



ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2020 ТОМ **103** ВЫПУСК **2**
VOLUME ISSUE



ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЕ ГИДРОЛАЗЫ ХЛЕБНЫХ КЛОПОВ: СВОЙСТВА, ЗНАЧЕНИЕ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ОГРАНИЧЕНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ

А.В. Конарев

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

e-mail: al_konarev@hotmail.com

Пищеварительные гидролазы выступают в качестве ключевых элементов пищевых связей в биоценозах. От эффективности гидролаз в снабжении организма фитофага пластическими и энергетическими материалами кормовых растений зависит его жизнь и способность к воспроизводству. Системы пищеварительных гидролаз насекомых-фитофагов сформировались в ходе их длительной коэволюции с растениями. Это справедливо и для растительноядных клопов, включая такого опасного вредителя пшеницы, как вредная черепашка. Знание особенностей пищеварительных систем вредителей необходимо для разработки методов борьбы с ними. Основным экономически значимым фактором вредоносности представителей рода *Eurygaster* и других клопов, повреждающих зерно пшеницы, выступают протеазы. Они нарушают структуру клейковины и серьезно ухудшают хлебопекарные качества муки. α -Амилазы обеспечивают усвоение крахмала – главного источника энергии этих насекомых. Пищеварительные α -амилазы и протеазы вредной черепашки изучаются во всем мире на протяжении многих лет, однако данные по ним еще весьма фрагментарны. Недостаточно сведений относительно ферментов этих клопов, вовлеченных в питание вегетативными органами злаков. Данные литературы по более изученным группам клопов и других насекомых могут помочь в выборе путей исследования ферментов обсуждаемой группы вредителей. Существует немало способов укрепления поврежденной клопами клейковины, однако далеко не все они безопасны. Белковые ингибиторы протеаз и других гидролаз рассматриваются в качестве перспективных элементов в разработке безопасных для человека и окружающей среды методов борьбы с хлебными клопами и снижения причиняемого ими ущерба качеству зерна. Пониженная чувствительность протеаз вредной черепашки к белковым ингибиторам может быть преодолена путем конструирования новых ингибиторов на основе известных и хорошо изученных форм ингибиторов протеаз других организмов, а также с привлечением иных высокоспецифичных подходов, включая использование антител к активным центрам ферментов или РНК-интерференцию. Сами протеазы хлебных клопов могут найти применение в диагностике повреждения зерна, в пищевых технологиях и в медицине.

Ключевые слова: вредная черепашка, хлебные клопы, пищеварительные гидролазы, α -амилазы, протеазы, клейковина пшеницы, ингибиторы

Поступила в редакцию: 28.04.2020

Принята к печати: 28.05.2020

Введение

Пищеварительные гидролазы делают возможным усвоение насекомыми, как и другими животными, энергетических и пластических пищевых субстратов. Существующие в настоящее время комплексы пищеварительных ферментов фитофагов и системы их ингибиторов и других защитных белков у растений представляют собой промежуточный результат непрекращающейся в течение сотен миллионов лет сопряженной эволюции данных организмов. Особенности пищеварительной системы того или иного фитофага отражают как эволюционную историю его становления, так и свойства потребляемых им углеводов, белков, липидов и т.д., содержащихся в кормовых растениях.

Клопы из семейств Scutelleridae и Pentatomidae, повреждающие зерно пшеницы и ячменя, наносят существенный ущерб качественным и количественным параметрам урожая этих важнейших культур в России, странах Европы, Азии и Африки (Павлюшин и др. 2015; Critchley, 1998; Dizlek et al., 2018). Наиболее опасным и экономически значимым вредителем из них выступает клоп вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. Кроме него в России встречаются еще 5 видов этого рода (Neimorovets, 2020), из которых по меньшей мере два, *Eurygaster maura* L. и

Eurygaster austriaca Schrank, также вредоносны для сельского хозяйства. Повреждение клопами зерна существенно снижает его экспортную стоимость, и прямые финансовые потери российских поставщиков составляют порядка \$100–150 млн/год (Рылько, 2011). В свою очередь, в Азии на пространстве от Турции до Киргизстана и Пакистана клопы вредят посевам зерновых культур на площади 15 млн га (Davari and Parker, 2018). При отсутствии химических обработок и других мер защиты это приводит к потерям до 30% урожая ячменя и до 50–100% пшеницы (Parker et al., 2011; Darkoh et al., 2010). В Новой Зеландии сходным по типу наносимого ущерба видом выступает клоп *Nysius huttoni* White (Lygaeidae) (Every et al., 2005). Изменение климата может привести к существенному расширению ареала с продвижением данных вредителей в более северные регионы (Aljaryan et al., 2016).

Оценка значения определенной группы пищеварительных ферментов хлебных клопов зависит от рассматриваемой проблемы. С позиций потребительских качеств зерна для человека наиболее важны протеазы вредителя, повреждающие клейковину. Крахмал зерна служит основным источником энергии вредителя, без потребления которого невозможна, в частности, его перезимовка. В связи с этим

первостепенное значение имеют α -амилазы. Питание клопа вегетативными частями растения обеспечивается пока ещё недостаточно изученным набором соответствующих гидролаз. При рассмотрении таких параметров жизнеспособности, как всхожесть зерна, могут быть важны разные группы гидролаз слюнных желез вредителя. Поскольку в поврежденном зрелом зерне из всех секретированных клопами гидролаз выявляются лишь некоторые протеазы (Konarev et al., 2019), именно они представляют интерес для диагностики повреждения и т.д. Кроме того, протеазы и другие гидролазы насекомых, включая хлебных клопов, представляют большой интерес в связи с возможностями их использования в различных пищевых и химических технологиях, производстве биотоплива, моющих средств и т.д. (Olanca and Ozay, 2010; Mika et al., 2013; Kannan et al., 2019).

Главным экономически значимым фактором вредоносности хлебных клопов служат протеазы слюнных желез, которые вводятся в зерно при питании этих сосущих вредителей (Kretovich, 1944, Sivri and Koksel, 1998; Konarev et al., 2011, 2019; Dizlek and Ozer, 2016). Протеазы, оставшиеся в эндосперме после всасывания насекомым ферментированного содержимого, сохраняют свою активность после созревания зерна и его хранения в течение многих лет. При замесе теста экзогенные протеазы, присутствующие в поврежденных зернах, гидролизуют запасные белки, формирующие клейковину, в том числе глюteniны, от которых во многом зависят хлебопекарные свойства муки. Структура клейковины нарушается, и тесто “растекается”. Помимо протеаз слюнные железы вредной черепашки вырабатывают α -амилазы и липазы (Вилкова, 1968, 1979; Павлюшин и др. 2015; Конарев и Фомичева, 1991; Mehrabadi et al., 2014). К сожалению, протеом и транскриптом вредной черепашки еще недостаточно изучены, однако известно, что в слюнных железах ряда видов растительоядных Hemiptera синтезируются и другие пищеварительные гидролазы, в т.ч. полигалактуроназы, а также факторы, участвующие в детоксикации ксенобиотиков для преодоления защитных механизмов растений – эстеразы, глутатион S-трансферазы и цитохром P450 (Cooper et al., 2013). Отмечены существенные различия в уровнях экспрессии генов, связанных с пищеварением и обезвреживанием защитных веществ растений, у особой большой злаковой тли *Sitobion avenae* (Fabricius), питающихся на пшенице и ячмене (Wang et al., 2020). По наличию соответствующих мРНК в слюнных железах клопа слепняка *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) выявлена работа 45 генов, кодирующих полигалактуроназы, двух – α -амилазы, по одному для глюкозидазы, гликангидролазы и аминопептидазы, четырех – липазы и не менее 15 – сериновые протеазы (Zhu et al., 2016). Хлебные клопы не

ограничиваются питанием зернами злаков и повреждают также листья и стебли, нанося при этом значительный ущерб растению. Для успешного усвоения питательных веществ из вегетативных органов вредителю необходим соответствующий арсенал гидролаз. Синтез тех или иных гидролаз пищеварительной системой насекомого определяется характером пищи (Li et al., 2017), а его интенсивность может возрастать при наличии в ней соответствующих ингибиторов для компенсации потери активности (Pytelkova et al., 2009). Частично гидролизованный в ходе внекишечного пищеварения материал растительных тканей поступает в кишечник клопа, где подвергается действию другого набора протеаз и амилаз, обеспечивающих полное расщепление пептидов и углеводов до соединений (моно- и олигомеров), доступных для всасывания. Важная задача защиты растений и пищевого производства – ограничение деструктивной активности протеаз и других гидролаз хлебных клопов, что может быть достигнуто разными путями, в том числе с использованием белковых ингибиторов. Протеазы хлебных клопов также представляют интерес как модификаторы белков клейковины для использования в пищевой промышленности и медицине (получение белковых гидролизатов, снижение токсичности белков клейковины для глютен-чувствительных пациентов и т.д.). Как и белки других членистоногих, пищеварительные ферменты и компоненты секрета слюнных желез хлебных клопов могут проявлять аллергенную активность и представлять определенную опасность, провоцируя астму у работников мукомольного производства (Armentia et al., 2004). Как ведущий фактор вредоносности хлебных клопов, протеазы могут быть использованы в роли перспективного критерия для диагностики повреждения зерна. Подавление активности пищеварительных гидролаз хлебных клопов может быть использовано для ограничения наносимого ими ущерба производству. Одним из подходов здесь может служить использование природных или специально сконструированных белковых ингибиторов ферментов. При этом следует учитывать особенности пищеварения данных вредителей. Подавление гидролаз обоих отделов пищеварительного тракта значительно повышает энергетические затраты на усвоение пищи насекомыми, что ведет к снижению их численности. Кроме того, ингибирование гидролаз слюнных желез способствует снижению потерь качества урожая зерна. В обзоре освещены современные представления о свойствах, значении, возможных путях использования, а также ограничения нежелательной активности протеаз вредной черепашки и других хлебных клопов. В связи с ограниченностью сведений по некоторым гидролазам именно хлебных клопов, будут обсуждены и данные по таксономически близким клопам или другим насекомым.

Внекишечное пищеварение

Внекишечное пищеварение широко распространено у беспозвоночных. Оно характерно для хищных представителей 80% семейств Arthropoda (Cohen, 1998). Разнообразие вариантов питания, встречающихся у настоящих клопов (Heteroptera), превышает таковое у почти всех других групп насекомых (Zeng and Cohen, 2000; Cohen, 1998). Интересный аспект их пищевой адаптации – “трофическая гибкость”, присущая факультативному питанию зоофагов

растениями (зоофитофагия) или наоборот, питанию фитофагов животными (фитозоофагия) (Zeng and Cohen, 2000), что находит отражение, в частности, в высокой степени структурной близости пищеварительных ферментов у разных групп клопов. Ряд видов клопов – важных вредителей сельскохозяйственных культур, сочетают зоофагию с фитофагией в зависимости от доступности той или иной пищи. Считается, что, в целом, зоофитофагия сопряжена

с повышенной ролью пищеварительных протеаз относительно α -амилаз, тогда как у фитозоофагов (виды рода *Lygus* Hahn, семейство Miridae) или фитофагов (*Eurygaster* Lap.) соотношение ролей данных гидролаз обратное. Кроме того, соотношение, как и состав ферментов, могут меняться в зависимости от состава пищи. При этом, например, специфичная к белкам клейковины протеаза GHP3 из слюнных желез вредной черепашки обладает высокой степенью гомологии как с пищеварительными протеазами хищных клопов, так и протеазами, входящими в состав продуцируемых ими ядов (см. ниже). Сходство молекулярной структуры гидролаз растительноядных, хищных и кровососущих клопов может служить объяснением относительной легкости “переключения”, в эволюционном масштабе, между вариантами питания. В связи с этим

выглядит в известной степени обоснованным распространенное в современной экологии расширенное представление о хищничестве как о любом поедании одних организмов другими, причем без обязательного умерщвления жертвы. Пока нет единого представления о том, что было первичным для клопов – зоофагия или фитофагия. Ряд данных указывает на то, что у предков современных клопов переход от зоофагии к фитофагии происходил неоднократно. Среди представителей многих групп из подотряда Heteroptera встречаются как зоофаги, так и фитофаги (Walker et al., 2016). Отдельные внутривидовые группы некоторых клопов, например, из семейства Miridae, могут проявлять генетически детерминированную специализацию к тому или иному варианту питания (Dumont et al., 2017).

α -Амилазы

Крахмал служит важнейшим источником энергии фитофагов, в связи с чем роль расщепляющих его гидролаз в пищеварении многих насекомых-фитофагов, включая вредную черепашку и других хлебных клопов, особенно высока (Вилкова, 1968, 1980). Зерно пшеницы содержит около 70% крахмала (James et al., 2003) В составе пшеничного крахмала представлены два типа полимеров D-глюкозы – линейный (амилоза) и разветвленный (амилопектин), причем последний существенно преобладает. Соотношение амилозы и амилопектина оказывает существенное влияние на технологические и иные качества зерна, причем многое зависит от структуры амилопектина. Гранулы крахмала у разных растений существенно отличаются по подверженности гидролизу α -амилазами разных видов фитофагов. При сходном соотношении обоих полимеров в устойчивом и неустойчивом к вредной черепашке сорте пшеницы наблюдалась связь между пониженной подверженностью крахмала гидролизу α -амилазой вредителя и относительно высокой устойчивостью сорта, что объясняется особенностью структуры амилопектина (Буринская, 1985).

α -Амилазы или 1,4- α -D-глюкан-глюкоганогидролазы (КФ 3.2.1.1) гидролизуют полисахаридную цепь крахмала и других полимеров D-глюкозы до олигосахаридов различной длины. α -Амилазы вырабатываются в запасующих крахмал тканях растений при прорастании, грибами при развитии в растительном субстрате и т.д. У животных, в т.ч. растительноядных насекомых, α -амилазы входят в число наиболее важных пищеварительных гидролаз (Da Lage, 2018). У насекомых, включая клопов, как и у других животных, геном, как правило, содержит несколько вариантов генов α -амилаз, что предположительно расширяет возможности утилизации разных форм крахмала в различных условиях (Da Lage et al., 2002; Da Lage, 2018; Ghamari et al., 2014). В целом, α -амилазы насекомых по структуре близки α -амилазам других животных и объединены в подсемейство гликозилгидролаз GH13_15 совместно с аналогичными ферментами других беспозвоночных (Stam et al., 2006). При этом наблюдаются существенные отличия между ферментами разных групп насекомых в рамках упомянутой структуры (Da Lage, 2018). У клопов амилазы синтезируются в двух независимых отделах пищеварительного тракта – слюнных железах и кишечнике (Вилкова, 1980; Ravan et al., 2009; Ramzi et al., 2016; Li

et al., 2017). α -Амилазы, как и другие гидролазы хлебных клопов, изучаются довольно давно и многими авторами (Вилкова 1980; Конарев, 1981; Konarev, 1996; Mehrabadi et al., 2014), однако данные по ним более скудны и разрознены по сравнению со такими ферментами у кровососущих, хищных и других растительноядных клопов. Еще не отсекарованы геномы представителей родов *Eurygaster* и *Aelia* Fabricius, что существенно затрудняет анализ их ферментативных систем. Накоплено недостаточно сведений и по анализу транскриптомов их пищеварительных органов. Вследствие этого в обзоре приходится учитывать и литературные данные по другим видам клопов. У вредной черепашки α -амилазы слюнных желез и кишечника отличаются по компонентному составу при изофокусировании, электрофоретической подвижности и отношению к белковыми ингибиторам из зерна пшеницы (Конарев, 1982а, 1982в, 1992). В слюнных железах растительноядного клопа *L. lineolaris* выявлена экспрессия двух кодирующих α -амилазу генов (Zhu Y-C et al., 2016). В базе данных NCBI представлены результаты секвенирования генома (Sparks et al., 2020) клопа *Halyomorpha halys* (Stål) (Pentatomidae), таксономически ближайшего к вредной черепашке исследованного в этом отношении вида, другого опасного вредителя сельскохозяйственных культур. В ней содержится информация, по крайней мере, о двух генах α -амилазы. Уровень экспрессии α -амилаз у насекомых может меняться в зависимости от состава пищи или присутствия в ней ингибиторов, причем отдельные изоформы могут отличаться по отношению к белковым ингибиторам (Pytelkova et al., 2009). Экспрессия генов α -амилаз может также меняться в ходе развития насекомого. Так, у личинок хищного клопа *Podisus maculiventris* (Say) (Pentatomidae) число изоформ α -амилаз увеличивается от одной у первого личиночного возраста до трех у пятого, а также у взрослых особей (Ghamari et al., 2014).

Большинство α -амилаз насекомых имеет молекулярную массу от 50 до 55 кДа (Franco et al., 2002; Da Lage, 2018). В кишечнике вредной черепашки *E. integriceps* методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) выявлены компоненты с молекулярной массой 49 и 52 кДа (Bandani et al., 2009). Оптимум pH α -амилаз насекомых колеблется в пределах от 4.5 до 7, а у видов рода *Eurygaster* этот показатель находится в интервале pH от 6 до 7 (Ravan et al., 2009). У вредной черепашки, как и у

многих других насекомых, активность α -амилаз снижается в присутствии ионов Mg^{2+} и повышается в присутствии ионов Cl^- (Ravan et al., 2009).

