



دانشگاه محقق اردبیلی
معاونت پژوهشی و فناوری

گزارش نهایی طرح تحقیقاتی

عنوان طرح پژوهشی:

تأثیر بعضی از ارقام برنج روی زیست شناسی، شاخص های تغذیه ای و فعالیت

پروتئولیتیک و آمیلولیتیک گوارشی *Tribolium castaneum* Herbest

(Coleoptera: Tenebrionidae)

مجری طرح:

دکتر بهرام ناصری

همکار طرح:

شادی مجد مرئی

گروه گیاه پزشکی، دانشکده ی کشاورزی و منابع طبیعی

این طرح با تصویب و حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا گردیده است.

بهار ۱۳۹۹

چکیده

شپشه قرمز آرد، (*Tribolium castaneum* (Herbest) (Coleoptera: Tenebrionidae)، یکی از آفات مهم محصولات انباری از جمله برنج در ایران و جهان است. در این تحقیق، ویژگی‌های زیستی، شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیم‌های گوارشی *T. castaneum* روی هشت رقم برنج (علی کاظمی، دم سیاه، فجر، گیلانه، گوهر، هاشمی، خزر و ندا) در دمای 30 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و شرایط تاریکی کامل بررسی شد. طولانی‌ترین دوره‌ی رشدی مراحل لاروی و شفیرگی و کمترین میزان زادآوری و باروری *T. castaneum* روی رقم گوهر مشاهده شد. کمترین میزان شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای سن چهارم شپشه قرمز آرد در ارقام گوهر و ندا به دست آمد. لاروهای سن چهارم روی رقم هاشمی، دم سیاه، علی کاظمی و گیلانه بیشترین میزان فعالیت آنزیم آمیلولیتیک را داشتند، درحالی‌که کمترین میزان فعالیت آنزیم روی رقم گوهر بود. همچنین بیشترین و کمترین میزان فعالیت پروتئولیتیک لاروهای سن چهارم به ترتیب روی ارقام خزر و هاشمی بود. تجزیه همبستگی نشان داد که در اغلب موارد بین پارامترهای زیستی و تغذیه‌ای آفت و میزان نشاسته و پروتئین ارقام مورد بررسی، همبستگی بالایی وجود داشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ارقام دم سیاه، هاشمی و علی کاظمی به عنوان ارقام حساس و سایر ارقام آزمایش شده (به ویژه رقم گوهر) به عنوان ارقام مقاوم در برابر *T. castaneum* هستند.

واژه‌های کلیدی: شپشه قرمز آرد، ارقام برنج، شاخص‌های تغذیه‌ای، آنزیم‌های گوارشی.

Abstract

Tribolium castaneum (Herbest) (Coleoptera: Tenebrionidae) is an important pest of stored products in Iran and some other areas of the world. In this study, life history, feeding indices and digestive enzymes activity of *T. castaneum* on eight rice cultivars (Ali-Kazemi, Dom-Siah, Fajr, Gilaneh, Gohar, Hashemi, Khazar, and Neda) were studied at $30 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity of $65 \pm 5\%$, and darkness conditions. A delay in the developmental time of *T. castaneum* was detected on cultivar Gohar. The lowest fecundity and egg fertility were observed on cultivar Gohar. Feeding indices of fourth instar larvae were the lowest on cultivars Gohar and Neda. The amylolytic activity of fourth instar was the highest on cultivars Hashemi, Dom-Siah, Ali-Kazemi and Gilaneh, and the lowest on cultivar Gohar. Also, the highest and lowest proteolytic activities of fourth instar were on cultivars Khazar and Hashemi, respectively. Correlation analysis showed high correlations existed, in most cases, between tested parameters of the pest on one side and starch and protein value of examined cultivars on the other. The results of cluster analysis indicated that DomSiah, Hashemi and Ali-Kazemi are susceptible cultivars, and other tested cultivars, especially Gohar, are resistant cultivars for feeding of *T. castaneum*.

Key words: Red flour beetle; rice cultivars; nutritional indices; digestive enzymes.



University of Mohaghegh Ardabil

Final Report of Research Project

Title

Effect of some rice cultivars on biology, feeding indices and digestive proteolytic and amylolytic activity of *Tribolium castaneum* (Herbest) (Coleoptera: Tenebrionidae)

Researcher: Dr. Bahram Naseri

Co-researcher: Shadi Majd Marani

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources

This Research Project Has Been Financially Supported by the Office of Vice Chancellor for Research

Spring 2020

فصل اول

مقدمه و هدف

غلات، مهم‌ترین منبع غذایی برای انسان و بسیاری از حیوانات در سراسر جهان می‌باشد. غلات اصلی شامل گندم، ذرت، برنج، جو، سورگوم، ارزن، چاودار، و جو دوسر می‌باشد که حدود ۶۰ درصد از محصولات کشت شده در جهان را به خود اختصاص داده‌اند. غلات از نظر محتوای پروتئینی و کربوهیدرات‌هایی مانند نشاسته دارای ارزش و اهمیت بالای غذایی می‌باشند. گندم، ذرت و برنج از عمده‌ترین غلات کشت شده در جهان می‌باشند (فائو^۱، ۲۰۱۲).

