نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹۰ - ۳۱(۲): ۱۷-۳۲

اجزای ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین در حشرات کامل زمستان‌گذران سوسک برگ‌خوار نارون، *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomelidae)

شقایق سودی[۱]، سعید محرمی‌پور[۱و*]، محسن برزگر[۲] و مریم عطاپور[۱]

۱- دانشگاه‌تربیت مدرس، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه حشره‌شناسی کشاورزی، تهران، صندوق پستی ۳۳۶-۱۴۱۱۵، ۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، صندوق پستی ۳۳۶-۱۴۱۱۵.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moharami@modares.ac.ir

Cryoprotectant contents of overwintering adults of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomelidae)

Sh. Soudi[1], S. Moharramipour[1&*], M. Barzegar[2] and M. Atapour[1]

1. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, P.O Box: 14115-336, Tehran, Iran, 2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. P.O Box: 14115-336, Tehran, Iran.

*Corresponding author E-mail: moharami@modares.ac.ir

چکیده

سوسک برگ‌خوار نارون، *Xanthogaleruca luteola* (Muller)، از مهم‌ترین آفات درختان نارون محسوب می‌شود که زمستان را به شکل حشرات کامل در حالت دیاپوز سپری می‌کند. به‌منظور شناسایی ترکیبات قندی ضد یخ و تغییرات فصلی آن‌ها، حشرات کامل به‌صورت ماهیانه از مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸ جمع‌آوری و ترکیبات قندهای الکلی اصلی موجود در بدن آن‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. مایواینوزیتول، تری‌هالوز، گلوکز و گلیسرول از مهم‌ترین ترکیبات ضد یخ شناسایی‌شده در بدن حشرات کامل زمستان‌گذران بودند. غلظت مایواینوزیتول به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین ترکیبات ضد یخ شناسایی‌شده در حشرات زمستان‌گذران سوسک برگ‌خوار نارون رابطه‌ی معکوس و معنی‌داری با تغییرات دما نشان داد ($P = ۰/۰۱۴$، $r = -۰/۸۱۴$). به‌طوری‌که با سرد شدن هوا غلظت آن در آذر ماه به حداکثر ۲/۷ ± ۳۲/۶ میکرومول در هر گرم وزن تر افزایش یافت، درحالی‌که این ترکیب در فروردین ماه به حداقل ۰/٤ ± ۳/۰ میکرومول در هر گرم وزن تر حشره‌ی کامل کاهش یافت. اما بیش‌ترین مجموع کل ترکیبات قندی و پلی‌ال‌ها در دی ماه (۷/٦ ± ۱۰۰/۷ میکرومول در هر گرم وزن تر) مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد مایواینوزیتول، تری‌هالوز و گلوکز نقش مهمی را در تحمل سوسک برگ‌خوار نارون به سرما ایفا می‌کنند.

واژگان کلیدی: سوسک برگ‌خوار نارون، دیاپوز، زمستان‌گذرانی، ترکیبات ضد یخ، مایواینوزیتول

Abstract

The elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Muller), is one of the most destructive pests of elm trees that overwinters as diapausing adult. The main cryoprotectants and their seasonal fluctuations in the elm leaf beetles were analyzed based on the monthly level of polyhydric alcohol from October 2008 through June 2009, using high performance liquid chromatography (HPLC). The compounds *myo*-inositol, trehalose, glucose and glycerol were found to be the most important polyols in the overwintering

دریافت: ۱۳۸۹/۳/۱۱، پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۷.

Archive of SID

www.SID.ir

adults, of which *myo*-inositol content exhibited an inversely significant correlation with temperature fluctuations ($r = -0.814$, $P = 0.014$). The highest level of *myo*-inositol was observed in December (32.6 ± 2.7 µmol g^{-1} fresh body weight), while its lowest level was recorded in April (3.0 ± 0.4 µmol g^{-1} fresh body weight). The total concentration of all cryoprotectants was 100.7 ± 7.6 µmol g^{-1} fresh body weights in January. The results underline the influential role of *myo*-inositol, trehalose and glucose compounds in enhancing the cold tolerance of elm leaf beetles and their chance of survival during freezing winter days.
Key words: elm leaf beetle, diapause, overwintering, cryoprotectants, *myo*-inositol

مقدمه

گونه‌های نارون، *Ulmus* spp.، از جمله درختان پهن‌برگی هستند که به‌علت دارا بودن قابلیت‌های زیستی و صنعتی از دیرباز مورد توجه قرار گرفته‌اند. تاکنون ۸٦ گونه از حشرات و کنه‌های خسارت‌زای این درختان از ایران گزارش شده است که تنها تعداد کمی از آن‌ها به‌علت خسارت بالا و دامنه‌ی پراکنش وسیع به‌عنوان آفت درجه‌ی یک این درختان محسوب می‌شوند که در میان آن‌ها سوسک برگ‌خوار نارون، *Xanthogaleruca luteola* (Muller)، از اهمیت بیشتری برخوردار است (Dahlsten, 1994). این آفت برای نخستین بار در سال ۱۸۰۳ میلادی از ایالت مریلند در آمریکا (Hance *et al*., 1994; Miller & Ware, 2001) و در ایران نیز در سال ۱۳۲٤ توسط افشار گزارش شد و در حال حاضر تقریباً در تمامی نقاط ایران انتشار یافته است (Davatchi & Moradeshaghi, 1962). سوسک برگ‌خوار نارون با تغذیه از برگ درختان نارون علاوه بر بدمنظره کردن تاج درختان، سبب کاهش کیفیت چوب، کاهش مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و ضعف آن‌ها در برابر حمله‌ی آفات ثانویه و سایر عوامل بیماری‌زا می‌شود (Brewer, 1973). این آفت بسته به شرایط جغرافیایی و محیطی در ایران ۲ تا ۳ نسل در سال دارد (Arbab *et al*., 1998) و زمستان را به‌صورت حشرات کامل در زیر پوستک درختان و سایر پناهگاه‌ها سپری می‌کند (Hance *et al*., 1994).

