

دانش گیاهپزشکی ایران

دوره ۴۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (ص ۲۶۳-۲۵۱)

## ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم آلفا-آمیلاز کفشدوزک خریزه (*Epilachna chrysomelina*) و اثر مهارکنندگی چند بازدارنده گیاهی روی آن

روح‌انگیز قنبرنژاد<sup>۱</sup>، محمد قدمیاری<sup>۲\*</sup> و رضا حسن ساجدی<sup>۳</sup>

۱ و ۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی و دانشیار، گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان، گیلان

۳. دانشیار، گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۰/۳)

### چکیده

*Epilachna chrysomelina* یکی از مهم‌ترین آفات گیاهان تیره کدوئیان است. ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا-آمیلاز در حشرات کامل کفشدوزک خریزه بررسی و فعالیت بهینه این آنزیم در pH ۴ و دمای ۵۰ درجه سلسیوس به دست آمد. فعالیت ویژه آلفا-آمیلاز در روده جلویی، میانی و عقبی و لوله گوارش سنین مختلف لاروی و حشرات کامل نر و ماده بررسی شد. بیشترین فعالیت این آنزیم در لاروهای سن سوم مشاهده شد و فعالیت آن در حشرات نر و ماده اختلاف معناداری با هم نداشت. فعالیت ویژه آلفا-آمیلاز در روده میانی به ترتیب ۵ و ۸/۳- برابر فعالیت ویژه آن در روده‌های جلویی و عقبی بود. ثابت میکائلیس-متن (Km) ۰/۶۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج زایموگرام آلفا-آمیلاز یک ایزوفرم از این آنزیم را در دستگاه گوارش این حشره نشان داد. همچنین اثر بازدارنده‌های استخراج‌شده از بذور گیاهان خلر (*Lathyrus sativus*)، شبدر (*Trifolium alexandrinum*)، ذرت (*Zea mays*)، باقلا (*Faba vulgaris*)، عدس (*Lentis culinaris*)، لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و ماش (V. radiata) روی این آنزیم نشان داد که بازدارنده‌های استخراجی از لوبیا و ماش قادر به مهار آن بودند.

**واژه‌های کلیدی:** آلفا-آمیلاز، بازدارنده، کفشدوزک خریزه، ویژگی‌های بیوشیمیایی.

### مقدمه

دستگاه گوارش در حشرات لوله طویلی است که از دهان شروع می‌شود و به مخرج ختم می‌گردد. این اندام مکان اصلی گوارش و جذب مواد غذایی بوده و برای هضم مواد غذایی، حاوی آنزیم‌های پروتئاز، کربوهیدراز، لیپاز و... است. آلفا-آمیلاز جزو آنزیم‌های کربوهیدراز بوده و دربرگیرنده خانواده‌ای از آندو آمیلازها است که پیوند آلفا را در پلی‌ساکاریدهایی مانند نشاسته و گلایکوژن هیدرولیز و گلوکوز و مالتوز تولید می‌کنند (Strobel et al., 1998; Farshbaf Pour Abad et al., 2010). ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی در حشرات، بسته به تاکسونومی حشره، رژیم‌های غذایی و شرایط زیست‌محیطی آنها متفاوت است

(Baker, 1989; Farshbaf Pour Abad et al., 2010).

تاکنون ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا-آمیلازهای سخت‌بال‌پوشان بررسی شده است (Sharifi et al., 2011; Vatanparast & Hosseinaveh, 2010; Hosseinaveh et al., 2007) و pH بهینه برای فعالیت بیشتر آنها در محدوده اسیدی گزارش شده است. همچنین، دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم‌ها در محدوده ۳۰-۵۰ درجه سلسیوس به دست آمده است. هدف از مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا-آمیلازها، ایجاد گیاهان مقاوم به آفات از طریق انتقال ژن‌های بازدارنده آنها به گیاهان زراعی است. مهارکننده‌های گیاهی به واسطه اثرشان روی آلفا-آمیلازها و پروتئینازها از فرایند گوارش

بیوشیمیایی هر کدام از این آنزیم‌ها ما را قادر می‌کند تا از مهارکننده‌ها در امر کنترل آفات استفاده کنیم (Chougule *et al.*, 2008). به همین دلیل در این تحقیق ویژگی‌های آلفا-آمیلاز دستگاه گوارش کفشدوزک خربزه برای اولین بار بررسی شد. امروزه استفاده از ارقام مقاوم و گیاهان تراریخته حاوی بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی یکی از روش‌های مؤثر در کنترل آفات است. ارقام مقاوم روی زیست‌شناسی آفات یا ارتباط متقابل گیاه-حشره تأثیر می‌گذارند و از شدت خسارت می‌کاهند. وارد کردن ژن‌های بیان‌کننده مهارکننده‌های آنزیمی حشره به گیاه و بیان این ژن‌ها در گیاه باعث تولید مهارکننده‌ها در گیاه می‌شود. با تغذیه حشره از این گیاهان، آنزیم‌های گوارشی بلوکه و گوارش غذا به صورت ناقص صورت می‌گیرد (Chougule *et al.*, 2008). در جهت نیل به این هدف، اثر بازدارنده‌های استخراج‌شده از چند گیاه روی فعالیت آمیلولیتیک نیز بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه، حشرات کامل کفشدوزک خربزه از روی بوته‌های خیار در استان گیلان (بندر کیشهر) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. حشرات روی برگ‌های گیاه کدو در شرایط آزمایشگاهی (دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $70 \pm 10$  درصد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) پرورش داده شدند.

### تشریح حشرات و تهیه عصاره آنزیمی

حشرات هم‌سن به‌طور تصادفی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز انتخاب شدند. دستگاه گوارش لاروهای سن دوم، سوم، چهارم و حشرات کامل نر و ماده هم‌سن یک روزه روی یخ جدا و برای انجام آزمایش‌ها در دمای  $20$ - درجه سلسیوس نگهداری شدند (Hosseininaveh & Ghadmayari, 2013). نمونه‌های هم‌گن‌سازی‌شده در دمای  $4$  درجه سلسیوس و  $13000$  دور در دقیقه به مدت  $15$  دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، محلول روشن‌شده به عنوان منبع آنزیم استفاده شد.

جلوگیری می‌کنند (Buonocore *et al.*, 1976; Silano *et al.*, 1978). مطالعات ثابت کرده‌اند که مقدار کمی از این پروتئین‌ها، آمیلازهای برخی از گونه‌های حشرات و پستانداران را در محیط غیرزنده مهار کردند؛ در حالی که روی آمیلاز گندم هیچ‌گونه اثر بازدارندگی نداشتند (Franco *et al.*, 2002; Silano *et al.*, 1978). بدیهی است که این مهارکننده‌های پروتئینی می‌توانند به عنوان عوامل حفاظت از دانه‌ها و بذرها در برابر حشرات دانه‌خوار عمل کنند (Appelbam *et al.*, 1964; Silano *et al.*, 1976).

