نشریه علمی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۱۸ شماره ۲، صفحه ۳۱۵-۳۰۸ سال ۹۹

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfrpr.2021.351522.1438
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0859.1399.18.308.36.2.1608.41

مقاله کوتاه

ویژگی‌های بیوشیمیایی برخی پروتئازهای گوارشی لیسه *Yponomeuta padella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae)

مریم عجم حسنی[1*]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

پست الکترونیک: shahroodm@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۵

چکیده

لیسه *Yponomeuta padella* به‌عنوان آفت مهم جنگل‌های ولیک در حوزه زاگرس مرکزی، در سال‌های اخیر خسارت جدی به این گونه جنگلی وارد کرده است. لاروهای آفت به شدت برگ‌خوار بوده و با تنیدن تارها و جذب گردوغبار و قارچ‌ها، سبب کاهش بارز فتوسنتز و ضعف درختان می‌شوند. در این تحقیق ویژگی‌های بیوشیمیایی بعضی پروتئازهای لارو سن پنجم شب‌پره *Y. padella* بررسی شد. برای انجام آزمایش‌ها، از تمام لوله گوارش لارو سن پنجم استفاده شد. پس از تشریح، روده‌ها هموژنایز شده و به‌همراه آب مقطر سانتریفیوژ شدند. محلول رونشین در مطالعات آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. اسیدیته بهینه با استفاده از سوبستراهای عمومی آزوکازئین و هموگلوبین برای فعالیت پروتئازی ۱۱ به‌دست آمد. اسیدیته بهینه با استفاده از سوبستراهای اختصاصی برای فعالیت تریپسین ۱۰ و ۱۱ و برای کیموتریپسین ۱۱ مشاهده شد. دمای بهینه فعالیت پروتئازی در محدوده ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس بود. تأثیر بازدارنده های سنتزی بر فعالیت آنزیم‌های پروتئاز مشهود بود. نتایج نشان داد که فعالیت پروتئاز توسط بازدارنده TLCK به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. درصد مهارکنندگی TLCK به میزان ۶۶/۲۳ درصدبیشتر از PMSF (۲۱/۳۴) درصد و TPCK (۳۴/۱۵) درصد بود. بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی آنزیم‌های گوارشی و بازدارنده‌های آنها در لیسه *Y. padella* برای اولین بار انجام شد. با توجه به خسارت‌زا بودن این آفت روی پایه‌های ولیک و گیلاس وحشی و خطر نابودی این درختان، به نظر می‌رسد که مطالعات مقدماتی بیوشیمیایی این حشره بتواند برای مدیریت آن مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: تریپسین و کیموتریپسین، بازدارنده پروتئاز، *Yponomeuta padella*.

شب‌پره‌های لیسه (small ermine moths) متعلق به جنس *Yponomeuta* شامل حدود ۷۵ گونه می‌باشند. این گونه‌ها بیشتر در مناطق پالئارکتیک گسترش دارند. یکی از گونه‌های لیسه، *Yponomeuta padella* (L.) با نام انگلیسی cherry ermine moth از آفات برگ‌خوار درختان رزاسه است. این آفت در اروپا روی هلو، آلو، آلوچه، گیلاس و ولیک خسارت‌زا می‌باشد (Bakker *et al*., 2008). در ایران در جنگل‌های حوزه زاگرس مرکزی در استان‌های چهارمحال و بختیاری و لرستان بیشتر روی درختان ولیک *Cratagus monogyna* و گیلاس وحشی *Cerasus* sp. مشاهده شده است. آفت لیسه به‌ویژه در سال‌های اخیر به‌صورت یکی از شایع‌ترین عوامل تنش‌زای بیولوژیک برای درختان جنس ولیک درآمده و سطح وسیعی از جنگل را دچار خسارت کرده است (Shariati *et al*., 2014). خسارت وارده از طریق

