نام خانوادگی: سعادتی بزدی **نام**: محمد

عنوان رساله: تجزیه پروتئوم غده بزاقی و روده پوره‌های سن پنجم و حشرات کامل سن گندم *Eurygaster integriceps* (Put.)

استادان راهنما: دکتر رضا فرشباف پور آباد دکتر محمود تورچی
استاد مشاور: دکتر نصرت اله ضرغامی

مقطع تحصیلی: دکتری **رشته**: حشره شناسی کشاورزی **گرایش**: فیزیولوژی **دانشگاه**: تبریز
دانشکده: کشاورزی **تاریخ فارغ التحصیلی**: ۱۳۹۱ **تعداد صفحه**: ۱۲۷
کلید واژه ها: غده بزاقی، روده، پروتئوم، سن گندم، متابولیسم.

چکیده:

دستگاه گوارش سن گندم *Eurygaster integriceps* Put. از دو اندام غده بزاقی و روده تشکیل شده است. ترشحات بزاقی در سن گندم باعث مایع کردن قسمتی از بافت گیاهی می گردد که به آن هضم خارج دهانی می‌گویند. این قسمت از بافت گیاه به درون روده پمپ می‌شود تا مرحله نهایی هضم در آنجا انجام گیرد. کارآیی دستگاه گوارش در سن گندم به پروتئین های موجود در آن بستگی دارد. در این مطالعه دو مرحله مهم پوره سن پنج و حشره کامل نسل جدید برای تجزیه پروتئوم غده بزاقی و روده حشره انتخاب گردیدند. الگوی پروتئینی این دو اندام با استفاده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی تعیین گردید و پروتئین هایی را که میزان بیان آنها در دو مرحله پوره و سن پنج دارای اختلاف معنی داری بود برای شناسایی نهایی با اسپکترومتری جرمی انتخاب شدند. از مجموع ۳۱۹ لکه پروتئینی شناسایی شده در روده، ۵۵ لکه پروتئینی دارای اختلاف معنی داری بین پوره سن پنج و حشره کامل بودند. ۲۳ لکه پروتئینی برای شناسایی انتخاب گردیدند که ۲۲ لکه در روده حشرات کامل و یک لکه پروتئینی در روده پوره های سن پنجم تجمع یافته بودند. پروتئین های موثر در متابولیسم ماکرومولکولهای زیستی مانند گلیسر آلدهید۳-فسفات دهیدروژناز، اسیل کوآنزیم A دهیدروژناز و گلوتامات دهیدروژناز؛ پروتئین های موثر در متابولیسم انرژی، آنتی اکسیدان ها، پروتئین های وابسته به سیستم ماهیچه ای و تعدادی پروتئین با نقش های متنوع مثل TCTP و HSC

70 در روده حشرات کامل تجمع یافته بودند و تنها HSP 70 در روده پوره های سن پنجم تجمع یافته بود. همچنین سه پروتئین گیاهی سرپین، بتا-آمیلاز و دی هیدرواسکوربات ردوکتاز در روده حشرات کامل شناسایی گردیدند. در غده بزاقی از بین ۱۳۱ لکه پروتئینی شناسایی شده، بیان ۱۳ لکه پروتئینی بین دو مرحله حشره کامل و پوره سن پنج اختلاف معنی داری داشتند. شش لکه پروتئینی در مرحله حشره کامل و هفت لکه در پوره های سن پنج تجمع یافته بودند. هیپوتتیکال پروتئین در غده بزاقی پوره های سن پنج و آرژنین کیناز در غده های بزاقی حشرات کامل با استفاده از اسپکترومتری جرمی شناسایی گردیدند. برای شناسایی سایر لکه های پروتئینی از توالی یابی پروتئین به روش ادمن استفاده گردید که منجر به شناسایی فسفولیپاز A2 در حشرات کامل گردید. تجمع پروتئین های موثر در متابولیسم مواد غذایی در روده حشرات کامل نشان داد که کارایی گوارش در این مرحله بالاتر از پوره های سن پنج می‌باشد. همچنین شناسایی بعضی پروتئین های وابسته به سیستم ایمنی پیشنهاد می‌کند که واکنشهای ایمنی در این مرحله سازمان یافته تر از پوره های سن پنجم می‌باشد.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

مقدمه..... ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- سن گندم..... ۵

۱-۱-۱- شکل شناسی..... ۵

۱-۱-۲- پراکنش جغرافیایی..... ۷

۱-۱-۳-گستردگی میزبان..... ۷

۱-۱-٤- بیولوژی و اکولوژی..... ۸

۱-۱-۵- نحوه و میزان خسارت..... ۸

۱-۱-٦- کنترل سن گندم..... ۱۰

۱-۱-۷- رفتار تغذیه ای در ناجوربالان..... ۱۱

۱-۲- غده بزاقی..... ۱۵

۱-۳- روده..... ۲٤

۱-٤- پروتئومیکس..... ۳۲

۱-٤-۱- تکنیک پروتئومیکس..... ۳٤

۱-۱-٤-۱- شناسایی پروتئین به کمک روش های مبتنی بر راهبرد **Bottom-up**..... ۳٤

۱-۲-٤-۱- شناسایی پروتئین ها به وسیله روش های مبتنی بر راهبرد **Top-down**..... ۳۵