Silano *et al.* (1978)، اظهار داشتند که در گونه‌هایی از حشرات که به دانه‌های گندم و فرآورده‌های آن حمله می‌کنند، فعالیت آمیلاز بالا بود و به مهار شدن توسط عصاره‌های آلبومین گندم حساسیت زیادی داشتند. Baker (1988)، گزارش کرد که فعالیت آلفا-آمیلازهای *Sitophilus oryzae* L. و *zeamais* (Col.: Curculionidae) در اثر تغذیه از گندم در مقایسه با جو بسیار کمتر بود. همچنین Cinco-Moroyoqui *et al.* (2008)، در مطالعه دیگری سه ایزوآمیلاز *Rhyzopertha dominica* را جداسازی و ویژگی‌های آنها را بررسی کردند. در این مطالعه، اثر مهارکنندگی عصاره‌های آلبومین گندم روی فعالیت آلفا-آمیلاز این حشره مطالعه شد. عصاره‌های مذکور، فعالیت این آنزیم را به‌طور معناداری مهار کردند. بین غلظت آلبومین و مهارکنندگی فعالیت آلفا-آمیلاز یک رابطه منفی وجود داشت. در واقع، غلظت کمتر آلبومین فعالیت مهارکنندگی بیشتری را به دنبال داشت. از بین سه ایزوآمیلاز، RdA70 و RdA79 طی  $60$  دقیقه به‌وسیله عصاره آلبومین گندم به‌طور معناداری مهار شدند؛ در حالی که فعالیت ایزوآمیلاز RdA90 حتی در غلظت‌های بالای آلبومین نیز مهار نشد. Yazdaniyan *et al.* (2010)، نشان دادند که بازدارنده آلفا-آمیلاز استحصالی از گندم (WAAI type 1) قادر به مهار آلفا-آمیلاز سن نواری چتریان *Graphosoma lineatum* است.

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های گوارشی، پایه و اساس پژوهش‌های مربوط به فیزیولوژی دستگاه گوارش را تشکیل می‌دهد. با توجه به استفاده از مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی در تولید گیاهان تراریخته حاوی این ترکیبات، شناخت ویژگی‌های

سلسیوس سانتیفرود شدند. مایع رونشین به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و سپس در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفرود شد. مایع رونشین حاصل از سانتیفرود با سولفات آمونیم اشباع شد (۷۰ درصد). برای این کار نمونه تحت آزمایش به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس به وسیله دستگاه مخلوطکن مخلوط گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفرود شد. رسوب حاصل در هر لوله با یک میلی‌لیتر بافر Tris-HCl با pH=۷ و غلظت ۰/۰۲ مولار به صورت سوسپانسیون درآمد. دیالیز نمونه‌ها توسط کیسه دیالیز انجام گرفت. محتویات کیسه‌های حاوی سوسپانسیون پروتئین- آمونیم سولفات به مدت ۲۰ ساعت در درون یک تانک با بافر Tris، pH ۷ و غلظت ۰/۰۲ مولار دیالیز شدند و طی این مدت، بافر سه بار عوض شد. محتویات کیسه دیالیز به‌طور مستقیم وارد ستون کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین<sup>۱</sup> DEAE-Cellulose گردید. سپس ستون با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مولار NaCl شسته شد و فرکشن‌های خارج شده از ستون (هر فرکشن یک میلی‌لیتر) جمع‌آوری شدند.

بررسی اثر بازدارنده‌های گیاهی روی فعالیت آنزیم برای انجام این آزمایش ابتدا ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده از دستگاه گوارش لاروهای سن سوم با ۲۰ میکرولیتر محلول بازدارنده گیاهی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس، واکنش با اضافه شدن سوبسترا شروع شد و فعالیت آلفا-آمیلاز با استفاده از روش Branfeld (1955)، اندازه‌گیری گردید.

### نتایج و بحث

ریخت‌شناسی دستگاه گوارش لاروهای کفشدوزک خربزه همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، لوله گوارش در لاروهای کفشدوزک خربزه به صورت لوله‌ای مستقیم است و از سه بخش جلویی، میانی و عقبی تشکیل شده است. بخش جلویی و عقبی نسبت به بخش میانی لوله گوارش کوچک‌تر است. لوله‌های مالپیگی نیز به قسمت انتهایی بخش میانی لوله گوارش متصل شده‌اند.

### اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم

فعالیت ویژه آلفا-آمیلاز با استفاده از سوبسترای نشاسته و با استفاده از روش Branfeld (1955)، تغییر داده شده توسط Asadi et al. (2010)، اندازه‌گیری شد. از منحنی استاندارد مالتوز برای اندازه‌گیری فعالیت آلفا-آمیلاز استفاده شد. میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها با استفاده از روش Bradford et al. (1976)، اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی (U) مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مول مالتوز را از نشاسته در مدت یک دقیقه در pH ۴ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس آزاد می‌کند.

### اندازه‌گیری pH و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم

اثر pH (۲-۱۲) روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز با استفاده از بافر استات سدیم-بورات-فسفات ۴۰ میلی‌مولار بررسی شد. در این پژوهش، اثر دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سلسیوس نیز روی فعالیت این آنزیم بررسی شد و میزان فعالیت نسبی محاسبه گردید.

### الکتروفورز Native PAGE و زایموگرام آلفا-آمیلاز

برای انجام این کار از روش Davis et al. (1964)، تغییر داده شده توسط Asadi et al. (2010)، استفاده شد.

### تعیین پارامترهای سینتیکی

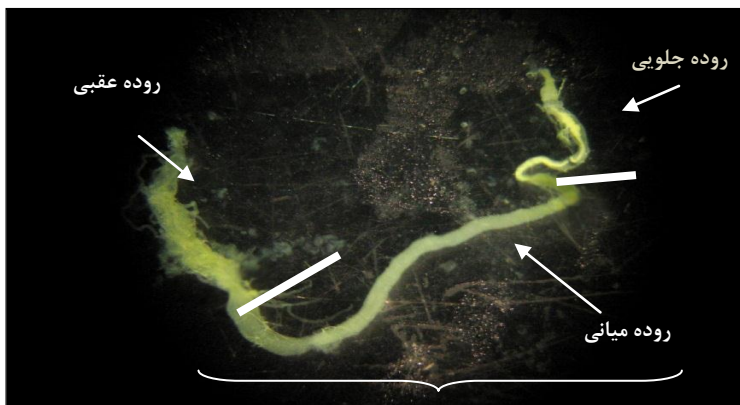
پارامترهای سینتیکی آنزیم آلفا-آمیلاز با استفاده از غلظت‌های مختلف ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد نشاسته اندازه‌گیری شد.

### استخراج بازدارنده‌های گیاهی

برای استخراج از بذور گیاهان خلر (*Lathyrus sativus*)، شبدر (*Trifolium alexandrinum*)، ذرت (*Zea mays*)، باقلا (*Faba vulgaris*)، عدس (*Lentis culinaris*)، لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و ماش (*V. radiata*) استفاده شد.