В одном из исследований не было обнаружено изменений в α -амилазной активности в зерне, поврежденном клопами *Eurygaster* и *Aelia*, и в структуре гранул крахмала в зонах повреждения (Rosell et al., 2002). На основании этого сделан вывод о непричастности амилолитических ферментов к ухудшению качества зерна при повреждении клопами. На наш взгляд, эта точка зрения не может считаться достаточно обоснованной, поскольку противоречит результатам, полученным другими авторами (Вилкова, 1973, 1980, Павлюшин, 2015; Бурлака и Каплин, 2015). В частности, у поврежденных вредной черепашкой зерен отмечено пониженное содержание крахмала (Dizlek, 2018). Клопы, встречающиеся в Новой Зеландии, отличались по воздействию α -амилаз на зерно. Повреждение зерна

N. huttoni и рядом других клопов не приводило к видимому изменению структуры крахмальных зерен, в то время как белковая составляющая эндосперма заметно уменьшалась. Одним из приводимых объяснений было отсутствие α -амилаз в секрете слюнных желез данных клопов. Лишь укусы клопа *Stenotus binotatus* (Fabricius) приводил к деградации крахмальных гранул и повышенной активности α -амилаз в зерне (Every et al. 1992). В слюнных железах вредной черепашки выявляется высокоактивная α -амилаза (Вилкова, 1980; Konarev, 1996), а повреждение зерна этим клопом сопровождается разрушением крахмальных гранул (Павлюшин и др., 2015). Очевидно, что ограничение усвояемости клопами главного источника их энергии – крахмала, представляется перспективным направлением создания устойчивых к данным вредителям форм пшеницы.

Ингибиторы α -амилаз

Среди природных регуляторов активности α -амилаз насекомых особое внимание привлекают белковые ингибиторы. В природе они играют важную роль в иммунитете растений к насекомым, а сконструированные на их основе высокоспецифичные к α -амилазам вредителей формы ингибиторов рассматриваются как перспективные и безопасные для человека и окружающей среды факторы защиты растений. Семена растений содержат ингибиторы α -амилаз нескольких типов, отличающиеся по молекулярной массе и структуре. Наиболее перспективными для применения в целях защиты растений от вредителей считаются лектиноподобные, тауматин-подобные, кноттин-подобные, γ -пуротионин-подобные, подобные ингибитору Кунитца из бобовых, а также ингибиторы из злаков (Franco et al., 2002; Конарев, 2017). Отличия по структуре и механизму действия обуславливают широкий спектр специфичности ингибиторов к α -амилазам разных групп организмов и видов насекомых. Помимо защитных ингибиторов, нацеленных на фитофагов, растения содержат специализированные ингибиторы эндогенных α -амилаз (Конарев, 1982а, 1982в; Конарев, 1985; Yamagata et al., 1998; Konarev et al., 1996; Franco et al., 2002). Молекулярная масса ингибиторов α -амилаз из растений колеблется от 4–13 кДа у мономерных форм до 50–60 кДа у ди- и тетрамерных (Franco et al., 2002).

α -Амилазы разных видов насекомых существенно отличаются по отношению к белковым ингибиторам (Конарев и Фомичева, 1991; Конарев, 1992; Franco et al., 2002). Так, α -амилазы долгоносиков *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) и *Callosobruchus chinensis* L. неодинаково реагировали с отдельными компонентами ингибиторов из семян разных видов и образцов фасоли (Konarev et al., 1999а). Нечувствительность α -амилазы к определенному ингибитору может быть результатом эволюционной адаптации к нему. Так, α -амилаза вредителя зернобобовых культур фасолевого зерновки *Acanthoscelides obtectus* Say не чувствительна к белковому ингибитору α API из семян основного кормового растения – фасоли *Phaseolus vulgaris* L. (Kluh et al., 2005), но подавляется ингибитором 0.19 WI из зерна пшеницы (Franco et al., 2000). Подобные наблюдения привели к созданию трансгенных растений с устойчивостью к вредителю, основанной на использовании

«незнакомых» для него вариантов ингибиторов (Solleti et al., 2008. Katoch et al., 2016; Chaudhary et al., 2018).

Зерно мягкой пшеницы содержит несколько вариантов ингибиторов α -амилаз (Buonocore et al., 1977; Lyons et al., 1987; Franco et al., 2000). Мономерные формы с молекулярной массой около 12 кДа более активны по отношению к α -амилазам большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. и ряда других вредителей запасов, а димерные также подавляют α -амилазу слюны человека (Buonocore et al., 1977; Конарев, 1982б; Конарев и Фомичева, 1991). Ингибиторы α -амилаз у злаков – представители широко распространенной у растений группы 2S альбуминов (Tatham and Shewry, 2008), куда входят также некоторые запасные белки и ингибиторы протеаз. Особый интерес для защиты растений представляют бифункциональные ингибиторы, совмещающие в одной молекуле активность ингибитора α -амилаз насекомых и ингибиторов протеаз животных и микроорганизмов, например, трипсина или субтилизина (Ohtsubo and Richardson, 1992; Yamagata et al., 1998; Franco et al., 2002). В зерне дикого ячменя *Hordeum bulbosum* L. обнаружен бифункциональный ингибитор α -амилаз насекомых и трипсина (Konarev and Lovegrove, 2012). Также существуют формы, обладающие ингибирующей активностью к α -амилазам насекомых и ферментативной хитиназной активностью, возможно направленной против фитопатогенных грибов (Ary et al., 1989).

У пшеницы изоформы ингибиторов α -амилаз насекомых проявляют высокую изменчивость по признаку наличия отдельных компонентов, контролируемых хромосомой 6В. Это сопровождается значительными различиями между образцами или отдельными зёрнами образцов по уровню активности ингибиторов (Конарев 1992; Konarev and Lovegrove, 2012). Особенно заметны проявления такой изменчивости у тетраплоидных пшениц эволюционного ряда *Triticum turgidum* L. Весьма вероятно, что именно таковой была природа изменчивости образцов по активности ингибиторов по отношению к α -амилазам, которая коррелировала с устойчивостью к зерновым вредителям (Yetter et al., 1979). Наследование компонентов спектра ингибиторов α -амилаз насекомых подчиняется простым менделевским закономерностям (Конарев и Митрофанова, 1987). Компонентный состав содержащихся в эндосперме

пшеницы ингибиторов α -амилаз (и ингибиторов протеаз) насекомых отражает (Конарев, 1992; Konaev, 1996) полиплоидную природу и геномный состав мягкой пшеницы и ее эволюционные связи с тетраплоидными пшеницами и эгилопсами – предполагаемыми донорами геномов В и D (Конарев, 1983).

Особенность α -амилаз вредной черепашки – практически полное отсутствие (у ферментов из слюнных желез) или очень низкая чувствительность (в кишечнике) к ингибиторам из зерна пшеницы (Конарев, 1981, 1982в, 1992; Konaev, 1996). α -Амилазы из кишечника клопа на 2–3 порядка менее чувствительны к ингибиторам из зерна пшеницы по сравнению с ферментом мучного хрущача *T. molitor* (Конарев, 1982в; Konaev, 1996). При этом имеющиеся данные все же свидетельствуют о возможной защитной роли данных ингибиторов по отношению к хлебным клопам. Поглощенные вместе с разжиженным содержимым эндосперма ингибиторы α -амилаз насекомых сохраняют свою активность в кишечнике клопа вредная черепашка (Конарев, 1982в). Данные масс-спектрометрии подтверждают присутствие пшеничных ингибиторов α -амилаз (и ингибиторов протеаз) в содержимом кишечника вредителя (Saadati and Toorchi, 2017). Ряд исследователей анализировали действие слабообогатщенных препаратов ингибиторов из зерна пшеницы на кишечную α -амилазу

вредной черепашки. Экстракты из разных сортов мягкой пшеницы по-разному ингибировали кишечную α -амилазу клопа (Abdolahadi et al., 2016). Farhoodi et al. (2019) показали, что фракции водосолерастворимых белков, экстрагированные из зерна разных иранских сортов тетраплоидной *Triticum turgidum* L. и гексаплоидной мягкой (*T. aestivum* L.) пшеницы, существенно отличались по ингибирующей активности по отношению к кишечной α -амилазе этого вредителя. Наибольшей активностью обладали экстракты из зерна мягкой пшеницы. Мы можем объяснить это наличием у мягкой пшеницы активных ингибиторов α -амилаз насекомых, контролируемых хромосомой 6 генома D, в то время как зерно *T. turgidum* не содержит данных ингибиторов, а многие образцы данного вида лишены еще и сходных ингибиторов, контролируемых геномом В (Конарев, 1982б и в, 1992; Konaev, 1996). Если α -амилазы слюнных желез черепашки нечувствительны к ингибиторам из пшеницы, то по данным Mehrabadi et al., (2010, 2012), активность этих ферментов (как и кишечных) подавляется ингибиторами из тритикале – гибрида пшеницы и ржи. Это указывает на принципиальную возможность конструирования на их основе более специфичного и эффективного ингибитора, который мог бы быть использован при создании устойчивых к хлебным клопам форм пшеницы.

Полигалактуроназы

Стенки клеток растений представляют собой резервуар органического углерода планетарного масштаба (Pauly and Keegstra, 2008; Pauchet et al., 2010). Чтобы расщепить и усвоить этот богатый углеводами защитный барьер, микроорганизмы секретируют гидролазы, нацеленные на пектин, целлюлозу или гемицеллюлозы. Пектиновую основу клеточных стенок растений формируют нити полигалактуронана, состоящего из соединенных в цепь остатков α -D-галактуроновой кислоты. Разрушение пектиновых веществ необходимо для обеспечения доступа гидролаз питающихся растениями микроорганизмов и насекомых к питательным веществам клеток растений. Важную роль в разрушении пектина играют полигалактуроназы (polygalacturonase, PG) – пектиназа, пектолаза и т.д., гидролизующие α -1,4 связи полигалактуронана. Насекомые, как и другие животные, преимущественно лишены данных ферментов, решают проблему разрушения клеточных стенок, в основном, за счет ферментов симбиотических микроорганизмов, обитающих в их пищеварительном тракте (Giron et al., 2017). Однако отдельные группы насекомых (некоторые жуки, тли, клопы и др.) приобрели пектин-гидролизующие ферменты за счет горизонтального переноса соответствующих генов от микроорганизмов более 100 миллионов лет назад. Гены полигалактуроназ у жуков из семейств Chrysomelidae и Curculionidae, а также клопов рода *Lygus* (Miridae) родственны соответствующим генам грибов аскомицетов (Allen and Mertens, 2008; Kirsch et al., 2014; Soucy et al., 2015; Xu et al., 2019), а у палочников – генам бактерий родов *Pantoea*, *Klebsiella*, and *Enterobacter* (Shelomi et al., 2016).

Вредная черепашка и другие хлебные клопы на разных стадиях развития питаются как вегетативными частями растения, так и созревающими зёрнами, где в клеточных стенках присутствуют в разных соотношениях

структурные полисахариды – глюканы, ксиланы, пектин и др. (Burton and Fincher, 2014; Chateigner-Boutin et al., 2014; Zhang et al., 2014). Эти соотношения меняются в ходе развития растений и, например, у пшеницы содержание пектина в вегетативных органах снижается с возрастом. Кроме того, состав клеточных стенок у злаков существенно отличается от такового у двудольных и большинства других однодольных. У пшеницы клеточные стенки в вегетативных частях и зёрнах также существенно отличаются по составу полисахаридов, причем в зёрне пектинов содержится значительно меньше (Chateigner-Boutin et al., 2014). По-видимому, указанные различия между злаками и другими растениями отразились и на особенностях пищеварительных систем фитофагов. Сведений по гидролизующим пектин ферментам вредной черепашки пока еще мало. В отличие от клопов-фитофагов семейства Miridae, в слюнных железах вредной черепашки (сем. Scutelleridae) не удалось выявить гидролизующих пектин ферментов. У особей, питавшихся созревающими зёрнами, пектинэстеразная и полигалактуроназная активность присутствовали лишь в первом и четвертом отделах средней кишки (Vatanparast et al., 2011). Пока неясно, способны ли слюнные железы вредной черепашки синтезировать полигалактуроназы при питании вегетативными частями злаков. Можно предположить, что усвоению структурных полисахаридов клеточных стенок пшеницы хлебными клопами могут способствовать эндосимбиотические бактерии, жизненно необходимые данному фитофагу (Kafil et al., 2013). По некоторым данным, пока не подтвержденным другими авторами, у вредной черепашки все же есть собственный ген полигалактуроназы (Azam et al., 2015). Интересно, что питание зёрнами пшеницы индуцировало более значительную экспрессию этого гена в кишечнике клопов, чем питание зёрнами ячменя, ржи или тритикале.

Данные по анализу транскрипции контролирующего полигалактуроназу гена свидетельствуют о важности указанного фермента для пищеварения вредной черепашки и позволяют рассматривать его в качестве одной из «мишеней» для разработки подходов к борьбе с этим вредителем. В связи с этим могут представлять интерес белковые ингибиторы полигалактуроназ (polygalacturonase-inhibiting proteins, PGIP), присутствующие в клеточных стенках практически всех растений.

PGIP представляют собой гликопротеины, структурно близкие обширной группе богатых лейциновыми повторами (Leucine-repeat rich, LRR) белков, вовлеченных в реализацию важнейших механизмов иммунитета растений к бактериям, грибам и насекомым (Yagullina et al., 2016; Rathinam et al., 2020).

Протеазы играют ряд важнейших функций во всех живых организмах, и на долю кодирующих их генов приходится около 2% от общего числа генов (Barrett et al., 2001; Rawlings et al., 2004; Rawlings and Bateman, 2019). Пищеварительные протеазы, осуществляющие гидролиз пептидных связей в белках пищи, обеспечивают насекомых, как и другие организмы, аминокислотами – мономерами для построения собственных белков, а дефицит необходимых аминокислот ведет к негативным последствиям, вплоть до летального исхода. В связи с этим оправдан подход к протеазам как к потенциальным «мишеням» для разработки методов и средств защиты растений от вредителей, специфичных и безопасных для человека, сельскохозяйственных животных и окружающей среды. Кроме того, протеазы различных организмов, в том числе насекомых, могут найти применение во многих технологических процессах (Philipps-Wiemann, 2018). Пищеварительные протеазы насекомых принадлежат, главным образом, к четырем основным классам, отличающимся по структуре активного центра и механизму действия – сериновые, цистеиновые, аспартильные и металлопротеазы (Terra and Ferreira, 2012). Отличием протеолитического комплекса некоторых групп насекомых от такового у млекопитающих служит вовлечение в пищеварение, помимо широко распространенных сериновых и аспартильных ферментов, цистеиновых протеаз (Oliveira et al., 2003). Это существенно расширило пищевые адаптации насекомых и позволило более эффективно гидролизовать некоторые белки растений, например, проламины, а также нейтрализовать белковые ингибиторы протеаз и токсичные белки типа лектинов. Считается, что переходы от животной пищи к растительной (например, к лишенному белков флоэмному соку) и обратно, а также давление отбора, могли приводить к потере определенных типов протеаз, в частности, сериновых, и восполнению их отсутствия в кишечнике за счет «рекрутирования» лизосомальных ферментов типа катепсинов В и L (Terra et al., 2019). Имеющиеся данные позволяют предположить появление подобных протеаз в кишечнике в результате дубликации исходных лизосомальных генов протеаз с последующей дивергенцией, позволившей осуществлять секрецию «новых» протеаз из клетки и их активацию в полости кишечника. Такое дополнение арсенала протеаз произошло относительно недавно в эволюционном масштабе и наблюдается у некоторых групп клопов, тлей и

PGIP подавляют активность эндогенных и экзогенных PG. PGIP из фасоли способны подавлять активность PG слюнных желез клопов семейства Miridae, причем одни изоформы ингибиторов проявляли более высокую специфичность к эндогенным PG, а другие – к PG насекомых (D'Ovidio et al., 2004; Frati et al., 2006). На примере арабидопсиса показана защитная роль PGIP в отношении жука листоеда *Phaedon cochleariae* F., а также установлено, что PG насекомых ингибируются теми же PGIP, что и PG фитопатогенных бактерий и грибов. Можно предположить, что это отражает сходство PG насекомых и микроорганизмов, возникшее в результате горизонтального переноса генов.

Протеазы

жесткокрылых. У ряда клопов и жуков «лизосомальные» ферменты теперь соседствуют с сериновыми и другими, что обеспечивает им более полное усвоение белковой пищи. Цистеиновые протеазы найдены и в кишечнике вредной черепашки (Amiri et al., 2016). У представителей более древних таксонов, например, тараканов, в кишечнике преобладают сериновые протеазы, а «лизосомальных» цистеиновых ферментов нет (Tamaki et al., 2014).

До последнего времени не существовало единого мнения относительно внекишечного пищеварения у клопов – осуществляется ли при этом реальное переваривание белков и углеводов до мономеров, доступных для усвоения, или его основная задача заключается лишь в разжижении тканей жертвы/растения до консистенции, достаточной для всасывания. Так, в кишечнике хищного клопа *Podisus nigrispinus* (Dallas), входящего, как и ряд хлебных клопов, в семейство Pentatomidae, выявляются мышечные волокна жертв, которые окончательно перевариваются кишечными протеазами и другими гидролазами (Fialho et al., 2012). Коллагеназа, вырабатываемая слюнными железами, лишь фрагментировала ткани. По-видимому, сходная ситуация с перевариванием белков может наблюдаться и у клопов, высасывающих содержимое семян, размягченное соответствующими протеазами.

Особенность белков клейковины, содержащихся в эндосперме пшеницы, заключается в их нерастворимости в физиологических условиях как из-за высокого содержания пролина и глутамина, так и ассоциации субъединиц глютелина в гигантские сети за счет дисульфидных связей (Shewry and Halford, 2002; Shewry, 2019). Для перевода данных белков в состояние, пригодное для всасывания, вредная черепашка и другие хлебные клопы вводят в эндосперм протеазы, секретированные слюнными железами. Под их действием высокомолекулярные агрегаты белков клейковины разрушаются. В поврежденных клопами зернах увеличивается содержание растворимых в присутствии ДСН белков, а количество «неизвлекаемого» белка снижается (Sivri et al., 2004).

Для щитников характерно «двухфазное» пищеварение, где слюнные железы и кишечник имеют разные функции и, соответственно, состав гидролаз. Слюнные железы, их секрет и кишечник растительного мраморного клопа *H. halys* существенно отличаются по составу и, видимо, функциям протеаз (Lomate and Bonning, 2018).