۲-٤-۱- کاربرد پروتئومیکس در حشره شناسی کشاورزی..... ۳۷

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- جمع آوری حشرات کامل سن گندم برگشتی..... ٤٠

۲-۲- تعیین میزان تغذیه و وزن در حشرات کامل و پوره های سن پنجم سن گندم..... ٤١

۲-۳- تشریح حشرات..... ٤١

۲-۳-۱- غده بزاقی..... ٤١

۲-۳-۲- روده..... ٤٢

۲-٤- استخراج پروتئین..... ٤٣

۲-٥- پروتئین کل..... ٤٥

۲-٦- الکتروفورز دو بعدی..... ٤٧

۲-٦-۱- ایزو الکتریک فوکسینگ..... ٤٨

۲-٦-۱-۱- استفاده از روش ژل لوله ای..... ٤٩

۲-٦-۱-۲- استفاده از روش ژل نواری..... ٥١

۲-٦-۲- بعد دوم (SDS-PAGE)..... ٥٣

۲-۷- رنگ آمیزی..... ٥٤

۲-۷-۱- رنگ آمیزی کوماسی ٥٥

۲-۷-۲- رنگ آمیزی با نیترات نقره..... ٥٥

۲-۸- رنگبری..... ٥٦

۲-۹- خشک کردن ژل ٥٦

۲-۱۰- تصویر برداری از ژل ها..... ٥٧

۲-۱۱- تجزیه تصویر ژل ها..... ٥٧

۲-۱۲- بریدن لکه های پروتئینی ۵۸

۲-۱۳- هضم..... ۵۹

۲-۱٤- نمک زدایی..... ٦۰

۲-۱۵- تعیین نسبت وزن مولکولی به بار هر پپتید با استفاده ازnano LC-MS/MS ٦۱

۲-۱٦- جستجو برای شناسایی پروتئین در داده پایگاه های بیو انفورماتیکی..... ٦۳

۲-۱۷- لکه گذاری الکتریکی..... ٦٤

۲-۱۸- توالی یابی پروتئین به روش ادمن..... ٦۵

فصل سوم: نتایج وبحث

۳-۱- اندازه گیری آزمایشگاهی میزان تغذیه و وزن در دو مرحله پوره سن پنج و حشره کامل..... ٦۹

۳-۲- تجزیه و تحلیل پروتئوم روده در حشرات کامل و پوره های سن پنجم سن گندم..... ۷۱

۳-۲-۱- پروتئین های موثر در متابولیسم قندها..... ۸٦

۳-۲-۲- پروتئین موثر در متابولیسم چربی ها..... ۸۸

۳-۲-۳- پروتئین های موثر در متابولیسم پروتئین ها..... ۸۹

۳-۲-٤- آنتی اکسیدان ها..... ۹۰

۳-۲-۵- پروتئین های وابسته به سیستم ماهیچه ای..... ۹۰

۳-۲-٦- پروتئین های موثر در متابولیسم انرژی..... ۹۲

۳-۲-۷- پروتئین هایی با نقش های متنوع..... ۹٤

۳-۲-۸- پروتئین های گیاهی وارد شده به روده سن گندم..... ۹٦

۳-۳- تجزیه و تحلیل پروتئوم غده بزاقی در حشرات کامل و پوره های سن پنجم سن گندم..... ۹۸

نتیجه گیری کلی..... ۱۰۸

پیشنهادات..... ۱۱۰

ضمیمه..... ۱۱۲

منابع مورد استفاده..... ۱۱۹

فهرست جداول، شکل ها و نمودارها

جدول، شکل و نمودار صفحه

جدول ۱-۳- تجزیه میزان بیان لکه های پروتئینی روده ای در دو مرحله حشره کامل و پوره سن پنج..... ۷۷

جدول ۲-۳- پروتئین های شناسایی شده در NCBI شاخه جانوران ۸۲

جدول ۳-۳- پروتئین های شناسایی شده در NCBI با استفاده از همه ورودی ها ۸٤

جدول ٤-۳- تجزیه میزان بیان لکه های پروتئینی غده بزاقی در دو مرحله حشره کامل و پوره سن پنج.....۱۰٦

شکل ۱-۱- حشره کامل سن گندم، پوره سن پنج سن گندم، تخمریزی سن گندم در دو ردیف ۷ تایی.....٦

شکل۲-۱- دانه های گندم سالم (ستون سمت راست) و دانه های سن زده (ستون سمت چپ).....۱۰

