تحقیقات آفات گیاهی
۱۰ (۲): ۷۵-۹۱ -۱۳۹۹

بررسی بیوشیمیایی انواع پروتئازهای گوارشی اختصاصی در کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Col.: Coccinellidae) و تاثیر طعمه-های مختلف بر فعالیت آنها

آرش زیبایی*
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۹)

چکیده

انواع و ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئازهای گوارشی در لاروها و افراد بالغ کفشدوزک شکارگر *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant با استفاده از سوبستراها و بازدارنده‌های اختصاصی تعیین و تغییر فعالیت آنها پس از تغذیه روی طعمه-های مختلف ارزیابی شد. کفشدوزک‌ها در شرایط آزمایشگاه پرورش یافته و با شپشک آرد آلود تغذیه شدند. تشریح بدن در محیط کلرید سدیم انجام شد و لوله گوارش نمونه‌ها همگن و سانتریفیوژ شد. سپس فعالیت انواع پروتئازهای گوارشی تحت تاثیر سوبستراها و بازدارنده‌های اختصاصی و با تغذیه از سه میزبان تعیین شد. نتایج نشان داد که فقط سیستئین پروتئازها و اگزوپپتیدازها در معده افراد بالغ فعال بودند، اما در لاروها، سرین و سیستئین پروتئازها نیز در هضم نقش داشتند. بیشترین فعالیت سرین پروتئازهای تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز لاروها به ترتیب در اسیدیته‌های ۸، ۸-۹ و ۹ به دست آمد. اسیدیته بهینه فعالیت کاتپسین‌های B و L به ترتیب در مقادیر ۶ و ۵ در لاروها و افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* تعیین شد. بیشترین فعالیت آمینو- و کربوکسی پپتیداز گوارشی لاروها در اسیدیته ۷ اندازه‌گیری شد، اما این دو آنزیم در افراد بالغ به ترتیب در اسیدیته‌های ۷ و ۶ بیشترین فعالیت را نشان دادند. بازدارنده‌های اختصاصی سیستاتین، E-64، TLCK، SBTI، TPCK و AEBSF.HCL سبب کاهش معنی‌دار فعالیت پروتئازهای اختصاصی لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri* شدند. تفاوت معنی‌داری در فعالیت سرین پروتئازها، اگزوپپتیدازها و کاتپسین L لاروهای تغذیه شده از شپشک آردآلود مرکبات *Planococcus citri*، شپشک آردآلود چای *Pseudococcus viburni* و شته چای *Toxoptera aurantii* مشاهده نشد، اما سیستئین پروتئازها و آمینوپپتیداز افراد بالغ تغذیه شده از شته چای کمترین فعالیت را از خود نشان دادند. تفاوت پروفایل پروتئازی در لاروها و افراد بالغ این کفشدوزک موید تفاوت فیزیولوژیک این دو مرحله زیستی و اهمیت سرین پروتئازها در فرآیندهای حفظ و نگهداری شرایط رشدی دستگاه گوارش است. علاوه براین، فعالیت بیشتر سیستئین پروتئازها در افراد بالغ به ماهیت طعمه مصرف شده و وجود ترکیبات مختلف پروتئینی و حتی گلیکوپروتئینی در طعمه‌ها باز می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پروتئاز، *Cryptolaemus montrouzieri*، فعالیت آنزیمی

* نویسنده مسئول: arash.zibaee@guilan.ac.ir

مقدمه

پروتئازها در زمره مهم‌ترین آنزیم‌های موثر در فیزیولوژی موجودات زنده به ویژه حشرات بوده و در القای بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک بدن حشرات همچون ایمنی، پاسخ سلولی به یک محرک، هضم موادغذایی و حتی تجزیه ترکیبات ناگوارد اهمیت دارند (Nation, 2008). این آنزیم‌ها پیوندهای پپتیدی را در مولکول‌های پروتئینی هیدرولیز کرده و بر اساس اینکه از انتهای زنجیره آمینواسیدی پیوندها را تجزیه کنند یا به طور مستقیم روی پیوندهای داخلی پپتیدی موثر باشند، به دو گروه اگزوپپتیدازها و اندوپپتیدازها تقسیم می‌شوند (Kanost and Clem, 2011). علاوه بر این، این آنزیم‌ها بر اساس گروه‌های شیمیایی موجود در ساختار و عملکردشان در محیط‌های بیوشیمیایی در مواجهه با سوبستراها و بازدارنده-های مختلف نیز تقسیم‌بندی می‌شوند. گروه‌های اصلی اندوپپتیدازها عبارتند از سرین پروتئازها، سیستئین پروتئازها، آسپارتیک پروتئازها و متالوپروتئازها، درحالی‌که اگزوپپتیدازها به دو گروه آمینو- و کربوکسی پپتیدازها تقسیم می‌شوند (Noren *et al*., 1986; Rawlings *et al*., 2010; Kanost and Clem, 2011; Terra and Ferreira, 2012). آمینوپپتیدازها اسیدهای آمینه را از انتهای پپتیدها جدا کرده و همچنین، در جداکردن اسیدهای آمینه آلانین، لئوسین و آسپارتیل از انتهای پپتید نقش دارند. کربوکسی پپتیدازها از انتهای کربوکسیل پپتید اسیدهای آمینه را جدا کرده و بر اساس سازوکار کاتالیتیک تقسیم-بندی می‌شوند (Terra and Ferreira, 2012).

پروتئازهای گوارشی در اغلب حشرات آفت از بالپولکداران، سخت‌بالپوشان، دوبالان و نیم‌بالان بررسی شده‌اند، اما بررسی‌های مشابه روی حشرات شکارگر محدود است. مشخص شده است که اسیدیته بهینه فعالیت پروتئاز گوارشی *Rodalia cardinalis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) و *Coccinella septempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) بین ۵-۶ گزارش شده است (Sakurai, 1968). گزارش شده که سیستئین پروتئازها، آنزیم‌های غالب در معده کفشدوزک *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) لاروها و افراد بالغ بوده و اسیدیته بهینه ۵/۵ تا ۶ را نشان می‌دهند (Walker *et al*., 1998). بررسی پروتئازهای گوارشی افراد بالغ کفشدوزک *Harmonia axyridis* pallas (Coccinellidae: Coleoptera) نشان داد که سیستئین پروتئازها آنزیم‌های غالب معده بوده و سرین، آسپارتیک و متالوپروتئیازها فعالیت جزئی دارند. پروتئازهای گوارشی در اسیدیته ۶ و دمای ۴۵ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت را داشتند (Koo and Park, 2002).

اگرچه اهمیت بررسی پروتئازهای گوارشی در حشرات آفت به منظور کنترل کارآمد آنها از طریق گسترش بازدارنده‌های پروتئازی در قالب گیاهان مقاوم نهادینه شده است، اما در حشرات شکارگر می‌تواند به طور مستقیم بر افزایش کارایی آنها موثر باشد. در واقع، ترجیح تغذیه از طعمه‌های مختلف و بررسی واکنش‌های تابعی و عددی یک شکارگر کاربردهای فراوانی در ارزیابی کارایی شکارگران آفت دارند، اما تغذیه از طعمه‌های مختلف سبب تغییر در فعالیت آنزیم‌های گوارشی شده و مقادیر مواد مغذی در دسترس برای سایر فعالیت‌های فیزیولوژیک را تغییر می‌دهد؛ به طوری‌که طول عمر، تولید مثل و سایر فراسنجه‌های اکولوژیک شکارگر را تحت تاثیر قرار خواهد داد. از سوی دیگر، شناخت آنزیم‌های گوارشی شکارگران به ویژه پروتئازها و برهمکنش آنها با نوع طعمه خورده شده می‌تواند سبب بهبود عملکرد شکارگر به عنوان یک عامل بیوکنترل از یک سو و پرورش مناسب‌تر شکارگر در واحدهای پرورش انبوه شود. با توجه به مطالعه اندک پروتئازهای کفشدوزک‌های شکارگر از نظر بیوشیمیایی و نحوه برهمکنش آنها با طعمه‌های مختلف، پژوهش حاضر در نظر دارد در ابتدا با استفاده از سوبستراهای اختصاصی، تنوع پروتئازهای گوارشی معده لاروها و افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) را مشخص کرده و پس از آن، ویژگی‌های بیوشیمیایی آنها را از نظر اسیدیته و پاسخ به غلظت‌های مختلف بازدارنده‌های اختصاصی تعیین کند.

به علاوه، روند تغییرات آنها را در لاروها و افراد بالغ تغذیه شده از طعمه‌های مختلف در باغ‌های چای و مرکبات شامل شپشک آردآلود چای *Pseudococcus viburni* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae)، شپشک آرد آلود مرکبات *Planococcus citri* Risso (Hemiptera: Pseudococcidae) و شته چای *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae) بررسی کند.

