

تأثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر چند فراسنج زیستی و فیزیولوژیک کرم غوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* (Hübner, ۱۸۰۸) (Lepidopter: Noctuidae)

سیده سنا نجات^۱، رضا فرشباغ پورآباد^{۲*} و شببم عاشوری^۳

۱- دانشجوی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۳- پژوهشگر فرادکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

*مسئول مکاتبه rfpourabad@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۷

چکیده

در این مطالعه، تأثیر چهار رژیم غذایی مصنوعی حاوی آرد لوبیا چشم‌بلبلی، لوبیا قرمز، لوبیا سفید و ذرت بر تغییرات میزان پروتئین کل لاروهای سن چهارم، روده‌ها و اجسام چربی لاروهای سنین پنجم و ششم و پیش‌سفیره‌ها و نیز پروتئین کل سفیره‌ها و همچنین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پکتیناز گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner مورد مطالعه قرار گرفت. الگوهای پروتئینی با الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید و اسرشت‌گر نیز مقایسه شدند. براساس نتایج به دست آمده، کم‌ترین میزان پروتئین در تمام بدن لاروهای سن چهارم و روده و اجسام چربی لاروهای سن پنجم در رژیم حاوی ذرت و بیش‌ترین میزان آن در رژیم حاوی لوبیا سفید بود. حشرات پرورش یافته روی رژیم حاوی ذرت در مدت آزمایش وارد سن ششم لاروی نشدند. به غیر از پروتئین اجسام چربی لارو سن ششم، در بقیه‌ی تیمارهای سنین ششم و پیش‌سفیره، تفاوت معنی‌داری در رژیم‌های مختلف مشاهده نشد. کم‌ترین میزان پروتئین سفیره، در رژیم حاوی لوبیا قرمز و بیش‌ترین میزان آن در رژیم حاوی لوبیا سفید مشاهده شد. با توجه به کاهش پروتئین در رژیم‌های مختلف، وزن لاروها و فعالیت آلفا-آمیلاز و پکتیناز گوارشی نیز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار گرفت. کم‌ترین وزن لاروها و فعالیت آنزیم‌های مذکور در رژیم حاوی ذرت ثبت شد. کاهش یا افزایش میزان پروتئین در آزمایش‌ها، در تصاویر مربوط به ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید نیز قابل مشاهده بود. در کل، رژیم‌های غذایی مصنوعی حاوی ذرت و لوبیا قرمز رژیم مناسبی برای پرورش این حشره نبودند ولی رژیم‌های حاوی لوبیا سفید و لوبیا چشم‌بلبلی رژیم مناسبی برای این حشره گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های گوارشی، الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید و اسرشت‌گر، پروتئین، رژیم غذایی مصنوعی، *Helicoverpa armigera*.

مقدمه

حشره‌کش‌ها باعث شده که این حشره از مهم‌ترین آفات محصولات کشاورزی به‌شمار آید (Fitt, 1989). نیازهای غذایی حشرات بسته به گونه و شرایط فیزیولوژیک آن‌ها به شدت متغیر هستند. بسیاری از حشرات رژیم‌های غذایی را انتخاب می‌کنند که ترکیبات مغذی مورد نیاز در آن‌ها دارای یک تعادل بهینه است (یزدانیان، ۱۳۹۰). شناخت متابولیسم چربی‌ها و پروتئین‌ها در حشرات، به‌ویژه حشرات آفت دارای نقش مهمی در شناسایی بهتر و کامل‌تر فیزیولوژی دستگاه گوارش، نحوه‌ی بهره‌برداری و ایجاد خسارت توسط حشرات

کرم غوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae) گونه‌ای همه‌چیزخوار و همه‌جازی است که در اکثر مناطق پنبه‌کاری کشور انتشار دارد. این حشره یکی از آفات مهم سبزی و صیفی محسوب شده و در ایران مخصوصاً به پنبه، گوجه-فرنگی، یونجه و ذرت خسارت می‌زند (خانجانی، ۱۳۸۴). قدرت چندین‌خواری بالا، دامنه‌ی پراکندگی گسترده، دیابوز اختیاری، قدرت تولیدمثل بالا و مقاومت در برابر

کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep.: Pyralidae) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد (Teimouri et al., 2015). شاخص‌های تغذیه‌ای این شب‌پره (مانند نرخ مصرف نسبی و کارایی تبدیل غذای گوارش‌یافته) در اثر تغذیه از این سه نوع رژیم غذایی به صورت معنی‌داری تحت تاثیر قرار گرفتند. بیش‌ترین میزان فعالیت آلفا-آمیلاز، لیپاز و پروتئازهای عمومی در روده‌ی لاروهایی که در رژیم غذایی مصنوعی پرورش یافته بودند، مشاهده شد و پروتئین و چربی کل این لاروها نیز دارای بالاترین مقدار بود. تاثیر تراکم لاروی و غلظت مواد غذایی بر مقدار پروتئین و چربی بدن در مگس *Hermetia illucens* L. (Dip.: Stratiomyidae) مطالعه و مشاهده شد که محتوای پروتئین بدن لارو در تراکم‌های پایین لارو و غلظت مواد مغذی، پایین‌تر بود (Barragan Fonseca et al., 2018). چربی خالص بدن لارو در تراکم بالاتر لاروها و غلظت بیشتر مواد مغذی، بالاتر بود. این مطالعه نشان داد که محتوای چربی خالص لاروها به شدت تحت تاثیر غلظت مواد مغذی و تراکم آن‌ها قرار دارد.

با توجه به اهمیت کرم غوزه‌ی پنبه به عنوان آفت محصولات کشاورزی و لزوم پرورش بهتر این حشره در شرایط آزمایشگاهی جهت انجام تحقیقات گسترده، در این مطالعه، تاثیر چهار رژیم غذایی مصنوعی حاوی آرد لوبیا چشم‌بلبلی، لوبیا قرمز، لوبیا سفید و ذرت بر تغییرات میزان پروتئین کل موجود در روده و اجسام چربی و همچنین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پکتیناز گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

جمعیت کرم غوزه‌ی پنبه از کلنی موجود در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه شد. پرورش حشرات در دمای 27 ± 2 درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام گرفت. از چهار رژیم