حشرات در طول دوره‌ی زمستان‌گذرانی باید تا حد امکان از اثرات نامطلوب دماهای پایین بر بدنشان اجتناب کنند، یکی از ویژگی‌های حشرات زمستان‌گذران تولید قندهای الکلی با وزن مولکولی کم می‌باشد. سنتز این قندها در طول دوره‌ی زمستان علاوه بر حشرات در تعدادی از موجودات زنده نظیر کرم‌ها (Holmstrup, 1995)، کنه‌ها و عنکبوت‌ها (Sømme, 1979)، پادمان (Sømme, 1982; Storey & Storey, 1992) و حتی در گیاهان (Levitt, 1980) نیز گزارش شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

گلیسرول معمول‌ترین قند الکلی در حشرات به‌شمار می‌آید، علاوه بر گلیسرول ترکیبات دیگری نظیر تری‌هالوز، سوربیتول، گلوکز و مانیتول نیز در بسیاری از حشرات زمستان‌گذران تولید می‌شود (Salt, 1961). گلوکز و تری‌هالوز در شفیره‌ی شب‌پره‌ی *Mamestra brassicae* L. (Goto *et al.*, 2000)؛ مایواینوزیتول، سایلواینوزیتول، تری‌هالوز و گلوکز در حشرات کامل سوسک *Aulacophora nigripennis* (Motschulsky) (Watanabe & Tanaka, 1998)؛ سوربیتول در شفیره‌های پروانه‌ی سفیده‌ی کلم، *Pieris brassicae* L. (Sømme, 1967)؛ گلیسرول، سوربیتول و گلوکز در تخم‌های کنه‌ی قرمز اروپایی، *Panonychus ulmi* (Koch) (Sømme, 1965)؛ تریتول و سوربیتول در حشرات کامل سوسک *Upis ceramboides* (L.) (Miller & Smith, 1975) و گلیسرول، سوربیتول و تری‌هالوز در لاروهای مگس *Eurosta solidaginis* (Fitch) (Morrissey & Baust, 1976) به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات قندی ضد یخ شناسایی شده‌اند. علی‌رغم تحقیقات متعددی که روی ترکیبات ضد یخ در بسیاری از حشرات صورت گرفته است ولی تاکنون گزارشی از ترکیبات ضد یخ در سوسک برگ‌خوار نارون به چاپ نرسیده است.

علاوه بر دماهای پایین، سنتز این ترکیبات در بسیاری از حشرات ارتباط تنگاتنگی با ورود به فاز دیاپوز دارد (Tsumuki & Kanehisa, 1978; Shimada, 1982; Furusawa *et al.*, 1987). حشرات با کمک سیستم هورمونی وارد فاز دیاپوز می‌شوند. در واقع دیاپوز نوعی رویداد ژنتیکی برنامه‌ریزی شده است که در پاسخ به شرایط محیطی نامساعد دمایی، رطوبتی، نوری و فقدان مواد غذایی اتفاق می‌افتد (Danks, 1987). در طول دوره‌ی دیاپوز ساز و کارهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلفی در اتباط با افزایش تحمل حشرات به سرما صورت می‌گیرد. سنتز ترکیبات قندی با وزن مولکولی پایین یکی از ساز و کارهای فیزیولوژیک در طول دوره‌ی دیاپوز محسوب می‌شود (Tsumuki & Kanehisa, 1978; Shimada, 1982; Furusawa *et al.*, 1987). مثلاً افزایش تدریجی گلیسرول و سوربیتول در حشرات برای نخستین‌بار در تخم‌های دیاپوزه‌ی پروانه‌ی کرم ابریشم، *Bombyx mori* L.، مشاهده شد (Chino, 1957). علاوه بر این حشره، افزایش تری‌هالوز در لاروهای دیاپوزه‌ی کرم سیب، *Cydia pomonella* (L.) (Khani *et al.*, 2007)؛ گلیسرول در لاروهای دیاپوزه‌ی کرم ساقه‌خوار برنج، *Chilo suppressalis* Walker،

Archive of SID

www.SID.ir

(Atapour & Moharramipour, 2009) و گلیسرول، سوربیتول، گلوکز و تری‌هالوز در لاروهای سوسک *Scolytus intricate* (Ratzeburgi) (Morrisey & Baust, 1976) گزارش شد.