در ابتدا مقدار ۳۰ گرم از بذورهای تحت آزمایش به‌وسیله آسیاب برقی به‌صورت آرد درآمد. به هر یک از این نمونه‌ها ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر ۰/۱۵ مولار NaCl اضافه گردید و به‌وسیله مخلوط‌کن به مدت یک ساعت در دمای اتاق به آرامی مخلوط شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه

1. Diethyl aminoethyle-cellulose

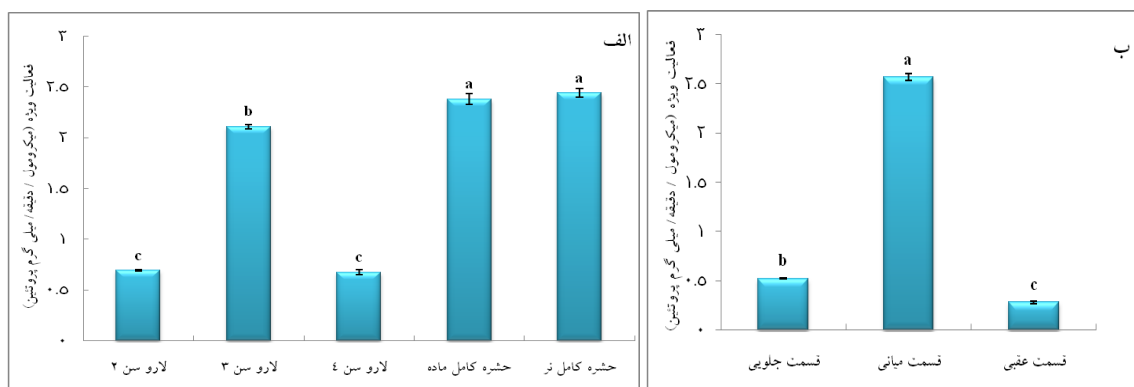


شکل ۱. قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش در لاروهای کفشدوزک خربزه *E. chrysomelina* (اصلی)

دارد؛ به طوری که با افزایش تغذیه و جذب غذا، فعالیت آنزیم نیز در بافت روده افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت که با توجه به تغذیه بیشتر لارو سن کفشدوزک خربزه، فعالیت ویژه آلفا-آمیلاز در این سن بیشتر از بقیه سنین است. فعالیت ویژه این آنزیم در حشرات نر و ماده اختلاف معناداری با هم نداشتند (شکل ۲-الف). از دلایل تفاوت فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در مراحل مختلف نشو و نما می‌توان به عواملی همچون نوع و میزان تغذیه اشاره کرد (Hori, 1972).

### فعالیت آنزیم در لاروها و حشرات کامل

اندازه‌گیری فعالیت ویژه آلفا-آمیلاز سنین مختلف لاروی، حشرات کامل نر و ماده و سه قسمت لوله گوارش لارو سن سوم نشان داد که بیشترین فعالیت این آنزیم در لاروهای سن سوم بود (شکل ۲-الف) که آن را می‌توان با میزان تغذیه و تحرک زیاد این مرحله لاروی نسبت به سنین دیگر توجیه کرد. Christopher & Mathavan (1985)، اظهار داشتند که بین میزان تغذیه، میزان جذب غذا و فعالیت آنزیم ارتباط مستقیمی وجود



شکل ۲. مقایسه میانگین فعالیت ویژه آلفا-آمیلاز در سنین مختلف لاروی و حشرات کامل نر و ماده (الف) و سه قسمت لوله گوارش لارو سن سوم کفشدوزک خربزه (ب)

\*میانگین‌های دارای حروف مشترک، از نظر آماری در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند.

مقدار فعالیت ویژه آلفا-آمیلاز در قسمت میانی لوله گوارش به ترتیب ۵ و ۸/۳ برابر فعالیت ویژه آن در قسمت جلویی و عقبی لوله گوارش به دست آمد (شکل ۲-ب) که نشان می‌دهد فعالیت این آنزیم در قسمت میانی دستگاه گوارش لارو سن سوم بیشتر از قسمت جلویی و در قسمت جلویی بیشتر از قسمت عقبی آن

طی بررسی‌های Kazzazi et al. (2005)، روی آلفا-آمیلاز سنین مختلف پورگی سن گندم *Eurygaster integriceps* P. فعالیت ویژه این آنزیم در مراحل مختلف پورگی سنین اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۷۸، ۱/۲۱، ۱/۲۳، ۱/۲۵ میکرومول / دقیقه / میلی گرم پروتئین بود.

کلرادو (*Leptinotarsa decemlineata*) را ۶/۴ گزارش کردند. *Silva et al.* (1999)، pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در سوسک *Tenebrio molitor*، را ۵/۸ به دست آوردند. *Valencia et al.* (2000)، pH بهینه ۵ را برای فعالیت این آنزیم در سوسک *Hypothenemus hampei* گزارش کردند. *Baker* (1983)، pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز را در لاروهای چندین سخت‌بال‌پوش از جمله شپش برنج *S. oryzae*، شپش گندم *S. granarius*، شپش ذرت *S. zeamais* و *R. dominica* در محدوده ۴ تا ۵/۸ گزارش کرد. همچنین *Applebaum & Konijn* (1965)، pH بهینه ۵/۲ را برای سوسک *Callosobruchus chinensis* (*Podoler & Applebaum*, 1971) و ۵/۴ را برای *Tribolium castaneum* گزارش کرده‌اند. فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در لوله گوارش بیشتر سخت‌بال‌پوشان در محیط اسیدی است که نتایج حاضر نیز همین امر را ثابت می‌کند و با نتایج محققان دیگر روی دیگر سخت‌بال‌پوشان هم‌خوانی دارد. بررسی فعالیت آنزیم در pHهای مختلف روی ژل نیز نتایج به دست آمده از فعالیت آنزیمی را تأیید می‌کند.

#### اندازه‌گیری pH بهینه فعالیت آنزیم

فعالیت بهینه آلفا-آمیلاز با انکوباسیون مخلوط واکنش در دماهای مختلف ۱۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد و بیشینه فعالیت آنزیم در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به دست آمد. با توجه به شکل ۴ با افزایش دما از ۱۰ تا ۵۰ درجه میزان فعالیت آنزیم متناسب با دما افزایش یافت، ولی بعد از ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش دما از میزان فعالیت آنزیم کاسته شد. این کاهش فعالیت به این دلیل بود که با افزایش دمای بیش از ۵۰ درجه سلسیوس ساختمان پروتئینی آنزیم دگرگون می‌شود. *Mendiola- Olaya et al.* (2000)، دمای بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز رودهای سوسک *Prostephanus truncatus* را ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس گزارش کردند و نشان دادند که از دمای ۴۰ درجه سلسیوس به بالا، سرعت فعالیت آن کاهش می‌یابد. کاهش سریع فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر از ۴۰ درجه سلسیوس نشان‌دهنده عدم پایداری آن در دماهای بالا است. *Safaei Khorram et al.*

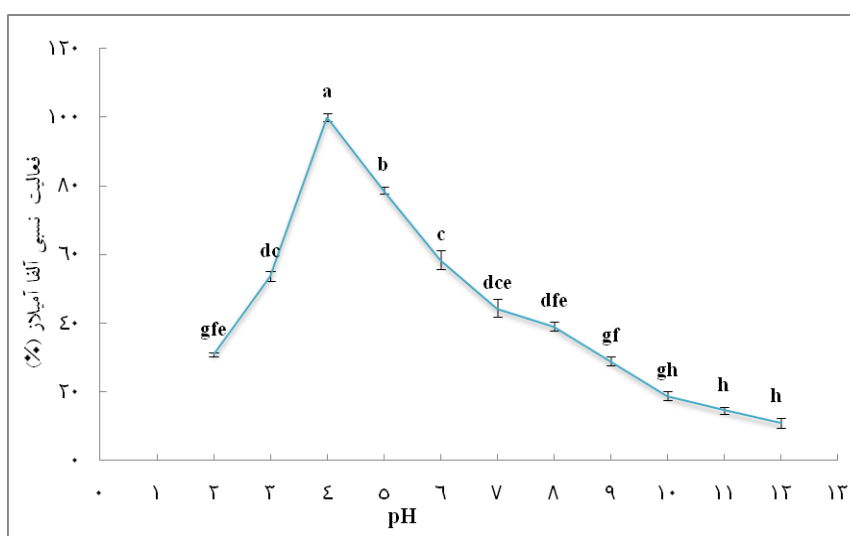
است. *Ramzi & Hoseininaveh* (2010)، فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز رودهای سن سبز پسته (*Brachynema germari*) را در قسمت‌های مختلف روده بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که فعالیت این آنزیم در قسمت روده میانی سوم از همه بالاتر و در قسمت چهارم از بقیه قسمت‌ها کمتر بود. *Sharifi et al.* (2011) نشان دادند که میزان فعالیت این آنزیم در روده میانی سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* از روده جلویی و عقبی آن بیشتر بود.