آفت در گیاهان می‌باشد (Canavoso et al., 2001). در مطالعه‌ای رابطه‌ی بین محتوی پروتئینی همولنف و اجسام چربی سفیده‌ی بزرگ کلم *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae) در طول نشوونما مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که در طول تبدیل شدن پیش‌شفیره-ها به شفیره‌های جوان، مقدار قابل توجهی از پروتئین همولنف حشره کاهش پیدا کرد و به پروتئین اجسام چربی افزوده شد (Chippendale and Kilby, 1969). پروتئین گرانولی و پروتئین ذخیره‌سازی اجسام چربی لارو شب‌پره *Hyalophora cecropia* L. (Lep.: Saturniidae) مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که اجسام چربی در اواخر دوره‌ی تغذیه‌ی لاروی دو نوع پروتئین ذخیره‌ای مرتبط را تولید و آن‌ها را در دانه‌های کریستالی به‌عنوان منابع پروتئین مورد نیاز برای دگردیسی ذخیره می‌کنند (Tojo et al., 1978). در مطالعاتی، اثرات ارقام مختلف سویا (Naseri et al., 2010; Soleimannejad et al., 2010; Fathipour and Naseri, 2011)، میزبان‌های مختلف گیاهی از خانواده بقولات (Baghery et al., 2013) و رژیم غذایی حاوی پودر گندم (Wang et al., 2006) روی مولفه‌های زیستی کرم غوزه‌ی پنبه از جمله مولفه‌های جدول زندگی، میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی، تولید مثل، رشد و طول عمر و شاخص‌های تغذیه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این الگوهای رشد و بقای کرم غوزه‌ی پنبه، تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف شامل حبوبات (نخود و نخود سودانی)، سبزیجات (گوجه‌فرنگی و بامیه)، گل‌ها (گل رز و گل همیشه بهار) و غلات (سورگوم و ذرت) بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی مهم روده (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) نیز بررسی شده‌اند (Sarate et al., 2012). همچنین در تحقیقی به‌جای آگار در غذای مصنوعی کرم غوزه‌ی پنبه از تاپیوکا استفاده شد و تاثیر آن روی مولفه‌های زیستی طی پنج سال متوالی بررسی گردید (Abbasi et al., 2007). اثر دو رقم پسته تجاری (اکبری و کالکوچی) و یک رژیم غذایی مصنوعی روی شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیمی

شدند. همه نمونه‌های مربوط به تیمارها در چهار تکرار تهیه شده و به دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس منتقل گردیدند.

همگن‌سازی و تهیه‌ی نمونه‌های پروتئینی

نمونه‌ها با استفاده از دستگاه همگن‌ساز (هموژنایزر) به مدت ۳۰ ثانیه همگن شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل Universal 320R سانتریفیوژ گردیدند. پس از حذف لایه چربی سطحی، محلول‌های رویی حاوی پروتئین پس از انتقال به میکروتیوب دیگری، به دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس منتقل گردیدند تا در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین

غلظت پروتئین نمونه‌ها بر اساس روش Bradford (1976) با استفاده از آلبومین سرم گاوی^۱ (BSA) به‌عنوان پروتئین استاندارد (در غلظت‌های ۰/۰۳۲، ۰/۰۶۴، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر) تعیین شد. ده میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۱۹۰ میکرولیتر معرف رنگی بردفورد (حاوی ۰/۰۱ درصد کوماسی بریلینت بلو G-250، ۸/۵ درصد اسید فسفریک و ۴/۷ درصد اتانول) در چاهک‌های میکروپلیت ریخته شدند. پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ با استفاده از الیزاریدر اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها قبل از سنجش پروتئین، ۵۰ برابر رقیق شده بودند. با استفاده از معادله خط راست، غلظت پروتئین نمونه‌های مورد نظر اندازه‌گیری شد.

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید واسرشت گر

جهت بررسی میزان تغییر در تعداد و شدت نوارهای پروتئینی، الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید

غذایی مصنوعی مختلف برای پرورش لاروهای کرم غوزه‌ی پنبه استفاده شد. غذای مصنوعی با استفاده از دانه‌های آسیاب‌شده لوبیا چشم‌بلبلی (۲۵۰ گرم)، آگار (۱۲ گرم)، اسید سوربیک (۲/۲ گرم)، اسید آسکوربیک (۳/۵ گرم)، متیل-۴-هیدروکسی بنزوات (۱/۱ گرم)، مخمر نان (۳۵ گرم)، پودر جوانه‌ی گندم (۳۰ گرم)، فرمالدهید (۲/۵ میلی‌لیتر)، روغن آفتابگردان (۵ میلی‌لیتر) و آب مقطر (۸۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد (Shorey and Hale, 1965). در سه رژیم دیگر، از آرد دانه‌های لوبیا سفید، لوبیا قرمز و ذرت به‌جای لوبیا چشم‌بلبلی استفاده شد، به این ترتیب که حدود ۱۰۰ تخم گذاشته شده توسط حشرات کامل به داخل ظروف پرورش حاوی مواد غذایی مختلف منتقل شده و بعد از رسیدن به سن سوم لاروی به منظور جلوگیری از هم‌خواری، پرورش لاروها به صورت انفرادی در شیشه‌های مک کارتی انجام شد.

تشریح اجسام چربی و روده‌ی لاروها

پس از پرورش یک نسل حشره، از ظروف مربوط به هر رژیم غذایی پنج عدد لارو سنین پنجم، ششم و پیش شفیره جهت تشریح و استخراج کل روده و اجسام چربی به‌طور تصادفی انتخاب شدند. جهت بررسی اثر رژیم غذایی روی رشد، لاروها با استفاده از ترازوی دیجیتالی حساس توزین و پس از ثبت میانگین وزن هر گروه، تشریح شدند. داخل شیشه ساعت به ازای هر لارو ۵۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته شد و لوله‌های گوارش لاروها به میکروتیوب‌های حاوی ۳۵۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل شدند. پس از آن، اجسام چربی با استفاده از قلم مو (به همراه بافر استخراج) جمع‌آوری و به میکروتیوب دیگر حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل گردیدند. چهار عدد لارو سن چهارم پرورش یافته روی رژیم‌های غذایی ذکر شده، پس از توزین به میکروتیوب‌های حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل شدند. همچنین، از هر رژیم غذایی مورد بررسی، یک عدد شفیره حاصل از لاروهای پرورش یافته روی آن‌ها در ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر در هر میکروتیوب قرار داده

1. Bovine Serum Albumin

بعد از سرد شدن، مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد و میزان جذب نوری در دستگاه الیزاریدر و طول‌موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. در شاهد به‌جای آنزیم، مقدار آن از بافر گلاسیسین استفاده گردید. میزان فعالیت آنزیمی در رژیم غذایی حاوی لوبیا چشم-بلبلی که رژیم غذایی رایج این حشره می‌باشد، ۱۰۰ درصد محاسبه گردید و فعالیت نسبی آنزیم‌های لاروهای پرورش یافته روی سه رژیم غذایی دیگر بر اساس آن محاسبه شد. آزمایش در چهار تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی انجام شد.

تجزیه‌ی آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Instat3 تجزیه و تحلیل گردیدند. از تجزیه واریانس یکطرفه استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده گردید.

