

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی

بررسی فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و سرین پروتئازهای گوارشی کرم سیب

Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)

نگارنده

سونیا امیری جامی

اساتید راهنما

دکتر مریم عجم حسنی

دکتر وحید حسینی نوه

بهمن ۱۳۹۷

شماره: ۱۳۹۷/۱۱/۱۴

تاریخ:

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای سونیا امیری جامی با شماره دانشجویی ۹۵۰۲۰۳۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش حشره شناسی تحت عنوان: بررسی فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و سرین پروتئازهای گوارشی کرم سیب *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) که در تاریخ ۱۳۹۷/۱۱/۰۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: جیلی جریب) مردود
نوع تحقیق: نظری عملی

عضو هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر مریم عجم حسنی	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر وحید حسینی نوه	استاد	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر شیده موجرلو	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر مسعود حکیمی تبار	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر علی درخشان شادهپری	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در صورت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

خالصانه این پژوهش را تقدیم می‌کنم به

پدرم،

قصه صبوری کلهای حافظه، اسوه بزرگواری و عطف

مادرم،

مهرباترین فرشته زمینی، تجلی عشق و دلسوزی و تکیه گاه استوارم در رسیدن به قله های ترقی

خواهرانم،

مهرباترین و صبورتترین همراهان و مونس زندگی ام

پاسکزاری

ستایش خدای راکه پاس او آشکار است در آفریدگان، سپاس چیره است و پرتوان، بزرگی او بس بلند است و بی کران، پاس پرودگار حکیم و بنده نواز، پاس او راکه همواره لطف بی کرانش شامل عالم شده است و در سایه رحمت و عنایتش و نیز در سایه الطاف استادان کرامی توفیق انجام این پژوهش فراهم آمد.

در آغاز وظیفه خود می دانم که از زحمات بی دریغ استادان راهنمای فرزانه و ارجمند خانم دکتر مریم عجم حسنی که آموخته های زیادی از ایشان دارم و همواره با صبر و حوصله بسیار مرا در مسیر انجام این پایان نامه یاری نمودند و آقای دکتر وحید حسینی نوبه به خاطر راهنمودند و به مکتوبی های ارزنده شان در جهت پیشرفت بهتر پایان نامه کمال قدردانی و سپاس گزاری خود را ابراز دارم. از آقای دکتر علی درخشان شاد مری و آقای دکتر مسعود حکیمی تبار به خاطر داوری عادلانه و روشنگرانه شان تشکر و قدردانی می نمایم.

از کلیه دوستان و همکاران عزیزم به ویژه خانم مهندس مریم محمودزاده و خانم دکتر بهاره غلامی که هر کدام به نوعی در انجام پایان نامه با من همکاری داشتند و مرا مورد لطف و محبت خود قرار دادند، به پاس تمامی مهربانی ها و محبت های بی دریغشان که همواره یاری گر من در سطحات سخت دوران تحصیل بوده اند، صمیمانه قدردانی می کنم.

پسچنین بر خود لازم می دانم از پدرم که در تمامی دوران زندگی ام نگاه گرم، محبت و حمایت های کرانه اش همواره روشنگر زندگی و تحصیل بود قدردانی می کنم.

از مادرم، اسوه نمونه ای ایثار و محبت، کسی که در همه حال به فکر من بوده است و از خواهران دوست داشتنی ام که همواره مشوقم در پی نمودن راه های نابهار زندگی، وجود کریشان شادی بخش محطاتم بوده است، خاضعانه تشکر و قدردانی می کنم.

در پایان برای همه ی این عزیزان نعمت سلامتی و تندرستی را از درگاه خداوند منان خواستارم.

تعهد نامه

اینجانب **سونیا امیری جامی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه شناسایی و تعیین ویژگی های آنزیم های آلفا آمیلاز و پروتئاز

های گوارشی کرم سیب (*Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)

تحت راهنمایی دکتر مریم عجم حسنی و وحید حسینی نوه 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 .

چکیده

کرم سیب با نام علمی *Cydia pomonella* (L.) (Lep: Tortricidae) از جمله آفات مهم و درجه یک باغات سیب است که همه ساله خسارت قابل توجهی به بار می آورد. امروزه به منظور کنترل حشرات زیان آور، توجه زیادی به ویژگی های فیزیولوژیک آنها با هدف اختلال در فرآیندهای هضم و جذب غذا در معده آنها معطوف شده است. تعیین ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم های گوارشی، اولین گام موثر در اتخاذ روش های کنترلی بر پایه فیزیولوژی حشرات است. بدین منظور برای آگاهی از جنبه های فیزیولوژی گوارش کرم سیب، میوه های سیب آلوده در بهار و تابستان از باغ های سیب شهرستان تربت جام جمع آوری شدند و لاروهای کرم سیب از میوه ها خارج شده و مورد بررسی قرار داده شدند. لوله گوارشی لاروهای سن پنج در شرایط آزمایشگاهی به طور جداگانه استخراج شده و جهت برآوردهای آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. ماکزیمم فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز، آلفا و بتا گلوکوزیداز در حضور سوبستراهای نشاسته، پارا نیتروفنیل آلفا گلوکوپیرانوزید و پارا نیتروفنیل بتا گلوکوپیرانوزید و در دامنه اسیدیته های متفاوت بررسی و اپتیمم آنها در pH برابر ۱۰، ۸ و ۸ به دست آمد. دمای بهینه این آنزیم ها در دامنه دمایی مختلف نیز مورد آزمایش قرار گرفت و به ترتیب ۳۵، ۳۰ و ۳۰ درجه سانتیگراد به دست آمد. با استفاده از سوبسترای آزوکازین فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی در دامنه ای از اسیدیته بررسی و مشخص شد که ماکزیمم فعالیت آن در pH=۱۱ می باشد. دمای بهینه پروتئاز عمومی نیز در ۳۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. فعالیت پروتئازهای اختصاصی تریپسین، کیمو تریپسین و الاستاز با استفاده از سوبستراهای تخصصی به ترتیب بنزوئیل-ال-آرژنین-پی-نیترو آلانید، ساکسینیل-آلانین-آلانین-پرولین-فنیل آلانین-پی-نیترو آلانید، ان-ساکسینیل-آلانین-آلانین-آلانین-پی-نیترو آلانید در دامنه ای از اسیدیته بررسی و بیشینه فعالیت آنها در pH=۱۱ به دست آمد. دمای بهینه فعالیت هر سه پروتئاز نامبرده در ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده شد. به علاوه اسیدیته آنزیم لیپاز با سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل بوتیرات برابر ۸ بود و بیشینه دمای فعالیتی آن در ۴۰ درجه سانتیگراد است. در بررسی غلظت های ۵ و ۱۰ میلی مولار یون های فلزی آهن Fe^{2+} ، منیزیم Mg^{2+} ، منگنز Mn^{2+} ، روی Zn^{2+} و مس Cu^{2+} بر آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز، تریپسین، کیمو تریپسین، الاستاز و لیپاز با سوبستراهای اختصاصی، یون مس ۱۰ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آنزیمی آلفا و بتا گلوکوزیداز شده و دیگر یون ها این فعالیت آنزیمی را مهار کرده و باعث کاهش فعالیت شده اند. در بررسی اثر غلظت های متفاوت یون های نامبرده بر فعالیت سرین پروتئازی، منجر به افزایش معنی دار فعالیت آنزیم الاستاز تحت تاثیر یون روی ۵ میلی مولار شده و دیگر یون ها باعث کاهش

فعالیت سرین پروتئازی شدند. آنزیم لیپاز نیز توسط این یون ها مهار گشته و یون مس در هر دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی مولار هیچ گونه تاثیری بر فعالیت آنزیمی نشان نداده است. بررسی های زایموگرام آلفا آمیلاز نشان دهنده دو ایزوفرم این آنزیم بود، همچنین زایموگرام پروتئاز ویژه تریپسین با استفاده از صفحات نیتروسولوز دو باند را در لوله گوارشی کرم سیب نشان داد. زایموگرام پروتئاز عمومی با استفاده از سوبسترای هموگلوبین چهار باند را نشان داد که نشان دهنده وجود چهار نوع پروتئاز در لوله گوارش کرم سیب می باشد.

کلمات کلیدی: کرم سیب، آنزیم های گوارشی، اسیدپتته، دما، یون های فلزی، زایموگرام

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل اول: مقدمه و کلیات
۷	فصل دوم: بررسی منابع
۸	۱-۲- سیب
۸	۲-۲- کرم سیب
۸	۱-۲-۲- محل پراکنش
۸	۲-۲-۲- میزبانها
۹	۳-۲-۲- شکل شناسی
۹	۱-۳-۲-۲- حشره کامل
۱۰	۲-۳-۲-۲- تخم
۱۰	۳-۳-۲-۲- لارو
۱۱	۴-۳-۲-۲- شفیره
۱۲	۴-۲-۲- زیست شناسی
۱۲	۵-۲-۲- روش های کنترل
۱۲	۱-۵-۲-۲- کنترل مکانیکی
۱۳	۲-۵-۲-۲- کنترل بیولوژیک
۱۴	۳-۵-۲-۲- کنترل فرمونی
۱۵	۴-۵-۲-۲- کنترل ژنتیکی
۱۵	۵-۵-۲-۲- کنترل شیمیایی
۱۷	۳-۲- ویژگی های دستگاه گوارش در حشرات و راسته بالپولکداران
۱۹	۴-۲- آنزیم های گوارشی
۱۹	۱-۴-۲- نحوه عمل آنزیم

۱۹	۲-۴-۲- طبقه بندی و نام گذاری آنزیم ها
۲۰	۲-۴-۱- کربوهیدرازها
۲۰	۲-۴-۲- استرازها
۲۰	۲-۴-۳- پروتئازها
۲۰	۲-۵- ساز و کار ترشح آنزیم های گوارشی
۲۲	۲-۶- pH لوله گوارش حشرات و اثر آن بر فعالیت آنزیمی
۲۳	۲-۷- دما و اثر آن بر فعالیت آنزیمی
۲۳	۲-۸- فلزات سنگین و اثر آن بر فعالیت آنزیمی
۲۵	۲-۹- آنزیم های گوارشی در حشرات
۲۶	۲-۹-۱- آلفا آمیلاز
۲۷	۲-۹-۲- گلوکوزیداز و گالاکتوزیداز
۲۹	۲-۹-۳- پروتئاز ها
۳۰	۲-۹-۴- سرین پروتئازها
۳۱	۲-۹-۵- تریپسین
۳۲	۲-۹-۶- کیمو تریپسین
۳۲	۲-۹-۷- الاستاز
۳۲	۲-۹-۸- لیپاز
۳۵	فصل سوم: مواد و روشها
۳۶	۳-۱- جمع آوری لاروها
۳۴	۳-۲- تشریح لارو ها و جدا سازی لوله گوارشی
۳۵	۳-۳- تهیه عصاره آنزیمی
۳۵	۳-۳-۱- همگن سازی نمونه ها
۳۵	۳-۳-۲- سانتریفیوژ نمونه ها
۳۵	۳-۴- تهیه بافر

۳۶	۵-۳- تهیه معرف ها
۳۶	۱-۵-۳- معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید
۳۶	۶-۳- سوپستراها
۳۷	۷-۳- سنجش فعالیت گلوکوزیداز
۳۷	۱-۷-۳- تعیین pH بهینه آنزیم آلفا آمیلاز
۳۸	۲-۷-۳- تعیین دمای بهینه آنزیم آلفا آمیلاز
۳۸	۳-۷-۳- تعیین pH بهینه آنزیم های آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز
۳۸	۴-۷-۳- تعیین دمای بهینه آنزیم های آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز
۳۹	۸-۳- سنجش فعالیت پروتئولیتیکی
۳۹	۱-۸-۳- تعیین pH بهینه آنزیم های سرین پروتئازها
۳۹	۲-۸-۳- تعیین دمای بهینه آنزیم های سرین پروتئازها
۳۹	۳-۸-۳- تعیین pH بهینه پروتئاز عمومی
۴۰	۴-۸-۳- تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی
۴۰	۹-۳- فعالیت لیپولیتیک
۴۰	۱-۹-۳- تعیین pH بهینه آنزیم لیپاز
۴۰	۲-۹-۳- تعیین دمای بهینه آنزیم لیپاز
۴۱	۱۰-۳- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز، سرین پروتئازها و لیپاز
۴۱	۱۱-۳- تعیین پروتئین کل
۴۲	۱۲-۳- تجزیه داده ها
۴۳	۱۳-۳- زایمو گرام آلفا آمیلاز
۴۳	۱۴-۳- زایموگرام پروتئازها
۴۴	۱-۱۴-۳- زایموگرام پروتئازهای ویژه
۴۵	۲-۱۴-۳- زایموگرام پروتئاز عمومی
۴۹	فصل چهارم: نتایج و بحث

۴۸	۱-۴- تعیین pH بهینه آلفا آمیلاز
۵۰	۲-۴- تعیین دمای بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز
۵۱	۳-۴- زایموگرام آلفا-آمیلاز
۵۳	۴-۴- تعیین pH بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز
۵۵	۵-۴- تعیین دمای بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز
۵۷	۶-۴- اثر یون های فلزی بر فعالیت گلیکوزیدازی
۵۹	۴-۷- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی
۵۹	۱-۷-۴- تعیین pH بهینه پروتئاز عمومی
۶۱	۲-۷-۴- تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی
۶۲	۳-۷-۴- تعیین pH بهینه پروتئازهای اختصاصی (تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز)
۶۵	۴-۷-۴- تعیین دمای بهینه پروتئازهای اختصاصی
۶۶	۵-۷-۴- زایموگرام پروتئاز عمومی
۶۷	۶-۷-۴- زایموگرام پروتئازهای اختصاصی
۶۹	۷-۷-۴- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های پروتئازی
۷۰	۸-۴- تعیین pH بهینه لیپاز
۷۳	۹-۴- تعیین دمای بهینه لیپاز
۷۴	۱۰-۴- اثر یون های فلزی بر فعالیت لیپاز
۷۹	منابع

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۲-۱- حشره کامل کرم سیب <i>Cydia pomonella</i>	۱۰
شکل ۲-۲- تخم کرم سیب.....	۱۱
شکل ۲-۳- لارو کرم سیب	۱۲
شکل ۲-۴- شفیره کرم سیب	۱۲
شکل ۲-۵- آثار خسارت کرم سیب.....	۱۷
شکل ۲-۶- منحنی استاندارد پروتئین	۴۳
شکل ۴-۱- بخش های مختلف لوله گوارشی در لارو سن پنجم کرم سیب.....	۵۰
شکل ۴-۲- اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز لوله گوارشی لارو سن پنجم کرم سیب	۵۱
شکل ۴-۳- اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز لوله گوارشی لارو سن پنجم کرم سیب.....	۵۴
شکل ۴-۴- زایموگرام آلفا آمیلاز لارو سن پنجم کرم سیب.....	۵۵
شکل ۴-۵- اثر pH بر فعالیت های آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم کرم سیب.....	۵۷
شکل ۴-۶- اثر دما بر فعالیت های آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم کرم سیب	۵۹
شکل ۴-۷- اثر غلظت های یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم کرم سیب	۶۱
شکل ۴-۸- اثر pH بر فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی کرم سیب	۶۳
شکل ۴-۹- اثر دما بر فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی کرم سیب	۶۵
شکل ۴-۱۰- اثر دما بر فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی کرم سیب.....	۶۶
شکل ۴-۱۱- اثر دما بر فعالیت پروتئازهای اختصاصی لوله گوارشی کرم سیب	۶۸
شکل ۴-۱۲- زایموگرام پروتئاز عمومی لارو سن پنجم کرم سیب	۷۰
شکل ۴-۱۳- زایموگرام پروتئاز اختصاصی تریپسین در لارو سن پنجم کرم سیب	۷۱
شکل ۴-۱۴- اثر غلظت های یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های پروتئازهای اختصاصی لارو سن پنجم کرم سیب	۷۳
شکل ۴-۱۵- اثر pH بر فعالیت لیپاز لوله گوارشی لارو سن پنجم کرم سیب	۷۴

فصل اول

مقدمه و کلیات

سیب با نام علمی *Malus pumila* Miller، متعلق به خانواده گلسرخیان Rosaceae می باشد. سیب بومی آسیای مرکزی است، در حال حاضر کشور ایران با تولید چهار درصد سیب درختی جهان هم از نظر سطح زیر کشت هم از نظر تولید رتبه سوم را در دنیا به خود اختصاص داده است (آمار نامه کشاورزی، ۱۳۹۷). از میان آفات و عوامل بیماریزای سیب، کرم سیب (تخم خوار سیب) با نام علمی *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) مخرب ترین و کلیدی ترین آفت باغ های سیب در جهان معرفی شده است (فرانک^۱ و همکاران، ۲۰۰۷؛ لایت^۲ و همکاران، ۲۰۰۱). این آفت اولین بار در انگلستان شناسایی شد، درختان مورد حمله کرم سیب شامل سیب، به و گلایی بوده و گاهی روی زردآلو، گردو و انار هم دیده می شود. کرم سیب در واقع لارو شب پره کوچکی است که به درون میوه می رود و از گوشت و دانه های آن تغذیه می نماید. بیشتر میوه هایی که در همان مرحله اول رشد مورد حمله آفت قرار می گیرند می ریزند و آن هایی هم که روی درخت باقی می ماندند، در اثر فضولات حشره و عوامل فاسد کننده از قبیل قارچ ها و باکتری ها غیر قابل استفاده می گردند (دواچی و اسماعیلی، ۱۳۴۴). کرم سیب در اکثر مناطقی که سیب کشت می شود دارای سه نسل در سال است اما در مناطق کوهستانی روی سیب و گردو دو نسل در سال گزارش شده است. نسل اول کرم سیب قادر به ایجاد خسارت به میوه نیست اما لاروهای نسل دوم و سوم آفت خسارت قابل توجهی را به محصول وارد می کنند (رجبی و همکاران، ۱۳۹۰). کرم سیب تقریباً هر ساله درختان میوه دانه دار را با جمعیتی قابل ملاحظه مورد حمله قرار می دهد، به طوری که خسارت آن از سطح زیان اقتصادی تجاوز می کند به همین دلیل این حشره در زمره آفات کلیدی قرارداد. تاکنون روشهای متفاوتی برای کنترل این حشره به کار گرفته شده است، کنترل شیمیایی با استفاده از سموم آزیمفوس متیل، فوزالن و اتریمفوس مشاهده شده است. استفاده از میکروارگانیسم ها مانند ویروس (GV) و رها سازی زنبورهای پارازیتوئید تریکوگراما در محیط و هم چنین روشهای کنترل غیر شیمیایی شامل بستن گونی ها یا کارت های آغشته به موادی

¹ Frank

² Light

از جمله بتانفتول به اطراف درخت که کانون اصلی زمستان گذرانی لارو این حشره است و از بین بردن میوه های آلوده در سراسر سال از راهکارهای مهم کنترل این آفت است (اسماعیلی، ۱۳۸۶؛ بهداد، ۱۳۷۵). ولی تاکنون هیچ یک از این روش ها نتوانسته سبب کاهش قاطع در جمعیت آفت شود از این رو لازم و ضروری است در مورد روش های کنترل غیر شیمیایی آفت تحقیقات بیشتری صورت گیرد. در مناطق مختلف جهان در اثر استفاده دراز مدت از حشره کش ها، افزایش مقاومت کرم سیب به حشره کش های شیمیایی مختلف گزارش شده است (گیلومی و ریدل^۱ و همکاران، ۲۰۰۷؛ والتر^۲، ۲۰۰۸). باتوجه به اهمیت کنترل آفات از نظر تامین مواد غذایی و بهداشت، جامعه بشری همواره در جستجوی راه های اقتصادی و بی زیان برای حل این مشکل بوده است. در حقیقت مصرف آفت کش ها به عنوان تنها وسیله کنترل، منجر به پیدایش پدیده هایی مانند مقاومت بعضی آفات در برابر این مواد و عوارض ناخواسته زیست محیطی شده است. عکس العمل دست اندرکاران، طرح برنامه ای بود که در آن تلفیقی از روش های مختلف کنترل را توصیه می کرد، در این راستا کنترل مطلوب و اقتصادی آفت همراه با عوارض کمتری از طریق مدیریت تلفیقی آفات میسر می شود (طالبی، ۱۳۸۶). در برنامه های مدیریت تلفیقی آفات یکی از ابزارهای مهم، مقاومت گیاهان به آفات می باشد که با پیشرفت و استفاده از تکنیک های مهندسی ژنتیک امکان همسانه سازی و قرار دادن ژن های جدید و کارا در گیاهان زراعی برای ایجاد مقاومت در برابر آفات حشره ای فراهم آمده است (شارما^۳ و همکاران، ۲۰۰۱). استفاده از ارقام مقاوم و گیاهان تراریخته یکی از روش های موثر کنترل می باشد. ارقام مقاوم به طرق مختلف روی زندگی آفت و یا ارتباط متقابل گیاه-حشره تاثیر گذاشته و از شدت خسارت می کاهند. یکی از موارد بسیار حیاتی در این ارتباط نوع و میزان تغذیه حشره از میزبان می باشد. با توجه به رفتار تغذیه ای حشرات، دستگاه گوارش آنها دچار تغییراتی در جهت سازگاری برای هضم غذا شده است و یکی از عوامل کلیدی در بحث گوارش، آنزیم های سیستم گوارش حشره است. از این رو مطالعه آنزیم های

¹ Giliomee & riedl

² Walter

³ Sharma

گوارشی به عنوان شناسایی پتانسیل این جانوران در آسیب رسانی به محصولات کشاورزی و نیز اتخاذ تصمیماتی در روش های متنوع مبارزه از جایگاه ارزشمندی برخوردار است (طالبی، ۱۳۸۶).

پروتئینها و کربوهیدرات ها اجزای مهم غذای حشرات را تشکیل می دهد که محصولات هضم آنها در بسیاری از فرآیندهای زیستی حشرات نقش حیاتی ایفا می کنند، پروتئازها یا آنزیم های هیدرولیز کننده پروتئینها و کربوهیدرازها به روش های مختلف، غذای خورده شده را در حشرات قابل جذب و بهره برداری می سازند (گیت هاوس و همکاران، ۱۹۹۹). با توجه به گوناگونی زیاد رژیم غذایی در حشرات و تنوع بسیار گسترده آنها، انواع مختلفی از پروتئازها و کربوهیدرازها در دستگاه گوارش آنها یافت می شود. هر گونه اختلال در هضم پروتئینها در سیستم گوارشی حشرات منجر به بهره برداری ضعیف از منبع غذایی، کندی رشد و حتی مرگ به علت گرسنگی می گردد (گیت هاوس و همکاران، ۱۹۹۹).

تاکنون گزارش مستندی مبنی بر مطالعات فیزیولوژی گوارش کرم سیب ثبت نشده است. به نظر می رسد بررسی آنزیم های موثر در هضم و جذب غذا در لارو های این آفت مهم و اقتصادی بتواند در استفاده از روش های جدید کنترل آن موثر باشد.

در تحقیق حاضر اهداف زیر مورد مطالعه قرار گرفت:

- تعیین دما و pH بهینه آنزیم آلفا آمیلاز لارو سن پنجم کرم سیب
- تعیین دما و pH بهینه آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لارو سن پنجم کرم سیب
- تعیین دما و pH بهینه پروتئاز عمومی در لارو سن پنجم کرم سیب
- تعیین دما و pH بهینه آنزیم های تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز در لارو سن پنجم کرم سیب
- تعیین دما و pH بهینه آنزیم لیپاز در لارو سن پنجم کرم سیب

¹ Gatehouse

- اثر یون های فلزی آهن Fe^{2+} ، منیزیم Mg^{2+} ، منگنز Mn^{2+} ، روی Zn^{2+} و مس Cu^{2+} بر فعالیت آنزیم

های آلفا و بتا گلوکوزیداز، سرین پروتئازها و لیپاز

- زایموگرام آلفا آمیلاز

- زایموگرام پروتئاز عمومی با استفاده از سوبسترای هموگلوبین

- زایموگرام پروتئاز اختصاصی تریپسین

فصل دوم

بررسی منابع

از نظر گیاهشناسی، سیب با نام علمی *Malus pumila* Miller درختی تکپایه متعلق به خانواده گلسرخیان Rosaceae می باشد که به دلیل میوه شیرین و گوشتی اش شناخته شده است. در سر تا سر دنیا، این درخت برای استفاده میوه آن کشت می شود (بارنس^۱، ۱۹۹۱). سیب یکی از قدیمی ترین میوه های شناخته شده بوده و در سده هفدهم توسط مهاجران به آمریکای شمالی آورده شد و نخستین باغ میوه قاره آمریکای شمالی در بوستون توسط کشیش ویلیام بلکستون در سال ۱۶۲۵ کاشته شد. یافتن سیب های کوچک در قزاقستان، در سال ۳۲۸ قبل از میلاد را به اسکندر نسبت داده اند. سیب های مختلف که به شکل دانه از اروپا آورده شده بودند هم در مسیرهای حرکت تاجران بومی آمریکایی کاشته می شدند و هم در مزارع استعماری گسترش یافتند. در سال ۱۸۴۵ کاتالوگی از یک محل نگهداری سیب در آمریکا ۳۵۰ نوع متفاوت از بهترین سیب ها را تبلیغ می کرد، چنین چیزی از دیدگاه انواع جدید ارقام سیب را در اوایل سده نوزدهم در آمریکای شمالی نشان می دهد. در سده بیستم پروژه های آبیاری در واشینگتن شرقی شروع شد و موجب شد صنعت چند میلیارد دلاری میوه گسترش یابد که محصول اصلی این صنعت، سیب بود. آمریکا با تولید ۱۰٪ سیب جهان دومین تولید کننده عمده سیب است، ترکیه نیز یکی از تولید کنندگان بزرگ این محصول محسوب می شود. فرانسه، ایتالیا، آفریقای جنوبی و شیلی در بین صادرکنندگان عمده سیب قرار دارند (بروونگ، ۱۹۹۹). در حال حاضر ایران با تولید چهار درصد سیب درختی جهان هم از نظر سطح زیر کشت هم از نظر تولید رتبه سوم را در دنیا به خود اختصاص داده است. با تولید بیش از سه میلیون تن سیب در سال ۱۳۹۷ در کشور، تنها ۷۰۰ هزار تن آن به خارج از کشور صادر می شود که رقم ناچیزی است و یکی از مهم ترین عوامل محدودکننده صادرات این محصول، وجود آفات و بیماریهاست که همه ساله خسارت جبران ناپذیری به کشاورزان وارد میکند. یکی از آفات درجه اول سیب، کرم سیب است. این آفت کلیدی تقریباً به تمام

¹ Barnes

² Browning

ارقام سیب در باغات سیب کل کشور حمله کرده و با داشتن تعداد نسل زیاد، برای تمام انواع سیب خسارت زامی باشد.

