زیست‌شناسی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز سوسک چهارلکه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) روی ارقام مختلف ماش

بهرام ناصری، آرین عبادی، زهرا رضایی
گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
✉bnaseri@uma.ac.ir https://orcid.org/0000-0001-5821-0957
✉aryan.eb75@gmail.com https://orcid.org/0009-0009-8367-7597
✉zhrarzii1400@gmail.com https://orcid.org/0009-0002-7394-4515

چکیده:
سوسک چهارلکه‌ای حبوبات، *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae)،یکی از آفات مهم دانه حبوبات در ایران و اغلب کشورهای جهان می‌باشد. بررسی مقاومت ارقام حبوبات نسبت به این حشره می‌تواند در کاهش خسارت آفت مفید باشد. در این پژوهش، مقاومت دانه پنج رقم مختلف ماش (سخاوت، زربخش، پرتو، ازبک و افغان) با بررسی پارامترهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز سوسک چهارلکه‌ای حبوبات در دمای ۱± ۲۸ درجهسلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصدو ۲۴ ساعتتاریکی ارزیابی شد. پس از تخم‌گذاری حشرات بالغ، دانه¬های ماش حاوییک عدد تخم به صورت انفرادی به ظروف پتری ۶ سانتی‌متری منتقل و طول دوره قبل از بلوغ، درصد بقای افراد نابالغ، زادآوری و طول عمر حشرات کامل نر و ماده روی هر رقم بررسی شد. نتایج به دست آمده از زیست‌شناسی و پارامترهای جدول زندگی حشره با روش دوجنسی سن–مرحله رشدی تجزیه شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، درصد زنده‌مانی و طول دوره‌ی مراحل نابالغ روی رقم‌های مختلف ماش تفاوت معنی‌داری نداشت. در میان ارقام ماش مورد بررسی، زادآوری سوسک‌های ماده روی رقم پرتو (۶۹/۲۱ تخم) کمتر از سایر رقم‌هابود. طولانی‌ترین دوره تخمگذاری آفت روی رقم زربخش (۵/۳۳ روز) و کوتاه‌ترین آن روی رقم ازبک (۴/۵۴ روز) به دست آمد. با این حال، نرخ خالص تولید مثل (R_0)، نرخ ذاتی افزایش جمعیت (r) و نرخ متناهی افزایش جمعیت (λ) روی رقم‌های مختلف ماش تفاوت معنی‌داری نداشت. کمترین فعالیت آنزیم‌هایگوارشی آمیلاز و پروتئاز لاروهای سن چهارم روی رقم سخاوت به دست آمد. مطابق با یافته‌های به دست آمده از پژوهش حاضر، تفاوتی در حساسیت و مقاومت رقم‌های ماش مورد بررسی نسبت به سوسک چهارلکه‌ای حبوبات مشاهده نشد.

واژه‌هایکلیدی: آفت انباری، جدول زندگی، مقاومت دانه، رقم حبوبات

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۴۰۳/۰۰/۰۰
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۰/۰۰
دبیر تخصصی:جلال جلالی سندی

***Citation*:??????????**

مقدمه

حبوبات دومین منبع مهم غذاییبشر بعد از غلاتبوده و سرشار از پروتئین، کربوهیدرات، کلسیم و آهن می‌باشند (Sanon et al., 2010). در بین حبوبات، ماش(*Vigna radiata* L. (Wilczek به عنوان پروتئین گیاهی ارزان برای تغذیه انسان، جانوران اهلی و همچنین استفاده به صورت کود سبز از اهمیت خاصی برخوردار است (FAO, 2016).

سوسک چهارلکه‌ای حبوبات(*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae یکی ازاصلی‌ترین عوامل خسارت‌زا روی دانه‌ی انواع حبوبات در شرایط مزرعه و انبار است. این سوسک بومی آفریقا بوده ولی امروزه در تمام نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا انتشار یافته و خسارت قابل توجهی به دانه‌یحبوبات در مزارع، انبارها و سیلوها وارد می‌نماید(Kumar, 2017). پراکنش وسیع و توانایی تغذیه‌ای بالای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات در مزرعه و انبار باعث کاهش ارزش اقتصادیحبوبات حساسبه این آفت شده است (Johnson and Valer, 2003). در انبار، حشرات ماده تخم‌های خود را روی سطح دانه حبوبات قرار می‌دهند. لاروها پس از تفریخ از تخم و عبور از پوسته دانه، وارد کوتیلدون شده و از محتویات آن تغذیه می‌کنند. در مواردی دانه‌های آفت‌زده در اثر تغذیه لارو کاملا خالی می‌شوند که موجب کاهش شدید وزن، ارزش غذایی و قدرت جوانه‌زنی آن شده و در نتیجه، ارزش بازارپسندی محصول به شدت کم می‌شود (Kumar, 2017). سوسک‌های حبوبات علاوه بر خسارت‌های زیاد به دانه‌های انباری، به علت همراه داشتن بعضی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا قادرند سلامتی انسان را در معرض خطر قرار دهند (Mohandass et al., 2006).

با عنایت به اینکه سوسک چهار لکه‌ای حبوبات داخل دانه و در مکان‌های دور از دسترس فعالیت می‌کند، کنترل آن با چالش‌های زیادی روبرو است. از جمله روش‌های متداول کنترل این آفت، استفاده از آفتکش‌های شیمیاییمانند متیل برماید و فستوکسین می‌باشد که زیان جبران‌ناپذیری بر انسان، جانداران

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

غیرهدفو محیط زیست وارد کرده است(Krzyżowski et al., 2021). با توجه به خسارت بالای آفات انباری و مضرات کاربرد آفتکش‌های شیمیایی، استفاده از ارقام مقاوم یکی از بهترین روش‌های کنترل یا کاهش خسارت این آفت محسوب می‌شود. مقاومت گیاه میزبان از ابزارهای مهم مدیریت تلفیقی آفات است که از لحاظ اقتصادی و امنیت محیط زیست، نتایج قابل قبولی را به دنبال داشته است (Kennedi et al., 1987). با توجه به اینکه پارامترهای زیستی و توانایی‌افزایش جمعیت یک حشره تحت تأثیر تغذیه ازارقام گیاهی مختلف قرار می‌گیرد، لذا می‌توان با اندازه‌گیری این پارامترهای آفت، از آن‌ها برای ارزیابی مقاومت و حساسیت ارقام به حشرات آفت استفاده کرد. یکی دیگر از روش‌های موثر در برنامه‌های مدیریت آفات، استفاده از گیاهان تراریخته دارای ترکیبات شیمیایی ثانوی موثر روی آنزیم‌های گوارشی حشرات است. بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی یکی از ترکیبات شیمیایی دفاعی موجود در گیاهان است که با مهار هضم درشت مولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های وارد شده به دستگاه گوارش حشره، باعث کاهش تغذیه، کندی سرعت رشد و حتی مرگ به علت گرسنگی می‌شود (Azzouz et al., 2005). لذا به منظور استفاده موفقیت‌آمیز از بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی در مدیریت آفات، بررسی میزان فعالیت پروتئازها و آمیلازهای گوارشی حشرات (به عوان دو گروه آنزیم‌های گوارشی غالب) و تاثیر آنها بر رشد، بقاء و تولیدمثل حشره ضروری است.

