Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 2, Summer 2022, p. 213-225

Effect of Micronutrient Fertilizers on Digestive Enzymes Activity of *Hippodamia variegata* (Goeze) Fed on *Myzus persicae* (Sulzer)

T. Alizamani[1*], J. Shakarami[2], M. Mardani Talaee[3], A. Zibaee[4]

Received: 05-01-2022
Revised: 28-02-2022
Accepted: 19-03-2022
Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:
Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani Talaee, M., & Zibaee, A. (2022). Effect of Micronutrient Fertilizers on Digestive Enzymes Activity of *Hippodamia variegata* (Goeze) Fed on *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Iranian Plant Protection Research 36*(2): 213-225. (In Persian with English abstract)
DOI: 10.22067/JPP.2022.74291.1070

Introduction

The green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) is one of the severe pests of bell pepper *Capsicum annuum* L. in the greenhouse. Ladybird, *Hippodamia variegata* (Goeze), is an important general predator in both larval and adult stages to various aphid species, including, *M. persicae*. In this study, the effect of nutritional interaction among plant-herbivore-natural enemy under the influence of foliar application of iron, zinc, copper and manganese in bell pepper on the activity of digestive enzymes of the third and fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* was examined.

Materials and Methods

The experiments were performed as a completely randomized design with four replicates per treatment during 2020-2021 in the greenhouse and laboratory of the Department of Plant Protection, College of Agriculture, Lorestan University. The foliar application of micronutrient carried out at four-to six-leaf stage with a certain amount of each micronutrient fertilizer. Then, sufficient number of the third and fourth instar larvae of *H. variegata* were randomly collected from each treatment and replication. The samples transferred to 1 mL of distilled water, and homogenized with a hand pestle. Then, the samples centrifuged at 13000 g for 15 min at 4°C. The supernatants as the enzyme source were collected and reserved at −20°C for starting biochemical assays. The activity of digestive enzymes was measured according to the standard protocols.

Results

The results showed that the amount of digestive enzymes activity of the third and the fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* reared on the different micronutrient treatments were higher than the control treatment. The total protease and the trypsin activity were higher in the third instar larvae *H. variegata* reared on manganese (0.583 and 19.296 U/mg protein) and iron (0.574 and 18.426 U/mg protein), respectively. The highest and lowest activity of chymotrypsin, aminopeptidase and carboxypeptidase were found in the third instar larvae in manganese (15.518, 8.95 and 7.536 U/mg protein) and control (7.353, 2.139 and 2.665 U/ mg protein) treatments, respectively. The highest (18.952) and lowest (9.139 U/ mg protein) elastase activity were found in the third instar larvae on iron and control, respectively. The higher activity of α-amylase (25.20 U/mg protein) was observed in the third instar larvae of *H. variegata* in iron treatments then the other treatments. The total protease (0.183 U/ mg protein) and the chymotrypsin (10.396 U/ mg protein) of the fourth instar larvae predatory had higher activities with iron treatment and these enzymes had lower activities on control (0.036 and 6.763 U/ mg protein) and copper (0.059 and 6.655 U/ mg protein) treatments. The highest activity of trypsin and aminopeptidase were observed in the fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* reared on iron

1 and 2- Former Ph.D. Student of Entomology and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Lorestan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: alizamani.ta@fa.lu.ac.ir)
3- Former Ph.D. Student of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan-Rasht, Iran

(6.893 and 2.317 U/ mg protein) and the highest activity of elastase was found on iron (2.486) and zinc (2.251 U/ mg protein, respectively). Also, the lowest activity of trypsin, aminopeptidase and elastase were found on control. The carboxypeptidase activity was higher in the fourth instar larvae *H. variegata* fed on the all micronutrients than the control. Also, the highest and lowest activity of α-amylase were observed in the fourth instar larvae *H. variegata* fed on micronutrients of copper and iron (17.64 and 15.04 U/ mg protein) and control (9.160 U/mg protein), respectively.

Discussion

The results showed that the amount of digestive enzymes activity of the third and the fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* reared on different micronutrient treatments were higher than the control treatment.

Based on the results, the foliar application of plants with micronutrient fertilizers has a positive effect on the performance of predator of *H. variegata* through nutritional interaction and improving of the growth quality. Thus, the quality of host plants, as the first level of nutrition, has an important effect on the physiological characteristics of the predator on the third level of nutrition and show the positive effect of prey nutrients on the physiological performance of *H. variegata* that can be used in *M. persicae* management programs.

Conclusion

Using different micronutrient fertilizers along with biological control agents such as ladybird *H. variegata* could be effective in integrated management programs of *M. persicae* through the growth quality improvement of the host plants.

Keywords: Digestive enzymes, *Hippodamia variegata*, Micronutrient fertilizers

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۲۲۵-۲۱۳

تاثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی *Hippodamia variegata* (Goeze) در تغذیه از *Myzus persicae* (Sulzer)

طیبه علی زمانی[1*]- جهانشیر شاکرمی[2]- مژگان مردانی طلایی[3]- آرش زیبایی[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵.
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۸

چکیده

شته سبز هلو، *Myzus persicae* (Sulzer) یکی از آفات مهم فلفل دلمه *Capsicum annuum* L. می‌باشد. کفشدوزک *Hippodamia variegata* (Goeze) شکارگر عمومی مهم گونه‌های مختلف شته، از جمله *M. persicae* در مراحل لاروی و حشره کامل می‌باشد. در مطالعه حاضر، تأثیر برهم‌کنش غذایی بین گیاه- گیاه‌خوار- دشمن طبیعی تحت تأثیر محلول‌پاشی ریز مغذی آهن، روی، مس و منگنز در فلفل‌دلمه بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای بالغ سن سوم و چهارم *H. variegata* تغذیه شده از *M. persicae* مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در هر تیمار انجام شد. فعالیت آنزیم‌های گوارشی از جمله پروتئازکل، آلفاآمیلاز و پروتئازهای اختصاصی بر اساس پروتکل-های استاندارد اندازه‌گیری شد. فعالیت پروتئازکل و تریپسین لاروهای سن سوم *H. variegata* پرورش‌یافته در تیمارهای منگنز (۰/۵۸۳ و ۱۹/۲۹۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و آهن (۰/۵۷۴ و ۱۸/۴۲۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. براساس نتایج، بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین، آمینوپپتیداز و کربوکسی‌پپتیداز لاروهای سن سوم *H. variegata* به ترتیب در تیمارهای منگنز (۱۵/۵۱۸، ۸/۹۵۰ و ۷/۵۳۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و شاهد (۷/۳۵۳، ۲/۱۳۹ و ۲/۶۶۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد. بیشترین (۱۸/۹۵۲) و کمترین (۹/۱۳۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) فعالیت الاستاز لاروهای سن سوم شکارگر به ترتیب در تیمارهای آهن و شاهد ثبت شد. فعالیت بالاتر آلفاآمیلاز لاروهای سن سوم *H. variegata* در تیمار آهن (۲۵/۲۰ واحد برمیلی‌گرم بر پروتئین) ثبت شد. فعالیت پروتئاز کل و کیموتریپسین لاروهای سن چهارم *H. variegata* در تیمار آهن (۰/۱۸۳ و ۱۰/۳۹۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با شاهد (۰/۰۳۶ و ۶/۷۶۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و ریزمغذی مس (۰/۰۵۹ و ۶/۶۵۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین فعالیت تریپسین، الاستاز و آمینوپپتیداز لاروهای سن چهارم شکارگر در تیمارهای آهن (۶/۸۹۳، ۲/۴۸۶، ۲/۳۱۷)، روی (۶/۵۴۳، ۲/۲۵۱، ۱/۸۲۷) و منگنز (۵/۶۳۱، ۱/۹۵۷، ۲/۰۵۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با شاهد ثبت شد. فعالیت کربوکسی‌پپتیداز لاروهای سن چهارم *H. variegata* در تمامی تیمارهای ریزمغذی نسبت به شاهد بیشتر بود. همچنین بیشترین و کمترین فعالیت آلفاآمیلاز لاروهای سن چهارم *H. variegata* به ترتیب در تغذیه از ریزمغذی‌های مس (۱۷/۶۴)، آهن (۱۵/۰۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و شاهد (۹/۱۶۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد. بنابراین استفاده از کودهای ریزمغذی با بهبود کیفیت گیاهان میزبان همراه با بکارگیری عوامل کنترل بیولوژیک مثل کفشدوزک *H. variegata* می‌تواند در برنامه‌های مدیریت آفات مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های گوارشی، کودهای ریزمغذی، *Hippodamia variegata*

