

تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز گوارشی در زنبور برگ‌خوار ثانوی رز (*Allantus viennensis* Schr. (Hym.: Tenthredinidae))

فرشید جهانجو^۱ - مولود غلام زاده چیتگر^{۲*} - محمد قدمیاری^۳ - رضا حسینی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۶

چکیده

لاروهای زنبور برگ‌خوار ثانوی رز *Allantus viennensis* به عنوان یکی از آفات مهم گیاه رز از برگ‌ها تغذیه کرده و در تراکم‌های بالا در مدت کوتاهی گیاه را عاری از برگ می‌کنند. داشتن اطلاعات در مورد ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی اولین گام در جهت استفاده از بازدارنده‌های گیاهی در برنامه‌های کنترل آفات می‌باشد. بنابراین در تحقیق حاضر ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز در دستگاه گوارش لارو *A. viennensis* بررسی شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در لاروهای سنین ۵-۲ زنبور نشان داد که با افزایش سن لاروی، میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته و در لاروهای سن پنجم بیشترین میزان مشاهده می‌شود. همچنین میزان فعالیت ویژه آنزیم در روده میانی نسبت به روده جلویی و عقبی بیشتر است. حداکثر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش به ترتیب در pHهای ۸، ۶ و ۶ بود. دمای بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز به ترتیب در ۵۰، ۶۰ و ۳۰ درجه سلسیوس بدست آمد. با استفاده از منحنی Lineweaver-Burk مقادیر K_m و V_{max} آنزیم آلفا-آمیلاز به ترتیب برابر با ۱/۴۷۸ میلی‌گرم بر میلی لیتر و ۰/۱۴ میکرومول بر دقیقه محاسبه شد. مقادیر K_m آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش به ترتیب برابر با ۰/۶۹ و ۰/۴۱ میلی‌مولار و مقادیر V_{max} به ترتیب برابر با ۰/۸۴ و ۱/۷۶ میلی‌مولار بر دقیقه بر میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج زایموگرام روی ژل نشان داد که آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش لارو *A. viennensis* به ترتیب دارای ۳، ۱ و ۱ ایزوفریم می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، بازدارنده‌ها، رز، زنبور برگ‌خوار ثانوی

مقدمه

و بال‌غشاییان (۱۹) اشاره کرد. آلفا گالاکتوزیداز جزو اگزوگلیکوزیدازها بوده که پیوندهای انتهایی D-گالاکتوز را در طیف وسیعی از الیگوساکاریدهای گالاکتوزیدی نظیر ملی‌بیوز، استاکیوز و رافینوز هیدرولیز می‌کند. بتا گالاکتوزیدازها آنزیم‌هایی هستند که سوبستراهای دارای بخش‌های گالاکتوزیدی مانند لاکتوز، گلیکولپیدیها، پروتئوگلیکان‌ها، الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها را می‌شکنند (۲۸). این آنزیم‌ها در تجزیه دی و الیگوساکاریدهای حاصل از همی سلولز و سلولز و همچنین در برهم‌کنش‌های بین گیاهان و حشرات نقش دارند (۳۷). آنزیم‌های آلفا - بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش راسته‌های مختلف حشرات توسط محققین متعددی استخراج و مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۸، ۱۹ و ۲۰).

زنبور برگ‌خوار ثانوی رز (*Allantus viennensis* Schr. (Hym.: Tenthredinidae)) یکی از آفات مهم گیاه رز در استان گیلان می‌باشد. لاروهای این زنبور به‌طور دسته جمعی از سطح پارانشیم برگ‌های جوان تغذیه می‌کنند و منجر به بی‌برگی بوته‌های گل رز و محمدی می‌شوند (۲۳). با توجه به اینکه گل محمدی در صنعت گلابگیری مورد استفاده دارد و نیز به عنوان گیاه زینتی در پارک‌ها و

آنزیم‌های آلفا-آمیلاز جزو اندو آمیلازها بوده (۱۵) که عمل هیدرولیز پیوندهای آلفا دی ۱ و ۴- گلوکان در ترکیباتی همچون نشاسته، گلیکوژن و دیگر کربوهیدرات‌ها را بر عهده دارند (۲۷). این آنزیم‌ها کربوهیدرات‌ها را به واحدهای دی و مونومر تبدیل می‌کنند و بدین ترتیب این مواد را برای سلول‌های روده حشرات قابل جذب می‌سازند. آلفا آمیلازها در میکروارگانیزم‌ها، گیاهان و جانوران وجود دارند. این آنزیم‌ها در لوله گوارش بسیاری از حشرات یافت شده و مورد بررسی قرار گرفته است. از این جمله می‌توان به راسته بالپولکداران (۴)، راست بالان، دو بالان و سخت بال‌پوشان (۳۱ و ۳۷)

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی و دانشیاران دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲- استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

*-نویسنده مسئول: (Email: mgholamzadeh@areeo.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.v32i3.64128

رونشین به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز با استفاده از روش برنفلد (۸) اندازه گیری شد. در این آزمایش از محلول نشاسته یک درصد به عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز از بافر استات سدیم- گلیسین - فسفات ۵۰ میلی مولار استفاده شد. واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با مقدار ۱۰ میکرولیتر آنزیم (محلول رونشین)، ۵۰ میکرولیتر نشاسته به عنوان سوبسترا و ۴۰ میکرولیتر بافر، به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معرف^۱ DNS^۱ به مجموعه اضافه شد و برای مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. بعد از سرد شدن نمونه‌ها یک میلی لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتری (Stat fax 3200®) قرائت شد. این آزمایش برای سه قسمت از لوله گوارش (روده جلویی، روده میانی و روده عقبی) لاروهای سنین ۵-۲ زنبور برگخوار ثانوی رز انجام شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز و بر حسب میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز با استفاده از سوبستراهای p- نیتروفنیل-D- α - گالاکتوپیرانوزید^۲ و p- نیتروفنیل-D- β - گالاکتوپیرانوزید^۳ به ترتیب برای آلفا و بتا گالاکتوزیداز انجام شد. واکنش با ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیم، ۴۵ میکرولیتر سوبسترا و ۱۱۵ میکرولیتر بافر استات سدیم- گلیسین- فسفات ۵۰ میلی مولار در دمای ۳۵ درجه سلسیوس صورت گرفت. بعد از ۲۰ دقیقه، با افزودن ۶۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ نرمال واکنش متوقف و بعد از ۱۰ دقیقه مقدار هیدرولیز سوبستراهای نامبرده بر اساس تشکیل پارا-نیتروفنیل در دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد (۳۶).

