

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

بدینوسیله گواهی می شود خانم فریبا مهرخو در تاریخ ۸۹/۱۱/۲۰ از رساله دکتری ۱۸ واحدی خود با عنوان:
تأثیر ارقام مختلف سویا بر فعالیت های پروتئولیتیک آنزیم های گوارشی و پارامترهای دموگرافی
Spodoptera exigua (Lep: Noctuidae)
دفاع کرده است. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا بررسی کرده و پذیرش آنرا برای
دریافت درجه دکتری (Ph. D) تأیید می نمایند.

امضاء	رتبه علمی	نام و نام خانوادگی	اعضای هیات داوران
	دانشیار	دکتر علی اصغر طالبی	۱- استاد راهنمای اصلی
	-	-	۲- استاد راهنمای دوم
	دانشیار	دکتر سعید محرمی پور	۳- استاد مشاور اول
	استادیار	دکتر وحید حسینی نوه	۴- استاد مشاور دوم
	استاد	دکتر یعقوب فتحی پور	۵- استاد ناظر
	استادیار	دکتر حمیدرضا حاجی قنبر	۶- استاد ناظر
	دانشیار	دکتر احمد عاشوری	۷- استاد ناظر
	دانشیار	دکتر ابراهیم صادقی	۸- استاد ناظر
	استاد	دکتر یعقوب فتحی پور	۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرح‌های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اتری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب فریبا مهرخو دانشجوی رشته **حشره شناسی کشاورزی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۵** مقطع **دکتری** دانشکده **کشاورزی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین‌نامه فوق‌الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:
فریبا مهرخو
تاریخ: ۱۳۸۹/۳/۱۶

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **حشره شناسی کشاورزی** است که در سال ۱۳۸۹ در دانشکده

کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **علی اصغر طالبی**، مشاوره جناب آقای دکتر **سعید**

محرمی پور و مشاوره جناب آقای دکتر **وحید حسینی نوه** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.


ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب **فریبا مهرخو** دانشجوی رشته **حشره شناسی کشاورزی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی

آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **فریبا مهرخو**

تاریخ و امضا:  ۸۹، ۳/۱۲



دانشکده کشاورزی- گروه حشره شناسی کشاورزی

رساله دکتری

تأثیر ارقام سویا روی فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم های گوارشی و پارامترهای

دموگرافیک (*Spodoptera exigua* (Lepidoptera:Noctuidae))

نگارش

فریبا مهرخو

استاد راهنما:

دکتر علی اصغر طالبی

اساتید مشاور:

دکتر سعید محرمی پور

دکتر وحید حسینی نوه

بهمن

1389

تقدیم به

اسوہ صبر و فداکاری، پدر و مادرم
یاور ہمیشہ زندگی، همسر

و

همه کسانی که دوستشان دارم.

تشکر و قدردانی

ستایش از آن خداوند است و بس

و سپاس بی‌کران بر همه عزیزانی که در مسیر تعالی انسانها، مخلصانه و عاشقانه گام می‌نهند، آموزگاران و معلمین ارجمندی که قطره قطره وجود خویش را در قالب علم و دانش به من آموختند، خاصه استادان عزیزی که در راه انجام این تحقیق مرا یاری رساندند: استاد راهنمای گرامی، جناب آقای دکتر علی اصغر طالبی و اساتید مشاورگرامی، جناب آقای دکتر سعید محرمی پور و جناب آقای دکتر وحید حسینی نوه که با تواضع هدایت انجام تحقیق و دفاعم را به عهده گرفتند. از زحمات ارزنده اساتید ناظر ارجمند جناب آقای دکتر یعقوب فتحی پور و جناب آقای دکتر حمیدرضا حاجی قنبر اساتید محترم گروه حشره شناسی کشاورزی به پاس مطالعه رساله و ارائه نظرات و پیشنهادهای ارزنده شان در امور دفاع رساله با نهایت احترام سپاسگزاری می‌نمایم. از جناب آقای دکتر کریم کمالی استاد محترم گروه حشره شناسی کشاورزی که افتخار شاگردی در محضر ایشان را داشتم، سپاسگزارم. از هیئت محترم داوران جناب آقای دکتر احمد عاشوری و جناب آقای دکتر ابراهیم صادقی اساتید محترم ناظر که مطالعه و ویرایش رساله را برعهده داشتند سپاسگزارم. از جناب آقای مهندس ابوطالب موسی زاده به پاس همکاری صمیمانه شان در طول مراحل انجام تحقیق تشکر می‌نمایم.