مقدمه

شته سبز هلو، *Myzus persicae* (Sulzer)، یکی از آفات مهم گیاهان تیره بادمجانیان [5] و فلفل‌دلمه، *Capsicum annuum* L.،

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری حشره‌شناسی و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران

(* نویسنده مسئول: Email: alizamani.ta@fa.lu.ac.ir)
۳- دانشجوی سابق دکتری حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۴- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
DOI: 10.22067/JPP.2022/74291.1070
5- Solanaceae

می‌باشد (Özgökçe *et al*., 2018). این آفت علاوه بر خسارت مستقیم از طریق تغذیه، با انتقال بیماری‌های ویروسی و آلودگی‌های میکروبی، خسارت غیر مستقیم ایجاد می‌کند (Fenton *et al*., 2010). با توجه به اثرات سوء مصرف سموم شیمیایی بر محیط زیست، موجودات غیر هدف و طغیان مجدد آفات، استفاده از روش‌های سازگار با اکوسیستم در قالب راهبرد مدیریت تلفیقی آفات در کنترل آفت الزامی می‌باشد. کنترل بیولوژیک به عنوان یک مولفه مهم مدیریت تلفیقی آفات مطرح است که می‌تواند نقش و اهمیت قابل توجهی در کاهش جمعیت و خسارت آفات داشته باشد (Scholler *et al*., 1997). کفشدوزک‌های خانواده Coccinellidae از عوامل مهم کنترل بیولوژیک در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات می‌باشند و در این بین گونه‌ی *Hippodamia variegata* (Goeze) با توجه به قدرت جستجوگری زیاد، توان تولیدمثلی و نرخ بالای مصرف شکار از اهمیت بیشتری برخوردار است و در کاهش جمعیت شته‌ها و از جمله شته سبز هلو بسیار مؤثر است (Kontodimas and Stathas, 2005). این کفشدوزک یک شکارگر عمومی مهم در مراحل لاروی و حشره بالغ می‌باشد که علاوه بر شته‌ها، از شپشک‌ها، پسیل‌ها، سفید بالک‌ها، زنجرک‌ها، کنه‌ها، تخم و لارو پروانه‌ها نیز تغذیه می‌کند (Obrycki and Kring, 1998). انجام عملیات کشاورزی مانند بکارگیری نهاده‌های کشاورزی و استفاده از کودهای ریزمغذی به عنوان یک روش مدیریتی جدید می‌تواند در برنامه‌های کنترل آفات از طریق تأثیر بر برهمکنش‌های سه‌گانه با تغییر عناصر غذایی بافت گیاه و تغییر حساسیت گیاه به آفات بر عملکرد دشمن طبیعی نیز موثر باشد. (Lu *et al*., 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد که انجام عملیات کشاورزی و استفاده از کودها از جمله کودهای ریزمغذی می‌تواند روی ویژگی‌های جمعیتی آفات و دشمنان طبیعی آن‌ها موثر باشد (Mirab-balou and Mottaghinia *et al*., 2015; Alizamani, 2022). از طرفی افزایش میزان تغذیه، تراکم و استقرار بهتر دشمنان طبیعی و همچنین میزان پارازیتیسم بالاتر پارازیتوئیدها در اثر استعمال کودها گزارش شده است (Mottaghinia *et al*., 2015).

محلول‌پاشی یا تغذیه برگی عناصر به عنوان یکی از روش‌های مناسب، موثر و اقتصادی مصرف کودها با کاهش خطرات زیست محیطی است، که در بر طرف کردن نیاز غذایی گیاهان به عناصر غذایی کم مصرف مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین تغذیه برگی در مقایسه با کاربرد خاکی، مواد غذایی مورد نیاز گیاهان را سریع‌تر، با کارایی بالاتر و هزینه کمتر فراهم می‌کند (Yassen *et al*., 2010). علاوه بر عناصر غذایی اولیه یعنی نیتروژن، فسفر و پتاسیم، عناصر ریز مغذی مانند آهن، روی، مس و منگنز نیز برای رشد و نمو مطلوب گیاهان ضروری می‌باشند. کودهای ریزمغذی آهن، روی، مس و منگنز از اجزای اصلی در ساختار آنزیم‌ها و پروتئین‌ها بوده و در فرآیندهای مختلف متابولیکی و فیزیولوژی گیاهان، فعال شدن آنزیم‌ها، سنتز ماکرومولکول‌ها، هورمون‌های رشد و فتوسنتز نقش مهمی را ایفاء می‌کنند (Hansch and Mendel, 2009).

در حقیقت کمیت و کیفیت غذا همانند دیگر عوامل نظیر دما، رطوبت و دوره‌ی نوری رشد، عملکرد و روند فعالیت‌های فیزیولوژیکی حشرات را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Jansen and Groot, 2004; Musa and Ren, 2005). لذا مطالعه فرآیندهای هضم در حشرات به عنوان یک کلید رابط بین حشرات و محیط آن‌ها می‌تواند منجر به توسعه روش‌های کنترل براساس فیزیولوژی شود. بنابراین، دانش گسترده در مورد سیستم گوارش، فرآیندهای هضم و جذب و سازگاری آن‌ها با رژیم غذایی حشرات برای بهبود روش‌های کنترل مبتنی بر هدف دستگاه گوارش و برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات الزامی است (Bigham and Hosseininaveh, 2010;Nation, 2008). حشرات به مجموعه‌ای از آنزیم‌های گوارشی از جمله کربوهیدرازها، و پروتئازها برای تجزیه مواد غذایی خورده شده نیاز دارند. طبیعت ماده‌ی غذایی و هرگونه تغییر در غذای مصرفی از جمله گیاهان میزبان یا رژیم غذایی و مواد شیمیایی بلعیده شده می‌تواند فعالیت این آنزیم‌ها را تغییر دهد (Silva *et* Mendiola-Olaya *et al*., 2000; *al*., 2009). آنزیم‌های گوارشی از گروه هیدرولازها هستند و با اضافه شدن مولکول آب پیوندهای شیمیایی آن‌ها شکسته می‌شوند. کربوهیدرازها آنزیم‌هایی هستند که در هضم کربوهیدرات‌ها نقش دارند و نقش اصلی آن‌ها شکستن پیوندهای گلیکوزیدی است که سبب اتصال منوساکاریدها به همدیگر می‌شوند. از جمله آنزیم‌های کربوهیدرازی، آمیلاز گوارشی حشرات از نوع آلفا- آمیلاز است که پیوندهای گلیکوزیدی آلفا- ۱ و ۴ واحدهای گلوکز در پلی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کند (Franco *et al*., 2000). پروتئازها آنزیم‌های هضم‌کننده پروتئین‌ها بوده و سبب شکسته‌شدن پیوندهای پپتیدی بین اسیدهای آمینه می‌شوند. پروتئازها را براساس سازوکار کاتالیز به دو گروه اندوپروتئاز (اندوپپتیدازها) و اگزوپروتئاز (اگزوپپتیدازها) تقسیم می‌کنند (Pascual-Ruiz *et al*., 2009). اندوپپتیدازها پیوندهای پپتیدی بین اسیدهای آمینه را از وسط زنجیره پروتئینی و اگزوپپتیدازها پیوندهای پپتیدی اسیدهای آمینه را از دو قسمت انتهایی زنجیره‌پپتیدی می‌شکنند. گروهی از اگزوپپتیدازها که موجب آزاد شدن اسیدآمینه از انتهای آمینوی اسیدآمینه می‌شوند را آمینوپپتیداز و گروهی که سبب آزادشدن اسیدآمینه از انتهای کربوکسیلی می‌شوند را کربوکسی‌پپتیداز می‌نامند (Nation, 2008).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که طعمه‌های مختلف، پروتئین‌های موجود در طعمه و کمیت و کیفیت مواد مغذی می‌توانند فعالیت آنزیم‌های گوارشی شکارگرها را تحت تأثیر قرار دهند (Pascual-Ruiz *et al*., 2009; Habibi *et al*., 2001; Sorkhabi-Abdolmaleki *et al*., 2013). مطالعات پیشین در

