

## بررسی مشخصات بیوشیمیایی آلفا-آمیلاز و گلوکوزیدازهای گوارشی در

### سن قرمز پسته (*Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae)

محمد رضا حسینی<sup>۱</sup>✉، سیده مینو سجادیان<sup>۲</sup>، محمد وطن پرست<sup>۳</sup> و وحید حسینی نوه<sup>۴</sup>

۱- گروه گیاه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رفسنجان؛ ۲- دانشجوی دکتری و دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج؛

۳- دانشجوی دکتری دانشگاه بوعلی سینا، همدان

(تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲)

### چکیده

سن قرمز پسته *Lygaeus pandurus* یکی از سن‌های زیان‌آور پسته در استان کرمان است. به منظور شناخت بهتر فیزیولوژی این آفت، ضمن تشریح حشرات کامل در زیر استریومیکروسکوپ، روده میانی و غدد بزاقی آنها جدا و به عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. سپس، با استفاده از سوبستراهای اختصاصی، فعالیت و برخی از ویژگی‌های کربوهیدرازها تعیین گردید. اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در روده میانی و غدد بزاقی این آفت به ترتیب، ۵ و ۶ بدست آمد. بیشینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی در اسیدیته ۵ و ۴ در غدد بزاقی به ترتیب در اسیدیته ۵ و ۶ مشاهده شد. دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز در روده میانی و غدد بزاقی به ترتیب ۵۰ و ۴۰ درجه سلسیوس، برای آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و برای آلفا و بتا-گلوکوزیداز غدد بزاقی به ترتیب در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس تعیین شد. بیشترین پایداری آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی در اسیدیته ۴ تا ۶ مشاهده شد. فعالیت آلفا-آمیلاز روده میانی تحت تأثیر یون‌های کلسیم و منیزیم و نیز EDTA کاهش یافت. بیشترین افزایش فعالیت آلفا-گلوکوزیداز روده میانی مربوط به حضور یون کلسیم و بیشترین افزایش فعالیت بتا-گلوکوزیداز روده میانی مربوط به یون منیزیم بود. بررسی‌های زایموگرام، یک شکل آنزیمی از آلفا و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی و غدد بزاقی این حشره را به اثبات رساند. همچنین، زایموگرام‌ها وجود دو ایزوفرم آلفا-آمیلاز در غدد بزاقی و سه ایزوفرم این آنزیم را در روده میانی این حشره نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آمیلاز، گلوکوزیدازهای گوارشی، *Lygaeus pandurus*.

### Biochemical characterization of $\alpha$ -amylase and digestive Glucosidase in the pistachio red bug,

#### *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae)

M. R. HASSANI<sup>۱</sup>✉, S. M. SAJADIAN<sup>۲</sup>, M. VATANPARAST<sup>۳</sup> and V. HOSSEINI NAVEH<sup>۴</sup>

1- Department of Plant Protection, Rafsanjan Branch, Islamic Azad University, Rafsanjan, Iran; 2- Ph.D. Student,

University of Tehran, Karaj, Iran; 3- Ph. D. Student, University of Bu Ali Sina, Hamedan, Iran;

4- Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

### Abstract

The pistachio red bug, *Lygaeus pandurus* is one of the most destructive true bugs of pistachio in Kerman province. In order to better understanding about the nutritional physiology of the pest, after dissecting adults under stereomicroscope their midguts and salivary glands were removed. The tissues were homogenized and centrifuged and the supernatants were used as the enzyme source in subsequent experiments. Using specific substrates, carbohydrase activity and some of their characteristics were determined. The optimal pH for activity of  $\alpha$ -amylase in the midgut and salivary glands were 5 and 6, respectively. Maximum activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase were observed at pH 5 in the midgut and at pH 5 and 6, in salivary glands, respectively. Optimal temperature for  $\alpha$ -amylase activity in midgut and salivary glands obtained 50 and 40 °C, respectively. Midgut  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase were optimally active at 45 °C and maximum activity of  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase in salivary glands were determined at 30 and 35 °C, respectively. Midgut  $\alpha$ -amylase activity of this pest decreased in presence of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and EDTA. Midgut  $\alpha$ -glucosidase activity was highest in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . In contrast,  $\text{Mg}^{2+}$  increased midgut  $\beta$ -glucosidase activity. Zymogram analysis showed one form of  $\alpha$ -glucosidase and one form of  $\beta$ -glucosidase in both midgut and salivary glands of this pest. Two isoforms of  $\alpha$ -amylase were detected in salivary glands and three isoforms of  $\alpha$ -amylase in midgut of this pest.

**Key words:** Amylase, Digestive Glucosidases, *Lygaeus pandurus*.

## مقدمه

پسته یکی از مهم‌ترین تولیدات کشاورزی است که در ایران پیشینه‌ی تاریخی طولانی دارد. امروزه، ارزش اقتصادی این محصول ایران را به کشور نخست در صادرات آن مبدل کرده است به طوری که میزان زیادی از صادرات غیر نفتی به پسته وابسته می‌باشد (Sheibani *et al.* 1995). سن‌های زیان‌آور از آفات کلیدی پسته محسوب می‌شوند که در سراسر مناطق پسته‌کاری کشور وجود دارند و معمولاً خسارت اقتصادی قابل توجهی به آن وارد می‌کنند (Bigham and Hosseini naveh, 2010). مهم‌ترین آفت پسته از خانواده Lygaeidae, *Lygaeus pandurus* (Scopoli) است که کشاورزان به آن سن قرمز پسته می‌گویند. این سن در بسیاری از مناطق پسته‌کاری ایران وجود دارد و از آفات مهم پسته به شمار می‌آید. بدیهی است که آنزیم‌های گوارشی در حشرات، از جمله سن قرمز پسته، نقشی اساسی در تغذیه آفت و در نتیجه خسارت ایجاد شده به محصول را دارند. از این رو مطالعه روی مشخصات آنزیم‌های گوارشی حشرات دارای اهمیت زیادی می‌باشد. در مورد ناجوربالان، مطالعه آنزیم‌های گوارشی یکی از مهم‌ترین زمینه‌های شناخت فیزیولوژی دستگاه گوارش این حشرات و بررسی خسارت وارده به گیاهان میزبان توسط سن‌ها می‌باشد (Baptist, 1941; Hori, 1976; Franco *et al.* 2002). از مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی موجود در ترشحات بزاقی، آلفا-آمیلازها و آلفا و بتا-گلوکوزیدازها می‌باشند که مسئولیت بهره‌برداری از مواد غذایی حاوی نشاسته یا گلیکوژن را به عهده دارند (Hori, 1968; Zeng *et al.* 2002).

مواد هضم شده در اثر تزریق ترشحات بزاقی به بافت گیاه با مکش وارد لوله گوارش شده و در آنجا در اثر تأثیر آنزیم‌های گوارشی متعدد، هضم آنها کامل و جذب می‌گردند. در نیم‌بالپوشان، آنزیم‌های موجود در غدد بزاقی ترشح شده و موجب تسهیل نفوذ خرطوم به درون بافت گیاهی می‌شوند. کربوهیدرات‌ها از مهم‌ترین مواد غذایی مورد استفاده در حشرات هستند که در صورت نیاز ممکن است به چربی‌ها

تبدیل شده و یا در تولید اسیدهای آمینه سهیم باشند.

