نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹۲ – ۳۳(۳): ۵۷-۶۸

تأثیر طعمه‌های مختلف بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی سن *Andrallus spinidens* (Hem.: Pentatomidae)

سحر سرخابی عبدالملکی[۱]، آرش زیبایی[۱و*]، رضا حسینی[۱] و حسن هدی[۲]

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌ی علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی ۱۳۱۴-۴۱۶۳۵، ۲- آزمایشگاه کنترل بیولوژیک آمل، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، آمل.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arash.zibaee@guilan.ac.ir

Effects of different prey regimes on activities of digestive enzymes in *Andrallus spinidens* (Hem.: Pentatomidae)

S. Sorkhabi-Abdolmaleki[1], A. Zibaee[1&*], R. Hosseini[1] and H. Hoda[2]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, P.O. Box 41635-1314, Rasht, Iran, 2. Amol Biological Control Laboratory, Iranian Research Institute of Plant Protection, Amol, Iran.

*Corresponding author, E-mail: arash.zibaee@guilan.ac.ir

چکیده

واکنش آنزیم‌های گوارشی پوره‌های سن *Andrallus spinidens* Fabricius تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف شامل لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج، *Chilo suppressalis* Walker، شب‌پره‌ی موم‌خوار، *Galleria melonella* (L.)، شب‌پره‌ی هندی، *Plodia interpunctella* (Hübner)، و بید آرد، *Ephestia kuehniella* Zeller، برای یافتن مناسب‌ترین طعمه جهت پرورش انبوه این سن بررسی شد. پوره‌ها از سن دوم تا ۲٤ ساعت پس از ظهور پوره‌های سن پنجم روی طعمه‌های مختلف تغذیه شدند. بیش‌ترین وزن پوره‌ها در پوره‌های تغذیه‌شده با کرم ساقه‌خوار نواری برنج و شب‌پره‌ی موم‌خوار به‌دست آمد. همچنین، مشخص شد که بیش‌ترین مقدار پروتئین کل در پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار وجود دارد. فعالیت کربوهیدرازهایی مثل آلفا-آمیلاز، آلفا- و بتا- گلوکوزیداز در پوره‌های تغذیه‌شده با کرم ساقه‌خوار نواری برنج و بید آرد بیش‌تر از بقیه بود. بیش‌ترین فعالیت تری‌آسیل‌گلیسرول‌لیپاز در پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار مشاهده شد که در ژل الکتروفورز نیز نواحی بسیار مشخصی در مقایسه با سایر پوره‌ها را نشان می‌داد. فعالیت پروتئازی کل در دو اسیدیته‌ی مختلف نشان‌دهنده‌ی بیش‌ترین فعالیت در پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار برای اسیدیته‌ی ۸ و بید آرد برای اسیدیته‌ی ٦ بود. بیش‌ترین فعالیت سرین پروتئینازها، سیستئین پروتئینازها و دو اگزوپپتیداز در پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار و بید آرد مشاهده شد. ارتباط بین فعالیت آنزیم‌های گوارشی سن *A. spinidens* و ترکیب غذایی طعمه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده‌ی طبیعت سازگار پروفایل آنزیمی باشد. این نتایج می‌تواند در یافتن طعمه‌های مناسب جهت کنترل موفق آفات و تولید انبوه عوامل کنترل بیولوژیک مناسب باشد.

واژگان کلیدی: *Andrallus spinidens*، آنزیم‌های گوارشی، طعمه‌های مختلف

Abstract

The responses of digestive enzymes of the midgut of *Andrallus spinidens* Fabricius nymphs, toward feeding on *Chilo suppressalis* Walker, *Galleria melonella* (L.), *Plodia interpunctella* (Hübner) and *Ephestia kuehniella* Zeller were analyzed to find the most satisfactory species for a mass rearing program. The nymphs were fed from 2nd instar until 24 hours after the emergence of the 5th instar. The highest weight gain was recorded in the nymphs that fed on *C. suppressalis* and *G. melonella*, and the highest amount of total protein found in the nymphs feeding on *G. mellonella*. Carbohydrase activities including α-amylase, α- and β-glucosidase were the highest in the nymphs that were fed on *C. suppressalis* and *E. kuhniella*. The highest TAG-lipase activity occurred in the nymphs feeding on *G. mellonella* and the related gel electrophoresis showed distinctive zones in comparison with the rest. General proteolytic was performed at two pH values and the highest activity recorded in *G. melonella* (pH 8) and *E. kuehniella* (pH 6). The highest activities of serine proteinases, cysteine proteinases and two exopeptidases were found in the nymphs fed on *G. mellonella* and *E. kuehniella*. Correlation between digestive enzyme activities in *A. spinidens* and nutritional composition of their feeds may reflect the adaptive nature of the enzymatic profile. These findings can efficiently help to find the most suitable species for an efficient control program and successful mass rearing of the biocontrol agent.

Key words: *Andrallus spinidens*, digestive enzymes, different preys

مقدمه

سن *Andrallus spinidens* Fabricius شکارگری است که به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک در آسیا مورد توجه قرار گرفته است (Zibaee *et al*., 2012a). پوره‌ها و افراد بالغ این شکارگر از لاروهای پروانه‌ها، مثل *Naranga aenescens* Moore، *Chilo suppressalis* Walker

دریافت: ۱۳۹۲/۶/۵، پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۸.

و *Helicoverpa armigera* Hübner، در مالزی، هند و شمال ایران تغذیه می‌کنند (Najafi-Navaee *et al*., 1998). در بررسی‌های اولیه مشخص شد که سن *A. spinidens* در مزارع برنج شمال ایران پنج نسل در سال داشته و نقش مهمی در تنظیم جمعیت آفت برنج دارد. این سن آنزیم‌های بزاقی خود را به بدن طعمه تزریق کرده و پس از مایع کردن بافت‌ها، مواد هضم‌شده را به دستگاه گوارش خود پمپ می‌کند. همچنین، مشخص شد که این سن آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، لیپاز و طیف گسترده‌ای از پروتئازها را برای هضم نهایی مواد مغذی مورد استفاده قرار می‌دهد (Zibaee *et al*., 2012a, 2012b; Sorkhabi-Abdolmaleki *et al*., 2013).