اندازه گیری pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز

برای بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز، ابتدا pHهای مختلف ۱۲-۳ با استفاده از بافر استات سدیم- گلیسین- فسفات ۵۰ میلی مولار تهیه و سپس روی فعالیت آنزیمی بررسی شدند. برای تعیین اثر دما روی فعالیت آنزیم، دماهای مختلف (۱۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سلسیوس) مورد آزمایش

باغچه‌های منازل کشت می‌شود، در مکان‌های نامبرده کاربرد ترکیبات شیمیایی در کنترل آفات این گیاه پیشنهاد نمی‌شود. زیرا این ترکیبات اثر مخربی روی انسان و محیط زیست ایجاد کرده و نیز در صورت کاربرد مواد شیمیایی مشکل مقاومت آفات به آفت‌کش‌ها وجود خواهد داشت. این اثرات منفی ناشی از کاربرد ترکیبات سمی موجب شده است که روش‌های نوینی در راستای کنترل این دسته آفات مورد بررسی قرار گیرد (۱۹، ۲۴ و ۳۴). امروزه استفاده از ارقام مقاوم و گیاهان تراریخته یکی از روش‌های جدید کنترل آفات در برنامه‌های مدیریت تلفیقی به شمار می‌رود. وارد کردن ژن‌های بیان کننده مهار کننده‌های آنزیمی حشرات به گیاه و بیان ژن‌های مذکور در گیاه باعث مقاومت گیاهان به آفات می‌شود. در نتیجه طی تغذیه، مهارکننده‌ها وارد بدن حشره شده و آنزیم‌های گوارشی آن را بلوکه می‌کنند (۳۵). تاکنون مطالعات گسترده‌ای در زمینه بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات به ویژه بازدارنده‌های آلفا- آمیلاز انجام شده است. این بازدارنده‌ها به طور گسترده‌ای در گیاهان وجود دارند و به احتمال زیاد نقش مهمی در حفاظت از گیاهان در برابر حشرات عهده‌دار هستند (۱۶). تاکنون ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز در زنبور برگخوار ثانوی رز مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین در تحقیق حاضر ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های مذکور در لوله گوارش لاروهای *A. viennensis* جهت دستیابی به روشی جدید در کنترل این آفت تعیین شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه حشرات

لاروهای زنبور برگخوار ثانوی رز از روی بوته‌های گل رز *Rosa hybrid L.* محوطه دانشگاه گیلان در تابستان ۱۳۸۹ جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پرورش روی برگ‌های گل رز در اتاقک رشد حشرات در دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی $60 \pm 10\%$ و دوره روشنایی: تاریکی ۱۶:۸ انجام شد. شناسایی مراحل مختلف لاروی بر اساس اندازه گیری عرض کپسول سر طبق داده‌های حسینی و صحراگرد (۲۳) صورت گرفت.

تشریح حشره و تهیه عصاره آنزیمی

ابتدا لاروهای زنبور روی یخ بی‌حس شدند و سپس به کمک پنس، سطح شکمی لاروها را شکافته و لوله گوارش بیرون آورده شد. برای استخراج آنزیم‌ها از لوله گوارش از یک هموژنایزر دستی استفاده شد. نمونه‌های هموژنایز شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول

1- Dinitrosalicylic acid

2- pNaGa

3- pN β Ga

استات سدیم-فسفات-بورات ۲۵ میلی مولار با pHهای ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفت.

در مورد آنزیم‌های گالاکتوزیداز، پس از اتمام الکتروفورز، ژل به درون ظروف حاوی سوبستراهای اختصاصی هر یک از آنزیم‌ها که به طور جداگانه در بافر استات سدیم ۰/۱ مولار حل شده بودند منتقل گردید. از سوبستراهای $4\text{-MU}\alpha\text{Ga}^1$ و 4-MUBGa^2 به ترتیب برای آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز استفاده شد. با قرار دادن ژل در دستگاه ژل داگ باندهای تشکیل شده در زیر اشعه فرابنفش مشاهده شدند.

اندازه گیری پروتئین موجود در نمونه های آنزیمی

اندازه گیری پروتئین با استفاده از روش برادفورد (۱۰) انجام و از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS انجام گردید.

نتایج و بحث

فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گالاکتوزیداز

نتایج نشان داد که با افزایش سن لاروی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گالاکتوزیداز افزوده می‌شود (شکل‌های ۱ و ۲). بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم در لاروهای سن پنجم بدست آمد. این تفاوت در فعالیت ویژه آنزیم در مراحل مختلف رشدی را می‌توان به عواملی همچون نوع و میزان تغذیه در حشرات نسبت داد (۲۲). گزارشاتی مبنی بر این وجود دارد که نوع و غلظت آنزیم متناسب با مرحله رشدی حشره تغییر می‌کند. هوری (۲۱) با مطالعه فعالیت آنزیم آمیلاز در مراحل مختلف رشدی سن بدبوی کلم *Eurydema rugosa* نشان داد که در پوره‌های سن دوم فعالیت آنزیم بسیار کم اما در پوره‌های سنین سوم، چهارم و پنجم نسبتاً بالا بوده و در سن پنجم به حداکثر مقدار خود می‌رسد. فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در بافت معده میانی لارو پروانه *Catopsili crocale* به طور معنی‌داری با افزایش سن لاروی افزایش یافت. بین میزان جذب غذا و فعالیت آنزیم نیز ارتباط مستقیم مشاهده شد، به طوری که با افزایش تغذیه و جذب غذا فعالیت آنزیم نیز در بافت معده افزایش یافت (۱۲). در بررسی فعالیت آلفا-آمیلاز روی مراحل مختلف رشدی

قرار گرفت. در مورد آلفا آمیلاز، نمونه آنزیمی، سوبسترا و بافر در هر یک از دماهای مذکور به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس بقیه مراحل همانند روش کار توضیح داده شده در بند اندازه‌گیری فعالیت آنزیم انجام شد. در مورد آلفا-بتا گالاکتوزیداز واکنش با نمونه آنزیم، سوبسترا و بافر در هر یک از دماهای ذکر شده به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت و بقیه مراحل همانند روش کار توضیح داده شده در بند اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اجرا شد.