مواد و روش‌ها

پرورش کفشدوزک *C. montrouzieri*

به منظور تشکیل کلنی، ابتدا پوره‌ها و افراد بالغ شپشک آرد آلود مرکبات از باغ‌های مرکبات آلوده به کدو تنبل (منطقه ساری) جمع‌آوری و به منظور تکثیر، در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲±۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شد. سپس، افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* به آزمایشگاه منتقل شده و به صورت جفت‌های جداگانه درون ظروف پلاستیکی شفاف به ابعاد ۷×۶×۳ سانتی‌متر روی شپشک‌ها تغذیه شده و در شرایط آزمایشگاهی پرورش داده شدند. لاروها نیز در شرایط آزمایشگاهی بیان‌شده روی همان طعمه پرورش یافتند. در تمام مراحل پرورش، ظروف به طور روزانه تمیز یا تعویض شده و طعمه جدید در اختیار مراحل لاروی و بالغ قرار گرفت. پس از سه نسل پرورش، لاروها و افراد بالغ کفشدوزک برای انجام آزمایش‌ها استفاده شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های سنجش آنزیمی در لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri*

لاروهای سن سوم و افراد بالغ تغذیه کرده از شپشک آردآلود مرکبات به‌طور تصادفی انتخاب شدند. سپس، روی یخ بی‌حس شده و کل لوله گوارش آن‌ها در محلول نمکی (NaCl, 10mM) و با استفاده از دستگاه استریو میکروسکوپ از بدن خارج شد. معده از بقیه قسمت‌ها جدا شده و نسبت مساوی (وزن به حجم) با آب مقطر در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری با استفاده از هموژنایزر دستی روی یخ هموژنایز شد. نمونه‌های همگن شده در ۲۰۰۰۰×g و دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رونشین حاصل به منظور سنجش فعالیت آنزیمی در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد. برای تهیه نمونه‌های متصل به غشا اگزوپپتیدازها (Membrane-Bound samples)، به مایع ته‌نشین به دست آمده از سانتریفیوژ اول، ترایتون ایکس- ۱۰۰ به میزان ۱۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌گرم پروتئین (پس از سنجش مقدار پروتئین) اضافه شد، و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ساعت قرار گرفت. سپس، با سانتریفیوژ در ۲۰۰۰۰×g دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس، نمونه متصل به غشاء تهیه شده و به منظور سنجش فعالیت آنزیمی در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد (Ferreira and Terra, 1983).

سنجش آنزیمی

سرین پروتئازها

فعالیت تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز (به‌عنوان سه زیر گروه از سرین پروتئینازها) با استفاده از غلظت یک میلی‌مول از BApNA (Nabenzoyl- L- arginine- p- nitroanilide, Sigma-Aldrich, Austria) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین، SAAPPpNA (N- succinyl- alanine- alanine- proline- phenylalanine- p- nitroanilide, Sigma-Aldrich, Austria) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی کیموتریپسین و SAAApNA (N- succinyl- alanine- alanine- alanine- p- nitroanilide, Sigma-Aldrich, Austria) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی الاستاز اندازه-گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۰ میکرولیتر از بافر یونیورسال (گلیسین، سوکسینات و ۲-مورفولینواتان سولفوریک اسید، ۵۰ میلی‌مول طبق منابع اسیدیته بهینه‌ی ۸ برای سرین پروتئازها)، ۳۵ میکرولیتر از سوبستراهای اختصاصی ذکر شده و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر (Awareness, Statfax, 2100,

(USA) اندازه‌گیری شد. برای اثبات فعالیت پروتئازی ویژه برای هر سوبسترا به طور جداگانه از کنترل منفی، شامل بافر و سوبسترا با آنزیم از پیش جوشانده شده (به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس) و کنترل منفی حاوی نصف مقدار توصیه شده از بازدارنده‌های اختصاصی استفاده شد (Oppert *et al*., 1997) (جدول ۱).

سیستئین پروتئازها

فعالیت کاتپسین‌های B و L (به‌عنوان دو زیر گروه از سیستئین پروتئازها) با استفاده از غلظت یک میلی‌مول سوبستراهای اختصاصی Z- Ala- Arg- Arg 4- methoxy- β- naphtylamide acetate و N- benzoyl- Phe- Val- Arg- p- nitroanilide hydrochloride اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۰ میکرولیتر از بافر یونیورسال (طبق منابع اسیدیته بهینه‌ی ۵ برای سیستئین پروتئازها)، ۳۵ میکرولیتر از سوبستراهای اختصاصی ذکر شده و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اثبات فعالیت پروتئازی ویژه برای هر سوبسترا به طور جداگانه از کنترل منفی، شامل بافر و سوبسترا با آنزیم از پیش جوشانده شده (به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس) و کنترل منفی حاوی نصف مقدار توصیه شده از بازدارنده‌های اختصاصی استفاده شد (Oppert *et al*., 1997) (جدول ۱).

اگزوپپتیدازها

فعالیت دو اگزوپپتیداز در معده لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri* با استفاده از دو ترکیب Hippuryl- L- Arginine و Hippuryl- L- Phenilalanine به‌ترتیب به‌عنوان سوبستراهای اختصاصی کربوکسی و آمینوپپتیداز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۰ میکرولیتر از بافر یونیورسال (طبق منابع اسیدیته بهینه ۷ برای اگزوپپتیدازها)، ۳۵ میکرولیتر از سوبستراهای اختصاصی بیان شده و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اثبات فعالیت پروتئازی ویژه برای هر سوبسترا به طور جداگانه از کنترل منفی، شامل بافر و سوبسترا با آنزیم از پیش جوشانده شده (به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس) استفاده شد (Oppert *et al*., 1997).

تعیین اسیدیته بهینه برای هر یک از پروتئازهای اختصاصی در عصاره‌ی لوله‌ی گوارش

ارزیابی اسیدیته بهینه پروتئازهای اختصاصی در معده لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri* با استفاده از بافر یونیورسال (۵۰ میلی‌مول) انجام شد. دامنه اسیدیته انتخاب شده برای سرین پروتئازها ۱۱-۵، سیستئین پروتئازها ۸-۳ و اگزوپپتیدازها ۱۰-۳ انتخاب شد. مخلوط واکنش شامل ۷۰ میکرولیتر از بافر یونیورسال ۳۵ میکرولیتر از سوبستراهای اختصاصی ذکر شده و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود که به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و جذب در طول موج ۴۰۵ و ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تاثیر بازدارنده‌های اختصاصی روی فعالیت پروتئازی

به منظور بررسی اثر مهارکننده‌های اختصاصی بر فعالیت پروتئازی، از AEBSF.HCl [4-(2-aminoethyl) Phenylmethylsulfonyl fluoride) در غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکرومول برای الاستاز؛ TLCK (Na- p- tosyl- L- lysine chloromethyl ketone) در غلظت‌های ۰٫۲، ۰٫۴، ۰٫۶، ۰٫۸ و ۱ میلی‌مول و بازدارنده SBTI [Soybean Trypsin Inhibitor] در غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکرومول برای تریپسین، TPCK (N- tosyl- L- phenylalanine chloromethyl ketone,) در غلظت‌های ۰٫۲، ۰٫۴، ۰٫۶، ۰٫۸ و ۱ میلی‌مول برای کیموتریپسین، سیستاتین در غلظت‌های ۰٫۲، ۰٫۴، ۰٫۶، ۰٫۸ و ۱ میلی‌مول و بازدارنده E-64 (L- trans- epoxysuccinyl- leucylamido- (4- guanidine)- butane) در غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکرومولار برای کاتپسین‌های B و L استفاده شد. برای همه موارد در نمونه‌های شاهد هم حجم بازدارنده آب مقطر ریخته شد. مخلوط واکنش شامل ۷۰

میکرولیتر از بافر یونیورسال، ۳۵ میکرولیتر از سوبستراهای اختصاصی ذکر شده، ۱۵ میکرولیتر از غلظت‌های مورد نظر هر بازدارنده (آب مقطر در شاهد) و ۲۵ میکرولیتر محلول آنزیمی بود که به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تاثیر طعمه‌های مختلف بر فعالیت پروتئازهای گوارشی لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri*

در این آزمایش، ۶۰ جفت کفشدوزک نر و ماده یک روزه از کلنی پرورش جدا شده و به سه گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند. این سه گروه به ترتیب با شپشک آردآلود چای، شپشک آردآلود مرکبات و شته چای به طور جداگانه تغذیه شدند. پس از تخمگذاری و تفریخ لاروها، لاروهای هر گروه نیز به طور جداگانه با طعمه‌های ذکر شده تغذیه شده و ۶۰ لارو سن سوم از هر گروه برای سنجش فعالیت پروتئازی در نظر گرفته شدند. به بقیه لاروها اجازه داده شد که به شفیره تبدیل شوند و پس از ظهور افراد بالغ، امکان تغذیه روی هر طعمه به طور جداگانه به مدت ۴۸ ساعت فراهم شد. پس از این مدت افراد بالغ نیز برای سنجش فعالیت پروتئازی استفاده شدند. شرایط پرورش در دمای ۱±۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود و نحوه آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی و مقادیر سنجش پروتئازی نیز همانند قبل بود. در طول آزمایش سعی شده که وزن مساوی از طعمه در اختیار لاروها و افراد بالغ قرار گیرد تا گرسنگی بر فعالیت آنزیمی تاثیرگذار نباشد.