کمیت و کیفیت پزوتئین‌های موجود در طعمه‌ها، نوع و فعالیت آنزیم‌های گوارشی شکارگرها را تغییر می‌دهد (Broadway & Duffey, 1988; Felton, 1996; Pascual-Ruiz *et al*., 2009). به‌طور مثال، تحقیقات Pascual-Ruiz *et al*. (2009) نشان داد که طعمه‌های مختلف، فعالیت پروتئازها را در سن شکارگر *Podisus maculiventris* Say تحت تأثیر قرار می‌دهد ولی روی پروتئازهای بزاق بی‌تأثیر است. بااین‌وجود، Habibi *et al*. (2001) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های بزاقی این سن نیز تحت تأثیر تغذیه از طعمه‌های مختلف تغییر می‌کند.

در بررسی‌های اکولوژیک، واکنش‌های تابعی و عددی برای مشخص کردن کارایی شکارگرها روی طعمه‌ای خاص به‌کار می‌روند. اما در بررسی‌های فیزیولوژیک، واکنش آنزیم‌های گوارشی از نظر فعالیت بیوشیمیایی یا حتی بیان ژن‌های مرتبط می‌تواند نشان‌دهنده‌ی مناسب بودن طعمه یا کارایی شکارگر باشد. در تنظیم تغذیه‌ای حشرات، فرآیندهای پیچیده و برهم‌کنش‌کننده‌ای تقش دارند که با دردسترس قرار دادن و پراکنده کردن مواد مغذی مختلف منجر به بقا و تولید مثل حشرات می‌شوند (Simpson & Raubenheimer, 1999).

پرورش انبوه سن *A. spinidens* به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک، مستلزم طعمه‌ی زنده است. پرورش یک شکارگر کارآمد نیز به کیفیت غذایی طعمه بستگی دارد. این عامل می‌تواند بر رشد پوره‌ها در پاسخ به تغذیه از منابع غذایی مختلف تأثیرگذار باشد (Legaspi *et al*., 2004). هدف از مطالعه‌ی حاضر، تعیین تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی پوره‌های سن *A. spinidens* تغذیه‌شده با لاروهای سن چهارم کرم ساقه‌خوار نواری برنج، *C. suppressalis*، شب‌پره‌ی هندی، *Plodia interpunctella* (Hübner)، بید آرد، *Ephestia kuehniella* Zeller، و شب‌پره‌ی موم‌خوار، *Galleria melonella* (L.)، است. این پژوهش با استفاده از بررسی کمی آنزیم‌ها از طریق سوبستراها و بررسی کیفی با استفاده از ژل الکتروفورز انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش سن *A. spinidens*، تست تغذیه‌ای و تهیه‌ی نمونه‌ی آنزیمی

حشرات بالغ سن شکارگر *A. spinidens* در اواخر شهریور و اوایل مهر از مزارع برداشت‌شده‌ی برنج در آمل جمع‌آوری شدند و روی لاروهای سنین آخر شب‌پره‌ی موم‌خوار، به‌عنوان طعمه، در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰٪ پرورش یافتند. پس از تخم‌گذاری حشرات بالغ و تفریخ تخم‌ها، پوره‌های سن یک به ظروف جداگانه‌ای منتقل شدند. برای تست طعمه‌های مختلف از روش Pascual-Ruiz *et al*. (2009) با اندکی تغییر استفاده شد. پوره‌ها پس از رسیدن به سن دوم، هرکدام به‌تنهایی در ظروف پلاستیکی دارای تهویه به قطر ۲/۵ سانتی‌متر قرار داده شدند و برای تأمین رطوبت، پنبه‌ی خیس‌شده با آب

داخل ظروف گذاشته شد. ظروف مزبور در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند. روزانه دو تا سه لارو *C. suppressalis*، *P. interpunctella*، *E. kuehniella* و *G. melonella* برای پوره‌های سن شکارگر فراهم شد تا به سن پنجم رسیدند. برای هر رژیم مختلف طعمه، ۱۰ پوره در نظر گرفته شد. در پایان، وزن پوره‌های سن پنجم اندازه‌گیری شده و به هریک از این پوره‌ها ۲٤ ساعت فرصت تغذیه داده شد. در پایان تست، پوره‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند و پس از تشریح در زیر استریو میکروسکوپ، معده‌ی آن‌ها طبق روش Cohen (1993) خارج و نمونه‌ی آنزیمی تهیه شد.

لاروهای *G. melonella* از مؤسسه‌ی تحقیقات برنج کشور در آمل تهیه شدند و در ظروف پلاستیکی دارای تهویه در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰٪ روی غذای مصنوعی که شامل موم، عسل، گلیسیرین، مخمر و سبوس بود، پرورش داده شدند (de Oliveira *et al*., 2011). لاروهای *E. kuehniella* و *P. interpunctella* از دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تهران در کرج تهیه شدند و در ظروف و شرایط آزمایشگاهی فوق روی غذای مصنوعی که برای *E. kuehniella* شامل آرد، سبوس، مخمر و گلیسیرین و برای *P. interpunctella* شامل ترکیبات بالا و گندم بود، پرورش داده شدند (de Oliveira *et al*., 2011). لاروهای *C. suppressalis* از مزارع برنج آمل جمع‌آوری و در ظروف مذکور روی ساقه‌های برنج در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰٪ پرورش داده شدند.

تشریح و جداسازی اندام‌های گوارشی حشره و تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی

حشرات بالغ به‌طور تصادفی انتخاب شدند و معده‌ی آن‌ها در زیر استریو میکروسکوپ و در محلول نمکی (NaCl، ۱۰ mM) طبق روش Cohen (1993) جدا شد. در مورد پوره‌های سنین اول و دوم، کل بدن مورد استفاده قرار گرفت. بدن حشره‌ی بالغ به‌وسیله‌ی اسکالپر برش داده شده و پس از حذف اجسام چربی، لوله‌ی گوارش مشاهده شد. معده‌ی حشرات تشریح‌شده به نسبت مساوی (وزن به حجم) در آب مقطر هموژنایز شد. نمونه‌های هموژنایزشده در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رونشین جهت بررسی‌های آنزیمی در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد.

تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز عصاره‌ی لوله‌ی گوارش در پوره‌های سن پنجم تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف

فعالیت آلفا-آمیلاز با استفاده از روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (Bernfeld, 1955) و محلول نشاسته‌ی ۱٪ به‌عنوان سوبسترا، اندازه‌گیری شد. بیست میکرولیتر از هر نمونه‌ی آنزیمی به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۰۲ مولار و اسیدیته‌ی ۷/۱) و ٤۰ میکرولیتر نشاسته انکوبه شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DNS و حرارت دادن مخلوط واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش متوقف شده و جذب در طول موج ٥٤٥ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آلفا-آمیلاز به‌عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای تولید یک میلی‌گرم مالتوز در ۳۰ دقیقه و دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس تعریف می‌شود. آزمایش در سه تکرار انجام شد.

تعیین فعالیت TAG-Lipase در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش پوره‌های سن پنجم تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف

اندازه‌گیری فعالیت لیپاز با استفاده از روش Tsujita *et al*. (1989) انجام شد. بیست میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی معده و ٤۰ میکرولیتر

p-nitrophenyl butyrate (۲۷ میلی‌مولار) به‌عنوان سوبسترا، با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۰۲ مولار و اسیدیته‌ی ۷/۱) ترکیب و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شدند. پس از این مدت، محلول سدیم هیدروکسید یک مولار به هر میکروتیوب اضافه شده و جذب در ٤۰۵ نانومتر خوانده شد. اگر پی‌نیتروفنیل بوتیرات به‌عنوان سوبسترا استفاده شود، یک واحد آنزیم در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و اسیدیته‌ی ۷/۲، در هر دقیقه یک نانومول پی‌نیتروفنول آزاد می‌کند. آزمایش در سه تکرار انجام شد.

تعیین فعالیت پروتئازی کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش پوره‌های سن پنجم تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف

سنجش پروتئاز کل با استفاده از سوبسترای آزوکازئین طبق روش Elpidina *et al*. (2001) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl (۰/۰۲ مولار و اسیدیته‌های ٦ و ۸)، ۵۰ میکرولیتر آزوکازئین ۲٪ و ۲۰ میکرولیتر نمونه می‌باشد که به‌مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شدند. پس از این مدت، فعالیت پروتئازی با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر TCA ۳۰٪ متوقف شده و مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس و در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، حجم مساوی سدیم هیدروکسید ۲ مولار به محلول رونشین اضافه شده و جذب در طول موج ٤۵۰ نانومتر ثبت شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد.

تعیین فعالیت پروتئازی اختصاصی در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش پوره‌های سن پنجم تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف

– **سرین پروتئینازها**. فعالیت تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز (به‌عنوان سه زیرگروه از سرین پروتئینازها) با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار از BApNA[1] به‌عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین، SAAPPpNA[2] به‌عنوان سوبسترای اختصاصی کیموتریپسین و SAAApNA[3] به‌عنوان سوبسترای اختصاصی الاستاز، اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۳۵ میکرولیتر از بافر Tris-HCl (طبق آزمایش‌های قبل، اسیدیته‌ی بهینه‌ی ۹ برای تریپسین، ۱۰ برای کیموتریپسین و ۱۱ برای الاستاز)، ۵ میکرولیتر از سوبستراهای اختصاصی مذکور و ۵ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. مخلوط واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. پس از این مدت، برای پایان یافتن واکنش، TCA ۳۰٪ اضافه و پارانیتروانیلین آزاد شده در طول موج ٤۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

– **سیستئین پروتئینازها**. فعالیت کاتپسین‌های B، L و D (به‌عنوان سه زیرگروه از سیستئین پروتئینازها) با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار سوبستراهای اختصاصی Z-Ala-Arg-Arg 4-metjoxy-β-naphtylamide acetate، N-benzoyl-Phe-Val-Arg-p-nitroanilide hydrochloride و کاتپسین D اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۳۵ میکرولیتر بافر Tris-HCl (طبق آزمایش‌های قبل، اسیدیته‌ی بهینه‌ی ٤ برای کاتپسین B و ٦ برای کاتپسین‌های D و L)، ۵ میکرولیتر از هرکدام از سوبستراهای اختصاصی فوق‌الاشاره و ۵ میکرولیتر از محلول آنزیمی بود. مخلوط واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. برای توقف واکنش، تری‌کلرواستیک اسید ۳۰٪ اضافه و جذب در ٤۰۵ نانومتر خوانده شد.

۱– Nabenzoyl-L-arginine-p-nitroanilide.

۲– N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide.

۳– N-succinyl-alanine-alanine-alanine-p-nitroanilide.

- **اگزوپپتیدازها**. فعالیت دو اگزوپپتیداز در معده‌ی سن *A. spinidens* با استفاده از Hippuryl-L-Arginine و Hippuryl-L-Phenilalanine، به‌ترتیب به‌عنوان سوبستراهای اختصاصی کربوکسی‌پپتیداز و آمینوپپتیداز، اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور، ۵ میکرولیتر از سوبستراهای مذکور و ۵ میکرولیتر محلول آنزیمی به ۳۵ میکرولیتر بافر Tris-HCl (طبق آزمایش‌های قبل، اسیدیته‌ی بهینه‌ی ۱۰ برای آمینوپپتیداز و ۸ برای کربوکسی‌پپتیداز) اضافه شد. مخلوط واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. با اضافه کردن TCA ۳۰٪ واکنش متوقف و جذب در ۳٤۰ نانومتر خوانده شد. تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