از سرکار خانم مهندس سمیرا فراهانی، سرکار خانم مهندس پروین رضوی و سرکار خانم مهندس خاطره شیرافکن و همکلاسی های خوبم در گروه حشره شناسی کشاورزی که در مسیر انجام این تحقیق مرا یاری نموده‌اند صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

و در پایان از خانواده محترم قاسمی و مهرخو به پاس محبت‌های بی‌دریغ‌شان نهایت سپاس و تشکر را دارم.

چکیده

کرم برگخوار چغندر، (*Spodoptera exigua* Hübner (Lep.: Noctuidae) آفت مهم با دامنه میزبانی وسیع در ایران است. تأثیر نه رقم سویا (032، 033، Hill، M4، M7، M9، M11، TMS و Zane) بر پارامترهای زیست شناسی، دموگرافیک، شاخص های تغذیه ای و فعالیتهای پروتئولیتیک آنزیم های گوارشی کرم برگخوار چغندر در آزمایشگاه تحت شرایط دمایی $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی 5 ± 60 درصد و دوره نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی انجام گرفت. بیشترین و کمترین طول دوره مراحل نابالغ آفت به ترتیب روی ارقام Hill ($24/56 \pm 0/21$ روز) و 033 ($22/01 \pm 0/14$ روز) بود. میانگین تخم های گذاشته شده توسط هر فرد ماده در طول عمر روی رقم 033 بیشترین میزان ($1156/20$ تخم در روز) را نسبت به سایر ارقام سویا داشت. بیشترین میزان نرخ خالص تولید مثل، نرخ ذاتی افزایش جمعیت به ترتیب $30/35 \pm 636/75$ (ماده/ماده/نسل) و $0/079 \pm 0/374$ (ماده/ماده/روز) روی رقم 033 به دست آمد. طول مدت زمان یک نسل و دو برابر شدن جمعیت نیز مربوط به رقم 033 بود. رقم 033 از نظر ترکیبات غذایی مطلوب تر و غنی تر از سایر ارقام بوده، به طوری که حتی تغذیه کمتر آن توانسته بود نرخ رشد نسبی ($61/94 \pm 7832/50$ میلی گرم/میلی گرم/روز) لاروها را سبب شود، همچنان که بالاترین میزان بازدهی تبدیل غذای خورده شده و تبدیل غذای هضم شده مربوط به رقم 033 ($3/88 \pm 75/80$ درصد) و ($94/20 \pm 64/70$ درصد) بود. بهینه فعالیت پروتئولیتیک عصاره روده میانی لارو، با استفاده از آزوکازین در ناحیه قلیایی (برابر 10-11) اتفاق افتاد. بررسی زایموگرام کازین، وجود حداقل 6 باند پروتئینازی را در عصاره روده میانی لارو نشان داد و به ویژه وجود تریپسین پروتئینازها را مشخص ساخت. اگر چه بیشترین فعالیت پروتئولیتیک کل در لاروهای تغذیه شده با ارقام Zane و BP بود، کمترین میزان فعالیت آنزیم تریپسین نیز روی این ارقام به دست آمد که به دلیل وجود مهارکننده سرین پروتئینازی تریپسینی (TLCK) بود که منجر به ترشح بیشتر کیموتریپسین شده است. به طور کلی بررسی های انجام شده نشان دهنده وجود سرین پروتئینازهای تریپسین و کیموتریپسین در عصاره آنزیمی معده میانی لاروهای *S. exigua* است و در این میان تریپسین ها نقش بیشتری در فعالیت پروتئولیتیک کل برعهده دارند.