تعیین مقدار پروتئین در نمونه‌های آنزیمی

غلظت پروتئین بر اساس روش لوری و همکاران (Lowry *et al*., 1951) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی به‌عنوان پروتئین استاندارد اندازه‌گیری شد. ده میکرولیتر از پروتئین استاندارد در سه تکرار با ۵۰ میکرولیتر معرف رنگی ترکیب شد و در سه تکرار دیگر، ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی آنزیمی با ۵۰ میکرولیتر رنگ معرف مخلوط شد. پس از انکوباسیون به‌مدت ۱۵ دقیقه، جذب در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون t-test و توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد مقایسه شدند. داده‌های IC_{50} توسط نرم‌افزار POLO-Plus محاسبه شدند.

نتایج

تعیین انواع پروتئازهای گوارشی در معده لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri*

جدول ۱ نتایج تعیین انواع پروتئازهای گوارشی را در معده لاروها و افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* نشان می‌دهد. در لاروها استفاده از سوبسترای اختصاصی، کنترل منفی و نصف غلظت توصیه شده بازدارنده اختصاصی، حضور تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز را به عنوان سرین پروتئازها و کاتپسین B و L را به عنوان سیستئین پروتئازها نشان می‌دهد. اما در افراد بالغ، فعالیتی از سرین پروتئازها مشاهده نشد و فقط فعالیت سیستئین پروتئازها در معده آنها ثبت شد (جدول ۱). از طرف دیگر، بررسی فعالیت اگزوپپتیدازها نشان داد که هر دو آمینو- و کربوکسی پپتیداز در معده لاروها و افراد بالغ فعالیت داشته، اما فعالیت آنها در نمونه‌های متصل به غشا (Membrane-Bound) بیشتر از محلول (Soluble) بود (جدول ۲؛ $p< 0.003$).

جدول ۱- پروفایل اندوپپتیدازهای اختصاصی در لاروها و افراد بالغ *Cryptolaemus montrouzieri*

Table 1. The profile of specific endopeptidases in the larvae and the adults of *Cryptolaemus montrouzieri*

Endopeptidases[1]	Larvae		Adult	
	NC[2]	NC+Inhibitor[3]	NC	NC + Inhibitor
Trypsin	0.0154±0.003	0.0075±0.003	NA[4]	NA
Chymotrypsin	0.0063±0.001	0.0010±0.0002	NA	NA
Elastase	0.0069±0.003	0.0070±0.0005	NA	NA
Cathepsin B	0.0222±0.001	0.0040±0.0002	0.0317±0.002	0.0117±0.004
Cathepsin L	0.0165±0.001	0.0045±0.0006	0.0267±0.001	0.0121±0.001

1. The enzyme activity has been shown as specific activity of µmol/min/mg protein
2. NC refers to negative control in which a boiled midgut sample was used as blank to verify protease activity.
3. NC + Inhibitor refers to use both boiled sample and specific inhibitors for each proteases. In details, 0.5 mM of TLCK and TPCK; 5 µM AEBSF.HCL and 0.5 mM of Cystatine were used in enzyme assay.
4. NA refers to no activity.

جدول ۲- پروفایل اگزوپپتیدازهای اختصاصی در لاروها و افراد بالغ *Cryptolaemus montrouzieri*

Table 2. The profile of specific exopeptidases in the larvae and the adults of *Cryptolaemus montrouzieri*

Exopeptidases[1,2]	Larvae		Adult	
	Soluble	Membrane-Bound	Soluble	Membrane-Bound
Aminopeptidase	0.002±0.0003	0.0195±0.0007*	0.0033±0.001	0.034±0.004*
Carboxypeptidase	0.008±0.001	0.017±0.002*	0.007±0.004	0.033±0.003*

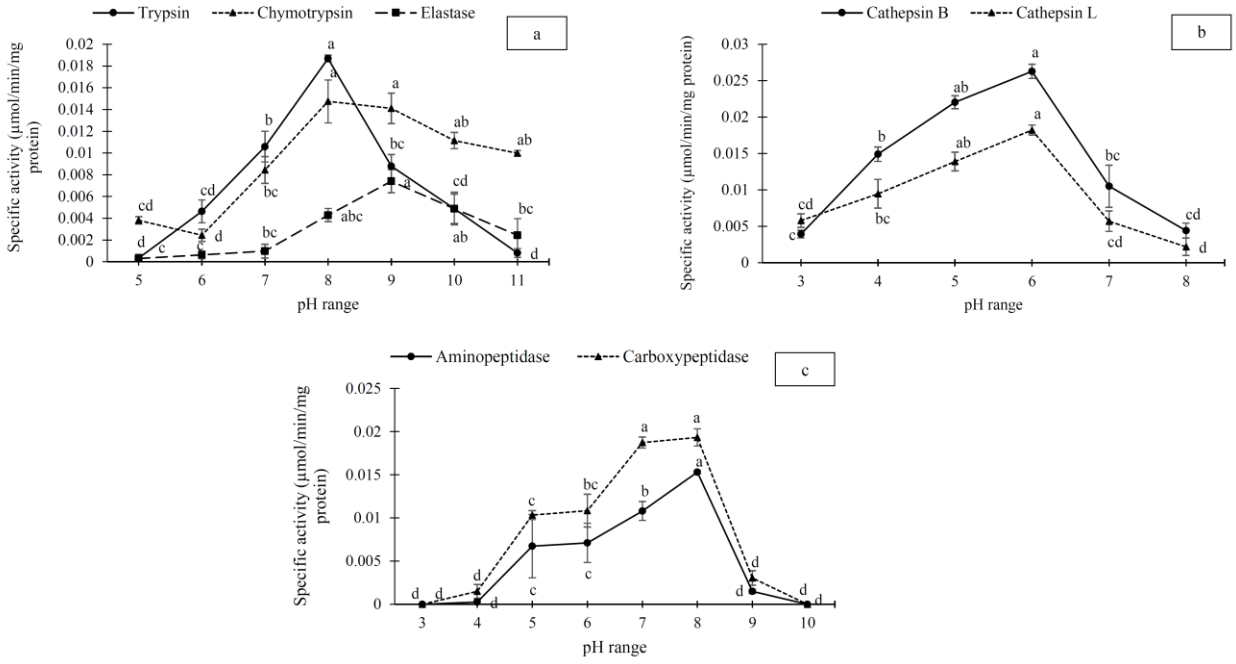
1. The enzyme activity has been shown as specific activity of µmol/min/mg protein.
2. Asterisk refers to statistical differences between soluble and membrane-bound fractions for each enzyme (t-test, $p \leq 0.05$).

تعیین اسیدیته بهینه برای هر یک از پروتئازهای اختصاصی در عصاره لوله گوارش

اسیدیته بهینه فعالیت پروتئازهای مشخص شده در معده لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri* در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. فعالیت تریپسین گوارشی لاروها از اسیدیته ۵ تا ۸ روند صعودی داشته و در مقیاس ۸ به بیشترین مقدار خود رسید، اما پس از آن تا اسیدیته ۱۱ کاهش یافت (شکل ۱؛ F=41.72; P=0.0001; df=6). کیموتریپسین نیز روند مشابهی را داشت، اما بیشترین فعالیت این آنزیم در اسیدیته ۸ و ۹ مشاهده شد (شکل ۱a؛ F=18.65; P=0.0001; df=6). در نهایت، اسیدیته بهینه برای فعالیت الاستاز در معده لاروها در مقدار ۹ به دست آمد (شکل ۱a؛ F=7.78; P=0.0008; df=6). دو کاتپسین B و L بیشترین فعالیت خود را در اسیدیته ۶ نشان دادند (شکل ۱b؛ F=40.41; P=0.0001; df=5؛ F=20.4; P=0.0001; df=5)، اما اسیدیته بهینه فعالیت آمینوپپتیداز در مقدار ۸ و کربوکسی پپتیداز در مقدار ۷ و ۸ به دست آمد (شکل ۱c؛ F=7.43; P=0.0005; df=7؛ F=58.12; P=0.0001; df=7). پروفایل اسیدیته در افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* نشان داد که سیستئین پروتئازها در اسیدیته ۵ بیشترین فعالیت را دارند (شکل ۲a؛ F=36.97; P=0.0001; df=5؛ F=7.51; P=0.0021; df=5) و دو اگزوپپتیداز سنجش شده نیز بیشترین فعالیت خود را در اسیدیته ۷ نشان دادند (شکل ۲b؛ F=45.11; P=0.0001; df=7؛ F=78.94; P=0.0001; df=7).