برنج (*Oryza sativa* L.) گیاهی از تیره‌ی گندمیان^۲ و تک‌لپه‌ای بوده و غنی از نشاسته می‌باشد (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۶). این گیاه پس از گندم مهم‌ترین گیاه زراعی جهان و از تامین‌کننده‌های مهم غذا در دنیا است (رئیس‌ی و همکاران، ۱۳۹۶). سابقه کشت و کار برنج در کشورهای چین و هند به حدود ۵۰۰۰ سال و در کشور ایران به حدود ۲۰۰۰ سال قبل برمی‌گردد (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۶). در کشورهای در حال توسعه، برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تامین می‌کند (پارک^۳ و همکاران، ۲۰۱۵). در ایران بیش‌ترین میزان تولید برنج در استان‌های گیلان و مازندران می‌باشد (حسن نتاج و همکاران، ۱۳۹۲).

برآوردها نشان می‌دهد که ۵-۱۰ درصد دانه‌های انبارشده در دنیا توسط آفات انباری متعدد مورد حمله قرار می‌گیرند. این تلفات در نواحی گرمسیری که دما و رطوبت در طول فصل تابستان بالاست، تا ۵۰ درصد هم می‌رسد (مقصود^۴ و همکاران، ۱۹۸۸؛ احمد و احمد^۵، ۲۰۰۲). شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (Herbest) یک آفت جهانی و مهم غلات انباری می‌باشد. افراد بالغ و لاروهای *T. castaneum* علاوه بر غلات، از میوه‌های خشک، سبوس، چرم، پوست و آرد نیز تغذیه می‌کنند (اتوال^۶، ۱۹۷۶؛ حامد و ختاک^۷، ۱۹۸۵؛ ختاک و همکاران، ۱۹۹۹؛ دارس^۸ و همکاران، ۲۰۰۱). در صورت آلودگی شدید، آردها زرد و کپک زده شده، بوی نامطبوع و تندی پیدا می‌کنند که برای مصرف انسان مناسب نیستند (اتوال، ۱۹۷۶). خسارت شپشه‌ی قرمز آرد از یک طرف و عدم توجه کافی به اصول نگهداری فرآورده‌های کشاورزی از طرف دیگر، زیان‌های کمی و کیفی بسیار جدی را به دنبال می‌آورد. در نتیجه، نه تنها ارزش تجاری و مرغوبیت محصولات انبار شده کاهش می‌یابد، بلکه گاهی مشکلات بهداشتی قابل توجهی را نیز در مصرف‌کنندگان این محصولات ایجاد می‌نماید (باقری زنونز، ۱۳۷۵). کشاورزان برای کنترل خسارت ناشی از آفات

¹ FAO

² Graminae

³ Park

⁴ Magsood

⁵ Ahmad and Ahmad

⁶ Atwal

⁷ Hamed and Khattak

⁸ Dars

انباری از آفت‌کش‌های شیمیایی نظیر متیل بروماید و فسفین استفاده می‌کنند. امروزه به‌دلیل آگاهی از خطرات ناشی از کاربرد بی‌رویه آفت‌کش‌ها و اثرات باقیمانده‌ی آنها در محصولات کشاورزی و آب‌های زیرزمینی و همچنین اثر سوء برای کسانی که در معرض سمپاشی هستند، سیاست جاری سیاست‌گذاران تولید غلات کشور، رسیدن به کشاورزی پایدار، خودکفایی در تولید غلات و کاهش سطوح مبارزه شیمیایی با آفات مزرعه‌ای و انباری غلات می‌باشد.

در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM)، مبارزه‌ی شیمیایی، فقط یکی از ابزارهای مورد استفاده است که در کنار روش‌های دیگر کنترل مانند کنترل بیولوژیکی و زراعی می‌تواند به کنترل ایمن‌تر و کم‌هزینه‌تر آفت کمک نماید (آلونسو^۱، ۲۰۰۹؛ دل‌پینو^۲ و همکاران، ۲۰۱۱). استفاده از ارقام مقاوم به آفات، یکی از راه‌های کنترل زراعی است که چشم‌انداز روشنی را پیش روی بشر قرار داده است. ارقام مقاوم با تأثیر روی مراحل زیستی آفت و یا ارتباط متقابل گیاه-آفت می‌توانند خسارت آفات را کاهش دهند (پاندا و خوش^۳، ۱۹۹۵). ارقام مقاوم که در مدیریت تلفیقی آفات همراه با دیگر روش‌های کنترل آفت مورد استفاده قرار می‌گیرند، از اجزای اساسی IPM می‌باشند و با استفاده از این ارقام می‌توان با کاهش شدت فشار اعمال شده توسط سموم شیمیایی علیه آفات، احتمال بروز مقاومت آفت نسبت به سموم شیمیایی را کاهش داد (پاندا و خوش، ۱۹۹۵). گیاهان واجد مقاومت آنتی‌بیوزی می‌توانند با کاهش بقای مراحل مختلف سنی، اندازه و شکل بدن، طول عمر حشرات کامل و تولیدمثل حشرات نسل بعد نقش مؤثری در کنترل حشرات آفت داشته باشند (دنت^۴، ۲۰۰۰؛ سرفراز^۵ و همکاران، ۲۰۰۶). توانایی حشرات در تکمیل هر چه سریعتر مراحل حساس قبل از بلوغ و رسیدن به مرحله‌ی تولید نتاج وابستگی زیادی به کیفیت و عناصر غذایی موجود در گیاهان میزبان دارد. بنابراین، ارقام دارای مقاومت نسبی بالا ممکن است اثربخشی سایر روش‌های کنترل آفت (از جمله کنترل بیولوژیک و کنترل شیمیایی) را از طریق کندکردن مراحل قبل از بلوغ و طولانی‌تر کردن زمان رسیدن به مرحله‌ی تولید نتاج افزایش دهند (زالوکی و ملکوم^۶، ۲۰۰۲). بنابراین، ارقام مقاوم گیاهی می‌توانند به عنوان مکمل کنترل بیولوژیک و شیمیایی در برنامه‌های IPM استفاده شوند. برخی از مطالعات انجام شده در مورد تأثیر غلات مختلف روی زیست‌شناسی آفات انباری نشان می‌دهد که تغییر در ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی غلات به طور معنی‌دار سبب تغییر نرخ رشد و زادآوری حشره می‌شود (برزویی و همکاران، ۲۰۱۵؛ گلی‌زاده و عابدی، ۲۰۱۶).