واژگان کلیدی: کرم برگخوار چغندر قند، ارقام سویا، آنزیم های گوارشی، پارامترهای دموگرافیک، شاخص های تغذیه ای.

فهرست مطالب

1.....	فصل اول مقدمه.....
5.....	فصل دوم: مروری بر منابع.....
6.....	2-1- جایگاه سویا در بین محصولات زراعی.....
6.....	2-2- آفات شایع سویا در جهان.....
8.....	2-3- آفات شایع سویا در ایران.....
8.....	2-4- جایگاه کرم برگخوار چغندر (<i>S. exigua</i>) در رده بندی حشرات.....
8.....	2-5- سطح انتشار و پراکندگی کرم برگخوار چغندر.....
9.....	2-6- اهمیت اقتصادی و دامنه میزبانی کرم برگخوار چغندر.....
10.....	2-7- نقش گیاهان میزبان بر میزان خسارت وارده توسط آفات.....
10.....	2-8- زیست شناسی آزمایشگاهی کرم برگخوار چغندر روی میزبان های گیاهی متفاوت.....
14.....	2-9- پارامترهای دموگرافی کرم برگخوار چغندر.....
17.....	2-10- شاخص های تغذیه ای.....
18.....	2-11- دستگاه گوارشی حشرات.....
19.....	2-12- آنزیم های گوارشی حشرات.....
20.....	2-13- مهار کننده های پروتئازی گیاهی (Plant protease inhibitors).....
21.....	2-14- مزایای مهار کننده های پروتئینازی گیاهان.....
22.....	الف- مهار کننده سرین پروتئینازی.....
24.....	ب- مهار کننده های سیستئینی.....
24.....	ج- مهار کننده های پروتئینازی متالو و آسپارتیکی.....
25.....	2-15- مکانیسم عمل مهار کننده های پروتئینازی.....
28.....	فصل سوم: مواد و روش ها.....
29.....	3-1- جمع آوری نمونه ها.....
29.....	3-2- کاشت ارقام مختلف سویا.....
30.....	3-3- پرورش انبوه کرم برگخوار چغندر.....
30.....	3-4- مطالعات آزمایشگاهی.....

- 30.....1-4-3- بررسی زیست شناسی آزمایشگاهی شب پره *S. exigua*
- 31.....2-4-3- پارامترهای دموگرافیک
- 31.....1-2-4-3- جدول زندگی (Life table)
- 33.....2-2-4-3- جدول تولیدمثل ویژه سنی
- 35.....3-2-4-3- محاسبه پارامترهای رشد جمعیت (Population Growth Parameters)
- 41.....5-3- شاخص های تغذیه ای *Spodoptera exigua*
- 44.....6-3- تعیین فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم های گوارشی
- 444.....1-6-3- پرورش لاروهای *S. exigua* روی ارقام سویا
- 44.....2-6-3- تهیه عصاره آنزیمی از روده میانی دستگاه گوارش لارو *S. exigua*
- 44.....3-6-3- تهیه بافر
- 45.....4-6-3- تهیه اسیدپتته های مختلف (6 تا 12) از بافر یونیورسال
- 45.....5-6-3- تعیین غلظت پروتئین نمونه
- 45.....6-6-3- تعیین فعالیت پروتئینازی کل
- 46.....7-6-3- تعیین pH بهینه فعالیت پروتئینازی
- 46.....8-6-3- تشخیص آنزیم های پروتئولیتیک با استفاده از الکتروفورز پروتئین (زایموگرام)
- 48.....9-6-3- تعیین فعالیت آندوپروتئولیتیکی با استفاده از سوبستراهای ویژه (تخصصی)
- 48.....10-6-3- اثرات مهارکننده بر فعالیت پروتئولیتیک کل
- 49.....11-6-3- تشخیص نوع پروتئینازها با بکار بردن مهار کننده ها در زایموگرام
- 50.....12-6-3- زایموگرام پروتئینازهای ویژه
- 52..... فصل چهارم: بحث و نتایج
- 53.....1-4- زیست شناسی آزمایشگاهی *S. exigua*
- 53.....1-1-4- دوره رشدی قبل از بلوغ و طول عمر
- 66.....2-1-4- دوره تخمیزی و میزان باروری
- 70.....3-1-4- تجزیه کلاستر ویژگی های زیست شناسی *S. exigua*
- 72.....2-4- جدول زندگی و باروری روزانه *S. exigua*
- 78.....3-4- جدول تولید مثل
- 83.....1-3-4- تجزیه کلاستر پارامترهای تولیدمثل *Spodoptera exigua*

