

تغییرات ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین در لاروهای زمستان‌گذران

کرم برگ‌خوار چغندر، (*Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae))

مریم عطاپور^۱، سعید محرمی‌پور^{۱*} و محسن برزگر^۲

۱- دانشگاه تربیت 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

Changes of cryoprotectants in overwintering larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae)

M. Atapour¹, S. Moharramipour^{1&*} and M. Barzegar²

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

کرم برگ‌خوار چغندر، *Spodoptera exigua* (Hübner)، حشره‌ای با دامنه‌ی میزبانی وسیع است که خسارت عمده‌ای را به‌خصوص به چغندر، سیب‌زمینی و پنبه وارد می‌سازد. به منظور درک بهتر چگونگی زمستان‌گذرانی آفت، ترکیبات ضد یخ (cryoprotectants) لاروهای زمستان‌گذران طی ماه‌های آبان تا اسفند ۱۳۸۷ به همراه نمونه‌های پرورش‌یافته در آزمایشگاه با HPLC اندازه‌گیری شد. پنج ترکیب تری‌هالوز، گلوکز، مایواینوزیتول، گلیسرول و سوربیتول به‌ترتیب در نمونه‌ها مورد شناسایی قرار گرفت که در میان آن‌ها تری‌هالوز بیش‌ترین مقدار و بیش‌ترین افزایش را طی ماه‌های سرد از خود نشان داد (از ۰/۹۹ میلی‌گرم بر یک گرم از وزن حشره در آبان تا ۳/۹ میلی‌گرم بر یک گرم در دی ماه). به‌این‌ترتیب، به نظر می‌رسد مهم‌ترین ترکیب ضد یخ در لاروهای زمستان‌گذران کرم برگ‌خوار چغندر تری‌هالوز باشد که با افزایش غلظت، حشره را قادر می‌سازد تا زمستان را با موفقیت پشت سر گذارد.

واژگان کلیدی: کرم برگ‌خوار چغندر، *Spodoptera exigua*، ترکیبات ضد یخ، تری‌هالوز، سرماسختی

Abstract

The beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), is a polyphagous pest that causes serious damages to a wide range of agricultural crops including beet, potato and cotton. In order to deepen our understanding of the biology of the pest during the winter, overwintering larvae of beet armyworm were collected from the fields from November 2008 through March 2009. Using HPLC technique, the level of cryoprotectants (antifreeze compounds) inside the body of larvae was measured and the following five compounds were detected: trehalose, glucose, myo-inositol, glycerol and sorbitol. It is found that the amount of polyols and trehalose is always higher than the other compounds and during the coldest days of the winter their level sharply increases from 0.99 mg/g fresh weight in November to 3.9 mg/g fresh weight in January. The results suggest that trehalose is the key cryoprotectant that helps overwintering larvae of beet armyworms survives during the harsh winter days.

Key words: beet armyworm, *Spodoptera exigua*, cryoprotectants, trehalose, cold hardiness

مقدمه

بسیاری از حشرات ساکن مناطق معتدل در طول دوره‌ی زندگی خود با تغییرات محیطی متنوعی مواجه هستند. این حشرات جهت مصون ماندن از این شرایط که می‌تواند بقاء آن‌ها را تهدید کند، روش‌های تطابقی بسیاری را به کار می‌برند. مواجه شدن با دماهای پایین طی ماه‌های سرد زمستان یکی از متداول‌ترین این شرایط است که بیشتر حشرات زمستان‌گذران با افزایش سرماسختی خود، آن را پشت سر می‌گذارند (Denlinger, 1991; Leather *et al.*, 1993). به همین علت علم مطالعه‌ی دماهای پایین (Cryobiology) و چگونگی زمستان‌گذرانی حشرات امروزه توجه زیادی را به خود معطوف داشته است.

در میزان سرماسختی حشرات سه گروه متفاوت از ترکیبات حائز اهمیت هستند. این سه گروه عبارتند از ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین، عوامل مولد هسته‌ی یخ و پروتئین‌های ضد یخ (Lee & Denlinger, 1991; Bale, 2002). مطالعات نشان داده‌اند که در دوره‌ی زمستان‌گذرانی، غلظت ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین (cryoprotectants) به تدریج افزایش می‌یابد (Kostal, 2006). افزایش چنین ترکیبات ضد یخی در طیف وسیعی از موجودات زمستان‌گذران نظیر گیاهان، کرم‌ها، کنه‌ها و عنکبوت‌ها، بسیاری از دم‌فتری‌ها، حشرات و حتی خزندگان دیده شده است (Kostal *et al.*, 2001). غلظت این ترکیبات که شامل برخی قندها و قندهای الکلی می‌شود، به‌طور عموم در همه‌ی حشرات به تدریج طی زمستان افزایش می‌یابد. با وجود این که شناخته‌شده‌ترین ترکیب این مواد گلیسرول می‌باشد اما در گروه‌های مختلف حشرات مواد دیگری نظیر سوربیتول، مانیتول، مایوانوزیتول، اینوزیتول، اتیلن‌گلیکول، ریبتول، تری‌هالوز، فروکتوز و گلوکز مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (Lee, 2010). در حشراتی که از استراتژی اجتناب از یخ‌زدگی بهره می‌برند ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین سبب افزایش ظرفیت سرد شدن فوق‌العاده و کاهش نقطه‌ی انجماد می‌شوند (Duman *et al.*, 1995). حشراتی که از استراتژی تحمل به یخ‌زدگی بهره می‌برند با مکانیسم‌هایی نظیر کاهش بالقوه‌ی فاصله‌ی مولکول‌های آب و در نتیجه کاهش احتمال توسعه‌ی بلور یخ، حفظ ثبات الکترولیت‌های بافری و ساختار پروتئین‌ها، کاهش جریان یافتن آب از میان غشاء و حفظ حجم سلول در شرایط دماهای پایین، بروز صدمات احتمالی ناشی از یخ‌زدگی، نظیر

صدمات مکانیکی در محل یخ‌زدگی، عدم تعادل الکترولیت‌ها، بحرانی شدن حجم سلول، تبلور و انجماد مجدد را کاهش می‌دهند (Bale, 2002). به‌طور کلی ترکیبات ضد یخ در این دسته از حشرات میزان آب قابل دسترس برای انجماد و به دنبال آن میزان آب‌گیری سلول را تنظیم کرده و شوک اسمزی حاصل از یخ‌زدگی را کاهش می‌دهند (Kostal et al., 2001).

