نامه انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹٤ – ۳۵(۳): ۷۷–۸۹

مطالعه سازوکارهای مقاومت و بیان پروتئین ژنوتیپ‌های غربال‌شده از ژرم‌پلاسم مزرعه‌ای یونجه نسبت به سرخرطومی برگ یونجه *Hypera postica* Gyll. (Col.: Curculionidae)

مهدی کاکایی[۱و۲]، حجت‌اله مظاهری‌لقب[۳*] و هدیه شرربار[٤و٥]

۱– گروه مهندسی کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ۲–گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، ۳– گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، ٤– گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، ٥– مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: Hojat.mazahery@yahoo.co.uk

Resistance mechanisms and protein expression of screening genotypes of alfalfa field germplasm to alfalfa weevil *(Hypera postica* Gyll*)* (Col ., Curculionidae)

M. Kakaei[1&2], H. Mazahery-Laghab[*3] and H. Shararbar[4&5]

1. Assistant Professor Agricultural Engineering Department of Payame noor University, Tehran, 2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, 3. Department of Agronomy and Plant Breeding, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, 4. Department of Plant Protection, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran, 5. Molecular Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
*corresponding author, E-mail: Hojat.mazahery@yahoo.co.uc

چکیده

سرخرطومی برگ یونجه *Hypera postica* Gyll از جمله آفات مهمی است که هر ساله عملکرد علوفه گیاه یونجه را تحت تأثیر قرار داده و چین اول آن را به‌طور کامل از بین می‌برد. در این مطالعه سازوکارهای آنتی‌زنوز، آنتی‌بیوز و تحمل ۱٦ ژنوتیپ حاصل از نتایج غربال مزرعه‌ای در گلخانه با نوسان دمای شبانه‌روز بین ۱۸ تا ۲۷ درجه سلسیوس در فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی و با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین میزان پروتئین‌های بیان شده و تفاوت بیان آن‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف با استفاده از روش SDS-PAGE، تراکم تریکوم و میزان کلروفیل برگ و نیز ارتباط آن‌ها با تعداد لاروهای سرخرطومی جلب‌شده مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تشخیص هم‌بستگی بین صفات گلخانه‌ای و داده‌های حاصل از مطالعات الکتروفورز یک‌بُعدی SDS-PAGE از آزمون مانتل استفاده شد. هم‌بستگی معنی‌داری بین صفات مورد اندازه‌گیری در گلخانه و داده‌های مولکولی مشاهده نشد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه براساس تمام صفات به روش سلسله مراتبی Ward در سه خوشه مقاوم، نیمه‌حساس و حساس دسته‌بندی شدند. در این میان، ژنوتیپ‌های "محلی‌بمی"، "تالنت ۲"، "همدانی ۱۰٦" و "کدی ۱۰۸" می‌توانند به‌عنوان ژنوتیپ‌های دارای پتانسیل مقاومت به لارو سرخرطومی برگ یونجه مدنظر قرار گرفته و در آزمون‌های تکمیلی، بیشتر مورد بررسی قرار گیرند.

واژگان کلیدی: سازوکار آنتی‌زنوز، سازوکار آنتی‌بیوز، سازوکار تحمل، سرخرطومی برگ یونجه، الکتروفورز یک‌بُعدی SDS-PAGE

Abstract

The alfalfa weevil (*Hypera postica* Gyll) is a serious pest that adversely affects alfalfa forage yield and completely destroys the harvest in the early season every year. In this study, we evaluated the mechanisms of antixenosis, antibiosis and tolerance of 16 genotypes obtained from the screening field, between 18 and 27 °C in April and May 2014 in a completely randomized design with four replications at the greenhouse condition. The rate of expressed proteins and their differences within genotypes were analyzed using SDS-PAGE method. The trichome density and leaf chlorophyll content and their impact on the quantity of weevil larvae were evaluated. We used Mantel test to determine the correlation between greenhouse features and data from one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis. No significant correlation was observed between the traits in the greenhouse and molecular data. Using ward method, the studied genotypes were divided into three groups: resistant, moderately susceptible and susceptible. The genotypes "Mahali-Bami", "Talents 2"," Hamadani 106" and "code 108" can be further investigated in the future for their potential resistance to alfalfa weevil larvae.