نتایج

پروتئین کل

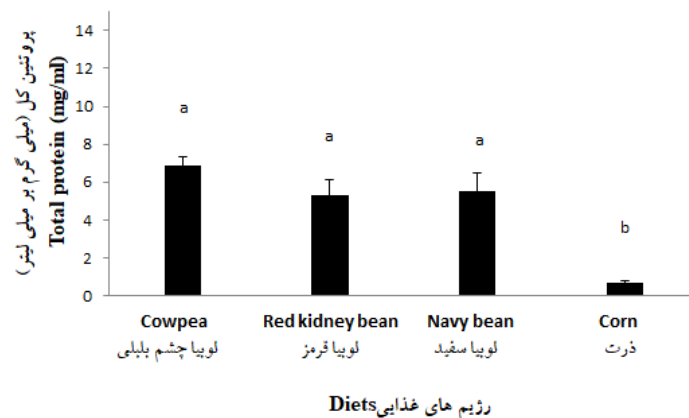
نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی مربوط به بررسی اثر رژیم‌های غذایی مختلف بر مقدار پروتئین کل بدن لاروهای سن چهارم کرم غوزه‌ی پنبه نشان داد که بین داده‌ها در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($F_{3,15}=15.924$, $P=0.0002$). کم-ترین میزان پروتئین کل بدن مربوط به رژیم غذایی حاوی ذرت بود که با سه رژیم دیگر حاوی لوبیا چشم‌بلبلی، سفید و قرمز که به ترتیب دارای بیش-ترین میزان پروتئین بودند، اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۱).

بررسی اثر رژیم‌های غذایی مختلف روی مقدار پروتئین ذخیره شده در اجسام چربی لاروهای سن پنجم، ششم و پیش‌شیره نشان داد که کم-ترین میزان پروتئین موجود در لاروهای سن پنجم پرورش داده شده روی رژیم غذایی حاوی

احیائی یا واسرشت گر دارای سدیم دودسیل سولفات یا SDS-PAGE با روش Laemmli (1970) با استفاده از ژل جدا کننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده چهار درصد اجرا شد. نمونه‌ی پروتئینی با حرارت دادن به مدت پنج دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سلسیوس پروتئین‌ها دناتوره شدند و از مرکاپتواتانول (احیاکننده‌ی پیوند دی‌سولفیدی پروتئین‌ها) در داخل بافر نمونه استفاده گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۱۴۰ ولت تا رسیدن نوار رنگی به انتهای ژل اجرا شد. ژل‌ها با استفاده از روش کوماسی بریلینت بلو (حاوی ۵۰ درصد متانول، ۱۰ درصد اسیداسستیک و ۰/۰۵ درصد کوماسی بریلینت بلو R-250) تا زمانی که کاملاً آبی تیره شوند، رنگ‌آمیزی شدند. سپس ژل‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول رنگ‌بر روی دستگاه تکان‌دهنده قرار داده شدند و پس از آن عمل رنگ‌زدایی با محلول متانول و اسید استیک انجام گردید. عمل رنگ‌زدایی تا سفید شدن رنگ زمینه ژل و مشخص شدن نوارهای پروتئینی به رنگ آبی، ادامه پیدا کرد و از ژل‌ها تصویربرداری انجام گرفت. وزن مولکولی نوارهای پروتئینی در حضور نشانگر پروتئینی SL7011 (۱۱-۱۸۰ کیلودالتون، Sinaclon®) تخمین زده شد.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز و پکتیناز

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز و پکتیناز به ترتیب با استفاده از نشاسته یک درصد و پکتین یک درصد (تهیه شده در آب مقطر با دمای ۷۰ درجه‌ی سلسیوس) به‌عنوان زیرنشت، انجام شد (حسینی نوه و قدمیاری، ۱۳۹۲). واکنش با افزودن ۱۰ میکرولیتر آنزیم، ۲۵ میکرولیتر زیرنشت و ۶۵ میکرولیتر بافر گلاسیسین (۰/۵ مولار با اسیدیت ۱۰) شروع شد و مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) به مجموعه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد.



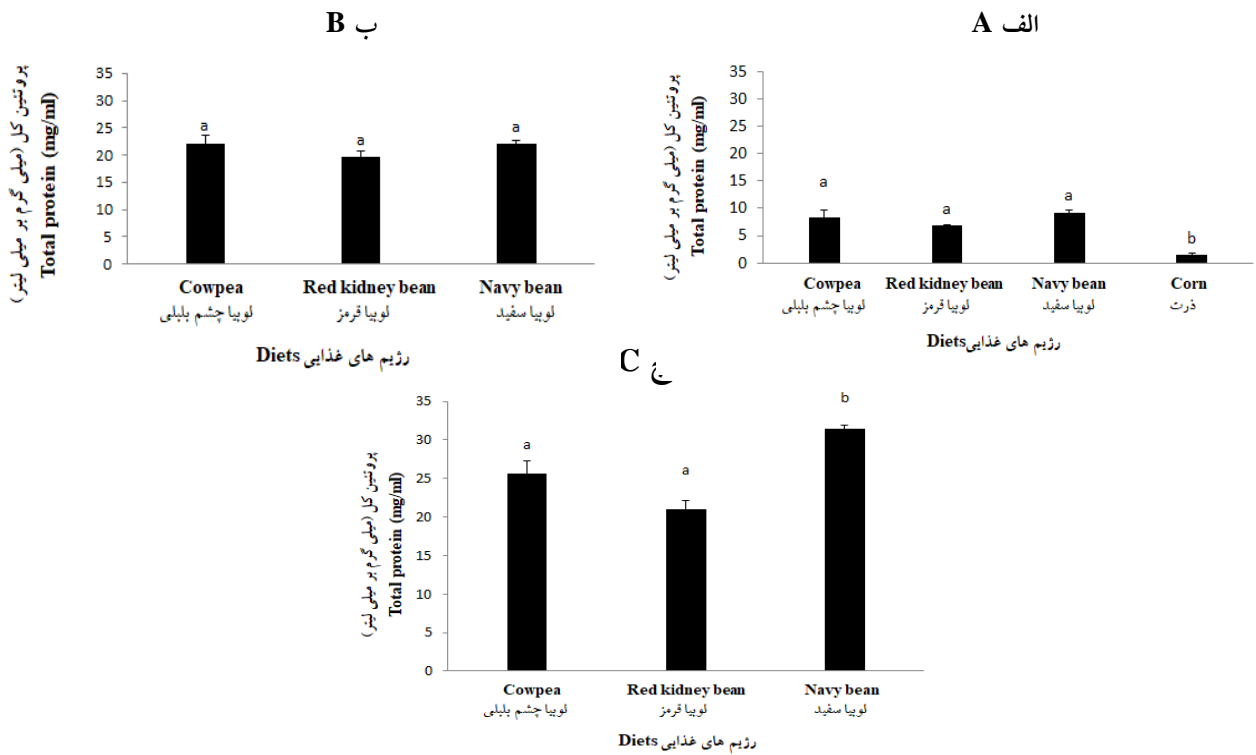
شکل ۱- مقدار پروتئین کل بدن لاروهای سن چهارم کرم غوزه ی پنبه در رژیم های غذایی مختلف. حروف غیرمشابه نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می باشند.

Figure 1. Whole-body protein amount of 4th instars of the cotton bollworm reared on different diets. Means with different letters are significantly different (Tukey's test; $P < 0.01$).