کرم برگ‌خوار چغندر، *Spodoptera exigua* (Hübner)، یکی از شناخته‌شده‌ترین آفات کشاورزی به شمار می‌رود. لاروهای این حشره دارای دامنه‌ی میزبانی بسیار وسیعی بوده و به ۶۰ گونه از ۳۱ تیره‌ی مختلف گیاهان زراعی و علف‌های هرز خسارت می‌زنند (Heppner, 1998). از مهم‌ترین گیاهان زراعی مورد حمله‌ی کرم برگ‌خوار چغندر می‌توان به چغندر قند، یونجه، ذرت، پنبه، کلم، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و کاهو اشاره کرد (Heppner, 1998; Azidah & Sofian, 2006). این آفت به‌طور معمول در مرحله‌ی شفیرگی و در عمق چند سانتی‌متری خاک زمستان‌گذرانی می‌کند، با این حال در مناطقی با زمستان‌های ملایم‌تر به سایر اشکال، به‌ویژه لارو نیز در طول زمستان مشاهده می‌شود. شدت و ضعف آفت در ابتدای هر سال زراعی مربوط به ذخیره‌های زمستانه‌ی لارو و یا شفیره‌هایی است که موفق به زمستان‌گذرانی شده‌اند. به‌طوری‌که هر چه تعداد این لاروها و یا شفیره‌ها بیشتر باشد جمعیت آفت در بهار سال بعد نیز بیشتر خواهد بود (Kheyri, 1976; Heppner, 1998; Khanjani, 2006). به این ترتیب مطالعه‌ی چگونگی زمستان‌گذرانی آفت و عواملی که در این فرآیند دخیل هستند بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

تاکنون در زمینه‌ی ترکیبات ضد یخ و به‌طور کلی چگونگی سرماسختی و زمستان‌گذرانی این آفت مطالعات بسیار ناچیزی صورت گرفته است. طی یکی از معدود مطالعات صورت‌گرفته در این زمینه در کشور کره‌ی جنوبی، چهار ترکیب گلیسرول، گلوکز، سوربیتول و تری‌هالوز در لاروهای سن پنجم پرورش‌یافته در آزمایشگاه که به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شده بودند، به‌وسیله‌ی کروماتوگرافی لایه‌ی نازک (thin layer chromatography) شناسایی شد (Kim & Kim, 1997). با این حال تاکنون روند تغییرات این ترکیبات طی ماه‌های سرد از حشرات جمع‌آوری‌شده از مزرعه‌ی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

باتوجه به اهمیت و خسارت روزافزون کرم برگ‌خوار چغندر روی انواع محصولات زراعی، شناخت جنبه‌های مختلف فیزیولوژی و زیست‌شناسی این گونه، می‌تواند در مدیریت کارآمدتر آن مؤثر باشد. از آنجایی که تاکنون مطالعات چندانی روی مقوله‌ی تحمل به سرمای این آفت صورت نپذیرفته است انجام مطالعات کامل‌تر در این زمینه و بررسی تغییرات به وقوع پیوسته در ترکیبات بیوشیمیایی بدن می‌تواند کمک شایانی به شناخت بیشتر ویژگی‌های زیستی این آفت در طی ماه‌های سرد بکنند. هدف این مطالعه شناسایی مهم‌ترین ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین طی دوره‌ی زمستان‌گذرانی کرم برگ‌خوار چغندر و بررسی تغییرات آن‌ها در این زمان و مقایسه‌ی آن با حشرات پرورش‌یافته در آزمایشگاه به‌عنوان شاهد می‌باشد تا به این وسیله گوشه‌ای از ساز و کار زمستان‌گذرانی کرم برگ‌خوار چغندر روشن شود.

مواد و روش‌ها

حشرات مورد نیاز و اطلاعات هواشناسی

در مهر ماه لاروهای سن آخر از مزرعه جمع‌آوری و در داخل قفس‌های توری حاوی گلدان‌های چغندر برگی رهاسازی شدند. این قفس‌ها که دارای ابعاد $120 \times 85 \times 65$ سانتی‌متر بودند در جوار مزارع دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس مستقر و در هر ماه (از آبان تا اسفند) نمونه‌های زمستان‌گذران به شکل کاملاً تصادفی از داخل این قفس‌ها جمع‌آوری شدند. پرورش نمونه‌های آزمایشگاهی در اتاقک رشد در دمای 1 ± 25 درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی صورت پذیرفت. جهت تغذیه‌ی لاروها از برگ چغندر و جهت تغذیه‌ی حشرات کامل از محلول آب و عسل ۱۰ درصد استفاده شد. جهت کسب ویژگی‌های دمایی مورد نیاز، از اطلاعات ایستگاه هواشناسی که در جوار مزارع دانشکده‌ی کشاورزی مستقر می‌باشد استفاده شد.

شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین

به این منظور حداقل ۳ نمونه (به‌عنوان سه تکرار) از لاروهای سن پنجم جمع‌آوری‌شده از طبیعت در هر ماه و یا نمونه‌های آزمایشگاهی (شامل مراحل حشره‌ی کامل، شفیره و

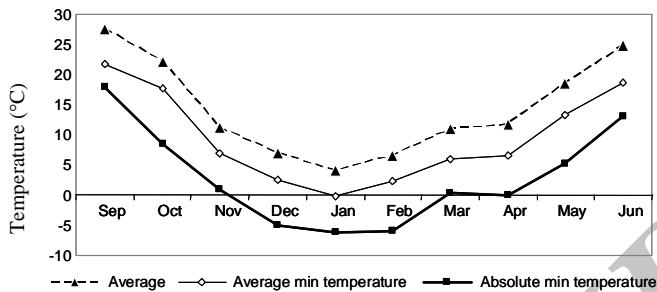
لاروهای سن ۵) مورد استفاده قرار گرفت. هر نمونه در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد همگن شد و پس از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰ g در آن تحت خلاء گذاشته شد تا حلال آن تبخیر شود. پس از تبخیر کامل حلال، ۲۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر (HPLC grade) به هر نمونه افزوده شد و نمونه‌ها پس از تصفیه با صافی سر سرنگی (Millex, USA) جهت تزریق به دستگاه HPLC (Waters, USA) آماده شدند (Pullin & Bale, 1989a). فاز متحرک مورد استفاده، آب (HPLC grade) بود. برای جداسازی از ستون مخصوص جداسازی کربوهیدرات‌ها (HPLC grade) (300 × 7.8 mm, Supelco, USA) استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و آشکارساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست (RI) بود. دمای ستون در زمان جداسازی ۸۰ و دمای آشکارساز ۳۰ درجه‌ی سلسیوس بود. پس از انجام تنظیمات دستگاه و پایدار شدن آن، ۲۰ میکرولیتر از نمونه به‌وسیله‌ی سرنگ هامیلتون به دستگاه تزریق و کروماتوگرام مربوطه ثبت شد. جهت تجزیه‌ی کمی قندهای الکلی جداسازی‌شده، از روش رسم منحنی استاندارد استفاده شد. برای این منظور استانداردهای ترکیبات مختلف شامل glycerol, myo-inositol, sorbitol, glucose و trehalose (Sigma Aldrich) با غلظت‌های مشخص تهیه و به دستگاه تزریق شد سپس منحنی استاندارد (سطح زیر پیک در برابر غلظت) برای هر جزء رسم شد. با توجه به زمان بازداری، نوع قند موجود در نمونه و با توجه به سطح زیر پیک و منحنی درجه‌بندی، غلظت جزء مورد نظر در نمونه اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌ی آماری

