بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی

تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های کربوهیدرازی و سرین پروتئازهای معده بید چغندر قند *Scrobipalpa ocellatella* (Lepidoptera; Gelechiidae)

نگارنده

سمانه عباس آبادی

استاد راهنما

دکتر مریم عجم حسنی

تیر ۱۳۹۸

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

تقدیم به:

مادر مهربانم که برای به ثمر رساندن توانایی‌های بالقوه ام از شیره جان مایه گذاردند و چون باغبانی دلسوز زحمت مراقبتم را برای رسیدن به این مرحله شکوفایی به جان خریدند و پدر عزیزم که در تمام مراحل زندگی همچون تکیه گاهی مطمئن در کنارم بودند و بار راهنمایی‌هایشان چون چراغی ره افروز در طی این طریق مرا یاری نمودند و خواهر و برادران عزیزم که در این راه مشوق و راهنمای من بودند.

و نیز همسر عزیزم که وجودش شوق زیستن، وفایش مایه عشق، صفایش مایه آرامش و صبرش مایه پشتکار من است.

بر اساس حدیث معروف پیامبر اکرم (ص) من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق وظیفه خود می دانم تا مراتب سپاس و تقدیم خود را از زحمات بی شائبه و ارشادات ارزشمند استاد بزرگوار سرکار خانم دکتر مریم عجم حسنی که مراد تهیه و تدوین این رساله یاری نموده اند ابراز نمایم. همچنین از اساتید فرزانه، جناب آقای دکتر علی درخشان شاد مهری و دکتر مسعود حکیمی تبار که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ و همچنین جناب آقای دکتر پرویز حیدری که نماینده تحصیلات تکمیلی بنده بودند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

و در پایان تقدیم به تمام کسانی که مرا در انجام این تحقیق یاری کردند: خانم ها سونیا امیری عزیز که راهنما و دلسوز بنده در انجام مراحل پروژه بودند، سرکار خانم مهندس خانم محبوبه عبداللهی که با دلسوزی فراوان در واحد آزمایشگاه مربی بنده بودند و دوستان عزیزم خانم راضیه نوذهی، سحر زال نژاد، معصومه طباطبایی، مینو کروجی و ملیحه عباسی کمال قدردانی را دارم.

تعهد نامه

اینجانب سمانه عباس آبادی دانشجوی دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های کربوهیدرازی و سرین پروتئازهای معده بید چغندر قند تحت راهنمائی سرکار خانم دکتر مریم عجم‌حسنی متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

* متن این صفحه نیز باید در ابتدای نسخه های تکثیر شده پایان نامه وجود داشته باشد

چکیده

بید چغندر قند با نام علمی *Scrobipalpa ocellatella* Boyd (Lep: Gelechiidae) جزء آفات مهم چغندرقند است که سالانه، خسارات جبران ناپذیری به این محصول اقتصادی کشورمان وارد می‌کند. استفاده از مهار کننده‌های آنزیم‌های گوارشی و یا ژن‌های مهارکننده‌ی آنزیم‌های گوارشی که به گیاه منتقل می‌شوند می‌تواند یک استراتژی جدید در کنترل این آفت خطرناک در نظر گرفته شود. اولین مرحله در اجرای این شیوه‌ها، شناسایی آنزیم‌های گوارشی موجود در لوله گوارش لارو بید چغندر است. در این پژوهش ویژگی‌های بیوشیمیایی گلوکوزیدازی و پروتئازهای موجود در دستگاه گوارش لارو سن آخر این آفت مورد بررسی قرار گرفت. لاروهای بید چغندر قند در طول فصل رشد از مزارع شهرستان جوین جمع‌آوری شدند. لوله گوارش حشرات جداسازی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. با استفاده از سوبستراها و معرف‌های هر یک از آنزیم‌های ذکر شده، فعالیت آنزیمی و خصوصیات بیوشیمیایی شامل pH (۱۱-۶)، دما (۵۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد) و اثر یون‌های آهن، منیزیم، منگنز، روی و مس اندازه‌گیری شد. درجه حرارت بهینه آلفا و بتا گلوکوزیداز، ۴۰ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. بیشترین فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در حضور سوبستراهای اختصاصی در اسیدیته‌های مختلف بررسی و اپتیمم آن‌ها در pH= ۸ بدست آمد. بیشینه فعالیت اسیدیته پروتئاز عمومی، در لوله گوارشی این آفت با استفاده از سوبسترای آزوکازئین در دامنه‌ی pH= ۹-۱۱ تعیین شد. دمای بهینه پروتئاز عمومی ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. فعالیت پروتئازهای اختصاصی تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز با استفاده از سوبستراهای تخصصی در دامنه‌ای از اسیدیته بررسی و بیشینه فعالیت آن‌ها به ترتیب ۱۰، ۱۱ و ۱۱ به دست آمد. دمای بهینه برای سه پروتئاز ذکر شده به ترتیب برابر با ۳۵، ۳۵ و ۴۰ و۴۰ درجه سانتی‌گراد بود. اثر یون‌های فلزی آهن، منیزیم، منگنز، روی و مس با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز، تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز معنی‌دار بود چنان‌که، یون منیزیم ۵

میلی‌مولار باعث افزایش، یون‌های منگنز ۱۰ میلی‌مولار و مس ۵ میلی‌مولار سبب کاهش فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز و یون آهن ۵ میلی‌مولار سبب افزایش فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز شد. همه‌ی یون‌های نامبرده سبب افزایش فعالیت آنزیم تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز شد.

کلمات کلیدی: لارو بید چغندر، آنزیم‌های گوارشی معده، اسیدیته، دما، یون‌های فلزی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

فصل دوم: بررسی منابع ۵

۲-۱- لیتای چغندرقند ۶

۲-۲- رده بندی ۶

۲-۳- مرفولوژی آفت ۶

۲-۳-۱- حشره کامل ۶

۲-۳-۲- تخم ۷

۲-۳-۳- لارو ۷

۲-۳-۴- شفیره ۹

۲-۴- خسارت ۹

۲-۵- دستگاه گوارش حشرات ۱۰

۲-۵-۱- روده جلویی ۱۰

۲-۵-۲- روده میانی ۱۱

۲-۵-۳-روده عقبی ۱۱

۲-۶- آنزیمهای گوارشی ۱۲

۲-۶-۱-مبانی آنزیم شناسی ۱۲

۲-۷- pH لوله گوارشی حشرات ۱۳

۲-۸- آنزیمهای گوارشی در حشرات ۱۴

۲-۸-۱-آنزیمهای گوارش دهنده کربوهیدراتها ۱۵

۲-۸-۱-۱- آلفا آمیلازها ۱۶

۲-۸-۱-۲- آلفا و بتا گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها ۱۷

۲-۹- آنزیمهای گوارش دهندهی پروتئین ها ۱۸

۲-۱۰- آنزیمهای گوارش دهنده لیپیدها ۲۱

فصل سوم: مواد و روشها ۲۳

۳-۱- جمع آوری حشرات ۲۴

۲-۳- جدا سازی لوله گوارش ۲۴
۳-۳- تهیه عصاره آنزیمی ۲۵
۳-۴- تهیه بافر ۲۵
۳-۵- تهیه معرفها ۲۵
۳-۵-۱- معرف دی نیتروسالسیلیک اسید ۲۵
۳-۵-۲- معرف تری کلرو استیک اسید ۲۶
۳-۶- سوبسترا ها ۲۶
۳-۶-۱- تهیه سوبسترای برای آنزیمهای آلفا و بتا گلوکوزیداز ۲۶
۳-۶-۲- تهیه سوبسترای آزوکازئین برای آنزیم پروتئاز عمومی ۲۶
۳-۶-۳- سوبستراهای تریپسین، کیمو تریپسین، الاستاز برای سنجش پروتئازهای اختصاصی ۲۶
۳-۶-۳-۱- تهیه سوبسترای تریپسین ۲۶
۳-۶-۳-۲- تهیه سوبسترای کیمو تریپسین ۲۷
۳-۶-۳-۳- تهیه سوبسترای الاستاز ۲۷
۳-۷- سنجش فعالیت گلوکوزیدی ۲۷
۳-۷-۱- اندازه گیری pH بهینه آنزیمهای آلفا و بتا گلوکوزیداز ۲۷
۳-۷-۲- اندازه گیری دمای بهینه آنزیمهای آلفا و بتا گلوکوزیداز ۲۷
۳-۷-۳- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز ۲۸
۳-۸- سنجش فعالیت پروتئولیتیکی ۲۸
۳-۸-۱- تعیین pH بهینه آنزیمهای سرین پروتئازی ۲۸
۳-۸-۲- اندازه گیری دمای بهینه آنزیمهای سرین پروتئاز ۲۹
۳-۸-۳- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های سرین پروتئازی ۲۹
۳-۹- اندازه گیری pH بهینه پروتئاز عمومی ۲۹
۳-۱۰- اندازهگیری دمای بهینه پروتئاز عمومی ۳۰
۳-۱۱-تعیین پروتئین کل.. ..... ۳۰
۳-۱۲- تجزیه وتحلیل آماری نتایج ۳۱
فصل چهارم: نتایج و بحث ۳۳
۴-۱-اثر pH بر فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز ۳۵
۴-۲-اثر دما بر فعالیت آنزیمهای آلفا و بتا-گلوکوزیداز ۳۸

۴-۳-اثر یونهای فلزی بر فعالیت گلیکوزیدازی ۴۱
۴-۴-تعیین فعالیت پروتئولیتیکی ۴۳
۴-۴-۱-تعیین pH بهینه پروتئاز عمومی ۴۳
۴-۴-۲-تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی ۴۵
۴-۴-۳-تعیین pH بهینه پروتئازهای اختصاصی (تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز) ۴۶
۴-۴-۴-تعیین دمای بهینه پروتئازهای اختصاصی (تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز) ۵۰
۴-۴-۵-اثر یونهای فلزی بر فعالیت آنزیمهای پروتئازی ۵۳
نتیجه گیری کلی ۵۸
منابع ۶۱

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ مراحل مختلف زندگی بید چغندرقند و آثار خسارت آن..... ۸

شکل ۳-۱- منحنی استاندارد پروتئین..... ۳۱

شکل ۴-۱ لوله گوارشی لارو سن پنجم بید چغندرقند ۳۴

شکل ۴-۲ اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندرقند ۳۶

شکل ۴-۳ اثر pH بر فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندرقند ۳۶

شکل ۴-۴ اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندرقند ۳۹

شکل ۴-۵ اثر دما بر فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندرقند ۴۰

شکل ۴-۶ اثر غلظت یون های فلزی بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندرقند..... ۴۲

شکل ۴-۷ اثر غلظت یون های فلزی بر فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندرقند..... ۴۳

شکل ۴-۸ اثر pH بر فعالیت پروتئاز عمومی لارو سن پنجم بید چغندرقند ۴۴

شکل ۴-۹ اثر دما بر فعالیت پروتئاز عمومی لارو سن پنجم بید چغندرقند ۴۶

شکل ۴-۱۰ اثر pH بر فعالیت پروتئاز اختصاصی تریپسین لارو سن پنجم بید چغندرقند ۴۷

شکل ۴-۱۱ اثر pH بر فعالیت پروتئاز اختصاصی کیموتریپسین لارو سن پنجم بید چغندرقند..... ۴۸

شکل ۴-۱۲ اثر pH بر فعالیت پروتئاز اختصاصی الاستاز لارو سن پنجم بید چغندرقند ۴۹

شکل ۴-۱۳ اثر دما بر فعالیت پروتئاز اختصاصی تریپسین لارو سن پنجم بید چغندرقند ۵۱

شکل ۴-۱۴ اثر دما بر فعالیت پروتئاز اختصاصی کیموتریپسین لارو سن پنجم بید چغندرقند..... ۵۲

شکل ۴-۱۵ اثر دما بر فعالیت پروتئاز اختصاصی الاستاز لارو سن پنجم بید چغندرقند ۵۲

شکل ۴-۱۶ اثر یون‌های فلزی بر فعالیت پروتئاز اختصاصی تریپسین لارو سن پنجم بید چغندر قند..... ۵۴

شکل ۴-۱۷ اثر غلظت یون‌های فلزی بر فعالیت پروتئاز اختصاصی کیموتریپسین لارو سن پنجم بید چغندر قند..... ۵۴

شکل ۴-۱۸ اثر غلظت یون‌های فلزی بر فعالیت پروتئاز اختصاصی الاستاز لارو سن پنجم بید چغندر قند..... ۵۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه

بیـد چغنـدر قنـد یـا لیتـای چغنـدرقند با نام علمی *Scrobipalpa ocellatella* Boyd (Lepidoptera: Gelechiidae) جزء آفات اختصاصی چغندرقند است که فقط به چغندرقند، چغندرعلوفه ای و چغندرهای وحشی حمله می‌کند و تقریبا در تمام نواحی چغندرکاری ایران وجود دارد (خیری[1]، ۱۳۶۹). این حشره در نواحی گرمسـیری و نیمه گرمسـیری و درمناطقی که تابستان های خیلی گرم دارد طغیان بیشتری دارد (اسـماعیلی[2] و همکاران، ۱۳۷۴). لارو این آفت با تغذیه از قسـمت جوانه مرکزی چغندر، سـبب خسـارات زیادی از جمله; فسـاد جوانه‌ها، کاهش عملکرد ریشـه و وزن قند حاصـل شده است که از ارزش اقتصادی این محصـــول می‌کاهد (احمدی و همکاران، ۲۰۱۷). روش‌های متعددی به منظور کنترل بید چغندرقند وجود دارد اما رایج‌ترین آن‌ها استفاده از ترکیبات شیمیایی می‌باشد. کاربرد سموم شیمیایی اثرات مضر بر موجودات غیر هدف و محیط زیسـت دارد (همتی و همکاران، ۲۰۱۷). پژوهش‌های بسـیاری روی کنترل شـیمیایی بید چغندرقند انجام شـده است (آرنادو[3] و همکاران، ۲۰۱۲). اما این روش به دلیل فعالیت لارو بید در بخش جوانه مرکزی از اثر بخشی رضایت‌مندی برخوردار نیست به علاوه استفاده از سموم شیمیایی همیشـه با چالش های بزرگی از جمله آلودگی های زیسـت محیطی و اثر گذاری ناگوار روی موجودات غیر هدف از جمله انسـان مواجه بوده اسـت. مشـکلات موجود در زمینه‌ی کنترل شـیمیایی آفات سـبب توجه بیشـتر به سـایر روش های کنترلی از جمله اسـتفاده از عوامل مهار زیسـتی یا کنترل بر مبنای ویژگی‌های فیزیولوژیکی آفت شـده اسـت. یکی از این روش‌ها هدف قرار دادن دسـتگاه گوارش و به ویژه آنزیم‌های گوارشـی حشرات زیان آور است. امروزه یکی از استراتژی‌ها در برنامه مدیریت تلفیقی آفات کاهش فعالیت آنزیم های گوارشی آفات توسط مهار کننده های پروتئینی طبیعی موجود در ارقام مقاوم، یا ایجاد گیاهان

[1] Kheiry
[2] Esmaieli
[3] Arnaudov

تراریخته حاوی مهار کننده های مؤثر از طریق شناسایی ژن های عامل مقاومت گیاهی و انتقال آن به سایر گیاهان پر محصول و حساس به آفت می باشد. مشخص شده است که چندین گروه مختلف از پروتئین‌های گیاهی روی انواعی از آفات، سمی هستند (جانسما و بولتر[1]،۱۹۹۷). این ترکیب ها با جلوگیری از عمل آنزیم‌ها، سبب هضم ناقص غذا و مانع جذب اسیدهای آمینه و مواد غذایی ضروری شده و درنتیجه موجب کندی رشد و نیز سبب مرگ حشره در اثرگرسنگی می‌شوند (بوداتا[2] و همکاران، ۲۰۰۸). مهارکننده های آنزیمی گزینه های مناسبی برای حفاظت گیاهان و محصولات آن‌ها در مقابل خسارت حشرات گیاه خوار و دانه خوار هستند. این مهارکننده ها که در بسیاری از گیاهان به طور طبیعی به عنوان بخشی از دفاع ذاتی حضور دارند به ویژه در غلات و حبوبات به فراوانی یافت می‌شوند و پتانسیل حشره‌کشی بالایی دارند (فرانکو[3] و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به این که یکی از مهمترین اثرات ترکیبات ثانویه شیمیایی موجود در گیاهان، تغییر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات می‌باشد، بنابراین مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گوارشی در روده میانی حشرات لازم و ضروری است (میچاد[4]، ۱۹۹۷). تا به امروز تحقیقات زیادی در زمینه بیوشیمی آنزیم‌های گوارشی صورت گرفته است. هدف از این تحقیقات، مشخص کردن خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌های گوارشی و بررسی مهارکننده‌های سنتزی و استخراج شده از گیاهان روی فعالیت این آنزیم‌ها می‌باشد. آنزیم‌های گوارشی در تغذیه و جذب مواد غذایی در طول مراحل مختلف زندگی حشره نقشی حیاتی دارند و بدین طریق در حفظ بقا و تولید مثل حشره مؤثر واقع می‌شوند (جورج[5] و همکاران، ۲۰۰۸). مطالعه در زمینه‌ی آنزیم‌های گوارشی حشرات، اساس مطالعه‌ی فیزیولوژی دستگاه گوارش آن‌ها به شمار می‌رود. با توجه به اهمیت استفاده از مهار کننده های گیاهی آنزیم های گوارشی و تولید گیاهان تراریخته‌ی حاوی این ترکیبات، اولین قدم در مسیر استفاده از مهار کننده ها در

[1] Jongsma & Bolter
[2] Budatha
[3] Franco
[4] Michaud
[5] George

امر کنترل آفات، شـــناخت کامل ویژگی های هر کدام از آنزیم های گوارشـــی می باشـــد به علاوه در مورد حشرات مفید، استفاده از فعال کننده های آنزیم های گوارشی می‌تواند در بهبود احتمالی پرورش های آنها نقش داشـــته باشـــد. ویژگی های مختلف آنزیم های گوارشـــی شـــامل دما و pH بهینه آنزیم، مدت زمان پـایـداری آنزیم، اثر غلظـت آنزیم و فعالیت آن، اثر محلول‌ها یا حلال‌های مختلف بر فعالیت آنزیم و غیره می‌باشـد (فرشـباف پورآباد و همکاران، ۱۳۸۹). تاکنون در زمینه بررسـی خصوصیات آنزیم های پروتئاز و کربوهیدراز در سـیسـتم گوارشـی بید چغندر قند گزارشی مستند ثبت نشده است. به همین دلیل در این تحقیق، ویژگی‌های بیوشـیمیایی آنزیم‌های کربوهیدرازی و سـرین پروتئازهای گوارشی این حشره آفت به منظور فراهم ساختن اطلاعاتی در زمینه فیزیولوژی گوارش این حشره مورد مطالعه قرار گرفت.

اهداف تحقیق حاضر عبارت‌اند از:

- تعیین دما و اسیدیته بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز معده لارو سن پنج بید چغندر قند
- تعیین دما و اسیدیته بهینه فعالیت پروتئازهای عمومی معده لارو سن پنج بید چغندر قند
- تعیین دما و اسیدیته بهینه فعالیت پروتئازهای اختصاصی شامل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز معده لارو سن پنج بید چغندر قند
- اندازه گیری پروتئین کل

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- لیتای چغندرقند

آفت لیتای چغندر قند با نام علمی *Scrobipalpa ocellatella* Boyd، در ایران اولین بار توسط افشار در سال ۱۳۱۷ از کرج و ورامین جمع آوری گردید و بعد دواچی در سال ۱۳۲۸ مقالاتی مرتبط با این آفت منتشر کرده است (خیری و همکاران، ۱۳۶۹). این آفت به انواع چغندر قند، حمله می‌کند و تاکنون از روی گیاهان زراعی دیگر گزارش نشده است و تقریبا در تمام مناطق چغندرکاری ایران وجود داشته و طغیان آن بیشتر در چغندرکاری های خراسان، اصفهان، فارس، کرمان، همدان، کرمانشاه و کرج مشاهده شده است و از کشورهای اروپای شرقی شامل جنوب روسیه و اکثر کشورهای خاورمیانه نیز گزارش شده است. این حشره در نواحی گرمسیری و در مناطقی که تابستان خیلی گرمی دارد طغیان بیشتری دارد (اسماعیلی و همکاران، ۱۳۷۴).

۲-۲- رده بندی

بید چغندر قند در رده Insecta، زیررده Pterygota، بالا راسته Holometabola، راسته Lepidoptera، بالاخانواده Gelechioidea، خانواده Gelechiidae، زیرخانواده Gelechiinae و قبیله Gnorimoschemini قرار دارد. نام های مترادف این آفت *Lita ocellatella*، *Phtorimaea ocellatella* و *Gnorimoschema ocellatella* می‌باشد.

۲-۳- مرفولوژی آفت

۲-۳-۱- حشره کامل

حشره کامل بید چغندر پروانه کوچکی است که طول بدن آن حدود ۷ میلی‌متر و عرض بدن با بال های باز ۱۴ میلی‌متر است. بال‌های رویی به رنگ قهوه‌ای متمایل به زرد بوده و روی آن‌ها نقاط کوچک سیاه رنگی وجود دارد که مجموعه این نقاط کوچک لکه های سیاه منظم و بزرگتری را تشکیل می‌دهد. رنگ بال‌های زیری خاکستری روشن است و در اطراف آن‌ها ریشک های بلند ظریفی وجود دارد. بال‌ها، بدن

حشـره را به صـورت شـیروانی می‌پوشـاند. شـکم در حشـرات ماده حجیم تر از نرها می‌باشـد و بال ها در حشـرات نر کوتاه‌تر از حشـرات ماده می‌باشـد. رنگ بال‌ها در نر، خاکسـتری تیره ولی در حشـرات ماده روشن‌تر است (بهداد، ۱۳۷۱) (شکل ۲-۱، L).

۲-۳-۲- تخم

تخم ها بیضـی شـکل و در ابتدا به رنگ زرد روشـن بوده، ولی با نزدیک شدن به زمان تفریخ، تیره و سیاه رنگ می‌شود. حشره ماده اکثرا تخم‌ها را به صورت چند عددی در کنار رگبرگ‌ها، انتهای دمبرگ و جوانه مرکزی بوته ها می‌گذارد. تخم‌ها چند روز پس از تخم ریزی چروکیده شده و در یک انتهای آن نقطه‌های گرد قهوه‌ای و بسـیـار کوچکی ظاهر می‌گردد. متوسـط طول تخم‌ها ۰/۴۵ میلی‌متر و عرض آن‌ها ۰/۳ میلی‌متر است و با چشم غیر مسلح به راحتی دیده نمی‌شود (خانجانی، ۱۳۸۸).