Анализ литературы указывает на принципиальное сходство систем пищеварительных протеолитических ферментов у представителей разных семейств подотряда Heteroptera. Отличия касаются, главным образом, степени экспрессии протеаз, адекватных главному кормовому белку. У хищников разжижение мышечных тканей жертвы осуществляется, в частности, коллагеназами (Fialho et al., 2012). У кровососущих клопов есть протеазы, специфичные к белкам крови (Santiago et al., 2017).

Набор протеаз слюнных желез вредной черепашки включает формы типичных сериновых трипсиноподобных и химотрипсиноподобных (по молекулярной массе, субстратной специфичности и отношению к ингибиторам) ферментов (Конарев и др., 2017), характеризующихся высокими изоэлектрическими точками (ИЭТ) и чувствительностью к тем или иным известным белковым ингибиторам. Подобные протеазы обычны для хищных, кровососущих и растительноядных представителей различных семейств клопов. В то же время поглощение высокомолекулярных комплексов белков клейковины из эндосперма требует его разжижения, что обеспечивается высокоспецифичными протеазами, в том числе с ИЭТ близкими к 7.0 или «нейтральными» (Konarev et al., 2011, 2019). Протеаза, похожая по способности гидролизовать высокомолекулярные субъединицы глютеина, но отличающаяся от упомянутых ферментов вредной черепашки по субстратной специфичности (сайту гидролиза), секретируется слюнными железами новозеландского клопа *N. huttoni* (Every et al., 2005).

В слюнных железах и кишечнике опасного вредителя многих культур клопа-слепняка *L. lineolaris* были выявлены несколько трипсиноподобных по структуре сериновых протеаз (Zhu et al., 2003). Протеазы слюнных желез с молекулярной массой около 26 кДа обладали способностью гидролизовать желатин, казеин и VApNA (стандартный субстрат, применяемый для анализа активности бычьего трипсина) и ингибировались апротинином и PMSF. Протеазы синтезировались в составе полипептида, состоящего из сигнального пептида, пропептида (активационного пептида) и зрелого фермента с характерной для многих сериновых протеаз животных N-концевой аминокислотной последовательностью IVGG. Слюнные железы и кишечник отличались по набору протеаз.

Обнаружено, что повышение экспрессии пищеварительных протеаз у насекомых в ответ на изменения в составе пищи, в частности, на появление ингибиторов протеаз, сопровождается усилением синтеза в пищеварительных органах определенных эндогенных ингибиторов, обладающих, по-видимому, регуляторной или ограничительной функцией для защиты собственных белков насекомого от нежелательного протеолиза (Lomate et al., 2018). Анализ сиалотранскриптома кровососущих клопов, наиболее изученных с точки зрения молекулярной биологии, указывает на синтез в их слюнных железах как сериновых протеаз, так и разнообразных белковых ингибиторов, в частности из семейства ингибитора Kazal (Santos et al., 2007). Эти ингибиторы, подавляя регуляторные протеазы жертвы, обеспечивают более эффективное всасывание крови. В организме растительноядного клопа *H. halys* (Pentatomidae) также присутствуют ингибиторы типа Kazal, родственные ингибитору тромбина дипеталогастину (NCBI ID:

XP_014283937.2). Пока неясны функции данного ингибитора – либо это «отголоски» хищничества, либо ограничение активности эндогенных протеаз. Вполне возможно, что хлебные клопы также могут обладать подобными ингибиторами. Среди возможных путей их применения может быть использование в целях блокировки деструктивной для пищевых технологий протеолитической активности или для придания растениям устойчивости к вредителям. В свою очередь, ингибиторы протеаз, содержащиеся в насекомых – жертвах хищного клопа щитника *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae), способны подавлять активность трипсиноподобных ферментов из его слюнных желез (Zibae et al., 2012). Интересно, что «кормовые» виды отличались по оказываемому эффекту. Эти данные могут указывать на потенциальную защитную роль данных белков.

Для вредной черепашки и многих других клопов характерно преобладание сериновых протеаз в слюнных железах и цистеиновых – в кишечнике, хотя сериновые в последнем также присутствуют (Вилкова, 1980; Конарев и Фомичева, 1991; Hosseinaveh et al., 2009; Amiri et al., 2016). Из слюнных желез клопа слепняка *Lygus hesperus* Knight (Miridae) была выделена протеаза с ИЭТ при изофокусировании при pH около 10, способная гидролизовать VApNA и казеин, чувствительная к ингибитору сериновых протеаз PMSF, а также к белковому ингибитору трипсина из лимских бобов и овомукоиду (Zeng et al., 2002). Дубовский и др. (2006) выявили в кишечнике вредной черепашки сериновые протеазы, активность которых не подавлялась ингибитором трипсина Кунитца. С помощью протеомных технологий Bezdi et al. (2012) показали присутствие в слюнных железах личинки пятого возраста и имаго вредной черепашки трипсина, химотрипсина, какой-то иной сериновой протеазы ssp3, а также α -амилаз, нуклеаз и ряда других ферментов.

Активность протеаз, как и других гидролаз в пищеварительных органах клопов, как правило, определяется наличием и типом потребляемой в данный момент пищи (Mehrabadi et al., 2014). Так, сериновые нейтральные протеазы активны в слюнных железах вредной черепашки, питающейся созревающим зерном, и почти незаметны у перезимовавших особей, питающихся проростками (Konarev et al., 2011). Изменения в активности пищеварительных ферментов могут происходить как за счет усиления экспрессии кодирующих их генов, так и путем активации запасенных зимогенов (Konarev et al., 2019).

Использование реплик, содержащих в качестве субстрата белки клейковины – глютеин или глиадин, а также желатиновых реплик существенно повысило чувствительность анализа протеаз вредной черепашки (Konarev et al., 2011; Konarev and Lovegrove, 2012). В результате было установлено присутствие в слюнных железах вредителя и поврежденном им зерне нескольких независимых систем протеаз – «нейтральных», с ИЭТ приблизительно между pH 6 и 7, специфичных к белкам клейковины, и «щелочных» (с ИЭТ выше 7), гидролизующих как клейковину, так и животный белок желатин (Конарев и др. 2017; Konarev et al., 2019). По-видимому, нейтральные протеазы, остающиеся в поврежденном клопами зерне после его созревания, играют основную разрушительную роль в отношении клейковины при замесе теста. Такая протеаза была

выделена из нескольких образцов поврежденного вредной черепашкой зерна пшеницы, собранных в России и Турции (Konarev et al., 2011). Молекулярная масса протеазы составляла около 28 кДа. Фермент специфично гидролизует пептидные связи между гекса- и нонапептидными повторами полипептидной цепи высокомолекулярных субъединиц глютеина с остатком глутамина в сайте гидролиза в позиции P1. По результатам частичного секвенирования выделенных из поврежденного клопом зерна изоформ нейтральных протеаз, а также клонирования отдельных соответствующих форм протеаз, синтезируемых в слюнных железах вредителя (Konarev et al., 2011) можно сделать вывод об их принадлежности к семейству пептидаз S1 (по классификации MEROPS), куда входят также хорошо охарактеризованные трипсины и химотрипсины членистоногих и млекопитающих.

Представляет интерес сопоставление данных по повреждению зерна вредной черепашкой и другими, в том числе таксономически удаленными клопами. Повреждение зерна пшеницы новозеландским клопом *N. huttoni* сопровождается разрушением высоко- и низкомолекулярных субъединиц глютеина, приводящим к ухудшению хлебопекарных качеств муки (Every et al., 1989). Из зерна пшеницы, сильно поврежденного клопом *N. huttoni*, была выделена протеаза, способная гидролизовать высокомолекулярные субъединицы глютеина пшеницы, сходные с ними секалины ржи и D-гордеина ячменя, а также β -казеин коровьего молока (Every et al., 2005). Протеаза оказалась специфичной к пептидным связям глютеина и β -казеина, образованным остатками глутамина в позиции P1. В полипептидной цепи глютеина, состоящей из многократно повторяющихся характерных гекса- и нонапептидов, гидролизовалась связь, расположенная в середине гексапептида (SGQ*GQP-GYYPTSLQQ). Близкая по свойствам протеаза, выделенная из зерна пшеницы, поврежденного вредной черепашкой, также гидролизовала связь, образованную остатком глутамина в позиции P1, но расположенную между гекса- и нонапептидными элементами (PGQGQQ*-GYYPTSLQQ) (Konarev et al., 2011). При этом было обнаружено, что при питании семенами других видов растений слюнные железы *N. huttoni* вырабатывают иные протеолитические ферменты, адекватные соответствующим запасным белкам (Every and Stufkens, 1999). Это может служить хорошей иллюстрацией высокой адаптационной способности пищеварительных систем клопов к виду пищи.

Нейтральная протеаза из поврежденных черепашкой зерен была частично секвенирована, что позволило клонировать последовательности ДНК клопа, кодирующие три изоформы фермента (gluten hydrolyzing proteinase, GHP1-GHP3) у особей из Ставропольского края, а также Самарской и Саратовской областей (Konarev et al., 2011). Форма GHP3 была экспрессирована в клетках бактерий, дрожжей (Долгих и др., 2014; Konarev et al., 2019) и насекомых (Долгих и др. 2020, неопубликованные данные). В серии исследований она использовалась в качестве модельного фермента. Антитела к протеазе GHP3, а также PCR-анализ подтвердили присутствие (и экспрессию) данного фермента в слюнных железах вредной черепашки (Konarev и др. 2017; Долгих и др., 2017; Amiri et al., 2016). GHP3 (G1), как и еще одна сериновая протеаза (Tру)

также синтезировались в кишечнике, причем при питании клопов зернами пшеницы уровень их экспрессии был существенно выше, чем в случае зерен других злаков (Amiri et al., 2016). Эти результаты указывают на вовлеченность GHP3 и Тру в пищеварение клопа.

Анализ данных с использованием сервера BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) показал, что протеаза GHP3 обладает относительно высокой (до 66%) гомологией с химотрипсиноподобными протеазами клопа *H. halys*, а также трипсиноподобными протеазами *L. lineolaris* и других клопов этого же рода (до 42%). Из протеаз млекопитающих наибольшую гомологию с GHP3 проявляют химотрипсиноподобные ферменты (до 37%). Наблюдалась также существенная гомология GHP3 с протеолитическими компонентами ядов, характерных для хищных клопов, например водяного клопа *Lethocerus distinctifemur* Menke (Belostomatidae).

Компьютерная модель, построенная на основе аминокислотной последовательности GHP3 и с использованием в качестве шаблона трипсиноподобной протеазы речного рака, показала, что, при общем сходстве структуры с известными сериновыми протеазами различных беспозвоночных, данный фермент клопа имеет ряд особенностей, по-видимому, отражающих его субстратную специфичность к белкам клейковины. Так, например, удлинен участок полипептидной цепи, образующий петлю, формирующую карман S4 активного центра и вовлеченную в связывание остатка глутамина в позиции P4 (Konarev et al., 2011). Подобные структурные особенности ферментов могут быть использованы при разработке специфичных ингибиторов нежелательных для человека гидролаз (см. ниже).

Методами иммуноблоттинга и иммунофлюоресцентной микроскопии с использованием антител к рекомбинантной форме протеазы GHP3 было установлено, что данный фермент синтезируется в слюнных железах вредной черепашки в форме неактивного зимогена и откладывается в секреторных гранулах (Konarev и др. 2017). Активация зимогена GHP3, как и у протеолитических ферментов ряда других видов насекомых *in vivo* происходит, судя по всему, под действием пока неизвестной эндогенной трипсиноподобной протеазы. В пользу этого говорят, в частности, данные по активации рекомбинантного зимогена GHP3 иммобилизованным трипсином (Konarev и др. 2017; Konarev et al., 2019). В лабораторных условиях активация происходит под действием иммобилизованного бычьего трипсина, гидролизующего пептидную связь между C-концевым остатком аргинина в составе пропептида и остатком изолейцина в N-концевой области последовательности зрелого фермента, характерной для сериновых протеаз (IVGG---). По-видимому, *in vivo* процесс активации имеет нейрогуморальную регуляцию и запускается при наличии соответствующего пищевого субстрата. Имеющиеся данные указывают на то, что подобные преобразования происходят и с щелочными протеазами слюнных желез вредной черепашки (Konarev et al., 2019). Активация зимогенов сериновых протеаз *in vivo* выполняет одну из ключевых функций трипсиноподобных ферментов как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных (Querino et al., 2020). Активирующее действие трипсина на зимогены пищеварительных протеаз *in vitro* показано

на разных видах насекомых (Vizioli et al., 2001). Подобные активирующие протеиназы играют важную роль в пищеварении и их подавление с использованием ингибиторов

рассматривается как одно из возможных направлений защиты растений (Parde, 2009).

Пролил-эндопептидазы

Использование синтетического субстрата benzyloxycarbonyl-Gly-Pro-p-nitroanilide (ZGPPNA) позволило обнаружить в поврежденном вредной черепашкой зерне протеазу, специфично гидролизующую пептидные связи, образованные с участием остатков пролина (Darkoh et al., 2010). Полноразмерная последовательность ДНК, кодирующая данную протеазу (пролил-эндопептидазу, spPER) была клонирована и экспрессирована в клетках *E.coli* (Yandamuri et al., 2014). Молекулярная масса фермента составила около 80 кДа. Наиболее близкой к spPER из известных протеаз по структуре оказалась пролил-специфичная протеаза из ракообразного *Daphnia pulex* Leydig (56% гомологии). 51% гомология с пролил-эндопептидазой из мозга свиньи позволила построить компьютерную 3D модель spPER. Последняя оказалась уникальным представителем семейства протеаз S9A, способным гидролизовать белки, размер которых превышает 30 кДа, что необычно для подобных ферментов из-за структурных особенностей их активного центра. Именно к таким белкам принадлежат глиадины и глютенины. Эта группа исследователей под руководством доктора В. Clack из Stephen F. Austin State University (США) считают spPER главным деструктивным для клейковины фактором, секретируемым вредной черепашкой в зерно пшеницы. Ими рассматриваются возможности ограничения активности данного фермента воздействием на содержащиеся в структуре гена spPER сайты, связывающие факторы транскрипции (Yandamuri et al., 2014) или конструированием специфичных пептидных ингибиторов, например, на основе пептидов – продуктов гидролиза казеина (Kadarkova et al., 2017). Подтверждена экспрессия пролил-специфичной протеазы в слюнных железах вредной черепашки (Konarev et al., 2019). С помощью нового метода идентификации в сочетании с ИЭФ белков выявлена активность такой протеазы в слюнных железах клопа и у ее экспрессированной рекомбинантной формы. Однако в этих же условиях активности пролил-специфичной протеазы в поврежденных вредной черепашкой зернах обнаружить не удалось. Эти результаты позволяют предположить, что spPER преимущественно активна при питании клопов эндоспермом, где она, возможно, способствует разжижению клейковины, но ее активность при

замесе теста из муки из поврежденных зерен, по-видимому, незначительна. Основную деструктивную роль здесь, видимо, играют «нейтральные» протеазы, сохраняющие активность в поврежденном зерне (Konarev et al., 2019).

Особенность пролил-специфичных протеаз, особенно широко распространенных у микроорганизмов, заключается в способности к глубокому гидролизу богатых пролином и глутамином белков клейковины. Обычные для человека протеазы типа трипсина и химотрипсина не способны гидролизовать такие пептидные связи и разрушают глиадины и глютенины до более крупных фрагментов. Пролин-богатые пептиды содержат множество иммуногенных эпитопов и способны инициировать в организме человека аутоиммунные и иные нежелательные реакции. Такие пептиды могут проявлять токсичность по отношению к страдающим опасным заболеванием – целиакией или более широкому кругу глютен-чувствительных людей (Caio et al., 2019; Shewty, 2019). Эффективного гидролиза клейковины до нетоксичных пептидов можно добиться с помощью пролил-эндопептидаз, например, из грибов или бактерий, в том числе рекомбинантных. Препараты протеаз различного происхождения, гидролизующих пептидные связи белков, образованные с участием остатков пролина и глутамина, предлагается использовать в форме добавок к пище, обезвреживающих клейковину (Piper et al., 2004; Stepniak et al., 2006; Amador et al., 2019). Подобные ферменты насекомых также представляют интерес как перспективные факторы обезвреживания клейковины (Kumar, 2016; Tereshchenkova et al., 2019). spPER и другие пролил-специфичные протеазы хлебных клопов тоже можно рассматривать в качестве перспективных «инструментов» для модификации клейковины. Разработан простой метод выявления пролил-специфичных протеаз, который может упростить анализ таких ферментов (Konarev et al., 2019). В свою очередь, «нейтральная» протеаза из поврежденных клопом зерен пшеницы также способна гидролизовать иммуногенные эпитопы белков клейковины, в частности, последовательность QGGYYPTS глютенина (Konarev et al., 2011), связанную с HLA-DQ8 формой целиакии (van de Wal et al., 1999).

