پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۱ (۳): ۵۰-۴۱ (۱۴۰۱)- مقاله پژوهشی

Journal of Applied Research in Plant Protection 11(3): 41-50 (2022)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.15400

اثر تغذیه از رقم‌های مختلف چغندرقند بر میزان پروتئین و فعالیت آلفا-آمیلاز حشرات کامل *Lixus incanescens*، و مهار آنزیم با عصاره‌های پروتئینی تریتیکاله و چاودار

آرزو ورمزیاری[۱]، رضا فرشباف پورآباد[۱] و شبنم عاشوری[۲]✉

[۱] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. [۲] پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران.
✉shashouri@aeoi.org.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۳ بازنگری: ۱۴۰۰/۸/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۴

چکیده

خرطوم‌بلند چغندرقند *Lixus incanescens* تقریبا در تمام مزارع چغندرقند ایران انتشار دارد و خسارت شدید کمی و کیفی روی چغندرقند وارد می‌کند. در این پژوهش، تاثیر تغذیه از چهار رقم مختلف چغندرقند به‌نام‌های افسوس، آناکوندا، اگریت و پرمییر روی وزن حشرات کامل، میزان پروتئین روده، فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای و نیز مهار آن با عصاره‌های پروتئینی بذور چاودار و تریتیکاله مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین وزن حشرات کامل (۲۰/۳۳ میلی‌گرم) در اثر تغذیه از رقم افسوس مشاهده شد و بین سه رقم دیگر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. میزان پروتئین روده و میزان فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای در حشرات کامل تغذیه کرده از رقم‌های مختلف به طور معنی‌داری متفاوت بود و کم‌ترین و بیش‌ترین مقادیر به ترتیب در رقم پرمییر و افسوس ثبت شدند. طبق نتایج، عصاره پروتئینی تریتیکاله فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای حشرات کامل تغذیه کرده از هر چهار رقم را مهار کرد و بین چهار رقم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیش‌ترین میزان مهارکنندگی (۹۳ درصد) در حشرات کامل تغذیه کرده از رقم پرمییر دیده شد. همچنین، عصاره پروتئینی چاودار فعالیت آلفا- آمیلاز گوارشی حشرات کامل تغذیه کرده از رقم پرمییر را تا ۹۸ درصد مهار کرد و بین سه رقم دیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با استناد به نتایج، مهارکننده‌های پروتئینی چاودار و تریتیکاله می‌توانند به عنوان یکی از عوامل موثر در کنترل تلفیقی این آفت مورد توجه قرار گیرند. همچنین دو رقم افسوس و پرمییر را می‌توان به ترتیب به عنوان رقم مطلوب و نامطلوب برای این آفت گزارش نمود.

کلمات کلیدی: پروتئین روده، خرطوم‌بلند چغندر قند، عصاره‌های پروتئینی، فعالیت آنزیم، ویژگی‌های فیزیولوژیک

Effect of feeding from different sugar beet cultivars on *Lixus incanescens* adults gut protein content and α-amylase activity, and the enzyme inhibition by triticale and rye protein extracts

Arezu Varmazyari[1], Reza Farshbaf Pourabad[1], Shabnam Ashouri[2]✉

[1]*Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.* [2]*Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran.* shashouri@aeoi.org.ir✉

Received: 15 Oct 2021 Revised: 9 Nov 2021 Accepted: 5 Dec 2021

Abstract

Sugar beet long snout weevil *Lixus incanesncens* is spread in almost all sugar beet fields in the Iran and causes economic quantitative and qualitative damage to sugar beet. In current study, the effect of four different sugar beet cultivars; Efesos, Anaconda, Aigrette and Premiere, on weight of adults, gut protein content, gut α-amylase activity and its inhibition with rye and triticale seed protein extracts were compared. The highest weight (20.33 mg) was seen in Efesos cultivar fed adults and no significant difference was recorded between the others. The gut protein content and α-amylase activity in the adults fed on different sugar beet cultivars were different significantly and the least and highest values were recorded in Premiere and Efesos, respectively. According to the results, triticale protein extracts inhibited the gut α-amylase activity of all adults fed on four sugar beet cultivars and there was no significant difference between them. The highest inhibitory rate (93%) was recorded in adults fed on Premiere. Also, the rye protein extract inhibited the Premiere fed adults digestive α-amylase activity up to 98% and no significant difference was observed between the others. Consequently, rye and triticale protein inhibitors can be considered as one of the integrated pest management factors for the control of this pest. Also, Efesos and Premiere can be reported as desirable and undesirable cultivars for this insect, respectively.

Keywords: Enzyme Activity, Gut Protein, Physiological Parameters, Protein Extracts, Sugar Beet Long Snout Weevil

How to cite:

Arezu Varmazyari, Reza Farshbaf Pourabad, Shabnam Ashouri 2022. Effect of feeding from different sugar beet cultivars on *Lixus incanescens* adults gut protein content and α-amylase activity, and the enzyme inhibition by triticale and rye protein extracts. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (3): 41–50.