تعیین پارامترهای V_{max} و K_m آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گالاکتوزیداز

برای تعیین پارامترهای سینتیکی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز، ابتدا غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد از نشاسته ۱ درصد تهیه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر آنزیم به ۴۰ میکرولیتر بافر استات سدیم-گالاسین-فسفات ۵۰ میلی مولار افزوده و پس از ۴ دقیقه به هر یک از نمونه‌ها ۵۰ میکرولیتر محلول نشاسته از غلظت‌های تهیه شده اضافه گردید. بقیه مراحل همانند اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز انجام شد. ثابت میکائیلیس (K_m) و حداکثر سرعت واکنش (V_{max}) با استفاده از منحنی Lineweaver-Burk محاسبه شد.

برای تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز، ابتدا غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی مولار از سوبستراهای اختصاصی هر یک از آنزیم‌ها تهیه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیم به ۴۵ میکرولیتر سوبسترا با غلظت‌های تعیین شده و ۱۱۵ میکرولیتر بافر استات سدیم-گالاسین-فسفات اضافه شد. در زمان‌های صفر، ۱۵ و ۳۰ دقیقه بعد از شروع واکنش، با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ مولار واکنش متوقف و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. مقدار V_o آنزیم در غلظت‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار اکسل و مقدار K_m و V_{max} با استفاده از نرم افزار هایپر اندازه گیری شد.

الکتروفورز Native PAGE و زایموگرام آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گالاکتوزیداز

برای انجام این کار از روش دیویس (۱۳) استفاده شد. بعد از بارگذاری نمونه‌ها، الکتروفورز در ۱۰۰ ولت و در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. در مورد آلفا آمیلاز، پس از اتمام الکتروفورز، محلول تراپتون ۲/۵ درصد روی ژل ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه ژل در آن محلول قرار داده شد. پس از شستشو با آب مقطر، ژل داخل بافر تریس قرار داده شد. سپس ژل به داخل محلول نشاسته یک درصد منتقل شد و بعد از آن داخل محلول لوگول قرار گرفت. همچنین زایموگرام این آنزیم در pHهای مختلف انجام شد. در بررسی اثر pH، ژل در محلول نشاسته ۱ درصد حل شده در بافر

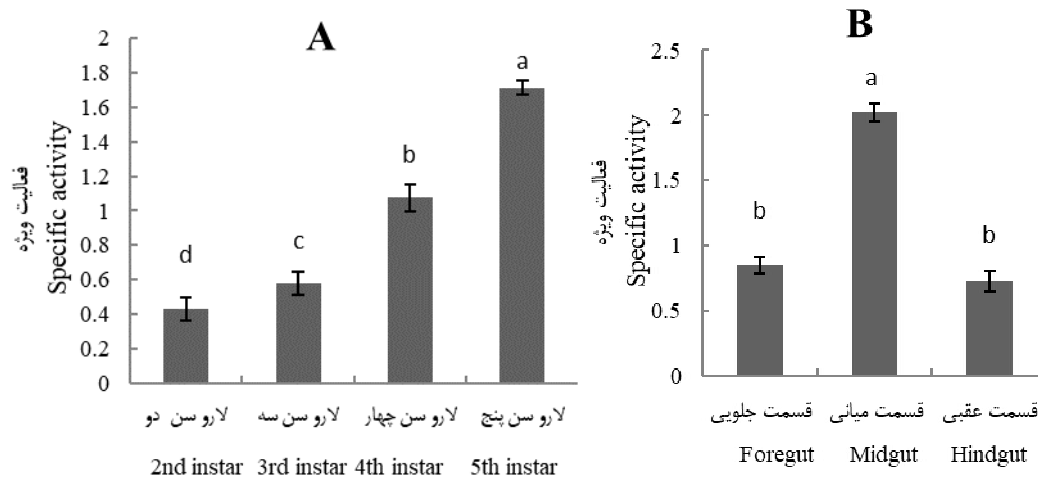
آزمایش مقدار فعالیت ویژه آنزیم بتا-گالاکتوزیداز نسبت به آلفا-گالاکتوزیداز در بافت‌های مورد آزمایش بیشتر بود.

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

فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در لوله گوارش لارو *A. viennensis* در دامنه‌ای از ۵-۱۰ pH مشاهده شد و بیشترین فعالیت آنزیم در pH=۸ بدست آمد (شکل ۴). در تشابه، pH بهینه در لوله گوارش لارو زنبور برگخوار رز *Arge rosae* برابر ۸ گزارش شد (۱۹). اسیدیته یکی از خواص داخلی بسیار مهم معده است که روی آنزیم‌های گوارشی تأثیرگذار می‌باشد. آنزیم‌ها دارای دامنه‌ای از pH مطلوب می‌باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در pH بالاتر و پایین‌تر از آن فعالیت‌شان کاهش می‌یابد (۱۵). اسیدیته می‌تواند روی پایداری آنزیم و بهبود فعالیت بهینه آن تأثیرگذار باشد. اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم با اسیدیته معده حشره در برخی گونه‌ها هم‌خوانی داشته و تحت تأثیر فاکتورهای نظیر غذا، pH غذا و جمعیت میکروارگانسیم‌های معده می‌باشد (۱۴).

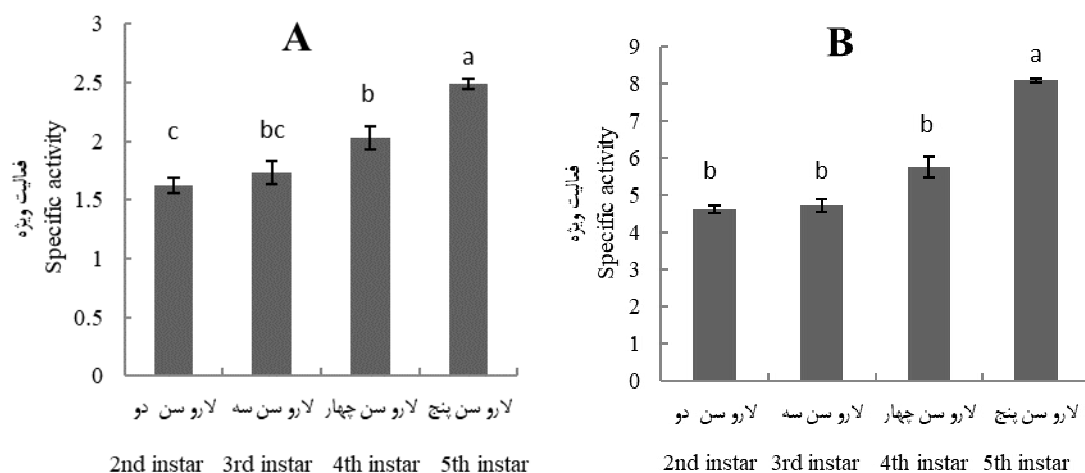
Spodoptera frugiperda حداکثر فعالیت آنزیمی در سن آخر لاروی اتفاق افتاد (۳). در تحقیق حاضر احتمالاً دلیل افزایش فعالیت ویژه آنزیم در لاروهای سنین بالاتر زنبور برگخوار ثانوی رز تغذیه بیشتر این مراحل لاروی و ذخیره منابع انرژی کافی برای تولید مثل مرحله بالغ باشد. زیرا با افزایش سن لاروی میزان تغذیه توسط لاروها بیشتر شده و حجم غذای بیشتری به داخل لوله گوارش وارد می‌شود. در نتیجه ترشح آنزیم‌های مختلف برای انجام عملیات هضم نیز بیشتر خواهد شد.