Ингибиторы протеаз

Белковые ингибиторы выступают природными регуляторами активности протеаз у животных и растений (Мосолов, 1983). Широкое применение они нашли в медицине. На основе известных ингибиторов создаются формы, направленные на подавление протеаз патогенных бактерий, грибов, протистов и вирусов (Shamsi et al., 2016). Особое внимание уделяется разработке ингибиторов, позволяющих ограничивать нежелательную активность эндогенных протеолитических ферментов, вовлеченных в различные патологические процессы (Qiu et al., 2017; Riley et al., 2019). Ингибиторы – важный компонент иммунологической системы растений (Вилкова и Конарев, 2010; Конарев, 2017). В связи с этим на протяжении уже нескольких десятилетий большие надежды возлагаются

на ингибиторы в связи с потенциальной возможностью использовать их в сельском хозяйстве как средство борьбы с вредными для растений микроорганизмами и насекомыми (Ryan, 1990; Dunaevsky et al., 2005; Yarullina et al., 2016; Akbar et al., 2018; Singh et al., 2018; Cotabarren et al., 2020;). У живых организмов охарактеризовано около 100 типов белковых ингибиторов протеаз, отличающихся по структуре и механизмам действия (Rawlings et al., 2004, 2017). Из них у растений найдено более 12 типов (Bateman and James, 2011). Преимущества ингибиторов как средств защиты растений заключаются в их относительной специфичности, безопасности для человека и окружающей среды, а также то, что они входят в число естественных для живых организмов факторов, регулирующих активность

ферментов. Подавляя активность пищеварительных протеаз и затрудняя тем самым усвоение белков растений фитофагами, ингибиторы повышают их энергетические затраты на усвоение пищи и снижают жизнеспособность (Вилкова и Конарев, 2010). Однако следует учитывать, что системы пищеварительных ферментов у насекомых и ингибиторов у растений складывались в ходе длительной коэволюции этих организмов (Конарев, 2017; Konarev et al., 1996; Jongsma and Beekwilder, 2011). Существенным недостатком, сдерживающим практическое применение ингибиторов в сельском хозяйстве, служит то, что насекомые обладают рядом механизмов преодоления негативного для них воздействия ингибиторов (Jongsma and Bolter, 1997). Среди них – усиление экспрессии пищеварительных протеаз, экспрессия нечувствительных к ингибиторам форм этих протеаз, а также протеолитическое разрушение ингибиторов (Singh et al., 2018).

Воздействие ингибиторов из растений на насекомых может сводиться не только к простому ограничению активности пищеварительных протеаз, а быть гораздо сложнее. Понятна ситуация, когда белковые ингибиторы подавляют активность соответствующих протеаз и это приводит к снижению жизнеспособности или даже гибели фитофагов. Однако защитная функция ингибиторов может проявляться и более опосредовано. Так, тли, как и клопы, входящие в монофилетический (по данным секвенирования митохондриальных геномов, Li et al., 2015) отряд Hemiptera, как правило, питаются флоэмным соком растений, практически не содержащим белки. Соответственно у большинства видов тлей в пищеварительной системе отсутствуют или малоактивны протеазы. Однако присутствие в пище обладающих ингибиторной активностью к химотрипсину фрагментов ингибитора Баумана-Бирк приводило к повышенной смертности гороховой

тли *Acyrtosiphon pisum* Harris. При этом ингибиторы трипсина проявляли меньшее негативное воздействие на насекомых (Rahbé et al., 2003). Возможно, защитная роль ингибиторов в данном случае состоит в подавлении активности не пищеварительных протеаз, а каких-то других эндогенных химотрипсиноподобных ферментов, вовлеченных в метаболизм насекомого. В отличие от гороховой тли, у которой протеолитическая активность не выявлялась, у большой злаковой тли в кишечнике были активны цистеиновые и сериновые химотрипсиноподобные ферменты (Pyati et al., 2011). Однако, по мнению авторов, белковое питание не достаточно для этого фитофага и протеазы играют лишь вспомогательную роль. При этом даже при наличии в пище достаточного количества свободных аминокислот, присутствие ингибиторов оказывало негативное воздействие на тлей. По-видимому, и в этом случае мишенью для ингибиторов служили протеазы насекомого, участвующие в гидролизе собственных белков. Подобные эффекты ингибиторов протеаз могут проявляться и в отношении клопов. Слюнные железы и кишечника клопов из семейства Pentatomidae отличаются по составу протеаз, а сами протеазы из этих органов неодинаково реагируют с теми или иными белковыми ингибиторами (Lomate and Bonning, 2016). То же характерно и для протеаз вредной черепашки (Конарев и др., 2017; Amiri et al., 2016; Konarev et al., 2019). Многие авторы изучали взаимодействие различных белковых ингибиторов с протеазами черепашки (Sivri and Koksel, 2000; Hosseinaveh et al., 2009; Saadati et al., 2011; Mehrabadi et al., 2014; Olanca and Ozay, 2015), однако результаты их исследований довольно противоречивы. По-видимому, это отчасти связано со сложностью набора протеаз и меняющимся уровнем экспрессии его отдельных составляющих (Конарев и др. 2013; Konarev et al., 2019)

Перспективные пути создания эффективных ингибиторов протеаз хлебных клопов и других насекомых

Учитывая огромный позитивный потенциал данных защитных белков, усилия исследователей сегодня направлены на преодоление адаптации вредных насекомых к ингибиторам. Можно выделить несколько разрабатываемых ныне подходов (Shamsi et al., 2016; Singh et al., 2018; Clemente et al., 2019). Так, использование при создании устойчивых растений генов ингибиторов, с которыми данный вредитель в природе не встречался, может замедлить адаптацию. Также затрудняет приспособление внедрение генов двух и более структурно и эволюционно независимых ингибиторов протеиназ. Многообещающими были результаты экспериментов по параллельному использованию генов ингибиторов протеаз и других токсичных для насекомых белков, например, лектинов (Yu et al., 2014). Однако такие подходы требуют известной осторожности и детального анализа побочных воздействий токсичных белков на человека или энтомофагов, поскольку некоторые из них, в отличие от ингибиторов протеаз, потенциально небезопасны (Poulsen and Pedersen, 2010). Проще обстоит дело с использованием подобных сочетаний для технических культур. В качестве одного из пока немногочисленных примеров успешного применения упомянутой технологии можно упомянуть создание в Китае используемых на практике форм хлопчатника, в которые внедрили гены Bt-токсина и ингибитора трипсина (Gatehouse, 2011).

Возможно, более перспективным направлением станет конструирование специфичных ингибиторов протеаз вредных организмов с привлечением компьютерного моделирования и на основе известных природных форм данных белков. В пользу обоснованности такого подхода свидетельствует успешный опыт его применения в медицине при разработке средств терапии, нацеленных на подавление нежелательной активности протеаз патогенов или собственных ферментов организма человека (Кузнецова и др., 2016; Riley et al., 2019). Исходными формами для конструирования могут быть известные классические ингибиторы протеаз из животных и растений, продомены, блокирующие активный центр собственно протеаз в составе зимогенов, или белковые субстраты. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что «нейтральные» протеазы, секретируемые вредной черепашкой в поврежденное зерно в наибольшей мере ответственны за повреждение клейковины при замесе теста (Конарев и др. 2014, 2017; Konarev et al., 2019). Особенность этих протеаз – очень низкая чувствительность к известным белковым ингибиторам. Применение высокочувствительных модификаций методов анализа взаимодействия нейтральных протеаз с различными типами ингибиторов из растений и животных позволило установить, что отдельные представители семейства ингибитора химотрипсина I из картофеля, в частности,

выделенные и изученные ранее (Konarev et al., 2002) ингибиторы из семян космеи (*Cosmos bipinnatus* Cav.) и ряда других сложноцветных, могут служить исходными формами для конструирования эффективных ингибиторов этих протеаз (Konarev et al., 2011; Конарев, 2019, неопубликованные данные). Активность «щелочных» протеаз, также присутствующих в поврежденных зернах и способных повреждать клейковину, подавляется рядом известных («стандартных») ингибиторов протеаз типа апротинина животных или соевого ингибитора трипсина (Konarev et al., 2019). Это упрощает подбор базовых форм для моделирования и конструирования. В. Clack и др., сосредоточившие внимание на пролил-специфичных пептидазах слюнных желез вредной черепашки (Yandamuri et al., 2014), предприняли попытку взять за основу фрагменты белка молока – казеина (Vishram and Clack, 2015; Kadakova, 2017), однако пока эта работа не получила продолжения.

В последнее время как в медицине, так и в защите растений интенсивно внедряются технологии, основанные на РНК-интерференции, позволяющие с помощью коротких фрагментов комплементарной РНК (двухцепочечной РНК, или dsRNA) блокировать активность определенных генов, в т.ч. протеаз (Thakur et al., 2016). К достоинствам данной технологии можно отнести возможность применения для подавления ключевых для жизнеспособности вредных организмов генов при доставке РНК как в форме аэрозоля, так и в виде добавки в корм. Подходы, использующие РНК-интерференцию, в ряде случаев могут рассматриваться как альтернатива трангенным технологиям, использующим гены бактериальных токсинов, особенно в случае формирования резистентности к последним (Fishilevich et al., 2016). Такая РНК может вырабатываться и трансгенными растениями. Очень важен правильный выбор мишеней для РНК-интерференции. Мишени должны отвечать за жизненно важные для насекомого функции, в геноме не должно быть полностью дублирующих эти функции генов, а dsRNA должна обладать высокой избирательностью во избежание нежелательных для биоценоза последствий. Разрабатываются подходы к повышению эффективности подбора таких мишеней (Wang et al., 2011).

Известны примеры разработки технологии РНК-интерференции для борьбы с растительноядными клопами из рода *Lygus* путем подавления экспрессии генов-мишеней (Девген и др., 2018). Иранские исследователи продемонстрировали принципиальную возможность подавления жизнеспособности вредной черепашки путем блокирования экспрессии гена, кодирующего кишечную цистеиновую протеазу с помощью соответствующей dsRNA (Amiri et al., 2016). Недавно Amiri and Bandani (2020) провели подобную работу с гидролизующей клейковину (GH, gluten hydrolyzing) протеазой черепашки, идентичной описанной ранее протеазе GHP3 (Konarev et al., 2011, 2019; Долгих и др., 2014). Обработка личинок пятого возраста и имаго раствором dsRNA, комплементарной элементу последовательности гена протеазы GH, подавляла экспрессию последней в слюнных железах и кишечнике и вызывала нарушения в развитии личинок. Полученные этими авторами данные свидетельствуют о важной роли протеазы GH/GHP3 не только в пищеварении, но и других физиологических процессах в организме клопа.

Очевидно, что при разработке новых подходов к защите растений необходимо знание особенностей пищеварительной системы вредителя. Так, высокая нуклеазная активность в секрете слюнных желез клопов семейства Pentatomidae может понизить эффективность использования методов РНК-интерференции. Секрет слюнных желез клопа *H. halys* характеризуется высокой активностью различных РНКаз. РНКазы, специфичные к двухцепочечным РНК (ds RNases), как и ДНКазы, более активны в слюнных железах и их секрете, чем в кишечнике (Lomate and Bonning, 2018). В связи с этим возникает потребность в безопасных способах доставки специфичной dsRNA в кишечник (Cantón and Bonning, 2019).

Очевидно, что у технологии РНК-интерференции большое будущее в решении проблем защиты растений, в том числе и в отношении хлебных клопов. Однако следует учитывать, что применение таких средств еще до конца законодательно не отрегулировано. Так, зачастую полагают, что, поскольку обработка живых объектов препаратами dsRNA не создает новых или генетически модифицированных организмов, а сами dsRNA не наследуются и не служат мутагенами, данная технология не подпадает под существующие ограничения. Однако здесь все же необходима осторожность, поскольку долговременные последствия применения технологии РНК-интерференции для экосистем пока до конца не изучены (Heinemann, 2019; Liu et al., 2019).

Слабой стороной технологии, связанной с конструированием пептидных ингибиторов на основе известных форм данных белков, выступает довольно высокий консерватизм механизмов их действия, обусловленный консерватизмом структур протеаз, отвечающих за связывание субстрата. Следствие этого – широкий спектр возможных мишеней для нового ингибитора, помимо целевого фермента (Schneider et al., 2012). Альтернативой пептидным ингибиторам с классическим механизмом действия могут стать антитела. Уже накоплено немало примеров успешного применения антител для защиты растений от вредных организмов, в частности, от вирусов и грибов (Safarnejad et al., 2011, Peschen et al., 2016). Чрезвычайно высокая специфичность антител к отдельным участкам полипептидной цепи, в том числе, участвующим в связывании субстрата, открывает возможность создания узконаправленных ингибиторов протеаз, что уже находит применение в медицине (Lopez et al., 2019). Достоинство таких антител заключается в безопасности для человека и животных. Последовательности ДНК, кодирующие соответствующие антитела, в том числе их короткие производные – scFv-фрагменты (single-chain variable fragments), могут быть встроены в геном растения. В этом году показана принципиальная возможность подавления активности нейтральных протеаз слюнных желез вредной черепашки специфичными антителами. Были получены поликлональные антитела к рекомбинантному пептиду, соответствующему фрагменту полипептидной цепи протеазы GHP3, вовлеченному в формирование кармана S4 – подцентра связывания субстрата. Этот карман ответственен за связывание остатка глутамина в составе глютеина в позиции P4. Антитела, связываясь с данным фрагментом, блокируют доступ субстрата к активному центру протеазы и делают невозможным его гидролиз (Dolgikh et al., 2020).

Свойства клейковины, влияющие на ее устойчивость к протеазам хлебных клопов

Сорта пшеницы существенно отличаются по устойчивости клейковины к воздействию протеаз хлебных клопов. Во многом устойчивость определяется особенностями состава и свойств глютенинов (Sivri et al., 2002). Как известно, за наиболее важные хлебопекарные качества муки отвечают высокомолекулярные субъединицы глютенинов (Shewry and Halford, 2002). Интересно отметить, что со свойствами глютенинов связана не только устойчивость клейковины, но и полевая устойчивость самой пшеницы к данным вредителям (Werteker and Kramreither, 2008). Возможно, устойчивая к протеолизу клейковина малодоступна для всасывания, что и ограничивает повреждение зерна.

От действия протеаз вредителя, в первую очередь, страдают высокомолекулярные субъединицы глютенина (HMWG, high molecular weight glutenin). У разных сортов пшеницы электрофоретический спектр HMWG состоит из 3–5 компонентов. Спектры HMWG, как и глиадинов, генетически детерминированы и даже используются как удобные и информативные инструменты сортовой идентификации (Конарев, 1983). Fatehi et al. (2008) показали, что устойчивость сортов пшеницы к вредной черепашке

может коррелировать с компонентным составом HMWG. Выяснилось, что сочетание компонентов HMWG 7+8 и 2+12 положительно коррелирует с процентом поврежденных зерен, тогда как набор компонентов 7+9 и 12 отчетливо отрицательно коррелирует с данным показателем.

На устойчивость клейковины к различного рода повреждениям оказывают влияние и сортовые особенности глиадинов. Теняева (2004) предложила использовать определяемые электрофорезом в сочетании с денситометрией количественные и качественные характеристики компонентов спектров α - и ω -глиадинов в качестве маркеров устойчивости технологических, хлебопекарных свойств зерна разных сортов и биотипов озимой пшеницы к разрушительному действию протеаз хлебных клопов. Обнаружено, что даже отдельные биотипы в пределах одного сорта, идентифицируемые по спектрам данных глиадинов, могут заметно отличаться по уровню и характеру изменений хлебопекарных свойств муки из поврежденных вредной черепашкой зерен (Емельянов, 2008). По-видимому, использование устойчивых к воздействию протеаз клопов биотипов может содействовать созданию форм пшеницы с невосприимчивой к повреждению клейковиной.

Улучшители клейковины, поврежденной протеазами хлебных клопов

Само по себе употребление хлеба и других продуктов, приготовленных из поврежденного хлебными клопами зерна, безопасно для человека. Однако такое повреждение приводит как к снижению урожая пшеницы, так и к ухудшению качества муки, что выражается в размягчении и «расплывании» теста, его низкой устойчивости при брожении, повышенной липкости, выпекании хлеба с уменьшенными высотой и объемом, грубой коркой и неудовлетворительной структурой мякиша (Павлюшин и др. 2015; Dizlek, 2018). Сильное поражение зерна приводит к глубокому гидролизу белков, что может ограничивать пригодность использования такой муки для выпечки хлебобулочных изделий.

Многими исследователями показано, что, чем выше содержание поврежденных зерен, тем хуже качественные характеристики муки. При этом имеющиеся в литературе сведения относительно критичного для качества клейковины уровня повреждения зерна клопами сильно разнятся. Приводимые цифры колеблются от 0.3 до 15%, что может быть связано с особенностями видового или популяционного состава вредителей, а также их плотностью при повреждении, погодными условиями, доступностью воды, продолжительностью периода роста растений, фазой созревания зерен и степенью их высасывания, сортовыми особенностями кормового растения и т.д. (Конарев и др., 2013; Dizlek 2018). Важно отметить, что наличие, активность и компонентный состав протеаз хлебных клопов в поврежденном зерне существенно отличаются у разных образцов (Конарев и др., 2013; Konarev et al., 2019).

Уровень поврежденности может быть определен визуальными и инструментальными методами, однако потенциальная опасность для хлебопекарных качеств муки может быть оценена лишь с привлечением биохимических методов (см. раздел «диагностика») или непосредственно выпечкой. Разработаны и продолжают разрабатываться разнообразные технологические подходы к снижению

ущерба качеству клейковины или ее «укреплению». Так или иначе они направлены на снижение активности, в первую очередь, протеаз, а также других гидролаз вредителей, ограничение доступности белков муки для гидролиза данными ферментами или укрепление нарушенной протеазами пространственной белковой сети.

Среди путей к преодолению негативных последствий поражения зерна клопами, используемых в пищевых технологиях – подбор оптимальной влажности и температуры, добавление неповрежденной муки с сильной клейковиной, уменьшение продолжительности «отдыха» теста (и, видимо, в целом, сокращение времени между добавлением воды к муке и выпечкой, что должно ограничить эффект от действия протеаз), выбор типа выпекаемого изделия (печенье, крекеры или вафли, вместо хлеба) и т.д. (Dizlek and Özer et al., 2017).

