]- **نویسنده مسؤول**: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(mohsenyazdanian@yahoo.com)

۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشیارگروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۴- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۵- استادیار، آزمایشگاه متابولیسم دارو و بیوشیمی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۲۰

چکیده

نوع آنزیم‌های گوارشی حشرات معمولا با نوع رژیم غذایی آن‌ها ارتباط دارد و حداقل، حضور غالب یک آنزیم نشان می‌دهد که رژیم غذایی حشره عمدتا شامل بستره‌ی مربوط به آن آنزیم می‌باشد. فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات متناسب با وضعیت فردی و نشو و نمایی آن‌ها تغییرات قابل توجهی را نشان می‌دهد. بررسی حاضر نشان داد که در سن *Graphosoma lineatum* (L.) اثر نوع ماده‌ی غذایی (دانه‌های مختلف گیاهان تیره‌ی چتریان) روی فعالیت آنزیم غیرمعنی‌دار بود. نتایج نشان داد که در صورت یکسان نبودن شرایط بیولوژیک و فیزیولوژیک حشرات مورد استفاده در آزمایش‌ها، فعالیت آنزیم در نرها و ماده‌ها ممکن است به ترتیب تا ٤/٥ و ٣/٥ برابر متغیر باشد. به طور کلی، فعالیت آنزیم در حشرات کامل ماده بیش‌تر از نرها بود. فعالیت آلفا- آمیلاز تحت تاثیر دمای محیط پرورش (از ٤ تا ٣٠ درجه‌ی سانتی‌گراد) قرار نگرفت. با گرسنگی دادن حشرات کامل به مدت صفر تا ٤٨ ساعت، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پس از ٢٤ ساعت (١٢/٣٢ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و ٣٦ ساعت (١٤/١٣ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) گرسنگی مشاهده گردید که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. فعالیت آنزیم در بین هر دو غده‌ی بزاقی یک فرد یکسان بود که نشان می‌دهد هر دو غده‌ی بزاقی یک فرد برای تولید یا تخلیه‌ی آنزیم به شکل نسبتا همزمانی به محرک‌های مربوطه پاسخ می‌دهند. متفاوت بودن فعالیت آنزیم در ساعت‌های مختلف شبانه‌روز به یکسان نبودن شرایط بیولوژیک و فیزیولوژیک حشرات مورد استفاده نسبت داده شد. فعالیت آلفا- آمیلاز در حشرات مورد استفاده از نسل‌های دهم تا هفدهم یکسان (حدود ٤/٧ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و فاقد اختلاف معنی‌دار بود. علی‌رغم شباهت برخی از نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققان، بررسی حاضر تاییدکننده‌ی این نظریه است که رسیدن به یک تعمیم کلی در مورد ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات میسر نیست و آنزیم‌های هر گونه باید به طور جداگانه بررسی شوند.

کلید واژه‌ها: سن *Graphosoma lineatum*، ویژگی‌های زیستی، آلفا- آمیلاز بزاقی، فعالیت

مقدمه

آلفا- آمیلازها[1] دربرگیرنده‌ی خانواده‌ای از آندوآمیلازها[2] هستند که پیوندهای α-(1,4)-D-glucan را در ترکیبات نشاسته‌ای، گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌های وابسته هیدرولیز می‌کنند (۱۶و ۱۷). این آنزیم‌ها در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نقش محوری

1- α-amylases
2- Endoamylases

دارنـد (۲۳،۱۷، ۲۴ و ۲۵). ایـن آنـزیم‌هـا یکـی از بزرگ‌ترین خانواده‌های آنزیمـی گـروه گلایکوزیـل هیـدرولازها[1] هـستند کـه بـر مبنـای تـوالی‌شـان طبقه‌بندی شـده‌انـد (۹ و ۱۲). بـه خـاطر گـسترش وسـیع آلفـا- آمیلازهـا در تمـامی اشـکال حیـات (پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها[2])، توالی اسید آمینـه‌ای آن‌ها بسیار متغیر مـی‌باشـد (۹). آلفـا- آمیلازهـا در زیست‌فناوری، به ویژه در صنایع غـذایی و فـراوری نشاسته به یکـی از ارزشـمندترین آنـزیم‌هـا تبـدیل شده‌اند. بسیاری از حشرات، به ویژه آن‌هایی که طی مرحلـه‌ی لاروی و یـا حـشره‌ی کامـل خـود روی فراورده‌های غله‌ای زنـدگی مـی‌کننـد، بـرای زنـده ماندن بـه آمیلازهایـشان وابـسته هـستند (۶، ۱۰ و ۲۲). آلفا- آمیلازهای حشرات و پستانداران در شکل ساختمان‌های نوع اول و سـوم خـود شـباهت‌هـای بسیار زیادی را نـشان مـی‌دهنـد (۲۳). تنهـا آلفـا- آمیلاز حشرات که ساختمان سه بعدی آن مـشخص شـده اسـت، مربـوط بـه کـرم زرد آرد *Tenebrio molitor* L. (کـرم زرد آرد) مـی‌باشـد (۱۰، ۲۲ و ۲۴). آنزیم منومریک[3] به ابعاد تقریبـا ۴۰× ۴۶ × ۷۵ آنگستروم و دارای سه دامنه‌ی مشخص است. شکل سه بعدی این آنزیم مشابه مدل‌های ارایه شده برای آلفـا- آمیلازهـای میکروبـی، گیـاهی و پـستانداران می‌باشد (۲۲ و ۲۴). برخی حشرات دارای چند آلفـا- آمیلاز گوارشی عمده با نقاط ایزوالکتریـک متفـاوت هستند (۲۶).