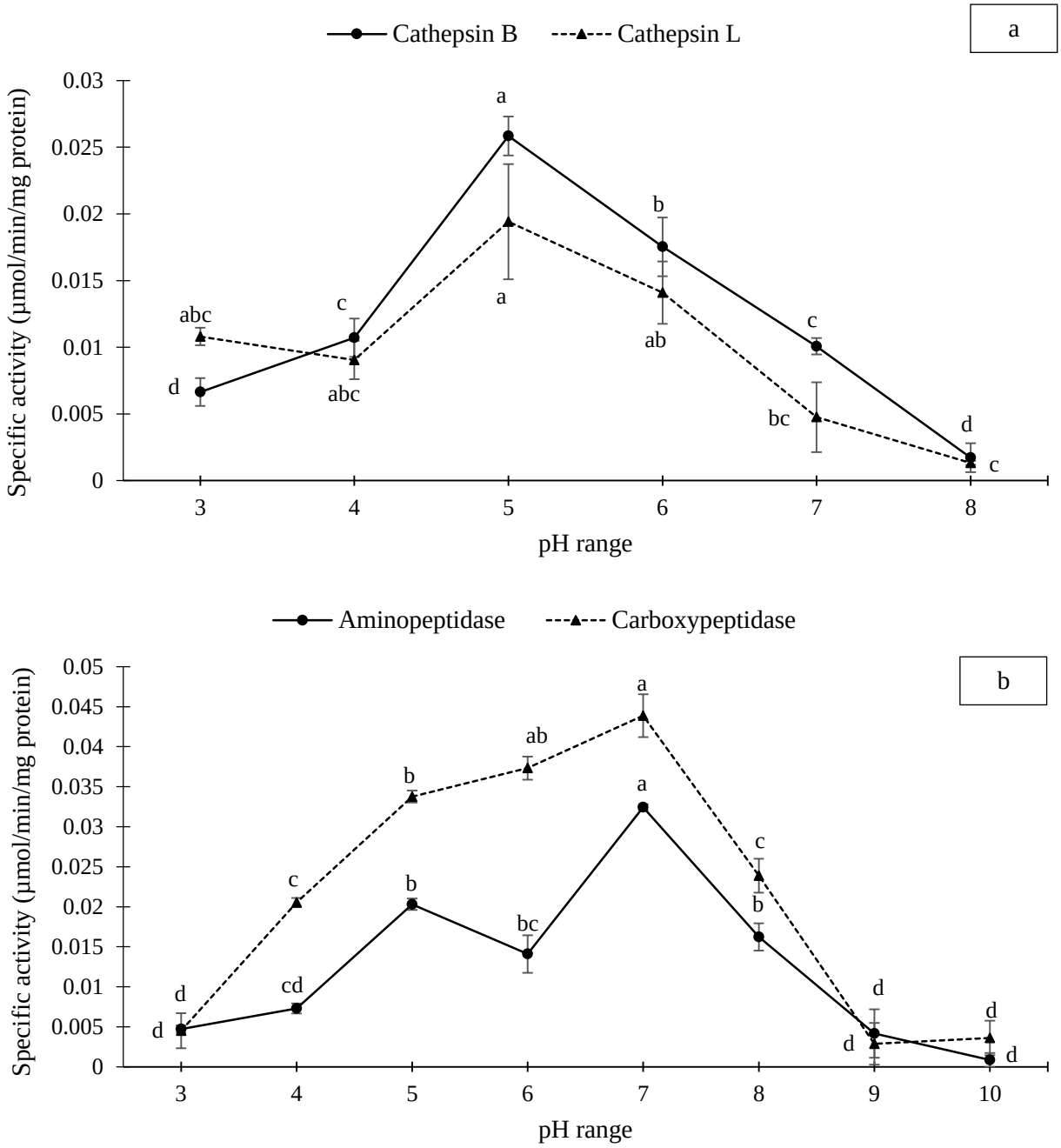
تاثیر بازدارنده‌های اختصاصی روی فعالیت پروتئازی

غلظت‌های مختلف بازدارنده‌های اختصاصی سبب کاهش معنی‌دار فعالیت پروتئازهای اختصاصی در معده لاروها و افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* شدند، به طوری‌که بالاترین غلظت در همه بازدارنده‌ها سبب کمترین فعالیت در آنزیم‌ها شد. بر این اساس، درصد بازدارندگی سیستاتین بر فعالیت کاتپسین‌های B و L در لاروها به ترتیب ۸۵ و ۹۳ درصد، در افراد بالغ به ترتیب ۸۷ و ۸۸ درصد؛ درصد بازدارندگی E-64 بر فعالیت کاتپسین‌های B و L در لاروها به ترتیب ۹۷ و ۷۶ درصد، در افراد بالغ به ترتیب ۹۵ و ۷۱ درصد؛ درصد بازدارندگی TLCK و SBTI بر فعالیت تریپسین لاروها به ترتیب ۸۹ درصد و ۶۳ درصد؛ درصد بازدارندگی TPCK بر فعالیت کیموتریپسین لاروها ۹۳ درصد و AEBSF.HCL بر فعالیت الاستاز لاروها ۹۲ درصد بود (شکل ۳ a-d). مقادیر IC_{50} هر کدام به ترتیب ۰/۴۵۱ و ۰/۵۸۲ میلی‌مول از سیستاتین علیه کاتپسین B و L افراد بالغ، ۴/۸۲۲ و ۷/۴۷۱ میکرومول E-64 علیه کاتپسین‌های B و L افراد بالغ، ۰/۴۸۳ میلی‌مول از TLCK علیه تریپسین لاروها، ۶/۴۱۵ میکرومول از SBTI علیه تریپسین لاروها، ۰/۵۰۵ میلی‌مول از TPCK علیه کیموتریپسین لاروها، ۳/۵۷۴ میکرومول AEBSF.HCL علیه الاستاز لاروها، ۰/۴۱۷ و ۰/۵۳۳ میلی‌مول از سیستاتین علیه کاتپسین‌های B و L لاروها، ۵/۰۸۸ و ۷/۱۶۷ میکرومول E-64 علیه کاتپسین‌های B و L لاروها به دست آمد (جدول ۳).



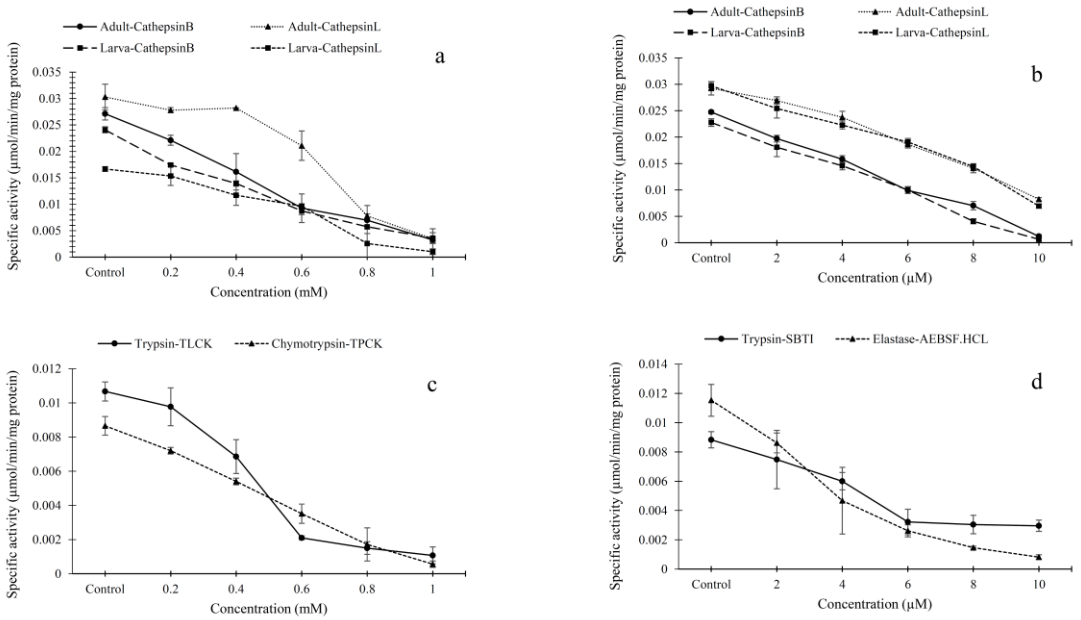
شکل ۱- پروفایل اسیدیته پروتئازهای اختصاصی در لاروهای *Cryptolaemus montrouzieri*. a) سرین پروتئازها، b) سیستئین پروتئازها، c) اگزوپپتیدازها. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف مشخص شده‌اند (آزمون توکی، $p\leq0.05$).

