

Milanović S., Lazarević J., Mrdaković M., Vlahović M., Miletić Z. 2008. *Host plant effect on the activity of digestive enzymes of the gypsy moth caterpillars*. Bulletin of the Faculty of Forestry 98: 127-142.

Слободан Милановић
Јелица Лазаревић
Марија Мрдаковић
Милена Влаховић
Зоран Милетић

UDK: 630*453+131.3:595.78 *Lymantria dispar*
Оригинални научни рад

ЕФЕКАТ БИЉКЕ ХРАНИТЕЉКЕ НА АКТИВНОСТ ДИГЕСТИВНИХ ЕНЗИМА ГУСЕНИЦА ГУБАРА

Извод: Хранљива вредност лишћа биљке хранитељке, као и садржај продуката секундарног метаболизма, утичу на параметре који карактеришу раст и развиће инсеката. Овај утицај се може остварити преко ензима варења од чије активности зависи степен искоришћења унете хране. У раду су приказани резултати испитивања утицаја исхране лишћем три врсте храста - цер (*Quercus cerris*), лужњак (*Q. robur*) и китњак (*Q. petraea*), на раст, развиће и активност дигестивних ензима ларви губара (*Lymantria dispar* L.) IV ступња. У односу на ларве храњене лишћем цера и лужњака, ларве храњене китњаком су имале најмању телесну масу, најмањи садржај протеина и највећу специфичну активност протеаза у средњем цреву. Специфична активност амилазе је била значајно смањена у средњем цреву ларви храњених лужњаком док биљка хранитељка није утицала на трајање развића ларви до уласка у IV ступањ. Како би се објаснили добијени резултати, истовремено је вршена анализа хемијског састава лишћа којим су храњене гусенице током II и IV ларвеног ступња.

Кључне речи: губар, храстови, дигестивни ензими

HOST PLANT EFFECT ON THE ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES OF THE GYPSY MOTH CATERPILLARS

Abstract: Insect growth and development depend on nutritive value and secondary metabolite content of their host plants. This influence may be exerted through changing the activity of digestive enzymes which further affects efficiency of conversion of

мр Слободан Милановић, истраживач сарадник, Института за шумарство, Београд
др Јелица Лазаревић, виши научни сарадник, Института „Синиша Сijanковић“, Београд
мр Марија Мрдаковић, истраживач сарадник, Института „Синиша Сijanковић“, Београд
мр Милена Влаховић, истраживач сарадник, Института „Синиша Сijanковић“, Београд
др Зоран Милетић, научни сарадник, Института за шумарство, Београд

ingested food. This paper represents the results of investigation of feeding effects on the leaves of three oak species (*Quercus cerris*, *Q. robur* and *Q. petraea*) on growth, development and digestive enzyme activities of the 4th instar gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L.). Compared to larvae fed on *Q. cerris* and *Q. robur* leaves, larvae fed on *Q. petraea* exhibited the lowest body mass, midgut protein content and specific protease activity. Specific amylase activity was significantly reduced in the midguts of larvae fed on *Q. robur* while host plant did not affect larval duration upon molting into the 4th instar. Concomitant chemical analyses of leaves given to the 2nd and 4th instar larvae was carried out in order to explain the obtained results.

Key words: gypsy moth, oaks, digestive enzymes

1. УВОД

Инсекти који се хране лишћем спадају у групу која храну троши нерационално. Ларве својим мандибулама откидају мале фрагменте са маргина листа. На тај начин оне разарају многе од биљних ћелија чији се садржај раствара и бива сварен у њиховом цреву. Међутим, многе ћелије, неоштећене мандибулама, пролазе кроз цревни канал и појављују се у фецесу са очуваним садржајем.

По уношењу, храна бива изложена дејству дигестивних ензима пљувачних жлезда и секретима самог цревног тракта. Угљени хидрати, масти и протеини, од којих се састоји храна, бивају разложени на мање молекуле дејством ензима варења и тако добијени продукти бивају апсорбовани у хемолимфу инсекта (Wigglesworth, 1964).

Раст и репродукција инсеката не зависе само од присуства и количине хранљивих материја, већ и од баланса есенцијалних компоненти у храни и расподеле њиховог садржаја током развића. Азот има централну улогу у метаболичким процесима везаним за раст и развиће свих организама (Mattson, 1980). Просторно и временско варирање садржаја азота (Fennу, 1970) у лишћу биљке хранитељке утиче на количину унете хране, варење и степен њеног искоришћења. Упркос једнаком просечном дневном уносу, ларве губара које су изложене условима исхране са променљивим садржајем азота, имају редуковану масу лутки и продужено развиће у односу на оне које су у храни имале константан садржај овог елемента (Stockhoff, 1993). Смањење садржаја протеина у храни доводи до продуженог развића и смањења масе лутки губара. Компензаторни одговор на смањени садржај протеина је повећање количине унете хране што уз повећани садржај продуката секундарног метаболизма доводи до негативних последица по раст и развиће и смањене отпорности инсеката на патогене. За гусенице губара је карактеристичан мали проценат искоришћења азота који износи око 16% (Lovett *et al.*, 1998, Lovett *et al.*, 2002) и алкалан рН средњег црева који представља адаптацију на храну богату танинима (Vegenbaum, 1980), што је карактеристично за лишће храстова.

Хемијски састав лишћа биљке хранитељке, пре свега садржај танина, преко ефекта на активност дигестивних ензима од којих зависи степен искоришћења унете

хране, утиче на трајање развића и репродуктивни потенцијал губара. Промена односа различитих ензима варења и њихова хиперпродукција или смањење активности доводе до поремаћаја метаболизма и последично до смањеног раста ларви. Од хранљиве вредности унете хране зависи и синтеза вителогенина код гусеница губара те се ови негативни утицаји, преко квалитета јаја, манифестују и у наредној генерацији (Rossiter *et al.*, 1998). Дакле, ефекат биљке хранитељке на развиће губара се не може потпуно разумети без схватања утицаја биљке на конзумацију и варење.