بررسی زایموگرام لیپاز و پروتئاز

بررسی زایموگرام پروتئاز و لیپاز با استفاده از ژل‌های متراکم‌کننده و جداکننده‌ی ٤٪ و ۱۰٪ طبق روش Garcia-Carreno *et al*. (1993) و Laemmli (1970) انجام شد. الکتروفورز در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس و در ولتاژ ثابت ۷۵ میلی‌ولت انجام شد و پس از اینکه رنگ به انتهای ژل رسید، ژل به‌آرامی جدا شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر ترایتون ۱٪ قرار داده شد. ژل پس از شستشو با آب مقطر، حدود ۳/۵–۳ ساعت وارد محلول کازئین ۱٪ (سوبسترا) شد. سپس، با کوماسی بلو ۰/۱٪ در متانول، استیک اسید و آب مقطر، به‌ترتیب با نسبت‌های ۵۰، ۱۰ و ٤۰، در تمام طول شب رنگ‌آمیزی و بعد از آن ۲ ساعت در بافر رنگ‌بری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۰ میلی‌لیتر استیک‌اسید و ۳۰ میلی‌لیتر الکل اتانول گذاشته شد. در مورد لیپاز، از سوبسترای 4-methylumbellipheryl-butyrate به غلظت ۵ میلی‌مولار استفاده شد. برای مشاهده و عکس‌برداری از باندها در ترانس ایلومیناتور، ژل به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول حاوی سوبسترای فلورسنت قرار داده شد.

تعیین پروتئین کل در عصاره‌ی آنزیمی لوله‌ی گوارش پوره‌های سن پنجم تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف

غلظت پروتئین طبق روش Lowry *et al*. (1951) تعیین شد. ده میکرولیتر از پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاو) در سه تکرار با ۵۰ میکرولیتر رنگ معرف ترکیب شد و در سه تکرار دیگر، ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی آنزیمی با ۵۰ میکرولیتر رنگ معرف مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. سپس، جذب در ٥٤۰ نانومتر خوانده شد.

نتایج و بحث

در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که تغذیه از طعمه‌های مختلف فعالیت آنزیم‌های گوارشی سن *A. spinidens* را تحت تأثیر قرار می‌دهد. چنین بررسی‌های بیش‌تر در مورد حشرات گیاه‌خوار انجام شده ولی در نیم‌بالان به‌دلیل وجود گوارش خارج دهانی اطلاعات کمی در دسترس است. باتوجه به نتایج حاصل در این پژوهش و بررسی‌های قبلی صورت گرفته توسط Sorkhabi-Abdolmaleki *et al*. (2013) و Sorkhabi-Abdolmaleki & Zibaee (2014)، تغذیه‌ی *A. spinidens* در زمان‌های مختلف و رژیم‌های غذایی متنوع، پیچیدگی و طبیعت انعطاف‌پذیر آنزیم‌های گوارشی را جهت هضم غذا طی رشد پوره‌ها و بلوغ افراد بالغ نشان می‌دهد. تغذیه از طعمه‌های مختلف روی فیزیولوژی گوارشی و عملکرد حشرات شکارگر مؤثر است. برخی از طعمه‌ها مناسب‌تر بوده و سبب افزایش وزن بیش‌تری در شکارگر می‌شوند و میزان پروتئین کل را در بدن شکارگر به‌مقدار بیش‌تری افزایش می‌دهند. ارزش و کیفیت غذایی طعمه‌ها در عملکرد شکارگرها نقش مهمی دارند (De Clercq *et al*., 1998). برای تعیین کیفیت غذا، Legaspi *et al*. (2004) و Shapiro & Legaspi (2006) از

خواص بیوشیمیایی همچون پروفایل لیپیدی و پروتئینی پوره‌ها و افراد بالغ سن شکارگر *P. maculiventris* استفاده کردند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که در حشرات گیاه‌خوار کمیت و کیفیت آنزیم‌های گوارشی با تغییر در نوع پروتئین رژیم غذایی تغییر می‌کند (Broadway & Duffey, 1988). سایر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ترکیب بزاق سن‌های گیاه‌خوار نیز ممکن است در پاسخ به ترکیب غذایی گیاه میزبان تغییر کند (Habibi *et al*., 2001).

نتایج تعیین پروتئین کل عصاره‌ی لوله‌ی گوارش و وزن پوره‌های سن پنجم تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است. میزان پروتئین کل در پوره‌هایی که از شب‌پره‌ی موم‌خوار به‌عنوان طعمه تغذیه کردند، بیش‌تر از سایر پوره‌ها بود و پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی هندی، کم‌ترین میزان پروتئین را دارا بودند. وزن پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار و کرم ساقه‌خوار نواری برنج بیش‌تر از بقیه‌ی پوره‌ها بود ($Pr > F: ۲۲/۳۱$، $P \leq ۰/۰۰۰۱$) و پوره‌هایی که از شب‌پره‌ی هندی تغذیه کرده بودند، وزن کمی داشتند. در تحقیقات Pascual-Ruiz *et al*. (2009) هیچ تفاوتی در رشد و وزن پوره‌های سن *P. maculiventris* تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف مشاهده نشد. تنوع غذایی نقش مهمی در فیزیولوژی و زیست شناسی حشرات دارد. این پدیده در بسیاری از حشرات ثابت شده و به کارایی غذایی حشرات روی میزبان‌های آن‌ها بستگی دارد. تعادل ضروری مواد غذایی اصلی، مثل اسیدهای آمینه یا پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها به سازگاری غذای خورده‌شده توسط شکارگر مربوط می شود (Chapman, 1998).