در هر تیمار حداقل از سه تکرار و در هر تکرار از یک عدد حشره استفاده شد. اطلاعات به‌دست‌آمده به صورت خطای معیار \pm میانگین گزارش شدند. تجزیه‌ی داده‌ها با کمک تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه‌های میانگین تیمارهای مختلف با کمک آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (16.0) انجام شد. جهت بررسی رابطه‌ی میان دو متغیر از آزمون همبستگی Pearson استفاده شد.

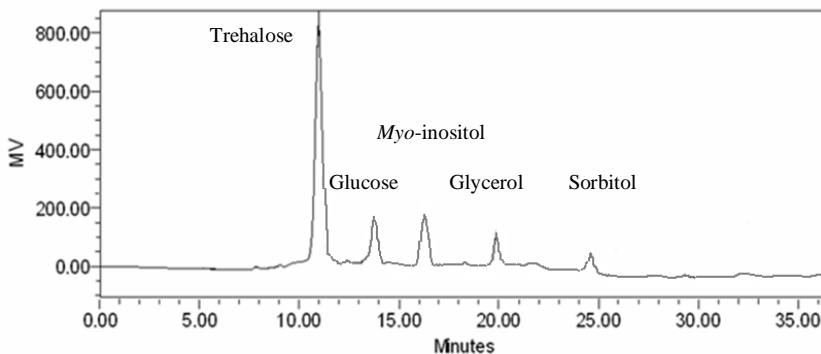
نتایج و بحث

طی پاییز و زمستان ۱۳۷۸ کرم برگ‌خوار چغندر به صورت لاروهای سن آخر (سن پنجم) به رنگ تیره‌تر از لاروهای غیر زمستان‌گذران در میان برگ‌های خشکیده و ریخته‌شده در پای گلدان‌ها زمستان‌گذرانی کرد. جمع‌بندی دماهای روزانه مشخص کرد که از آذر ماه دما به‌طور محسوسی کاهش یافته، در دی ماه به حداقل خود رسیده و در بهمن نیز پایین بوده است، به طوری که در این ۳ ماه حداقل دمای ثبت شده زیر صفر درجه‌ی سلسیوس بوده است (به ترتیب ۵-، ۶/۲- و ۶- درجه) (شکل ۱) و به‌طورکلی ۳۳ روز یخبندان وجود داشته است. در هر ماه تعدادی از لاروهای برگ‌خوار چغندر (حداقل ۳ نمونه) جمع‌آوری و ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین با کمک HPLC در آن‌ها شناسایی و اندازه‌گیری شد. پنج ترکیب تری‌هالوز، گلوکز، مایوانوزیتول، گلیسرول و سوربیتول مهم‌ترین ترکیباتی بودند که مورد شناسایی قرار گرفتند (شکل ۲). نخستین ترکیب شناسایی شده تری‌هالوز بود که غلظت آن به‌طور معنی‌داری در ماه آبان تا اسفند متفاوت بود ($F_{4,12} = 5/3, P < 0/05$) (شکل ۳-۱). این ترکیب قند رایج همولنف حشرات با ۱۲ اتم کربن (متشکل از دو مولکول گلوکز) می‌باشد که غلظت آن در حالت عادی در همولنف ثابت است اما در برخی حشرات زمستان‌گذران، به عنوان ضد یخ عمل کرده و میزان آن افزایش می‌یابد (Denlinger, 2002). مقدار تری‌هالوز در آبان ماه $0/28 \pm 0/99$ میلی‌گرم بر یک گرم از وزن حشره بود که با افزایش تقریبی ۴ برابر به $0/55 \pm 3/9$ در دی ماه و $1/1 \pm 3/8$ در بهمن ماه رسید و رابطه‌ی منفی و معنی‌داری را با میانگین دمای ماهیانه نشان داد ($r = -0/947, P = 0/014$) به این ترتیب که با کاهش دما بر مقدار آن افزوده شد. در بررسی دیگری که روی میزان گلیسرول و اسمولالیتی همولنف لاروهای سن پنجم سرمادیده‌ی این آفت صورت گرفته بود مشاهده گردید که تغییرات اسمولالیتی بسیار چشم‌گیر ولی تغییرات گلیسرول در همولنف ناچیز است و از این رو عنوان گردید که به احتمال زیاد ترکیب دیگری به جز گلیسرول وجود دارد که به‌عنوان ضد یخ نقش مهم‌تری داشته و اسمولالیتی همولنف را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (Kim & Song, 2000). به این ترتیب با توجه به نتایج این مطالعه مشخص گردید که ترکیب ناشناخته می‌تواند همان تری‌هالوز باشد.



شکل ۱. میانگین دمای ماهیانه، میانگین حداقل دمای ماهیانه و پایین‌ترین دمای ثبت‌شده طی ماه‌های شهریور ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸.

Fig. 1. Monthly average temperature, average monthly minimum temperature and the absolute minimum temperature from September 2008 to June 2009.



شکل ۲. کروماتوگرام HPLC مربوط به جداسازی ترکیبات ضد یخ موجود در یک نمونه از لارو سن ۵ زمستان‌گذران کرم برگ‌خوار چغندر جمع‌آوری‌شده در دی‌ماه ۱۳۸۷. نوع ستون: Ca, 59305-U, 300 × 7.8 mm, Supelco, USA, حلال و فاز متحرک: آب، سرعت جریان فاز متحرک: ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، نوع آشکارساز: ضریب شکست (RI)، دمای ستون در زمان جداسازی ۸۰ و دمای آشکارساز ۳۰ درجه‌ی سلسیوس.