۲-۲- کرم سیب

کرم سیب *Cydia pomonella* (L.) از راسته Lepidoptera به خانواده Tortricidae و زیر خانواده Olethreutinae تعلق دارد. این حشره در مقالات مختلف با نام های علمی از جمله *aeneana* (Tortrix), *glaphyrana* (*Carpocapsa splendana* ab.), *pomana* (*Pyralis*), *pomonana* (Tortrix) معرفی شده است (بارانس، ۱۹۹۱). این حشره دارای نام عمومی *codling moth* یا تخم خوار سیب می باشد. علت این نام گذاری به واسطه تغذیه لاروهای حشره از قسمت دانه سیب می باشد (کاردو همکاران، ۱۹۹۷؛ والرا و همکاران، ۲۰۱۰).

۱-۲-۲- محل پراکنش

کرم سیب یک آفت همه جا گیر بوده و در تمام پنج قاره جهان انتشار دارد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۲). در ایران نیز این آفت از مناطق هم سطح دریای آزاد (نواحی جلگه ای گیلان و مازندران) تا مناطقی با ارتفاع ۲۶۰۰ متر در مناطق مختلف کشور به ویژه البرز مرکزی فعال است. به عبارت کلی تر در تمام مناطقی از ایران که کشت درختان میوه سردسیری رواج دارد این آفت نیز وجود دارد (رجبی، ۱۳۹۰).

۲-۲-۲- میزبانها

این حشره آفتی پلی فاز است و آفت خطرناک و جدی سیب، گلابی و گردو است. این حشره دارای میزبان های متفاوت دیگری نظیر بادام، زرد آلو، هلو، آلو می باشد (ماسون^۴ و همکاران، ۲۰۰۱).

۲-۲-۳- شکل شناسی

۲-۲-۳-۱- حشره کامل

¹ Carde

² Valera

³ Wang

⁴ Mason

عرض پروانه های این آفت با بالهای باز به ۱۵ تا ۲۲ میلی متر می رسد. بال های رویی خاکستری بوده و در انتها دارای یک لکه خاکستری متالیک می باشند. در متن بال های جلویی نوارهای عرضی قهوه ای رنگی جلب توجه می کند (رجبی، ۱۳۹۰).

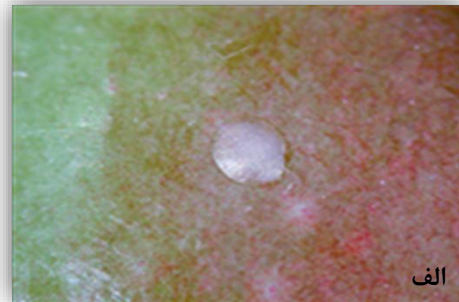
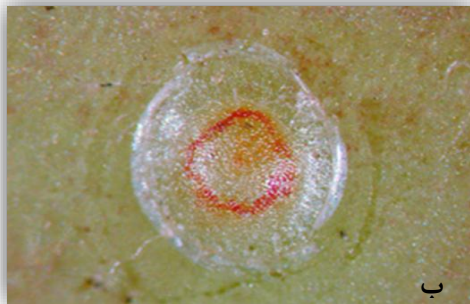


شکل ۱-۲-حشره کامل کرم سیب *Cydia pomonella* (اصلی)

۲-۲-۳-۲- تخم

تخم های کرم سیب شبیه به دانه عدس کمی بیضوی می باشد. عرض آن حدود ۰/۹۲-۱ و طول آن ۱/۱-۱/۳ میلی متر است. پوسته تخم به شکل بسیار ظریفی مشبک است. تخم در اوایل بی رنگ و مات

بوده و پس از گذشت یک سوم از زمان لازم برای دوره جنینی حلقه های قرمز روی آن ظاهر می گردد. کپسول سیاه سر لارو را می توان از یک تا دو روز قبل از تفریخ از ماورای پوسته تخم مشاهده نمود (بهداد، ۱۳۷۵؛ رجبی، ۱۳۹۰).



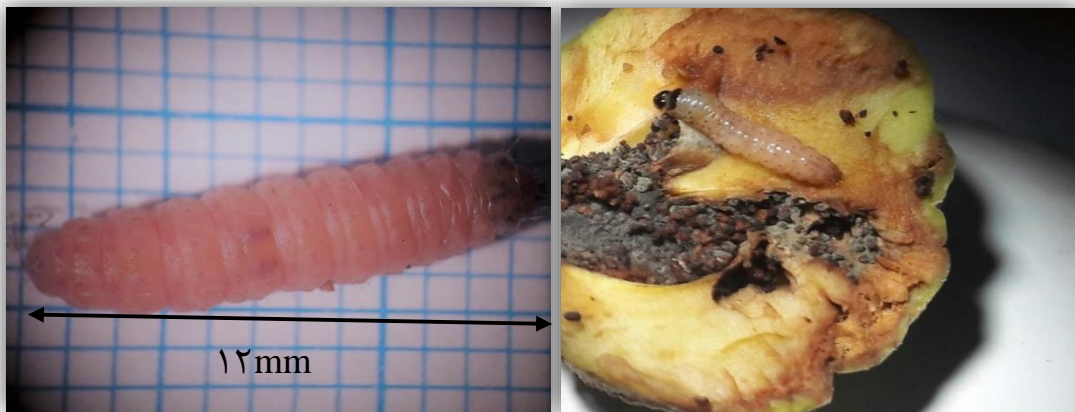
شکل ۲-۲- الف) تخم کرم سیب (تازه گذاشته شده) ب) تخم کرم سیب نزدیک تفریخ شدن

برگرفته از سایت <http://jenny.tfrec.wsu.edu>

۲-۲-۳-۳- لارو

لارو سن یک به طول $1/3-1/4$ میلی متر و به رنگ سفید با کپسول سر به رنگ سیاه می باشد. لارو سن یک با ایجاد شکاف جانبی از تخم خارج می شود (رجبی، ۱۳۹۰). لارو کامل در حدود ۱۵-۲۰ میلی متر طول دارد و رنگ آن سفید و در سطح پشتی متمایل به ارغوانی است و اغلب به صورت خمیده

در داخل پیله قرار دارد (میراب بالو و همکاران، ۱۳۹۱) و در لاروهای نر یک جفت بیضه به رنگ تیره در حلقه پنجم قرار دارد (رجبی، ۱۳۹۰).



شکل ۲-۳- لارو سن چهارم کرم سیب در حال تغذیه (اصلی) لارو سن پنجم کرم سیب (اصلی)

۲-۳-۴- شفییره

شفییره به رنگ قهوه ای روشن تا قهوه ای تیره و طول آن ۱۰/۵-۸/۵ میلی متر است. در شفییره نر سوراخ تناسلی در بند نهم و در ماده در بند هشتم است. در حالی که مخرج در هر دو در مفصل دهم قرار دارد (رجبی، ۱۳۹۰).



شکل ۲-۴ شفییره کرم سیب (اصلی)

۲-۲-۴- زیست شناسی

این حشره زمستان را به شکل لاروهای سن آخر داخل پیله سفید رنگ نسبتاً ضخیم در زیر پوست و یا لا به لای شکافهای تنه و شاخه های درختان میزبان می گذراند. البته لاروهای زمستان گذران آفت را در نقاط دیگری از جمله زیر کلوخها و برگهای ریخته شده پای درختان و داخل شکافهای مختلف خاک اطراف تنه درخت میزبان و همچنین در مخفیگاه های داخل جعبه های میوه و انبارها نیز میتوان دید (رجبی، ۱۳۹۰). کرم سیب دارای دیپوز اجباری در طول فصل سرد است. دیپوز در این حشره زمانی همه را در بر میگیرد که طول روشنایی روز به حدود ۱۲ ساعت برسد (اوایل شهریور).

پرواز پروانه های نسل اول یا نسل زمستانگذران کرم سیب در اواخر فروردین ماه شروع شده و در اواخر اردیبهشت ماه به اوج خود میرسد. اوج پرواز پروانه های نسل سوم از اواخر مرداد تا نیمه اول شهریور ماه میباشد. در بهار مصادف با باز شدن گلهای درختان سیب حشرات کامل ظاهر میشوند. این حشرات پس از مدتی تغذیه از نوش گل و قطرات شبنم جفتگیری و سپس تخم های خود را روی کاسبرگ، نهنج و برگهای مجاور میوه ها و حتی سرشاخه های گیاهان میزبان قرار میدهند. تخم ها اکثراً نزدیک میوه ها گذاشته میشوند به عبارت دیگر برای یافتن تخم روی برگها باید بیشتر به آنها توجیه کرد که نزدیک میوه ها قرار دارند. هر پروانه ماده تعداد ۸۰ عدد تخم در مدت ۲۰-۱۰ می گذارد (بهداد، ۱۳۷۵). این تخم ها به رنگ سفید شکر خیلی کوچک و غالباً به طور انفرادی دیده میشوند. لاروهای جوان نسل اول معمولاً از محل گلگاه وارد میوه شده و شروع به تغذیه می کنند و پس از کامل شدن رشد، درون میوه ها، زیر پوست درختان یا در خاک به شفیره تبدیل میشوند (میراب بالو و همکاران، ۱۳۹۱).

۲-۲-۵- روش های کنترل

۲-۲-۵-۱- کنترل مکانیکی

کنترل مکانیکی کرم سیب از سال ها قبل اعمال می شده است که شامل پاک کردن و از بین بردن پوسته های شل و شکسته روی تنه درختان می باشد. این محل ها پناهگاه زمستانه لارو کامل آفت

محسوب می شوند. بستن نوارهای مقوایی و یا گونی آغشته به موادی از قبیل بتانفتول اطراف تنه درختان موجب جلب لاروهای زمستان گذران و از بین رفتن آنها می شود (بهداد، ۱۳۷۵).

۲-۲-۵-۲- کنترل بیولوژیک

کنترل بیولوژیک از طریق کاربرد دشمنان طبیعی از قبیل پارازیتوئید ها، پرداتورها، پاتوژن ها، آنتاگونیست ها و یا میکروارگانسیم های رقیب، برای کاهش جمعیت یک آفت انجام می شود (موسوی، ۱۳۷۹). در مورد راسته بال غشائیان (Hymenoptera) زنبورهای پارازیتوئید مختلفی برای کرم سیب در منابع ذکر شده است. به عنوان مثال زنبور (*Ephialtes caudatus* (L)) از خانواده Ichneumonidae و زیر خانواده Pimplinae فقط روی کرم سیب فعال بوده است (نوری و همکاران، ۱۳۶۸). این حشره پارازیت لاروهای پیله بسته کرم سیب که زمستان گذرانی کرده و یا در طول سایر نسل ها برای شفیره شدن آماده می شوند، می باشند. این زنبورها برای پارازیت کردن میزبان خود قبلا لارو داخل پیله را بی حس نموده و سپس تخم را درون پیله قرار می دهند (بلال و سینقه، ۲۰۰۲). زنبور دیگری با نام علمی (*Pristomerus vulnerator* (Panzer)) که متعلق به زیر خانواده Ophioninae می باشد تاکنون فقط در منطقه کرج دیده شده و میزبان آن لارو کرم سیب است. این زنبور یک پارازیت داخلی است به طوری که تخم خود را داخل بدن لارو می گذارد (بهداد، ۱۳۷۵).

در اکثر نقاط مهم که کشت سیب رواج دارد نوعی زنبور به نام *Pimpla turionellae* (L) دیده شده که میزبان آن شفیره های کرم سیب است (بارانس، ۱۹۶۵). از زنبورهای خانواده Trichogrammatidae جنس *Trichogramma* تاکنون سه گونه به اسامی *T. evanescens*، *T. embryophagum* و *T. cacoeciae* در ایران گزارش شده اند (شجاعی و همکاران، ۱۳۶۸؛ نوردولاند، ۱۹۹۴).

هر سه گونه قادرند تخم های کرم سیب را پارازیت نمایند. از زنبورهای خانواده Pteromalidae گونه *Dibracgys boarmiae* (Walker) شناخته شده است که در کاهش جمعیت لاروهای زمستان

¹ Ballal & Singh

² Norduland

گذران کرم سیب در منطقه کرج و شهریار موثر بوده است (ابراهیمی، ۱۳۷۸). این حشره لاروهای داخل پیله را پارازیت می کند و هرگز لاروهای لخت را مورد حمله قرار نمی دهد (گرانجر^۱، ۲۰۰۳). از راسته دوبالان (Diptera) مگسی با نام علمی *Neoplectops pomonellae* (L) از خانواده Ostomidae گزارش شده است که از لاروهای کرم سیب تغذیه می کند (دواچی و اسماعیلی، ۱۳۴۴). گونه های متعددی از سوسک های خانواده Carabidae در تقلیل جمعیت کرم سیب در خاک گزارش شده اند به این معنی که این سوسک لاروهای درحال جستجو برای محل مناسب شفیرگی را شکار می کند، همچنین در خانواده Staphylinidae پنج گونه شناسایی شده که در کاهش جمعیت کرم سیب اهمیت دارند (رجبی، ۱۳۹۰). از سن های خانواده Miridae جنس *Phytocoris* به عنوان تخم خوار کرم سیب گزارش شده است (تانادا و کایا^۲، ۱۹۹۳).

۲-۲-۵-۳- کنترل فرمونی

در طول دهه های ۱۹۲۰ تا ۱۹۳۰ استفاده از تله های طعمه ای یک روش پذیرفته شده برای تعیین لزوم و زمان سمپاشی علیه کرم سیب بود. با کشف فرمون جنسی ماده در سال ۱۹۷۲ و به دنبال آن ساخت این ترکیبات امکان جدیدی در پایش جمعیت و مدیریت کرم سیب فراهم شد. در بیشتر موارد مواد فرار جلب کننده شب پره های نر در تله های فرمونی استفاده میشود. این مواد شیمیایی جلب کننده مشابه مواد فرار مصنوعی جاذب شب پره های ماده هستند که شب پره های نر را برای جفتگیری جذب میکند. کارایی نسبی انواع تله های چسبنده و غیر چسبنده فرمونی برای پایش جمعیت کرم سیب در چند باغ سمپاشی شده و سمپاشی نشده شمال شرقی آمریکا بررسی شد و بر اساس نتایج به دست آمده تله فرمونی چسبنده نوع Pherocon II را به عنوان بهترین نوع تله برای ردیابی کرم سیب معرفی کردند. ولی باید توجه داشت که اطلاعات به دست آمده توسط تله های فرمونی همیشه به راحتی قابل تفسیر نیست چون تعداد حشرات شکار شده در هر تله فرمونی تحت تأثیر گروهی از عوامل مثل مهاجرت،

¹ Granger

² Tanada & Kaya

دما، نور ماه، سرعت باد، موقعیت تله و فرمون، پایداری فرمون و رقابت در جلب بین تله های فرمونی و ماده های مستقر در منطقه تغییر میکند. براین اساس، زمانی که مدیریت کرم سیب بر مبنای نتایج حاصل از تله های فرمونی است و در حد قابل قبول اعمال نمی شود علت این نقیصه را ضعف داده های حاصل از تله های فرمونی میدانند. مطالعات اخیر نشان میدهد که به تازگی ترکیبات جلب کننده دوجنسی (DA2313) نیز تهیه شده است که با شکار حشرات ماده در کنار حشرات نر امکان بیشتری را برای تعیین مناسب ترین زمان کنترل فراهم کرده است (رنجبر اقدم، ۱۳۹۲).

۲-۲-۴-۵-۴- کنترل ژنتیکی

آزمایشاتی توسط محققین در زمینه امکان عقیم کردن شب پره سیب توسط اشعه گاما صورت گرفته است. در این روش شب پره ها را روی غذای مصنوعی پرورش داده و سپس این حشرات تحت تاثیر اشعه گاما قرار می گیرند و به وسیله هلیکوپتر در باغ های آزمایشی رها می گردند. شب پره های نر که تحت تاثیر اشعه قرار گرفته باشند، اگر با شب پره ماده که در شرایط طبیعی وجود دارد جفت گیری کنند، تدریجا تخم هایی که گذاشته می شوند اغلب عقیم مانده و از آن ها لاروی خارج نمی شود. این روش آزمایش شده و نتایج رضایت بخشی داشته است (موسوی، ۱۳۷۹؛ چارمیلوت^۱ و همکاران، ۲۰۰۰).

۲-۲-۵-۵-۵- کنترل شیمیایی

موثرترین و متداول ترین روش برای کنترل کرم سیب روش شیمیایی است. برای مبارزه شیمیایی و تعیین زمان های دقیق سم پاشی بررسی شرایط آب و هوایی منطقه ضروری است. در بعضی مناطق خروج شب پره ها به تدریج صورت می گیرد و بدین جهت تخم ریزی به طور مداوم روی میوه ها انجام می شود، بنابراین حفاظت دائم درخت ها از طریق شیمیایی ضرورت پیدا کرده است.

از این رو برای کاهش مصرف سموم، زمان تخم ریزی و خروج لاروهای جوان کرم سیب در نسل های مختلف و ظهور حشرات کامل را با استفاده از وسایل و روش های مختلف از قبیل نصب تله های نوری و یا فرمونی در باغ ها تعیین می شوند. همچنین می توان با جمع آوری پیله ها و قرار دادن آن ها در

¹ Charmilot

قفس هایی در باغ های سیب زمان اوج پرواز پروانه ها را تعیین و اولین سم پاشی را آغاز کرد. معمولا زمان ظهور حشراتی که زمستان را گذرانده اند مصادف با ۱۴-۱۰ روز پس از ریزش گل برگ ها است که بلافاصله سم پاشی باید شروع شود (بهداد، ۱۳۷۵). در زمینه انتخاب بهترین آفت کش علیه کرم سیب از سال ۱۳۴۴ تاکنون مطالعات فراوانی توسط محققین انجام گرفته است. آزیفونیس متیل (گوزاتیون) یکی از سموم موثر بر کرم سیب در آزمایشات بوده و همچنان برای این آفت توصیه می شود، بررسی ها نشان داده است که تتراکلروینفوس (گاردونا) روی کرم سیب به اندازه متیداتیون (سوپراکسید) و آزینفوس متیل (گوزاتیون) موثر بوده است (بلومفیلد،^۱۲۰۰۳). ترکیبی نظیر سوپر اسید، گوزاتیون، فوزولون، اکامت، سوین، سومی تیون روی کرم سیب موثر بوده اند و بهتر است در اولین سم پاشی از سموم نفوذی استفاده گردد (گیلومی و ریدل،^۲۲۰۰۷).



شکل ۲-۵- آثار خسارت کرم سیب *Cydia pomonella* (اصلی)

¹ Blomefield

² Giliomee & riedl

۲-۳- ویژگی های دستگاه گوارش در حشرات و راسته بالپولکداران

در حشرات لوله گوارش یا کانال غذایی، لوله نسبتاً طولی است که از حفره دهانی آغاز و به مخرج ختم می شود. مطالعات فیزیولوژیک نشان داده است که در همه حشرات سه بخش اصلی روده جلویی^۱، روده میانی^۲ و روده عقبی^۳ قابل تشخیص می باشد. در طول رشد و نمو جنینی، روده جلویی از فرورفتگی های بافت اکتودرمی در انتهای بخش جلویی بدن توسعه می یابد. روده جلویی و عقبی دارای پوشش کوتیکولی چسبیده به سطح سلولهای پوششی می باشند و روده میانی فاقد آن می باشد (وازکوئز-آریستا و همکاران، ۱۹۹۹؛ نیشن، ۲۰۰۲).

روده میانی محل اصلی ترشح آنزیم های گوارشی و هضم در بیشتر حشرات می باشد. در بسیاری از حشرات، لوله های کور در قاعده یا نزدیک روده میانی وجود دارند، اما ممکن است این لوله های کور در نقاط مختلفی در طول روده میانی مشاهده شوند. در بعضی از حشرات، لوله های کور محل اصلی جذب محصولات هضم شده می باشد. به علاوه ساختار لوله های کور مشابه بخش میانی روده گزارش شده است، به طوری که سلولهای پوششی میکروویلی های این منطقه، قابلیت ترشح آنزیم های گوارشی را دارند (نیشن، ۲۰۰۲).

لارو های راسته بالپولکداران دارای یک روده جلویی خیلی باریک، روده میانی بزرگ، طویل و نسبتاً مستقیم و روده عقبی کوتاه می باشد. تقریباً هیچ ذخیره و هضمی در روده جلویی صورت نمی گیرد، بلکه هضم در روده میانی توسط سلولهای ستونی انجام می پذیرد. ثابت شده است که نوع رژیم غذایی در شکل بخش های مختلف لوله گوارش تاثیر دارد. تقریباً همه لاروهای راسته بالپولکداران از بافتهای گیاهی تغذیه کرده و به نظر می رسد تغییرات لوله گوارش در ایجاد سازگاری در جهت عبور دادن سریع غذا در طول روده میانی طویل و توانایی انجام عمل هضم است. زمانی که حجم زیادی از غذا موجود

¹ Foregut

² Midgut

³ Hindgut

⁴ Vazquez-Arista

⁵ Nation

باشد، تغذیه تقریباً پیوسته است و لاروها ممکن است در یک شبانه روز حتی بیشتر از وزن بدن خود غذا بخورند. هضم و جذب در امتداد طول روده میانی، با ترشحات آنزیمی سلول های ستونی انجام می گیرد و pH معده به دلیل ترشح مداوم بی کربنات پتاسیم به داخل لومن توسط سلولهای جامی شکل، قلیایی می باشد (نیشن، ۲۰۰۲).

به دلیل اینکه حشره کامل و لارو بالپولکداران دارای دو شکل متفاوت زندگی و عادات تغذیه ای هستند، لوله گوارش در حشرات کامل، کاملاً متفاوت از لاروها بوده و بسیاری از حشرات کامل بالپولکداران فقط از شهد گلها تغذیه کرده و این شهد در چینه دان ذخیره شده و به تدریج برای عمل وارد روده میانی می شود. بعضی از حشرات کامل دارای قطعات دهانی تحلیل رفته هستند و اصلاً تغذیه ندارند این حشرات فقط برای جفت گیری و تخم گذاری زنده مانده و عمر کوتاهی دارند (نیشن، ۲۰۰۲).

۲-۴- آنزیم های گوارشی

۲-۴-۱- نحوه عمل آنزیم

آنزیم ها کاتالیزورهای زیستی هستند که واکنش های شیمیایی درون سلولها را تسهیل و تسریع می کنند. کاتالیزورها در واکنش ها بدون تغییر می مانند ولی آنزیم ها مانند سایر پروتئین ها تحت شرایط مختلف پایدار نمی مانند. این مواد در اثر حرارت بالا، وجود اسید ها و قلیا ها تغییر می کنند (مجد و شریعت زاده، ۱۳۸۵). آنزیم ها پروتئین هایی هستند که یک یا چند محل ویژه به نام جایگاه های فعال دارند. هر ماده ای که آنزیم بر آن اثر کند یک سوبسترا است. سوبسترا به جایگاهها متصل می شود. در نتیجه این کنش متقابل، سوبسترا از نظر شیمیایی تغییر پیدا کرده و به یک یا چند محصول تبدیل می شود (مجد و شریعت زاده، ۱۳۸۵). آنزیم ها واکنش را تا رسیدن به حالت تعادل تسریع می کنند. آنزیم ها آنقدر موثرند که ممکن است یک واکنش را 10^8 تا 10^{11} بار سریع تر از حالت غیر کاتالیزوری به انجام برسانند. آنزیم ها تا حد زیادی برای سوبسترای خود اختصاصی هستند و اغلب مولکول های نزدیک

و مشابهی را که تفاوت شکل اندکی دارند نمی پذیرند. علت اختصاصی بودن آنزیم ها را باید در ساختمان فضایی آن با سوبسترا جستجو کرد (مجد و شریعت زاده، ۱۳۸۵).

۲-۴-۲- طبقه بندی و نام گذاری آنزیم ها

آنزیم ها را بر حسب واکنش های شیمیایی که کاتالیز می کنند به ۶ گروه اصلی اکسیدوردوکتازها، ترانسفرازها، هیدرولازها، لیازها، ایزومرازها و لیگازها تقسیم بندی می کنند. هیدرولازها بیشتر در واکنش های هیدرولیزی شرکت می کنند. بیشتر واکنش هایی که در دستگاه گوارش حشرات توسط آنزیم های گوارشی کاتالیز می شوند از این نوع می باشند (مجد و شریعت زاده، ۱۳۸۵). سه گروه اصلی هیدرولازها عبارتند از :

۲-۴-۲-۱- **کربوهیدرازها:** این آنزیم هیدرولیز پلی ساکاریدها و دی ساکاریدها را به قندهای ساده کاتالیز می کنند و در بردارنده آنزیم های مختلفی می باشند :

الف- آمیلاز: هیدرولیز نشاسته و تبدیل آن به مالتوز را کاتالیز می کند. آمیلاز در غدد بزاقی و لوله گوارش بسیاری از حشرات یافت می شود.

ب- مالتاز: مالتوز را هیدرولیز و به دو مولکول گلوکز تبدیل می نماید. به همین ترتیب لاکتاز، لاکتوز یا قند شیر را به گلوکز و گالاکتوز هیدرولیز می کند.

۲-۴-۲-۲- **استرازها:** این گروه از آنزیم ها استرازها را به الکل و اسید هیدرولیز می نمایند.

الف- لیپاز: به آن دسته از آنزیم ها اطلاق می شود که تجزیه چربی های خنثی به اسیدهای چرب و گلیسرول را کاتالیز می نمایند.

ب- فسفاتاز: این گروه را نیز می توان در گروه استرازها طبقه بندی نمود زیرا هیدرولیز استرازهای اسید فسفریک را به یک الکل و اسید فسفریک کاتالیز می نمایند.

۲-۴-۲-۳- **پروتئازها:** پروتئازها هیدرولیز پروتئین و مشتقات آن ها را به اسیدهای آمینه و پپتیدها کاتالیز می کنند (مجد و شریعت زاده، ۱۳۸۵).

۲-۵- ساز و کار ترشح آنزیم های گوارشی

ترشح آنزیم های گوارشی به داخل جوف لوله گوارش به دو صورت ترشح پیوسته و ترشح تنظیم شده انجام می گیرد. در ترشح پیوسته آنزیم ها به محض سنتز شدن از سلول های پوششی بدون توجه به محیط اطراف و بدون نیاز به سیگنال آزاد می شوند ولی در ترشح تنظیم شده آنزیم سنتز و اغلب به صورت زیموژن ذخیره می شوند و هنگامی که یک سیگنال دریافت شود، آزاد می شوند (لهان و بولر، ۱۹۹۶). بیشتر حشراتی که تا به امروز مطالعه شده اند از ترشح پیوسته بجای ترشح تنظیم شده بهره می جویند (مفات و همکاران، ۱۹۹۵).

علائمی که منجر به ترشح آنزیم های گوارشی می گردند ممکن است ناشی از تحریک بوجود آمده توسط غذای خورده شده باشد، که به این حالت کنترل غذایی گفته می شود (لهان و بولر، ۱۹۹۶). در این مورد که این مواد بطور مستقیم روی سلولهای ترشح کننده آنزیم عمل می کنند، یا از طریق سلولهای اندوکرین موجود در لوله گوارش بسیاری از حشرات عمل می کنند، به خوبی شناخته شده نیست (نیشن، ۲۰۰۲).