ارتباط با تأثیر کودهای ریزمغذی بر برهم‌کنش فلفل‌دلمه و شته سبز هلو نشان می‌دهد که این عناصر با بهبود ویژگی‌های مرفولوژیک (نظیر ارتفاع، وزن تر و خشک ساقه، ریشه، برگ و افزایش سطح برگ)، فیزیولوژیک (مانند کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) و آنتی‌اکسیدان‌های گیاه میزبان و همچنین با القای مقاومت آنتی‌بیوز از طریق افزایش سطح ترکیبات ثانویه دفاعی (مانند فنول و فلاونوئید) و بروز استرس اکسیداتیو در بدن شته سبز هلو منجر به اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژی و کاهش پارامترهای جدول زندگی شته سبز هلو شده است (Alizamani *et al*., Alizamani *et al*., 2020 ; 2021a; Alizamani *et al*., 2021b). بعلاوه بررسی‌ها نشان می‌دهد که فعالیت نسبی پروتئازها در روده‌ی سن *Podisus maculiventris* (Say) به طعمه‌ی تغذیه شده بستگی دارد و سن *P. maculiventris* ممکن است از آنزیم‌های پروتئولیتیک طعمه برای هضم غذا استفاده کند و نقش مهم آنزیم‌های گوارشی طعمه در فرآیند هضم شکارگر بیان شده است (Pascual-Ruiz *et al*., 2009). ارتباط بین آنزیم‌های گوارشی سن *Andrallus spinidens* (Fabricius) و ترکیب غذایی طعمه‌ها، نشان‌دهنده‌ی طبیعت سازگار پروفایل آنزیمی عنوان شده که می‌تواند در یافتن طعمه‌های مناسب جهت کنترل موثر آفات و تولید انبوه عوامل کنترل بیولوژیک مناسب و موثر باشد (Sorkhabi-Abdolmaleki *et al*., 2013). بر طبق گزارش والکر و همکاران (Thompson, 1999) گروه سیستئین پروتئازها (کاتپسین‌های B و L)، آنزیم‌های غالب در معده لاروها و حشرات بالغ کفشدوزک دو نقطه‌ای، *Adalia bipunctata* (L.)، می‌باشند. نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که فرآیند هضم کفشدوزک دو نقطه‌ای ممکن است از طریق مهارکننده‌های سیستئین پروتئیناز بیان شده در گیاهان تراریخته برای کنترل آفات، از طریق برهم‌کنش سه سطحی بین کفشدوزک‌ها، شته‌ها و گیاهان زراعی ایجاد می‌شود، تحت تأثیر قرار گیرد. با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تاثیر عناصر ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی دشمنان طبیعی انجام نشده است، لذا، هدف مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی تغییرات آنزیم‌های گوارشی (آلفاآمیلاز، پروتئاز کل و پروتئازهای اختصاصی) لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک *H. variegata* تغذیه شده با *M. persicae* پرورش‌یافته روی تیمارهای مختلف ریزمغذی است. بنابراین، نتایج حاصل از این مطالعه، تأثیر تیمار کردن گیاهان میزبان با کودهای ریزمغذی بر عملکرد دشمنان طبیعی از طریق تغییر در برهم‌کنش‌های غذایی گیاه- گیاهخوار و دشمن طبیعی نشان می‌دهد که می‌تواند در مدیریت آفت موثر باشد.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان اجرای پژوهش

آزمایش‌ها در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و چهار تکرار در سال ۱۳۹۹ انجام شد.

تهیه بذر و پرورش گیاهان میزبان

در این پژوهش، بذر فلفل دلمه‌ای رقم کالیفرنیا واندر از شرکت گلپاد سپاهان شهر استان اصفهان تهیه و استفاده شد. به منظور تسهیل در رشد و جوانه‌زنی، بذور گیاه در داخل دستمال کاغذی مرطوب در ظروف پتری شیشه‌ای (به قطر ۹ و ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر) به مدت ۱۰ روز خیسانده شد. سپس هر بذر در داخل گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ۱۵ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر، حاوی خاک و ماسه به نسبت ۲ به ۱ در گلخانه تحت شرایط دمای ۵±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره نوری طبیعی کاشته شد. آبیاری گیاهان در فواصل زمانی معین براساس نیاز آبی آن‌ها (هر ۲ تا ۳ روز یک بار) انجام شد.

تهیه تیمارهای مورد مطالعه

کودهای ریزمغذی بیومین منگنز، بیومین مس و بیومین روی از شرکت بازارگان کالا تهران و ریزمغذی آهن (آلفاآهن) از شرکت مزرعه فراز آسمان تهران تهیه شد. تیمارهای مورد مطالعه در این پژوهش شامل محلول‌پاشی گیاهان در مرحله‌ی رشدی شش تا هشت برگی به ترتیب با (۱) منگنز، (۲) مس و (۳) روی به میزان یک میلی‌لیتر در یک لیتر آب، ۴- گیاه فلفل دلمه‌ای پرورش‌یافته در خاک زراعی معمولی به علاوه محلول‌پاشی گیاه در مرحله شش تا هشت برگی با ریزمغذی آلفا آهن به میزان ۱/۷ گرم در یک لیتر آب و ۵- گیاه فلفل دلمه‌ای پرورش یافته در خاک زراعی معمولی (بدون کود-دهی) به عنوان تیمار شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

پرورش حشرات

جمعیت اولیه شته سبز هلو از کلنی آزمایشگاهی دانشگاه محقق اردبیلی اردبیل تهیه شد. سپس شته‌های سبز هلو بالغ (۵۰ شته بالغ) را با استفاده از قلم‌موی نازک روی بوته‌های فلفل دلمه در مرحله رشدی هشت تا ۱۰ برگی منتقل کرده و در شرایط گلخانه پرورش داده شدند. جهت حفظ کلنی و جلوگیری از پارازیته و شکار شدن شته‌ها، گیاهان حاوی کلنی شته با استفاده از قفس‌های ساخته شده از چوب و توری پارچه‌ای (به ابعاد ۱/۵×۲/۵ متر)محصور شدند. جمعیت اولیه کفشدوزک *H. variegata* از مزارع یونجه استان ایلام تهیه شد. سپس برای پرورش کلنی، کفشدوزک‌های مربوطه را به صورت جفت‌های نر و ماده در داخل ظروف پتری به قطر ۹ و عمق یک سانتی‌متر دارای کاغذ صافی مرطوب در کف آن با هم نگه داشته