رشد و نشو و نمای حشرات بر اثـر مهـار شـدن آنزیم‌های گوارشی به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد و به همین دلیل، ترکیبـات جدیـد زیـادی از جملـه برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد حـشرات[4] بـه عنـوان ترکیبـات ضـدتغذیه و مهارکننـده‌هـای آنـزیم‌هـای گوارشـی مـورد بررسـی قـرار گرفتـه‌انـد (۷ و ۱۶). مهارکننده‌های آنزیم‌هـا مـی‌تواننـد در راهبردهـای کنترل حشرات نقش‌های مهمی را ایفا کنند. با وجود ایـن، لازم اسـت تـا پـیش از اسـتفاده از آن‌هـا یـا توسـعه‌ی گیاهـان تـراژن بـرای کنتـرل آفـات، از بیوشیمی آنزیم‌هـای گوارشـی درک کـاملی داشـته باشیم (۹، ۱۷ و ۲۰). ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات بر حسب گونه، رژیم‌های غـذایی و شـرایط زیست‌محیطی و جغرافیایی، تفـاوت‌هـای زیـادی را نـشان مـی‌دهنـد و اثـرات فعـال‌کننـده‌هـا و مهارکننده‌های آنزیمی نیـز بـه همـین دلیـل، روی آنزیم‌های گوارشی متفاوت می‌باشند (۱۳). به دلیـل همین تفاوت‌ها، ویژگی‌هـای آنـزیم‌هـای گوارشـی بسیاری از گونه‌های حشرات به تفصیل مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در مورد هر گونـه، ویژگـی‌هـای آن آنزیم‌ها مشخص گردیده است.

سن نواری چتریان، *Graphosoma lineatum* (L.)، در دنیا از کشورهای حوزه‌ی دریای مدیترانـه، منطقه‌ی قفقاز، ایـران، ترکمنـستان (۱۹) و سـواحل بالتیک واقع در جنـوب شـرقی سـوئد (۱۸) گـزارش شده است. در ایران نیـز در اسـتان‌هـای آذربایجـان شـرقی، تهـران، خراسـان (۲ و ۳) و مازنـدران و گلـستان (مـشاهدات و جمـع‌آوری‌هـای شخـصی نگارنده‌ی اول) دیده شده اسـت. گیاهـان میزبـان و غذایی آن گیاهان تیره‌ی چتریـان مـی‌باشـند. ایـن جنس فاقد دیـاپوز اجبـاری اسـت (۱ و ۲). در ایـن بررسی، تاثیر برخی از ویژگی‌های زیستی سن نواری چتریـان (نـوع مـاده‌ی غـذایی، اختلافـات فـردی، جنـسیت، دمـای محـیط پـرورش، طـول دوره‌ی گرسنگی، تغییرات شبانه‌روزی و نسل) روی فعالیـت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی آن بـرای اولـین بـار مـورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حـشرات کامـل سـن نـواری چتریـان، *G. lineatum*، از روی گیـاه شـوید در اسـتان

1- Glycosyl hydrolases
2- Prokaryotes and Eukaryotes
3- Monomeric enzyme
4- Insect growth regulators (IGRs)

گلستان جمع‌آوری شدند. حشرات به انستکتاریوم گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تبریز منتقل شدند و نسبت به پرورش آن‌ها اقدام گردید. پرورش آزمایشگاهی این حشره با توجه به منابع موجود (۱ و ۲) انجام شد. تمام مراحل مختلف نشوونمایی در دمای ۲±۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۷۰ درصد و دوره‌ی نوری به تاریکی ۱۶:۸ پرورش داده شدند. حشرات به مدت ده نسل روی دانه‌های جعفری خالص‌سازی شدند و از نسل دهم به بعد در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی غده‌ی بزاقی و سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز

حشرات کامل به روش یزدانیان و همکاران (۵) تشریح گردیدند. غدد بزاقی مورد استفاده در سنجش فعالیت آنزیم پس از خارج شدن از قفس‌سینه، مطابق روش نامبردگان برای تهیه‌ی نمونه‌های آنزیمی و سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت پروتئین تمام نمونه‌های آنزیمی به روش بیسینکونینیک اسید[1] و با استفاده از آلبومین سرم گاوی[2] به عنوان استاندارد تعیین شد. در نهایت، فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین[3] محاسبه گردید (۴).

صفات مورد بررسی

اثر نوع ماده‌ی غذایی روی فعالیت آنزیم

تیمارهای غذایی مورد نظر عبارت بودند از: جعفری، هویج، شوید، کرفس، گشنیز، زیره‌ی سبز، رازیانه و مخلوطی از آن‌ها (به نسبت وزنی مساوی) که از مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان، گرگان، تهیه گردیدند. حشرات به مدت دو نسل روی هر یک از مواد غذایی فوق پرورش داده شدند و از حشرات کامل نسل دوم برای انجام آزمایش‌ها استفاده گردید. محلول‌های آنزیمی حاوی ۱۰ جفت غده‌ی بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی ۱۰ روزه (به صورت جداگانه) به ازای یک میلی‌لیتر بافر فسفات بودند.

اثر اختلافات فردی روی فعالیت آنزیم

حشرات جمع‌آوری شده از کلنی (بدون توجه به سن آن‌ها) به ۱۰ گروه تقسیم شدند (۵ گروه برای نرها و ۵ گروه برای ماده‌ها) که هر گروه شامل ۵ حشره‌ی کامل بود. غدد بزاقی حشرات هر گروه در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (معادل ۱۰ جفت در یک میلی‌لیتر بافر) هموژنیزه و سانتریفیوژ شدند. فعالیت آنزیم برای هر گروه مشخص گردید. در نهایت، انحراف استاندارد (S) و نسبت فعالیت ماکزیمم به مینیمم مربوط به ۵ گروه نرها و ۵ گروه ماده‌ها محاسبه شد (۱۳).

اثر جنسیت روی فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در نرها و ماده‌ها با توجه به سایر آزمایش‌های انجام شده مورد مقایسه قرار گرفت.

اثر دمای محیط پرورش روی فعالیت آنزیم

حشرات کامل ۱۰ روزه همراه با ظروف پرورشی خود به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور و در دماهای ۴، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۲۷ و ۳۰ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شدند. برای تهیه‌ی محلول‌های آنزیمی، ۱۰ جفت غده‌ی بزاقی از حشرات کامل نر یا ماده (به طور جداگانه) در یک میلی‌لیتر بافر فسفات هموژنیزه و سانتریفیوژ گردید. به حشرات کامل گرسنگی داده نشد.

اثر طول دوره‌ی گرسنگی روی فعالیت آنزیم

حشرات کامل نر و ماده‌ی ۱۰ روزه (به طور جداگانه) همزمان از کلنی انتخاب گردیدند و در ظروف جداگانه‌ای فاقد آب و مواد غذایی به مدت صفر (شاهد، تغذیه کرده)، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی گرسنگی داده شدند.

1- Bicinchoninic acid
2- Bovine serum albomin
3- U/mg protein

برای تهیه محلول‌های آنزیمی از ۱۰ جفت غده‌ی بزاقی به ازای یک میلی‌لیتر بافر فسفات استفاده شد.