در سلولهای روده میانی بالپولکداران، تریپسین با غشاء وزیکول های کوچک موجود در داخل سلولهای روده میانی ترکیب می گردد. این وزیکول ها به میکروویلی های سلول های ستونی منتقل شده و در آنجا تریپسین به صورت حلال در داخل وزیکول ها در می آید. از طریق فرآیند اگزوسیتوز، وزیکول ها بصورت وزیکول های دو جداره از میکروویلی ها جوانه می زنند و محتویات آنها به داخل جوف لوله گوارش آزاد می شود (سانتوس و ترا^۴، ۱۹۸۴؛ سانتوس و همکاران، ۱۹۸۳). فرآیند مشابهی در پشه *Aedes aegypti* (L) رخ می دهد (گراف^۴ و همکاران، ۱۹۸۹)، که در آن وزیکول های حاوی تریپسین محلول به غشاهای میکروویلی ها متصل می گردند و با ساز و کار اگزوسیتوز تریپسین آزاد می شود.

¹ Lehane & Buller

² Moffat

³ Santos & Terra

⁴ Graf

جورادو^۱ و همکاران (۱۹۹۶) دریافتند که تریپسین در سلولهای روده میانی لاروهای مگس خانگی *Musca domestica* L در ابتدا توسط یک پیوند پپتیدی به غشاها پیوند می شوند، سپس در جسم گلژی ذخیره شده و به فرم متصل به غشا در وزیکول های ترشحی محصور می شوند. این وزیکول ها با غشا پلاسمایی در سطح تماس بین جوف و لوله گوارش ترکیب می شوند و بنابراین تریپسین در معرض pH لوله گوارش قرار می گیرد. در هر حالت، آماده سازی و ترشح آنزیم به احتمال خیلی قوی یک فرآیند پر هزینه است.

۲-۶- pH لوله گوارش حشرات و اثر آن بر فعالیت آنزیمی

آنزیم دارای یک pH بهینه می باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در pH بالاتر یا پایین تر از آن، فعالیت آنزیم کاهش می یابد. زنجیره های جانبی اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال ممکن است به صورت اسیدها یا بازهای ضعیف عمل نمایند که این عمل آن ها بستگی به حفظ آنها در یک حالت یونیزاسیون خاص دارد. به علاوه، زنجیره های جانبی سایر اسیدهای آمینه موجود در محل های دیگر ساختمان پروتئین نیز در واکنش های متقابلی شرکت می نمایند که برای ایجاد و حفظ ساختمان پروتئین مفید هستند (محمدی، ۱۳۸۵). مقدار pH هر بخش از لوله گوارش به میزان زیادی عمل هرگونه از آنزیم های ترشح شده یا حمل شده همراه با غذا به داخل آن بخش را تحت تاثیر قرار می دهد. علاوه بر این، pH لوله گوارش ممکن است حلالیت مواد بلعیده شده، سمیت بعضی از سموم بالقوه و جمعیت میکروارگانیزم های لوله گوارش را تحت تاثیر قرار دهد (نیشن، ۲۰۰۲).

مقدار pH لوله گوارش بویژه روده میانی یکی از مهم ترین ویژگی های محیط داخلی بدن حشره است که بر روی آنزیم های گوارشی تاثیر می گذارد. گزارش های زیادی از pH جوف لوله گوارش در بسیاری از حشرات وجود دارد که متناسب با pH بهینه فعالیت آنزیم های گوارشی آنها می باشد (ترا و فریرا^۲، ۱۹۹۴؛ میلر و همکاران^۳، ۱۹۹۵). بررسی ها نشان می دهد که pH روده میانی یک خصوصیت خاص

¹ Jordao

² Terra & Ferreira

³ Miller

گونه است و علاوه بر آن معمولا در داخل راسته های مختلف حشرات حفظ می شوند (گری سون،^۱ ۱۹۸۵؛ برن بام،^۲ ۱۹۸۰). با این حال، بعضی تاکسون ها، مانند دوبالان و سخت بالپوشان تنوع قابل توجهی در این ویژگی نشان می دهند. در سخت بالپوشان pH روده میانی از خیلی اسیدی (pH=۳-۴) در Chrisomelide و Meloidae تا pH بسیار قلیایی (۸-۹) در لارو Scarabaeidae متغیر است (کریستلر^۳ و همکاران، ۱۹۹۰؛ شابراری^۴ و همکاران، ۲۰۱۴). در راسته ناجوربالان pH روده میانی اسیدی می باشد (ترا و فریرا، ۱۹۹۴).

۲-۷- دما و اثر آن بر فعالیت آنزیمی

رحیمی^۵ و همکاران (۲۰۱۱) اظهار داشتند که هر آنزیم دارای طیف دمایی مناسب برای فعالیت است، در دما های بالاتر از این طیف، تغییر در ترکیب ساختار بخصوص در مراکز آنزیم به وجود می آید. بنابراین تا زمانی که دما ترکیب سه بعدی آنزیم را از بین نبرده باشد، می تواند به عنوان یک کاتالیزور در واکنش عمل نماید. هر آنزیم برای فعالیت بهینه حد خاصی از دما را می پذیرد، افزایش دما باعث تغییر در ویژگی های سینتیکی واکنش دهنده ها (سوبسترا و آنزیم) می گردد و در نتیجه شدت واکنش آنزیمی و جذب انرژی بالا توسط آنزیم، ترکیب سه بعدی آن از هم گسیخته و فعالیت آن کاهش می یابد. برآورد بین مولکول ها با افزایش دما افزایش می یابد، این باعث می شود مولکول های بیشتری به انرژی فعال تبدیل شوند که میزان واکنش را افزایش می دهد. از آنجایی که مولکول ها نیز سریعتر حرکت می کنند، برخورد بین آنزیم و سوبسترا نیز افزایش می یابد. همانطور که تمام پروتئین ها، درجه حرارت بیش از ۴۰ درجه سانتیگراد، شروع به تجزیه می کنند. بنابراین، دو انتهای محدوده فعالیت برای آنزیم تعیین می شود که در چه درجه حرارتی فعالیت را شروع می کند و در چه درجه حرارتی شروع به تجزیه شدن و از بین رفتن می کند (مارینوتی و جیمز،^۶ ۱۹۹۰).

¹ Grayson

² Berenbaum

³ Christeller

⁴ Shabarari

⁵ Rahimi

⁶ Marinotti & James

۲-۸- فلزات سنگین و اثر آن بر فعالیت آنزیمی

در کتب و مراجع گوناگون تعاریف و تفسیرهای مختلفی از فلزات سنگین به عمل آمده است، علت اطلاق لفظ سنگین، وزن مخصوص بالاتر از ۶ گرم بر سانتی متر مکعب می باشد که این فلزات دارا می باشند. توانایی انسان در استخراج و استفاده از فلزات نقش عمده ای در پیشرفت جامعه امروز ایفا می کند (ویلسون^۱، ۱۹۹۴). بیشتر فلزات دامنه وسیعی برای استفاده دارند اما این استفاده وسیع هزینه سنگینی را بر محیط زیست وارد کرده است، فلزات سنگین با تمام گزارش ها از تاثیرات منفی آنها هم اکنون نیز در حال وارد شدن به محیط هستند (هان^۲ و همکاران، ۲۰۰۲). بیشتر مطالعات انجام گرفته بر تاثیر منفی فلزات سنگین روی موجودات زنده انجام شده است. این اثرات مستقیم به صورت تاثیر کلی، نشان دهنده سمیت فلزات سنگین بر فرآیندهای زیستی مختلف است که حتی در مواردی باعث مرگ و میر می شود. این تاثیر به طور کلی وابسته به غلظت است (ون اوویک^۳ و همکاران، ۲۰۰۷). تاثیر آلودگی فلزات سنگین روی حشرات گیاه خوار در راسته های مختلف بسیار متفاوت است (کورچیوا^۴ و همکاران، ۱۹۹۸). به طور کلی حشرات جونده و مکنده در میان حشرات خشکی زی بیشتر در معرض آلودگی از طریق گیاهان در تنش فلزات سنگین قرار دارند تا جایی که اثرات منفی به وضوح روی حشرات دیده می شود (ون اوویک و همکاران، ۲۰۰۷). پژوهش های انجام گرفته روی حشرات مختلف، بیشتر رشد و تولیدمثل را مورد بررسی قرار می دهند، این موضوع که گیاهان به عنوان واسطه و منتقل کننده فلزات سنگین به حشرات گیاه خوار می باشند به وضوح ثابت شده است (لینکوویست^۵، ۱۹۹۲). اگر فلزات می توانند بر رشد اثر بگذارند پس این توانایی را دارند که روی سامانه های دیگر حشرات همانند سامانه گوارشی نیز اثر گذار باشند (ون اوویک و همکاران، ۲۰۰۷). روی تنها فلزی است که در تمامی طبقه های آنزیمی وجود دارد (بروآدلی^۶ و همکاران، ۲۰۰۷). در پروتئین ها، یون های روی بیشتر همراه با

¹ Wilson

² Han

³ Van Ooik

⁴ Koricheva

⁵ Lindqvist

⁶ Broadley

اسیدهای آمینه آسپارتیک، گلوتامیک، سیستئین و هیستیدین می باشند (براندت^۱ و همکاران، ۲۰۰۹). مقادیر بالای روی باعث کاهش جذب مس و آهن می شود. عوامل متعددی می توانند بر اثر فلزات سنگین بر موجودات تاثیر گذار باشند. اولین و مهم ترین مورد ماهیت فلز است و در کنار این ویژگی، غلظت فلز، مدت زمان و گونه مورد آزمایش نیز توانایی تغییر در تاثیر فلزات سنگین را دارند. این موارد بیان کننده این است که ماهیت هر فلز از نظر ضروری بودن یا غیر ضروری بودن تا چه اندازه می تواند بر سیستم های مختلف بدن یک جاندار تاثیر گذار باشد. غلظت فلز در درجه بعدی دارای اهمیت ویژه ای است. غلظت های بالا از فلزات سنگین توانایی سمیت را دارند و به خوبی در تحقیقات مختلف ثابت شده است ولی این موضوع که اثر مقادیر پایین از این فلزات چگونه می توانند بر موجودات تاثیر بگذارند تاکنون مورد بررسی کمتری قرار گرفته است به ویژه زمانی که موضوع بحث، فلزات سنگین ضروری است که نقش مهمی را در فیزیولوژی ایفا می کنند. زیرا آنزیم ها به وسیله این فلزات متلاشی شده و قدرت آنزیمی خود را ازدست می دهند. به علاوه این فلزات در سوخت و ساز بدن وارد شده و عمل متابولیسم را مختل می نمایند (فوسمیر،^۲ ۱۹۹۰).

۲-۹- آنزیم های گوارشی در حشرات

کربوهیدراتها از مهم ترین مواد غذایی مورد استفاده در حشرات می باشد. کربوهیدرات ها به عنوان منبع اصلی و ابتدایی انرژی توسط اکثر حشرات مصرف می شوند. بیشتر حشراتی که تاکنون آزمایش شده اند به مقداری کربوهیدرات در رژیم غذایی نیاز دارند و هنگامی که نسبت کربوهیدرات افزایش می یابد رشد بهتری دارند. کربوهیدرات اساسا به مونو ساکارید اطلاق می شوند و نشاسته و گلیکوژن، پلی ساکاریدهای اصلی ذخیره ای گیاهان و حشرات می باشند استفاده از کربوهیدرات های مختلف به توانایی حشره در هیدرولیز کردن پلی ساکارید ها و خصوصیت سیستمهای آنزیمی مشارکت کننده در فرآیندهای متابولیکی بستگی دارد پروتئین ها یک جزء مهم از غذای حشرات را تشکیل می دهند که

¹ Brandt

² Fosmire

محصولات هضم آن‌ها در بسیاری از فرآیندهای زیستی حشرات نقش حیاتی ایفا می‌کنند. پروتئین‌ها، پلیمرهای حاصل از دهیدراتاسیون اسیدهای آمینه هستند که در آن‌ها هر اسید آمینه توسط یک نوع پیوند کووالانسی به اسید آمینه مجاور خود متصل شده است. گروهی از آنزیم‌ها بنام پروتئازها یا آنزیم‌های هیدرولیز کننده پروتئین‌ها، به روش‌های مختلف پروتئین‌های غذایی خورده شده توسط حشره را قابل جذب و بهره‌برداری می‌سازند. (چپمن^۱، ۱۹۹۸).

نیازهای غذایی حشرات از لحاظ پیچیدگی و گسترش شاید کمتر از مهره‌داران نیست. این نیازها به ویژه در مراحل رشدی آنها بسیار مهم است. امروزه ثابت شده است که اگر بعضی از اسیدهای آمینه مانند تریپتوفان و سیستئین به مقداری کافی در غذای حشرات وجود نداشته باشد عمل رشد دچار اختلال شدید می‌شود. توانایی استفاده از مواد غذایی گیاهی و جانوری در حشرات وابسته به حضور آنزیم‌های خاص دارد، به عبارتی تغذیه و رشد در حشرات بسته به وجود آنزیم‌های کربوهیدراز و پروتئاز به منظور هضم مواد قندی و پروتئین‌ها در حشرات می‌باشد (لهان و بولر، ۱۹۹۶).

۲-۹-۱-آلفا آمیلاز

آلفا آمیلاز در برگیرنده خانواده ای هستند که هیدرولیز پیوند‌ها را در ترکیبات نشاسته ای گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌های وابسته انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها نقش محوری در متابولیسم کربوهیدرات‌ها در جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها دارند. این آنزیم‌ها یکی از بزرگترین خانواده‌های آنزیمی گروه گلایکوزیل هیدرولازها هستند که بر مبنای توالی شان طبقه بندی شده اند (آمیگو و فلر^۲، ۲۰۰۰). بسیاری از حشرات بویژه آنهایی که طی مرحله لاروی یا حشره کامل بر روی فرآورده‌های غله ای زندگی می‌کنند، برای زنده ماندن وابسته به آمیلازهایشان هستند (هوری^۳، ۱۹۷۴). تنها آلفا آمیلاز حشرات

¹ Chapman

² D'Amico & Feuer

³ Hori

که ساختار سه بعدی آن مشخص شده است مربوط به گونه *Tenebrio molitor* L می باشد (فریرا^۱ و همکاران، ۲۰۰۱).

۲-۹-۲- گلوکوزیداز و گالاتوزیداز

شامل آنزیم هایی می باشد که الیگوساکارید ها و دی ساکاریدها را هیدرولیز می کنند. گلیکوزیدازها معمولاً بر اساس مونوساکارید ها نام گذاری می شوند. بنابراین گلوکوز حاصل از عمل آنزیم و شکست باندهای آنها از ناحیه آلفا یا بتا گلوکوزیداز حاصل می شود (ترا و فریرا، ۱۹۹۴).

این آنزیم ها به فراوانی در موجودات یافت می شود (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). آلفا گلوکوزیداز در دستگاه گوارش اغلب حشرات یافت می شوند و در عده ای نظیر زنبور عسل در غدد هیپرفارنژیال سر نیز مشاهده شده است (بیکر و لنر،^۲ ۱۹۷۲). هورن و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که عمده فعالیت این آنزیم در روده میانی نقش فیزیولوژیک خود را ایفا می نمایند هرچند که فعالیت این آنزیم در غدد بزاقی حشرات نیز گزارش شده است. وزن مولکولی این آنزیم بین ۶۰ تا ۸۰ کیلو دالتون است. اگرچه در مواردی حالت اولیگومریک از این آنزیم شناخته شده که وزن مولکولی آنها تا ۲۰۰ کیلودالتون مشاهده شده است. به عنوان مثال این حالت در *Drosophilla melanogaster* (Fabricius) دیده شده است (فابریک^۴ و همکاران، ۲۰۰۲).

آلفا گلوکوزیداز در هضم مولکول های کوچک کمک می کند که از گلوکوز رها می شوند و بسیاری از حشرات دارای یک یا چند آلفا یا بتا گلوکوزیداز هستند که دامنه گسترده ای از کربوهیدرات های کوچک را هضم می کنند (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). آلفا گلوکوزیداز مالتوز، ساکارز، تری هالوز، ملزیتور و استاکیوز را هیدرولیز می کند. آلفا گلوکوزیداز حشرات توسط سلولهای پوششی معده میانی ترشح شده و وارد لومن معده میانی می شود (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). یکی از ویژگی های آلفا گلوکوزیدازهای روده

¹ Ferreira

² Baker & Lehner

³ Horne

⁴ Fabrick

میانی حشرات pH بهینه فعالیت آنهاست که در حشرات مختلف بررسی شده است. به عنوان مثال فعالیت بهینه این آنزیم در سوسک *T. molitor* در اسیدیته ۳/۷ (ترا و همکاران، ۲۰۰۵) و در بالپولکی *Erinnys ello* (L) در اسیدیته ۵/۸ (سانتوس و همکاران، ۱۹۸۶) گزارش شده است متفاوت است. در حشرات بالاترین pH برای فعالیت آلفا گلوکوزیداز در بال غشائیان و کمترین آن در سن ها مشاهده است (ترا و فریرا، ۱۹۹۴) و این صرف نظر از ارتباط با pH روده میانی می باشد. بیکر (۱۹۹۱) در مورد شپشه دندانه دار برنج *Sithophilus oryzae* (L) و مارینوتی (۱۹۹۰) در مورد پشه ناقل تب زرد *A. aegypti* (L) مطالعاتی انجام داده و نشان دادند که آلفا گلوکوزیدازهای این حشرات قادر به هیدرولیز اولیگوساکارید ها به مالتوپنتوز هستند.

بتا گلوکوزیدازها دارای نامهای دیگر شامل جنتوبیاز و سلوبیاز نیز می باشد. بتا گلوکوزیداز در همه گیاهان، جانوران، قارچ ها و باکتری ها وجود دارد (اسن، ۱۹۹۳). در حشرات، بتا گلوکوزیداز از چندین راسته گزارش شده است. بتا گلیکوزیدازها بسته به مونوساکاریدی که حذف می کنند، بتا گلوکوزیداز، بتا گالاکتوزیداز، بتا زایلوزیداز و غیره نامیده می شوند (دیویس^۱ و همکاران، ۱۹۹۷). فریرا و همکاران (۱۹۹۸) آزمایشات گسترده ای جهت بررسی فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز روی سوبستراهای مختلف در حشرات راسته سخت بالپوشان، بالپولکداران، بال غشائیان و راست بالان انجام دادند. همچنین پونتو و لو^۳ (۲۰۰۲) فعالیت بتا گلوکوزیداز در روده میانی زنبور عسل *Apis mellifera* (L.) را با استفاده سوبسترای p-nitrophenyl-β-D-glucoside مورد مطالعه قرار دادند.

مطالعات بسیاری در مورد ویژگیهای بیوشیمیایی آلفا و بتا گلوکوزیداز حشرات از راسته های مختلف مانند بالپولکداران، ناجوربالان و سخت بالپوشان توسط مارانا^۴ و همکاران (۲۰۰۰)، آزدو^۵ و همکاران

¹ Esen

² Davis

³ Pontoh & Low

⁴ Marana

⁵ Azevedo

(۲۰۰۳)، ناکونیزی^۱ و همکاران (۲۰۰۶)، یاپی^۲ و همکاران (۲۰۰۹)، رمزی^۳ و همکاران (۲۰۱۰)،
قدمیاری^۴ و همکاران (۲۰۱۰) و بیکر (۱۹۹۱)، فریرا و همکاران (۱۹۹۹) و غیره انجام گرفته است.

گراسمن و ترا^۵ (۲۰۰۱) به مطالعه آنزیم آلفا گالاکتوزیداز و خصوصیات بیوشیمیایی و اثرات دما، pH و ترکیبات شیمیایی روی آن در روده میانی لاروهای *T. molitor* و *Spodoptera frugiperda* (S) پرداختند.

۲-۹-۳- پروتئازها

آنزیم های مسئول هیدرولیز کامل پروتئین ها به اسیدهای آمینه، پروتئازها هستند. پروتئازها آنزیم های عمل کننده روی پیوندهای پپتیدی هستند و شامل اندو پپتیدازها و اگزو پپتیدازها می باشند. پروتئینازها براساس مکانیزم کاتالیک با استفاده از معرف های ویژه یا تعیین اثر pH بر فعالیت آن ها به زیر رده هایی تقسیم می شوند (ترا و فریرا، ۱۹۹۴) که عبارتند از :

الف) سرین پروتئازها : این آنزیم ها دارای فعالیت بهینه در محیط قلیایی می باشند.

ب) سیستئین پروتئینازها : فعالیت بهینه آن ها در شرایط اسیدی است.

ج) آسپارتیک پروتئینازها : فعالیت بهینه آن ها در pH کمتر از ۵ می باشد.

د) متالو پروتئینازها : نیاز به یک یون فلزی در فرآیند کاتالیز دارند.

اگزو پپتیدازها شامل آنزیم هایی هستند که یک اسید آمینه را از انتهای آمینی یا از انتهای کربوکسیلی زنجیره هیدرولیز می کنند. دی پپتیدازها منجر به هیدرولیز پیوند پپتیدی بین دو اسید آمینه می گردند.

¹ Nakonieczny

² Yapi

³ Ramzi

⁴ Ghadamyari

⁵ Grossmann

۲-۹-۴- سرین پروتئازها

از آنزیم های این گروه میتوان به تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز اشاره نمود. آنزیم های مذکور از لحاظ ساختمانی با همدیگر متفاوت بوده و در نتیجه با سوبستراهای مختلفی وارد واکنش می شوند. حدود ۴۰ خانواده از سرین پپتیدازها وجود دارد که با توجه به اسید آمینه موجود در محل کاتالیک از هم تفکیک می شوند، این ۴۰ خانواده به هفت کلان (Clan) گروه بندی می گردند : SA ، SB ، SC، SE ، SF ، SH و TA (بارت و همکاران، ۱۹۹۸).

SA: آنزیم های این گروه در محل فعال خود به ترتیب دارای اسید آمینه های هیستیدین، آسپارتیک اسید و سرین می باشند.

SB: آنزیم های این گروه در محل فعال خود به ترتیب دارای اسید آمینه های آسپارتیک اسید، هیستیدین و سرین می باشند.

SE: آنزیم های این گروه در محل فعال خود به ترتیب دارای اسید آمینه های سرین و لیزین می باشند.

SC: آنزیم های این گروه در محل فعال خود به ترتیب دارای اسید آمینه های سرین، آسپارتیک اسید و هیستیدین می باشند.

SF: آنزیم های این گروه در محل فعال خود به ترتیب دارای اسید آمینه های سرین و لیزین یا سرین و هیستیدین می باشند.

SH: آنزیم های این گروه در محل فعال خود به ترتیب دارای اسید آمینه های هیستیدین، سرین و هیستیدین می باشند.

TA: آنزیم هایی را شامل می شود که گروه نوکلئوفیل در انتهای آمین آنها می باشد.

¹ Barret

گروه نوکلئوفیل در کلان SA، SB، SC، SH هیدروکسیل اسید آمینه هیستیدین و در SE و SF گروه هیدرکسیل لیزین می باشد (بارت^۱ و همکاران، ۱۹۹۸).

۲-۹-۵- تریپسین

تریپسین اولین بار در سال ۱۸۷۶ توسط کوهن در ترشحات پانکراس تشخیص داده شد. حدود ۱۰۹ توالی تریپسین حشرات در بانک ژن تا مارس ۲۰۰۳ ثبت شده است (گیلبرت^۲ و همکاران، ۲۰۰۵)، که بسیاری از آنها متعلق به سن ها (زنگ^۳ و همکاران، ۲۰۰۲)، سخت بالپوشان (تاتلی^۴ و همکاران، ۲۰۱۰)، دوبالان (گیلبرت و همکاران، ۲۰۰۵)، کک ها (رابوسی^۵ و همکاران، ۲۰۰۴) و بالپولکداران (ژو^۶ و همکاران، ۲۰۰۲) می باشند.

تریپسین ها سرین پروتئینازهایی هستند که ترجیحا زنجیره های پروتئینی را از طرف کربوکسیلی اسیدهای آمینه بازی مانند آرژنین یا لیزین می شکنند. فعالیت آنزیم شبه تریپسین گوارشی در بیشتر حشرات گزارش شده است. بیشتر تریپسین های گزارش شده در حشرات دارای وزن مولکولی در حدود ۲۰ تا ۳۵ کیلودالتون و مقادیر مختلف pH (دامنه ۴ تا ۵) می باشند. مقدار pH فعالیت بهینه بدون هیچ گونه سازگاری با pH موجود در روده میانی همیشه قلیایی است (غالبا بین ۸ تا ۹). تریپسین های خالص شده از بالپولکداران مقدار pH بهینه بالاتری برای فعالیت تریپسین به دلیل بالاتر بودن pH لوله گوارش نشان می دهند. در تریپسین استخراج شده از چندین حشره فعالیت هیدرولیزی ویژه آنها در پلی پتیدها مشخص شده است (ترا و فریرا، ۱۹۹۴).

۲-۹-۶- کیمو تریپسین

حدود ۶۳ توالی از کیموتریپسین حشرات در بانک ژن تا مارس ۲۰۰۳ ثبت شده است که متعلق به ۲۲ گونه از ۶ راسته حشرات می باشد (بارت و همکاران، ۱۹۹۸). این توالی ها متعلق به راسته نیم بالپوشان

¹ Barret

² Gilbert

³ Zeng

⁴ Tatli

⁵ Rabossi

⁶ Zhu

(کلباچ^۱ و همکاران، ۲۰۰۲)، سخت بالپوشان (تاتلی و همکاران، ۲۰۱۰)، بال غشائیان (ویت ورس^۲ و همکاران، ۱۹۹۸)، کک ها (رابوسی و همکاران، ۲۰۰۴)، دوبالان (کاسو^۳ و همکاران، ۱۹۹۴) و بالپولکداران (پترسون^۴ و همکاران، ۱۹۹۵) می باشند. کیموتریپسین ها سرین پروتئینازهایی هستند که زنجیره پروتئینی را از طرف کربوکسیل اسیدهای آمینه آروماتیک همچون فنیل آلانین، تریپتوفان، تیروزین و لوسین می شکنند (بارت و همکاران، ۱۹۹۸).

بیشتر کیموتریپسین های حشرات دارای وزن مولکولی در حدود ۲۰ تا ۳۰ دالتون می باشند و pH بهینه فعالیت آن ها در حدود ۸ تا ۱۱ بدون سازگاری با pH روده میانی می باشد. کیموتریپسین ها در بالپولکداران همانند تریپسین ها دارای pH بهینه بالاتری نسبت به دیگر حشرات می باشد (ترا و فریرا، ۱۹۹۴).

۲-۹-۷- الاستاز

از زمانی که کریستلر و همکاران (۱۹۹۰) شبه الاستازها را در سیرسیرک *Teleogryllus commodus* (Walker) تشخیص دادند، شناسایی این آنزیم در بسیاری دیگر از حشرات مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۹-۸- لیپاز

آنزیم لیپاز عموماً به عنوان هیدرولازهای تری آسیل گلیسرول های کربوکسیل استر را در دی آسیل گلیسرول ها، گالاکتو لیپیدها و فسفو لیپیدها و بویژه در تری آسیل گلیسرول ها می شکنند، بنابراین نقش کلیدی در کنترل جذب، انتقال و بهره برداری از لیپید دارند (هورن و همکاران، ۲۰۰۹). لیپازها گروهی از آنزیمها هستند که تری گلیسرول را به دی و مونو گلیسرول ها همراه با اسیدهای چرب به عنوان محصولات جانبی هیدرولیز میکنند (مرداکوویچ^۵ و همکاران، ۲۰۰۸؛ شارما و همکاران، ۲۰۰۱)

¹ Colebatch
² Withworth
³ Casu
⁴ Peterson
⁵ Mrdakovic

علاوه بر این استری کردن و تجزیه آمینها، اسیدها و بازها را نیز کاتالیز میکنند (حسن^۱ و همکاران، ۲۰۰۹).