۲-۳-۳- لارو

لاروهایی که تازه از پوسته تخم خارج می‌شوند به رنگ زرد روشن هستند و به تدریج که رشد می‌کنند در پشت آن‌ها نوارهای قرمز رنگی ظاهر می‌شود، ولی زیر شکم آن‌ها به رنگ زرد تیره است. به علاوه در پشت لاروها خال‌های سـیاهی وجود دارد که روی هر کدام یک مو دیده می‌شـود (شکل ۲-۱، A -D). لارو بید چغندر قند دارای پنج سـن لاروی اسـت. طول لارو سن یک، حدود ۲/۸ میلی‌متر و لارو سن پنج (کامل) حدود ۱۱/۵ میلی‌متر است. سر لاروهای جوان سیاه است و به تدریج که سن بزرگ‌تر می‌شود به رنگ قهوه ای درمی‌آید. بدن لارو دارای ۱۳ مفصل می‌باشد. پاهای سینه‌ای در سه مفصل سینه‌ای و پاهای شکمی در مفصل‌های سوم، چهارم، پنجم، ششم و دهم شکم قرار دارند. در سطح پشتی بدن لاروهای کامل چند نوار تیره و روشن دیده می‌شود (شکل ۲-۱، E & F) (خانجانی، ۱۳۸۸).

شـکل (۲-۱) مراحل مختلف زندگی بید چغندر قند و آثار خسـارت آن. A;B;C&D : لاروهای سن یک تا چهار بید چغندر قند، E: لارو نر سن پنج بید چغندرقند (تشخیص لارو نر و ماده، از طریق لکه تیره در بند هشتم و نهم سطح پشتی لارو نر) F: لارو ماده سـن پنج بید چغندر قند G: پیش شـفیره (پایین) و شـفیره (بالا) بید چغندر قند H: مرحله آخر شفیرگی بید چغندر قند L: حشـــره کامل بید چغندر قند M و N: پیچیدگی برگ‌های چغندر قند در اثر تغذیه لارو بید چغندر قند O: خسـارت سنین اولیه لارو بید چغندر قند در جوانه مرکزی بوته که منجربه سیاه شدگی بوته می‌شود. P: خسارت شدید بید چغندر قند، پوسیدگی و فساد مرکز ریشه (شکل‌ها اصلی).

۲-۳-۴- شفیره

شـفیره ها به شکل کله قندی و به رنگ قرمز تیره هستند که داخل پیله سفید و یا زرد رنگی که لارو سن آخر قبل از شفیره شدن در خاک می‌تند تشکیل می‌گردد. طول شفیره ماده حدود ۵/۷ میلی‌متر و شفیره نر ۵/۲ میلی‌متر است (خیری، ۱۳۶۹) (شکل ۲-۱، G & H)

۲-۴- خسارت

لاروهای نسـل اول بیشتر کناره برگ‌ها و دمبرگ‌ها را مورد حمله قرار می‌دهند. تغذیه لاروهای سن اول و دوم از کناره های برگ های جوان سبب پیچیدگی، لوله و سیاه شدن برگ‌ها می‌شود. ولی لاروهای سنین بعدی، از انتهای دمبرگ ها و جوانه های مرکزی گیاه که محل اصـلی زندگی این آفت است تغذیه کرده و از خود، توده‌ای از فضـولات و الیافی از تار به جای می‌گذارند (شـکل۲-۱، O). بدین صورت که این لاروها هنگـام تغـذیـه از جوانـه‌هـای مرکزی ابتـدا بـا تـارهای ســـفید و نازک، برگ‌های میانی بوته‌ها را به هم می‌چسـبانند و سپس داخل آن مخفی می‌شوند (شکل۲-۱، M & N). در اثر تغذیه لاروها و مخلوط شدن فضـولات آن‌ها به شـیره گیاهی، جوانه‌های مرکزی به هم چسبیده و سیاه می‌شوند. این وضعیت، از علائم بارز و مشـخص آلودگی بوته‌های چغندر قند به این آفت است و بوته‌های آلوده از دور به خوبی از بوته‌های سـالم قابل تشـخیص می‌باشـند. در مواقعی که جوانه‌های مرکزی کاملا فاسـد شـده و از بین رفته باشند، لاروها برای تغذیه در مغز بوته فرو رفته و در سـر ریشـه‌ها و قسـمتی که از خاک بیرون اسـت دالان‌هایی تولید می‌کند (شـکل۲-۱، P). خسارت این آفت باعث توقف رشد بوته‌ها و کاهش وزن ریشه و درصد عیار قند می‌گردد و اغلب بوته‌های ضـعیف در اثر خسـارت شدید این آفت زرد شده و خشک می‌شوند. به طور کلی لاروهای این آفت از نور گریزان بوده و همیشه درلابه‌لای جوانه‌ها، برگ‌ها و دمبرگ‌ها پنهان می‌شوند (خیری، ۱۳۶۹). حداکثر تراکم لاروهای آفت و خسارت در دهه دوم و سوم مهر ماه بروز می‌کند (مشاهدات

عباس آبادی در سال ۱۳۹۷). تغذیه آفت در بسیاری از موارد، علاوه بر خسارتی که در بالا ذکرشد، سبب نفوذ عوامل قارچی شده و بدین صورت خسارت تشدید می‌گردد (خیری و همکاران، ۱۳۶۹).

۲-۵- دستگاه گوارش حشرات

ساختمان و عمل لوله گوارش که معمولا روده نام دارد، متناسب با عادات غذایی حشرات، تکامل یافته است. روده‌های حشرات اشکال متنوعی دارند و به روش‌های ویژه‌ای برای هضم غذاهای جامد، مایع، تغییر یافته اند. ولی، ساختار کلی در مورد سه قسمت اصلی روده جلویی، روده میانی، و روده عقبی در تمام حشرات حفظ شده است. در بیشتر حشرات، روده میانی محل اصلی ترشح آنزیم‌های گوارشی، گوارش غذا و جذب مواد غذایی می‌باشد، هر چند، در برخی نیز بخشی از گوارش در روده جلویی یا روده عقبی انجام می‌شود (یزدانیان، ۱۳۸۹). در حشرات، دستگاه گوارش به شکل لوله طویلی است که در تمام طول بدن امتداد یافته و ابتدای آن در جلو به دهان و انتهای آن در آخر شکم، به مخرج منتهی می‌گردد (نیشن[1]، ۲۰۰۸).

۲-۵-۱- روده جلویی

در طول نشو و نمای رویانی، روده جلویی بر اثر تا خوردن یک بافت اکتودرمی که در قسمت انتهایی جلویی بدن واقع است، تشکیل می‌شود. سلول‌های اپی‌تلیومی روده جلویی یک پوشش کوتیکولی ترشح می‌کند که به دیواره آن‌ها می‌چسبد. این پوشش دارای کیتین و هم دارای پروتئین است و اساسا شبیه رو کوتیکول و درون کوتیکول جلد بدن می‌باشد. نواحی به شدت اسکلروتینه شده‌ی پوشش روده جلویی حاوی برون کوتیکول سخت می‌باشند. روده جلویی به حفره دهانی (دهان)، حلق، مری، چینه‌دان و

[1] Nation

پیش‌معده (سنگ‌دان) تقسیم می‌شوند، که هر قسمت ممکن است به شدت تغییر یافته باشد. سلول‌های اپی‌تلیومی روده‌ی جلویی معمولا به شکل سلول‌های پهن پولک مانندی هستند که با کوتیکول (Intima) پوشیده شده‌اند و وظیفه اصلی این کوتیکول دندانه دار، خرد کردن قطعات غذایی است (نیشن، ۲۰۰۸).

۲-۵-۲- روده میانی

در بیشتر حشرات، روده میانی محل اصلی ترشح آنزیم‌های گوارشی، هضم و جذب می‌باشد. در بسیاری از حشرات، لوله‌های کور در ابتدا یا نزدیک به ابتدای روده میانی قرار دارند اما ممکن است در نقاط مختلفی در طول آن دیده شوند. در برخی از حشرات، لوله‌های کور یکی از محل‌های اصلی جذب فرآورده‌های گوارش یافته می‌باشند و ممکن است آنزیم‌های گوارشی را نیز تولید کنند. نقش لوله‌های کور جذب، افزایش سطح معده و کمک به هضم بیشتر مواد غذایی است (شجاعی، ۱۳۸۴). سلول‌های ستونی در روده میانی وظیفه اصلی گوارش را به عهده دارند. این سلول‌ها حدود ۹۰٪ سلول‌های پوششی جدار معده را تشکیل می‌دهند. عمر سلول‌های ستونی محدود است. سلول‌های فرسوده توسط سلول‌های رویشی جایگزین می‌شوند که گاه در مجموعه‌هایی به نام Nidi در جدار معده دیده می‌شوند. این سلول‌ها حدود ۳-۲٪ سلول‌های پوششی این بخش را شامل می‌شوند.

۲-۵-۳-روده عقبی

روده عقبی همانند روده جلویی در رویان از بافت اکتودرمی تکامل می‌یابد و در نتیجه، سلول‌های روده عقبی نیز روی سطح خود دارای یک پوشش کوتیکولی هستند. لوله‌های مالپیگی معمولا نقطه‌ی شروع روده‌ی عقبی را مشخص می‌سازند. برخی از محققان محل اتصال بین روده‌های میانی و عقبی را پیلوروس[1]

[1] Pylorus

نامیده‌اند و یک ساختار تیغه ای شکل ممکن است در این قسمت وجود داشته باشد. گاهی اوقات، روده باریک مستقیما به راست روده متصل می‌شود اما در برخی از حشرات، یک قسمت میانی مشخص وجود دارد که برخی مؤلفان آن را روده بزرگ نامیده‌اند. راست روده انتهایی‌ترین قسمت روده عقبی می‌باشد که به مخرج ختم می‌گردد (چپمن، ۱۹۹۸). در راست روده عمدتا باز جذب آب و املاح صورت می‌گیرد.

۲-۶- آنزیم‌های گوارشی

۲-۶-۱-مبانی آنزیم شناسی

آنزیم‌ها کاتالیزورهایی زیستی هستند که سرعت واکنش‌های ویژه‌ای را افزایش می‌دهند. آنزیم‌ها سرعت واکنش تبدیل سوبسترا[1] به فرآورده[2] را تحت تأثیر قرار می‌دهند و عدم وجود آن‌ها در سلول باعث می‌شود که بیشتر واکنش‌های بیوشیمیایی با سرعت مناسب انجام نگیرند. سرعت واکنش آنزیمی در مقایسه با همان واکنش، اما غیرآنزیمی تا 10^{14} برابر سریع‌تر انجام می‌گیرد (حسینی نوه و قدمیاری،۱۳۹۳). آنزیم‌ها دارای فعالیت اختصاصی هستند بنابراین هر یک از آن‌ها روی ماده‌ی غذایی ویژه‌ای اثر می‌کنند و معمولا به وسیله‌ی گرمای زیاد و یا مواد اسیدی و بازی قوی و تشعشعات از بین می‌روند. علاوه بر شرایط مناسب فیزیکی محیط که در فعال شدن آنزیم ها مؤثرند بعضی مواد دیگر به نام کوآنزیم[3] و یون‌های کلسیم می‌توانند فعالیت آنزیم‌ها را افزایش دهند و یا آنتی آنزیم‌ها[4] که می‌توانند فعالیت آن‌ها را متوقف کنند. در هر کجا که اعمال متابولیک صورت می‌گیرد وجود آنزیم‌ها ضروری است، بنابراین آنزیم‌ها در همه‌ی اجزا و اندام‌های سلولی حضور فعال دارند (مجد و شریعت‌زاده، ۱۳۸۵). علاقه و توجه به آنزیم‌ها به دلایل پویایی

[1] Substrate
[2] Products
[3] Coenzymes
[4] Antienzymes

و نقش ضروری آن‌ها در سلول، قدرت کاتالیزی فوق‌العاده و تخصصی بودن آن‌هاست (حسینی نوه و قدمیاری،۱۳۹۳).

۲-۷- pH لوله گوارشی حشرات

مقدار pH لوله گوارش، به ویژه روده میانی، یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های محیط درونی بدن حشرات است که بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تأثیر می‌گذارد. pH لوله گوارش ممکن است حلالیت مواد بلعیده شده، سمیت بعضی از سموم و جمعیت میکروارگانیسم‌های لوله گوارش را تحت تاثیر قرار دهد (نیشن ،۲۰۰۸). در بسیاری از حشرات، pH روده میانی با مقدار pH بهینه فعالیت آنزیم‌های گوارشی آن‌ها متناسب می‌باشد (ترا و فریرا[1]، ۱۹۹۴). اثر pH روی فعالیت آنزیم را معمولا به یونیزاسیون گروه‌های زنجیرهای جانبی در جایگاه فعال پروتئینی نسبت می‌دهند که سبب می‌شود زنجیرهای جانبی به صورت اسید یا باز ضعیف عمل کنند. ضمناً زنجیرهای جانبی سایر اسیدهای آمینه موجود در محل‌های دیگر ساختمان پروتئین نیز در واکنش‌های متقابلی شرکت می‌نمایند که برای ایجاد و حفظ ساختمان پروتئین مؤثر هستند (فرشباف پور آباد و همکاران، ۱۳۸۹). تغییر pH روده میانی، محدودیت‌هایی را برای فعالیت آنزیم‌های گوارشی به وجود می‌آورند و تعداد کمی از آنزیم‌ها می‌توانند فعالیت بهینه را در چنین دامنه متغیری از pH حفظ کنند. بنابراین، در گونه‌های مختلف حشرات، pH روده میانی متفاوت است و در نتیجه آنزیم‌های مختلفی نیز یافت می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که pH روده میانی، ویژه گونه است و گذشته از آن، معمولا راسته‌های اصلی حشرات اسیدیته‌های روده میانی مختلف دارند (گری سون[2]، ۱۹۸۵; ولفسون و موردک[3]، ۱۹۹۰). با این حال، بعضی از راسته‌ها، مانند دو بالان و سخت‌بالپوشان، تنوع قابل توجهی را در این ویژگی نشان می‌دهند. در سخت‌بالپوشان، pH روده میانی از خیلی اسیدی (pH

[1] Terra. & Ferreira
[2] Grayson
[3] Wolfson & Murdock

برابر با ۳ تا ۴) در خانواده‌های Chrysomelidae و Meloidae تا pH قلیایی (۸ تا ۹) در لاروهای برخی افراد خانواده Scarabaeidae متغیر است (کریستلر و همکاران، ۱۹۸۹; ولسفون و موردک، ۱۹۹۰) . در راسته ناجوربالان، pH روده میانی اسیدی می‌باشد (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). برخی از پروتئازها در pH های قلیایی و برخی نیز در pH های اسیدی بیشترین فعالیت را دارند (یزدانیان، ۱۳۸۹). حشرات با روده میانی دارای pH قلیایی، دارای سرین پروتئازهایی مانند تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز می‌باشند که pH فعالیت بهینه آن‌ها خنثی یا قلیایی است. طبق گزارش زیبایی و همکاران (۲۰۱۲) و شریفلو همکاران (۲۰۱۶) pH قلیایی لوله گوارشی در لارو سفیده بزرگ کلم (L) *Pieris brassica*، به علت تغذیه‌ی لارو این آفت از گیاهان خانواده چلیپائیان که سرشار از مواد آللوشیمیایی است می‌باشد و این خاصیت قلیایی عاملی مهم برای افزایش قابلیت هضم پروتئین‌های تغذیه شده از برگ میزبان است. گونه‌هایی که دارای روده‌ی میانی با pH اسیدی می‌باشند، مانند برخی از سخت‌بالپوشان، دوبالان و ناجوربالان، برای هضم پروتئین‌ها به سیستئین یا آسپارتیک و پروتئازها تکیه دارند که در pH اسیدی بیشترین فعالیت را از خود نشان می‌دهند (جونسون و روبوسکی،۲۰۰۰). طبق گزارشات ویات (۱۹۶۱)، (سانتوس و همکاران، ۱۹۸۳)، (ترپاتی و کریشنا، ۱۹۸۸)، (بیکر،۱۹۸۹)، (ناکونیکزنی و همکاران، ۲۰۰۶)، (زیبایی و همکاران، ۲۰۰۸)، (مهرآبادی و بندانی، ۲۰۰۹)، بندانی و همکاران (۲۰۱۰) و (امیری جامی، ۲۰۱۹) pH بهینه فعالیت آنزیم‌های گوارشی در حشرات راسته بالپولکداران قلیایی می‌باشد.

۲-۸- آنزیم‌های گوارشی در حشرات

آنزیم‌های گوارشی در حشرات به سه گروه شامل آنزیم‌های گوارشی کربوهیدرات‌ها (کربوهیدرازها)، پروتئین‌ها (پروتئازها) و چربی‌ها (استرازها) تقسیم می‌شوند (چپمن[1]، ۱۹۹۸).

[1] Chapman

۲-۸-۱-آنزیم‌های گوارش دهنده کربوهیدرات‌ها

کربوهیدرات ها به عنوان یک منبع غذایی مورد نیاز برای رشد، نمو، تولید مثل و بقای اکثر حشرات مهم و ضروری است (داد[1]، ۱۹۹۸). ارزش غذایی کربوهیدرات‌ها بستگی به وجود آنزیم های گوارشی برای هیدرولیز کردن کربوهیدرات های پیچیده به مونومرهای تشکیل دهنده آن دارد که پس از آن توسط سلول های اپی‌تلیال روده میانی جذب می شوند. کربوهیدرات‌ها به شکل پلی‌ساکارید و دی‌ساکارید همراه غذا وارد بدن می‌شوند ولی برای عبور از دیواره معده و جذب شدن باید به مونوساکاریدها تجزیه شوند. کربوهیدرازها هیدرولیز پلی‌ساکاریدها و دی‌ساکاریدها را به قندهای ساده کاتالیز می‌کنند و دربردارنده آنزیم‌های مختلفی مانند آمیلازها، سلولازها، پکتینازها، گلوکوزیدازها، گالاکتوزیدازها و آنزیم‌های دیگر می‌باشند. آنزیم‌های هضم کننده کربوهیدرات‌ها هم به وسیله غدد بزاقی و هم به وسیله سلول‌های اپی‌تلیومی جدار معده ساخته می‌شوند. مهم‌ترین قند مصرفی، نشاسته است که به عنوان یک پلی ساکارید به وسیله حشرات گیاه‌خوار استفاده می‌شود در حالی که حشرات گوشت‌خوار بیشتر از گلیکوژن به عنوان پلی ساکارید استفاده می‌کنند (لهان و بولر، ۱۹۹۶). مهم‌ترین آنزیمی که در هضم قندها نقش دارد آنزیم آمیلاز است که نشاسته و گلیکوژن را به قندهای ساده تر می‌شکند. آلفا-گلوکوزیداز و ایزو مالتاز از جمله آنزیم‌هایی هستند که قندهای ساده‌تر را به گلوکز تبدیل می‌کنند (ون اوویک[2] و همکاران، ۲۰۰۷). از آنزیم‌های دیگری که در هضم قندها نقش دارند می‌توان به آلفا و بتا- گلوکوزیداز و آلفا-آلفا ترهالاز اشاره کرد. این آنزیم‌ها ترهالوز را به دو مولکول گلوکز می‌شکنند. در مواردی لازم است که یک پروتئین، به عنوان مثال یک آنزیم، در ضمن حفظ فعالیت خود تا حد امکان از بقیه پروتئین‌ها جدا شود این آنزیم به پیوندهای گلوکوزیدی داخلی نشاسته و گلیکوژن حمله می‌کند و بنابراین، باعث تشکیل شدن مخلوطی از اجزای کوچکتر کربوهیدرات‌ها می‌شود. آلفا-گلوکوزیداز و الیگو-۶،۱-گلوکوزیدار (یا ایزو مالتاز) با اثر روی اجزای کوچکتر کربوهیدرات‌ها باعث آزاد شدن

[1] Dadd
[2] Van Ooik

گلوکز می‌شوند. بیشتر حشرات دارای یک یا چند آلفا یا بتا- گلوکوزیداز نیز هستند که طیف وسیعی از کربوهیدرات‌های کوچک را تجزیه می‌کنند.

۲-۸-۱-۱- آلفا آمیلازها

بسیاری از کربوهیدرازها از غدد بزاقی و روده میانی حشرات ترشح می‌شوند که در میان آنها فقط آلفا آمیلاز به ترتیب در زنجیره های α-1، 4-گلوکان گزارش شده است (ترا و همکاران، ۱۹۹۶). آلفا آمیلازها (α-1, 4-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.1) در برگیرنده خانواده‌ای از اندوآمیدازها هستند که هیدرولیز پیوند α-D-(1,4) glucan را در نشاسته، گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌های وابسته انجام می‌دهند (پلگرینی و همکاران، ۲۰۰۶) و آن‌ها را به مالتوز، مالتوتوریوز و مالتودکسترین تبدیل می‌کند (هنریسات[1]، ۲۰۰۲). آنزیم α- آمیلاز به نام‌های گلیکوژناز α-D-glucan-glucanohydrolas-1,4 نیز خوانده می‌شود و از آن جایی که قادر است به طور کامل در غیاب کلسیم فعالیت کند به آن کلسیم-متالوآنزیم[2] نیز گفته می‌شود (بوید[3]،۲۰۰۲). این آنزیم‌ها در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نقش محوری دارند (اکتاویو، ۲۰۰۰). بسیاری از حشرات، به ویژه آن‌هایی که مرحله لاروی یا حشره کامل روی فرآورده‌های غله‌ای زندگی می‌کنند، برای زنده ماندن به آمیلازهایشان وابسته هستند (مک گریگور و همکاران، ۲۰۰۰; فرانکو و همکاران، ۲۰۰۰). آلفا آمیلاز نقش مهمی در هضم گوارشی حشرات و زنده مانی آن‌ها در شرایط متنوع دارند (ترا و فریرا، ۲۰۰۵). با مطالعه ساکاگوچی و سوزوکی[4] (۲۰۱۳) روی مگس سرکه *Drosophila melanogaster* (Meigen) مشخص شد که با افزایش آمیلاز به مواد غذایی، سرعت رشد جمعیت لاروی نیز افزایش پیدا می‌کند. قابل پیش بینی است که افزودن آمیلاز باعث افزایش تجزیه

[1] Henrissat
[2] calciummetalloenzyme
[3] Boyd
[4] Sasaki & Suzuki

قندها می‌شود که آن نیز به نوبه خود سوخت و ساز حشره را افزایش می‌دهد و رشد و نمو را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با توجه به این فرضیه ثابت می‌شود که غذای غنی شده با گلوکز، شفیرگی را در شب پره هندی *Plodia interpunctella* (Hubner) به تاخیر می‌اندازد (بوید و همکاران، ۲۰۰۸). بوید گزارش داد که فعالیت آمیلاز در لاروهایی که از غذای غنی شده با گلوکز تغذیه می‌کنند افزایش می‌یابد، و سبب افزایش وزن و نیز کاهش مرگ و میر در لاروها می‌شود. آنزیم آلفا آمیلاز علاوه بر اینکه از سلول‌های اپی تلیال روده و غدد بزاقی سنتز و ترشح می‌شوند، از همولنف حشرات نیز گزارش شده اند (صابری، ۱۳۹۱; اسدی و همکاران، ۱۳۸۹). معصومی و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی اثر رژیم‌های غذایی مختلف روی لارو شب پره هندی *P. interpunctella* پرداختند و گزارش دادند که سطح بیان ژن آلفا آمیلاز در لاروهای تغذیه کرده از گردو بیش از سایر تیمارها است. محققان وجود آنزیم آلفا آمیلاز را درلوله گوارشی بسیاری از حشرات از جمله راسته‌های بالپولکداران، سخت بالپوشان و سن‌ها مشخص کرده اند، که عبارت‌اند از؛

(سومادر و شریواستاوا،۱۹۸۰)، (باکر،۱۹۸۹)، (ابراهام و همکاران،۱۹۹۲)، (ترا و فریرا، ۲۰۰۵)، (زیبایی و همکاران، ۲۰۰۸)، (اسدی و همکاران،۲۰۱۰)، (رمزی و حسینی نوه، ۲۰۱۰)، (بی‌غم و همکاران، ۲۰۱۰)، (شریفی و همکاران، ۲۰۱۱)، (صابری و قدمیاری، ۲۰۱۲) و (اسدی و همکاران، ۲۰۱۲).