فعالیت آنزیم در بین جفت‌های غده‌ی بزاقی یک سن و بین افراد مختلف

آزمایش چهار بار تکرار شد. در هر تکرار، (A) جفت‌های غدد بزاقی ۲۰ حشره‌ی کامل نر یا ماده (به طور مجزا) به طور جداگانه به دو گروه A_1 (غدد سمت راست بدن) و A_2 (غدد سمت چپ بدن) تقسیم شدند. از طرف دیگر، (B) غدد بزاقی جدا نشده‌ی ۲۰ حشره‌ی کامل نر یا ماده (به طور مجزا) به طور تصادفی به دو گروه B_1 و B_2 (هر گروه شامل ۱۰ جفت) تقسیم شدند. در نهایت، انحراف استاندارد (s) مربوط به هر گروه و نیز نسبت تغییر فعالیت آنزیم از رابطه‌ی:

[۱۰۰× (بیش‌ترین فعالیت/ کم‌ترین فعالیت)−۱]

بین A_1 و A_2 و همچنین بین B_1 و B_2 محاسبه گردید تا اختلاف در فعالیت آنزیم بین جفت‌های غده‌ی بزاقی یک فرد با فعالیت آن در بین افراد مختلف مقایسه گردد (۱۳). غدد بزاقی گروه‌های فوق در یک میلی‌لیتر بافر فسفات هموژنیزه و سانتریفیوژ شدند. حشرات کامل بدون توجه به سن آن‌ها از کلنی انتخاب گردیدند.

تغییرات شبانه‌روزی و فعالیت آنزیم

حشرات کامل نر و ماده‌ی ۱۰ روزه در ساعات ۸ صبح (اوایل فاز روشنایی)، ۱۲ ظهر، ۶ عصر، ۱۲ شب (اوایل فاز تاریکی) و ۶ صبح از ظروف پرورشی انتخاب و بلافاصله تشریح شدند (بدون گرسنگی دادن). نمونه‌های آنزیمی از هموژنیزه و سانتریفیوژ شدن ۱۰ جفت غده‌ی بزاقی حشرات کامل نر یا ماده (به صورت جداگانه) در یک میلی‌لیتر بافر فسفات تهیه گردیدند.

فعالیت آنزیم در نسل‌های مختلف

برای تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز در نسل‌های مختلف، از حشرات کامل نر و ماده‌ی ۱۰ روزه‌ی نسل‌های دهم تا هفدهم (به طور جداگانه) استفاده گردید. از محلول‌های آنزیمی حاوی ۱۰ جفت غده‌ی بزاقی به ازای یک میلی‌لیتر بافر فسفات استفاده شد.

تجزیه‌های آماری

پیش از تجزیه‌ی واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C مورد آزمون قرار گرفت و در صورت نیاز، تبدیل مناسب انجام شد. سپس با استفاده از همین نرم‌افزار، تجزیه واریانس‌ها انجام شدند. حدود اطمینان و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار فوق‌الذکر و به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد اعمال قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

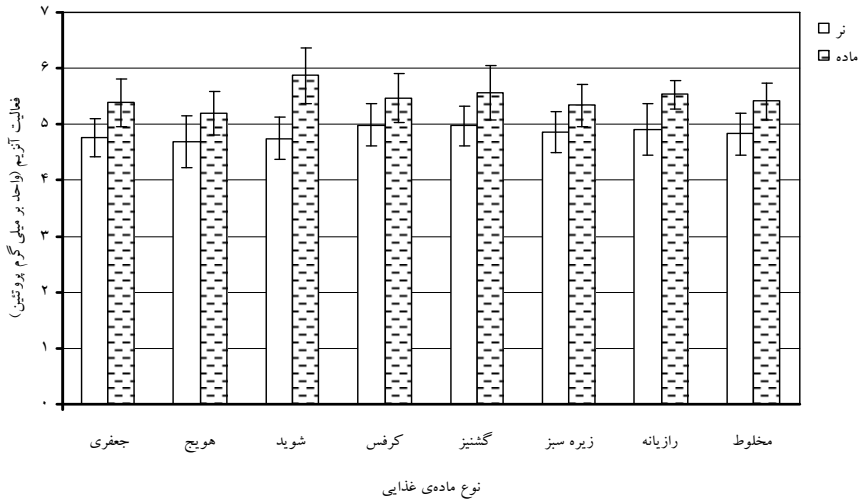
نتایج و بحث

اثر نوع ماده‌ی غذایی روی فعالیت آنزیم

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آلفا- آمیلاز در حشرات کامل نر و ماده‌ی پرورش یافته روی مواد غذایی مختلف (دانه‌های مختلف گیاهان تیره‌ی چتریان) نشان داد که اثر نوع ماده‌ی غذایی روی فعالیت آنزیم غیرمعنی‌دار بود ($p > ۰/۰۵$). این امر نشان می‌دهد که نوع ماده‌ی غذایی، در کاهش یا افزایش فعالیت آنزیم اثری نداشت. در شکل ۱، میانگین فعالیت آنزیم در حشرات کامل نر و ماده نشان داده شده است.

چندین گزارش وجود دارد مبنی بر این که حضور یک آنزیم در دستگاه گوارش یک حشره ضرورتا بدین معنی نیست که آن حشره می‌تواند در طبیعت از بستره‌ی[1] آن آنزیم استفاده کند. با وجود این، نوع آنزیم‌های گوارشی حشرات معمولا در ارتباط با نوع رژیم غذایی آن‌ها می‌باشد و حداقل، حضور غالب یک آنزیم نشان می‌دهد که رژیم غذایی حشره عمدتا شامل بستره‌ی مربوط به آن آنزیم می‌باشد

1- Substrate



شکل ۱- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان، *Graphosoma lineatum* در اثر تغذیه از دانه‌های مختلف چتریان (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH٦/٩٥).

(۱۳ و ۱۴). لذا، انتظار می‌رود که حضور یا عدم حضور یک آنزیم در دستگاه گوارش یک حشره در ارتباط با حضور یا عدم حضور بستره‌ی مربوطه در غذا باشد (۲۱). فعالیت شدید آلفا- آمیلاز نشان می‌دهد که گونه‌های مربوطه برای استفاده از نشاسته‌ی نامحلول موجود در بافت‌های گیاهی از طریق هضم خارج‌دهانی، به خوبی سازگاری یافته‌اند (۲۷).