¹ Alonso

² Del pino

³ Panda and Khush

⁴ Dent

⁵ Sarfraz

⁶ Zalucki and Malcolm

یکی از روش‌های ارزیابی مقاومت گیاهان میزبان، مطالعه‌ی شاخص‌های تغذیه‌ای حشره روی ارقام مختلف با تعیین میزان رشد حشره، میزان غذای خورده شده و تاثیر آن روی نشوونمای حشره می‌باشد (هاینس و میلار^۱، ۱۹۹۸). میزان مصرف غذا توسط یک حشره گیاهخوار به کیفیت گیاه میزبان و میزان کارایی تغذیه‌ای آن حشره بستگی دارد. شاخص‌های تغذیه‌ای بیانگر وضعیت فیزیولوژیکی حشره و در راستای آن تأثیر ترکیبات گیاهی بر فیزیولوژی آنزیم‌های گوارشی آفت می‌باشند. ترکیبات شیمیایی ثانویه در گیاهان وجود دارند که می‌توانند علاوه بر تأثیر احتمالی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بر میزان کارایی تغذیه‌ای و رشد آفت نیز اثرگذار باشند، لذا مطالعه شاخص‌های تغذیه‌ای به طور قابل توجهی نشان‌دهنده خصوصیات تغذیه‌ای گیاهان میزبان برای حشره آفت می‌باشد که می‌تواند در برنامه‌های مدیریتی آفات مفید و قابل استفاده باشد.

با توجه به رفتار تغذیه‌ای حشرات، دستگاه گوارش آنها دچار تغییراتی در جهت سازگاری برای هضم غذا شده است. یکی از عوامل کلیدی در مقوله‌ی گوارش، آنزیم‌های گوارشی است. بنابراین نقش آنزیم‌ها در رابطه بین گیاه و حشره بسیار بااهمیت است. لذا در برنامه‌های کنترل آفات در بخش استفاده از ارقام مقاوم، نقش این مواد، حیاتی است. از این رو بررسی آنزیم‌های گوارشی به عنوان ابزاری جهت شناسایی توانایی این جانوران در آسیب‌رسانی به محصولات کشاورزی و نیز اتخاذ تصمیماتی در روش‌های متنوع مبارزه با آنها از جایگاه ارزشمندی برخوردار است. مطالعه واکنش-های حشرات آفت به متابولیت‌های ثانویه و مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی موجود در رژیم‌های غذایی مختلف و همچنین محتوای پروتئین و کربوهیدرات غذا به‌طور قابل توجهی نشان‌دهنده ویژگی‌های تغذیه‌ای گیاهان میزبان برای حشره آفت می‌باشد و می‌تواند در برنامه‌های مدیریتی آفت قابل استفاده باشد. امروزه هدف قراردادن آنزیم‌های گوارشی حشرات زیان‌آور توسط مهارکننده‌های پروتئینی طبیعی موجود در ارقام مقاوم یا گیاهان تراریخته‌ی مقاوم حاوی مهارکننده‌های مؤثر بدست آمده از گیاهان دیگر یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها در برنامه‌ی مدیریت تلفیقی آفات می‌باشد. در بین آنزیم‌های گوارشی مؤثر در هضم مواد غذایی، آمیلازها و پروتئازها مهمترین گروه آنزیم‌های گوارشی هستند که به‌ترتیب در هضم نشاسته و پروتئین گیاهی نقش دارند. آمیلاز گوارشی در حشراتی که از غلات تغذیه می‌کنند از اهمیت بسزایی برخوردار است (فرانکو^۲ و همکاران، ۲۰۰۲). اختلال در متابولیسم ریزمغذی‌ها با مهار هضم ماکرومولکول‌ها به عنوان یک هدف کلیدی برای استفاده در کنترل حشرات مدنظر بوده است (هیلدر^۳ و همکاران، ۱۹۹۲).

¹ Haynes and Millar

² Franco

³ Hilder

با عنایت به این که تاکنون تحقیقات قابل توجهی در مورد ویژگی‌های زیستی، شاخص‌های تغذیه‌ای و آنزیم‌های گوارشی شپشه‌ی قرمز آرد روی ارقام مختلف برنج صورت نگرفته و به دلیل اهمیت این آفت از نظر ایجاد خسارت اقتصادی شدید روی محصولات انباری، بررسی‌های انجام شده در این زمینه می‌تواند به شناسایی ارقام مقاوم کمک کند تا بتوان با استفاده از ویژگی‌های مقاومت این گیاهان و انتقال آن به گیاهان حساس نیاز به کاربرد روش‌های کنترل شیمیایی را محدودتر نمود.

