

شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت پروتئولیتیک گوارشی شب‌پره پوست‌خوار میوه

پسته، *Arimania comaroffi* (Ragonot) (Lep.: Pyralidae) روی پنج رقم پسته

سیدمظفر منصوری* و فهیمه خواجه

گروه تنوع‌زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: m.mansouri.89@gmail.com

چکیده

شب‌پره پوست‌خوار میوه پسته، *Arimania comaroffi* (Ragonot) آفتی است که در سال‌های اخیر در برخی باغات پسته رفسنجان به صورت طفیانی درآمده است. برای مطالعه شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیمی پروتئازی کل، لاروهای آفت روی میوه پنج رقم پسته شامل احمدآقایی، اکبری، اوحدی، کله قوچی و ممتاز در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 45 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت (تاریکی: روشنایی) پرورش داده شدند. در هر ظرف آزمایشی یک لارو با وزن اولیه برابر روی یک میوه پسته از هر رقم قرار داده شد. هر ۲۴ ساعت یکبار میوه‌ها تعویض شدند و در هر مرتبه افزایش وزن لاروها، وزن پوست میوه پسته تغذیه شده و وزن فضولات لاروی ثبت شد. هم‌چنین میزان پروتئین کل پوست میوه ارقام پسته اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، کم‌ترین مقادیر دو شاخص بازدهی غذای خورده شده و بازدهی غذای هضم شده در لاروهای پرورش‌یافته روی رقم اوحدی و کم‌ترین میزان فعالیت پروتئازی لاروی روی ارقام اوحدی و اکبری مشاهده شد. بیش‌ترین مقادیر کلیه شاخص‌های تغذیه‌ای محاسبه شده و نیز بیش‌ترین میزان فعالیت پروتئازی در لاروهای تغذیه‌شده با پوست میوه رقم ممتاز به دست آمد. کم‌ترین میزان پروتئین کل در پوست میوه اکبری و بیش‌ترین مقدار پروتئین روی پوست میوه رقم ممتاز ثبت شد. هم‌چنین همبستگی مثبت معنی‌داری بین میزان پروتئین پوست میوه و فعالیت پروتئازی وجود داشت. بر اساس نتیجه تجزیه خوشه‌ای مجموع داده‌های آزمایشی، رقم‌های اوحدی، احمدآقایی و اکبری نسبت به دو رقم دیگر تاثیر منفی معنی‌داری روی میزان کارایی تغذیه لارو *A. comaroffi* داشتند. **واژگان کلیدی:** *Arimania comaroffi*، پروتئین، پوست میوه پسته، تجزیه خوشه‌ای.

Feeding indices and digestive proteolytic activity of pistachio hull borer, *Arimania comaroffi* (Rogonot) (Lep.: Pyralidae) on five pistachio varieties

Seyed Mozaffar Mansouri* & Fahimeh Khajeh

Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

*Corresponding author, Email: m.mansouri.89@gmail.com

Abstract

Pistachio hull borer, *Arimania comaroffi* (Rogonot) (Lep.: Pyralidae) is an insect pest which has turn into an outbreak in some pistachio orchards of Rafsanjan. In order to study feeding indices and total proteolytic enzymatic activity, larvae of *A. comaroffi* were reared on fruits of five pistachio varieties including, Ahmadaghai, Akbari, Ohadi, Kaleghochi and Momtaz at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $45 \pm 5\%$ RH and 16:8 (L:D) h. In each experimental container, one larva at the same initial weight was located on one fruit of each pistachio variety. Every 24 h, fruits were changed and larval weight gain, weight of skin of pistachio's fruit and weigh of larval feces were recorded. The total protein of fruits skin of different pistachio varieties was evaluated as well. Based on the results, the lowest amounts of conversion efficiency of ingested food and conversion efficiency of digested food were in larvae reared on fruit of Ohadi variety and the lowest proteolytic activity was in larvae fed on fruits of Ohadi and Akbari varieties. The highest feeding indices and protease activity were in larvae fed on Momtaz. The lowest protein content of pistachio fruits skin was on Ohadi and Akbari, and the highest content was on

Momtaz. There was a positive correlation between protein content of tested varieties and protease activity of larvae. According to the result of cluster analysis, Ohadi, Ahmadaghai, and Akbari varieties had a negative significant effect on feeding efficiency of *A. comaroffi* larvae as compared with the other varieties.

Key words: *Arimania comaroffi*, protein, pistachio fruit's skin, cluster analysis.

Received: 24 July 2017, Accepted: 15 November 2017

مقدمه

شب‌پره پوست‌خوار میوه پسته، *Arimania comaroffi* (Ragonot) (Lepidoptera: Pyralidae) آفتی است تک‌خوار که در اصطلاح محلی استان کرمان کراش نامیده می‌شود. در چند سال اخیر این حشره به ویژه در باغ‌های پسته رفسنجان به صورت طغیانی درآمده و ایجاد خسارت شدید نموده است (Basirat et al., 2015). این حشره اولین بار در سال ۱۳۵۱ از جنگل‌های درختان بنه در استان فارس گزارش شده است و هم‌چنین در بعضی از پسته کاری‌های رفسنجان مشاهده شده است (Samet, 1985). این آفت در استان‌های کرمان، فارس، خراسان، اصفهان، یزد و سیستان و بلوچستان انتشار داشته و میزبان آن پسته می‌باشد (Samet, 1985; Basirat et al., 2015). لاروهای سن یک در کلیه نسل‌های آفت ابتدا از ناحیه اپیدرم روی و پارانثیم برگ تغذیه می‌نماید. در نسل‌های دوم و سوم تخم‌گذاری به طور عمده روی میوه پسته و ترجیحاً روی میوه‌های نیمه‌خشک و خشک انجام می‌شود. لاروهای آفت عمدتاً از پوست روی، دم میوه و محور خوشه‌ها تغذیه می‌کنند که با تنیدن مقدار زیادی تار نیز همراه است که سبب چسباندن میوه‌ها به همدیگر می‌شوند (Basirat et al., 2015). این تارها لاروهای حشره را در برابر عوامل خارجی مصون نموده و از رسیدن سموم به لاروها نیز می‌تواند جلوگیری نمایند. هم‌چنین تغذیه لاروهای آفت موجب به جای گذاشتن لکه‌های تیره در روی پوست استخوانی دانه پسته شده که از بازار پسندی و مرغوبیت پسته کاسته می‌شود (Mehrnejad, 2001; Bemani et al., 2012).