لاروهای حشره زیاد بوده و قسمت عمده برگ‌های درختان آلوده توسط این آفت تغذیه می‌شوند. لاروهای سنین بالا دارای زندگی اجتماعی بوده و به‌صورت دسته‌جمعی روی درختان با تنیدن تار، لانه‌هایی را ایجاد می‌کنند، به‌علاوه درختان آفت زده به‌دلیل ترشح تارهای لاروها، گردوغبار را جذب کرده که این عمل منجر به کاهش سطح فتوسنتز و ضعف درخت آلوده می‌شود (Edmonds *et al*., 2000). گزارش‌هایی از روش‌های کنترل طبیعی برای آن در مناطق گسترده‌ای از اروپا وجود دارد: فرومون جنس ماده لیسه در جنگل‌های اروپا نقش مهمی در جلب نرهای آن دارد (Löfstedt *et al*., 1991). توان پارازیتیسم زنبور پارازیتوئید *Ageniaspis fuscicollis* Dalm روی لاروهای لیسه حدود ۵۰-۶۰ درصد گزارش شده است. همچنین لاروهای مگس *Agria mamillata* Pand به‌عنوان شکارگر شفیره‌های آفت معرفی شده‌اند (Mowat & Clawson, 1995).

تغذیه بالای لاروهای لیسه از برگ‌های درختان میزبان، حضور آنزیم‌های فعال گوارشی را در معده آن ضروری می کند. حشرات برای استفاده از منابع غذایی و هضم ماکرومولکول‌ها به آنزیم‌های گوارشی وابسته هستند. بخش قابل‌توجهی از مولکول‌های غذا شامل پروتئین‌ها هستند و سرین‌پروتئازها به‌عنوان آنزیم‌های مهم هیدرولیزکننده پروتئین ها در کانال غذایی طیف وسیعی از حشرات مانند بال‌پولک داران فعالیت می‌کنند (Srinivasan, 2006). براساس گزارش‌ها، امروزه تولید گیاهان مقاوم و تراریخته که حامل ژن‌های کدکننده مهارکننده‌های پروتئاز هستند، رو به گسترش است. درواقع، حشره با تغذیه از میزبان حاوی بازدارنده آنزیم گوارشی، دچار اختلال در هضم، کاهش وزن، کاهش میزان تولیدمثل و درنهایت کاهش خسارت‌زایی می‌شود که این نتایج هدف نهایی و مطلوب ما در مدیریت آفات محسوب می‌شود. ازاین‌رو به نظر می‌رسد اولین گام برای کاربرد این بازدارنده ها در کنترل آفات، شناخت دقیق ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات است (Gholamzadeh *et al*., 2017). تحقیقات وسیعی در مورد چگونگی فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند پروتئازهای بال‌پولک‌داران در دامنه‌های مختلف دمایی و اسیدیته انجام شده است که ازآن‌جمله می توان به مطالعاتRanjbar و همکاران (۲۰۱۱) روی کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* zeller، Gholamzadeh و همکاران (۲۰۱۳) روی شب‌پره انجیر *Choreutis nemorana* Hübner، Yazdani و همکاران (۲۰۱۴) روی پروانه برگ‌خوار مرکبات *Papilio demoleus* L. و Mehrkhou (۲۰۱۷) روی سفیده بزرگ کلم *Pieris brassicae* L. اشاره کرد. لیسه *Y. padella* از آفات برگ‌خوار مهم جنگل‌های ولیک در زاگرس محسوب می‌شود و تاکنون مطالعه‌ای در زمینه فیزیولوژی آنزیم‌های مؤثر در هضم آن انجام نشده است. بنابراین هدف از این تحقیق، شناسایی ویژگی‌های پروتئازهای لوله گوارش این آفت است تا مقدمه‌ای برای امکان دستیابی به روش‌های نوین کنترل و مدیریت باشد.

لاروهای سنین مختلف لیسه از روی شاخه و برگ‌های درختان ولیک (جنگل‌های ولیک استان لرستان حوزه زاگرس مرکزی) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از تغذیه لاروهای کوچک از برگ‌های میزبان، از لاروهای سن پنج آفت در آزمایش‌ها استفاده شد. طول بدن و عرض کپسول سر با استفاده از قانون دایار تعیین و سن لاروی مشخص شد (Dyar, 1890). پس از استخراج لوله گوارش از بدن لارو، برای تهیه عصاره آنزیمی، تمام لوله گوارش هموژنایز و بعد در مدت ۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (Cohen, 1993). بخش رونشین نمونه‌ها به‌عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شدند. برای تعیین اسیدیته پروتئاز عمومی، مخلوط واکنش شامل ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱ درصد، ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۹۰ میکرولیتر بافر یونیورسال با اسیدیته مورد نظر (۱۲-۳) بود که به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه انکوبه شد. هضم پروتئینی با افزودن ۳۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۳۰ درصد متوقف و آزوکازئین هیدرولیز نشده موجود در واکنش، با قرار دادن در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ دقیقه به طور کامل رسوب داده شد و بعد با سرعت ۱۵۰۰۰ به مدت