- 4-4- جدول پارامترهای رشد جمعیت *S. exigua*..... 84
- 1-4-4- تجزیه کلاستر پارامترهای رشد جمعیت *Spodoptera exigua*..... 90
- 5-4- شاخص های تغذیه ای لارو *Spodoptera exigua*..... 91
- 1-5-4- تأثیر ارقام مختلف سویا روی شاخص های تغذیه ای لارو *Spodoptera exigua*..... 91
- الف- شاخص های تغذیه ای لاروهای سن سوم..... 91
- ب- شاخص های تغذیه ای لاروهای سن چهارم..... 92
- ج- شاخص های تغذیه ای لاروهای سن پنجم..... 94
- د- شاخص های تغذیه ای لارو سن ششم..... 95
- ه- شاخص های تغذیه ای مجموع سنین لاروی..... 97
- 2-5-4- تأثیر سنین مختلف لاروی بر شاخص های تغذیه ای *S. exigua* پرورش یافته روی رقم 033..... 99
- 3-5-4- تجزیه کلاستر شاخص های تغذیه ای *Spodoptera exigua*..... 115
- 6-4- بررسی فعالیت های پروتئولیتیکی روده میانی روی ارقام مختلف سویا..... 116
- 7-4- pH بهینه فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی ارقام مختلف سویا..... 117
- 8-4- تعیین فعالیت ویژه پروتئینازی کل عصاره آنزیمی روده میانی لاروهای *S. exigua* روی ارقام مختلف سویا.. 120
- 9-4- تشخیص آنزیم های پروتئولیتیک با استفاده از الکتروفورز پروتئین (زایموگرام)..... 122
- 10-4- تعیین pH بهینه فعالیت آندوپروتئولیتیک عصاره روده میانی لاروهای پرورش یافته روی رقم 033..... 123
- 11-4- تعیین فعالیت آندوپروتئولیتیک با استفاده از سوبستراهای تخصصی..... 125
- 12-4- تأثیر مهارکننده های شیمیایی بر فعالیت سرین پروتئازها..... 127
- 1-12-4- تعیین اثر مهارکننده عمومی سرین پروتئینازی (PMSF)..... 127
- 2-12-4- تعیین اثر مهارکننده عمومی تریپسینازی (TLCK)..... 127
- 3-12-4- تعیین اثر مهارکننده عمومی کیموتریپسینازی (TPCK)..... 128
- 13-4- تشخیص نوع پروتئینازها با بکار بردن مهار کننده ها در زایموگرام..... 133
- 1-13-4- اثر مهارکننده عمومی PMSF بر فعالیت پروتئولیتیک کل..... 133
- 2-13-4- اثر مهارکننده های اختصاصی TLCK و TPCK بر فعالیت پروتئولیتیک کل..... 135
- 1-2-13-4- اثر مهارکننده TLCK بر فعالیت تریپتیک در ژل..... 135
- 2-2-13-4- اثر مهارکننده TPCK بر فعالیت کیموتریپتیک در ژل..... 135