مطالعه‌های مختلف روی شاخص‌های بیولوژیک، اکولوژیک و فیزیولوژیک یک حشره آفت سبب مشخص شدن نقاط قوت و ضعف و مراحل زیستی حساس آفت در نسل‌های مختلف خواهد شد (Awmack & Leather, 2002). رشد و نمو و تولید مثل حشرات به شدت به کیفیت و کمیت غذای خورده شده توسط حشره بستگی دارد (Slansky, 1990). عوامل متعددی مطلوبیت گیاه میزبان را برای تغذیه، رشد و نمو و ایجاد جمعیت نسل بعد توسط حشره آفت تحت تأثیر قرار می‌دهند که از آن جمله می‌توان به نوع و میزان عناصر غذایی گیاه، ترکیبات شیمیایی ثانوی گیاه و توانایی هضم و جذب غذای خورده شده توسط حشره اشاره نمود (Sciber & Slansky, 1981; Barton Browne & Raubenheimer, 2003). اندازه‌گیری مقدار غذای مصرفی به وسیله حشرات گیاه‌خوار یک روش رایج مطالعه اثر متقابل بین رابطه گیاه-گیاه‌خوار می‌باشد (Sciber & Slansky, 1981). شاخص‌های تغذیه‌ای می‌توانند به عنوان یک ابزار در بهبود درک فیزیولوژی تغذیه و اکولوژی حشرات استفاده شوند (Sciber & Slansky, 1981). شاخص‌های تغذیه‌ای به‌ویژه شاخص بازدهی تبدیل غذای خورده شده و بازدهی تبدیل غذای هضم شده از جمله شاخص‌های تغذیه‌ای بسیار مهمی می‌باشند که بیانگر وضعیت فیزیولوژیک حشره و در راستای آن تأثیر ترکیبات گیاهی بر فیزیولوژی آنزیم‌های گوارشی آفت می‌باشند (Rayapuram & Baldwin, 2006). محققین متعددی شاخص‌های تغذیه‌ای را برای مطالعه هضم، جذب و بازدهی غذای هضم شده منابع غذایی برای بررسی مقاومت گیاهان در مورد لاروهای شب‌پره‌ها به کار برده‌اند (Naseri; Hemati et al., 2012; Mansouri et al., 2013; Rahimi Namin et al., 2014; Waldbauer, 1968; Rayapuram & Baldwin, 2006; Soleimannejad et al., 2010; et al, 2010a).

هضم به وسیله آنزیم‌های گوارشی در تعداد زیادی از بال‌پولکداران توصیف شده است. از جمله مطالعه فعالیت‌های پروتئازی روده میانی در لارو ۱۲ گونه مختلف پروانه (Christeller et al., 1992)، شب‌پره سیب‌زمینی گونه *Tecia solanivora* (Povolny) (Valensia-Jimenes, 2008)، کرم ساقه‌خوار برنج، *Chilo suppressalis* Walker (Zibae et al., 2008)، کرم قوزه پنبه، *H. armigera* (Rahimi Namin et al., 2014؛ Naseri et al., 2014b؛ Naseri et al., 2014؛ Kotkar et al., 2009) مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین Mansouri et al. (2013) فعالیت آنزیم‌های گوارشی را به صورت توام با شاخص‌های تغذیه‌ای بید سیب‌زمینی مطالعه نموده‌اند و گزارش کردند که رقم مورن به دلیل سفتی بالای بافت گوشت غده نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها سبب افزایش ترشح آنزیم جهت هضم غذای خورده شده است. از آنجا که تاکنون در مورد شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت‌های آنزیم‌های پروتئازی روده میانی لارو شب‌پره پوستخوار میوه پسته روی ارقام مختلف پسته اطلاعاتی وجود ندارد، لذا مطالعه روی میوه ارقام مهم و با بیشترین سطح زیر کشت در کشور ضروری است. هدف از این تحقیق، ارزیابی تعدادی از شاخص‌های فیزیولوژیک از جمله شاخص‌های تغذیه‌ای و میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئازی لارو شب‌پره پوستخوار میوه پسته روی میوه پنج رقم پسته مورد مطالعه بود.