Key word: Antixenosis mechanism, Antibiosis mechanism, Tolerance mechanisms, Alfalfa weevil, One-dimensional SDS-PAGE electrophoresis

مقدمه

گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) با سطح زیرکشت ۰/٦٥ میلیون هکتار در ایران یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای به‌شمار می‌رود که به‌علت دارا بودن ترکیباتی مانند پروتئین، مواد معدنی، انواع ویتامین‌ها و برخی متابولیت‌های ثانویه نظیر ساپونین، برتری خاصی نسبت به سایر گیاهان علوفه‌ای دارد (Zare*et al*., 2009). مطالعه راجع به جنبه‌های زیستی یونجه در مناطق خاستگاه آن طبق مطالعات آمایش سرزمین مربوط به بخش کشاورزی، ضروری و بااهمیت است؛ چرا که

دریافت: ۱۳۹٤/٥/۱۷، پذیرش: ۱۳۹٤/۹/٥.

اجماع کلی وجود دارد که ایران ناحیه مرکزی خاستگاه جغرافیایی یونجه می‌باشد. ولیکن اهمیت، وفور و پراکنش آن در منطقه غرب کشور ازجمله استان همدان حائز اهمیت است (Kakaei & Mazaheri-Laghab, 2014). زراعت گیاهان علوفه‌ای در استان همدان از اولویت خاصی برخوردار بوده و کشت آن‌ها در اغلب نقاط استان رایج و سطح وسیعی از اراضی زراعی به کشت و تولید یونجه اختصاص یافته است. در این میان، سرخرطومی برگ یونجه *Hypera postica* Gyll یکی از آفات کلیدی و عوامل محدودکننده یونجه محسوب می‌شود که هر ساله خسارت قابل‌توجهی به مزارع کشت یونجه وارد می‌کند. این آفت در مراحل مختلف لاروی و بلوغ از یونجه تغذیه می‌کند، ولی خسارت عمده آن مربوط به لاروهای سنین سوم و چهارم می‌باشد. مبارزه شیمیایی متداول‌ترین روش کنترل این آفت است، ولی بهتر است در کنار استفاده از سموم شیمیایی، سایر روش‌های مدیریتی نیز در کنترل این آفت مدّنظر قرار گیرد (Khanjani, 2009).

استفاده از ژنوتپ‌های مقاوم یکی از مطمئن‌ترین روش‌های کنترلی بوده و برای کشاورزان در حکم بیمه‌ای مطمئن و کم‌هزینه است (Seyyedi-Sahebari, 2007). عمده‌ترین مزیت کشت گیاهان مقاوم به حشرات کاهش‌یافتن میزان هزینه‌های تولید است؛ زیرا مقداری از هزینه‌های کنترل حشرات یا تمامی این هزینه‌ها با کاشت بذر یا کلون مقاوم صرفه جویی می‌شود (Smith, 1989). ازآنجایی‌که تولید و استفاده از ژنوتیپ‌های مقاوم به آفات، روشی اساسی نسبت به سایر روش‌های کنترل آفات است، دست‌یابی به آن از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (Khanjani, 2009). غربال ارقام به‌منظور مقاومت به آفات و بیماری‌ها، در برنامه‌های به‌نژادی اغلب محصولات کشاورزی از اهمیت شایانی برخوردار بوده و در بیشتر کشورها مورد توجه قرار می‌گیرد. بر این اساس، لزوم پرداختن به این امر در برنامه‌های به‌نژادی یونجه در کشور و به ویژه در استان همدان روشن می‌گردد.

