Archive of SID

نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹۱ - ۳۲(۲): ۱۷-۳۳

ترکیبات ضد یخ و روند تغییرات آن‌ها در شته‌ی مومی کلم، *Brevicoryne brassicae* (Hem.: Aphididae)

فاطمه سعیدی[۱]، سعید محرمی‌پور[۱و*] و محسن برزگر[۲]

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

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

Cryoprotectants and their changes in cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (Hem.: Aphididae)

F. Saeidi[1], S. Moharramipour[1&*] and M. Barzegar[2]

1. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

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

چکیده

شته‌ی مومی کلم، *Brevicoryne brassicae* (L.)، یکی از آفات مهمی است که در طول دوره‌ی زمستان با تغذیه از انواع کلم، به‌ویژه کلم‌های زینتی، جمعیت بالایی را روی این گیاهان تشکیل می‌دهد. لذا به‌منظور شناسایی ترکیبات ضد یخ در شته‌ی مومی کلم و بررسی تغییرات این ترکیبات طی فصول سرد، افراد بالغ به‌صورت ماهانه از مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸ از روی کلم‌های زینتی جمع‌آوری گردید و میزان قندها و پلی‌ال‌های موجود در بدن، به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) تعیین شد. همچنین مقدار گلیکوژن موجود در نمونه‌ها به کمک طیف‌سنجی UV-Vis اندازه‌گیری شد. چهار ترکیب گلوکز، مانیتول، مایواینوزیتول و ترهالوز مورد شناسایی قرار گرفتند که مانیتول، مایواینوزیتول و ترهالوز رابطه‌ی همبستگی معنی‌داری را با میانگین دمای محیط نشان دادند. مجموع غلظت کل این سه ترکیب از کم‌ترین مقدار در مهر ماه (۳/۰۷ ± ۱۱/۹۰ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره) به بیش‌ترین مقدار (۸/۸۳ ± ۵۵/۸ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره) در سردترین ماه سال یعنی دی ماه افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد این سه ترکیب، به‌ویژه مانیتول، نقش مهمی در افزایش تحمل شته‌ی مومی کلم در برابر سرما دارند. میزان گلیکوژن طی ماه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد و از ۰/۵۸ ± ٤/۸ میلی‌گرم بر هر گرم وزن تر حشره در مهر ماه تا ۰/۹۸ ± ۳/۳ میلی‌گرم بر هر گرم وزن تر حشره در آذر ماه در نوسان بود و رابطه‌ی معنی‌داری بین گلیکوژن و ترکیبات ضد یخ مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: شته‌ی مومی کلم، *Brevicoryne brassicae*، ترکیبات ضد یخ، مانیتول و گلیکوژن

Abstract

Cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.), is an important pest of cabbage, especially ornamental cabbages, due to its voracity and population build-up on these plants in wintertime. The cryoprotectants of *B. brassicae* and their changes were investigated during the cold seasons. Adult aphids were collected monthly on ornamental cabbages from October 2008 through May 2009. The amount of sugars and polyols were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) and the amount of glycogen was spectrophotometrically determined. The identified compounds were as follows: glucose, mannitol, *myo*-inositol and trehalose. Mannitol, *myo*-inositol and trehalose were significantly correlated with

دریافت: ۱۳۹۰/۳/۳، پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۶.
www.SID.ir

Archive of SID

average temperature. The total amount of these compounds increased from the lowest amount (11.90 ± 3.07 µmol/g f.w.) in October to its highest (55.8 ± 8.83 µmol/g f.w.) in the coldest month, January. There appears that these three compounds, especially mannitol, play important roles in enhancing cold tolerance of *B. brassicae* during cold seasons. The amount of glycogen showed no significant differences during those months and varied from 4.8 ± 0.58 mg/g f.w. in October to 3.3 ± 0.98 mg/g f.w. in December. There was no significant correlation between glycogen and the cryoprotectants.
Key words: cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, cryoprotectants, mannitol, glycogen

مقدمه

طی دوره‌ی زمستان‌گذرانی در بدن حشرات یک‌سری تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اتفاق می‌افتد که به مصون ماندن حشرات از اثرات سوء ناشی از دماهای پایین کمک می‌کنند. ازجمله‌ی این تغییرات، افزایش غلظت یک‌سری ترکیبات با وزن مولکولی پایین شامل قندها و پلی‌ال‌ها می‌باشد که تحت عنوان ترکیبات ضد یخ شناخته شده‌اند. Chino (1957) برای نخستین‌بار افزایش گلیسرول و سوربیتول در تخم‌های زمستان‌گذران *Bombyx mori* L. (Lep.: Bombycidae) را گزارش نمود. افزایش غلظت قندها و پلی‌ال‌های با وزن مولکولی کم طی دوره‌ی زمستان‌گذرانی در تعداد زیادی از موجودات زنده اعم از گیاهان (Levitte, 1980)، کرم‌ها (Slotsbo *et al*., 2008)، کنه‌ها و عنکبوت‌ها (Sømme, 1979)، بسیاری از دم‌فنری‌ها و حشرات (Storey & Storey, 1991)، حتی خزندگان (Costanzo *et al*., 1995) و دوزیستان (Jenkins & Swanson, 2005) گزارش شده است. رایج‌ترین پلی‌ال گزارش شده در حشرات گلیسرول می‌باشد. علاوه‌برآن، حشرات قندها و پلی‌ال‌های مختلفی، ازجمله اتیلن‌گلیکول، ترهالوز، مایواینوزیتول، مانیتول، سوربیتول، ریبیتول، اریتریتول و ترئیتول را در واکنش به دماهای پایین سنتز می‌کنند (Kostal & Simek, 1994; Kostal *et al*., 2001; Walters, 2009; Lacey *et al*., 2010). این ترکیبات باعث حفظ ساختار طبیعی غشاهای بیولوژیک و پروتئین‌ها در دماهای پایین شده و به‌این‌ترتیب باعث افزایش تحمل حشره به سرما در ماه‌های سرد سال می‌شوند. در اکثر حشرات زمستان‌گذران یکی از مهم‌ترین منابع سنتز ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین، استفاده از ذخایر گلیکوژن طی ماه‌های پاییز و زمستان می‌باشد (Li *et al*., 2002).