با توجه به مطالب فوق، به نظر می‌رسد که اثر نوع ماده‌ی غذایی روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی بیش‌تر تحت تاثیر نوع رژیم غذایی حشره (گوشت خواری، گیاه خواری، گوشت خواری- گیاه خواری یا گیاه خواری- گوشت خواری) قرار دارد تا مثلا تغذیه از دو یا چند نوع میزبان گیاهی یا دو یا چند نوع میزبان جانوری. به عنوان مثال، در یک گونه‌ی گوشتخوار- گیاهخوار، تغذیه از رژیم غذایی جانوری باعث کاهش فعالیت آلفا- آمیلاز و تغذیه از رژیم غذایی گیاهی، باعث افزایش فعالیت آن خواهد شد. با وجود این، تفاوت‌های کمّی و کیفی آن‌ها نیز باعث بروز اختلافاتی در فعالیت آنزیم‌های گوارشی خواهد گردید. عدم اختلاف در فعالیت آلفا- آمیلاز بین حشرات کامل تغذیه کرده از دانه‌های مختلف چتریان را می‌توان به شباهت‌های بسیار زیاد کمّی و کیفی مواد غذایی مورد استفاده در این بررسی نسبت داد.

اثر اختلافات فردی روی فعالیت آنزیم

نسبت فعالیت ماکزیمم و مینیمم آلفا- آمیلاز در پنج گروه بررسی شده، در مورد حشرات کامل نر و ماده به ترتیب ۴/۵۵ و ۳/۵۲ و انحراف استانداردهای آن‌ها نیز به ترتیب ۲/۶۵ و ۳/۲۳ بود. این امر بدین معنی است که در صورت یکسان نبودن شرایط بیولوژیک و فیزیولوژیک حشرات مورد استفاده در آزمایش، فعالیت آنزیم در نرها و ماده‌ها ممکن است به ترتیب تا ۴/۵ و ۳/۵ برابر متغیر باشد. نتایج فوق نشان می‌دهند که جهت انجام آزمایش‌ها و بررسی اثر یک تیمار، بایستی تا حد امکان از حشراتی استفاده نمود که شرایط بیولوژیک و فیزیولوژیک آن‌ها از هر نظر شبیه هم باشد.

در سن *Lygus disponsi* Linnavuori، نسبت فعالیت ماکزیمم به مینیمم آلفا- آمیلاز در هشت گروه بررسی شده برابر با ۳/۵ بود. این امر نشان داد که فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی

L. disponsi حتی هنگامی که از یک مکـان و در یک زمان جمع‌آوری شوند، به شکل قابل توجهی در میان افراد مختلف، متفاوت خواهـد بـود (۱۳ و ۱۵). اثر تغییرات فردی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشـی در مـــورد پروتئازهـــای روده‌ای مگـــس اصـــطبل، *Stomoxys calcitrans* (L.) و ملـخ مهـاجر، *Locusta migratoria* (L.) نیـز گـزارش شـده است (۱۰). بنا به گفته‌ی هوری[1] (۱۳ و ۱۵)، احتمال زیادی وجود دارد کـه بـروز ایـن اختلافـات عمـدتا مربوط به تغییـر در فعالیـت آنـزیم در بـین مراحـل مختلف نشوونمایی و به طور جزیی نیـز مربـوط بـه مقدار آنزیم تولیدی در اثر شرایط زیست محیطـی و گرسنگی باشـند. حـشرات کامـل مـورد اسـتفاده در بررسی حاضر و در این مورد خاص (جمع‌آوری شده در یک زمان و از یک مکان، بدون توجه به سـن و بدون گرسنگی دادن) مخلوطی از حشرات کامل بـا طول عمرهای مختلف بودند که شرایط تغذیـه‌ای و گرسنگی آن‌ها (و در نتیجه مقدار آنـزیم موجـود در مجرای داخلی[2] غده‌ی بزاقی‌شان) نیز با هم تفـاوت داشت. ایـن امـر مـی‌توانـد باعـث بـروز اختلافـات مشاهده شده در فعالیت آنزیم شده باشد.

اثر جنسیت روی فعالیت آنزیم

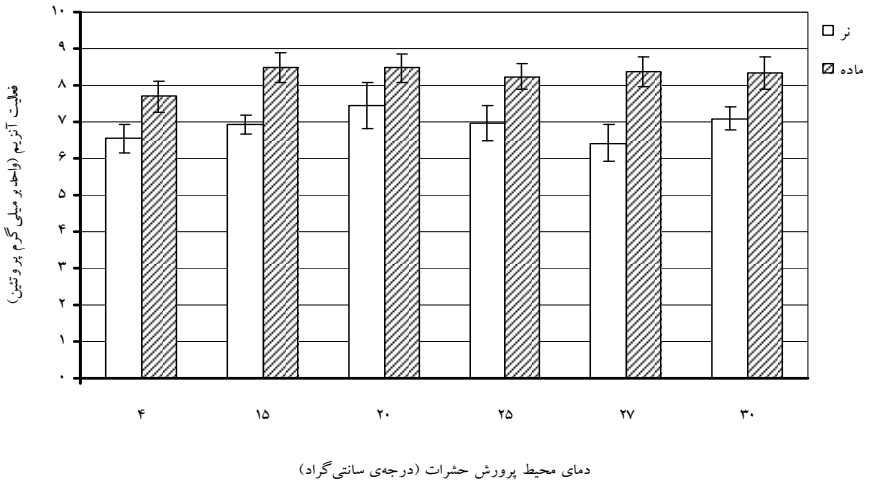
اثر کلی جنسیت روی فعالیت آنزیم، همان نتایج و مطالب ارایه شده در قبل می‌باشد، یعنی بـه طـور کلی، فعالیت آنزیم در حـشرات کامـل مـاده‌ی سـن نواری چتریان بیش‌تر از حشرات کامل نـر بـود. بـه گفته‌ی فوسه و همکاران[3] (۱۱)، فعالیت آلفا- آمیلاز در حشرات ماده اغلب بیش‌تر از نرها می‌باشد. دلیل این امر را می‌توان نیاز بیش‌تر ماده‌ها به مواد غذایی برای تولید مثل دانست.