پروتئین‌ها از جمله متابولیت‌های اولیه مرتبط با میزبان‌یابی حشرات آفت هستند که در ایجاد سازوکار آنتی‌زنوز گیاه نقش دارند (Smith, 1989). یکی از روش های بررسی بیان پروتئین‌ها استفاده از ژل‌های الکتروفورز است که طی آن حضور یا عدم‌حضور باند پروتئین در ژنوتیپ‌های مختلف و یا در شرایط تنش و عدم‌تنش مورد مقایسه قرار می‌گیرد (Naghavi *et al*., 2007). چندین گروه پروتئین دفاعی در گیاهان مشخص شده است (Bowers, 1980). این پروتئین‌ها پس از واردآمدن آسیب به گیاه یا در واکنش به حمله آفات در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابند. برخی از پروتئین‌های دفاعی گیاهی فقط به‌صورت موضعی در محل زخم تولید می‌شوند، درحالی‌که واکنش‌های سیستمیک دیگری منجر به توزیع و تجمع این پروتئین‌ها در سرتاسر گیاه می‌شود. پروتئین‌های گیاهی که بازدارنده آنزیم‌های پروتئیناز و آمیلاز هستند و همین‌طور لکتین‌های گیاهی که برای سلول‌های بشره مخاطی روده آفت سمی هستند، توانایی محافظت از گیاهان را در برابر حشرات دارا هستند (Kafie & Mahdavi Damghani, 2007).

با تکمیل مطالعات مربوط به پارامترهای مقاومت یونجه به این آفت و جمع‌بندی اطلاعات شاید بتوان قدم‌هایی ابتدایی در مورد نقش ژنوتیپ‌های مختلف یونجه نسبت به سرخرطومی برگ یونجه به تصویر کشید و گامی برای مدیریت این آفت مهم برداشت. هدف از این مطالعه بررسی سازوکارهای مقاومتی آنتی‌زنوز، آنتی‌بیوز و تحمل برخی ژنوتیپ‌های یونجه و شناسایی ژنوتیپ‌های با مقاومت نسبی بالاتر به‌منظور

استفاده کاربردی از آن‌ها در برنامه‌های مدیریت تلفیقی سرخرطومی برگ یونجه است. هم‌چنین تعیین ژنوتیپ‌های مطلوب برای اهداف به‌نژادی با کمک تکنیک الکتروفورز یک‌بعدی پروتئین‌ها (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).) به‌عنوان ترکیبات حاصل از متابولیسم اولیه گیاه- و بررسی ارتباط بیان پروتئین‌ها با مقاومت از اهداف دیگر این مطالعه است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ١٦ ژنوتیپ یونجه شامل "لاداک"، "ورنال"، "همدانی ٥٤"، "تفرش ٤٢"، "محلی‌بمی"، "همدانی"، "کدی ١٠٨"، "همدانی ١٠٦"، "یزدی"، "ناراگامت"، "تالنت ٢"، "811utece"، "محلات ٢٥"، "سفیدبوران قزوین ٩٩"، "فیض ٤٣" و "رینالی" از بین ١٥٠ ژنوتیپ موجود در ژرم‌پلاسم یونجه در مزرعه علمی- تحقیقاتی دانشگاه بوعلی‌سینا، غربال شده و در دو بخش گلخانه‌ای و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفتند.

بخش گلخانه‌ای: بازدیدها از مزرعه تحقیقاتی یونجه برای دستیابی به لاروهای سن سوم آفت (به‌دلیل اینکه سن‌های سه و چهار آفت بیشترین خسارت را ایجاد می‌کنند (Khanjani, 2009) از لاروهای سن سوم استفاده شد)، در اواخر اسفند ١٣٩٢ و اوایل فروردین ١٣٩٣ به‌صورت هر سه روز یک‌بار انجام شد. بدین منظور، عمل تورزنی در هر بازدید به‌طور تصادفی از نقاط مختلف مزرعه انجام شد. لاروهای سن سوم آفت سپس به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