تاکنون هیچ پژوهشی درباره پارامترهای رشد جمعیت و فعالیت آنزیم‌های گوارشی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی ارقام ماش مورد آزمایش در پژوهش حاضر صورت نگرفته است. با این حال، مطالعاتی درباره تاثیر دانه حبوبات مختلف بر پارامترهای زیستی و فیزیولوژی آنزیم‌های گوارشی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات انجام شده است که به برخی از آنها اشاره می‌شود. یافته‌های Roesli et al. (1990) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در زادآوری سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی دانه لوبیا چشم بلبلی و ماش وجود نداشت، اما طول دوره‌ی نابالغ این آفت روی ماش کوتاه‌تر بود. جدول زندگی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی دانه‌های لوبیا چشم بلبلی، نخود، عدس و ماش توسط Kazemi et al. (2009) بررسی و گزارش شد که لوبیا چشم بلبلی مطلوب‌ترین میزبان برای نشوونمای این آفت بود. زیست‌شناسی *C. maculatus* روی دانه ماش توسط Devi and Devi (2014) بررسی و طول دوره‌ی جنینی ۶–۷ روز، طول دوره‌ی لاروی ۱۸–۲۲ روز و طول دوره‌ی شفیرگی ۴–۵ روز گزارش شد. تاثیر تغذیه از دانه لوبیا چشم‌بلبلی، نخود و ماش روی فعالیت پروتئاز گوارشی لاروهای سن چهارم سوسک چهارلکه‌ای حبوبات بررسی و بالاترین فعایت ویژه سیستئین پروتئازها روی لوبیا چشم‌بلبلیگزارش شد (Sarboland et al., 2017). زیست–شناسی و جدول زندگی *C. maculatus* روی دانه حبوبات مختلف بررسی و عدس به عنوان نامطلوب‌ترین میزبان برای افزایش جمعیت این سوسک معرفی شد (Bidar et al., 2021). مقاومت دانه‌ی هفت رقم باقلا (مهتا، شادان، فیض، برکت، سرازیری، شاخ‌بزی و اتونو) با بررسی ترجیح تخمگذاری و جدول زندگی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات ارزیابی و رقم‌های شاخ‌بزی و سرازیری به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین رقم‌ها نسبت به این حشره معرفی شدند (Naseri et al., 2022). نتایج حاصل از مطالعه پارامترهای رشد جمعیت و فعالیت آنزیم‌های گوارشی *C. maculatus* روی دانه۶ رقم حبوبات مختلف نشان داد که لوبیا چشم‌بلبلی، ماش و نخود آسیب‌پذیری بیشتری نسبت به باقلا، عدس و بادام زمینی در برابر این آفت دارند (Mansouri et al., 2022).

این پژوهش با هدف بررسی مقاومت و حساسیت پنج رقم تجاری ماش نسبت به *C. maculatus* با بررسی پارامترهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز آفت انجام شد تا با استفاده از ویژگی‌های مقاومت این ارقام و انتقال آن به ارقام حساس، بتوان کاربرد روش‌های شیمیایی کنترل آفت را به حداقل رساند.

.

مواد و روش‌ها

تهیه ارقام ماش. به منظور پرورش *C. maculatus* و انجام آزمایش‌ها، دانه ارقام مختلف ماش شامل سخاوت، زربخش و پرتو از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد (دزفول، خوزستان) و دو رقم وارداتی ازبک و افغان (به ترتیب واردشده از کشور ازبکستان و افغانستان) از بازار تهران تهیه شدند.ارقام ماش مورد آزمایش، جزو ارقام تجاری و رایج کشت شده در ایران می‌باشند.

تعیین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی دانه ارقام ماش

اندازه‌گیری درصد رطوبت و سختی دانه. برای تعیین درصد رطوبت رقم‌های مختلف ماش (در سه تکرار)، بر اساس روش تایید شده انجمن AACC[1] (2000)، ابتدا ۲ گرم از دانه‌های آسیاب‌شده هر رقم در دمای ۱۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت خشک شد. سپس اختلاف بین وزن اولیه دانه‌ها و وزن خشک آنها، تقسیم بر وزن اولیه به عنوان درصد رطوبت دانه در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری سختی دانه، از دستگاه سختی‌سنج (مدل SANTAM ساخت ایران) استفاده شد. به این صورت که سرعت حرکت صفحه بالایی (متحرک) دستگاه روی عدد ۵ میلی‌متر بر دقیقه تنظیم شد و میزان نیروی مورد نیاز (بر حسب نیوتون) برای شکستن هر دانه به عنوان شاخص سختی دانه در نظر گرفته شد. این آزمایش در ۱۰ تکرار (هر تکرار شامل یک عدد دانه)انجام شد.

[1]Approved methods of the American association of cereal chemists

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

Accepted MSJES

تعیین اندازه و وزن هزاردانه. اندازه (مساحت و حجم) دانه‌ی هر یک از ارقام مورد آزمایش (در ۱۰ تکرار) بر اساس فرمول‌های ارائه شده توسط Mitchel (1990)به شرح زیر محاسبه شدند:

$$D_g = (L \times W \times T)^{1/3}$$
$$S = \pi \times D_g^2$$
$$V = D^{g3} \times (\pi/6)$$

در فرمول بالا، D_g، S و V به ترتیب میانگین قطر ژئومتریک، مساحت و حجم دانه و L، W و T به ترتیب طول، عرض و ضخامت دانه می‌باشدکه با استفاده از کولیس دیجیتالی (با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری شد. میانگین وزن هزاردانه، با انتخاب تصادفی هزار عدد دانه ماش از هر رقم (در ۱۰ تکرار) و وزن گیری آنها با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد.

سنجش غلظت پروتئین و نشاسته. به منظور سنجش غلظت پروتئین محلول در ارقام مختلف ماش (در سه تکرار)، نخست دانه های هر رقم با دستگاه آسیاب‌کن به طور کامل آرد شده و ۰/۰۵ گرم از آرد هر رقم، همراه با ۱ میلی‌لیتر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۸/۲) همگن شد. بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس، فاز رویی (رونشین) برداشته شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از مواد همگن شده به ۱ میلی‌لیتر از معرف برادفورد اضافه و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد (Bradford, 1976).

به منظور سنجش غلظت نشاسته (در سه تکرار)، ۰/۵ گرم از آرد هر رقم با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد (با دمای ۶۰ درجه سلسیوس) مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز رویی برداشته شد. باقی‌مانده مخلوط داخل لوله آزمایش ریخته و به هر لوله ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۶/۵ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۵۲ درصد اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای صفر درجه سلسیوس قرار داده شده، سپس سانتریفیوژ شده و فاز رویی جدا شد. با استفاده از سمپلر، ۲۰۰ میکرولیتر از فاز رویی برداشته و با آب مقطر به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد.برای تهیه معرف آنترون، ۲۰۰ میلی‌گرم آنترون در ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد حل شد،سپس ۴ میلی‌لیتر ار محلول آنترون به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در حمام آبی (با دمای ۶۰ درجه سلسیوس) قرار داده و بلافاصله به داخل یخچال منتقل شد. در نهایت جذب نمونه‌ها بعد از گذشت ۳۰ دقیقه،در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد (Sheligl, 1986).

تهیه عصاره دانه ماش. برای عصاره‌گیری از دانه‌های هر رقم ماش، ابتدا مقدار ۱ گرم از دانه‌های آسیاب شده از هر رقم در ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خیسانده شد. سپس از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور داده شدند. متانول در دمای کمتر از ۵۰ درجه سلسیوس توسط دستگاه روتاری تبخیر شد و باقی‌مانده عصاره در دمای ۴ درجه سلسیوس برای انجام آزمایشات نگهداری شد (Pourmorad et al., 2006).

اندازه‌گیری میزان فنول و فلاونوئید. برای اندازه‌گیری میزان فنل کل(در سه تکرار)، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره دانه، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۲ درصد)، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرو لیتر معرف Folin-Ciocalteu(۵۰ درصد) اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت، جذب آن‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتربا طول‌موج ۷۲۰ نانومتر ثبت شد. اسید گالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. میزان فنل کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل اسیدگالیک بر گرم وزن خشک دانه ثبت شد (Meda et al., 2005).

برای سنجش فلاونوئید دانه(در سه تکرار) به ۵۰۰ میکرو لیتر از هر عصاره دانه، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول استات سدیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب محلول بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک اندازه‌گیری شد. بلانک حاوی تمام ترکیبات ذکرشده در بالا بود اما بجای عصاره دانه، همان حجم متانول ۸۰ درصد به بلانک اضافه شد. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل عصاره‌هابراساسمیلی‌گرم معادل کوئرستین برگرم وزن خشکدانه گزارش شد(Mita et al., 1997).