سن پنجم روی رژیم حاوی لوبیا سفید بود که با میانگین رژیم حاوی لوبیا چشم بلبلی اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۲ الف). میزان پروتئین روده ی لاروهای سن ششم در رژیم های غذایی مختلف در سطح احتمال یک درصد با هم دیگر اختلاف معنی داری داشتند. کمترین میزان پروتئین مربوط به رژیم غذایی حاوی لوبیا قرمز و بیشترین میزان پروتئین مربوط به رژیم غذایی حاوی لوبیا سفید بود (شکل ۲ ب). میزان پروتئین در روده ی پیش شفیره ها روی رژیم غذایی حاوی لوبیا سفید دارای بیشترین مقدار بود که با مقادیر آن روی رژیم های غذایی حاوی لوبیا قرمز و لوبیا چشم بلبلی (بدون اختلاف معنی دار با هم) با رژیم غذایی حاوی لوبیا سفید در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی دار بود (شکل ۲ ج). ($F_{3,15}=93.819$, $P=0.0001$) (شکل ۳ الف). میزان پروتئین روده ی لاروهای سن ششم در رژیم های غذایی مختلف در سطح احتمال یک درصد با هم دیگر اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۲ ب). ($F_{2,11}=1.525$, $P=0.2689$) (شکل ۲ ج). با توجه به طولانی شدن دوره ی نشوونمایی لاروها و افزایش مرگ و میر در رژیم غذایی حاوی ذرت، اندازه گیری میزان پروتئین لاروهای سن ششم و پیش شفیره روی این رژیم غذایی مقدور نبود.

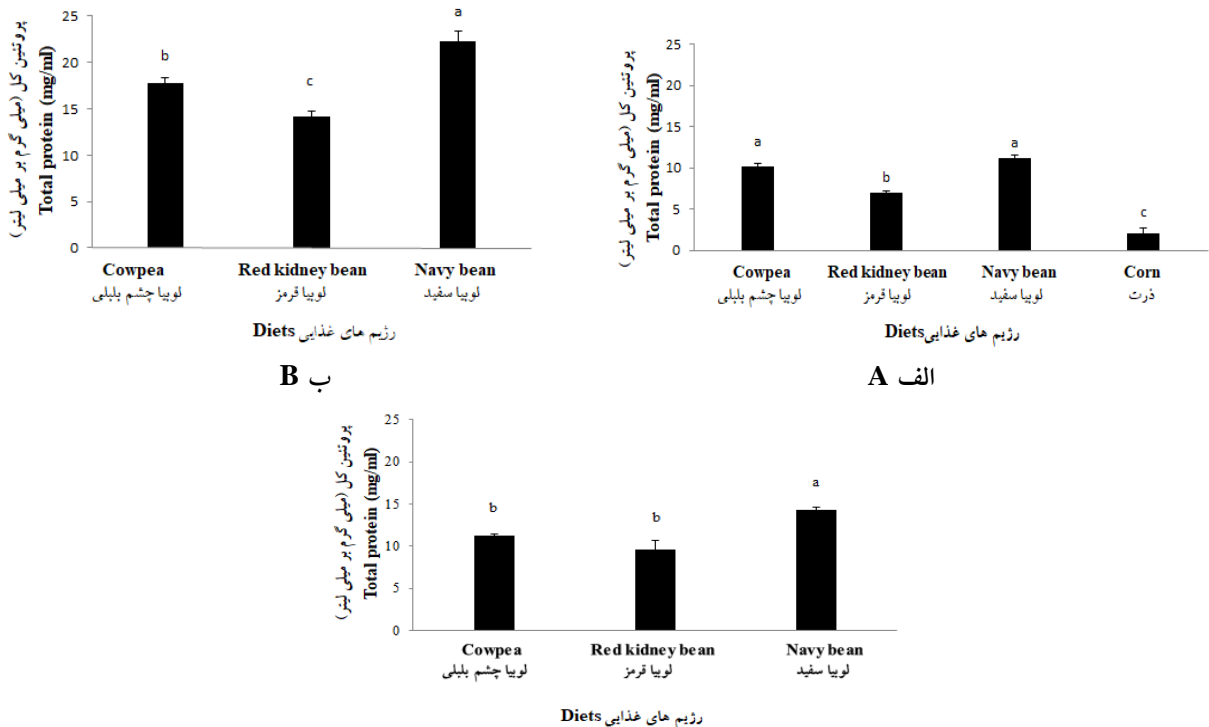
ذرت در سطح احتمال یک درصد با سه رژیم غذایی دیگر اختلاف معنی دار داشت ($F_{3,15}=21.288$, $P=0.0001$) (شکل ۲ الف). میزان پروتئین در اجسام چربی لاروهای سن ششم پرورش یافته روی رژیم های غذایی مختلف اختلاف معنی داری نداشتند ($F_{2,11}=1.525$, $P=0.2689$) (شکل ۲ ب). مقدار پروتئین در اجسام چربی پیش شفیره ها در رژیم های غذایی مختلف در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی دار بود. بیشترین مقدار پروتئین در این مرحله مربوط به رژیم غذایی حاوی لوبیا سفید بود و میانگین های دو رژیم دیگر اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند ($F_{2,11}=18.758$, $P=0.0006$) (شکل ۲ ج). با توجه به طولانی شدن دوره ی نشوونمایی لاروها و افزایش مرگ و میر در رژیم غذایی حاوی ذرت، اندازه گیری میزان پروتئین لاروهای سن ششم و پیش شفیره روی این رژیم غذایی مقدور نبود.

بررسی اثر رژیم های غذایی مختلف روی مقدار پروتئین ذخیره شده در روده ی لاروهای سن پنجم، ششم و پیش شفیره نشان داد که کمترین میزان پروتئین موجود در روده ی لارو سن پنجم روی رژیم غذایی حاوی ذرت و بعد از آن در رژیم غذایی حاوی لوبیا قرمز بود که در سطح احتمال یک درصد با دو رژیم غذایی دیگر و با هم دیگر نیز اختلاف معنی دار داشتند. بیشترین میزان پروتئین موجود در روده ی لاروهای



شکل ۲- مقدار پروتئین موجود در اجسام چربی لاروهای سن پنجم (الف)، و ششم (ب) و پیش شفیره‌های (ج) کرم غوزه‌ی پنبه در اثر تغذیه از رژیم‌های غذایی مختلف. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

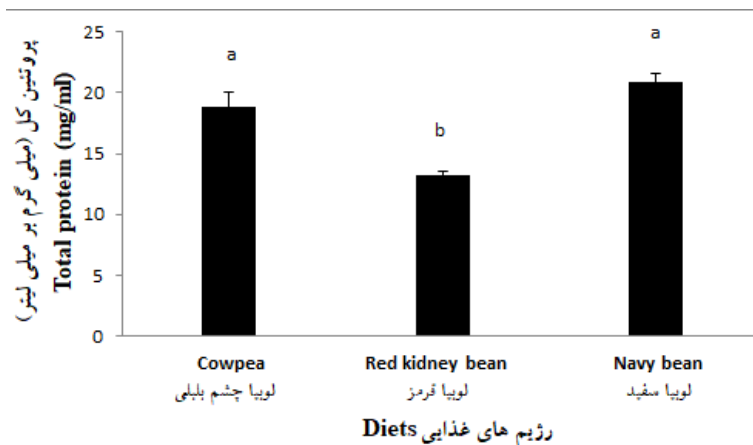
Figure 2. Fat bodies protein amount of the cotton bollworm 5th instars (A), and 6th instars (B) and Pre-pupa (C) reared on different diets. Means with different letters are significantly different (Tukey's test; P < 0.01).