با اندازه‌گیری آنزیم در سه قسمت مختلف لوله گوارش لارو سن پنجم زنبور برگخوار ثانوی رز مشخص شد که میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-بتا گالاکتوزیداز در روده میانی به مراتب بیشتر از دو قسمت دیگر است (شکل ۱ B) و شکل ۳). مطابق با این نتیجه، بیشترین فعالیت آمیلولیتیک در روده میانی سن *Dysdercus koenigii* اندازه‌گیری شد (۳۲). میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در روده میانی لاروهای سن سوم کفشدوزک خربزه (۱۷)، سن سبز پنبه (۲۹) و سوسک برگخوار نارون (۳۳) از روده جلویی و عقبی بیشتر بود. نتیجه مشابهی برای فعالیت آنزیم‌های گالاکتوزیداز توسط قنبری نژاد و همکاران (۱۸) گزارش شد. طبق نتایج این



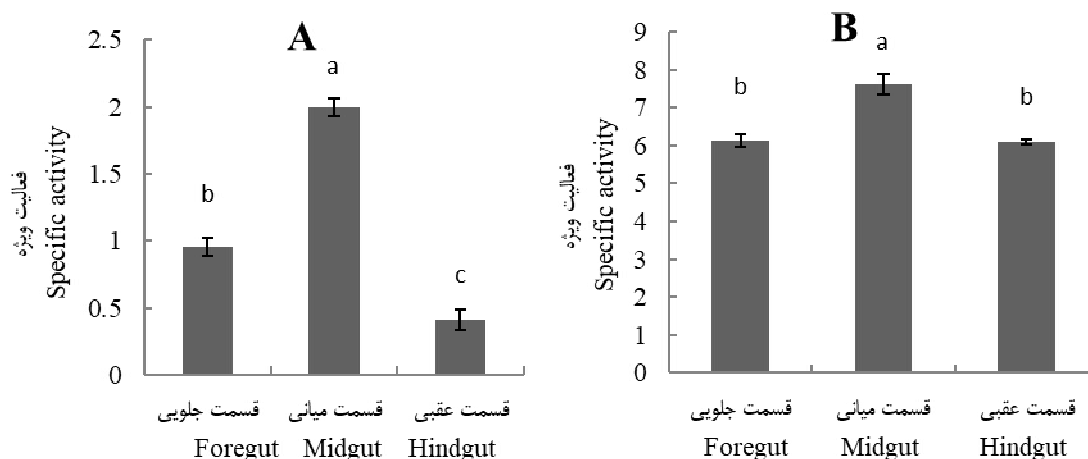
شکل ۱- میانگین فعالیت ویژه آنزیم آلفا-آمیلاز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در سنین مختلف لاروی (A) و سه قسمت لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis* (B)

Figure 1- Mean of α -amylase specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) in the different larval stages (A) and three parts of gut of fifth larval instar (B) of *Allantus viennensis*
Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$)



شکل ۲- میانگین فعالیت ویژه (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) آنزیم آلفا- گالاکتوزیداز (A) و بتا- گالاکتوزیداز (B) در سنین مختلف لاروی *Allantus viennensis*

Figure 2- Mean specific activity of α -galactosidase (A) and β -galactosidase (B) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) in the different larval stages of *Allantus viennensis*
Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$)



شکل ۳- میانگین فعالیت ویژه (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) آنزیم آلفا- گالاکتوزیداز (A) و بتا- گالاکتوزیداز (B) در سه قسمت لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis*

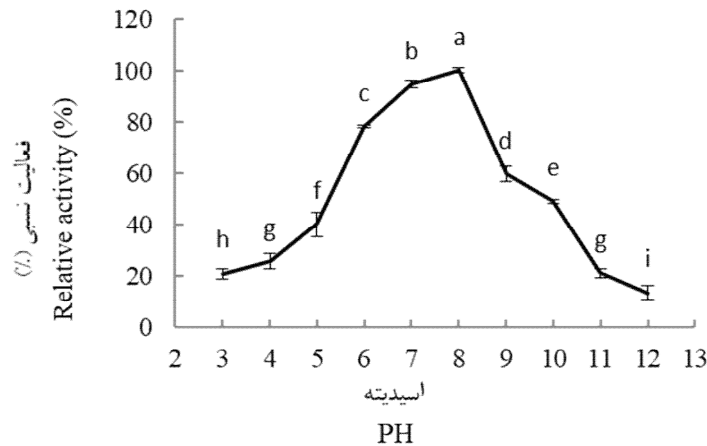
Figure 3- Mean specific activity of α -galactosidase (A) and β -galactosidase (B) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) in three parts of gut of fifth larval instar of *Allantus viennensis*
Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$)

و هضم غذا در حشرات را کاهش می‌دهند (۱۱). اما در pH بالاتر تشکیل کمپلکس بسیار کند صورت می‌گیرد (۷). همانطور که اشاره شد pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در دستگاه گوارش لاروهای زنبور برگخوار ثانوی رز در شرایط قلیایی بدست آمد. ازین رو می‌توان نتیجه گرفت چون گل محمدی غنی از تانن است (۲۵) احتمالاً یکی از دلایل فعالیت حداکثر این آنزیم در محیط قلیایی این باشد که pH بالای دستگاه گوارش باعث شده تا تانن موجود در گل محمدی با پروتئین‌های تغذیه شده توسط زنبور برگخوار ثانوی رز کمتر کمپلکس تشکیل دهد. همچنین قابل ذکر است که عدم وجود

برن بائوم (۷) از بررسی مقادیر pH گزارش شده برای ۶۰ گونه در ۲۰ خانواده از حشرات از جمله خانواده Tenthredinidae نتیجه گرفت که pH لوله گوارش لاروها به خصوصیات شیمی گیاه میزبان وابسته است. لاروهایی که از برگ‌های درختان که مشخصاً حاوی مقادیر بیشتری از تانن می‌باشند تغذیه می‌کنند، متوسط pH لوله گوارش آن‌ها ۸/۶۷ می‌باشد. مقادیر بالای pH در لوله گوارش لاروهای تغذیه کننده از غذاهای غنی از تانن ممکن است به عنوان یک مکانیزم محافظتی جهت کاهش سمیت تانن تکامل یافته باشد. زیرا تانن‌ها در pH‌های پایین به پروتئین‌ها باند شده و میزان تجزیه

آمیلاز نبوده که البته نتایج زایموگرام تأیید کننده این مطلب می باشد.