پرورش سوسک چهارلکه‌ای حبوبات. کلنی اولیه‌ی *C. maculatus*، از جمعیت آزمایشگاهی پرورش‌یافته روی دانه‌ی لوبیا چشم بلبلی (رقم مشهد) واقع در آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه محقق اردبیلی تهیه و در ظروف پلاستیکی گرد (قطر ۱۸/۵ و ارتفاع ۷ سانتی‌متر) به طور گروهی پرورش داده شدند. این ظروف در دمای ۱±۲۸ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و تاریکی کامل نگهداری شدند. حشرات کامل نر و ماده پس از ظهور، جمع‌آوری و به طور مجزا به ظروف جدید(قطر ۱۸/۵ و ارتفاع ۷ سانتی‌متر) حاوی ۱۵۰ گرم دانه هر یک از ارقام ماش انتقال داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، از تخم‌های حداکثر یک‌روزهبرای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

بررسی زیست‌شناسی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی ارقام مختلف ماش. برای بررسی تأثیر تغذیه از ارقام مختلف ماش روی زیست–شناسی آفت، ۳۰ جفت از افراد بالغ نر و ماده‌ی سوسک چهارلکه‌ایحبوبات به طور مجزا داخل ظروف پرورش (قطر ۱۸/۵ و ارتفاع ۷ سانتی‌متر) حاوی دانه

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

Accepted MSJFSI

ارقام مختلف ماش قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، تعداد ۵۰ عدد تخم به ازای هر رقم انتخاب (هر دانه حاوی یک تخم) و به صورت انفرادی به ظروف پتری ۶ سانتی‌متری منتقل شدند. درب ظروف پتری برای تامین تهویه به ابعاد تقریبی یک سانتی‌متر سوراخ و با توری مسدود شد. بازدید روزانه از ظروف انجام و طول دوره‌ی نشوونما و بقای مراحل نابالغ ثبت شد. پس از ظهور حشرات کامل، هر یک جفت حشره نر و ماده،برای جفتگیری و تخمگذاری به ظروف پتری ۶ سانتی‌متری حاوی ۵ عدد دانه ارقام مورد آزمایش (به عنوان بستر تخمگذاری) منتقل شدند. طول عمر حشرات کامل نر و ماده و میزان زادآوری (تعداد تخم‌های گذاشته شده) در هر روز و در طول دوره تخمگذاری تا پایان عمر حشرات کامل به طور دقیق مورد بررسی قرار گرفت.

پارامترهای رشد جمعیت سوسک چهارلکه¬ای حبوبات روی ارقام ماش. جدول زندگی (پارامترهای رشد جمعیت) سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی پنج رقم مختلف ماش به روش دوجنسی سن–مرحله رشدی بررسی شد. بدین منظور، ابتدا نرخ بقای ویژه سنی (l_x) و زادآوری ویژه سنی (m_x) آفت با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شدند (Chi and Su, 2006):

$$l_x = \sum_{j=1}^{k} s_{xj}$$

$$m_x = \frac{\sum_{j=1}^{k} s_{xj} f_{xj}}{\sum_{j=1}^{k} s_{xj}}$$

سپس پارامترهای رشد جمعیت شامل نرخ ناخالص تولید مثل (GRR)، نرخ خالص تولید مثل (R_0) تولید مثل، نرخ ذاتی افزایش جمعیت (r)، نرخ متناهی افزایش جمعیت (λ) و متوسط زمان یک نسل (T) آفت با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شدند (Chi and Su, 2006):

$$GRR = \sum_{x=\alpha}^{\beta} m_x$$

$$R_0 = \sum_{x=1}^{\omega} \sum_{j=1}^{m} s_{xj} f_{xj}$$

$$\sum_{x=1}^{\omega} e^{-r(x+1)} l_x m_x = 1$$

$$\lambda = e^r$$

$$T = \frac{\ln R_o}{r}$$

سنجش محتوای پروتئین و فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو

تهیه عصاره آنزیمی. برای تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی، ۵۰ عدد لارو سن چهارم (آخر) *C. maculatus* پرورش‌یافته روی هر رقم ماش انتخاب و کل بدن لارو در یک میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از هموژنایزر برقی با سرعت ۳۵۰۰ ×rpm به مدت ۳۰ ثانیه روی یخ همگن شدند. مخلوط‌های حاصل در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۵۰۰۰ (×g) به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رونشین‌های به دست آمده جداسازی شد و به‌منظور سنجش میزان پروتئین بدن و فعالیت پروتئولیتیک و آمیلولتیک گوارشی مورد استفاده قرار گرفت (Borzoui and Bandani, 2013).

Accepted MS JESI

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

سنجش محتوای پروتئین بدن لارو. محتوای پروتئین بدن لاروهای سن آخر بر اساس روش Bradford (1976) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره بدن لارو با ۱ میلی‌لیتر معرف بردفورد مخلوط شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آلفا–آمیلاز، ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر ۵۰ Tris-Hcl میلی مولار با اسیدیته‌ی ۵/۵، با ۱۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی حاصل از لاروها و ۶۰ میکرولیتر نشاسته‌ی ۱ درصد مخلوط شد. بعد از نیم ساعت واکنش در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر معرف رنگی ۳، ۵– دی نیترو سالیسیلیک اسید به مخلوط واکنش اضافه شد. سپس در حمام آب گرم (میانگین دمای ۹۰ درجه‌ی سلسیوس) به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و پس از سرد شدن نمونه‌ها، جذب نوری هر کدام در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد (Bernfeld, 1955). هر یک از آزمایشات مربوط به تیمار و شاهد در سه تکرار انجام شد.

سوبسترای هموگلوبین (شرکت سیگما، آلمان) برای سنجش فعالیت پروتئازی کل لارو *C. maculatus* مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۳۰ میکرولیتر محلول هموگلوبین ۲ درصد در ۹۰ میکرولیتر بافر استات سدیم (اسیدیته ۵/۵) (Cohen, 1993) و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. هضم پروتئینی با اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۳۰ درصد متوقف و هموگلوبین هیدرولیز نشده موجود در واکنش، با قراردادن آنها در یخچال به مدت ۳۰ دقیقه بطور کامل رسوب داده شد. بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمونه‌ها با سرعت ۱۶۰۰۰(×g)، حجم مساوی از معرف Folin-Ciocalteu رقیق شده به رونشین اضافه و پس از ۱۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۶۵۰ نانومتر با استفاده از الایزاریدر تعیین شد. (Folin and Ciocalteu, 1927) در شاهد (بلانک) عصاره آنزیمی بعد از اضافه کردن تری کلرواستیک اسید به مخلوط واکنش افزوده شد. هر یک از آزمایشات مربوط به تیمار و شاهد در سه تکرار انجام شد

تجزیه آماری. برای اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون Kolmogorov-Smirnov با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab نسخه ۱۶ استفادهشد. تجزیه واریانس ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ارقام ماش، فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئین بدن لاروها با استفاده از روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) بانرم‌افزار آماری Minitab انجام شد. اختلاف‌های آماری بین میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون Tukey در سطح احتمال ۵ درصد بررسی شد. نتایج به دست آمده از پارامترهای زیستی سوسک با روش دوجنسی سن–مرحله رشدی در نرم‌افزار TWOSEX-MS Chart تجزیه شدند (Chi, 1988; Chi, 2021). جهت تکراردار کردن این پارامترها از روش بوت‌استرپ و به منظور ارزیابی تفاوت آماری بین میانگین‌ها، از آزمون بوت‌استرپ جفت‌شده استفاده شد. ارتباط بین پارامترهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دانه ارقام ماش با روش تجزیه همبستگی پیرسون بررسی شد.