آنزیم لیپاز بطور وسیع در عالم طبیعی گسترش یافته و ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی و فعالیتهای آنها در بسیاری از گونه های جانوران، گیاهان، باکتریها، مخمرها و قارچها بررسی شده است (مرداکوویچ و همکاران، ۲۰۰۸).

لیپیدها برای پوست اندازی در طول ظهور حشرات بالغ در بالپولکداران بسیار مهم میباشند (ماجومدر و سنگوپتا،^۲ ۱۹۷۹). لیپیدها و لیپازها اعمال مختلفی را در حشرات انجام میدهند، به عنوان مثال لیپیدها به تولید مثل و تولید تخم های بیشتر توسط ماده ها، کمک شایانی مینمایند. لیپیدها تقریباً ۴۰ درصد وزن خشک تخم های *Manduca sexta* (L.) را تشکیل میدهند (کاوویا و همکاران، ۱۹۸۸). ماده های گرسنه تعداد تخم های کمی میگذارند اما پس از تغذیه این تعداد افزایش می یابد (زیگلر،^۴ ۱۹۹۱) که این رفتار در کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Hubner) هم مشاهده شده است (همتی^۵ و همکاران، ۲۰۱۷).

لیپازها از سلول های معده میانی تولید می شوند و این آنزیم ها تری آسید گلیسرول ها را هیدرولیز می کنند که با تشکیل مونوآسید گلیسرول و اسید های چرب آزاد همراه است. در بعضی از گونه ها بویژه در بالپولکداران که pH بالایی در مجرای معده میانی دارند انتقال آسید و هیدرولیز منجر به تولید گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد می شوند (کاناوسو و همکاران، ۲۰۰۱).

¹ Hasan

² Majumder & Sengupta

³ Kawooya

⁴ Ziegler

⁵ Hemati

⁶ Canavoso

فصل سوم

مواد و روشها

۳-۱- جمع آوری لاروها

به منظور جمع آوری لاروهای کرم سیب (*Cydia pomonella* (L.)) جهت انجام آزمایش ها ابتدا، با استفاده از تله های فرمونی کرم سیب، اوج پرواز حشرات کامل این آفت ردیابی و تعیین شد. معمولا ۲۱ روز بعد از تاریخ اولین ظهور که با شمارش پروانه های جلب شده به تله ها ثبت می شد، جمع آوری میوه های سیب رقم نار از باغات مختلف شهرستان تربت جام انجام می شد. با توجه به اینکه کرم سیب ۳-۴ نسل در سال دارد، تله گذاری و جمع آوری میوه های آلوده در فصل های بهار و تابستان ادامه داشت. میوه های آلوده معمولا محتوی یک عدد لارو بودند که با باز کردن میوه ها، لارو سن ۵ از محل دالان لاروی به آرامی و با استفاده از یک پنس برداشته شده و جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار می گرفت. چنانچه لاروها هنوز کوچک بوده و به سن پنج نرسیده بودند، لاروها به روی میوه سیب سالم منتقل شده و در شرایط آزمایشگاه دمای 1 ± 27 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 10 ± 50 درصد و دوره نوری ۸: ۱۶ (تاریکی : روشنایی) نگهداری می شدند تا تغذیه خود را کامل کرده و کاملا پشت گلی شوند. لازم به ذکر است طول بدن لارو سن پنج ۲۰-۱۵ میلیمتر، عرض کپسول سر ۴-۲ میلیمتر و سطح پشتی بدن آن صورتی گلی رنگ است.

۳-۲- تشریح لاروها و جدا سازی لوله گوارشی

به منظور جداسازی لوله گوارشی از بدن لاروها براساس روشن کوهن^۱ (۱۹۹۳) عمل شد. ابتدا لاروها روی قطعات یخ بی حس شدند. سپس روی یخ به کمک دو عدد پنس، سر لارو را جدا کرده و با استفاده از اسکالپل، بدن لارو را به شکل طولی برش داده و بدین ترتیب لوله گوارش به طور کامل آشکار شد و پس از حذف بافت های چربی لوله گوارشی از بدن استخراج می شد. لوله گوارش در داخل میکروتیوب هایی با حجم ۱/۵ میلی لیتر قرار داده شد. نمونه های تشریح شده بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری می شدند.

¹ Cohen

۳-۳- تهیه عصاره آنزیمی

۳-۳-۱- همگن سازی نمونه ها

نمونه های درون میکروتیوب ها، به وسیله یک همگنه ساز شیشه ای با مقداری آب مقطر و در دمای ۴ درجه سانتیگراد بطور جداگانه همگنه سازی شدند.

۳-۳-۲- سانتریفیوژ نمونه ها

با توجه به نیاز آزمایش، نمونه های هموژینایز شده سانتریفیوژ گردید (SIGMA, 3-16 KL). برای این منظور نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، بخش رو نشین نمونه ها به عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

۳-۴- تهیه بافر

برای آزمایش های آنزیمی و تعیین pH مناسب برای فعالیت های آنزیمی، بافر یونیورسال استات-فسفات-بورات سدیم ۴۰ میلی مولار که دامنه وسیعی از pH های اسیدی و قلیایی (۱۲-۲ pH) را شامل می شود مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۵- تهیه معرف ها

۳-۵-۱- معرف دی نیترو سالیسیک اسید^۱

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از این معرف یک گرم دی نیترو سالیسیک اسید را با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده به خوبی حل کرده، سپس ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات به آن اضافه کرده و هم زده تا کاملاً یکنواخت گردد. سپس ۲۰ میلی لیتر از محلول سدیم هیدروکسید دو مولار به آن افزوده و حجم کل با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می شود. این معرف برای احیای واکنش های مربوط به آنزیم آلفا آمیلاز و رنگی شدن ترکیب بافر و عصاره آنزیم استفاده می شود.

¹ Homogeniz

² Supernatant

³ DNSA

۳-۵-۲- معرف تری کلرو استیک اسید^۱

این معرف به منظور متوقف کردن واکنش های پروتئولیتیک در غلظت ۳۰-۱۰ درصد تهیه شد.

۳-۶- سوبستراها

۱- بنزوئیل-ال-آرژنین-پی-نیتروآلانید^۲: سوبسترای ویژه برای سنجش فعالیت تریپسین که در غلظت نهایی ۱ میلی مولار مورد استفاده قرار گرفت.

۲- ساکسینیل-آلانین-آلانین-پرولین-فنیل آلانین-پی-نیتروآلانید^۳: سوبسترای ویژه برای سنجش فعالیت کیمو تریپسین که در غلظت نهایی ۱ میلی مولار مورد استفاده قرار گرفت.

۳- ان-ساکسینیل-آلانین-آلانین-آلانین-پی-نیتروآلانید^۴: سوبسترای ویژه برای سنجش فعالیت الاستاز که در غلظت نهایی ۱ میلی مولار مورد استفاده قرار گرفت.

۴- پارا نیتروفنیل آلفا گلوکوپیرانوزید^۵: سوبسترای ویژه برای سنجش فعالیت آلفا گلوکوزیداز که در غلظت نهایی ۵ میلی مولار تهیه شد.

۵- پارا نیتروفنیل بتا گلوکوپیرانوزید^۶: سوبسترای ویژه برای سنجش فعالیت بتا گلوکوزیداز که در غلظت نهایی ۵ میلی مولار تهیه شد.

۶- نشاسته: سوبسترا برای سنجش فعالیت آلفا آمیلاز که در غلظت ۱٪ مورد استفاده قرار گرفت.

۷- آزوکازئین : سوبسترای تخصصی برای سنجش فعالیت پروتئاز عمومی در غلظت نهایی ۱ میلی مولار تهیه شد.

¹ TCA
² BApNA
³ SAAPPpNA
⁴ SAApNA
⁵ pNP α Glu
⁶ pNP β Glu

۸- پارانیتر و فنیل بوتیرات: سوبسترای تخصصی برای سنجش فعالیت لیپاز که در غلظت نهایی ۵۰ میلی مولار تهیه شد.

۳-۷- سنجش فعالیت گلوکوزیدازی

۳-۷-۱- تعیین pH بهینه آنزیم آلفا آمیلاز

بدین منظور ۲۰ میکرولیتر آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر بافر با دامنه pH (۵-۱۱) و ۱۵ میکرولیتر سوبسترا (نشاسته ۱٪) مخلوط و به مدت ۳۵ دقیقه در حمام بن ماری با دمای ۳۸ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر معرف DNS به منظور متوقف کردن واکنش اضافه و برای مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط را داخل چاهک های پلیت ریخته و با طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر (مدل ELX-۸۰۰) خوانده و نتایج ثبت شد (برن فلد، ۱۹۵۵).

۳-۷-۲- تعیین دمای بهینه آنزیم آلفا آمیلاز

بدین منظور ۲۰ میکرولیتر آنزیم و ۱۰۰ میکرولیتر بافر با PH بهینه و ۱۵ میکرولیتر سوبسترا (نشاسته ۱٪) مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام بن ماری با دمای (۲۰-۳۰-۳۵-۴۰-۴۵-۵۰) انکوبه شد. سپس مقدار ۲۵ میکرولیتر معرف DNS به منظور متوقف کردن واکنش افزوده، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل را در چاهک های پلیت ریخته و با طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده و نتایج ثبت شد (برن فلد، ۱۹۵۵).

۳-۷-۳- تعیین pH بهینه های آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز براساس روش لو و همکاران (۱۹۸۶) و پری^۳ (۱۹۹۶) با اندکی تغییر انجام شد.

¹ Bernfeld

² Low

³ Parry

به این منظور ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۸۵ میکرولیتر بافر با $\text{pH} = 5-13$ در حضور ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی به ترتیب $\text{pNP}\alpha\text{Glu}$ ، $\text{pNP}\beta\text{Glu}$ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید دو مولار واکنش متوقف و میزان پارانیتروفنل آزاد شده توسط میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری و نتایج ثبت گردید.

۳-۷-۴- تعیین دمای بهینه آنزیم های آلفا گلوکوزیداز 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 $\text{pNP}\alpha\text{Glu}$ ، $\text{pNP}\beta\text{Glu}$ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای مورد آزمایش (۳۰-۲۰-۳۵-۴۰-۴۵-۵۰) قرار گرفتند. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید دو مولار واکنش متوقف و میزان پارانیتروفنل آزاد شده توسط میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری و نتایج ثبت گردید.

۳-۸-۸- سنجش فعالیت پروتئولیتیکی

۳-۸-۱- تعیین pH بهینه آنزیم های سرین پروتئازها

بررسی وجود و میزان فعالیت اندوپروتئینازهای تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز در عصاره لوله گوارشی کرم سیب با استفاده از سوبستراهای تخصصی و بر اساس روش گارسینا-کرنو^۱ و هارد (۱۹۹۳) انجام شد.

سوبستراهای BApNA ، SAAPPpNA ، SAAApNA در غلظت نهایی ۱ میلی مولار و به میزان ۵ میکرولیتر به ترتیب برای تشخیص پروتئاز های تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز در حجم ۸۵ میکرولیتر بافر با $\text{pH} = 5-11$ و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی آغاز شد. با استفاده از میکروپلیت ریدر مقدار فعالیت آنزیمی و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان کل ۲۰ دقیقه و فواصل زمانی یک دقیقه ثبت گردید.

¹ Garcia-Carreno

۳-۸-۲- تعیین دمای بهینه آنزیم های سرین پروتئازها

در این سنجش از سوبستراهای اختصاصی BApNA, SAAPPpNA, 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 دمای (۲۰-۳۰-۳۵-۴۰-۴۵-۵۰) قرار گرفتند. با استفاده از میکروپلیت ریدر مقدار فعالیت آنزیمی و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان کل ۲۰ دقیقه و فواصل زمانی یک دقیقه ثبت گردید.

۳-۸-۳- تعیین pH بهینه پروتئاز عمومی

مخلوط واکنش شامل ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱ درصد، ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۹۰ میکرولیتر بافر با pH موردنظر (۵-۱۱) می باشد که به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه انکوبه شد. هضم پروتئینی با افزودن ۳۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۳۰ درصد، 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 ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. حجمی مساوی از سدیم هیدروکسید یک مولار به روشین افزوده و جذب آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر تعیین گردید.

۳-۸-۴- تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی

بدین منظور ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱ درصد، ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۹۰ میکرولیتر بافر با PH بهینه مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دماهای مورد آزمایش (۲۰-۳۰-۳۵-۴۰-۴۵-۵۰) انکوبه شد. هضم پروتئینی با افزودن ۳۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۳۰ درصد، 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 ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. حجمی مساوی از سدیم هیدروکسید یک مولار به روشین افزوده و جذب آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر تعیین گردید.

۳-۹- فعالیت لیپولیتیک

۳-۹-۱- تعیین pH بهینه آنزیم لیپاز

با توجه به اینکه لیپازها به غشا متصل هستند، بنابراین از بافر فسفات ترایتون دار برای همگن نمودن نمونه استفاده شد. حجم ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی را با ۱۸۰ میکرولیتر بافر فسفات مخلوط نموده، سپس ۲۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل بوتیرات اضافه و هم زده شدند. جذب واکنش در ۴۰۵ نانومتر به طور پیوسته با فاصله زمانی ۱ دقیقه تا ۱۵ دقیقه اندازه گیری می شود.

۳-۹-۲- تعیین دمای بهینه آنزیم لیپاز

برای سنجش، حجم ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی را با ۱۸۰ میکرولیتر بافر فسفات مخلوط نموده، سپس ۲۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل بوتیرات اضافه شده. محلول حاصل در دماهای مورد نظر (۲۰-۳۰-۳۵-۴۰-۴۵-۵۰) به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری قرار گرفت. سپس جذب واکنش در ۴۰۵ نانومتر به طور پیوسته با فاصله زمانی ۱ دقیقه تا ۱۵ دقیقه اندازه گیری می شود.

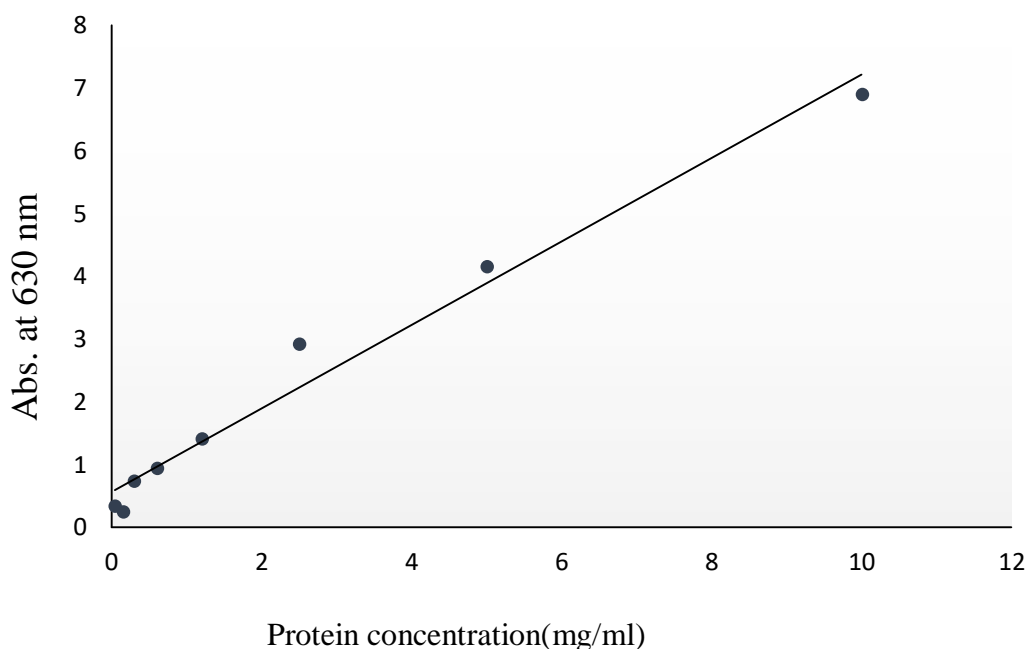
۳-۱۰- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز، سرین پروتئازها و

لیپاز

در این آزمایش اثر یون های آهن Fe^{2+} ، منیزیم Mg^{2+} ، منگنز Mn^{2+} ، روی Zn^{2+} و مس Cu^{2+} در غلظت های متفاوت ۵ و ۱۰ میلی مولار روی فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز، سرین پروتئازها و لیپاز بررسی شدند. پس از تهیه غلظت های مشخص از یون های نامبرده، مقدار ۸۵ میکرولیتر بافر، ۱۰ میکرولیتر یون، ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با هم مخلوط و جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر تعیین گردید.

۳-۱۱- تعیین پروتئین کل

غلظت پروتئین نمونه ها با استفاده از روش لوری انجام شد (لوری^۱ و همکاران ۱۹۵۱). از غلظت پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) یک طیف رقیق شده به صورت (۰/۰۴، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۵، ۵، ۱۰) تهیه شد. سپس از هریک از این غلظت ها در سه تکرار، ۲۰ میکرولیتر را در ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف بردفورد وارد کرده تا رنگ موردنظر ظاهر گردد. سپس منحنی استاندارد بر اساس رسم میزان جذب نمونه ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر نسبت به غلظت پروتئین تهیه گردید.



شکل ۲-۶- منحنی استاندارد پروتئین

۳-۱۲- تجزیه داده ها

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه داده ها با نرم افزار SAS.۹۰۱ انجام شد. مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای توکی صورت گرفت.

¹ Lowry

۳-۱۳- زایمو گرام آلفا آمیلاز

زایموگرام فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در عصاره لوله گوارشی با استفاده از ژل پلی اکریل آمید جدا کننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده چهار درصد و به صورت native-PAGE (روش داویس و همکاران، ۱۹۹۷) و بدون استفاده از مرکاپنواتانول و جوشاندن انجام شد. بعد از اینکه خط حرکت بافر که به وسیله رنگ آبی برموفنل آبی دیده می شود به قسمت انتهایی ژل رسید جریان برق دستگاه قطع گردید. ژل در زیر جریان آرام آب از بین صفحات شیشه ای خارج و با آب مقطر شستشو داده شد. در ادامه به مدت یک ساعت در ۵۰ میلی لیتر بافر ۰/۵ مولار تریس (Tris-HCL) (pH=۱۰) محتوی نشاسته ۱٪ و CaCl_2 ۲۰ میلی مولار غوطه ور شد. بعد از نفوذ سوبسترا به داخل ژل آن را با آب مقطر شسته و برای نمایان شدن باندها و متوقف کردن واکنش در محلول لوگول قرار گرفت. محلول لوگول متشکل از I_2 ۱۰ میلی مولار و KI ۱۴ میلی مولار بوده و باعث رنگ آمیزی قسمت هایی از نشاسته که واکنش نداده می شود و در نتیجه باندهای روشن ظهور می کنند. در پایان توسط ژل داک (E-BOX-VX5) از باندهای ظاهر شده عکسبرداری شد.

مواد لازم

۱- محلول استوک اکریل آمید (۳۰ درصد): ۳۰ گرم اکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید در حدود ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و سپس حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و محلول در ظرف تیره نگهداری گردید.

۲- بافر ژل پایین: این بافر دارای غلظت ۱/۵ مولار تریس با pH= ۸/۸ است. برای تهیه آن ۱۸/۲ گرم تریس باز در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس pH آن با اسید کلریدریک دو مولار تا ۸/۸ پایین آورده شد و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

۳- بافر ژل بالا: این بافر دارای غلظت ۰/۵ مولار تریس با $pH=6/8$ است. برای تهیه آن ۶/۱ گرم تریس باز در حدود ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس با اسید کلریدریک دو مولار pH آن به ۶/۸ تنظیم گردید و حجم نهایی آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

۴- بافر الکتروود: این بافر دارای غلظت ۲۵ میلی مولار تریس باز و ۱۹۲ میلی مولار گلیسین است. برای تهیه آن ۰/۶ گرم تریس باز و ۲/۸۸ گرم گلیسین در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می شود (pH این بافر حدود ۸/۳ است و نیازی به تنظیم ندارد).

۵- بافر نمونه (۵x): شامل ۱۵ میلی لیتر تریس یک مولار با $pH=6/8$ ، ۲۵ میلی لیتر گلیسرول و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر می باشد. پس از مخلوط کردن این مواد، چند بلور بروموفنل اضافه می شود تا بافر به رنگ آبی تیره درآید.

۶- پرسولفات آمونیوم ۱/۵ درصد: ۰/۱۵ گرم پرسولفات آمونیوم در یک میلی لیتر آب مقطر حل می گردد (در هر بار نیاز، محلول تازه آن مورد استفاده قرار گرفت).

۷- TEMED, N,N, (Tetramethylethylenediamine N-N) به میزانی که در دستور العمل گفته شده است مورد استفاده قرار می گیرد.

۳-۱۴- زایموگرام پروتئازها

در مواردی لازم است که یک پروتئین، برای نمونه یک آنزیم، در ضمن حفظ فعالیت خود تا حد امکان از بقیه پروتئین ها جدا شود. در چنین مواردی روش هایی از الکتروفورز که پروتئین را واسرشته نکند، ضروری است. الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید (PAGE) از روش های متداولی است که به این هدف بکار می رود. بار طبیعی، اندازه و شکل پروتئین ها از عمده ترین عوامل موثر در جداسازی این مولکول ها در PAGE است. جداسازی پروتئین ها در ژل های دارای منافذ بزرگ (برای مثال پلی آکریل آمید با غلظت کم) عمدتاً متأثر از تفاوت بار الکتریکی است.

PAGE در سیستم بافری تریس_ گلیسین (سیستم با pH بازی) که ابتدا توسط داویس ارائه گردید، متداول ترین سیستم بافری برای الکتروفورز پروتئین ها در شرایط طبیعی است. نقطه ایزوالکتریک اغلب پروتئین ها در دامنه ۷-۴ قرار دارد. این مواد در pH بازی دارای بار منفی هستند و به طرف قطب مثبت (آند) حرکت می کنند.

۳-۱۴-۱- زیموگرام پروتئین‌های ویژه

در این بررسی تشخیص الکتروفورزی سرین پروتئین‌ها با استفاده از ژل پلی اکریل آمید جدا کننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده چهار درصد و به طریقه هم پوشانی و به روش (وینوکورو^۱ و همکاران ، ۲۰۰۵) انجام شد.

در این روش پس از به پایان رسیدن الکتروفورز (به صورت native-PAGE) ژل به آرامی با کمک آب مقطر از بین صفحات شیشه ای الکتروفورز خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در بافر تریس اسیدی (Tris-HCl) ۵۰ میلی مولار pH=۱۰ قرار گرفت. در مرحله بعد ژل با آب مقطر شستشو و بر روی صفحات نیتروسولوزی که از قبل به مدت ۴۰ دقیقه به طور جداگانه در سوبسترای اختصاصی تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز غوطه ور شده بودند، قرار گرفت. ژل به همراه صفحات نیتروسولوزی در داخل دسیکاتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. به محض ظاهر شدن خطوط زرد کم رنگ صفحات نیتروسولوزی را از روی ژل برداشته شد. برای مشخص شدن باندها و پارا نیترو آنیلین آزاد شده، صفحات داخل محلول سدیم نیتريت^۲ ۰/۱۲٪، سولفامات آمونیوم^۳ ۰/۵٪ و ان نفتیل اتیلن دیامین^۴ ۰/۰۵٪ هر کدام به مدت ۵ دقیقه و به ترتیب قرار داده شد. در پایان تصویر باندهای صورتی رنگ ظاهر شده بروی صفحات مربوط به فعالیت تریپسین، کیموتریپسین و الاستازی عصاره لوله گوارشی توسط ژل داک ثبت گردید.

¹ Vinokorov

² Sodium nitrite

³ Ammonium sulfamate

⁴ N-(1-naphthyl) ethylenediamine

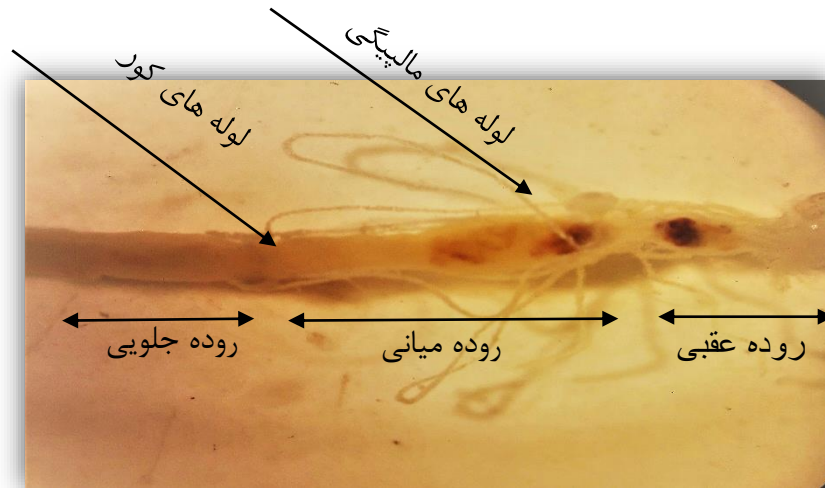
۳-۱۴-۲- زایموگرام پروتئاز عمومی

الکتروفورز نمونه آنزیمی به صورت native-PAGE انجام شد (روش بیکر، ۱۹۹۱). بدین منظور پس از آماده شدن ژل بالا و ژل پایین، عصاره آنزیمی لوله گوارشی کرم سیب با بافر نمونه مخلوط و در چاهک ها ریخته شد. برای مشاهده فعالیت آنزیم بعد از اینکه خط حرکت بافر که به وسیله رنگ آبی کوماسی بلو دیده می شود به قسمت انتهایی ژل رسید، جریان برق دستگاه قطع گردید. سپس ژل به آرامی با کمک آب مقطر از بین صفحات شیشه ای الکتروفورز خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ میلی لیتر بافر گلایسین pH=۱۰ قرار گرفت و روی شیکر به آرامی حرکت داده شد و بعد با آب مقطر شستشو و به مدت سه ساعت در ۱۰۰ میلی لیتر بافر گلایسین حاوی سوبسترای هموگلوبین ۰/۲۵٪ بر روی شیکر قرار گرفت تا سوبسترا به داخل ژل نفوذ و آنزیم بر آن عمل کند. در پایان ژل با آب مقطر شسته و فوراً با کوماسی بلو (۰/۱٪) R-250 در متانول- استیک اسید- آب (به نسبت های ۵۰:۱۰:۴۰ حجمی) رنگ آمیزی و ثابت شد، رنگ بری تا زمان ظهور باندهای کاملاً واضح در زمینه شفاف ادامه یافت (حداقل ۲ ساعت). پس از به دست آوردن ژل های با وضوح مناسب باندها توسط دستگاه ژل داک تصویر دیجیتالی به دست آمد.