#### اندازه‌گیری pH بهینه فعالیت آنزیم

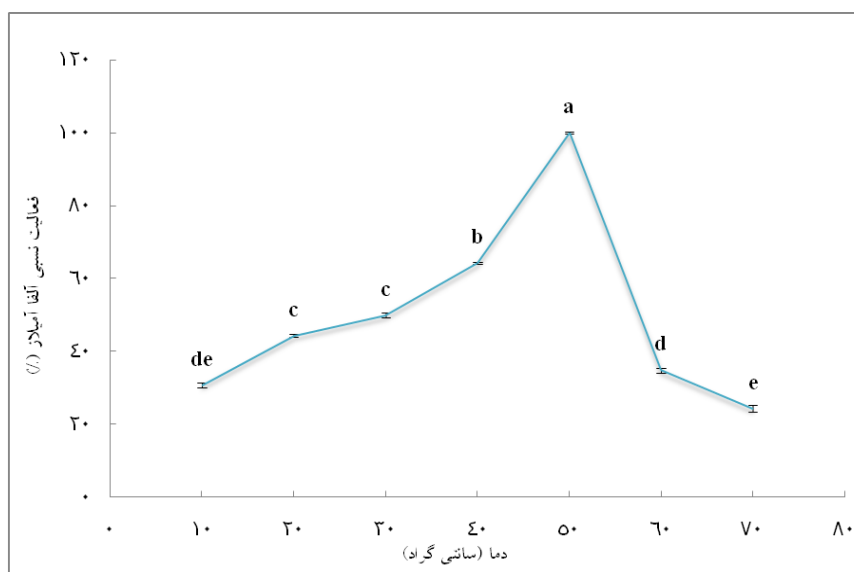
pH بهینه فعالیت آلفا-آمیلاز کفشدوزک خربزه برابر با ۴ به دست آمد (شکل ۳). در زمینه میزان pH روده و اثر pH روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات گزارش‌های مختلفی وجود دارند. pH محتویات دستگاه گوارش از عوامل عمده تأثیرگذار روی آنزیم‌های گوارشی است. pH می‌تواند روی پایداری آنزیم و بهبود فعالیت بهینه آن تأثیرگذار باشد (*Dow*, 1986). دلیل اصلی بررسی pH قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش حشرات، شناسایی مهارکننده‌های مناسبی است که بتوانند در آن دامنه مشخص pH فعالیت قابل توجهی داشته باشند. در این آزمایش، pH بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی *E. chrysolina*، ۴ به دست آمد که با بررسی زایموگرام در pHهای مختلف این موضوع نیز تأیید شد (شکل‌های ۳ و ۶). گزارش‌های بسیار زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه pH بهینه برای فعالیت این آنزیم در حشرات بین ۵/۵ تا ۹/۵ است. pH بهینه برای فعالیت آلفا- و بتا- آمیلازها در دیگر موجودات زنده نیز بین ۴/۷-۶/۹ گزارش شده است. به طور معمول آنزیم‌های آلفا-آمیلاز حشرات در محیط خنثی تا کمی اسیدی بیشترین فعالیت را دارند (*Baker*, 1983; *Terra et al.*, 1996). طی تحقیقات *Baker* (1991) و *Valencia et al.* (2000)، pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در حشرات راسته‌های سخت‌بال‌پوشان و جوربالان در محدوده اسیدی متمایل به خنثی و در راسته‌های بال‌پولک‌داران و بال‌غشاییان فعالیت آنزیمی در محدوده قلیایی صورت می‌گیرد. *Safaei Khorram et al.* (2010)، pH بهینه برای بیشینه فعالیت این آنزیم در سوسک

مولکولی اسید آمینه آنها است. یک تغییر کوچک در این ساختمان، به‌ویژه در جایگاه فعال، ممکن است شدت واکنش کاتالیزوری آنها را به‌طور قابل توجهی تغییر دهد. دما از جمله فاکتورهایی است که با ایجاد تغییراتی در ترکیب سه بعدی آنزیم فعالیت آن را کاهش می‌دهد. بعضی از تغییرات به‌طور کلی فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها را متوقف می‌کنند، اما اگر محیط آنزیم‌ها به شرایط عادی برگردد، آنزیم فعالیت خود را دوباره به دست خواهد آورد. اگر تغییرات به حدی باشد که آنزیم به حالت اولیه برنگردد، فعالیت آنزیم کاهش خواهد یافت.

(2010)، دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز را ۳۷ درجه سلسیوس برای سوسک کلرادو *L. decemlineata* گزارش کردند، اما این آنزیم در طیف گسترده‌ای از دما (از ۲۵ تا ۴۶ درجه) فعال بود. همچنین Vatanparast & Hoseinaveh (2010)، اظهار داشتند که دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم در سرخرطومی یونجه (*Hypera postica*) ۳۵ درجه سلسیوس بود. دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز *C. chinensis*، ۳۶-۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است (Hori, 1969). پایداری آنزیم‌های پروتئینی وابسته به ترکیب سه بعدی و ساختمان

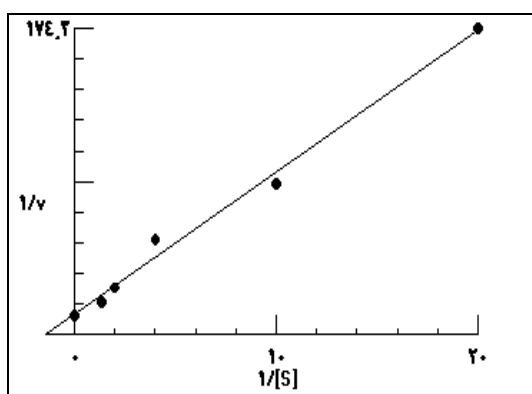


شکل ۳. اثر pH روی میانگین فعالیت نسبی آنزیم آلفا-آمیلاز لوله گوارش *E. chrysolina*. \* میانگین‌های دارای حروف مشترک، از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند.



شکل ۴. نمودار اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لوله گوارش *E. chrysolina*. \* میانگین‌های دارای حروف مشترک، از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معناداری با یکدیگر ندارند.

دارای دو ایزوفرم از آنزیم آلفا-آمیلاز است (Baker, 1989). با استفاده از نشاستهٔ محلول به عنوان سوبستر، پنج ایزوفرم از آلفا-آمیلاز در عصارهٔ خام از کل بدن لارو سوسک *Morimus funereus* شناسایی شدند. در لارو شب‌پره‌های *Spodoptera litura* و *C. cephalonica* و سوسک *C. chinensis* تعداد ایزوفرم‌های آنزیم آلفا-آمیلاز بیشتر از ۵ است؛ در حالی که در سوسک‌های *S. oryzae* و *T. castaneum* فقط یک ایزوفرم مشاهده شده است (Wissesing *et al.*, 2008; Sivakumar *et al.*, 2006). و نیز یک ایزوفرم از آنزیم آلفا-آمیلاز در سوسک *C. maculatus*، سن گندم (Kazzazi *et al.*, 2005)، کرم ابریشم (Kanekatysa, 1978)، سن سبز پسته (Ramzi & Hosseinaveh, 2010) و سوسک برگ‌خوار نارون (Sharifi *et al.*, 2011) گزارش شده است.