Экстракты из шишек хмеля подавляли активность протеаз в муке из поврежденного зерна и улучшали характеристики клейковины (Olanca and Ozay, 2015). Можно отметить, что шишки хмеля давно и широко используются в медицине, пивоварении и хлебопечении, что может свидетельствовать о безопасности данной добавки для человека (Biendl and Pinzl, 2009; Irakli et al., 2019). Возможно, стабилизирующий эффект данного экстракта на клейковину связан с действием разнообразных веществ вторичного происхождения. Такие соединения могут непосредственно инактивировать протеазы, либо, связываясь с белками, ограничивать их доступность для гидролиза. Использование закваски на основе бактерий рода *Lactobacillus* также позволяет улучшить хлебопекарные качества муки из поврежденных вредной черепашкой зерен, что подтверждается и данными электрофореза запасных белков (Özülkü and Sivri Özay, 2020).

Выдерживание поврежденных клопами зерен при 55 °С в течение недели или при 70 °С в течение получаса приводило к снижению в них протеолитической активности

и улучшению технологических качеств муки (Ertugay et al., 1995; Türker and Elgün, 1998b). Качество клейковины и выпекаемого хлеба может быть улучшено обработкой в микроволновой печи в течение 2–3 минут (Türker and Elgün, 1998a).

Обнаружено, что обработка ультразвуком поврежденных клопами зерен существенно подавляет протеазы вредителя, улучшает показатели клейковины и не оказывает негативного влияния на качество клейковины из неповрежденных зерен (Durak et al., 2016). Добавление 1.5% муки из семян головчатки *Cephalaria syriaca* (L.) Roem. & Schult. к муке из поврежденных вредной черепашкой зерен пшеницы по данным оценки на фаринографе существенно улучшало реологические характеристики клейковины. Такая добавка традиционно используется в Турции для улучшения хлебопекарных качеств муки (Başar et al., 2016). Для восстановления вязкоэластичных свойств и газоудерживающей способности клейковины из поврежденных клопами зерен часто используют подходы, аналогичные тем, что обычно применяют для улучшения качества муки и теста, в т.ч. улучшители качества хлебобулочных изделий окислительного действия – кислород, пероксид водорода, персульфат аммония, бромат и иодат калия, диоксид хлора и т.д. На мукомольных предприятиях муку отбеливают хлором, оксидами азота, пероксидом бензоила и т.п. Следует отметить, что в разных странах перечни разрешенных для производства хлеба химикатов сильно разнятся и многие из перечисленных препаратов запрещены, например, в ЕС, из-за потенциальной канцерогенности. В США использование таких препаратов допускается только при строгом соблюдении установленных правил, обеспечивающем их относительную безвредность (Joye et al., 2009).

В России окислители давно используются в хлебопекарной промышленности для укрепления клейковины, повышения газоудерживающей способности теста и улучшения формоустойчивости заготовок. В настоящее время список разрешенных здесь окислителей также существенно ограничен. Среди наиболее употребляемых и безопасных можно назвать аскорбиновую кислоту. Последняя, как и другие окислители, способствуют формированию дисульфидных связей в клейковине, поврежденной протеазами вредной черепашки, и, укрепляя пространственную белковую сеть, снижают индекс деформации клейковины (ИДК) до необходимого уровня. Недостаток данного подхода заключается в том, что окислители, добавленные к муке, могут продолжать свое действие при ее последующем хранении на протяжении многих дней, что приводит к чрезмерному укреплению клейковины. Впрочем,

Протеазы в диагностике повреждения зерна хлебными клопами

В отличие от грызущих вредителей, у клопов, как и ряда других Hemiptera, основным фактором, разрушающим ткани растений, служат гидролазы, секретируемые слюнными железами. Соответственно и методы диагностики повреждения основаны на выявлении морфологических признаков такого повреждения – в случае семян это их деформация, наличие точки в месте прокола, изменения в структуре эндосперма, вызванные действием α -амилазы, протеазы и т.д. Для выявления повреждения зерна пшеницы хлебными клопами разработаны или

существуют ферментные добавки, оптимизирующие газоудерживающую способность такого теста (Ковальчук, 2009). Качество хлеба из пораженной клопом-черепашкой пшеницы может быть существенно улучшено добавками органических кислот и ферментов, снижающих pH теста и инактивирующих ферменты вредителей (Dizlek, Özer, 2016). Такие добавки признаны не опасными для здоровья.

Катализируемое ферментами формирование ковалентных связей между полипептидными цепями, приводящее к укреплению белковой сети или образованию крупных белковых агрегатов, считается относительно безопасной альтернативой химическим улучшителям клейковины и находит широкое применение в пищевой промышленности. Так, трансглутаминазы (КФ 2.3.2.13) катализируют формирование в белках ковалентных связей между свободными аминогруппами, присущими, например, остаткам лизина, и остатками глутамина. Такие связи не поддаются гидролизу большинством протеолитических ферментов. Показана возможность «укрепления» клейковины из поврежденных клопами зерен и улучшения ее характеристик путем использования микробной трансглутаминазы (Bonet et al., 2005). Эффект достигается за счет образования перекрестных связей между полипептидными элементами клейковинных белков и формирования высокомолекулярных белковых агрегатов, что компенсирует последствия гидролиза белков протеазами вредителей. Трансглутаминазы широко используются в пищевых технологиях для улучшения функциональных свойств белков мяса, молочной сыворотки и сои (Yildirim and Hettiarachchy, 1997; Wang et al., 2018). Однако данный подход требует известной осторожности, поскольку трансглутаминаза 2 человека вовлечена в процесс иммунопатогенеза целиакии, а микробные трансглутаминазы выступают в качестве сильных аллергенов и также могут провоцировать целиакию (De Palma et al., 2014; Matthias et al., 2016).

Окислительно-восстановительные ферменты, в частности, глюкозооксидаза, гексоксидаза и лакказа также используются в качестве безопасных ингредиентов для укрепления клейковины, в том числе, из поврежденного протеазами вредной черепашки зерна (Bonet et al., 2007; Gradinaru et al., 2017; Armstrong et al., 2019; Mayolo-Deloisa et al., 2020). Глюкозооксидаза катализирует окисление β -D-глюкозы в присутствии кислорода, продуцируя образование D-глюконовой кислоты и перекиси водорода, что способствует формированию дисульфидных или дитиозиновых мостиков между полипептидами. Отмечено стабилизирующее действие глюкозооксидазы, в первую очередь, на высокомолекулярные субъединицы глютенина поврежденного зерна пшеницы.

разрабатываются разнообразные методы, в том числе, визуальные, инструментальные – просмотр в видимом или инфракрасном свете (Вилкова и др., 1976; 2006, Singh et al., 2009; Armstrong et al., 2019), а также в других диапазонах электромагнитных волн (Архипов и др., 2017), в т.ч. с привлечением искусственного интеллекта (Sabancı, 2019). Следует учитывать, что морфологические признаки не всегда позволяют достоверно оценить природу и уровень повреждения. Несколько более информативны биохимические методы, например, выявление следов

гидролиза запасных белков зерна протеазами вредителя (Яковенко и др. 1978; Torbica et al., 2014; Olanca et al., 2016 и т.д.). Однако изменение морфологии семян или разрушение белков, приводящее к ослаблению или исчезновению электрофоретических компонентов спектра запасных белков может вызываться не только протеазами и другими гидролазами хлебных клопов, но и ферментами самого зерна при его прорастании или фитопатогенных грибов, например, при фузариозе (Гагкаева et al., 2011; Eggert et al., 2011). Более специфичные методы диагностики повреждения зерна пшеницы хлебными клопами, основанные на использовании антител к белкам слюнных желез (в значительной мере представляющих собой набор пищеварительных гидролаз), разрабатывались в нашей стране еще в 1970-х (Гаврилюк и др., 1975; Семенова и др. 1977). Попытки обратиться к этому подходу для анализа поврежденных семян пшеницы и других растений осуществлялись и в относительно недавнее время (Lait et al., 2003; Vaccino et al., 2016). То, что эти высокоспецифичные методы пока не получили широкого применения, может быть связано трудностями стандартизации получения антител. Возможно, что внедрение технологий моноклональных и одноцепочечных scFv-фрагментов антител (Долгих и др., 2017) позволит сделать иммунохимический подход к диагностике более доступным для практического применения. Разработка методов выявления гидролизующих клейковину протеаз с использованием субстратных реплик после изoeлектрического фокусирования (ИЭФ) белков поврежденного зерна или слюнных желез, открыла путь к новому более специфичному подходу к диагностике повреждения. После инкубации реплик, содержащих нерастворимый или растворимый в уксусной кислоте глютеин, либо глиадин, в контакте с разделяющим гелем в случае присутствия в образце соответствующих протеаз, на репликах появляются отчетливые полосы гидролиза (Конарев и др. 2014, 2017; Долгих и др. 2014; Konarev et al., 2011, 2019; Konarev and Lovegrove, 2012). В результате получаются характерные для вредной черепашки и родственных ей клопов спектры полос гидролиза, отражающие спектры протеаз, которые могут быть использованы независимо или в качестве дополнения к традиционным критериям диагностики (Нейморовец и др., 2016; Вилкова

и др., 2018). Преимущество подобного биохимического подхода, по сравнению с интраскопическими методами, заключается в том, что первые выявляют повреждение зерна (и потенциальный ущерб качеству хлеба) по главному фактору вредности клопов – активным протеазам, а вторые – по результатам действия этих протеаз в созревающем зерне. В итоге, во многих образцах зерна с явными видимыми признаками повреждения клопами, активные протеазы отсутствуют. Отсутствие протеаз может быть обусловлено многими причинами – сортовыми особенностями зерна, фазой его развития в момент укола и т.д. В свою очередь хлебопекарному качеству муки угрожают преимущественно зерна, содержащие активные протеазы. При этом повреждение клопами, обусловленное целым рядом гидролаз (независимо от остаточного уровня протеаз в зрелом зерне), может оказывать негативное влияние на другие важные параметры урожая пшеницы, в том числе на всхожесть зерна, что заслуживает дальнейшего изучения (Капусткина и Нефедова, 2017). Представляется наиболее эффективным использование в качестве простых информативных дополнительных критериев диагностики повреждения зерна пшеницы хлебными клопами метода ИЭФ в комплексе с субстратными репликами в сочетании с микрометодом определения степени набухания клейковины в растворе ДСН. Последний довольно точно отражает степень повреждения клейковины протеазами. ИЭФ спектры гидролизующих клейковину протеаз могут существенно отличаться как между образцами поврежденного зерна, так и в пределах одного образца при анализе отдельных зерновок. Это может отражать как сортовые особенности зерна, так и популяционную изменчивость клопов (Конарев и др., 2013; Konarev et al., 2019). Недавно был предложен еще один вариант высокоспецифичной диагностики поврежденности зерен по активности протеаз клопов. Основываясь на полученных Konarev et al. (2011) данных по субстратной специфичности гидролизующей глютеин протеазы, выделенной из поврежденных вредной черепашкой зерен пшеницы, исследователи из Турции создали синтетические флуоресцентные субстраты, позволяющие оперативно выявлять протеазы вредителя (Hançerlioğlu et al., 2018).

Заключение

Знание особенностей пищеварительных систем растительноядных клопов, включая такого опасного вредителя пшеницы, как вредная черепашка, необходимо для разработки эффективных и безопасных средств борьбы с ними, а также подходов к снижению причиняемого ими ущерба качеству урожая. До сих пор наиболее распространены деструктивные для биосферы химические методы борьбы с вредной черепашкой. Существующие способы укрепления поврежденной клопами клейковины далеко не всегда безопасны. Белковые ингибиторы протеаз и других гидролаз могут рассматриваться в качестве перспективных элементов новых подходов к решению перечисленных

проблем. Пониженная чувствительность протеаз вредной черепашки к белковым ингибиторам может быть преодолена путем конструирования новых ингибиторов на основе их известных форм, а также с привлечением других высокоспецифичных технологий, включая использование антител к активным центрам ферментов или РНК-интерференцию. Тестирование протеаз хлебных клопов способно повысить эффективность диагностики повреждения зерна, а сами протеазы данных насекомых могут найти применение в пищевых технологиях для модификации клейковины, а также в медицине.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-08-00828 А)

Библиографический список (References)

Архипов МВ, Прияткин НС, Гусакова ЛП, Потрахов НН, Кропотов ГИ (2017) Неразрушающий контроль качества семян:

возможности и перспективы. *Труды Кубанского государственного аграрного университета* 66:20–27

- Буринская НВ (1985) Амилоза и амилопектин в крахмале пшениц, обладающих различной устойчивостью к вредной черепашке. В кн. Устойчивость с.х. растений к вредителям и проблемы защиты растений. Сб. науч. тр. Л.: ВИЗР, 1985 с.108–111.
- Бурлака ГА, Каплин ВГ (2015) Биоэкологическое обоснование защиты зерновых злаков от хлебных клопов (надсемейства Pentatomoidea) в лесостепи Среднего Поволжья [Электронный ресурс] Самара: РИЦ СГСХА. 145 с. <https://rucont.ru/efd/343267>
- Вилкова НА (1968) К физиологии питания вредной черепашки *Eurygaster integriceps* (Heteroptera, Scutelleridae). *Энтомологическое обозрение* 47(2):701–710
- Вилкова НА (1973) Питание вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Put. на пшенице разных сортов. *Труды ВИЗР* 37:59–75.
- Вилкова НА (1979) Иммунитет растений к вредителям и его связь с пищевой специализацией насекомых-фитофагов. *Чтения памяти Н.А.Холодковского* 31:68–103.
- Вилкова НА (1980) Физиологические основы теории устойчивости растений к насекомым: Автореф. дисс. ... докт. с-х.н. Л. 49 с.
- Вилкова НА, Капусткина АВ, Конарев АВ, Фролов АН (2018) Проблемы диагностики поврежденности зерна пшеницы хлебными клопами. *Защита и карантин растений* 9:3–8
- Вилкова НА, Конарев АВ (2010) Современные проблемы иммунитета растений к вредителям. *Вестник защиты растений* 3:3–15.
- Вилкова НА, Нефедова ЛИ, Худяков СВ (2006) Способы диагностики поврежденности зерна сосущими вредителями. Патент на изобретение SU 2278502 (РФ)
- Вилкова НА, Шапиро ИД, Борщова ТА (1976) Использование инфракрасной микроскопии для диагностики повреждения и устойчивости зерновок к клопам. В сб.: Методы исследования патологических изменений в растении. М.: Колос. 216–219.
- Гаврилук ИП, Конарев ВГ, Шапиро ИД, Вилкова НА, Семенова АЯ, Литвинов АМ (1975) Способ определения поврежденности зерна и муки пшеницы вредителями. Патент на изобретение SU 487627
- Гагкаева ТЮ, Гаврилова ОП, Левитин ММ, Новожилов КВ (2011) Фузариоз зерновых культур. *Защита и карантин растений* 5:69–120
- Девген НВ, Ноде Я, Рамакерс Р, Богарт Т (2018) Уменьшение экспрессии генов у насекомых-вредителей. Патент на изобретение 218.016.7A1F. <http://edrid.ru/rid/218.016.7A1F.html>
- Долгих ВВ, Сендерский ИВ, Конарев АВ (2014) Получение и свойства рекомбинантных протеиназ *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих глютен. *Прикладная биохимия и микробиология* 50(5):466–474. <https://doi.org/10.7868/s0555109914040205>
- Долгих ВВ, Царев АА, Сендерский ИВ, Тимофеев СА, Конарев АВ (2017) Рекомбинантные одноцепочечные антитела как инструмент для выявления и изучения глютен-гидролизующих протеиназ клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.). *Вестник защиты растений* 91(1):21–26
- Дубовский ИМ, Гризанова ЕВ, Боярищева ЕА, Исмаилов ВЯ, Глухов ВВ (2006) Изучение протеиназ в кишечнике имаго клопа вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. (Heteroptera, Scutelleridae) различных поколений. *Евразийский энтомологический журнал* 5(4): 271–275
- Емельянов НА (2008) Природа иммунитета пшеницы и возможности селекции устойчивых сортов к ферментам вредной черепашки (*Eurygaster integriceps* Put.) *Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И. Вавилова* 5:16–19
- Капусткина АВ, Нефедова ЛИ (2017) Жизнеспособность семян при повреждении пшеницы вредной черепашкой. *Вестник защиты растений* 2(92):22–28
- Ковальчук Е (2009) Простой способ коррекции качества муки на мельницах. *Хлебопродукты* 10:40–41
- Конарев АлВ (1981) Специфичность альбуминов зерна пшеницы – ингибиторов α -амилаз к ферментам вредной черепашки. *Бюллетень ВИР* 114:30–32
- Конарев АлВ (1982а) Идентификация ингибиторов собственных и чужеродных α -амилаз среди белков зерна пшеницы. *Бюллетень ВИР* 118:11–12
- Конарев АлВ (1982б) Компонентный состав и генетический контроль ингибиторов α -амилаз насекомых из зерна пшеницы и эгилопсов. *Доклады ВАСХНИЛ* 6:42–44
- Конарев АлВ (1982в) Природа ингибиторов α -амилаз в связи с проблемами эволюции и иммунитета пшеницы и других злаков. Дисс. ... к.б.н. Л. 170 с.
- Конарев АлВ (1985) Методы анализа компонентного состава ингибиторов α -амилаз и протеиназ у злаков. *Прикладная биохимия и микробиология* 21(1):92–100
- Конарев АлВ (1992) Системы ингибиторов гидролаз у злаков: организация, функции и эволюционная изменчивость. Дисс. ... д.б.н. М.: 356 с.
- Конарев АлВ (2017) Молекулярные аспекты иммунитета растений и их коэволюции с насекомыми. *Биосфера* 9(1):79–99. <https://doi.org/10.24855/biosfera.v9i1.325>
- Конарев АлВ, Долгих ВВ, Сендерский ИВ, Конарев АВ, Капусткина АВ, Нефедова ЛИ, Губарева НК (2017) Иммунохимический анализ комплекса протеиназ клопа вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих белки клейковины пшеницы. *Вестник защиты растений* 1:12–20
- Конарев АлВ, Долгих ВВ, Сендерский ИВ, Нефедова ЛИ, Конарев АВ, Губарева НК (2014) Свойства нативных и рекомбинантных протеиназ слюнных желез клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.), гидролизующих клейковину пшеницы. *Вестник защиты растений* 2:3–16
- Конарев АлВ, Конарев АВ, Нефедова ЛИ, Губарева НК, Озай ДС (2013) Анализ полиморфизма гидролизующих клейковину протеиназ в зерновках пшеницы, поврежденных вредной черепашкой *Eurygaster integriceps* Put. и родственными ей клопами. *Доклады РАСХН* 5: 7–11. <https://doi.org/10.3103/S1068367413060104>
- Конарев АлВ, Митрофанова ОП (1987) Анализ наследования компонентов ингибиторов α -амилаз и трипсина у мягкой пшеницы. *Цитология и генетика* 21(1): 15–18
- Конарев АлВ, Фомичева ЮВ (1991) Перекрестный анализ взаимодействия компонентов α -амилаз и протеиназ насекомых с белковыми ингибиторами из эндосперма пшеницы. *Биохимия* 56(4):628–638
- Конарев ВГ (1983) Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос.; 320 с.
- Кузнецова СС, Колесанова ЕФ, Таланова АВ, Веселовский АВ (2016) Перспективы создания новых ингибиторов терапевтически значимых сериновых протеаз на основе кноттинов и пептидного ингибитора трипсина из семян подсолнечника (SFTI 1). *Биомедицинская химия*. 62(4):353–68. <http://doi.org/10.18097/PBMC20166204353>
- Мосолов ВВ (1983) Белковые ингибиторы как регуляторы процессов протеолиза. М.: Наука. 41 с.
- Нейморовец ВВ, Конарев АлВ, Нефедова ЛИ, Гричанов ИЯ (2016) Методы выявления повреждений колоса и зерен злаковых культур клопами-черепашками рода *Eurygaster* (обзор). *Защита и карантин растений* 2: 28–36
- Павлюшин ВА, Вилкова НА, Сухорученко ГИ, Нефедова ЛИ, Капусткина АВ (2015) Вредная черепашка и другие хлебные клопы. Санкт-Петербург: ВИЗР. 280 с.
- Рылько Д. Вред от черепашки. *Агроинвестор*. <https://www.agroinvestor.ru/markets/article/11707-vred-ot-cherepashki/> (11.06.2020)
- Семенова АЯ Вилкова НА, Гаврилук ИП (1977) О специфичности белков слюнных желез некоторых хлебных клопов. *Труды Всесоюзного научно-исследовательского института защиты растений* 36–38.