Бројни радови на губару су показали утицај биљки хранитељки на преживљавање, развиће, репродукцију као и нутритивне индексе губара (конзумацију, сварљивост и степен искоришћења хране) (Barbosa, 1978, Barbosa *et al.*, 1986, Stoyenoff, 1994, Lazarević *et al.*, 2002). Већина радова се односи на утицај неповољних биљки хранитељки и штетних алелохемикалија док су ретки радови који пореде ефекте нутритивних једињења на губара (Stockhoff, 1993), а радова који испитују ефекат хемијског састава лишћа на његову дигестивну физиологију готово да нема (Лазаревић, 1994, Лазаревић *et al.*, 1994, Лазаревић, 2000, Lazarević *et al.*, 2003). Циљеви истраживања изнетих у овом раду су били да се испита утицај три различите врсте храста (цер, лужњак и китњак) као повољних биљки хранитељки на масу, трајање развића и конзумацију хране код ларви губара IV ступња као и утицај исхране на активност дигестивних ензима амилазе и протеазе.

Од есенцијалног значаја за разумевање утицаја биљке хранитељке на развиће дефолијатора је хемијски састав лишћа у време исхране појединих ларвених ступњева. Код старијих ларвених ступњева инсеката, расте толерантност према одбрамбеним и антинутритивним материјама биљака док су млађи ступњеви посебно осетљиви на ове материје. Хемијски састав лишћа којим се хране рани ларвени ступњеви (I и II) је веома значајан јер битно утиче на дужину постембрионалног развића и број пресвлачења (Leonard, 1970). С друге стране, током IV ларвеног ступња почиње акумулација хранљивих материја које се током оогензе користе у синтези вителогенина чиме се посредно преко материнског ефекта утиче на потомство у наредној генерацији (Rossiter *et al.*, 1998). У циљу објашњења утицаја биљки хранитељки на раст, развиће и дигестивну физиологију губара, у овом раду су изнети и резултати испитивања хемијског састава лишћа три врсте храстова којим су се ларве губара храниле током другог и четвртог ступња.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

2.1. Услови гајења губара

Легла коришћена у огледу су сакупљена на локалитету Опово (ШГ „Банат”, Панчево, ШУ Зрењанин, ГЈ “Горње Потамишје”, одељења 72а и 73а) у плантажи евроамеричке тополе (*Populus x euroamericana*).

Јаја су прво механички очишћена од длачица, а потом су површински дезинфикована потапањем у 0,1% раствор натријум хипохлорита у трајању од 5 минута. После тога она су 10 минута испирани дестилованом водом и на крају осушена. Витална јаја из 25 легала су помешана и стављена на пиљење у епрувете. После пиљења, за сваку изабрану врсту храста (цер, лужњак и китњак), издвојено је по 50 гусеница. До III ларвеног ступња гусенице су гајене групно, по 10 индивидуа у једној стакленој Петри посуди пречника 15 *cm*. Од III ступња па до жртвовања гусенице су гајене појединачно у Петри посудама пречника 10 *cm*. Сваког дана гусенице су храњене свежим лишћем. Праћење развића губара обављено је у контролисаним условима клима коморе на температури од 25°C, фотопериоду 14/10 (светло/тама) и релативној влажности 70%.

2.2. Одређивање параметара раста и развића

Свакодневно је праћено пиљење и пресвлачење ларви и за сваку ларву је одређен број дана од пиљења до жртвовања. Маса ларви је мерена трећег дана IV ларвеног ступња уочи жртвовања.

2.3. Биохемијске методе

Жртвовање гусеница се одвијало трећег дана по пресвлачењу у четврти ступањ. Дисекцијом је одстрањивано средње црево на пулту са ледом. Измерено је средње црево и израчунат проценат масе црева у односу на масу ларве. Овај параметар је индиректни показатељ конзумације хране (Jindra, Sehnal, 1989). Груби хомогенати средњег црева су добијени након хомогенизације у физиолошком раствору (100 *mg* ткива на 1 *mL* физиолошког раствора) и центрифугирања (10.000 *g*) у трајању од 10 минута.

Активност амилазе је одређена по методи Bernfeld-a (1955), модификовано по Doane-y (1967). После 10 минута инкубације хомогената црева у Gly-NaOH пуферу рН 9,6 додаје се супстрат скроб претходно растворен и прокуван у пуферу чиме почиње ензиматска реакција (финална концентрација скроба у реакционој смеси је 1%). После 30 минута на 45°C реакција се прекида додавањем Самнеровог реагенса. После 5 минута кувања на 100°C и хлађења, реакциона смеша је разблажена са дестилованом водом. Интензитет црвене боје је одређиван спектрофотометријски на таласној дужини од 550 *nm*. Због спонтане разградње скроба као и могућег присуства малтозе у скробу, апсорпција је мерена и у одсуству ензима при чему је у реакционој смеси хомогенат црева замењен пуфером. Специфична активност амилазе је одређена као однос апсорпција на 550 *nm* и апсорпције на 595 *nm* на којој је одређивана количина протеина.

Активност протеазе је одређена Куницовом методом (Kunitz, 1947). Протеолитичка активност је одређивана мерењем апсорпције на 280 *nm* чији интензитет зависи од количине ароматичних аминокиселина (Trp, Tyr) ослобођених разградњом

супстрата казеина. Хомогенат црева је инкубиран 5 минута у Gly-NaOH пуферу рН 10, после чега се додаје супстрат казеин претходно растворен и прокуван у пуферу (финална концентрација у реакционој смеши је 1%). После 1 h на 40°C, реакција је прекинута додавањем 10% трихлор-сирћетне киселине која таложи неразграђени казеин док у расатвору остају аминокиселине. Поред проба са хомогенатом црева прављене су и пробе без ензима (бланк супстрат) и без супстрата (бланк ензим). Хомогенат црева у бланк супстрату и супстрат у бланк ензиму су замењени пуфером. Бланк супстратом се врши корекција апсорпције због спонтане разградње казеина и због присуства ароматичних аминокиселина у казеину, а бланк ензимом се врши корекција због присуства ароматичних аминокиселина у хомогенату црева. Таложење се одвијало у фрижидеру на 4°C после чега су пробе филтриране кроз филтер папир „Schleicher & Schuell 2034A”. У филтрату је мерена апсорпција на 280 nm. Специфична протеолитичка активност је изражена као однос апсорпција на 280 nm и апсорпције на 595 nm на којој је одређивана количина протеина.