ترکیبات فوق از طریق دو مکانیسم کلی سبب حفاظت موجود زنده در برابر سرما می‌شوند: (۱) خواص اسمزی این ترکیبات سبب کاهش سرعت تشکیل هسته‌های یخ می‌شود (Lovelock & Bishop, 1959) و (۲) علاوه بر این باعث پایداری غشاء سلولی و ساختارهای پروتئینی در زمان از دست دادن آب سلولی می‌گردد (Gekko & Timasheff, 1981a, 1981b; Crowe *et al*., 1992). گونه‌های حساس به یخزدگی با کاهش تدریجی نقطه‌ی انجماد تا حد امکان از یخزدگی اجتناب می‌کنند. در حشرات حساس به یخزدگی به ازای یک مول از این ترکیبات، نقطه‌ی ذوب ۱/۸۵ و نقطه‌ی انجماد ۳ تا ٤ درجه‌ی سلسیوس کاهش می‌یابد (Zachariassen, 1985). این ترکیبات در غلظت‌های پایین سبب پایداری ساختار غشاء سلولی می‌شوند (Williams, 1990) و از تغییر ساختار پروتئین‌ها در دماهای پایین و حتی دماهای بالاتر از نقطه‌ی انجماد جلوگیری می‌کنند (Storey & Storey, 1988). ازآنجاکه سوسک برگ‌خوار نارون زمستان را با موفقیت سپری کرده و سبب ایجاد خسارات سنگین در بهار سال بعد می‌شود، لذا مطالعه‌ی وضعیت دیاپوز و تحمل این آفت به سرما از اهمیت بالایی برخوردار است. این تحقیق به‌منظور شناخت ترکیبات ضد یخ مهمی که نقش به‌سزایی در تحمل این آفت به سرما دارد انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

جمع‌آوری نمونه از مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸ از روی درختان نارون دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس واقع در اتوبان تهران- کرج (′٤٤°۳۵ شمالی و ′۱۰°۵۱ شرقی، ارتفاع ۱۳۵۰ متر) به شکل تصادفی صورت گرفت. به‌منظور سهولت در نمونه‌برداری از اوایل شهریور تله‌های مقوایی به دور تنه‌ی درختان پیچیده شد و نمونه‌ها ماهانه از این تله‌ها جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده پس از اندازه‌گیری وزن بدن که به‌طور متوسط در طول دوره‌ی نمونه‌برداری به ازای هر فرد ۰/۳۷ ± ۱۰/۷۱ میلی‌گرم بود، داخل میکروتیوب‌های

Archive of SID

www.SID.ir

استریل و در دمای ۳۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند. دمای روزانه‌ی محیط نیز با استفاده از داده‌های ایستگاه هواشناسی مستقر در چیتگر که در فاصله‌ی یک کیلومتری از محل نمونه‌برداری قرار داشت حاصل شد.

اندازه‌گیری قندهای الکلی

برای استخراج و اندازه‌گیری میزان قندهای الکلی موجود در بدن، هر نمونه متشکل از سه حشره‌ی کامل در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد درون هاون چینی همگن و به داخل میکروتیوب‌های استریل ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس نمونه‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. قسمت بالایی نمونه از رسوب جدا و داخل میکروتیوب‌های استریل ریخته شد و سپس میکروتیوب‌ها در آون تحت خلاء (Mmert, model VS-1202V5, Germany) در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند تا حلال آن‌ها تبخیر شود. پس از تبخیر کامل حلال، ۲۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به رسوب باقی‌مانده اضافه و کاملاً مخلوط شد. قبل از تزریق نمونه به داخل دستگاه، نمونه‌ها به‌وسیله‌ی صافی سرسرنگی با منافذ ۰/٤٥ میکرومتر صاف شد. قندهای الکلی به‌وسیله‌ی دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Waters, Milford, MA, USA) مجهز به ستون تجزیه‌ی کربوهیدرات‌ها (Ca 59305-U, 300 × 7.8 mm, Supelco-Sigma Aldrich) جداسازی شد. فاز متحرک شامل آب، سرعت فاز متحرک یک میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست (Refractive Index Detector) بود. جداسازی قندها در دمای ۸۰ درجه‌ی سلسیوس برای ستون و آشکارساز انجام شد. فاز متحرک به‌وسیله‌ی گاز هلیوم گاززدایی شد. پس از تنظیمات دستگاه و پایدارشدن آن، نمونه‌ی قندی تهیه‌شده از کل بدن حشرات کامل به حجم ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام آن ثبت شد.

جهت اندازه‌گیری یا تجزیه‌ی کمی قندهای الکلی جداشده از روش رسم منحنی درجه‌بندی استفاده شد. برای این منظور استانداردهای گلوکز، تری‌هالوز، گلیسرول و مایواینوزیتول با غلظت‌های ۱۰۰ تا ٤۰۰۰ ppm به دستگاه تزریق و سپس منحنی استاندارد (سطح زیر پیک برابر غلظت) برای هر غلظت رسم شد. با توجه به زمان بازداری، نوع قند

Archive of SID

www.SID.ir

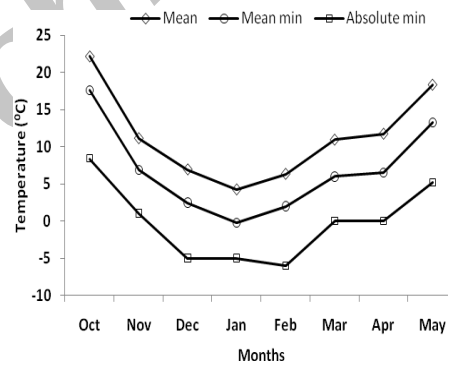
موجود در نمونه و با توجه به سطح زیر پیک و منحنی استاندارد، غلظت قند در هر نمونه اندازه‌گیری شد (Atapour *et al*., 2008).

تجزیه‌ی آماری

اطلاعات به‌دست آمده به‌صورت میانگین ± خطای معیار (mean ± standard error) گزارش شد. تجزیه‌ی داده‌ها با کمک تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و مقایسه‌ی میانگین تیمارهای مختلف با کمک آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (15.0) انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

به‌منظور بررسی تأثیر دما روی تغییرات ترکیبات شیمیایی بدن، میانگین دمای حداقل و دمای مطلق حداقل از ماه مهر ۱۳۸۷تا اردیبهشت ۱۳۸۸ با استفاده از داده‌های هواشناسی به‌دست آمد (شکل ۱). داده‌های هواشناسی، دی را سردترین ماه سال نشان داد. میانگین حداقل دما در دی‌ماه ۰/۲- و دمای مطلق حداقل ۵- درجه‌ی سلسیوس بود.