- Тянева ОЛ (2004) Глиадиновый комплекс зерна озимой пшеницы, устойчивой к вредной черепашке *Eurygaster integriceps* Put. Дисс. ... к.с.-х.н. Саратов. 175 с.
- Яковенко ВА, Литвинов АМ, Гаврилюк ИП (1978) Электрофоретическая характеристика белков пшеницы, пораженной клопом-черепашкой. *Известия вузов. Пищевая технология*. 3:16–19.
- Abdolahadi F, Mirmoayedi A, Seifikar M (2016) Inhibition of digestive α -amylase from *Eurygaster integriceps* (Sunn pest) by a proteinaceous extract from wheat varieties Bezostaya, Gaspard, and Darab. *J Fund Appl Sci* 8(2S):1759–1770. <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v8i2s.433>
- Akbar SMD, Jaba J, Regode V, Kumar GS, Sharma HC (2018) Plant protease inhibitors and their interactions with insect gut proteinases. In: *The biology of plant-insect interactions*. CRC Press. 1–47. ISBN: 978-1-4987-0973-6
- Aljaryian R, Kumar L, Taylor S (2016) Modelling the current and potential future distributions of the sunn pest *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) using CLIMEX. *Pest Manag Sci* 72: 1989–2000. <https://doi.org/10.1002/ps.4247>
- Allen ML, Mertens JA (2008) Molecular cloning and expression of three polygalacturonase cDNAs from the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *J Insect Sci* 8(27):1–4. <https://doi.org/10.1673/031.008.2701>
- Amador MD, Arevalo-Rodriguez M, Durán EM, Reyes JC, Martin CS (2019) A new microbial gluten-degrading prolyl endopeptidase: Potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides. *PLoS one* 14(6):e0218346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218346>
- Amiri A, Bandani AR, Alizadeh H (2016) Molecular identification of cysteine and trypsin protease effect of different hosts on protease expression, and RNAi mediated silencing of cysteine protease gene in the Sunn pest. *Arch Insect Biochem Physiol*. 91(4):189–209. <https://doi.org/10.1002/arch.21311>
- Amiri A., Bandani A.R. (2020) Gluten hydrolase gene silencing using RNAi and its effect on the Sunn pest growth and development. *Phytoparasitica*. <https://doi.org/10.1007/s12600-020-00821-8>
- Armentia A, Lombardero M, Martinez C, Barber D, Vega JM, Callejo A (2004) Occupational asthma due to grain pests *Eurygaster* and *Ephestia*. *J Asthma*. 41(1):99–107. <https://doi.org/10.1081/JAS-120026067>
- Armstrong P, Maghirang E, Ozulu M (2019) Determining damage levels in wheat caused by Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) using visible and near-infrared spectroscopy. *J. Cereal Sci* 86:102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.02.003>
- Ary MB, Richardson M, Shewry PR (1989) Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's tears (*Coix lachryma-jobi*). *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 999(3):260–266. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90007-1).
- Azam A, Reza BA, Morteza A (2015) Molecular identification of sunn pest some vital genes and analysis effect of different hosts on polygalacturonase expression. *Mol Entomol* 6(4):1–9 <https://doi.org/10.5376/me.2015.06.0004>
- Bandani AR, Kazzazi M, Mehrabadi M (2009) Purification and characterization of midgut α -amylases of *Eurygaster integriceps*. *Entomol Sci* 12(1):25–32. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2009.00303.x>
- Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA (2001) The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* 134(2-3):95–102. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4332>
- Başar Ş, Karaoğlu MM, Boz H (2016) The effects of *Cephalaria syriaca* flour on the quality of Sunn pest (*Eurygaster Integriceps*)-damaged wheat. *J Food Qual* 39(1):13–24. <https://doi.org/10.1111/jfq.12176>
- Bateman KS, James MNG (2011) Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Curr Protein Pept Sci* 12(5):341–347. <https://doi.org/10.2174/138920311796391124>
- Bezdi MS, Pourabad RF, Toorchi M, Zarghami N, Komatsu S (2012) Protein patterns in the salivary gland of the sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Put.)(Hemiptera: Scutelleridae). *Turk Entomol Derg* 36(2):215–223
- Biendl M, Pinzl C (2009) Hops and health. *MBAA TQ* 46:1–7. <https://doi.org/10.1094/TQ-46-2-0416-01>
- Bonet A, Caballero PA, Gómez M, Rosell CM (2005) Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect-damaged wheat. *Cereal Chem* 82(4):425–430. <https://doi.org/10.1094/CC-82-0425>
- Bonet A., Rosell CM, Pérez-Munuera I, Hernando I (2007). Rebuilding gluten network of damaged wheat by means of glucose oxidase treatment. *J Sci Food Agric* 87(7):1301–1307. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2846>
- Buonocore V, Petrucci T, Silano, V (1977) Wheat protein inhibitors of α -amylase. *Phytochemistry* 16(7):811–820. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86672-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86672-8)
- Burton RA, Fincher GB (2014) Evolution and development of cell walls in cereal grains. *Front Plant Sci* 5:456. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00456>
- Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med* (2019) 17(1):1–20. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z>
- Cantón PE, Bonning BC (2019) Proteases and nucleases across midgut tissues of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) display distinct activity profiles that are conserved through life stages. *J Insect Physiol* 119:103965. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103965>
- Chateigner-Boutin AL, Bouchet B, Alvarado C, Bakan B, Guillon F (2014) The wheat grain contains pectic domains exhibiting specific spatial and development-associated distribution. *PLoS One* 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089620>
- Chaudhary A, Bala K, Thakur S, Kamboj R, Dumra N (2018) Plant defenses against herbivorous insects: A Review. *IJCS* 6(5):681–688. <https://www.researchgate.net/publication/327703671>
- Clemente M, Corigliano MG, Pariani SA, Sánchez-López EF, Sander VA, Ramos-Duarte VA (2019) Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming. *Int J Mol Sci* 20(6):1345. <https://doi.org/10.3390/ijms20061345>
- Cohen AC (1998) Solid-to-liquid feeding: the inside (s) story of extraoral digestion in predaceous Arthropoda. *Am. Entomol.* 44:103–117. <https://doi.org/10.1093/ae/44.2.103>
- Cooper WR, Nicholson SJ, Puterka GJ (2013) Salivary proteins of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) *Ann Entomol Soc Am* 106(1):86–92. <http://dx.doi.org/10.1603/ANI12096>
- Cotabarren J, Lufraño D, Parisi MG and Obregón WD (2020) Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. *Plant Science* 110398. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398>
- Critchley BR (1998). Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae). *Crop Prot* 17:271–287. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(98\)00022-2](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(98)00022-2)
- Da Lage JL (2018) The amylases of insects. *International journal of insect science* 10:1–14. <https://doi.org/10.1177/117954331880478>
- Da Lage J-L, van Wormhoudt A, Cariou M-L (2002) Diversity and evolution of the α -amylase genes in animals. *Biol Bratisl* 57 (Suppl. 11):181–189.
- Darkoh C, El-Bouhssini M, Baum M, Clack B (2010) Characterization of a prolyl endopeptidase from *Eurygaster integriceps* Puton (Sunn pest) infested wheat. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 74(3):163–178. <https://doi.org/10.1002/arch.20370>
- Davari A, Parker BL (2018) A review of research on Sunn Pest {*Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae)} management published 2004–2016. *J Asia Pac Entomol* 21(1):352–360. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.01.016>
- De Palma G, Apostoli P., Mistrello G, Zanotta S, Bertorelli G (2014) Microbial transglutaminase: a new and emerging occupational allergen. *Ann Allerg Asthma Im* 112(6):553–554. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.03.012>

- Dizlek H (2018) A biochemical factor that significantly disrupt the wheat quality: insect enzyme salivary. In: 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), Podgorica, Montenegro, 26–30 June 2018. Book of Proceedings. 33–35
- Dizlek H, Özer MS (2016) Effects of sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damage ratio on physical, chemical, and technological characteristics of wheat. *Qual Assur Saf Crops Foods* 8(1):145–156. <https://dx.doi.org/10.5073/JABFQ.2015.088.003>
- Dizlek H, Özer MS (2017) Improvement of physical, physicochemical, and rheological characteristics of sunn pest (*Eurygaster integriceps*) damaged wheat by blending. *Qual Assur Saf Crop Foods* 9(1):31–39. <https://dx.doi.org/10.3920/QAS2015.0781>
- Dolgikh V, Tsarev A, Timofeev S, Zhuravlyov V, Senderskiy I, Lovegrove A, Konarev A (2020) Antibodies raised against a Sunn bug (*Eurygaster integriceps* Put.) recombinant protease rGHP3p2, can inhibit gluten hydrolyzing activity // *Food Sci Nutr* 8(1):703–708. <https://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1361>
- D'Ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, Devoto A, Pontiggia D, Roberti S, Galletti R, Conti E, O'Sullivan D, De Lorenzo G (2004) Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. *Plant Physiol* 135(4):2424–2435. <https://dx.doi.org/10.1104/pp.104.044644>
- Dumont F, Lucas E, Reale D (2017) Coexistence of zoophytophagous and phytozoophagous strategies linked to genotypic diet specialization in plant bug. *PLoS one*. 12(5):e0176369. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176369>
- Dunaevsky YE, Elpidina EN, Vinokurov KS, Belozersky MA (2005) Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Mol Biol* 39(4):608–613.
- Durak AN, Erbas M, Arslan S. (2016) Ultrasonication to inactivate the proteolytic enzymes in sunn bug damaged wheat. *J Cereal Sci* 71 122e129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.07.014>
- Eggert K, Rawel HM, Pawelzik E (2011) In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases. [Электронный ресурс] *Eur Food Res Technol* 233(4):697. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1566-x>
- Ertugay Z, Celik I, Elgun A, Ertugay M.F (1995) The application of different tempering methods to Sunn pest (*Eurygaster* spp.) damaged and undamaged wheat III: effect on bread properties. *World of Flour Products* 4:10–16.
- Every D, Farrell JA, Stufkens MW (1989) Effect of *Nysius huttoni* on the protein and baking properties of two New Zealand wheat cultivars. *N Z J Crop Hortic Sci* 17(1):55–60. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.1989.10428010>
- Every D, Farrell JA, Stufkens MW (1992) Bug damage in New Zealand wheat grain: the role of various heteropterous insects. *N Z J Crop Hortic Sci* 20(3):305–312. <https://doi.org/10.1080/01140671.1992.10421772>
- Every D, Stufkens MA (1999) Effect of the salivary proteinase from the New Zealand wheat bug, *Nysius huttoni*, on various exotic and endemic plant seeds. *N Z J Crop Hortic Sci* 27(3):191–196 <https://doi.org/10.1080/01140671.1999.9514096>
- Every D, Sutton KH, Shewry PR, Tatham AS, Coolbear T (2005) Specificity of action of an insect proteinase purified from wheat grain infested by the New Zealand wheat bug, *Nysius huttoni*. *J Cereal Sci* 42:185–191. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.04.003>
- Farhoodi N, Kazzazi M, Hosseinaveh V, Arezi I (2019) Inhibitory effect of proteinaceous seed extract of three Iranian wheat cultivars on *Eurygaster integriceps* (Sunn pest) digestive enzymes. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* 52(15-16):1177–1192. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1693886>
- Fatehi F, Behamta MR, Zali AA (2008) Evaluating the resistance to sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put) and its relationship with high-molecular-weight glutenin subunit in wheat. In Proceedings of 11th International Wheat Genetics Symposium 2008, Brisbane, Australia, 24–29 August 2008. <http://hdl.handle.net/2123/318>.
- Fialho MC, Moreira NR, Zanuncio JC, Ribeiro AF, Terra WR, Serrão JE (2012) Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Physiol* 58(6):850–856. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.009>
- Fishilevich E, Vélez AM, Storer NP, Li H, Bowling AJ, Rangasamy M, Worden SE, Narva KE, Siegfried BD (2016) RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Manag Sci* 72(9):1652–1663. <https://doi.org/10.1002/ps.4324>
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Bloch C Jr, Silva CP, Grossi de, Sa MF (2000) Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur J Biochem* 267:2166–2173. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01199.x>
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-de-Sá MF (2002) Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. *Eur J Biochem* 269(2):397–412. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02656.x>
- Fрати F, Galletti R, De Lorenzo G, Salerno G, Conti E (2006) Activity of endo-polygalacturonases in mirid bugs (Heteroptera: Miridae) and their inhibition by plant cell wall proteins (PGIPs). *Eur J Entomol* Jul 1;103(3):515. <https://dx.doi.org/10.14411/eje.2006.067>
- Gatehouse AJ (2011) Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Curr Protein Pept Sci* 12(5):409–416. <https://doi.org/10.2174/138920311796391142>
- Ghamari M, Hosseinaveh V, Darvishzadeh A, Chougule NP (2014) Carbohydrases in the digestive system of the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 85:195–215. <https://doi.org/10.1002/arch.21153>
- Giron D, Dedeine F, Dubreuil G, Huguet E, Mouton L, Outreman Y, Vavre F, Simon JC (2017) Influence of microbial symbionts on plant-insect interactions. *Adv Bot Res* 81: 225–257. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2016.09.007>
- Gradinaru C.L, Ulea E, Lipsa FD, Florea AM (2017) Correction of low values of gluten power (W value) due to the Sunn pest attack. *Agronomy Series of Scientific Research/Lucrari Stiintifice Seria Agronomie*, 60(2):51–56
- Hançerlioğulları BZ, Köksel H, Dudak FC (2018) Development of a peptide substrate for detection of sunn pest damage in wheat flour. *J Sci Food Agric* 98(15):5677–5682. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9113>
- Heinemann JA (2019) Should dsRNA treatments applied in outdoor environments be regulated? *Environ Int* 132:104856. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.050>
- Hosseinaveh V, Bandani A, Hosseinaveh F, Cohen A (2009) Digestive proteolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *J Insect Sci* 9(1). Article 70. <https://doi.org/10.1673/031.009.7001>
- Irakli M, Mygdalia A, Chatzopoulou P, Katsantonis D (2019) Impact of the combination of sourdough fermentation and hop extract addition on baking properties, antioxidant capacity and phenolics bioaccessibility of rice bran-enhanced bread. *Food Chem* 285:231–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.145>
- James M, Denyer K, Myers A (2003) Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6: 215–222. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00042-6)
- Jongsma MA, Beekwilder J (2011) Co-evolution of insect proteases and plant protease inhibitors. *Curr Protein Pept Sci* 12(5):437–47. <https://doi.org/10.2174/138920311796391115>
- Jongsma MA, Bolter C (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol* 43(10):885–895. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(97\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(97)00040-1)
- Joye IJ, Lagrain B, Delcour JA (2009) Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking—A review. *J. Cereal Sci* 50(1):11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.001>