مقدمه

خرطوم‌بلند چغندرقند با نام علمی *Lixus incanescens* (Boheman, 1836) (Coleoptera: Curculionidae) یکی از مهم‌ترین آفات چغندرقند در ایران محسوب می‌شود. حشرات کامل و لاروهای این حشره به شدت خسارت‌زا هستند که این مسئله باعث اهمیت بیشتر این آفت شده است. لاروها با تغذیه از دم‌برگ‌ها و حشرات کامل با تغذیه از برگ‌ها و دم‌برگ‌ها باعث کم شدن سطح سبز گیاه، کاهش رشد رویشی تا ۷۵ درصد، کاهش وزن ریشه و غده و کاهش عیار قندی غده می‌گردند (Fathi & Abedi 2015).

حشراتی که از گیاهان تغذیه می‌کنند، به گوارش درشت مولکول‌های غذایی وابسته هستند. تبدیل درشت مولکول‌ها به مولکول‌های کوچک‌تر توسط آنزیم‌ها صورت می‌گیرد (Jongsma & Bolter 1997). آنزیم‌هایی مانند تریپسین، آمیلازها، پروتئازها، بتاگلیکوزیدازها و غیره در دستگاه گوارش حشرات فعالیت دارند. از این بین، آلفا- آمیلازها با تبدیل کربوهیدرات‌ها به دی‌ساکاریدها مواد را برای سلول‌های روده حشرات قابل جذب می‌سازند. این آنزیم‌ها در لوله گوارش و غدد بزاقی بسیاری از حشرات یافت شده و جهت شکستن و تبدیل نشاسته به مالتوز ضروری می‌باشند (Terra & Ferreira 1994; Valencia-Jime´nez *et al.* 2008). دستکاری فعالیت آلفا- آمیلازها در حشرات آفت اهمیت زیادی دارد، چرا که با مهار فعالیت آنها، گوارش در حشره مختل و سبب کاهش تولید انرژی در بدن خواهد شد (Carlini & Grossi-de-sa 2002). گیاهان از طریق تولید ترکیبات دفاعی که ممکن است پروتئینی باشند، درجه خاصی از مقاومت را علیه حشرات تکامل داده‌اند. مهارکننده‌های آنزیم‌ها از طریق عملکرد خود بر روی آلفا- آمیلازها و پروتئازهای گوارشی حشرات، مانع گوارش نشاسته و پروتئین‌های گیاهی می‌شوند. انواع مهارکننده‌های آمیلازها در گیاهان مختلف، به‌ویژه غلات، معرفی شده‌اند که در تنظیم جمعیت حشرات گیاه‌خوار و مکنده نقش دارند. مهارکننده‌های آنزیم که در گیاهان موجود هستند، به دلیل بهبود مقاومت گیاهان در برابر حشرات، کاهش اثرات سوء زیست‌محیطی و امنیت بالای آنها در جهت حفظ عوامل کنترل زیستی، دارای اهمیت بسیار زیادی هستند. داشتن اطلاعات در مورد ویژگی‌های آنزیم‌های گوارشی حشرات اولین گام در جهت استفاده از مهارکننده‌های آن‌ها برای استفاده در برنامه‌های مدیریت کنترل آفات می‌باشد (Franco *et al.* 2002). بنابراین، با توجه به اهمیت یافتن رقم‌های مقاوم به آفات و اهمیت فیزیولوژی گوارش حشرات در کنترل آنها، در این تحقیق اثر تغذیه از رقم‌های مختلف چغندرقند بر میزان پروتئین روده و فعالیت آلفا- آمیلازهای روده‌ای حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندرقند و مهار آنزیم با عصاره‌های پروتئینی بذور چاودار و تریتیکاله مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندرقند در تیرماه سال ۱۳۹۹ از ارقام مختلف چغندرقند شامل اگریت، آناکوندا، افسوس و پرمییر، در مزارع چغندرقند مناطق شوراب و بولاماج شهرستان خوی، جمع‌آوری و به گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز منتقل شدند. این حشرات تا زمان تهیه نمونه از آنها، روی برگ‌های همان رقم‌های مختلف چغندرقند که از مزارع تهیه شده بودند، جداگانه نگه‌داری شدند. به این صورت که، تعداد ۳۰ عدد حشره کامل درون ظروف پلاستیکی نیمه‌شفاف با قطر ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر، حاوی برگ‌های رقم‌های مورد بررسی، قرار داده شدند. جهت جلوگیری از خشک شدن برگ‌ها، پنبه‌های آغشته به آب به دم‌برگ‌ها پیچیده شدند و هر روز این برگ‌ها تعویض می‌شدند. پرورش حشرات در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی صورت گرفت.