Fig. 2. HPLC chromatogram of cryoprotectants separation in a sample of overwintering 5th instar larvae of beet armyworm collected in February 2009. Column type: Ca, 59305-U, 300 × 7.8 mm, Supelco, USA, solvent and mobile phase: water, flow: 0.5 ml/min, detector type: RI, external (column) temperature: 80°C and internal (detector) temperature: 30°C.

تغییرات مشاهده شده در میزان گلوکز درست عکس تری هالوز بود و این ترکیب کمترین میزان خود را در سردترین ماهها از خود نشان داد (شکل ۳-B). گلوکز بالاترین غلظت خود را در ماههای آبان و آذر (به ترتیب $0/46 \pm 3/4$ mg/g و $3/6 \pm 0/71$ mg/g) دارا بود و پس از آن به طور معنی داری تغییر کرد ($F_{4,12} = 7/5, P < 0/001$). غلظت این ترکیب در دی ماه حدود سه برابر کاهش یافت ($1/03 \pm 0/38$ mg/g) و به کمترین مقدار خود در بهمن رسید ($0/32 \pm 0/23$ mg/g) و دوباره در اسفند ماه افزایش یافت ($2/9 \pm 0/51$ mg/g). در مطالعه‌ی دیگر که روی میزان ذخایر گلیکوژن لاروهای زمستان گذران کرم برگ خوار چغندر در همین بازه‌ی زمانی صورت گرفت در میزان غلظت این ترکیب نیز اختلاف معنی داری مشاهده شد و طی سردترین ماهها بیش از دوبرابر کاهش یافت (Atapour & Moharramipour, 2011). علی‌رغم معنی دار بودن تغییرات گلیکوژن طی ماههای مختلف، رابطه‌ی همبستگی معنی داری میان این تغییرات با غلظت تری هالوز مشاهده نشد ($r = -0/884, P = 0/116$). با این حال کاهش چشمگیر گلیکوژن در زمان کاهش دما و افزایش تری هالوز به عنوان مهم‌ترین ترکیب ضد یخ در حشرات متعدد نظیر شفیره‌های *Hyphantria cunea* Drury (Li et al., 2001)، *Enosima leucotaeniella* (Ragonot) و یا لاروهای *Mamestra brassicae* L. (Ding et al., 2003) گزارش شده است. بررسی‌های به عمل آمده در این زمینه نشان داده‌اند که آنزیم‌هایی نظیر گلیکوژن فسفوریلاز، هگزوکیناز و فسفوفروکتوکیناز در کاهش و تبدیل ذخایر گلیکوژن به ترکیبات ضد یخی همچون گلیسرول و تری هالوز نقش اساسی را ایفا می‌نمایند (Storey & Storey, 1988). در مطالعات صورت گرفته روی کرم ساقه خوار برنج، *Chilo suppressalis* Walker، نیز مشخص شده است که گلیکوژن به عنوان مهم‌ترین منبع افزایش ترکیبات ضد یخ طی ماههای سرد سال عمل می‌کند (Goto et al., 2001) و به نظر می‌رسد گلوکز نیز در این زمان در کنار کاهش ذخایر گلیکوژن به افزایش ترکیبات ضد یخ، به‌ویژه گلیسرول کمک می‌نماید (Atapour et al., 2008; Atapour & Moharramipour, 2009). در مطالعه‌ی حاضر بین کاهش غلظت گلیکوژن و گلوکز رابطه‌ی همبستگی معنی داری مشاهده شد ($r = 0/953, P = 0/047$) و به نظر می‌رسد که دو ترکیب گلیکوژن و گلوکز با تبدیل خود به سایر ترکیبات ضد یخ، به‌ویژه تری هالوز نقش مهمی را می‌توانند در زمستان گذرانی کرم

برگ‌خوار چغندر ایفا کند. با این وجود مطالعات تکمیلی آنزیمی در این رابطه می‌تواند بسیار مثمر ثمر واقع شود.

علاوه بر تری‌هالوز، مقدار گلیسرول و همچنین مایواینوزیتول، به‌ویژه در دی و بهمن ماه تغییر معنی‌داری از خود نشان داد (به‌ترتیب $F_{4,12} = 13/1$, $P < 0/001$ و $F_{4,12} = 34/9$, $P < 0/001$) (شکل ۳-C و D). غلظت گلیسرول در آبان ماه بسیار اندک بود ($0/52 \pm 0/01$ mg/g) اما به $2/4 \pm 0/56$ mg/g در بهمن ماه رسید و پس از آن دوباره در اسفند ماه کاهش یافت ($0/28 \pm 0/06$ mg/g). رابطه‌ی همبستگی مثبت و معنی‌داری میان گلیسرول و تری‌هالوز مشاهده شد ($r = 0/952$, $P = 0/012$). در مورد مایواینوزیتول نیز تغییرات مشابه اما در سطحی پایین‌تر مشاهده گردید. در آبان غلظت این ترکیب $0/2 \pm 0/01$ mg/g بود، در دی و بهمن ماه به حداکثر مقدار خود رسید (به‌ترتیب $1/55 \pm 0/21$ mg/g و $1/52 \pm 0/12$ mg/g) و در اسفند ماه کاهش یافت ($0/45 \pm 0/1$ mg/g). بین تغییرات غلظت گلیسرول و مایواینوزیتول با گلوکز رابطه‌ی همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد (به‌ترتیب $r = -0/934$, $P = 0/020$ و $r = -0/977$). علی‌رغم اینکه این دو ترکیب طی سردترین ماه‌های سال بیش‌ترین افزایش را از خود نشان دادند اما با این‌وجود غلظت آن‌ها در بالاترین سطح به نیمی از غلظت تری‌هالوز در این زمان نمی‌رسد. به این ترتیب مشخص می‌شود که مهم‌ترین ترکیب ضد یخ در لاروهای زمستان‌گذران این آفت تری‌هالوز می‌باشد اما دو ترکیب گلیسرول و مایواینوزیتول نیز در کنار آن می‌توانند به‌عنوان ترکیب ضد یخ نقش داشته باشند. مثال‌های دیگری نیز وجود دارند که در آن‌ها چند ترکیب ضد یخ هم‌زمان تولید شده است. به‌عنوان مثال، در *Cryptopygus antarcticus* Willem گلیسرول، مانیتول و تری‌هالوز (Sømme & Block, 1982) و یا در *Phyrrhocolis aprus* L. ریبتیول، سوربیتول، مانیتول و آرابینیتول (Kostal et al., 2001) تولید می‌شود. به نظر می‌رسد علت اینکه این حشرات از چندین ترکیب ضد یخ به جای یک ترکیب استفاده می‌کنند این باشد که چون در آن‌ها ترکیبات ضد یخ با غلظت بالایی تولید می‌شوند بنابراین امکان دارد سنتز یک ترکیب با غلظت بالا برای سلول‌ها سمی باشد و از این‌رو اقدام به سنتز چندین ترکیب می‌نمایند (Baust, 1973). البته این امکان هم وجود دارد که ترکیبات متفاوت عملکرد متفاوت داشته و بنابراین به این شکل نقش ضد یخی بهتری را ایفا نمایند (Zachariassen, 1985).