۲-۸-۱-۲- آلفا و بتا گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها

علاوه بر آلفا آمیلازها، گلوکوزیدازها و گالاکتوزیدازها آنزیم‌های اصلی هضم کربوهیدرات در حشرات گیاهخوار هستند. در حشرات، گلوکوزیدازهای گوارشی و گالاکتوزیدازها برای هیدرولیز دی و الیگوساکارید ها مهم هستند (باکر،۱۹۹۳). آلفا گلوکوزیداز (EC 3.2.1.20) یک هیدرولاز exo-action است که گلوکز را از پیوند های ۱، ۴- آلفا گلوکوزید حذف می کند. آلفا گلوکوزیداز حشرات، توسط سلول‌های پوششی معده میانی ترشح شده و وارد لومن معده میانی می‌شود (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). این آنزیم هیدرولیز ساکارز، مالتوز است. بتا گلوکوزیداز هیدرولیز آریل و الکل گلوکوزیدها و اتصالات ۱-۴ بین دو است (ترا و همکاران، ۱۹۹۶).

بتا گلوکوزیداز در همه گیاهان، جانوران، قارچها و باکتری‌ها وجود دارد (اسن، ۱۹۹۳). آلفا D-گالاکتوزیدازهای (EC 3.2.1.22) هیدرولازهای exo-action هستند که حذف گالاکتوز را از پیوند های ۱، ۴- آلفا گالاکتوزید در ملیبوز، رافینوز، استاکیوز و گلوکز کاتالیز می‌کند (میئر و رید، ۱۹۸۲). بتا گالاکتوزیداز موجود در مواد غذایی حشره می‌تواند به مونوساکاریدهایی با بتا، دی گالاکتوزیدازهای (EC3.2.1.23) تبدیل شود.

تاکنون، خواص بیوشیمیایی آلفا و بتا گالاکتوزیداز و گلوکوزیداز در راسته‌های مختلف حشرات، آزودو و همکاران (۲۰۰۳) و ناکونیزی و همکاران (۲۰۰۶)، یاپی و همکاران (۲۰۰۹)، قدمیاری و همکاران (۲۰۱۰)، بی‌غم و همکاران (۲۰۱۰)، شریفی و همکاران (۲۰۱۱)، ریسه و همکاران (۲۰۱۲)، آقا علی و همکاران (۲۰۱۲)، وطن پرست و همکاران (۱۳۹۱) ، احسائی و همکاران (۲۰۱۳)، غلامزاده چیتگر و همکاران (۲۰۱۳، غلامزاده چیتگر و همکاران (۲۰۱۴) و غلامزاده چیتگر (۲۰۱۸) گزارش شده است.

۲-۹- آنزیم‌های گوارش دهنده‌ی پروتئین ها

گوارش پروتئین ها در حشرات توسط چند گروه از آنزیم‌ها انجام می‌شود به طوری‌که برخی از آن‌ها در لومن روده به صورت آزاد وجود دارند، در حالی که بقیه به غشا متصل می‌باشند. پروتئازها به دو گروه اصلی اندوپپتیدازها (پروتئینازها یا اندوپروتئازها) و اگزوپپتیدازها (اگزوپروتئازها) تقسیم می‌شوند (حسینی نوه و قدمیاری،۱۳۹۲). اندوپپتیدازها در هضم اولیه‌ی پروتئین‌ها نقش داشته و منجر به شکسته شدن پیوندهای داخلی مولکول‌های پروتئین می‌شود. درحالی که اگزوپپتیدازها با حمله به پیوندهای آمینو اسیدی آن‌ها را از انتهای آمینی یا کربوکسیلی زنجیره هیدرولیز و پروتئین را به قطعات کوچک‌تر تقسیم می‌کند. وجود پروتئینازهای مختلف، به علت متنوع بودن اسیدهای آمینه در زنجیره‌ی پپتیدی آن‌ها است. پروتئینازهای مؤثر در گوارش بر اساس مکان فعالیت و سازوکار هیدرولازی به گروه‌های سرین، سیستئین، آسپارتیک و متالوپروتئیناز طبقه بندی می‌شوند که با استفاده از معرف‌های خاص و اثر اسیدیته شناسایی می‌شوند (ترا

و فریرا[1]، ۲۰۱۲). سرین پروتئینازها درجایگاه فعال آنزیم دارای یک سرین و یک هیستیدین می‌باشند (بولر و تونسند[2]، ۲۰۱۳) این آنزیم‌ها شامل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز بوده که در شرایط قلیایی فعالیت می‌کنند این اندوپروتئازها در روده میانی بسیاری از حشرات یافت شده‌اند. سیستئین پروتئینازها در جایگاه فعال خود دارای اسید آمینه سیستئین بوده و ترکیبات جیوه‌ای سبب باز دارندگی فعالیت آن‌ها می‌شود (ترا و فریرا، ۲۰۱۲). بیشینه فعالیت سیستئین پروتئازها معمولا در ناحیه کمی اسیدی (pH ۵ تا ۶) است. آسپارتیک پروتئینازها به عنوان پروتئینازهای اسیدی شناخته می‌شوند بهینه فعالیت این آنزیم در محدوده اسیدی می‌باشد (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). متالو پروتئینازها در مکان فعال خود دارای یون‌های دو ظرفیتی مثل روی و منگنز به همراه یک مولکول آب هستند (ترا و فریرا، ۲۰۱۲). سیستئین پروتئازها و آسپارتیک اسید پروتئازها در pH های اسیدی بهتر عمل می‌کنند. پروتئازهایی که pH اپتیمم آن‌ها اسیدی است، کتپسین[3] نیز نام دارند. تریپسین، کیموتریپسین و آمینو پپتیدازها در بسیاری از حشرات وجود دارند اما در مورد ترشح پروتئازهایی که هم در pH های اسیدی و هم در pHهای قلیایی فعال باشند، گزارشی وجود ندارد. برای این‌که گوارش به طور مؤثری انجام شود، هم نوع پروتئاز و هم pH روده بایستی مناسب باشد. پروتئازهای سیستئین، معمولا بر اساس اثر مهار کننده های فعال آن‌ها (یدواستات، یدواکتامید و E-64) و فعال سازی آنزیم ها با ترکیبات تیول شناسایی می‌شوند (هورن[4] و همکاران، ۲۰۰۹). در حشرات، پروتئازهای سیستئین در فرایندهای گوارش استفاده می‌شود (گیت هاوس[5] و همکاران، ۱۹۹۹). اما مواردی نشان می‌دهد که پروتئینازهای سیستئین ممکن است نقش های دیگری نیز داشته باشند (جردائو[6] و همکاران، ۱۹۹۶). مطالعات در مورد فعالیت pH پروتئاز سیستئین در عصاره خالص روده لارو بال‌پولکداران نشان داده است

[1] Terra & Ferreira
[2] Buller & Townsend
[3] cathepsin
[4] Horne
[5] Gatehouse
[6] Jordao

که این فعالیت به طور کلی در محدوده قلیایی است (بوید[1]، ۱۹۹۲؛ گیلبرت[2] و همکاران، ۲۰۰۵). بسیاری از سوسک‌ها دارای سیستئین پروتئازهایی هستند که بیشترین فعالیت آن‌ها در pH های کمی اسیدی مشاهده می‌شود (هاوسمن[3]، ۱۹۹۰ ولفسون مرداک، ۱۹۹۰). برخی از گونه‌های خانواده‌ی Scarabaeidae سرین پروتئازهایی دارند که در pH های بالای روده‌ی میانی فعال هستند که ویژگی بارز این حشرات است، و نیز فاقد سیستئین پروتئاز می‌باشند (مک‌گیه[4] و همکاران، ۱۹۹۵). بالپولکداران به طور مشخص آنزیم‌های تریپسین را ترشح می‌کنند (والائیتیس[5]، ۱۹۹۵) که در pHهای قلیایی بیشترین فعالیت را دارند و بنابراین، pH مطلوب آن‌ها در روده میانی بر اثر ترشح یون‌های پتاسیم به داخل لومن روده توسط سلول‌های جامی[6] شکل تامین می‌شود. شواهد موجود در مورد اثر غذا بر نوع پروتئازهای ترشح شده اندک می‌باشد (ولفسون مرداک، ۱۹۹۰ هاوسمن، ۱۹۹۰). حشرات خون‌خوار ممکن است دارای سرین پروتئازها و یا دارای کتسپین‌ها باشند. به عنوان مثال، آنزیم پروتئولیتیک اصلی در روده میانی افراد ماده‌ی پشه تب زرد *Aedes aegypti* (L.) (بوروسکی، ۱۹۸۸) و نیز مگس گزنده *Stomoxys calcitrans* (L.) از آنزیم‌های تریپسین می‌باشد. تریپسین به عنوان یک آنزیم گوارشی، تقریبا در همه‌ی حشرات یافت می‌شود (اولیویرا و همکاران، ۲۰۱۴). این آنزیم در فرایندهای پوست اندازی، بازسازی بافت، ایمنی ذاتی، دیاپوز، لقاح، فعال شدن پیش سازهای آنزیمی مؤثر است (لازارویک و ژانکوویک[7]، ۲۰۱۵). تغییرات در آنزیم های گوارشی با ویژگی‌های متفاوت، در سرین پروتئازها به ویژه تریپسین، با تکثیر ژن‌های جهش یافته ایجاد شده‌اند (ژو و همکاران ۲۰۱۰). برخی از بالپولکداران، با گذشت زمان در ژن آنزیم‌های گوارشی خود دچار جهش می‌شوند که باعث مقاومت در برابر مهارکننده‌های گیاهی می‌شوند (کووار ۲۰۱۵). با تکامل مجموعه ای از ژن‌های کد کننده‌ی

[1] Boyd
[2] Gilbert
[3] Houseman
[4] McGhie
[5] Valaitis
[6] Goblet cell
[7] Lazarevic & Jankovic

تریپسین و کیموتریپسین حساسیت لارو برخی از بال‌پولکداران نسبت به مهار کننده های گیاهی کاهش پیدا کرده است (پائولیلو و همکاران، ۲۰۰۰; اولیویرا و همکاران ۲۰۱۴). در مطالعات انجام شده، فعالیت آنزیم تریپسین در روده قدامی بیشتر از روده عقبی می‌باشد. به طور مثال، آنزیم تریپسین بیشتر در بخش جلویی لوله گوارش بالپولکداران و راست بالان وجود دارد، ولی در حشراتی مانند سخت بال پوشان و دوبالان این آنزیم بیشتر در بخش عقبی معده فعالیت دارند (لازارویک و ژانکوویک، ۲۰۱۵). همچنین فعالیت آنزیم گوارشی تریپسین در لارو *Pieris.brassica* فعالیت آنزیم تریپسین در روده جلویی لارو بیشتر از روده عقبی آن می‌باشد (شریفلو و همکاران، ۲۰۱۷). این اختلاف ها ممکن است به علت عادات غذایی، pH لوله گوارش و وجود پروتئازهای مختلف در پروتئین های موجود در بدن حشرات باشند. در مطالعات قبلی گزارش شده است که حضور سرین پروتئازها (تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز) ، آمینو و کربوکسیپپتیدازها در معده لارو سفیده بزرگ کلم به عنوان عامل تنظیم کننده پروتئازها در گوارش این آفت می‌باشد (زیبایی، ۲۰۱۲). پروتئین های غذایی در ابتدا توسط اندوپپتیدازهایی، مانند سرین ها و سیستئین ها، هضم می شوند و بیشترین فعالیت مربوط به پروتئاز تریپسین در روده جلویی لارو سفیده بید کلم است که نقش آن را به عنوان یک آنزیم پیشگام برای هضم پروتئین مشخص می‌کند (شریفلو و همکاران ۲۰۱۷). سن خونخوار *Rhodnius prolixus* Stal کتپسین هایی ترشح می‌کنند که در pH های اسیدی فعال هستند اما فاقد آنزیم های تریپسین می‌باشند. سرینیواسان و همکاران (۲۰۰۸) به بررسی آنزیم های گوارشی آفات مختلف متعلق به راسته بالپولکداران پرداختند. در راسته بالپولکداران ۹۵ درصد فعالیت لوله‌های گوارشی مربوط به آنزیم های سرین پروتئاز می‌باشد.

۲-۱۰- آنزیم‌های گوارش دهنده لیپیدها

مهم‌ترین چربی‌هایی که به وسیله حشرات استفاده می‌شوند حاوی تری گلیسرید هستند. چربی‌ها به شکل اسیدهای چرب و یا دی‌گلیسرید از قسمت‌های جلویی معده و روده کور جذب می‌شوند. لیپازها مهم‌ترین

آنزیم‌هایی هستند که تری‌گلیسریدها را به اسیدهای چرب و گلیسرول تبدیل می‌کنند. فسفولیپازها با اثر بر روی دیواره سلولی غذاهای هضم شده و شکستن آن‌ها، باعث اثر سایر آنزیم‌ها بر روی غذا می‌شوند. استرازها نیز از جمله آنزیم‌هایی هستند که بر روی مولکول‌های محلول در آب اثر می‌گذارند (چپمن، ۱۹۹۸).

فصل سوم

مواد و روشها

۱-۳-جمع آوری حشرات

به منظور جمع‌آوری لاروهای بید چغندر قند از مزارع آلوده چغندر، در اواسط بهار (اردیبهشت ماه ۱۳۹۷) مصادف با ظهور لاروهای نسل اول، نمونه برداری در مزارع رقم توکان، در شهرستان جوین، استان خراسان رضوی آغاز شد. مختصات جغرافیایی این شهرستان ۳۶ درجه و ۳۷ دقیقه و ۱۲/۰۰۷ ثانیه عرض شمالی از خط استوا و ۵۷ درجه و ۲۸ دقیقه و۵۳/۷۵۳ ثانیه طول شرقی از نصف النهار مبدا، با ارتفاع ۱۱۲۵ متر از سطح دریا، می‌باشد. نمونه برداری تا اواخر مهر ماه ۱۳۹۷ (قبل از برداشت چغندر) ادامه داشت. پس از جمع‌آوری برگ‌ها و جوانه‌های مرکزی آلوده به بید چغندرقند، نمونه‌ها به آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی منتقل شدند و لاروهای سن پنج جدا سازی شدند. طول بدن لاروهای سن پنج حدود ۱۱/۵ میلی‌متر است، و در سطح پشتی بدن لاروهای کامل، پنج نوار وجود داشت و لاروهای سن پنج، کاملا گلی رنگ بودند (رضایی، ۲۰۰۸). لوله گوارش این لاروها در برآوردهای آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند. چنانچه لاروهای جمع آوری شده کوچک بوده و هنوز برای تشریح آماده نبودند، در ظروف پرورش حاوی برگ چغندر قند با ابعاد ۸×۵×۱۰ سانتی‌متر و در اتاقک رشد به دمای ۱±۲۵، رطوبت نسبی ۵۰٪ و نسبت روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت قرار می‌گرفتند. این لاروها روزانه بازبینی می‌شدند. زمانی که لاورها به سن پنج دو روزه می‌رسیدند در آزمایشات، مد نظر قرار می‌گرفتند.

۲-۳- جدا سازی لوله گوارش

برای جدا سازی لوله گوارش از بدن لاروهای آفت بر اساس روش کوهن (۱۹۹۳) عمل شد. به طوری‌که ابتدا لاروها روی قطعات یخ قرار داده شده و بی حس شدند. سپس به کمک اسکالپل سر و انتهای بدن لارو را جدا کرده و به وسیله پنس، لوله گوارش لارو به آرامی خارج می‌شد. پس از حذف بافت‌های چربی، تعداد ۱۵ عدد لوله گوارش در داخل یک میکروتیوب به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر قرار داده شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند.

۳-۳- تهیه عصاره آنزیمی

برای استخراج آنزیم‌ها از لوله گوارش، نیاز به همگن سازی[1] نمونه ها می باشد. به این منظور از یک هموژنایزر دستی استفاده شد. در این مرحله لوله‌های گوارشی معمولا در حجم مساوی با مقدار معینی آب مقطر هموژنایز شدند، میکروتیوب‌ها در این مرحله داخل قطعات کوچک یخ قرار داشتند تا از به هم‌ریختگی ساختار آنزیم‌ها ممانعت شود. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفیوژ (مدل SIGMA, 3-16 KL، ساخت کشور آلمان) شدند. مایع رویی میکروتیوب-ها (رونشین[2]) از بخش ته نشین جدا شد و تا زمان آزمایش به عنوان منبع آنزیمی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۳-۴- تهیه بافر

برای آزمایش‌های آنزیمی و تعیین pH مناسب برای فعالیت‌های آنزیمی، بافر یونیورسال[3] استات- فسفات- بورات سدیم ۴۰ میلی مولار که دامنه وسیعی از pH های اسیدی و قلیایی (pH =۲-۱۲) را شامل می‌شود مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۵- تهیه معرف‌ها

۳-۵-۱- معرف دی نیتروسالسیلیک اسید

برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر از این معرف یک گرم دی نیتروسالسیلیک اسید را با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و به خوبی حل کرده، سپس ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات به آن اضافه شد و بعد ۲۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم دو مولار به آن اضافه کرده و حجم کل با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این معرف متوقف کننده واکنش بین آنزیم آلفا آمیلاز با سوبسترای نشاسته می باشد.

[1] Homogenize
[2] Supernatant
[3] Universal

۳-۵-۲- معرف تری کلرو استیک اسید

این معرف متوقف کننده واکنش‌های پروتئولیتیک می‌باشد و در غلظت ۳۰-۱۰ درصد تهیه شد.

۳-۶- سوبسترا ها

۳-۶-۱- تهیه سوبسترای برای آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

ترکیبات پارا نیتروفنل آلفا دی گلوکوپیرانوزید (pNαG) و پارا نیتروفنل بتا دی گلوکوپیرانوزید (pNβG) به ترتیب سوبستراهای مورد نیاز برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز می‌باشند. هر دو ترکیب دارای وزن مولکولی یکسانی هستند. برای تهیه ۰/۳ میلی‌لیتر از هر یک از آن‌ها با غلظت دو میلی مولار، مقدار ۰/۰۰۰۲ گرم از هر یک از آن‌ها را با ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر به حجم رسانده شد.

۳-۶-۲- تهیه سوبسترای آزوکازئین برای آنزیم پروتئاز عمومی

آزوکازئین سوبسترای مورد نیاز برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز می‌باشد. برای تهیه آزوکازئین ۱ درصد مقدار ۰/۲۵ گرم از آزوکازئین به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به دلیل عدم حل شدن آزوکازئین در آب، ابتدا آن را در ۳۰۰ میکرولیتر NaOH ۰/۱ مولار حل شد، سپس با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

۳-۶-۳- سوبستراهای تریپسین، کیمو تریپسین، الاستاز برای سنجش پروتئازهای اختصاصی

۳-۶-۳-۱- تهیه سوبسترای تریپسین

ترکیب بنزوئیل ال آرژنین پی نیتروآلانید (BApNA or BRpNA) به عنوان سوبسترای ویژه برای سنجش فعالیت تریپسین با غلظت ۲۰ میلی‌مولار، استفاده شد، یعنی مقدار ۰/۰۰۳۴۷ گرم از سوبسترای تریپسین در ۰/۴ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید حل شد.

۳-۶-۳-۲- تهیه سوبسترای کیمو تریپسین

برای تهیه ساکسینیل آلانین آلانین پرولین فنیل آلانین پی نیترو آلانید (SAAPFpNA) در غلظت ۲۰ میلی‌مولار مقدار ۰/۰۰۵ گرم از سوبسترا را در ۰/۴ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید حل شد.

۳-۶-۳-۳- تهیه سوبسترای الاستاز

ترکیب ان ساکسینیل آلانین آلانین آلانین پی نیتروآلانید (SAAApNA) با غلظت ۲۰ میلی‌مولار، برای اندازه‌گیری فعالیت کیموتریپسین مورد استفاده قرار گرفت یعنی، مقدار ۰/۰۰۳۶ گرم از سوبسترای فوق در ۰/۴ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید حل شد.

*کلیه سوبستراها بعد از تهیه، در یخچال نگهداری شد و به هنگام مصرف بیش از ۲۴ ساعت از تهیه آن نگذشته بود.

۳-۷- سنجش فعالیت گلوکوزیدی

۳-۷-۱- اندازه گیری pH بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

روش انجام آزمایش به این صورت است که مقدار ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۸۵ میکرولیتر بافر با pH (۶-۱۱) در حضور ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی به ترتیب pNαGlu، pNβGlu به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید دو مولار، واکنش، متوقف و میزان جذب پارانیتروفنل آزاد شده توسط میکروپلیت ریدر (مدل ۸۰۰- ELX) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد (لو و همکاران، ۱۹۸۶).