شکل ۵. منحنی لاینویور- بارک برازش شده برای آلفا-آمیلاز لارو سن سوم کفشدوزک خربزه

#### اثر بازدارنده‌های گیاهی (از لوبیا تیپ دو و ماش) روی

##### فعالیت آلفا-آمیلاز

بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز به‌طور گسترده مطالعه شدند و در بیشتر غلات و حبوبات وجود آنها محرز شده است. بیشتر آنها روی آلفا-آمیلاز حشرات اثر مهارکنندگی دارند. با توجه به اینکه بازدارنده‌های استخراج‌شده از بذره‌های لوبیا و ماش بیشترین مهار را نشان دادند، به همین دلیل سعی شد تا با کروماتوگرافی تبادل یونی بازدارنده خالص شود. فعالیت بازدارندگی فرکشن‌های حاصل از ستون کروماتوگرافی بذور دو گیاه لوبیا و ماش علیه آلفا-آمیلاز کفشدوزک خربزه تعیین گردید (شکل ۷-الف و ب).

#### بررسی پارامترهای $V_{max}$ و $K_m$ آنزیم آلفا-آمیلاز

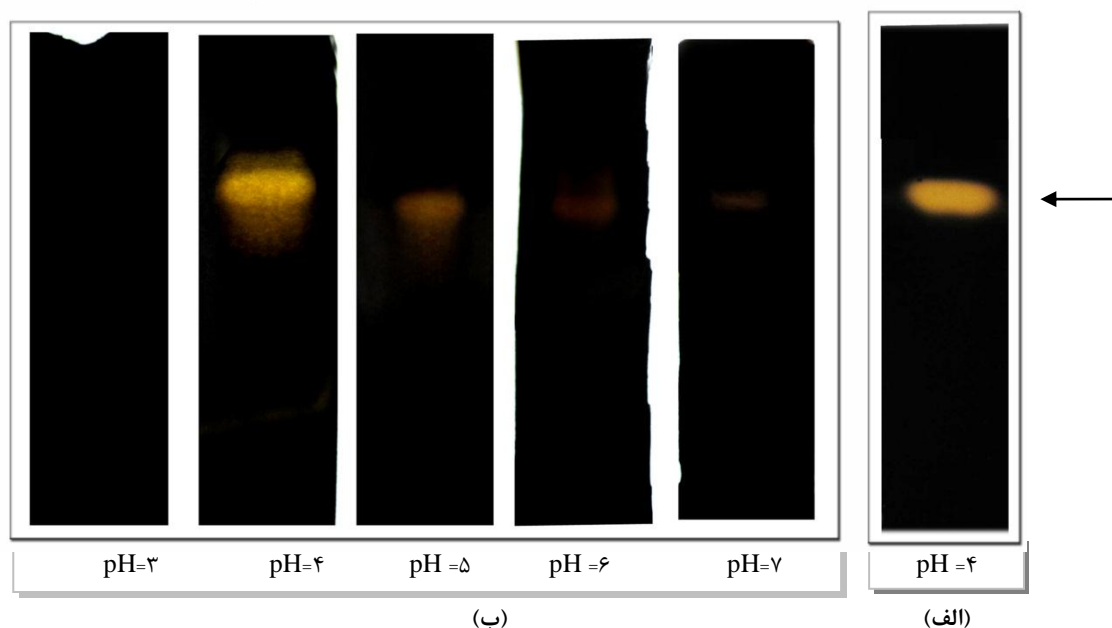
مقدار  $K_m$  آنزیم آلفا-آمیلاز در لولهٔ گوارش کفشدوزک خربزه برابر با  $0/۶۹$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (شکل ۳-۵). Sharifi *et al.* (2011)، اظهار کردند که مقدار  $V_{max}$  و  $K_m$  آلفا-آمیلاز سوسک برگ‌خوار نارون به‌ترتیب برابر با  $۱/۳۴$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و  $۱/۵۲$  میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین است. مقدار  $K_m$  برای آنزیم آلفا-آمیلاز در سوسک دانهٔ غلات *R. dominica*،  $0/۹۸$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (Priya *et al.*, 2010). نتایج ما نشان می‌دهد که میزان  $K_m$  آلفا-آمیلاز کفشدوزک خربزه کمتر از سوسک برگ‌خوار نارون و سوسک دانهٔ غلات است که نشان‌دهندهٔ گیرایی<sup>۱</sup> بالای آنزیم آلفا-آمیلاز کفشدوزک خربزه به نشاسته است. Asadi *et al.* (2010)، مقادیر  $K_m$  را برای آلفا-آمیلاز رودهٔ میانی، غدد بزاقی و همولنف کرم سبز برگ‌خوار برنج به‌ترتیب  $0/۹۷۲$ ،  $0/۱۴۸$  و  $0/۱۳۲$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. همچنین مقدار  $K_m$  آلفا-آمیلاز در معدهٔ میانی و غدد بزاقی سن سبز پسته *B. germari* به‌ترتیب  $0/۷۷$  و  $0/۴۱$  میلی‌مولار گزارش شده است (Ramzi & Hosseinaveh, 2010).

#### زایموگرام آلفا-آمیلاز در pH های مختلف

نتایج نشان دادند که pH بهینهٔ فعالیت آلفا-آمیلاز در محدودهٔ اسیدی قرار داشت و با افزایش pH از ۴، از میزان فعالیت آن کاسته شد. بررسی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در pH های مختلف در ژل نیز که به‌روشنی با تغییر شدت رنگ باند ظاهرشده مشخص گشت، فعالیت بیشینه آنزیم را در pH برابر با ۴ مشخص کرد (شکل ۶). زایموگرام تأییدکنندهٔ نتایج به‌دست آمده از اثر pH روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز است. نتایج نشان داد که آلفا-آمیلاز کفشدوزک خربزه دارای یک ایزوفرم است. تعداد ایزوفرم‌های آنزیم آلفا-آمیلاز در حشرات راسته‌های مختلف متفاوت است. تعداد ایزوفرم‌های شناخته‌شدهٔ آنزیم آلفا-آمیلاز در گونه‌های مختلف حشرات از ۱-۸ متفاوت است. Dojnov *et al.* (2010)، سه ایزوفرم از آلفا-آمیلاز را در رودهٔ میانی لاروهای سوسک *Cerambyx cerdo* گزارش کردند. لارو شب‌پرهٔ *Anagasta kuehniella*

1. Affinity





شکل ۶. زایموگرام فعالیت آلفا- آمیلاز لارو سن سوم *E. chrysomelina* فعالیت آلفا- آمیلاز روی ژل در pH بهینه (الف). فعالیت آلفا- آمیلاز در pH های مختلف (ب) \* هر لوله گوارش در ۱۵ میکرولیتر هموزنایز و در هر چاهک ۳۰ میکرولیتر بارگذاری شد.

در چهار واریته ماش (Mungbean) را روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز خالص‌سازی‌شده سوسک *C. maculatus* بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که پروتئین‌های استخراج‌شده از این واریته‌ها، آنزیم آمیلاز این حشره را به‌طور کامل مهار می‌کند. همچنین Kitaruma (1990) *et al.* نیز در تحقیقات خود نتایج مشابهی را گزارش کردند که فعالیت آنزیم آمیلاز معده میانی دو سوسک *C. chinensis* و *C. maculatus* توسط مهارکننده‌های استخراج‌شده از حبوبات مهار می‌شود.