کربوهیدرات‌ها، عموماً به صورت منوساکارید جذب می‌شوند، بنابراین دی ساکاریدها و پلی ساکاریدهای غذا باید شکسته شوند. نشاسته و گلیکوژن، پلی ساکاریدهای اصلی ذخیره‌ای گیاهان و حشرات هستند که توسط آمیلازها، پیوندهای گلیکوزیدی آلفا ۱ و ۴ آن‌ها هیدرولیز و در نهایت هضم می‌شوند. دی ساکاریدهای عادی، نظیر سوکروز و مالتوز دارای واحدهای گلوکزی هستند که توسط پیوند آلفا به پلی ساکاریدها نظیر سلولز، نشاسته و غیره تبدیل می‌شوند. قندهای فوق توسط آلفا-گلوکوزیدازها (آنزیم‌های باز کننده پیوند آلفا) هضم می‌شوند. همانند آنزیم‌های پروتئولیتیک، آلفا-گلوکوزیدازها ممکن است ویژگی‌های سوبسترای متفاوتی را نشان دهند. به طور طبیعی بتا-گلوکوزیدها معمولاً منشأ گیاهی دارند و بیشترین فعالیت بتا-گلوکوزیداز در حشرات گیاهخوار وجود دارد (Chapman, 1998).

مطالعه آنزیم‌های گوارشی موجود در غده بزاقی و روده میانی سن *Stenotus binotatus* (Fabricius) (Hem.: Miridae) توسط Hori (1976) نشان داد که آنزیم‌های آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز، پکتیناز و پروتئاز، هم در غدد بزاقی و هم در روده میانی حشره وجود دارند، ولی بتا-گالاکتوزیداز و استراز فقط در روده میانی یافت شدند. آلفا-گلوکوزیدازها (EC 3.2.1.20) هیدرولیز باقیمانده  $\alpha$ -1 و 4 گلوکوزی از آریل گلوکوزیدها (نظیر *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoside) دی ساکاریدها یا الیگوساکاریدها) را کاتالیز می‌نمایند که به فراوانی در موجودات یافت شده‌اند (Terra and Ferreira, 1994). یکی از ویژگی‌های آلفا-گلوکوزیدازهای روده میانی حشرات، اسیدیته بهینه فعالیت آنها است که اغلب آلفا-گلوکوزیدازهای حشرات، دارای فعالیت بهینه در اسیدیته بین ۵ تا ۶/۵ می‌باشند (Terra and Ferreira, 1994) و این صرف‌نظر از ارتباط با اسیدیته روده میانی می‌باشد. Hori (1972) نشان داد که در گونه‌هایی از سن‌های خانواده

اهمیت بسیار زیادی دارد و به عنوان هدفی برای نابود کردن حشره مدنظر قرار گرفته است. پژوهش حاضر، نخستین پژوهش انجام شده در زمینه بررسی ویژگی‌هایی بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا- آمیلاز، آلفا و بتا-گلوکوزیداز موجود در غده بزاقی و روده میانی در سن قرمز پسته در جهان می‌باشد و یافته‌های حاصل از آن شاید بتواند به کنترل این آفت کمک کند.

### روش بررسی

**جمع آوری سن قرمز پسته:** حشرات کامل از باغ‌های پسته شهرستان زرنند از روی درختان پسته (رقم اکبری) جمع آوری شدند.

**جداسازی غدد بزاقی و روده میانی:** غدد بزاقی بر اساس روش Cohen (1993) پس از بی‌حس نمودن حشرات در روی یخ، با ننگ داشتن بدن سن به وسیله یک پنس، غدد بزاقی به آرامی به کمک یک پنس دیگر با کشیدن جدا کرده و در داخل میکروتیوب‌های حاوی ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر سرد قرار داده شدند. برای جدا کردن روده میانی نیز بر اساس روش Cohen (1993) عمل شد. ابتدا با بی‌حس کردن حشرات روی یخ، پاها جدا و اطراف بدن با قیچی برش داده شد. پس از بیرون آوردن دستگاه گوارش، روده میانی از آن جدا و در داخل میکروتیوب‌های حاوی ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر سرد قرار داده شد.

**تهیه عصاره‌ی آنزیمی:** به منظور تهیه عصاره آنزیمی از غدد بزاقی و بافت روده میانی، میکروتیوب‌های حاوی نمونه‌ها با استفاده از یک همگنه‌ساز دستی شیشه‌ای در شرایط دمایی ۴ درجه سلسیوس همگن گردیدند. آنگاه، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۶۰۰۰xg برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع روشن‌شده جدا و تا زمان استفاده در مراحل بعدی آزمایش‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

Coreidae و Pentatomidae در غدد بزاقی مقدار گلوکوزیدازها بسیار اندک و در بعضی گونه‌ها بتا-گلوکوزیداز وجود ندارد. بررسی‌های Terra and Ferreira (1994) نشان داد که آلفا-گلوکوزیدازها، دی ساکاریدها و الیگوساکاریدها را نیز هیدرولیز می‌نمایند. این آنزیم‌ها در دستگاه گوارش اغلب حشرات یافت می‌شوند. نوع غذای مصرفی توسط حشره، باعث می‌شود که آنزیم در اثرگذاری روی سوبسترای خود به صورت ترجیحی عمل نماید. (Esen et al. (1993) نشان دادند که آنزیم بتا-گلوکوزیداز در همه گیاهان، جانوران، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارد. وجود این آنزیم در حشرات نیز در راسته‌های مختلف گزارش شده است. حشرات مختلف گیاهخوار دارای سیستم بتا-گلوکوزیداز فعالی هستند که قادر است گلوکوزیدها را هیدرولیز نمایند (Terra and Ferreira, 1994). بتا-گلوکوزیدازهای دستگاه گوارش گونه‌هایی از راسته دویالان، راست‌بالان، پروانه‌ها و زنبورها توسط Ferreira et al. (1998) بررسی شد. آنها نشان دادند که این آنزیم در گونه‌های مختلف این راسته‌ها به صورت محدود قادر به فعالیت روی آمیگدالین<sup>۱</sup> و سالیسیلین<sup>۲</sup> هستند. آمیگدالین و سالیسیلین، سوبسترای گلوکوزیدی گیاهی می‌باشند و بتا-گلوکوزیدازهای حشرات با وجود مقادیر کم روی آنها مؤثرند. این تحقیقات مؤید این است که حضور گلوکوزیدازها در غدد بزاقی و روده میانی سن قرمز پسته می‌تواند در هیدرولیز گلوکوزیدهای احتمالی موجود در غذای حشره نقش داشته باشد.

در مدیریت تلفیقی آفات، بررسی امکان استفاده از ارقام مقاوم گیاهی ضروری است. تولید ارقام مقاوم دارای ژن‌های کدکننده مهارکننده‌های آنزیمی از جدیدترین راهکارهای موجود است. در این میان مطالعه آنزیم‌های گوارشی آفات

۱- Amygdalin ((6-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl) oxy] (phenyl) acetone trile)

۲- Salicyline ((2R,3S,4S,5R,6S)-2-(hydroxymethyl) -6- [2-(hydroxymethyl) phenoxy] oxane-3,4,5-triol)

همزمان با نمونه‌های تیمار انجام گرفت با این تفاوت که در نمونه‌های کنترل، آنزیم بعد از افزودن هیدروکسید سدیم اضافه گردید. همه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد (واحد فعالیت آنزیمی: U/mg of protein). رسم کلیه نمودارهای آماری بوسیله نرم افزار Sigmaplot 10.0 انجام شد.