شدند. برای ایجاد سیستم تهویه و جلوگیری از افزایش رطوبت درپوش پتری‌ها را به اندازه سه سانتی‌متر سوراخ کرده و با توری ریز پوشانده شد. ظروف پرورش حشرات کامل و برگ‌های خشکیده به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی‌های میکروبی روزانه تعویض شدند (Omkar James, 2004) و کفشدوزک‌ها در ظروف جدید قرار داده شدند. تغذیه‌ی کفشدوزک‌ها به صورت روزانه با شته سبز هلو انجام شده و برای تأمین رطوبت داخل ظروف پتری از یک گلوله پنبه مرطوب استفاده شد. روزانه تخم‌های گذاشته شده از محیط پرورش و برگ گیاهان میزبان با استفاده از قلم موی نازک جدا کرده و به ظروف پتری دیگر برای تفریخ و پرورش کلنی کفشدوزک انتقال داده شدند. پس از تفریخ تخم‌ها برای تغذیه‌ی لاروها، برگ‌های آلوده به شته سبز هلو (۶۰ شته بالغ) به پتری‌ها اضافه شد. پتری‌های حاوی لارو روزانه بازدید و برگ آلوده به شته به منظور تغذیه در اختیار شکارگر قرار گرفت. قبل از انجام آزمایش‌های سنجش آنزیمی و به منظور به دست آورن تعداد کافی از لاروهای سن سوم و چهارم، کفشدوزک *H. variegata* را در تیمارهای مورد نظر در داخل ظروف پتری محتوی برگ آلوده به شته سبز هلو پرورش داده و از لاروهای سن سوم و چهارم این نسل پرورش یافته روی تیمارهای ریزمغذی برای انجام آزمایش و به دست آوردن منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها

بررسی تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک *H. variegata* در تغذیه از *M. persicae* روی فلفل دلمه بر طبق روش (Ferreira and Terra, 1983) صورت گرفت. برای این منظور ابتدا به ترتیب تعداد ۲۰ لارو از سنین سوم و چهارم کفشدوزک *H. variegata* به صورت تصادفی از هر تیمار مورد نظر جمع‌آوری شد. کل بدن لارو در آب مقطر هموژنایز شد. سپس نمونه‌های هموژنایز شده با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و روشناور حاصل از آن به عنوان منبع آنزیمی برای سنجش فعالیت‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز کل

اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز کل با استفاده از ۴۰ میکرولیتر سوبسترای آزوکازئین (۲ درصد) براساس روش (Elpidina *et al.*, 2001) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۴۰ میکرولیتر سوبسترا، ۸۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (۲۰ میلی‌مولار اسیدیته‌ی ۷) و ۲۰ میکرولیتر نمونه بود. سپس بعد از ۶۰ دقیقه انکوبه‌شدن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۸۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید (۳۰ درصد) اضافه شده و نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت حجم مساوی از هیدروکسید سدیم (۲ مولار) اضافه شده و جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر درطول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فعالیت اندوپپتیدازها (سرین پروتئازها)

سنجش فعالیت سرین‌پروتئازها شامل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز بر طبق روش (Rahbe *et al.*, 2003) به ترتیب با استفاده از یک میلی‌مولار سدیم- بنزویل- دی ال- آرژنین- پی- نیتروآنالید[1] (به عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین)، ان- سوکسینیل- آلانین- آلانین- پرولین- فنیل آلانین- پی- نیتروآنالید[2] (به عنوان سوبسترای اختصاصی کیموتریپسین) و ان- سوکسینیل- آلانین- آلانین- آلانین- پی- نیتروآنالید[3] به عنوان سوبسترای اختصاصی الاستاز انجام شد. سپس برای اندازه‌گیری فعالیت هر یک از سرین پروتئازها ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای ویژه هر آنزیم را به صورت مجزا با ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (۲۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸) و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی حشرات (لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت واکنش با اضافه‌کردن ۱۰۰ میکرولیتر اسید تری‌کلرواستیک ۳۰ درصد متوقف شد و میزان جذب آنزیمی در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد.

اندازه‌گیری فعالیت اگزوپپتیدازها

براساس روش (Rahbe *et al.*, 2003) سنجش فعالیت دو آنزیم اگزوپپتیداز یعنی آمینوپپتیداز و کربوکسی‌پپتیداز به ترتیب با استفاده از سوبسترای اختصاصی هیپوریل- ال- آرژنین[4] و هیپوریل- ال- فنیل- آلانین[5] با غلظت یک میلی‌مولار انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای آنزیمی ذکر شده،۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (۲۰ میلی مولار با اسیدیته ۸) و ۱۰ میکرولیتر عصاره‌ی حشرات بود. سپس واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از آن با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۳۰ درصد واکنش متوقف و جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد.

1- Na-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide.
2- N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide.
3- N-succinyl-alanine-alanine-alanine-p-nitroanilide
4- Hippuryl-L-Arginine
5- Hippuryl-L-Phenilalanine

اندازه‌گیری فعالیت آلفا- آمیلاز

سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز در لاروهای سنین سوم، چهارم کفشدوزک *H. variegata* براساس روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید (Bernfeld, 1955) مورد بررسی قرار گرفت. برای این آزمایش، ۸۰ میکرولیتر بافر یونیورسال با اسیدیته ۷، ۴۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد به عنوان سوبسترا و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک در هر یک از تیمارها به طور جداگانه، در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیترو سالیسیک‌اسید به مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت در نهایت، میزان جذب نور به وسیله الایزاریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov– Smironov قبل از تجزیه داده‌ها بررسی شد. سپس تحلیل نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای دشمن طبیعی با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) در نرم‌افزار آماری MINITAB نسخه ۱۶ صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (HSD) انجام شد.

نتایج

بررسی تاثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو سن سوم کفشدوزک *H. variegata*

در فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سن سوم کفشدوزک *H. variegata* در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی گیاهان تیمار شده با کودهای ریزمغذی تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین فعالیت پروتئاز کل در لاروهای سن سوم در تیمارهای منگنز و آهن (به ترتیب ۰/۵۸۳ و ۰/۵۷۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن (۰/۰۸۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) در کفشدوزک‌های تغذیه شده از شته‌های پرورش‌یافته در گیاهان شاهد ثبت شد (جدول ۱، $F= ۳۰/۹۲$; $df= ۴, ۱۹$; $p<۰/۰۵$). تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در لاروهای سن سوم کفشدوزک نیز معنی‌دار بود ($F= ۲۹/۷۶$; $df= ۴, ۱۹$; $p<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت آلفاآمیلاز در تیمار آهن (۲۵/۲۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت شد و فعالیت آن در بین سایر تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۱- فعالیت پروتئاز کل و آلفاآمیلاز لاروهای سن سوم کفشدوزک *Hippodamia variegata* تغذیه‌شده از *Myzus persicae* پرورش‌یافته روی فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 1- Total protease and α-amylase activity of third instar larvae of *Hippodamia variegata*, fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers.