شکل ۳-۱- قسمت‌های مختلف غده بزاقی در سن *Lygus disponsi*.....۱٦

شکل ٤-۱- ساختمان دستگاه گوارش در سن *Leptocorisa varicornis*.....۲٦

شکل ۱-۲- ظروف پرورش سن گندم در اتاقک رشد گروه گیاهپزشکی.....٤۰

شکل۲-۲- غده بزاقی در حشره کامل سن گندم.....٤۲

شکل۳-۲- روده در حشره کامل سن گندم.....٤۳

شکل ٤-۲- دستگاه مکش برای تبخیر محلول و خشک کردن پلت پروتئینی.....٤٥

شکل ٥-۲- اسپکتروفوتومتر مدل DU 730.....٤٦

شکل ٦-۲- طرح ساده از روند کلی الکتروفورز دوبعدی.....٤۷

شکل ۷-۲- دستگاه ایزو الکتریک فوکسینگ به روش ژل لوله ای.....٥۰

شکل ۸-۲- ظرف مخصوص ژل های نواری ۱۱ سانتیمتری.....٥۲

شکل ۹-۲- دستگاه بعد اول.....٥۲

شکل ۱۰-۲- دستگاه الکتروفورز بعد دوم.....٥٤

شکل۱۱-۲- جعبه نوری برای بریدن لکه های پروتئینی.....٥۸

شکل ۱۲-۲- دستگاه هضم پروتئین.....٦۰

شکل ۱۳-۲- دستگاه نانو کروماتوگرافی.....۶۲

شکل ۱۴-۲- دستگاه اسپکترومتری جرمی.....۶۳

شکل ۱۵-۲- طرح شماتیک از طیف سنجی جرمی مرحله ای.....۶۲

شکل ۱۶-۲- دستگاه الکتروبلات.....۶۵

شکل ۱۷-۲- دستگاه توالی یابی پروتئین.....۶۷

شکل۱-۳- الگوی الکتروفورز دو بعدی روده در حشرات کامل سن گندم حاصل از نرم افزار تجزیه ژل.....۷۵

شکل ۲-۳- الگوی الکتروفورز دو بعدی روده در پوره سن پنج سن گندم حاصل از نرم افزار تجزیه ژل..... ۷۶

شکل ۳-۳- الگوی پروتئوم روده در پوره سن پنجم و حشره کامل سن گندم.....۸۰

شکل ۴-۳- الگوی بیان پروتئین های غده بزاقی سن گندم در دو مرحله: پوره سن پنج و حشره کامل.....۱۰۲

شکل ۵-۳- الگوی پروتئینی غده بزاقی در حشره کامل سن گندم که با نیترات نقره رنگ آمیزی شده است.....۱۰۷

نمودار ۱-۲- نمودار استاندارد غلظت های پروتئین به روش برادفورد.....۴۶

نمودار ۱-۳- مقایسه میانگین میزان خسارت در پوره های سن پنجم و حشرات کامل.....۷۰

نمودار ۲-۳- مقایسه میانگین وزن حشرات کامل و پوره های سن پنجم بعد از یک روز تغذیه ۷۱

نمودار ۳-۳- در صد بیان پروتئین های روده ای در سن گندم.....۷۴

نمودار ۴-۳- درصد بیان پروتئین های تجمع یافته روده در دو مرحله حشره کامل و پوره سن پنج.....۷۴

نمودار۵-۳- میزان نسبی بیان پروتئین ها در روده پوره های سن پنجم و حشرات کامل ۸۱

نمودار ۶-۳- فراونی نسبی گروههای پروتئینی تغییر یافته در روده حشره کامل و پوره سن پنجم سن گندم.....۸۶

نمودار ۷-۳- در صد بیان پروتئین های غده بزاقی در سن گندم.....۱۰۰

نمودار ۸-۳- درصد بیان پروتئین های تجمع یافته غده بزاقی در دو مرحله حشره کامل و پوره سن پنج.....۱۰۰

نمودار ۹-۳- میزان نسبی بیان پروتئین ها در غده بزاقی پوره های سن پنجم وحشرات کامل ۱۰۳

سن گندم *Eurygaster integriceps* (Put.) مهمترین آفت گندم در خاورمیانه بخصوص ایران می‌باشد (Javaheri et al., 2009). با آنکه جمعیت این آفت در سالهای متمادی نوساناتی را دارد اما در مجموع میانگین خسارت وارده در اکثر سال ها بالاتر از سطح زیان اقتصادی است. سن گندم یک نسل در سال دارد و بیش از ۸ ماه از سال را به صورت حشره کامل در دامنه کوهها و زیر بوته های گون در تابستان گذرانی و زمستان گذرانی بسر می‌برد و فقط ۳ تا ٤ ماه در مزرعه به صورت فعال حضور دارد. این حشره دارای پنج سن پورگی بوده و بجز سن یک در سایر سنین از گندم تغذیه می کند که بالاترین میزان خسارت نیز مربوط به حشرات کامل نسل جدید و پوره‌های سن پنجم می‌باشد (رجبی، ۱۳۸۲).