فصل چہارم

نتائج و بحث

لوله گوارشی لارو سن پنجم کرم سیب پس از استخراج از بدن لارو، تشریح شد و بخشهای روده جلویی، روده میانی و روده عقبی مشخص شده و لوله های مالپیگی در ابتدای بخش عقبی روده مشاهده گردید. بر اساس مشاهدات، بخش جلویی لوله گوارش لوله ای شکل و کشیده است. در ادامه، بخش میانی لوله گوارش به عنوان محل اصلی هضم و جذب غذا و فعالیت آنزیم های گوارشی حجیم تر از بخش اول مشاهده می شود. این قسمت، تیره تر از بخش های اول و سوم لوله گوارش است که به دلیل هضم غذا و فعالیت آنزیم های گوارشی می باشد. در نهایت بخش سوم لوله گوارش که مسئول اصلی دفع مواد زاید و باز جذب آب و املاح می باشد قرار گرفته است. ترشح آنزیم های گوارشی در این قسمت بر اساس گزارشات (ونترا و همکاران، ۲۰۰۳) به میزان اندکی صورت می گیرد.



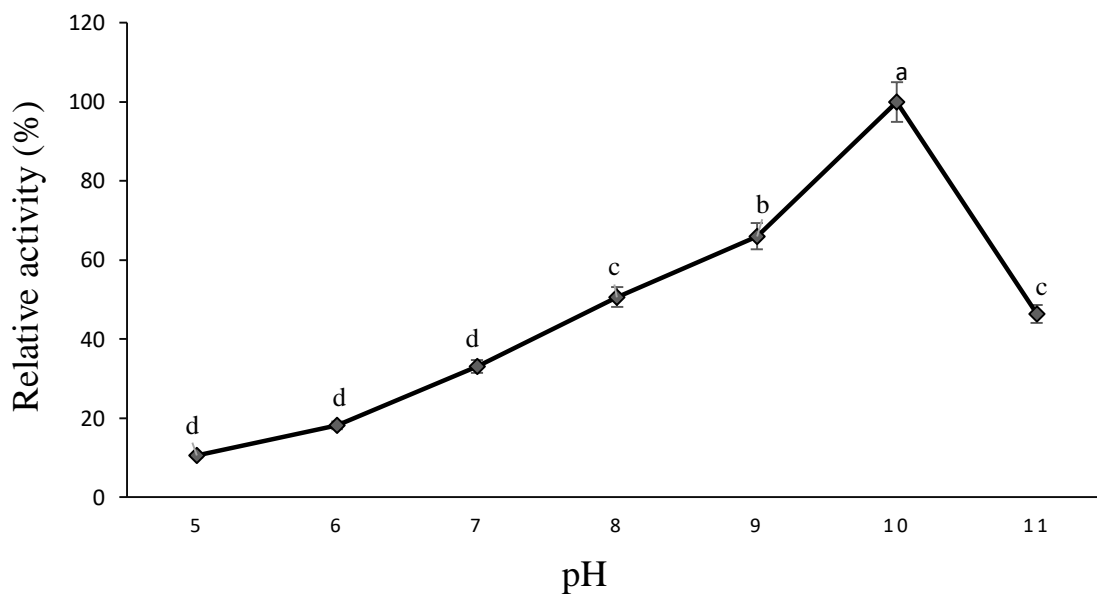
شکل ۴-۱- بخش های مختلف لوله گوارشی در لارو سن پنجم کرم سیب

نتایج آزمایشات این تحقیق نشان دهنده تاثیر معنی دار اسیدیته و دما بر فعالیت آنزیم های گوارشی مهم روده لارو سن پنج کرم سیب بود. همچنین تاثیر انواع یون های فلزی شامل آهن Fe^{2+} ، منیزیم Mg^{2+} ، منگنز Mn^{2+} ، روی Zn^{2+} ، مس Cu^{2+} بر فعالیت نسبی آنزیم ها معنی دار می باشد.

¹ Venetter

۴-۱- تعیین pH بهینه آلفا آمیلاز

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لوله گوارش و غدد بزاقی اکثر لاروهای بالپولکداران در شرایط قلیایی به طور فاحشی افزایش می یابد (والنسیا^۱ و همکاران، ۲۰۰۰)، نتایج ما همین موضوع را ثابت می کند. اثر pH بر فعالیت آمیلولیتیکی عصاره لوله گوارشی لارو کرم سیب در شکل ۴-۲ نشان داده شده است. همان طور که مشخص است آنزیم آلفا- آمیلاز در دامنه وسیعی از pH قلیایی ۱۰-۸ بیشترین فعالیت را نشان می دهد ($F= ۱۵۳/۲$ $df_{t,e}=۶, ۱۴$ ، $P \leq ۰/۰۰۰۱$). فعالیت بیشینه این آنزیم در $pH=۱۰$ مشاهده شد ($100 \pm 0/005$) در pH های اسیدی فعالیت آلفا آمیلاز بسیار کم بوده و در $pH=۵$ به صفر نزدیک می شود.



شکل ۴-۲- اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز لوله گوارشی لارو سن پنج کرم سیب

آلفا-آمیلاز در بدن جانوران از جمله حشرات، نشاسته و گلیکوژن را مورد حمله قرار می دهد. در اثر شکستن زنجیره کربوهیدرات در نشاسته و گلیکوژن، مخلوطی از الیگوساکاریدها آزاد می شود (ترا و همکاران، ۲۰۰۵). حشرات مقدار کمی از پلی ساکاریدها را بوسیله غدد بزاقی حمل می کنند و هضم

¹ Valensia

کامل پلی ساکارید ها در معده میانی انجام می گیرد (کفیر^۱ و همکاران، ۲۰۰۲). برای تشخیص مقدار تولید این ترکیبات از دی نیترو سالیسیلیک اسید به عنوان معرف استفاده می شود. این ماده در ترکیب با دی ساکارید هایی مانند مالتوز رنگ نارنجی تولید می کند. بنابراین افزایش مقدار رنگ نارنجی نشان دهنده افزایش عملکرد آنزیم است (یاماموتو^۲، ۱۹۹۸).

فعالیت بهینه آنزیم آلفا-آمیلاز در دیگر بالپولکداران از جمله لارو پروانه کرم ابریشم *Bombyx mori* (L) (کانکاتسو^۳، ۱۹۷۸)، شب پره مدیترانه ای آرد *Anagasta kuhniella* (Zeller) (بیکر، ۱۹۹۱)، لارو پروانه کرم ابریشم هندی *Antheraea mylitta* Dury (ناگراج و آبراهام^۴، ۱۹۹۵)، کرم برگخوار پنبه *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (ایشایا^۵ و همکاران، ۱۹۷۱)، (L.) *Mamestra brassicae* (مهرخو^۶ و همکاران، ۲۰۱۳) به ترتیب برابر ۹/۳، ۹، ۹/۵، ۹/۵، ۹/۵ گزارش شده است. مارک ویک^۷ و همکاران (۱۹۹۶) فعالیت بیوشیمیایی آلفا-آمیلاز در عصاره روده میانی چهار گونه از بالپولکداران خانواده های *Tortricidae* و *Gelechiidae* و اثر مهار کنندگی چند مهار کننده گیاهی روی این آنزیم را مطالعه کردند.

این چهار گونه شامل پروانه های *Epiphyas postvittana* (Walker)، *Planototrix octo* (Dugdale) و *Ctenopseustis obliquana* (Walker) از آفات درخت سیب با pH بهینه برابر با ۱۰/۵ و شب پره بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* (Zeller) از آفات مهم سیب زمینی با pH بهینه برابر با ۹/۵ برای فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز نشان دهنده تاثیر نوع تغذیه حشره بر pH بهینه فعالیت این آنزیم می باشد. هم چنین سنتوس و همکاران (۱۹۸۳) pH بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز در پروانه *E. ello* (L.) را برابر با ۹/۸ ذکر می کنند. والنسیا-جیمنز^۸ و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی در پروانه

¹ Kfir

² Yamamoto

³ Kanekatsu

⁴ Nagarajn & Abraham

⁵ Ishaaya

⁶ Mehrkhou,

⁷ Markwick

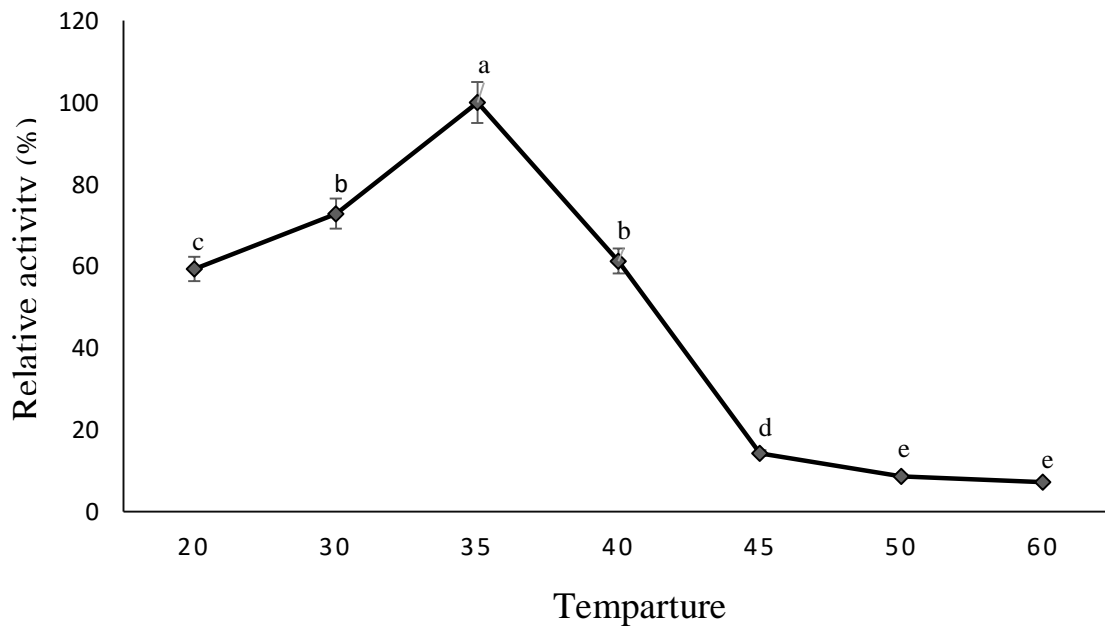
⁸ Valencia-Jimenez

Tecia solanivora (Povolny) و اثرات pH، دما و مهارکننده های گیاهی بر آن را بررسی کردند و مشخص شده این حشره دارای سه ایزوفرم آنزیم آلفا-آمیلاز است که در pH های ۷ تا ۱۰ بهترین فعالیت و در pH=۹ بالاترین فعالیت را نشان می دهند. ناگارجو و آبراهام (۱۹۹۵) برای تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در روده میانی لاروهای پروانه *Antheraea mylitta* Dury از سه بافر مختلف استفاده کرد و مشخص شد pH بهینه در حدود ۹/۲ بدست آمد. والنسیا و همکاران (۲۰۰۰) نیز آنزیم آلفا آمیلاز را در پروانه *Hypothenemus hampei* (Ferrari) را بررسی کرده و اظهار می کند pH بهینه فعالیت آنها ۴ تا ۷ می باشد.

۲-۴- تعیین دمای بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز

آزمایشات انجام شده روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لوله گوارش در اکثر حشرات نشان داده است که فعالیت بهینه برای این آنزیم در محدوده دمایی ۵۰-۳۰ درجه سانتیگراد می باشد. در این آزمایش همانطور که در شکل ۳-۴ دیده می شود، فعالیت آنزیمی در گستره دمایی ۲۰-۴۰ درجه سانتیگراد بالا می باشد و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به حداکثر فعالیت خود می رسد ($100 \pm 0/010$) ($P \leq 0/004$)، $F= 5/54$ $df_{t,e}= 6$ ، ۱۴) در دماهای بالاتر و پایین تر از این محدوده کاهش قابل ملاحظه ای مشهود است. با افزایش دما به بیش از ۴۰ درجه سانتیگراد میزان فعالیت آنزیم به شدت کاهش یافت. که نشان دهنده تغییر ساختمان سه بعدی پروتئینی آنزیم می باشد، هر آنزیم در دمای مطلوب و خاص خود قادر است که بیشترین فعالیت را داشته باشد. فعالیت و پایداری آنزیم ها وابسته به ساختار سه بعدی و ساختمان مولکول های اسید آمینه آن ها است. دمای زیاد با ایجاد تغییرات در ساختار سه بعدی آنزیم فعالیت آن را کاهش می دهد. افزایش دما در محیط واکنش آنزیمی باعث افزایش انرژی سینتیکی واکنش دهنده ها (سوبسترا و آنزیم) می شود. در نتیجه افزایش دما در این محیط باعث جذب انرژی زیاد توسط آنزیم و از هم گسیختن ساختمان سه بعدی آن و متعاقب آن کاهش فعالیت آنزیم می شود

(بوید^۱ و همکاران، ۲۰۰۲). یزدانی^۲ و همکاران (۲۰۱۰) دمای مناسب فعالیت آلفا-آمیلاز لارو پروانه برگخوار توت *Glyphodes pyloalis* (Walker) را ۳۷ و ۴۰ درجه سانتیگراد اعلام نمودند، دمای بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز در کرم ساقه خوار برنج *Chilo suppressalis* (Walker) ۳۵-۴۰ درجه سانتیگراد گزارش شده است (زیبایی^۳ و همکاران، ۲۰۰۸). دمای بهینه درشب پره آلو (*Grapholita Treitschke*) ۳۵ درجه سانتیگراد محاسبه شد (ابراهیم زاده، ۱۳۹۴).



شکل ۳-۴- اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز لوله گوارشی کرم سیب

۳-۴- زیموگرام آلفا-آمیلاز

تعداد ایزوفرم های آنزیم آلفا-آمیلاز در حشرات راسته های مختلف، متفاوت است. زیموگرام آلفا آمیلاز در لارو سن پنجم کرم سیب تایید کننده وجود این آنزیم در لوله گوارش این حشره است (شکل ۴-۴). این آنزیم در کرم سیب دارای دو ایزوفرم است (روش داویس و همکاران، ۱۹۹۷).

¹ Boyd
² Yazdani
³ Zibae

$\frac{1}{2}$ →
→



شکل ۴-۴- زایموگرام آلفا آمیلاز لارو سن پنجم کرم سیب

آزمایش اسدی^۱ و همکاران (۲۰۱۰) روی کرم سبز برگخوار برنج (*Naranga aenescens* (Moore) نشان داد که آنزیم آلفا-آمیلاز در لوله گوارش لارو سن آخر کرم سبز برگخوار برنج وجود داشته و دارای ۲ ایزوفرم می باشد در حالیکه بندانی^۲ و همکاران (۲۰۱۰) الگوی تحرک آنزیم آلفا-آمیلاز لوله گوارش لارو سن ۳ کرم سبز برگخوار برنج *N. aenescens* را روی ژل الکتروفورز بررسی کرده و تنها یک ایزوفرم از این آنزیم مشاهده کردند. صابری^۳ و همکاران (۲۰۱۱) ۳ ایزوفرم از آنزیم آلفا-آمیلاز در سرخرطومی حنایی خرما (*Rhynchophrus ferrugineus* (Olivier) گزارش کردند. نتایج حاصل از زایموگرام آلفا آمیلاز پروانه ابریشم باف پاییزی (*Hyphantria cunea* (Drury) دو ایزوفرم را در این حشره نمایان کرد (غلام زاده، ۱۳۹۷). باکر^۴ (۱۹۷۲) دو ایزوفرم آلفا آمیلاز در لارو شب پره مدیترانه ای آرد *A. kuhniella* (Zeller) گزارش کرد. تعداد ایزوفرم های شناخته شده آنزیم آلفا آمیلاز در گونه های مختلف حشرات از ۸-۱ عدد متفاوت می باشد. در *H. armigera* (F.)، *S. litura* (F.)، *Callosobruchus maculatus* (F.)

¹ Asadi

² Bandani

³ Saberi

⁴ Baker

تعداد ایزوفرم های آلفا آمیلاز بیشتر از ۵ عدد می باشد در حالی که در *T. castaneum* ، *S. oryzae* L. فقط یک ایزوفرم مشاهده شده است (کامپوس^۱ و همکاران، ۱۹۸۹؛ بون و همکاران، ۱۹۹۸؛ وسینگ^۲ و همکاران، ۲۰۰۸).

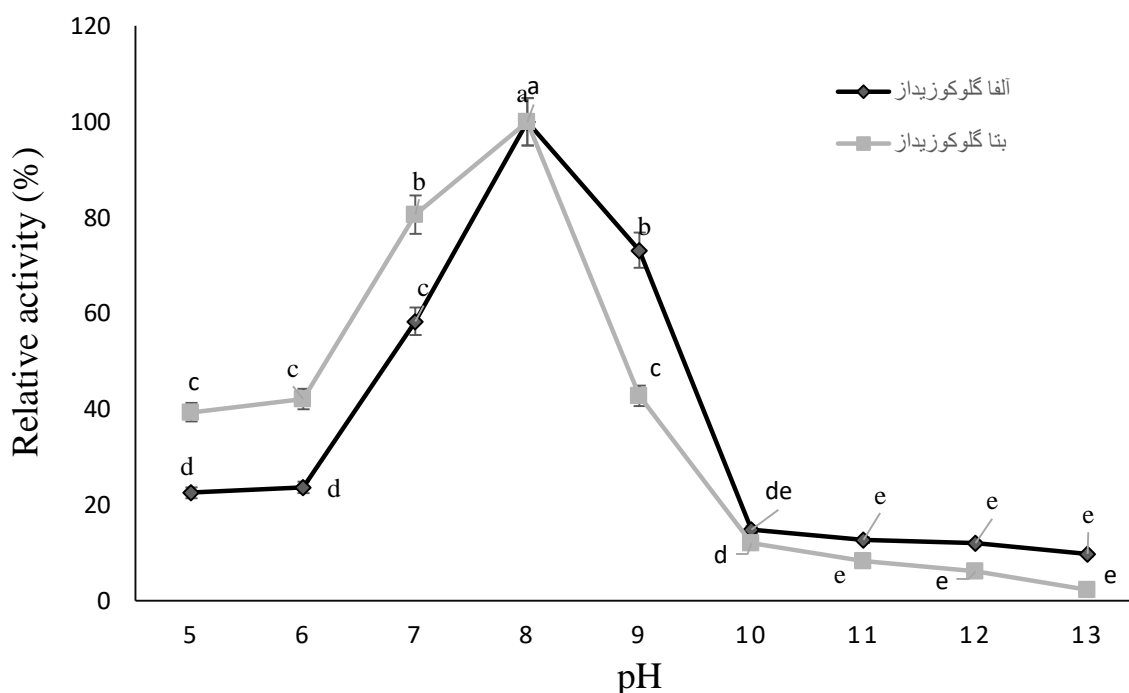
۴-۴- تعیین pH بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز

pH بهینه برای فعالیت آنزیم با pH معده حشره در برخی گونه ها هم خوانی داشته و تحت تاثیر فاکتورهایی نظیر غذا، pH غذا و جمعیت میکروارگانیسم های معده می باشد (داو، ۱۹۸۶). مقدار pH بهینه برای اثر pH بر فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز عصاره لوله گوارشی لارو کرم سیب در شکل ۴-۵ نشان داده شده است. آزمایش اثر pH روی فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز در طیف ۵-۱۳ pH انجام شد. چنانکه در شکل مشهود است آلفا گلوکوزیداز در pH های ۷-۹ بیشترین فعالیت را دارد و در pH های کاملاً اسیدی و قلیایی بالا فعالیت بسیار ناچیزی دارد و فعالیت بیشینه خود را در pH=۸ نشان می دهد (۱۰۰ ± ۰/۰۱۳) (F= ۴۶۱/۳۵ df_{t,e}= ۷، ۱۶ P ≤ ۰/۰۰۰۱) در مورد آنزیم بتا گلوکوزیداز نیز فعالیت این آنزیم با افزایش pH افزایش یافته و در pH=۸ به اوج خود می رسد و بعد از آن با افزایش pH فعالیت کاهش می یابد (۱۰۰ ± ۰/۰۷) (F= ۵۰/۸۳ df_{t,e}= ۷، ۱۶ P ≤ ۰/۰۰۰۱).

¹ Campos

² Wiessing

³ Dow



شکل ۴-۵- اثر pH بر فعالیت های آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم کرم سیب

مطالعات زیادی در مورد آلفا و بتا گلوکوزیداز حشرات راسته های مختلف انجام گرفته که مشابه با نتایج به دست آمده در این تحقیق است. به عنوان مثال فعالیت بهینه آلفا گلوکوزیداز در pH برابر با ۳/۷ برای سوسک (*T. molitor* (L.) (ترا و همکاران، ۲۰۱۲) و یا ۵/۸ برای پروانه (*E. ello* (L.) (سانتوس و همکاران، ۱۹۸۳) متفاوت است. در حشرات بالاترین pH فعالیت گلوکوزیدها در بال غشائیان و کمترین آن در سن ها مشاهده شده است (ترا و فریرا، ۱۹۹۴) و این صرفنظر از ارتباط با pH روده میانی می باشد. فریرا و همکاران (۱۹۹۸) آزمایشات گسترده ای جهت بررسی فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز در حشرات راسته سخت بالپوشان، بالپولکداران، بال غشائیان و راست بالان انجام دادند. همچنین پونتو و لو (۲۰۰۲) فعالیت بتا گلوکوزیداز در روده میانی زنبور عسل (*A. mellifera* (L.) را مورد مطالعه قرار دادند و pH بهینه آن را ۶ گزارش کردند. پراتویل سوسا^۱ و همکاران (۱۹۸۶) فعالیت بهینه آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز روده میانی در پروانه (*Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermuller) را ۶ گزارش کردند.

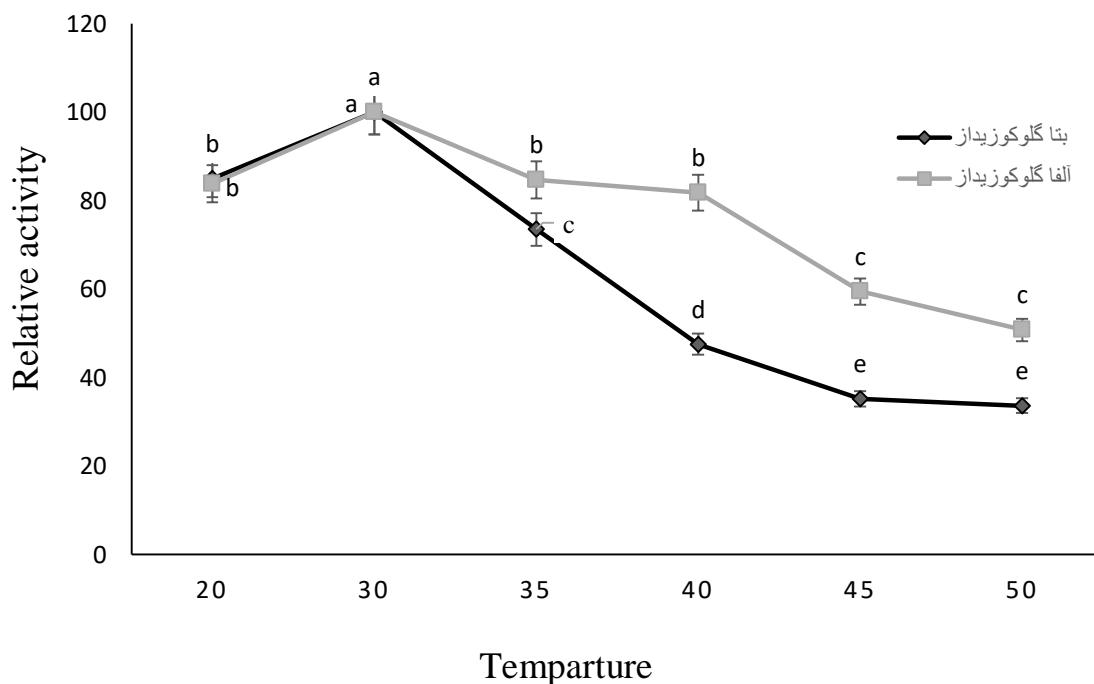
¹ Pratiel-Sosa

همچنین سانتوس و فریرا (۱۹۸۴) فعالیت بهینه بتا گلوکوزیداز روده میانی در پروانه *E. ello* (L) را pH برابر با ۶/۵ گزارش می کند. قدمیاری و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آلفا و بتا گلوکوزیداز در روده میانی و بزاق پروانه برگخوار توت *G. pyloalis* (Walker) پرداختند. در این تحقیق pH بهینه فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز در روده میانی برابر با ۷/۵ و ۵/۵ محاسبه شد. مطالعات بیشتر در مورد آلفا و بتا گلوکوزیداز حشرات راسته های مختلف مانند بالپولکداران، ناجوربالان و سخت بالپوشان توسط مارانا و همکاران (۲۰۰۰)، آزودو و همکاران (۲۰۰۳)، ناکوئیزی و همکاران (۲۰۰۶)، یایی و همکاران (۲۰۰۹)، رمزی و همکاران (۲۰۱۰) و غیره انجام شده است. غلام زاده و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم های گوارشی کفشدوزک خربزه *Epilachna chrysomelina* (Fabricius) pH بهینه فعالیت آنزیمی را ۵ اعلام کردند. pH بهینه فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز در روده میانی سن قرمز پسته *Lygaeus pandurus* (Scopoli) نیز ۵ مشاهده شد (حسن و همکاران، ۱۳۹۳).

۴-۵- تعیین دمای بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز

دمای بهینه آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارشی کرم سیب ۳۰ درجه سانتیگراد می باشد (شکل ۴-۶) که در آلفا گلوکوزیداز با روند آهسته تری در دماهای بالاتر کاهش می یابد (100 ± 0.007) (۱۰۰ ± ۰/۰۰۷) (F= ۸۵/۲۵ df_{t,e}= ۵، ۱۲ P ≤ ۰/۰۰۰۱) اما در بتا گلوکوزیداز این کاهش فعالیت، سریعتر صورت می گیرد تا در دماهای ۴۵-۵۰ درجه سانتیگراد به فعالیتی محدود و یکنواخت می رسد (0.314 ± 0.005) (۰/۰۳۱۴ ± ۰/۰۰۵) (F= ۳۲۴/۷۳ df_{t,e}= ۵، ۱۲ P ≤ ۰/۰۰۰۱).

طبق اظهار (پریس و استیونز، ۱۹۸۹) هر آنزیم در یک طیف دمایی فعالیت مناسبی دارد و در دماهای بالاتر یا پایین تر از این طیف ممکن است تغییرات برگشت ناپذیری در ساختار آنزیم ایجاد شود و در نتیجه فعالیت آن ها کاهش یابد. پژوهش های صورت گرفته در مورد حشرات راسته بالپولکداران نشان می دهند، آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیدازی در دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتیگراد فعالیت بهینه دارند.