اثر دمای محیط پرورش روی فعالیت آنزیم

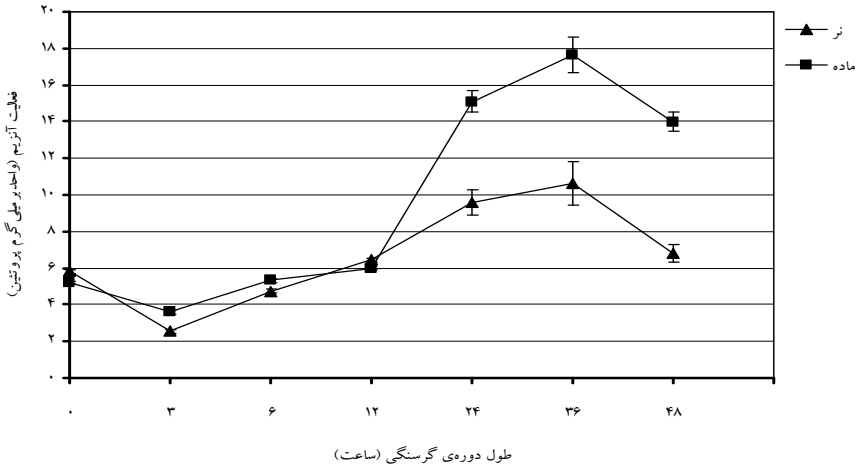
اثر دماهای پرورشی مختلف روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز حشرات کامـل نـر و مـاده غیرمعنـی‌دار بـود ($p > ۰/۰۵$) که نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اخـتلاف معنی‌دار بـین فعالیـت آنـزیم در دماهـای پرورشـی مختلف است. روند و مقایسه میانگین فعالیت آنـزیم در شکل ۲ ارایه شده است.

کن[4] (به نقل از منبع شماره‌ی ۱۳) گزارش کـرد که فعالیت آلفا- آمیلاز شته‌ی *Tetraneura ulmi* (L.) تحت تاثیر دماهای زیست محیطی قرار داشت. در دماهای پرورشی از ۲۱ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، فعالیـــت آنزیم‌های گوارشی *Bombyx mori* (L.) در دماهای پایین‌تر، بیش‌تر بود. فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای *B. mori* در دماهای بالا یا بر اثر نگهداری لاروها در شرایط سرد کاهش یافت. تحـت شـرایط دمایی بالاتر از ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گـراد یـا دماهـای پایین‌تـر از ۲۳ تـا ۱۳ درجـه، فعالیـت پروتئازهـای روده‌ای لاروهای کرم زرد آرد *T. molitor* L. در ۴ روز اول کـاهش یافـت امـا در مـورد آلفـا- آمـیلاز روده‌ای آن چنـین رونـدی مـشاهده نگردیـد (۱۳). ایشاآیا و همکاران[5] (به نقـل از منبـع شـماره‌ی ۱۳) گزارش کردند که فعالیت آنزیمـی در روده‌ی میـانی شـــب‌پـــره‌ی *Spodoptera littoralis* (Boisduval) با افزایش دما از ۱۰ به ۳۲ درجـه‌ی سانتی‌گراد، افزایش یافت. با توجه به نتـــایج هوری (۱۳ و ۱۵)، هرچنـد فعالیـت آلفـا- آمـیلاز بزاقـی حشرات کامل و پوره‌هـــای سن پنجم*L. disponsi* (بر حسب میـلی‌گرم گلـــوکز تولید شده) در واکنش به دماهـــای زیست محیطی مختلف (۲، ۲۰ تـا ۲۳، ۲۵ تا ۲۷ و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) از نظـر آمـاری اختلاف معنی‌داری نـشان نـداد (بـه ترتیـب ۲/۶۳، ۳/۹۱، ۳/۴۶ و ۴/۱۳ در حـــشرات کامـــل و ۲/۰۵، ۵/۱۵، ۴/۹۴ و ۳/۱۱ در پوره‌های سـن پـنجم)، امـا فعالیت آنزیم در دمای ۲ درجه کم و بیش کـم‌تـر از

1- Hori
2- Lumen
3- Fusé *et al.*
4- Ken
5- Ishaaya *et al.*



شکل ۲- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی در حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان، *Graphosoma lineatum*، در دماهای مختلف پرورش (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH٦/٩٥)



شکل ۳- فعالیت آلفا-آمیلاز بزاقی در حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان، *Graphosoma lineatum*، پس از دوره‌های گرسنگی متفاوت (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH٦/٩٥)

فعالیت آن‌ها در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و بالاتر بود. وی، یکی از دلایل مهم این امر را کاهش فعالیت فیزیولوژیک حشرات در دماهای پایین دانسته است. نتایج حاصله از تحقیق حاضر با نتایج هوری (۱۳ و ۱۵) در مورد سن *L. disponsi* مطابقت دارد.

اثر طول دوره گرسنگی روی فعالیت آنزیم

اثر تیمار گرسنگی روی فعالیت آنزیم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مشاهده‌ی شکل ۳ نشان می‌دهد که روند فعالیت آنزیم در حشرات کامل نر و ماده یکسان بود. در حشرات کامل نر، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت گرسنگی مشاهده گردید که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. پس از آن، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به تیمارهای ۱۲ و ۴۸ ساعت

گرسنگی بود که بین آن‌ها نیز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. فعالیت آنزیم در تیمار شاهد (حشرات تغذیه کرده) با فعالیت آن در تیمار ۶ ساعت گرسنگی فاقد اختلاف معنی‌دار و مقدار آن از دو مورد قبلی کم‌تر بود. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم در حشرات کامل نر پس از ۳ ساعت گرسنگی مشاهده شد که با فعالیت آن در کلیه‌ی تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت. در حشرات کامل ماده نیز همین حالت دیده شد، بدین معنی که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم به ترتیب مربوط به تیمارهای ۳۶ و ۳ ساعت گرسنگی بودند.