توزین حشرات کامل و تهیه نمونه‌های پروتئینی

برای انجام آزمایش‌ها، تعداد ۱۵ عدد حشره کامل خرطوم‌بلند چغندرقند از ظروف مربوط به هر رقم به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از ترازوی دیجیتال مدل Vicon (Acculab®، دقت تا هزارم اعشار) بر حسب میلی‌گرم توزین شدند. سپس جهت تهیه نمونه پروتئینی، این حشرات با استفاده از قیچی میکروجراحی و پنس روی شیشه ساعت حاوی آب مقطر و زیر استریومیکروسکوپ تشریح شدند. ۱۵ عدد روده کامل درون میکروتیوب‌های حاوی ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر قرار داده شدند. نمونه‌ها، سپس توسط دستگاه همگن‌ساز، همگن شدند. نمونه‌های همگن شده در چهار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی درون هر میکروتیوب، به میکروتیوب دیگری منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان بررسی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

برآورد غلظت پروتئین

میزان غلظت پروتئین در نمونه‌ها براساس روش Bradford (1976) از طریق رسم نمودار برای پنج غلظت پروتئین استاندارد یعنی آلبومین سرم گاوی (۰/۰۳۲، ۰/۰۶۳، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تخمین زده شد. در چاهک میکروپلیت، به ۱۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی ۱۹۰ میکرولیتر معرف رنگی بردفورد (حاوی ۰/۰۱ درصد کوماسی بریلینت بلو G-250، ۸/۵ درصد اسید فسفریک، ۴/۷ درصد اتانول) اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد. با توجه به سنجش اولیه، همه نمونه‌ها با آب مقطر ۱۰ برابر رقیق شدند.

سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز

فعالیت آلفا- آمیلاز با استفاده از روش Bernfeld (1995) با اندکی تغییر سنجش شد. مخلوط واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر نمونه حاوی آنزیم، ۲۵ میکرولیتر زیرنهشت یا سوبسترا (نشاسته یک درصد) و ۶۵ میکرولیتر بافر یونیورسال (Universal buffer) ۰/۰۲ مولار (pH ۵)، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در داخل بن-ماری به مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شد. در شاهد به جای آنزیم از بافر یونیورسال استفاده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی-نیتروسالسیلیک اسید (DNS) به واکنش اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در آب با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. معرف دی-نیتروسالیسیلیک اسید حاوی یک گرم دی‌نیتروسالیسیلیک اسید، ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات و ۲۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۲ نرمال بود، که با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از سرد شدن، نمونه‌ها به چاهک میکروپلیت منتقل شدند و جذب نوری در دستگاه جذب‌خوان میکروپلیت (Absorbance microplate reader) در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. فعالیت نسبی آلفا- آمیلاز به صورت درصدی از فعالیت آلفا- آمیلاز در حشرات تغذیه کرده از رقم افسوس (بیش‌ترین فعالیت در این رقم ثبت گردید) محاسبه شد. آزمایش‌ها پنج بار تکرار شدند.

استخراج عصاره‌های پروتئینی از بذور گیاهی

بذور تریتیکاله (*Triticosecale wittmack* cv. Sanabad) و چاودار (*Secale cereal* L. cv. Danko) از مرکز تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردیدند. استخراج عصاره پروتئینی طبق روش Baker (1987) و Melo *et al.* (1999) با اندکی تغییر شرح داده شده توسط Ashouri & Farshbaf Pourabad (2016) انجام شد.

سنجش میزان مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی گیاهی

این آزمایش مشابه سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز بود با این تفاوت که قبل از اضافه نمودن نشاسته، میکروتیوب‌های حاوی ۱۰ میکرولیتر نمونه حاوی آنزیم، ۵۵ میکرولیتر بافر یونیورسال و ۱۰ میکرولیتر مهارکننده (عصاره‌های پروتئینی بذور، با غلظت سه میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شدند. سپس زیرنهشت به ترکیب اضافه شده و دوباره در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شدند. شاهد مهارکنندگی نیز حاوی ۶۵ میکرولیتر بافر یونیورسال (اسیدیته ۵)، ۱۰ میکرولیتر مهارکننده و ۲۵ میکرولیتر نشاسته یک درصد بود. آزمایش‌ها پنج بار تکرار شدند. در پایان، درصد مهار فعالیت آنزیم محاسبه گردید (Ashouri *et al.* 2015).

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید واسرشت‌گر

غلظت پروتئین‌های جدا شده بر اساس وزن مولکولی روی ژل پلی-آکریل‌آمید احیائی یا واسرشت‌گر دارای سدیم‌دودسیل‌سولفات یا SDS-PAGE بررسی شد. الکتروفورز با روش Laemmli (1970) و با استفاده از ژل جداکننده (Resolving gel) ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده (Stacking gel) چهار درصد اجرا شد. برای این منظور و قبل از ریختن نمونه پروتئینی در چاهک‌ها، با حرارت دادن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس پروتئین‌ها دناتوره (Denature) شدند و در بافر نمونه از مرکاپتواتانول (Mercaptoethanol)استفاده گردید. پس از بارگذاری نمونه‌ها در ژل رویی، الکتروفورز با ولتاژ ۱۴۰ ولت در دمای چهار درجه سلسیوس انجام شد. در نهایت و پس از رسیدن نوارهای پروتئینی به انتهای ژل، الکتروفورز به پایان رسید و ژل به دست آمده به مدت یک شبانه‌روز در محلول رنگی کوماسی بریلینت بلو (حاوی ۵۰ درصد متانول، ۱۰ درصد اسیداستیک و ۰/۰۵ درصد کوماسی بریلینت بلو R-250) روی دستگاه تکان‌دهنده رنگ‌آمیزی شد. سپس، با محلول رنگ‌بر (حاوی ۴۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسیداستیک) چندین بار روی ژل‌ها رنگ‌زدایی انجام گرفت تا نوارهای پروتئینی به رنگ آبی در متن روشن قابل مشاهده گردند. بعد از آن، ژل‌ها در دستگاه اسکنر تصویربرداری شدند. وزن مولکولی نوارهای پروتئینی در حضور استاندارد

با شماره کاتالوگ SL7011 (۱۸۰-۱۱کیلو دالتون؛Sinaclon®) تخمین زده شد.