۲-۱- اهداف تحقیق

- بررسی ویژگی‌های زیستی *T. castaneum* روی ارقام مختلف برنج
- بررسی شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای *T. castaneum* در واکنش به تغذیه از ارقام مختلف برنج
- بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز لاروهای *T. castaneum* در واکنش به تغذیه از ارقام

مختلف برنج

فصل دوم

مبانی و پیشینه تحقیق

۲-۱- شپشه‌ی قرمز آرد *T. castaneum*

۲-۱-۱- جایگاه شپشه‌ی قرمز آرد در رده بندی حشرات (برور^۱ و همکاران، ۲۰۰۵):

Class: Insecta

Sub class: Pterygota

Order: Coleoptera

Family: Tenebrionidae

Genus: *Tribolium*

Species: *T. castaneum* (Herbst), 1898

۲-۱-۲- مناطق انتشار شپشه‌ی قرمز آرد

شپشه‌ی قرمز آرد دارای پراکنش جغرافیایی بسیار وسیع در نواحی گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل جهان است که خسارت اقتصادی قابل توجهی را به دانه های انبارشده و فرآورده‌های حاصل از آنها وارد می‌کند. براساس برخی از شواهد، موطن اصلی این آفت سودان، هندوستان و یا استرالیا بوده، که از آنجا به اروپا و امریکا و سپس به تمام نقاط جهان انتشار یافته است (ساد^۲، ۱۹۷۸؛ اسمیت و ویتمن^۳، ۱۹۹۲).

۲-۱-۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی شپشه‌ی قرمز آرد

تخم‌ها به شکل بیضی کشیده و به طول ۰/۳۵ تا ۰/۶۱ میلی‌متر است که در ابتدا سفید شفاف هستند. لاروها پس از خروج از تخم به رنگ کرمی یا زرد بوده و دارای بدن باریک و کشیده و سه جفت پای سینه ای می‌باشند. سر لاروها به رنگ قهوه‌ای و آخرین حلقه‌ی بدن دارای یک جفت استتاله خار مانند به رنگ قهوه‌ای تیره می باشد (لیون^۴، ۲۰۰۰). شفیره‌ها به رنگ سفید و به طول ۳/۵ تا ۴ میلی‌متر می‌باشند (کومار^۵، ۲۰۱۲). حشره کامل سوسک کوچکی به طول ۳/۵ تا ۴ میلیمتر و به رنگ قهوه‌ای قرمز تا قهوه‌ای تیره می‌باشد. سر نیمه‌کروی و در قسمت جلو دارای لبه پهن و گسترده به نام شاپرون سفالیک است که روی قطعات دهانی را می‌پوشاند و تا نصف چشم‌های مرکب پیشروی می‌کند. شاخک‌ها کوتاه، ۱۱ بندی و سه بند انتهایی آن پهن شده است. صفحه پشت سینه تقریباً به شکل مربع است و در

¹ Borror

² Saad

³ Smith and Whitman

⁴ Lyon

⁵ Kumar

قسمت بالا عریض تر از قسمت پائین می باشد و روی آن از نقاط مدور فرو رفته نامنظم کوچک پوشیده شده است. بالپوش ها در قسمت پائین تقریباً نیم دایره بوده و دارای خطوط موازی و برجسته هستند که این خطوط در کناره های خارجی نمایان تر است. پاها به رنگ بدن، پنجه های جلو و وسطی هر یک ۵ مفصلی و پنجه های پاهای عقبی ۴ مفصلی است (بی نام^۱، ۱۹۸۶).

۴-۱-۲- اهمیت اقتصادی و دامنه ی میزبانی شپشه ی قرمز آرد

این گونه از مهمترین آفات آرد و مواد نشاسته ای محسوب می شوند با این حال علاوه بر آرد، از بلغور، سبوس و دانه های بادام زمینی، کرچک، کنجد، کتان، کاکائو، بذور مختلف و میوه های خشک نیز تغذیه می کنند. لاروهای این حشره قادر به تغذیه از دانه های سالم جو و گندم نیستند ولی می توانند از دانه های شکسته غلات و یا دانه هایی که قبلاً توسط سایر آفات مورد تغذیه قرار گرفته اند تغذیه کنند. هر لارو روزانه معادل هم وزن خود آرد می خورد و با فضولات و پوسته های خود آن را آلوده می کند و از این جهت ارزش نانوائی آرد پائین آمده و در صورت آلودگی شدید و فراوانی فضولات، آرد تلخ و بوی نامطبوع از آن استشمام می شود (گود^۲، ۱۹۳۶).

۵-۱-۲- زیست شناسی شپشه ی قرمز آرد

شپشه ی قرمز آرد زمستان را در مناطق سرد به صورت حشره کامل سپری کرده، ولی در مناطق گرم و معتدل تمام سال را بدون وقفه به فعالیت می پردازد. عمر حشرات کامل طولانی بوده و از ۵۵/۵ روز تا یک سال متغیر است. حشره کامل ماده در طول زندگی خود به طور متوسط ۳۰۰ تا ۴۰۰ عدد تخم می گذارد. تخم ها روزانه به تعداد ۲ تا ۱۸ عدد و به صورت انفرادی در داخل آرد و یا سایر مواد انبار شده گذارده می شوند. چون تخم ها با ماده لزجی احاطه شده اند، لذا مقداری آرد به آنها چسبیده و بزرگتر جلوه می کنند. تخم ها اغلب به جدار ظروف و کیسه ی آرد چسبیده، و از این طریق از جایی به جای دیگر منتقل می شوند. بسته به دما و رطوبت محیط، تخم ها در مدت ۳ تا ۶ روز تفریح می شوند. لاروها بلافاصله بعد خروج از تخم، شروع به تغذیه می کنند. دوره ی نشوونمای لارو بر حسب دمای محیط تغییر می نماید، به طوری که در دمای ۳۰ درجه ی سلسیوس ۱۳ تا ۱۴ روز و در دماهای پائین تر ممکن است تا ۴ ماه به طول بیانجامد. دوره ی شفیرگی ۶ تا ۸ روز است سپس حشرات کامل خارج می شوند. تعداد نسل در سال نیز بسته به دمای

¹ Anonymous

² Good

محیط‌های مختلف متغیر است. به‌عنوان مثال، در آب و هوای معتدل و گرم تا ۹ نسل، اما در آب و هوای معتدل و سرد ۳ تا ۴ نسل نوسان دارد (گود، ۱۹۳۶؛ باقری زنوز، ۱۳۷۵؛ کومار^۱، ۲۰۱۲).