**اندازه‌گیری اسیدیتیه بهینه فعالیت آنزیم:** برای تهیه اسیدیتیه‌های مختلف در گستره‌ی ۲ تا ۱۰، از بافر ۱۲۰ میلی‌مولار یونیورسال بورات-سیترات-فسفات استفاده شد. سپس، با سنجش فعالیت آلفا آمیلازی، آلفا گلوکوزیدازی و بتا گلوکوزیدازی در عصاره آنزیمی با روش‌های مذکور، اسیدیتیه بهینه فعالیت آنزیمی برای هر یک مشخص گردید.

**اندازه‌گیری دمای بهینه فعالیت آنزیم:** به منظور تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیمی، فعالیت آلفا-آمیلازها و آلفا و بتا-گلوکوزیدازها در دماهای مختلف ۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سلسیوس در عصاره آنزیمی سنجیده شد.

**بررسی اثر یون‌های فلزی مختلف و ترکیبات SDS و EDTA بر فعالیت آنزیم‌ها:** اثر یون‌های فلزی مختلف با استفاده از نمک‌های NaCl، KCl، MgCl<sub>2</sub> و CaCl<sub>2</sub> در غلظت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی‌مولار در محیط واکنش آنزیمی بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلازی، آلفا و بتا گلوکوزیدازی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، از SDS در غلظت‌های ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵ میلی‌مولار و EDTA در غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار برای بررسی اثر این دو ماده روی فعالیت سه آنزیم مذکور در بافر با اسیدیتیه بهینه فعالیت که از آزمایش "تعیین اسیدیتیه بهینه" بدست آمده بود، استفاده گردید. بدین منظور، پس از تهیه غلظت‌های مختلف از یون‌های مذکور، میزان ۵ میکرولیتر از این یون‌ها به آنزیم بافر اضافه گردید و پس از ۱۰ دقیقه سوبسترا به مخلوط واکنش افزوده شد. برای همه یون‌ها نیز یک شاهد در ۳ تکرار انتخاب شد که به جای یون، شاهد دارای آب مقطر بود. اثرات یون‌ها و ترکیبات مورد آزمایش با گروه تیمارهای شاهد در شرایط مشابه و همزمان مورد بررسی قرار گرفت.

### تعیین فعالیت آمیلولیتیکی در روده میانی و غدد بزاقی:

برای تعیین فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز از روش (Bernfeld 1955) با اندکی تغییر استفاده شد. برای این منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی به همراه ۲۰ میکرولیتر سوبسترای یک درصد نشاسته در میکروتیوب حاوی ۸۰ میکرولیتر بافر ریخته شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد و سپس ۵۰ میکرولیتر معرف رنگی DNS (دی نیتروسالیسیلیک اسید) به مخلوط واکنش اضافه شد. در نهایت میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. آنگاه، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر<sup>۱</sup> در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری نمونه‌های کنترل هم‌زمان با نمونه‌های تیمار انجام گرفت با این تفاوت که در نمونه‌های کنترل، آنزیم بعد از افزودن DNS افزوده شد. همه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. رسم کلیه نمودارهای آماری بوسیله نرم افزار Sigmaplot 10.0 انجام شد.

### تعیین فعالیت آنزیم آلفا و بتا-گلوکوزیداز در روده

**میانی و غدد بزاقی:** تعیین فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیدازی بر اساس روش‌های (Siegentaler 1977) و (Low et al. 1986) با اندکی تغییر در آن روش‌ها انجام شد. در این روش، مقدار هیدرولیز سوبسترای حاوی پارانیتروفنل، (pNaG)<sup>۲</sup> برای آلفا-گلوکوزیداز و (pNβG)<sup>۳</sup> برای اندازه‌گیری فعالیت بتا-گلوکوزیداز با استفاده از اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها با اسپکتروفوتومتر انجام شد. اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم‌ها در دمای اتاق و واکنش با ۱۵ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۱۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی ۵ میلی‌مولار و ۸۵ میکرولیتر بافر در مدت زمان ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر محلول یک نرمال هیدروکسید سدیم متوقف و میزان پارا-نیتروفنل تولید شده، در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری نمونه‌های کنترل نیز

۱- ELx808 Absorbance Microplate Reader-Bio-Tek

۲- 4-Nitrophenyl 3-D-glucopyranoside

۳- 4-Nitrophenyl F-D-glucopyranoside

مربوطه را روی ژل ریخته و ظرف حاوی ژل به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه داخل دسیکاتور قرارداده شد. پس از زمان انکوباسیون و برای ثبت باندهای تشکیل شده از دستگاه gel doc تحت طول موج UV استفاده شد.

#### نتیجه و بحث

شناسایی بیوشیمیایی آنزیم‌های دخیل در گوارش، به طراحی سیستم‌های کنترلی با استفاده از پروتئین‌های مهار کننده این آنزیم‌ها با منشاء گیاهی، کمک می‌کند. در مطالعه حاضر به بررسی برخی مشخصات بیوشیمیایی آمیلاز و گلوکوزیدازهای گوارشی سن قرمز پرداخته شد. یکی از مهم‌ترین مشخصات بیوشیمیایی آنزیم‌ها تعیین اسیدیته بهینه فعالیت آنها است تا سایر آزمایش‌ها بر مبنای این اسیدیته انجام شوند. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که اسیدیته بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در روده میانی و غدد بزاقی سن قرمز پسته به ترتیب، ۵ و ۶ می‌باشد (شکل ۱).

نتایج نشان می‌دهد که فعالیت آلفا-آمیلاز در اسیدیته‌ی بسیار قلبیایی (۸ تا ۱۰) و بسیار اسیدی (۲ تا ۴) بسیار پایین است به طوری که در این اسیدیته‌ها میزان فعالیت به زیر ۴۰ درصد می‌رسد. بیشترین فعالیت آلفا-آمیلاز روده میانی سن قرمز پسته در اسیدیته ۵ (در محیط نزدیک به حالت اسیدی) و در اسیدیته ۶ در غدد بزاقی بالاترین فعالیت را از خود بروز داده است. نتایج حاصل از این تحقیق در مورد آنزیم آلفا-آمیلاز با نتایج برخی از تحقیقات نزدیک است. به عنوان مثال در بررسی که روی سن *Brachynema germari* (Kolenati) انجام شد، اسیدیته بهینه برای فعالیت این آنزیم در روده میانی و غدد بزاقی به ترتیب ۵ و ۶ بدست آمد (Ramzi and Hosseinaveh, 2010). همچنین، اسیدیته بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز در سوسک *Hypothenemus hampei* (Ferrari) ۵ می‌باشد (Valencia-Jimenez et al. 2000)، در روده میانی سوسک *Callosobruchus chinensis* L. (Podoler and Applebaum, 1971) ۵/۲ و در سوسک

#### بررسی میزان پایداری آنزیم با گذشت زمان: پایداری

آنزیم‌های روده میانی در گستره اسیدیته‌های ۲ تا ۱۱ در دو بازه‌ی زمانی مختلف انجام شد. ابتدا آنزیم و بافرها با اسیدیته‌های مختلف را با هم مخلوط نموده و سپس به مدت یک و ۱۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، سوبستراهای مربوطه به مخلوط واکنش اضافه فعالیت آنزیم‌ها سنجیده شد.