Количина протеина у средњем цреву губара одређена је по методи Бредфорд-а (1976). У узорак или стандард (говеђи серум албумин) се додаје редестилована вода и концентрован Бредфордов реагенс. После 5 минута врши се читавање на спектрофотометру Shimadzu UV-160 на 595 nm. Количина протеина се одређује на основу стандардне праве за говеђи серум албумин и изражава се у μg по 1 mg цревног ткива.

2.4. Хемијске анализе лишћа

Лишће, којим су храњене гусенице губара, је узимано увек са истих стабла у Арборетуму шумарског факултета у Београду. Хемијске анализе лишћа, које су подразумевале утврђивање садржаја угљеника и азота, рађене су када су гусенице биле у другом и четвртом ларвеном ступњу. Узорци лишћа су пре анализе сушени 48 сати на температури од 40°C. Укупни угљеник је одређиван методом Ansttet-а у модификацији Пономарева и Плотникова (1975) мокрим сагоревањем у CrO_3 и H_2SO_4 . Укупан азот у лишћу је одређиван по методи Kjeldah-а. Разарање узорка вршено је у сумпорној киселини уз присуство катализатора (CuSO_4 и K_2SO_4 у односу 1:3), до превођења свих органских облика азота у амонијачни. Дестилација амонијака је вршена на Kjeldah-овој апаратури, а дестилат је хватан у борној киселини (Цамић, 1966).

2.5. Статистичке методе

Статистичка обрада података је извршена уз помоћ одговарајућег софтверског пакета. Одређиване су средње вредности (\bar{X}) и стандардне грешке ($\pm SE$) за свако посматрано обележје. Анализа варијансе и тест мултиплних рангова су рађени на логаритамски трансформисаним вредностима испитиваних особина осим за удео црева за који је узета аркус-синус трансформација.

3. РЕЗУЛТАТИ

3.1. Утицај различитих врста хрстова на раст и развиће губара

У табели 1 су приказани резултати одређивања параметара раста и развића губара. Између средњих вредности масе средњег црева (*MC*) жртвованих гусеница које су гајене на лишћу испитиваних врста хрстова постоје статистички значајне разлике ($F=9,89$, $p=0,0003$). Ове разлике су углавном последица разлика у величини ларви. Када је одређена релативна маса црева као проценат масе црева у односу на масу ларве, добијено је да нема разлика између ларви храњених различитим врстама хрстова што указује да испитиване биљке хранитељке не утичу на конзумацију хране.

Утврђено је постојање статистички значајних разлика ($F=64,69$, $p<0,0000$) између средњих вредности масе (*ML*) добијених гајењем на лишћу различитих врста хрстова. Између средњих вредности масе жртвованих гусеница гајених на лишћу цера и лужњака не постоје статистички значајне разлике. Између ове две групе и просечне масе гусеница гајених на лишћу китњака, постоје статистички значајне разлике. Ларве гајене на китњаку имају мању телесну масу у односу на ларве гајене на цери и лужњаку.

Између средњих вредности трајања развића од пиљења до жртвовања гусеница, које су гајене на лишћу различитих врста хрстова не постоје статистички значајне разлике ($F=0,61$, $p=0,5471$).

Табела 1. Број анализираних индивидуа (*N*), средње вредности (\bar{X}), стандардне грешке (*SE*), *F*-односи и *p* вредности из анализе варијансе за посматране параметре који карактеришу раст, развиће и конзумацију код ларви губара IV ступња (*MC* - маса и проценат масе црева, *ML* - маса ларве и *LR* - трајање развића ларве)

Table 1. The number of analysed individuals (*N*), mean values (\bar{X}), standard errors ($\pm SE$), and *F*-ratio and *p* values from the analysis of variance for various traits of the fourth instar gypsy moths (*MC* - weight and percentage of midgut weight; *ML* - larval weight and *LR* - larval development duration)

Параметар Parameter		цер - <i>Q. cerris</i>		лужњак - <i>Q. robur</i>		китњак - <i>Q. petraea</i>		<i>F</i>	<i>p</i>
		<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$		
<i>MC</i>	<i>mg</i>	17	104,88±11,673a	18	91,39±10,838a	12	38,42±2,695b	9,89	0,0003
	%	16	19,82±1,47a	17	16,57±1,02a	12	19,48±1,31a	2,19	0,1248
<i>ML</i>	<i>g</i>	17	0,502±0,032a	18	0,502±0,028a	12	0,204±0,018b	64,69	0,0000
<i>LR</i>	<i>гана / days</i>	17	21,0±0,284a	18	21,2±0,283a	12	21,4±0,149a	0,61	0,5471

Средње вредност са различитим словима у оквиру истог реда су значајно различите (Tukey HSD тест мултиплиних рангова, $p<0,05$).

Mean values within rows followed by different letters are significantly different (Tukey HSD multiple range test, $p<0.05$).

3.2. Утицај различитих врста храстова на активност дигестивних ензима губара

Резултати тестирања средњих вредности параметара који карактеришу активност дигестивних ензима у огледу са константним условима средине приказани су табели 2. Утврђено је постојање статистички значајних разлика између средњих вредности садржаја протеина у средњем цреву (*PROT*) гусеница губара, које су гајене на лишћу различитих врста храстова ($F=10,77$, $p=0,0002$). Између средњих вредности садржаја протеина у средњем цреву гусеница (*PROT*) гајених на лишћу цера и лужњака не постоје статистички значајне разлике. Између ове две групе и средње вредности садржаја протеина у средњем цреву гусеница (*PROT*) гајених на лишћу китњака, која је најмања и износи 6,61 μg протеина по 1 *mg* црева, постоје статистички значајне разлике.