۳-۷-۲- اندازه گیری دمای بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

به این منظور ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۸۵ میکرولیتر بافر با pH بهینه در حضور ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی به ترتیب pNαGlu، pNβGlu به مدت ۳۰ دقیقه به ترتیب در دماهای ۲۰،۳۰،۳۵،۴۰،۵۰ قرار گرفتند. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید دو مولار واکنش متوقف

و میزان جذب پارا نیترو فنل آزاد شـده توسـط میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری و ثبت شد (لو و همکاران، ۱۹۸۶).

۳-۷-۳- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز

ترکیبات آهن Fe^{2+}، منیزیم Mg^{2+}، منگنز Mn^{2+}، روی Zn^{2+}، مس Cu^{2+} با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، تهیه و اثر آن‌ها روی فعالیت آنزیم آلفا و بتا- گلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت. مقدار۸۵ میکرولیتر بافر، ۱۰ میکرولیتر از هر یک از یون‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر سـوبسـترای اختصاصی، همراه با ۱۰ میکرولیتر عصـــاره آنزیمی مخلوط، و جذب آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین گردید. تیمار بلانک فاقد آنزیم بوده و تنها بافر و سـوبسـترا استفاده شد. شاهد فاقد یون بود و تنها شامل بافر، سوبسترا و آنزیم بود (لو همکاران، ۱۹۸۶).

۳-۸- سنجش فعالیت پروتئولیتیکی

۳-۸-۱- تعیین pH بهینه آنزیم‌های سرین پروتئازی

بررسـی وجود و میزان فعالیت اندو پروتئازهای تریپسـین، کیموتریپسـین و الاسـتاز در لوله گوارشـی بید چغندر قند با استفاده از سوبستراهای تخصصی هر کدام از آنزیم‌های فوق و بر اساس روش گارسیا- کرنو و هارد[1] (۱۹۹۳) انجام شـد. سـوبسـتراهای BApNA, SAAPFpNA, SAAApNA درغلظت نهایی ۱ میلی‌مولار بـه ترتیـب برای تشـخیص پروتئازهای تریپسـین، کیموتریپسـین، و الاسـتاز به میزان ۵ میکرولیتراستفاده شد. بافر به حجم ۸۵ میکرولیتر با ۵ میکرولیتر سوبسترا و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شـد. با اسـتفاده از میکروپلیت ریدر مقدار فعالیت آنزیمی در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان ۳۰ دقیقه و فواصل زمانی ۵ دقیقه خوانده و ثبت شد.

[1] Garcia-Carreno & Haard

۳-۸-۲- اندازه گیری دمای بهینه آنزیم‌های سرین پروتئاز

در این آزمایش از سوبستراهای ویژه تریپسین (BApNA) ،کیموتریپسین (SAAPFpNA) و الاستاز (SAAApNA) استفاده شد. این سوبستراها به حجم ۵ میکرولیتر به ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۸۵ میکرولیتر بافر با pH بهینه افزوده شد و در دماهای ۴۰،۳۵،۳۰،۲۰ و ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. با خوانش دستگاه میکروپلیت ریدر میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان ۳۰ دقیقه با فاصله ۵ دقیقه ثبت گردید.

۳-۸-۳- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های سرین پروتئازی

در این آزمایش اثر یون‌های آهن Fe^{2+}، منیزیم Mg^{2+}، منگنز Mn^{2+}، روی Zn^{2+}، مس Cu^{2+} با غلظت‌های متفاوت ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، روی فعالیت آنزیم‌های سرین پروتئاز بررسی شدند. پس از تهیه غلظت‌های مشخص از یون‌های نامبرده، مقدار ۸۵ میکرو لیتر بافر، ۱۰ میکرولیتر یون، ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با هم مخلوط و جذب آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین گردید.

۳-۹- اندازه گیری pH بهینه پروتئاز عمومی

برای سنجش میزان فعالیت آنزیم پروتئاز، میکروتیوب‌های حاوی ۱۵ عدد لوله گوارشی لارو سن آخر بید چغندر قند، با مقدار معینی آب مقطر همگن شد. رونشین نمونه‌ها بعد از سانتریوفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه، استفاده شدند. در این آزمایش از ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱٪ به عنوان سوبسترا، و بافر یونیورسال ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. واکنش در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با مقدار ۱۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی، ۹۰ میکرولیتر بافر با pH مورد نظر (۱۱-۶) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. هضم پروتئینی با افزودن ۳۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک (TCA) ۳۰٪ ، متوقف و آزوکازئین هیدرولیز نشده موجود در واکنش، با قرار دادن در

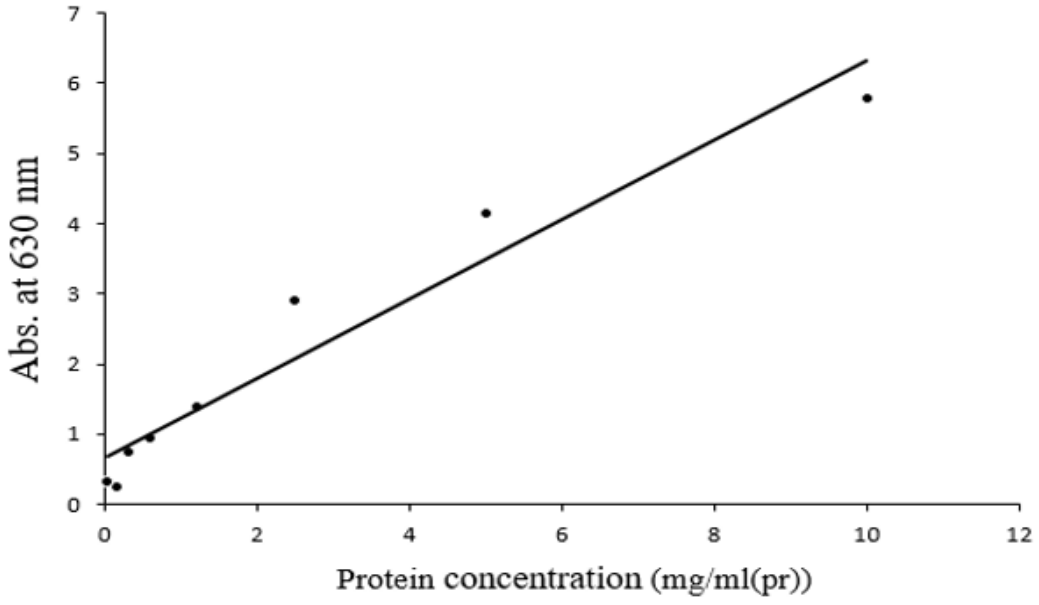
دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ ساعت به طور کامل رسوب داده شد و سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفیوژ شدند. حجم مساوی از سدیم هیدروکسید یک مولار به رونشین افزوده و جذب آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر تعیین گردید.

۳-۱۰- اندازه‌گیری دمای بهینه پروتئاز عمومی

برای تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی از ترکیب، ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱٪ ، ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۹۰ میکرولیتر بافر با pH بهینه استفاده شد که به مدت ۶۰ دقیقه در دماهای مورد آزمایش (۲۰،۳۰،۳۵،۴۰ و ۵۰) قرار داده شدند، ۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۳۰٪ ، به منظور متوقف کردن واکنش به هر میکروتیوب اضافه شد و با قرار دادن در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ ساعت به طور کامل رسوب داده شد. سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. حجمی مساوی از سدیم هیدروکسید یک مولار به رونشین افزوده و جذب آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر تعیین شد.

۳-۱۱-تعیین پروتئین کل

غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش لوری انجام شد (لوری و همکاران، ۱۹۵۱). از غلظت پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یک طیف رقیق شده به صورت (۰/۰۴، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵ و ۱۰) تهیه شد. سپس از هر یک از این غلظت‌ها در سه تکرار، ۲۰ میکرولیتر را در ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف بردفورد وارد کرده تا رنگ مورد نظر ظاهر گردد و پس از آن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد و سپس منحنی استاندارد بر اساس رسم میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر نسبت به غلظت پروتئین تهیه گردید.



شکل-۳-۱- منحنی استاندارد پروتئین

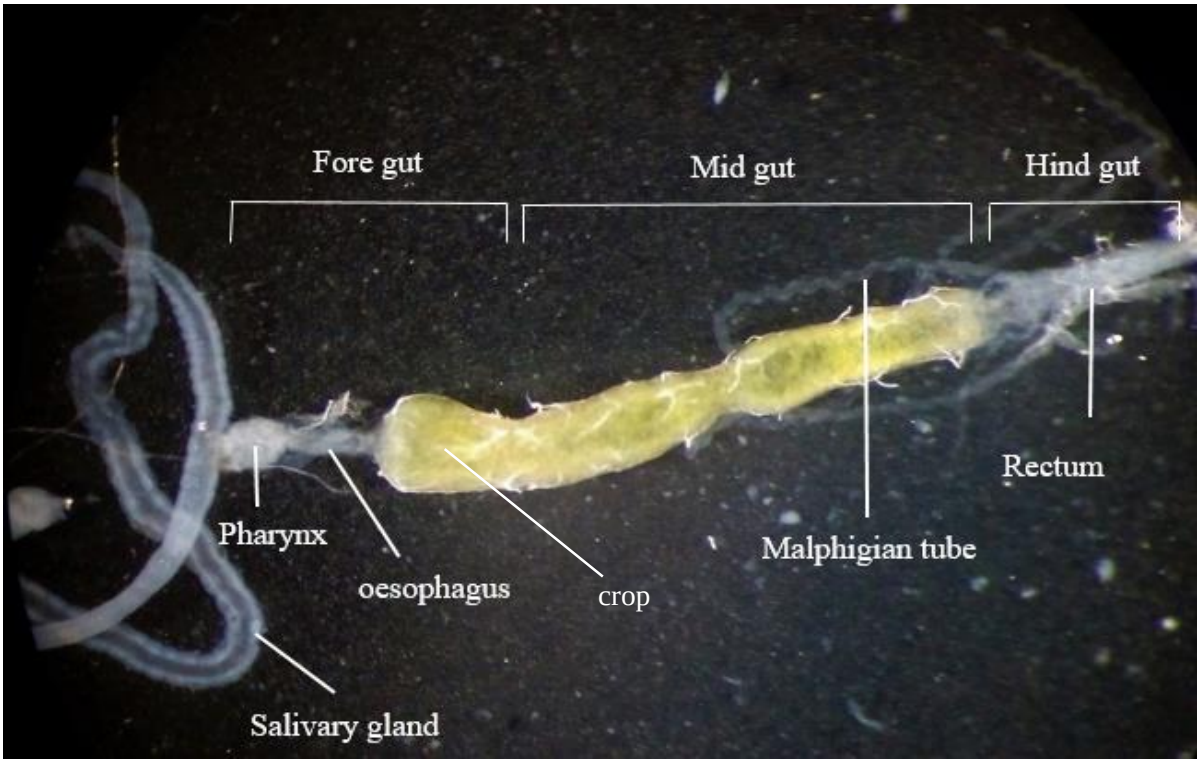
۳-۱۲- تجزیه وتحلیل آماری نتایج

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی و در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد (SAS, 1998)

فصل چهارم

نتایج و بحث

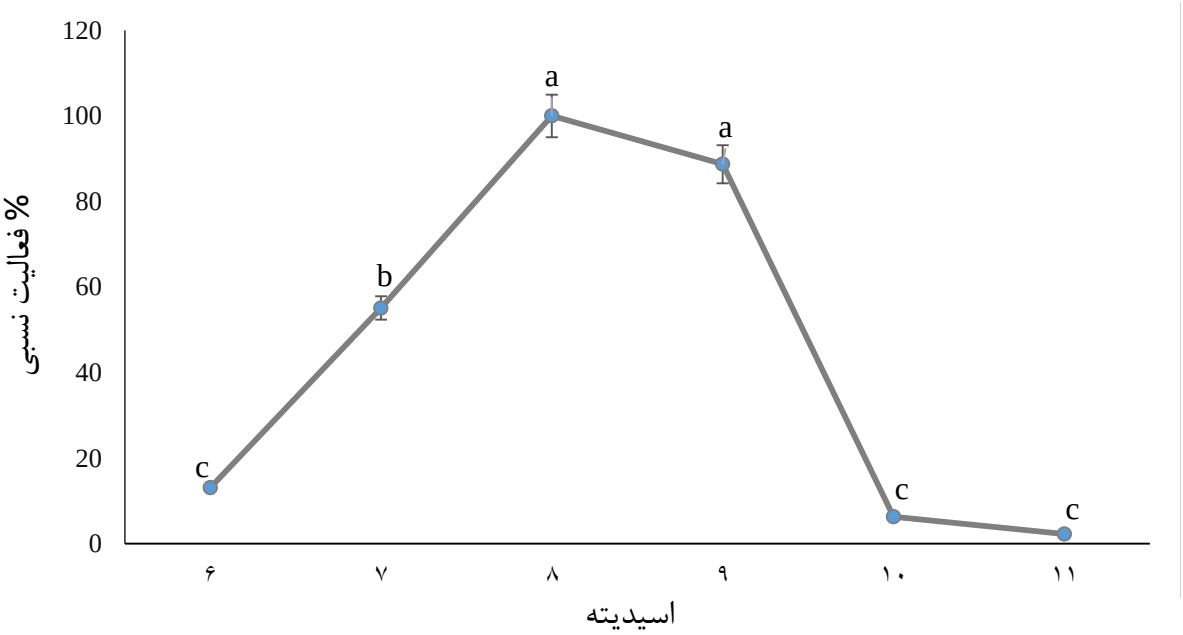
پس از استخراج لوله گوارشی از بدن لارو سن پنج بید چغندرقند، بخش‌های روده جلویی، روده میانی و روده عقبی مشخص شد. لوله‌های مالپیگی در انتهای روده میانی و ابتدای روده‌ی عقبی مشاهده گردید (شکل۴-۱). معده لارو بید چغندر قند مستقیم و کشیده است. بر اساس مشاهدات، قسمت میانی لوله گوارش نسبت به روده جلویی و روده عقبی توسعه یافته‌تر است و انواع سلول‌های ستونی معده، آنزیم‌های گوارشی را جهت هضم و جذب مواد غذایی ترشح می‌کنند. در بخش جلویی روده میانی چینه دان قرار دارد که محل اصلی خرد کردن قطعات غذایی و ذخیره‌ی آن‌ها محسوب می‌شود به علاوه در ناحیه حلق، یک جفت غدد بزاقی لوله‌ای مشاهده شد (شکل ۴-۱). لوله‌های مالپیگی در لوله‌ی گوارش لارو بید چغندر کشیده و بیش از یک جفت مشاهده شد. این لوله‌ها گاه در تمام طول لوله گوارش گسترده شده‌اند. راست روده کیسه‌ای شکل و در انتهای روده‌ی عقبی مشاهده شد.



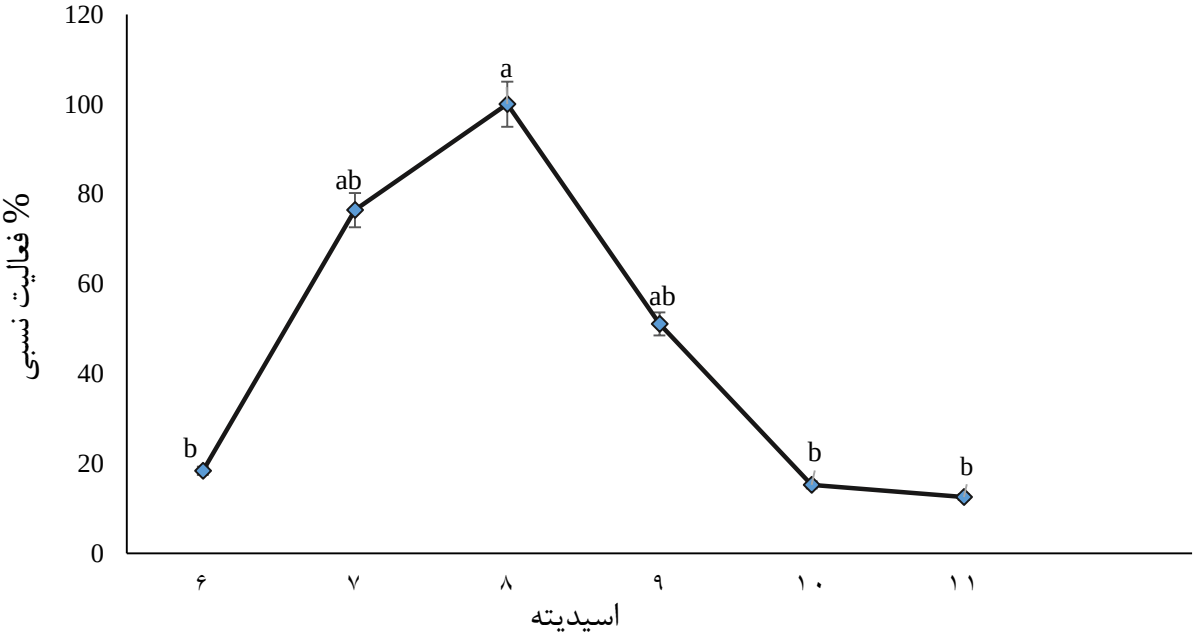
شکل ۴-۱- لوله گوارشی لارو سن پنج بید چغندرقند

۴-۱-اثر pH بر فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز

آزمایشات نشان داد که تاثیر اسیدیته بر فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی معنی‌دار بود. pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز در لوله گوارش برابر با ۰/۰۷۶ ± ۸ بدست آمد. آلفا گلوکوزیداز درpHهای ۹ -۷ بیشترین فعالیت را داشت و در pHهای اسیدی و قلیایی فعالیت این آنزیم به شدت کاهش یافت ($P \leq ۰/۰۰۰۱$، $df_{t,e} = ۵،۱۲$، $F=۱۶۰$). نتایج مربوط به اثر pH روی فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز (شکل ۴-۲)، نشان می‌دهد که میزان فعالیت این آنزیم در۶ =pH در حدود ۱۵٪ بود. این مقدار به تدریج با بالا رفتن pH افزایش یافته و در اسیدیته ۸ به حداکثر مقدار خود رسید. پس از آن با افزایش pH، میزان فعالیت آنزیم کاهش یافت، به طوری که در pHهای ۱۰ تا ۱۱به حداقل فعالیت خود رسید. در شکل (۴-۳) مشاهده می‌شود که فعالیت بتا-گلوکوزیداز در لوله گوارش از ۶ =pH روند رو به افزایش داشته تا این‌که به مقدار بیشینه خود (۱۰۰±۰/۰۱۷) در ۸±۰/۰۱۷ =pH می‌رسد ($P \leq ۰/۰۰۰۷$ ،۱۲ ،۵= $df_{t,e}$، $F=۹/۵$)، سپس با افزایش میزان pH، از فعالیت آن کاسته شد. روند کاهشی فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز از pH ۸ تا ۱۰ با سرعت بیشتری نسبت به pH ۱۰ تا ۱۱ افزایش می‌یابد.



شکل ۴-۲- اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندر قند



شکل ۴-۳- اثر pH بر فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندر قند

مقدار pH محتویات لوله گوارش، فاکتور اصلی تأثیرگذار بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌باشد. اغلب آلفا-گلوکوزیدازهای حشرات از راسته‌های مختلف غیر از بال‌پولکداران، دارای فعالیت بهینه در pH بین ۵ تا ۶/۵ می‌باشند (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). مطالعات زیادی در مورد آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز حشرات راسته‌ی بال-پولکداران انجام گرفته است که مشابه با نتایج به دست آمده در این تحقیق است چنانکه:

سانتوس[1] و همکاران (۱۹۸۳) pH بهینه برای پروانه *Erinnys ello* (L.) را ۵/۸ گزارش کرد. پراتویل سوسا[2] و همکاران (۱۹۸۶) فعالیت بهینه آنزیم آلفا و بتاگلوکوزیداز روده میانی در پروانه‌ی تارتن کاج *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermuller) را ۶ بیان کرد. قدمیاری و همکاران (۲۰۱۰) pH بهینه برای آلفاگلوکوزیداز پروانه برگخوار توت، *Glyphodes pyloalis* (Walke) را ۷/۵ و برای بتا-گلوکوزیداز در لوله گوارش همان آفت را، ۵/۵ اعلان کرد. طباطبائی و همکاران (۱۳۸۹) pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) را در محدوده ۶ تا ۸ و برای بتا گلوکوزیداز ۶ الی ۷، ترا[3] و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت بهینه آلفاگلوکوزیداز در سوسک *Tenebrio molitor* (L.) را ۳/۷ و اسدی و همکاران (۱۳۸۹)، pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا و بتا-گلوکوزیداز در سوسک برگخوار توسکا *Galerucella lineola* (Fabricius) را ۵ گزارش کردند. pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا و بتاگلوکوزیداز در روده سن قرمز پسته *Lygaeus pandurus* (S.) توسط حسنی و همکاران (۱۳۹۳) بررسی شد و برابر با ۵ گزارش شد. همچنین پونتو[4] و لو (۲۰۰۲) فعالیت بتا گلوکوزیداز در روده میانی زنبور عسل *Apis melifera* (L.) را بررسی و pH بهینه آن را ۶ گزارش کردند. غلامزاده و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گوارشی کفشدوزک خربزه *Epilachna chrysomelina* (Fabricius) pH بهینه فعالیت آنزیمی را ۵ اعلام کردند. بررسی‌های انجام شده توسط

[1] Santos
[2] Pratviel-Sosa
[3] Terra
[4] Pontoh

جهانجو و همکاران (۲۰۱۸) روی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز زنبور برگ‌خوار ثانوی رز *Allantus viennensis* (Schrank)، pH بهینه را برابر با ۶ خواند که با بررسی‌های انجام شده برای فعالیت بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز بال‌پولکداران هم‌خوانی نداشت، چنان‌که در سال ۲۰۱۸ در تحقیقاتی که غلام‌زاده چیتگر و همکاران روی پروانه ابریشم باف‌پاییزی *Hyphantria cunea* (Drury) انجام دادند، pH بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز را برابر با ۸ گزارش کردند و نیز امیری جامی در سال ۲۰۱۹ با بررسی‌هایی که روی کرم سیب انجام داد pH بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز را برابر با ۸ گزارش کرد. مطالعات بیشتر در مورد میزان فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز حشرات راسته‌های مختلف از جمله بال‌پولکداران، ناجوربالان و سخت‌بال‌پوشان توسط مارانا[1] و همکاران (۲۰۰۰)، آزودو[2] و همکاران (۲۰۰۳)، ناکوئیزی[3] و همکاران (۲۰۰۶)، یاپی و همکاران (۲۰۰۹) و رمزی[4] و همکاران (۲۰۱۰) انجام شده است.