مواد و روش‌ها

ارزیابی شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای شب‌پره پوستخوار میوه پسته در شرایط آزمایشگاهی

در ابتدا، تعدادی خوشه پسته آلوده به تخم و لارو سن اول آفت از یک باغ آلوده به آفت در حاشیه مسیر رفسنجان به زرند با مختصات طول جغرافیایی ۳۰ درجه، ۲۹ دقیقه و ۵۸/۷۷ ثانیه شرقی و عرض جغرافیایی ۵۶ درجه، ۲ دقیقه و ۲۲/۵۹ ثانیه شمالی در اوایل خردادماه جمع‌آوری شدند و با قرار دادن در ظروف با درب توری به ابعاد ۲۴×۱۷×۱۰ سانتی‌متر به آزمایشگاه منتقل شدند. برای اطمینان از سالم بودن و پارازیت نبودن، لاروها در شرایط آزمایشگاهی در اتاقک پرورش (دمای ۲۵±۱، رطوبت نسبی ۴۵±۵ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت (تاریکی: روشنایی) نگهداری شدند. شفیره‌های تشکیل شده به ظروف جدید با ابعاد فوق‌الذکر منتقل شدند و پس از ظهور حشرات کامل، روزانه میوه پسته در ظروف قرار داده شد. میوه‌های آلوده به لارو سن اول آفت به ظروف پلاستیکی به ابعاد ۸/۵×۶/۵×۴ سانتی‌متر و با درپوش توری قرار داده شدند و روزانه میوه جدید پسته برای تغذیه آن‌ها قرار داده شد. سپس برای شروع مطالعه شاخص‌های تغذیه‌ای از لاروهای سن سوم و چهارم با وزن اولیه برابر استفاده شد.

میوه‌های پسته ارقام آزمایشی شامل پنج رقم اوحدی، کله قوچی، ممتاز، اکبری و احمد آقایی از باغ کلکسیون ایستگاه مرکز تحقیقات پسته رفسنجان که سابقه هیچ‌گونه سم‌پاشی و محلول‌پاشی نداشتند تهیه شدند. در هر تکرار (۱۰ تکرار در هر رقم) یک میوه پسته و تعداد یک لارو با وزن تقریبی سه میلی‌گرم داخل یک ظرف پلاستیکی به ابعاد ۸/۵×۶/۵×۴ سانتی‌متر و با درپوش توری قرار داده شدند و سپس ظروف آزمایشی در داخل اتاقک پرورش قرار داده شد. هر ۲۴ ساعت یک مرتبه، همه لاروها، غذای باقیمانده و فضولات لاروی تولید شده توسط آن‌ها به طور جداگانه توزین شدند. در هر مرتبه تعویض غذا، غذای باقیمانده (میوه قبلی مورد تغذیه قرار گرفته) و فضولات لاروی در پتری شیشه‌ای با قطر ۹ سانتی‌متر به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس گذاشته شدند. آزمایش به مدت یک هفته انجام شد. از آنجایی که لاروهای آفت می‌بایست تا پایان آزمایش مورد استفاده قرار گیرند و امکان اندازه‌گیری وزن خشک آن‌ها نبود لذا، جهت محاسبه وزن

خشک به طور تصادفی تعداد ۲۰ لارو از کلنی پرورش خارج و پس از غوطه‌ور نمودن در اتانول ۹۶ درجه، لاروها داخل پتری شیشه‌ای قرار داده شدند و تا زمان تثبیت وزن خشک در داخل آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. درصد کاهش رطوبت زیست توده لاروی برای تعیین وزن خشک لاروهای پرورش یافته روی میوه هر رقم پسته محاسبه شد. هم‌چنین برای تعیین میزان کاهش رطوبت طبیعی میوه‌های پسته، تعداد ۱۰ میوه پسته از هر رقم به تفکیک داخل ظروف مشابه ظروف آزمایشی و در شرایط مشابه آزمایش تعیین شاخص‌های تغذیه‌ای قرار داده شدند. در نهایت درصد کاهش وزن لاروی و کاهش وزن میوه‌های پسته از وزن خشک غذای خورده شده کسر شد (Mansouri et al., 2013; Hemati et al., 2012). شاخص‌های تغذیه‌ای *A. comaroffi* روی ارقام مختلف پسته با استفاده از فرمول‌های ارائه شده توسط Waldbauer (1968) محاسبه شدند:

شاخص مصرف، $AD = E - F/E$: Approximate Digestibility، شاخص $CI = E/A$: Consumption Index، شاخص هضم شونده‌گی غذا، $ECI = P/E$: Efficiency of Conversion of Ingested Food، شاخص بازدهی تبدیل غذای بلعیده شده، $ECD = P/E - F$: Efficiency of Conversion of Digested Food، شاخص بازدهی تبدیل غذای هضم شده، $RGR = E/A \cdot T$: Relative Growth Rate، نرخ مصرف نسبی، $RCR = E/A \cdot T$: Relative Consumption Rate، نرخ رشد نسبی، $E =$ وزن غذای خورده شده (میلی‌گرم)، $A =$ میانگین وزن لاروها در طول دوره (میلی‌گرم)، $F =$ وزن فضولات تولید شده (میلی‌گرم)، $P =$ افزایش وزن لاروها (میلی‌گرم) و $T =$ دوره زمانی مصرف غذا (روز).