تیمار Treatment	پروتئاز کل (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) General Protease (U/mg protein)	آلفاآمیلاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) α-amylase (U/mg protein)
شاهد Control	0.0835±0.0103^{c}	10.28±1.17^{b}
منگنز Mn	0.583±0.0645^{a}	9.750±0.700^{b}
آهن Fe	0.574±0.0207^{a}	25.20±1.51^{a}
مس Cu	0.311±0.0279^{b}	7.69±2.17^{b}
روی Zn	0.353±0.0386^{b}	6.250±0.996^{b}

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد

Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

همچنین بیشترین فعالیت تریپسین لاروهای سن سوم کفشدوزک در تغذیه از شته‌های پرورش یافته در تیمارهای منگنز (۱۹/۲۹۶) و آهن (۱۸/۴۲۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین مقدار آن در شاهد (۱۳/۶۴۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به دست آمد (جدول ۲)، ($F= ۳۱/۲۷$; $df= ۴, ۱۹$; $p<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت کیموتریپسین لاروهای سن سوم کفشدوزک در تیمار منگنز (۱۵/۵۱۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی گیاهان شاهد (۷/۳۵۳) و تیمار شده با مس (۸/۵۴۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده گردید ($F= ۶۸/۳۶$; $df= ۴, ۱۹$; $p<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین فعالیت الاستاز لاروهای سن سوم

کفشدوزک به ترتیب در تغذیه آن‌ها از شته‌های موجود در تیمارهای آهن (۱۸/۹۵۲) و شاهد (۹/۱۳۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت شد (جدول ۲، $F= ۳۰/۸۲; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$).

جدول ۲- فعالیت پروتئازهای اختصاصی لاروهای سن سوم کفشدوزک *Hippodamia variegata*، تغذیه‌شده از *Myzus persicae* پرورش‌یافته روی فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 2- Specific proteases activity of third instar larvae of *Hippodamia variegata* fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers

تیمار Treatment	(اندوپپتیداز واحد بر میلی‌گرم پروتئین) (Endo-peptidases U/mg protein)			(اگزوپپتیداز واحد بر میلی‌گرم پروتئین) (Exo-peptidases U/mg protein)	
	تریپسین Trypsin	کیموتریپسین Chymotrypsin	الاستاز Elastase	آمینوپپتیداز Amino- peptidases	کربوکسی‌پپتیداز Carboxy- peptidases
شاهد Control	13.649±0.683^{c}	7.353±0.301^{c}	9.139±0.482^{c}	2.139±0.373^{c}	2.665±0.489^{c}
منگنز Mn	19.296±0.660^{a}	15.518±0.400^{a}	12.720±0.524^{b}	8.95±1.19^{a}	7.536±0.381^{a}
آهن Fe	18.426±0.168^{a}	12.089±0.239^{b}	18.952±0.626^{a}	5.752±0.409^{b}	4.790±0.149^{b}
مس Cu	14.407±0.170^{bc}	8.543±0.566^{c}	13.320±0.964^{b}	3.118±0.258^{bc}	5.054±0.197^{b}
روی Zn	16.168±0.0507^{b}	10.481±0.348^{b}	12.548±0.454^{b}	4.535±0.514^{bc}	4.152±0.191^{b}

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد

Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

تأثیر تیمار کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های آمینو پپتیداز ($F= ۱۷/۱۱; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$) و کربوکسی پپتیداز ($F= ۳۲/۴۶; df= ۴, ۱۹;$) نیز معنی دار بود. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم‌های آمینوپپتیداز کربوکسی پپتیداز لاروهای سن سوم کفشدوزک به ترتیب در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی گیاهان تیمار شده با منگنز (۸/۹۵ و ۷/۵۳۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و شاهد (۲/۱۳۹ و ۲/۶۶۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت شد (جدول ۲).

بررسی تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو سن چهارم کفشدوزک *H. variegata*

بیشترین فعالیت پروتئاز کل لاروهای سن چهارم در تیمار آهن (۰/۱۸۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن در تغذیه کفشدوزک‌های تغذیه شده از شته‌های پرورش یافته روی شاهد و تیمار مس (۰/۰۳۶ و ۰/۰۵۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت شد ($F= ۵۴/۱۶; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت آلفاآمیلاز لاروهای سن چهارم کفشدوزک شکارگر در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی تیمارهای مس (۱۷/۶۴) و آهن (۱۵/۰۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت شد و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار شاهد (۹/۱۶۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به دست آمد ($F= ۱۳/۰۶; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم تریپسین لاروهای سن چهارم کفشدوزک به ترتیب در تغذیه از شته‌های پرورش‌یافته روی گیاهان تیمار شده با آهن (۶/۸۹۳) و شاهد (۳/۹۴۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت شد ($F= ۱۳/۹۶; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$). براساس نتایج بیشترین فعالیت آنزیم کیموتریپسین لاروهای سن چهارم در تیمار آهن (۱۰/۳۹۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی تیمارهای مس و شاهد (۶/۶۵۵ و ۶/۷۶۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به دست آمد ($F= ۱۲/۹۰; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$) (جدول ۴).

لاروهای سن چهارم کفشدوزک در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی تیمارهای روی (۲/۲۵۱) و آهن (۲/۴۸۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) بیشترین فعالیت آنزیم الاستاز را نشان دادند و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در شاهد (۱/۱۰۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت گردید ($F= ۴/۹۱; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین فعالیت آمینوپپتیداز لاروهای سن چهارم کفشدوزک به ترتیب در تیمارهای آهن (۲/۳۱۷) و شاهد (۰/۸۷۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد ($F= ۱۶/۳۴; df= ۴, ۱۹; p<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت کربوکسی‌پپتیداز لاروهای سن چهارم کفشدوزک در تیمارهای مس (۳/۸۲۵)، منگنز (۳/۷۹۳) و آهن (۳/۷۹۱ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد و کمترین فعالیت آن در تغذیه از شته‌های پرورش‌یافته روی تیمار شاهد (۲/۰۱۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) ثبت گردید

($F= ۶/۰۶$; $df= ۴, ۱۹$; $p<۰/۰۵$) (جدول ۴).

نتایج حاصل از این پژوهش (تأثیر تمامی تیمارهای مورد بررسی بر تک تک فعالیت‌های آنزیمی هر دو سن لاروی کفشدوزک *H. variegata*) به صورت یک نمودار ستونی در انتها نمایش داده شده است (شکل ۱).

جدول ۳- فعالیت پروتئاز کل و آلفاآمیلاز لاروهای سن چهارم کفشدوزک *Hippodamia variegata* تغذیه‌شده از *Myzus persicae* پرورش‌یافته روی فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 3- Total protease and α-amylase activity of fourth instar larvae of *Hippodamia variegata* fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers

تیمار Treatment	پروتئاز کل (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) General Protease (U/mg protein)	آلفاآمیلاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) α-amylase (U/mg protein)
شاهد Control	0.0360±0.0071^{c}	9.160±0.165^{c}
منگنز Mn	0.1386±0.0033^{b}	10.576±0.384^{bc}
آهن Fe	0.1835±0.0096^{a}	15.04±1.42^{a}
مس Cu	0.0593±0.0127^{c}	17.64±1.56^{a}
روی Zn	0.1067±0.0031^{b}	14.765±0.156^{ab}

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد

Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

جدول ۴- فعالیت پروتئازهای اختصاصی لاروهای سن چهارم کفشدوزک *Hippodamia variegata*، تغذیه‌شده از *Myzus persicae* پرورش‌یافته روی فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 4- Specific proteases activity of third instar larvae of *Hippodamia variegata* fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers

تیمار Treatment	(اندوپپتیداز واحد بر میلی‌گرم پروتئین) (Endo-peptidases U/mg protein)			(اگزوپپتیداز واحد بر میلی‌گرم پروتئین) (Exo-peptidases U/mg protein)	
	تریپسین Trypsin	کیموتریپسین Chymotrypsin	الاستاز Elastase	آمینوپپتیداز Amino- peptidases	کربوکسی‌پپتیداز Carboxy-peptidases
شاهد Control	3.947±0.356^{c}	6.763±0.270^{c}	1.106±0.118^{b}	0.876±0.124^{c}	2.014±0.191^{b}
منگنز Mn	5.631±0.198^{ab}	7.906±0.224^{bc}	1.957±0.158^{ab}	2.055±0.157^{ab}	3.793±0.526^{a}
آهن Fe	6.893±0.515^{a}	10.396±0.634^{a}	2.486±0.148^{a}	2.317±0.137^{a}	3.791±0.249^{a}
مس Cu	5.285±0.147^{bc}	6.655±0.548^{c}	1.901±0.359^{ab}	1.669±0.061^{b}	3.825±0.243^{a}
روی Zn	6.543±0.175^{ab}	8.918±0.360^{ab}	2.251±0.297^{a}	1.827±0.169^{ab}	3.059±0.276^{ab}

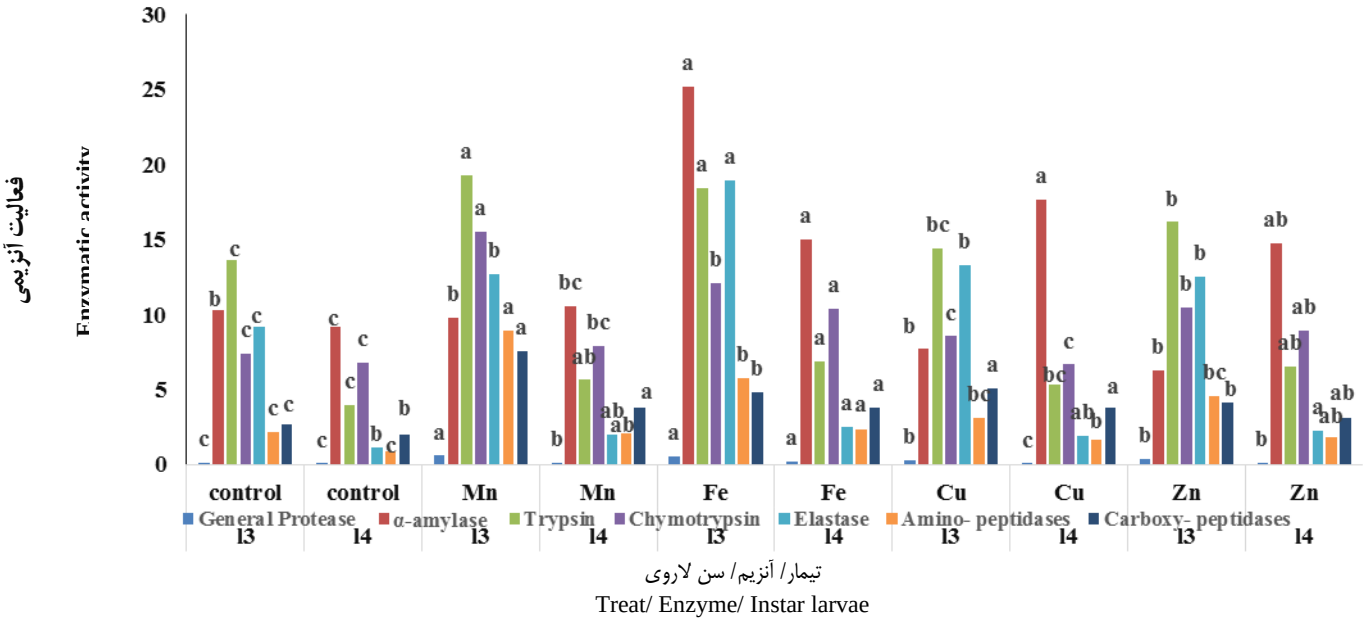
حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد

Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

بحث

روابط و اثرات متقابل سه سطح تغذیه‌ی اصلی زیست بوم‌های کشاورزی یعنی گیاهان- گیاه‌خواران و دشمنان طبیعی بسیار پیچیده می‌باشد. گیاهان میزبان به عنوان سطح اول تغذیه (و یکی از مهم‌ترین عوامل موثر از پایین به بالا[1]) از طریق خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی پارامترهای زیستی و فیزیولوژی حشره گیاه‌خوار و دشمن طبیعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Kalushkov and Hodek, 2004).

1- Bottom-up



شکل ۱- میانگین تأثیر تمامی تیمارهای مورد بررسی بر تک تک فعالیت‌های آنزیمی هر دو سن لاروی کفشدوزک *H. variegata*

ستون‌های با حروف یکسان از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند ($P<۰/۰۵$).

Figure 1- The mean effect of all treatments investigated on each enzymatic activity in both instar larvae of *H. variegata*

There is no statistically significantly difference between columns with the same letters (p≤0.05).

از سوی دیگر حشرات‌گیاه‌خوار (از فاکتورهای از بالا به پایین[1]) که از گیاهان میزبان تغذیه می‌کنند، به نوبه‌ی خود به عنوان منابع غذایی برای دشمنان طبیعی می‌باشند، در نتیجه گونه‌هایی که در سطوح غذایی بالا قرار دارند به طور غیر مستقیم تحت تأثیر برهم-کنش بین گیاه و گیاه‌خوار قرار می‌گیرند (Price *et al.*, 1980). از طرفی یکی از عوامل اساسی در مدیریت تلفیقی آفات، مطالعه آنزیم-های گوارشی آفات و دشمنان طبیعی و نیز تعیین ویژگی‌های آن‌ها است، زیرا حشرات گیاه‌خوار و دشمنان طبیعی به منظور تغذیه از گیاهان میزبان و طعمه به آنزیم‌های گوارشی خود وابسته می‌باشند (Alizamani *et al.*, 2021a). از سوی دیگر بررسی‌ها نشان می‌دهد که انجام عملیات کشاورزی و کوددهی گیاهان میزبان (از جمله استعمال کودهای ریزمغذی) سازگاری اکولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه‌خواران، دشمنان طبیعی و پارازیتوئیدها را با تغییر در محتوای منابع و رژیم غذایی مورد استفاده طعمه و دشمنان طبیعی از طریق بهبود کمیت و کیفیت مواد غذایی مورد نیاز رشد گیاهان، تغییر عناصر غذایی بافت گیاهی و تغییر حساسیت گیاه به آفات تحت تاثیر قرار می‌دهند (Mardani-Talaee *et al.*, 2016; Schädler *et al.*, 2010; Alizamani *et al.*, 2021a). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک *H. variegata* در تغذیه از شته سبز هلو پرورش‌یافته روی گیاه فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی مختلف، تحت تأثیر قرار گرفته است.

پروتئین‌ها به عنوان یکی از اجزای بیوشیمیایی مهم، نقش حیاتی در سیستم‌های فیزیولوژیکی حشرات از طریق دخالت در فعالیت‌های آنزیم‌ها، ترمیم بافت، تولیدمثل و ... دارند.