شکل ۱. میانگین ماهانه‌ی حداقل دما و دمای حداقل مطلق از مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸.

Fig. 1. Monthly mean of minimum temperature and absolute minimum temperature between October 2008 and June 2009.

Archive of SID

www.SID.ir

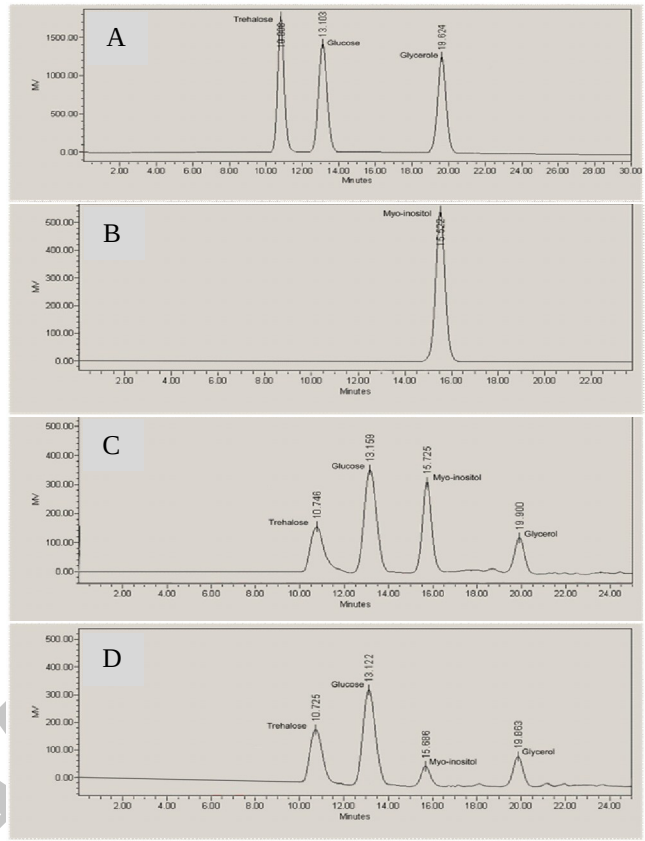
تجزیه‌ی قندهای بدن حشرات کامل نشان داد مایواینوزیتول، تری‌هالوز، گلوکز و گلیسرول ترکیبات اصلی ضد یخ در سوسک برگ‌خوار نارون محسوب می‌شوند (شکل ۲–C و D)، ضمن اینکه تغییرات غلظت این ترکیبات نیز طی ماه‌های مختلف به کمک دستگاه HPLC به‌دست آمد. علاوه بر قندهای ذکر شده، ترکیبات قندی دیگری نیز در کروماتوگرام‌ها مشاهده شد که یا دارای مقادیر بسیار ناچیز بودند و یا امکان شناسایی آن‌ها وجود نداشت. زمان بازداری برای تری‌هالوز، گلوکز، مایواینوزیتول و گلیسرول به‌ترتیب ۱۰/۸، ۱۳/۵، ۱۵/۳ و ۱۹/۱ دقیقه بود (شکل ۲–A و B). یکی از مهم‌ترین ترکیبات قندی با وزن مولکولی کم در سوسک برگ‌خوار نارون مایواینوزیتول بود که با دامنه‌ی تغییرات ۲/۵ تا ٤۰/۳ میکرومول در هر گرم وزن تر در ماه‌های مختلف تغییرات معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۵، df = ۷، F = ۱۱/۸۹). حشرات جمع‌آوری شده در مراحل اولیه‌ی دیاپوز در مهر ماه دارای مقادیر اندکی مایواینوزیتول (۱/٦ ± ٦/۲ میکرومول در هر گرم وزن تر) بودند اما میزان این ترکیب با پیشرفت دیاپوز و کاهش دما در طول پاییز به‌تدریج افزایش یافت و در دی ماه به بیش‌ترین میزان (۲/۷ ± ۳۲/٤۷ میکرومول در هر گرم وزن تر) رسید، به‌طوری‌که نمونه‌های آذر و دی اختلاف معنی‌داری را با سایر ماه‌ها نشان دادند. در اواخر زمستان با افزایش تدریجی دما و شکست دیاپوز میزان آن دوباره کاهش یافت. حشرات جمع‌آوری شده در فروردین (مرحله‌ی پس‌دیاپوز) دارای مقادیر بسیار اندکی مایواینوزیتول (۰/۲± ۲/۹ میکرومول در هر گرم وزن تر) بودند (شکل ۳–A).