مطالعه فعالیت پروتئازی کل لاروهای پرورش یافته روی پوست میوه ارقام مختلف پسته

تعداد ۲۰ عدد لارو با وزن تقریبی ۱۰ میلی‌گرم آفت روی پوست هر یک ارقام پسته مورد مطالعه به مدت ۲۴ ساعت پرورش داده و سپس روی قطعات یخ بی‌حس شده و به دقت زیر استریومیکروسکوپ تشریح شدند. روده‌های میانی لاروها با آب مقطر سرد شستشو شده و از بافت‌های چربی زاید پاکسازی شد. روده‌های میانی مربوط به لاروهای تغذیه کرده از هر رقم در یک میلی‌لیتر آب مقطر سرد در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شده و پس از هم‌وزن‌نایز، مخلوط‌های همگن حاصل در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت $(\times g) 16000$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. روشن‌بین‌های حاصل به منظور سنجش فعالیت پروتئولیتیک روده‌ی میانی لارو آفت مورد استفاده قرار گرفت. روشن‌بین‌های حاصل جمع‌آوری شده و تا زمان انجام آزمایش‌های سنجش فعالیت‌های پروتئازی در دمای ۲۴- درجه سلسیوس در فریزر نگهداری شد (Mansouri et al., 2013; Naseri et al., 2010; Hosseinaveh et al., 2007). برای آزمایش‌های مربوط به تعیین اسیدیته بهینه برای فعالیت‌های آنزیمی دو بافر شامل فسفات-بورات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با پوشش دامنه‌ای وسیع از اسیدیته‌های قلیایی (اسیدیته‌های ۷ تا ۱۲) و سوکسینات-گلایسین-۲، مورفو لینو اتان سولفونیک اسید ۱۰ میلی‌مولار با پوشش دامنه‌ای گسترده از اسیدیته‌های قلیایی و اسیدی (اسیدیته ۳ تا ۱۲) در نظر گرفته شد. برای سنجش فعالیت پروتئازی کل عصاره روده میانی لارو *A. comaroffi* در اسیدیته‌های مختلف (اسیدیته‌ی ۷ تا ۱۲) از سوسترای پروتئینی آزوکازئین و با روش Elpidina et al. (2001) استفاده شد. جهت تعیین میزان فعالیت آنزیمی پروتئازی جذب هر کدام از نمونه‌ها در طول موج ۴۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر استفاده شد. هر یک از آزمایش‌های مربوط به تیمار و شاهد در سه تکرار انجام شد (Mansouri et al., 2013).

اندازه‌گیری پروتئین کل میوه ارقام مختلف پسته

به این منظور یک گرم بافت تر (پوست رویی) از میوه هر رقم در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷/۲ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتیفریژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. از محلول رویی برای سنجش پروتئین استفاده گردید. برای سنجش مقدار پروتئین از روش Bradford (1976) استفاده شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی و پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از ده دقیقه جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید و این اندازه‌گیری برای هر رقم در سه تکرار انجام شد (Nadernejad et al., 2013).

تجزیه آماری

داده‌های شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیمی با استفاده از روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تجزیه شدند. هم‌چنین به منظور گروه‌بندی (تجزیه خوشه‌ای) ارقام مختلف پسته بر پایه، پروتئین کل میوه، شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیمی لارو *A. comaroffi* از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. هم‌چنین همبستگی بین میزان پروتئین پوست میوه ارقام پسته و میزان فعالیت پروتئین لارو آفت به روش Pearson مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون LSD در سطح پنج درصد استفاده شد (Mansouri et al., 2013; Naseri et al., 2014; Rahimi Namin et al., 2014; Nasri et al., 2010a,b; Hemati et al., 2012).

نتایج

شاخص‌های تغذیه‌ای مختلف لارو *A. comaroffi* روی پوست میوه ارقام مختلف پسته

نتایج تجزیه داده‌های مربوط به شاخص‌های تغذیه‌ای نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین شاخص‌های مختلف تغذیه‌ای لاروهای *A. comaroffi* پرورش‌یافته روی پوست میوه پسته پنج رقم پسته وجود دارد (ECD: $F_{4,95}=35/18$, $P \leq 0/001$; AD: $F_{4,95}=18/22$, $P=0/06$; CI: $F_{4,95}=5/13$, $P \leq 0/001$) نتایج (RCR: $F_{4,95}=19/04$, $P \leq 0/001$; RGR: $F_{4,95}=14/32$, $P=0/02$; ECI: $F_{4,95}=37/87$, $P \leq 0/001$) محاسبه شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای *A. comaroffi* در جدول ۱ مشخص شده است. بیش‌ترین مقدار شاخص مصرف و بیش‌ترین شاخص تقریبی هضم‌شوندگی در لاروهای پرورش‌یافته روی پوست میوه رقم ممتاز و کمترین مقدار شاخص مصرف روی رقم اوحدی به دست آمد. کمترین و بیشترین مقادیر شاخص‌های بازدهی غذای خورده شده روی رقم اوحدی و ممتاز مشاهده شد. مقادیر نرخ مصرف نسبی و نرخ رشد نسبی روی رقم احمدآقایی به‌طور معنی‌داری کمتر از این مقادیر روی سایر ارقام بود. (جدول ۱).

فعالیت پروتئولیتیک کل

فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره‌های روده میانی لاروهای *A. comaroffi* تغذیه شده با میوه‌های ارقام مورد آزمایش با استفاده از آزوکازین به عنوان سوبسترا (اسیدیته ۱۲) با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد

(شکل ۱). مقادیر فعالیت پروتئولیکی در عصاره روده میانی لاروهای تغذیه شده با پوست میوه ارقام اکبری، اوحدی به طور معنی‌داری کمتر از سایر لاروهای مورد آزمایش بود. بیش‌ترین فعالیت پروتئازی در لاروهای تغذیه کرده روی پوست میوه رقم ممتاز ($5/290 \pm 0/227$ U/mg) مشاهده شد (شکل ۱).