Figure 1. pH profile of specific proteases in the larvae of *Cryptolaemus montrouzieri*. a) serine proteases, b) cysteine proteases, c) exopeptidases. Statistical differences have been marked with different letters (Tukey test, $p\leq0.05$).



شکل ۲- پروفایل اسیدیته پروتئازهای اختصاصی در افراد بالغ *Cryptolaemus montrouzieri*. a) سیستئین پروتئازها، b) اگزوپپتیدازها. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف مشخص شده‌اند (آزمون توکی، $p \leq 0.05$).

Figure 2. pH profile of specific proteases in the adults of *Cryptolaemus montrouzieri*. a) cysteine proteases, b) exopeptidases. Statistical differences have been marked with different letters (Tukey test, $p \leq 0.05$).



شکل ۳- تاثیر بازدارنده‌ها بر فعالیت پروتئازهای اختصاصی در لاروها و افراد بالغ *Cryptolaemus montrouzieri*. a) سیستاتین روی کاتپسین‌ها، b) E-64 روی کاتپسین‌ها، c) TLCK و TPCK روی تریپسین و کیموتریپسین، d) SBTI و AEBSF.HCL روی تریپسین و الاستاز

Figure 3. Effects of the inhibitors on the activity of specific proteases in the larvae and the adults of *C. montrouzieri*. a) Cystatine against cathepsins, b) E-64 against cathepsins, c) TLCK, TPCK against trypsin and chymotrypsin, d) SBTI and AEBSF.HCL against trypsin and elastase

جدول ۳- غلظت‌های IC_{50} بازدارنده‌ها روی پروتئازهای سرین و سیستئین گوارشی *Cryptolaemus montrouzieri*

Table 3. IC_{50} concentrations of the inhibitors on the digestive serine and cysteine proteases of *Cryptolaemus montrouzieri*

Treatments	IC_{50}[1]	Confidence limit (95%)	Slope±SE	X^2	Df
Adult-CathpsinB-Cystatin	0.451	0.404-0.499	0.476±0.169	2.119	3
Adult-CathpsinL-Cystatin	0.582	0.472-0.700	0.672±0.182	7.0339	3
Adult-CathpsinB-E-64	4.822	2.63-7.061	0.510±0.172	15.627	3
Adult-CathpsinL-E-64	7.471	6.452-9.023	0.585±0.152	3.0109	3
Larva-Trypsin-TLCK	0.483	0.370-0.587	0.734±0.231	9.4867	3
Larva-Trypsin-SBTI[2]	6.415	4.585-9.936	0.498±0.150	9.3997	3
Larva-Chymotrypsin-TPCK	0.505	0.402-0.607	0.591±0.186	6.2488	3
Larva-Elastase-AEBSF.HCL	3.574	3.177-3.998	0.495±0.201	0.099	3
Larva-CathepsinB-Cystatin	0.417	0.303-0.524	0.435±0.162	4.3611	3
Larva-CathepsinL-Cystatin	0.533	0.323-0.742	0.663±0.194	18.393	3
Larva-CathepsinB-E-64	5.088	3.330-6.792	0.645±0.189	15.388	3
Larva-CathepsinL-E-64	7.167	5.055-13.554	0.519±0.148	10.766	3

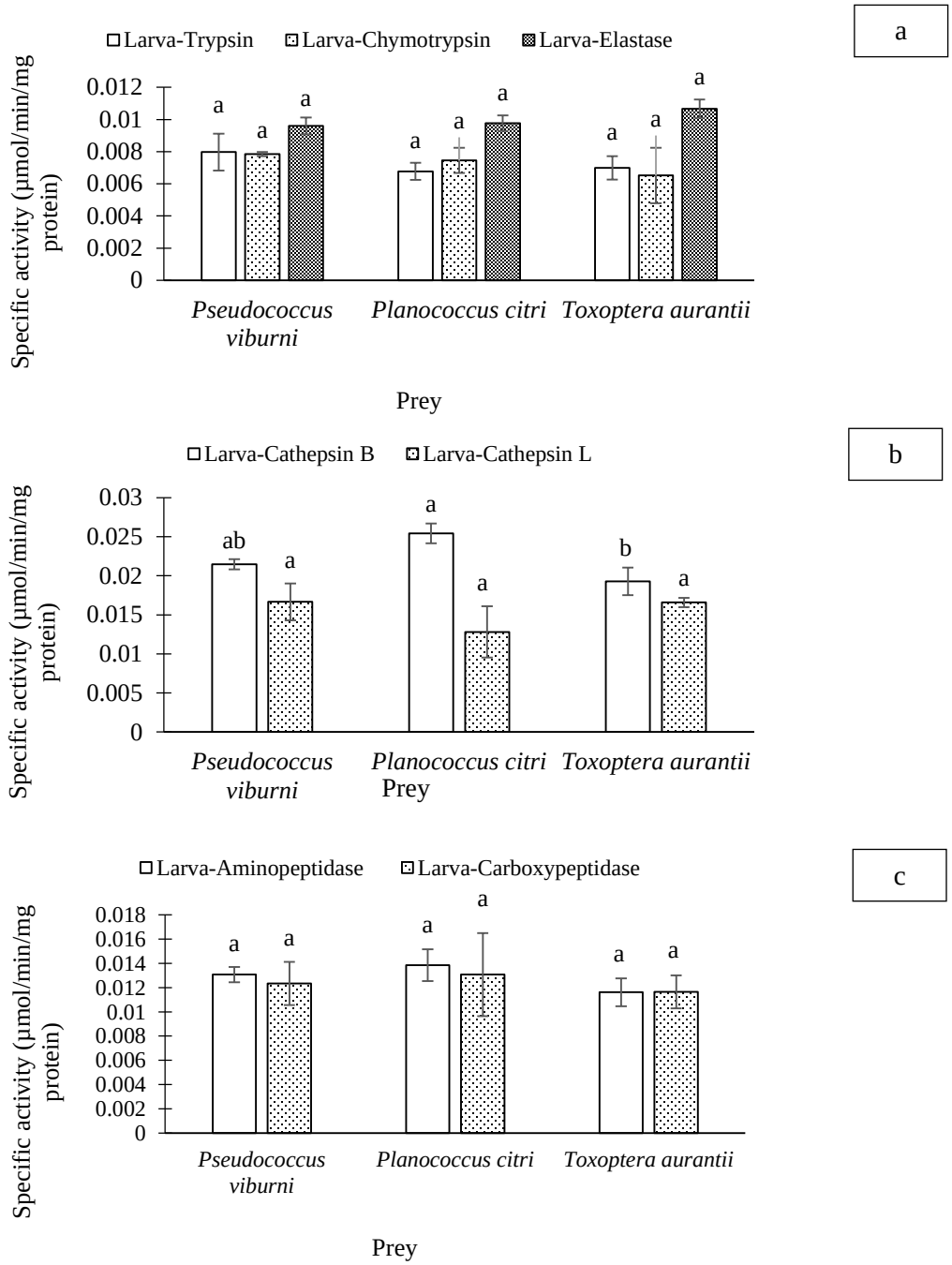
1. IC_{50} concentrations have been calculated as mM except for E-64 and AEBSF.HCL which are in µM.
2. The data were calculated by POLO-Plus software.

تاثیر طعمه‌های مختلف بر فعالیت پروتئازهای گوارشی لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri*

تفاوت معنی‌داری در فعالیت تریپسین (F=0.58; P=0.5878; df=2)، کیموتریپسین (F=0.39; P=0.6939; df=2) و الاستاز (F=1.2; P=0.3645; df=2) از سرین پروتئازها (شکل ۴a)، کاتپسین L (شکل ۴b؛ F=1.46; P=0.349; df=2) و آمینو- (شکل ۴c؛ F=1.21; P=0.3608; df=2) و کربوکسی پپتیداز (شکل ۴c؛ F=0.09; P=0.9127; df=2) لاروهای تغذیه شده از طعمه-های مختلف مشاهده نشد، اما کاتپسین B (شکل ۴b؛ F=10.8; P=0.0103; df=2) بیشترین فعالیت را در تغذیه روی شپشک مرکبات و کمترین فعالیت را روی شته چای نشان داد. در افراد بالغ، بیشترین فعالیت کاتپسین B (شکل ۵a؛ F=10.62; P=0.0107; df=2) پس از تغذیه با شپشک‌های آردآلود و کاتپسین L (شکل ۵a؛ F=6.4; P=0.0325; df=2) از شپشک چای مشاهده شد، اما هر دو آنزیم کمترین فعالیت را در افراد بالغ تغذیه شده از شته چای نشان دادند. بیشترین فعالیت آمینوپپتیداز افراد بالغ پس از تغذیه روی شپشک‌های آردآلود و کمترین فعالیت روی شته چای مشاهده شد (شکل ۵b؛F=37.53; P=0.0004; df=2)، اما کربوکسی پپتیداز بیشترین فعالیت خود را در افراد بالغ تغذیه-شده از شته چای و شپشک مرکبات و کمترین مقدار آن با تغذیه از شپشک چای حاصل شد (شکل ۵b؛ F=28.33; P=0.035; df=2).