جهت تعیین تأثیر تغذیه بر فعالیت کربوهیدرازهای سن *A. spinidens*، فعالیت سه آنزیم آلفا–آمیلاز، آلفا–گلوکوزیداز و بتا–گلوکوزیداز بررسی شد. بیش‌ترین فعالیت آلفا–آمیلاز ($Pr > F: ۷۶/۳۱$، $P \leq ۰/۰۰۰۱$)، آلفا–و بتا–گلوکوزیداز (به‌ترتیب $Pr > F: ٤/٥٤$، $P \leq ۰/۰۰۰۱$؛ $Pr > F: ٤/۰۳$، $P \leq ۰/۰۰۰۱$) در پوره‌های تغذیه‌شده با لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج بود (شکل ۱–A, B). آلفا–آمیلازها آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ای هستند که پیوندهای α-D-(1,4)-glucan را در گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌های مرتبط کاتالیز می‌کنند (Strobl *et al*., 1998; Franco *et al*., 2000). گلیکوژن کربوهیدرات ذخیره‌ای در حشرات است که نقش مهمی در متابولیسم حدواسط دارد. ازآنجایی‌که گلیکوژن طی مرحله‌ی شفیرگی از بدن لاروها به بدن افراد بالغ منتقل می‌شود، می‌تواند در بلوغ و تولید مثل افراد بالغ مؤثر باشد (Klowden, 2007). به عقیده‌ی Fialho *et al*. (2012)، گلیکوژن جانور شکارشده ابتدا توسط آلفا–آمیلاز و سپس گلیکوزیدازهای شکارگر هضم می‌شود که این پدیده در چندین گونه از نیم‌بالان مشاهده شده است (Ferreira *et al*., 1988; Silva & Terra, 1994; Terra & Ferreira, 2012). تغییر در فعالیت کربوهیدرازهای بررسی‌شده در سن *A. spinidens* می‌تواند نشان‌دهنده‌ی میزان گلیکوژن بدن طعمه و کارایی تغذیه‌ای شکار برای فرآیندهای بیولوژیک شکارگر باشد.

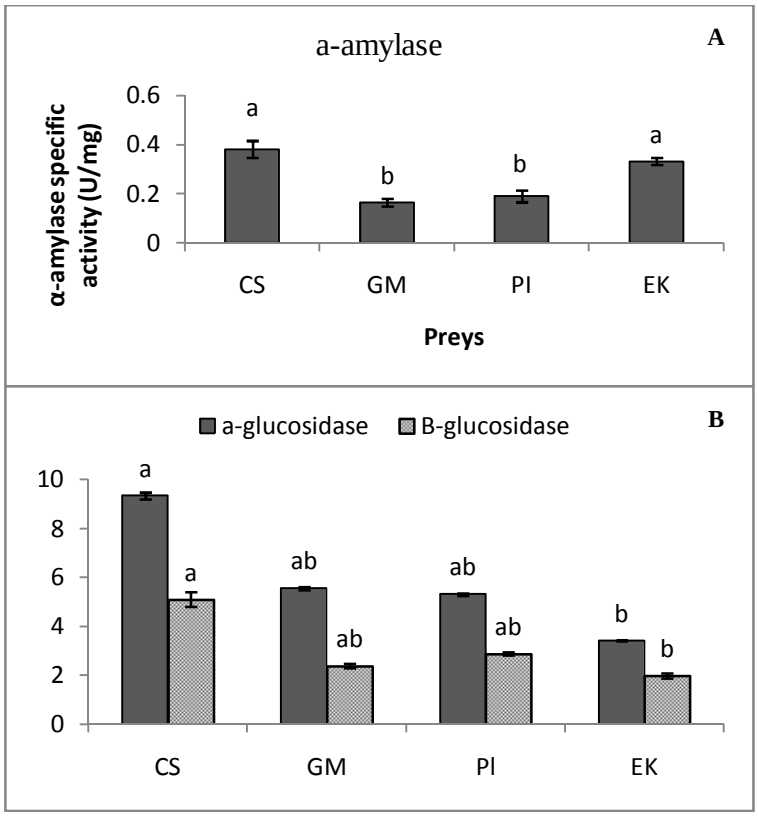
چربی‌ها شامل تری‌آسیل گلیسریدها، اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و استرول‌ها از اجزای اصلی بدن حشرات هستند که در فرآیندهای بیولوژیک متعددی مثل ساخت دیواره‌های سلولی، ایمنی، سوخت و ساز واسطه و غیره اهمیت دارند (Klowden, 2007). تری‌اسیل گلیسرول لیپاز (EC 3.1.1.3) آنزیمی است که هیدرولیز پیوندهای استری بیرونی خارجی تری‌آسیل گلیسرول‌ها (چربی ذخیره‌ای حشرات) را تسریع می‌کند (Terra & Ferreira, 2012). در مطالعه‌ی حاضر، بیش‌ترین فعالیت لیپاز در پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی

جدول ۱- میزان پروتئین کل لوله‌ی گوارش و وزن پوره‌های سن پنجم *Andrallus spinidens* تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف.

Table 1. Weight gain and amount of total protein in the midgut of *Andrallus spinidens* nymphs fed on different prey regims.

	Chilo suppressalis	***Galleria melonella***	***Plodia interpunctella***	***Ephestia kuehniella***
Weight gain (mg)	106.1 ± 5.36 a	107.65 ± 7.69 a	76.36 ± 3.15 b	86.86 ± 15.3 b
Total protein (mg)	1.69 ± 0.16 ab	1.85 ± 0.26 a	1.22 ± 0.17 b	1.37 ± 0.22 b