#### الکتروفورز و زایموگرام: یکی دیگر از روش‌های تعیین

وجود آنزیم‌ها و ایزوفرم‌های آن‌ها در روده میانی و غدد بزاقی، استفاده از الکتروفورز است. بدین منظور از الکتروفورز غیراحیایی (Native-PAGE) استفاده شد. ۱۶ میکرولیتر از نمونه آنزیمی به ۴ میکرولیتر بافر نمونه (متشکل از: ۶۲/۵ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک با pH ۶/۸، گلیسرول ۱۰ درصد و بروموفنول بلو ۰/۰۱ درصد) اضافه گردید. نمونه حاصل در چاهک‌های ژل متراکم‌کننده (۴ درصد) قرار داده شد. پس از برقراری جریان ۸۵ ولت، عصاره آنزیمی در طول ژل جداکننده ۱۰ درصد جهت جداسازی، به حرکت درآمد. پس از اتمام الکتروفورز و جدا سازی ژل از شیشه‌ها، ژل‌های جداکننده به صورت جداگانه در سوبستراهای هر آنزیم قرار داده شدند (برای آلفا-آمیلاز در نشاسته یک درصد، آلفا-گلوکوزیداز در ۴-متیل-آمبلیفریل-آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید<sup>۱</sup> سه میلی مولار و بتا-گلوکوزیداز در ۴-متیل-آمبلیفریل-بتا-دی-گلوکوپیرانوزید<sup>۲</sup> سه میلی مولار). در مورد آلفا-آمیلاز، ژل مربوطه پس از گذشت ۳۰ دقیقه از غوطه بردن در محلول سوبسترا، شسته شد و در محلول لوگول متشکل از ۱۰ میلی مولار و یدور پتاسیم ۱۴ میلی مولار قرار داده شد تا باندهای مربوطه به صورت نواحی روشن در زمینه تیره ظاهر شوند. جهت جلوگیری از ظاهر شدن باندهای مربوط به فسفریلاز، سوبسترای نشاسته حاوی کلسیم کلرید ۱۲ میلی مولار بود. در مورد گلوکوزیدازها سوبستراهای

۱- 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

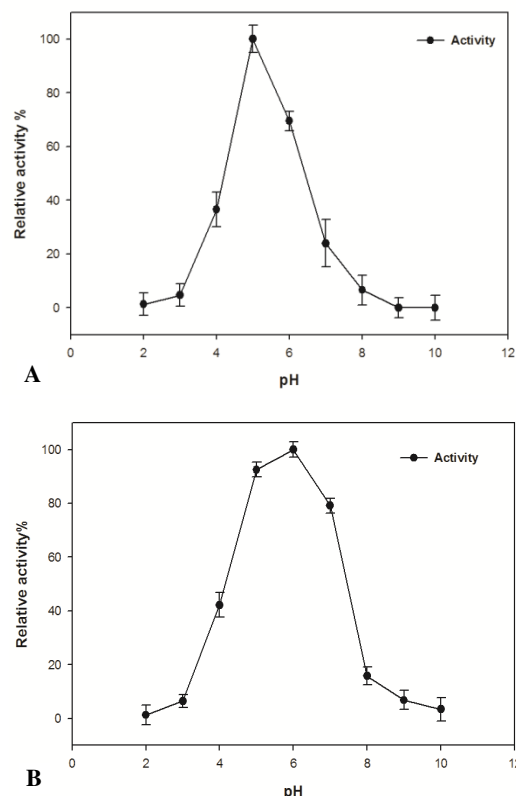
۲- 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside

گلوکوزیداز در اسیدیته ۵ بود. آنزیم آلفا-گلوکوزیداز فعالیت کمتری در اسیدیته‌های قلیایی (۷ تا ۱۰) و اسیدی (۲ و ۳) نسبت به آنزیم بتا-گلوکوزیداز نشان داد. اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز در غدد بزاقی (شکل ۲- B) نشان می‌دهد که بیش از ۸۰ درصد فعالیت آلفا و بتا-گلوکوزیدازها به ترتیب در اسیدیته‌های ۵ و ۶ رخ می‌دهد و در مورد آلفا-گلوکوزیداز فعالیت در اسیدیته‌های ۲ تا ۴ و ۸ تا ۱۰ به کمتر از ۳۰ درصد می‌رسد. در حالی که در مورد آنزیم بتا-گلوکوزیداز در اسیدیته ۴ و ۷ تا ۱۰ بیش از ۵۰ درصد فعالیت آنزیم حفظ و در اسیدیته ۳ و ۱۰ فعالیت به شدت کاسته شده است. در غدد بزاقی نیز آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در اسیدیته‌های قلیایی (۷ تا ۱۰) و اسیدی (۲ تا ۴) فعالیت کمتری نسبت به آنزیم بتا-گلوکوزیداز نشان داد. در بررسی اسیدیته بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی سن قرمز پسته، بیشترین فعالیت این آنزیم‌ها در pH ۵ بود (شکل ۲). در بررسی‌های مشابهی که روی سایر حشرات صورت گرفته است نیز نتایج مشابهی وجود دارد. مقدار pH بهینه فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی *Glyphodes pyloalis* (walker) به ترتیب ۷/۵ و ۵/۵ بدست آمد (Ghadamyari et al. 2010).

با توجه به این داده‌ها و اسیدیته بهینه‌ی فعالیت آلفا- آمیلاز، می‌توان گفت که احتمالاً اکثر کربوهیدرازهای گوارشی روده میانی این حشره در محیط‌های نزدیک به حالت اسیدی تمایل بیشتری به فعالیت دارند. بررسی‌های مشابه در سایر حشرات نیز بیانگر نتایج مشابه است. در تحقیقی روی فعالیت این دو آنزیم در سن *Brachynema germari* (kolenati) pH بهینه‌ی فعالیت آلفا-گلوکوزیداز در روده میانی و غدد بزاقی به ترتیب ۵ و ۶ و pH بهینه‌ی فعالیت بتا-گلوکوزیداز در روده میانی و غدد بزاقی این حشره به ترتیب ۵/۵ و ۶ گزارش شده است (Ramzi and Hosseinaveh, 2010).

آلفا-گلوکوزیداز در سن *Dysdercus peruvianus* از خانواده Pyrrhocoridae دارای بهینه

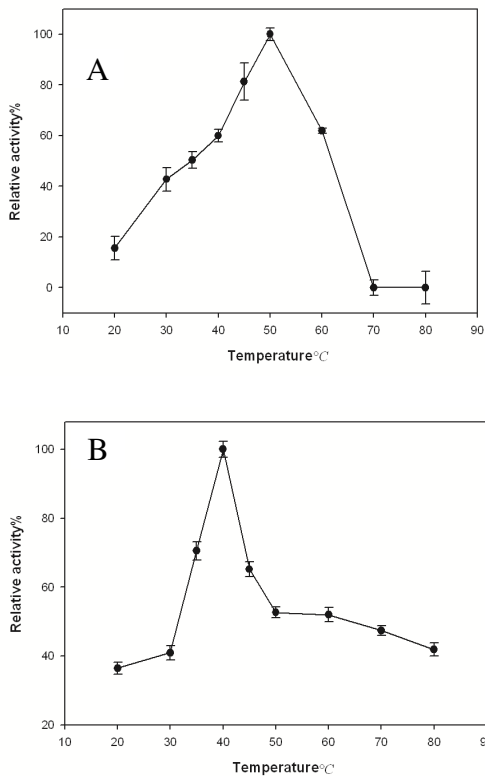
*Trogoderma granarium* (Everts) در گستره pH ۶ تا ۹ و تا حدودی قلیایی گزارش شده است (Hosseinaveh et al. 2007).