Ishimota *et al.* (1999)، نشان دادند که مهارکننده‌های پروتئینی جداشده از واریته‌های لوبیا (*P. vulgaris*) روی رشد حشره *C. maculatus* اثر منفی دارد و باعث کند شدن رشد آن می‌شود. Applebaum & Konijn (1965)، با افزودن عصاره حاوی بازدارنده از آرد گندم به غذای مصنوعی *T. castaneum* افزایش در مرگ‌ومیر لارو را گزارش کردند. Gatehouse *et al.* (1989)، این مسئله را نیز با افزایش بازدارنده‌ها به غذای *C. maculatus* ثابت کردند. Baker *et al.* (1991)، اثر مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز موجود در ۳۰ رقم گندم را روی آنزیم آلفا-آمیلاز خالص‌سازی‌شده از شپش برنج بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که فعالیت مهارکنندگی

نتایج درباره لوبیا نشان می‌دهد که فرکشن ۶ با غلظت نمکی ۰/۰۵ دارای  $36 \pm 0/01$  درصد بازدارندگی و فرکشن‌های ۲۶ و ۳۰ با غلظت نمکی ۰/۲ نیز به ترتیب دارای  $46 \pm 0/3$  و  $25 \pm 0/06$  درصد بازدارندگی بودند. درباره ماش، فرکشن‌های شماره ۱۷، ۲۲، ۲۳ و ۲۴ با غلظت نمکی ۰/۱، آنزیم آلفا-آمیلاز را به ترتیب به میزان  $12 \pm 0/2$ ،  $10 \pm 0/05$ ،  $36/5 \pm 0/12$  و  $25 \pm 0/08$  درصد مهار کردند (شکل‌های ۷ و ۸). اثر بازدارنده‌های گیاهی روی فعالیت آلفا-آمیلاز در موارد بسیاری مطالعه شده است. بیشترین مطالعات آنزیمی برای تعیین ویژگی‌های آنزیم‌ها و شناسایی مهارکننده‌های آنزیمی در حشرات، روی آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آمیلاز صورت گرفته است. بیشتر مطالعات آنزیمی روی آمیلازها در راسته‌های سخت‌بال‌پوشان، بال‌پولک‌داران و ناجوربالان صورت گرفته و کارهای کمتری نیز در دوبالان و سوسری‌ها انجام گرفته است. Gutierrez *et al.* (1990)، درباره تأثیر مهارکننده‌های استخراجی از گندم و جو روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در آفات مختلف مطالعه کردند. بر اساس نتیجه تحقیق آنها مشخص شد که این مهارکننده‌ها باعث مهار فعالیت این آنزیم می‌شوند. Bannakan *et al.* (2007)، اثر مهارکننده‌های موجود



گندم و جو را روی آنزیم آلفا-آمیلاز و تریپسین *S. Frugiperda* بررسی کردند و نشان دادند که پروتئین‌های مهارکننده گندم به‌طور مؤثری روی آنزیم آلفا- آمیلاز لوله گوارش حشره مذکور اثر مهارکنندگی دارند.

Chen et al. (1992)، دو ایزوزایم آلفا- آمیلاز از حشرات *S. oryzae* و *T. castaneum* و یک آلفا- آمیلاز منفرد از حشرات بالغ سوسک *T. molitor* جداسازی کردند. همه آنزیم‌های خالص‌سازی شده ساختار آمینواسیدی مشابه داشتند. یک مهارکننده استخراج شده از گندم (WRP-25) هر پنج آنزیم جداسازی شده را مهار کرد؛ درحالی‌که مهارکننده استخراج شده از ذرت فقط آنزیم‌های *T. castaneum* و *T. molitor* را مهار کرد. Markwick et al. (1996)، فعالیت آلفا- آمیلاز در معده میانی چهار گونه پروانه شامل سه پروانه آفت برگ و میوه سب *Planotortrix octo*، *Epiphyas postvittana*، *Ctenopseustis Obliquana* و یک آفت سبب زمینی *Phthorimaea Operculella* در پاسخ به pH و مهارکننده‌های گندم، جو، لوبیا قرمز و باکتری استریپتوماپسس بررسی شدند. میزان فعالیت آلفا-آمیلاز در عصاره‌های معده میانی لارو چهار گونه آفت پروانه‌ای بین ۰/۶ و ۰/۵ ماکرومول مالتوز بر دقیقه در هر گرم وزن حشره بود. تنها مهارکننده آلفا- آمیلاز گرفته شده از گندم فعالیت آنزیم‌های هر چهار گونه پروانه را مهار کرد. اما سه مهارکننده دیگر هیچ تأثیری روی فعالیت آنزیم نداشتند.

Gutierrez et al. (1993)، اثر سه مهارکننده به‌دست آمده از گندم را روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز هفت آفت از راسته پروانه‌ها *A. cautella*، *A. kuehniella*، *Agrotis ipsilon*، *Plodia interpunctella*، *A. elutella* و *A. segetum* بررسی کردند. در این آزمایش‌ها مهارکننده‌های تترامریک، دیمریک و مونومریک به ترتیب بیشترین اثر مهارکنندگی را روی آنزیم آلفا-آمیلاز این آفات داشتند. Kazzazi et al. (2005)، گزارش کردند که سن گندم با تطبیق کامل غذایی که روی گندم دارد، توانسته است طی روند تکاملی خود بر بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز موجود در گندم چیره گردد. این در صورتی است که بسیاری از

در رقم کمترین و در رقم Logan بیشترین مقدار را نشان داد.

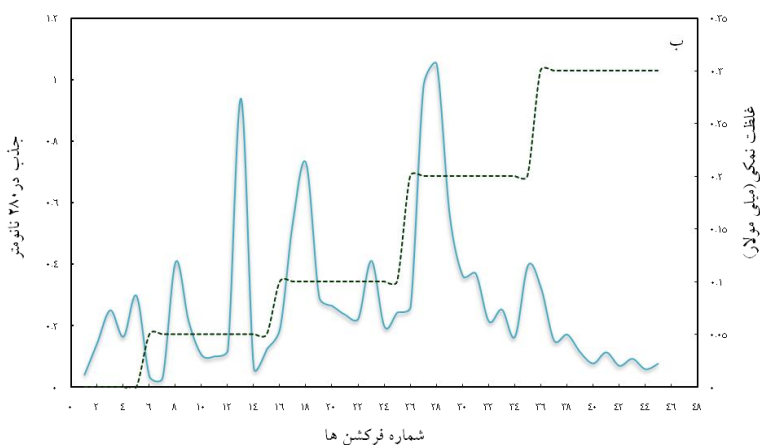
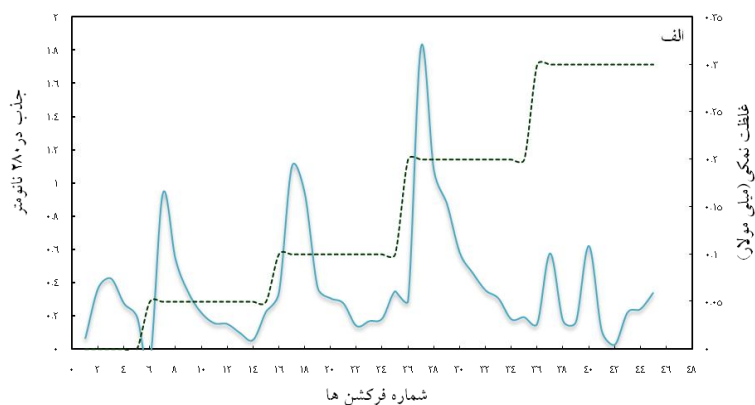
Nasari et al. (2010)، در بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز *Helicoverpa armigera* در واکنش به تغذیه از ارقام مختلف سویا، کمترین فعالیت آمیلازی را در ارقام DPX و Williams گزارش و علت مقاومت این ارقام را وجود برخی مهارکننده‌های آنزیمی و به احتمال زیاد وجود برخی ترکیبات شیمیایی می‌دانند که دارای اثر نامطلوب بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی است.