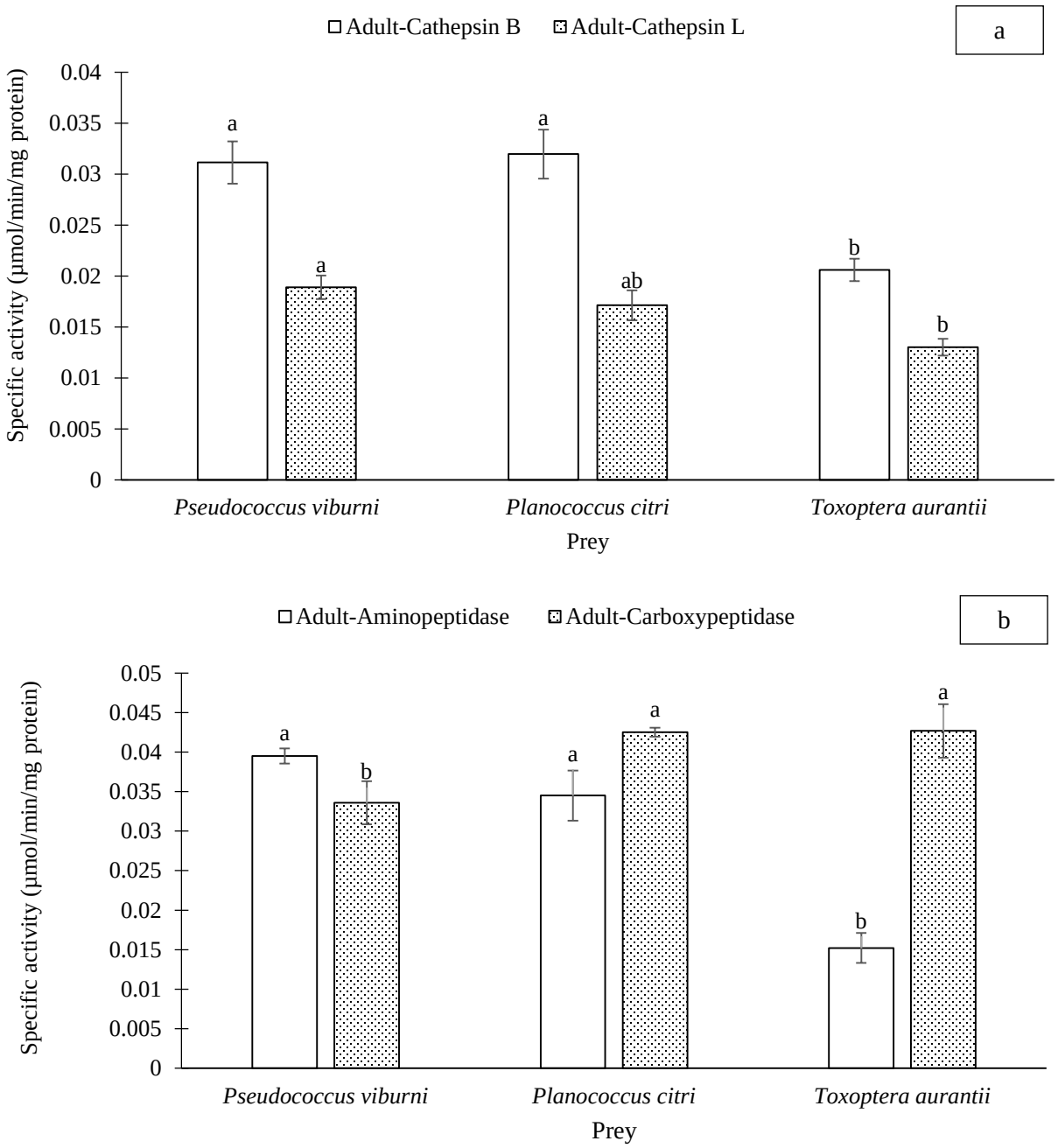
بحث

افراد خانواده Coccinellidae بر اساس رفتار تغذیه‌ای به سه گروه حشره‌خوار، گیاه‌خوار و قارچ‌خوار تقسیم می‌شوند که منجر به حضور و فعالیت متفاوت آنزیم‌های گوارشی به‌ویژه پروتئازهای گوارشی خواهد شد (Sakurai, 1968). به طور مثال، در کفشدوزک گیاه‌خوار *Epilachna chrysomelina* (Fabricius) (Coleoptera: Coccinellidae)، حضور هر دو پروتئازهای سرین و سیستئین در معده سنین مختلف لاروی و افراد بالغ گزارش شده است (غلامزاده چیتگر و همکاران، ۱۳۹۶). اگرچه پژوهش‌های مشابه روی کفشدوزک‌های شکارگر محدود است، اما گزارش شده است که سیستئین پروتئازها آنزیم‌های غالب در معده لاروها و افراد بالغ کفشدوزک *A. bipunctata* و افراد بالغ کفشدوزک *H. axyridis* هستند، هرچند فعالیت جزیی از سرین، آسپارتیک و متالوپروتئیازها در معده گونه دوم مشاهده شده است (Walker *et al.*, 1998; Koo and Park, 2002). در پژوهش حاضر روی کفشدوزک *C. montrouzieri* دو پروفایل پروتئازی مختلف در لاروها و افراد بالغ مشاهده شد. اگرچه در هر دو مورد، سیستئین پروتئازها غالب بودند، اما حضور اگزوپپتیدازها نیز با استفاده از سوبسترای اختصاصی و کنترل منفی به صورت متصل شده به غشا گزارش شده و لاروها، فعالیت جزئی نیز از سرین پروتئازهای تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز نشان دادند. وجود چنین تنوعی در مراحل لاروی و افراد بالغ به نوع طعمه مصرف شده آنها نسبت داده می‌شود، اما از آنجا که لاروها و افراد بالغ *C. montrouzieri* در شرایط پرورش از یک میزبان یعنی شپشک آردآلود مرکبات تغذیه شده بودند، بنابراین بهره‌گیری لاروها از پروتئازهای متنوع‌تر می‌تواند به نقش زیستی آنها مربوط باشد. در این مورد عقیده بر این است که رژیم غذایی مرحله لاوری کفشدوزک‌ها نقش اساسی در ظهور افراد بالغ با ظرفیت تولید مثلی مناسب دارد، بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که لاروها از تعداد بیشتری طعمه تغذیه کرده و تمام مواد مغذی آن را مورد مصرف قرار دهند. به طبع، سطح بالای تغذیه، مستلزم بهره‌مندی از طیف متنوعی از آنزیم‌های گوارشی است که این مساله می‌تواند به حضور سرین پروتئازها در لاروهای *C. montrouzieri* نسبت داده شود (Walker *et al.*, 1998).



شکل ۴- تغییر در فعالیت پروتئازهای گوارشی لاروهای *Cryptolaemus montrouzieri* پس از تغذیه روی سه طعمه *Pseudococcus viburni*، *Planococcus citri* و *Toxoptera aurantia*. a) سرین‌ها، b) سیستئین‌ها، c) اگزوپپتیدازها. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف مشخص شده‌اند (آزمون توکی، $p\leq0.05$).

Figure 4. Changes in the activities of digestive proteases in the larvae of *Cryptolaemus montrouzieri* when fed on the three preys, *Pseudococcus viburni*, *Planococcus citri* and *Toxoptera aurantia*. a) serines, b) cysteins, c) exopeptidases. Statistical differences have been marked with different letters (Tukey test, $p\leq0.05$).



شکل ۵- تغییر در فعالیت پروتئازهای گوارشی افراد بالغ *Cryptolaemus montrouzieri* پس از تغذیه روی سه طعمه *Pseudococcus viburni*، *Planococcus citri* و *Toxoptera aurantia*. a) سیستئین‌ها، b) اگزوپپتیدازها. تفاوت‌های آماری با حروف مختلف مشخص شده‌اند (آزمون توکی، $p\leq0.05$).

Figure 5. Changes in the activities of digestive proteases in the adults of *Cryptolaemus montrouzieri* when fed on the three preys, *Pseudococcus viburni*, *Planococcus citri* and *Toxoptera aurantia*. a) cysteins, b) exopeptidases. Statistical differences have been marked with different letters (Tukey test, $p\leq0.05$).

از سوی دیگر، در این پژوهش مشخص شد که آمینو- و کربوکسی پپتیدازها به صورت متصل شده به غشا فعالیت قابل توجهی دارند. بر اساس بررسی‌های مختلف مشخص شده است که حشرات کمتر تکامل یافته مثل راست‌بالان، نیم‌بالان و سخت‌بالپوشان Adephaga دارای آمینو- و کربوکسی پپتیداز محلول در لیومن معده هستند، اما در حشرات تکامل-یافته تر مثل سخت‌بالپوشان Polyphaga، دوبالان و بالپولکداران این آنزیم‌ها به صورت متصل‌شده به غشا می-باشند (Mehrabadi and Bandani, 2011; Zibaee, 2011; Terra and Ferreira, 2012).