شکل ۱- بررسی تغییرات میانگین فعالیت نسبی آلفا- آمیلاز در گستره‌ی اسیدیته‌های ۲ تا ۱۰ (A) روده میانی و (B) غدد بزاقی سن قرمز پسته ( $\pm$ SE).

Fig. 1. The effect of pH on the activities of  $\alpha$ -amylase extracted from the midgut (A) and salivary glands (B) of *L. pandurus* ( $\pm$ SE).

در بررسی‌های مشابهی که روی سایر حشرات صورت گرفته است نیز نتایج مشابهی وجود دارد. مقدار pH بهینه فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی *Glyphodes pyloalis* (Walker) به ترتیب ۷/۵ و ۵/۵ بدست آمد (Ghadamyari et al. 2010). اثر اسیدیته بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی (شکل ۲- A) نشان می‌دهد که بیش از ۷۰ درصد فعالیت آنزیم‌ها در اسیدیته‌های ۴ تا ۶ رخ می‌دهد و بیشینه فعالیت هر دو آنزیم آلفا و بتا-

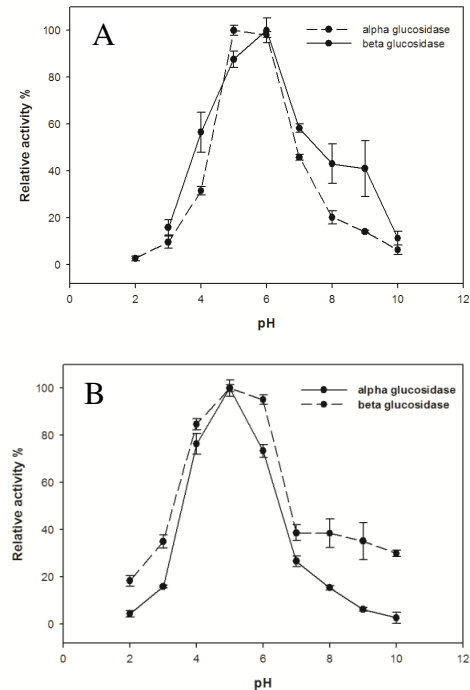


شکل ۳- بررسی تغییرات میانگین فعالیت نسبی آنزیم آلفا-آمیلاز در دماهای مختلف (A) روده‌ی میانی و (B) غدد بزاقی سن قرمز پسته (±SE).

**Fig. 3.** The effect of temperature on the activities of  $\alpha$ -amylase extracted from the midgut (A) and salivary glands (B) of *L. pandurus* (±SE).

در مطالعات Ramzi and Hosseinaveh (2010) دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم در روده میانی و غدد بزاقی به ترتیب ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است. در بررسی دیگر دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز در روده میانی سرخرطومی یونجه *Hypera postica* (Gyllenhal) ۳۵°C گزارش شده است (Vatanparast and Hosseinaveh., 2010). Sharifi et al. (2011) در مطالعه‌ای که روی سوسک برگخوار نارون *Xanthogaleruca luteola* (Muller) انجام دادند دمای بهینه برای بتا-گلوکوزیداز را ۵۰ درجه سلسیوس بدست آوردند. در مطالعه‌ی دیگری که روی بتا-گلوکوزیداز روده میانی *Rhynchophorus palmarum* (Olivier) صورت گرفته، دمای بهینه برای بتا-گلوکوزیداز ۵۵ درجه سلسیوس بدست آمده است (Yapi et al. 2009).

فعالیت در اسیدیته ۵ بوده است (Terra and Silva, 1997).



شکل ۲- بررسی تغییرات میانگین فعالیت نسبی آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در گستره‌ی اسیدیته‌های ۲ تا ۱۰ (A) روده‌ی میانی و (B) غدد بزاقی سن قرمز پسته (±SE).

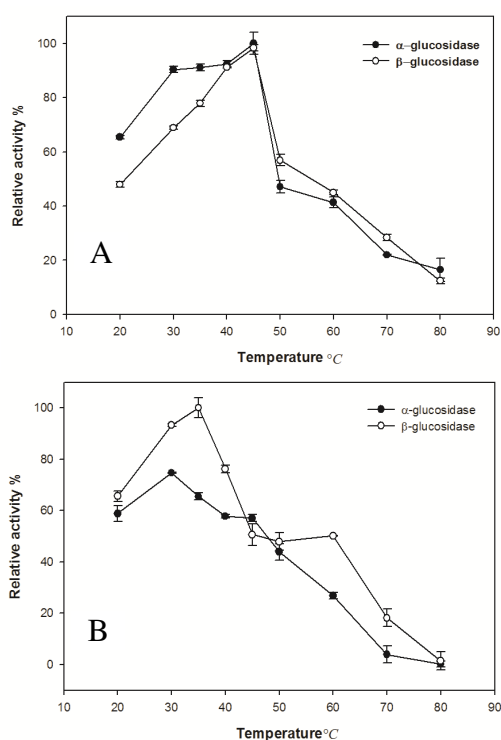
**Fig. 2.** The effect of pH on the activities of  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase extracted from the midgut (A) and salivary glands (B) of *L. pandurus* (±SE).

اثر دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز روده میانی و غدد بزاقی سن قرمز پسته نشان داد که فعالیت این آنزیم در روده میانی و غدد بزاقی از دمای ۲۰ درجه سلسیوس آغاز شده و به تدریج با افزایش دما فعالیت نیز افزایش می‌یابد تا جایی که بیشینه‌ی فعالیت این آنزیم در روده میانی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و در غدد بزاقی در دمای ۴۰ درجه سلسیوس رخ داده است. در روده میانی با افزایش دما به ۶۰ درجه سلسیوس فعالیت آلفا-آمیلاز کاهش یافته تا جایی که در دمای ۷۰ و ۸۰ درجه سلسیوس به صفر رسیده است. در حالی که در غدد بزاقی با افزایش دما به ۵۰ درجه سلسیوس فعالیت کاهش یافته اما تا دمای ۸۰ درجه سلسیوس بیش از ۴۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز حفظ شد.

در اسیدیته ۵ به ۷۰ درصد رسید.

در مورد آنزیم بتا-گلوکوزیداز روده میانی (شکل ۵- C) نیز بیشترین پایداری در گستره اسیدیته‌های ۴ تا ۶ بود. با انکوباسیون این دو آنزیم (آلفا و بتا-گلوکوزیداز) در اسیدیته‌های مختلف در دوره زمانی ۱۰ ساعت در مقایسه با دوره زمانی یک ساعت در بهترین اسیدیته برای فعالیت آنزیم، حدود ۴۰ درصد فعالیت آنزیم کاسته شد. بیشینه پایداری این آنزیم‌ها در اسیدیته‌های ۴ تا ۶ می‌تواند به دلیل اسیدی بودن محیط روده میانی در این سن‌ها باشد.

بررسی اثر یون‌های مختلف بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز، نشان داد که فعالیت این آنزیم تحت تأثیر یون‌های مختلف نوسانات مختلفی دارد (شکل ۶).



شکل ۴- بررسی تغییرات میانگین فعالیت نسبی آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز در دماهای مختلف (A) روده‌ی میانی و (B) غدد بزاقی سن قرمز پسته ( $\pm$ SE).