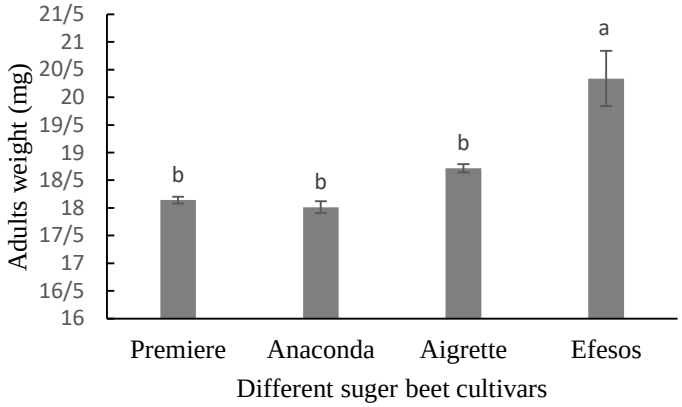
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Instat3 software و به صورت طرح کاملاً تصادفی یک‌طرفه انجام شد. در گروه‌بندی میانگین‌های مربوط به آزمایش‌های مختلف، آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد مورد استفاده قرار گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم شدند.

نتایج

وزن حشرات کامل

طبق نتایج تجزیه واریانس، تغذیه از رقم‌های مختلف چغندر قند روی وزن حشرات کامل خرطوم بلند چغندر قند اثر معنی‌داری داشت ($F_{3,19} = 16.862, p < 0.001$) و بیش‌ترین وزن حشرات کامل در اثر تغذیه از رقم افسوس (۲۰/۳۳ میلی‌گرم) حاصل شد که با میانگین‌های مربوط به تیمارهای اگریت، آناکوندا و پرمییر (به ترتیب ۱۸/۷۱، ۱۸/۰۱، ۱۸/۱۴ میلی‌گرم؛ فاقد اختلاف معنی‌دار باهم) دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۱).

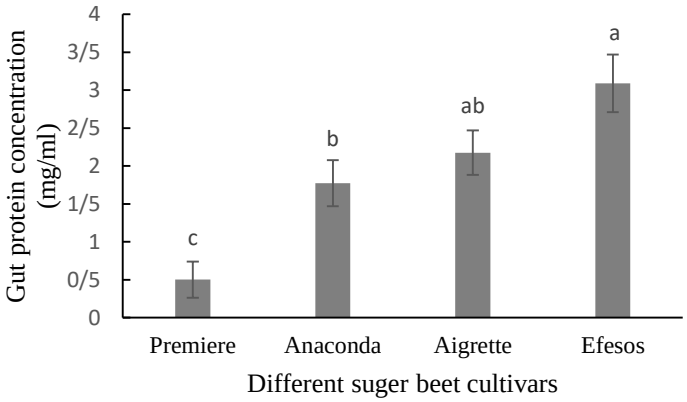


شکل ۱. وزن حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندرقند تغذیه کرده از چهار رقم چغندرقند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Figure 1. Weight of *Lixus incanescens* adults fed on four sugar beet cultivars. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.001$) based on Tukey's test.

میزان پروتئین روده حشرات کامل

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان پروتئین روده حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندر قند تغذیه کرده از رقم‌های مختلف چغندر قند در سطح احتمال آماری یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($F_{3,19} = 18.028, p < 0.001$). بیش‌ترین میزان پروتئین به ترتیب در روده حشرات کامل تغذیه کرده از رقم افسوس و اگریت (به ترتیب ۳/۰۹ و ۲/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر؛ فاقد اختلاف معنی‌دار باهم) دیده شد. پس از آن، میزان پروتئین در روده حشرات تغذیه کرده از رقم آناکوندا (۱/۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیش‌ترین مقدار را داشت که تنها با میانگین تیمار اگریت فاقد اختلاف معنی‌دار بود. کم‌ترین میزان پروتئین روده نیز در حشرات کامل تغذیه کرده از رقم پرمییر دیده شد (۰/۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که با میانگین‌های مربوط به سایر رقم‌ها تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۲).

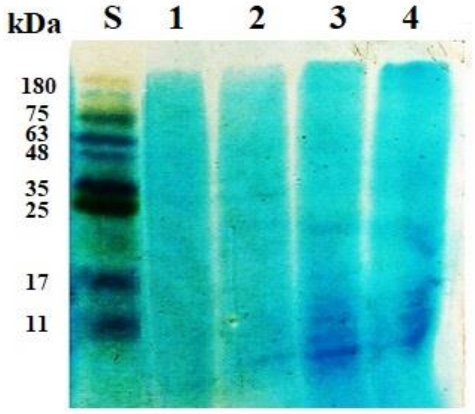


شکل ۲. غلظت پروتئین در روده حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندر قند تغذیه کرده از چهار رقم چغندرقند. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Figure 2. Gut protein concentration of *Lixus incanescens* adults fed on four sugar beet cultivars. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.001$) based on Tukey's test.