Утврђено је постојање статистички значајних разлика између средњих вредности специфичне активности амилазе (*SAA*) гусеница губара, које су гајене на лишћу различитих врста храстова ($F=112,64$, $p=0,0001$). Између средњих вредности специфичне активности амилазе (*SAA*) гусеница гајених на лишћу цера и китњака не постоје статистички значајне разлике. Између ове две групе и средње вредности специфичне активности амилазе (*SAA*) гусеница гајених на лишћу лужњака, која је најмања и износи 0,912, постоје статистички значајне разлике.

Између средњих вредности специфичне активности протеазе (*SPA*), гусеница које су гајене на лишћу испитиваних врста храстова, постоје статистички значајне разлике ($F=3,60$, $p=0,0364$). Између средњих вредности специфичне активности протеазе (*SPA*) гусеница гајених на лишћу лужњака и китњака постоје статистички значајне разлике. Између ове две групе и средњих вредности специфичне активности

Табела 2. Број анализираних индивидуа (*N*), средње вредности (\bar{X}), стандардне грешке (*SE*), *F*-односи и *p* вредности из анализе варијансе за посматране параметре који карактеришу активност дигестивних ензима

Table 2. The number of analysed individuals (*N*), mean values (\bar{X}), standard errors ($\pm SE$) and *F*-ratio and *p* values from the analysis of variance for protein content (*PROT*) and specific activities of digestive enzymes amylase (*SAA*) and protease (*SPA*) in the midgut of 4th instar gypsy moth larvae

Обележје	цер - <i>Q. cerris</i>		лужњак - <i>Q. robur</i>		китњак - <i>Q. petraea</i>		<i>F</i>	<i>p</i>
	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$	<i>N</i>	$\bar{X} \pm SE$		
<i>PROT</i> $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	17	9,39 \pm 0,829 \mathbf{a}	18	9,26 \pm 0,527 \mathbf{a}	12	6,16 \pm 0,225 \mathbf{b}	10,77	0,0002
<i>SAA</i> OD550/OD595	15	1,403 \pm 0,127 \mathbf{a}	17	0,912 \pm 0,073 \mathbf{b}	11	1,586 \pm 0,111 \mathbf{a}	12,64	0,0001
<i>SPA</i> OD280/OD595	14	0,687 \pm 0,098 \mathbf{ab}	17	0,608 \pm 0,100 \mathbf{a}	12	1,037 \pm 0,148 \mathbf{b}	3,60	0,0364

Средње вредност са различитим словима у оквиру истог реда су значајно различите (Tukey HSD тест мултиплих рангова, $p<0,05$).

Mean values within rows followed by different letters are significantly different (Tukey HSD multiple range test, $p<0.05$).

протеазе (*SPA*) гусеница гајених на лишћу цера, која износи 0,687, не постоје статистички значајне разлике.

3.3. Хемијске анализе лишћа

Садржај угљеника у лишћу цера и китњака опада у периоду развића губара од другог до четвртог ступња, док у лишћу лужњака благо расте (табела 3). Садржај азота у лишћу цера и лужњака расте од другог до четвртог ступња док у лишћу китњака опада. Садржај калцијума у лишћу свих испитиваних врста храстова расте од другог до четвртог ступња. Учешће магнезијума у лишћу цера и лужњака, којим су се храниле гусенице, расте од другог до четвртог ступња.

У лишћу китњака садржај магнезијума је током другог и четвртог ступња уједначен. Садржај калијума је код цера уједначен у време исхране другог и четвртог ступња. У лишћу лужњака и китњака садржај калијума опада од другог до четвртог ступња. Садржај фосфора благо опада у лишћа цера и лужњака током исхране четвртог ступња у односу на други. Код лишћа китњака бележи се пораст учешћа фосфора у време исхране гусеница четвртог ступња.

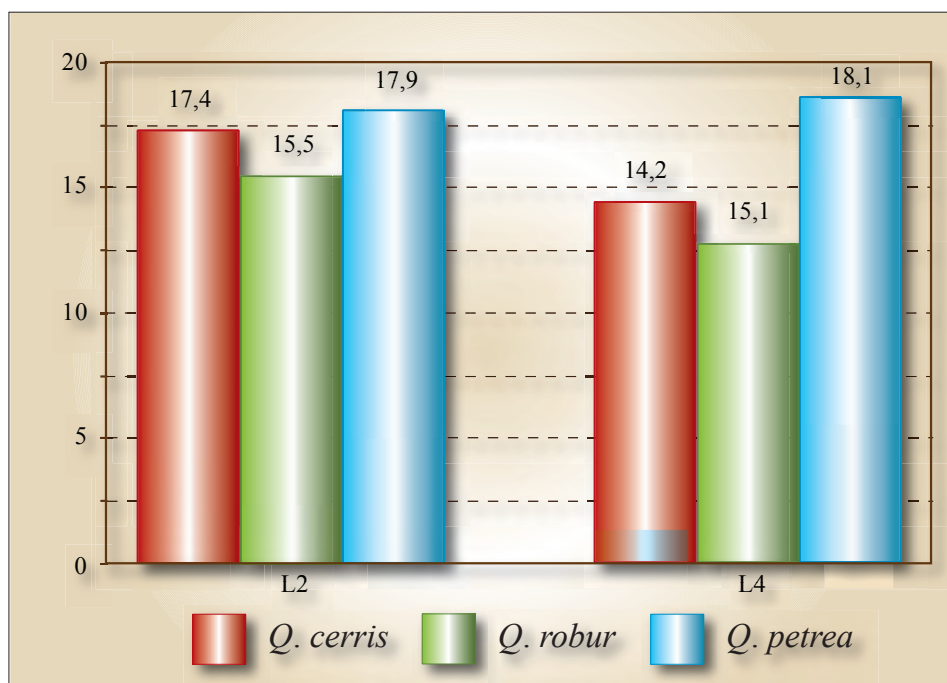
Однос угљеника и азота опада код лишћа цера којим су гусенице храњене у четвртог у односу на други ступањ. Исти тренд уочавамо и код лишћа лужњака са нешто слабијим падом. Код китњака се уочава благ пораст односа C/N у четвртог у односу на други ступањ. Однос C/N је иначе већи код китњака него код друге две врсте у оба термина анализирања узорака (графикон 1).