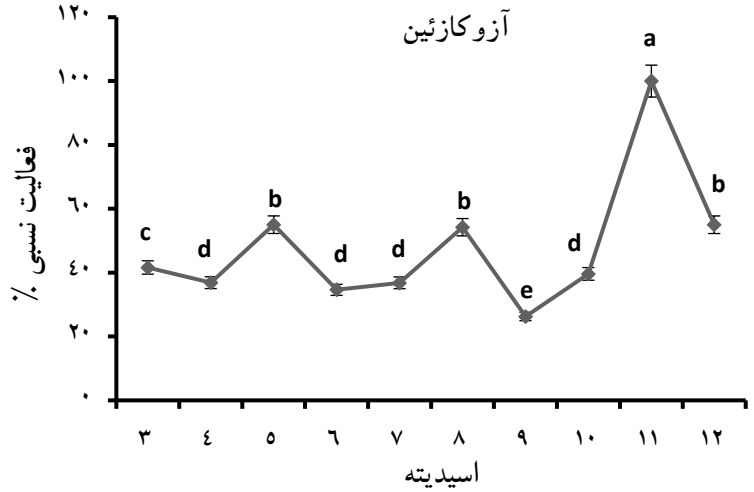
۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. حجمی مساوی از سدیم هیدروکسید یک مولار به رونشین افزوده و جذب آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر تعیین شد (Elpidina *et al*., 2001). برای تعیین دمای بهینه پروتئاز عمومی، ۳۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱ درصد، ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۹۰ میکرولیتر بافر با pH بهینه مخلوط و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دماهای مورد آزمایش (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سلسیوس) انکوبه شد و آزمایش مشابه مطالعه تعیین پروتئازهای عمومی در اسیدیته بهینه انجام گردید. به‌علاوه فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای هموگلوبین در محدوده اسیدیته ۱۲-۳ تعیین شد (Cohen, 1993). بررسی وجود و میزان فعالیت اندوپروتئینازهای تریپسین وکیموتریپسین در عصاره لوله گوارشی لیسه با استفاده از سوبستراهای تخصصی و براساس روش Garcia و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. سوبستراهای BApNA (N-Benzoyl-L-arginine-p-nitroalinide) و ^{SAAPPpNA} (N-Succinyl-alanin-alanin-prolin-phenylalanin-pnitroalinide) در غلظت ۱ میلی‌مولار و به‌میزان ۵ میکرولیتر به‌ترتیب برای تشخیص پروتئازهای تریپسین و کیموتریپسین در حجم ۸۵ میکرولیتر بافر با pH= ۳-۱۲ و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. با استفاده از میکروپلیت ریدر مقدار فعالیت آنزیمی و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان کل ۲۰ دقیقه و فواص زمانی ۵ دقیقه ثبت شد.

برای تعیین اثر بازدارنده‌های پروتئازی شامل PMSF (Phenylmethylsulfonyle fluoride)، TPCK (Tosyl-L-Phenylalanine chloromethyl Ketone) و TLCK (Tosyl-L-Lyslne chloromethyl Ketone) (۱ میلی‌مولار) نیز همانند آنچه در تعیین پروتئازهای عمومی انجام شده بود، در نظر گرفته شد. ولی عصاره‌های آنزیمی ۱۰-۱۵ دقیقه قبل از انجام واکنش با مهارکننده‌های مورد نظر انکوبه شد. جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان کل ۲۰ دقیقه و فواص زمانی ۵ دقیقه ثبت گردید.

