

粘虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶活性的敏感性研究

黄青春, 卓 军, 曹 松, 钱旭红\*

(华东理工大学药学院药物化工研究所, 上海 200237)

摘要: 研究了不同酶反应缓冲体系、pH 值、氯离子浓度以及噁唑哒嗪对 5 龄 2 日粘虫 *Pseudaletia separata* Walker 中肠  $\alpha$ -淀粉酶活性的影响。结果表明, 乙酸-乙酸钠缓冲体系 (pH 5.8) 和磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲体系 (pH 8.0) 有利于增强  $\alpha$ -淀粉酶活性, 比活力最高分别达到 4.49 和 4.97。在乙酸-乙酸钠缓冲体系 (pH 5.8) 中, 5、10、20、40 和 80 mmol/L 氯离子浓度引起  $\alpha$ -淀粉酶活性呈现先减弱后增强的变化规律, 而在磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲体系 (pH 8.0) 中仅呈现减弱的趋势。1.4 mmol/L 噁唑哒嗪对  $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制率可达 70%, 但抑制程度随着反应体系中蛋白含量的增加而逐渐降低。

关键词: 粘虫;  $\alpha$ -淀粉酶; 酶活性; pH 值; 氯离子; 噁唑哒嗪

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)02-0189-05

### Activity sensitivity of midgut $\alpha$ -amylase in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae)

HUANG Qing-Chun, ZHUO Jun, CAO Song, QIAN Xu-Hong\* (Institute of Pesticides and Pharmaceuticals, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** The effects of different enzymatic buffers, pH value, chloridion, and oxadiazolyl pyridazinone on the midgut  $\alpha$ -amylase activity in 5th-instar 2nd-day larvae of *Pseudaletia separata* Walker were assayed. The results showed that sodium acetate buffer (pH 5.8) and phosphate buffer (pH 8.0) were most beneficial to  $\alpha$ -amylase activity in their buffer series with different pH value, with the maximal activity as high as 4.49 and 4.97 U respectively. The activities against 5, 10, 20, 40, 80 mmol/L chloridion showed first decreasing and then increasing in sodium acetate buffer (pH 5.8), whereas they showed only gradually decreasing in phosphate buffer (pH 8.0). Inhibition of 1.4 mmol/L oxadiazolyl pyridazinone against  $\alpha$ -amylase activity was as high as 70 percent, and thereafter gradually decreased with the increase of  $\alpha$ -amylase protein.

**Key words:** *Pseudaletia separata*;  $\alpha$ -amylase; enzyme activity; pH value; chloridion; oxadiazolyl pyridazinone

昆虫对食物的消化和有效利用程度影响着自身的生长发育 (Slansky and Scriber, 1985), 抑制肠道蛋白酶和淀粉酶等的活性, 可降低许多鳞翅目昆虫肠道综合生理功能的效率 (Timmins and Reynolds, 1992; Terra and Ferreira, 1994)。 $\alpha$ -淀粉酶是昆虫消化系统中重要的消化酶, 它将昆虫体内的淀粉、糖原和多糖衍生物水解成为可溶性双糖麦芽糖及单糖葡萄糖和果糖等, 参与体内的能量代谢。目前, 有关昆虫  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的报道, 大多是植物源成分如凝集素类 (lectin-like)、 $\gamma$ -噁呤霉素类 ( $\gamma$ -purothionin) 和奇甜蛋白类 (thaumatin-like) 等抑制剂 (Franco *et al.*,

2002), 而有关人工合成的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂报道较少。同时作者发现, 在众多的  $\alpha$ -淀粉酶研究文献中, 有关  $\alpha$ -淀粉酶活性的测定多采用 3,5-二硝基水杨酸法或 I/KI 法, 但酶反应缓冲体系变化多样, 如柠檬酸钠缓冲液 (pH 5.0) (Valencia *et al.*, 2000)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5、9.5) (Nagaraju and Abraham, 1995; Biggs and McGregor, 1996)、乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 5.5) (Noelting and Bernfeld, 1948) 以及磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 5.8) (Ishimoto *et al.*, 1999) 等, 由不同缓冲体系所测定的结果存在一定的差异性。我们以粘虫 *Pseudaletia separata* Walker 幼