۶-۱-۲- روش‌های کنترل شپشه‌ی قرمز آرد

۱-۶-۱-۲- روش شیمیایی

در گذشته برای کنترل شیمیایی *T. castaneum* از سموم گازی مختلف مانند متیل برماید و فستوکسین استفاده می‌شد. با توجه به اینکه این حشره مقاومت بالایی نسبت به این سموم دارد، تولیدکنندگان محصولات کشاورزی ناگزیر به استفاده از دزهای بالاتر سموم برای کنترل موثرتر این آفت بودند. همین مسئله منجر به بروز سریع‌تر مقاومت در آفت و آلودگی بیش‌تر محصولات شده است (جود^۲ و همکاران، ۱۹۹۶).

۲-۱-۶-۲- روش‌های غیر شیمیایی

۱-۶-۲-۱- استفاده از ارقام مقاوم

براساس تعریف پینتر^۳ (۱۹۵۱)، رقم مقاوم رقمی است که در شرایط محیطی یکسان و به‌طور ژنتیکی در مقایسه با ارقام معمولی کمتر مورد خسارت آفت قرار گرفته و محصولی بیشتر و با کیفیت بالاتر تولید کند. بنابراین مقاومت امری نسبی بوده و در مقایسه با سایر رقم‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (اسمیت^۴ و همکاران، ۱۹۹۴). ارقام مقاوم که در مدیریت تلفیقی آفات همراه با دیگر روش‌های کنترل آفت مورد استفاده قرار می‌گیرند، از اجزای اساسی مدیریت تلفیقی آفات (IPM) محسوب می‌شوند و با استفاده از این ارقام می‌توان از شدت فشار اعمال شده توسط سموم شیمیایی علیه آفات کاست و بدین ترتیب احتمال بروز مقاومت توسط آفت نسبت به سموم شیمیایی را کاهش داد (پاندا و خوش، ۱۹۹۵). گیاهان واجد مکانیزم آنتی‌بیوزی می‌توانند با کاهش نرخ بقای مراحل مختلف رشدی، اندازه و وزن بدن، طول عمر حشرات کامل و زادآوری حشرات نسل بعد و یا تأثیر غیرمستقیم از طریق افزایش احتمال قرارگیری حشرات در معرض دشمنان طبیعی با طولانی‌تر کردن مراحل رشدی قبل از بلوغ، نقش مؤثری در کنترل حشرات آفت داشته باشند (دنت، ۲۰۰۰؛ سرفراز و همکاران، ۲۰۰۶). توانایی حشرات در تکمیل هر چه سریع‌تر مراحل حساس نابالغ و رسیدن به مرحله‌ی بلوغ، وابستگی زیادی به ریزمغذی‌های موجود در گیاهان میزبان دارد. بنابراین، ارقام دارای مقاومت نسبی بالا ممکن است اثربخشی سایر روش‌های کنترل آفت از جمله استفاده از دشمنان طبیعی و

¹ Kumar

² Jood

³ Painter

⁴ Smith

حشره‌کش‌ها را افزایش دهند (زالوکی و ملکوم^۱، ۲۰۰۲). بنابراین، ارقام مقاوم گیاهی می‌توانند به عنوان مکمل کنترل بیولوژیک و شیمیایی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات استفاده شوند. با توجه به خسارت زیادی که همه ساله به وسیله حشرات به محصولات کشاورزی در سطح جهانی وارد می‌شود، تهیه ارقام مقاوم علیرغم زمان طولانی و هزینه‌ی اولیه نسبتاً زیاد، روشی تقریباً مطمئن و در دراز مدت به صرفه می‌باشد (هنریش^۲ و همکاران، ۱۹۸۵). لذا ارقام مقاوم گیاهی به عنوان یکی از ابزارهای کارآمد در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به شمار می‌رود.

۲-۲-۶-۱-۲- شاخص‌های تغذیه‌ای

تغذیه عبارتست از کلیه‌ی مواد شیمیایی که یک موجود زنده برای رشد، توسعه‌ی بافت‌ها، تولیدمثل و تامین انرژی بدن خود نیاز دارد (سیفی، ۱۳۹۴). اگرچه حشرات قادر به سنتز برخی از این مواد شیمیایی هستند ولی بیشتر آن‌ها را از طریق خوردن مواد غذایی کسب می‌نمایند (چاپمن^۳، ۱۹۹۸). نوع و میزان عناصر غذایی گیاه، ترکیبات شیمیایی ثانوی گیاه و توانایی هضم و جذب غذای خورده شده توسط حشره از جمله عواملی هستند که مطلوبیت گیاه میزبان را برای تغذیه، رشد و ایجاد جمعیت نسل بعد توسط حشره‌ی آفت تحت تأثیر قرار می‌دهند (اسکرایبر و اسلانسکی^۴، ۱۹۸۱). مطالعات نشان داده است که در اثر تغییر کیفیت غذا میزان نشو و نمای حشرات نیز به طور قابل توجهی تغییر می‌کند (مارتین و پولین^۵، ۲۰۰۴). کیفیت مواد غذایی و میزان بازدهی حشره‌ی آفت رابطه‌ی مستقیمی با میزان غذای خورده شده توسط آن آفت دارد.