شکل ۴-۶- اثر دما بر فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز لوله گوارشی کرم سیب

دمای بهینه آنزیم های آلفا و بتاگلوکوزیداز در کرم خراط (*Z. pyrina* (L.)) درجه سانتیگراد بوده است (وطن پرست^۱ و همکاران، ۲۰۱۲). در *N. aenescens* (Moore) به ترتیب برابر با ۴۵ و ۵۵ درجه سانتیگراد (اسدی و همکاران،^۲ ۲۰۱۲) و در *Choreutis nemorana* (Hubner) به ترتیب برابر با ۳۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد (غلام زاده^۳ و همکاران، ۲۰۱۳) اعلان شده است، همچنین در شب پره مینوز

¹ Vatanparast

² Asadi

³ Gholamzadeh

گوجه فرنگی (*Tuta absoluta* (L.)) دمای بهینه فعالیت این آنزیم در ۴۵ درجه سانتیگراد می باشد. دمای بهینه فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز در برگ خوار انجیر (*Ocnerogiva Amanda* (L.)) درجه سانتیگراد گزارش شده است (غلام زاده و همکاران، ۲۰۱۴). به علاوه دمای بهینه فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز در سوسک برگخوار نارون (*Xanthogaleruca luteola* (Muller)) برابر با ۴۰ درجه سانتیگراد گزارش شده است (شریفی^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). کاهش فعالیت آنزیم در دمای بالا به این صورت قابل توجیه است که افزایش دما باعث جذب انرژی زیاد توسط آنزیم و از هم گسیختن ساختمان سه بعدی آن و متعاقب آن کاهش فعالیت آنزیم می شود (بوید و همکاران، ۲۰۰۲). فعالیت آنزیم ها به طور معمول از صفر تا ۳۵ یا ۴۰ درجه سانتیگراد افزایش می یابد، در محدوده ۶۰-۴۰ درجه سانتیگراد کاهش سریع در فعالیت آنزیمی رخ می دهد که این به واسطه افزایش آشفستگی مولکول های آنزیم - سوبسترا، و افزایش آهسته دنا تورا سیون دمایی آنزیم ها می باشد (هوپکین^۲، ۱۹۹۰).

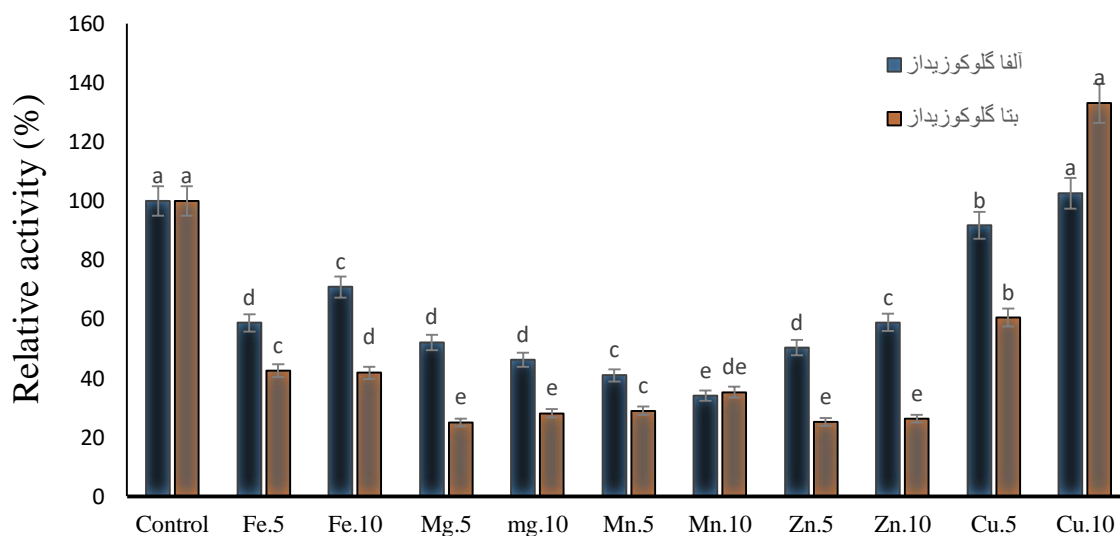
۴-۶- اثر یون های فلزی بر فعالیت گلیکوزیدازی

آنچه در شکل ۴-۷ مشاهده می شود اثر یون های آهن، منیزیوم، منگنز، روی و مس در غلظت های متفاوت ۵ و ۱۰ میلی مولار معنی دار می باشد ($P \leq 0.0001$ ، $df_{t,e} = 10, 22$ ، $F = 8.17$). با توجه به شکل یون مس در غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آنزیمی آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز می شود به طوری که یون مس ۱۰ میلی مولار باعث افزایش فعالیت آنزیم بیش از ۱۰۰٪ شده (۱۳۲ ± ۰/۰۲۸) و

¹ Sharifi

² Hopkin

یون مس ۵ میلی مولار باعث کاهش فعالیت این آنزیم شده است. دیگر یون های نامبرده اثر کاهشی بر فعالیت آنزیم داشته و میزان فعالیت را به کمتر از ۴۰٪ رسانده است. یون مس یک کوفاکتور برای واکنش های بیوشیمیایی بوده و کمبود آن باعث اختلال در فرآیند آنزیمی می شود (ژو و همکاران، ۲۰۰۲). مطالعات نشان داده است که غلظت روی و هم چنین زمان قرار گرفتن آن بر فرآیندهای سلولی نیز موثر است (پارک و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۴-۷- اثر غلظت های یون های فلزی بر فعالیت آنزیمی آلفا و بتا گلوکوزیداز لارو سن پنجم کرم سیب

CaCl₂ در غلظت ۴۰ میلی مولار فعالیت بتا گلوکوزیداز را کاهش و فعالیت آلفا گلوکوزیداز را در لوله گوارش لارو پروانه برگخوار توت افزایش داده است (قدمیاری و همکاران، ۲۰۱۰). یون Hg²⁺، Fe²⁺ و Mn²⁺ در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی مولار فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گلوکوزیداز را کاهش دادند (غلام زاده، ۱۳۹۷). در بررسی های صورت گرفته روی *G. pyloalis* (Walker) یون Ca²⁺ فعالیت آلفا گلوکوزیداز را افزایش می دهد (قدمیاری و همکاران، ۲۰۱۰). یابی و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعات اثر یون هایی که روی *Rhynchophorus palmarum* (L.) صورت گرفت، یون های مس، روی و آهن بر بتا

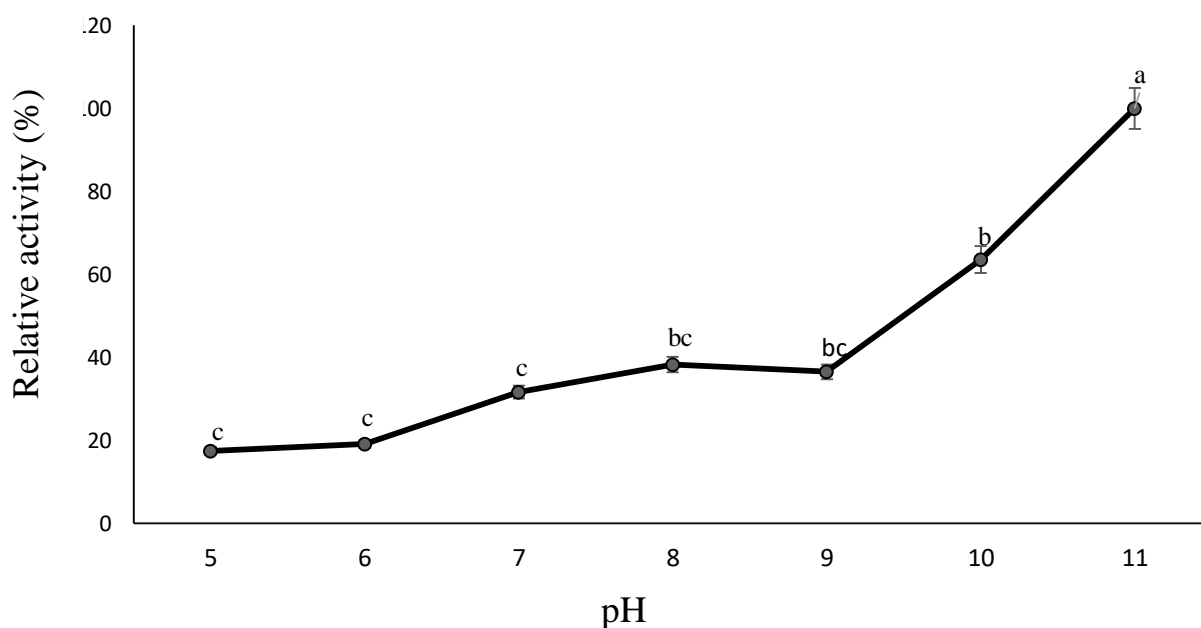
¹ Park

گلوکوزیداز اثر مهار کنندگی داشته در حالی که کلر، منگنز، منیزیم و باریم تاثیر زیادی روی فعالیت این آنزیم نداشته است

۷-۴- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی

۷-۴-۱- تعیین pH بهینه پروتئاز عمومی

فعالیت پروتئولیتیک عصاره لوله گوارشی با استفاده از آزوکازئین در دامنه ای از pH (۵-۱۱) بررسی شد. میزان فعالیت پروتئاز عمومی نسبت به pH های مختلف در شکل ۴-۸ نشان داده شده است. چنانچه مشخص است سوبسترای آزوکازئین در دامنه ای از pH های قلیایی هیدرولیز شده است به طوری که در pH های (۹-۱۱) فعالیت پروتئولیتیک قابل توجه بوده و بیشینه آن در pH برابر با ۱۱ مشاهده می شود (100 ± 0.14) ($P \leq 0.0001$, $F=39$ $df_{t,e}=6$). در pH های اسیدی ۶ و ۵ فعالیت نسبی بسیار جزئی و تقریباً برابر ۲۰ درصد مشاهده می شود در حالیکه در pH های قلیایی افزایش فعالیت پروتئازها ثبت شده است. به نظر می رسد که به دلیل فعالیت بیشتر پروتئولیتیک عصاره روده میانی در pH قلیایی نسبت به pH اسیدی، سرین پروتئینازها آنزیم های اصلی هیدرولیز کننده در عصاره روده میانی کرم سیب هستند.



شکل ۴-۸- اثر pH بر فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی کرم سیب

آزوکازئین سوبسترای پروتئینی است که معمولاً برای سنجش فعالیت پروتئولیتیک کل یک نمونه آنزیمی استفاده می‌شود و گزارش‌های بسیاری در این زمینه وجود دارد (کوهن، ۱۹۹۳؛ الپیدینا و همکاران، ۲۰۰۱). نتایج به دست آمده از فعالیت پروتئولیتیک کل در pH های مختلف، با استفاده از سوبسترای آزوکازئین، وجود پروتئازها با pH بهینه قلیایی را در عصاره لوله گوارشی کرم سیب نشان می‌دهد. فعالیت پروتئولیتیک در دامنه گسترده‌ای از pH قلیایی برای دیگر بالپولکداران نیز گزارش شده است (ترا و فریرا، ۱۹۹۴). در نتایجی که کریستلر و همکاران (۲۰۱۱) از مطالعه فعالیت‌های پروتئازی روده میانی در ۱۲ گونه از بالپولکداران به دست آوردند، نشان می‌دهد فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره روده میانی پروانه *Chrysodeixis erosoma* (Doubleday) از خانواده Noctuidae در حضور سوبسترای آزوکازئین و pH های قلیایی بالا بوده و فعالیت بیشینه در pH=۹ اتفاق می‌افتد. پیرا^۱ و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که pH بهینه فعالیت پروتئاز عمومی *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) در

¹ Elpidina

² Pereira

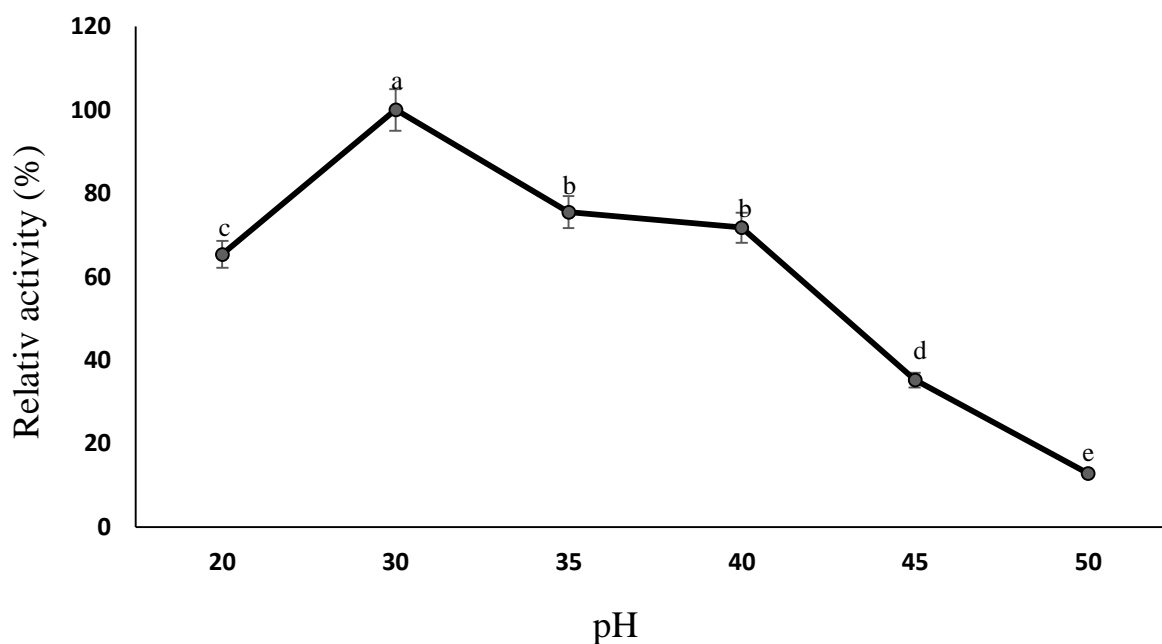
ناحیه قلیایی بوده و بیشترین فعالیت آن در $\text{pH}=10$ می باشد. هضم بهینه ترکیبات پروتئینی در pH های بالاتر در روده میانی نشان دهنده ارتباط مستقیم pH بهینه فعالیت پروتئازها و pH کلی روده میانی در گونه های دیگر از حشرات و بویژه بالپولکداران نیز گزارش شده است (حسینی نوه^۱ و همکاران، ۲۰۰۷). فعالیت پروتئولیتیکی در دامنه وسیعی از pH قلیایی در برابر سوبستراهای پروتئینی، وجود مجموعه ای از پروتئازهای شرکت کننده در هضم پروتئین ها را نشان می دهد (کاسو و همکاران، ۱۹۹۴).

۴-۷-۲- تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی

با توجه به شکل ۴-۹ بیشینه فعالیت پروتئاز عمومی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد می باشد (۰/۰۱۴ ± 100) ($P \leq 0/0001$ ، $df_{t,e} = 5$ ، 12 ، $F = 386/18$). در دماهای بالاتر فعالیت آن به سرعت کاهش می یابد، چنانچه مشهود است این آنزیم در دمای حدود ۲۰ درجه سانتیگراد شروع به فعالیت کرده تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد فعالیت بالای ۵۰٪ از خود نشان داده وبا افزایش دمای بیشتر، فعالیت آن کاهش یافته است.

پیرا و همکاران (۲۰۰۵) خصوصیات پروتئازهای معده میانی لارو سن آخر پروانه *A. gemmatalis* (Hubner) را بررسی و گزارش کردند که دمای مناسب برای فعالیت پروتئازها ۳۵ درجه سانتیگراد می باشد.

¹ Hosseininaveh



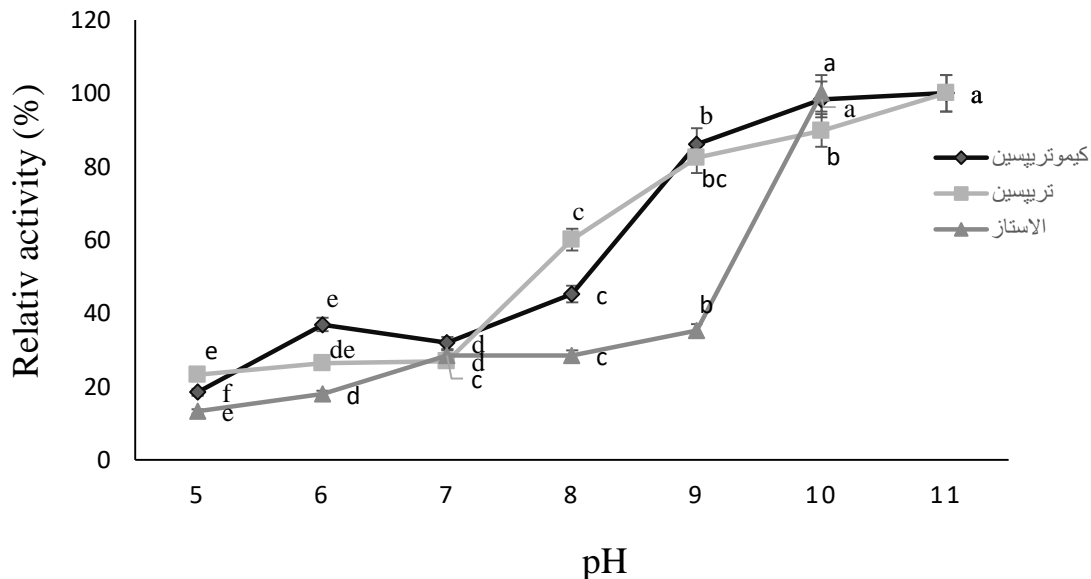
شکل ۴-۹- اثر دما بر فعالیت پروتئاز عمومی لوله گوارشی لاروسن پنج کرم سیب

۴-۷-۳- تعیین pH بهینه پروتئازهای اختصاصی (تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز)

در شکل ۴-۱۰ فعالیت سرین پروتئازهای عصاره لوله گوارشی در pH های مختلف با استفاده از سوبسترای تخصصی نشان داده شده است. همان گونه که مشخص است هیدرولیز سوبسترای SAAPPpNA توسط آنزیم کیموتریپسین در دامنه وسیعی از pH قلیایی (۱۱-۸) صورت می گیرد و بیشینه فعالیت آن در pH برابر با ۱۱ مشاهده می شود (100 ± 0.83) ($P \leq 0.001$)، $df_{t,e} = 6, 113$ ($F = 33/11$). بررسی فعالیت تریپسین لوله گوارشی نیز با استفاده از سوبسترای اختصاصی BApNA در دامنه از pH های اسیدی و قلیایی نشان دهنده فعالیت آن در pH های قلیایی با بیشترین فعالیت در pH=۱۱ می باشد و در pH های اسیدی کمترین فعالیت را نشان می دهد ($1/258 \pm 0.06$) ($F = 9291/44$ $df_{t,e} = 6, 113$ $P \leq 0.001$). از دیگر سرین پروتئینازهای موجود در عصاره روده میانی آنزیم الاستاز می باشد که فعالیت آن از طریق هیدرولیز سوبسترای اختصاصی SAAApNA مشخص شده است. این آنزیم نیز در pH های قلیایی بیشترین فعالیت و در pH های اسیدی کمترین فعالیت را

نشان می دهد و مشابه دیگر سرین پروتئازها در pH=۱۱ به حداکثر فعالیت خود رسیده است (۰/۰۰۷)

$(F= ۱۷۹۱/۱۱۴ \text{ df}_{t,e}= ۶, ۱۱۳ \text{ P} \leq ۰/۰۰۰۱) (۰/۲۵۲ \pm)$



شکل ۴-۱۰ اثر pH بر فعالیت پروتئازهای اختصاصی لوله گوارشی کرم سیب

منابع بسیاری pH بهینه فعالیت تریپتیک برای هیدرولیز سوبسترای BApNA در بالپولکداران S. littoralis (Boisduval) (لی و آنستی، ۱۹۹۵)، کرم قوزه پنبه *H. armigera* (Hubner) و *virescens* (Fabricius) (جانستون^۲ و همکاران، ۱۹۹۱)، پروانه کرم ابریشم *B. mori* (L.) (ساساکی و سوزوکی،^۳ ۱۹۸۲) و کرم ساقه خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilialis* (Hubner) (هاوسمن^۴ و همکاران، ۱۹۸۹) قلیایی و برابر ۱۰ گزارش کرده اند. لکادت^۵ (۱۹۶۶) pH بهینه فعالیت تریپتیک برای هیدرولیز سوبسترای SAAAPPpNA در سفیده بزرگ کلم *Pieris brassicae* (L.) را نیز برابر با ۱۰ بیان می کند. همچنین کوو^۶ و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت سرین پروتئینازهای تریپسین و کیمو تریپسین روده میانی *M. brassicae* (L.) را با استفاده از سوبسترای اختصاصی تعیین و pH بهینه آن ها را ۱۱/۵

¹ Lee & Anstee

² Johnson

³ Sasaki & Suzuki

⁴ Houseman

⁵ Lecadet

⁶ Koo

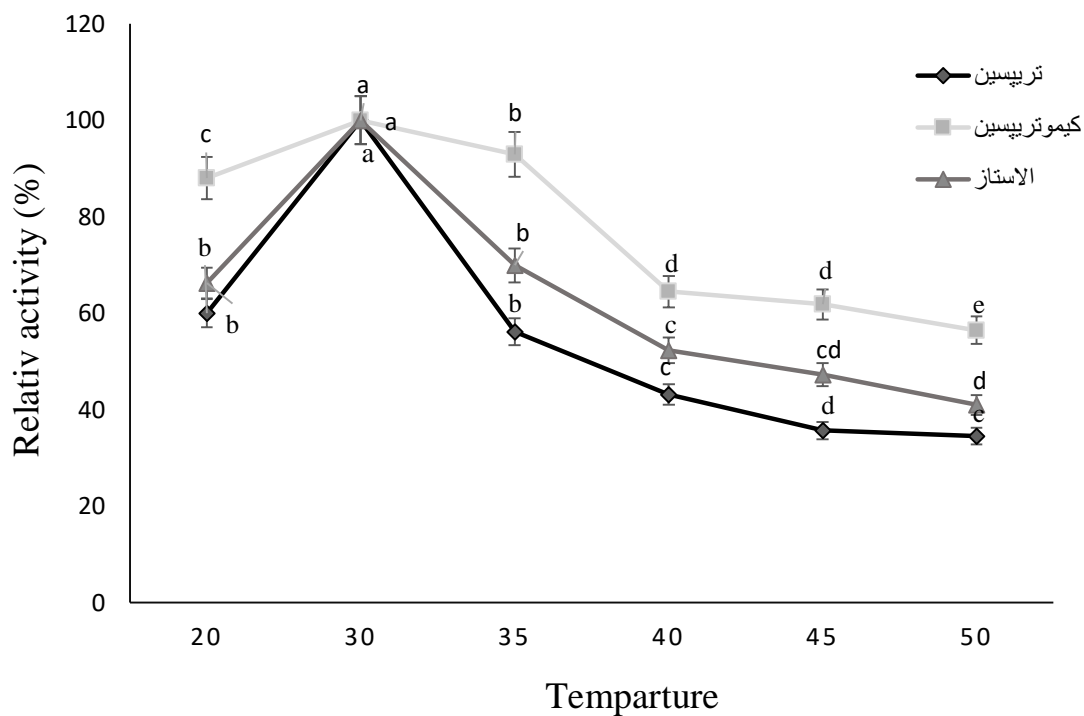
اعلان می کند. جورج^۱ و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعات خود بر روی سرین پروتئینازهای گوارشی در پروانه *Busseola fusca* (Fuller) pH بهینه فعالیت تریپسین، کیمو تریپسین و الاستازی را در حضور سوبستراهای اختصاصی به ترتیب ۱۱-۱۱/۵، ۱۰-۱۰/۵، ۹-۱۰/۵ به دست آوردند. نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر با نتایجی که در مطالعات مختلف بر روی pH بهینه فعالیت سرین پروتئینازها در دیگر بالپولکداران صورت گرفته است، مطابقت دارد.

برن بائوم (۱۹۸۰) از بررسی مقادیر pH برای ۶۰ گونه در ۲۰ خانواده حشرات نتیجه گرفت که pH روده میانی لاروهای بالپولکداران به شیمی گیاه میزبان نیز وابسته است. لاروهایی که از برگ درختان که مشخصا حاوی مقادیر بیشتری تانن می باشند تغذیه می کنند، متوسط pH روده میانی آنها ۸/۶ می باشد، در حالیکه لاروهایی که بیشتر از علف ها و بوته ها تغذیه می کنند متوسط pH روده میانی آنها ۸/۲ می باشد. pH بالاتر روده میانی در لاروهای تغذیه کننده از غذاهای غنی از تانن ممکن است به عنوان یک سازوکار محافظتی برای کاهش سمیت تانن تکامل یافته باشد. تانن ها با پروتئین ها تشکیل کمپلکس می دهند اما در pH بالاتر انجام آن بسیار کند صورت می گیرد. شرایط خیلی اسیدی که در نواحی ویژه ای از روده عقبی بعضی موربانه ها، سیرسیرکها و احتمالا دیگر حشرات که برای هضم سلولز در روده عقبی آنها میکروارگانیسم هایی وجود دارند متداول است ناشی از تخمیر غیر هوازی گلوکز حاصل از هضم سلولز است که در نتیجه تخمیر، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه شامل اسیدهای استیک و بوتیریک تولید می گردند (برن بائوم، ۱۹۸۰).

¹ Funke

۴-۷-۴- تعیین دمای بهینه پروتئازهای اختصاصی

با توجه به شکل ۴-۱۱ دمای بهینه فعالیت پروتئازی تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز در لوله گوارشی کرم سیب ۳۰ درجه سانتیگراد می باشد که در دماهای بالاتر با گذشت زمان فعالیت کاهش یافته و این کاهش فعالیت در تریپسین بسیار سریعتر صورت گرفته و در کیموتریپسین با سرعت آهسته تری رخ می دهد. در دامنه دمایی ۴۰-۵۰ درجه سانتیگراد کاهش فعالیت آنزیمی سرین پروتئازها بسیار آهسته بوده و روند تقریباً یکنواختی را طی می کند تا به صفر برسد ($P \leq 0.0001$ ، $df_{t,e} = 5$ ، 114 ، $124/75$) (F=



شکل ۴-۱۱- اثر دما بر فعالیت آنزیم های پروتئازی لوله گوارشی لارو سن پنجم کرم سیب

دما یکی از موثرترین عوامل در بالا بردن سرعت واکنش های آنزیمی است. سرعت واکنش ها تا مقدار بهینه افزایش یافته و سپس در دماهای ۴۵، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد به علت از بین رفتن ساختار سه بعدی آنزیم به شدت کاهش می یابد (سنسک، ۲۰۰۳).

طبق تحقیقات بوداتا و همکاران (۲۰۰۸)، دمای بهینه برای بیشینه فعالیت آنزیم پروتئاز در معده میانی لارو شب پره *Aachaea Janata* (L.) ۳۰ درجه سانتیگراد گزارش شده است. به گزارش کومار^۳ و همکاران (۲۰۰۶) دمای بهینه برای فعالیت آنزیم پروتئاز در لوله گوارش *Conogethes punctiferalis* (Guenee) ۴۰ درجه سانتیگراد است. کرم آلو *G. funebrana* (Treitschke) در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد بیشترین فعالیت پروتئازی را از خود نشان داد (ابراهیم زاده، ۱۳۹۴).