نتایج

ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی ارقام ماش. نتایج حاصل از بررسی پارامترهای فیزیکی و بیوشیمیایی ارقام مختلف ماش در جدول ۱ ارائه شده است. بیشترین درصد رطوبت دانه مربوط به رقم افغان و کمترین درصد مربوط به ارقام ازبک، سخاوت و زربخش بود ($F_{4,10}$= 12.29, P< 0.01). شاخص سختی پنج رقم ماش مورد بررسی دارای تفاوت معنی‌دار بود ($F_{4,45}$= 40.23; P < 0.001)، به طوری که بیشترین شاخص سختی در رقم پرتو و کمترین شاخص در رقم زربخش مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، مساحت ($F_{4,45}$= 48.32, P< 0.001) و حجم ($F_{4,45}$= 42.43, P< 0.001) دانه در ارقام سخاوت و زربخش بیشتر از رقم پرتو بود. بیشترین وزن هزار دانه در ارقام ازبک، سخاوت و زربخش و کمترین آن در رقم پرتو به دست آمد ($F_{4,45}$=

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

Accepted MS JESI

(757.56,$P < 0.001$). بیشترین میزان پروتئین دانه در رقم پرتو و کمترین آن در رقم زربخش ثبت شد ($F_{4,10}$= 12.41, $P< 0.01$). با این حال، میزان نشاسته دانه در ارقام مختلف مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری نداشت ($F_{4,10}$= 2.31, $P = 0.129$). غلظت ترکیبات فنولی موجود در دانه در ارقام ازبک و زربخش بیشتر از سایر ارقام بود ($F_{4,10}$= 27.03, $P < 0.001$). بیشترین و کمترین محتوای فلاونوئید دانه به ترتیب در ارقام زربخش و افغان به دست آمد ($F_{4,10}$= 22.99, P < 0.001).

نرخ بقاء و زادآوری ویژه سنی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی ارقام ماش. نرخ بقای ویژه سنی (l_x) و زادآوری ویژه سنی (m_x) سوسک *C. maculatus* روی دانه ارقام ماش درشکل ۱ نشان داده شده است. نرخ بقاء در اولین روز خروج حشره کامل ماده ۰/۷۴، ۰/۷۷، ۰/۸۶، ۰/۷۷ و ۰/۷۷ به ترتیب روی ارقام سخاوت، زربخش، پرتو، ازبک و افغان مشاهده شد. بیشترین سن حشرات ماده روی تیمارهای ذکر شده به ترتیب در روزهای ۳۳، ۳۷، ۳۳، ۳۴ و ۳۸ بود. شروع تخم‌گذاری ماده‌ها روی تمامی ارقام ماش در سن ۲۲ روز بود. بالاترین زادآوری ویژه سنی (m_x) روی ارقام مورد آزمایش به ترتیب ۱۱/۷۹، ۹/۶۹، ۱۱/۹۰، ۸/۵۹ و ۱۰/۳۶ نتاج در روز ۲۵ بود.

زیست‌شناسی و پارامترهای رشد جمعیت سوسک چهارلکه‌ای حبوباتروی ارقام ماش

درصد زنده‌مانی، طول دوره نابالغ، طول عمر حشرات کامل و زادآوری سوسک چهارلکه‌ای حبوباتروی ارقام مختلف ماش درجدول ۲ آورده شده است. درصد زنده‌مانی و طول دوره نابالغ حشره تفاوت معنی داری روی ارقام ماش مورد بررسی نداشت ($P> 0.05$). طول عمر حشرات کامل نر روی ارقام افغان و پرتو طولانی‌تر از ارقام سخاوت و زربخش بود ($P< 0.05$). حشرات ماده پرورش‌یافته روی رقم زربخش طولانی‌ترین عمر و حشرات ماده پرورش‌یافته روی رقم‌های افغان و پرتو کوتاه‌ترین عمر را داشتند ($P< 0.05$).طولانی‌ترین دوره تخمگذاری آفت روی رقم زربخش و کوتاه‌ترین آن روی رقم ازبک به دست آمد ($P< 0.05$). زادآوری سوسک‌های ماده روی رقم پرتو به طور معنی‌داری کمتر از سایر ارقام مورد بررسی بود ($P< 0.05$).

تمامی پارامترهای جدول زندگی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات به جز نرخ ناخالص تولیدمثل(GRR)،اختلاف معنی‌داری روی ارقام مختلف ماش نداشتند ($P> 0.05$، جدول ۳). نرخ ناخالص تولیدمثل سوسک روی رقم زربخش به طور معنی‌داری($P < 0.05$) بیشتر از ارقام ازبک و پرتو بود.

محتوای پروتئین لارو و فعالیت آنزیم‌های گوارشی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی ارقام ماش.محتوای پروتئین بدن ($F_{4,10}$= 33.23, P < 0.001) و فعالیت آلفا-آمیلاز ($F_{4,10}$= 153.15, $P < 0.001$) و پروتئاز کل ($F_{4,10}$= 25.33, $P < 0.001$) لاروهای سن چهارم سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی ارقام ماش مورد آزمایش، دارای اختلاف معنی‌دار بودند($P < 0.05$). بیش‌ترین میزان پروتئین در لاروهای پرورش‌یافته روی رقم زربخش(۰/۴۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین مقدار در لاروهای تغذیه شده با رقم ازبک(۰/۳۷۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. بیش‌ترین فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز روی رقم پرتو و کمترین فعالیت آنزیم روی رقم سخاوت ثبت شد. فعالیت پروتئولیتیک لاروهای پرورش‌یافته با رقم سخاوت کمتر از لاروهای تغذیه شده با سایر ارقام بود (جدول ۴).

تجزیه همبستگی بین پارامترهای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ارقام ماش

نتایج تجزیه همبستگی پیرسون بین پارامترهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی سوسک چهارلکه‌ای حبوبات و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دانه ارقام ماش نشان داد که طول عمر حشرات کامل ماده و GRR همبستگی منفی معنی‌داری با شاخص سختی دانه ارقام ماش داشت. همچنین همبستگی مثبت معنی‌داری بین درصد رطوبت دانه با طول عمر حشرات کامل نر، مساحت و حجم دانه با زادآوری و میزان فلاونوئید دانه با طول عمر حشرات کامل ماده مشاهده شد. بین سایر پارامترهای زیستی و فعالیت آنزیم¬های گوارشی مورد بررسی حشره با سایر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ارقام ماش مورد آزمایش همبستگی معنی‌داری ثبت نشد (جدول ۵).

Accepted MS JESI

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

جدول ۱- میانگین (± خطای معیار) برخی ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی دانه ارقام مختلف ماش

Table 1. Mean (± SE) some physical and biochemical characteristics of the seed of different green gram cultivars

Cultivar	Moisture (%)	Grain hardness (N)	Volume (mm^3)	Area (mm^2)	1000-seed weight (g)	Protein content (mg/ml)	Starch content (mg/ml)	Phenolic content (mg gallic acid/g)	Flavonoid content (mg quercetin/g)
Uzbek	8.51±0.24b	30.78±0.45b	45.97±2.39b	61.90±2.16b	68.13±0.43a	0.81±0.01bc	0.03±0.003a	40.70±3.60a	2.82±0.20bc
Afghan	9.93±0.14a	28.67±0.29c	53.30±2.26ab	68.34±1.90ab	54.28±0.89b	0.83±0.02ab	0.02±0.002a	9.53±1.85b	1.89±0.29c
Sekhavat	8.32±0.28b	28.79±0.39bc	60.00±2.37a	73.98±1.98a	69.76±0.31a	0.84±0.01ab	0.03±0.003a	11.90±2.08b	3.46±0.32b
Parto	9.16±0.09ab	33.31±0.45a	29.06±0.89c	45.19±1.08c	35.94±0.19c	0.86±0.01a	0.03±0.004a	18.10±4.10b	2.82±0.14bc
Zarbakhsh	8.21±0.199b	24.55±0.81d	60.16±1.56a	74.18±1.12a	68.13±0.43a	0.77±0.01c	0.02±0.003a	37.06±1.10a	4.86±0.17a

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters in each column indicate significant differences among the means (Tukey' HSD test, P < 0.05).