۲-۲-۶-۱-۲- آنزیم‌های گوارشی حشرات

بخش مهمی از غذای حشرات را پلی‌ساکاریدها، لیپیدها و پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند که به ترتیب توسط آنزیم‌های کربوهیدراز، لیپاز و پروتئاز هیدرولیز می‌شوند (چپمن^۶، ۱۹۹۸). آگاهی از سیستم هضم و جذب غذا در حشرات گیاهخوار، در اتخاذ روش‌های مدیریتی آنها مبتنی بر هدف قرار دادن آنزیم‌های گوارشی امری ضروری است (نیشن^۷، ۲۰۰۱). نشاسته پلی‌ساکارید اصلی ذخیره‌ای در گیاهان و و گلیکوژن پلی‌ساکارید اصلی ذخیره‌ای در حشرات می‌باشد که توسط آنزیم‌های آمیلاز هضم می‌شوند. کربوهیدرات‌های موجود در رژیم‌های غذایی مختلف، اغلب به صورت پلی‌ساکارید و دی‌ساکارید می‌باشند، این در حالی است که کربوهیدرات‌ها فقط به شکل مونوساکارید جذب

¹ Zalucki and Malcolm

² Heinrichs

³ Chapman

⁴ Scriber and Slansky

⁵ Martin and Pulin

⁶ Chapman

⁷ Nation

می‌شوند (چپمن، ۱۹۹۸). منبع غذایی مورد تغذیه حشرات رابطه مستقیمی با میزان فعالیت آمیلازها در سیستم گوارشی آن‌ها دارد (استروبل^۱ و همکاران، ۱۹۹۸).

آنزیم‌هایی که مسئولیت هیدرولیز کامل پروتئین‌ها و تبدیل آن‌ها به اسیدآمینو را دارند، پروتئازها می‌باشند که روی باندهای پپتیدی عمل کرده و خود شامل پروتئینازها (اندوپپتیداز) و اگزوپپتیدازها می‌باشند. پروتئینازها براساس مکانیسم‌های کاتالیکی به دو گروه اندوپروتئاز (اندوپپتیداز) و اگزوپروتئاز (اگزوپپتیداز) تقسیم می‌شوند و شناسایی آن‌ها به وسیله‌ی معرف‌های خاص می‌باشد (بارت^۲، ۱۹۸۲؛ پائولیلو^۳ و همکاران، ۲۰۰۰).

۲-۲- مروری بر تحقیقات گذشته

تأثیر برخی از هیبریدهای ذرت روی شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیم‌های گوارشی *T. castaneum* توسط عباس زاده (۱۳۹۶) بررسی شد. این پژوهشگر کمترین فعالیت پروتئولیتیک و آمیلولیتیک لاروهای سن چهارم را به ترتیب روی هیبریدهای AR89 و BC676 گزارش نمود. همچنین، کمترین کارایی تبدیل غذای خورده شده‌ی لاروها و حشرات کامل را به ترتیب روی هیبریدهای AS77 و SC703 گزارش نمود.

شفیق^۴ و همکاران (۲۰۰۶) ترجیح تغذیه‌ای و طول دوره‌ی نشوونمای شپشه‌ی قرمز آرد را روی فرآورده‌های گندم بررسی و گزارش کردند که ترجیح تغذیه‌ای این حشره روی گندم خشک و گرمادیده کمتر است. همچنین طولانی‌ترین و کوتاهترین دوره‌ی قبل از بلوغ را به ترتیب از روی گندم خشک و گرمادیده (۷۰ روز) و آرد درجه‌ی ۲ (۲۴ روز) گزارش کردند. خان^۵ (۲۰۱۱) تأثیر مهارکنندگی آلفا آمیلاز پروتئینی نخودفرنگی، لوبیا قرمز، ذرت، گندم و ارزن را در شرایط آزمایشگاهی روی *T. castaneum* بررسی و مشاهده کردند که از میان پنج نمونه مورد آزمایش، گندم، ذرت و ارزن دارای خاصیت مهارکنندگی بالایی روی فعالیت آلفا-آمیلاز *T. castaneum* بودند.

فابرس^۶ و همکاران (۲۰۱۴) دوره‌ی زیستی و فیزیولوژی گوارشی *T. castaneum* را در تغذیه از رژیم‌های گیاهی مختلف (شامل آرد گندم، لوبیا و نخود) ارزیابی و گزارش کردند که تغییرات در مواد مغذی موجود در رژیم غذایی می‌تواند بر زیست‌شناسی و فیزیولوژی تغذیه‌ای حشره تأثیر گذار باشد. نتایج به دست آمده توسط این محققان نشان داد که بقا و اندازه لاروها پس از تغذیه از لوبیا به شدت کاهش یافت، اما لاروهای تغذیه شده روی گندم بیشترین بقا و

¹ Strobl

² Barrett

³ Paulillo

⁴ Shafique

⁵ Khan

⁶ Fabres

وزن لاروی را داشتند. خرد پیر^۱ (۲۰۱۴) ترجیح تغذیه‌ای شپشه‌ی قرمز آرد را روی آرد گندم، برنج، ذرت و آرد سیب زمینی مطالعه و بیشترین و کمترین ترجیح حشره را به ترتیب از روی آرد گندم و سیب زمینی گزارش کرد. در این پژوهش، طولانی‌ترین و کوتاه‌ترین دوری لاروی مربوط به حشرات تغذیه کرده روی آرد سیب زمینی (۴۳/۷۲ روز) و آرد گندم (۳۲/۶۳ روز) بود.