یک نقطه ماکزیمم در منحنی pH بر این نکته دلالت دارد که فعالیت آمیلولیتیک در روده میانی این آفت محدود به یک نوع آلفا-

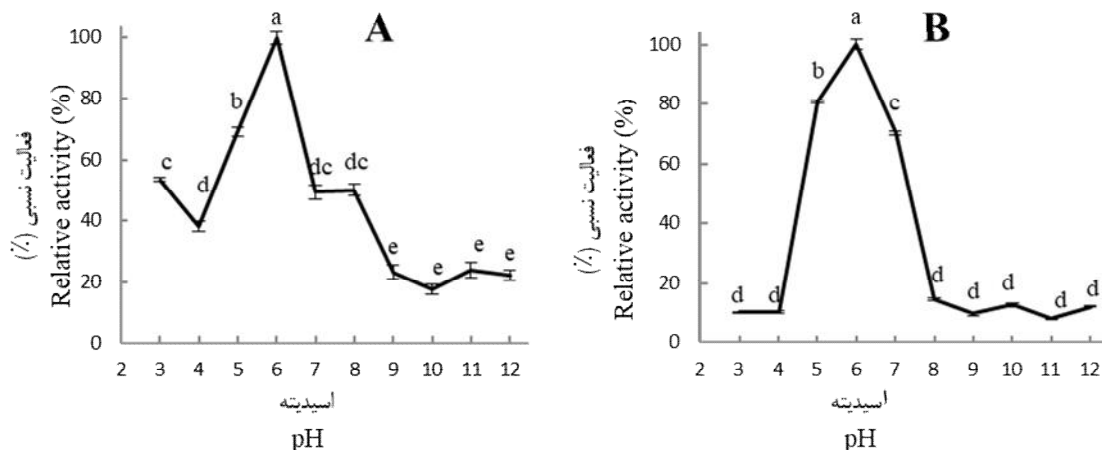


شکل ۴- اثر pH روی فعالیت آلفا-آمیلاز در لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis*

Figure 4- Effect of pH on the α -amylase activity in gut of fifth larval instar of *Allantus viennensis*
Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$)

درصد است و سپس به تدریج افزایش یافته تا به بیشترین فعالیت خود در pH=۶ می رسد و از pH=۸ به بعد میزان فعالیت آنزیم در لوله گوارش به صفر نزدیک می شود (شکل ۵ B). نتیجه مشابهی در زنبور برگخوار ثانوی رز در بررسی pH بهینه آنزیم های گلوکزیداز گزارش شد (۲۴). بیشترین فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش لارو زنبور برگخوار رز *A. rosae* در pH=۸ بدست آمد (۱۹).

pH بهینه فعالیت آنزیم های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش ۶ بدست آمد (شکل ۵). فعالیت آلفا گالاکتوزیداز در لوله گوارش در pH=۵ به میزان ۶۹٪ می رسد و سپس به تدریج افزایش یافته تا به بیشترین فعالیت خود یعنی ۱۰۰ درصد در pH=۶ می رسد و پس از آن در pH=۸-۱۲ میزان فعالیت بین ۱۷-۲۳٪ است (شکل ۵ A). فعالیت بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش در pH=۵ به میزان ۸۰

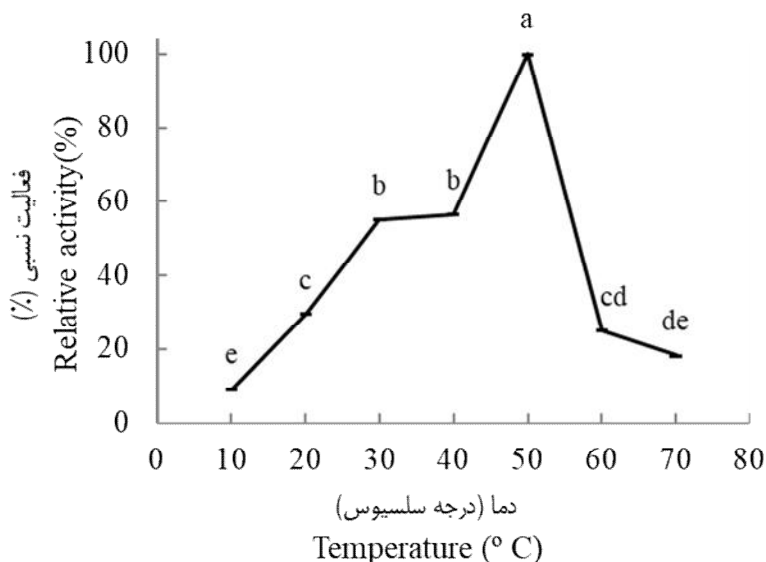


شکل ۵- اثر pH روی میانگین فعالیت آنزیم آلفا- گالاکتوزیداز (A) و بتا- گالاکتوزیداز (B) در لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis*
Figure 5- Effect of pH on α -galactosidase (A) and β -galactosidase (B) activity in gut of fifth larval instar of *Allantus viennensis*
Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$)

سه بعدی آن‌هاست. فعالیت آنزیم‌ها به طور معمول با افزایش دما از صفر تا ۴۰ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد، در محدوده دمایی ۶۰-۴۰ درجه سلسیوس کاهش سریع در فعالیت آنزیمی رخ می‌دهد. بدین ترتیب که دمای زیاد باعث تغییرات در ترکیب سه بعدی آنزیم شده و فعالیت آن را کاهش خواهد داد. همچنین طبق مطالعات بوید (۹) افزایش دما در محیط واکنش آنزیمی باعث افزایش انرژی سینتیکی واکنش دهنده‌ها (سوبسترا و آنزیم) می‌گردد. در نتیجه باعث جذب انرژی زیاد توسط آنزیم، از هم گسیخته شدن ساختمان سه بعدی و کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. همانطور که ذکر شد بعد از ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش دما از میزان فعالیت آنزیم کاسته می‌شود که نشان دهنده شروع تخریب ساختار آنزیم توسط دماست.