هرگونه اختلال در استفاده از پروتئین رژیم غذایی، موفقیت حشرات را در دو جنبه فیزیولوژیکی و اکولوژیکی تغییر می‌دهد (Gatehouse *et al.*, 1999). کمیت و کیفیت پروتئین‌های موجود در طعمه، نوع و فعالیت آنزیم‌های گوارشی شکارگرها را تغییر می‌دهد (Felton, 1996; Pascual-Broadway and Duffey, 1988; Ruiz *et al.*, 2009). نتایج فعالیت پروتئاز کل و پروتئازهای اختصاصی شامل تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، آمینو و کربوکسی‌پپتیداز لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک نشان می‌دهدکه فعالیت این آنزیم‌ها در تغذیه از شته سبز هلو در تیمارهای ریزمغذی به ویژه ریزمغذی‌های آهن و منگنز در مقایسه با شاهد بیشتر بوده است. افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی کفشدوزک شکارگر در تیمارهای ریزمغذی در مقایسه با شاهد می‌تواند به مقدار پروتئین و ترکیبات شیمیایی بدن طعمه مرتبط باشد. کمیت و کیفیت آنزیم‌های گوارشی حشرات با تغییر در نوع پروتئین رژیم غذایی تغییر می‌کند (Broadway and Duffey, 1988). کیفیت و ارزش غذایی

1- Top-down

طعمه در فیزیولوژی گوارشی و عملکرد حشرات شکارگر نقش موثری دارد (De Clercq *et al.*, 1998).

در حقیقت در سیستم‌های دارای سه سطح غذایی، پویایی جمعیت مصرف‌کننده سطح میانی (آفت) از طریق فرآیندها و تأثیرات سطح غذایی پایین‌تر (منبع غذایی) و سطح غذایی بالاتر (دشمن طبیعی) و تعاملات آن‌ها تنظیم می‌شود. نتایج بررسی تأثیر کوددهی عناصر ریزمغذی در گیاه فلفل دلمه بر رشد جمعیت پشه شته‌خوار *Aphidoletes aphidimyza* Rondani نشان می‌دهد که عناصر ریزمغذی با بهبود کیفیت گیاهان میزبان حشرات گیاه‌خوار در سطح اول تغذیه و از طریق برهم‌کنش‌های غذایی (گیاه- گیاه‌خوار –دشمن طبیعی) تأثیر مثبتی بر پارامترهای جدول زندگی و عملکرد شکارگر *A. aphidimyza* در سطح سوم تغذیه دارد (Mirab-balou and Alizamani, 2022). همچنین نتایج مطالعات پیشین ما نشان می‌دهد کودهای ریزمغذی که از اجزای اصلی در ساختار آنزیم‌ها و پروتئین‌ها می‌باشند، با تأثیر مثبت بر فرآیندهای رشد و نمو گیاه میزبان از طریق بهبود خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی و با تولید فنول و ترکیبات ضد تغذیه، ضمن نامساعد کردن بافت گیاهی برای تغذیه آفت منجر به القاء مقاومت آنتی‌بیوز، ایجاد سمیت و اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژی و کاهش پارامترهای جدول زندگی شته سبز هلو می‌شوند (Alizamani *et al.*, 2020 ; Alizamani *et al.*, 2021a; Alizamani *et al.*, 2021b). از این رو،گیاهان میزبان روی دفاع مستقیم (به صورت شیمیایی و مورفولوژیکی) و غیرمستقیم (از طریق دشمنان طبیعی) علیه گیاه-خواران موثر می‌باشند و بدین وسیله بر تعاملات چندگانه تأثیر می-گذارند. در واقع، تغییر در کیفیت گیاه میزبان به طور چشمگیری کارایی گیاه‌خوار و دشمن طبیعی گیاه‌خوار را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Thompson, 1999).

بررسی‌ها نشان‌دهنده نقش مهم طعمه و ترکیب غذایی آن در فعالیت نسبی پروتئازها و فرآیند هضم شکارگرهای *P. maculiventris* و *A. spinidens* است (Pascual-Ruiz et al., Sorkhabi-Abdolmaleki *et al.*, 20132009 ;). همچنین، تأثیر برهم‌کنش‌های سه گانه گیاه-گیاه‌خوار و دشمن طبیعی در گیاهان تراریخته بر فعالیت گوارشی لاروها و حشرات بالغ کفشدوزک *A. bipunctata* گزارش شده است (Walker *et al.*, 1998). لذا با توجه به افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، می‌توان گفت فرآیند هضم و جذب مواد غذایی در لاروهای کفشدوزک *H. variegata* به علت عدم وجود مهارکننده‌ها و بازدارنده‌های غذایی و آنزیمی به صورت موثر صورت گرفته است که با انتقال مواد غذایی از همولنف و دستگاه گوارش به اجسام چربی سطح ماکرومولکول‌های ذخیره‌ای را افزایش می‌دهد و متعاقباً می‌تواند منجر به بهبود کارآیی شکارگر در کنترل موثر طعمه شود.

کربوهیدرات‌ها یکی از ماکرومولکول‌های ضروری هستند که منبع اصلی انرژی بیشتر حشرات را تشکیل می‌دهند که نشوونما، باروری و دیگر فعالیت‌های حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Nation, 2008). آلفا- آمیلاز آنزیمی است که پیوندهای آلفا ۱ و ۴ دی گلوکان را در گلیکوژن، نشاسته و سایر کربوهیدرات‌ها را کاتالیز می‌کند (Franco *et al.*, 2000). چنین به نظر می‌رسد که تغذیه لاروهای کفشدوزک از شته‌های پرورش یافته در تیمارهای ریزمغذی به ویژه ریزمغذی آهن و مس دارای مقدار نشاسته بیشتری بوده که منجر به افزایش فعالیت آلفاآمیلاز شده است. افزایش فعالیت آلفاآمیلاز در تیمارهای ریزمغذی به دلیل تغییر در مواد غذایی بافت گیاه میزبان و عدم وجود مهارکننده‌های آلفاآمیلاز در رژیم غذایی می‌تواند نشان‌دهنده کارآیی هضم کربوهیدرات و ترکیبات شیمیایی در لاروهای کفشدوزک *H. variegata* باشد (Mardani-Talaee *et al.*, 2016; Alizamani *et al.*, 2021a;).

هر گونه ترکیب، صرف نظر از منشا آن خواه مصنوعی یا طبیعی باشد، هنگام ورود به بدن حشرات بر سازوکارهای فیزیولوژیک آن تأثیر می‌گذارد و متعاقباً تأثیرات مثبت یا منفی آن بر رشد، بقاء، تولیدمثل و فعالیت‌های آنزیمی و فیزیولوژی آفات و دشمنان طبیعی آن‌ها نمایان می‌شود. در حقیقت می‌توان گفت ویژگی‌های آنزیمی حشرات با رژیم غذایی آن‌ها ارتباط داشته و تأثیر این آنزیم‌ها بر فعالیت حشرات آفت و دشمنان طبیعی می‌تواند نقش مهمی در مدیریت آفات و عملکرد دشمنان طبیعی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