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (2003CB114402); 国家自然科学基金项目 (30400295)

作者简介: 黄青春, 男, 1969 年 8 月生, 博士, 副教授, E-mail: qchuang@ecust.edu.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 021-64253140-8007; E-mail: xhqian@ecust.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-04-14; 接受日期 Accepted: 2005-06-28

虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶为研究对象,研究不同酶反应缓冲体系、pH 值、氯离子( $\text{Cl}^-$ )浓度等对酶活性的影响,以及噁唑类药物对酶的抑制作用,探讨粘虫  $\alpha$ -淀粉酶的敏感性特征和合适的酶反应缓冲体系,用于比较不同昆虫  $\alpha$ -淀粉酶的生物学多样性特征,为针对昆虫  $\alpha$ -淀粉酶的新型抑制剂创制提供一些理论基础和实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试昆虫

粘虫在室温( $23 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 70%~80%,光周期 16L:8D 条件下采用新鲜玉米苗(maize seedling)饲养,以 5 龄 2 日幼虫用于实验。

### 1.2 供试药剂

3,5-二硝基水杨酸、可溶性淀粉、牛血清蛋白、麦芽糖等均为生化试剂,磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙酸钠等其他试剂均为分析纯,从上海化学试剂公司购置,噁唑哒嗪原粉(93%)其化学名称为 2-叔丁基-4-氯-5-[5-(4-氯苯基)-2-(1,3,4-噁二唑)甲氧基]3(2H)哒嗪酮,由本所合成和纯化,用 N,N-二甲基甲酰胺将其溶解成所需浓度。

### 1.3 酶源的制备

参照 Valencia 等(2000)方法进行酶源制备。挑选个体大小一致的 5 龄 2 日粘虫幼虫 50 头,在冰浴上解剖取其中肠,置于 5 倍体积的 20 mmol/L NaCl 水溶液(含 0.1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ )中冰浴匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\times$ g 离心 10 min,取上清液,冻干成粉末状,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏,作为酶源备用。

### 1.4 方 法

**1.4.1  $\alpha$ -淀粉酶活性的测定:**采用 Stellmach 等(1988)的 3,5-二硝基水杨酸法,以可溶性淀粉作为底物进行测定。取 0.5 mL 酶液预先置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 中水浴 15 min,加入同样预热到 25 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.5 mL 20 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(简称磷酸盐缓冲液,pH 5.8,含 1% 可溶性淀粉、20 mmol/L NaCl 和 0.1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ),反应 3 min 后,加入 3.0 mL 3,5-二硝基水杨酸显色剂(1.0% g/V)终止反应。反应液在沸水中显色 5 min 后,以流水冷却,加蒸馏水定容至 10 mL。在紫外分光光度计上测定吸光值  $\text{OD}_{512\text{nm}}$ 。每处理重复 5 次实验。以麦芽糖作标准曲线。酶的比活力单位用  $\text{mg}(\text{mg}\cdot\text{min})$  表示。

**1.4.2 不同 pH 缓冲体系对酶活性的影响:**按 1.4.1 节方法测定  $\alpha$ -淀粉酶活性,将其中磷酸盐缓

冲液分别用 pH 3.6、4.6 和 5.8 的乙酸-乙酸钠缓冲液(简称乙酸钠缓冲液)及 pH 5.8、6.9 和 8.0 的磷酸盐缓冲液进行替代,比较不同 pH 值的缓冲体系中  $\alpha$ -淀粉酶的活性。

**1.4.3 不同氯离子浓度对酶活性的影响:**分别选取乙酸钠缓冲液(pH 5.8)和磷酸盐缓冲液(pH 8.0),将 1.4.1 节反应体系中氯离子浓度分别设定为 5、10、20、40 和 80 mmol/L 系列梯度,其他均相同,测定氯离子对  $\alpha$ -淀粉酶活性的影响。