هوری (۱۵) حشرات کامل سن *L. disponsi* را به مدت صفر (شاهد)، ۱ تا ۳، ۵ تا ۷، ۹ تا ۱۱ و ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشت و هیچ گونه تفاوتی را در فعالیت آمیلاز آن‌ها (بر حسب میلی‌گرم گلوکز تولید شده) مشاهده ننمود. فعالیت آنزیم در طول ۱۲ ساعت اول گرسنگی (به ترتیب ۳/۷۲، ۳/۷۴ و ۳/۳۷) مشابه با حشرات کامل تغذیه کرده (شاهد) (۳/۵۱) بود ولی پس از گذشت ۲۴ ساعت از شروع گرسنگی، کاهش پیدا نمود (۲/۲)، هرچند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. ایشاآیا و سِویرسکی[1] (به نقل از منبع شماره‌ی ۱۳) نیز گزارش کردند که گرسنه نگهداشتن سپردارهای *Chrysomphalus aonidium* (L.) و *Aonidiella aurantii* (Maskell) به مدت ۲۴ ساعت، باعث کاهش شدید فعالیت آلفا- آمیلاز در روده‌ی میانی آن‌ها گردید. علت ثابت ماندن فعالیت آلفا- آمیلازهای بزاقی و کاهش فعالیت آلفا- آمیلازهای روده‌ای بر اثر گرسنگی را می‌توان این گونه توجیه کرد که آنزیم‌های گوارشی بزاقی در غده‌ی بزاقی ترشح و ذخیره می‌شوند و در هنگام تغذیه مورد استفاده قرار می‌گیرند اما ترشح آن‌ها در روده‌ی میانی، در پاسخ به خوردن غذا حادث می‌گردد. مطالعات جدیدتر (۸) نشان داده‌اند که پس از تغذیه، برای پر شدن کامل مخازن بزاقی بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت زمان لازم است و نتایج بررسی حاضر با نتایج تحقیقات جدیدتر مطابقت دارد. شاید بتوان اختلاف نتایج هوری (۱۵) با نتایج تحقیق حاضر را در این دانست که وی از حشرات جمع‌آوری شده از طبیعت استفاده کرد ولی ما از حشرات پرورش یافته در آزمایشگاه که از نظر بیولوژیک و فیزیولوژیک بسیار یکنواخت‌تر (خالص‌تر) بودند، استفاده کردیم. مشاهدات نشان داد که حشرات کامل پس از گرفته و گذاشته شدن در ظروف نگهداری، قطرات آبکی شکلی را از استیله‌های[2] خود خارج می‌کردند و بر اثر تحرک زیادی که داشتند، قادر به مکیدن دوباره‌ی آن نبودند. این امر و احتمالا بررسی‌های بعدی بستره توسط آن‌ها که همراه با خروج مایع بزاقی می‌باشد، می‌تواند دلیل کاهش فعالیت آنزیم پس از ۳ ساعت گرسنگی باشد. افزایش فعالیت آنزیم پس از ۳ ساعت گرسنگی نیز نتیجه‌ی ترشح و ذخیره شدن بزاق بوده است. کاهش فعالیت آنزیم پس از ۴۸ ساعت گرسنگی نیز احتمالا به این دلیل بوده که حشرات کامل پس از پر شدن کامل مخازن بزاقی و در نتیجه فشار وارده بر غدد بزاقی، مقداری از ترشحات خود را تخلیه کرده‌اند. برای روشن‌تر شدن موضوع، مشاهدات و بررسی‌های بیش‌تری مورد نیاز است.

فعالیت آنزیم در بین جفت‌های غده‌ی بزاقی یک سن و بین افراد مختلف

نتایج بررسی حاضر نشان داد که نسبت تغییر فعالیت آلفا- آمیلاز در بین جفت‌های غده‌ی بزاقی یک سن در حشرات کامل نر و ماده به ترتیب ۱۶/۶۷ و ۹/۲۱ درصد و انحراف استاندارد آن‌ها نیز به ترتیب ۰/۵۵۶ و ۰/۳ بود. نسبت تغییر فعالیت آنزیم در بین غدد بزاقی افراد مختلف در حشرات

1- Svirski

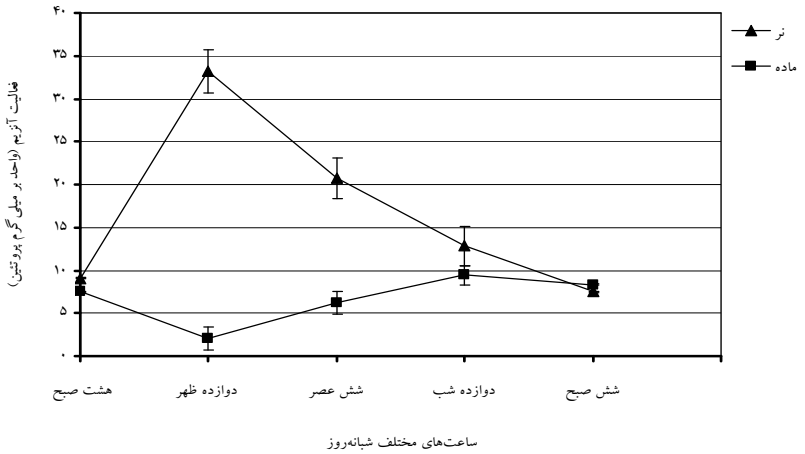
2- Stylet

کامل نر و ماده به ترتیب ۶۳/۳۳ و ۶۴/۷ درصد و انحراف استاندارد آن‌ها نیز به ترتیب ۱/۷۷۶ و ۲/۹۱۳ بود. همان طور که مشاهده می‌شود، نسبت تغییر فعالیت آنزیم در بین غدد بزاقی افراد مختلف، در حشرات کامل نر، ۳/۸ برابر و در حشرات کامل ماده، ۷/۰۲ برابر مقدار آن در بین جفت‌های غده‌ی بزاقی یک سن (با همان جنسیت) بود.

در سن *L. disponsi*، نسبت تغییر فعالیت آلفا- آمیلاز بین غدد بزاقی افراد مختلف دو برابر مقدار آن در بین جفت‌های غده‌ی بزاقی یک سن بود (۲۶/۸ درصد در مقابل ۱۲/۳ درصد). انحراف استاندارد داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم در افراد مختلف (۱۹/۳۷) بسیار بیش‌تر از مقدار آن در داده‌های مربوط به جفت‌های غده‌ی بزاقی یک سن (۶/۲) بود (۱۳ و ۱۵). این واقعیت که تفاوت در فعالیت آلفا- آمیلاز در بین جفت‌های غده‌ی بزاقی یک سن از تفاوت در فعالیت آن در بین غدد بزاقی افراد مختلف بسیار کم‌تر بود، نشان می‌دهد که هر دو غده‌ی بزاقی یک سن، آنزیم آلفا- آمیلاز خود را تقریبا به طور همزمان تولید یا تخلیه می‌کنند و این بدان معنی است که هر دو غده‌ی بزاقی یک سن، برای تولید یا تخلیه‌ی آنزیم، به شکل نسبتا همزمانی به محرک‌های مربوطه واکنش نشان می‌دهند (۱۳ و ۱۵).