علی‌رغم مطالعات وسیعی که در رابطه با شناسایی ترکیبات ضد یخ و نقش آن‌ها در تحمل به سرما در تعداد زیادی از گونه‌های حشرات صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای در این

www.SID.ir

Archive of SID

زمینه در شته‌ها انجام نشده است. ویژگی مهمی که شته‌ها را از لحاظ وضعیت زمستان‌گذرانی در مناطق معتدل از سایر حشرات متمایز کرده است، تداوم تغذیه و تولید مثل آن‌ها در طول فصول پاییز و زمستان می‌باشد. اکثر حشرات دارای یک مرحله‌ی زمستان‌گذران هستند که طی فصول پاییز و زمستان، تغذیه و تولید مثل خود را متوقف می‌سازند و با استفاده از ذخایر گلیکوژن، میزان قندها و پلی‌ال‌ها را به‌تدریج افزایش داده و تحمل خود را در برابر سرمای زمستان افزایش می‌دهند. درحالی‌که شته‌ها در مناطق معتدل در تمام طول سال حتی در زمستان نیز به تغذیه روی میزبان‌های گیاهی پرداخته و در ارتباط دائم با غذا می‌باشند. به همین دلیل نقش این ترکیبات در تحمل شته‌ها به سرما نادیده گرفته شده است.

شته‌ی مومی کلم، *Brevicoryne brassicae* (L.)، یکی از آفات مهم گیاهان خانواده‌ی چلیپائیان است که با تغذیه از شیره‌ی گیاهی و انتقال ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی خسارت فراوانی را به گیاهان این خانواده وارد می‌آورد (Costello & Altieri, 1995; Ellis *et al*., 1998; Satar *et al*., 2005). زمستان‌گذرانی این شته در کشورهای اروپایی نظیر روسیه و لهستان، آسیا و قسمت‌های شمالی ژاپن که دارای زمستان‌های بسیار سرد و سخت هستند، به‌صورت تخم می‌باشد، درحالی‌که در مناطق معتدل همانند آسیای مرکزی و سواحل دریای سیاه در قفقاز، زمستان را به‌صورت پوره و افراد بالغ سپری می‌کند (Takada, 1976; Arkhipov, 1985; Gabrys *et al*., 1997). شته‌ی مومی کلم زمستان را در تهران به‌دلیل وجود شرایط آب و هوایی معتدل به‌صورت پوره و افراد بالغ سپری می‌کند و در زمستان جمعیت انبوهی را روی کلم‌های زینتی تشکیل می‌دهد که می‌تواند منبعی برای ایجاد جمعیت‌های انبوه روی محصولات بهاره باشد و خسارت شدیدی را به‌این محصولات در اول فصل وارد کند (Saeidi *et al*., 2011). در مطالعه‌ای که روی میزان تحمل این آفت به سرما صورت گرفته، نشان داده شده است که این آفت قادر است تحمل خود به سرما را با سرد شدن هوا افزایش داده و دماهای بسیار پایین را در سردترین ماه‌های سال به‌راحتی تحمل کند. در مطالعه‌ی اخیر، ۵۰ درصد افراد بالغ در مهر ماه در دمای ۸/۵- درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت زنده ماندند که با سرد شدن هوا این میزان به ۱۱- درجه‌ی سلسیوس در ماه‌های سرد سال رسید. حتی ۲۰ درصد افراد جمعیت قادر به تحمل دمای ۱۳/۸- تا ۱٤/۸- درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت در سردترین ماه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

سال بودند (Saeidi *et al*., 2011). بنابراین شناسایی ترکیبات ضد یخ و بررسی روند تغییرات آن‌ها طی دوره‌ی زمستان‌گذرانی شته‌ی مومی کلم کمک زیادی به شناخت دلایل فیزیولوژیکی تحمل بالای این شته به سرما می‌کند. بدین منظور این تحقیق برای اولین‌بار با هدف تعیین ترکیبات ضد یخ مهم و اندازه‌گیری گلیکوژن و بررسی روند تغییرات آن‌ها طی دوره‌ی زمستان‌گذرانی شته‌ی مومی کلم انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و اطلاعات آب وهوایی

افراد بالغ شته‌ی مومی کلم طی ماه‌های مهر تا اردیبهشت ۸۸-۱۳۸۷ از روی کلم‌های زینتی کاشته شده در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس حدود ۲۵۰-۲۰۰ شته (حد اقل ۱۰۰ میلی‌گرم) در هر تکرار شمارش و توزین شده و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۵- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند.

جهت کسب اطلاعات دمایی مورد نیاز، از اطلاعات ایستگاه هواشناسی چیتگر واقع در مجاورت دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس استفاده گردید.