شکل ۳- مقدار پروتئین روده‌ی لاروهای سن پنجم (الف)، و ششم (ب) و پیش شفیره‌های (ج) کرم غوزه‌ی پنبه در اثر تغذیه از رژیم‌های غذایی مختلف. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Figure 3. Gut protein amount of the cotton bollworm 5th instars (A), and 6th instars (B) and pre-pupa (C) reared on different diets. Means with different letters are significantly different (Tukey's test; P < 0.01).

بود که با دو رژیم دیگر یعنی لوبیا سفید و لوبیا چشم-بلبلی که بدون اختلاف معنی دار با هم دارای بیشترین میزان پروتئین بودند، اختلاف معنی داری داشت (شکل ۴).



شکل ۴- مقدار پروتئین کل بدن شفیره های کرم غوزه ی پنبه در رژیم های غذایی مختلف. حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می باشند.

Figure 4. Whole-body protein amount of the cotton bollworm pupa reared on diffrents diets. Means with different letters are significantly different (Tukey's test; $P < 0.0$)

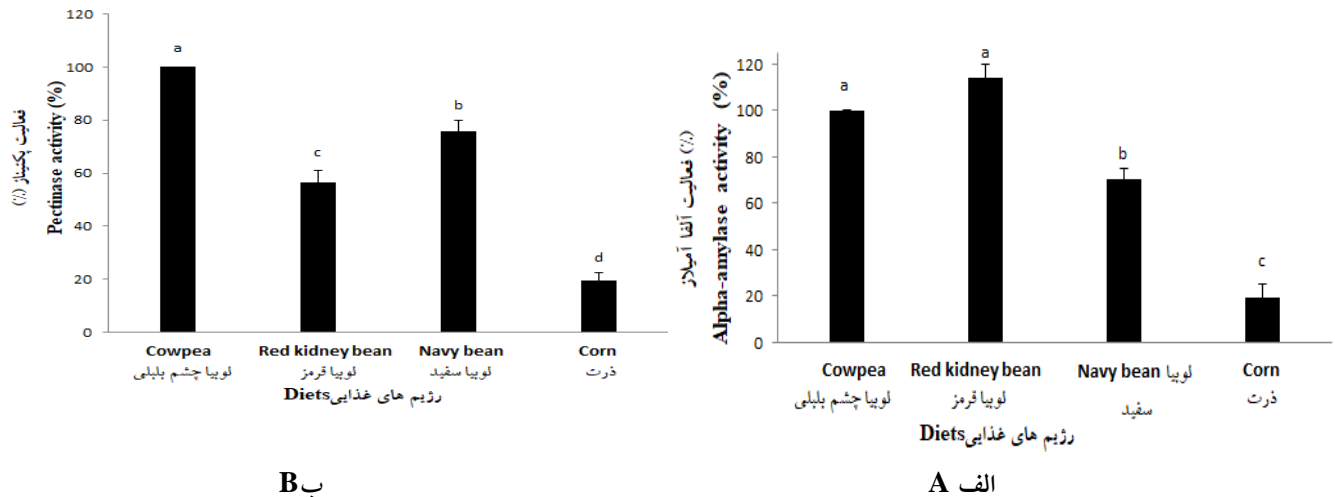
قرمز دارای بیشترین میزان فعالیت آلفا- آمیلاز بودند. که با میزان آن در لاروهای پرورش یافته روی رژیم غذایی حاوی لوبیا چشم بلبلی اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۵ الف).

فعالیت پکتیناز گوارشی لاروهای سن پنجم در اثر تغذیه از چهار رژیم غذایی مختلف دارای اختلاف معنی- دار بود ($F_{3,15}=107.06$, $P=0.0001$). طبق نتایج، کم- ترین فعالیت آنزیم به ترتیب در لاروهای تغذیه کرده از رژیم های غذایی حاوی ذرت، لوبیا قرمز، لوبیا سفید و لوبیا چشم بلبلی بود که با هم دارای اختلاف معنی دار بودند (شکل ۵ ب).

فعالیت آلفا- آمیلاز و پکتیناز

نتایج مربوط به بررسی اثر رژیم های غذایی مختلف بر فعالیت نسبی آلفا- آمیلاز و پکتیناز گوارشی لاروهای سن پنجم کرم غوزه ی پنبه به ترتیب در شکل های ۵ الف و ۵ ب نشان داده شده است. میزان فعالیت دو آنزیم در رژیم غذایی حاوی لوبیا چشم بلبلی که رژیم غذایی رایج این حشره می باشد، ۱۰۰ درصد محاسبه گردید و فعالیت نسبی آن دو در لاروهای پرورش یافته روی سه رژیم غذایی دیگر بر اساس آن محاسبه شد. فعالیت آلفا- آمیلاز در اثر تغذیه از رژیم های غذایی مختلف اختلاف معنی داری را نشان داد ($F_{3,15}=78.771$, $P=0.0001$). نتایج نشان دادند که لاروهای سن پنجم پرورش یافته به ترتیب روی رژیم های غذایی حاوی ذرت و لوبیا سفید دارای کمترین میزان فعالیت آلفا- آمیلاز و در مقایسه با

میزان آن در اثر تغذیه از دو رژیم غذایی حاوی لوبیا قرمز و لوبیا چشم بلبلی دارای اختلاف معنی دار بودند. لاروهای پرورش یافته روی رژیم غذایی حاوی لوبیا