در ناجوربالان دو اندام غده بزاقی[1] و روده[2] وظیفه هضم موادغذایی و جذب را بر عهده دارند (Miles, 1969). غده بزاقی در سن گندم همانند سایر ناجوربالان وظیفه برقراری اولین تماس با گیاه را بر عهده دارد بدین صورت که با تزریق بزاق به دانه گندم باعث مایع شدن بخشی از محتویات دانه شده، سپس با پمپ کردن این مایع به درون روده هضم نهایی را انجام داده و در نهایت جذب صورت می گیرد (Brown, 1962; Critchley, 1998).

پروتئین‌های بزاقی وظیفه هضم اولیه مواد گیاهی را در خارج از بدن حشره به عهده دارند. مرحله تکمیلی گوارش موادغذایی در روده نیز توسط پروتئین های گوارشی انجام می‌گیرد. علاوه بر پروتئین-های گوارشی پروتئین‌های دیگری نیز در روده حشرات وجود دارند که وظایف دفاعی در مقابل سموم

1- Salivary gland

2- Gut

شیمیایی و عوامل بیمارگر را بعهده دارند (Pauchet et al., 2008). شناسایی پروتئین های موجود در غده بزاقی و روده حشرات کمک موثری در درک بهتر فیزیولوژی تغذیه و سازوکارهای دفاعی موجود در این دو اندام می‌نماید.

سن گندم با تغذیه از محتویات دانه گندم بخصوص پروتئین های ذخیره ای آن با نام گلوتن باعث افت شدید در کیفیت این محصول می‌شود (Javaheri et al., 2009). مطالعات زیادی روی این آفت در ایران و سایر کشورها انجام گردیده است با این حال هنوز سازوکار واقعی تغذیه این حشره مبهم باقیمانده است. به نظر می‌رسد یکی از دلایلی که کنترل شیمیایی، پس از چندین دهه پژوهش در باره این سن هنوز تنها روش موجود برای مبارزه با آن به شمار می‌رود غفلت از سازو کارهای واقعی تغذیه‌ای و فیزیولوژی گوارش این حشره می‌باشد.

امروزه در ایران فقط از کنترل شیمیایی برای مهار این آفت استفاده می‌شود، به طوری که هزینه‌های بسیار بالایی را برای تولید به کشاورزان تحمیل می کند، از طرف دیگر ورود بی‌رویه سموم به اکوسیستم، آلودگی‌های زیست محیطی را در پی دارد که عواقب آن در نسل های آینده بیشتر مشاهده خواهد شد. به همین دلیل استفاده از راهکارهای کم خطرتر برای مدیریت این آفت ضروری به نظر می‌رسد. تولید گیاهان مقاوم به حشرات که حامل ژن های کد کننده پروتئین‌های حشره کش باشند از راههای جدید و ایمن برای کاهش خسارت آفات محسوب می‌شوند. تولید چنین ارقامی نیاز به دانش کافی از فیزیولوژی حشره و انتخاب یک یا چند پروتئین هدف مناسب در بدن حشره و بدنبال آن طراحی و ساخت یک مهارکننده پروتئینی مناسب در گیاه میزبان دارد. در راستای چنین راهبردی مطالعه دستگاه گوارش سن گندم با تاکید بر شناسایی پروتئوم آن ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش از رهیافت پروتئومیکس

برای تعیین الگوی پروتئوم دو اندام غده بزاقی و روده سن گندم بر اساس الکتروفورز دو بعدی استفاده شد. بدین ترتیب لکه‌های پروتئینی که بیان آنها بین پوره‌های سن پنج و حشرات کامل اختلاف معنی داری داشتند با استفاده از اسپکترومتری جرمی مورد شناسایی قرار گرفتند.

با شناسایی پروتیئن‌های موجود در غده بزاقی و روده به روش پروتئومیکس، پژوهشگران می‌توانند در آینده ای نزدیک با استفاده از مهندسی پروتئین، مهارکننده‌های مناسب را بر علیه یک یا تعدادی از آنها طراحی کنند تا در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به سن گندم استفاده شوند.

۱-۱- سن گندم *Eurygaster integriceps* Put.

سن گندم مهمترین آفت کشتزارهای غلات در ایران می‌باشد، که همه ساله خسارت بسیار بالایی را به گندم و جو وارد می‌کند. سابقه خسارت این حشره در ایران بسیار طولانی است بطوریکه در زمان‌های گذشته باعث ایجاد قحطی نیز شده است. برای مثال رفیع مرودشتی (به نقل از عبدالهی،۱۳۸۳) در بیش از یکصد سال قبل در قالب شعر میزان خسارت این حشره را چنین بیان کرده است:

خشکیده باد بال و پر سن که هیچگاه در ملک فارس کس نشنیدی گدای کاه

اولین مقاله علمی در این زمینه توسط مقوم الملک به نام ورامین و سن خوارگی در شماره دوم مجله فلاحت در سال ۱۲۹۷ منتشر شده است (به نقل از عبدالهی، ۱۳۸۳). با آنکه سابقه پژوهش در مورد این حشره به بیش از یک قرن می رسد، متاسفانه هنوز نتیجه رضایتبخشی حاصل نشده است و کنترل شیمیایی تنها روش مورد استفاده می‌باشد.