Садржај протеина расте у лишћу цера којим су се гусенице храниле током четвртог у односу на други ступањ. Код лишћа лужњака се примећује уравнотежен

Табела 3. Садржај појединих хемијских макро елемената у лишћу различитих врста храстова

Table 3. Macro elements content in leaves of different oak species eaten by gypsy moth larvae during 2nd (L₂) and 4th instar (L₄)

Елементи Elements	Ступњеве гусеница када је узорковано лишће за хемијске анализе Larval instars when the leaves were sampled for chemical analysis					
	L ₂			L ₄		
	цер <i>Q. cerris</i>	лужњак <i>Q. robur</i>	китњак <i>Q. petraea</i>	цер <i>Q. cerris</i>	лужњак <i>Q. robur</i>	китњак <i>Q. petraea</i>
	%					
C	46,74	44,83	47,33	44,48	45,33	45,91
N	2,69	2,89	2,65	3,14	2,97	2,54
CaO	0,82	0,79	0,90	1,09	0,91	1,02
MgO	0,84	1,17	1,00	0,96	1,35	1,00
K ₂ O	0,98	1,06	1,25	0,95	0,79	0,95
P ₂ O ₅	0,23	0,23	0,20	0,18	0,19	0,47

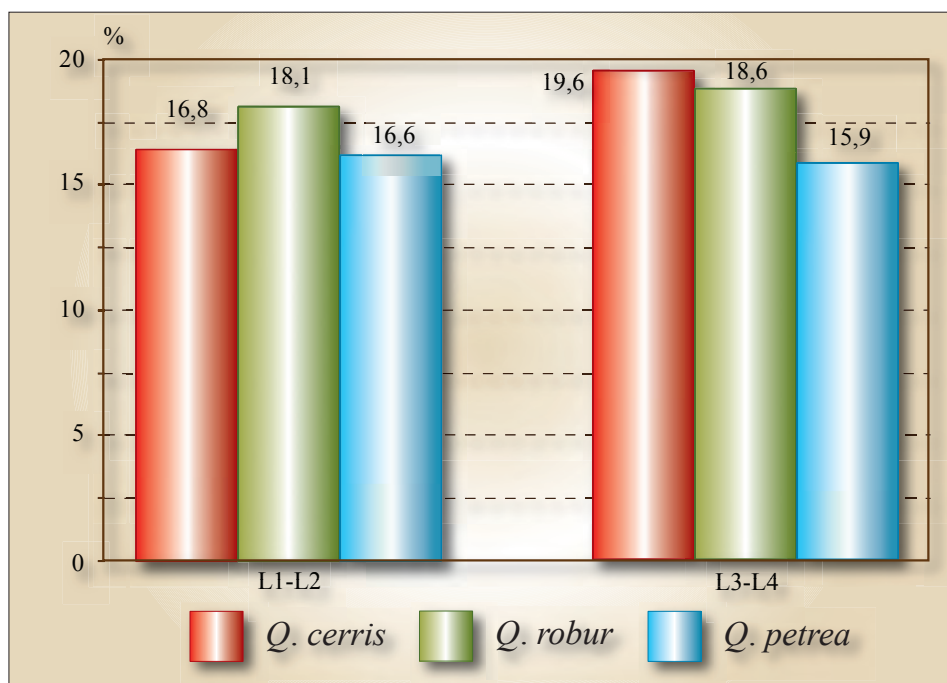


Графикон 1. Однос угљеника и азота у лишћу испитиваних врста храстова
Figure 1. Carbon nitrogen ratio in the leaves of examined oak species

садржај протеина са благим порастом у време четвртог ступња у односу на други. Код лишћа китњака налазимо обрнути тренд у односу на лишће лужњака (графикон 2).

4. ДИСКУСИЈА

Свака биљка има оптимални однос између унутрашњих резерви угљеника и минералних хранива који обезбеђује максимални раст (Chapin, 1980, Ingstad, 1982, Bloom *et al.*, 1985). Варијације у средини могу изазвати промену баланса резерви тако да ниво угљеника или хранива постане субоптималан за раст биљке. Промене у односу угљеника и хранива могу утицати на акумулацију секундарних материја на бази угљеника. На недостатак хранива биљке реагују порастом концентрације танина (Mattson *et al.*, 1983), лигнина (Waring *et al.*, 1985), фенола (Mattson *et al.*, 1983, Larsson *et al.*, 1986), једињења која отежавају варење инсеката или појединих продуката секундарног метаболизма на бази угљеника који ометају конзумацију хербивора (Brayant *et al.*, 1985). Ово становиште је у складу са хипотезом да је продукција секундарних материја на бази угљеника подржана вишком ресурса акумулираних изнад количина потребних за примарни метаболизам



Графикон 2. Садржај протеина у лишћу испитиваних врста храстова
Figure 2. Protein content in the leaves of examined oak species

биљака. Под таквим условима, секундарне материје могу, такође, функционисати као унутрашњи регулатор раста који успорава метаболизам и последично добија функцију одбране од патогена и хербивора. Алелохемикалије базиране на угљенику, које биљке користе у борби против фоливорних инсеката, имају кључно место у теорији односа биљака и инсеката (Tuomi *et al.*, 1988). Њихова улога се огледа у чињеници да са повећањем садржаја ових једињења у лишћу опада погодност за исхрану хербивора. Како је угљеник кључни елемент у саставу ових једињења његов повећани садржај у лишћу указује на повећано присуство одбрамбених материја. Усмеравање угљеника ка синтези различитих група једињења зависи од присуства хранљивих материја које су најчешће репрезентоване садржајем азота, па се као неопходно намеће познавање односа угљеника и азота, како би се разумело порекло угљеника. Што је C/N однос већи, већа је и вероватноћа да је угљеник пореклом из одбрамбених материја поготово уколико се ради о физиолошки старијем лишћу, јер вишак угљеника бива преусмерен са раста ка синтези алелохемикалија (Tuomi *et al.*, 1988). Ово поткрепљују и истраживања која указују на повећање садржаја танина са старењем лишћа (Feeny, 1970).