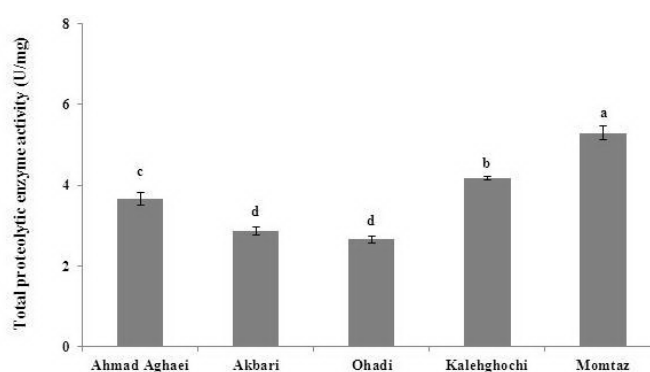
جدول ۱- شاخص‌های تغذیه‌ای (میانگین \pm خطای استاندارد) لاروهای شب‌پره پوست‌خوار میوه پسته روی پوست میوه پنج رقم پسته

Table 1. Feeding indices (Mean \pm SE) of *A. comaroffi* larvae on skin of fruit of five pistachio varieties

RGR (mg/mg/d)	RCR (mg/mg/d)	(%)ECD	(%)ECI	(%)AD	CI	Pistachio varieties
0.51 \pm 0.016 d	0.10 \pm 0.004 d	27.76 \pm 1.14 c	21.06 \pm 0.78 c	69.89 \pm 1.14 bc	3.5 \pm 0.09 c	Ahmad Aghaei
0.53 \pm 0.01 c	0.11 \pm 0.004 c	29.92 \pm 0.85 b	23.41 \pm 0.9 b	68.87 \pm 0.33 c	3.47 \pm 0.11 c	Akbari
0.53 \pm 0.015 c	0.11 \pm 0.003 c	24.96 \pm 0.7 d	19.36 \pm 0.77 d	67.27 \pm 1.83 c	3.17 \pm 0.06 d	Ohadi
0.56 \pm 0.012 b	0.12 \pm 0.004 b	28.51 \pm 0.41 b	25.42 \pm 0.63 b	71.80 \pm 1.38 b	3.72 \pm 0.07 b	Kalehghochi
0.58 \pm 0.017 a	0.13 \pm 0.005 a	32.87 \pm 0.69 a	29.10 \pm 0.91 a	75.01 \pm 0.93 a	4.18 \pm 0.09 a	Momtaz

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه بین میانگین‌ها می‌باشند (بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد).

The means followed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$, LSD).

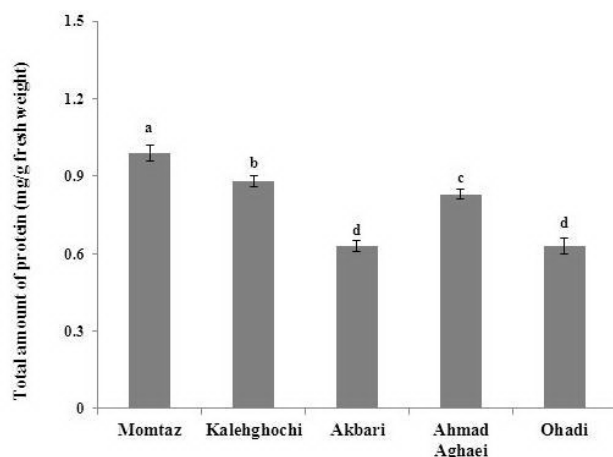


شکل ۱- میانگین (\pm اشتباه استاندارد) فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره روده میانی لاروهای *A. comaroffi* تغذیه شده با پوست میوه ارقام مختلف پسته

Fig. 1. Mean (\pm SE) total proteolytic activity of midgut extract from *A. comaroffi* larvae feeding on skin of fruit of five pistachio varieties

میزان پروتئین کل پوست میوه پنج رقم پسته

میزان پروتئین کل در پوست میوه ارقام مختلف پسته مورد آزمایش دارای اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۲). به طوری‌که این مقدار از $0/99 \pm 0/02$ میلی‌گرم بر گرم وزن تر پوست میوه رقم ممتاز تا $0/63 \pm 0/03$ در رقم اوحدی و $0/63 \pm 0/02$ میلی‌گرم بر وزن تر در پوست میوه رقم اکبری متغیر بود (شکل ۲).



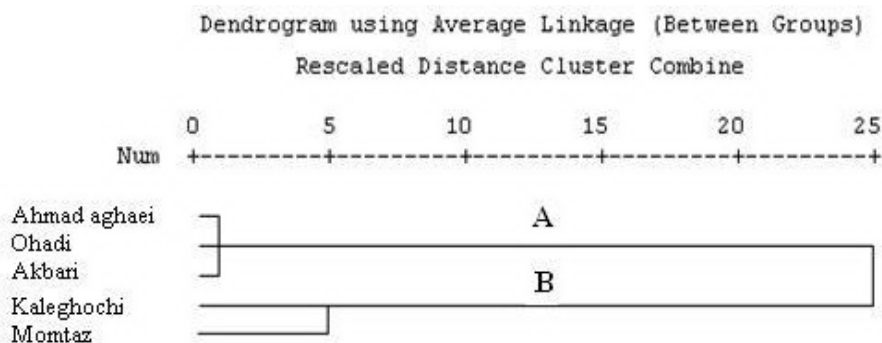
شکل ۲- میانگین (±) اشتباه استاندارد) میزان پروتئین کل پوست میوه پنج رقم پسته

Fig. 2. Mean (\pm SE) total protein in skin of fruit of five pistachio varieties

تجزیه خوشه‌ای ارقام مختلف پسته بر مبنای پروتئین کل پوست میوه پسته ارقام مختلف،

شاخص‌های تغذیه‌ای ECI و ECD، فعالیت پروتئازی عصاره روده میانی لارو *A. comaroffi*

در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مجموع داده‌های مربوط به شاخص‌های تغذیه‌ای مهم شامل ECI و ECD، فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو آفت و همچنین میزان پروتئین پوست میوه پنج رقم پسته مورد آزمایش به دست آمده، ارقام احمدآقایی، اوحدی و اکبری در زیرگروه A و ارقام کله قوچی و ممتاز در زیر گروه B گروه‌بندی شدند (شکل ۳). همچنین همبستگی مثبت معنی‌داری بین میزان پروتئین پوست میوه و فعالیت پروتئازی لارو وجود داشت ($r=0/9$ ، $P=0/003$).