الکتروفورز ژل پلی آکریل‌آمید واسرشت‌گر

الگوهای پروتئینی نمونه‌های تهیه شده از روده حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندر قند تغذیه کرده از چهار رقم مختلف با استفاده از الکتروفورز واسرشت‌گر (SDS-PAGE) مقایسه شدند. تصویر ژل به دست آمده در شکل ۳ ارایه شده است. الگوی پروتئینی نمونه-های تهیه شده نشان می‌دهد که نوارهای پروتئینی مربوط به رقم پرمییر دارای کم‌ترین شدت و نوارهای پروتئینی مربوط به رقم افسوس دارای بیش‌ترین شدت بودند. به طور کلی، باوجود واضح نبودن نوارهای مربوط به دو رقم پرمییر و آناکوندا (به دلیل کم بودن غلظت پروتئین) نتایج تخمین مقدار پروتئین با استفاده از روش بردفورد و تصویر مربوط به ژل پلی‌آکریل‌آمید واسرشت‌گر با هم هم‌خوانی دارند.

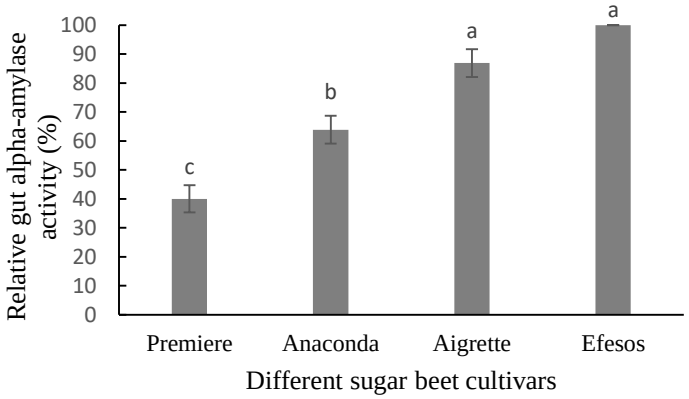


شکل ۳. SDS-PAGE میزان پروتئین روده حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندرقند تغذیه کرده از چهار رقم چغندر قند، که اعداد یک تا چهار به ترتیب نشان‌دهنده رقم‌های پرمییر، آناکوندا، اگریت و افسوس می‌باشند. ستون سمت چپ که با حرف S مشخص شده مربوط به پروتئین استاندارد (۱۸۰-۱۱ کیلودالتون) می‌باشد. از کوماسی بریلینت بلو جهت رنگ‌آمیزی ژل استفاده شد.

Figure 3. SDS-PAGE gut proteins of *Lixus incanescens* adults fed on four sugar beet cultivars. Numbers 1-4 represent the cultivars Premiere, Anaconda, Aigrette and Efesos, respectively. The left column marked with S corresponds to the standard protein (11-180 kDa). Coomassie brilliant blue was used for staining the proteins.

فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای

میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در روده حشرات تغذیه کرده از رقم افسوس، که بیش‌ترین فعالیت را داشت، از ۱۰۰ درصد محاسبه گردید و فعالیت نسبی آنزیم در حشرات کامل تغذیه کرده از سه رقم دیگر براساس آن محاسبه شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، فعالیت نسبی آنزیم آلفا- آمیلاز روده‌ای حشرات کامل تغذیه کرده از رقم‌های مختلف چغندر قند در سطح احتمال آماری یک درصد دارای اختلاف معنی‌داری بود ($F_{3,19} = 41.011$, $p < 0.001$). طبق نتایج مقایسه میانگین، فعالیت نسبی آنزیم در حشرات کامل تغذیه کرده از رقم اگریت (۹۸/۰۲ درصد) با رقم افسوس غیرمعنی‌دار بود ولی با دو میانگین دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. کم‌ترین میزان فعالیت نسبی آنزیم نیز به ترتیب در حشرات کامل تغذیه کرده از رقم آناکوندا و پرمییر (به ترتیب ۶۳/۸۶ و ۴۰ درصد؛ دارای اختلاف معنی‌دار باهم) مشاهده شد (شکل ۴).



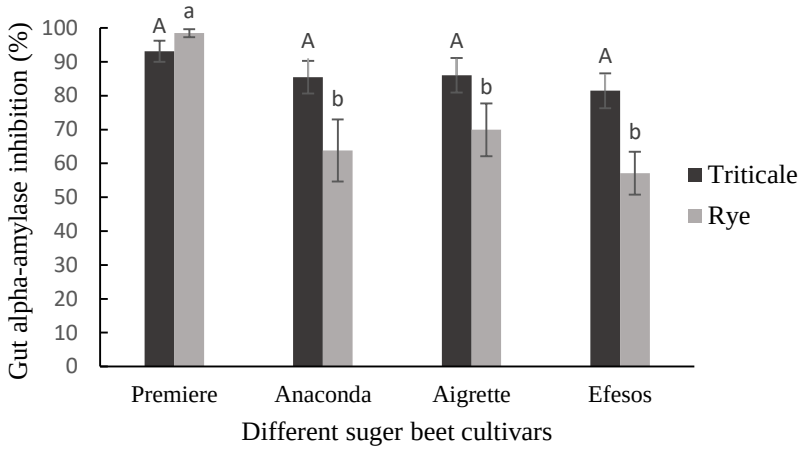
شکل ۴. درصد فعالیت نسبی آلفا- آمیلاز روده‌ای حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندر قند تغذیه کرده از چهار رقم چغندرقند. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Figure 4. Relative gut α-amylase activity (%) of *Lixus incanescens* adults fed on four sugar beet cultivars. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.001$) based on Tukey's test.