جداسازی و اندازه‌گیری قندها و پلی‌ال‌ها

جهت جداسازی و اندازه‌گیری قندها و پلی‌ال‌ها و بررسی روند تغییرات آن‌ها طی ماه‌های مختلف، از ٤ تکرار در هر ماه استفاده شد. به‌این صورت که ابتدا به هر نمونه ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه شده و در هاون چینی همگن شدند. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت g ۱۲۰۰۰، محلول رویی هر نمونه جدا و در میکروتیوب‌های ml ۱/۵ ریخته شد. سپس نمونه‌ها جهت تبخیر حلال (اتانول ۸۰ درصد) در آون تحت خلاء گذاشته شدند. پس از تبخیر کامل حلال، µl ۲۰۰ آب HPLC به هر نمونه اضافه شد و جهت تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) (Waters, USA) توسط صافی‌های سرسرنگی (Millex, USA) صاف شدند. برای جداسازی، از ستون مخصوص کربوهیدرات‌ها (300 × 7.8 mm, Supelco, USA) استفاده شد. فاز متحرک مورد استفاده آب (HPLC grade) و سرعت جریان فاز متحرک ۰/۵

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر در دقیقه بود و از آشکارساز نوع ضریب شکست (RI) استفاده شد. پس از انجام تنظیمات دستگاه و پایدارشدن آن ۲۰ µl از نمونه توسط سرنگ هامیلتون کشیده و به دستگاه تزریق و کروماتوگرام مربوطه ثبت شد. جهت تشخیص قندها و پلی‌ال‌ها در حشره، ابتدا استانداردهای ترکیبات مختلف شامل گلوکز، ترهالوز، گلیسرول، مایواینوزیتول، مانیتول، ریبیتول، آرابیتول و مالتیتول با چند غلظت مشخص تهیه و به دستگاه تزریق شد. سپس منحنی درجه‌بندی برای ترکیبات شناسایی‌شده رسم گردید و باتوجه به زمان بازداری، نوع قند موجود در نمونه و نیز باتوجه به سطح زیر پیک و منحنی درجه‌بندی، غلظت قند در نمونه اندازه‌گیری شد (Atapour & Moharramipour, 2009).

اندازه‌گیری گلیکوژن

جهت استخراج گلیکوژن، به رسوب حاصل از اولین مرحله‌ی سانتریفیوژ در اندازه‌گیری قندها و پلی‌ال‌ها، ۱ میلی‌لیتر محلول پتاس (KOH) ۳ درصد اضافه و ۳۰–۲۰ دقیقه جوشانیده شد. سپس ۰/۸ میلی‌لیتر محلول رسوب‌گذاری (دو قسمت NaCl دو درصد و هفت قسمت اتانول ۹۵ درصد) اضافه و پس از نیم‌ساعت جوشانیدن به یخچال منتقل شد. پس از ۲٤ ساعت نگه‌داری در یخچال، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پس از دوبار آب‌شویی با آب دوبار تقطیر، به نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر الکلی (alcohol reagent) و ۲ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. مقدار گلیکوژن موجود در نمونه‌ها به کمک طیف‌سنج UV-Vis در طول موج ٦٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا غلظت‌های مختلفی از استاندارد (۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر الکلی و ۲ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر) تهیه و جذب آن‌ها خوانده شد. سپس منحنی کالیبراسیون (جذب در برابر غلظت) رسم و با استفاده از معادله‌ی خط به‌دست آمده مقدار گلیکوژن موجود در نمونه‌ها محاسبه شد (Hansen *et al*., 1952).

تجزیه‌ی آماری

اطلاعات به‌دست آمده به‌صورت میانگین ± خطای معیار گزارش شدند. تجزیه‌ی داده‌ها با کمک تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شد و در صورت معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

شدن، مقایسه‌ی میانگین تیمارهای مختلف با کمک آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (V.16.0) انجام شد. جهت بررسی رابطه‌ی همبستگی مقادیر لگاریتمی ترکیبات ضد یخ با میانگین دمای محیط از روابط همبستگی پیرسون استفاده شد.

نتایج و بحث

اطلاعات آب و هوایی

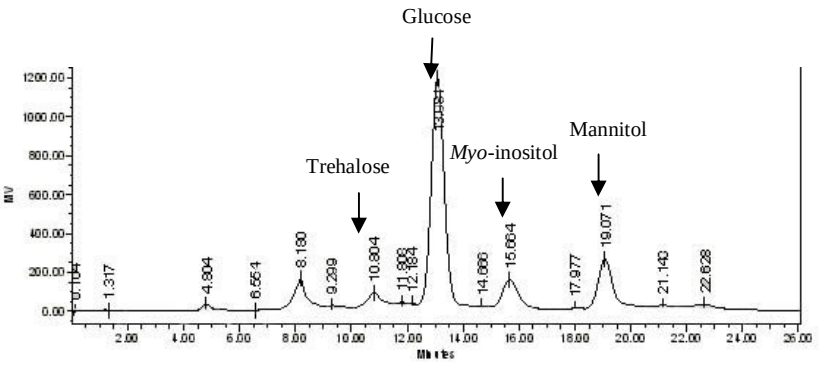
میانگین دمای هوا در زمان شروع مطالعه در مهر ماه سال ۱۳۸۷، ۲۲/۲ درجه‌ی سلسیوس بود که به‌تدرج طی ماه‌های بعدی کاهش یافت، به‌طوری‌که به‌ترتیب در آبان و آذر ماه به ۱۱ و ۷ درجه‌ی سلسیوس رسید. کم‌ترین میانگین دمای هوا در دی ماه (٤/۳ درجه‌ی سلسیوس) مشاهده شد. پس از آن دوباره میانگین دمای هوا روند افزایشی را طی کرد، به‌طوری‌که در اسفند ماه که افراد بال‌دار شته ظاهر می‌شوند میانگین دمای هوا به ۱۱ و در اردیبهشت ماه به ۱۸/٤ درجه‌ی سلسیوس رسید. به‌طورکلی براساس اطلاعات هواشناسی، سردترین ماه‌ها در سال ۱۳۸۷ آذر، دی و بهمن بوده است.