تری‌هالوز ترکیب دیگری بود که در حشرات کامل شناسایی شد. میزان این ترکیب در طول پاییز و زمستان تغییر معنی‌داری نداشت و فقط نمونه‌های فروردین و اردیبهشت تفاوت معنی‌داری را با نمونه‌های سایر ماه‌ها نشان دادند (P < ۰/۰۵، df = ۷، F = ۳/۰٤). بیش‌ترین مقدار تری‌هالوز در آذر (۵/۵ ± ۳۲ میکرومول در هر گرم وزن تر) و کم‌ترین مقدار آن در فروردین (۰/۱ ± ۱۰/۱ میکرومول در هر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ۲–C). گلوکز نیز با دامنه‌ی تغییرات ۹/۸ تا ۵۲ میکرومول در هر گرم وزن تر در ماه‌های مختلف تغییرات معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۵، df = ۷، F = ٤/۹) (شکل ۳–B). بیش‌ترین مقدار گلوکز در نمونه‌های آبان‌ماه (۵ ± ٤۰/۲ میکرومول در هر گرم وزن تر) و کم‌ترین مقدار آن در نمونه‌های اردیبهشت (۱/۲ ± ۱۲ میکرومول در هر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ۳–C). گلیسرول نیز

Archive of SID

www.SID.ir

با دامنه‌ی تغییرات ۳/۳ تا ٦/٥ میکرومول در هر گرم وزن تر در ماه‌های مختلف تغییرات معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۵$، $df = ۷$، $F = ۵/۸$)، هرچند مقدار این ترکیب در مقایسه با ترکیبات دیگر بسیار اندک بود (شکل ۳–D).

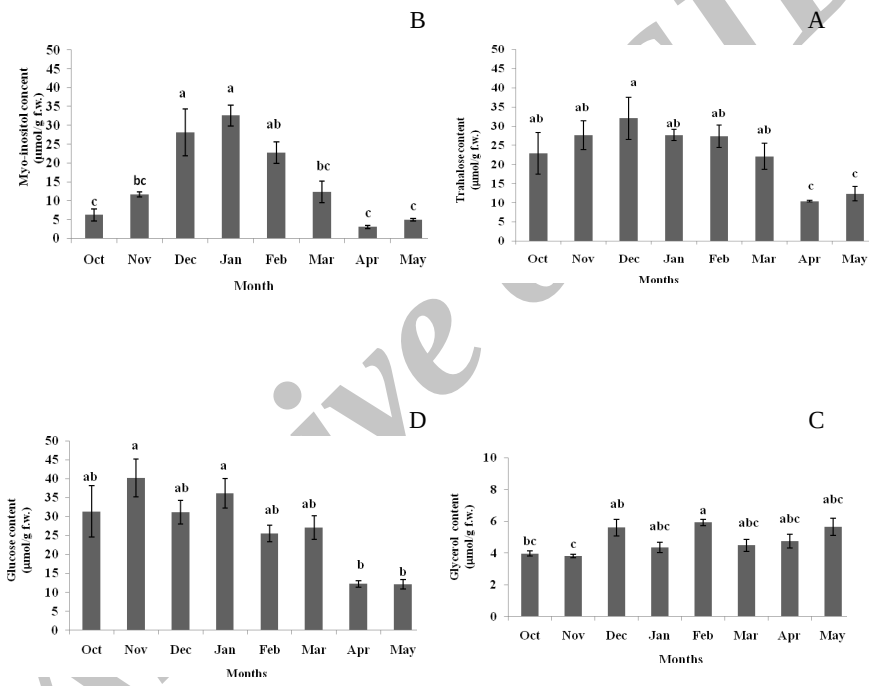


شکل ۲. کروماتوگرام HPLC مربوط به استانداردهای تری‌هالوز، گلوکز و گلیسرول (A) و مایواینوزیتول (B) (۲۰۰ پی‌پی‌ام) و کروماتوگرام مربوط به جداسازی ترکیبات ضد یخ موجود در حشرات کامل؛ دی ماه (C) و فروردین ماه (D).

Fig. 2. HPLC choromatograms of trehalose, glucose and glycerol (A) *myo*-inositol (B) (200 ppm) and chromatogram of cryoprotectants separation in April (C) and January (D).

www.SID.ir

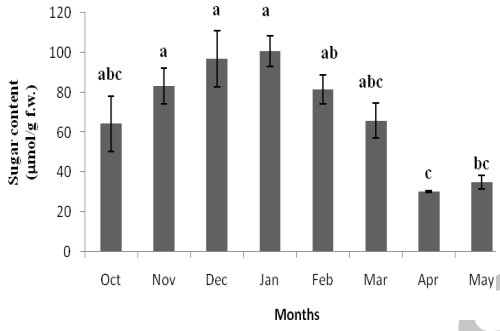
مجموع ترکیبات قندی نیز در ماه‌های مختلف تغییرات معنی‌داری داشت (P < ۰/۰۵، df = ۷، F = ٦/٤). حشرات کامل جمع‌آوری شده در سردترین فصل سال (دی ماه) دارای بیش‌ترین مقدار ترکیبات قندی بود (۷/٦ ± ۱۰۰/۷ میکرومول در هر گرم وزن تر) و نمونه‌های فروردین کم‌ترین مقدار این ترکیبات (۰/٤ ± ۳۰/٤ میکرومول در هر گرم وزن تر) را نشان دادند (شکل ٤).



شکل ۳. تغییرات میانگین غلظت مایواینوزیتول (A)، تری‌هالوز (B)، گلوکز (C) و گلیسرول (D) در حشرات کامل سوسک برگ‌خوار نارون از مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸. حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون Tukey می‌باشد.

Fig. 3. Changes of *myo*-inositol (A), trehalose (B), glucose (C) and glycerol (D) content in adult of elm leaf beetle between October 2008 and June 2009. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test.

www.SID.ir



شکل ٤. تغییرات میانگین مجموع ترکیبات قندی ضد یخ در حشرات کامل سوسک برگخوار نارون از مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸. حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون Tukey می‌باشد.

Fig. 4. Changes of total mean content in adult of elm leaf beetle between October 2008 and June 2009. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test.