**Fig. 4.** The effect of temperature on the activities of  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase extracted from the midgut (A) and salivary glands (B) of *L. pandurus* ( $\pm$ SE).

اثر دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی (شکل ۴- A) نشان داد که با افزایش دما تا ۴۵ درجه سلسیوس فعالیت هر دو آنزیم افزایش یافته و در ۴۵ درجه سلسیوس به حداکثر مقدار فعالیت رسید. با افزایش دما به ۵۰ درجه سلسیوس، فعالیت هر دو آنزیم به شدت کاهش داشت تا این که در دمای ۸۰ درجه سلسیوس فعالیت به حدود ۲۰ درصد رسید. اثر دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز غدد بزاقی (شکل ۴- B) نشان داد که بیشینه فعالیت هر دو آنزیم در دمای پایین‌تری نسبت به روده میانی است. بیشینه فعالیت آلفا-گلوکوزیداز در غدد بزاقی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و بتا-گلوکوزیداز در دمای ۳۵ درجه سلسیوس بدست آمد. نتایج نشان داد که فعالیت هر دو آنزیم در دماهای بالاتر از ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس کاهش یافته و در ۸۰ درجه سلسیوس به حدود صفر رسید. داده‌های بدست آمده در این پژوهش با نتایج مطالعات مشابه در سایر حشرات مشابهت دارد. (Ramzi and Hosseininaveh, 2010) بیشینه فعالیت آلفا-گلوکوزیداز روده میانی و غدد بزاقی سن سبز پسته را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گزارش کرده‌اند. همچنین، آن‌ها بیشینه فعالیت بتا-گلوکوزیداز روده میانی و غدد بزاقی سن سبز پسته را به ترتیب در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس مشاهده کرده‌اند.

پایداری آنزیم آلفا-آمیلاز، آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی در اسیدیته‌های مختلف و دو دوره زمانی انکوباسیون یک و ۱۰ ساعت به منظور تعیین میزان پایداری آنها در محیط انجام شد. پایداری و ماندگاری آنزیم می‌تواند در فرآیند سنتز آنزیم (به منظورهای مختلف) فاکتور مهمی محسوب گردد.

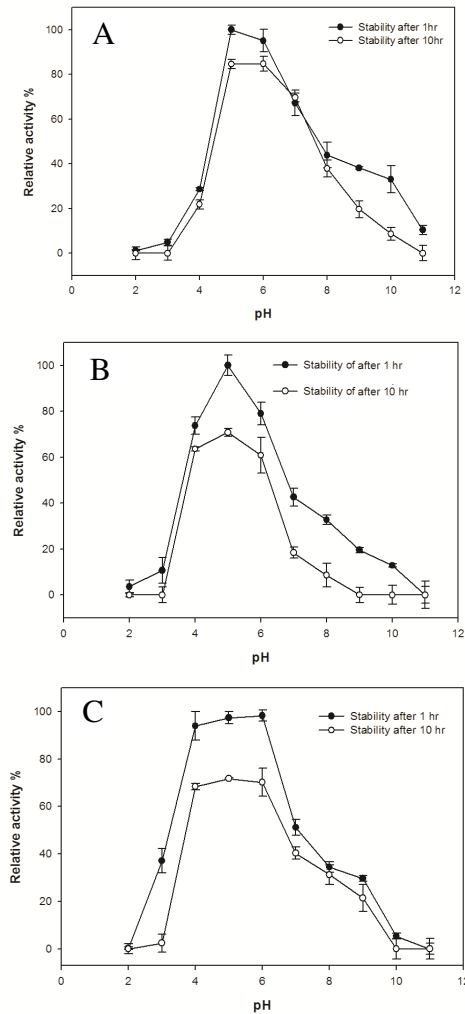
فعالیت آلفا-آمیلاز (شکل ۵- A) پس از طی یک ساعت از آزمون پایداری در اسیدیته‌های ۵ و ۶ به بیش از ۹۰ درصد رسید در صورتی که بعد از گذشت ۱۰ ساعت در همین محدوده به بیش از ۸۰ درصد نزول یافت. بیشترین پایداری آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در روده میانی (شکل ۵- B) در محدوده اسیدیته‌های ۴ تا ۶ رخ داد و در بیشترین حالت خود



مختلف و در حشرات مختلف به اثبات رسیده است. به عنوان مثال اثر این ترکیب روی آلفا-آمیلاز موجود در روده میانی و غدد بزاقی سن سبز پسته (*Brachynema germari* (Kolenati)) موجب کاهش فعالیت این آنزیم شده است (Ramzi and Hosseininaveh, 2010). در همین مطالعه عنوان شده است که EDTA و یون منیزیم نیز فعالیت آلفا-آمیلاز را در روده میانی و غدد بزاقی سن سبز پسته کاهش داده‌اند در حالی که یون‌های پتاسیم، سدیم و کلسیم بر فعالیت این آنزیم اثر افزایشی داشتند. در بررسی دیگری گزارش شده است که فعالیت آلفا-آمیلاز در روده میانی سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica* (Gyllenhal)) در حضور NaCl و KCl افزایش محسوسی یافته است (Vatanparast and Hosseininaveh, 2010).

اثر یون‌ها و ترکیبات مختلف بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا-گلوکوزیداز روده میانی سن قرمز پسته در شکل ۷ آورده شده است. همان گونه که مشخص است بیشترین تأثیر افزایشی بر فعالیت آلفا-گلوکوزیداز مربوط به یون کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) است که منجر به افزایش ۲۵ درصدی در فعالیت آلفا-گلوکوزیداز شده است. یون‌های سدیم (NaCl)، پتاسیم (KCl) و منیزیم ( $\text{MgCl}_2$ ) نیز تا اندازه‌ای سبب به افزایش فعالیت آلفا-گلوکوزیداز شده‌اند.