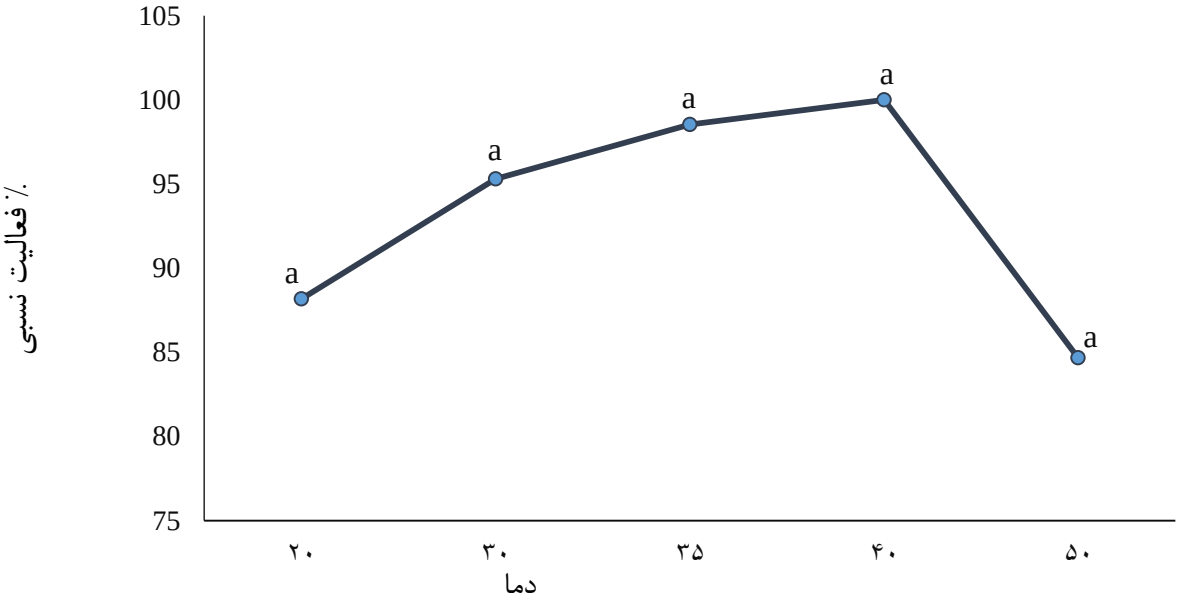
۴-۲-اثر دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز

دمای بهینه‌ی فعالیت آلفا-گلوکوزیداز (شکل۴-۴)، برابر با ۰/۰۳۲±۴۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد که این آنزیم، فعالیت ۱۰۰ درصدی (۰/۰۳۲±۱۰۰) را از خود نشان داد، ($df_{t,e=}$ ۴، ۱۰، $P \leq$ ۰/۰۰۰۱، F=۲۰/۳۳) و پس از آن با افزایش دما، فعالیت آنزیم روند کاهشی به خود گرفت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت به شدت کاهش یافت. دمای بهینه فعالیت بتا-گلوکوزیداز (شکل ۴-۵)، برابر با ۰/۰۵۷±۴۰ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد ($df_{t,e=}$ ۴، ۱۰،$P \leq$ ۰/۰۰۰۱، F=۹/۴۹). اما با افزایش دما، میزان فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز رو به کاهش رفت و به ۸۳ درصد رسید. آنزیم آلفاگلوکوزیداز فعالیت نسبی بالاتری در دمای یکسان نسبت به بتاگلوکوزیداز داشت به طوری‌که در حداقل دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت نسبی در آلفا گلوکوزیداز حدود ۸۷ درصد بود (شکل۴-۴)، ولی این فعالیت در دمای یکسان (۲۰ درجه سانتی گراد) در آنزیم گوارشی

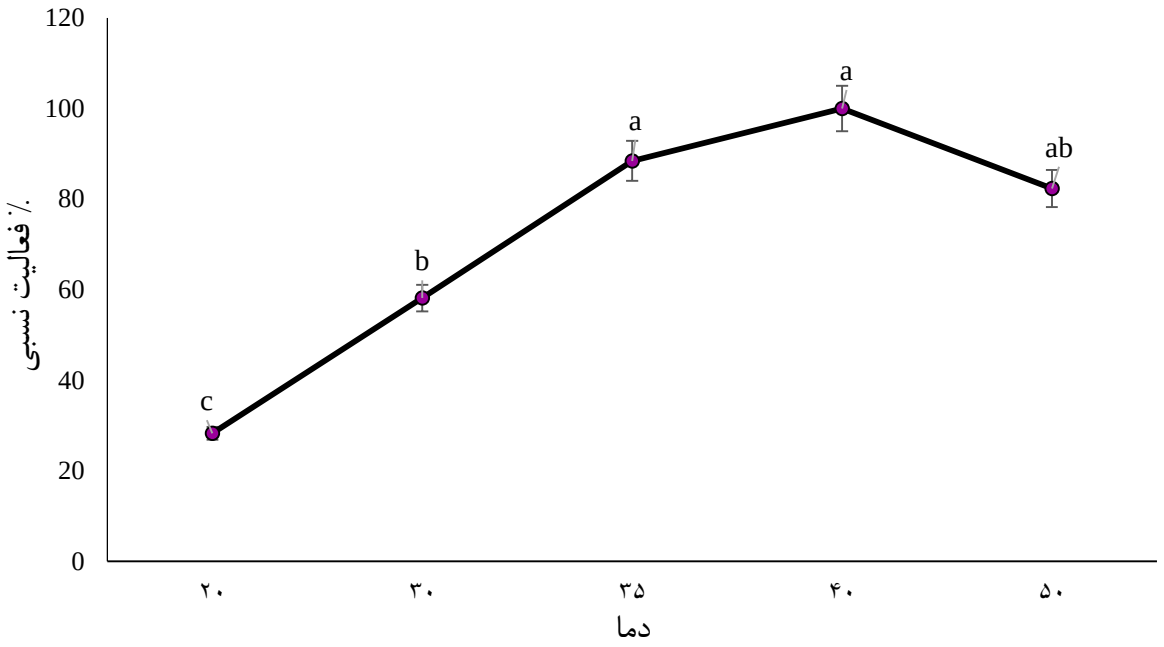
[1] Marana
[2] Azevedo
[3] Nakonieczny
[4] Ramzi

بتا گلوکوزیداز، از ۲۳ شروع شد (شکل ۴-۵). هر آنزیم برای فعالیت بهتر، نیاز به طیف دمایی خاصی دارد و دماهای بالاتر و یا پایین‌تر ممکن است عملکرد آنزیم را تحت تأثیر قرار دهد و ساختار آنزیم را تغییر دهد (رحیمی و همکاران، ۲۰۱۱). طبق مطالعات بوید و همکاران (۲۰۰۲)، افزایش دما در محیط واکنش آنزیمی، باعث افزایش انرژی سنتیکی واکنش‌دهنده‌ها (سوبسترا و آنزیم) می‌گردد. در نتیجه باعث جذب انرژی زیاد توسط آنزیم، از هم گسیخته شدن ساختمان سه بعدی و کاهش فعالیت آنزیم می‌شود.

تحقیقات انجام شده در حشرات راسته بالپولکداران حاکی از آن است که، آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را دارند.



شکل۴-۴- اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز لارو سن آخر بید چغندر قند



شکل۴-۵- اثر دما بر فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز لارو سن آخر بید چغندر قند

آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در اکثر حشرات در محدوده دمایی ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت دارند (هوبر و میشن، ۱۹۷۶). تحقیقات زیادی در مورد دمای بهینه‌ی آنزیم‌های گلوکوزیدازی وجود دارد که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی کرم ساقه‌خوار برنج *Chilo suppressalis* (Walker) ۴۵ درجه سانتی‌گراد (زیبایی و همکاران، ۲۰۰۸)، پروانه برگ‌خوار توت ۴۵ درجه سانتی‌گراد (قدمیاری و همکاران، ۲۰۱۰). سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* (Muller) ۴۰ درجه سانتی‌گراد (شریفی و همکاران، ۲۰۱۱)، کرم خراط *Z.pyrina* (L.) ۳۵ درجه سانتی‌گراد (وطن پرست و همکاران، ۲۰۱۲)، دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز در کرم سبز برگخوار برنج *N.aenescens* (Moore) به ترتیب برابر با ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد (اسدی و همکاران، ۲۰۱۲)، بیشینه دمای فعالیت

برای آنزیم آلفا و بتاگلوکوزیداز در زنبور برگ‌خوار ثانوی رز *A. viennensis* به ترتیب برابر ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد (جهانجو و همکاران، ۲۰۱۸)، برگ‌خوار انجیر *Ocnerogvia amanda* (L.) ۴۵ درجه سانتی‌گراد (غلام‌زاده و همکاران، ۲۰۱۴)، سن قرمزپسته *L. pandurus* برابر با ۴۵ درجه سانتی‌گراد (حسنی و همکاران، ۲۰۱۳) ، غلام‌زاده چیتگر و همکاران (۲۰۱۸) دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز در پروانه ابریشم‌باف پاییزی را ۳۵ درجه سانتی‌گراد و امیری جامی دمای بهینه برای آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز کرم سیب را برابر با ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند، که با نتایج بدست آمده از دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز در لارو بید چغندر قند با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد مطابقت دارد.

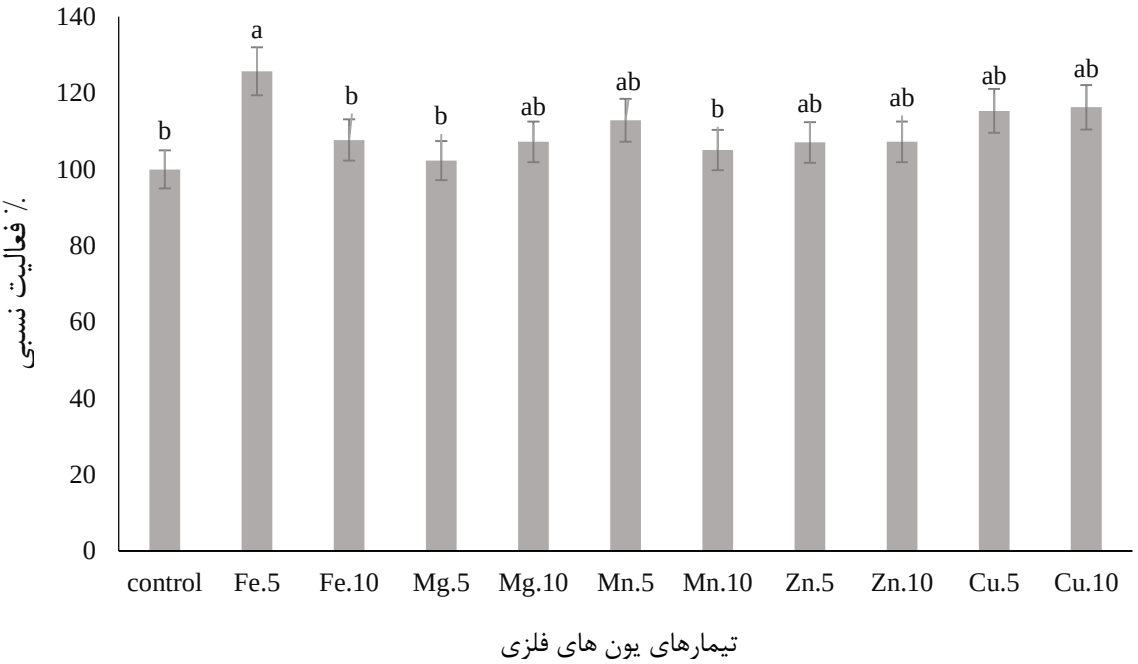
۴-۳-اثر یون‌های فلزی بر فعالیت گلیکوزیدازی

همانطور که در شکل ۴-۶ مشاهده می‌شود، غلظت‌های ترکیبات آهن، منیزیم، منگنز، روی، مس بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز معنی دار بود ($P \leq$ ۰/۰۲۷۱، $df_{t,e=}$ ۱۰، ۲۲، F=۲/۶۴).

یون منیزیم با غلظت ۵ میلی مولار (۰/۰۳۶ ±۱۰۲٪) باعث افزایش فعالیت آنزیم، و یون‌های منگنز با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (۰/۰۲۱ ± ۹۲٪) و مس با غلظت ۵ میلی‌مولار(۰/۰۷۳ ± ۹۲/۸٪) سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز شدند (شکل۴-۶).

شکل ۴-۶- اثر غلظت یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیمی آلفا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندر قند

یون آهن در غلظت ۵ میلی‌مولار (۰/۰۲۳±۱۲۵)، فعالیت آنزیمی بتاگلوکوزیداز را حدود ۲۰٪ افزایش می‌دهد ($F=۳$ ،$df_{t,e=}$ ۱۰، ۲۲،$P \leq ۰/۰۱۴۹$) و بیشتر یون‌های مورد آزمایش مانند؛ منیزیم ۱۰ میلی-مولار، منگنز ۵ میلی‌مولار، روی ۵ و ۱۰ میلی‌مولار و یون مس ۵ و ۱۰ میلی مولار به طور کلی سبب افزایش ۱۰ تا ۱۵ درصدی فعالیت بتا گلوکوزیداز نسبت به شاهد شده است (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷- اثر غلظت یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیمی بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم بید چغندر قند

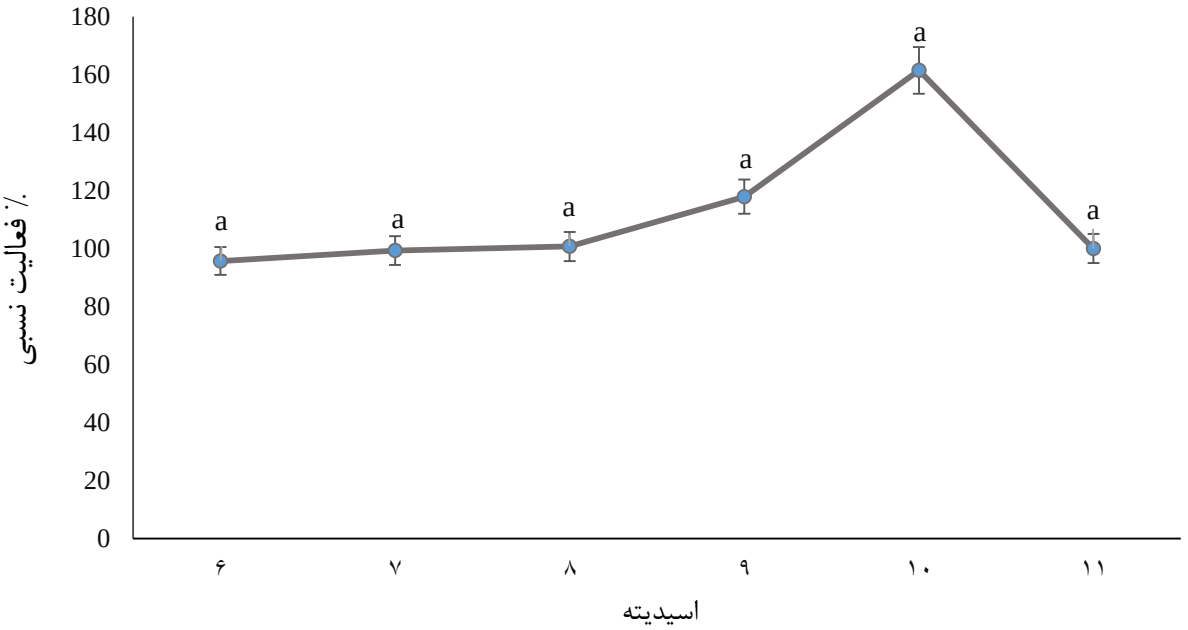
در بررسی‌های صورت گرفته روی پروانه برگ‌خوار توت، یون Ca^{2+}، فعالیت آلفا گلوکوزیداز را افزایش داده است (قدمیاری و همکاران، ۲۰۱۰). یون‌های Ba^{2+} در غلظت ۲۰ میلی‌مولار و Mg^{2+} در غلظت ۱۰ میلی‌مولار بیشترین افزایش معنی‌دار را روی فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز پروانه ابریشم باف پاییزی داشتند در حالی‌که یون‌های جیوه Hg^{2+}، آهن Fe^{2+} ، منگنز Mn^{2+} در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار فعالیت این آنزیم‌ها را کاهش دادند (غلام زاده، ۱۳۹۷).

۴-۴-تعیین فعالیت پروتئولیتیکی

۴-۴-۱-تعیین pH بهینه پروتئاز عمومی

در این آزمایش با توجه به آنچه در شکل ۴-۸ دیده می‌شود pH بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز در لوله گوارش لارو سن آخر بید چغندر قند برابر با ۰/۰۰۸± ۱۰ بدست آمد. با افزایش pH، فعالیت پروتئازی

افزایش یافته تا در pH=۱۰ به حداکثر فعالیت خود (یعنی ۱۰۰ درصد) رسید (۰/۰۰۵۲±۱۰۰) و پس از آن روند کاهشی داشت ($F=۳/۳۶، df_{t,e=}$ ۵، ۱۲، $P\leq ۰/۰۳$) (شکل۴-۸).



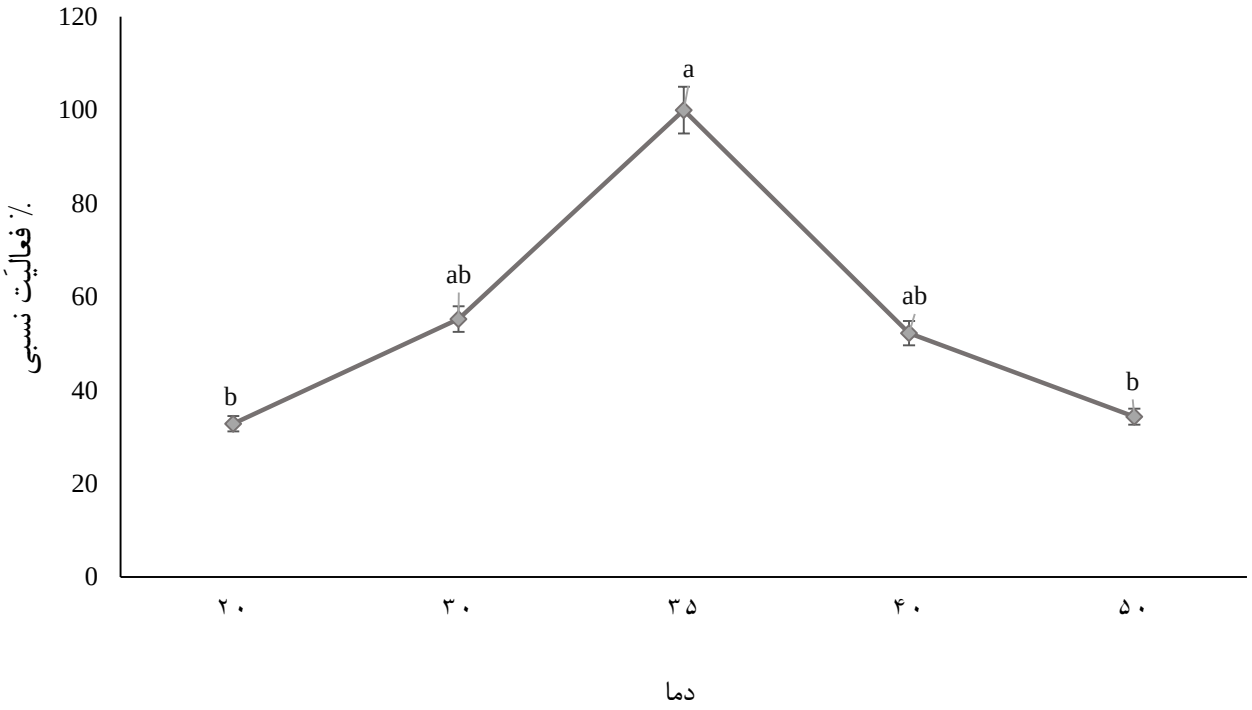
شکل-۴-۸-اثر pH بر فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی لارو سن پنج بید چغندر قند

آزوکازئین سوبسترای پروتئینی است که برای سنجش فعالیت پروتئولیتیکی عمومی نمونه آنزیمی، مورد استفاده قرار می‌گیرد، گزارش‌های زیادی در این زمینه ثبت شده است (کوهن، ۱۹۹۳; الپیدینا و همکاران، ۲۰۰۱). با توجه به نتایج به‌دست آمده از فعالیت پروتئازها در لوله گوارشی لارو بید چغندر قند، درمی‌یابیم که pH بهینه فعالیت پروتئاز عمومی در محدوده ۱۱-۹، می‌باشد که با گزارش ترا و همکاران (۱۹۹۴) که pH بهینه برای بالپولکداران را در محدوده قلیایی گزارش کرد هم‌خوانی دارد. پریرا و همکاران (۲۰۰۵)، pH بهینه فعالیت پروتئاز عمومی کرم ساقه خوار نواری برنج *Anticarsia. gemmatalis* (Hubner) را در محدوده قلیایی و برابر با ۱۰ گزارش کردند. جورج و همکاران (۲۰۰۸)، pH بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز در لوله گوارش لاروهای کرم ساقه‌خوار ذرت *Busseo lafusca* (Fuller) را ۹/۵ گزارش کردند. با مطالعات عجم

حسنی و همکاران (۲۰۱۲)، pH بهینه‌ی فعالیت پروتئازی در پروانه برگ‌خوار شبدر علوفه‌ای، (L) *Utetheisa pulchella* را برابر با ۸ اعلام کردند. کریستر و همکاران (۲۰۱۱)، با بررسی فعالیت‌های پروتئازی شب‌پره‌ی، *Chrysodeixis erosoma* (Doubleday) دریافتند pH بهینه فعالیت پروتئولیتیکی در بازه‌ی قلیایی و برابر با ۹ می‌باشد. استیگر و همکاران (۲۰۱۰) برای فعالیت پروتئازی در لوله گوارش پروانه‌ی *Cameraria ohridella* (Deschka & Dimic, 1986)، pH بهینه را بین ۸ تا ۹/۵ بدست آوردند. در آزمایشات انجام شده روی لارو بید چغندر قند، pH بهینه پروتئاز عمومی برابر با ۹ بدست آمد که که با نتایج ذکر شده در تحقیقات بالا مطابقت می‌کند، همچنین بررسی‌هایی که غلام‌زاده و همکاران (۱۳۹۶) بر روی فعالیت پروتئازهای گوارشی کفشدوزک خربزه انجام دادند، pH بهینه پروتئاز عمومی لوله گوارش این آفت را برابر با ۵ گزارش کردند که با نتایج آزمایش انجام شده هم خوانی نداشت.