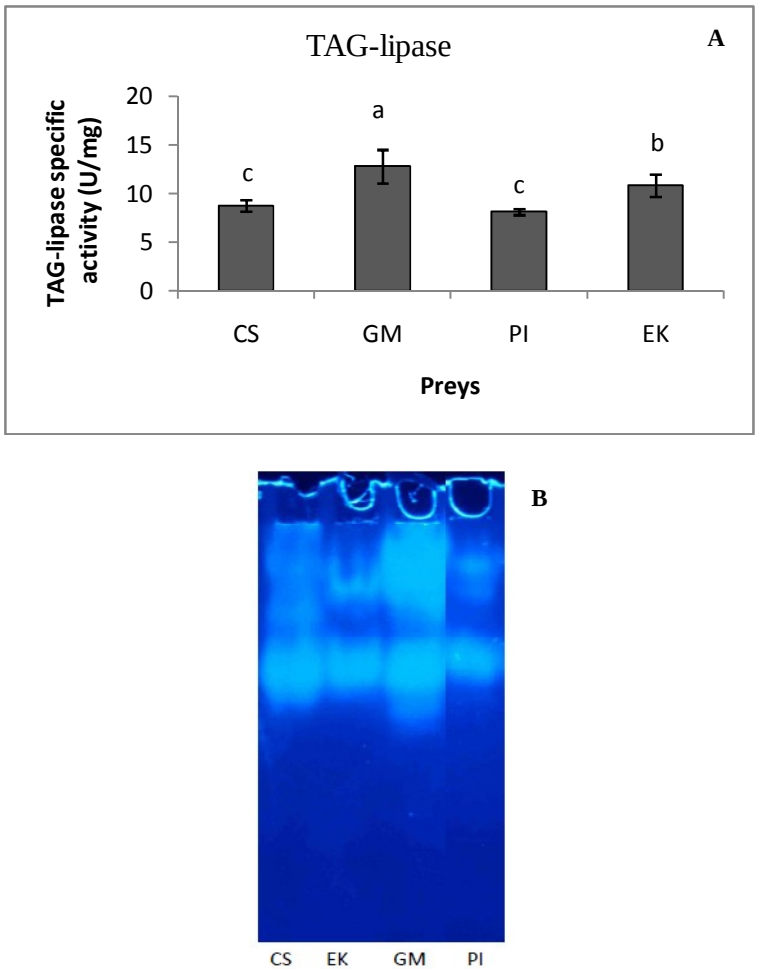
Different letters in each row show statistical differences by Tukey's test ($p < 0.05$).



شکل ۱- فعالیت آلفا-آمیلاز (A)، آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز (B) در پوره‌های سن *Andrallus spinidens* تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف (CS = *Chilo suppressalis*، GM = *Galleria melonella*، PI = *Plodia interpunctella*، EK = *Ephestia kuehniella*). حروف مختلف نشان‌دهنده‌ی تفاوت‌های آماری می‌باشند (آزمون توکی، P <۰/۰۵).

Fig. 1. The α-amylase (A), α- and β-Glucosidase (B) activities in the nymphs of *Andrallus spinidens* fed on different prey regims (CS = *Chilo suppressalis*, GM = *Galleria melonella*, PI = *Plodia interpunctella*, EK = *Ephestia kuehniella*). Different letters show statistical differences by Tukey's test ($p < 0.05$).

مومخوار مشاهده شد (P ≤ ۰/۰۰۰۲ ،Pr > F: ۲۵/۷۶) (شکل A-۲). تجزیه و تحلیل زایموگرام با استفاده از سوبسترای فلورسنت نشان داد که بیش از پنج باند لیپازی در پوره‌های تغذیه‌شده با این لارو در مقایسه با چهار باند در کرم ساقه‌خوار نواری برنج، سه باند در بید آرد و دو باند در شب‌پره‌ی هندی وجود دارد (شکل



شکل ۲- فعالیت تری‌اسیل گلیسرول لیپاز در پوره‌های سن *Andrallus spinidens* تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف (A) و زایموگرام مربوطه (B). حروف مختلف نشان‌دهنده‌ی تفاوت‌های آماری می‌باشند (آزمون توکی، ۰/۰۵> P). برای سرنام‌ها به شکل ۱ رجوع شود.

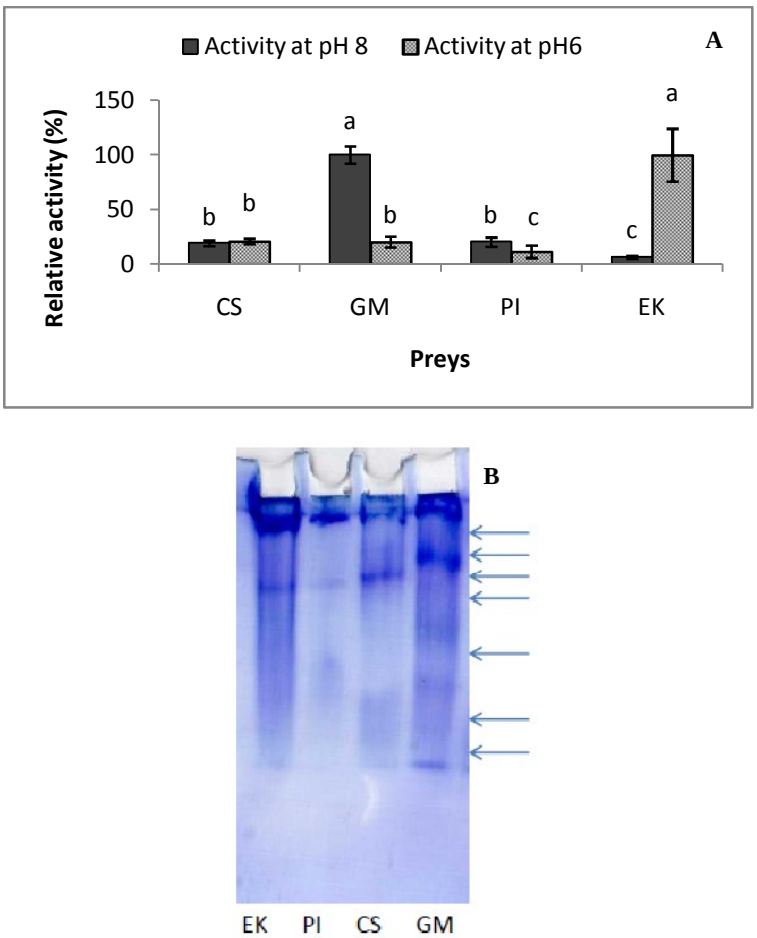
Fig. 2. TAG-lipase activity in the nymphs of *Andrallus spinidens* fed on various preys (A) and the related zymogram (B). Different letters show statistical differences by Tukey's test ($p < 0.05$). See fig. 1 for acronyms.

B-۲). تفاوت در فعالیت لیپاز در سن *A. spinidens* را می‌توان به تفاوت مقدار چربی‌های ذخیره‌شدن در بدن طعمه و حضور احتمالی برخی از انواع ترکیبات دفاعی و یا مهاری نسبت داد.