تغییرات شبانه‌روزی و فعالیت آنزیم

نتایج نشان داد که اثر تغییرات شبانه‌روزی روی فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. روند تغییرات و مقایسه میانگین فعالیت آنزیم حشرات کامل نر و ماده در ساعات مختلف شبانه‌روز در شکل ۴ نشان داده شده است. در حشرات کامل نر، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در ساعت ۱۲ ظهر و پس از آن در ساعت ۶ عصر مشاهده شد که با هم دارای اختلاف معنی‌دار بودند. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم نیز به ترتیب در ساعات ۱۲ شب، ۸ صبح و ۶ صبح مشاهده گردید که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی با مقادیر مربوط به ساعات ۱۲ ظهر و ۶ عصر دارای اختلاف معنی‌دار بودند. در حشرات کامل ماده، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم به ترتیب در ساعات ۱۲ شب، ۶ صبح و ۸ صبح مشاهده شد که فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. همچنین، بین میانگین فعالیت آن در ساعات ۶ و ۸ صبح با ۶ عصر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. فعالیت آنزیم در ساعت ۱۲ ظهر کم‌ترین



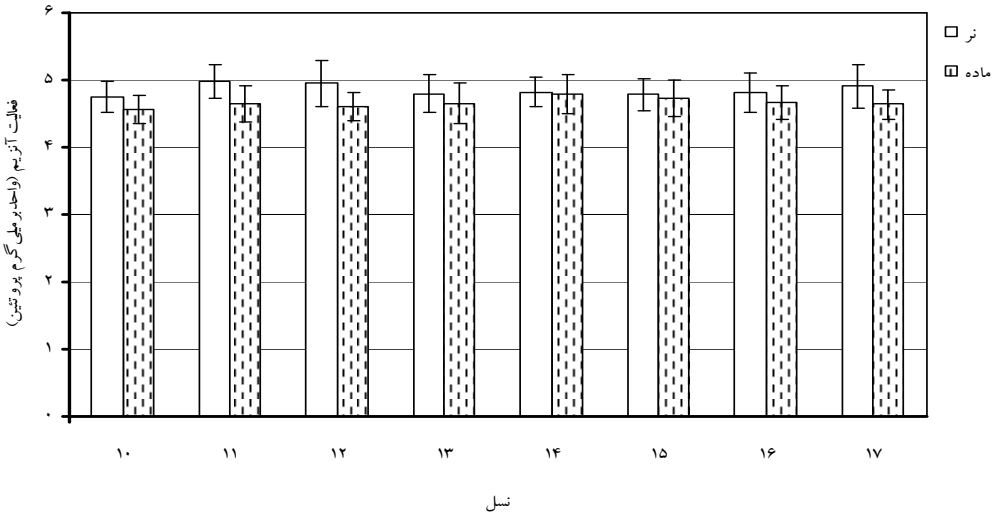
شکل ٤- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان، *Graphosoma lineatum* در ساعت‌های مختلف شبانه‌روز (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH٦/٩٥)

میزان خود را داشت و با میانگین فعالیت آن در سایر ساعات دارای اختلاف معنی‌دار بود.

در زمینه‌ی اثر تغییرات شبانه‌روزی روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات تاکنون تحقیقی انجام نشده است و بررسی حاضر اولین مورد در این زمینه می‌باشد. دلایل تغییر در فعالیت آلفا- آمیلاز در ساعات مختلف شبانه‌روز را شاید بتوان به طور جزیی به تغییر در میزان تولید آنزیم بر اثر دمای زیست محیطی و شرایط گرسنگی و به طور عمده، به تفاوت‌های موجود در فعالیت آنزیم بسته به مراحل مختلف نشو و نمایی و رشدی نسبت داد. حشرات کامل مورد استفاده در این بررسی مخلوطی از حشرات کامل با طول عمرهای مختلف و تحت شرایط گرسنگی (تغذیه) متفاوت بودند که به دلیل متفاوت بودن نسبت آن‌ها در هر تکرار، فعالیت آنزیم نیز تفاوت‌هایی را نشان داد. روند مشاهده شده در فعالیت آنزیم احتمالا متغیر خواهد بود و نتایج حاضر فقط نشان می‌دهند که فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز تغییراتی را نشان می‌دهد که احتمالا بیش‌تر ناشی از همان عوامل ذکر شده در بالا است. کم‌تر بودن میزان فعالیت آنزیم در حشرات کامل ماده نسبت به حشرات کامل نر (حشرات کامل بدون گرسنگی دادن مورد استفاده قرار گرفته بودند) می‌تواند به علت تغذیه‌ی بیش‌تر ماده‌ها در مقایسه با نرها باشد که به تخلیه‌ی هرچه بیش‌تر محتویات فضای داخلی غده‌ی بزاقی آن‌ها منجر شده است.

فعالیت آنزیم در نسل‌های مختلف

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم در حشرات کامل نر و ماده، اثر نسل روی فعالیت آنزیم غیرمعنی‌دار بود ($p > ۰/۰۵$). در شکل ۵، روند فعالیت آنزیم از نسل دهم تا هفدهم نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود، فعالیت آلفا- آمیلاز در تمامی نسل‌های مورد مطالعه یکسان و فاقد اختلاف معنی‌دار بود. به دلیل این که در این زمینه نیز تاکنون تحقیق دیگری صورت نگرفته، لذا بحث در مورد آن امکان‌پذیر نمی‌باشد.