بنابراین، به منظور کاهش اثرات زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی، کاربرد کودهای ریزمغذی به عنوان یک راهکار مدیریتی جدید در سیستم‌های کشاورزی، با تغییر در عناصر غذایی بافت گیاه و بهبود فرآیندهای رشد و نموی گیاهان، می‌تواند جنبه‌های مختلفی از ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژی سطوح غذایی بالاتر را در برهمکنش گیاه- گیاه‌خوار- دشمن طبیعی تحت تأثیر قرار دهد و در تولید و مدیریت محصولات و آفات گلخانه‌ای به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری گروه گیاه‌پزشکی و کارکنان دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان جهت همکاری برای انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1. Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani- Talaee, M., Zibaee, A., & Serrão, J.E. (2020). Direct interaction between micronutrients and bell pepper (*Capsicum annuum* L.), to affect fitness of *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Plant Protection Research* 60: 253-262. https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133319.
2. Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani- Talaee, M., Zibaee, A., & Serrao, J.E. (2021a). Micronutrient fertilizers affect the digestibility, intermediary metabolism, and oxidative stress in *Myzus persicae* (Sulzer). *Neotropical Entomoloy* 50: 940-947. https://doi.org/10.1007/s13744-021-00893-z.
3. Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani- Talaee, M., Zibaee, A., & Serrao, J.E. (2021b). Induce of antibiotic resistance in bell pepper, *Capsicum annuum* L, against green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), by micronutrient fertilizers. *Iranian Journal of Plant Protection Science* *52*(2): 73-85. https://doi.org/10.22059/IJPPS.2021.319609.1006969.
4. Bernfeld, P. (1955). Amylases, α and β. *Methods in Enzymology* 1: 149-158. https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5.
5. Bigham, M., & Hosseininaveh, V. (2010). Digestive proteolytic activity in the pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Asia Pacific Entomology* 13: 221-227. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.03.004.
6. Broadway, R.M., & Duffey, S.S. (1988)**.** The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 34: 1111-1117. https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90213-2.
7. De Clercq, P., Merlevede, F., & Tirry L. (1998). Unnatural prey and artificial diets for rearing *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control* 12: 137-142.
8. Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Gromenko, V.A., Rudenskaya, Y.A., Dunaevsky, Y.E., & Zhuzhikov, D.P. (2001). Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48: 206-216. https://doi.org/10.1002/arch.10000.
9. Felton, G.W. (1996). Nutritive quality of plant protein: sources of variation and insect herbivore responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32: 107-130.
10. Fenton, B., Kasprowicz, L., Malloch, G., & Pickup, J. (2010). Reproductive performance of asexual clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*, (Homoptera: Aphididae), colonising Scotland in relation to host plant and field ecology. *Bulletin of entomological research* 100: 451-460.
11. Ferreira, C., & Terra, W.R. (1983). Physical and kinetic properties of a plasma-membrane-bound *P*-Dglucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect *Rhynchosciara americana* larva. *Biochemical Journal* 213: 43-51.
12. Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch, C.Jr., Silva, C.P., & Grossi, de Sá M.F. (2000). Activity of wheat α-amylase inhibitors towards bruchid α-amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry* 267: 2166-2173. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000. 01199.x.
13. Gatehouse, A.M.R., Norton, E., Davidson, G.M., Babbe, S.M., & Newell, C.A. (1999). Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacenobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology* 45: 545-558.
14. Habibi, J., Backus, E.A., Coudron, T.A., & Brandt, S.L. (2001). Effect of different host substrates on hemipteran salivary protein profiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 369-375.
15. Hansch, R., & Mendel, R.R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12: 259-266. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006.
16. Jansen, B., & Groot, A. (2004). Occurrence, biological activity and synthesis of *drimane sesquiterpenoids*. *Natural Product Reports Article* 21: 449-477. https://doi.org/10.1039/b311170a.
17. Kalushkov, P., & Hodek, I. (2004). The effects of thirteen species of aphids on some life history parameters of the ladybird *Coccinella septempunctata*. *Biological Control* 50: 223-233.
18. Kontodimas, D.C., & Stathas, G.J. (2005). Phenology, fecundity and life table parameters of the predator *Hippodamia variegata* reared on *Dysaphis crataegi*. *Biocontrol* 50: 223-233. https://doi.org/10.1007/s10526-004-0455-7.
19. Lu, Z.X., Yu, X.P., Heong, K.L., & Hu, C. (2007). Effect of nitrogen fertilizer on herbivores and its stimulation to major insect pests in rice. *Rice Science* 14: 56-66. https://doi.org/10.1016/S1672-6308(07)60009-2.
20. Mardani-Talaee, M., Zibaee, A., Nouri-Ganblani, G., & Razmjou, J. (2016). Chemical and organic fertilizers affect physiological performance and antioxidant activities in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Invertebrate Survival Journal* 13: 122-133.
21. Mendiola-Olaya, E., Valencia-Jimenez, A., Valdés-Rodríguez, S., Delano-Frier, J., & Blanco-Labra, A. (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology* 126: 425-433.
22. Mirab-balou, M., & Alizamani, T. (2022). The effect of nutritional interaction between micronutrient fertilizers and *Capsicum annuum* L. on the population growth of *Aphidoletes aphidimyza* Rondani as predator of green peach

aphid. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 35(4): 481-494. https://doi.org/10.22067/JPP.2021.70745.1028.

23. Mottaghinia, L., Hassanpour, M., Razmjou, J., Chamani, E., & Hosseini, M. (2015). The effect of vermicompost on some biological characteristics of the melon aphid *Aphis gossypii* Glover and the predatory gall midge *Aphidoletes aphidimyza* Rondani on two cultivars of greenhouse cucumber. *Applied research in plant protection* 4(2): 56-70.
24. Musa, P.D., & Ren, S.X. (2005). Development and reproduction of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on three bean species. *Insect Science* 12: 25-30. https://doi.org/10.1111/j.1672-9609.2005.00004.x.
25. Nation, J.L. (2008). Insect physiology and biochemistry (2th ed.), London, CRC press, UK.
26. Obrycki, J.J., & Kring, T.J. (1998). Predaceous coccinellidae in biological control. *Annual Review of Entomology* l43: 295-321. https://doi.org/10.1146/annure.ento.43.1.295.
27. Omkar James, B.E. (2004). Influence of prey species on immature survival, development, predation and reproduction of *Coccinella transversalis* Fabricius (Col.: Coccinellidae). *Journal of Applied Entomology* 128: 150-157. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00826.x.
28. Özgökçe, M.S., Chi, H., Atlıhan, R., & Kara, H. (2018). Demography and population projection of *Myzus persicae* (Sulzer.) (Hemiptera: Aphididae) on five pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Phytoparasitica* 46:153-167. https://doi.org/10.1007/s12600-018-0651-0.
29. Pascual-Ruiz, S., Carrilo, L., Alvarez-Alfageme, F., Ruiz, M., Castanera, P., & Ortego, F. (2009). The effects of different prey regimes on the proteolytic digestion of nymphs of the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research* 99: 487-491. https://doi.org/10.1017/S0007485308006561.
30. Price, P.W., Bouton, C.E., Gross, P., McPheron, B.A., Thompson, J.N., & Weis, A. (1980). Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 11: 41-65. https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000353.
31. Rahbe, Y., Deraison, C., Bonade-Bottino, M., Girard, C., Nardon, C., & Jouanin, L. (2003). Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Science* 164: 441-450. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00405-8.
32. Schädler, M., Brandl, R., & Kempel, A. (2010). Host plant genotype determines bottom-up effects in an aphid-parasitoid-predator system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 135: 162-169. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00976.x.
33. Scholler, M., Prozell, S.A., Al-Kirshi, G., & Reichmuth, C. (1997). Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. *Journal of Stored Products Research* 33: 81-97.
34. Silva, L.B., Silva, W., Macedo, M.L.R., & Peres, M.T.L.P. (2009). Effects of croton urucurana extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 653-664.
35. Sorkhabi-Abdolmaleki, S., Zibaee, A., Hosseini, R., & Hoda, H. (2013). Effects of different prey regimes on activities of digestive enzymes in *Andrallus spinidens* (Hem.: Pentatomidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 33: 57-68. (In Persian with English abstract)
36. Thompson, S.N. (1999). Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology* 44: 561-592. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.561.
37. Walker, A.J., Ford, L., Majerus, M.E.N., Geoghegan, I.E., Birch, N., Gatehouse, J.A., & Gatehouse, A.M.R. (1998). Characterization of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 173-180.
38. Yassen, A., Abou El-Nour, E., & Shedeed S. (2010). Response of wheat to foliar Spray with urea and micronutrients. *Journal of American Science* 6: 14-22.