۴-۴-۲-تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی

دما یکی از مؤثرترین عوامل در بالا بردن سرعت واکنش‌های آنزیمی است. سرعت واکنش‌ها تا مقدار بهینه افزایش یافته و سپس در دمای بعد از ۳۵ درجه سانتی‌گراد به علت از بین رفتن ساختار سه بعدی آنزیم به شدت کاهش می‌یابد. در این آزمایش چنان‌چه در شکل ۴-۹ دیده می‌شود، دمای بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم پروتئاز عمومی در لارو سن آخر بید چغندر برابر با ۰/۰۰۶±۳۵ ٪ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. فعالیت آنزیم پروتئاز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در حدود ۰/۰۰۵ ± ۳۰ ٪ است، پس از آن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، به ۰/۰۰۴ ±۵۵/۲۲ ٪ درصد رسیده و نهایتا در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به بالاترین فعالیت خود یعنی، ۱۰۰ درصد رسید. بعد از دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مرور با افزایش دما، فعالیت این آنزیم کاهش یافت (۰/۰۰۶۴±۱۰۰، $P\leq$۰/۰۱۶، ۱۰، ۴، $df_{t,e=}$ ،۵/۱۷=F).



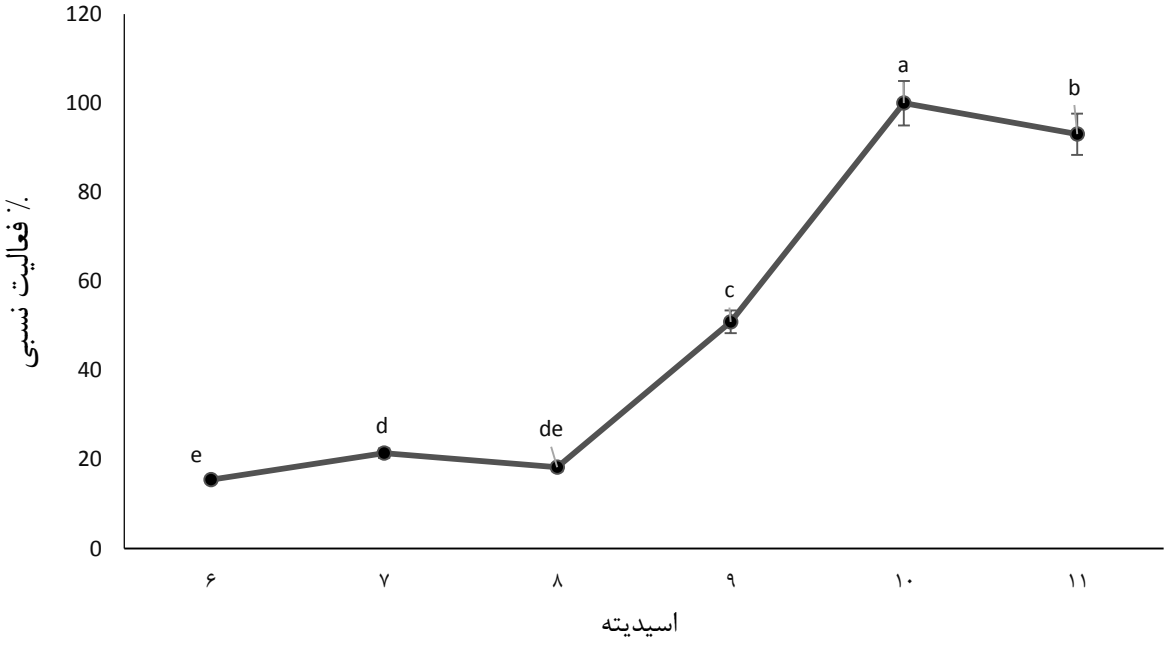
شکل ۴-۹- اثر دما بر فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی لارو سن پنج بید چغندر قند

طی تحقیقات بوداتا و همکاران (۲۰۰۸)، دمای بهینه برای بیشینه فعالیت آنزیم پروتئاز در معده میانی لارو سن پنجم شب پره (L) *Achaea janata*، ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است. پریرا و همکاران (۲۰۰۵) خصوصیات پروتئازهای معده میانی لارو سن آخر پروانه *A. gemmatalis* را بررسی کردند و دمای مناسب برای فعالیت پروتئازها را ۳۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند. دمای بهینه‌ی فعالیت پروتئاز عمومی، در *U.* (L) *pulchella* توسط عجم حسنی و همکاران (۲۰۱۲)، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد گزارش شد. بیشینه فعالیت آنزیم‌های پروتئاز عمومی گزارش لارو بید چغندر قند در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود که با نتیجه بررسی‌های فوق مطابقت می‌کند.

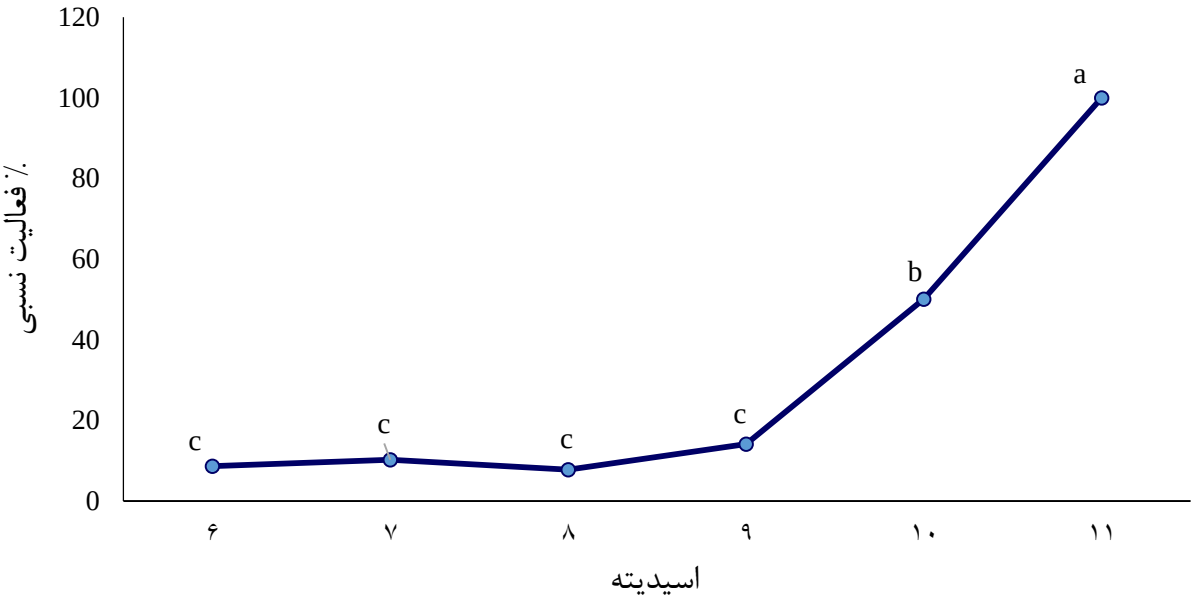
۴-۴-۳-تعیین pH بهینه پروتئازهای اختصاصی (تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز)

در شکل‌های ۴-۱۰تا ۴-۱۱ ، فعالیت سرین پروتئازها در pHهای متفاوت با استفاده از سوبستراهای تخصصی نشان داده شده است. در شکل (۴-۱۰) فعالیت آنزیم پروتئازی تریپسین از pH (۱۱-۶) نمایش داده شده

است. چنان که مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم تریپسین از pH =۶، که حدود ۲۰ درصد است آغاز می‌شود و در pH =۱۰ به اوج خود (۰/۰۰۵۳ ±۱۰۰٪) می‌رسد (۱۰۰±۰/۰۰۰۹، P≤۰/۰۰۰۱، ۱۰۰، $df_{t,e=}$ ۴، F=۱۶۹/۲۳). این نمودار نشان می‌دهد بیشینه فعالیت آنزیم تریپسین در محدوده قلیایی است، زیرا در pHهای اسیدی، آنزیم فعالیت چشمگیری نداشت و افزایش سرعت فعالیت آنزیم، از pH ۸ تا ۱۰ قابل مشاهده است شکل (۴-۱۰).

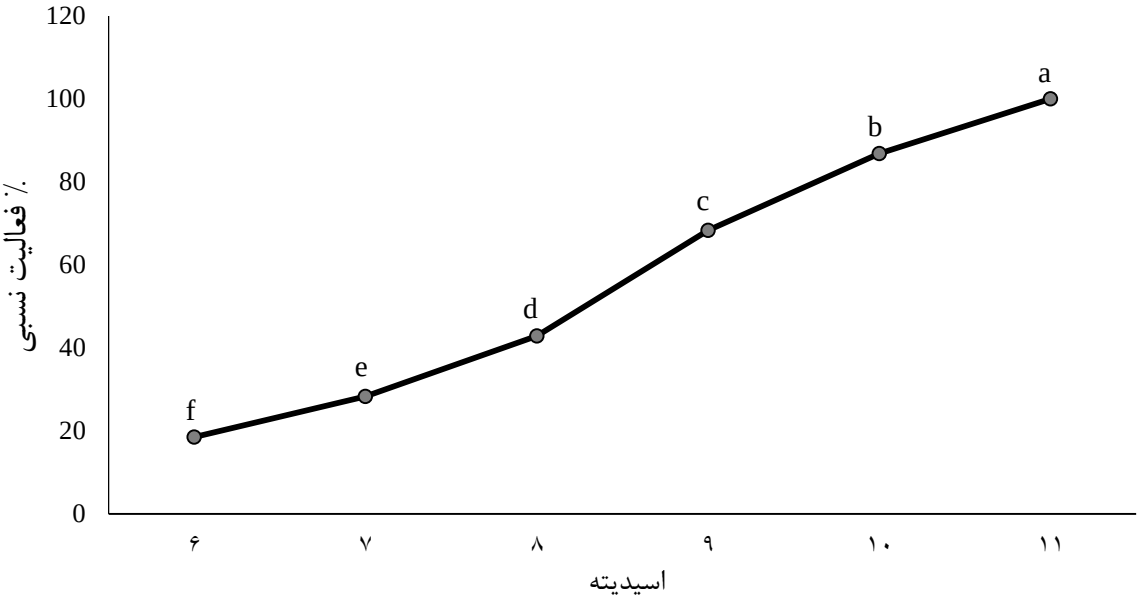


شکل ۴-۱۰- اثر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی تریپسین لارو سن آخر بید چغندر قند



شکل ۴-۱۱- اثر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی کیموتریپسین لارو سن آخر بید چغندر قند

در شکل ۴-۱۱ فعالیت آنزیم کیموتریپسین مشاهده می‌شود که، در pH =۶، فعالیت این آنزیم در کمترین حد خود (کمتر از ۲۰ درصد) بود. با افزایش اسیدیته محیط، درصد فعالیت نسبی نیز افزایش یافت ($P \leq ۰/۰۰۰۱$، $df_{t,e=}$ ۴، ۱۰۰، $F=۵۵۶/۱۵$). افزایش چشمگیر فعالیت نسبی آنزیم کیموتریپسین از pH ۹ آغاز و به بیشینه فعالیت خود در pH=۱۱، به مقدار ۰/۰۲۴±۱۰۰٪ رسید که گویای فعالیت بیشتر در pHهای قلیایی است (شکل۴-۱۱).



شکل ۴-۱۲- اثر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی الاستاز لارو سن پنجم بید چغندر قند

شکل ۴-۱۲ فعالیت نسبی دیگر آنزیم گوارشی سرین پروتئاز، به نام الاستاز را نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، افزایش فعالیت آنزیم الاستاز تدریجی است و با شیب تقریبا یکنواخت فعالیت نسبی آن افزایش پیدا کرده است، طوری‌که بیشینه فعالیت آن در pH =۱۱، ۰/۰۰۰۶±۱۰۰ درصد بوده است ($P\leq$۰/۰۰۰۱، ۱۰۰ ،۴ =$df_{t,e}$، F=۱۴۶/۰۸) (شکل ۴-۱۲).

تحقیقات زیادی مبنی بر بررسی pH بهینه فعالیت آنزیم گوارشی تریپسین در بالپولکداران وجود دارد، که در ذیل به آن اشاره می‌شود:

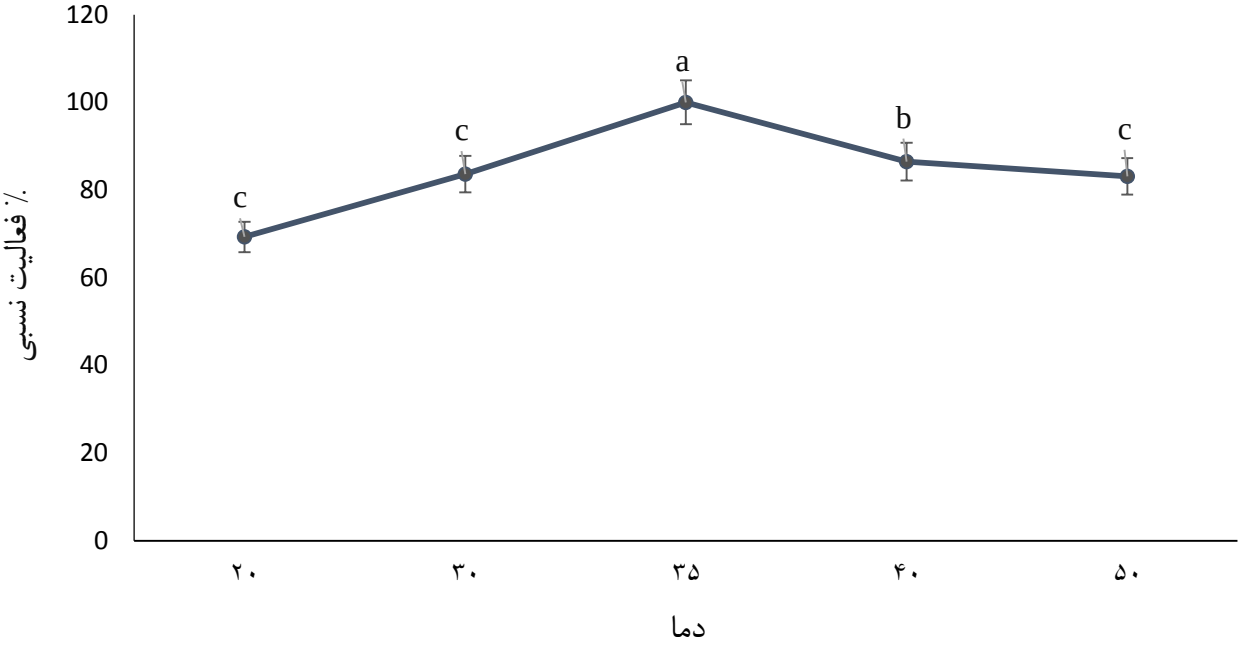
بیش‌ترین فعالیت تریپسین در کرم برگ‌خوار پنبه *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (لی و آنستی، ۱۹۹۵)،کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilialis* (Hunber) (هاوسمن و همکاران، ۱۹۹۰)، پروانه کرم ابریشم *Bombix mori* (L.) (ساساکی و سوزوک، ۱۹۸۲)، کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Hunber) (همتی و همکاران، ۲۰۱۷)،کرم برگخوار توتون *Heliothis virescens* (Fabricius) (جانستون و همکاران، ۱۹۹۱)، با اسیدیته‌ی بهینه برابر با ۱۰ گزارش شده است. pH بهینه سرین پروتئازهای تریپسین

و کیموتریپسین در پروانه کلم *Mamestra brassicae (L.)*، توسط کوو و همکاران (۲۰۰۸) مورد بررسی قرار گرفت و برابر با ۱۱/۵ گزارش شد. جورج و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیقات خود بر روی سرین پروتئازها در پروانه برگخوار ذرت *Busseo fusca* (Fuller) pH ، بهینه آنزیم‌های تریپسین، کیمو تریپسین و الاستاز را به ترتیب ۱۱/۵-۱۱، ۱۰/۵-۱۰، ۱۰/۵-۹ را گزارش کردند. طبق تحقیقات شریفلو و همکاران (۲۰۱۶)، pH بهینه فعالیت آنزیم گوارشی تریپسین در *P.brassicae* برابر ۸ گزارش شد. با توجه به نتایج فعالیت نسبی بیشتر درpH های بالا برای آنزیم‌های مورد تحقیق، در مطالعه‌ی حاضر آشکار می‌شود که محیط درونی معده لارو بید چغندر قند برای گوارش و هضم و جذب بهتر مواد غذایی باید حالت قلیایی داشته باشد احتمال می‌رود که pH بالا در حشرات جهت سازگاری آن‌ها برای تغذیه از گیاهان دارای تانن باشد (چپمن، ۱۹۹۸). زیرا تانن در pHهای پایین در معده حشرات به پروتئین‌ها باند شده و میزان تجزیه و هضم غذا را کاهش می‌دهند (داو، ۱۹۸۴).

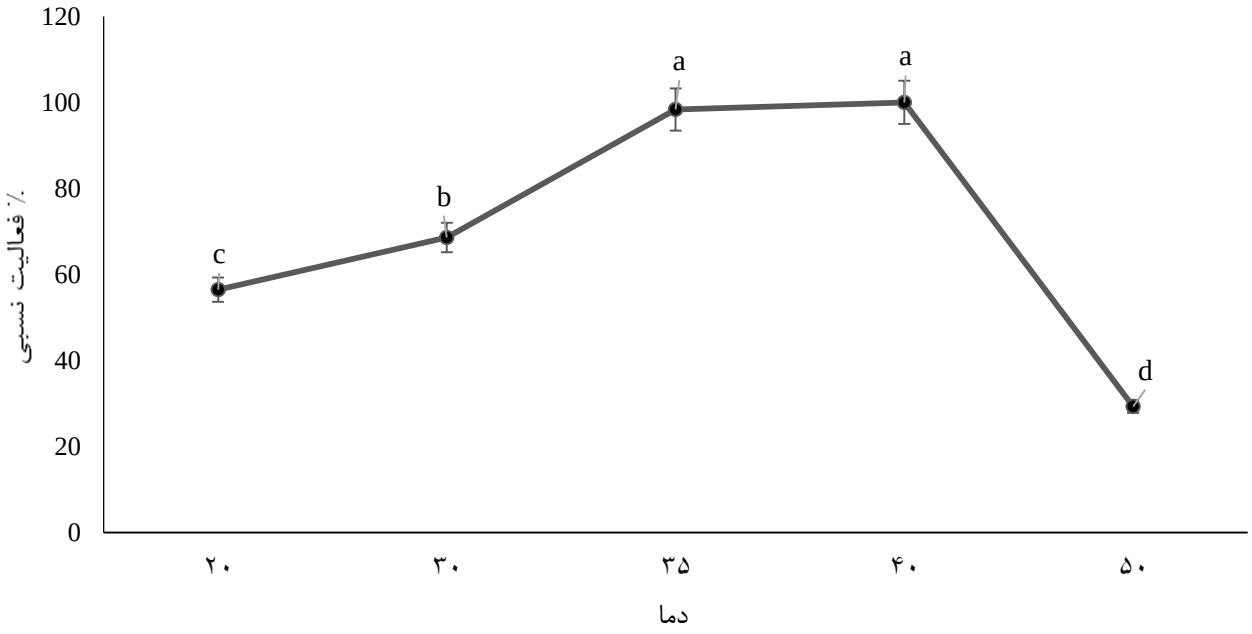
۴-۴-۴-تعیین دمای بهینه پروتئازهای اختصاصی (تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز)

با توجه به شکل ۴-۱۳ دمای بهینه فعالیت پروتئازی تریپسین ۰/۰۰۰۹ ±۱۰۰٪ ، در لوله گوارش لارو بید چغندر قند، ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود ($P\leq$۰/۰۰۰۱، $df_{t,e=}$ ۴، ۱۰۰، F=۱۷۰). همان‌طور که در شکل ۴- ۱۳ مشهود است، فعالیت آنزیم تریپسین در حداقل دما یعنی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نزدیک به ۰/۰۰۳ ±۷۰٪ است و با افزایش دما در نقطه ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ۱۰۰٪ فعالیت می‌رسد. پس از آن با افزایش دما، کاهش فعالیت آنزیم را شاهد بودیم، که با دمای بهینه، برای فعالیت آنزیم گوارشی لارو سن آخر بید چغندر قند اختلاف معنا داری داشت (شکل۴-۱۳). همانطور که در شکل ۴-۱۲ دیده می‌شود، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم گوارشی کیموتریپسین از ۶۰٪ شروع شد با افزایش دما، در نقاط ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد پیشرفت چشمگیری داشت و به حدود ۰/۰۱ ±۱۰۰ ٪ رسید (۰/۰۱±۱۰۰،

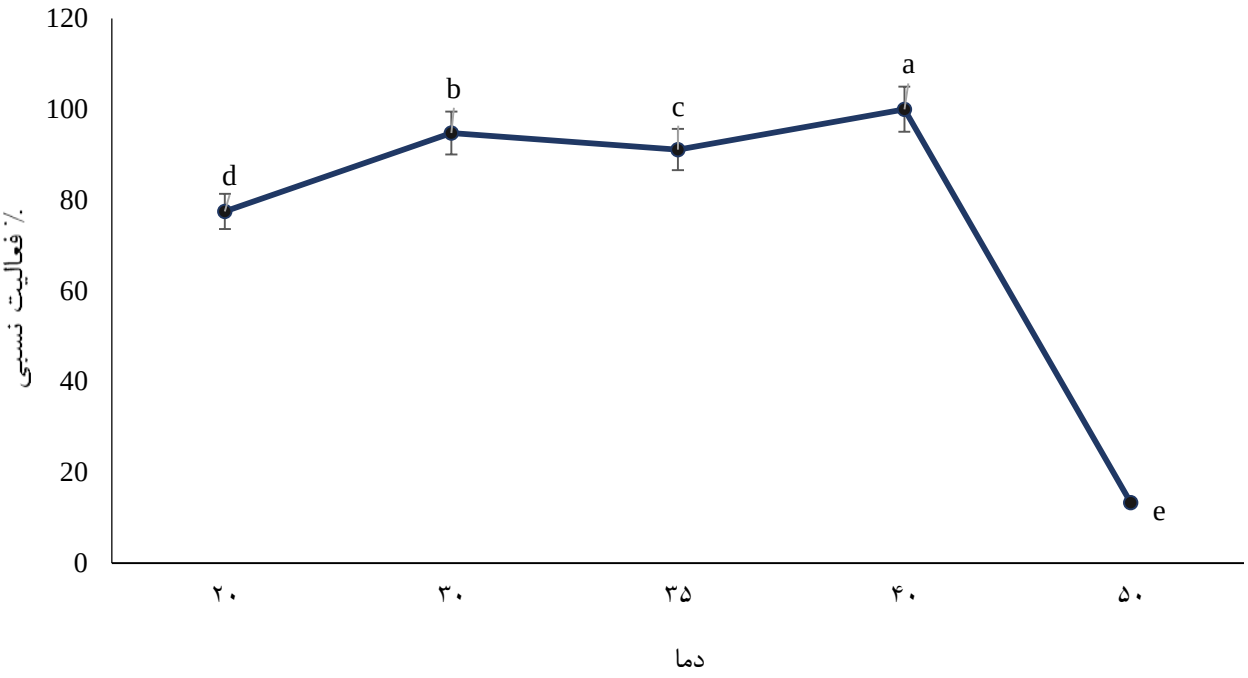
$P\leq$۰/۰۰۰۱، $df_{t,e=}$ ۴، ۱۰۰، F=۵۵۶/۱۵). پس آن در دماهای بالاتر فعالیت آنزیمی به شدت کاهش یافت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۰٪ پایین آمد (شکل ۴-۱۴).