۱-۱-۱- شکل شناسی

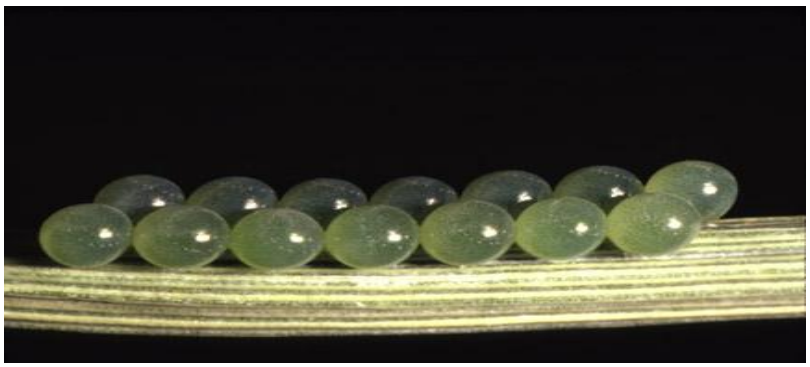
سن گندم حشره بزرگی است به طول ۱۲ تا ۱٤ میلیمتر با یک سپرچه بلند که تمام شکم را پوشانده است. این حشره دارای بدنی پهن می‌باشد که نسبت طول به عرض آنها ۱/٥٦ می‌باشد (شکل ۱-۱). رنگ بدن آنها متنوع است و زرد خاکستری تا قهوه ای مایل به سیاه و بعضی کاملا سیاه می-باشند. سر آنها مثلثی شکل بوده و در وسط آن یک شیار باریک وجود دارد. شاخک ها پنج بندی بوده و آخرین بند بلندتر از سایر بندها می‌باشد. خرطوم حشره نسبتا بلند بوده که در موقع استراحت زیر بدن جمع می‌گردد. بالهای حشره در زیر سپرچه پنهان گردیده و فقط قسمت‌های کناری بال‌ها و

حاشیه پنج حلقه انتهایی شکم از سطح پشتی رویت می‌گردد. ران و ساق در پاها دارای خارهای ریز قهوه‌ای رنگ بوده و پنجه‌های پا سه بندی می‌باشند که پنجه دوم از سایر بندها کوتاه‌تر می‌باشد. سن های نر و ماده را از روی حلقه های تناسلی در آخرین بند شکمی تشخیص می‌دهند (بهداد، ۱۳۸۱).

B

A

C



شکل ۱-۱- حشره کامل سن گندم (A)، پوره سن پنج سن گندم (محقق نیشابوری، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی) (B)، تخمریزی سن گندم در دو ردیف ۷ تایی روی برگ گندم (C) (رضا بیگی و رجبی، ۱۳۸۳).

۲-۱-۱- پراکنش جغرافیایی

مناطق اصلی پراکنش این حشره در ۲۵° تا ۵۵° عرض جغرافیایی و ۲۰° تا ۸۰° طول جغرافیایی در نیمکره شمالی می‌باشد. در خاورمیانه از شرق ترکیه، قسمت اعظم ایران، عراق، سوریه، لبنان و اسرائیل گزارش شده است. در اروپای شرقی از کرووواسی، صربستان، مونته نگرو، یونان، بلغارستان، رومانی و اکراین گزارش گردیده است. همچنین در آسیای غربی شامل قزاقستان، ازبکستان، قرقیزستان، تاجیکستان، افغانستان و پاکستان، همچنین در شمال افریقا از مراکش و الجزایر نیز گزارش شده اند (عبدالهی، ۱۳۸۳).

۳-۱-۱- گستردگی میزبان

سن گندم بالاترین مقدار تغذیه را از گندم *Triticium aestivum* دارد و سپس از سایر گرامینه ها مثل جو *Hordeum vulgare* ، چاودار *Secale cereal* ، ذرت *Zea mays* و سایر نازک برگ‌ها تغذیه می‌کند. همچنین برای تامین آب مورد نیاز از علف‌های هرز پهن برگ مثل خارشتر *Ahlbagi camelorum* نیز استفاده می‌نماید. گیاهانی که برای زمستان گذرانی انتخاب می-کند شامل دو گروه هستند، در نواحی جنوبی مثل ایران و عراق از بوته‌های گون و درمنه که سازگاری خوبی با نواحی کوهستانی بی‌آب دارند استفاده می‌کند در صورتی که در مناطق شمالی مثل رومانی و بلغارستان از درختان خزان کننده مثل بلوط جهت زمستانگذرانی استفاده می‌نماید (عبدالهی، ۱۳۸۳).