قندها و پلی‌ال‌ها

در این مطالعه چهار ترکیب گلوکز، مانیتول، ترهالوز و مایواینوزیتول مورد شناسایی قرار گرفتند که تغییرات فصلی قابل توجهی را نشان دادند (شکل ۱). گلوکز در تمام ماه‌های مورد مطالعه دارای بیش‌ترین مقدار نسبت به سایر ترکیبات بود و طی ماه‌های مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار نشان داد ($F = ۱۰/۱۷٤$؛ $df = ۷, ۲۱$؛ $P < ۰/۰۰۰۱$). غلظت گلوکز در مهر ماه ۸/۷ ± ۵۸/٦٦ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره به‌دست آمد و در آبان ماه به ۸/۷ ± ۱۰٤ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره افزایش یافت. گلوکز در دی ماه به بیش‌ترین مقدار (۱٤/٤ ± ۱٤۳/۲ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره) رسید، به‌طوری‌که به‌جز آبان ماه با سایر ماه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد. سپس مقدار آن در ماه‌های بعدی کاهش یافت (شکل ۲). در این مطالعه رابطه‌ی همبستگی معنی‌داری میان غلظت این ترکیب و میانگین دمای هوا مشاهده نشد ($P = ۰/۰۹۳$، $r = -۰/۶۷۹$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- کروماتوگرام HPLC مربوط به جداسازی قندها و پلی‌ال‌های موجـود در نمونـه‌ای از شته‌ی *B. brassicae*.

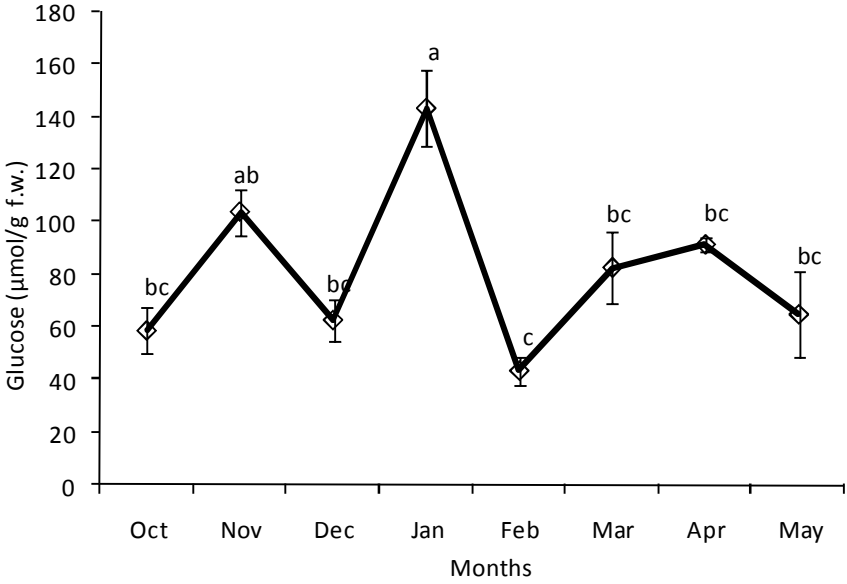
Fig. 1. HPLC chromatogram of cryoprotectants separation in a sample of *B. brassicae.*

در بسیاری از مطالعات انجام شده در این زمینه، تاکنون گزارشی مبنـی‌بـر اینکـه گلـوکز به‌عنوان ترکیب اصلی ضد یخ در حشرات شناخته شده باشد وجود ندارد امـا بـه‌همـراه سـایر ترکیبات گزارش شده است. به‌عنوان مثال، در تخم‌های سرمادیده‌ی جمعیت‌های مناطق معتدل و نیمـه‌گرمسـیری ملـخ *Locusta migratoria* (L.) گلـوکز بـه‌همـراه فروکتـوز، سـوربیتول، مایواینوزیتول و گلیسرول در پاسـخ بـه دماهـای پـایین سـنتز مـی‌شـود (Wang *et al*., 2010). همچنین، گلوکز در شفیره‌های زمستان‌گذران *Hyphantria cunea* Drury بـه‌همـراه گلیسـرول و مایواینوزیتول در مقادیر بسیار ناچیز شناسایی شده است (Li *et al*., 2001). حتی در تعـدادی از مطالعات کـاهش ایـن ترکیـب طـی دوره‌ی زمسـتان‌گـذرانی حشـرات گـزارش شـده اسـت (Atapour & Moharramipour, 2009).

مانیتول دیگر ترکیب شناسایی‌شده‌ای بود که غلظت آن طی ماه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار نشان داد ($F = ۵/۵٤٤$؛ $df = ۷, ۲۱$؛ $P < ۰/۰۰۰۱$). کم‌ترین مقدار این ترکیب در مهـر ماه (۳ ± ۷/۳ میکرومـول بـر هـر گـرم وزن تـر حشـره) و بـیش‌تـرین مقـدار آن در دی مـاه (٦/٥ ± ۳۸/۳ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره) به‌دست آمد. مقدار مانیتول تنها در دی مـاه اختلاف معنی‌دار با سایر ماه‌ها داشت (شکل ۳). رابطه‌ی همبستگی معنی‌داری بین غلظت ایـن

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تغییرات میانگین (± خطای معیار) غلظت گلوکز در افراد بالغ شته‌ی *B. brassicae* طی ماه‌های مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸. خطوط عمودی داخل شکل بیانگر خطای معیار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی می‌باشد.

Fig. 2. Glucose mean (± SE) concentration changes in *B. brassicae* adults from October 2008 to May 2009. Vertical lines in the graph indicate standard error. Means with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