سوربیتول ترکیب دیگری بود که در لاروهای زمستان‌گذران مورد شناسایی قرار گرفت و هرچند تغییرات غلظت آن طی ماه‌های آبان تا اسفند معنی‌دار نبود (شکل ۳-E) اما رابطه‌ی همبستگی منفی و معنی‌داری را با میانگین دمای ماهیانه نشان داد ($r = -0/968$, $P = 0/007$). یعنی با کاهش دما مقدار آن زیاد شد. این ماده در برخی حشرات نظیر *Pieris brassicae* L. (Pullin & Bale, 1989b)، *Dendroides Canadensis* Leconte (Horwath & Duman, 1984)، *Ips typographus* (L.) (Kostal et al., 2007)، *Eurosta solidaginis* Fitch (Bale et al., 1989) و *Tipula trivittata* Say (Duman et al., 1985) و *Pyrrhocoris apterus* L. (Kostal et al., 2001) به‌عنوان ترکیب ضد یخ شناسایی شده است. به نظر می‌رسد شاید چنانچه جمع‌آوری نمونه‌ها زودتر صورت می‌گرفت (مثلاً از شهریور ماه) امکان بررسی و مقایسه‌ی غلظت این ترکیب در بازه‌ی زمانی طولانی‌تری میسر می‌شد و شاید نتایج کامل‌تر و بهتری حاصل به‌دست می‌آمد.

شکل ۴ بررسی غلظت این پنج ترکیب را در مراحل سنی مختلف (حشره‌ی کامل، پیش‌شفیره، شفیره و لاروهای سن پنجم) کرم برگ‌خوار چغندر که در آزمایشگاه پرورش یافته بودند نشان می‌دهد. از آنجاکه امکان زمستان‌گذرانی این آفت، به‌ویژه در مناطقی با زمستان‌های ملایم‌تر به تمامی این اشکال وجود دارد، این آزمایش انجام پذیرفت تا در مطالعات آتی در صورت جمع‌آوری آفت به فرمی دیگر، امکان مقایسه‌ی ترکیبات آن با نمونه‌های آزمایشگاهی مقدور باشد. چنانچه در شکل ۴-A مشخص است غلظت تری‌هالوز در مراحل مختلف سنی از خود تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، باین‌وجود کم‌ترین میزان تری‌هالوز مربوط به مرحله‌ی لاروی ($0/23 \pm 0/76$ mg/g) و بالاترین آن مربوط به مرحله‌ی پیش‌شفیرگی ($0/67 \pm 2/5$ mg/g) می‌شد. این اختلاف در مورد گلوکز معنی‌دار بود ($F_{3,12} = 3/9$, $P < 0/05$) (شکل ۴-B) و کم‌ترین آن در مرحله‌ی حشره‌ی کامل ($0/31 \pm 1/9$ mg/g) و بیش‌ترین آن در مرحله‌ی شفیرگی ($0/23 \pm 3/8$ mg/g) دیده شد. میزان گلوکز در مرحله‌ی لاروی نیز بالا بود ($0/56 \pm 3/5$ mg/g). سوربیتول نیز در اینجا از خود اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). و در لاروها دارای کم‌ترین غلظت ($0/05 \pm 0/4$ mg/g) و در حشرات کامل و پیش‌شفیره‌ها دارای بالاترین غلظت (به‌ترتیب $0/18 \pm 1/29$ mg/g و $0/24 \pm 1/22$ mg/g) بود (شکل ۴-E). میزان گلیسرول در مراحل سنی مختلف از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت

(شکل ۴-C)، با این حال بالاترین غلظت آن در لاروها ($0.07 \text{ mg/g} \pm 0.04$) و کم‌ترین آن در حشرات کامل ($0.06 \text{ mg/g} \pm 0.19$) مشاهده شد. در مورد مایواینوزیتول اختلاف چشم‌گیر و معنی‌داری بین حشره‌ی کامل با سایر مراحل دیده شد ($P < 0.01$, $F_{3, 12} = 15/6$, شکل ۴-D)، یعنی غلظت آن در سه مرحله‌ی دیگر سنی بسیار پایین (در حدود 0.3 mg/g) بود اما در حشره‌ی کامل غلظت بسیار بالایی را به خود اختصاص داده بود ($1.02 \text{ mg/g} \pm 0.4$). به این ترتیب مشخص شد که در حشره‌ی کامل گلیسرول پایین‌ترین غلظت و مایواینوزیتول بالاترین غلظت را دارا می‌باشد. علت بالابودن بسیار زیاد این ترکیب در این مرحله‌ی سنی هنوز برای ما روشن نیست. البته به نظر می‌رسد چون شب‌پره‌های مولد نسل اول این گونه در طبیعت زود ظاهر می‌شوند، بنابراین شاید در حشرات کامل این آفت، مایواینوزیتول در غلظت بالایی تولید شده تا در صورت مواجه شدن با سرمای ناگهانی اوایل بهار، حشره‌ی کامل را در برابر این شرایط حفظ نماید. اگرچه مطالعات تکمیلی و سرمادهی حشرات آزمایشگاهی و بررسی غلظت ترکیبات ضد یخ در این حالت در آن‌ها در خصوص اظهار نظر قطعی در این زمینه لازم به نظر می‌رسد.