Accepted MS JFST

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

جدول ۲- زیست‌شناسی (میانگین ± خطای معیار) سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی دانه ارقام مختلف ماش

Table 2. Life history (mean ± SE) of *Callosobruchus maculatus* on seed of different green gram cultivars

Cultivar	Immature survival (%)	Pre-adult period (day)	Male longevity (day)	Male lifespan(day)	Female longevity (day)	Female lifespan (day)	Oviposition period (day)	Fecundity (eggs per reproductive period)
Uzbek	77.16 ±0.05 a	25.12 ±0.17 a	5.36 ±0.13 ab	30.40 ±0.31 ab	5.33 ±0.12 ab	30.58 ±0.24 ab	4.54 ±0.26 c	83.75 ±2.38 a
Afghan	77.14 ±0.05 a	24.42 ±0.25 a	5.76 ±0.18 a	31.30 ±0.40 a	5.16 ±0.12 b	30.45 ±0.30 ab	4.84 ±0.15 bc	89.70 ±2.88 a
Sekhavat	74.28 ±0.05 a	25.11 ±0.10 a	5.07 ±0.16 b	30.30 ±0.15 b	5.26 ±0.11 ab	30.26 ±0.20 b	4.84 ±0.15 bc	86.03 ±2.50 a
Parto	85.71 ±0.04 a	25.00 ±0.10 a	5.59 ±0.14 a	30.51 ±0.26 ab	5.18 ±0.08 b	30.24 ±0.15 b	4.90 ±0.15 bc	69.21 ±2.28 b
Zarbakhsh	82.85 ±0.04 a	25.44 ±0.30 a	5.16 ±0.15 b	30.56 ±0.53 ab	5.54 ±0.09 a	31.03 ±0.31a	5.33 ±0.12 a	85.66 ±4.95 a

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است (P<۰/۰۵).

Differentletters in each column indicate a significant difference between the means (Paired-bootstrap test, P < 0.05).

Accepted MS JESI

Correspondingauthor:Bahram Naseri, E-mail: bnaseri@uma.ac.ir
Copyright©2022,Naseri et al.

جدول ۳- پارامترهای رشد جمعیت (میانگین ± خطای معیار) سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی دانه ارقام مختلف ماش

Table 3. Population growth parameters (mean ± SE) of *Callosobruchus maculatus* on seed of different green gram cultivars

Cultivar	*GRR* (offspring)	R_0(offspring)	r (day^{-1})	λ (day^{-1})	T (day)
Uzbek	41.06±6.78b	28.71±5.04a	0.123±0.004a	1.13±0.005a	27.24±0.21a
Afghan	49.56±8.97ab	30.75±5.17a	0.125±0.006a	1.13±0.006a	27.35±0.23a
Sekhavat	57.69±11.21ab	31.95±5.04a	0.127±0.006a	1.13±0.007a	27.09±0.17a
Parto	41.03±5.11b	32.62±4.25a	0.123±0.006a	1.13±0.007a	27.33±0.12a
Zarbakhsh	82.01±17.15a	39.44±5.10a	0.133±0.005a	1.14±0.005a	27.58±0.26a

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters in each column indicate a significant difference between the means (Paired-bootstrap test, P < 0.05). *GRR*: Gross reproductive rate; R_0: Net reproductive rate; r: Intrinsic rate of population increase; λ: Finite rate of population increase; T: Mean generation time.

جدول ٤-میانگین(± خطای معیار) محتوای پروتئین و فعالیت گوارشی پروتئاز و آمیلاز لاروهای سن چهارم سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی دانه ارقام مختلف ماش

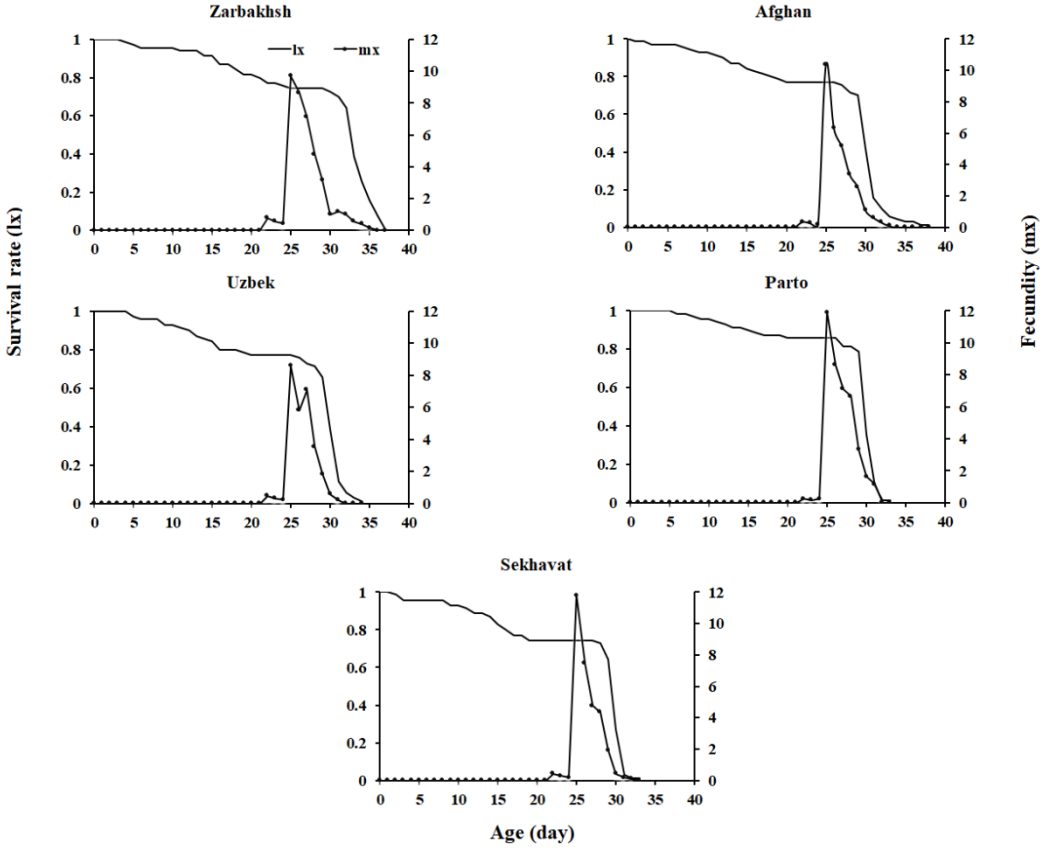
Table 4. Mean (± SE) protein content, and digestive proteolytic and amylolytic activity of fourth-instar larvae of Callosobruchus maculatus on seed of different green gram cultivars

Cultivar	Larval protein (mg/ml)	Protease activity (U/mg)	Amylase activity (U/mg)
Uzbek	0.373 ±0.002 c	2.96 ±0.03 a	40.900 ±0.145 b
Afghan	0.397 ±0.004 b	3.16 ±0.04 a	35.387 ±0.852 c
Sekhavat	0.396 ±0.002 b	2.58 ±0.03 b	30.763 ±0.307 d
Parto	0.402 ±0.001 b	3.14 ±0.01 a	46.450 ±0.526 a
Zarbakhsh	0.421 ±0.003 a	3.04 ±0.04 a	38.740 ±0.118 b

میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است (P<۰/۰۵).

Different letters in each column indicate significant differences among the means (Tukey' HSD test, P < 0.05)

Accepted MS JESI



شکل ۱–نرخ بقای ویژه‌ی سنی (l_x) و زادآوری ویژه‌ی سنی (m_x) *Callosobruchus maculatus* روی دانه ارقام مختلف ماش

Figure 1. Age-specific survival rate (l_x) and age-specific fecundity (m_x) of *Callosobruchus maculatus* reared on seed of different green gram cultivars

Accepted

جدول ۵- ضرایب همبستگی پیرسون (r) بین پارامترهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ارقام ماش مورد آزمایش

Table 5. Correlation coefficients (r) between biological parameters and digestive enzymes activity of *Callosobruchus maculatus* with physical and biochemical traits of tested green gram cultivars

$^{\delta}$*ML*= Male longevity, *FL*= Female longevity, *OP*= Oviposition period, *F*= Fecundity, *GRR*: Gross reproductive rate, *LP*= Larval protein, *PA*= Proteolytic activity, *AA*= Amylolytic activity