**1.4.4 不同浓度噁唑哒嗪对酶活性的影响:**参照 Ishimoto 等(1999)方法,将酶液、药剂和可溶性淀粉的体积比设定为 2:1:2,体系中噁唑哒嗪的浓度均为 1.4 mmol/L,反应体系中  $\alpha$ -淀粉酶蛋白的用量分别设定为 22.8、45.6、91.1、182.2 和 364.4 ng,其他均与 1.4.1 节相同。以不含药剂的相同处理作为对照,计算酶活性抑制率(%)。

### 1.5 蛋白质浓度测定

采用 Lowry 等(1951)的方法进行测定。

### 1.6 数据处理

数据采用 SPASS10.0 软件进行 ANOVA 方差分析、LSD( $P < 0.05$ )多重检验等统计分析,数值采用平均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 pH 值缓冲条件下 $\alpha$ -淀粉酶活性

分别以 3 种不同 pH 值的乙酸钠缓冲液和磷酸盐缓冲液作为缓冲体系测得  $\alpha$ -淀粉酶活性,结果见图 1。从图中可以看出,在两个不同类型的缓冲体系中,随着 pH 值的增大, $\alpha$ -淀粉酶的活性都逐渐增强,其中  $\alpha$ -淀粉酶活性在乙酸钠缓冲液(pH 5.8)和磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中达到最大,比活力分别为 4.49 和 4.97。结果表明  $\alpha$ -淀粉酶活性大小与缓冲体系的 pH 值密切相关。但是  $\alpha$ -淀粉酶活性在乙酸钠缓冲体系(pH 5.8)中显著高于磷酸盐缓冲体系(pH 5.8)( $P < 0.05$ ),这也许与  $\alpha$ -淀粉酶的精氨酸( $\text{Arg}^{+}$ )催化中心的性质有关(Franco *et al.*, 2002),但也说明在相同 pH 条件下缓冲液种类极大地影响  $\alpha$ -淀粉酶活性。

### 2.2 氯离子对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响

在乙酸钠缓冲体系(pH 5.8)中测定不同浓度氯离子对酶活性的影响,结果见图 2。随着氯离子浓度的升高, $\alpha$ -淀粉酶活性呈现先减弱后增强的变化规律,氯离子浓度为 5 mmol/L 和 80 mmol/L 时  $\alpha$ -淀

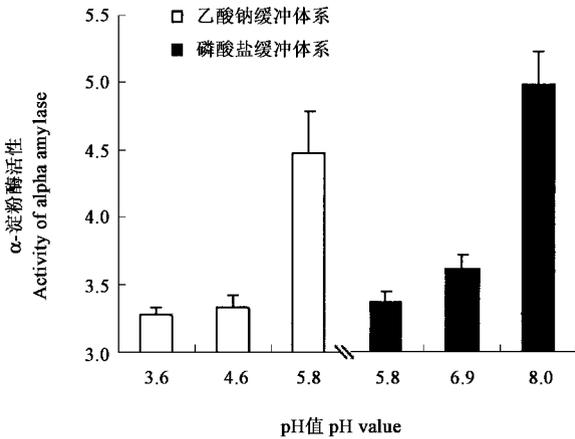


图 1 不同 pH 值缓冲体系中粘虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶的活性

Fig. 1 Activity of *P. separata* midgut  $\alpha$ -amylase in relation to pH value

粉酶活性基本接近,比活力分别为 4.73 和 4.60。当反应体系中氯离子浓度为 20 mmol/L 时, $\alpha$ -淀粉酶活性最弱,比活力为 3.71。

在磷酸盐缓冲体系(pH 8.0)中测定不同浓度氯离子对酶活性的影响,结果见图 2。随着氯离子浓度的增加, $\alpha$ -淀粉酶活性基本呈现逐渐下降的趋势。氯离子浓度为 5 mmol/L 时, $\alpha$ -淀粉酶活性最强,比活力为 4.25;当氯离子浓度为 80 mmol/L 时, $\alpha$ -淀粉酶比活力降到 1.97。