Значајне разлике које постоје у садржају протеина средњег црева гусеница губара храњених лишћем различитих врста храстова објашњавају се разликама у

хемијском саставу конзумиране хране. Садржај протеина у средњем цреву гусеница губара је већи уколико је садржај протеина у лишћу одговарајуће врсте храста већи.

Утврђена је повећана специфична активност амилазе код гусеница које су храњене лишћем цара и китњака у односу на гусенице храњене лишћем лужњака. Повећана специфична активност амилазе код гусеница које су храњене лишћем цара у односу на лужњак је највероватније последица механизма секретације односно повећаног садржаја шећера у средњем цреву. Механизам секретације, подразумева стимулативно дејство састојака хране (скроб, протеини) на синтезу и секрецију амилазе и протеаза. Значај овог механизма се састоји у усклађивању количине излучених ензима са количином специфичног супстрата у цреву (Лазаревић, 1994). У прилог овој тврдњи иду и резултати анализе лишћа који код цара показују мањи C/N однос, што указује на усмеравање угљеника ка расту и синтези складишних материја (скроб) (Tomí *et al.*, 1988).

У случају гусеница које су храњене лишћем китњака повећана специфична активност амилазе је последица смањене количине протеина у срењем цреву у односу на коју је изражена активност амилазе. Ово је свакако у вези са процесом старења лишћа за које је карактеристично смањење садржаја протеина и пораст садржаја одбрамбених материја а у првом реду танина (Feeny, 1970). У теорији одбране биљака од инсеката танини су означени као носиоци квантитативне одбране али и као редукенти сварљивости. Танини са протеинима граде у води нерастворљиве комплексе чиме се смањује ефикасност варења, што доводи до успоравања развића и смањења фекундитета. Како је C/N однос код лишћа китњака највећи, у време исхране IV ступња гусеница, када су и жртвоване ради испитивања ензиматске активности, вишак угљеника у односу на хранива је усмераван ка синтези одбрамбених материја а не ка складишним материјама.

Повећана специфична активност протеазе код гусеница које су храњене лишћем китњака такође представља последицу мањег садржаја протеина у лишћу китњака у односу на друге две врсте храста.

При објашњењу разлика у активности дигестивних ензима мора се узети у обзир и чињеница да гусенице гајене на лишћу китњака имају већи број пресвлачења што је довело до скраћења IV ступња (Милановић, 2007). Са физиолошке тачке гледишта трећи дан IV ступња није у исто време код гусеница гајених на лишћу цара и лужњака у односу на китњак. Гусенице храњене лишћем китњака су ближе пресвлачењу када опада конзумација а тиме и активност дигестивних ензима.

Пораст нивоа дигестивних ензима на неповољној хранитељки може бити адаптивна реакција која води бољем искоришћењу хране. Међутим, усмеравање амнино киселина ка синтези дигестивних ензима (протеина) истовремено значи смањење количине амнино киселина које се могу искористити за раст што објашњава мању масу ларви гајених на китњаку.

5. ЗАКЉУЧЦИ

- Исхрана различитим врстама храстова није утицала на трајање развића, али је показала значајан ефекат на масу ларви губара четвртог ступња. Исхрана лишћем китњака се показала као најмање повољна за раст ларви. Уочене разлике се могу објаснити разликама у хемијском саставу лишћа цера, лужњака и китњака и њиховом утицају на активност амилазе и протеаза од којих зависи степен искоришћења хране.
- Однос угљеника и азота (C/N), током другог ларвеног ступња губара, је највиши у лишћу китњака, нешто је нижи у лишћу цера а најнижи у лишћу лужњака. Имајући у виду добијене резултате може се закључити да су гусенице храњене лишћем китњака имале најнеповољнију храну за своје развиће током другог ларвеног ступња. Нешто повољнију храну за своје развиће имале су гусенице храњене лишћем цера а најповољнију храну су имале гусенице другог ступња храњене лишћем лужњака.
- Однос угљеника и азота (C/N), током четвртог ларвеног ступња губара, је највиши у лишћу китњака, нешто је нижи у лишћу лужњака а најнижи у лишћу цера. Имајући у виду добијене резултате може се закључити да су гусенице храњене лишћем китњака имале најнеповољнију храну за своје развиће током четвртог ларвеног ступња. Нешто повољнију храну за своје развиће имале су гусенице храњене лишћем лужњака а најповољнију храну су имале гусенице четвртог ступња храњене лишћем цера.
- Значајне разлике које постоје у садржају протеина средњег црева гусеница губара храњених лишћем различитих врста храстова објашњавају се разликама у хемијском саставу конзумиране хране. Садржај протеина у средњем цреву гусеница губара је већи уколико је садржај протеина у лишћу одговарајуће врсте храста већи.
- Повећана специфична активност протеазе код гусеница које су храњене лишћем китњака представља последицу мањег садржаја протеина у лишћу китњака у односу на друге две врсте храста.
- Повећана специфична активност амилазе код гусеница које су храњене лишћем цера у односу на лужњак је највероватније последица механизма секретације односно повећаног садржаја шећера у средњем цреву. У случају гусеница које су храњене лишћем китњака повећана специфична активност амилазе је последица смањене количине протеина у срењем цреву у односу на коју је изражена активност амилазе.
- При објашњењу разлика у активности дигестивних ензима мора се узети у обзир и чињеница да гусенице гајене на лишћу китњака имају већи број пресвлачења што је довело до скраћења IV ступња. Са физиолошке тачке гледишта трећи дан IV ступња није у исто време код гусеница гајених лишћем

цера и лужњака у односу на китњак. Гусенице храћене лишћем китњака су ближе пресвлачењу када опада активност дигестивних ензима.