٤-١-١- بیولوژی و اکولوژی

سن گندم حشره ای تک نسلی با دیاپوز اجباری می‌باشد که فقط ۳ تا ٤ ماه از سال را به عنوان یک حشره فعال بر روی گیاهان میزبان گذرانده و بقیه سال را در زیر بوته‌ها در حال استراحت می-باشد. دوره استراحت این حشره شامل دو فاز است که فاز اول شامل ماههای گرم و خشک اواخر تابستان و اوایل پاییز را در دامنه تپه‌ها سپری کرده و سپس برای زمستانگذرانی در طول ماههای خیلی سرد زمستان به صورت کپه ای در زیر بوته‌های گون تجمع می‌کنند. مناطق زمستانگذران سن گندم معمولا در فواصل ۱۰ تا ۲۰ کیلومتری مزارع گندم قرار دارند اما این حشره توانایی پرواز از مناطق زمستان گذران تا ۱۵۰ کیلومتر را هم دارد. معمولا در اوایل بهار سن های بالغ زمستانگذران به مزارع گندم و جو مهاجرت کرده که این پدیده حداکثر در طول یک ماه کامل می‌گردد (رجبی، ۱۳۸۲). سن ها بعد از ریزش تغذیه از برگ های گندم را آغاز کرده و سپس جفت گیری می‌کنند. تخم های حشره کروی، معمولا در دو ردیف و در هر دسته ۱۰ تا ١٦ عدد روی برگ ها گذاشته شده (شکل ۱-۱) و توسط ماده چسبناک موجود روی آنها به سطح برگ چسبانده می‌شوند (رضابیگی و رجبی، ۱۳۸۳). بعد از تفریخ تخم ها پوره‌های سن یک ظاهر شده که بصورت کپه‌ای در محل تفریخ باقی می‌مانند. این حشره دارای پنج سن پورگی می‌باشد که بعد از آن حشرات کامل نسل جدید بوجود می‌آیند. طول زمان یک نسل در آزمایشگاه بین ۳۵ تا ٤۰ روز می‌باشد در عین حال در مزرعه این زمان بسته به دمای محیط متنوع تر می‌باشد.

٥-١-١- نحوه و میزان خسارت

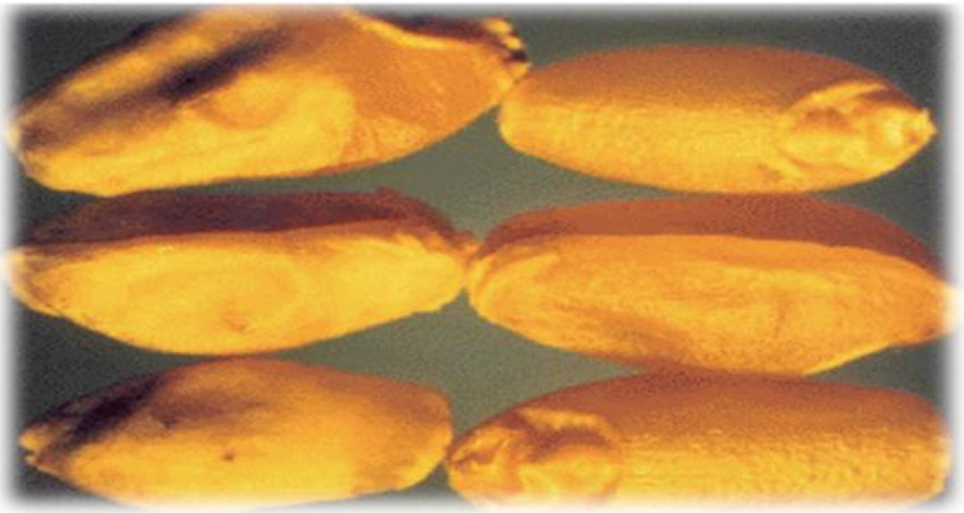
خسارت سن گندم بسته به دوره رشد ونمو گیاه در سه مرحله سن مادر، پوره و حشره کامل

نسل جدید اتفاق می‌افتد (بهداد، ۱۳۸۱). در مرحله اول بعد از ریزش سن مادری به مزرعه، این حشرات شروع به تغذیه از نسوج سبز گندم مثل ساقه ها، برگ ها و خوشه‌های سبز و جوان می‌کنند تا بتوانند منابع لازم برای تولید مثل و جفت گیری را بدست آورند. در نتیجه تغذیه از خوشه، در این مرحله رنگ خوشه‌ها سفید شده و از دور قابل تشخیص می‌باشد. خسارت آفت در این مرحله معمولا کم است بطوریکه هر حشره زمستانگذران در یک شرایط جوی مناسب حداکثر از پنج ساقه گندم می‌تواند تغذیه کند (Critchley, 1998).