اسیدیته دستگاه گوارش حشرات یکی از عوامل موثر در فعالیت آنزیم‌های گوارشی است؛ چراکه هر آنزیمی در اسیدیته بهینه خود بیشترین کارایی را در تبدیل سوبسترای غذایی به محصول قابل جذب داشته و هر نوع تغییر در این مقدار بهینه به واسطه حضور ترکیبات ناگوارد اعم از آفت-کش‌ها و بازدارنده‌ها می‌تواند سازوکار کاتالیتیکی واکنش بیوشیمیایی را تحت تاثیر قرار دهد. مهم‌تر اینکه، پروتئازهای مختلف در معده حشرات وابسته به اسیدیته‌های مختلفی هستند و ارزیابی فعالیت آنها در شرایط غیر زنده نیز مستلزم شناخت اسیدیته بهینه آنهاست (Terra and Ferreira, 2012). امروزه مشخص شده است که سرین پروتئازها آنزیم‌های فعال در دامنه قلیایی، سیستئین و آسپارتیک پروتئازها آنزیم‌هایی فعال در دامنه اسیدی و اگزوپپتیدازها فعال در اسیدیته خنثی تا قلیایی هستند (Terra and Ferreira, 2012). در پژوهش حاضر مشخص شد که تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز گوارشی لاروهای *C. montrouzieri* در اسیدیته‌های ۸، ۹-۸ و ۹ بیشترین فعالیت را داشته، اما کاتپسین‌های B و L اسیدیته بهینه ۶ و اگزوپپتیدازها اسیدیته بهینه ۷ و ۸ دارند. در افراد بالغ، کاتپسین‌های B و L در اسیدیته ۵ و اگزوپپتیدازها در اسیدیته ۷ بیشترین فعالیت را از خود نشان دادند. در بررسی‌های قبلی مشخص شد که پروتئازهای گوارشی کفشدوزک‌های شکارگر همچون *R. cardinalis*، *C. septempunctata*، *A. bipunctata* و *H. axyridis* در اسیدیته ۵ تا ۶ فعالند که نشانگر حضور سیستئین پروتئازها در دستگاه گوارش آنها برای هضم طعمه‌هاست (Sakurai, 1968; Walker *et al*., 1998; Koo and Park, 2002). البته گزارش شده است که اسیدیته دستگاه گوارش در لاروهای *A. bipunctata* بیشتر از افراد بالغ است (Walker *et al*., 1998). اسیدیته بهینه آنزیم‌های پروتئازی وابسته به فیلوژنی گونه است و به طور معمول در گونه‌های نزدیک مقیاس مشابهی وجود دارد (Zhang *et al*., 2002). به طور مثال، مقدار عددی ۵ به عنوان اسیدیته بهینه فعالیت پروتئازی در لاروها و افراد بالغ کفشدوزک خربزه گزارش شده است که گونه گیاه‌خوار خانواده Coccinellidae می‌باشد (Gholamzadeh-Chitgar *et al*., 2017). در سایر سوسک‌ها همچون برگخوار نارون *Xanthogaleruca luteola* Muller (Coleoptera: Chrysomelidae)، سوسک سیاه گندم *Zabrus tenebrioides* Goeze (Coleoptera: Carabidae)، شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae)، سوسک ریشه ذرت *Diabrotica undecimpunctata* Mannerheim (Coleoptera: Chrysomelidae) نیز اسیدیته ۴ تا ۶ گزارش شده است که اشاره به غالبیت پروتئازهای سیستئین در سخت‌بالپوشان فارغ از گیاه‌خوار یا حشره‌خوار بودن آنها دارد (Lemos *et al*., 1990; Fabrick *et al*., 2002; Oppert *et al*., 2003; Tatli *et al*., 2010).

استفاده از بازدارنده‌های اختصاصی یکی از اساسی‌ترین روش‌ها در اثبات حضور انواع پروتئازها در دستگاه گوارش حشرات است. در بررسی حاضر مشخص شد که غلظت‌های مختلف بازدارنده‌های سرین پروتئازی و سیستئین پروتئازی سبب کاهش فعالیت پروتئازها می‌شوند. با توجه به اهمیت سیستئین پروتئازها در سخت‌بالپوشان از یک سو و غالبیت حضور و فعالیت آنها در لاروها و افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* از دو بازدارنده E-64 و سیستاتین استفاده

شد. در بررسی بازدارنده‌ها روی پروتئازهای گوارشی کفشدوزک خربزه به عنوان نمونه گیاه‌خوار خانواده Coccinellidae مشخص شد که بازدارنده‌های PMSF علیه سرین پروتئازها، TLCK علیه تریپسین، TPCK علیه کیموتریپسین و یدواستات علیه سیستئین پروتئازها فعالیت پروتئازی را به طور معنی داری کاهش دادند (Gholamzadeh-Chitgar *et al*., 2017). در کفشدوزک *A. bipunctata* مشخص شد که اگرچه لئوپپتین و TPCK فعالیت سرین پروتئازی را کاهش دادند، اما با توجه به اهمیت بنزامیدین به عنوان بازدارنده رقابتی سرین پروتئازی و عدم توانایی آن در توقف هیدرولیز Z-phe-arg-*p*NA تریپسین و کیموتریپسین در افراد بالغ این کفشدوزک وجود ندارند. در نهایت، کاهش ۹۵ درصدی فعالیت پروتئازی توسط E-64 حضور سیستئین پروتئازها را در این حشره اثبات کرد (Walker *et al*., 1998). بررسی بازدارنده‌های مختلف روی فعالیت پروتئازی گوارشی *H. axyridis* نشان داد که بازدارنده‌های سیستئین پروتئازی همچون E-64، n-ethylmaleimide، ایدواستات، ایودواستامید، لئوپپتین و آنتی‌پین فعالیت پروتئازی را بین ۵۶ تا ۹۵ درصد کاهش دادند، در صورتی‌که آپروتنین به عنوان بازدارنده سرین پروتئازی سبب کاهش ۵ درصدی فعالیت آنزیمی شد (Koo and Park, 2002). با توجه با تطابق نتایج ما با نتایج مشاهده شده روی دو کفشدوزک *H. axyridis* و *A. bipunctata* می‌توان تا حد زیادی اطمینان داشت که سیستئین پروتئازها نقش بسزایی در گوارش سوسک‌های شکارگر خانواده Coccinellidae دارند.

تحقیقات در زمینه ارزیابی تاثیر رژیم غذایی بر فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات شکارگر گسترده نیست، اما مواردی از سن‌های شکارگر توسط پژوهشگران ارایه شده است. تاثیر طعمه‌های مختلف شامل شب‌پره موم‌خوار *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)، کرم ساقه‌خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae)، کرم سبز برگخوار برنج *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae) و شب‌پره مدیترانه ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) بر آنزیم‌های گوارشی سن شکارگر *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) بررسی شد (Sorkhabi-Abdolmaleki *et al*., 2013). مشخص شد که فعالیت پروتئازهای گوارشی سرین، سیستئین و اگزوپپتیدازها پس از تغذیه از طعمه‌های مختلف به طور معنی-داری تغییر می‌کند. بیشترین فعالیت سرین پروتئازها و اگزوپپتیدازها در سن‌های تغذیه شده از شب‌پره موم‌خوار مشاهده شد، در حالی‌که سن‌های تغذیه شده از شب‌پره بید آرد بیشترین فعالیت سیستئین پروتئازها را نشان دادند. نتیجه-گیری شد که ترکیب اسیدهای آمینه موجود در هر لارو حسب نوع تغذیه آنها می‌تواند منجر به فعال شدن پروتئازهایی متفاوت در سن‌های تغذیه شده باشد. همچنین نشان شده است که فعالیت نسبی پروتئازها در دستگاه گوارش سن *Podisus maculiventris* Say (Hemiptera: Pentatomidae) پس از تغذیه بسته به میزان پروتئین‌ها و مواد بازدارنده موجود در بدن هر طعمه متفاوت بوده و حتی این سن ممکن است از آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در بدن هر طعمه برای هضم استفاده کند؛ به طوری‌که فعالیت تریپسین و کیموتریپسین در سن‌های تغذیه شده از لارو بالپولکدارن بیشتر از سن‌های تغذیه شده از سخت‌بالپوشان بود (Pasqual-Ruiz *et al*., 2009). در بررسی حاضر مشخص شد که آنزیم‌های سیستئین به ویژه در افراد بالغ در شپشک‌های آردآلود بیشتر از شته چای بود. در این مورد به دو دیدگاه می‌توان رسید. اول اینکه، به دلیل پرورش مداوم کفشدوزک *C. montrouzieri* روی شپشک‌های آردآلود به ویژه مرکبات، نوعی سازگاری بین پروتئازهای گوارشی با ترکیبات پروتئینی موجود در بدن طعمه ایجاد شده است. دوم اینکه، شته چای به دلیل پرورش روی بوته چای ممکن است دارای ترکیبات ثانویه گیاه میزبان

بوده که سبب کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در کفشدوزک شده باشد.