Напомена: Рад представља део резултата магистарске тезе одбраћене на Шумарском факултету. Део истраживања је финансиран од стране МНТР, Републике Србије по пројекту ТР 20052.

ЛИТЕРАТУРА

- Barbosa P. (1978): *Host plant exploitation by the gypsy moth, Lymantria dispar*, Entomologia Experimentalis et Applicata 24 (28-37)
- Barbosa P., Martinat P., Waldvogel M. (1986): *Development, fecundity and survival of the herbivore Lymantria dispar and the number of plant species in its diet*, Ecological Entomology 11 (1-6)
- Berenbaum M. (1980): *Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera*, American Naturalist 115 (138-146)
- Berenfeld P. (1955): *Amylases, alpha and beta*, „Methods in Enzymology” (ed. P.C. Colowick, O.N. Kaplan), Academic Press 1, New York
- Bloom A.J., Chapin F.S. III, Mooney H.A. (1985): *Resource limitation in plants an economic analogy*, Annual Review of Ecology and Systematics 16 (363-392)
- Bradford M.M. (1976): *A rapid and sensitive for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry 72 (248-254)
- Brayant J.P., Chapin F.S. III, Reichardt P.B., Clausen T.P. (1985): *Adaptation to resource availability as a determinant of chemical defense strategies in woody plants*, „Chemically mediated interactions between plants and other organisms” (ed. Cooper-Driver G.A., Swain T., Conn E.E), Plenum Publishing Corporation, New York (219-237)
- Waring R.H., McDonald A.J.S., Larsson S., Ericsson T., Wiren A., Arwidsson E., Ericsson A., Lohammar T. (1985): *Differences in chemical composition of plants grown at constant relative growth rates with stable mineral nutrition*, Oecologia 66 (157-160)
- Wigglesworth V.B. (1964): *The life of insects*, Weidenfeld & Nicolson, London
- Doane W.W. (1967): *Quantification of amylases in Drosophila separated by acrylamide gel electrophoresis*, Journal of Experimental Zoology 164 (363-377)
- Fenny P. (1970): *Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by Winter Moth caterpillars*, Ecology 51, № 4 (565-581)
- Ingestad T. (1982): *Relative addition rate and external concentration; driving variables used in plant nutrition research*, Plant Cell Environment 5 (443-453)
- Jindra M., Sehnal F. (1989): *Larval growth, food consumption, and utilization of dietary protein and energy in Galleria mellonella*, Journal of Insect Physiology 35 (719-724)
- Kunitz M. (1947): *Crystalline soybean trypsin inhibitor - General properties*, Journal of Genetics Physiology 30 (291-310)
- Larsson S., Wiren A., Lundgren L., Ericsson T. (1986): *Effects of light and nutrient stress on leaf phenolic and chemistry in Salix dasyclados and susceptibility to Galeruca lineola (Col., Chrysomelidae)*, Oikos 47 (205-210)

- Лазаревић Ј. (1994): *Утицај биљки домаћина на дијететичке ензиме и варијабилности композиционих адаптивних вредности код губара *Lymantria dispar* L.*, магистарски рад у рукопису, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, Београд
- Лазаревић Ј. (2000): *Физиолошко тенејички механизми адаптација губара *Lymantria dispar* L. на нејовољну исхрану*, докторска дисертација у рукопису, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, Београд
- Лазаревић Ј., Ивановић Ј., Јанковић-Хладни М. (1994): *Ефекат хранљивој суисхраји на активност протеазе и индивидуалну перформансу код губара *Lymantria dispar* L.*, „Заштита биља дана и сутра” (ур. Шестовић М., Нешковић Н., Перих И.), Друштво за заштиту биља Србије, Београд (283-301)
- Lazarević J., Perić-Mataruga V., Stojković B., Tucić N. (2002): *Adaptation of the gypsy moth to an unsuitable host plant*, Entomologia Experimentalis et Applicata 102 (75-86)
- Lazarević J., Perić-Mataruga V. (2003): *Nutritive stress effects on growth and digestive physiology of *Lymantria dispar* larvae*, Jugoslovenska Medicinska Biohemija 22, Beograd (53-59)
- Leonard D.E. (1970): *Intrinsic factors causing qualitative changes in populations of *Porthetria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae)*, Canadian Entomologist 102 (239-249)
- Lovett G.M., Hart J.E., Christenson L.M., Jones C.G. (1998): *Caterpillar guts and ammonia volatilization: retention of nitrogen by gypsy moth larvae consuming oak foliage*, Oecologia 117 (513-516)
- Lovett G.M., Christenson L.M., Groffman P.M., Jones C.G., Hart J.E., Mitchell M.J. (2002): *Insect defoliation and nitrogen cycling in forests*, Bioscience 52 (335-341)
- Mattson W.J. (1980): *Herbivory in relation to plant nitrogen content*, Annual Review of Ecology and Systematics 11 (119-161)
- Mattson W.J., Slocum S.S., Koller C.N. (1983): *Spruce budworm *Choristoneura fumiferana* performance in relation to foliar chemistry of its host plants*, Gen. Tech. Rep. NE. 85, Forest defoliator-host interactions, Northeastern Forest Experiment Station, USDA Forest Service, Washington (53-65)
- Милановић С. (2007): *Развиће губара (*Lymantria dispar* L.) на лишћу *Quercus cerris* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl. и *Q. robur* L. у контролисаним условима*, Гласник Шумарског факултета 96, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (55-67)
- Пономарева В., Плотникова Т. (1975): *Определение содержания и состава органического вещества в торфяно-болотных почвах*, Методические указания по определению содержания и состава гумуса в почвах (минеральных и торфяных), Всесоюзная Академия Сельскохозяйственных наук В.И. Ленина, Центральный Музей Почвоведения им. В. Б. Докучаева, Ленинград
- Rossiter M.C., Shultz J.C., Baldwin I.T. (1998): *Relationships among defoliation, red oak phenolics, and gypsy moth growth and reproduction*, Ecology 69 (267-277)
- Southwood T.R.E. (1973): *The insect plant relationship - an evolutionary perspective*, „Insect/plant relationships” (ed. by Van Emden H.F.), The Royal entomological society 6, London (3-30)
- Stockhoff B.A. (1993): *Diet heterogeneity: implications for growth of a generalist herbivore, the gypsy moth*, Ecology 74 (1939-1949)