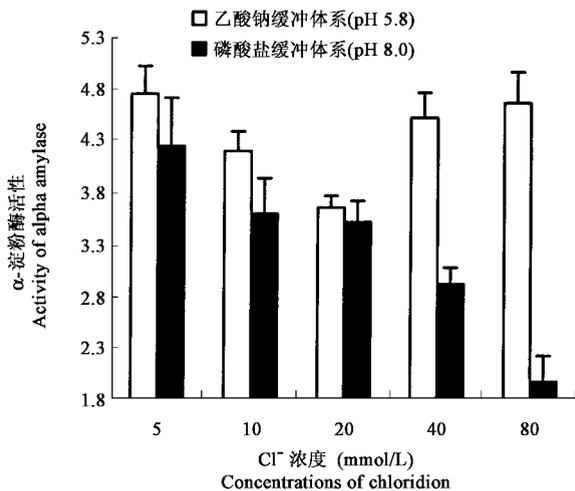


图 2 不同缓冲体系中氯离子浓度对粘虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶活性的影响

Fig. 2 Effect of chloridion concentration on *P. separata* midgut  $\alpha$ -amylase activity in different buffer systems

### 2.3 噁唑嗪对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响

测定结果见图 3。随着反应体系中蛋白含量的增加, $\alpha$ -淀粉酶活性亦逐渐增强,当  $\alpha$ -淀粉酶蛋白含

量为 364.4 ng 时,其活性达 6.26 比活力单位。同时还可以看出,1.4 mmol/L 噁唑嗪对  $\alpha$ -淀粉酶活性具有一定的抑制作用,在  $\alpha$ -淀粉酶蛋白含量为 22.78 ng 时,其活性抑制率接近 70%,但  $\alpha$ -淀粉酶的抑制程度随着反应体系中蛋白含量的增加而逐渐降低,当反应体系中蛋白含量为 364.4 ng 时, $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制率降低至约为 21.3%。

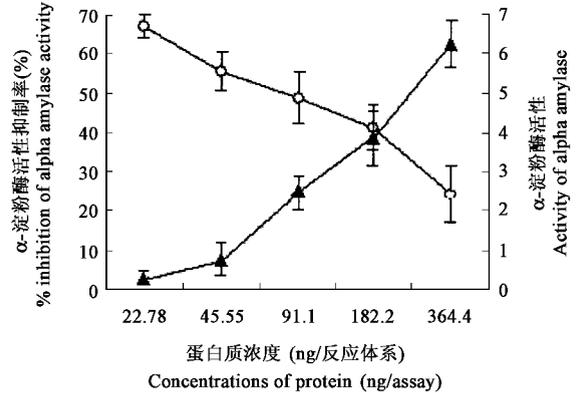


图 3 不同蛋白含量的反应体系中噁唑嗪对  $\alpha$ -淀粉酶活性的影响

Fig. 3 Changes of inhibitory activity ( $\circ$ ) of oxadiazolyl pyridazinone (1.4 mmol/L) and activity of alpha amylase ( $\blacktriangle$ ) corresponding to different concentrations of the protein

## 3 讨论

$\alpha$ -淀粉酶是昆虫消化系统中重要的消化酶,抑制其生物活性,则能够降低昆虫体内糖类的同化作用,从而抑制昆虫的生长发育,起到控制害虫危害作物的目的(Ishimoto *et al.*, 1999)。昆虫  $\alpha$ -淀粉酶的研究受到许多研究者的重视,如:Biggs 和 McGregor (1996)研究新西兰草金龟 *Costelytra zealandica* 淀粉酶作为筛选淀粉酶抑制剂的基础;Titarenko 和 Chrispeels (2000)通过 RT-PCR 技术克隆了玉米根叶甲 *Diabrotica virgifera*  $\alpha$ -淀粉酶的 cDNA,用于  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的筛选研究;Prigent 等(1998)采用离子交换层析法部分纯化了果蝇 *Drosophila virilis* 和 *D. repleta* 的  $\alpha$ -淀粉酶,用于研究不同生境中两种果蝇的代谢进化关系。

目前, $\alpha$ -淀粉酶活性的测定多采用 3,5-二硝基水杨酸法或 I/KI 法,但酶反应缓冲体系多种多样,如柠檬酸钠缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、Tris-甘氨酸缓冲液、以及硼酸盐缓冲液等(Nagaraju and Abraham,