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

فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در لوله گوارش لاروهای *viennensis* در محدوده دمایی ۷۰-۱۰ درجه سلسیوس مورد آزمایش قرار گرفت. طبق نتیجه با افزایش دما از ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس، میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته و دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز در لوله گوارش لاروهای این زنبور ۵۰ درجه سلسیوس بدست آمد. بعد از ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش دما از میزان فعالیت آنزیم کاسته شده است (شکل ۶). نتیجه مشابهی در بررسی دمای بهینه فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در لوله گوارش لارو زنبور برگخوار رز *rosae* گزارش شد (۱۹). طبق نظرات کئیت و پترمن (۲۶) فعالیت و پایداری آنزیم‌ها وابسته به ساختمان مولکولی اسید آمینه و ترکیب



شکل ۶- اثر دما روی فعالیت آلفا-آمیلاز لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis*

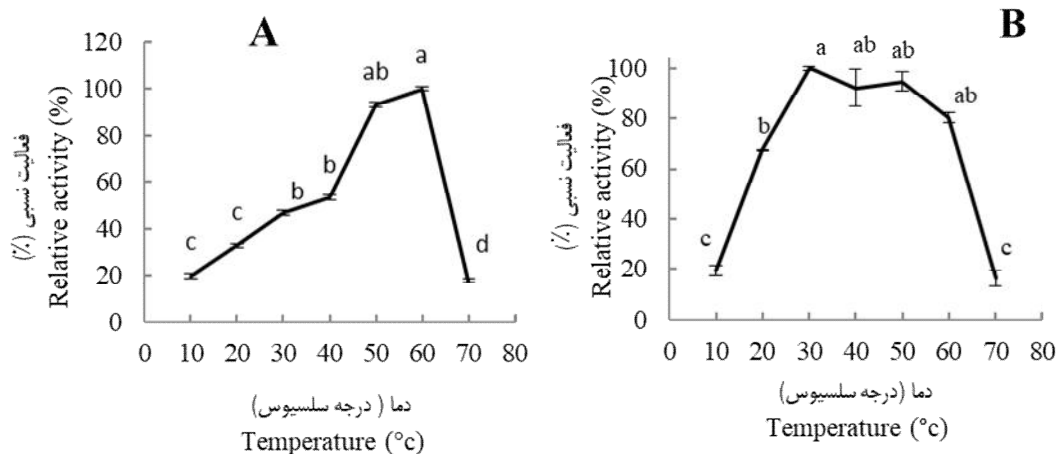
Figure 6. Effect of temperature on the α -amylase activity in gut of fifth larval instar of *Allantus viennensis*. Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$)

Osphranteria coerulescens حداکثر فعالیت آنزیم آلفا گالاکتوزیداز در ۶۰ درجه سلسیوس و برای بتا گالاکتوزیداز در ۴۰ درجه سلسیوس بدست آمد (۲).

پارامترهای V_{max} و K_m آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز

مقادیر V_{max} و K_m آنزیم آلفا-آمیلاز موجود در لوله گوارش *viennensis* به ترتیب برابر با ۱/۴۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/۱۴ میکرومول بر دقیقه بدست آمد. در لوله گوارش لارو زنبور برگخوار رز *A. rosae* مقدار K_m آنزیم آلفا-آمیلاز ۰/۸۲ میلی گرم بر میلی لیتر و مقدار V_{max} ۷/۳۲ میکرومول بر دقیقه محاسبه شد (۱۹).

فعالیت آلفا گالاکتوزیداز در لوله گوارش در محدوده دمایی ۵۰-۴۰ درجه سلسیوس به میزان ۹۰-۵۰ درصد است و بعد از آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به بیشترین فعالیت خود می‌رسد، سپس در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به یکباره کاهش می‌یابد (شکل ۷ A). فعالیت بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به بیشترین حد خود می‌رسد. فعالیت این آنزیم بعد از دمای ۶۰ درجه سلسیوس کاهش یافته و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس میزان فعالیت در حدود ۱۵ درصد است (شکل ۷ B). دمای بهینه برای فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در سوسک حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* در طیف ۶۰-۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است (۳۰). در لارو سوسک شاخه بلند رزاسه



شکل ۷- اثر دما روی میانگین فعالیت آنزیم آلفا- گالاکتوزیداز (A) و بتا- گالاکتوزیداز (B) در لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis*
 Figure 7- Effect of temperature on α -galactosidase (A) and β -galactosidase (B) activity in gut of fifth larval instar of *Allantus viennensis*

Means followed by similar letters showed no significantly difference from each other by Tukey's test ($p < 0.05$)

آلفا-آمیلاز در حشرات راسته‌های مختلف متفاوت و در گونه‌های مختلف حشرات از ۸-۱ عدد متغیر می‌باشد. تعداد یک ایزوفرم از این آنزیم در لوله گوارش لارو سوسک شاخه بلند رزاسه (۱)، سن سبز پسته (۲۹) و سوسک برگخوار نارون (۳۳) گزارش شده است. بیکر (۵) تعداد ۲ ایزوفرم از آنزیم آلفا-آمیلاز را در لارو پروانه *Anagastia kuehniella* گزارش نمود. تعداد ۳ ایزوفرم از آنزیم آلفا-آمیلاز در معده میانی کرم برگخوار برنج مشاهده شد (۴).