مرحله دوم خسارت توسط پوره‌های سنین مختلف ایجاد می‌گردد. پوره های سن اول بطور کلی هیچ گونه تغذیه ای ندارند و تغذیه از اواسط سن دوم پورگی آغاز می‌گردد (Javaheri et al., 2009). شدت تغذیه از سن سوم آغاز گردیده و در سن پنجم به بالاترین مقدار خود می‌رسد. نیاز بالای تغذیه‌ای در سنین آخر پورگی به دلیل لزوم وقوع پدیده دگردیسی و ظهور حشرات کامل می باشد.

مرحله سوم تغذیه توسط حشرات کامل نسل بهاره اتفاق می‌افتد که باعث ایجاد بالاترین میزان خسارت می‌گردد. این حشرات برای اینکه بتوانند به مناطق استراحت خود در دامنه کوهها پرواز کنند نیاز دارند تا مقدار زیادی چربی در بافت چربی بدنشان ذخیره کنند. حشرات برای پروازهای کوتاه می‌توانند از قند ها به عنوان سوخت برای ماهیچه‌های پروازی استفاده کنند ولی در مسیر های طولانی قند سریعا به اتمام رسیده و حشره نیاز دارد تا از یک سوخت مناسب تر که میزان انرژی بالاتر و دائمی‌تری برای ماهیچه ها فراهم کند استفاده نماید. تغذیه بیشتر از محتویات دانه‌های گندم باعث تجمع بیشتر چربی در بدن حشره می‌شود.

گندم های سن زده دارای دانه های لاغر و کوچک است که از نظر ترکیبات مواد غذایی ناقص و برای تهیه نان مناسب نمی‌باشند (Javaheri et al., 2009) (شکل ۲-۱).



شکل۲-۱- دانه های گندم سالم (ستون سمت راست) و دانه های سن زده (ستون سمت چپ). (رضابیگی و رجبی، ۱۳۸۳).

٦-۱-۱- کنترل سن گندم

روش‌های متنوعی برای کنترل این حشره وجود دارد ولی آنچه که امروزه عملا استفاده می‌شود کنترل شیمیایی می باشد. امروزه از سم فسفره فنیتروتیون برای کنترل این آفت در مرحله حشره کامل استفاده می‌گردد. استفاده بی رویه از سموم در ایران سابقه چندین ساله دارد که این مسئله باعث بوجود آمدن مقاومت نسبی بر علیه حشره کش‌ها در سن گندم شده است (عبدالهی، ۱۳۸۳). از طرف دیگر سمیت بسیار بالای حشره کش ها بر علیه مجموعه‌ای از حشرات مفید فعال در مزرعه سبب گردیده است که آفات درجه دومی مانند شته روسی گندم *Diuraphis noxia* ، شته سبز گندم

Schizaphis graminium و تریپس گندم *Haplothrips tritici* نیز حالت طغیانی پیدا کنند. از اینرو لزوم استفاده از روش های کم خطرتر برای زیست محیط افق جدیدی برای انجام تحقیقات در رسیدن به این ایده‌ال برای پژوهشگران ترسیم نموده است. استفاده از سموم مانوس با زیست محیط[1] که سازگاری بالایی با محیط زیست دارند از گزینه های مطلوب آفت کشها برای استفاده در مدیریت تلفیقی این آفت می‌باشد. همچنین دشمنان طبیعی کارایی در ارتباط با این آفت گزارش گردیده است که از مهمترین آنها می توان به زنبورهای پارازیتوئید تخم سن گندم اشاره کرد که حتی سابقه استفاده عملی از آنها برای کنترل بیولوژیک موجود می‌باشد ولی به دلایل مبهم استفاده از این روش در ایران متوقف گردیده است. قارچ بیمارگر حشرات *Beauvaria bassiana* به عنوان یک عامل کنترل نسبتا جدید در سال های اخیر مورد بررسی زیادی قرار گرفته است ولی تا کنون به عنوان روش کاربردی کم خطر برای کنترل این حشره مورد استفاده قرار نگرفته است.

استفاده از ارقام مقاوم که حامل ژن های کد کننده پروتئین‌های حشره کش باشند از راهبردهای جدید در کنترل آفات می‌باشند. در واقع در این زمینه سم شناسی، فیزیولوژی و بیوتکنولوژی ترکیب شده تا نتیجه کار مشترک آنها منجر به تولید یک رقم مقاوم جدید گردد. در نهایت این فرایند منجر به اختلال در سیستمهای فیزیولوژیک درونی حشره گردیده و باعث مرگ آن می‌گردد.