سنجش اثر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی

طبق نتایج تجزیه واریانس، اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی بذر تریتیکاله روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده حشرات کامل تغذیه کرده از رقم‌های مختلف مورد بررسی معنی‌دار نبود ($F_{3,19} = 1.108$, $p = 0.3747$). باوجود این، عصاره پروتئینی بذر تریتیکاله روی فعالیت آلفا- آمیلاز روده حشرات کامل تغذیه کرده از تمامی رقم‌ها مهارکنندگی بسیار بالایی (حدود ۸۱/۴۴ تا ۹۳/۱۲ درصد) داشت (شکل ۵).

بر خلاف عصاره پروتئینی بذر تریتیکاله، اثر مهارکنندگی عصاره پروتئینی بذر چاودار روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده حشرات کامل تغذیه کرده از رقم‌های مختلف مورد بررسی معنی‌دار بود ($F_{3,19} = 7.100$, $p = 0.003$). عصاره پروتئینی بذر چاودار، فعالیت آلفا- آمیلاز روده حشرات کامل تغذیه کرده از رقم پرمییر را بیش‌تر مهار نمود (۹۸/۴۸درصد) که با میزان آن در حشرات کامل تغذیه کرده از ارقام افسوس، اگریت و آناکوندا (به ترتیب ۵۷/۱۱، ۶۹/۹۴، ۶۳/۷۹ درصد؛ بدون اختلاف معنی‌دار باهم) دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۵).



شکل ۵. میزان مهارکنندگی عصاره پروتئینی تریتیکاله و چاودار روی فعالیت آلفا- آمیلاز گوارشی حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندر قند تغذیه کرده از چهار رقم چغندر قند. حروف مشابه و غیرمشابه که با حروف بزرگ و کوچک مشخص شده‌اند به ترتیب نشان‌دهنده‌ی اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Figure 5. Inhibitory effect of triticale and rye protein extracts on gut α-amylase activity of *Lixus incanescens* adults fed on four sugar beet cultivars. Same and different letters marked with uppercase and lowercase letters show non-significant ($p > 0.05$) and significant differences ($p < 0.01$) based on Tukey's test, respectively.

بحث

خرطوم‌بلند چغندرقند به عنوان یکی از مهم‌ترین آفات چغندرقند در جهان شناخته شده است. استفاده از سموم شیمیایی برای دفع این آفت، باعث آلودگی‌های زیست‌محیطی و مقاومت آفت شده است (Huignard *et al.* 2005). بنابراین، استفاده از مهارکننده‌های طبیعی از جمله مهارکننده‌های آنزیم آلفا- آمیلاز موجود در گیاهان غیرمیزبان (Franco *et al.* 2002) و رقم‌های مقاوم گیاهان میزبان جزو بهترین گزینه‌ها برای کنترل این آفت می‌باشند. به همین دلیل، در این تحقیق اثر چهار رقم رایج چغندر قند در منطقه آذربایجان غربی، روی چند ویژگی فیزیولوژیک مهم این آفت مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس نتایج، میانگین وزن حشرات کامل تغذیه کرده از رقم-های پرمییر، اگریت و آناکوندا تقریبا برابر ولی در رقم افسوس از همه بیش‌تر بود. بنابراین، می‌توان گفت که رقم افسوس از این نظر نسبت به سه رقم دیگر برای این حشره مطلوب‌تر بوده است.

در این بررسی، فعالیت آلفا- آمیلاز در روده حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندر قند تغذیه کرده از چهار رقم مختلف با هم متفاوت بود. کاهش میانگین پروتئین روده حشرات در اثر تغذیه از یک رقم باعث کاهش فعالیت آلفا- آمیلاز روده در آن حشرات شد. Nejat *et al.* (2020) نیز کم‌ترین میزان پروتئین روده و فعالیت آلفا- آمیلاز و پکتیناز گوارشی لاروهای کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) را در رژیم غذای مصنوعی حاوی پودر ذرت نسبت به لوبیا قرمز، لوبیا سفید و لوبیا چشم‌بلبلی مشاهده کردند. Naseri *et al.* (2016) فعالیت آنزیم‌های گوارشی و پاسخ‌های تغذیه‌ای در کرم طوقه‌بر چغندر قند *Autographa gamma* L. (Lepidoptera: Noctuidae) روی ۹ رقم چغندرقند به‌نام‌های پرتیرا، کارولینا، پالیتا، لتیزیر، تیلر، اردبیلی، پرشیا، روزیر و دورتئا را مورد مطالعه قرار دادند. این محققین بیان داشتند که بیش‌ترین محتوی پروتئینی سن چهارم و پنجم لاروهای این حشره و نیز بیش‌ترین میانگین وزنی زمانی بود که از رقم پرشیا تغذیه کردند. بیش‌ترین فعالیت آمیلازی در حشرات تغذیه کرده از رقم‌های روزیر و دورتئا مشاهده شد. همانند نتایج به دست آمده در این تحقیق، رقم چغندر قند در میزان پروتئین، وزن حشرات و فعالیت آنزیم روده‌ای موثر بوده است.