ترکیب و میانگین دمای هوا در ماه‌های مورد مطالعه مشاهده شد ($r = -۰/۷۶۰$ ،$P = ۰/۰۷٤$). مانیتول یک پلی‌ال شش کربنه با زنجیر خطی است که در سلسله‌ی جانوران خیلی توسعه نیافته است، بااین‌وجود در تعداد کمی از حشرات گزارش شده است (Gehrken, 1984). در مطالعه‌ای که روی متابولیسم تولید پلی‌ال‌ها در دماهای بالا در شته‌ی *Aphis gossypii* Glover انجام شد، نشان داده شده است که دماهای بالا (> ۳۵°C) سبب تحریک تولید مانیتول می‌شود. میزان مانیتول در شته‌هایی که در صبح (دمای ۲٦°C-۲۵) جمع‌آوری شده بودند کم‌تر از میزان مانیتول در شته‌های جمع‌آوری‌شده در عصر (دمای ٤۲°C-۳۸) بود و نقش مهمی در تحمل

www.SID.ir

Archive of SID

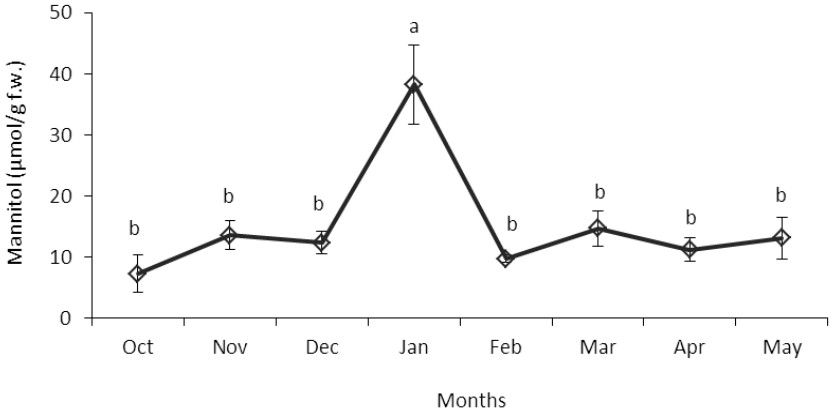
شته در دماهای بالا داشت (Hendrix & Salvucci, 1998). براساس نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر به‌نظر می‌رسد که مانیتول سبب محافظت شته‌ها در برابر استرس‌های دمایی اعم از سرما و گرما می‌شود. چنین خاصیتی برای سوربیتول در سفیدبالک‌ها نیز گزارش شده است (Wolfe *et al*., 1998). در بسیاری از گیاهان، شیره‌ی گیاهی شامل مقادیر فراوانی از ساکارز است (Tarczynski *et al*., 1992). حشراتی که از شیره‌ی گیاهی تغذیه می‌کنند، ساکارز را با استفاده از آنزیم سوکراز به گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌کنند (Niimi *et al*., 1993). در سفیدبالک‌ها و شته‌ها فروکتوز به‌عنوان سوبسترا و NADPH به‌عنوان کوآنزیم برای تولید پلی‌الها عمل می‌کنند (Salvucci *et al*., 1997). در شته‌ها، فروکتوز در اثر فعالیت آنزیم مانیتول‌دهیدروژناز به مانیتول تبدیل می‌شود که این واکنش توسط NADPH ketose reductase تسریع می‌شود (Hendrix & Salvucci, 1998). همان‌گونه که گفته شد اطلاعاتی در زمینه‌ی بررسی ترکیبات ضد یخ در شته‌ها در دست نیست و فقط اشاره شده است که مانیتول و گلیسرول ترکیباتی هستند که می‌توانند نقش مهمی در تحمل شته‌ها به سرما داشته باشند (Sømme, 1969). مانیتول در گونه‌های دیگری از حشرات، ازجمله در حشرات کامل زمستان‌گذران سوسک *Ips typographus* (L.) (Kostal *et al*., 2007)، در حشرات کامل دارای دیاپوز سن *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Kostal *et al*., 2001) و سرخرطومی *Lissorhopterus oryzophilus* L. (Lee *et al*., 2002) به‌عنوان ترکیب ضد یخ به‌همراه سایر ترکیبات گزارش شده است. باوجود اینکه گلیسرول به‌عنوان یک ترکیب ضد یخ مهم در بسیاری از حشرات زمستان‌گذران گزارش شده است (Layne Jr, 2004; Atapour & Moharramipour, 2009) اما در بعضی از حشرات زمستان‌گذران نظیر کرم سیب، *Cydia pomonella* (L.)، گلیسرول به‌عنوان ترکیب اصلی ضد یخ گزارش نشده است (Khani *et al*., 2007). بااین‌وجود، با بررسی‌های دقیق به‌عمل آمده در پژوهش حاضر وجود گلیسرول در حشرات زمستان‌گذران شته‌ی مومی کلم به اثبات نرسید.

در تمام ماه‌های مورد مطالعه دو ترکیب مایواینوزیتول و ترهالوز نیز شناسایی شدند که مایواینوزیتول اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($F = ۵/۵۴۴$؛ $df = ۷, ۲۱$؛ $P < ۰/۰۰۰۱$) ولی مقدار ترهالوز اختلاف معنی‌دار میان ماه‌های مختلف نداشت ($F = ۲/۵۴۳$؛ $df = ۷, ۲۱$؛ $P = ۰/۰۴۶$). بااین‌وجود، هر دو ترکیب در دی ماه دارای بیش‌ترین مقدار، به‌ترتیب ۱/۸ ± ۱۱/۷

www.SID.ir

Archive of SID

و ۰/٦ ± ۵/۸ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره بودند (شکل ٤). رابطه‌ی همبستگی معنی‌داری بین این ترکیبات و میانگین دمای هوا با ضرایب همبستگی r = −۰/۸۷۳، P = ۰/۰۱ برای مایواینوزیتول و r = ۰/۸۳۱، P = ۰/۰۲۱ برای ترهالوز مشاهده شد. این دو ترکیب جزء ترکیبات ضد یخ رایجی هستند که در اکثر حشرات زمستان‌گذران تولید شده و در بعضی از گونه‌ها به‌عنوان ترکیب اصلی ضد یخ عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال، مایواینوزیتول در حشرات کامل زمستان‌گذران سوسک *Aulacophora nigripennis* (Motsch.) (Watanabe & Tanaka,1999) و *Harmonia axyridis* Pallas (Watanabe, 2002) و ترهالوز در لاروهای زمستان‌گذران کرم سیب (Khani *et al*, 2007) و شفیره‌های دیاپوزی *H. cunea* (Li *et al*., 2001) به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب ضد یخ شناخته شده است.