139.....	14-4- زایموگرام پروتئینازهای ویژه
139.....	1-14-4- فعالیت تریپتیک عصاره آنزیمی روده میانی
140.....	2-14-4- فعالیت کیموتریپتیکی عصاره آنزیمی روده میانی
141.....	15-4- نتیجه گیری نهایی
143.....	16-4- پیشنهادات
144.....	فهرست منابع

فهرست جداول

- جدول 1-2- مهمترین آفات سویا در ایالات متحده آمریکا.....7
- جدول 2-2- گیاهان تراریخت که در آنها ژن های مهارکننده های پروتئازی بیان شده اند.....27
- جدول 3-1- ترکیبات و مقادیر مورد نیاز برای تهیه محلول ژل بالا (ژل متراکم کننده) و ژل پایین (ژل جدا کننده) برای SDS-PAGE.....47
- جدول 4-1- مقایسه طول دوره مراحل مختلف رشد و نمو *Spodoptera exigua* روی نه رقم سویا در شرایط آزمایشگاهی (دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد).....64
- جدول 4-2- میانگین (\pm خطای معیار) طول عمر (روز) حشرات کامل نر و ماده *Spodoptera exigua* روی نه رقم سویا.....65
- جدول 4-3- میانگین (\pm خطای معیار) طول مراحل مختلف تخم‌ریزی و باروی *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا.....69
- جدول 4-4- پارامترهای تولید مثل *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا.....82
- جدول 4-5- پارامترهای رشد جمعیت *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا.....89
- جدول 4-6- شاخص های تغذیه ای لاروهای سن سوم *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا.....101
- جدول 4-7- شاخص های تغذیه ای لاروهای سن چهارم *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا.....102
- جدول 4-8- شاخص های تغذیه ای لاروهای سن پنجم *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا.....103
- جدول 4-9- شاخص های تغذیه ای لاروهای سن ششم *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا.....104
- جدول 4-10- تأثیر سنین مختلف لاروی روی شاخص های تغذیه ای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی رقم 033.....105
- جدول 4-11- اثر مهار کننده های مختلف بر فعالیت آزوگازئینولیتیک عصاره روده میانی لارو *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی ارقام مختلف سویا.....128

فهرست شکل ها

- شکل 3-1- نه رقم سویای کاشته شده در مزرعه (الف) و گلخانه (ب) برای ایجاد جمعیت آزمایشگاهی *Spodoptera exigua* 39
- شکل 3-2- ظروف مورد استفاده جهت پرورش انبوه. *Spodoptera exigua* 39
- شکل 3-3- ظروف مورد استفاده در مطالعات آزمایشگاهی لارو (الف) شفیره (ب) و حشرات کامل (پ) *Spodoptera exigua* 40
- شکل 3-4- توزین وزن خشک لارو (الف) و برگ های ارقام مختلف سویا (ب) با ترازوی دیجیتال 43
- شکل 3-5- ترازوی دیجیتال مورد استفاده در مطالعات شاخص های تغذیه ای *Spodoptera exigua* 43
- شکل 3-6- لوازم مورد استفاده جهت تشریح لاروهای سن پنجم دو روزه *Spodoptera exigua* 51
- شکل 3-7- تشخیص آنزیم های پروتئولیتیک با استفاده از الکتروفورز پروتئین زایموگرام 51
- شکل 4-1- دسته تخم گذاشته شده توسط *Spodoptera exigua* (الف) تخم های تازه گذاشته شده؛ (ب) تخم های در حال تفریخ 61
- شکل 4-2- لاروهای نئونات *Spodoptera exigua* حاصل از تفریخ تخم (الف) و لاروهای سنین مختلف (ب) 61
- شکل 4-3- رنگ های مختلف لارو (الف) و کپسول سر در سنین مختلف لاروی *Spodoptera exigua* (ب) 62
- شکل 4-4- سطح پشتی و شکمی شفیره *Spodoptera exigua* (الف) ؛ (ب) شفیره ماده (سمت راست) و نر (سمت چپ) 62
- شکل 4-5- حشره کامل *Spodoptera exigua* 63
- شکل 4-6- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام مختلف سویا بر مبنای ویژگی های زیستی *Spodoptera exigua* 71
- شکل 4-7- نرخ بقاء ویژه سنی (l_x) و باروری روزانه (m_x) *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا 75
- شکل 4-8- مرگ و میر ویژه سنی (q_x) *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا 76
- شکل 4-9- مقایسه شاخص امید به زندگی (e_x) (*Spodoptera exigua* Life expectancy) روی ارقام مختلف سویا 77
- شکل 4-10- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام مختلف سویا بر مبنای پارامترهای تولیدمثل *Spodoptera* 77