- Kadakova P (2017) Inhibition of *Eurygaster integriceps* Puton prolyl endoprotease (spPEP) and human prolyl endopeptidase (hPEP) using α S1-casein peptide inhibitors. *FASEB J* (1_supplement): Abstract Number: 918.11
- Kafil M, Bandani AR, Kaltenpoth M, Goldansaz SH, Alavi SM, Miller T (2013) Role of symbiotic bacteria in the growth and development of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *J Insect Sci* 13(1). <https://doi.org/10.1673/031.013.9901>
- Kannan M, Mubarakali D, Thiyonila B, Krishnan M, Padmanaban B, Shantkriti S (2019) Insect gut as a bioresource for potential enzymes-an unexploited area for industrial biotechnology. *Biocatal Agric Biotechnol* 18:101010. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2019.01.048>
- Katoch R, Tripathi A, Thakur N (2016) Current perspective of plant protection strategies using inhibitory proteins against insects. *Indian J Agric Biochem* 29(2):124–133. [10.5958/0974-4479.2016.00021.6](https://doi.org/10.5958/0974-4479.2016.00021.6)
- Kirsch R, Gramzow L, Theißen G, Siegfried BD, Heckel DG, Pauchet Y (2014) Horizontal gene transfer and functional diversification of plant cell wall degrading polygalacturonases: key events in the evolution of herbivory in beetles. *Insect Biochem Mol Biol* 52:33–50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.06.008>
- Kluch I, Horn M, Hýblová J, Hubert J, Dolečková-Marešová L, Voburka Z, Kudliková I, Kocourek F, Mareš M (2005) Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 66(1):31–39. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.11.001>
- Konarev A, Dolgikh V, Senderskiy I, Konarev A, Kapustkina A, Lovegrove A (2019) Characterisation of proteolytic enzymes of *Eurygaster integriceps* Put.(Sunn bug), a major pest of cereals. *J Asia Pac Entomol*. 22(1):379–85. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.02.001>
- Konarev A.I., Tomooka N., Ishimoto M., and Vaughan D.A. (1999a) Variability of the inhibitors of serine, cysteine proteinases and insect α -amylases in *Vigna* and *Phaseolus*. In: G.T.S.Mugnozza, E.Porceddu & M.A.Pagnotta ed. “Genetics and breeding for crop quality and resistance” Proc. of the XV EUCARPIA Congress, Viterbo, Italy, September 20–25, 1998. Kluwer Academic Publishers, NL, 173–181.
- Konarev AV (1996) Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitors and host-parasite coevolution. *Euphytica* 92(1-2):89–94. <https://doi.org/10.1007/BF00022833>
- Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA, Vachrusheva TE, Konechnaya GY, Lewis M, Shewry PR (2002) Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry* 59(3):279–91. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00463-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00463-0)
- Konarev AV, Beaudoin F, Marsh J, Vilkova NA, Nefedova LI, Sivri D, Koksel H, Shewry PR, Lovegrove A (2011) Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of Sunn bug *Eurygaster integriceps* Put. *J Agric Food Chem* 59(6):2462–2470. <https://doi.org/10.1021/jf103867g>
- Konarev AV, Lovegrove A (2012) Novel detection methods used in conjunction with affinity chromatography for the identification and purification of hydrolytic enzymes or enzyme inhibitors from insects and plants. In: Magdeldin S. (ed) Affinity Chromatography. InTech. 187–210.
- Kretovich VL (1944) Biochemistry of the damage to grain by the wheat-bug. *Cereal Chem* 21:1–16.
- Kumar P (inventor), Alvine Pharmaceuticals Inc (assignee) (2016) Proteases for degrading gluten. United States patent US 9267128
- Lait CG, Miller DR, Bates SL, Borden JH, Kermod AR (2003) Biochemical assay detects feeding damage to loblolly pine seeds caused by the leaf-footed pine seed bug (Hemiptera: Coreidae). *J Entomol Sci* 38(4):644–653. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-38.4.644>
- Li W, Zhao X, Yuan W, Wu K (2017) Activities of digestive enzymes in the omnivorous pest *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) *J. Econ. Entomol* 110(1):101–110. <https://doi.org/10.1093/jee/tow263>
- Li H, Shao R, Song N, Song F, Jiang P, Li Z, Cai W (2015) Higher-level phylogeny of paraneopteran insects inferred from mitochondrial genome sequences. *Sci Rep* 5:8527. <https://doi.org/10.1038/srep08527>
- Liu S, Jaouannet M, Dempsey DM, Imani J, Coustau C, Kogel KH (2019) RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnol Adv* 31:107463. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107463>
- Lomate PR, Bonning BC (2016) Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Sci Rep* 6(1):1–10. <https://doi.org/10.1038/srep27587>
- Lomate PR, Bonning BC (2018) Proteases and nucleases involved in the biphasic digestion process of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 98(3):e21459. <https://doi.org/10.1002/arch.21459>
- Lomate PR, Dewangan V, Mahajan NS, Kumar Y, Kulkarni A, Wang L, Saxena S, Gupta VS, Giri AP (2018) Integrated transcriptomic and proteomic analyses suggest the participation of endogenous protease inhibitors in the regulation of protease gene expression in *Helicoverpa armigera*. *Mol Cell Proteomics* 17(7):1324–1336. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000533>
- Lopez T, Mustafa Z, Chen C, Lee KB, Ramirez A, Benitez C, Luo X, Ji RR, Ge X (2019) Functional selection of protease inhibitory antibodies. *PNAS* 116(33):16314–16319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903330116>
- Lyons A, Richardson M, Tatham AS, Shewry PR (1987) Characterization of homologous inhibitors of trypsin and α -amylase from seeds of rye (*Secale cereale* L.). *BBA Protein Struct Mol Enzymol* 915(2):305–313. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90314-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90314-1)
- Matthias T, Jeremias P, Neidhöfer S, Lerner A (2016). The industrial food additive, microbial transglutaminase, mimics tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. *Autoimmun Rev* 15(12), 1111–1119. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.011>
- Mayolo-Delouis K, González-González M, Rito-Palomares M (2020) Laccases in Food Industry: Bioprocessing, Potential Industrial and Biotechnological Applications. *Front Bioeng Biotech* 8:222. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222>
- Mehrabadi M, Bandani AR, Dastranj M (2014) Salivary digestive enzymes of the wheat bug, *Eurygaster integriceps* (Insecta: Hemiptera: Scutelleridae). *C R Biol* 337(6):373–382. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.04.003>
- Mehrabadi M, Bandani AR, Mehrabadi R, Alizadeh H (2012) Inhibitory activity of proteinaceous α -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary α -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pestic Biochem Phys* 102(3):220–228. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.01.008>
- Mehrabadi M, Bandani AR, Saadati F (2010) Inhibition of Sunn pest, *Eurygaster integriceps*, α -amylases by α -amylase inhibitors (T- α AI) from Triticale. *J Insect Sci* 10(1): 179. <https://doi.org/10.1673/031.010.14139>
- Mika N, Zorn H, Rühl M (2013) Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology. In *Yellow Biotechnology II*, Berlin: Springer. 1–17. https://doi.org/10.1007/10_2013_204
- Neimorovets V (2020) Review of the genus *Eurygaster* (Hemiptera: Heteroptera: Scutelleridae) of Russia. *Zootaxa*. 4722(6):501–539. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4722.6.1>
- Ohtsubo KI, Richardson M (1992). The amino acid sequence of a 20 kDa bifunctional subtilisin/ α -amylase inhibitor from brain of rice (*Oryza saliva* L.) seeds. *FEBS Lett* 309(1):68–72. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80741-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80741-X)
- Olanca B, Koksel H, Ozderen NT, Ozay DS (2016) Determination of wheat bug (*Eurygaster* spp.) damage in durum wheat (*Triticum durum* L.) by electrophoresis and rapid visco analyser *J Cereal Sci* 72:69–74. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.10.001>

- Olanca B, Özay DS (2010) Preparation and functional properties of gluten hydrolysates with wheat-bug (*Eurygaster* spp.) protease. *Cereal Chem* 87(6):518–523. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-02-10-0026>
- Olanca B, Ozay DS (2015) Effects of natural protease inhibitors on high protease activity flours. *J Cereal Sci* 65:290–297. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.08.007>
- Oliveira AS, Xavier-Filho J, Sales MP (2003) Cysteine proteinases and cystatins. *Braz Arch Biol Technol* 46:91–104. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000100014>
- Özülkü G, Sivri Özay D (2020) Improving the bread quality of suni-bug damaged wheat flours by sourdough breadmaking and liquid rye sour. *Acta Aliment* 49(2):170–180. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.2.6>
- Parde VD (2009) Inhibition of *Helicoverpa armigera* gut zymogen activation by plant protease inhibitors *PhD Thesis* Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada University. 204 p. http://oar.icrisat.org/128/1/merged_document-3.pdf (Accessed 04.06.2020)
- Parker BL, Amir-Maafi M, Skinner M, Kim J, EL-Bouhssini M (2011) Distribution of Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae), in overwintering sites. *J Asia Pac Entomol* 14(1):83–88. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.10.005>
- Pauchet Y, Wilkinson P, Chauhan R (2010) Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. *PLoS one* 5(12):e15635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015635>
- Pauly M, Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant J* 54(4):559–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03463.x>
- Peschen D., Schillberg S., Fischer R. (2016) Antibody-mediated pathogen resistance in plants. In: MacDonald J., Kolotilin I., Menassa R. (eds) *Recombinant Proteins from Plants*. Methods in Molecular Biology. 1385 New York: Humana Press. 273–291. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3289-4_19
- Philippis-Wiemann P (2018) Proteases—human food. In: *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Academic Press. 267–277. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00013-7>
- Piper JL, Gray GM, Khosla C (2004) Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 311(1):213–219. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.068429>
- Poulsen M, Pedersen JW (2010) Assessing biosafety of GM plants containing lectins. In D Hemming (ed) *Animal Science Review 2010*. UK. CAB International. 165–170
- Pyati P, Bandani AR, Fitches E, Gatehouse JA (2011) Protein digestion in cereal aphids (*Sitobion avenae*) as a target for plant defence by endogenous proteinase inhibitors. *J Insect Physiol* 57(7):881–891. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.024>
- Pytelkova J, Hubert J, Lepšík M, Šobotník J, Šindelka R, Křížková I, Horn M, Mareš M (2009) Digestive α -amylases of the flour moth *Ephestia kuehniella* – adaptation to alkaline environment and plant inhibitors. *FEBS J* 276(13):3531–46. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07074.x>
- Qiu Y, Taichi M, Wei N, Yang H, Luo KQ, Tam JP (2017) An orally active bradykinin B1 receptor antagonist engineered as a bifunctional chimera of sunflower trypsin inhibitor. *J Med Chem* 60(1):504–510. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01011>
- Querino LAM, Fonseca NJ, de Oliveira LC, Lobo FP, Bleicher L (2020) Coevolved positions represent key functional properties in the trypsin-like serine proteases protein family. *J Chem Inf Model* 60(2):1060–1068. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00903>
- Rahbé Y, Ferrasson E, Rabesona H, Quillien L (2003) Toxicity to the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman–Birk protease inhibitors from pea seeds. *Insect Biochem Mol Biol* 33(3):299–306. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00244-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00244-8)
- Ramzi S, Zibae A (2016) α -amylase activity in the salivary glands and the midgut of *Apodiphus amygdali* Germar (Hemiptera: Pentatomidae). *TJS* 14(2):183–189. <https://doi.org/10.15547/tjs.2016.02.011>
- Rathinam M, Rao U, Sreevathsa R (2020) Novel biotechnological strategies to combat biotic stresses: polygalacturonase inhibitor (PGIP) proteins as a promising comprehensive option. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(6):2333–2342. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10396-3>
- Ravan S, Mehrabadi M, Bandani AR (2009) Biochemical characterization of digestive amylase of wheat bug, *Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae). *Afric J Biotech* 8:3640–3648.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD (2017) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* 46(D1):D624–632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>.
- Rawlings ND, Bateman A (2019) Origins of peptidases. *Biochimie* 166:4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.026>
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378(3):705–716. <https://doi.org/10.1042/bj20031825>
- Riley BT, Ilyichova O, De Veer SJ, Swedberg JE, Wilson E, Hoke DE, Harris JM, Buckle AM (2019) KLK4 inhibition by cyclic and acyclic peptides: structural and dynamical insights into standard-mechanism protease inhibitors. *Biochemistry* 58(21):2524–2533. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00191>
- Rosell CM, Aja S, Sadowska J (2002) Amylase activities in insect (*Aelia* and *Eurygaster*)-damaged wheat. *J Sci Food Agric* 82(9):977–982. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1138>
- Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28(1):425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>
- Saadati F, Bandani AR (2011) Effects of serine protease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *J. Insect Sci* 11(72). <https://doi.org/10.1673/031.011.7201>
- Saadati M, Toorchi M (2017) The study of plant protein accumulation in gut of insect using proteomics technique: Wheat–sunn pest interaction. *J Saudi Soc Agric Sci* 16(3):205–209. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.06.005>
- Sabancı K (2020) Detection of sunn pest-damaged wheat grains using artificial bee colony optimization-based artificial intelligence techniques. *J Sci Food Agric* 100(2):817–824. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10093>
- Safarnejad MR, Jouzani GS, Tabatabaie M, Twyman RM, Schillberg S (2011) Antibody-mediated resistance against plant pathogens. *Biotechnol Adv* 29(6):961–971. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.011>
- Santiago PB, de Araújo CN, Motta FN, Praça YR, Chameau S, Bastos IM, Santana JM (2017) Proteases of haematophagous arthropod vectors are involved in blood-feeding, yolk formation and immunity. *Parasites Vectors* 10(1):79. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2005-z>
- Santos A, Ribeiro JM, Lehane MJ, Gontijo NF, Veloso AB, Sant’Anna MR, Araújo RN, Grisard EC, Pereira MH (2007) The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol* 37(7):702–712. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.04.004>
- Schneider EL, Lee MS, Baharuddin A, Goetz DH, Farady CJ, Ward M, Wang CI, Craik CS (2012) A reverse binding motif that contributes to specific protease inhibition by antibodies. *J Mol Biol* 415(4):699–715. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.036>
- Shamsi TN, Parveen R, Fatima S (2016) Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *Int J Biol Macromol* 91:1120–1133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069>
- Shelomi M, Danchin EGJ, Heckel DG, Wipfler B, Bradler S, Zhou X, Pauchet Y (2016) Horizontal gene transfer of pectinases from bacteria preceded the diversification of stick and leaf insects. *Sci Rep* 6:26388. <http://dx.doi.org/10.1038/srep26388>

- Shewry PR (2019) What is gluten – why is it special? *Front Nutr* 6:101. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00101>
- Shewry PR, Halford NG (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot*. *Oxford University Press Online* 53(370). <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>
- Singh CB, Jayas DS, Paliwal J, White NDG (2009) Detection of insect-damaged wheat kernels using near-infrared hyperspectral imaging. *J Stored Prod Res* 45(3):151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.12.002>
- Singh S, Singh A, Kumar S, Mittal P, Singh IK (2018) Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. *Insect Sci* (2):186–201. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12641>
- Sivri D, Batey IL, Skylas DJ, Daqiq L, Wrigley CW (2004) Changes in the composition and size distribution of endosperm proteins from bug-damaged wheats. *Aust. J. Agric. Res* (4):477–483. <https://doi.org/10.1071/AR03185>
- Sivri D, Köksel H (1998) Effects of wheat bug (*Eurygaster maura*) proteolytic enzymes on electrophoretic properties of gluten proteins. *N Z J Crop Hort Sci* 26:117–125. <https://doi.org/10.1080/01140671.1998.9514048>
- Sivri D, Köksel H (2000) Characterisation and partial purification of a gluten hydrolyzing proteinase from bug (*Eurygaster* spp.) damaged wheat. In: Shewry PR, Tatham AS (eds). *Wheat Gluten*. Bristol: Royal Society of Chemistry. 287–290. <https://doi.org/10.1039/9781847552372-00287>
- Sivri D, Sapirstein HD, Bushuk W, Köksel H (2002) Wheat intercultivar differences in susceptibility of glutenin protein to effects of bug (*Eurygaster integriceps*) protease. *Cereal Chem* 79(1):41–44. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.41>
- Solleti SK, Bakshi S, Purkayastha J, Panda SK, Sahoo L (2008) Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confer resistance to storage pests, bruchid beetles. *Plant Cell Rep* 27:1841–1850. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0606-x>
- Soucy SM, Huang J, Gogarten JP (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet* 16(8):472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Sparks ME, Bansal R, Benoit JB, Blackburn MB, Chao H, Chen M, Cheng S, Childers C, Dinh H, Doddapaneni HV, Dugan S (2020) Brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål), genome: putative underpinnings of polyphagy, insecticide resistance potential and biology of a top worldwide pest. *BMC genomics* 21(1):1–26. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6510-7>
- Stam MR, Danchin EGJ, Rancurel C, Coutinho PM, Henrissat B (2006) Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Prot Eng Des Sel* 19: 555–562. <https://doi.org/10.1093/protein/gz1044>
- Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning F. (2006) Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(4):G621–629. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00034.2006>
- Tamaki FK, Pimentel AC, Dias AB, Cardoso C, Ribeiro AF, Ferreira C et al. (2014) Physiology of digestion and the molecular characterization of the major digestive enzymes from *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol* 70:22–35. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.08.007>
- Tatham AS, Shewry PR (2008) Allergens to wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy* 38(11):1712–1726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03101.x>
- Tereshchenkova VF, Klyachko EV, Benevolensky SV, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Filippova IY, Elpidina EN (2019) Preparation and purification of recombinant dipeptidyl peptidase 4 from *Tenebrio molitor*. *Appl Biochem Microbiol* 55(3):218–23. <https://doi.org/10.1134/S0003683819030141>
- Terra WR, Dias RO, Ferreira C (2019) Recruited lysosomal enzymes as major digestive enzymes in insects. *Biochem Soc Trans* 47(2):615–623. <https://doi.org/10.1042/BST20180344>
- Terra WR, Ferreira C (2012) Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert LI (ed) *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. London: Academic Press. 365–418. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10011-X>
- Thakur N, Munday JK, Upadhyay SK (2016) RNAi—Implications in entomological research and pest control. *RNA Interference* 6:341–70. <http://dx.doi.org/10.5772/61814>
- Torbica AM, Mastilović JS, Pojić MM, Kevrešan ŽS (2014) Effects of wheat bug (*Eurygaster* spp. and *Aelia* spp.) infestation in preharvest period on wheat technological quality and gluten composition. *Sci World J Article ID* 148025 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/148025>
- Türker S, Elgün A (1998a) Süne-kımlı zararlı tavlı buğdaylara mikrodalga uygulamasının öğütme ve un özelliklerine etkisi. *Gıda Derg.* 23 (1):67e73.
- Türker S, Elgün A (1998b) Süne ve kımlı zararlı buğdayların farklı sıcaklıklarda kısa süreli depolanmasının un özelliklerine etkisi. *Un Mamülleri Dünyası* 6(5-6):50
- Vaccino P, Ingegno B, Pansa M, Copta T, and Tavella L (2016) Common wheat and cereal bug interactions: kernel quality depletion and immunodetection of damage. *J Agric Sci* 155(2):193–204. <https://doi.org/10.1017/S0021859616000162>.
- van de Wal Y, Kooy YM, van Veelen P, Vader W, August SA, Drijfhout JW, Peña SA, Koning F (1999) Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol* 29(10):3133–3139. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10<3133::AID-IMMU3133>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3133::AID-IMMU3133>3.0.CO;2-G)
- Vatanparast M, Hosseinaveh V, Hosseinaveh F, Pakarpour F (2011) Digestive pectinolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* 44(14): 1390–1398. <https://doi.org/10.1080/03235408.2010.499723>
- Vishram A Clack B (2015) Identification of prolyl endopeptidase (PEP) inhibitory peptides from *Lactobacillus helveticus* digestion of four recombinant bovine caseins. *The FASEB J* 29(1_supplement):894–812
- Vizioli J, Catteruccia F, della Torre A, Reckmann I, Müller, H-M (2001) Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Eur J Biochem* 268 (14):4027–4035. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02315.x>.
- Walker AA, Weirauch C, Fry BG, King GF (2016) Venoms of heteropteran insects: a treasure trove of diverse pharmacological toolkits. *Toxins* 8(2):43 <https://doi.org/10.3390/toxins8020043>
- Wang D, Shi X, Liu D, Yang Y, Shang Z (2020) Transcriptome profiling revealed potentially critical roles for digestion and defense-related genes in insects' use of resistant host plants: a case study with *Sitobion avenae*. *Insects* 11(2):90. <https://doi.org/10.3390/insects11020090>
- Wang L, Yu B, Wang R, Xie J (2018) Biotechnological routes for transglutaminase production: recent achievements, perspectives and limits. *Trends Food Sci Technol* 81:116–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.015>
- Wang Y, Zhang H, Li H, Miao X (2011) Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS one* 6(4): e18644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018644>
- Werteker M, Kramreither G (2008) Relation between susceptibility to wheat bug attack and digestibility of glutenin. *J Cereal Sci* 47(2):226–232. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.03.012>
- Xu P, Lu B, Liu J, Chao J, Donkersley P, Holdbrook R, Lu Y (2019) Duplication and expression of horizontally transferred polygalacturonase genes is associated with host range expansion of mirid bugs. *BMC Evol Biol* (2019) 19(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1351-1>
- Yamagata H, Kunimatsu K, Kamasaka H, KURAMoTo T, Iwasaki T (1998) Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and