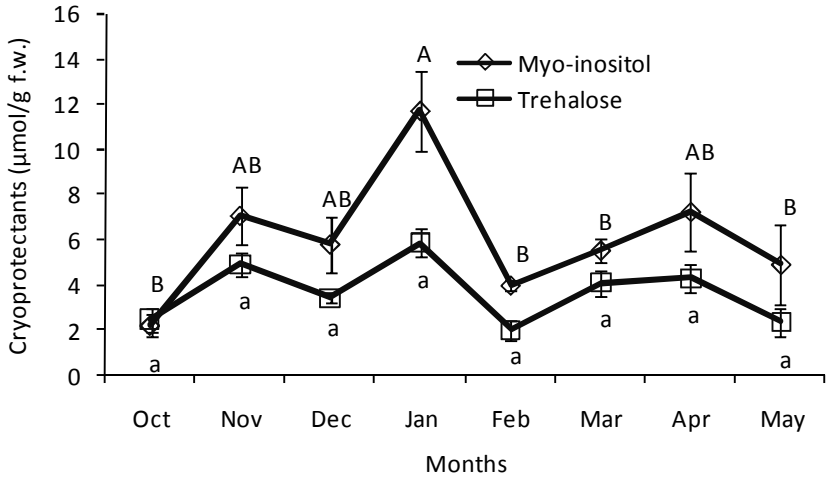


شکل ۳- تغییرات میانگین (± خطای معیار) غلظت مانیتول در افراد بالغ شته‌ی *B. brassicae* طی ماه‌های مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸. خطوط عمودی داخل شکل بیانگر خطای معیار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی می‌باشد.

Fig. 3. Mannitol mean (± SE) concentration changes in *B. brassicae* adults from October 2008 to May 2009. Vertical lines in the graph indicate standard error. Means with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- تغییرات میانگین (± خطای معیار) غلظت مایواینوزیتول و ترهالوز در افراد بالغ شته‌ی *B. brassicae* طی ماه‌های مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸. خطوط عمودی داخل شکل بیانگر خطای معیار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی می‌باشد.

Fig. 4. *Myo*-inositol and trehalose mean (± SE) concentration changes in *B. brassicae* adults from October 2008 to May 2009. Vertical lines in the graph indicate standard error. Means with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

مجموع غلظت سه ترکیب مانیتول، مایواینوزیتول و ترهالوز در ماه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار نشان داد ($F = ۸/۲۳۳$؛ $df = ۷, ۲۱$؛ $P < ۰/۰۰۰۱$). مجموع غلظت این ترکیبات در دی ماه بیش‌تر از سایر ماه‌ها بود (۸/۸۳ ± ۵۵/۸ میکرو مول بر هر گرم وزن تر حشره) و با سایر ماه‌ها اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۵).

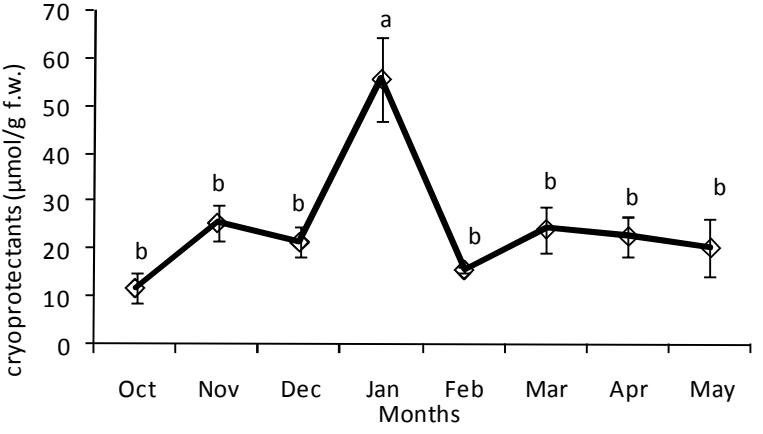
گلیکوژن

مقدار گلیکوژن درتمام ماه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($F = ۰/۳۸۹$؛ $df = ۷, ۱۶$؛ $P < ۰/۸۹۰$) و از بیش‌ترین مقدار (۰/۵۸ ± ٤/۸ میلی‌گرم بر هر گرم وزن تر

www.SID.ir

Archive of SID

حشره) در مهر ماه تا کم‌ترین مقدار (۰/۹۸ ± ۳/۳ میلی‌گرم بر هر گرم وزن تر حشره) در آذر ماه به میزان ۱/۵ میلی‌گرم بر هر گرم وزن تر حشره در نوسان بود (شکل ٦). یکی از منابع تولید قندها و پلی‌ال‌ها در سیستم‌های جانوری، استفاده از ذخایر گلیکوژن می‌باشد. تبدیل گلیکوژن به قندها و پلی‌ال‌ها در بسیاری از حشرات زمستان‌گذران و دارای دیاپوز گزارش شده است. گلیکوژن در مراحل فعال و بدون دیاپوز حشرات ذخیره شده و طی ماه‌های سرد و در مرحله‌ی زمستان‌گذران و دیاپوز حشرات مصرف می‌شود و مقدار آن طی این دوره کاهش می‌یابد (Chino, 1957; Salt, 1957). در مطالعه‌ی حاضر رابطه‌ی همبستگی معنی‌داری بین مقدار گلیکوژن و ترکیبات ضد یخ در ماه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (P = ۰/۸۸۱، r = ۰/۰۶۴) و میزان تغییرات آن در مقایسه با تغییرات گلیکوژن در سایر حشرات زمستان‌گذران بسیار اندک



شکل ۵- تغییرات میانگین (± خطای معیار) مجموع غلظت کل مانیتول، مایواینئزیتول و ترهالوز در افراد بالغ شته‌ی *B. brassicae* طی ماه‌های مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸. خطوط عمودی داخل شکل بیانگر خطای معیار و حروف مشابه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از آزمون توکی می‌باشد.