Parameter$^{\delta}$	Hardness index		Moisture content		Seed surface area		Seed volume		1000-seed weight		Protein content		Phenol content		Flavonoid content	
	r	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*	*r*	*P*
ML	0.48	0.41	**0.95**	**0.01**	-0.55	0.33	-0.56	0.32	-0.73	0.16	0.43	0.47	-0.37	0.54	-0.80	0.10
FL	-0.75	0.15	-0.75	0.14	0.50	0.40	0.50	0.39	0.62	0.27	**-0.92**	**0.03**	0.77	0.13	**0.90**	**0.04**
OP	-0.69	0.20	-0.23	0.71	0.32	0.60	0.34	0.57	0.02	0.98	-0.51	0.39	0.07	0.91	0.73	0.16
F	0.06	0.26	0.03	0.97	**0.90**	**0.04**	**0.89**	**0.04**	0.76	0.13	-0.52	0.37	-0.01	0.99	0.04	0.95
GRR	**-0.93**	**0.02**	-0.50	0.39	0.70	0.19	0.72	0.17	0.51	0.38	-0.76	0.14	0.25	0.68	0.85	0.07
LP	-0.58	0.30	-0.10	0.87	0.23	0.71	0.26	0.68	-0.13	0.84	-0.34	0.58	-0.10	0.87	0.62	0.26
PA	-0.01	0.99	-0.13	0.84	0.33	0.59	0.35	0.57	0.16	0.80	0.47	0.43	-0.70	0.19	0.01	0.99
AA	0.53	0.36	0.13	0.83	-0.86	0.06	-0.86	0.06	-0.67	0.22	0.12	0.85	0.40	0.51	-0.06	0.93

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که سوسک چهارلکه‌ای حبوبات واکنش تغذیه‌ای و زیستی متفاوتی نسبت به عوامل فیزیکی و بیوشیمیایی دانه ارقام ماش مورد آزمایش داشت. به طوری که برخی پارامترهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی آفت به طور معنی‌داری تحت تاثیر ارقام مورد تغذیه حشره قرار گرفت.

تغذیه سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات در مرحله لاروی از دانه ارقام ماش مورد آزمایش، اثر معنی‌داری روی درصد زنده‌مانی و طول دوره نابالغ نداشت. عدم تفاوت در بقاء و نشوونمای سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات روی این ارقام نشان می‌دهد که لاروها توانایی تغذیه‌ی بهینه از دانه ارقام ماش را دارا بوده و یا کیفیت غذایی دانه‌ها برای نشوونمای مطلوب لاروها یکسان بوده است (Seram et al., 2016). به عبارت دیگر، تغییر در ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی دانه ارقام مورد آزمایش، اثر معنی‌داری روی مراحل قبل از بلوغ آفت نداشت. محدوده طول دوره نابالغ سوسک چهارلکه‌ای حبوبات در پژوهش حاضر، همراستا با مقادیر گزارش شده توسط Mansouri et al. (2022) و Bidar et al. (2021) برای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات پرورش‌یافته روی دانه ماش می‌باشد. با این حال، طول دوره نابالغ آفت روی ارقام ماشکوتاه‌تر از مقدار گزارش شده توسط Naseri*et al.* (2022) برای سوسک چهارلکه‌ای حبوباتروی ارقام مختلف باقلامی‌باشد. این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل تفاوت در گونه میزبان و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها باشد.

با توجه به اینکه لاروهای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات در داخل دانه محصور بوده و تمامی مراحل لاروی و شفیرگی را درون یک دانه سپری می‌کنند، لذا تخم‌گذاری سوسکهای ماده روی دانه‌های با ارزش غذایی بالاتر، برای زنده‌مانی و نشوونمای بهتر لاروها و شفیره‌ها اهمیت بسزایی دارد (Messina, 1991). حشره کامل سوسک چهارلکه‌ای حبوبات قادر به تغذیه نیستند، بنابراین توانایی تغذیه‌ای و هضم و جذب غذا در دوره لاروی، تعیین‌کننده طول عمر و قابلیت تولیدمثلی حشرات کامل خواهد بود. تغذیه سوسک چهارلکه‌ای حبوبات در مرحله لاروی اثر معنی‌دار روی طول عمر حشرات کامل نر و ماده داشت. در پژوهش حاضر، طولانی بودن عمر حشرات کامل ماده و دوره تخم‌گذاری روی دانه رقم زربخش می‌تواند به دلیل نرم‌تر بودن دانه (شاخص سختی کمتر) این رقم در مقایسه با سایر ارقام مورد بررسی باشد. علاوه بر این، کوتاه بودن طول عمر حشرات کامل ماده روی رقم پرتو منجر به کاهش معنی‌دار زادآوری (تعداد تخم‌های گذاشته شده) حشرات پرورش یافته روی این رقم شد. در این آزمایش، اندازه و وزن دانه در رقم پرتو کمتر از رقم زربخش بود، بنابراین، سوسک‌های ماده تخم‌های کمتری روی رقم پرتو در مقایسه با سایر ارقام قرار دادند. این یافته همسو با نتایج بررسی‌های سایر پژوهشگران می‌باشد که اعلام کردند سوسک چهارلکه‌ای حبوبات، روی دانه حبوبات بزرگ‌تر و سنگین‌تر در مقایسه با دانه‌های کوچکتر و سبکتر، تخم‌های بیشتری قرار می‌دهد (Patil and Jadhav, 1985; Mbata, 1993; Bidar et al., 2021).

خصوصیات فیزیکی و مرفولوژیکی دانه حبوبات شامل اندازه، شکل، نرمی بافت، زبری و ضخامت پوسته بذر روی میزان تخمگذاری سوسک چهارلکه‌ای حبوبات تاثیر قابل توجهی دارند (Southgate, 1979; Sarikarin et al., 1999). در این آزمایش، علی رغم بالا بودن غلظت پروتئین دانه در رقم پرتو، به دلیل سختی بالای دانه این رقم لاروها قادر به تغذیه بهینه نبوده و حشرات ماده حاصل از آنها کوتاه‌ترین عمر و زادآوری را داشتند. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین زادآوری سوسک چهارلکه‌ای حبوبات و اندازه (مساحت و حجم) دانه ارقام ماش نشان داد که اندازه دانه یکی از عوامل اصلی تاثیرگذار روی تعداد تخم‌های گذاشته شده توسط حشره می‌باشد. دلیل احتمالی دیگر، وجود ترکیبات دفاعی ناشناخته در پوسته دانه رقم پرتو می‌باشد که ممکن است از تخمگذاری سوسک-

Accepted MS JESI

های ماده ممانعت کنند. به منظور اثبات این موضوع، انجام مطالعاتی در آینده برای شناسایی دیگر عوامل دفاعی موثر در مقاومت ارقام ماش نسبت به *C. maculatus* ضروری است. با توجه به همبستگی مثبت و معنی‌دار بین درصد رطوبت دانه و طول عمر حشرات کامل نر می‌توان نتیجه گرفت که لاروهایی که به حشره نر تبدیل شدند از دانه‌های با رطوبت بالاتر تغذیه بهتری در مقایسه با دانه‌های با رطوبت پایین‌تر داشتند. علی رغم طولانی بودن عمر حشرات کامل نر روی رقم پرتو، اما به دلیل کاهش معنی‌دار عمر حشرات کامل ماده روی این رقم، زادآوری آفت روی این رقم کاهش یافت. محدوده زادآوری سوسک چهارلکه‌ای حبوبات در پژوهش حاضر، نزدیک به مقادیر گزارش شده توسط Mansouri et al. (2022) و Bidar et al. (2021) برای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات پرورش‌یافته روی دانه ماش می‌باشد.