ساقیر^۲ و همکاران (۲۰۱۴) شاخص‌های تغذیه‌ای *T. castaneum* را روی آرد گندم، ذرت و جو بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که بیشترین شاخص مصرف و نرخ رشد نسبی روی آرد ذرت و کمترین آن روی آرد جو بود. همچنین، بیشترین و کمترین کارایی تبدیل غذای خورده شده به ترتیب روی آرد جو و ذرت مشاهده شد. یافته‌های ایشان نشان داد که جو نامناسب‌ترین میزبان برای تغذیه‌ی این حشره می‌باشد. برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی شپشه‌ی قرمز آرد توسط عصمتی (۱۳۹۴) بررسی شد. نتایج این پژوهشگر نشان داد که بیشترین فعالیت آمیلاز در دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس و در اسیدیته‌ی ۵ می‌باشد. ناصری و همکاران (۲۰۱۷) شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیم‌های گوارشی شپشه‌ی قرمز آرد را روی رژیم‌های غذایی مختلف بررسی کردند. این پژوهشگران کمترین کارایی تبدیل غذای خورده شده را روی سویا، و بیشترین کارایی را روی غذای مصنوعی و ذرت مشاهده نمودند. همچنین، کمترین فعالیت پروتئولیتیک و آمیلولیتیک را روی ارزن، گندم و ذرت گزارش کردند.

رحیمی نمین و همکاران (۲۰۱۸) تاثیر ارقام مختلف جو را روی ویژگی‌های زیستی *T. castaneum* مطالعه و گزارش کردند که ارقام ماکویی و فجر ۳۰ با طولانی‌تر کردن دوره‌ی لاروی و دوره‌ی لاروی-شفیرگی و کاهش میزان زادآوری و باروری حشره جزء ارقام نامناسب برای رشدونمو این آفت هستند. همچنین، این محققان در تحقیقی دیگر تأثیر ارقام مختلف جو را روی فیزیولوژی تغذیه‌ای *T. castaneum* بررسی و اظهار داشتند که در بین ارقام مورد آزمایش، بیشترین میزان غذای خورده شده و نرخ رشد حشره روی رقم لوت بوده و این رقم برای تغذیه آفت مناسب می‌باشد (رحیمی نمین و همکاران، ۲۰۱۹).

¹ Kheradpir

² Sagheer

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱- تهیه‌ی میزبان

به منظور پرورش *T. castaneum*، ارقام مختلف برنج شامل دم سیاه، خزر، فجر، هاشمی، گیلانه، علی کاظمی، ندا و گوهر از موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور (استان گیلان) تهیه و برای تغذیه‌ی این آفت استفاده شدند. این ارقام جزو ارقام تجاری برنج در ایران محسوب می‌شوند. بذور ارقام مختلف برنج به مدت یک هفته در دمای ۱۵- درجه سلسیوس نگهداری شدند، سپس به دمای ۴ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از این مدت، بذور به طور کامل آسیاب شدند و قبل از شروع آزمایش به مدت دو هفته در دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس قرار داده شدند (هنریش و همکاران، ۱۹۸۴).

۳-۲- پرورش آزمایشگاهی *T. castaneum*

به منظور پرورش *T. castaneum* در آزمایشگاه، حشرات کامل آفت از کلنی آزمایشگاهی پرورش یافته روی غذای مصنوعی (مخلوط ۶۰ درصد آرد گندم، ۳۰ درصد سیبوس گندم و ۱۰ درصد مخمر) واقع در آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه محقق اردبیلی تهیه و سپس روی دانه‌های شکسته‌ی ارقام برنج در ظروف پلاستیکی (قطر ۱۵ و ارتفاع ۶ سانتی‌متر) به مدت دو نسل پرورش داده شدند. این ظروف در اتاقک پرورش با دمای 30 ± 1 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و در شرایط تاریکی کامل نگهداری شدند. حشرات کامل نر و ماده (۱ تا ۵ روزه) نیز برای تخم‌گیری به ظروف پلاستیکی (طول ۱۸، عرض ۱۲، ارتفاع ۶ سانتی‌متر) که توسط یک توری جهت تهویه پوشانده شده بودند منتقل شده و لاروهای سن اول روزانه از ظروف پتری جمع‌آوری و برای شروع آزمایش‌ها استفاده شدند.

۳-۳- بررسی ویژگی‌های زیستی *T. castaneum* روی ارقام مختلف برنج

در این مرحله مقدار یک گرم از هر یک از ارقام برنج داخل پتری‌های ۶ سانتی‌متری که بالای آن سوراخ و با توری حریر مسدود شده بود، قرار داده شدند. داخل هر ظرف پتری یک عدد لارو سن یک (یک روزه) قرار داده و درب ظرف با پارافیلیم محکم بسته شد. تمامی ظروف در دمای 30 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و در شرایط تاریکی کامل نگهداری شدند. بازدید از ظروف به طور روزانه انجام و طول دوره لاروی و شفیرگی به همراه مرگ و میر آن‌ها ثبت شدند. پس از ظهور حشرات کامل، یک حشره نر (۲۵-۱۸ تکرار) و یک حشره ماده (۲۷-۱۷ تکرار) درون ظرف پتری (۶ سانتی‌متری) حاوی یک گرم آرد از هر رقم با یکدیگر جفت شدند. هر پنج روز یک‌بار جفت‌های بالغ به ظروف جدید محتوی رقم برنج مورد نظر منتقل شدند.