1995; Biggs and McGregor, 1996; Prigent *et al.*, 1998; Valencia *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001)。另外, 酶反应缓冲体系的最适 pH 值从 2.6 至 9.5, 氯离子浓度从 0.14 至 50.0 mmol/L。作者推测, 诸多研究中所用的酶活性测定条件可能与供试昆虫种类的酶特异性和针对性有关, 不同昆虫的  $\alpha$ -淀粉酶之间可能存在着不同性质同工酶的缘故。如: Valencia 等(2000)报道咖啡果小蠹螟 *Hypothenemus hampei* 中肠  $\alpha$ -淀粉酶活性的最适 pH 值范围是 4.0 ~ 7.0; Nagaraju 和 Abraham(1995)报道在 pH 9.5 的 Tris-HCl 和 Tris-甘氨酸两种缓冲体系中, 印度柞蚕 *Antheraea mylitta* 消化液中的淀粉酶活性达到最大。作者研究发现, 粘虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶在乙酸钠缓冲体系(pH 5.8)和磷酸盐缓冲体系(pH 8.0)中活性相对较高, 且在磷酸盐缓冲体系(pH 8.0)中活性高于前者, 但是否为最适测定条件和最大酶活性, 尚有待进一步研究。

许多研究报道, 氯离子能够激活昆虫  $\alpha$ -淀粉酶活性(Buonocore *et al.*, 1976; Terra *et al.*, 1977; Baker and Woo, 1985), 但 Podoler 和 Appelbaum(1971)报道氯离子能够抑制绿豆象 *Callosobruchus chinensis*  $\alpha$ -淀粉酶活性; Nagaraju 和 Abraham(1995)研究发现, 反应体系中氯离子存在与否, 都不影响印度柞蚕消化液淀粉酶的  $K_m$  值。作者研究发现, 氯离子在不同的测定体系中对粘虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶活性具有不同的作用规律。随着氯离子浓度的升高, 在乙酸钠缓冲体系(pH 5.8)中  $\alpha$ -淀粉酶活性呈现先抑制后增强的变化规律, 而在磷酸盐缓冲体系(pH 8.0)中  $\alpha$ -淀粉酶活性呈现出抑制程度逐渐增大的趋势。这种变化规律是否与粘虫  $\alpha$ -淀粉酶的特异性有关, 尚需进一步证实和比较研究。

$\alpha$ -淀粉酶在昆虫体内的存在形式决定于其食物的性质。Titarenko 和 Chrispeels(2000)研究发现, 用人工饲料饲养的玉米根叶甲幼虫, 其  $\alpha$ -淀粉酶活性很低, 而采用玉米苗饲养的玉米根叶甲幼虫, 其  $\alpha$ -淀粉酶活性有很大的提高。菜豆 *Phaseolus vulgaris* 中  $\alpha$ AI-1 对咖啡果小蠹螟  $\alpha$ -淀粉酶活性具有很大的抑制作用(Valencia *et al.*, 2000), 却能够诱导巴西豆象 *Zabrotes subfasciatus* 体内  $\alpha$ -淀粉酶活性(Silva *et al.*, 2001)。本实验所用粘虫幼虫一直以玉米苗饲养, 人工饲料是否影响其体内  $\alpha$ -淀粉酶活性, 值得进一步研究。

作者研究还发现, 外源噁唑类药物对粘虫幼虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶活性显示出一定的抑制作用, 尽管该抑制作用随着反应体系中蛋白含量的增加而逐渐降

低, 但该结果也许说明了噁唑类药物对粘虫幼虫具有拒食作用的部分原因(Huang *et al.*, 2003), 提示在研究昆虫拒食生理的同时应重视昆虫饲料对  $\alpha$ -淀粉酶的诱导或抑制作用。该药物的具体作用机理还需进一步的深入研究。