به‌منظور بررسی ساز و کار آنتی‌زنوز (Antixenosis)، در گلخانه دانشگاه بوعلی‌سینا با نوسان دمای شبانه‌روز بین ١٨ تا ٢٧ درجه سلسیوس در فروردین و اردیبهشت ١٣٩٣ در قالب طرح کاملاً تصادفی و با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در پیرامون یک گلدان بسیار بزرگ به شکل دایره و به ابعاد ٣٠ × ٩٠ (ارتفاع × قطر) با فاصله ٢٥ سانتی‌متر از هم کشت شدند. شماره ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای پلاستیکی در کنار هر ژنوتیپ مشخص شد. زمانی‌که گیاهان دو هفته‌ای بوده و از نظر ارتفاع و میزان رشد یکنواخت شدند، لاروهای سن سوم به تعداد ٥٠ عدد در وسط گلدان بزرگ رهاسازی شده و سپس گلدان‌ها به‌وسیله استوانه‌های توری با مش مناسب محبوس شدند. جمعیت حشرات تا زمانی‌که ژنوتیپ حساس خسارت شدید دیده یا جمعیت بالایی از حشره روی آن تجمع یابد، نگه‌داری شد. پس از گذشت ٣، ٦ و ٩ ساعت تعداد لارو مستقر شده روی هر ژنوتیپ یادداشت شد. هم‌چنین به‌منظور بررسی ارتباط این سازوکار با برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک یونجه، تراکم کرک‌های (Trichomes) غده‌ای موجود در برگ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه با استریومیکروسکوپ و واحدهای ٥ و ١٠ میلی‌متر مربع، برای هر ژنوتیپ در سه تکرار محاسبه شد. به‌علاوه، از هر ژنوتیپ ١٠ برگ به‌طور تصادفی انتخاب شده و با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج SPAD ساخت کشور ژاپن، میزان کلروفیل موجود در برگ هر ژنوتیپ اندازه‌گیری شد. درنهایت میزان آسیب وارد شده به‌وسیله لاروهای سن سوم سرخرطومی با روش درجه‌بندی عینی (مشاهده‌ای) و از طریق نمره دادن از عدد صفر تا نه (Samerz & Lehman, 1976) تعیین گردید.

به‌منظور بررسی سازوکار آنتی‌بیوز (Antibiosis) نیز ٨ عدد بذر از هر ژنوتیپ در گلدانی با قطر دهانه ٢٠ سانتی متر که با مخلوط خاک زراعی، کود حیوانی پوسیده و ماسه به نسبت مساوی پر شده بود، کشت گردید. زمانی که ساقه‌ها به‌طول ١٥ سانتی‌متری رسیدند، به‌وسیله قیچی از کف بریده شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. از هر ژنوتیپ، تعداد ٤ ساقه انتهایی برش داده شد و داخل ظروف پتری با قطر ١٥ سانتی‌متر قرار داده شدند. قسمت

برش با پنبه مرطوب پوشانده شد و در صورت نیاز روزانه آبفشانی می‌شد. سپس ۷ لارو سن سوم پس از توزین اولیه با ترازوی AND حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم، با استفاده از قلم‌موی نرم ابریشمی در هر پتری قرار داده شد. پس از گذشت چهار روز که هنوز لاروها پوست‌اندازی نکرده بودند و در سن سوم بودند، میزان مرگ‌ومیر لاروها یادداشت و وزن آن‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد. شاخص مقاومت برای هر ژنوتیپ با استفاده از نسبت میانگین وزن لاروهای زنده در پایان آزمایش به میانگین وزن لاروهای زنده در ابتدای آزمایش، محاسبه شد (Seyyedi-Sahebari, 2007). بر این اساس، شاخص معادل ۱ نشان‌دهنده وجود حساسیت متوسط و شاخص‌های بالاتر و پایینتر از ۱ به‌ترتیب نمایانگر حساسیت زیاد و مقاومت ژنوتیپ‌ها تلقی شدند.