۴-۷-۵- زایموگرام پروتئاز عمومی

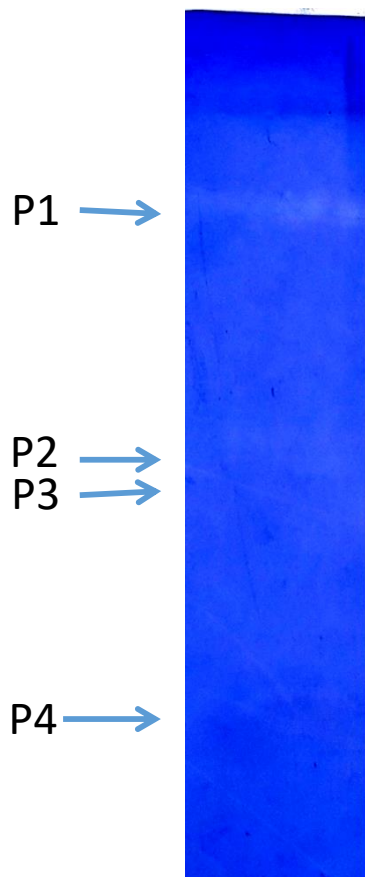
ویژگی های پروتئینازهای موجود در لوله گوارشی کرم سیب با استفاده از الکتروفورز غیراحیایی و بکار بردن سوبسترای هموگلوبین مورد بررسی قرار گرفت (روش بیکر^۴، ۱۹۹۱). با توجه به شکل ۴-۱۲ چهار باند در پروتئاز عمومی مشاهده شد که پروتئین های سبک تر در قسمت های پایین تر ژل قرار گرفته و پروتئین های سنگین تر در قسمت بالایی مشاهده شد.

¹ Cencek

² Budatha

³ Kumar

⁴ Baker



شکل ۴-۱۲- زایموگرام پروتئاز عمومی در لارو سن پنجم کرم سیب

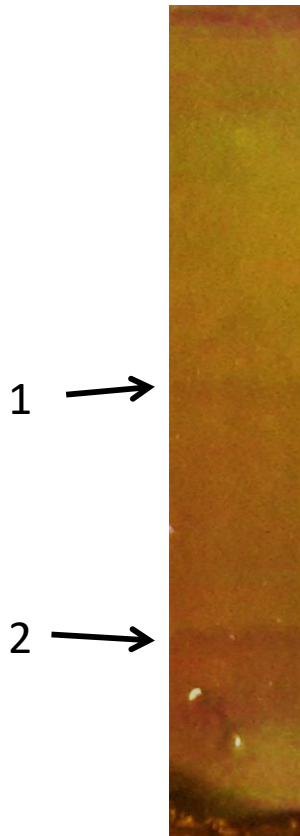
فانک^۱ و همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه زایموگرام فعالیت پروتئازی پروانه *B. fusca* (Fuller) وجود شش باند پروتئازی را نشان دادند. طباطبایی و همکاران (۱۳۸۹) نشان داد که پنج باند پروتئاز در روده میانی لارو شب پره کرم گلوگاه انار *Ectomyeloid ceratoniae* (Zeller) وجود دارد. هم چنین کوچکی (۱۳۹۰) نشان داد که سه ایزوفرم از آنزیم پروتئاز در لوله گوارش ابریشم باف پاییزی *H. cunea* (Drury) وجود دارد. نتایج زایموگرام اسدی (۲۰۱۲) در کرم سبز برگخوار برنج *N. aenescens* (Moore) و جهانجو (۱۳۹۰) در زنبور برگخوار ثانوی رز *Allantus viennensis* (Panzer) چهار باند پروتئازی را روی ژل نشان داد. عجم حسنی^۲ و همکاران (۲۰۱۲) تعداد باندهای *Utethesia Pulchella* (L) را شش عدد گزارش کردند.

۴-۷-۶- زایموگرام پروتئینازهای اختصاصی

¹ Funke

² Ajamhassani

برای مطالعات دقیق تر پروتئینازهای لوله گوارشی کرم سیب زایموگرام آنها با استفاده از ژل پلی اکریل آمید جدا کننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده چهار درصد به دست آمد. در این بررسی تشخیص الکتروفورزی سرین پروتئینازهای تریپسین، کیمو تریپسین و الاستاز به طریقه همپوشانی بر روی صفحات نیتروسلولزی و به روش (وینوکورو و همکاران، ۲۰۰۵) انجام شد. آنالیز این زایموگرام و نتایج به دست آمده در شکل ۴-۱۳ وجود دو باند تریپسین را ثابت می کند.



شکل ۴-۱۳- زایموگرام پروتئاز اختصاصی تریپسین در لارو سن پنجم کرم سیب

ثابت شده پروانه *H. armigera* (Hubner) دارای ۲۰ نوع ایزوفرم های مختلف سرین پروتئازهای فعال در لوله گوارش می باشد (بون^۱ و همکاران، ۱۹۹۸؛ گیتھوس^۲ و همکاران، ۱۹۹۷؛ پاتاناکار^۳ و همکاران، ۲۰۰۱ و سرینیواسان^۴ و همکاران، ۲۰۰۶).

¹ Bown

² Gatehouse

³ Patankar

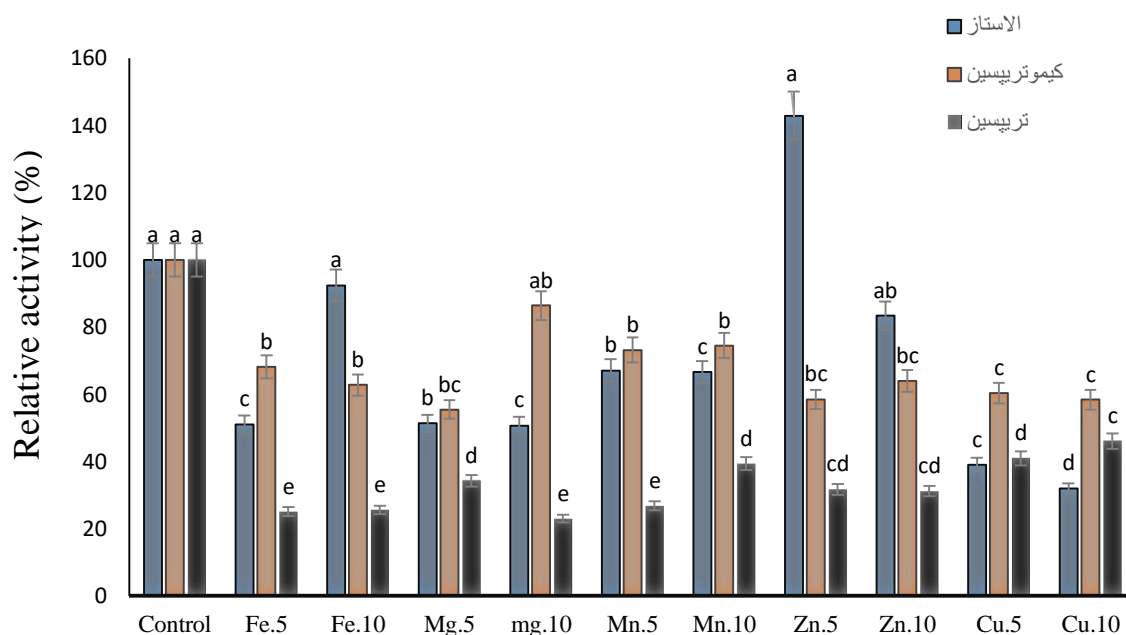
⁴ Srinivasan,

۴-۷-۷- اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های پروتئازی

تاثیر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم پروتئاز کرم سیب معنی دار بود ($P \leq 0/0001$ ، $df_{t,e} = 10$ ، $F = 90/197$). با توجه به شکل ۴-۱۴ اثر غلظت های ۵ و ۱۰ میلی مولار یون های آهن، منیزیم، منگنز، روی و مس بر فعالیت آنزیمی سرین پروتئازها بصورت کاهش فعالیت عمل کرده و باعث مهار فعالیت آنزیم شده است اما غلظت ۵ میلی مولار یون روی بر فعالیت الاستاز باعث افزایش عملکرد آن گشته و فعالیت آنزیمی را تا بیش از ۱۰۰٪ افزایش داده است ($0/11 \pm 142$). یون سولفات روی جزء ساختاری بسیاری از آنزیم ها و پروتئین ها است و باعث افزایش فعالیت آنزیمی شده زیرا یون های فلزی به عنوان پل های یونی یا نمکی بین دو اسید آمینه مجاور عمل می کنند و اثر تحریک کننده بر فعالیت الاستازی داشته است (پادایاچی، ۲۰۰۶).

تاثیر یونهای فلزی روی آنزیم های مختلف توسط بسیاری از محققین مورد مطالعه قرار گرفته است. یون های فلزی بسته به نوع آنزیم میتوانند باعث افزایش یا کاهش فعالیت آن گردند (حسن و همکاران، ۲۰۰۹). بر طبق گزارشات یون های Ca^{2+} و Mg^{2+} باعث افزایش فعالیت آنزیمی پروتئاز در روده میانی لارو پروانه *A. gemmatalis* (Hubner) می شوند (پریرا، ۲۰۰۵). نتایج اسدی (۲۰۱۲) نشان داد که جیوه Hg^{2+} ، باریم Ba^{2+} و آهن Fe^{2+} فعالیت آنزیم پروتئاز را در لوله گوارش لارو سن آخر کرم سبز برگخوار برنج *N.aenescens* (Moore) کاهش می دهند. ژو و همکاران (۲۰۰۲) اثر یون های Cu^{2+} ، Mg^{2+} ، Br^{2+} و K بر فعالیت پروتئازی بررسی و بیان کردند که یون ها فعالیت آنزیمی را در شب پره هندی *P. interpunctella* (Hübner) تحت تاثیر قرار نمی دهد.

¹ Padayachee

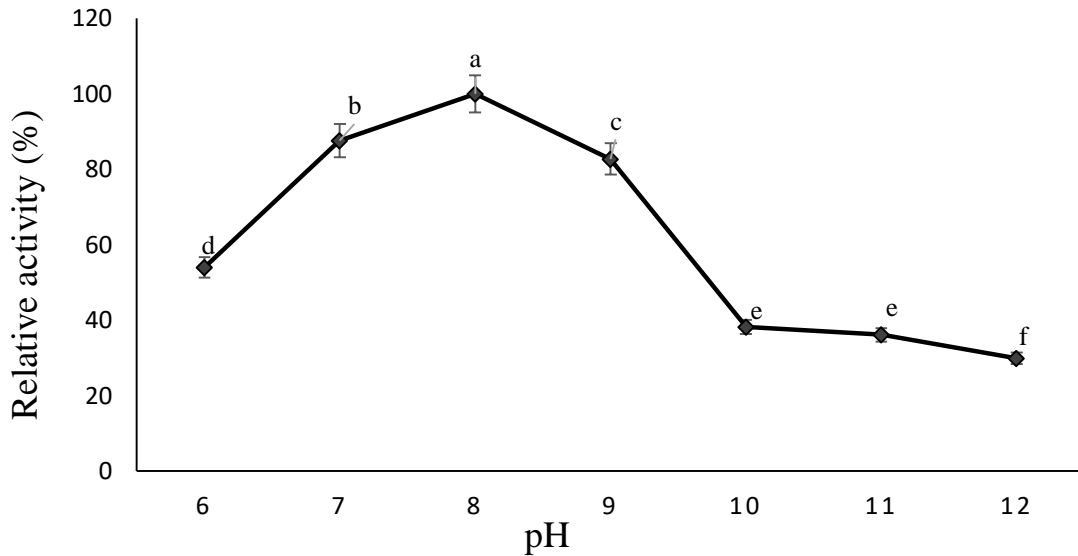


شکل ۴-۱۴- اثر غلظت های یون های فلزی بر فعالیت آنزیم های پروتئازهای اختصاصی لارو سن پنجم کرم سیب

۴-۸- تعیین pH بهینه لیپاز

با توجه به شکل ۴-۱۵ بیشینه فعالیتی آنزیم لیپاز در لارو کرم سیب pH=۸ مشاهده شد (± 0.003) و در pH بالاتر و پایین تر روند کاهشی داشته در pH ۱۰-۱۲ به کمتر از ۳۰ درصد فعالیت رسیده است ($F=4814/11$ $df_{t,e}=6$ ، 105 $P \leq 0.0001$). آنزیم لیپاز در حشرات دارای نقشهای کلیدی در رابطه با بهره برداری از چربیها، انبار کردن و انتقال آنها هستند و همچنین اهمیت زیادی برای بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی پایه ای تولید مثل، رشد و نمو، دفاع در برابر پاتوژن ها و تنش اکسیداتیو و علامت دهی فرومونی دارند (هورن و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعات انجام گرفته در مورد لیپاز حشرات اندک بوده و اکثراً روی اجسام چربی متمرکز شده است (اورسلیک^۱ و همکاران، ۲۰۰۸). اثر عوامل مختلف روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز توسط بسیاری از محققین بررسی شده است، عواملی مانند pH، دما، یون های فلزی و مهارکننده ها باعث کاهش یا افزایش فعالیت آنزیم لیپاز می شوند (حسن و همکاران، ۲۰۰۹).

¹ Orscelik



شکل ۴-۱۵ اثر pH بر فعالیت آنزیم لیپاز لوله گوارشی لارو سن پنجم کرم سیب

براساس مطالعات گذشته pH بهینه آنزیم لیپاز در ابریش باف ناجور (*Lymantria dispar* (L.) (مرداکوویچ و همکاران، ۲۰۰۸)، کرم ساقه خوار برنج (*C. suppressalis* (Walker) (زیبایی و همکاران، ۲۰۰۸)، کرم شاخدار توتون (*M. sexta* (L.) (توناز^۱ و استنلی، ۲۰۰۴)، (*N. aenscens* (Moore) (زیبایی و همکاران، ۲۰۱۲) به ترتیب ۸/۲، ۱۰، ۸ و ۱۰ گزارش شده است. باتوجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه که نشان می دهد مراحل دارای تغذیه بالا، فعالیت آنزیمی بالایی نیز دارند و مراحل فاقد تغذیه، دارای کمترین فعالیت آنزیمی و یا حتی فاقد آن هستند که میتوان اینگونه توضیح داد که در مراحل آخر سنین لاروی و کمی قبل از ورود به مرحله شفیرگی، حشره بافت های چربی خود را ذخیره می کند تا در مراحل غیر فعال برای ادامه زندگی و انجام فرآیندهای مختصر بیولوژیکی و فیزیولوژیکی ذخیره کافی داشته باشد به همین دلیل آنزیم لیپاز در کمترین میزان ممکن خود ترشح و استفاده می شود و به عبارتی فعالیت خیلی کمی دارد. همچنین در حشرات کامل که رژیم تغذیه ای مبنی بر استفاده از شهد می باشد نیز آنزیم لیپاز فعالیت بسیار کمی دارد. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات سایر محققین میتوان تفاوت فعالیت آنزیم در مراحل مختلف نشو و نمایی را به تفاوت

¹ Tunaz

در نوع غذا و میزان تغذیه این مراحل نسبت داد. pH بهینه برای فعالیت یک آنزیم با pH معده حشره در برخی گونه های حشرات همخوانی دارد (داو، ۱۹۸۶). در بیشتر گونه های حشرات pH مجرای معده در محدوده ۶ تا ۷/۵ است (مرداکوویچ و همکاران، ۲۰۰۸). در حالیکه pH معده بالپولکداران، قلیایی است و بیشتر مطالعات انجام شده روی فعالیت آنزیم لیپاز در این حشرات نشان می دهد که فعالیت این آنزیم با pH قلیایی حمایت می شود. مطالعات انجام یافته توسط کاناووسو و همکاران (۲۰۰۱) روی آنزیم لیپاز کرم شاخدار توتون *M. Sexta* (L.) نشان از قلیایی بودن pH بهینه این آنزیم دارد. بررسی های انور و سالم الدین^۱ (۱۹۹۷) روی لیپاز رده لارو پروانه *Opilosoma obilique* (Walker) حداکثر فعالیت این آنزیم را در pH=۸ نشان داد. تئو و وودرینگ^۲ (۱۹۹۸) روی آنزیم لیپاز گوارشی سیرسیرک خانگی *Acheta domesticus* (Linnaeus) مطالعاتی انجام دادند و نتایج به دست آمده به این صورت بود که pH بهینه ۸ برای لیپاز مشاهده شد. هوسدن^۳ (۱۹۹۳) روی فعالیت لیپاز در ماهیچه های پروازی *M. Sexta* (L.) بیشترین فعالیت را در pH=۷/۵ مشاهده کرد. کریستلر و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت آنزیم لیپاز را بر روی شش گونه مختلف از لارو بالپولکداران بررسی کردند و متوجه شدند تمامی آنزیم های لیپاز این شش گونه بیشترین فعالیت خود را در pH= ۹-۱۰ دارند.

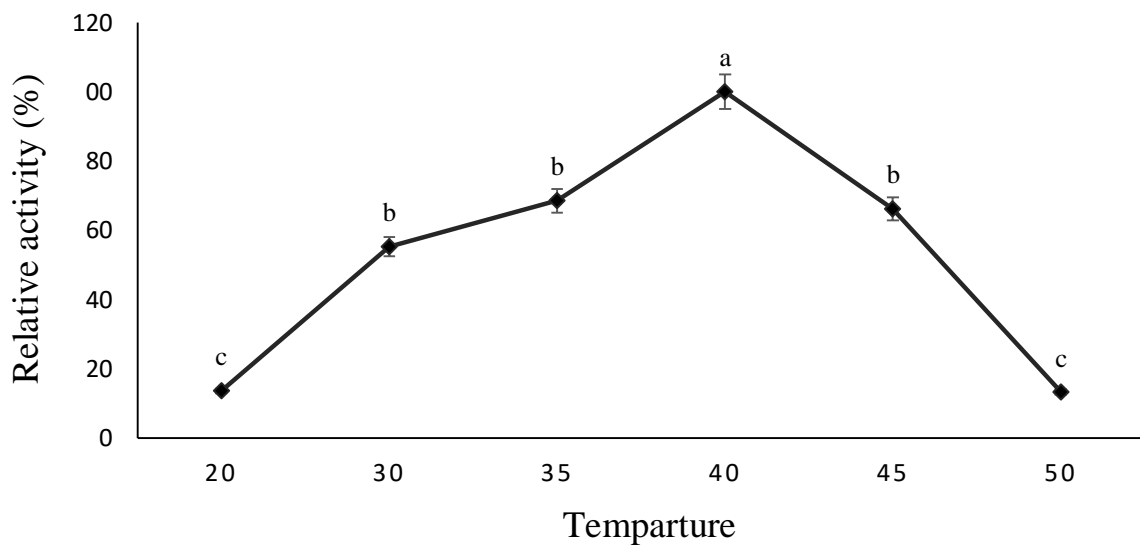
¹ Anwar & Saleemuddin

² Teo & Woodring

³ Heusden

۹-۴- تعیین دمای بهینه لپپاز

با توجه به شکل ۴-۱۶ فعالیت آنزیمی لپپاز در دامنه دمایی ۳۰-۴۰ درجه سانتیگراد افزایش یافته و فعالیت بهینه آن در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد است ($100 \pm 0/004$) و در دماهای بالاتر فعالیت آنزیمی کاهش می یابد به گونه های که در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتیگراد به صفر نزدیک می شود ($F=66/31$ $df_{t,e}=50,90$ $P \leq 0/0001$).



شکل ۴-۱۶- اثر دما بر فعالیت آنزیم لپپاز لوله گوارشی لارو سن پنجم کرم سیب

مطالعات انجام شده بر روی موجودات مختلف توسط سایر محققین، مواردی از تشابه و تفاوت در دمای بهینه فعالیت آنزیم لپپاز را نشان میدهد. در مطالعات زیبایی و همکاران (۲۰۰۸) روی فعالیت آنزیم لپپاز معده و غدد بزاقی کرم ساقه خوار برنج *C. suppressalis* (Walker) محدوده دمایی ۳۷ تا ۴۰ درجه سانتیگراد به عنوان دمای بهینه برآورد گردید. هوسدن (۱۹۹۳) دمای بهینه فعالیت لپپاز در ماهیچه های پروازی *M. Sexta* (L.) درجه سانتیگراد بدست آورد. کاپین و احمد^۱ (۱۹۸۰) فعالیت آنزیم لپپاز کرم ابریشم باف ناجور *L. dispar* را اندازه گیری و دمای بهینه آن را ۵۰ درجه سانتیگراد بیان کردند. با افزایش درجه حرارت، سرعت واکنشهای آنزیمی و غیرآنزیمی با افزایش انرژی جنبشی و فراوانی

¹ Kapin & Ahmad

مولکولهای واکنشگر بیشتر می گردد. با وجود این انرژی حرارتی همچنین می تواند انرژی جنبشی آنزیم را تا نقطه ای افزایش دهد که از سد انرژی مربوط به تخریب ساختمان سه بعدی آنزیم فراتر رود که در صورت افزایش بیش از حد، زنجیر پلی پپتیدی شروع به باز شدن یا واسرشته شدن میکند که همراه با ازدست رفتن فعالیت کاتالیتیکی آن خواهد بود. این موضوع شاید بتواند روند صعودی فعالیت آنزیمی تا دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، روند نزولی بعد از آن و توقف فعالیت آنزیمی در دماهای ۵۰ درجه سانتیگراد را توضیح دهد.

۴-۱۰- اثر یون های فلزی بر فعالیت لیپاز

اثر غلظت یون های آهن، منیزیم، منگنز، روی و مس بر فعالیت لیپاز بصورت کاهشی بوده و یون مس با شاهد یکسان عمل کرده و فعالیت آنزیم را در حالت یکنواخت حفظ کرده و اثری بر کاهش یا افزایش آن نداشته است ($P \leq 0.0001$ ، $F=10.1/34$ $df_{t,e}=10$ ، 153)، (شکل ۴-۱۷). به گزارش محققان یون های فلزی منیزیم، منگنز، پتاسیم سبب مهار فعالیت آنزیمی می شوند (باباکان و راند،^۱ ۲۰۰۶؛ رید،^۲ ۲۰۰۷؛ وارا لاکشمی^۳ و همکاران، ۲۰۰۹؛ مونتریو و اولیویرا،^۴ ۲۰۱۰).

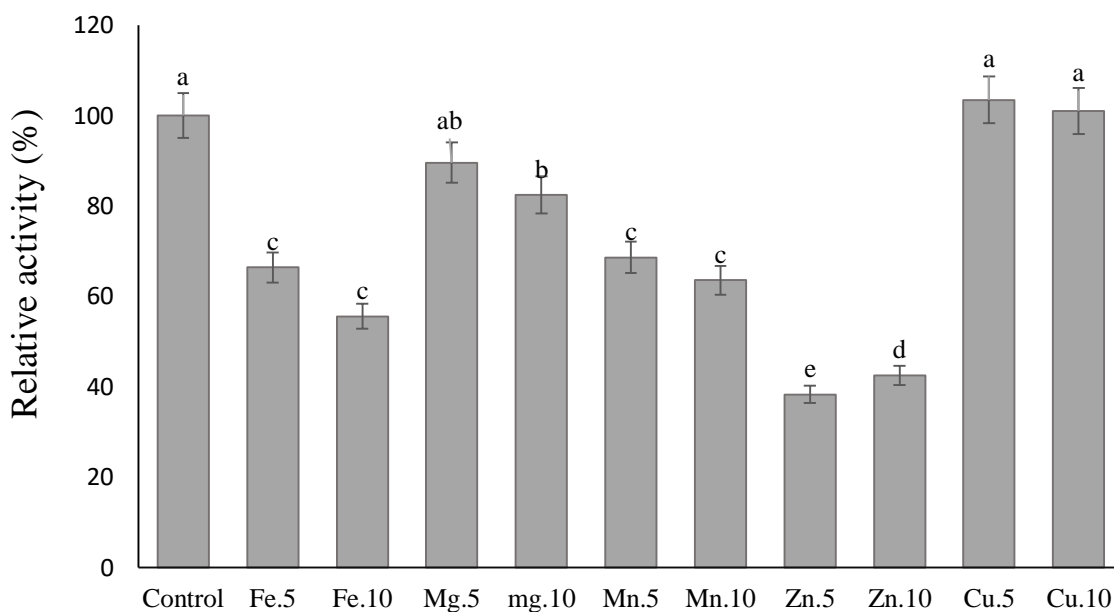
¹ Babakan & Rand

² Reyed

³ Varalakshmi

⁴ Monterio & Oliveira

مطالعاتی که زیبایی و همکاران (۲۰۱۲) بر روی *P. brassicae* L. انجام داد مشخص کرد که یون های Ca^{2+} ، Mg^{2+} باعث افزایش فعالیت آنزیم لیپاز در این حشره می گردد و هم چنین یون های کلسیم، منیزیم، سدیم و پتاسیم در *N. aenscens* Moore باعث مهار فعالیت آنزیمی می شود. در مطالعه زیبایی و همکاران (۲۰۰۸) روی فعالیت آنزیم لیپاز کرم ساقه خوار برنج *C. suppressalis* نشان داده شد که فعالیت این آنزیم در حضور یون پتاسیم کاهش می یابد.



شکل ۴-۱۷- اثر غلظت های یون های فلزی بر فعالیت آنزیم لیپاز لارو سن پنجم کرم سیب

منابع

- ابراهیمی، ا. (۱۳۷۸). مطالعه مرفولوژیک و آنزیماتیک گونه جنس (*Trichogramma Westwood*) در ایران، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، ص ۵۴۱.
- 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. (۱۳۸۶). آفات مهم درختان میوه. تهران، انتشارات سپهر. چاپ چهارم، ص ۱۵۸-۱۵۴.
- آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۷. اداره کل آمار و اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی. ص ۲۷۱.
- بهداد، ا. (۱۳۷۵). دایره المعارف گیاهپزشکی ایران. انتشارات نشر یادبود، ص ۱۴۴۰-۱۴۰۰.
- جهانجو، ف. (۱۳۹۰). مطالعه آنزیم های گوارشی زنبور برگخوار ثانوی رز (*Allantus viennensis* (Schr.) (Hym. : Tenthredidae). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی، دانشگاه تهران.
- دواجی، ع. اسماعیلی، م. (۱۳۴۴). آزمایش پنج فرمول سم در مبارزه با کرم سیب. نشریه آفات و بیماری های گیاهی ۱۴-۲۳. ۳۲.
- رجبی، غ. ر. (۱۳۹۰). حشرات زیان آور درختان میوه سردسیری ایران. موسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی، ص ۴۶۵.
- رضوی طباطبایی، پ. حسینی نوه، و. گلدانساز، س. ح. و شیرافکن خ. (۱۳۸۹). فعالیت پروتئولیتیکی گوارشی در شب پره کرم گلوگاه انار (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep: pyralidae) خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. تهران، ص ۵۱۹.
- رنجبر اقدم، ح. (۱۳۹۲). برآورد آستانه پایین دمایی رشد و نمودار گرمایی جمعیت های کرم سیب مستقر در استانهای آذربایجان غربی، اصفهان و تهران با استفاده از مدل های ریاضی. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور. سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی. ص ۴۹.
- شجاعی، م. نصرالهی، ع. و آزمایش، م. (۱۳۶۸). روش دستیابی به زنبورهای *Trichogramma* در انارستانها و مراحل تکثیر آن در بیوفابریک، خلاصه مقالات گردهمائی بررسی مسائل منطقه ای در استان یزد، ص ۴۲.
- طالبی جهرمی، خ. (۱۳۸۶). سم شناسی آفتکشها. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۴۳۶.