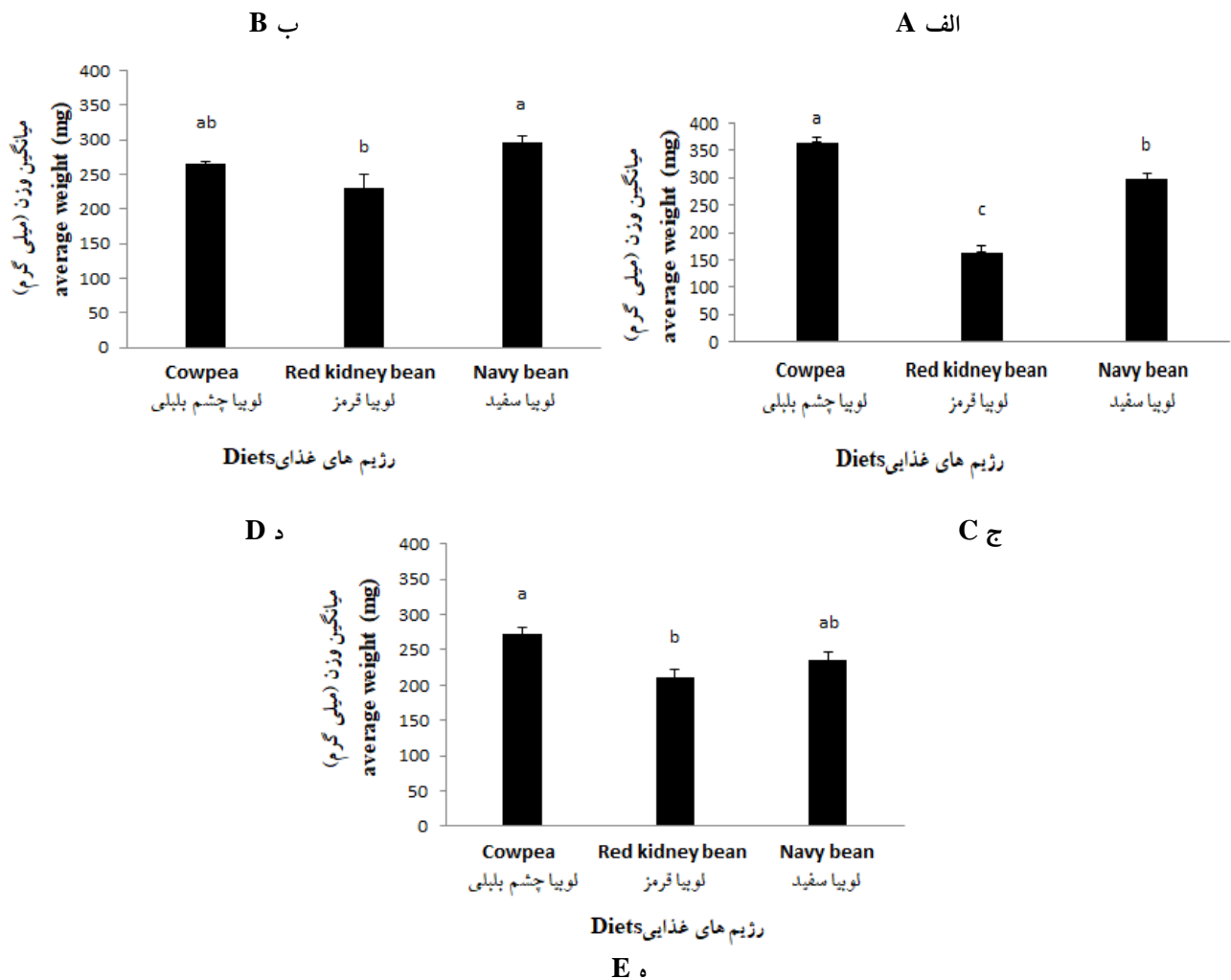
شکل ۵- میزان فعالیت آلفا- آمیلاز (الف) و پکتیناز (ب) گوارشی لاروهای سن پنجم کرم غوزه‌ی پنبه در اثر تغذیه از رژیم‌های غذایی مختلف. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Figure 5. Digestive α -amylase (A) and pectinase (B) activities of the cotton bollworm 5th instars reared on different diets. Means with different letters are significantly different (Tukey's test; $P < 0.01$).

غذایی مختلف نیز دارای اختلاف معنی‌دار بود ($F_{2,11}=110.58, P=0.0001$). بیش‌ترین وزن لاروهای سن ششم به ترتیب در اثر تغذیه از رژیم‌های غذایی حاوی لوبیا چشم‌بلبلی و لوبیا سفید دیده شد که با هم دارای اختلاف معنی‌دار بودند. کم‌ترین وزن این لاروها نیز در اثر تغذیه از رژیم غذایی حاوی لوبیا قرمز دیده شد که با دو میانگین قبلی دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۶ ج). وزن پیش‌شیره‌ها ($F_{2,11}=6.869, P=0.0154$) و شیره‌های ($F_{2,11}=8.168, P=0.0095$) حاصل از لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی مختلف نیز دارای اختلاف معنی‌دار بود. در هر دو مورد، بیش‌ترین وزن در شیره‌ها و پیش‌شیره‌های حاصل از رژیم‌های غذایی حاوی لوبیا سفید و لوبیا چشم‌بلبلی دیده شد که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. کم‌ترین وزن این دو مرحله‌ی نشوونمایی نیز در اثر تغذیه از رژیم غذایی حاوی لوبیا قرمز مشاهده شد (شکل ۶ د، شکل ۶ ه).

اثر رژیم غذایی روی رشد لاروها، پیش‌شیره‌ها و شیره‌ها

نتایج مربوط به تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف روی رشد لاروهای سنین چهارم، پنجم و ششم، پیش‌شیره‌ها و شیره‌ها در شکل شش نشان داده شده‌اند. وزن لاروهای سن چهارم در رژیم‌های غذایی مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشتند ($F_{3,15}=3.113, P=0.0666$) (شکل ۶ الف). به همین دلیل، آزمایش‌های اصلی روی لاروهای سن پنجم و مراحل نشوونمایی بعدی انجام شدند. وزن لاروهای سن پنجم در رژیم‌های غذایی مختلف در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($F_{3,15}=41.147, P=0.0001$). بیش‌ترین وزن لاروها در اثر تغذیه از رژیم غذایی حاوی لوبیا چشم‌بلبلی مشاهده شد که با وزن آن‌ها در اثر تغذیه از رژیم حاوی لوبیا قرمز فاقد اختلاف معنی‌دار اما با وزن آن‌ها در اثر تغذیه از دو رژیم غذایی دیگر دارای اختلاف معنی‌دار بود. کم‌ترین وزن نیز در اثر تغذیه از رژیم غذایی حاوی ذرت مشاهده شد که با میانگین وزن لاروها در اثر تغذیه از سه رژیم دیگر دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۶ ب). وزن لاروهای سن ششم در اثر تغذیه آن‌ها از رژیم‌های



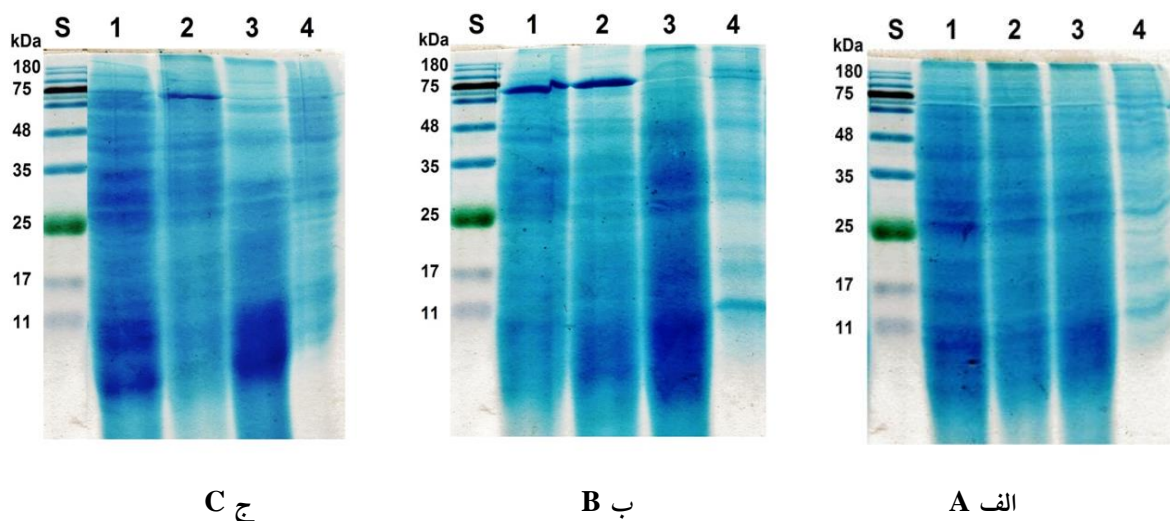
شکل ۶- وزن لاروهای سن چهارم (الف)، پنجم (ب)، و ششم (ج)، پیش شفیره‌ها (د) و شفیره‌های (ه) کرم غوزه‌ی پنبه پرورش یافته روی رژیم‌های غذایی مختلف. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Figure 6. Weights of the cotton bollworm 4th instars (A), 5th instars (B), and 6th instars (C), pre-pupa (D) and pupa (E) reared on diffrents diets. Means with different letters are significantly different (Tukey's test; $P < 0.01$).