Fig. 5. Total cryoprotectants mean (± SE) concentration changes in *B.brassicae* adults from October 2008 to May 2009. Vertical lines in the graph indicate standard error. Means with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

www.SID.ir

Archive of SID

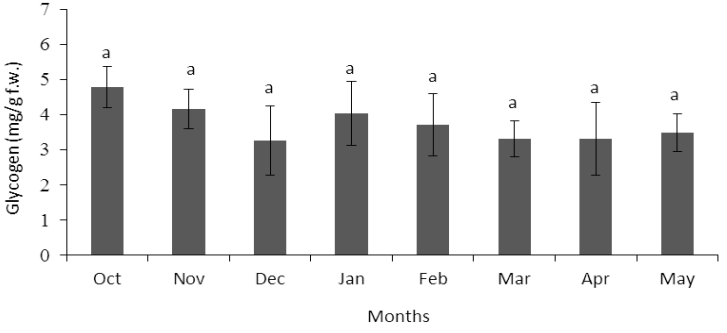
می‌باشد. به‌عنوان مثال در مطالعاتی که روی تغییرات گلیکوژن در کرم ساقه‌خوار برنج، *Chilo suppressalis* (Walker)، انجام شد، مقدار گلیکوژن از کم‌ترین مقدار در بهمن ماه (۰/۵ ± ۱۳/۷۲ میلی‌گرم بر هر گرم وزن تر حشره) تا بیش‌ترین در مرداد ماه (۳/۹ ± ۳۰/۸۵ میلی‌گرم بر هر گرم وزن تر حشره) به میزان حدود ۱۷ میلی‌گرم در نوسان بود، به‌طوری‌که به‌ازای افزایش گلیسرول طی ماه‌های پاییز و زمستان میزان گلیکوژن کاهش می‌یافت (Atapour & Moharramipour, 2009). به‌نظر می‌رسد شته‌ها، جهت تولید قندها و پلی‌ال‌ها از منابع گلیکوژن استفاده نمی‌کنند. ازآنجاکه شته‌ها در تمام طول سال از گیاه تغذیه می‌کنند، قندها و پلی‌ال‌های موجود در شیره‌ی گیاهی را یا به‌طور مستقیم دریافت می‌کنند و یا به‌طور مستقیم از غذای تغذیه‌کرده می‌سازند، زیرا به‌طور دایم به غذا دسترسی دارند. بنابراین نیازی به ذخیره‌ی گلیکوژن جهت تولید این ترکیبات از طریق مسیرهای متابولیسم واسطه نخواهند داشت (Knight & Bale, 1986).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیبات ضد یخ شناسایی‌شده در شته‌ی مومی کلم در مواجهه با شوک‌های سرمایی در ماه‌های سرد سال سنتز می‌شوند. در مطالعات قبلی ما میزان تحمل افراد بالغ شته‌ی مومی کلم به سرما در دماهای ۵-، ۱۰- و ۱۵- درجه‌ی سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت طی ماه‌های مهر ۱۳۸۷ تا اردیبهشت ۱۳۸۸ مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه‌ی اخیر ۷۰ تا ۹۰ درصد افراد بالغ به‌راحتی قادر به تحمل دمای ۵- درجه‌ی سلسیوس بودند. درحالی‌که میزان بقای افراد بالغ در دمای ۱۰- درجه‌ی سلسیوس تغییرات چشم‌گیری نشان داد، به‌طوری‌که درصد بقا از ۵۵ درصد در مهر و آبان به ۸۰ درصد در دی ماه رسید و تقریباً تا بهمن ماه ثابت ماند. با گرم شدن هوا در بهار، میزان تحمل به سرما نیز کاهش یافت و درصد بقا به ٤٠ درصد در اردیبهشت ماه رسید (میزان تلفات در دمای ۱۵- درجه‌ی سلسیوس بسیار بالا بود) (Saeidi *et al*., 2011). این در حالی است که مقدار کل ترکیبات ضد یخ نیز از ۳/۰۷ ± ۱۱/۹میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره در مهر ماه با یک افزایش حدود ٤/٥ برابری به۸/۸۳ ± ۵۵/۸ میکرومول بر هر گرم وزن تر حشره در دی ماه رسید و پس از آن در ماه‌های بعدی کاهش یافت. افزایش مقدار ترکیبات ضد یخ، به‌ویژه مانیتول، در این شته طی ماه‌های پاییز و زمستان و رسیدن آن‌ها به بیش‌ترین مقدار خود در ماه‌های سرد سال، به‌ویژه دی ماه،

www.SID.ir

Archive of SID

هماهنگی قابل توجهی را با تحمل بالای این شته در دماهای زیر صفر درجه‌ی سلسیوس در این ماه‌ها نشان داد. به‌این‌ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این ترکیبات نقش مهمی در تحمل شته‌ی مومی کلم به سرما دارند و حشره با افزایش غلظت این ترکیبات در مواجهه با دماهای پایین قادر است بقای خود را در شرایط سرد و سخت زمستان افزایش داده و جمعیت‌های انبوهی را روی میزبان‌های زمستانه ایجاد کند.



شکل ٦- تغییرات میانگین (± خطای معیار) غلظت گلیکوژن در افراد بالغ شته‌ی *B. brassicae* از مهر ۱۳۸۷تا اردیبهشت ۱۳۸۸. میانگین‌ها بر اساس تجزیه‌ی واریانس (ANOVA) معنی‌دار نبودند.

Fig. 6. Glycogen mean (± SE) concentration changes in *B. brassicae* adults from October 2008 to May 2009. Means were not significant according to ANOVA.

منابع

Arkhipov, G. E. (1985) Sucking pests of crucifers. *Zashchita Rastenii*, *Moscow* 9, 50-51.

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.