- Stoyenoff J.L., Witter J.A., Montgomery M.E. (1994): *Nutritional indices in the gypsy moth (Lymantria dispar (L.)) under field conditions*, Oecologia 97 (143-157)
- Tuomi J., Niemela P., Chapin F.S. III, Brayant J.P., Siren S. (1988): *Defensive response of trees in relation with their carbon/nutrient balance*, „Mechanisms of woody plant defenses against insects” (ed. Mattson W.J., Levieux J. & Dagan B.C.), Springer-Verlag, New York (57-73)
- Chapin F.S. III (1980): *The mineral nutrition of wild plants*, Annual Review of Ecology and Systematics 11 (233-260)
- Џамић Р. (1966): *Одређивање укупног азота по Kjeldahl-у*, приручник за испитивање земљишта, Југословенско друштво за проучавање земљишта, Београд

Slobodan Milanović
Jelica Lazarević
Marija Mrdaković
Milena Vlahović,
Zoran Miletić

HOST PLANT EFFECT ON THE ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES OF THE GYPSY MOTH CATERPILLARS

Summary

The nutritive value of host plant leaves, as well as the content of secondary metabolites, affects the parameters which characterise insect growth and development. This effect is exerted by digestive enzymes whose activity affects the efficiency of conversion of ingested food. The host plant effect on the gypsy moth development cannot be completely explained without the understanding of host plant effect on consumption and digestion. The efficiency of ingested food depends on the activity of digestive enzymes, so the comparison of amylase and protease activity in the larvae fed on different plants, can point to the host plant suitability for the gypsy moth development.

Chemical composition of the host plant leaves, primarily the tannin content, through the effect on the digestive enzyme activity affects the gypsy moth duration of development and reproductive potential.

Chemical composition of the leaves fed to individual larval instars is of essential significance for the understanding of the host plant effect on the development of folivorous insects. Later larval instars are increasingly more tolerant to defensive and non-nutritive substances, while earlier instars are especially susceptible to these substances. Chemical composition of the leaves fed to early larval instars (1st and 2nd) is very significant because it has an essential impact on the duration of postembryonic development and the number of moltings. On the other hand, the accumulation of nutritive substances starts during the 4th larval instar; they are used in the synthesis of vitelogenine during the oogenesis, by which the progeny in the following generation is indirectly influenced through the maternal effect. For this reason, chemical analysis of oak leaves (Turkey oak, common oak and sessile oak) fed to the gypsy moth larvae during the experiment was performed during the 2nd and 4th larval instars.

The diet of different oak species did not affect the duration of the gypsy moth larval development, but it had a significant effect on larval mass in the 4th larval instar. Feeding on sessile oak leaves was the least favourable for larval growth. The observed differences can be explained by the

differences in the chemical composition of oak leaves and their effect on the amylase and protease activity decisive for the efficiency of the ingested food.

Carbon nitrogen ratio (C/N) during the gypsy moth 2nd larval instar is the highest in sessile oak leaves, somewhat lower in Turkey oak leaves and the lowest in common oak leaves. Based on the study results, it can be concluded that the caterpillars fed on sessile oak leaves had the most unfavourable food for their development during the 2nd larval instar. The larvae fed on Turkey oak leaves had somewhat more favourable food for their development, and the 2nd larval instar fed on common oak leaves had the most favourable food.

Carbon nitrogen ratio (C/N) during the gypsy moth 4th larval instar is the highest in sessile oak leaves, somewhat lower in common oak leaves, and the lowest in Turkey oak leaves. Based on the study results, it can be concluded that the caterpillars fed on sessile oak leaves had the most unfavourable food for their development during the 4th larval instar. The larvae fed on common oak leaves had somewhat more favourable food for their development, and the 4th larval instar fed on Turkey oak leaves had the most favourable food.

Significant differences in the protein content in the midgut of the gypsy moth larvae fed on the leaves of different oak species are explained by the differences in the chemical composition of the ingested food. Protein content in the midgut of the gypsy moth larvae is higher if the protein content in the leaves of the oak species is higher.

The higher specific activity of amylase in caterpillars fed on Turkey oak leaves compared to common oak is most likely the consequence of the secretagogue mechanism, i.e. the increased level of sugar in the midgut. In the case of caterpillars fed on sessile oak leaves, the higher specific activity of amylase is the consequence of the reduced level of proteins in the midgut, compared to which the activity of amylase is expressed.

The higher specific activity of protease in caterpillars fed on sessile oak leaves is the consequence of the lower content of proteins in the leaves of sessile oak, compared to the other two oak species.

The explanation of differences in the activity of digestive enzymes should take into account also the fact that the caterpillars fed on sessile oak leaves have a higher number of moltings which led to the shorter 4th instar. From the physiological standpoint, the third day of the 4th instar is not at the same time in the caterpillars fed on the leaves of Turkey oak and common oak, compared to the caterpillars fed on sessile oak. Caterpillars fed on the leaves of sessile oak are closer to molting when the activity of digestive enzymes decreases.