حاوی ذرت دارای کم‌ترین شدت بودند. در شکل هفت ب، نوار مربوط به رژیم حاوی لوبیا سفید، و در شکل هفت ج نیز نوار مربوط به رژیم حاوی لوبیا چشم‌بلبلی دارای بیش‌ترین شدت نسبت به سایر رژیم‌ها بودند. نتایج به دست آمده با الکتروفورز واسرشت‌گر و حاصل از آزمایش‌های آزمایشگاهی با یکدیگر در تطابق هستند.

الگوهای پروتئینی

الگوهای پروتئینی نمونه‌های تهیه شده از کل بدن لاروهای سن چهارم، و اجسام چربی و رودی لاروهای سن پنجم در اثر تغذیه از رژیم‌های غذایی مختلف در شکل هفت ارایه گردیده‌اند. در هر سه شکل، الگوی پروتئینی تهیه شده با استفاده از الکتروفورز واسرشت‌گر نشان داد که نوارهای پروتئینی کل بدن، روده و اجسام چربی لاروهای پرورش یافته روی رژیم غذایی



شکل ۷- الگوهای پروتئین روده (الف) و اجسام چربی (ب) لاروهای سن پنجم و کل بدن لاروهای سن چهارم (ج) کرم غوزه‌ی پنبه تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی مختلف در الکتروفورز واسرشت‌گر. اعداد ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب نشان‌گر رژیم‌های غذایی حاوی لوبیا چشم‌بلبلی، لوبیا قرمز، لوبیا سفید و ذرت می‌باشند. ستون سمت چپ که با حرف لاتین S مشخص شده مربوط به پروتئین استاندارد (نشانگر) می‌باشد.

Figure 7. Protein patterns of the cotton bollworm 5th instars gut (A) and fat bodies (B) and 4th instars whole bodies (C) reared on different diets, on SDS-PAGE. Numbers 1, 2, 3 & 4 indicate diets; cowpea, red kidney bean, navy bean and corn, respectively. The left column marked with S, corresponds to the standard protein (marker).

بحث

در مطالعه‌ای میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در همه‌ی مراحل زیستی از جمله همه‌ی سنین لاروی، شفیره، تخم و حشره‌ی کامل کرم غوزه‌ی پنبه اندازه‌گیری و نتیجه گرفته شد که سطح فعالیت آلفا- آمیلاز پایینی در سنین اولیه‌ی لاروی داشتند ولی این فعالیت تا سن ششم لاروی به مرور افزایش پیدا می‌کند (Kotkar et al., 2009). محققین دیگری بیان داشتند که آنزیم‌های گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه سطح ترشح متغیری را در رژیم‌های غذایی مختلف نشان می‌دهند و مشخص شد که ترکیب ماکرومولکولی رژیم غذایی (پروتئین و کربوهیدرات) عامل این تغییر می‌باشد (Sarate et al., 2012). در تحقیق حاضر نیز فعالیت آنزیم‌ها در سن پنج لاروی مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در این تحقیق می‌توان گفت بسته به رژیم غذایی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلفا- آمیلاز و پکتیناز می‌تواند متغیر باشد. کم‌ترین فعالیت آنزیم‌های مذکور در رژیم حاوی ذرت ثبت شد.

بررسی فعالیت آنزیم‌ها و میزان پروتئین در اجسام چربی، روده و کل بدن حشرات در اثر تغذیه از رژیم‌های غذایی مختلف حشره حایز اهمیت می‌باشد تا با تأکید بر اثر تغییرات رژیم غذایی بر میزان پروتئین موجود در بافت‌های مختلف حشرات، امکان کنترل این آفت را با برهم زدن فیزیولوژی عادی آن میسر نمود. وابسته بودن میزان پروتئین کل در اجسام چربی و روده به سن و مرحله‌ی نشو و نمائی حشرات در شب‌پره *Antheraea mylitta* Drury (Lep.: Saturniidae) نیز نشان داده شده است (Kumar et al., 2011) که با نتایج بررسی حاضر تطابق دارد. در تحقیق حاضر، کم‌ترین میزان پروتئین در تمام بدن لاروهای سن چهارم و روده و اجسام چربی لاروهای سن پنجم در رژیم حاوی ذرت و بیش‌ترین میزان آن در رژیم حاوی لوبیا سفید بود. کم‌ترین میزان پروتئین شفیره نیز، در رژیم حاوی لوبیا قرمز و بیش‌ترین میزان آن در رژیم حاوی لوبیا سفید مشاهده شد.

های غذایی دارای پروتئین و کربوهیدرات اندک (گل رز، گل همیشه بهار، بامیه و گوجه فرنگی)، دارای وزن بیشتر و دوره‌ی نشوونمایی سریع‌تری بودند (Sarate et al., 2012) در نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز در سن چهارم و پنجم کم‌ترین وزن لارو در رژیم غذای مصنوعی ذرت و در سنین بالاتر، به دلیل عدم رشد در رژیم ذرت، در رژیم لوبیا قرمز ثبت شد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، به‌طور کلی رژیم‌های غذایی مصنوعی حاوی آرد ذرت و لوبیا قرمز برای پرورش و تکثیر این حشره مناسب نبودند ولی رژیم‌های غذایی حاوی لوبیا سفید یا لوبیا چشم‌بلبلی برای آن مناسب گزارش می‌شوند. بنابراین با این که گیاه ذرت جزو میزبان‌های اصلی کرم غوزه‌ی پنبه است ولی به‌عنوان جزئی از رژیم غذایی مصنوعی، برای پرورش این حشره مطلوب نمی‌باشد.