- 83*exigua*
- شکل 4-11- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام مختلف سویا بر مبنای پارامترهای رشد جمعیت *Spodoptera*
- 90*exigua*
- شکل 4-12- میزان تغذیه (الف)، تفاوت وزن (ب) و میزان فضولات (پ) لاروهای *Spodoptera exigua* روی سویا106
- شکل 4-13- نرخ مصرف نسبی (الف) و نرخ رشد نسبی (ب) لاروهای *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا107
- شکل 4-14- کارایی تبدیل غذای خورده شده (الف)، کارایی غذای هضم شده (ب) و قابلیت هضم شونده گی غذا (پ) توسط لاروهای *Spodoptera exigua* روی ارقام مختلف سویا108
- شکل 4-15 - نرخ مصرف نسبی (الف) و نرخ رشد نسبی (ب) لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی رقم 033 سویا109
- شکل 4-16- کارایی تبدیل غذای خورده شده (الف)، کارایی غذای هضم شده (ب) و قابلیت هضم شونده گی غذا (پ) توسط لاروهای *Spodoptera exigua* روی رقم 033 سویا110
- شکل 4-17 - دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام مختلف سویا بر مبنای شاخص های تغذیه ای *Spodoptera exigua*.
116
- شکل 4-18- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام مختلف سویا بر مبنای پارامترهای رشد جمعیت *Spodoptera*
.....*exigua* 117
- شکل 4-19- تأثیر pH های مختلف روی فعالیت پروتئولیتیک (آزوکازین) عصاره روده میانی لارو *Spodoptera*
.....*exigua* 119
- شکل 4-20- مقایسه فعالیت ویژه پروتئولیتیک کل عصاره آنزیمی روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی ارقام مختلف سویا در اسیدیته (pH) بهینه برابر 10120
- شکل 4-21- تشخیص آنزیم های پروتئولیتیک روده میانی در لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی پنج رقم سویا با استفاده از الکتروفورز پروتئین (زایموگرام)122
- شکل 4-22- فعالیت ویژه تریپسینی عصاره روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی رقم 033 سویا در اسیدیته های مختلف124
- شکل 4-23- فعالیت ویژه کیمو تریپسینی عصاره روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی رقم 033 سویا