Sivakumar et al. (2006)، اثر سه مهارکننده پروتئینی جداسازی شده از غلات شامل LMCO3، FMCO11 و FMCO13 را روی آلفا-آمیلاز معده چهار آفت انباری شامل *S. oryzae*، *T. castaneum*، *C. chinensis* و *C. cephalonica* و چهار آفت گیاه‌خوار شامل *S. litura*، *Plutella xylostella*، *Achaea janata*، *H. armigera* بررسی کردند. مهارکننده‌های پروتئینی جداسازی شده از غلات آنزیم آلفا-آمیلاز حشرات آفت را به نسبت‌های مختلف مهار کردند. بیشترین درصد مهارکنندگی برای LMCO3 و FMCO13 روی آلفا-آمیلاز سوسک (*C. chinensis* (Col.: Bruchidae) ثبت شد. همچنین مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز این گندمیان به‌طور معناداری فعالیت آلفا-آمیلاز حشرات *A. janata*، *C. cephalonica*، *S. oryzae* و *T. castaneum* را کاهش دادند که نشان‌دهنده این مطلب بود که مهارکننده‌های آلفا-آمیلاز می‌توانند علیه حشرات آفت استفاده شوند.

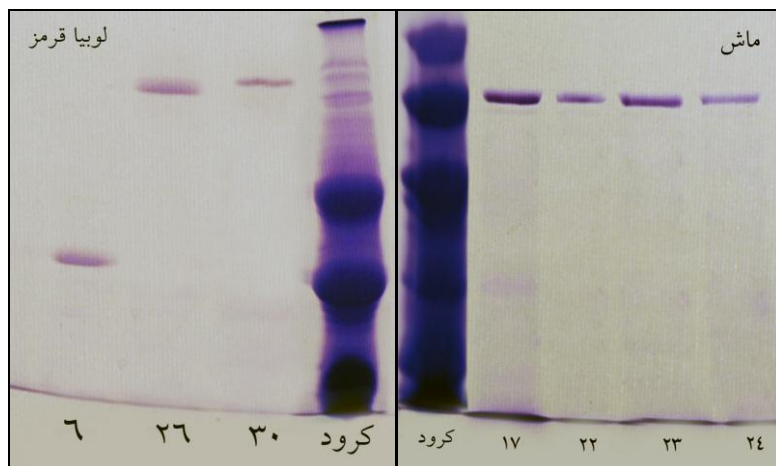
Kashiwaba et al. (2002)، دریافتند که ترکیب شیمیایی موجود در دانه‌های لوبیا (*V. umbellata*) باعث مهار شدن رشد در *C. maculatus*، *C. analis* و *C. chinensis* می‌گردد و این ترکیب شیمیایی باعث مهارشدن آنزیم آمیلاز می‌شود. در مطالعه Feng et al. (1996)، مهارکننده‌های آنزیم آلفا-آمیلاز تحت عناوین WRP25، WRP24، WRP26 و WRP27 با روش کروماتوگرافی مایع فاز معکوس از آرد گندم خالص‌سازی شده و اثر آنها روی آلفا-آمیلاز آفات انباری بررسی گردید و نتایج این فرضیه را که مهارکننده‌ها باعث کند شدن رشد حشرات می‌شوند، اثبات کرد. همچنین Alfonso et al. (1997)، اثر مهارکننده‌های

بیشترین بازدارندگی را روی آلفا-آمیلاز کفشدوزک خربزه داشتند. بنابراین به نظر می‌رسد که ژن‌های کدکننده این بازدارنده‌ها پتانسیل خوبی برای ایجاد گیاهان مقاوم به این آفت داشته باشند.

آفات دیگر که از گندم تغذیه نمی‌کنند، حساسیت زیادی به بازدارنده‌های آن دارند. در این تحقیق نتایج نشان داد که بازدارنده‌های استخراج‌شده از لوبیا (*P. vulgaris*) و ماش (*V. radiate*)



شکل ۷. کروماتوگرام فرکشن‌های به‌دست‌آمده از کروماتوگرافی تبادل یونی DEAE cellulose بازدارنده‌های استخراج‌شده از ماش (الف) و لوبیا (ب). نقطه‌چین نشان‌دهنده شیب غلظت (۰/۵-۰) مولار NaCl است.



شکل ۸. SDS-PAGE فرکشن‌های خالص‌شده بازدارنده‌های استخراجی از ماش و لوبیا قرمز با کروماتوگرافی تبادل یونی