- germinating seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(5):978–985. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.978>
- Yandamuri RC, Gautam R, Darkoh C, Dareddy V, El-Bouhssini M, Clack BA (2014) Cloning, expression, sequence analysis and homology modeling of the prolyl endoprotease from *Eurygaster integriceps* Puton. *Insects* 5(4):762–82. <https://doi.org/10.3390/insects5040762>
- Yarullina LG, Akhatova AR, Kasimova RI (2016) Hydrolytic enzymes and their proteinaceous inhibitors in regulation of plant–pathogen interactions. *Russ J Plant Physiol* 63(2):193–203. <https://doi.org/10.1134/S1021443716020151>
- Yetter MA, Saunders RM, and Boles HP (1979) α -Amylase inhibitors from wheat kernels as factors in resistance to postharvest insects. *Cereal Chem* 56(4):243–244
- Yildirim M, Hetiarachchy NS (1997) Biopolymers produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *J Food Sci* 62(2):270–275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03983.x>
- Yu X, Wang G, Huang S, Ma Y, Xia L (2014) Engineering plants for aphid resistance: current status and future perspectives. *Theor Appl Genet* 127:2065–2083. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2371-2>
- Zeng F Cohen AC (2000) Partial characterization of α -amylase in the salivary glands of *Lygus hesperus* and *L. lineolaris*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126(1):9–16. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00193-8)
- Zeng F, Zhu YC, Cohen AC (2002) Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem Mol Biol* 32(4):455–464. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00123-0)
- Zhang H, Fangel JU, Willats WG, Selig MJ, Lindedam J, Jørgensen H, Felby C (2014) Assessment of leaf/stem ratio in wheat straw feedstock and impact on enzymatic conversion. *Gcb Bioenergy* 6(1):90–96. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12060>
- Zhu YC, Yao J, Luttrell R (2016) Identification of genes potentially responsible for extra-oral digestion and overcoming plant defense from salivary glands of the tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) using cDNA sequencing. *J Insect Sci* 16(1):60. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew041>
- Zhu YC, Zeng F, Oppert B (2003) Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of proteinase activities in the salivary glands and gut of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Insect Biochem Mol Biol* 33(9):889–99. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00094-8)
- Zibae A, Hoda H, Fazeli-Dinan M (2012) Role of proteases in extra-oral digestion of a predatory bug, *Andrallus spinidens*. *J Insect Sci* 12(51):1–17. <https://doi.org/10.1673/031.012.5101>

Translation of Russian References

- Arkhipov MV, Priyatkin NS, Gusakova LP, Potrakhov NN, Kropotov GI (2017) [Non-destructive quality control of seeds: opportunities and prospects]. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 66:20–27 (In Russian)
- Burinskaya NV (1985) *Amiloza i amilopektin v krakmale pshenits, obladayushchikh razlichnoy ustoichivostyu k vrednoy cherepashke* [Amylose and amylopectin in starch of wheat varieties with different resistance to the Sunn pest. In: Resistance of farm crops to pests and problems of plant protection. Leningrad. VIZR: p. 108–111 (In Russian)]
- Burlaka GA, Kaplin VG (2015) *Bioekologicheskoe obosnovaniye zashchity zernovykh zlakov ot hlebnyyh klopov (nadsemeystva Pentatomoidea) v lesostepi Srednego Povolzh'ya* [Bioecological substantiation of the protection of cereals from bread bugs (Pentatomoidea superfamily) in the forest-steppe of the Middle Volga] Samara: RIC SGSKhA. 145 p. <https://rucont.ru/efd/343267> (In Russian)
- Devgen NV, Node Ya, Ramakers R, Bogart T [Reducing gene expression in insect pests] Patent 218.016.7A1F. <http://edrid.ru/rid/218.016.7A1F.html> (In Russian)
- Dolgikh VV, Senderskiy IV, Konarev AV (2014) [Production and properties of recombinant glutenin-cleaving proteinases from *Eurygaster integriceps* Put.] *Applied Biochemistry and Microbiology* 50(5):433–440. <https://doi.org/10.1134/S0003683814040048> (Translated in English)
- Dolgikh VV, Tsarev AA, Senderskiy IV, Timofeev SA, Konarev AV (2017) [Recombinant single chain antibodies as implement for detection and studying *Eurygaster integriceps* proteinases hydrolyzing gluten]. *Vestnik zashchity rasteniy* 91(1):21–26 (In Russian)
- Dubovskiy IM, Grizanova EV, Boyarisheva EA, Ismailov VYa, Glupov VV (2006) [Investigation of proteases in the digestive tract of different generations of sunn pest, *Eurygaster integriceps* Put. (Heteroptera, Scutelleridae)]. *Evrasiyskiy entomologicheskii zhurnal* 5(4): 271–275 (In Russian)
- Emelyanov N.A. (2008) [Immunity and possibilities of the selection stability varieties to the ferments of the *Eurygaster integriceps* Put.] *Vestnik Saratovskogo gosagrouniversiteta im. N.I. Vavilova* 5:16–19 (In Russian)
- Gagkaeva TYu, Gavrilova OP, Levitin MM, Novozhilov KV (2011) [The fusariosis of cereal crops] *Zashchita i karantin rasteniy* 5:69–120 (In Russian)
- Gavrilyuk I.P., Konarev V.G., Shapiro I.D., VilkoVA NA Semenova AYa, Litvinov A.M (1978) Patent SU 487627 (In Russian)
- Kapustkina AV, Nefedova L (2017) [Viability of seeds at damage of wheat by Sunn pest]. *Vestnik zashchity rasteniy* 2(92):22–28 (In Russian)
- Konarev A.I.V., Dolgikh V.V., Senderskiy I.V., Nefedova L.I., Konarev A.V., Gubareva N.K. (2014) [Properties of natural and recombinant Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) salivary gland proteinases hydrolyzing wheat gluten]. *Vestnik zashchity rasteniy* 2:3–16 (In Russian)
- Konarev AIV (1981) [Specificity of albumins of wheat grain – the inhibitors of α -amylase – in relation to the ferments of the Sunn pest] *Bulletin VIR* 114:30–32 (In Russian)
- Konarev AIV (1982a) [Identification of inhibitors of endogenous and exogenous α -amylases among wheat proteins] *Bulletin VIR* 118:11–12 (In Russian)
- Konarev AIV (1982b) [Component composition and genetic control of insect α -amylase inhibitors from wheat and aegilops grain]. *Doklady VASKHNIL* 6:42–44 (In Russian)
- Konarev AIV (1982v) *Priroda ingibitorov α -amilaz v svyazi s problemami evolyutsii i immuniteta pshenitsy i drugikh zlakov* [The nature of α -amylase inhibitors in connection with the problems of evolution and immunity of wheat and other cereals] Cand. Biol. Thesis. Leningrad. 170 p. (In Russian)
- Konarev AIV (1982a) [Identification of inhibitors of endogenous and exogenous α -amylases among wheat proteins]. *Bulletin VIR* 118:11–12 (In Russian)
- Konarev AIV (1985) [Methods for analyzing the component composition of α -amylase and proteinase inhibitors in cereals] *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 21(1):92–100 (In Russian)
- Konarev AIV (1992) *Sistemy ingibitorov gidrolaz u zlakov: organizatsiya, funktsii i evolyutsionnaya izmenchivost* [Cereal hydrolase inhibitor systems: organization, function, and evolutionary variability] *Dr. Biol. Thesis*. Moscow. 356 p. (In Russian)
- Konarev AIV (2017) [Molecular aspects of plant immunity and their coevolution with insects] *Biosfera* 9(1):79–99. <https://doi.org/10.24855/biosfera.v9i1.325> (In Russian)
- Konarev AIV, Konarev AV, Nefedova LI, Gubareva NK, Ozay DS (2013) Analysis of gluten-hydrolyzing proteinase polymorphism in wheat grains damaged by Sunn Pest *Eurygaster integriceps* Put. and related bugs. *Russian Agricultural Sciences* 39(5–6):390–395. <https://doi.org/10.3103/S1068367413060104> (Translated in English)

- Konarev AIV, Mit'fanova OP (1987) [Analysis of inheritance of α -amylase and trypsin inhibitor components in soft wheat] *Tsitologiya i genetika* 21(1): 15–18 (In Russian)
- Konarev AIV, Dolgikh VV, Senderskiy IV, Kapustkina AV, Nefedova LI, Konarev AV, Gubareva NK (2017) [Immunochemical analysis of Sunn pest *Eurygaster integriceps* proteinase complex hydrolyzing wheat gluten proteins] *Vestnik zashchity rasteniy* 1:12–20 (In Russian)
- Konarev AIV, Fomicheva YuV (1991) [Cross analysis of the interaction of α -amylase and proteinase components of insects with protein inhibitors from wheat endosperm]. *Biokhimiya* 56(4):628–638 (In Russian)
- Konarev VG (1983) *Belki rasteniy kak geneticheskie marker* [Plant proteins as genetic markers]. Moscow: Kolos. 320 p. (In Russian)
- Kovalchuk E (2009) [A simple way to adjust flour quality in mills]. *Khleboprodukt* 10:40–41 (In Russian)
- Kuznetsova SS, Kolesanova EF, Talanova AV, Veselovsky AV (2016) [Prospects for the design of new therapeutically significant protease inhibitors based on knottins and sunflower seed trypsin inhibitor (SFTI 1)]. *Biomeditsinskaya khimiya* 62(4):353–368. <http://doi.org/10.18097/PBMC20166204353> (In Russian)
- Mosolov VV (1983) *Belkovye ingibitory kak regulatory protsessov proteoliza* [Plant proteinaceous inhibitors as regulators of proteolysis]. Moscow. Nauka. 41 p. (In Russian)
- Neimorovets VV, Konarev AIV, Nefedova LI, Grichanov IYa (2016) [Methods for the detection of the damage of the ear and grains of cereals caused by corn bugs of the *Eurygaster* genus (review)]. *Zashchita i karantin rasteniy* 2: 28–36 (In Russian)
- Pavlyushin VA, Vil'kova NA, Sukhoruchenko GI, Nefedova LI, Kapustkina AV (2015) *Vrednaya cherepashka i drugie khlebnye klop* [Sunn pest and other wheat bugs]. St. Petersburg. VIZR. 280 p. (In Russian)
- Rylko D. (2011) [Damage from Sunn pest] *Agroinvestor* January, 19. <https://www.agroinvestor.ru/markets/article/11707-vred-ot-cherepashki/> (In Russian)
- Semenova AY, Vil'kova NA, Gavrilyuk IP (1977) [On the specificity of salivary gland proteins of some bread bugs]. *Trudy VIZR* 36–38 (In Russian)
- Tenyaeva OL (2004) *Gliadinovyy kompleks zerna ozimoy pshenitsy, ustoychivoy k vrednoy cherepashke Eurygaster integriceps Put.* [Grain gliadin complex of winter wheat resistant to Sunn pest] *Dr. Biol. Thesis.* Saratov. 175 p. (In Russian)
- Vilkova NA (1968) On the physiology of nutrition of Sunn bug *Eurygaster integriceps* (Heteroptera, Scutelleridae). *Entomologicheskoe obozreniye* 47(2):701–710 (In Russian)
- Vilkova NA (1973) [The feeding of the Sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. on different wheat varieties] *Trudy VIZR* 37:59–75 (In Russian)
- Vilkova NA (1979) [Immunitet rasteniy k vreditel'yam i ego svyaz s pishchevoy specializatsiey nasekomyh-fitofagov] *Chteniya pamyati N.A.Kholodkovskogo* 31:68–103. (In Russian)
- Vilkova NA (1980) *Fiziologicheskoe osnovy teorii ustoychivosti rasteniy k nasekomym* [Physiological basis of the theory of plant resistance to insects] *Abstr. Dr. Agr.Sci. Thesis.* Leningrad. 49 p. (In Russian)
- Vilkova NA, Konarev AV (2010) [Modern problems of plant immunity to pests]. *Vestnik zashchity rasteniy.* 3:3–15 (In Russian)
- Vilkova NA, Shapiri ID, Borshcheva TA (1976) *Ispolzovaniye infrakrasnoy mikroskopii dlja diagnostiki povrezhdeniya i ustoychivosti zernovok k klopam. Metody issledovaniya patologicheskikh izmeneniy v rastenii* [The use of infrared microscopy to diagnose damage and resistance of kernels to bugs. Methods for the study of pathological changes in plants]. Moscow: Kolos. 216–219. (In Russian)
- Vilkova NA, Kapustkina AV, Konarev AIV, Frolov AN (2018) [Problems of diagnostics of wheat grain damage by wheat bugs] *Zashchita i karantin rasteniy* 9:3–8 (In Russian)
- Vilkova NA, Nefedova LI, Khudyakov SV (2006) [Method for diagnosing of wheat grain injured by sucking pests]. Patent RU 2278502 (In Russian)
- Yakovenko VA, Litvinov AM, Gavrilyuk IP (1978) Electrophoretic characterisation of proteins of chinch-bug affected wheat. *Izvestia Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy. Pishchevaya Tekhnologiya.* 3:17–19 (In Russian)

Plant Protection News, 2020, 103(2), p.65–86

OECD+WoS: 1.06+IY (Entomology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-2-13279>

Full-text review

DIGESTIVE HYDROLASES OF WHEAT BUGS: PROPERTIES, SIGNIFICANCE AND POSSIBLE WAYS TO LIMIT THEIR ACTIVITY

A.V. Konarev

All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

e-mail: al_konarev@hotmail.com

Digestive hydrolases are the key elements of trophic links in ecosystems. The systems of digestive hydrolases of phytophagous insects have been established during their long-term co-evolution with plants. This is also true for herbivorous bugs, including a dangerous pest of wheat, the Sunn bug (also known as the Sunn pest). Proteases are the main economically significant damage factor of representatives of the genus *Eurygaster* and other bugs harmful to the wheat grain. Proteases disrupt the structure of gluten and seriously impair the baking qualities of flour. α -Amylases provide assimilation of starch, the main source of energy for these insects. The data on digestive α -amylases and proteases of the Sunn pest remain fragmentary. Little is known regarding the enzymes involved in bugs' feeding by the vegetative parts of cereals. There are many ways to strengthen gluten damaged by bugs, though not all of them are safe. Proteinaceous inhibitors of proteases and other hydrolases are considered as promising elements to develop safe for health and eco-friendly means to control wheat bugs and reduce their damage to the grain quality. The reduced sensitivity of the Sunn pest proteases to protein inhibitors can be overcome by constructing novel inhibitors based on their known forms, as well as by involving other highly specific approaches, including the use of antibodies to active enzyme centers or RNA interference. The bugs' proteases themselves can be used in the diagnosis of grain damage, in food technologies and in medicine.

Keywords: Sunn pest, wheat bugs, digestive hydrolases, α -amylases, proteases, wheat gluten, inhibitors

Received: 28.04.2020

Accepted: 28.05.2020