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

Costanzo, J. P., Grenot, C. & Lee, R. E. (1995) Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Computational Physics* 165, 238-244.
www.SID.ir

Archive of SID

Costello, M. J. & Altieri, M. A. (1995) Abundance, growth rate and parasitism of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* on broccoli grown living mulches. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 52, 187-196.

Ellis, P. R., Pink, D. A. C., Phelps, K., Jukes, P. L., Breeds, S. E. & Pinnegar, A. E. (1998) Evaluation of a core collection of brassicae accessions for resistance to *Brevicoryne brassicae*. *Euphytica* 103, 149-160.

Gabrys, B. J., Gadomski, H. J., Klukowski, Z., Pickett, J. A., Sobota, G. T., Wadhams, L. J. & Woodcock, C. M. (1997) Sex pheromone of cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*: identification and field trapping of male aphids and parasitoids. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1881-1890.

Gehrken, U. (1984) Winter survival of an adult bark beetle *Ips acuminatus* Gyll. *Journal of Insect Physiology* 30, 421-429.

Hansen, R., Rutter, W. & Craine, E. (1952) A nephelometric method for the determination of glycogen. *Journal of Biological Chemistry* 195, 127-132.

Hendrix, D. L. & Salvucci, M. E. (1998) Polyol metabolism in homopterans at high temperatures: accumulation of mannitol in aphids (Aphididae: Homoptera) and sorbitol in whiteflies (Aleyrodidae: Homoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 120, 487-494.

Jenkins, J. & Swanson, D. (2005) Liver glycogen, glucose mobilization and freezing survival in chorus frogs, *Pseudacris triseriata*. *Journal of Thermal Biology* 30, 485-494.

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

Knight, J. D. & Bale, J. S. (1986) Cold hardiness and overwintering of the grain aphid *Sitobion avenae*. *Ecological Entomology* 11, 189-197.

Kostal, V. & Simek, P. (1994) 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.

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). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 130, 365-374.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

Lacey, M. J., Lenz, M. & Evans, Th. A. (2010) Cryoprotection in dampwood termites (Termopsidae, Isoptera). *Journal of Insect Physiology* 56, 1-7.

Layne Jr, J. R. (2004) Freeze tolerance and cryoprotection in caterpillars of the giant leopard moth *Ecpantheria scribonia* (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Thermal Biology* 30, 267-271.

Lee, K. Y., Chang, Y. D. & Kim, Y. G. (2002) Trehalose, a major sugar cryoprotectant of the overwintering rice water weevil, *Lissorhopterus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 5, 35-41.

Levitte, J. (1980) *Responses of plants to environmental stresses*: *chilling, freezing and high temperatures* stresses. Vol. 1, 2nd ed. 497 pp. Academic Press, New York.

Li, Y. P., Goto, M., Ding, L. & Tsumuki, H. (2002) Diapause development and acclimation regulation enzymes associated with glycerol synthesis of the sonahi ecotype of the rice stem borer larva, *Chilo suppressalis* Walker. *Journal of Insect Physiology* 48, 303-310.

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.

Niimi, T., Yamashita, O. & Yaginuma, T. (1993) A cold inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry* 213, 1125-1131.

Saeidi, F., Moharramipour, S. & Atapour, M. (2012) Changes of supercooling point and cold tolerance in overwintering adults of *Brevicoryne brassicae* (Hem.: Aphididae) in Tehran, Iran. *Journal of Entomological Society of Iran* 31(2), 79-91.

Salt, R. (1957) Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. *Canadian Entomology* 89, 491-494.

Salvucci, M. E., Wolfe, G. R. & Hendrix, D. L. (1997) Effect of sucrose concentration on carbohydrate metabolism in *Bemisia argentifolii*: biochemical mechanism and physiological role for trehalose synthesis in the silverleaf whitefly. *Journal of Insect Physiology* 43, 457-464.

www.SID.ir

Archive of SID

Satar, S., Kersting, U. & Ulusoy, M. R. (2005) Temperature dependent life history traits of *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hom., Aphididae) on white cabbage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29, 341-346.

Slotsbo, S., Maraldo, K., Malmendal, A., Nielsen, N. C. & Holmstrup, M. (2008) Freeze tolerance and accumulation of cryoprotectants in the enchytraeid *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) from Greenland and Europe. *Cryobiology* 57, 286-291.

Sømme, L. (1969) Manitol and glycerol in overwintering aphid eggs. *Norsk Entomologisk Tidsskrift* 16, 107-111.

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

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.

Takada, H. (1976) Studies of aphids and their parasites on cruciferous crops and potatoes, II life-cycle. *Kontyu* 44, 366-384.

Tarczynski, M., Byrne, D. & Miller, W. (1992) High performance liquid chromatography analysis of carbohydrates of cotton-phloem sap and of honeydew produced by *Bemisia tabaci* feeding on cotton. *Plant Physiology* 98, 753-756.

Walters, K. R. Jr., Pan, Q. F., Serianni, A. S. & Duman, J. G. (2009) Cryoprotectant biosynthesis and the selective accumulation of threitol in the freeze-tolerant Alaskan beetle, *Upis ceramboides*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 16822-16831.

Wang, X. H., Qi, X. L. & Kang, L. (2010) Geographic differences on accumulation of sugars and polyols in locust eggs in response to cold acclimation. *Journal of Insect Physiology* 56, 966-970.

Watanabe, M. (2002) Cold tolerance and myo-inositol accumulation in overwintering adults of a lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology* 99, 5-9.

Watanabe, M. & Tanaka, K. (1999) Cold tolerance strategy of the freeze-intolerant chrysomelid, *Aulacophora nigripennis* (Coleoptera: Chrysomelidae), in warm-temperate regions. *European Journal of Entomology* 96, 175-181.

Wolfe, G. R., Hendrix, D. L. & Salvucci, M. E. (1998) A thermoprotective role for sorbitol in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Insect Physiology* 44, 597-603.

www.SID.ir