شکل-۴-۱۳- اثر دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی تریپسین لارو سن پنجم بید چغندر قند



شکل-۴-۱۴- اثر دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی کیموتریپسین لارو سن پنجم بید چغندر قند

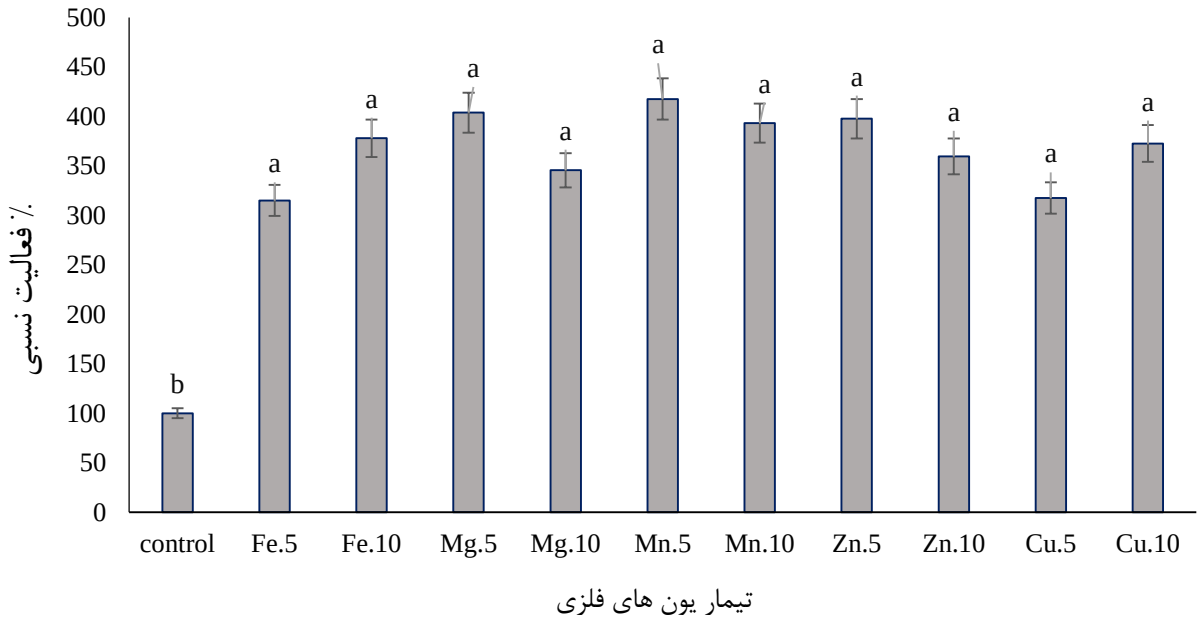


شکل-۴-۱۵- اثر دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی الاستاز لارو سن پنجم بید چغندر قند

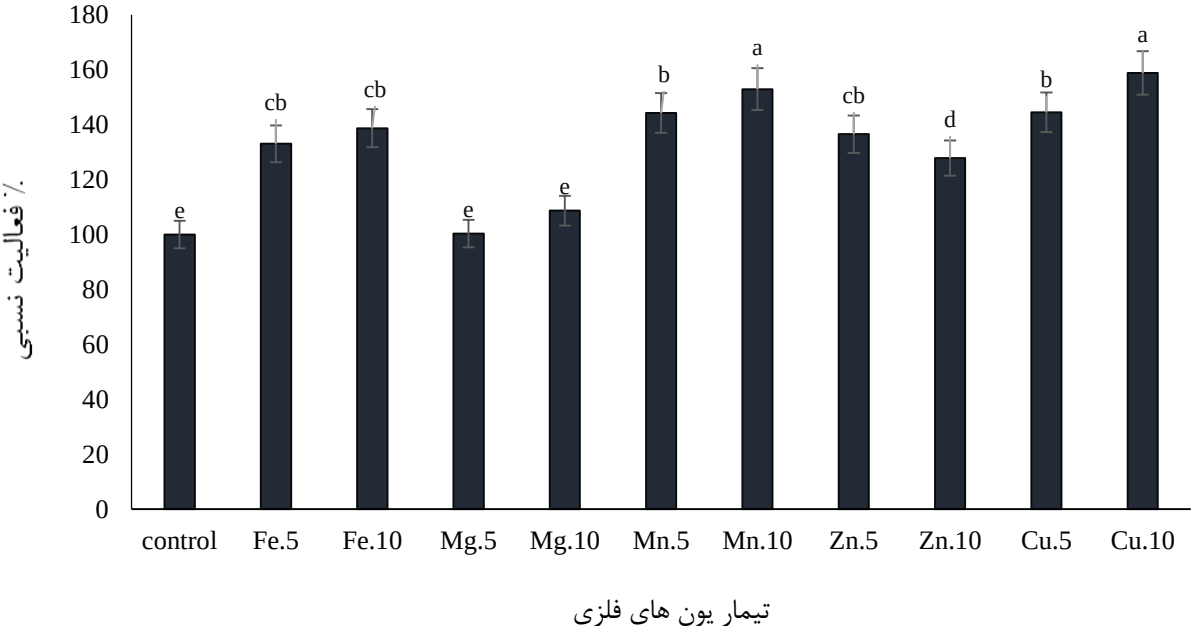
شکل ۴-۱۵ اثر دما بر فعالیت سرین پروتئاز الاستاز را نشان می‌دهد که در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد این فعالیت نسبی به ۰/۰۰۸±۷۸٪ رسیده است. همزمان با افزایش دما، فعالیت پروتئولیتیک با شیب کم، افزایش یافت تا به نقطه اپتیمم یعنی ۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید (۰/۰۰۰۶±۱۰۰) با افزایش پیوسته دما، سرعت کاهش فعالیت پروتئازی نیز بیشتر شده است و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به ۰/۰۰۰۱ ± ۱۵٪ رسید. طبق مطالعات جوزف راج کومار و همکاران (۲۰۰۶)، دمای بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز در لوله گوارش پروانه‌ی *Conogethes punctiferalis* (Guenee) ۴۰ درجه سانتی‌گراد است. کرم آلو، *Grapholita funebrana* (Treitschke) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت پروتئازی را از خود نشان داد (ابراهیم‌زاده، ۱۳۹۴). دمای مطلوب برای فعالیت آنزیم تریپسین در لوله گوارش سفیده‌ی بزرگ کلم، برابر با ۴۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (زیبایی، ۲۰۱۲; شریفلو همکاران، ۲۰۱۶) و بررسی‌هایی امیری جامی در سال ۲۰۱۹ بر روی دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم‌های سرین پروتئازی کرم سیب انجام داد، دمای بهینه را برابر با ۳۰ درجه سانتی گراد اعلام کرد. در تحقیق حاضر دمای بهینه برای فعالیت سرین پروتئازهای تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز به ترتیب برابر است با ۳۵، ۳۵ و۴۰ ، ۴۰ درجه سانتی‌گراد که با مطالعات سایر محققان تطابق دارد.

۴-۴-۵-اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم‌های پروتئازی

تاثیر یون‌های آهن Fe^{2+}، منیزیم Mg^{2+}، منگنز Mn^{2+} ، روی Zn^{2+}، مس Cu^{2+} بر فعالیت نسبی آنزیم کیموتریپسین تاثیر معنی دار داشته است ($P\leq$۰/۰۰۰۱، $df_{t,e=}$ ۱۰، ۲۲۰، F=۱۰/۰۱). به طوری‌که تمام یون‌ها باعث افزایش فعالیت پروتئازی شدند. در واقع تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی دار فعالیت کیموتریپسین را به همراه داشتند (شکل ۴-۱۶).



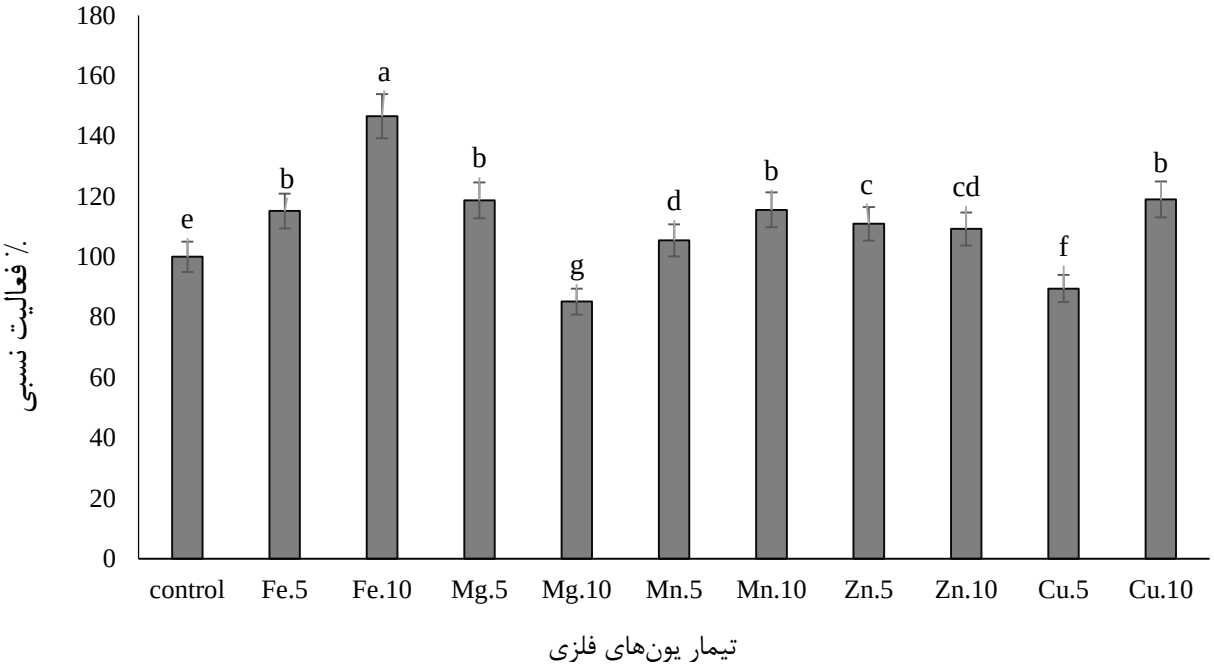
شکل-۴-۱۶- اثر غلظت یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی کیموتریپسین لارو سن پنجم بید چغندر قند



شکل-۴-۱۷- اثر غلظت یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی تریپسین لارو سن پنجم بید چغندر قند

با توجه به شکل ۴-۱۷ یون‌های منگنز و مس با غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار، باعث افزایش فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم تریپسین شدند ($P\leq$۰/۰۰۰۱، ۲۲۰ ،$df_{t,e=}$ ۱۰، $F=$۸۱/۴۵). یون‌های منگنز و مس با غلظت ۵ میلی‌مولار نیز، فعالیت آنزیم تریپسین را تا ۴۰ درصد بالا برد. سایر یون‌های به کار برده شده با غلظت‌های متفاوت، اثر خنثی داشتند و اثر منفی و مهار کننده نداشتند. یون‌های فلزی بسته به نوع آنزیم می‌توانند سبب افزایش و یا کاهش فعالیت آن گردند (حسن و همکاران، ۲۰۰۹). گزارش شده است که یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} اثر افزایشی روی فعالیت آنزیم پروتئاز در معده میانی لارو سن آخر پروانه (Hunber) *A. gemmatalis* دارند (پریرا، ۲۰۰۵). نتایج اسدی (۱۳۸۹) نشان داد که یون‌های آهن Fe^{2+}، جیوه Hg^{2+} و باریم Ba^{2+} باعث کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز در لوله گوارش لارو سن آخر کرم سبز برگخوار برنج (Moore) *N.aenescens* می‌شود.

بررسی ابراهیم‌زاده[1] (۱۳۹۴) نشان داد که NaCl و KCl در غلظت ۱۰ میلی‌مولار، NaCl و $CaCl_2$ در غلظت ۲۰ میلی‌مولار تاثیر افزایشی بر فعالیت آنزیم داشتند و یون‌های کلسیم Ca^{2+}، منیزیم Mg^{2+}، باریم Ba^{2+} و روی Zn^{2+} باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های پروتئازی در لوله گوارش کرم آلو(Treitschke) *G. funebrana* شدند.



شکل-۴-۱۸- اثر غلظت یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم پروتئاز اختصاصی الاستاز لارو سن پنجم بید چغندر قند

طبق نتایج به دست آمده، یون‌های مورد استفاده در آزمایش، اثر معنی داری روی فعالیت پروتئاز الاستاز داشت ($P\leq$۰/۰۰۰۱، $df_{t,e=}$ ۱۰، ۲۲۰ ،F=۲۲۰/۹۱). همان‌طور که در شکل ۴-۱۸ ملاحظه می‌شود یون Fe^{2+} در غلظت ۱۰ میلی‌مولار بیشترین افزایش را روی فعالیت آنزیم الاستاز داشت (۱۴۶/۵۵±۰/۰۰۲۲). یون‌های Fe^{2+} و Mg^{2+} ۵ میلی‌مولار اثر افزایشی روی فعالیت آنزیم داشت. سایر یون‌ها، غیر از یون‌های Mg^{2+} ۱۰ میلی‌مولار و Cu^{2+} ۵ میلی‌مولار که فعالیت آنزیم الاستاز را نسبت به شاهد به طور معنی داری کاهش دادند، سبب افزایش فعالیت آنزیم الاستاز شدند (شکل ۴-۱۸). با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات فوق و فیزیولوژی گیاه چغندر قند، که حاوی عناصری همچون: ۱۸٪ آهن، ۲۳ ٪ منیزیم، ۱۷٪ منگنز، ۳٪ روی، ۶٪کلسیم، ۵٪ فسفر، ۱۲٪ پتاسیم و ۸٪ سدیم است درمی‌یابیم، به دلیل وجود این یون‌ها در برگ‌های چغندر قند که محل اصلی تغذیه آفت مورد نظر است و اثر تیمارها و فعالیت آنزیم‌ها افزایش یافته است، برخی از یون‌های گزارش شده‌ی موجود درچغندر قند شامل: سدیم Na^{+}، پتاسیم k^{+} و منیزیم

Mg^{2+} جزء عناصر قلیایی هستند، بر اساس نتایج بدست آمده، بیشینه فعالیت آنزیم‌ها در آزمایشات انجام شده، عمدتا در pH قلیایی رخ داد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان تا حدودی به ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های موجود در لوله گوارش بید چغندر قند پی برد. این اطلاعات پایه‌ای، به منظور شناخت و امکان تولید ترکیبات بازدارنده‌ی گیاهی آنزیم‌های گوارشی آفت مانند مهار کننده‌های سنتزی PMSF، TLCK و TPCK ضروری است. این ترکیبات منجر به هضم ناقص غذا و مانع از جذب اسید آمینه‌های ضروری در حشره می‌شود. کندی رشد و مرگ حشرات آفت در اثر گرسنگی، روش مناسب و جایگزینی برای کنترل آفات است. گرچه روش‌های متعددی به منظور کنترل بید چغندرقند وجود دارد و رایج‌ترین روش در اغلب مناطق دنیا استفاده از ترکیبات شیمیایی می‌باشد. این روش به دلیل عدم رضایت بخشی روی آفت مورد نظر، آلودگی‌های زیستی و مشکلات فراوان دیگری که ایجاد می‌کند، سبب توجه بیشتر به دیگر عوامل کنترل، از جمله کنترل فیزیولوژیک شده است. مهارکننده های آنزیمی گزینه های مناسبی برای حفاظت گیاهان و محصولات آن‌ها در مقابل خسارت حشرات گیاه‌خوار هستند. نتایج این تحقیق نشان داد که آنزیم‌های گوارشی آلفا و بتا-گلوکوزیداز، پروتئاز عمومی و سرین پروتئازها در لوله‌ی گوارشی لارو بید چغندر وجود دارند. میزان فعالیت این آنزیم‌ها در لوله گوارش نسبت به یکدیگر، در pH و دماهای مختلف، متفاوت است. آنزیم‌های گلوکوزیدازی در pH= ۸ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد ، آنزیم‌های سرین پروتئازی در pH=۱۰-۱۱ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و پروتئاز عمومی در pH= ۹ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را داشتند. با توجه به نتایج حاصل آنزیم‌های گلیکوزیدازی در دماهای بالاتری نسبت به پروتئازها فعالیت دارند. در مورد اثر یون‌های مورد استفاده در آزمایش، برای آنزیم‌های گلیکوزیدازی آلفا و بتا-گلوکوزیداز به ترتیب، بیشترین فعالیت مربوط به یون‌های منیزیم و آهن ۵ میلی‌مولار بود و تقریبا تمام یون‌های مورد آزمایش برای سرین پروتئازهای تریپسین، الاستاز و به ویژه کیموتریپسین، اثر افزایشی را به دنبال داشت. با توجه به اطلاعات بدست آمده از فیزیولوژی لارو بید چغندر می‌توان این گونه استنباط کرد که این آفت در محیطی

که دمای آن حدود ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته آن قلیایی باشد، بیشترین فعالیت را دارد و نیز خسارت بیشتری به محصول مورد نظر وارد می‌کند، بنابراین در استفاده از کودها و عناصر تغذیه‌ای و حتی رقم گیاه می‌بایست اسیدیته در نظر گرفته شود که باعث افزایش فعالیت آفت و به دنبال آن تشدید خسارت محصول نشود. به علاوه چنانچه دمای محیط برای کشت و پرورش چغندر تحت کنترل قرار گیرد، قطعا فعالیت آنزیم‌های مختلف گوارشی تحت تاثیر بوده و هضم و جذب غذا توسط این آفت درجه یک چغندر کاهش پیدا می‌کند

منابع

ابراهیم زاده، ص. (۱۳۹۴). مطالعه ویژگی های بیوشیمیایی پروتئازها و کربوهیدرازهای گوارشی شب پره میوه آلو *Grapholita funebrana*. **پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.**

اسماعیلی، م. ،میرکریمی، ا. و ؛آزمایش فرد، پ. ۱۳۷۴. حشره شناسی کشاورزی. **انتشارات دانشگاه تهران،** چاپ سوم، ۵۵۰ صفحه

امیری جامی، س. (۱۳۹۷). بررسی فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و سرین پروتئازهای گوارشی کرم سیب *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera:Tortricidae). **پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی صنعتی شاهرود،** ۹۴ صفحه

بهداد، ابراهیم. ۱۳۷۱. آفات مهم گیاهان زراعی ایران، **انتشارات مرکز نشر یاد بود،** چاپ سوم، ۵۵۰ صفحه

جهانجو، ف.، غلامزاده م.، قدمیاری م. و حسینی ر. (۱۳۹۷) تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا – بتا گلوکوزیداز گوارشی در زنبور برگخوار ثانوی رز *Allantus viennensis* Schr. (Hym.: Tenthredinidae) **نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)** جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص.۳۶۱-۳۵۱.

حسینی نوه، و. و قدمیاری م. (۱۳۹۳). مبانی و مفاهیم روش‌های آزمایشگاهی در بیوشیمی، فیزیولوژی و سم شناسی حشرات. **انتشارات دانشگاه تهران،** ۵۷۹ ص.

خانجانی، م. (۱۳۸۸). آفات گیاهان زراعی ایران، **انتشارات دانشگاه بوعلی سینا،** ۷۳۸ ص.

خیری، م. ، نعیم، ع. ،فاضلی، م. ج. ،جوانقدم، ه. و اقتدار،ع. ۱۳۶۹. بررسی لیتای چغندر قند در کشور. **آفات و بیماری‌های گیاهی،** ۴۸(۱) : ۱-۳۹.

شجاعی، م. (۱۳۸۴). حشره شناسی (مورفولوژی و فیزیولوژی). **انتشارات دانشگاه تهران،** ۱۹۵ ص.

طباطبائی، پ.، حسینی نوه و .، گلدانساز س.ح. و شیرافکن خ . (۱۳۸۹). فعالیت پروتئولیتیکی گوارش در شب پره کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep: pyralidae) **خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران** ۱۲-۹ مرداد تهران، صفحه ۵۱۹ .

غلامزاده م.، قدمیاری م.، کوچکی ب. و جلالی ج. (۱۳۹۷). تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا-بتا گلوکوزیداز گوارشی در پروانه ابریشم باف پاییزی، *Hyphantria cunea* Drury (Lep : Arctidae) **مجله علمی کشاورزی، جلد ۴۱ شماره ۱.**

فرشباف پور، ر.، رشیدی ل.، ولیزاده م.، یزدانیان م. و محمدی د. (۱۳۸۹). بررسی برخی ویژگی‌های آنزیم آلفا- آمیلاز شب پره هندی (Lep : Pyralidae) *Plodia interpunctella* Hubner. **حفاظت گیاهان ۲۴: ۲۶۲-۲۵۴**.