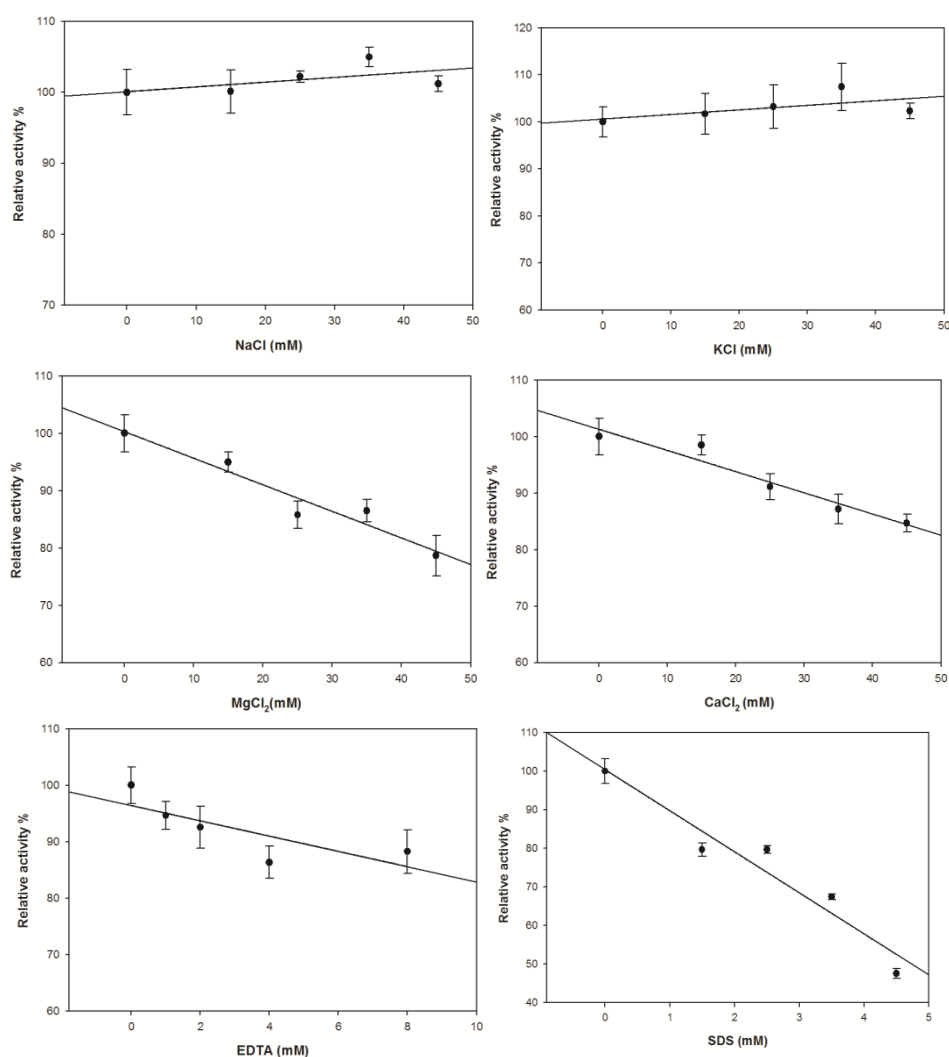
در حالی که SDS به طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش فعالیت آلفا گلوکوزیداز شده است. در مورد آنزیم بتا-گلوکوزیداز، بیشترین تأثیر افزایشی مربوط به یون منیزیم ( $\text{MgCl}_2$ ) است که حدود ۳۰ درصد فعالیت آن را افزایش داده است. یون‌های سدیم (NaCl)، پتاسیم (KCl) و کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر فعالیت بتا-گلوکوزیداز نداشته‌اند. SDS فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز را کاهش داد. در پژوهشی نشان داده شده است که یون‌های  $\text{Cu}^{2+}$  و  $\text{Mg}^{2+}$  به ترتیب موجب افزایش و عدم تأثیر بر فعالیت هر دو آنزیم آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در سن *Lygus hesperus* (Knight) شده‌اند (Zeng and Cohen, 2001).



شکل ۵- بررسی پایداری آلفا-آمیلاز (A)، آلفا-گلوکوزیداز (B) و بتا-گلوکوزیداز (C) روده میانی سن قرمز پسته در اسیدیته‌های مختلف بعد از گذشت یک و ۱۰ ساعت.

**Fig. 5.** Stability of  $\alpha$ -amylase (A),  $\alpha$ -glucosidase (B) and  $\beta$ -glucosidase (C) extracted from midgut of *L. pandurus* at different pHs after 1 and 10 hrs incubation period.

یون‌های سدیم (NaCl) و پتاسیم (KCl) تأثیر بسیار کمی بر افزایش فعالیت این آنزیم داشتند. فعالیت آلفا-آمیلاز روده میانی *L. pandurus* (Scopoli) تحت تأثیر دیگر یون‌ها و ترکیبات مانند کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ )، منیزیم ( $\text{MgCl}_2$ ) و EDTA کاهش یافت. ترکیب SDS موجب کاهش فعالیت آنزیم نسبت به دیگر ترکیبات و یون‌ها شد. هم‌چنین، SDS نیز فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز روده میانی این حشره را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کم کرد. اثر بازدارندگی SDS در آزمون‌های



شکل ۶- بررسی اثرات یون‌ها و ترکیبات مختلف در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز روده میانی سن قرمز پسته

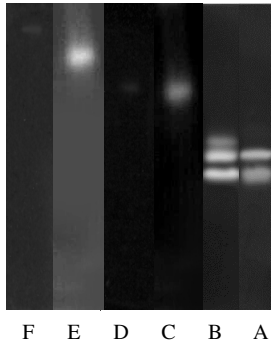
Fig. 6. Effect of ions and different compounds on  $\alpha$ -amylase extracted from the midgut of *L. pandurus*

غدد بزاقی و سه ایزوفریم از این آنزیم در روده میانی حشره بود. در زایموگرام آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز روده میانی و غدد بزاقی سن *L. pandurus* تنها یک فرم آنزیمی مشاهده شد. که تنها یک فرم آنزیمی آلفا-گلوکوزیداز و یک فرم آنزیمی بتا-گلوکوزیداز در روده میانی و غدد بزاقی این حشره وجود دارد. وضوح و شدت باندهای حاصل نشان می‌دهد که فعالیت این دو آنزیم در غدد بزاقی نسبت به روده میانی بیشتر است (شکل ۸). در سایر مطالعات نیز فقط یک باند در زایموگرام آلفا-آمیلاز غدد بزاقی و روده میانی *Brachynema germari* (Kolenati) مشاهده شده

یون  $Ca^{2+}$  فعالیت آلفا-گلوکوزیداز را در *Glyphodes pyloalis* (Walker) افزایش داده است (Ghadamyari et al. 2010). یون‌های  $ZnCl_2$  و  $CuCl_2$  و  $FeCl_3$  روی بتا-گلوکوزیداز در *Rhynchophorus palmarum* (Olivier) تاثیر مهارکنندگی داشته است در حالی که  $MgCl_2$ ،  $BaCl_2$ ،  $MnCl_2$  و  $SrCl_2$  تاثیر زیادی روی فعالیت این آنزیم نداشته است (Yapi et al. 2009).

نتایج حاصل از زایموگرام آنزیم آلفا-آمیلاز وجود ۲ باند در غدد بزاقی و ۳ باند در روده میانی این حشره را به اثبات رساند که نشان دهنده وجود دو ایزوفریم از این آنزیم در

امروزه معضلات کاربرد سموم شیمیایی بر هیچکس پوشیده نیست. روش‌های نوین کنترل آفات همواره بدنبال یافتن روش‌های عاری از سموم و حتی امکان ایمن برای انسان و سایر جانداران غیر هدف می‌باشد.



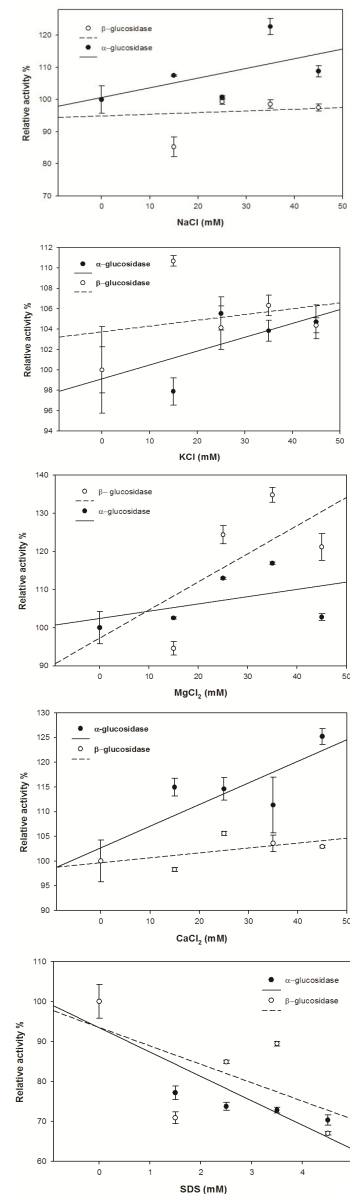
**شکل ۸-** زایموگرام آلفا-آمیلاز غدد بزاقی (A)، آلفا-آمیلاز روده میانی (B)، آلفا-گلوکوزیداز غدد بزاقی (C)، آلفا-گلوکوزیداز روده میانی (D)، بتا-گلوکوزیداز غدد بزاقی (E) و بتا-گلوکوزیداز روده میانی سن قرمز پسته (F).