۳-۴- بررسی زادآوری و باروری *T. castaneum* روی ارقام مختلف برنج

برای تعیین زادآوری (تعداد تخم‌های گذاشته شده) *T. castaneum*، یک عدد حشره‌ی نر و یک عدد حشره‌ی ماده درون یک ظرف پتری با ۰/۳ گرم از بذور آسیاب شده هر رقم قرار داده شدند. برای تعیین باروری (درصد تخم‌های تفریخ شده)، تخم‌های گذاشته شده به مدت ۲۰ روز در شرایط پرورش ذکر شده در بالا نگهداری و تعداد لاروهای خارج شده از تخم شمارش شدند. آزمایش‌ها تا زمان مرگ آخرین فرد نر و ماده ادامه یافت.

۵-۳- شاخص‌های تغذیه‌ای *T. castaneum*

به منظور تعیین شاخص‌های تغذیه‌ای *T. castaneum* به ازای هر رقم، تعداد ۷۰ عدد لارو سن چهارم یک روزه (در هفت گروه ۱۰ عددی) داخل ظروف پتری ۶ سانتی متری پرورش داده شدند. بدین منظور وزن لاروها قبل و بعد از تغذیه، وزن غذای داده شده و وزن غذای باقی مانده در انتهای آزمایش تعیین شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به منظور تعیین وزن خشک، نمونه‌های دیگری از لاروها و رقم‌های مورد آزمایش همزمان با انجام آزمایش اصلی، انتخاب و بعد از توزین اولیه، در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک شده و وزن خشک آن‌ها به دست آمد. شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای *T. castaneum* روی ارقام مختلف برنج با استفاده از فرمول‌های ارائه شده توسط والدبائور^۱ (۱۹۶۸) محاسبه شدند:

بازدهی تبدیل غذای خورده شده (Efficiency of conversion of ingested food (ECI)

$$ECI = \frac{P}{E}$$

نرخ مصرف نسبی (Relative consumption rate (RCR)

$$RCR = \frac{E}{A * T}$$

نرخ رشد نسبی (Relative growth rate (RGR)

$$RGR = \frac{P}{A * T}$$

E = وزن غذای خورده شده

P = افزایش وزن لارو طی ۷ روز

A = اختلاف وزن اولیه و نهایی لارو

¹ Waldbaur

T = مدت زمان تغذیه (روز)

۳-۶- تهیهی بافر و عصاره آنزیمی از روده میانی لارو *T. castaneum*

به منظور تعیین اسیدیتتهی مناسب برای فعالیت‌های آنزیمی از بافر استات-سدیم هیدروکسید ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد که دامنه‌ی وسیعی از اسیدیتته‌های اسیدی و قلیایی (۲ تا ۱۲) را شامل می‌شود (ناصری و همکاران، ۲۰۱۷). سپس از بافر مذکور با اسیدیتته‌ی ۵ به منظور بررسی فعالیت‌های پروتئولیتیک و آمیلولیتیک شیشه‌ی قرمز آرد استفاده شد. پس از تغذیه لاروهای *T. castaneum* از ارقام مختلف برنج، لارو سن چهارم ابتدا روی یخ بی‌حس شده و سپس با اسکارپل سر حشره قطع شد. پس از آن با کمک دو پنس در انتهای بدن خراش ایجاد کرده و یک پنس از ناحیه‌ی سر و یکی از ناحیه‌ی انتهای بدن گرفته و روده‌ی میانی بیرون کشیده شد. سپس روده‌ی میانی لارو با استفاده از یک هموژنایزر شیشه‌ای دستی روی یخ همگن شد. مخلوط‌های همگن به دست آمده در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت (xg) ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. روشین‌های حاصل به میکروتیوب‌های جدید منتقل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای استفاده‌های بعدی نگهداری شدند.

۳-۷- بررسی فعالیت آمیلولیتیک گوارشی لارو *T. castaneum* روی ارقام مختلف برنج

برای سنجش فعالیت آمیلاز، هر واحد آزمایشی شامل ۵۰۰ میکرولیتر بافر با اسیدیتته‌ی بهینه (اسیدیتته‌ی ۵)، ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی و ۴۰ میکرولیتر نشاسته‌ی ۱ درصد بود. بعد از ۳۰ دقیقه واکنش در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس، به آن ۱۰۰ میکرولیتر معرف رنگی DNSA (۳ و ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید) اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی در دمای ۸۵ تا ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در (xg) ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس، جذب هر کدام در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین شد. این آزمایش در سه تکرار انجام و به ازای هر تکرار یک بلانک در نظر گرفته شد (برنفلد^۱، ۱۹۵۵).

۳-۸- بررسی فعالیت پروتئولیتیک گوارشی لارو *T. castaneum* روی ارقام مختلف برنج

برای سنجش فعالیت پروتئازی عصاره روده‌ی میانی لارو *T. castaneum*، در اسیدیتته‌ی بهینه، زیرنهشت (سوبسترای) آزوکازئین بر مبنای کار الپیدینا^۲ و همکاران (۲۰۰۱) با کمی تغییر مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۸۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱/۵ درصد در بافر استات-سدیم هیدروکسید و ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی بود که به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. هضم پروتئینی با اضافه کردن ۱۰۰

¹ Bernfeld

² Elpidina