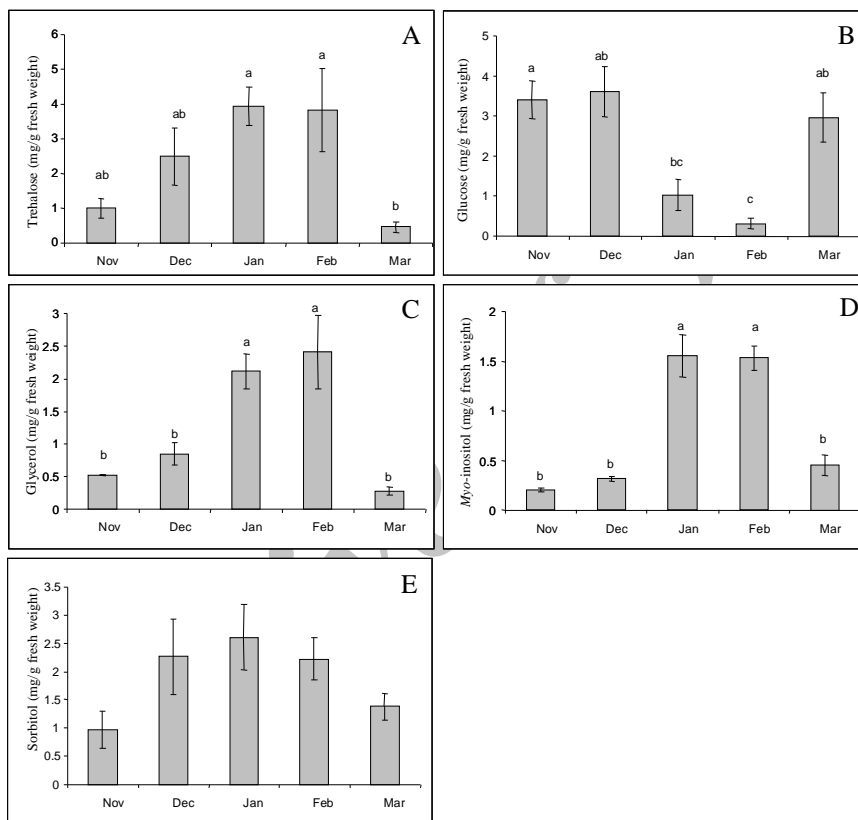
از آنجاکه میزان تری‌هالوز و گلوکز در لاروهای آزمایشگاهی و لاروهای جمع‌آوری شده در اواسط زمستان (دی ماه) با یکدیگر اختلاف داشتند، مقایسه‌ای میان این دو گروه و همچنین گروه سومی که شامل لاروهای آزمایشگاهی که به مدت ۷۲ ساعت در دوره‌ی نوری روزکوتاه (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۱۵ درجه‌ی سلسیوس نگه داشته شده بودند صورت پذیرفت (شکل ۵). در مورد هر پنج ترکیب بین لاروهای آزمایشگاهی عادی و لاروهای آزمایشگاهی سرمادیده اختلافی دیده نشد، درحالی‌که این دو با لاروهای جمع‌آوری شده از طبیعت در دی ماه به شدت و به‌طور معنی‌دار اختلاف داشتند. میزان تری‌هالوز، سوربیتول، گلیسرول و مایواینوزیتول در لاروهای دی ماه نسبت به دو گروه دیگر بسیار بالاتر بود. بلعکس، غلظت گلوکز در این لاروها پایین اما در لاروهای دو گروه دیگر بالا بود. از آنجاکه بین لاروهای آزمایشگاهی عادی و لاروهای آزمایشگاهی سرمادیده در مورد ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین اختلافی مشاهده نشد بنابراین مشخص شد که غلظت این ترکیبات در لاروهایی که به‌صورت کوتاه مدت در دمای پایین و دوره‌ی روشنایی

روز کوتاه قرار گرفته‌اند تغییری نمی‌کند و قرارگیری طولانی مدت و تدریجی نمونه‌ها در چنین شرایطی لازم است تا تولید این ترکیبات را در حشره القاء کند.

به این ترتیب می‌توان این گونه قضاوت نمود که فرآیند سرماسختی در این حشره یک فرایند طولانی مدت بوده که طی آن حشره به تدریج خود را با شرایط سرد و سخت طبیعت تطبیق می‌دهد و در سردترین ماه‌های سال میزان ترکیبات ضد یخ و در نتیجه سرماسختی به اوج خود می‌رسد. لذا، به نظر می‌رسد که چنانچه حشره در اوایل و یا اواخر دوره زمستان‌گذرانی خود (ابتدای پاییز و انتهای زمستان) با دماهای بسیار پایین مواجه شود، به علت پایین بودن سطح ترکیبات ضد یخ، به ویژه تری‌هالوز، امکان تلفات شدید نسل زمستان‌گذران آفت وجود دارد. ولی چنانچه هوا در اواخر پاییز به تدریج کاهش یابد و تا اواخر زمستان و اوایل پاییز این سرما تداوم یابد شرایط بهینه برای رسیدن حشره به اوج سرماسختی و عمق رکود فراهم می‌آید و با توجه به اینکه حشرات زمستان‌گذران نقش مهمی را در میزان جمعیت آفت در نسل‌های آتی ایفا می‌کنند، در چنین شرایطی می‌توان طغیان آفت را در سال زراعی بعد انتظار داشت. این همان نتیجه‌ای است که Kheyri (1976, 1985) در مطالعات بسیار جامع خود به‌طور تجربی به آن رسیده بود. در این مطالعات عنوان شده است که سرمای زمستانه نقش مهمی را در میزان طغیان آفت در سال بعد ایفا می‌کند، به این ترتیب که در صورت کاهش تدریجی دما در اواخر پاییز و داشتن زمستان سرد و یخبندان که دامنه‌ی آن تا بهار کشیده می‌شود، به دلیل عدم نوسانات درجه‌ی حرارت در این فصل، لاروها و شفیره‌های زمستان‌گذران تا بهار به خوبی حفظ می‌شوند و تشکیل شفیره‌ها و ظهور پروانه‌های نسل زمستانه به تعویق می‌افتد. همچنین، به دلیل عقب‌افتادن کشت چغندر قند در این شرایط، در نهایت مرحله‌ی حساس رشد و نمو چغندر قند با حمله‌ی نسل دوم آفت که یکی از خطرناک‌ترین نسل‌هاست مواجه می‌شود (Kheyri, 1976, 1985).