اگرچه نیم‌بالان از هضم خارج دهانی برای مایع کردن بافت‌های طعمه استفاده می‌کنند اما هضم واقعی پروتئین‌ها درون روده‌ی میانی و تحت فعالیت پروتئازها رخ می‌دهد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پروتئولیز در روده‌ی نیم‌بالان به‌طورعمده توسط سیستئین‌پروتئازها، آمینوپپتیدازها و کربوکسی‌پپتیدازها انجام می‌شود، اگرچه در بعضی سن‌های شکارگر نیز بسته به نوع طعمه، سرین‌پروتئازها می‌توانند مؤثر باشند (Stamopoulos *et al*., 1993; Bell *et al*., 2005; Alvarez-Alfageme *et al*., 2007; Pascual-Ruiz *et al*., 2009). در بررسی‌های Sorkhabi-Abdolmaleki *et al*. (2013)، حضور پروتئازهای تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز،

کاتپسین‌های B، L، D و آمینوپپتیداز L و کربوکسی‌پپتیداز A در معده‌ی سن *A. spinidens* مشخص شده است.

ازآنجایی‌که سرین‌پروتئازها و سیستئین‌پروتئازها در اسیدیته‌ی قلیایی و اسیدی فعال هستند، و نیز براساس نتایج تحقیقات Sorkhabi-Abdolmaleki *et al*. (2013)، فعالیت پروتئولیتیک به‌طورکلی در دو اسیدیته ۶ و ۸ بررسی شد. نتایج نشان داد که در اسیدیته‌ی ۸، بیش‌ترین فعالیت پروتئولیتیک مربوط به پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار، و در اسیدیته‌ی ۶، مربوط به پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی هندی است ($F: 21/02 > Pr \leq 0/0001$) (شکل A–۳). در زایموگرام پروتئازی، کم‌ترین و بیش‌ترین تعداد باند به‌ترتیب در پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی هندی و پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار مشاهده شد (شکل B–۳). نتایج تحقیقات Pascual-Ruiz *et al*. (2009)



شکل ۳– فعالیت پروتئاز کل در پوره‌های سن *Andrallus spinidens* تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف (A) و زایموگرام مربوطه (B). حروف مختلف نشان‌دهنده‌ی تفاوت‌های آماری می‌باشند (آزمون توکی، $P <$ ۰/۰۵). برای سرنام‌ها به شکل ۱ رجوع شود.

Fig. 3. General proteolytic activity in the nymphs of *Andrallus spinidens* fed on various preys (A) and the related zymogram (B). Different letters show statistical differences by Tukey's test ($p < 0.05$). See fig. 1 for acronyms.

جدول ۲- فعالیت پروتئازی اختصاصی در پوره‌های *Andrallus spinidens s* تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف.

Table 2. Specific proteolytic activity in the nymphs of *Andrallus spinidens* fed on different prey regims.

Specific protease	*Chilo suppressalis*	*Galleria melonella*	*Plodia interpunctella*	*Ephestia kuehniella*
Trypsin-like	3.82 ± 0.08 b	4.70 ± 0.08 a	3.36 ± 0.004 b	2.80 ± 0.122 c
Chymotrypsin-like	2.62 ± 0.009 b	4.05 ± 0.02 a	1.56 ± 0.09 d	1.85 ± 0.004 c
Elastase	4.09 ± 0.024 a	3.95 ± 0.028 a	2.19 ± 0.046 c	2.06 ± 0.025 c
Cathepsin B	4.16 ± 0.02 c	4.72 ± 0.009 b	2.03 ± 0.009 d	6.02 ± 0.016 a
Cathepsin L	4.82 ± 0.032 c	5.93 ± 0.008 a	3.20 ± 0.024 d	5.92 ± 0.04 a
Cathepsin D	1.75 ± 0.008 c	1.95 ± 0.083 b	1.46 ± 0.028 c	3.50 ± 0.004 a
Aminopeptidase L	5.19 ± 0.032 b	5.95 ± 0.02 a	3.40 ± 0.008 c	2.78 ± 0.036 c
Carboxypeptidase A	3.28 ± 0.012 c	6.93 ± 0.024 a	3.68 ± 0.032 b	3.55 ± 0.016 b

Different letters in each row show statistical differences by Tukey's test ($p < 0.05$).

نشان داد که فعالیت نسبی پروتئازها در روده‌ی سن *P. maculiventris* به طعمه‌ی تغذیه‌شده بستگی دارد. همچنین، این محققین پیشنهاد کردند که سن مذکور ممکن است از آنزیم‌های پروتئولیتیک طعمه برای هضم بافت‌های آن‌ها استفاده کرده باشد. به‌طور مثال، مشاهده شد که فعالیت تریپسین و کیموتریپسین سن *P. maculiventris* تغذیه‌شده با لارو بال‌پولک‌داران بیش‌تر از سن‌های تغذیه‌شده با لارو سخت‌بال‌پوشان و شفیره‌ی دوبالان است (Pascual-Ruiz *et al*., 2009). ازآنجایی‌که شب‌پره‌ی موم‌خوار بزرگ‌ترین بدن را در مقایسه با دیگر طعمه‌ها دارد و بیش‌ترین فضای داخلی بدن را دستگاه گوارش اشغال می‌کند، بنابراین بیش‌ترین فعالیت پروتئولیتیک در اسیدیته‌ی ۸ پوره‌های تغذیه‌شده با این طعمه قابل توجیه است. نتایج استفاده از سوبستراهای اختصاصی نیز این مورد را تأیید می‌کند (جدول ۲). بیش‌ترین فعالیت پروتئازی سرین‌پروتئازها و هر دو اگزوپپتیداز در پوره‌های تغذیه‌شده با شب‌پره‌ی موم‌خوار مشاهده شد، درحالی‌که سیستئین‌پروتئازها بیش‌ترین فعالیت را در پوره‌های تغذیه‌شده با بید آرد نشان دادند (جدول ۲). به‌طورکلی، فعالیت متفاوت پروتئازی در سن *A. spinidens* تغذیه‌شده با لارو بال‌پولک‌داران مختلف می‌تواند باتوجه به مقدار مختلف پروتئین در بدن طعمه متفاوت باشد.