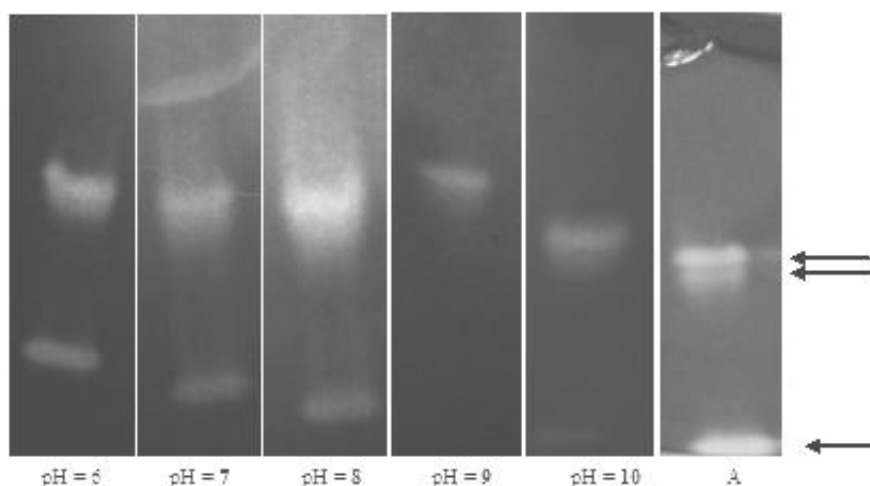
نتایج حاصل از زایموگرام آلفا-آمیلاز در pHهای مختلف نشان دهنده فعالیت این آنزیم در طیف وسیعی از pH می‌باشد. طیف گسترده فعالیت آلفا آمیلاز در pHهای مختلف می‌تواند به علت وجود ایزوزایم‌ها در مجموعه آنزیمی مورد مطالعه باشد (۶). در pHهای ۶، ۷ و ۸ سه ایزوفرم و در pHهای ۹ و ۱۰ دو ایزوفرم از آنزیم مشاهده شده است. همچنین در pH=۸ آنزیم آمیلاز بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده از زایموگرام تأیید کننده نتایج بدست آمده از اثر pH روی فعالیت آنزیم آمیلاز است.

طبق نتایج، تعداد یک ایزوفرم از آنزیم آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش با استفاده از الکتروفورز Native PAGE مشاهده گردید (شکل ۹). تعداد یک ایزوفرم برای آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در سوسک حنایی خرما (۳۰) و لارو کفشدوزک خربزه (۱۸) گزارش شد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

طبق نتایج، میزان K_m آمیلاز زنبور برگخوار ثانوی رز بیشتر از K_m آمیلاز لارو زنبور برگخوار رز می‌باشد. این موضوع نشان دهنده گیرایی پایین‌تر آلفا آمیلاز زنبور برگخوار ثانوی رز به سوبسترای خود (نشاسته) در مقایسه با آلفا-آمیلاز لارو زنبور برگخوار رز می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده، مقادیر K_m آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش به ترتیب برابر با ۰/۶۹ و ۰/۴۱ میلی-مولار و مقادیر V_{max} به ترتیب برابر با ۰/۸۴ و ۱/۷۶ میلی-مولار بر دقیقه بر میلی لیتر بدست آمد. مقدار بالاتر K_m آنزیم آلفا گالاکتوزیداز نسبت به مقدار K_m بتا گالاکتوزیداز در لوله گوارش نشان دهنده میزان کشش کمتر این آنزیم به سوبسترایش در مقایسه با آنزیم بتاگالاکتوزیداز به سوبسترای خود می‌باشد. مقادیر K_m آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در لوله گوارش لارو زنبور برگخوار ثانوی رز (به ترتیب برابر با ۲/۷۲ و ۲/۰۲ میلی-مولار) (۲۴)، بیشتر از مقادیر K_m آنزیم‌های آلفا و بتا گالاکتوزیداز بدست آمد که می‌توان نتیجه گرفت گالاکتوزیدازها نسبت به گلوکوزیدازها در لوله گوارش لاروهای زنبور مذکور به سوبسترای خود کشش بیشتری نشان می‌دهند.

زایموگرام آنزیم‌های آلفا- آمیلاز و آلفا - بتا گالاکتوزیداز

آنالیز زایموگرام نشان داد که آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش زنبور برگخوار ثانوی رز *A. viennensis* دارای ۳ ایزوفرم است (شکل ۸ (A)). نتیجه مشابهی برای آنزیم آلفا آمیلاز در لوله گوارش لارو زنبور برگخوار رز *A. rosae* بدست آمد (۱۹). تعداد ایزوفرم‌های آنزیم

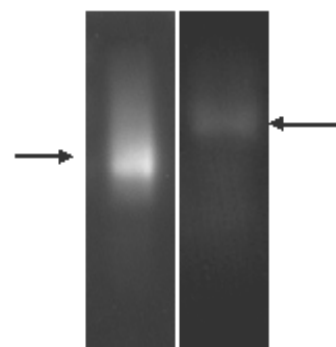


شکل ۸- زایموگرام فعالیت آلفا-آمیلاز در لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis* (A) و در pHهای مختلف (۶-۱۰)
Figure 8- Zymogram of the α -amylase activity of gut extract from *A. viennensis* larvae (A) and in different pH (6-10)

با توجه به نتایج این تحقیق، وجود آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفا بتا گالاکتوزیداز در دستگاه گوارش لاروهای زنبور *A. viennensis* ثابت شده است. استفاده از گیاهان تراریخته حاوی ژن مهارکننده آنزیم حشرات و مداخله در هضم و جذب مواد غذایی ضروری، می‌تواند جایگزین مؤثری در راستای کاهش استفاده از ترکیبات شیمیایی زیانبار باشد. امید است با بکارگیری از نتایج ارائه شده در تحقیق حاضر و همچنین مطالعات تکمیلی در آینده گام‌های مهمی در راستای روش‌های نوین کنترل آفت مذکور برداشته شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه گیلان جهت حمایت‌های مالی تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.



شکل ۹- زایموگرام فعالیت آنزیم آلفا- گالاکتوزیداز (سمت راست) و بتا- گالاکتوزیداز (سمت چپ) در لوله گوارش لارو سن پنجم *Allantus viennensis*
Figure 9- Zymogram of α -galactosidase (right) and β -galactosidase (left) activity in gut of fifth larval instar of *Allantus viennensis*