- در اسیدیته های مختلف.....124.....
- شکل 4-24- فعالیت تریپسین عصاره آنزیمی روده میانی لارو *Spodoptera exigua* تغذیه شده با ارقام مختلف سویا در pH بهینه برابر 11.....126.....
- شکل 4-25- فعالیت کیموتریپسین عصاره آنزیمی روده میانی لارو *Spodoptera exigua* تغذیه شده با ارقام مختلف سویا در pH بهینه برابر 11.....126.....
- شکل 4-26- تأثیر مهارکننده عمومی سرین پروتئینازی (آزوکازئینولیتیک) عصاره روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی ارقام مختلف سویا.....132.....
- شکل 4-27- تأثیر مهارکننده اختصاصی تریپسینی (آزوکازئینولیتیک) عصاره روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی ارقام مختلف سویا.....132.....
- شکل 4-28- تأثیر مهارکننده اختصاصی کیموتریپسینی (آزوکازئینولیتیک) عصاره روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* پرورش یافته روی ارقام مختلف سویا.....133.....
- شکل 4-29- آنالیز زایموگرام مهارکننده عمومی PMSF بر فعالیت پروتئولیتیک عصاره آنزیمی روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* تغذیه شده با ارقام مختلف سویا.....134.....
- شکل 4-30- آنالیز زایموگرام مهارکننده اختصاصی TLCK بر فعالیت تریپتیکی عصاره آنزیمی روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* تغذیه شده با ارقام مختلف سویا.....136.....
- شکل 4-31- آنالیز زایموگرام مهارکننده اختصاصی TPCK بر فعالیت کیموتریپتیکی عصاره آنزیمی روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* تغذیه شده با ارقام مختلف سویا.....138.....
- شکل 4-32- آنالیز زایموگرام فعالیت تریپتیکی عصاره آنزیمی روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* تغذیه شده با ارقام مختلف سویا.....139.....
- شکل 4-33- آنالیز زایموگرام فعالیت کیموتریپتیکی عصاره آنزیمی روده میانی لاروهای *Spodoptera exigua* تغذیه شده با ارقام مختلف سویا.....140.....

فصل اول

مقدمه

در بین دانه های روغنی، سویا به دلیل داشتن ارزش غذایی بالا، کیفیت مطلوب پروتئین، تولید روغن، قیمت پایین آن در مقایسه با پروتئین های حیوانی، استفاده در صنایع دام و طیور (مکمل های غذایی)، داروسازی، تولید فرآورده های کشاورزی، بیشترین میزان سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است (Meyer, 1971; Smith and Cricle, 1972; Smith and Huyser, 1987; Wilcox, 1987). مناطق مهم کشت دانه های روغنی در ایران، استان های گلستان، مازندران، خوزستان، لرستان، اردبیل و کرچ می باشند که استان گلستان بیشترین میزان سطح زیر کشت را در بین استان ها به خود اختصاص داده است (مصطفی نژاد، 1381).

کرم برگخوار چغندر قند (*Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) به عنوان یکی از مهمترین آفات برگخوار سویا محسوب می شود. در ایران این آفت از اغلب مناطق کشت سویا (مخصوصاً مناطق شمال کشور) از جمله استان های گرگان، مازندران و اردبیل گزارش شده است. (خانجانی 1383، مصطفی نژاد، 1381). معمولاً مزارع سویای دیر کاشت، در ابتدای رشد مورد حمله این آفت قرار گرفته به طوری که در جمعیت های بالای این آفت، مزرعه به کلی از بین می رود (مجتهدی، 1358).

برای کنترل این آفت در اغلب مناطق کشت سویا، از روش شیمیایی استفاده می شود برای کاهش عوارض جانبی مواد شیمیایی بر آلودگی محیط زیست و سلامت بشر، مهندسی ژنتیک گیاهی به عنوان یک روش مکمل برای ایجاد گیاهان مقاوم به آفات پیشنهاد شده است. مهارکننده های پروتئینازی گیاهی (اثرات حشره کشی با منشأ گیاهی) به عنوان یک استراتژی مؤثر برای کنترل حشرات آفت، حائز اهمیت می باشند. به عبارت دیگر استفاده از ارقام مقاوم یا گیاهان تراریخت حاوی مهارکننده های آنزیمی به ویژه آنزیم های گوارشی حشرات، یکی از روش های مؤثر برای دستیابی به این هدف است. مهار کننده های آنزیمی گیاهی، با اختلال در هضم پروتئین در دستگاه گوارشی حشرات باعث کمبود منابع غذایی، کندی رشد و نمو و حتی مرگ به علت گرسنگی حشره می گردند (Azzouz et al., 2005).