ارتباط بین فعالیت آنزیم‌های گوارشی در سن *A. spinidens* و ترکیب مواد مغذی طعمه ممکن است نشان‌دهنده‌ی ماهیت سازگارشونده‌ی آنزیم‌ها نسبت به ترکیب رژیم غذایی باشد. تعیین تغییرات آنزیم‌های گوارشی در شکارگرهای تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف ممکن است برای یافتن مناسب‌ترین طعمه استفاده شود و منجر به کنترل موثر آفت و یا پرورش انبوه عوامل کنترل بیولوژیک گردد. می‌توان با انجام بررسی‌های جامع‌تر روی بیان ژن آنزیم‌های گوارشی سن *A. spinidens* تغذیه‌شده با طعمه‌های مختلف، درک کاملی از فیزیولوژی گوارش این حشره به‌دست آورد.

منابع

Alvarez-Alfageme, F., Martinez, M., Pascual-Ruiz, S., Castanera, P., Diaz, I. & Ortego, F. (2007) Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgenic Research* 16, 1-13.

Bell, H. A., Down, R. E., Edwards, J. P., Gatehouse, J. A. & Gatehouse, A. M. R. (2005) Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae); effect of proteinase inhibitors. *European Journal Entomology* 102, 139-145.

Bernfeld, P. (1955) Amylases, α and β. *Methods in Enzymology* 1, 149-158.

Broadway, R. M. & Duffey, S. S. (1988) The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 34, 1111-1117.

Chapman, R. F. (1998) *The insects*: *structure and function*. 4th ed. 775 pp. Cambridge University press.

Cohen, A. C. (1993) Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renadii*. *Journal of Insect Physiology* 39, 823-829.

De Clercq, P., Merlevede, F. & Tirry, L. (1998) Unnatural prey and artificial diets for rearing *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control* 12, 137-142.

de Oliveira, C. F. R., Luz, L. A., Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B., Marangoni, S. & Macedo, M. L. R. (2011) Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry* 46, 498-504.

Elpidina, E. N., Vinokurov, K. S., Gromenko, V. A., Rudenskaya, Y. A., Dunaevsky, Y. E. & Zhuzhikov, D. P. (2001) Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology* 48, 206-216.

Felton, G. W. (1996) Nutritive quality of plant protein: sources of variation and insect herbivore responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32, 107-130.

Ferreira, C., Ribeiro, A. F., Garcia, E. S. & Terra, W. R. (1988) Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochemistry* 18, 521-530.

Fialho, M. C. Q., Moreira, N. R., Zanuncio, J. C., Ribeiro, A. F., Terra, W. R. & Serrão, J. E. (2012) Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Insect Physiology* 58, 850-856.

Franco, O. L., Riggen, D. J., Melo, F. R., Bloch, C., Silva, C. & Grossi-de-Sa, M. F. (2000) Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal Biochemistry* 267, 2166-2173.

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

Habibi, J., Backus, E. A., Coudron, T. A. & Brandt, S. L. (2001) Effect of different host substrates on hemipteran salivary protein profiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98, 369-375.

Klowden, M. J. (2007) *Physiological systems in insects*. 2nd ed. 688 pp. New York, NY: Elsevier.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Legaspi, J. C., Shapiro, J. P. & Legaspi, B. C. (2004) Biochemical comparison of field and laboratory populations of *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) in Florida. *Southwest Entomologist* 29, 301-303.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-75.

Najafi-Navaee, A., Saeb, H. & Osco, T. (1998) Biology and ecology of *Andrallus spinidens* F. as the predator of rice, cotton and maize pests. *Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress*, *Vol. I*, *Pests*, p. 49.

Pascual-Ruiz, S., Carrilo, L., Alvarez-Alfageme, F., Ruiz, M., Castanera, P. & Ortego, F. (2009) The effects of different prey regimes on the proteolytic digestion of nymphs of the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research* 99, 487-491.

Shapiro, J. P. & Legaspi, J. C. (2006) Assessing biochemical fitness of predator *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) in relation to food quality: effects of five species of prey. *Annals of the Entomological Society of America* 99, 321-326.

Silva, C. P. & Terra, W. R. (1994) Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24, 493-505.

Simpson, S. J. & Raubenheimer, D. (1999) Assuaging nutritional complexity: a geometrical approach. *Proceedings of Nutrition Society* 58, 779-789.

Sorkhabi-Abdolmaleki, S. & Zibaee, A. (2014) Secretagogue mechanism of digestive enzyme secretion in the midgut of *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). *Proceedings of National Academy of Science India, Section B*: *Biological Sciences* 84(2), 373-379.

Sorkhabi-Abdolmaleki, S., Zibaee, A., Hoda, H., Hosseini, R. & Fazeli-Dinan, M. (2013) Proteolytic compartmentalization and activity in the midgut of *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Entomological and Acarological Research* 45, 33-41.

Stamopoulos, D. C., Diamantidis, G. & Chloridis, A. (1993) Activite´s enzymatiques du tube digestif du pre´dateur *Podisus maculiventris* (Hem.: Pentatomidae). *Entomophaga* 38, 493-499.

Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F. & Glockshuber, R. (1998) A novel strategy for inhibition of α-amylases: yellow meal worm α-amylase in complex with *Ragi* bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure* 6, 911-921.

Terra, W. R. & Ferreira, C. (2012) Biochemistry and molecular biology of digestion. pp. 365-418 in Gilbert, L. I. (Ed.) *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. 563 pp. Academic Press, London.

Tsujita, T., Ninomiya, H. & Okuda, H. (1989) *p*-Nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Journal of Lipid Research* 30, 997-1004.

Zibaee, A., Hoda, H., & Fazeli-Dinan, M. (2012a) Role of proteases in extra-oral digestion of a predaceous bug, *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Insect Science* 12, article 51.

Zibaee, A., Hoda, H. & Fazeli-Dinan, M. (2012b) Purification and biochemical properties of a salivary α-amylase in *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). *Invertebrate Survival Journal* 9, 48-57.