غلام زاده، م. قدمیاری، م. قنبری نژاد، ر. (۱۳۹۶). "ویژگی های بیوشیمیایی پروتئازهای گوارشی کفشدوزک خربزه *Epilachna chrysomelina* (Fabricius) (Col.: Coccinellidae). **ایران. ص ۳۰۴-۲۹۳.**

کوچکی، ب. (۱۳۹۰). تاثیر *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* بر فعالیت آنزیم های گوارشی و فنل اکسیداز لارو پروانه ابریشم باف پاییزی (*Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera : Arctiidae)). **پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان.**

محمدی، ر. (مترجم). (۱۳۸۵). بیوشیمی لنیجر، جلد اول، انتشارات آبیژ، ص ۵۵۴.

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

موسوی، م. (۱۳۷۹). مبارزه بیولوژیکی. چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ص ۴۱۲.

میراب بالو، م.، پوریان، ح. گلابتونچی، ا. و حیدری، پ. (۱۳۹۱). اطلس رنگی آفات درختان میوه. چاپ سوم، انتشارات مرز دانش تهران، ص ۲۹۸.

نوری، پ. بیات اسدی، ه. فرزانه، ا. و رضائینژاد، م. (۱۳۶۸). بکارگیری زنبور *Trichogramma* در مبارزه بیولوژیک علیه کرم گلوگاه انار در ورامین و ساوه، خلاصه مقالات گردهمایی بررسی مسائل منطقه ای در استان یزد، ص ۲۸.

Ajamhassani, M., Zibae, 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.

Anwar, A. and Saleemuddin.M.,(1997)."Alkaline-pH-acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma oblique*: stability and potential as detergent additives", **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 25: 43-46.

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.

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.

Azevedo T. R., Terra W. R., 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.

- Babakan., S and Rand AG, (2006). "Characterization of honey amylase". *Journal of Food Science* 72(1): C050-5.
- Baker, J. E., (1991). "Properties of amylase from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granaries*". *Insect Biochemistry* 13: 421- 428.
- Baker, J. E. (1991). "Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*". *Insect Biochemistry* 21, 61521.
- 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.
- Baker, R.J. and Y. Lehner. (1972). "A look at honey bee gut functions", *Bee J.* 112: 336-338.
- Ballal, C.R. and Singh, S.P. (2002). "The effectiveness of *Trichogramma chilonis*, *Trichogramma pretisun* and *Trichogramma brasiliense* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) as parasitoids of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Sunflower (*Helianthus annuus*) and redgram (Cajanus cajan)". *Biocontrol. Sci. Tech*, 13: 231-240.
- Barnes, M.M. (1991), "Codling Moth Occurrence, Host Race Formation, and Damage, in Tortricid Pests their Biology, Natural Enemies and Control, eds. L.P.S. Van der Geest and H.H. Evenhuis Amsterdam", *The Netherlands*: Elsevier, pp. 313-327.
- Barnes. M. M, M. J. Wargo.and Baldwin.,R L. (1965).New Low intensity ultraviolet light trap for detection of codling moth activity California Agriculture.19(10):6-7.
- Barret, A.J., Rawling, N.D., Woessner, J.F.,(1998). Handbook of proteolytic enzymes. *J Academic Press*, 795 pp.
- Berenbaum, M., (1980). "Adaptive significance of midgut pH in larval lepidoptera" *The American Naturalist* 115(1), 138-146.
- Bernfeld, P., (1955). Amylase, and . Methods in Enzymology 1: 149- 151.
- Blomefield, T.L. (2003). " Bionomics, Behaviour and control of the Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)". In Pome Fruit Orchards in South Africa, PhD Agric.
- Brandt, E. G., Hellgren, M., Brinck, T., Bergman, T. and Edholm O. (2009). "Molecular dynamics study of zinc binding to cysteines in a peptide mimic of the alcohol dehydrogenase structural zinc site". *Physical Chemistry Chemical Physics* 11 (6): 975- 83.

- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. and Lux, A. (2007). "Zinc in plants". *New Phytologist* 173 (4): 677-702.
- Bown, D.P., H.S. Wilkinson and J.A. Gatehouse. (1998). "Midgut carboxypeptidase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: enzyme characterisation, cDNA cloning and expression". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 739- 749.
- Boyd, J.R.D.W., (2002). "Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigrifulus* (Uhler) (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits". *Annals of the Entomological Society of America* 96: 667- 671.
- Browning, F. (1999). *Apples: The Story Of the Fruit of Temptation*. North Point Press.
- 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.
- Campos, F.A.P., Xavir-Filho, J., Silva, C.P., Ary, M.B., (1989). "Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midgut of larve of the Bruchid beetle , *Callosobruchus maculates* (F.). Department of biochem. Mulec. Biol". *Federal University of Ceara, P.O.Box* 1065.92b:51-57.
- Canavoso, L. E. and M. A. Wells, (2000), "Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*", ***Insect Biochemistry and Molecular Biology***, 30: 1173-1180.
- Canavoso, L. E., Z. E. Jouni, K. J. Karnas, J. E. Pennington and M. A. Wells, (2001). "Fat metabolism in insects", *Annual Review of Nutrition*, 21:23-46.
- Carde R.T., Baker T.C., and Castrovillo P.J. (1997). Disruption of sexual communication in *Laspeyresia pomonella* (codling moth), *Grapholitha molesta* (oriental fruit moth) and *G. prunivora* (lesser apple worm) with hollow fiber attractant sources. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 22: 280-288.
- Casu, R.E., Jarmey, J.M., Elvin, C.M., (1994). "Isolation of a trypsin like serin proteases gene family the sheep blowfly *Lucilia cuprina*". *Insect Molecular Biology*, 3: 159-170.
- Casu, R.E., Pearson, R.D., Jarmey, J.M., (1994). "Excretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and amino acid sequence from mRNA". *Insect Molecular Biology*, 3:201-211.
- Cencek T. (2003). "Thermostability of *Hypoderma lineatum* antigen". Bull. *Veterinary Institute in Pulawy* 47: 121-131.

- Charmillot P.J., Hofer D., and Pasquier D. (2000). "Attract and kill: a new method for control of the codling moth *Cydia pomonella*." *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94: 211-216.
- Chapman R. F. (1998). The insects Structure and Function. *Cambridge University Press*. 770 pp.
- 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 a major component". *Insect Biochemistry* , 20, 157-167.
- Christeller, J., T. Sawsan Amara and F., Carrière, (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.
- Cohen, A.C., (1993). "Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzyme in a predaceous, *Zelus renardii*". *Journal of Insect Physiology* 39, 823-829.
- Colebatch, G., Cooper, P., East, P., East, P., (2002). "cDNA cloning of a salivary chymotrypsin like protease and the identification of six additional cDNA encoding putative digestive protease from green mired *creontiades dilutes* (Hemiptera: Miridae)". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1056-1075.
- D'Amico, S., Gerday C. and Feuer, G. (2000). "Structural similarities and evolutionary relationships in chloride-dependent α - amylases." *Gene*, 253: 95- 05.
- Davis, B. J., (1997). " Disc electrophoresis II. Method and application to human serum Proteins". *Annals of the New York Academy of Sciences* 12: 404- 427.
- Dow, J. A. T. (1986). "Insect midgut function" *Advances in Insect Physiology*, 19: 187-329.
- 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.
- Fabrick, J., Behnke, C., Czaplá, T., Bala, K., Rao, A.G., Kramer, K.J. & Reeck, G.R. (2002) "Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern cornrootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae)". *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 405-415.

- Funke, I. and M.F. Melzig, (2006). "Traditionally used plants in diabetes therapy- phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity *Busseola fusca* (Fuller) ". **Braz. J. Pharmacogn.** 16: 1-5.
- Ferreira, C., B.B. Torres and W.R. Terra. (1998). "Substrate specificities of midgut - glycosidases from insects of different orders". **Comparative Biochemistry Physiology** 119: 219- 225.
- Ferreira C., Marana S. R., Silva C. and Terra W. R. (1999). "Properties of digestive glycosidase and peptidase and the permeability of the peritrophic membranes of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae)". **Comparative Biochemistry Physiology** 123: 241-250.
- Ferreira, A.H.P., Marana, S.,R Terra, W.R., Ferreira, C., (2001). " Purification molecular cloning, and properties of a β -glucosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) Larvae". **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 31, 1065-1076.
- Fosmire, G. J. (1990). "Zinc toxicity". **The American Journal of Clinical Nutrition** 51 (2): 225-227.
- Franck, P., Reyes M., Olivares J., Sauphanor, B. (2007). "Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers". **Molecular Ecology**, 16: 3554-3564.
- Garcia-Carreno F. L. , L. E, Dimes and Haard N. F. (1993). "Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous 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 larvae of tomato moth, *Lacanobia oleraceae*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo". **Journal of Insect Physiology**, 45: 545-558.
- Gatehouse, L.N., Shannon, A.L., Burgess, E.P.J., Christeller, J.T., (1997). "Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet Insect" **Biochemistry and Molecular Biology** 27, 929-944.
- 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. Hosseinaveh 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., Ghadamyary M. and Sharifi M. (2013). "Identification and characterisation of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis*

- nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae)". ***Plant Protection Science*** 50: 84–89.
- Gholamzadeh Chitgar M., Ahsaei S. M., Ghadamyari M., Sharifi M., Hosseini Naveh V. and Sheikhnejad H. (2014)." Biochemical characterization of digestive carbohydrases in the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae)". ***Journal of Crop Protection*** 2: 305-318.
- Gilbert, L.I., Latrou, K., Gill, S.S., (2005). Comprehensive molecular insect science 1 edn. Elsevier, Amsterdam, 355-365pp.
- Giliomee, J.H., and riedl, H. (2007). "A Century on Codling Moth Control in South Africa I: Historical Perspective", ***Journal of South African Horticultural Science***, 8:27-31.
- Graf, R., Hriegel, H., (1989). "The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) and in vitro stimulation un isolated midguts". ***Insect Biochemistry***, 19: 129-137.
- Granger K.R., Brunneer J.F., and Doerr M.D. (2003). Managing codling moth with new insecticides: Assail, Interpid and Success. Proceeding of the 77th Annual Western orchard pest& Diseases Management Conference, Portland, Washington.
- Grayson, J.M., (1985). "Acidity-alkalinity in the alimentary canal of twenty insect species". ***Virginia Journal of Science*** 2, 46-59.
- Grossmann, G.A., Terra, W.R., (2001)." Alpha-galactosidases from the larval midgut of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera)". ***Comparative Biochemistry and Physiology B*** 128, 109-122.
- Han, F. X., Banin, A., Su, Y., Monts, D. L., Plodinec, J. M., Kingery, W. L. and Triplett, G. E. (2002). "Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere". ***Naturwissenschaften*** 89 (11): 497-504.
- Hasan, F., A. Ali shah and A. Hameed, (2009). "Methods for detection and characterization of lipases" , ***Biotechnology Advances***, 27: 782-798.
- 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.
- Heusden, M. C. V., (1993)." Characterization and identification of a lipoprotein lipase from *Manduca sexta* flight muscle" ***Insect Biochemistry and Molecular Biology***, 23(7): 785- 792.
- Hopkin, S. P.,(1990). "Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods." ***Func. Ecol.*** 4: 321□327.

- Hori, K., (1974). "Plant growth promoting factor in the salivary glands of the bug *Lygus disponsi*" **J. Insect physiol**, 20: 1623-1627.
- 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.
- Hosseininaveh, V., Bandani, A.R., Azmayeshfard, p., hosseinkhani, S., Kazzazi, M., (2007). "Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidea: coleopteran)". **Journal of Stored Products Research** 43, 515-522.
- Houseman, J.G., Down, A.E.R., Momison, P.E., (1989). "Similarities in digestive proteases production in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) and *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae)". **Insect biochemistry**, 15: 471-474.
- Ishaaya I., Moore I. and Joseph D. (1971) "Protease and amylase activity in larvae of the Egyptian cotton worm, *Spodoptera littoralis* ". **J. Insect Physiol.** 17, 945-953.
- 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 Biochemistry** 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 immunocytochemical study". **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 26, 337-34.
- Kanekatsu, R., (1978)." Studies on further properties for an alkaline amylase in the digestive juice of the silkworm *Bombyx mori* " **J.Fac.Text. Sci.Technol**, 76:1-21.
- Kapin, M. A. and S. Ahmad, (1980). "Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.): optimum assay condition, quantification and characterization", **Insect Biochemistry**, 10: 331-337.
- Kawooya, J. T. and J. H. Law, (1988). "Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg". **Journal of Biological Chemistry** 263: 8748-8753.
- Kfir R., Overholt W. A., Khan Z. R. and Polaszek A. (2002). "Biology and management of economically important Lepidopteran cereal stem borer in Africa". **Annual Review of Entomology** 47: 701-731.
- 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.

- Kumar, S., K. Kikon, A. Upadhyay, S. S. Kanwar and R. Gupta, (2005), Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS Protein Expression and Purification, 41: 38-44.
- Lecadet, M.M., dedonder, R., (1966). "Lee proteases de pieris brassicae, purification et proprietes". *Bull. Soc Chim. Biol*, 48:631-660.
- 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.
- Light, D. M., A. L. Knight. (2001). "A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.)." *Naturwissenschaften* 88(8): 333-338.
- Lindqvist, L. (1992). "Accumulation of cadmium, copper, and zinc in five species of phytophagous insects". *Environmental Entomology* 21 (1): 160-163.
- 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
- Low N. H., Vong V. and Spornest P. (1986). "A new enzyme, β - glucosidase, in honey bee" *.Journal of Apical Research* 25: 178-181.
- Majumder, U. K. and A. Sengupta, (1979). "Triglyceride composition of chrysalis oil, an insect lipid". *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56: 620-623.
- 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.
- Markwick, N. P., Reid, S. J., Laing, W. A., & Christeller, J. T. (1996). " Effects of dietary protein and protease inhibitors on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae)". *Journal of economic entomology*, 88(1), 33-39.
- Marinotti O. and James A. A. (1990). "An alpha-glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito *Aedes aegypti*" *Insect Biochemistry* 6: 619-623.
- Mason, C. E., Stromdahl, E. Y. & Pesek, Jr., J. D. (2001). " Placement of pheromone traps within the vegetation canopy to enhance capture of male European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae)". *Journal of Economic Entomology*, 90, 795-800.
- Mehrkhrou, F., Mahmoodi, L. & Mousavi, M. (2013) "Nutritional indices parameters of large white butterfly *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) on different cabbage crops". *African Journal of Agricultural Research* 8, 3294.3298.

- Miller J. W., Kramer K. J. and Law J. H. (1995) "Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, Johannson (Lepidoptera: Sphingidae)". **Comp. Biochem. Physiol.** 48B, 117-129.
- Moffat, M.R., Blakmore, D., Lehane, M.J., (1995). "Studies on the synthesis and secretion of digestive trypsin in *Stomoxys calcitrans* (Insecta-Diptera)". **Comparative Biochemistry and Physiology** 110(B) 126:291-300.
- Monterio P and Oliveira PD, (2010). "Application of microbial α -amylase in industry". **Brazilian Journal of Microbiology** 41: 850-861.
- Mrdakovic, M., J. Lazarevic, V. Peric-Mataruga, L. Ilijin and M. Vlahovic, (2008). "Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larval midgut" **Folia Biologica (Krakow)**, 56 (1-2): 103-110.
- Nagarajn, J., Abraham, E.C., (1995)." Purification and characterization of digestive amylase from the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae)". **Comp.Biochem. Physiol**, 110: 201-209.
- Nakonieczny, M., K. Michalczyk and A. Kedzierski. (2006)." Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *Frankenbergeri*". **Comptes Rendus Biologies** 329: 765- 774.
- Nation, J., (2002). Insect physiology and biochemistry. **CRC Press**, 485 pp.
- Norduland, A.D. (1994). "Habitat Location by Trichogramma in Wajnbrg E. and S.A. Hassan". **Biological control with egg parasitoid**, 15:155-163.
- Orscelik, O., M. A. Akpınar and S. Gorgun,(2008)." Partial purification of total body lipase from *Gryllus campestris* L. (Orthoptera: Gryllidae)". **Fen Bilimleri Dergisi**, 28 (2): 1-10.
- Padayachee T, (2006). "Application of thermostable α -amylase from *Thermomyces lanuginosus* ATCC 58157 to nutritionally enhance starch based food". **PhD Dissertation of Biotechnology, Durban University of Technology**.
- Park, J. D., Y. and Klaassen, C.D. (2009). "Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals ". **Toxicology** 163(2): 93-100.
- Parry M.W. (1996). A study of the interaction of some fungal metabolites with the insect species *Drosophila melanogaster*. **Birkbeck College University of London**, 215 pp.
- Patankar, A.G., Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Sainani, M. N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. (2001)." Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest". **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 31, 453-464.

- Pereira M. E., Dörr F. A. Peixoto N.C., Lima-Garcia J. F., Dörr 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.
- Peterson, A.M., Barillas-Mury, C.V., Wells, M.A., (1995). "Sequence of three cDNAs encoding an alkaline midgut trypsin from *Manduca sexta*". ***Insect Biochemistry and Molecular Biology*** 24, 463-471.
- Pratviel-Sosa F., Clemont S., Percheron F. and Chararas C. (1986). "Studies on glycosidases and glucanases in *Thaumetopoea pityocampa* larvae. PartI. Purification and som properties of the α - glucanases". ***Comparative Biochemistry and Physiology*** 84: 77-81.
- Pontoh, J. and N.H. Low. 2002. "Purification and characterization of α -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*)". ***Insect Biochemistry and Molecular Biology*** 32 : 679 – 690.
- Rabossi A, Stoka V, Puizdar V, Turk V, Quesada-Allue LA (2004) "Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis". ***Archives of Insect Biochemistry and Physiology*** 57: 51–67.
- 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.
- Reyed M, (2007). "Biosynthesis and properties of extracellular amylase by encapsulation *Bifidobacterium bifidum* in batch culture". ***Australian Journal of Basic and Applied Sciences*** 1(1): 7-14.
- Saberi Riseh N., Ghadamyari M. and Motamednia B. (2011). "Biochemical characterization of α -amylase from digestive system and haemolymph of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col : Curculionide)". ***Global Conference on Entomology 2011, Chiang Mai, Thailand***. P. 350.
- 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.
- Santos, C.D., W.R. Terra. (1986)." Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis ello* larvae and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane". ***Insect Biochemistry*** 16: 691- 700.

- Santos, C.D., W.R. Terra. (1984). "Plasma membrane associated amylase and trypsin: interacellular distribution of digestive enzyme in the midgut of the cassava hornworm *Erinnys ello*". *Insect Biochemistry*, 14: 587-595.
- Sasaki, T., Suzuki, Y., (1982). "Alkaline proteases in digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*". *Biochem. Biophys. Acta*, 703: 1-10.
- Srinivasan, A., Giri A.P., Gupta, V.S., (2006). "Structural and functional diversities in lepidopteran serin proteases". *Cellular & Molecular Biology Letters* 11(1), 132-154.
- SAS Institute INC. (1997). SAA/STAT user's guid for personal computers, version 6.12. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- 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.
- Sharma, R., Y. Chisti and U. C. Banerjee, (2001). "Production, purification, characterization and application of lipases" *Biotechnology advances*, 19: 627-662.
- Sharma H. C. and Ortiz R. (2000). "Transgenics, pest management, and the environment". *Current Science* 79: 421-437.
- Shabarari M., Naseri B., Zibaee A. Hajizadeh J. (2014). "Characterization of digestive α -amylase in the midgut of willow leaf beetle *Plagioderia versicolora* (Coleoptera: Chrysomelidae)". *Journal of Crop Protection* 3: 245-254.
- Tanada, Y. and Kaya, H. K. (1993). Fungal infection. In: Insect pathology. *Academic press. San Diego*, pp. 318-362.
- Tatli, A., Bandani, A. & Naghdi, M. (2010)" Study of the digestive protease in the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomyliidae)". Proceedings of *the 19th Iranian Plant Protection Congress*, Tehran, Iran, p. 300. [In Persian].
- Teo, L. H. and J. P. Woodring, (1988). "The digestive protease and lipase in the house cricket *Acheta domesticus*" *Insect Biochemistry*, 18(4): 363-367.
- 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., (1994). "Insect digestive enzyme: Properties, compartmentalization and function". *Comparative Biochemistry and physiology* 109, 1-62.
- Tunaz, H. and D. W. Stanley, (2004). "Phospholipase A2 in salivary glands isolated from tobacco hornworms, *Manduca sexta*" *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 139: 27- 33.
- Vatanparast M. and Hoseininaveh V. (2010). "Digestive amylase and pectinase activity in the larvae of alfalfa weevil *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae)". *Entomological Research* 6: 328-335. 87.
- Valencia-Jimenez, A., Arboleda, J.W., Lopez Avila, A., Grossi-de-Sa M.F., (2008). "Digestive α -amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors". *Bulletin of Entomological Research* 98, 575-579.
- Valencia, A., Bustillo, AE., Ossa, GE., Chrispeels, MJ., (2000). "Alpha-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors". *Insect Biochem Mol Biol.* 30(3), 139-49.
- Valera, L., G., Welter. S. C., Jones. V. P., Brunner. J. F. & Riedl. H. (2010). "Monitoring and Characterization of insecticide resistance in Codling moth *Cydia Pomonella* (Lep.: Tortricidae) in four western states. *Journal of Economic Entomology*. 86(1):1-10.
- 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.
- Varalakshmi KN, Kumudini BS, Nadini BN, Solomon J, Suhas R, Mahesh B and Kavitha AP, (2009). "Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore". *Polish Journal of Microbiology* 58(1): 29-36.
- Vazquez-Arista, M., R. Smith, N.A. Martinez Gallardo and Bianco-Labra. (1999). "Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva *Postephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostichidae)". *Journal of Stored Products Research*, 35, 167-174.
- 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.
- Vinokorov, K.S., Oppert, B., Elpidina, E.N., (2005). "An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using P-nitroanilide substrates". *Analytical Biochemistry* 337, 164-166.
- Yamamoto T. (1988). "Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes". *Amylase Research Society of Japan*, CRC Press, 201 pp.

- 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.
- Yazdani E., J.Sendi J., Zibae A. Ghadamyari M. (2010)." Enzymatic properties of α -amylase in the midgut and the salivary glands of mulberry moth, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera : Pyralidae)". **Comptes Rendus Biologies** 23: 17-21.
- Walter, S.C. (2008). Codling Moth, in Encyclopedia of Insects, eds. H.Resh and R.T. Carde, USA: Elsevier, pp. 189-199.
- Wang. S., Lkedidiala, J. N., Tangj. & Hansen, J. D. (2002). "Thermal death Kinetics and heating rate effects for fifth. Instar Codling Moth *Cydia Pomonella* (Lep.: Tortricidae) in four western states". **Journaal of Economic Entomology**. 86(1): 1-10.
- Wiessing A., Engkagula A., Wongpiyasatida A. & Chuwongkomon k. (2008). "Purification and characterization of *Callosobruchus maculates* α -amylase". **Kasetsart Journal Natural Science** 42: 240 – 244.
- Wilson, A. (1994). "The living rock: the story of metals since earliest times and their impact on developing civilization". **Woodhead publishing**
- Withworth, S.T., Blum, M.S., Travis, J., (1998)." Proteolytic enzyme from larvae of the fire ant, *Solenopsis Invicta*: Isolation and characterization of for serin endopeptidase". **Journal of Biochemistry and Molecular Bioligy**, 273, 14430-14434.
- Zeng, F., Zhu, Y., Cohen, A. C., (2002). "Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *lygus Hesperus* (Hemiptera: Miridae)". **Insect Biochemistry Molecular Biology**, 32, 455-564.
- Zhu, Y.C., Kramer, K.K., Oppert, B., Dowdy, A.K., (2002). "Cdna of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strins with different susceptibilities to *Bacillus yhurngiensis* Toxin". **Insect Biochemistery and Molecular Biology**, 32,215-224.
- Zibae, 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.
- Zibae 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.

Ziegler, R., (1991). "Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*". *Journal of Comparative Physiology* [B] 161: 125-131.

Abstract

Cydia pomonella (L.) (Lep: Tortricidae) is one of the most important pests of apple orchards, which causes significant damage every year. Today, in order to control the harmful insects, much attention has been paid to their physiological characteristics, with the aim of disturbing the digestive processes and absorption of food in their stomachs. The determination of biochemical properties of digestive enzymes is the first effective step in the adoption of physiological control methods. To determine the physiology of digestion of apple grape, polluted apple fruits in spring and summer were collected from the Torbat Jam turtlenecks, and apple larvae were removed from the fruits and examined. The gastrointestinal tract of larvae of age 5 was extracted separately in laboratory conditions and stored for -20 freezing for enzymatic evaluation. The maximum activity of α -amylase, α -glucosidase and β -glucosidase enzymes was investigated in the presence of starch substrate, para-nitrophenyl α -glucopyranoside and para nitrophenyl β -glucopyranoside and in the range of different acidity and their optimum at pH 10, 8 and 8. The optimal temperature of these enzymes was tested at different temperature ranges, respectively at 35, 30 and 30 respectively. Using the azocasin substrate, the activity of the general protease of the gastrointestinal tract in a range of acidity was studied and it was determined that its maximum activity was at pH=11. The optimal temperature of the protease was also measured at 30 ° C. The activity of trypsin, chymotrypsin and elastase specific proteases was also studied by using special substrates of benzoyl-L-arginine-p-nitroallanidesuccinyl-Alanine-Alanine-Proline-phenylalanine-p nitroallanide, n-succinylalanine-alanine-alanine-p-nitroalanide were studied in a range of acidity and peak activity at pH=11. The optimal temperature of all three proteases was observed at 30 ° C. In addition, the acidity of the lipase enzyme with paranitrophenyl butyrate specific substrate was 8 and its maximum operating temperature was 40 ° C.

In the study of concentrations of 5 and 10 mM ions Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} copper on α -glucosidase and β -glucosidase enzymes, trypsin, chymotrypsin, elastase and lipase with specific substrates, 10 mM ion Cu^{2+} increased the enzymatic activity of α -glucosidase, β -glucosidase and other ions inhibited this enzyme activity and decreased activity. In studying the effect of different concentrations of the mentioned ions on serum protease activity, the activity of the enzyme elastase was increased by the effect of Zn^{2+} 5 mM and other ions reduced the serum protease activity. The lipase enzyme was also

inhibited by these ions, and Cu^{2+} showed neutral state at both concentrations of 5 and 10 mM.

The α -amylase zymograms showed two isoforms of this enzyme, as well as trypsin special protease zymograms using two band nitrocellulose plates in the *C. pomonella* (L.) gastrointestinal tract. The general protease zymogram was shown using a four band hemoglobin substrate.

Keywords: *Cydia pomonella*, Digestive Enzymes, pH, Temperature, Metal ions, Zymograms.



Faculty of Agriculture
M.Sc. Thesis in Entomology

Evaluation of the activity α -amylase and serin proteases of *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)

By:

Sonia Amiri Jami

Supervisors:

Dr. Maryam Ajamhassani

Dr. Vahid Hosseininaveh

January 2019