生物体内许多功能性酶都具有离子激性的特性, 如超氧化物歧化酶(SOD)等, 昆虫  $\alpha$ -淀粉酶也具有类似的性质。Nagaraju 和 Abraham(1995)还报道印度柞蚕消化液中的淀粉酶是  $Ca^{2+}$  依赖性胞内酶(endoenzyme)。Prigent 等(1998)发现  $Ca^{2+}$ 、 $K^+$  和  $Na^+$  能够增强果蝇  $\alpha$ -淀粉酶的淀粉分解活性, 而  $Ba^{2+}$  仅能增强果蝇 *D. repleta*  $\alpha$ -淀粉酶的活性, 具有一定的选择性。粘虫幼虫中肠  $\alpha$ -淀粉酶是否具有阳离子激性, 尚需进一步研究。随着对  $\alpha$ -淀粉酶研究的不断深入, 昆虫  $\alpha$ -淀粉酶有望成为新农药靶向性创制设计的潜在实用靶标。

**致谢** 感谢中国科学院上海植物生理生态研究所唐振华研究员审阅和修改本文。

## 参考文献 (References)

- Baker JE, Woo SM, 1985. Purification, partial characterization and postembryonic levels of amylases from *Sitophilus oryzae* and *Sitophilus granaries*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2: 415 - 428.
- Biggs DR, McGregor PG, 1996. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 69 - 75.
- Buonocore V, Poerio E, Silano V, Tomasi M, 1976. Physical and catalytic properties of  $\alpha$ -amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae. *Biochem. J.*, 153: 621 - 625.
- Franco OL, Rigden DJ, Melo R, Grossi-de-Sá MF, 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.*, 269: 397 - 412.
- Huang QC, Qian XH, Song GH, Cao S, 2003. The toxic and antifeedant activity of 2H-pyridazin-3-one-substituted 1,3,4-oxadiazoles against the armyworm *Pseudaletia separata* (Walker) and other insects and mites. *Pest Manag. Sci.*, 59: 533 - 539.
- Ishimoto M, Yamada T, Kaga A, 1999. Insecticidal activity of an alpha amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of alpha amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1432: 104 - 112.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265 - 275.
- Nagaraju J, Abraham EG, 1995. Purification and characterization of digestive amylase from the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B: 201 - 209.

- Noelting G, Bernfeld P, 1948. Sur les enzymes amylolytiques. III. La  $\beta$ -amylase : dosage d'activité et contrôle de l'absence d' $\alpha$ -amylase. *Helv. Chim. Acta*, 31 : 286 – 290.
- Podoler H, Appelbaum SW, 1971. The alpha amylase of beetle, *Callosobruchus chinensis*. *Biochem. J.*, 121 : 321 – 325.
- Prigent S, Matoub M, Rouland C, Cariou ML, 1998. Metabolic evolution in  $\alpha$ -amylases from *Drosophila virilis* and *D. repleta*, two species with different ecological niches. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B : 407 – 412.
- Silva CP, Terra WR, Xavier-Filho J, Grossi-de-Sá MF, Lopes AR, Pontes EG, 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* with emphasis on  $\alpha$ -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29 : 355 – 366.
- Silva CP, Terra WR, de Sá MFG, Samuels RI, Isejima EM, Bifano TD, Almeida JS, 2001. Induction of digestive  $\alpha$ -amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera : Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor I. *J. Insect Physiol.*, 47 : 1 283 – 1 290.
- Slansky FJr, Scriber JM, 1985. Food consumption and utilization. In : Kerkut GA, Gilbert LI eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Oxford : Pergamon Press. 87 – 163.
- Stellmach B, Mitarb U, von Gottschick W, 1988. Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin. Darmstadt : Steinkopff. 8. [ B.施特尔马赫著, 钱嘉渊译, 1992. 酶的测定方法. 北京 : 中国轻工业出版社. 8 ]
- Terra WR, Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes : properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B (1) : 1 – 62.
- Terra WR, Ferreira C, De Bianchi AG, 1977. Action pattern, kinetical properties electrophoretic studies on an alpha-amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 56B : 201 – 209.
- Timmins WA, Reynolds SE, 1992. Aradirachtin inhibits secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars : reduced growth due to impaired protein digestion. *Entomol. Exp. Appl.*, 63 : 47 – 54.
- Titarenko E, Chrispeels M, 2000. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the  $\alpha$ -amylases of the Western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 : 979 – 990.
- Valencia A, Bustillo AE, Ossa GE, Chrispeels MJ, 2000.  $\alpha$ -amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hamper*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30 : 207 – 213.

(责任编辑 : 黄玲巧)