نتایج آزمایش‌ها نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار اسیدیته بر فعالیت پروتئازی با دو نوع سوبسترای آزوکازئین و هموگلوبین تریپسین و کیموتریپسین در لوله گوارش لارو سن پنج *Y. padella* بود (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴). فعالیت نسبی این آنزیم‌ها در اسیدیته‌های پایین کم بود ولی در اسیدیته‌های بالا افزایش یافت تا به بیشینه خود در اسیدیته ۱۱ رسید. اسیدیته بهینه در لوله گوارش به فاکتورهایی مانند رژیم غذایی، اسیدیته غذا، حضور میکروارگانیسم‌های معده و مرحله رشدی حشره وابسته است (Dow, 1986).

نتایج سایر محققان نیز حکایت از فعالیت بالای پروتئازهای لارو بال‌پولک‌داران در اسیدیته‌های قلیایی دارد، به‌طوری‌که اسیدیته بهینه برای پروانه شاخدار تنباکو *Manduca sexta* (L.) (Samuels *et al*., 1993)، کرم غوزه پنبه *Heliothis virescens* (Fabricus) (Johnston *et al*., 1991)، شب‌پره کلم *Mamestra brassicae* (L.) (Chougule *et al*., 2008)، کرم گلوگاه انار (Ranjbar *et al*., 2011)، سفیده بزرگ کلم و کرم ساقه‌خوار برنج *Chilo suppressalis* Walker (Zibaee *et al*., 2012a; Zibaee *et al*., 2012b)، برگ‌خوار مرکبات (Yazdani *et al*., 2014) و پروانه برگ‌خوار شبدر *Utethesia pulchella* L. (Ajamhassani *et al*., 2012) در محدوده ۱۱-۸ به‌دست آمد. شکل ۵ نشان‌دهنده تأثیر دما بر فعالیت پروتئازی است. فعالیت آنزیم در دماهای پایین‌تر، چشمگیر نبود ولی به تدریج با افزایش دما روند فعالیت افزایشی شد تا در محدوده دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت نسبی پروتئازی به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده شد. در دماهای بالاتر با از هم گسیختگی ساختار سه بعدی آنزیم (Boyd, 2002)، فعالیت آنزیم کاهش معنی‌داری یافت و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس فعالیت نسبی به صفر رسید. تغییرات دما بر رشد، سازوکار هموستازیس، فراوانی سلول‌های خونی و واکنش‌های دفاعی حشرات ثابت شده است (Gillespie *et al*., 2000; Ajamhassani & Pourali, 2020). البته فعالیت هضم و آنزیم‌های گوارشی نیز تحت تأثیر دما تغییر می‌کند. محدوده دمایی برای فعالیت بهینه پروتئازها در برگ‌خوار شبدر، کرم ساقه‌خوار برنج و سفیده کلم نیز ۳۵-۲۵ درجه سلسیوس به‌دست آمد (Ajamhassani *et al*., 2012;

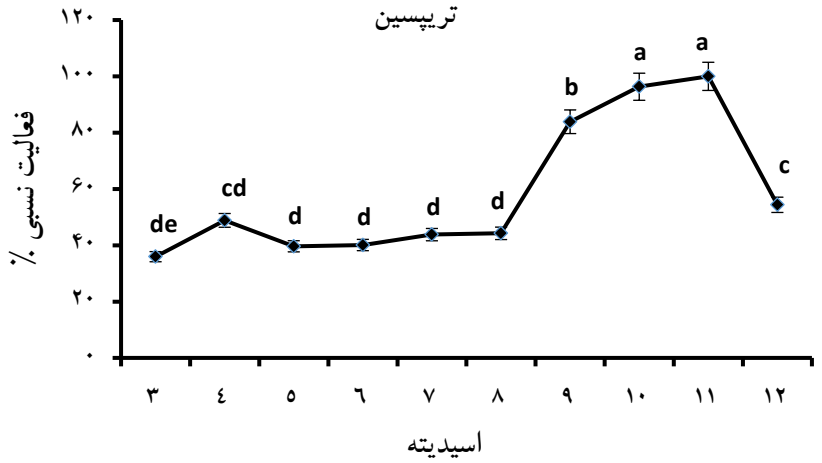
Zibaee *et al*., 2012a, Zibaee *et al*., 2012b). در آزمایش بررسی تأثیر بازدارنده‌ها، مشاهده شد که TLCK بالاترین تأثیر بازدارندگی را روی فعالیت پروتئازی لیسه به میزان ۶۶/۲۳ درصد دارد و TPCK در مرتبه بعدی (۳۴/۱۵ درصد) است. تأثیر مهارکنندگی PMSF به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر بازدارنده‌ها بود و به‌مقدار ۲۱/۳۴ درصد به‌دست آمد (شکل ۶). این دو ترکیب از بازدارنده‌های فعالیت تریپسین و کیموتریپسین محسوب می‌شوند و به‌مقدار قابل‌توجهی توانستند سبب مهار فعالیت این آنزیم‌ها شوند. به‌این‌ترتیب، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که طیفی از پروتئازها در لوله گوارش لارو لیسه *Y. padella* وجود دارد که منجر به هضم پروتئین‌های موجود در برگ ولیک می‌شود.