شکل ۵- فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی حشرات کامل نر و ماده‌ی سن نواری چتریان، *Graphosoma dineatum* در نسل‌های مختلف (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH۶/۹۵)

در این بررسی، اثر برخی از ویژگی‌های زیستی سن *G. lineatum* (نوع ماده‌ی غذایی، اختلافات فردی، جنسیت، دمای محیط پرورش، طول دوره‌ی گرسنگی، تغییرات شبانه‌روزی و نسل) روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی آن برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت. برخی از نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققان مشابه بودند و در مواردی نیز اختلاف دیده شد. لذا، بررسی حاضر تاییدکننده‌ی این نظریه است که رسیدن به یک تعمیم کلی در مورد ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات میسر نیست و آنزیم‌های هر گونه باید به طور جداگانه مطالعه و بررسی شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقایان امیر منصور وطنخواه مسئول آزمایشگاه عمومی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز و علی اصغر حمیدی کارشناس مسئول آزمایشگاه آنالیز افزاری، دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به خاطر کمک‌های بی‌دریغشان در امر سنجش فعالیت آنزیم و تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها، و نیز از آقای مهندس سعید قدیری راد محقق بخش مبارزه‌ی بیولوژیک مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان به دلیل در اختیار گذاشتن دانه‌های چتریانِ مورد استفاده تشکر می‌گردد.

منابع

۱. شاهرخی خانقاه، ش. ۱۳۷۶. پرورش انبوه و کنترل کیفی زنبورهای *Trissolcus grandis* (Hym., Scelionidae) با استفاده از میزبان واسط *Graphosoma lineatum* برای کنترل سن *Eurygaster integriceps* (Hem., Scutelleridae). پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۱۰ ص.

۲. عسگری، ش. ۱۳۷۴. بررسی امکان تکثیر انبوه زنبورهای پارازیتوئید تخم سن، *Trissolcus* spp.، روی میزبان واسط آزمایشگاهی *Graphosoma lineatum*. پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تهران. ۲۲۰ ص.

۳. مدرس اول، م. ۱۳۸۰. فهرست آفات کشاورزی ایران و دشمنان طبیعی آن‌ها. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۲۹ ص.

۴. مرادپور، ز. ۱۳۸۲. بررسی *in vitro* اثر دیگوکسین بر روی فعالیت مولیبدنیوم هیدروکسیلازها. پایان‌نامه‌ی دکترای داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تبریز. ۹۸ ص.

۵. یزدانیان، م.، فرشباف پورآباد، ر.، رشیدی، م.ر.، ولیزاده، م. و رشتچی‌زاده، ن. ۱۳۸۵. فعالیت آلفا- آمیلاز در معده و غده‌ی بزاقی سن نواری چتریان *Graphosoma lineatum* (Het., Scutelleridae). مجله‌ی دانش کشاورزی، جلد ۱۶، شماره ۲، صص ۹۱-۱۰۶.

6. Bandani, A.R., and Balvasi, A. 2006. Comparison of alpha-amylase activity in larval stages of flour beetles, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71: 537-541.

7. Cao, S., Qian, X., Song, G., Chai, B., and Jiang, Z. 2003. Synthesis and antifeedant activity of new oxadiazolyl 3(2H)-pyridazinones. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 152-155.

8. Cohen. A.C. 1993. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. Journal of Insect Physiology, 39: 823-829.

9. D'Amico, S., Gerday, C., and Feller, G. 2000. Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α-amylases. Gene, 253: 95-105.

10. 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.

11. Fuse, M., Zhang, J.R., Partridge, E., Nachman, R.J., Orchard, I., Bendena, W.G., and Tobe, S.S. 1999. Effects of an allatostatin and a myosuppressin on midgut carbohydrate enzyme activity in the cockroach *Diploptera punctata*. Peptides, 20: 1285-1293.

12. Henrissat, B., and Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochemistry Journal, 316: 695-696.

13. Hori, K. 1973. Studies on enzymes, especially amylases, in the digestive system of the bug *Lygus disponsi* and starch digestion in the system. Research Bulletin of the Obihiro University, 8: 173-60.

14. Hori, K. 1971. Physiological conditions in the midgut in relation to starch digestion and the salivary amylase of the bug *Lygus disponsi*. Journal of Insect Physiology, 17: 1153-1167.

15. Hori, K. 1970. Some variations in the activities of salivary amylase and protease of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hemiptera: Miridae). Applied Entomology and Zoology, 5: 51-61.

16. Huang, Q., Kong, Y., Liu, M., Feng, J., and Liu, Y. 2008. Effect of oxadiazolyl 3(2H)-pyridazinone on the larval growth and digestive physiology of the armyworm, *Pseudaletia separata*. 7pp. Journal of Insect Science 8:19, available online: insectscience.org/8.19

17. Kazzazi, M., Bandani, A.R., Ashuri, A., and Hosseinkhani, S. 2005. α-amylase activity of nymphal stages of sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 70: 863-867.

18. Larsson, F.K. 1989. Female longevity and body size as predictors of fecundity and egg length in *Graphosoma lineatum* (L.). Deutsche Entomologische Zeitschrift, 36: 329-334.

19. Lodos, N. 1986. Entomology of Turkey, general, applied, faunistic. Ege University Publications, Bornova, 2: 580 p.

20. Mehrabadi, M., and Bandani, A.R. 2009. Assessing of α-amylase activity of midgut in wheat bug *Eurygaster maura*. American Journal of Applied Sciences, 6(3):478-483.

21. Saxena, K.N. 1955. Studies on the passage of food, hydrogen-ion concentration and enzymes in the gut and salivary glands of *Dysdercus koenigii* Fabr. (Pyrrhocoridae: Heteroptera). Journal of Zoological Society of India, 7:145-154.

22. Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F.X., and Glockshuber, R. 1998a. Crystal structure of yellow meal worm α-amylase at 1.64A° resolution. Journal of Molecular Biology, 278:617-628.

23. Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F.X., and Glockshuber, R. 1998b. A novel strategy for inhibition of α-amylases: yellow meal worm α-amylase in complex with the *Ragi* bifunctional inhibitor at 2.5 A° resolution. Structure, 6:911-921.

24. Strobl, S., Gomis-Ruth, F.X., Maskos, K., Frank, G., Huber, R., and Glockshuber, R. 1997. The amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. FEBS Letters, 409:109-114.

25. Titarenko, E., and Chrispeels, M.J. 2000. cDNA Cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α-amylases of the western corn rootworm , *Diabrotica virgifera virgifera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30:979-990.

26. Valencia-Jiménez, A., Arboleda, J.W., López Ávila, A., and Grossi-de-Sá, M.F. 2008. Digestive α-amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. Bulletin of Entomological Research, 98:575-579.

27. Zeng, F., and Cohen, A.C. 2000. Comparison of α-amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. Comparative Biochemistry and Physiology, 126A:101-106.