تولید قندهای الکلی با وزن مولکولی کم و پلی‌الها در زمستان یک رویداد شایع در میان موجودات زنده محسوب می‌شود (Levitt, 1980). در گونه‌های حساس به یخزدگی این ترکیبات علاوه بر کاهش نقطه‌ی انجماد، سبب حفاظت غشاء سلولی و ساختارهای پروتئینی در دماهای پایین می‌شوند (Crowe *et al*., 1983; Quinn, 1985; Williams, 1990). در تعدادی از حشرات نظیر لارو برخی از زنبورها میزان قندهای الکلی و پلی‌الها در زمستان گاهی به پنج مولار نیز می‌رسد (Salt, 1961) ولی در اکثر حشرات حساس به یخزدگی این ترکیبات در مقادیر نسبتاً کم (میکرومول) تولید می‌شوند (Salt, 1959; Ring, 1981). سوسک برگ‌خوار نارون گونه‌ای حساس به یخزدگی است. میانگین نقطه‌ی انجماد بدن حشرات کامل جمع‌آوری شده در مهر ماه ۰/۷ ± ۱۳/٤– درجه‌ی سلسیوس بود که این میزان در آذر و دی به‌ترتیب به ۰/۹ ± ۱۸/٤– و ۱/۳ ± ۱۸/۲– درجه‌ی سلسیوس کاهش یافت و این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود (Soudi & Moharramipour, 2009) ($F = ۸/۹$ ،$df = ۷$ ،$P < ۰/۰۰۱$). در حشرات کامل

Archive of SID

www.SID.ir

زمستان‌گذران سوسک برگ‌خوار نارون مجموع قندهای الکلی در دی ماه به بیش‌ترین میزان (۰/۱ میکرومول در هر گرم وزن تر) رسید، از آنجایی‌که کاهش نقطه‌ی ذوب و انجماد توسط این ترکیبات وابسته به غلظت آن‌ها است (کاهش نقطه‌ی ذوب و انجماد به‌ترتیب ۱/۸٦ و ۳ تا ٤ درجه به ازای هر مول) (Zachariassen, 1985)، لذا با قاطعیت نمی‌توان عامل اصلی کاهش نقطه‌ی انجماد را به میزان ترکیبات ضد یخ در این حشره نسبت داد. به نظر می‌رسد که این ترکیبات در حفظ تعادل غشاء سلولی و ساختارهای پروتئینی در دماهای پایین نقش داشته باشند. تطابق زمانی میان افزایش ترکیبات قندی و کاهش نقطه‌ی انجماد بدن در این آفت می‌تواند بیانگر آن باشد که سنتز این ترکیبات نقش به‌سزایی در استراتژی زمستان‌گذرانی سوسک برگ‌خوار نارون ایفا می‌کند.

مایواینوزیتول به‌عنوان یکی از ترکیبات اصلی شناسایی‌شده در سوسک برگ‌خوار نارون، یک ترکیب کم‌یاب در میان سایر بندپایان محسوب می‌شود و در حشراتی نظیر سوسک‌های Carabidae (Block & Sømme, 1983)، کفشدوزک *Epilachna vigintioctomaculata* Motschulsky (Kostal *et al.*, 1996; Hoshikawa, 1987) و عنکبوت خانگی *Achaearanea tepidariorum* (Koch) (Tanaka, 1995) شناسایی شده است. دمایی که سبب تحریک سنتز ترکیبات قندی ضد یخ می‌شود در محدوده‌ی صفر تا ۵ درجه‌ی سلسیوس قرار دارد ولی در دماهای صفر تا ۵- درجه‌ی سلسیوس سرعت سنتز این ترکیبات افزایش می‌یابد (Storey & Storey; 1991). بر اساس نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد دماهای پایین تأثیر به‌سزایی در افزایش غلظت مایواینوزیتول در سوسک برگ‌خوار نارون دارد، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان مایواینوزیتول در سردترین ماه‌های سال یعنی آذر و دی ماه مشاهده شد. به نظر می‌رسد که تحریک سنتز مایواینوزیتول در این حشره نیازمند دماهای پایین باشد و از این نظر رابطه‌ی معکوس و معنی‌داری میان میانگین دمای ماهانه با غلظت مایواینوزیتول مشاهده شد ($P = ۰/۰۱٤$، $r = -۰/۸۱٤$). احتمالاً تغییرات مایواینوزیتول ارتباط نزدیکی با دیاپوز دارد، به‌طوری‌که با ورود حشرات کامل به فاز پیش‌دیاپوز در مهر ماه، غلظت مایواینوزیتول به‌تدریج افزایش یافت و در آذر و دی که احتمالاً حشره در عمق دیاپوز به‌سر می‌برد غلظت این ترکیبات به حداکثر رسید. همچنین، کاهش ناگهانی مایواینوزیتول در بهار با پایان دیاپوز و ورود حشرات به فاز

Archive of SID

www.SID.ir

پس‌دیاپوز ارتباط مستقیمی دارد. کاهش قندهای الکی و پلی‌الها در بهار به‌عنوان نشانه‌ی اتمام دیاپوز در بسیاری از حشرات گزارش شده است (Tsumuki, 1990). با وجودی که با کاهش نقطه‌ی انجماد بدن حشرات زمستان‌گذران سوسک برگ‌خوار نارون مقدار مایواینوزیتول افزایش یافت ولی رابطه‌ی معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد مشاهد نشد (P = ۰/۰۶۱، r = −۰/۷۹۲).