در این پژوهش، اغلب پارامترهای رشد جمعیت سوسک چهارلکه‌ای حبوبات تفاوت معنی‌داری روی ارقام ماش مورد بررسی نداشتند. با این حال، مقدار *GRR* حشره روی رقم زربخش بیشتر از ارقام ازبک و پرتو به دست آمد. یکی از عوامل کلیدی تاثیرگذار روی *GRR* آفت، سختی دانه‌ارقام ماش می‌باشد زیرا بر اساس نتایج همبستگی، با افزایش شاخص سختی دانه، مقدار *GRR*سوسک کاهش یافت. علی رغم بالا بودن میزان فنل و فلاونوئید در رقم زربخش، افزایش مقدار *GRR*روی این رقم نشانگر توانایی بالای لاروها در خنثی کردن ترکیبات دفاعی میزبان برای استفاده هر چه بهتر از عناصر غذایی آن می‌باشد. همچنین، این احتمال وجود دارد که غلظت فنل و فلاونوئید در رقم زربخش به اندازه‌ای نبوده که برای لاروهای حشره سمی یا بازدارنده باشد. طبق نتایج به دست آمده، با توجه به اینکه نرخ ذاتی افزایش جمعیت (*r*) سوسک چهارلکه‌ای حبوبات، به عنوان اصلی‌ترین پارامتر رشد جمعیت حشره، تفاوت معنی‌داری روی ارقام ماش مورد آزمایش نداشت، بنابراین حشره توانایی یکسانی برای افزایش جمعیت روی این ارقام داشته است. مقادیر نرخ ذاتی افزایش جمعیت سوسک چهارلکه‌ای حبوبات در پژوهش حاضر، نزدیک به مقادیر گزارش شده توسط Mansouri et al. (2022) و Bidar et al. (2021) برای سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات روی دانه ماش می‌باشد. با این حال، مقادیر نرخ ذاتی افزایش جمعیت و نرخ خالص تولیدمثل این حشرهروی ارقام ماش بیشتر از مقادیر گزارش شده برای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی ارقام مختلف باقلا است(Naseri *et al.*, 2022) که نشان دهنده مطلوبیت بالاتر دانه ماش در مقایسه با دانه باقلا برای افزایش جمعیت سوسک چهارلکه‌ای حبوباتمی‌باشد. این تفاوت‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه میزبان و ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی آنها باشد.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، غلظت پروتئین دانه بین ارقام زربخش و ازبک تفاوت معنی‌داری نداشت، با این حال میزان پروتئین بدن لاروهای تغذیه شده با رقم زربخش بیشتر از لاروهای پرورش‌یافته با رقم ازبک بود. این امر می‌تواند به دلیل سختی کمتر رقم زربخش در مقایسه با رقم ازبک باشد که منجر به تغذیه بهتر لاروها و هضم و جذب بیشتر پروتئین در بدن لاروها شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که لاروهای سن چهارم سوسک چهارلکه‌ای حبوبات توانایی بالایی در تنظیم ترشح آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز در واکنش به تغذیه از ارقام مختلف ماش داشتند. کمترین فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز و آمیلاز روی رقم سخاوت بود. میزان فعالیت آمیلاز لاروهای تغذیه شده با رقم پرتو، تقریبا ۱/۵ برابر بیشتر از فعالیت آمیلاز لاروهای پرورش‌یافته روی رقم سخاوت بود. با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار غلظت نشاسته در ارقام مختلف ماش، این ویژگی دانه تاثیری بر تغییر فعالیت آمیلاز حشره روی ارقام مورد آزمایش نداشت. با این حال، Lazar et al. (2014) گزارش کردند که دانه‌های ارقامی از ماش که نشاسته بالاتری دارند برای تغذیه لاروهای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات مطلوب‌تر از ارقامی هستند که نشاسته کمتری دارند. سطح بیان ژن آلفا-آمیلاز، مطابق با مقدار نشاسته یا گلوکز موجود در غذا تنظیم می‌شود. حشره با افزایش محتوی نشاسته و یا گلوکز موجود در غذا، میزان بیان آنزیم آلفا-آمیلاز و در نتیجه میزان ترشح آن را کاهش می‌دهد (Silva et al., 2001). البته این مورد همیشه صادق نیست و در جایی که مقدار درشت‌مغذی‌ها در غذا متناسب با نیاز حشره بالا رود، حشره ممکن است فعالیت آنزیمی را تا یک حد مورد نیاز بالا ببرد تا بیش‌ترین استخراج موادغذایی را داشته باشد و از آن برای نشوونمای بهتر استفاده کند (Kotkar et al., 2009). فعالیت پایین آنزیم پروتئاز روی رقم سخاوت می‌تواند به دلیل کیفیت پایین درشت‌مغذی‌ها، سختی دانه و یا وجود پروتئین‌های مهارکننده آنزیم پروتئاز دراین رقم باشد. با این حال، نتایج Sarboland et al. (2017) نشان داد که فعالیت پروتئازی بالا در لاروهای سوسک چهارلکه‌ای حبوبات روی دانه لوبیا چشم‌بلبلی به دلیل پروتئین بیشتر لوبیا چشم‌بلبلی در مقایسه با دانه نخود و ماش می‌باشد.

بر اساس یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر، ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی دانه ارقام مورد آزمایش، تاثیر معنی‌داری روی محتوای پروتئین بدن و فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و پروتئاز لاروهای سن چهارم داشت، به طوری کهکمترین فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و پروتئاز روی رقم سخاوت به دست آمد. با این حال، درصد زنده‌مانی، طول دوره‌ی مراحل نابالغ و اغلب پارامترهای رشد جمعیت حشره روی رقم‌های مختلف ماش تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین، تفاوتی در حساسیت و مقاومت رقم‌های ماش مورد بررسی نسبت به سوسک چهارلکه‌ای حبوبات مشاهده نشد. با توجه به حساسیت بالای تمامی ارقام مورد آزمایش در برابر سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات، در انبارهایی که این آفت شیوع داشته و ارقام ماش در کنار یکدیگر انبار می‌شوند،بایستی با پایش دقیق محصول، اقدامات مراقبتی بیشتری برای پیشگیری از طغیان آفت اتخاذ شود.

Accepted MS JES

Author Contributions

Bahram Naseri: conceptualization, investigation, final review and edit, visualization, supervision, project administration and funding acquisition. **Aryan Ebadi:** methodology, formal analysis, investigation, draft preparation, final review and edit. **Zahra Rezaei:** methodology, final review and edit.

Funding

This research has received financial support by the University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Data Availability Statement

All data supporting the findings of this study are available within the paper.

Acknowledgments

This research was supported by the University of Mohaghegh Ardabili (Research grant number: 1402.D.9.29071.

Ethics Approval

Insects and mites were used in this study. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Accepted MS JESI

REFERENCES

AACC, 2000. Approved methods of the American association of cereal chemists.10th, *American association of cereal chemists*, Saint Paul, Minnesota.

Azzouz, H., A. Cherqui, E.D.M. Campan, Y.R. Duport, G. Jouanin, L. Kaiser and P. Giordanengo, 2005. Effects of plant protease inhibitors oryzacystatin I and soybean Bowman–Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae) and its parasitoid *Aphelinusabdominalis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Journal of Insect Physiology*, 51: 75-86.. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.11.010

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β. *Methods in Enzymology*, 1: 149-154. https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5

Bidar, F., J. Razmjou, A. Golizadeh, S.A.A. Fathi, A. Ebadollahi and B. Naseri, 2021. Effect of different legume seeds on life table parameters of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Stored Products Research*, 90: 101755. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101755

Borzoui, E., Bandani, A.R., 2013. Wheat and triticale proteinaceous seed extracts inhibit gut α-amylase and protease of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*. *Molecular Entomology*, 4: 13–21. https://doi: 105376/me.2013.04.0003

Bradford, M.A. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-day binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Chi, H. 1988. Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. *Environmental Entomology*, 17(1): 26-34. https://doi.org/10.1093/ee/17.1.26

Chi, H. 2021. TWOSEX–MSChart: a Computer Program for the Age Stage, Two-Sex Life Table Analysis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. doi:10.1127/entomologia/2022/1851

Chi, H. and H.Y. Su, 2006. Age-stage, two-sex life tables of *Aphidiusgifuensis* (Ashmead)(Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzuspersicae* (Sulzer)(Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female fecundity and the net reproductive rate. *Environmental Entomology*, 35(1): 10-21. https://doi.org/10.1603/0046-225X-35.1.10

Cohen A.C. 1993. Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous heteropteran, *Zelus renardii*. *Journal of Insect Physiology*, 39 (10): 823-829. https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90114-7

Devi, M.B. and N.V. Devi, 2014. Biology and morphometric measurement of cowpeaweevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) in green gram. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2 (3): 74-76.

FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927) On Tyrosine and Tryptophane Determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73: 627-650. https://doi: 10.1016/S0021-9258(18)84277-6

Johnson, J.A. and K.A. Valero, 2003. Use of commercial freezers to control cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), in organic garbanzo beans. *Journal of Stored Product Research*, 96(6): 1952- 1957. https://doi.org/10.1603/0022-0493-96.6.1952

Kazemi, F., A.A. Talebi, Y. Fathipour and S. Farahani, 2009. A comparative study on the effect of four leguminous species on biological and population growth parameters of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Col.: Bruchidae). *Advances in Environmental Biology*, 3(3): 226-232.

Kennedy, G.G., F. Gould, O.M.B. Deponti and R.E. Stinner, 1987. Ecological, agricultural and commercial considerations in the deployment of insect resistant King ABS (1994) *Heliothis/Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). In: Mathews GA, Tunstall JP (eds) Insect Pests of Cotton, pp: 39-106. CAB International, U.K.

Kotkar, H.M., P.J. Sarate, V.A. Tamhane, V.S. Gupta and A.P. Giri, 2009. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *Journal of Insect Physiology*, 55: 663-670. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.05.004

Krzyżowski, M., Baran, B., & Francikowski, J. 2021. Intergenerational transmission of resistance of *Callosobruchus maculatus* to essential oil treatment. *Molecules*, 26(15): 4541. https://doi.org/10.3390/molecules26154541

Kumar, R. (2017). Insect Pests of Stored Grain: Biology, Behavior, and Management Strategies. https://doi.org/10.1201/9781315365695

Lazar, L., B. Panickar and P.S. Patel, 2014. Impact of biochemicals on the developmental stages of pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* infesting green gram. *Journal of Food Legumumes,* 27(2): 121-125.

Mansouri, S.M., Naseri, B., Bidar, F. 2022. Oviposition preference, population growth and digestive enzymatic function of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae) on six legume grains. *Journal of Stored Products Research,* 99. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2022.102011

Mbata, G.N. 1993. Evaluation of susceptibility of varieties of cowpea to *Callosobruchus maculates* (F.) and *Callosobruchus subinnotatus* (Pic.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 29:. https://doi.org/10.1016/0022-474X(93)90002-L

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., &Nacoulma, O. G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91(3): 571-577. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006

Accepted MSEI

Messina, F.J. 1991. Life history variation in a seed beetle: adult egg-laying *vs.* larval competitive ability. *Oecologia,* 85: 447-455.

Mita, S., Murano, N., Akaike, M., & Nakamura, K. 1997. Mutants of Arabidopsis thaliana with pleiotropic effects on the expression of the gene for β-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal*, 11(4): 841-851. doi: 10.1046/j.1365-313x.1997.11040841.x

Mitchell, R. 1990. Behavioral ecology of *Callosobruchusmacuiatus.* pp. 317-330in Fujii, K., Gatehouse, A.M.R. Johnson, C.D. Mitchell, R. and Yoshida, T. (Eds.) Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coeuolution. Kluwer, London.

Mohandass, S.M., F.H. Arthur, K.Y. Zhu and J.E. Throne, 2006. Hydroprene: mode of action current status in stored-product pest management, insect resistance, and future prospects. *Crop Protection*, 25: 602-909. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.01.014

Naseri, B., F. Hamzavi, A. Ebadollahi and F. Sheikh, 2022. Physicochemical traits of *Vicia faba*L. seed cultivars affect oviposition preference and demographic parameters of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Stored Products Research,* 95. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101924.

Papp, M. and A. Mesterhazy, 1993. Resistance to bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) in winter wheat varieties. *Euphytica*, 67: 49-57.

Patil, S.M., I.D. Jadhav, 1985. Studies on the relative susceptibility of some promising varieties of pea, *Pisum sativum* to the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* in storage. *Bulletin of Grain Technology*, 20: 28.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. &Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1142-1145. http://www.academicjournals.org/AJB

Roesli, R., P. Dobie, and B. Gerard, 1990. Strain differences in two species of *Callosobruchus*(Coleoptera: Bruchidae) developing on seeds of cowpea {*Vigna unguiculata* (L.)} and green gram {*V. radiata* (L.)}. *Biotropia*, 4: 19-30.

Sanon, A., N.M. Ba, C.L. Binso-Dabire and B.R. Pittendrigh, 2010. Effectiveness of spinosad (naturalytes) in controlling the cowpea storage pest, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(1): 203-210. https://doi.org/10.1603/EC09093

Sarboland, S., F. Mehrkhou and M. Imani, 2017. Gut proteolytic profile of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) in response to feeding on different fabaceous host plants. *Journal of Agricultural Sciience and Technology*, 19: 121-132.

Sarikarin, N., P. Srinives, R. Kaveeta, P. Saksoong, 1999. Effect of seed texture layer on bruchid infestation in mungbean*Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Science Asia*, 25: 203–206.. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.1999.25.203

Seram, D., S. Mohan, J.S. Kennedy and N. Senthil, 2016. Development and damage assessment of the storage beetle, *Callosobruchus maculatus* (Thanjavur and Coimbatore strain) under normal and controlled conditions . Pp. 25–31. In: Navarro S, Jayas DS, Alagusundaram K, (Eds.) Proceedings of the 10th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products (CAF2016), CAF Permanent Committee Secretariat, Winnipeg, Canada.

Sheligl, H. Q. 1986. Die verwertungorgngischersourendurch chlorella lincht. Planta Journal, 47-51.

Silva, C.P., W.R. Terra, J. Xavier-Filho, M.R. Grossi de Sa, E.M. Isejima, A.R. DaMatta, F.C. Miguens and T.D. Bifano, 2001. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotessubfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of a–amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 41-50. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00103-X

Southgate, B.J. 1979. Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology,* 24: 449-473. **https://doi.org/10.1146/annurev.en.24.010179.002313**

Accepted MSJES

Life history and digestive protease and amylase activity of the cowpea weevil,*Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) on different green gram cultivars

Bahram Naseri,Aryan Ebadi and Zahra Rezaei
Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences & Natural Resources, University of MohagheghArdabili, Ardabil, Iran

✉bnaseri@uma.ac.ir https://orcid.org/0000-0001-5821-0957
✉aryan.eb75@gmail.com https://orcid.org/0009-0009-8367-7597
✉zhrarzii1400@gmail.com https://orcid.org/0009-0002-7394-4515

Article History
Received: xx 2024|*Accepted:*xx2024|Subject Editor: Jalal Jalali Sendi

Abstract
The cowpea weevil,*Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae) is one of the important pests of stored legume grains in Iran and many countries of the world. Investigation of resistance status of legume grains to *C. maculatus* infestation can be helpful in minimizing its severe damage. In this research, we studied the resistance of five green gram cultivars (Sekhavat, Zarbakhsh, Parto, Uzbek, and Afghan) to *C. maculatus* using its life history parameters and digestive protease and amylase activity at 28 ± 1°C, 65 ± 5% relative humidity, and 24 h darkness. After oviposition of adult weevils, green gram seeds containing one egg were individually transferred to 6 cm Petri dishes, and the pre-adult period, the survival percentage of immature individuals, fecundity and longevity of male and female insects on each cultivar were investigated. The results obtained from the life history and life table parameters of the insect were analyzed by age-stage, two-sex method. According to obtained results, there was no significant difference in the percentage of survival and the length of the immature stages on different cultivars of green gram. Among the examined cultivars, fecundity of female weevils on cultivar Partov (69.21 eggs) was lower than on other tested cultivars. The longest oviposition period was obtained on cultivar Zarbakhsh (5.33 days) and the shortest on cultivar Uzbek (4.54 days). However, the net reproductive rate (R_0), intrinsic rate of population increase (r) and finite rate of population increase (λ) were not significantly different on five cultivars of green gram. The amylolytic and proteolytic activities of fourth instar larvae were lowest on cultivar Sekhavat. According to the findings of the present study, no difference was found in the susceptibility and resistance of the studied green gram cultivars to the cowpea weevil.

Key words: Storage pest, life table, seed resistance, legume cultivar
Corresponding Author Bahram Naseri
***Citation*:**????????

Accepted MS JESI