مجد، الف. و م. ع. شریعت زاده. (۱۳۸۵). زیست شناسی سلولی و مولکولی، **انتشارات آییژ**، ص ۷۳۱.

یزدانیان م. (۱۳۸۹). فیزیولوژی و بیوشیمی حشرات (ترجمه)، **انتشارات مختومقلی فراغی**، گرگان. ۴۸۶ ص.

Abraham E. G., Nagaragu J., Datta R. K.(1992).″ Biochemical study of amylase in the silkworm, *Bombyx mori* L″.: comparative analysis in diapausing and nondiapausing strain.- ***Insect Biochemistry and Molecular Biology***, 22: 867-873.

Aghaali, N., Ghadamyari, M. and Ajamhasani, M.(2012).″ Biochemical characterization of glucosidases and galactosidases from rosaceae branch borer″, Osphranteria coerulescens Redt. (Col.: Cerambycidae). ***Rom J Biochem***.

Ahmadi, F., Moharramipour, S. & Mikani, A. (2017). ″Photoperiodism of diapause induction in sugar beet moth, *Scrobipalpa ocellatella* (Lepidoptera: Gelechiidae)″. ***7th International Symposium on the Environmental Physiology of Ectotherms and Plants*** 320-321.

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

Ajamhassani, M., Zibaee, A., Sendi, J., Askary, H., & Farrar, N. (2012)." Proteolytic activity in the midgut of the crimson speckled moth *Utethesia Pulchella* (L) (Lepidoptera: Arctiidae)". ***Journal of Plant Protection Research***, 52(3), 368-373.

Amorim T. M. L., Macedo, L. L. P., Ucha A,F., Oliviera A. S., Pitanga J. C. M., Masedo F. P., Santos E. A. and Sale M. P.(2008).″ Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella*″ (Lepidoptera: Pyralidae) target for the action of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and chitin-binding vicilin (EVV). ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*** 56: 7738-7745.

Arnaudov V, Raykov S, Davidova R, Hristov H, Vasilev V, Petkov P. Monitoring of pest population: an important element of integrated pest management of field crops. ***Agricultural Science and Technology.*** 2012, 4(1): 77-80

Asadi A., Ghadamyari M.,Sajedi R., J. Sendi J., 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)". ***Section Cellular and Molecular Biology*** 6: 1-9.

Asadi A., Ghadamyari M..Sajedi R., Jalali J. and Tabari M. (2010). "Biochemical characterization of midgut, salivary glands and haemolymph α-amylases of the rice green caterpillar, *Naranga aenescens* L (Lep: Noctuidae)". ***Bulletin of Insectology*** 63: 175-181.

Azevedo T. R., Terra W. R.and, Ferreira C. (2003). "Purification and characterization of three β- glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis". **Insect Biochemistry and Molecular Biology*** 33: 81-92.

Baker J.E., (1989). ″Electrophosis analysis of amylase isozymes in geographical strains of *Sitophilus oryzae*, S. zeamays and S. granarius (coleopteran: Curculionidae)″. ***Journal of Stored Product Research*** 23:125-131.

Bandani A. R., Malrki F., Rahmani S. and Fazeli-Dinan M. (2010). "Characterization of α-amylase in the alimentary canal of *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae), the rice green caterpillar". ***Munis Entomology and Zoology*** 5: 716-725.

Bigham, M. and Hosseini naveh, V, 2010.″ Digestive proteolytic activity in the pistachio green stink bug″. *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). ***Journal of Asia-Pacific Entomology***. No. 13: 221-227.

Bouayad, N., Rharrabe, K., Ghailani, N., Sayah F. 2008.″Effects of different food commodities on larval development and α-amylase activity of *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae)″. ***Journal of Stored ProductsResearch***. 44:373.378.

Boyd, J.R.D.W., (2002)." Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigritulus* (Uhler) (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits". ***Annals of the Entomological Society of America*** 96: 667- 671.

Borovsky, D. 1988. Oostatic hormone inhibits biosynthesis of midgut of midgut proteolytic enzymes and egg development in mosquitoes. ***Arch. Insect Biochem.Physiol***., 7:187-210.

Budatha M., Meur G. and Datta-Gupta A. (2008). "Identification and characterization of midgut proteases in *Achaeta janata* and their implication". ***Biotechnology Letters*** 30: 305-310.

Buller, A.R. & Townsend, C.A. (2013).″Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identityof the catalytic triad″. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 110, 653–661.

Chapman R. F. (1998).″The insects Structure and Function″. ***Cambridge University Press***. 770 pp.

Christeller, J., T. Sawsan Amara and F., Carriere, (2011). "Galactolipase, phospholipase and triacylglycerol lipase activities in the midgut of six species of lepidopteran larvae feeding on different lipid diets" ***jurnal of insect physiology***, 57: 1232–1239.

Christeller, J., T. Laing, W,A., Shaw, B. D.,Burgess, E.P.J., (1990). "Characterization and partial purification of the digestive proteases of the black field cricket, Telegrylus commodus (Walker): elastase is amajor component". ***Insect Biochemistery*** , 20, 157-167.

Cohen, A.C., (1993). "Organization of digestion and preliminary character ization of salivary trypsin-like enzyme in a predaceous, Zelus renardii". ***Journal of Insect Physiology*** 39, 823-829.

Dadd, R.H.(1998).″ Nutrition: Organisms. In: Kerkut GA, Gilbert LL (eds), ***Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology,*** *Vol. 4, Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion*, Pergamon Press, Oxford, pp 313-390, 1985.

Dow J. A., 1984.″Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport″. ***American Journal of Physiology***, 246: R633-R635.

Elpidina, E. N., vino-Kurov, K.S., Gromenko, V.A., Rudenskaya, Y.A., (2001). "Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut". ***Archives of Insect Biochemistry and Physiology*** 48, 206-216.

Esen, A. (1993). ″Glucosidases″: ***Biochemistry and Molecular Biology***, pp. 1- 14.

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Bloch JCP, Grossi de Sa MF, 2002,″Plant α-amylase inhibitors and their intraction with insect α-amylases, structure, function and potential for crop protection″, ***European Journal of Biochemistry***, 269: 397-412.

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Bloch JCP, Grossi de Sa MF, 2000.″ Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylase and structural explanation of observed specificities″. ***European Journal of Biochemistry***. 267:2166-2173.

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

Gatehouse, A.M.R., Norton, E., Davison, G.M., Babbe, M.S., Newell, C.A., Gatehouse, J.A., (1999). "Digestive proteolytic activity in larve of tomato moth, Lacanobia oleracear; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo". ***Journal of Insect Physiology***, 45: 545-558.

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.

Ghadamyari, M., V. Hosseininaveh and M. Sharifi. (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.

Gholamzadeh Chitgar M., Ahsaei S. M., Ghadamyari M., Sharifi M., Hosseini Naveh V. and Sheikhnejad H. (2018)." Biochemical characterization of digestive carbohydrases in the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae)". ***Journal of Crop Protection*** 2: 305-318.

Gholamzadeh., M. Ghadamyari., M. Sharifi., M. Hassan, S., R, (2014).″Partial characterization of digestive carbohydrases in the midgut of fig tree skeletionizer moth, Choreutis nemorana″ Hubner (Lepidoptera: choreutidae) Department of Plant Protection, ***Faculty of Agricultural Science, University of Guilan,Rasht, Iran.***

Gholamzadeh Chitgar M., Ghadamyary M. and Sharifi M. (2013). "Identification and characterisation of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae)". ***Plant Protectection Science*** 50: 84–89.

Gilbert, L.I., Latrou, K., Gill, S.S., (2005).″Comprehensive molecular insect science 1 edn″. ***Elsevier, Amesterdam***, 355-365pp.

Grayson, J.M., (1985). "Acidity-alkalinity in the alimentary canal of twenty insect species". ***Virginia Journal of Science*** 2, 46-59.

Hasan, F., A. Ali shah and A. Hameed, (2009). "Methods for detection and characterization of lipases" , ***Biotechnology Advances***, 27: 782-798.

Hassani., M. R, Sajadian., S, Vatanparast., M and Hosseni Naveh., V (2013).″Biochemical characterization of α-amylase and digestive Glucosidase in the pistachio red bug″, *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae), ***Department of Plant Protection, Rafsanjan Brach***, Islamic Azad University

Hemati, S. A., Naseri, B., Ganbalani, G. N., Dastjerdi, H. R., & Golizadeh, A. (2017). "Digestive proteolytic and amylolytic activities and feeding responses of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants". ***Journal of economic entomology***, 105(4), 1439-1446.

Henrissat, B., Deleury, E. and Coutinho, P.M., ″Glycogen metabolism loss: a common marker of parasitic behavior in bacteria Trends Genet, 18: 437-440, 2002.

Horne, I., V. S. Haritos and J. G. Oakeshott, (2009). "Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects "***Insect Biochemistry and Molecular Biology***, 39: 547- 567.

Houseman, J.G., Down, A.E.R., Momison, P.E., (1990). "Similarities in digestive proteases production in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) and Stomoxys calcitrans (Diptera: Muscidae)". ***Insect biochemistery***, 15: 471-474.

Huber, R.E. and Mathison, R.D. (1976).″Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (*Apis mellifera*). ***Can. J. Biochem***. 54: 153-164.

Johnson K.S. and Rabosky D. (2000). "Phylogenetic distribution of cysteine proteinases in beetles: Evidence for an evolutionary shift to an alkaline digestive strategy in Cerambycidae". ***Comparative Biochemistry and Physiology*** Part B 126: 609 – 619.

Johnston, K.A., Lee, M.J., Gatehouse, J.A., Anstee, J.H., (1991). "The partial purification and characterization of serin protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*". ***Insect Biochemistery*** 21, 389-397.

Jordao, B.P., Terra, W.R., Riberio, A.F., Lehane, M.J., Ferreira, C., (1996). "Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midgut. A biochemical and immunocyto chemical study". ***Insect Biochemistry and Molecular Biology*** 26, 337-34.

Jongsma M. A. and Bolter C. (1997). ″The adaptation of insects to plant protease inhibitors″. ***Journal of Insect Physiology*** 43: 885-895.

Koo, Y.D., Ahn, J.E., Salzman, R.A., Moon, J., Chi, Y.H., Yun, D.J., Lee, S.Y., Koiwa, H., Zhu-salzman, K., (2008).″Functional expression of an insect cathepsin B-like counter-defense protein″. ***Insect Molecular Biology***, 17(3): 235-245.

Lazarevic, J. & Jankovic-Tomanic, M. (2015). ″Dietary and phylogenetic correlates of digestive trypsin activity in insect pests″. ***Entomologia Experimentalis et Applicats***

Lee, M.J., and Anstee, J.H., (1995). "Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site". ***Insect Biochemistry and Molecular Biology*** 25, 49-61.

Lehane, M.J., Buller, H.M., Crisanti A. (1996). "Mechanisms controlling the synthesis and secretion of digestive enzymes in insect". In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F.(Editors) Biology of the Insect Midgut. ***London***. Pp 195-205.

Low N. H., Vong V. and Spornest P. (1986). "A new enzyme, β- glucosidase, in honey bee".***Journal of Apical Research*** 25: 178-181.

Lowry, O.H., N.J., Rosebrough, A.L. Farr and Randall, R. J. (1951)."Protein measurement with the Folin-Phenol reagents ***″. J. Biol. Chem***.:193 265-275

MacGregor EA, Bazin SL, Ens EW, Lahnstein JLJ, Macri L, Shirley JNJ, MacGregor AW. 2000. ″Structural models of limit dextrinase inhibitors from barley″. ***Journal of Cereal Science***. 31:79–90.

McGhie, T.k., J.T Christeller, R. Ford, and P.G. Allsopp. 1995.Characterization of midgut proteninase activities of white grubs: *Lepidiota noxia*, *Lepidiota negatoria*, and *Antitrogus consanguineus* (Scarabaeidae, Melolonthini). *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 3:50-58

Marana, S.R., R.W. Terra and C. Ferreira. (2000). "Midgut - D- glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). physical properties, substrate specificities and function". ***Insect Biochemistry and Molecular Biology*** 25 (7): 835- 843.62.

Masomi, P., Farshbaf Pourabad, R., Mohommadi., A & Khakvar., R. (2016).″Effect of four different nutrition regimes on the alpha-amylase gene expression in the Indian moth, *Plodia interpunctella*″. ***Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.***

Mehrabadi M. and Bandani A. R. (2009). ″Study on salivary glands α- amylase in wheat bug *Erigaster Maura* (Hemiptera: Scutelleridae)″. ***American Journal of Applied Sciences*** 6: 555-560.

Meier, H. and Reid, G., ″Reserve Polysaccharides Other than Starch in Higher Plants, In: Loewus FA, Tanner W (eds), Encyclopedia of Plant Physiology″***, Springer Verlag, New York,*** pp 418 -471, 1982.

Michaud D. (1997). ″Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests″. ***Trends in Biotechnology*** 15: 4-6.

Nakonieczny, M., K. Michalczyk and A. Kedziorski. (2006)." Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. Frankenbergeri ″. ***Comptes Rendus Biologies*** 329: 765- 774.

Nation, J., (2008). Insect physiology and biochemistry. ***CRC Press***, 485 pp.

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

Oliveira, C. F. R., Marangoni, S., & Macedo, M. L. R. (2014). ″The trypsin inhibitor from Entada acaciifolia seeds affects negatively the development of Mediterranean flour moth, *Anagasta Kuehniella*″. ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, 108, 74-79.

Paulillo, L. C., Lopes, A. R., Cristofoletti, P. T., Parra, J. R., Terra, W. R., & Silva-Filho, M. C.(2000). ″Changes in midgut endopep-tidase activity of Spodoptera Frugiperda (Lepidoptera: Noctoidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors″. ***Journal of Economic Entomology,*** 93(3),892-896.

Pereira M. E., Dorr F. A. Peixoto N.C., Lima-Garcia J. F., Dorr F. and Brito G. G. (2005). " Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)". ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research*** 38: 1633- 1641.

Pelegrini PB, Murad AM, Grossi-De-Sa MF, Mello LV, Roméiro LAS, Noronha EF. 2006. ″Structure and enzyme properties of Zabrotes subfasciatus α-amylase. Archives of Insect″ ***Biochemistry and Physiology***. 61:77–86.

Pontoh, J. and N.H. Low. 2002. "Purification and characterization of –glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*)". ***Insect Biochemistry and Molecular Biology*** 32 : 679 – 690.

Pratviel-Sosa F., Clemont S., Percheron F. and Chararas C. (1986). "Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopoea pitycocampa* larvae. Partl. Purification and som properties of the α- glucanases". ***Comparative Biochemistry and Physiology*** 84: 77-81.

Rahimi-Namin, F., Naseri, B., Arghand, A. & Azizi, M**.** (2011)" Effect of pH and temperature on protease and amylase activities of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae)" 2nd Iranian Pest Management Congress, Kerman University, p. 93.

Ramzi S., Hosseininaveh V. (2010). "Biochemical characterization of digestive α-amylases, α- glucosidase and β-glucosidases in pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera:Pentatomidae)". ***Journal of Asia-Pacific Entomology*** 13 (3): 215-219.

Rezaei V. ″Explore the possibility of biological control against pests of sugar beet″, ***Journal of sugar beet.*** 2008. 26(1): 105.

Riseh, N.S., Ghadamyari, M. and Motamediniya, B., ″Biochemical characterization of α & β-glucosidases and α- & β-galactosidases from red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col.: Curculionide)″. ***Plant Protect Sci***, 48: 85-93, 2012.

Saberi Riseh N., Ghadamyari M. and Motamednia B. (2011). "Biochemical characterization of α-amylase from digestive stystem and haemolymph of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col : Curculionide)". ***Global Conference on Entomology 2011, Chiang Mai, Thailand***. P. 350.

SAS Institue INC. (1998). SAA/STAT user's guid for personal computers, version 6.12. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Sasaki, T., Suzuki, Y., (1982). "Alkaline proteases in digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*". ***Biochem. Biophys***. Acta, 703: 1-10.

Santos C. D. Ferreira C. and Terra W. R. (1983)." Concentration of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello". **Jornal of Insect Physiology*** 20: 707-714.

Sharifi M., Ghadamyari M., Mahdavi M. & Fetemeh S. (2011). "Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its α-amylase by inhibitors extracted from the common bean". ***Archive Biological Science*** 63: 705-716.

Sharifloo, A., Zibaee, A., Sendi, J.J. & Talebi Jahroumi, K.H. (2017). ″Biochemical characterization a digestive trypsin in the midgut of large cabbage white butterfly, *Pieris brassicae* L″. (Lepidoptera: Pieridae). ***Bulletin of Entomological Research***, Page 1 of 9.

Sharifloo, A., Zibaee, A., Sendi, J.J. & Talebi Jahroumi, K.H. (2016), ″Characterization Of a Digestive α-Amylase in the Midgut of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae)″. ***Frontiers in Physiology*** 7,96.

Somadder K., ShrIvastava M. (1980). ″ Digestive enzymes in the gut and salivary gland of the larvae of Chilo auricilius Ddgn″. Cellular and Molecular Life Sciences, 36: 218-223.

Srinivasan, A., Giri A.P., Gupta, V.S., san(2006). "Structural and functional diversities in lepidopteran serin proteases". ***Cellular & Molecular Biology Letters*** 11(1), 132-154.

Styger D., Dolezych B. Nakonieczny M., Migula P., Michalczyk K., Zaak M. (2010). Digestive enzymes activity in larvae of *Comeraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). Comptese Rendus Biologies 33: 725-735.

Terra W.R. & Ferreira C. (2012). "Biochemistry and molecular biology of digestion. In: L.I. Gilbert, K. Iatrov and S.S. Gill (Eds)". ***Insect Molecular Biology and Biochemistry. Elsevier Press***, pp. 366-406.

Terra, W.R., Ferreira, C., (2005). "Biochemistry of digestion. In: Gilbert L.I., Iatrou K.,Gill S.S. (Eds), comprehensive Molecular Insect Science ***". Oxford, Elsevier, Chapter*** 4, pp.171-224.

Terra W.R., Ferreira C., Jordao B.P.& Dillon R.J. (1996). Digestive enzymes. In: M.J. Lehane and P.F. Billingsley (Eds.). Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall, London, PP.153-194.

Terra, W.R., Ferreira, C., (1994). "Insect digestive enzyme: Properties, compartmentalization and function". ***Comparative Biochemistry and physiology*** 109, 1-62.

Tripathi A. B., & Krishna S. S. (1988). ″Digestion of food in the midgut of the larva of Earias vitella (Lepidoptera : Noetuidea) carbohydrases″. ***Journal of Advanced Zoology*** 9: 51-58.

Valaitis, A.P. 1995. ″Gypsy moth midgut proteinase: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush broder membrane leucine aminopeptidase″. ***Insect Biochem. Mol. Biol***., 25: 139-149.

Van Ooik, T., Rantala, M. J. and Saloniemi, I. (2007)." Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata* ". ***Environmental Pollution*** 145 (1): 348-354.

Vatanparast M. and Hoseininaveh V. (2012). "Digestive amylase and pectinase activity in the larvae of alfalfa weevil *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae)". ***Entomological Research*** 6: 328-335. 87.

Venetter, R. C., E. E. Davis, J. Zaspel, H. Heisler and M. Larson, (2003)." Mini Risk Assessment Old World bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)". ***Department of Entomology, University of Minnesota***, 28:1-36.

Wolfson J. L. and Murdock L. L. (1990). ″Diversity in digestive proteinase activity among insects″. ***J. Chem. Ecol***. 16, 1089-1102.

Wyatt G.R. (1964). ″The biochemistry of insect hemolymph″. ***Annual Review of Entomology*** 6: 75-102.

Yapi, D.Y.A., D. Gnakri, S.L. Niamke and L.P. Kouame. (2009). "Purification and biochemical characterization of a specific -glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum".* ***Journal of Insect Science*** 4: 1- 13.

Zhao P., Wang G-H., Dong, Z-M., Duan, J., Xu, P-Z., Cheng, T-C., … Xia, Q-Y.(2010). ″Genome-Wide identification and Expression analysis of serine proteases and homologs in the silkworm *Bombyx mori*″. ***BioMed Central Genomics***, 405, 1-11.

Zibaee, A., (2012). "A digestive lipase of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae): purification, characterization, and host plants effects" ***Arch Insect Biochemistry Physiology,*** 81(1):1-19.

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

Abstract

Scrobipalpa ocellatella Boyd (Lep: Gelechiidae), is one of the most important pests of sugar beet in Iran, Which annually causes irreparable damage to this country's economic product. The use of digestive enzymes inhibitors or digestive enzymes-inhibiting genes that are transmitted to the plant can be considered as a new strategy for controlling this pest. The first step in the implementation of these methods is to identify the digestive enzymes in the gastrointestinal tract of the beet larvae. In this study, the biochemical properties of glucosidase and protease in the gastrointestinal tract of the last larval period of the pest were studied. *Scrobipalpa ocellatella* were collected from the fields of jovein during the growing season. The digestive tract of insects was isolated and stored at -20 ° C. Enzymic activity and biochemical properties including pH, temperature and ion effects were measured using substrates and reagents of each of the enzymes mentioned. The optimal α and β-glucosidase temperatures were calculated at 40 ° C. The highest activity of α and β-glucosidase enzymes were investigated in the presence of specific substrates in different acidity and its optimum at pH 8 was obtained. Maximum activity of total protease acidity in the digestive tract of this pest was determined using the azocasin substrate and equal to pH = 11- 9. Optimum total protease temperature was measured at 35 ° C. The activity of specific proteins trypsin, kimotrypsin and elastase was investigated using special substrates in the range of acidity and their maximum activity was respectively, 10, 11 and 11. The optimal temperature for the three proteases mentioned was respectively 35, 40 and 40 ° C. The effect of metallic Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} and Cu^{2+} with concentrations of 5 and 10 mM, was significant for α and β-glucosidase enzymes, trypsin, chymotrypsin and elastase. In addition, increased 5 mM of Mg^{2+}, 10 mM of Mn^{2+} and 5 mM of Cu^{2+}, reduced the activity of the α-glucosidase enzyme and 5 mM of Fe^{2+}, which increased the activity of β-glucosidase enzyme. All of these ions increase the activity of trypsin and elastase enzymes.

key words: Suger beet larva, Digestive enzymes of midgut, acidity, temperature, metallic ions

School of Agriculture

Master Thesis in Agricultural Entomology

Determination of biochemical properties of carbohydrate enzymes and serine proteases of sugar beet *Scrobipalpa ocellatella* (Lepidoptera; Gelechiidae)

Author

Samane Abbasabadi

Supervisor

Dr. Maryam Ajam Hassani

June 2019