در گزارشی سه ترکیب ثانویه، شامل پیروکاتکول، گرامین و فرولیک اسید از گندم به‌طور جداگانه به رژیم غذایی مصنوعی کرم غوزه‌ی پنبه افزوده شدند و تأثیر آن روی میانگین وزن لارو و شفیره مورد بررسی قرار گرفت (Wang et al., 2006). این محققین به این نتیجه رسیدند که این سه ترکیب ثانویه باعث کاهش میانگین وزن لارو و شفیره و تغییر در مولفه‌های زیستی مانند سرعت رشد نسبی، قابلیت گوارش و راندمان غذایی در لارو می‌شوند. نتایج تحقیق دیگری نشان داد که در هنگام تغذیه از رژیم غذایی مصنوعی مبتنی بر تاپیوکا در مولفه‌های مختلف زیستی کرم غوزه‌ی پنبه مانند دوره‌ی رشد لاروی و شفیرگی، درصد شفیرگی، وزن شفیرگی، میزان ظهور حشرات کامل نر و ماده، طول عمر، باروری و تخم‌ریزی تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد (Abbasi et al., 2007). همچنین تفاوت در مولفه‌های زیستی کرم غوزه‌ی پنبه در میزبان‌های حساس و مقاوم در تحقیق دیگری اثبات شده است (Farrar and Kennedy, 1987)، به این ترتیب که این حشره روی دو گونه گوجه‌فرنگی وحشی مقاوم *Solanum habrochaites* و زراعی حساس *S. lycopersicum* پرورش داده شد و تغییرات وزن لاروی، تلفات، نرخ مصرف و راندمان مواد غذایی خورده شده به‌طور معنی‌داری تغییر یافت. در مطالعه دیگری نیز اثر معنی‌دار تغذیه از رژیم‌های غذایی مختلف مانند ذرت، توتون، پنبه، گوجه فرنگی، روی وزن لاروهای سن آخر و شفیره‌های کرم غوزه نشان داده شده است (Liu et al., 2004) که نتایج این تحقیق مبنی بر تحت تأثیر قرار گرفتن وزن لاروها و شفیره‌های این حشره بسته به نوع رژیم غذایی را تایید می‌کند. در گزارش دیگری بین کیفیت رژیم‌های غذایی با وزن لاروها و شفیره‌های کرم غوزه‌ی پنبه رابطه‌ی معنی‌داری مشاهده شده است. لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی سرشار از پروتئین و کربوهیدرات (نخود سودانی، نخود، ذرت و سورگوم) در مقایسه با لاروهای تغذیه کرده از رژیم-

1. Pyrocatechol
2. Gramine
3. Ferulic acid

منابع

- حسینی نوه و و قدمیاری م، ۱۳۹۲. مبانی و مفاهیم روش‌های آزمایشگاهی در بیوشیمی، فیزیولوژی و سم‌شناسی حشرات، انتشارات دانشگاه تهران، ۵۷۷ صفحه.
- خانجانی م، ۱۳۸۴. آفات گیاهان زراعی ایران. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا همدان. ۷۱۹ صفحه.
- یزدانیان م، ۱۳۹۰. سامانه‌های فیزیولوژیک در حشرات. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. جلد اول، ۵۲۳ صفحه.
- Abbasi BH, Ahmed K, Khalique F, Ayub N, Liu HJ, Kazmi SAR, Aftab MN, 2007. Rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on a tapioca-based artificial diet. *Journal of Insect Science*, 7(1): 35.
- Baghery F, Fathipour Y, Naseri B, 2013. Nutritional indices of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seeds of five host plants. *Applied Entomology and Phytopathology*, 80(2): 19-27.
- Barragan Fonseca KB, Dicke M, Van Loon JJ, 2018. Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(9): 761-770.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248-254.
- Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA, 2001. Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition*, 21(1): 23-46.
- Chippendale GM, Kilby BA, 1969. Relationship between the proteins of the haemolymph and fat body during development of *Pieris brassicae*. *Journal of Insect Physiology*, 15(5): 905-926.
- Farrar Jr RR, Kennedy GG, 1987. Growth, food consumption and mortality of *Heliothis zea* larvae on foliage of the wild tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* and the cultivated tomato, *L. esculentum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 44(3): 213-219.
- Fathipour Y, Naseri B, 2011. Soybean cultivars affecting performance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). In *Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology*. IntechOpen. DOI: 10.5772/14838.
- Fitt GP, 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, 34(1): 17-53.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Liu Z, Li D, Gong P, Wu K, 2004. Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on different host plants. *Environmental Entomology*, 33(6): 1570-1576.
- Kotkar HM, Sarate PJ, Tamhane VA, Gupta VS, Giri AP, 2009. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *Journal of Insect Physiology*, 55(8): 663-670.
- Kumar D, Pandey JP, Jain J, Mishra PK, Prasad BC, 2011. Qualitative and quantitative changes in protein profile of various tissue of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury. *International Journal of Zoological Research*, 7(2): 147-155.
- Naseri B, Fathipour Y, Moharrampour S, Hosseiniaveh V, 2010. Nutritional indices of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on 13 soybean varieties. *Journal of Insect Science*, 10(1): 151.
- Sarate PJ, Tamhane VA, Kotkar HM, Ratnakaran N, Susan N, Gupta VS, Giri AP, 2012. Developmental and digestive flexibilities in the midgut of a polyphagous pest, the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science*, 12(1): 42.

- Shorey HH, Hale RL, 1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 58: 522-524.
- Soleimannejad S, Fathipour Y, Moharramipour S, Zalucki MP, 2010. Evaluation of potential resistance in seeds of different soybean cultivars to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) using demographic parameters and nutritional indices. *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1420-1430.
- Teimouri N, Sendi JJ, Zibae A, Khosravi R, 2015. Feeding indices and enzymatic activities of carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: pyrallidae) on two commercial pistachio cultivars and an artificial diet. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(1): 76-82.
- Tojo S, Betchaku T, Ziccardi VJ, Wyatt GR, 1978. Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *Journal of Cell Biology*, 78(3): 823-838.
- Wang Y, Cai QN, Qing-Wen Z, Han Y, 2006. Effect of the secondary substances from wheat on the growth and digestive physiology of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology*, 103(1): 255-258.

Impact of Different Diets on Some Biological and Physiological Parameters in the *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae)

Seyedeh Sana Nejat¹, Reza Farshbaf Pour Abad^{2*} and Shabnam Ashouri³

¹M.S. Student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

²Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³Postdoctoral Researcher of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding Autor: rfpourabad@yahoo.com

Received: 27 May 2020

Accepted: 9 August 2020

Abstract

In current research, the effect of four artificial diets containing cowpea, red kidney bean, navy bean and corn seed flour on protein content of 4th instars whole body; 5th and 6th instars larval and pre-pupal gut and fat bodies; and pupal whole body of the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner), were investigated. Also, the effect of different diets on the digestive α -amylase and pectinase was studied. Protein patterns were also compared using SDS-PAGE. According to the results, the lowest amount of protein in 4th instars whole body and 5th instars gut and fat bodies was seen in corn as diet and highest one was in navy bean diet. Insects reared on the corn as diet did not developed to 6th larval stage during the experiment. Except for the protein content of 6th instars fat bodies, no significant differences were observed in the other treatments of the 6th instars and pre-pupa. The lowest amount of pupal protein was found in red kidney bean diet and the highest one was in navy bean diet. Due to the decrease in protein content in different diets, insect weight and the activity of digestive α -amylase and pectinase were also affected and significant differences were observed. The least weight and activity of enzymes were recorded in corn diet. Differences in the amount of protein was also detected in SDS-PAGE. Consequently, artificial diets of corn and red kidney bean are not suitable for this insect rearing and white bean and cowpea are reported as appropriate diets.

Keywords: Digestive Enzymes, Polyacrylamide gel electrophoresis, Protein, Artificial diets, *Helicoverpa armigera*.