Jabaleh *et al.* (2020) خسارت خرطوم‌بلند چغندر قند روی پنج رقم شکوفا، فلورس، سیلوتا، سیروباستوس و موناتونا را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج ایشان نشان داد که بیش‌ترین تراکم تخم و لارو خرطوم‌بلند به ترتیب در رقم سیروباستوس و موناتونو بود و دلیل احتمالی آن را ضخامت و طول بیش‌تر دم‌برگ‌های این رقم‌ها

گزارش کردند. Fathi & Abedi (2015) نیز تراکم و خسارت خرطوم‌بلند چغندر قند را در شش رقم چغندر قند اردبیلی، ارس، پرشیا، فلورس، لاتینیا و روزیر مطالعه کردند. نتایج حاکی از آن بود که رقم پرشیا به‌دلیل دارا بودن دم‌برگ‌های کوتاه با ضخامت کم‌تر نسبت به رقم‌های دیگر خسارت کم‌تری را متحمل شده است. هر دو این مطالعات با نتایج این تحقیق هم‌راستا هستند چرا که در این مطالعه نیز رقم افسوس که رقم حساس‌تری ثبت شده است، دارای دم‌برگ‌های ضخیم‌تر می‌باشد.

در این پژوهش، عصاره پروتئینی تریتیکاله فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای حشرات کامل خرطوم‌بلند چغندر قند را در مقایسه با عصاره چاودار به میزان بیش‌تری مهار کرد. در سایر مطالعات روی اثر مهارکنندگی عصاره‌های پروتئینی تریتیکاله و چاودار در فعالیت آلفا- آمیلاز حشرات دیگر نیز نتایج مشابه حاصل شده است، عصاره پروتئینی تریتیکاله فعالیت آمیلاز غدد بزاقی سن گندم *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera: Scutelleridae) را ۸۷ درصد (Mehrabadi *et al.* 2012)، فعالیت آمیلاز لاروهای شب‌پره پشت الماسی *Plutella xulostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) را ۹۳ درصد (Dastranj 2012)، فعالیت آمیلاز لاروهای سفیده کوچک کلم *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). را ۷۹ درصد (Dastranj 2012)، فعالیت آمیلازی لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *Arge rosae* L. (Hymenoptera: Argidae) را ۶۲ درصد (Mohammadzadeh *et al.* 2013)، فعالیت آلفا- آمیلازی کرم گلوگاه انار *Ectomyelois* ceratoniae Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) را ۷۵ درصد (Borzoui & Bandani 2013)، فعالیت آلفا- آمیلاز لاروهای کرم غوزه پنبه را ۷۰ درصد (Dastranj & Bandani 2012) و فعالیت آلفا- آمیلازی لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) را ۶۶ درصد (Esmaeli & Bandani 2015) مهار کرده است. همچنین Fatehi *et al.* (2016) عنوان کردند که عصاره پروتئینی بذر چاودار فعالیت آلفا- آمیلاز سوسک سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineat* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) و بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* Z. (Lepidoptera: Gelechiidae) را به ترتیب تا ۷۶ و ۷۹ درصد مهار کرده است. نتایج فوق با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارند. با وجود این، در بررسی‌های سایر محققان، عصاره-های پروتئینی تریتیکاله و چاودار فعالیت آلفا- آمیلازهای سایر حشرات را به میزان کم‌تری مهار کرده‌اند که این تفاوت در نتایج می‌تواند به گونه حشره، مقاومت متفاوت آلفا- آمیلازهای حشرات در برابر مهارکننده‌ها، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در حشرات مختلف و نیز به غلظت عصاره‌های پروتئینی مورد استفاده بستگی داشته باشد.