تری‌هالوز ترکیب دیگری است که در حشرات کامل زمستان‌گذران سوسک برگ‌خوار نارون شناسایی شد و به‌عنوان یک ترکیب ضد یخ در تعداد زیادی از حشرات نیز گزارش شده است (Rains & Dimock, 1978; Shimada & Riihimaa, 1990; Kostal & Simek, 1995). مکانیسم عمل دقیق تری‌هالوز در تحمل حشرات زمستان‌گذران به سرما هنوز به‌طور کامل شناخته شده نیست. این ترکیب احتمالاً از تخریب ساختارهای پروتئین پس از شک‌های دمایی جلوگیری می‌کند و سبب حفاظت سلول در برابر آسیب ناشی از واکنش‌های اکسیداتیوی می‌شود (Benaroudj *et al.*, 2001). این ترکیب در فصول پاییز و زمستان در غلظت‌های بالا مشاهده شد و مقدار آن طی این فصول تغییر چندانی نکرد و تقریباً ثابت بود. همچنین رابطه‌ی معنی‌داری میان تغییرات غلظت این ماده با تغییرات میانگین دمای ماهانه مشاهده نشد (P = ۰/۱۷۸، r = −۰/۶۳۳). بنابراین، به نظر می‌رسد که سنتز این ترکیب مستقل از تخریک دماهای پایین بوده و حشره قبل از ورود به سرما میزان غلظت آن را بالا برده باشد.

ترکیب دیگری که در این حشرات شناسایی شد گلوکز بود که میزان آن در ماه‌های مورد مطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان داد. بیش‌ترین غلظت گلوکز مربوط به فصول پاییز و زمستان بود و طی این فصول اختلاف معنی‌داری میان مقادیر این ترکیب مشاهده نشد. همچنین، در مورد تغییرات این ترکیب رابطه معنی‌داری با میانگین دمای ماهانه مشاهده نشد (P = ۰/۹۹۳، r = −۰/۰۰۵)، لذا به نظر می‌رسد که سنتز این ترکیب نیز همانند تری‌هالوز قبل از دوره‌ی سرما آغاز شده باشد.

گلیسرول نسبت به سایر ترکیبات کم‌ترین میزان را در حشرات زمستان‌گذران سوسک برگ خوار نارون به خود اختصاص داد. بررسی تغییرات غلظت گلیسرول روند مشخصی را نشان نداد و رابطه‌ی معنی‌داری میان تغییرات غلظت این ترکیب و میانگین دمای ماهانه

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده نشد (P = ۰/۲۶۰، r = −۰/۵٤۹). به‌طورکلی توانایی سنتز ترکیبات قندی با وزن مولکولی پایین در حشرات زمستان‌گذران سوسک برگ‌خوار نارون با کاهش تدریجی دما افزایش یافت و در سردترین ماه‌های سال مجموع غلظت ترکیبات قندی به حداکثر رسید، به‌طوری‌که رابطه‌ی معکوس و معنی‌داری میان حداقل مطلق ماهانه‌ی دما و میانگین کل ترکیبات ضد یخ مشاهده شد (P = ۰/۰۳٤، r = −۰/۸٤٦). به نظر می‌رسد این ترکیبات در حشرات کامل زمستان‌گذران سوسک برگ‌خوار نارون احتمالاً سبب حفاظت ساختارهای پروتئینی و غشاء سلولی در برابر شوک‌های سرمایی، حتی در دماهای به‌نسبت پایین، شده و می‌توان حداکثر تحمل حشرات نسبت به سرما را در سردترین ماه‌های سال انتظار داشت.

منابع

Arbab, J., Jalali, J. & Sahragard, A. (1998) An investigation on the biology of elm leaf beetle *Galerucella* (*Pyrrhalta*) *luteola* Mull. (Col., Chrysomelidae) in laboratory condition. *Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress, Vol. I, Pests*, p. 172.

Atapour, M. & Moharramipour, S. (2009) Changes of cold hardiness, supercooling capacity, and major cryoprotectants in overwintering larvae of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology* 38, 260-265.

Atapour, M., Moharramipour, S., Barzegar, M. & Khani, A. (2008) Some cryoprotectants of overwintering larvae of rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) in north parts of Iran. *Applied Entomology and Phyopathology* 75(2), 27-38. [In Persian with English summary].

Benaroudj, N., Lee, D. H. & Goldberg, A. L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cell and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry* 276, 24261-24267.

Block, W. & Sømme, L. (1983) Low temperature adaptations in beetles from the sub-Antarctic island of South Georgia. *Polar Biology* 2, 109-114.

Brewer, J. W. (1973) Control of elm leaf beetle in Colorado. *Journal of Economic Entomology* 66, 162-164.

Chino, H. (1957) Conversion of glycogen in to sorbitol and glycerol in the diapausing eggs of *Bombyx* silkworm. *Nature* 180, 606-607.

Archive of SID

www.SID.ir

Crowe, J., Crowe, L. M. & Mouradian, R. (1983) Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology* 20, 346-356.

Crowe, J., Hoekstra F. & Crowe, L. (1992) Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54, 579-599.

Dahlsten, D. L. (1994) Elm leaf beetle management the California experience. *Plant Protection Quarterly* 9, 42-43.

Danks, H. V. (1987) *Insect dormancy*: *an ecological perspective.* 439 pp. Biological Survey of Canada, Ottawa.

Davatchi, A. & Moradeshaghi, J. (1962) The elm leaf beetle *Galerucella luteola*, economic importance and their control. Plant Protection Letter, College of Agriculture, Tehran University. [In Persian].

Furusawa, T., Shimizu, K. & Yano, T. (1987) Polyol accumulation in the non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Sericultural Science of Japan* 56, 150-156.

Gekko, K. & Timasheff, S. N. (1981a) Mechanisms of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20, 4667-4674.