شکل ۱- تأثیر اسیدیته بر فعالیت نسبی پروتئاز عمومی در لوله گوارش لارو سن پنجم لیسه *Yponomeuta padella* با استفاده از سوبسترای آزوکازئین

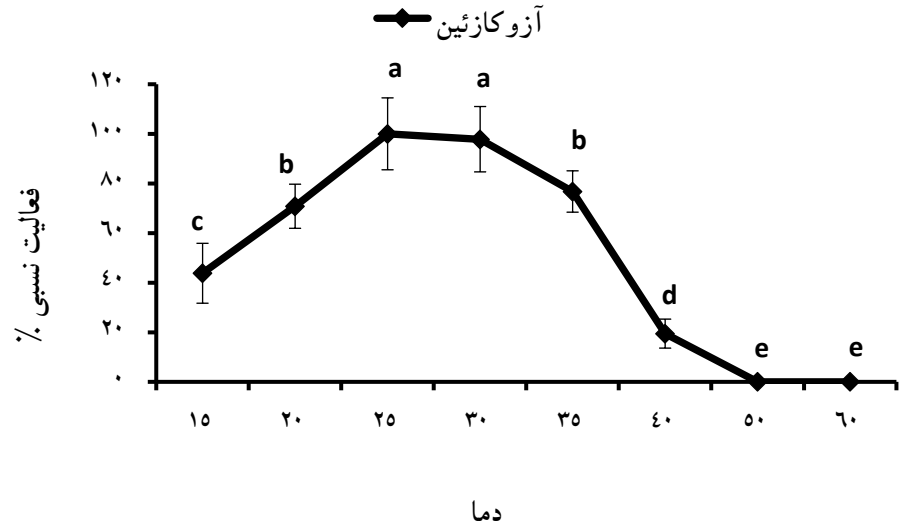
شکل ۲- تأثیر اسیدیته بر فعالیت نسبی پروتئاز عمومی در لوله گوارش لارو سن پنجم لیسه *Yponomeuta padella* با استفاده از سوبسترای هموگلوبین

البته تأثیر بازدارندگی این بازدارنده‌ها بر فعالیت پروتئازی بسیاری از بال‌پولک‌داران گزارش شده است. بی‌شک حضور بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات در گیاهان میزبان آنها می‌تواند تأثیر منفی بر هضم غذا و درنتیجه رشد و بقای حشرات داشته باشد (Zhu-Slazman, 2003). شناخت ویژگی‌های بیوشیمیایی پروتئازهای لیسه *Y. padella* به‌عنوان اولین مطالعات فیزیولوژی گوارش آفت، می‌تواند برای برنامه‌های کنترل این آفت جنگلی مخرب باشد. البته انجام تحقیقات تکمیلی برای شناسایی ویژگی‌های کربوهیدرازها، لیپاز و سایر پروتئازها، همچنین شناخت ویژگی‌های ایمنی شناختی این حشره ضروری است تا بهتر بتوان از روش‌های مختلف کنترل علیه آن بهره گرفت.