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام مختلف پسته بر مبنای میزان پروتئین کل پوست میوه، شاخص‌های تغذیه‌ای ECI، ECD و فعالیت پروتئولیتیک روده‌ی میانی لاروهای *A. comaroffi* پرورش یافته روی پوست میوه ارقام مختلف پسته.

Fig. 3. Dendrogram of cluster analysis of different pistachio varieties based on total protein in skin of fruit, feeding indices of ECI, ECD and midgut proteolytic activity of *A. comaroffi* larvae reared on skin of different pistachio varieties.

بحث

کیفیت مواد غذایی و وجود متابولیت‌های ثانویه گیاهی در گیاهان میزبان یک عامل کلیدی تعیین کننده در

میزان بقا و رشد و نمو لاروهای حشرات گیاهخوار است (Awmack & Rayapuram, & Baldwin, 2006)

(Leather, 2002). در این مطالعه مشخص شد که میزان پروتئین کل در رقم حساس ممتاز از سایر ارقام بیشتر بود. لاروهای پرورش‌یافته روی رقم ممتاز با تغذیه بیشتر از پوست میوه، میزان پروتئین بیشتری نسبت به لاروهای پرورش‌یافته روی چهار رقم پسته دیگر به‌دست آورده بودند و در نتیجه پس از هضم و جذب آن سبب افزایش وزن لاروهای پرورش‌یافته و به تبع آن افزایش اکثر شاخص‌های تغذیه‌ای شد. بر اساس مطالعه (Rupali *et al.*, 2003). به طور معمول در ارقام گیاهی حساس، میزان پروتئین‌ها و قندها بیشتر از ارقام مقاوم می‌باشد.

در این مطالعه وجود اختلاف معنی‌دار در شاخص‌های تغذیه‌ای *A. comaroffi* به ویژه شاخص بازدهی تبدیل غذای بلعیده شده (ECI) و شاخص بازدهی تبدیل غذای هضم شده (ECD) روی ارقام مختلف پسته نشان داد که نوع رقم گیاه میزبان می‌تواند ارزش غذایی آن را تغییر دهد. در بین شاخص‌های تغذیه‌ای، شاخص ECI نشان‌دهنده‌ی توانایی یک حشره برای استفاده از غذای مورد نیاز جهت رشد و نمو بوده و همچنین ECD شاخصی است که افزایش یا کاهش عمومی نسبتی از هضم غذای متابولیزه شده را برای تولید انرژی نشان می‌دهد (Nathan *et al.*, 2005). نتایج حاصل از شاخص‌های ECI و ECD نشان داد که بیش‌ترین مقدار تغذیه آفت برای جذب بیشتر مواد غذایی روی رقم ممتاز از جمله پروتئین، بیشتر بود و حاکی از بالا بودن میزان تبدیل غذای خورده شده و هضم شده به زیست‌توده بدن در مقایسه با سایر ارقام پسته می‌باشد. به عقیده پژوهشگران، میزان مصرف غذا به قابلیت هضم غذا و کارایی تبدیل غذای خورده شده به زیست توده بستگی دارد (Batista Pereira *et al.*, 2002). همچنین این تفاوت می‌تواند به دلیل وجود اختلاف در نیازهای غذایی حشره در طول مراحل مختلف رشد و نمو باشد که نتیجه‌ی این تفاوت معمولاً با تغییر در مصرف غذا و رفتار تغذیه‌ای همراه است (Barton Browne & Raubenheimer, 2003).

نتایج حاصل از مطالعه فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئازی نشان داد که در ارقام اوحدی، اکبری و احمدآقایی که شاخص مصرف و ECI و ECD پایین‌تری داشتند میزان ترشح و فعالیت آنزیم‌ها نیز پایین بود. همچنین میزان پروتئین پوست میوه نیز در این ارقام کم‌تر از سایر ارقام بود. در مقابل در لاروهای پرورش یافته روی ارقام ممتاز و کله قوچی که بالاترین میزان شاخص مصرف، ECI و ECD را در مقایسه با لاروهای پرورش‌یافته روی سایر ارقام داشتند بالاترین میزان فعالیت آنزیمی مشاهده شد. (Rahimi Namin *et al.*, 2014). با ارزیابی شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو کرم قوزه پنبه روی هفت رقم لوبیا نشان دادند که پایین‌ترین میزان فعالیت پروتئازی لاروی روی رقمی که دارای کم‌ترین میزان پروتئین بود (رقم تلاش) مشاهده شد. همچنین در مطالعه مذکور کمترین مقادیر ECI و ECD نیز در لاروهای سن چهارم *H. armigera* پرورش‌یافته روی لوبیای رقم تلاش ثبت شد. در مطالعه‌ی دیگر که فعالیت آنزیم‌های پروتئازی و آمیلازی و متابولیسم پروتئین لمبه گندم، *Trogoderma granarium* Everts، روی رقم جو انجام شد، مشخص شد که لاروهای تغذیه‌شده با بذر جو لاین ۳۰ (Line 30) که دارای بالاترین میزان پروتئین بین سایر ارقام بود، بیشترین فعالیت آنزیمی پروتئازی را داشتند (Mardani-Talaei *et al.*, 2017). نتایج تحقیق (Mardani-Talaei *et al.*, 2017) و نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که هضم پروتئین موجود در غذا به کمک فعالیت بهتر و بیشتر آنزیم‌های گوارشی پروتئازی سبب افزایش زیست توده لاروی و در نتیجه شاخص‌های تغذیه‌ای شده است. پایین بودن مقدار ECD و ECI لاروی شب‌پره پوستخوار میوه پسته روی رقم اوحدی و احمدآقایی ممکن است به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی ثانوی با اثرات نامطلوب روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی، وجود مهارکننده‌های پروتئاز و یا ارزش غذایی پایین در این رقم‌ها می‌باشد (Naseri *et al.*, 2010b). (Naseri *et al.*, 2014) با مطالعه فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های تغذیه‌ای لارو کرم قوزه پنبه که روی