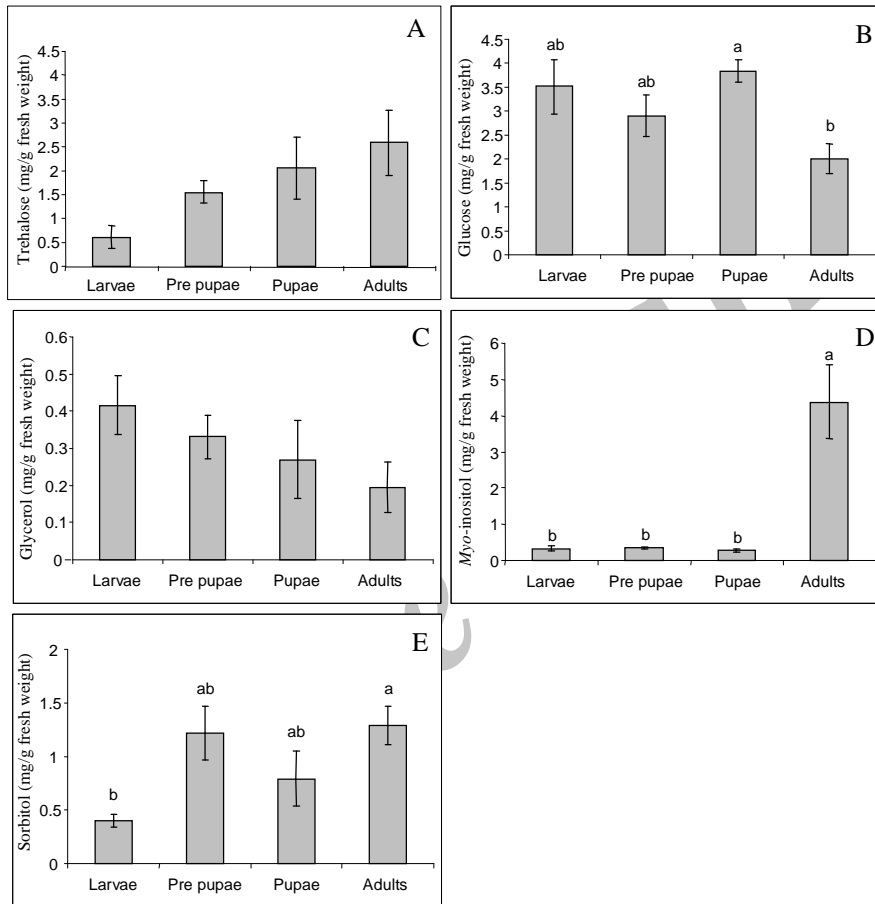
مطالعه‌ی ترکیبات ضد یخ و چگونگی تغییرات آن‌ها گرچه بخش‌هایی از چگونگی زمستان‌گذرانی این آفت را مشخص ساخت ولی باین وجود از آنجاکه عوامل دیگری همچون برخی پروتئین‌های ضد یخ در فرآیند سرماسختی حشرات دخیل هستند لذا مطالعات تکمیلی

در راستای روشن‌شدن ابعاد مختلف این فرآیند، به‌ویژه اطلاع از وجود پروتئین‌های ضد یخ در کرم برگ‌خوار چغندر می‌تواند بسیار مفید و مثمر ثمر واقع شود.



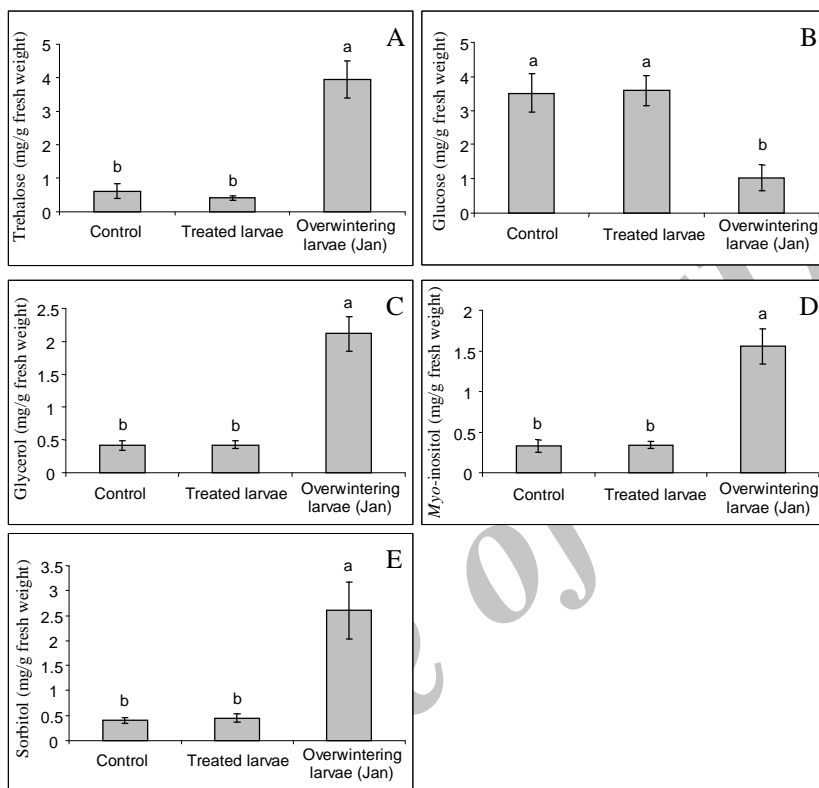
شکل ۳. تغییرات غلظت ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین در لاروهای زمستان‌گذران کرم برگ‌خوار چغندر جمع‌آوری‌شده از آبان تا اسفندماه ۱۳۸۷. A- تری‌هالوز، B- گلوکز، C- گلیسرول، D- مایواینوزیتول و E- سوربیتول. حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون توکی می‌باشد.

Fig. 3. Cryoprotectants changes in the overwintering larvae of beet armyworm from November 2008 to March 2009. A, Trehalose; B, Glucose; C, Glycerol; D, Myo-inositol and E, Sorbitol. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.



شکل ۴. تغییرات غلظت ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین در مراحل سنی مختلف کرم برگ‌خوار چغندر پرورش‌یافته در آزمایشگاه. A- تری‌هالوز، B- گلوکز، C- گلیسرول، D- مایواینوزیتول و E- سوربیتول. حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون توکی می‌باشد.

Fig.4. Cryoprotectants changes in the different stages of lab-reared beet armyworm. A, Trehalose; B, Glucose; C, Glycerol; D, Myo-inositol and E, Sorbitol. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.