در پژوهش حاضر، از بین چهار رقم چغندر قند مورد مطالعه، رقم پرمییر نسبت به سه رقم دیگر مطلوبیت کم‌تری برای این آفت داشت و میانگین وزن، فعالیت آلفا- آمیلاز روده‌ای و میانگین پروتئین روده‌ای حشرات کامل تغذیه کرده از آن کم‌تر بود. استفاده از این رقم می‌تواند در برنامه‌های مدیریت تلفیقی خرطوم‌بلند چغندرقند در مزارع چغندر قند مفید باشد. با انجام مشاهدات مزرعه‌ای، پی برده شد که رقم افسوس نسبت به سه رقم دیگر دارای دم‌برگ‌های ضخیم‌تر و درازتری بود. احتمال می‌رود که ضخامت و طول بیش‌تر دمبرگ‌ها به دلیل ایجاد محل‌های مناسبی برای تخم-گذاری، دلیل بالاتر بودن تراکم جمعیت این آفت در مزارع مورد بررسی باشد. این دو صفت همچنین ممکن است در افزایش میانگین وزن حشرات کامل، میانگین میزان پروتئین و فعالیت آلفا-آمیلاز روده‌ای در حشرات کامل تغذیه کرده از رقم افسوس موثر بوده باشند. به طور کلی و با استناد به نتایج تحقیق حاضر، انتقال ژن‌های مهار کننده‌های پروتئینی بذور چاودار و تریتیکاله به رقم-های چغندر قند و ایجاد رقم‌های مقاوم دارای این مهارکننده‌ها و نیز استفاده از رقم پرمییر می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای استفاده در کنترل تلفیقی این آفت در مزارع چغندر قند محسوب شوند.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه تبریز به جهت حمایت مالی از این پژوهش ابراز می‌نمایند.

References

Ashouri Sh, Farshbaf Pourabad R, Bandani A, Dastranj M, 2015. Inhibitory effects of barley and wheat seed protein on digestive α-amylase and general protease activity of *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Turkish Journal of Entomology* 1 (39): 321–32.

Ashouri Sh, Farshbaf Pourabad R, 2016. Effects of proteinaceous extract of rapeseed on the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) digestive alpha-amylase activity and some biological parameters. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 5 (2): 199–214 (In Persian with English abstract).

Baker JE, 1987. Purification of isoamylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. by HPLC and their interaction with partially purified amylase inhibitor from wheat. *Insect Biochemistry* 17: 37–44.

Bernfeld P, 1955. Amylases, α and β. *Methods in Enzymology* 1: 149–158.

Borzoui E, Bandani AR, 2013. Wheat and triticale proteinaceous seed extracts inhibit gut alfa-amylase and protease of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*. *Molecular Entomology* 4: 313–21.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.

Carlini CR, Grossi-de-sa MF, 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515–1539.

Dastranj M, 2012. Investigation of the effect of plant inhibitors of wheat, chickpeas and beans on the activity of digestive amylase and proteinase enzymes of *Plutella xulostella* (Lepidoptera: Plutellida) and *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). Master Thesis in Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, University of Tehran.

Dastranj M, Bandani A, 2012. Effect of proteinaceous extract of triticale seed extract on α-amylase activity of *Helicoverpa armigera*. *Plant Pests Research* 2 (1): 50–57 (In Persian with English abstract).

Esmaeli M, Bandani AR, 2015. The effect of proteinaceous extract of triticale on α-amylase activity of tomato leaf miner, *Tuta absoluta* Meyrick (Lep.: Gelechiidae). *Plant Pests Research* 6 (1): 1–12 (In Persian with English abstract).

Fatehi S, Farshbaf Pourabad R, Ashouri Sh, 2016. Purification of alpha-amylase inhibitors of Colorado potato beetle and potato moth from rye seed protein extract by affinity chromatography. 22th *Iranian Congress of Plant Protection*, August 27-30, University of Tehran, Karaj, Iran. P. 731.

Fathi AA, Abedi AA, 2015. Comparison of six cultivars of sugar beet infection to *Lixus incanescens* (Col.: Curculionidae). *Journal of Plant Protection* 28 (4): 517–524 (In Persian with English abstract).

Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi MF, 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase, structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry* 269: 397–412.

Huignard J, Dugravot S, Ketoh KG, 2005. Use of secondary plant products to protect the seeds of a legume, cowpea: Effects on insect pests and their parasitoids. *In: Biopesticides of Plant Origin (Regnault-Roger C, Philogène B, Vincent C eds)* 123–137.

Jabaleh I, Khodashahi R, Baghban Khalilabad S, 2020. Comparison of different cultivars of sugar beet infection to *Lixus incanescens* (Col.: Curculionidae) in Joghatay. *Applied Plant Protection* 9 (1): 17–27 (In Persian with English abstract).

Jongsma MA, Bolter CJ, 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43: 885–896.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

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. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102: 220–228.

Melo FR, Sales MP, Silva LS, Franco OL, Bloch JRC, *et al.*, 1999. α-Amylase inhibitors from cowpea seeds. *Protein Peptide Letter* 6: 387–392.

Mohammadzadeh M, Bandani AR, Borzoui E, 2013. The effect of cereal seed extracts on amylase of the

rose sawfly, *Arge rosae* Linnaeus (Hymenoptera: Argidae*). Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46: 1–10.

Naseri B, Golikhajeh N, Rahimi F, 2016. Digestive physiology and nutritional responses of *Autographa Gamma* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science* 16 (1): 53.

Nejat SS, Farshbaf Pourabad R, Ashouri Sh, 2020. Impact of Different Diets on Some Biological and Physiological Parameters in the *Helicoverpa armigera* (Hübner,1808) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9 (2): 61–74 (In Persian with English abstract).

Terra WR, Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109: 1–62.

Valencia-Jime´nez A, Arboleda AJW, Lopez Avila A, Grossi-de-Sa MF, 2008. Digestive α-amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors. *Bulletin of Entomological Research* 98: 575–579.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons. org/ licenses/by-nc/2.0/)