**Fig. 8.** Zymogram of  $\alpha$ -amylase extracted from salivary glands (A), and midgut (B),  $\alpha$ -glucosidase extracted from the salivary glands (C), and midgut (D), and  $\beta$ -glucosidase extracted from the salivary glands (E), and midgut (F), of *L. pandurus*.

تولید گیاهان مقاوم تراریخته از جمله روش‌های مناسب برای کاهش مصرف سموم حشره کش علیه آفات می‌باشد. اولین گام برای اعمال یک استراتژی کنترلی بر پایه مهار کنندگی در تغذیه، شناسایی ویژگی‌های شیمیایی آنزیم‌های گوارشی است (Strobl et al. 1998).

بنابراین، شناسایی بیوشیمیایی آنزیم‌های دخیل در گوارش، به طراحی سیستم‌های کنترلی با استفاده از پروتئین‌های مهار کننده این آنزیم‌ها با منشاء گیاهی، کمک می‌کند. در مطالعه حاضر، حضور و فعالیت آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در روده میانی و غدد بزاقی سن قرمز پسته و بررسی برخی از خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم‌ها بررسی شد.

است (Ramzi and Hosseinaveh, 2010). هم‌چنین، یک ایزوفرم در بررسی زایموگرام فعالیت آلفا-آمیلاز روده میانی سرخرطومی برگ یونجه (*Hypera postica*) (Gyllenhal) گزارش شده است (Vatanparast and Hosseinaveh, 2010). یافته‌های حاصل از این پژوهش، اولین بررسی صورت گرفته در این زمینه روی سن قرمز پسته است.



**شکل ۷-** بررسی اثرات یون‌ها و ترکیبات مختلف در غلظت‌های متفاوت بر فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز روده میانی سن قرمز پسته

**Fig. 7.** Effect of ions and different compounds on  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidase extracted from the midgut of *L. pandurus*

## References

- BAPTIST, B. A. 1941. The Morphology and Physiology of the Salivary Glands of Hemiptera-Heteroptera. Quarterly Journal of Microscopical Science, No. 8: 91-139.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . Methods in Enzymology, No. 1: 149-158.
- BIGHAM, M. and V. HOSSEINI NAVEH, 2010. Digestive proteolytic activity in the pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Asia-Pacific Entomology, No. 13: 221-227.
- CHAPMAN, R. F. 1998. The Insects, Structure and Function. Cambridge University Press, 788 pp.
- COHEN, A. C. 1993. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. Journal of Insect Physiology, No. 39: 823-829.
- ESEN, A. 1993.  $\beta$ -Glucosidases, overview. In: Esen, A. (Ed),  $\beta$ -Glucosidase: Biochemistry and Molecular Biology. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1-13.
- FERREIRA, C., B. B. TORRES and W. R. TERRA, 1998. Substrate specificities of midgut  $\beta$ -glycosidases from insects of different orders. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, No. 119: 219-225.
- FRANCO, O. L., D. J. RIGDEN, F. R. MELO and M. F. GROSSI-DE-SÁ, 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. European Journal of Biochemistry, No. 269(2): 397-412.
- GHADAMYARI, M., V. HOSSEININAVEH and M. SHARIFI, 2010. Partial biochemical characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.: Pyralidae). Comptes rendus biologiques, No. 333, 197-204.
- HORI, K. 1968. Feeding behavior of the cabbage bug, *Eurydema rugosa* Motschulsky (Hemiptera: Pentatomidae) on the cruciferous plants. Applied Entomology and Zoology, No. 3: 26-36.
- HORI, K. 1972. Comparative study of a property of salivary amylase among various heteropterous insects. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, No. 42: 501-508.
- HORI, K. 1976. Plant growth-regulating factor in the salivary gland of several heteropterous insects. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, No. 53: 435-438.
- HOSSEININAVEH, V., A. BANDANI, P. AZMAYESH-FARD, S. HOSSEINKHANI and M. KAZAZI, 2007. Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera). Journal of Stored Products Research, No. 43: 515-522.
- LOW, N. H., V. VONG and P. SPORNEST, 1986. A new enzyme,  $\beta$ -glucosidase, in honey. Journal of Apicultural Research, No. 25: 178-181.
- PODOLER, H. and S. W. APPLEBAUM, 1971. The  $\alpha$ -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*. Biochemical Journal, No. 121: 321-325.
- RAMZI, S. and V. HOSSEININAVEH, 2010. Biochemical characterization of digestive  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase in pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). Journal of Asia-Pacific Entomology, No. 13(3): 215-219.
- SIEGENTALER, U. 1977. Eine einfache and rasche methode zur bestimmung de alpha-glucosidase (saccharase) in honing. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene, No. 68: 251-258.
- SHARIFI, M., M. GHADAMYARI, M. MAHDAVI MOGHADAM and F. SAIIDI, 2011. Biochemical characterization of digestive carbohydrases from *Xanthogaleruca luteola* and inhibition of its  $\alpha$ -amylase by inhibitors extracted from the common bean. Archives of Biological Sciences, No. 63(3), 705-716.
- SHEIBANI, A., H. FARIVAR-MAHIN and A. AZGHANDI, 1995. Pistachio production in Iran. Ministry of Agriculture, Agricultural and Educational Organization, Pistachio Research Institute. (In Persian).
- SILVA, C. P. and W. R. TERRA, 1997. Alpha-galactosidase

- activity in ingested seeds and in the midgut of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, No. 34: 443-460.
- STROBL, S., K. MASKOS, G. WIEGAND, R. HUBER, F. GOMIS-RUTH and R. GLOCKSHUBER, 1998. A novel strategy for inhibition of  $\alpha$ -amylases: Yellow meal worm  $\alpha$ -amylase in complex with Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. Structure, No. 6: 911-921.
- TERRA, W. R. and C. FERREIRA, 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, No. 109: 1-62.
- VALENCIA-JIMENEZ, A., A. E. BUSTILLO, G. A. OSSA and M. J. CHRISPEELS, 2000.  $\alpha$ -amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, No. 30: 207-213.
- VATANPARAST, M. and V. HOSSEININAVEH, 2010. Digestive amylase and pectinase activity in the larvae of alfalfa weevil *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). Entomological Research, No. 40 (6): 328-335.
- YAPI, D. Y. A., D. GNAKRI, S. L. NIAMKE and L. P. KOUAME, 2009. Purification and biochemical characterization of a specific  $\beta$ -glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. Journal of Insect Science, No. 9 (4): 1-13.
- ZENG, F. and A. C. COHEN, 2001. Induction of elastase in a zoophagous heteropteran, *Lygus hesperus*. Annals of the Entomological Society of America, No. 94: 141-156.
- ZENG, F., Y. ZHU and A. COHEN, 2002. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, No. 131(3): 453-63.