شکل ۵. تغییرات غلظت ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین در لاروهای سن ۵ آزمایشگاهی عادی به‌عنوان شاهد، لاروهای سن ۵ آزمایشگاهی که ۷۲ ساعت در دمای ۱۵ درجه سلسیوس نگه داشته شده بودند (treated larvae) و لاروهای زمستان‌گذران جمع‌آوری شده در دی ماه (overwintering larvae) کرم برگ‌خوار چغندر. A- تری‌هالوز، B- گلوکز، C- گلیسرول، D- مایواینوزیتول و E- سوربیتول. حروف مشابه نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون توکی می باشد.

Fig. 5. Cryoprotectants changes in the lab-reared 5th instar larvae (control), lab-reared 5th instar larvae that treated at 15°C for 72h (treated larvae) and overwintering larvae of beet armyworm collected in January 2009 (overwintering larvae). A, Trehalose; B, Glucose; C, Glycerol; D, Myo-inositol and E, Sorbitol. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

منابع

- Atapour, M. & Moharramipour, S.** (2009) Changes of cold hardiness, supercooling capacity and Major cryoprotectants in overwintering larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology* 38(1), 260-265.
- Atapour, M. & Moharramipour, S.** (2011) Changes in supercooling point and glycogen reserves in overwintering larvae and lab-reared samples of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to determining of cold hardiness strategy. *Applied Entomology and Phytopathology* 78(2), 199-216. [In Persian with English summary].
- 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 Phytopathology* 75(2), 27-38. [In Persian with English summary].
- Azideh, A. A. & Sofian-Azirun, M.** (2006) Life History of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on Various Host Plants. *Bulletin of Entomological Research* 96, 613-618.
- Bale, J. S.** (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 357 (B), 849-862.
- Bale, J. S., Hansen, T. N. & Baust, J. G.** (1989) Nucleators and sites of nucleation in the freeze tolerant larvae of the gallfly *Eurosta solidaginis* (Fitch). *Journal of Insect Physiology* 35, 291-298.
- Baust, J. G.** (1973) Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems. *Cryobiology* 10, 197-205.
- Denlinger, D. L.** (1991) Relationship between cold hardiness and diapause. pp. 174-198 in Lee, R. E. & Denlinger, D. L. (Eds) *Insect at Low Temperature*. 513 pp. Chapman and Hall, New York.
- Denlinger, D. L.** (2002) Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47, 93-122.
- Ding, L., Li, Y. & Goto, M.** (2003) Physiological and biochemical changes in summer and winter diapause and non-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. during long-term cold acclimation. *Journal of Insect Physiology* 49, 1153-1159.

- Duman, J. G., Neven, L. G., Beals, J. M., Olson, K. O. & Castellino, F. J.** (1985) Freeze tolerance adaptations, including haemolymph protein and lipoprotein ice nucleators, in larvae of the crane fly *Tipula trivittata*. *Journal of Insect Physiology* 31, 1-9.
- Duman, J. G., Olsen, T. M., Yeung, K. L. & Jerva, F.** (1995) The roles of ice nucleators in cold tolerant invertebrates. pp. 201-219 in Lee, R. E., Warren, G. J. & Gusta, L. V. (Eds) *Biological ice nucleation and its applications*. 370 pp. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Goto, M., Fujii, M., Suzuki, K. & Sakai, M.** (1998) Factors affecting carbohydrate and free amino acid content in overwintering larvae of *Enosima leucotaeniella*. *Journal of Insect Physiology* 44(1), 87-94.
- Goto, M., Li, Y. & Honma, T.** (2001) Changes of diapause and cold hardiness in the Shonai ecotype larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) during overwintering. *Applied Entomology Zoology* 36(3), 323-328.
- Heppner, J. B.** (1998) *Spodoptera* armyworm in Florida (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Entomological Circular 390, 5 p.
- Horwath, K. L. & Duman, J. G.** (1984) Further studies on the involvement of the circadian system in photoperiodic control of antifreeze protein production in the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of Insect Physiology* 30, 947-955.
- Khanjani, M.** (2006) *Vegetable pests in Iran*. 2nd ed. 467 pp. Bu-Ali Sina University Press. [In Persian].
- Kheyri, M.** (1976) Investigation on outbreak on the beet armyworm *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae). *Applied Entomology and Phytopathology* 42, 1-15. [In Persian with English summary].
- Kheyri, M.** (1985) Investigation in the biology and population fluctuation of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hb) in Karaj, Iran. Ph. D. Thesis. Tehran University. [In Persian with English summary].
- Kim, Y. & Kim, N.** (1997) Cold hardiness in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Physiological and Chemical Ecology* 26(5), 1117-1123.
- Kim, Y. & Song, W.** (2000) Effect of thermoperiod and photoperiod on cold tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Physiological and Chemical Ecology* 29(5), 868-873.

- Kostal, V.** (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52, 113-127.
- Kostal, V., Slachta, M. & Simek, P.** (2001) Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Journal of Insect Physiology* 130 (B), 365-374.
- Kostal, V., Zahradnickova, H., Simek, P. & Zeleny, J.** (2007) Multiple component system of sugars and polyols in the overwintering spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Insect Physiology* 53, 580-586.
- Leather, S. R., Walters, K. F. A. & Bale, J. S.** (1993) *The ecology of insect overwintering*. 255 pp. Cambridge University Press.
- Lee, R. E.** (2010) A primer on insect cold-tolerance. pp. 3-34 in Denlinger, D. L. & Lee, R. E. (Eds) *Low temperature biology of insects*. 390 pp. Cambridge University Press.
- Lee, R. E. & Denlinger, D. L.** (1991) *Insects at low temperature*. 513 pp. Chapman and Hall, New York.
- Li, Y. P., Goto, M., Ito, S., Sato, Y., Sasaki, K. & Goto, N.** (2001) Physiology of diapause and cold hardiness in the overwintering pupae of the fall webworm *Hyphantria cunea* in Japan. *Journal of Insect Physiology* 47, 1181-1187.
- Pullin, A. S. & Bale, J. S.** (1989a) Effects of low temperature on diapausing *Aglais urticae* and *Inachis io* (Lepidoptera: Nymphalidae): overwintering physiology. *Journal of Insect Physiology* 35, 283-290.
- Pullin, A. S. & Bale, J. S.** (1989b) Influence of diapause and temperature on cryoprotectant synthesis and cold hardiness in pupae of *Pieris brassicae*. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 94(3), 499-503.
- Sømme, L. & Block, W.** (1982) Cold tolerance of *Collembola* at Signy Island, Maritime Antarctic. *Oikos* 38, 168-176.
- Storey, K. B. & Storey, J. M.** (1988) Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews* 68, 27-84.
- Zachariassen, K. E.** (1985) Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews* 65, 799-832.