در پژوهش حاضر مشخص شد که اگرچه لاروها و افراد بالغ کفشدوزک *C. montrouzieri* در فعالیت سیستئین پروتئازها و اگزوپپتیدازها مشترکند، اما فعالیت جزیی سرین پروتئازها در لاروها می‌تواند نشانگر تفاوت فیزیولوژی گوارشی آنها و نوعی سازگاری لاروها در محیط زیست در صورت فقدان طعمه اصلی باشد. به طور مثال، در اغلب سن-های شکارگر سنین اولیه پورگی از گرده و شیره گیاهی تغذیه می‌کنند که به رشد و نمو آنها در صورت نبود یا گریز طعمه کمک می‌کند. در پژوهش حاضر اگرچه شرایط پرورش در آزمایشگاه و تامین طعمه یکسان بود، فعالیت جزئی سرین پروتئازها در لاروها می‌تواند مربوط به نقش این آنزیم‌ها در بعضی فرآیندهای فیزیولوژیک رشد باشد. از سوی دیگر، پاسخ آنزیم‌های پروتئازی به بازدارنده‌های اختصاصی و سنجش فعالیت آنها با سوبستراهای اختصاصی می‌تواند بیانگر وابستگی این کفشدوزک به طیف گسترده‌ای از پروتئازهای گوارشی باشد. تفاوت فعالیت پروتئازهای گوارشی به ویژه در افراد بالغ پس از تغذیه روی طعمه‌های مختلف نشانگر نوعی سازگاری یا انعطاف‌پذیر بودن این آنزیم‌ها برای هضم غذای خورده شده طی مراحل رشدی است که به دنبال آن بر فیزیولوژی گوارش و عملکرد زیستی و تولیدمثلی آنها موثر است. در واقع، ارزیابی تغییرات فعالیت این آنزیم‌ها در کنار سایر آنزیم‌های گوارشی می‌تواند در یافتن مناسب‌ترین طعمه در پرورش انبوه یا کنترل کارآمد آفت هدف در باغ راهگشا باشد. اگرچه در تحقیقات تکمیلی، بررسی‌های واکنش تابعی و فراسنجه‌های زیستی–جمعیتی ضروری به نظر می رسد.

سپاسگزاری

این مقاله با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه گیلان در قالب قرارداد پژوهشی ۱۵پ/۱۳۱۹۷۸ انجام شده است. نگارنده از همکاری مهندس حسن هدی از بخش کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاهپزشکی در آمل و دکتر سمر رمزی از پژوهشکده چای کشور به سبب فراهم‌سازی امکان پرورش و تسهیل در انجام آزمایش‌ها قدردانی می نماید.

References

Fabrick, J., Behnke, C., Czapla, T., Bala, K., Rao, A. G., Kramer, K. J. and Reeck, G. R. 2002. Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern cornrootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32: 405-415.

Ferreira, C. and Terra, W. R. 1983. Physical and kinetic properties of a plasma-membranebound P-D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana* larva). **Biochemistry Journal** 213: 43–51.

Gholamzadeh-Chitgar, M., Ghadamyari, M. and Ghanbarinejad, R. 2017. Biochemical properties of digestive proteases of melon ladybird, *Epilachna chrysomelina* (Fabricius) (Col.: Coccinellidae). **Journal of Entomological Society of Iran** 37: 293-304 [In Persian].

Kanost, M. R. and Clem, R. J. 2011. Insect proteases. In: Gilbert, L.I. (Ed.), Insect Molecular Biology and Biochemistry. Elsevier, Amsterdam, pp. 346–364.

Koo, M. S. and Park, Y. C. 2002. Gut luminal digestive proteinases of adult Lady Beetle, *Harmonia axyridis* (Coccinellidae: Coleoptera), fed an artificial diet. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 5: 167-173.

Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P. and Xavier-Filho, J. 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 56: 219-227.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193: 265–275.

Mehrabadi, M. and Bandani, A. R. 2011. Secretion and formation of perimicrovillar membrane in the digestive system of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) in the response of feeding. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 78: 190-200.

Nation, J. L. 2008. Insect Physiology and Biochemistry, 2nd edition. CRC Press, London.

Norén, O., Sjostrom, H., Danielsen, E. M., Cowell, G. M. and Skovbjerg, H. 1986. The enzymes of the enterocyte plasma membrane. In P. Desnuelle, H. Sjostrom, and O. Norén (Eds.), Molecular and Cellular Basis of Digestion (pp. 355–365). Amsterdam: Elsevier.

Oppert, B., Morgan, T. D., Hartzer, K., Lenarcic, B., Galesa, K., Brzin, J., Turk, V., Yoza, K., Ohtsubo, K. and Kramer, K. J. 2003. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology** 134: 481-490.

Pascual-Ruiz, S., Carrilo, L., Alvarez-Alfageme, F., Ruiz, M., Castanera, P. and 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.

Rawlings, N. D., Barrett, A. J. and Bateman, A. 2010. *MEROPS*: the peptidase database. **Nucleic Acids Research** 38: D227–D233.

Sakurai, H. 1968. Physiological studies on the digestion of coccinellid beetle (Coleoptera: Coccinellidae), with special reference to their food habits. **Applied Entomology and Zoology** 3: 130-138.

Sorkhabi-Abdolmaleki, S., Zibaee, A., Hosseini, R. and Hoda, H. 2013. Effects of different prey regimes on activities of digestive enzymes in *Andrallus spinidens* (Hem.: Pentatomidae). **Journal of Entomological Society of Iran** 33: 57-68 [In Persian].

Tatli, A., Bandani, A. and Naghdi, M. 2010. Study of the digestive protease in the elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Col., Chrysomylidae). Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress, 9-12 Aug., Tehran, Iran, p. 300 [In Persian].

Terra, W. R. and Ferriera, C. 2012. Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 365–418.

Walker, A. J., Ford, L., Majerus, M. E. N., Geoghegan, I. E., Birch, N., Gatehouse, J. A. and Gatehouse, A. M. R. 1998. Characterisation of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 28: 173–180.

Zibaee, A. 2011. Digestive enzymes of large cabbage white butterfly, *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) from developmental and site of activity perspectives. **Italian Journal of Zoology** 79: 13-26.

Plant Pest Research
2020-10 (2): 75-91

A Biochemical study on the types of digestive specific proteases in the ladybird, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Col.: Coccinellidae) and the effects of different preys on their activity

A. Zibaee*
Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: July 7, 2020- Accepted: September 19, 2020)

Abstract

Type and biochemical properties of the digestive proteases were determined using specific substrates and inhibitors in the larvae and the adults of *Cryptolaemus montrouzieri* and their activity changes were evaluated when fed on the different preys. Rearing of beetles was done in laboratory conditions and they were fed on citrus mealybug. Dissection was done in NaCl medium and the obtained midgut was homogenized and centrifuged. Then, the activity of digestive proteases determined by using the specific substrates and inhibitors by feeding on three hosts. The results showed that just cysteine proteases and exopeptidases were active in the midgut of adults while both serine and cysteine proteases were engaged in the digestion by the larvae. The highest activity of the serine proteases; trypsin, chymotrypsin and elastase, were found in the pH sets of 8, 8-9 and 9, respectively. The optimal pH of cathepsins B and L were determined in 6 and 5 pH values of the larvae and the adults of *C. montrouzieri*, respectively. The highest activities of digestive larval amino- and carboxypeptidases were measured at pH 7 while these two enzymes showed the highest activity at pH sets of 7 and 6 in the adults, respectively. The specific inhibitors including cystatin, E-64, TLCK, SBTI, TPCK and AEBSF.HCL significantly decreased the activities of specific proteases in the larvae and the adults of *C. montrouzieri*. No significant differences were observed in the activities of serine proteases, exopeptidases and cathepsin L in the larvae fed on *Planococcus citri*, *Pseudococcus viburni* and *Toxoptera aurantii* but cysteine proteases and aminopeptidases in the adults fed on tea aphid showed the least activity. The difference in proteolytic profile of the larvae and the adults of *C. montrouzieri* concur the physiological differences in these two developmental stages with the emphasize on serine proteases in the preservation and control of developmental status of digestive tract. In addition, the higher activity of cysteine proteases in the adults may be related to the nature of utilized prey and presence of different proteinaceous components or even glycoperoteins in the preys.

Key words: Protease, Digestion, *Cryptolaemus montrouzieri*, Biochemical characterization

Corresponding author:* arash.zibaee@guilan.ac.ir