Gekko, K. & Timasheff, S. N. (1981b) Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* 20, 4677-4686.

Goto, M., Li, Y., Kayaba, S., Outani, S. & Suzuki, K. (2000) Cold hardiness in summer and winter diapause and post-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. under temperature acclimation. *Journal of Insect Physiology* 47, 709-714.

Hance, T. D., Nibelle, D., Lebrum, P., Van Impeg, G & Van Hove, C. (1994) Selection of Azolla forms resistant to the water lily aphid, *Rhopalosiphum nymphaeae. Entomologia Experimentalis at Applicata* 70, 11-17.

Holmstrup, M. (1995) Polyol accumulation in earthworm cocoons induced by dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 111, 251-255.

Hoshikawa, K. (1987) Interconversion between glycogen and inositol in hibernation adults of phytophagous lady beetle, *Epilachna vigintioctomaculata*. *Insect Biochemistry* 17, 265-268.

Khani, A., Moharramipour, S. & Barzegar, M. (2007) Cold tolerance and trehalose accumulation in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortrichidae). *European Journal of Entomology* 104, 385-392.

Archive of SID

www.SID.ir

Kostal, V., Nedved, O. & Simek, P. (1996) Accumulation of high concentrations of *Myo*-inositol in the overwintering ladybird beetle, *Ceratomegilla undecimnotata*. *Cryo-Letters* 17, 267-272.

Kostal, V. & Simek, P. (1995) Dynamics of cold hardiness, supercooling and cryoprotectants in diapausing and non-diapausing pupae of the cabbage root fly, *Delia radicum* L. *Journal of Insect Physiology* 41, 627-634.

Levitt, J. (1980) *Responses of plants to environmental stresses chilling, freezing and high temperature stresses*. 497 pp. Academic Press, New York.

Lovelock, J. E. & Bishop, M. W. H. (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183, 1394-1395.

Miller, F. & Ware, G. (2001) Resistance of temperate Chinese elms (*Ulmus* spp.) to feeding by the adult elm leaf beetle (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 94, 162-166.

Miller, L. K & Smith, J. S. (1975) Production of thereitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance. *Nature* 258, 519-520.

Morrissey, R. E. & Baust, J. G. (1976) The ontogeny of cold tolerance in the gall fly, *Eurosta solidagensis*. *Journal of Insect Physiology* 22, 431-437.

Quinn, P. J. (1985) A lipid phase separation model of low temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* 22, 128-146.

Rains, T. D. & Dimock, R. V. (1978) Seasonal variation in cold hardiness of the beetle *Popilus disjunctus*. *Journal of Insect Physiology* 24, 551-554.

Ring, R. A. (1981) The physiology and biochemistry of cold tolerance in arctic insects. *Journal of Thermal Biology* 6, 219-229.

Salt, R. W. (1959) Survival of frozen fat body cells in an insect. *Nature* 193, 1426.

Salt, R. W. (1961) Principles of insect cold hardiness. *Annual Review of Entomology* 6, 55-74.

Shimada, K. (1982) Glycerol accumulation in developmentally arrested pupae of *Papilio machaon* obtained by brain removal. *Journal of Insect Physiology* 28, 975-978.

Shimada, K. & Riihimaa, A. (1990) Cold induced freezing tolerance in diapausing and non-diapausing larvae of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) with accumulation of trehalose and proline. *Cryo-Letters* 11, 243-250.

Sømme, L. (1965) Changes in sorbitol content and supercooling points in overwintering eggs of the European red mite. *Canadian Journal of Zoology* 43, 881-884.

Archive of SID

www.SID.ir

Sømme, L. (1967) The effect of temperature and anoxia on haemolymph composition and supercooling in three overwintering insects. *Journal of Insect Physiology* 13, 805-814.

Sømme, L. (1979) Overwintering ecology of alpine Collembola and oribatid mites from the Austrian Alps. *Ecological Entomology* 4, 175-180.

Sømme, L. (1982) Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 73, 519-543.

Soudi, Sh. & Moharramipour, S. (2009) Cold hardiness strategy in overwintering adults of leaf beetles, *Galerucella luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). *VIth International Conference on Arthropods*: *Chemical, Physiological, Biotechnological and Environmental Aspects*, p. 19.

Storey, K. B. & Storey, J. M. (1988) Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews* 68, 27-84.

Storey, K. B. & Storey, J. M. (1991) Biochemistry of cryoprotectants. pp. 64-93 in Lee, R. E. & Denlinger, D. L. (Eds) *Insects at low temperature*. 513 pp. Chapman and Hall, New York.

Storey, K. B. & Storey, J. M. (1992) Natural freezing survival in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 365-386.

Tanaka, K. (1995) Seasonal change in glycogen and inositol/sorbitol contents of house spider, *Achaearanea tepidariorum* (Araneae: Theridiidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 110B, 539-545.

Tsumuki, H. (1990) Environmental adaptations of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* and the blue alfalfa aphid, *Acyrthosiphon kondoi* to seasonal fluctuations. *Advances in Invertebrate Reproduction* 5, 273-278.

Tsumuki, H. & Kanehisa, K. (1978) Carbohydrate content and oxygen uptake in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Research Institute for Bioresources, Okayama University* 17, 95-110.

Watanabe, M. & Tanaka, K. (1998) Adult diapause and cold hardiness in *Aulacophora nigripennis* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Physiology* 44, 1103-1110.

Williams, W. P. (1990) Cold-induced lipid phase transitions. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B* 326, 55-570.

Zachariassen, K. E. (1985) Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews* 65, 799-832.

Archive of SID

www.SID.ir