۷-۱-۱- رفتار تغذیه ای در ناجوربالان

بطورکلی آنچه که باعث ایجاد خسارت در گیاه میزبان می‌گردد تغذیه آفت می‌باشد. دستگاه

[1] Biorational

گوارش حشرات عامل اصلی تعیین نوع خسارت و میزان تغذیه در گیاهان می‌باشد. این دستگاه وظیفه اصلی در جذب مواد غذایی مورد نیاز برای سایر فرایند های متابولیکی بدن را به عهده دارد (Pauchet et al., 2008). از اینرو هر گونه اختلالی در روند جذب مواد غذایی یا ایجاد صدمه-ای به ساختمان دستگاه گوارش باعث توقف جریان کسب انرژی از مواد غذایی گردیده و هموستازی بدن مختل گردیده و حشره پس از مدتی از بین خواهد رفت. سن گندم همچون سایر ناجوربالان دارای هضم خارج دهانی[1] می باشد که در این روش ابتدا غده بزاقی از طریق کانال بزاقی ترشحات پروتئینی خود را به بافت گیاه تزریق کرده که در نتیجه آن قسمتی از بافت گیاه به شکل مایع در آمده و سپس از طریق کانال غذایی به درون روده پمپ می‌شوند (Habibi et al., 2002). ترشحات بزاقی بیشتر شامل پروتئازهایی می‌شوند که باعث هیدرولیز پروتئین ذخیره ای گندم بنام گلوتن می گردند (Every, 1992). مرحله هضم نهایی نیز در روده انجام شده که در طی آن مواد غذایی به ذرات ریزی که قابل جذب از طریق دیواره روده میانی باشند تبدیل می‌گردند.

فرایند تغذیه در حشرات مانند سایر جانوران وابسته به پروتئین‌های موجود در دستگاه گوارش می باشد. نوع و فراوانی پروتئین‌های موجود در دستگاه گوارش اطلاعات مفیدی در زمینه تغذیه حشره شامل وابستگی به سوبستراهای خاص یا میزان استفاده از بعضی مواد غذایی را ارائه می‌نماید. استفاده از مهار کننده های پروتئینی برای ایجاد اختلال در برهمکنش پروتئین های دستگاه گوارش با مواد غذایی از راهکار های جدید و مورد علاقه پژوهشگران برای کاهش تغذیه در حشرات می‌باشد. این پروتئین‌های سمی که دارای ساختمان سه بعدی ویژه ای می‌باشند به صورت نسبتا اختصاصی بر علیه حشرات عمل می‌کنند و در نتیجه آلودگی زیست محیطی کمتری را نیز در مقایسه با آفت کش

1- Extra oral digestion

های شیمیایی خواهند داشت. از مهمترین گروه‌های پروتیئنی حشره کش، سموم تولید شده توسط باکتری *Bacillus thuringiensis* می باشد که معمولا بر علیه یک راسته مشخص از حشرات بصورت اختصاصی عمل می‌کنند. سم اختصاصی تولید شده توسط این باکتری یک ترکیب پروتئینی می‌باشد که به دیواره روده میانی نفوذ کرده و تعادل یونی موجود در سلول ها را برهم زده و در نتیجه فرایندهای تغذیه ای حشره دچار اختلال می‌شود (Chen et al., 2008). تاکنون ژن های کد کننده این پروتئین‌های سمی به تعدادی از گیاهان منتقل شده و گیاهان مقاوم در برابر آفات اختصاصی ایجاد گردیده است. گیاهان حاوی این ژن ها به محصولات Bt[1] مشهور شده اند که از مهمترین آنها می توان به تنباکو، سیب زمینی، گوجه فرنگی، یونجه، پنبه، ذرت، برنج و سویا اشاره کرد. از دیگر پروتئین‌های حشره کش، مهار کننده‌های آنزیم‌های گوارشی می‌باشند که باعث بلوکه کردن فعالیت کاتالیتیکی آنزیم ها شده و در نتیجه سوبستراهای زیستی تجزیه نشده و حشره توانایی خود را در بهره برداری از موادغذایی از دست داده و در اثر گرسنگی از بین می‌رود. مهار کننده‌هایی که بصورت کاربردی بر علیه پروتئین‌های گوارشی حشرات استفاده شده اند در دو گروه مهار کننده های آلفا-آمیلاز[2] و مهارکننده های پروتئازی[3] قرار می‌گیرند. گزارش های موجود در زمینه کارایی مهار کننده‌ی آلفا-آمیلاز بر علیه آفات مهم بسیار کمتر از مهار کننده‌های پروتئازی می‌باشد و بیشتر محدود به سخت بالپوشان خانواده Bruchidae می‌باشد (Jouanin et al ., 1998) ولی در زمینه مهار کننده‌های پروتئازی گزارش های متعددی موجود می‌باشد که مهمترین دلیل آن تنوع بالاتر آنزیم های پروتئاز نسبت به آلفا-آمیلاز می باشد که گستره مهار کننده های آن ها نیز بالاتر خواهد بود. دو گروه

1- Bt crop

2- α-amylase inhibitors

3- Protease inhibitors