## REFERENCES

- Alfonso, J. F., Ortego, F., Sanchez-Monge, R., Garcia-Casado, G., Pujol, M., Castanera, P. & Salcedo, G. (1997). Wheat and barley inhibitors active towards  $\alpha$ -amylase and trypsin- like actives from *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1729-1741.
- Applebaum, S. W. (1964). The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase. *Journal of Insect Physiology*, 10, 897-906.
- Applebaum, S.W. & Konijn, A.M. (1965). The utilization of starch by larvae of the flour beetle. *Tribolium castaneum*. *Journal of Nutrition*, 85, 275-282.
- Asadi, A., Ghadamyari, M., Sajedi, R.H., Jalali, J. & Tabari, M. (2010). Biochemical characterization of midgut, salivary glands and haemolymph  $\alpha$ -amylases of the rice green caterpillar, *Naranga aeneascens* L. (Lep.: Noctuidae). *Bulletin of Insectology*, 63(2), 175-181.
- Baker, J.E. (1983). Properties of amylase from midguts of larvae of *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus granarius*. *Insect Biochemistry*, 13, 421-428.
- 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.
- Baker, J. E. (1991). Purification and partial characterization of  $\alpha$ -amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry*, 21, 303-311.
- Bannakan, I., Hormchan, P., Wongpiyasatid, A. & Engkakul, A. (2007). Effects of alpha-amylase inhibitor on mungbean weevil, *Callosobruchus maculatus*, *in vivo* and *in vitro* and on barley malt alpha-amylase *in vitro*. *Kasetsart Journal: Natural Science*, 41 , 451-460
- 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.
- Buonocore, V., Poerio, E., Silvano, V. & Tomasi, M. (1976). Physical and catalytic properties of  $\alpha$ -amylase from *Tenebrio molitor* L. Larvae. *Journal of Biochemistry*, 153, 621-625.
- Chen, M.S., Feng, G., Zen KC, Richardson M, Valdes-Rodrigues S, Reeck GR & Kramer KJ. (1992). Alpha amylase from three species of stored grain Coleopteran and their inhibition by wheat & corn proteinaceous inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 261-268.
- Chougule, N.P., Doyle, E., Fiches, E. & Gatehouse, J. A. (2008). Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (Lep; Noctuidae) and effect of soybean inhibitor (SKTI) in feeding assay. *Journal of Insect Physiology*, 54, 563-572.
- Christopher, M. S. M. & Mathavan, S. (1985). Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale*. *Journal of Insect Physiology*, 31, 217-221.
- Cinco-Moroyoqui, F.J., Díaz-Malvárez, F.I., Alanís-Villa, A., Barrón-Hoyos, J.M., Cárdenas-López, J.L., Cortez-Rocha, M.O. & Wong-Corral, F.J. (2008). Isolation and partial characterization of three isoamylases of *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150,153-160.
- 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.
- Dojnov, B., Loncar, N., Bozic, N., Nenadovic, V., Ivanovic, J. & Vujcic, Z. (2010). Comparison of  $\alpha$ -amylase isoforms from the midgut of *Cerambyx cerdo* L. (Coleoptera:Cerambycidae) larvae developed in the wild and on an artificial diet. *Archives of Biological Science Belgrade*, 62 (3), 575-583.
- Dow, J. A. T. (1986). *Insect midgut function, Advances in Insect Physiology*, 19, 187-329.
- Farshbaf Pour Abad, R., Rashidi, L., Valizadeh, M., Yazdanian, M. & Mohammadi, D. (2010). Evaluating some properties of Indian moth *Plodia interpunctella* Hübner (Lep., Pyralidae) alpha-amylase. *Journal of Plant protection (Agricultural Science and Technology)*, 24(3), 354-362 (In Farsi).
- Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.S., Kramer, K.J., Morgan, T.D. & Reeck, G.R. (1996)  $\alpha$ -Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human  $\alpha$ -amylases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26, 419- 426.
- Franco, O. L., Rigen, D. J., Melo, F. R. & Grossi-de-Sá MF. (2002). Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases structure, Function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*, 269(2), 397-412.
- Gatehouse, A. M. R., Jepson, K. A. I. & Pavery, D. J. (1989). The effects of alpha amylase inhibitors on insect storage pests: inhibition of alpha-amylase *in vitro* and effects on development *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(8), 272-374.
- George, D., Ferry, N., Beak, E. & Gatehouse, A. (2008). Characterization of midgut digestive proteases from the maize stem borer *Busseola fusca*. *Pest Management Science*, 64, 1151-1158.
- Gutierrez, C., Sanchez-Mong, R., Gomes, L., Ruiz-Tapiador, M., Castanera, M. & Salcedo, G. (1990). Alpha-amylase activities of agriculture insect pest are specifically affected by different inhibitor preparation from wheat and barely endosperms. *Plant Science*, 72, 37-44.

24. Hori, K. (1972). Comparative study of property of salivary amylase among various Heteropterous insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 42, 501-508.
25. Hosseiniaveh, V., Bandani, A., Azmayeshfard, P., Hosseinkhani, S. & Kazzazi, M. (2007). Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*, 43, 515-522.
26. Hosseiniaveh, V. & Ghadamyari, M. (2013). *Principle and concepts of experimental methods in insect biochemistry, physiology and toxicology*. University of Tehran Press. 577 pp.
27. Ishimoto, M., Yamada, T. & Kaga, A. (1999). Insecticidal activity of an alpha-amylase-like protein resembling a putative precursor of alpha-amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris* L.. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1432(1), 104-112.
28. Kanekatysa, U. (1978). Studies on further properties for an alkaline amylase in the digestive juice of the silk worm. *Biocontrol Science and Technology*, 76, 5-21.
29. Kashiwaba, K., Tomooka, N., Kaga, A., Hanand, O.K. & Vaughn, D.A. (2002). Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean (*Vigna umbellata*). *Journal of Economic Entomology*, 96(1), 207-213.
30. Kazzazi, M., Bandani, A. R. & Hoseinkhani, S. (2005). Biochemical characterization of  $\alpha$ -amylase of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *Entomological Science*, 8, 371- 377.
31. Kitamura, K., Isimoto, M. & Ishii, S. (1990). Bruchid resistance factors in *Phaseolus* and *Vigna* legumes, In K. Fujii et al. (Eds.), *Bruchids and Legumes: Economics* (pp. 229-239.).
32. Markwick, N.P., Laing, W.A., Christeller, J.T., Reid, S. J. & Newton, M.R. (1996).  $\alpha$ -Amylase activities in larval midgut extracts from four species of Lepidoptera (Tortricidae and Gelechiidae): Response to pH and to inhibitors from wheat, barley, kidney bean, and *Streptomyces*. *Journal of Economic Entomology*, 89, 39-45.
33. Mendiola- Olaya, E., Valencia- Jimenez, A., Valdes- Rodriguez, S., Delano- Frier, J. & Blanco- labra, A. (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn, *Comparative Biochemistry and physiology*, 126, 425-433.
34. Naseri, B., Fathipour, Y., Moharrampour, S. & Hosseiniaveh, V. (2010). Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* (Hubner) in response to feeding on different soybean cultivars. *The Iranian Plant Protection Congress*, 19, 443
35. Priya, S., Kaur, N. & Gupta, A.K. (2010). Purification, characterization and inhibition studies of  $\alpha$ -amylase of *Rhizopertha dominica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 231-237
36. Podoler, H. & Applebaum, S. W. (1971). The  $\alpha$ -amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis* properties. *Biochemical Journal*, 121, 321- 325.
37. Ramzi, S. & Hosseiniaveh, V. (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*, 13, 215-219.
38. Safaei Khorram, M., Farshbaf Pour Adab, R., Yazdaniyan, M. & Jafarnia, S. (2010). Digestive  $\alpha$ -amylase from *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): response to pH, temperature and some mineral compounds. *Advances in Environmental Biology*, 4(1), 101-107.
39. Sharifi, M., Gadamyari, M., Mahadavi, M. & Fetemeh, S. (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 Science Belgrade*, 63 (3), 705-716.
40. Silano, V. (1978). Biochemical and nutritional significance of wheat albumin inhibitors of  $\alpha$ - amylase. *Cereal Chemistry*, 55(5), 722-731.
41. Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-filho, J., Grossi-de-sa, M.F., Lopes, A.R. & Pontes, E.G. (1999). Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligo-saccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 355-366.
42. Sivakumar, S., Mohan, M., Franco, O.L. & Thayumanavan, B. (2006). Inhibition of insect pest  $\alpha$ -amylases by little and winger millet inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 155-160.
43. Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F. X. & Glockshuber, R. (1998). Crystal structure of yellow meal worm  $\alpha$ -amylase at 1.64Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 278, 617-628.
44. Valencia, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E. & Chrispeels, M. J. (2000).  $\alpha$ -amylase of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 207-213.
45. Vatanparast, M. & Hosseiniaveh, V. (2010). Digestive amylase and pectinase activity in the larvae of alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 40, 328-335.

46. Wisseeing, A., Engkagula, A., Wongpiyasatida, A. & Chuwongkomon, K. (2008). Purification and characterization of *Callosobruchus maculatus*  $\alpha$ -amylase. *Kasetsart Journal: Natural Science*, 42, 240-244.
47. Yazdanian, M., Farshbaf Pour Abad, R., Rashidi, L., Valizadeh, M., Rashtizadeh, N., Vatankhah, M. & Hamidi, A.A. (2010). Effects of some alpha-amylase inhibitors on the salivary alpha-amylase activity of the striped bug, *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Scutelleridae). *Journal of Plant protection (Agricultural Science and Technology)*, 24(2), 173-186. (In Farsi).