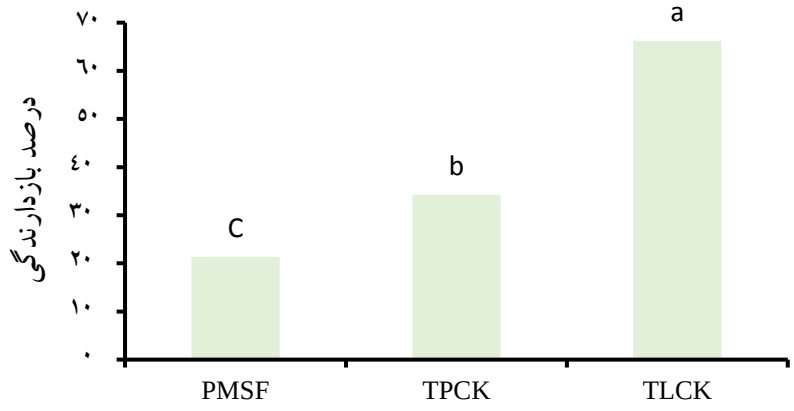


شکل ۳- تأثیر اسیدیته بر فعالیت نسبی تریپسین در لوله گوارش لارو سن پنجم لیسه *Yponomeuta padella*

شکل ۴- تأثیر اسیدیته بر فعالیت نسبی کیموتریپسین در لوله گوارش لارو سن پنجم لیسه *Yponomeuta padella*



شکل ۵- تأثیر دما بر فعالیت نسبی پروتئاز عمومی در لوله گوارش لارو سن پنجم لیسه *Yponomeuta padella* با استفاده از سوبسترای آزوکازئین



شکل ۶- تأثیر بازدارندگی TLCK، TPCK و PMSF روی فعالیت پروتئازی لارو سن پنجم لیسه *Yponomeuta padella*

منابع مورد استفاده

-Ajamhassani, M., Zibaee, A., Sendi, J.J., Askary, H. and Farrar, N. 2012. Proteolytic activity in the midgut of the Crimson Speckled Moth *Utethesia pulchella* L. (Lepidoptera: Arctiidae). Journal of Plant Protection Research, 52(3): 364-369.

-Ajamhassani, M. and Pourali, Z. 2020. Hemogram study and effect of thermal Stresses on abundance of immunocytes in larvae of Goat Moth, *Cossus cossus* (Lepidoptera: Cossidae). Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 17(2): 239-250 (In Persian).

-Bakker, A.C., Roessingh, P. and Menken, S.B.J., 2008. Sympatric speciation in Yponomeuta: no evidence for host plant fidelity. Entomologia Experimentalis et Applicata, 128: 240-7.

-Boyd, J.R.D.W. 2002. Digestive enzymes and stylet morphology of *Deraeocoris nigritulus* (Uhler) (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habit. Annals of the Entomological Society of America, 96: 667- 671.

-Chougule, N.P., Doyle, E., Fitches, E. and Gatehouse, J.A. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. Journal of Insect Physiology, 54: 563-572.

-Cohen, A.C. 1993. Organization of digestion and

-Mehrkhou, F. 2017. Biochemical characterization of digestive proteases of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) feeding on cruciferous hosts. Journal of Entomological Society of Iran, 37(2): 155- 168. (In Persian)

-Mowat, D.J. and Clawson, S. 1995. Natural control of the Small Ermine Moth *Yponomeuta padella* (L.). Agriculture, Ecosystem and Environment, 52: 93-102.

-Ranjbar, M., Sendi, J.J. and Zibaee, A. 2011. Proteolytic activity in the midgut of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), Pomegranate carob moth. Research Report, 8: 132-142.

-Samuels, R.I., Charnley, A.K. and Reynolds, S.E.A. 1993. cuticle degrading proteinase from the moulting fluid of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochemistry and Molcular Biology, 23: 607-614.

-Shariati Najafabadi, H., Gorjestani, SH., Soltani, A. and Saeedi, Z. 2014. Study on some indicase in select of *Cratagus monogyna* by *Hyponomeuta padella* in forests. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 12(1): 57-66 (In Persian).

-Srinivasan, A., Giri, A.P. and Gupta, V.S. 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serin proteases. Cellular & Molecular Biology Letters, 11(1): 132-154.

-Yazdani, E., Zibaee, A. and Sendi, J.J. 2014. Digestive proteases of *Papilio demoleus* compartmentalization and characterization. Phytoparasitica, 42: 121-133.

-Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R.A., Shade R.E. and Ahn, J.E. 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. Insect Molecular Biology, 12: 135.145.

-Zibaee, A. 2012a. Digestive enzymes of large cabbage white butterfly, *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) from developmental and site of activity perspectives. Italian Journal of Zoology, 79 (1): 16.23.

-Zibaee, A. 2012b. Proteolytic profile in the larval midgut of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae). Entomological Research, 42(1): 142-150.

preliminary characterization of salivary trypsin like enzymes in a predaceous Heteropteran, *Zelus renadii*. J. Insect. Physiol., 39 (10): 823–829.

-Dow, J.A.T. 1986. Insect midgut function. Advances in Insect Physiology, 19: 187-329.–Dyar, H.C. 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. Journal Psyche., 5: 420-422.

-Edmonds, R.L., Agee, J.K. and Gara, R.I. 2000. Forest health and protection. McGraw Hill, Boston, London, xvii, 630 p.

-Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Gromenko, V.A., Rudenskaya, Y.A., Dunaevsky, Y.E. and Zhuzhikov, D.P. 2001. Compartmentalization of proteinases and amylases in Nauphoeta cinerea midgut. Arch. Insect. Biochem. Physiol., 48(4): 206–216.

-Garcia-Carreno, F.L., Dimes, L.E. and Haard, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases orproteinaceous protease inhibitors. Analytical Biochemistry, 214: 61-69.

-Gholamzadeh Chitgar, M., Ghadamyari, M. and Sharifi M. 2013. Identification and characterisation of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). Plant Protectection Science, 50: 84–89.

-Gholamzadeh Chitgar, M., Ghadamyari, M. and Ghanbarinezhad, R. 2017. Biochemical properties of digestive proteases of melon ladybird, *Epilachna chrysomelina* (Fabricius) (Col.: Coccinellidae). Journal of Entomological Society of Iran, 37(3): 293-304 (In Persain).

-Gillespie, J.P., Burnett, C. and Charnley, A.K. 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var acridum. Journal of Insect Physiology, 46: 429-437.

-löfstedt, C., herrebout, W. and Menken, S.B.J. 1991. Sex pheromones and their potential role in the evolution of sex reproductive isolation in small ermine moths (Yponomeutidae). Chemoecology, 2: 20–28.

-Johnston, K.A., Lee, M.J., Gatehouse, J.A. and Anstee, J.H., 1991. The partial purification and characterization of serin protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. Insect Biochemistery, 21: 389-397.

Study on biochemical properties of some digestive proteases of cherry ermine moth, *Yponomeuta padella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae)

M. Ajamhassani[1*]

1*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
E-mail: shahroodm@gmail.com

Received: 16.08.2020 Accepted: 03.02.2021

Abstract

Cherry ermine moth, *Yponomeuta padella* (L.) (Lep.: Yponomeutidae) is a major pest of *Cratagus monogyna* in central Zagros region with serious damage to the forest tree species in recent years. Larvae feed the leaves by making web structure on them leading to reduce of photosynthetic rate by absorbing the pollutant and fungi. In this study, biochemical properties of some digestive proteases of the 5th instar larvae of cherry ermine moth were studied in its alimentary canal .Whole of gut was used in experiments. After dissecting, guts were homogenized and centrifuged with distilled water. Supernatant was used in enzyme activity studies. The optimal pH for protease activity in alimentary canal were found 11 in presence of Azocasein and hemoglobin as general substrates. The optimal pH for trypsin and chymotrypsin activity were obtained 10, 11 and 11, respectively in presence of BApNA and SAAPPpNA as their specific substrates. Optimal temperature for protease activity was 25-30ºC. The inhibitory effect of inhibitors on enzyme activity was sharply. The results showed that the highest inhibition rate in proteolytic activity caused by TLCK. Inhibition percentage TPCK and PMSF was 34.15 and 21.34% respectively. Study on the physiological characteristics of digestive enzyme and their inhibitors was done for first time. *Y. padella* is a serious pest of *Cratagus monogyna* and *Cerasus* sp. It seems this research could be beneficial for its management.

Key words: Trypsin and chymotrypsin, Protease inhibitor, Cherry ermine moth.