تعدادی از ارقام گوجه‌فرنگی پرورش داده شده بودند تفاوت معنی‌داری بین میزان فعالیت پروتئازی و آمیلازی، شاخص‌های تغذیه‌ای و وزن شفیره آفت مشاهده نمودند به طوری‌که لاروهای تغذیه‌شده با رقم Sun 6108 fl کم‌ترین میزان فعالیت آنزیمی، پایین‌ترین شاخص‌های تغذیه‌ای و کمترین میانگین وزن شفیره و لاروهای پرورش‌یافته روی رقم Cal JN3 بیش‌ترین مقادیر این شاخص‌ها را دارا بودند (Nasari et al., 2014). در تحقیق حاضر نیز همبستگی مثبت معنی‌داری بین میزان پروتئین پوست میوه و فعالیت پروتئازی وجود داشت که بیانگر ارتباط مستقیم فعالیت آنزیمی پروتئازی برای هضم و جذب پروتئین موجود در پوست میوه هر رقم است. در تحقیق حاضر، بیش‌ترین مقادیر شاخص‌های هضم شونده‌ی غذا (AD)، نرخ مصرف نسبی (RCR) و نرخ رشد نسبی (RGR) لاروی مربوط به رقم ممتاز بود که نشان‌دهنده‌ی مناسب بودن این رقم برای تغذیه‌ی لاروهای شب پره پوستخوار میوه پسته در مقایسه با سایر ارقام می‌باشد. بالا بودن شاخص هضم شونده‌ی غذا (AD) نشان‌دهنده آن است که لارو حداکثر غذای مصرف شده را هضم نموده است و هم‌چنین بالا بودن میزان دو شاخص RCR و RGR بیانگر آن است که هم میزان مصرف غذا و هم میزان غذای هضم و جذب شده‌ای که به زیست توده حشره اضافه شده در لاروهای تغذیه‌شده با این رقم بالاترین بود که در نهایت سبب بیشترین افزایش رشد لارو نسبت به لاروهای تغذیه‌شده با سایر ارقام شد. در مقابل پایین بودن این سه شاخص در لاروهای پرورش‌یافته روی میوه سه رقم پسته اوحدی، احمدآقایی و اکبری نشان‌دهنده هضم کمتر غذای مصرف شده و به تبع آن رشد کمتر لارو آفت روی آن‌ها بوده است.

بر اساس نتیجه حاصل از تجزیه خوشه‌ای که از مجموع داده‌های مربوط به شاخص‌های تغذیه‌ای مهم شامل ECI و ECD، فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو آفت و هم‌چنین میزان پروتئین پوست میوه پنج رقم پسته مورد آزمایش به دست آمد، گروه A شامل میوه ارقام احمدآقایی، اوحدی و اکبری به عنوان میزبان‌های نامناسب و گروه B، متشکل از ارقام کله قوچی و ممتاز به عنوان میزبان‌های مناسب برای *A. comaroffi* معرفی شدند. احتمالاً وجود عامل آنتی‌بیوزی مثل حضور بعضی از مهارکننده‌های آنزیمی در این سه رقم (گروه A) منجر به کاهش میزان تغذیه لاروهای آفت روی این ارقام بود که انجام مطالعه‌های بیشتر در این می تواند این موضوع را تایید نماید. در تحقیق حاضر نیز ارقام ممتاز و کله قوچی مناسب‌ترین ارقام برای تغذیه لارو *A. comaroffi* در میان ارقام مورد بررسی معرفی شدند که می‌تواند به دلیل محتوای پروتئینی بالا و در نتیجه ارزش غذایی بالاتر این دو رقم در مقایسه با سایر ارقام مورد آزمایش مربوط باشد. این آفت در حال گسترش در بخش‌های مختلفی از باغات شهرستان‌های رفسنجان و سیرجان می‌باشد. لذا با توجه به این نکته و نیز بر اساس نتایج این تحقیق و مشخص شدن ارقام نسبتاً "حساس به خسارت این شب‌پره (ارقام ممتاز و کله قوچی) می‌بایست قانون‌های آلودگی به این آفت به‌ویژه روی ارقام حساس با دقت مورد بررسی و بازدید مستمر قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدین وسیله مولفین از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته در حمایت مالی از انجام طرح مذکور به شماره ۱/۲۷۲۷ و کد ۴۱۹۲۰۷ تشکر می‌نمایند. هم‌چنین از موسسه تحقیقات پسته کشور و به ویژه جناب آقای دکتر مهدی بصیرت عضو محترم هیات علمی موسسه تحقیقات پسته که نهایت همکاری را در اجرای این طرح تحقیقاتی داشته‌اند قدردانی می‌گردد.