منابع

- 1- Aghaali N., Ghadamyari M., Ajamhasani M., and Mohammadi Khoramabadi A. 2011. Biochemical characterization of digestive α -amylase from rosaceae branch borer, *Osphranteria coerulescens* Redt. (Col.: Cerambycidae). p. 338. Global Conference on Entomology, 5 – 9 March. 2011. Chiang Mai, Thailand.
- 2- Aghaali N., Ghadamyari M., and Ajamhasani M. 2012. Biochemical characterization of glucosidases and galactosidases from rosaceae branch borer, *Osphranteria coerulescens* Redt. (Col.: Cerambycidae). Romanian Journal of Biochemistry, 49 (2): 125–137.
- 3- Alfonso J.F., Ortego F., Sanchez-Monge R., Garcia-Casado G., Pujol M., Castanera P., and Salcedo G. 1997. Wheat and barley inhibitors active towards α -amylase and trypsin- like activities from *Spodoptera frugiperda*. Journal of Chemical Ecology, 23: 1729-1741.
- 4- Asadi A., Ghadamyari M., Sajedi R.H., 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(2): 175-181.
- 5- Baker J.E. 1989. Interaction of partially- purified amylase from larval *Anagastia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) with amylase inhibitors from wheat. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 93 B: 239 - 246.
 - 6- Baker J.E. 1991. Purification and partial characterization of alfa amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhizoperta dominica*. *Insect Biochemistry*, 21: 303-311.
 - 7- Berenbum M. 1980. Adaptive significant of midgut pH in larval Lepidoptera. *American Naturalist*, 115: 295-302
 - 8- Bernfeld P. 1955. Amylase, α and β . *Methods in Enzymology*, 1: 149- 151.
 - 9- Boyd D.W. 2002. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigrutilus* (Uhler). (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits. *Annual of the Entomological Society of America*, 96: 667- 671.
 - 10- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248- 254.
 - 11- Chapman R.F. 1998. *The Insects Structure and Function*. 4th ed. Cambridge University Press, p. 782.
 - 12- Christopher M.S.M., and Mathavan S. 1985. Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale*. *Journal of Insect Physiology*, 31: 217-221.
 - 13- Davis B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 12: 404- 427.
 - 14- Dow J.A. 1984. Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *American Journal of Physiology*, 246: 633-635.
 - 15- Franco O.L., Rigden D.J., Melo F.R., and Grossi- de-sa M.F. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with Insect α - amylases, structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*, 269: 397-412.
 - 16- Garcia-Olemd F., Sanchez-mong G.R., Gomez L., Royo J., and Carbonero P. 1987. Plant proteinaceous inhibitor of proteinases and α -amylas. *Plant Molecular Cell Biology*, 4: 275-335.
 - 17- Ghanbarinezhad, R., Ghadamyari, M., and Sajedi, R. 2014. Biochemical characterization of α -amylase in *Epilachna chrysomelina* (Col.: Coccinellidae). *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 45 (2): 251-263. (In Persian).
 - 18- Ghanbarinezhad, R., Ghadamyari, M., Sajedi, R., and GholamzadehChitgar, M. 2015. Biochemical characterization of galactosidases in *Epilachna chrysomelina* (Col.: Coccinellidae). *Journal of Plant Protection*, 38 (3): 13-24. (In Persian).
 - 19- Gholamzadeh Chitgar M., Ahsaei S.M., Ghadamyari M., Sharifi, M., Hosseini Naveh V., and Sheikhnejad H. 2013. Biochemical characterization of digestive carbohydrases in the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae). *Journal of Crop Protection*, 2 (3): 305-318.
 - 20- Gholamzadeh Chitgar, M., Ghadamyari, M., Sharifi, M., and Hassan Sajedi, R. 2014. Partial characterization of digestive carbohydrases in the midgut of fig tree skeletonizer moth, *Choreutis nemorana* Hubner (Lepidoptera: Choreutidae). *Trakia Journal of Sciences*, 1: 27-37.
 - 21- Hori K. 1968. Some properties and developmental changes in occurrence of the salivary amylase of the cabbage bug, *Eurydema rugosa* Motschulsky (Hemiptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology*, 3: 198-202.
 - 22- Hori K. 1973. Studies on enzymes, especially amylases, in the digestive system of the bug, *Lygus disponi* and starch digestion in the system. *Research Bulletin Onihiro University*, 8: 173-260.
 - 23- Hosseini R., and Sahragard A. 2003. Study on morphological Characters and some features of biology and spatial distribution pattern of rose minor leaf eating sawfly, *Allantus viennensis* (Schr.) (Hym.; Tenthredinidae) in Guilan University. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 10(2): 103-115.
 - 24- Jahanjo F., Ghadamyari M., Hosseini R., and Sajedi R.H. 2013. Biochemical characterization of digestive α - β glucosidases in *Allantus viennensis* (Hym.: Tenthredinidae). *Iranian Plant Protection Journal*, 44 (1): 141-151. (In Persian).
 - 25- Jaimand K., Rezaee M.B., Tabaei Aghdaei S.R., Nadery Hajibagher Kandy M., and Meshkizadeh S. 2012. Dtermination of tannins in rose water, wastewater and petal residue of *Rosa damascena* Mill. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27(2): 348-357.
 - 26- Keith J.L., and Peterman B.F. 1979. Temperature effect in enzyme kinetics. *Methods in Enzymology*, 63: 234-257.
 - 27- MacGregor E., and Svensson B. 2001. Biochimica Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1546: 1-20.
 - 28- Meier H., and Reid J.S.G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. P. 418-471. In: Loewus F.A., Tanner W. (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Verlag, New York.
 - 29- Ramzi S., and 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.
 - 30- Saberi Riseh N., Ghadamyari M., and Motamediniya B. 2012. Biochemical characterization of α and β -glucosidases and α - and β -galactosidases from red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col.: Curculionide). *Plant Protection Science*, 48: 85.93.
 - 31- Saberi Riseh, N., and Ghadamyari, M. 2012. Biochemical characterization of α -amylases from gut and hemolymph

- of *Rhynchophorus ferrugineus* Olivieri (Col.: Curculionidae) and their inhibition by extracts from the legumes *Vigna radiata* L. and *Phaseolus vulgaris* L. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 72-81.
- 32- Sexena K.N. 1954. Physiology of the alimentary canal of *Leptocoris varicornis* Fabr. (Hemiptera: Coreidae). *Journal of the Zoological Society of India*, 6: 111-112.
- 33- Sharifi M., Gadamyari M., Mahadavi M., and 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 Sciences Belgrade*, 63 (3): 705-716.
- 34- Sharifi M., Gholamzadeh Chitgar M., Gadamyari M., Sajedi R.H., and Amini S. 2012. Characterisation of digestive protease in the rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(10): 1170-1182.
- 35- Sharma H.C., and Ortiz R. 2000. Transgenics, pest management, and the environment. *Current Science*, 79: 421-437.
- 36- Silva C.P., Terra W.R., Xavier-Filho J., Grossidesa M.F., Lopes A.R., and Pontes E.G. 1999. Digestion in larvae of *Calosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on alpha amylase and oligosaccharidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 355-366.
- 37- Terra W.R., and Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109: 1- 62.