با توجه به اینکه پروتئازها در بین آنزیم‌های گوارشی باعث هضم مواد پروتئینی خورده شده توسط حشره می‌شوند، لذا با اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه و هضم پروتئین به عنوان یک هدف کلیدی برای استفاده در کنترل حشرات مورد توجه هستند (Hilder *et al.*, 1992). به این ترتیب با کلون کردن ژن‌های کد کننده پروتئازها و انتقال آنها به گیاهان تراریخت، امکان استفاده از این گیاهان برای کنترل آفات مطالعه شده است (Thomas *et al.*, 1994). ارقام مختلف گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی ثانویه، بر آنزیم‌های گوارشی حشرات مؤثر می‌باشند. لذا بررسی آنزیم‌های گوارشی حشرات به منظور طراحی دقیق روش‌های کنترل مناسب در جهت استفاده موفقیت‌آمیز از مهارکننده‌های پروتئازها در مدیریت تلفیقی آفات لازم و ضروری است (Michaud, 1997; Jongsma *et al.*, 1995, 1996).

در برنامه مدیریت تلفیقی آفات، آگاهی از ویژگی‌های فیزیولوژی گوارشی و اطلاعات مربوط به ویژگی‌های زیستی حشره آفت مورد نظر ضروری است. در این میان پارامترهای زیستی و باروری حشره آفت می‌تواند به عنوان معیاری مؤثر انتخاب و بررسی گردند. ارقام مختلف گیاهی به دلیل دارا بودن مجموعه‌ای از پروتئین‌های بازدارنده فعالیت گوارشی، علاوه بر تأثیر احتمالی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بر پارامترهای زیستی آفت که مهمترین آن نرخ ذاتی افزایش جمعیت طبیعی (r_m) می‌باشد، نیز تأثیر می‌گذارند. به عبارت دیگر برای تعیین میزان تأثیر ترکیبات گیاهی بر فیزیولوژی آنزیم‌های گوارشی آفت مطالعه پارامترهای زیستی حشره به ویژه r_m منطقی به نظر می‌رسد.

با توجه به اینکه در زمینه فعالیت آنزیم‌های گوارشی و پارامترهای دموگرافیک *S. exigua* روی ارقام مختلف سویا و تعیین مهمترین رقم در بین ارقام مورد مطالعه سویا، تاکنون تحقیقات چندانی صورت نگرفته است و به دلیل اهمیت آفت از نظر ایجاد خسارت روی سویا و سمپاشی‌های مکرر که موجبات آلودگی زیست محیطی و مقاوم شدن آفت را به دنبال دارد، لذا بررسی‌های انجام شده در این زمینه

می‌تواند در کاهش مصرف سموم شیمیایی و گرایش به استفاده از ارقام مقاوم گیاهی به عنوان یکی از پایه های مؤثر در برنامه‌های مدیریتی آفات مثمر ثمر واقع شود.

با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر ارقام مختلف سویا بر وضعیت پارامترهای زیستی، شاخص های تغذیه ای و آنزیم‌های گوارشی لارو برگخوار چغندر قند (*S. exigua*) است. یکی از کاربردهای مهم پارامترهای دموگرافی به ویژه r_m ، در تعیین میزان مقاومت گیاهان میزبان در برابر آفات می‌باشد، به طوری که r_m پایین در حشرات بیانگر نامطلوب بودن میزبان گیاهی و به عبارت دیگر مقاوم بودن گیاه میزبان نسبت به حشره محسوب می‌شود، لذا اطلاعات به دست آمده از مطالعه آنزیم‌های گوارشی آفت به همراه مطالعه پارامترهای دموگرافی آن روی ارقام مختلف سویا، می‌تواند گام مؤثری در جهت استفاده از مهارکننده‌های پروتئینازی گیاهی و تولید ارقام مقاوم گیاهی، به عنوان یکی از ابزارهای کنترلی در مدیریت تلفیقی آفات باشد.