References

- Awmack , C. S. & Leather, S. R.** (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 47, 817–44.
- Barton Browne, L. & Raubenheimer, D.** (2003) Ontogenetic changes in the rate of ingestion and estimates of food consumption in fourth and fifth instar *Helicoverpa armigera* caterpillars. *Journal of Insect Physiology* 49, 63–71.
- Basirat, M., Golizadeh, A., Fathi, S. A. A. & Hassanpour, M.** (2015) Demography of pistachio fruit hull borer moth, *Arimania komaroffi* (Lepidoptera: Pyralidae) on three pistachio cultivars under laboratory condition. *Iranian Journal of Plant Protection* 46, 249–258. [In Persian with English summary]
- Batista Pereira, G. L., Petacci, F., Fernandes, B. J., Correa, A. G., Vieira, P. C., Fatima da Silva, M. & Malaspina, O.** (2002) Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science* 58, 503–507.
- Bemani, M., Izadi, H., Mahdian, K., Khani, A. & Samih, M A.** (2012) Study on the physiology of diapause, cold hardiness and supercooling point of overwintering pupae of the pistachio fruit hull borer, *Arimania comaroffi*. *Journal of Insect Physiology* 58, 897–902.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Christeller, J. T., Laing, W. A., Markwick, N. P. & Burgess, E. P. J.** (1992) Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22, 735–746.
- Elpidina E. N., Vinokurov K. S., Gromenko, V. A., Rudenshaya, Y. A., Dunaevsky Y. E. & Zhuzhikov, D. P.** (2001) Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 206–216.
- Hemati, S. A., Naseri, B., Nouri Ganbalani, G., Rafiee Dastjerdi, H. & Golizadeh, A.** (2012) Effect of Different Host Plants on Nutritional Indices of the Pod Borer, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science* 12, 1–15.
- Hosseinaveh, V., Bandani, A., Azmayeshfard, P., Hosseinkhani, S. & Kazemi, M.** (2007) Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera). *Journal of Stored Products Research* 43, 515–522.
- Kotkar, H. M., Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Gupta, V. S. & Giri, A. P.** (2009) Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *Journal of Insect Physiology* 55, 663–670.
- Mansouri, S. M., Nouri-Ganbalani, G., Fathi, S. A. A., Naseri, B. & Razmjou, J.** (2013) Nutritional indices and midgut enzymatic activity of *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae fed different potato germplasms. *Journal of Economic Entomology* 106, 1018–1024.
- Mardani-Talae, M., Zibae, A., Abedi, Z. & Golizadeh, A.** (2017) Digestion and protein metabolism of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) fed on different barley varieties. *Journal of Stored Products Research* 73, 37–41.
- Mehrnejad, M. R.** (2001) The current status of pistachio pests in Iran. XI Grempa seminar on pistachios and almonds, Ciheam. 315–322.
- Nadernejad, N., Ahmadimoghadam, A., Hossyinfard, J. & Poorseyedi, S.** (2013) Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Iranian Journal of Plant Biology* 5, 95–109. [In Persian with English summary]

- Nathan, S. S., Chung, P. G. & Murugan, K.** (2005) Effect of biopesticides applied separately or together on nutritional indices of the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis*. *Phytoparasitica* 33, 187–195.
- Naseri, B., Fathipour, Y., Moharramipour, S. & Hosseininaveh, V.** (2010a) Nutritional indices of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on 13 soybean varieties. *Journal of Insect Science* 10, 1–14.
- Naseri, B., Fathipour, Y., Moharramipour, S., Hosseininaveh, V. & Gatehouse, A. M. R.** (2010b) Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. *Pest Management Science* 66, 1316–1323.
- Naseri, B., Kouhi, D., Razmjou, J. & Golizadeh, A.** (2014) Digestive enzymatic activity and nutritional responses of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed various tomato cultivars. *Journal of Economic Entomology* 107, 1655–1661.
- Rahimi Namin, F., Naseri, B. & Razmjou, J.** (2014) Nutritional performance and activity of some digestive enzymes of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, in response to seven tested bean cultivars. *Journal of Insect Science* 14, 1–18.
- Rayapuram, C. & Baldwin, I. T.** (2006) Using nutritional indices to study LOX3-dependent insect resistance. *Plant Cell Environment* 29, 1585–1594.
- Rupali, G., Jyoti, R. & Chavan, J. K.** (2003) Biochemical analysis of chickpea cultivars in relation to pod borer infestation. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry* 16, 47–48.
- Samet, Kh.** (1985) The life cycle of *Arimania komaroffi*, a new pest of *Pistacia vera* in Iran. *Entomologist's gazette* 36, 113–115.
- Sciber, J. M. & Slansky, F.** (1981) The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review of Entomology* 26, 183–211.
- Slansky, F. Jr.** (1990) Insect nutritional ecology as a basis for studying host plant resistance. *Florida Entomologist* 73, 359–378.
- Soleimannejad, S., Fathipour, Y., Moharramipour, S. & Zalucki, M. P.** (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, 1420–1430.
- Valencia-Jime'nez, A., Arboleda, J. W., Lopez Avila, A. & Grossi-de-Sa, M. F.** (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.
- Waldbauer, G. P.** (1968) The consumption and utilization of food by insects. *Advanced in Insect Physiology* 5, 229–288.
- Zibae, A., Bandani, A. A., Kafil, M. & Ramzi, S.** (2008) Characterization of α -amylase in the midgut and the salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11, 201–205.