به‌منظور بررسی سازوکار تحمل (Tolerance) نیز، تعداد ۱۰ بذر از هر ژنوتیپ کشت و تعداد ۵ گیاهچه به طور یکنواخت در تمام گلدان‌ها نگه داشته شده و بقیه حذف شدند. سپس گلدان‌های غیرشاهد با ۲۰ لارو سن سوم و گلدان‌های شاهد بدون رهاسازی لارو به‌وسیله استوانه‌های توری پوشانده شدند. در طول مدت آزمایش تعداد لارو به‌ازای تعداد معینی از گیاهچه‌های یونجه ثابت نگه داشته شد و بدین‌منظور گیاهچه‌ها هر روز کنترل شدند. این آزمایش تا زمانی‌که حساس‌ترین ژنوتیپ کاهش رشد محسوسی نشان دهد، ادامه یافت. سپس ساقه‌های یونجه تمامی گلدان‌های آلوده و شاهد به‌وسیله قیچی باغبانی کف‌بر و وزن تر و خشک آن‌ها با استفاده از ترازوی حساس اندازه‌گیری شد. در نهایت شاخص تحمّل برای هر ژنوتیپ براساس نسبت عملکرد گیاهان آلوده به شاهد، محاسبه گردید.

بخش آزمایشگاهی: ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ ژنوتیپ‌های یونجه طی مراحل آلوده و شاهد، در حضور نیتروژن مایع و در هاون چینی پودر گردید. سپس به آن بافر استخراج تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰٪ و استون اضافه گردید و چندین بار به‌هم زده شدند. پس از قرار دادن مخلوط به‌دست آمده به‌مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس و رسوب پروتئین‌ها، نمونه‌ها به سانتریفیوژ یخچال‌دار (با دمای ٤ درجه سلسیوس) انتقال داده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور g ×۱٤۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. محلول شستشو (۷۰ میلی‌گرم DTT (Dithiothreitol) با استون به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) به رسوب باقی‌مانده در میکروتیوب، اضافه گردید. سوسپانسیون به‌دست آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه در یخچالی با دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند تا پروتئین‌های موجود در میکروتیوب به‌طور کامل رسوب کنند. این عمل برای هر یک از ژنوتیپ‌ها دو تا سه مرتبه (بسته به میزان آلودگی غیرپروتئینی) تکرار شد و نهایتاً نمونه‌های پروتئینی در دمای آزمایشگاه خشک شد. پس از این مرحله، µl ۵۰۰ بافر نمونه (Sample buffer = Lysis buffer) شامل اوره، تیواوره، تریس، آب دوبار تقطیر،PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) و DDT به mg ۱۰۰ از پودر خشک‌شده در هر لوله اضافه شد. سپس به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری و چندین بار ورتکس گردید. پس از آن، مخلوط حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و دور g × ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در این مرحله مایع رویی جدا و رسوبات دور ریخته شد. از محلول روئی برای مطالعه سنجش پروتئین (الگوی الکتروفورزی و مقدار کمی پروتئین‌های کل) استفاده گردید که سنجش پروتئین با استفاده از روش Bradford (1976) انجام شد.

در این تحقیق برای الکتروفورز پروتئین بافت برگ یونجه از روش SDS-PAGE (الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات) و در ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم‌کننده ۵

درصد به روش Laemmli (1970) با بعضی تغییرات استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از کوماسی‌بلو R-250 انجام گرفت. از پروتئین‌های استاندارد اوترانسفرین (۷۸ کیلودالتون)، آلبومین گاوی (٦٦ کیلودالتون)، اوآلبومین (٤٥ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (١٤ کیلودالتون) به‌عنوان نشانگر در ژل استفاده شد.

داده‌های کمّی حاصل از بخش گلخانه‌ای پس از تبدیل‌های لازم، با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه آنووا (One-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تیمارها درصورت مشاهده اختلاف معنی‌دار به روش توکی-بی (Tuckey-b) با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver 15 گروه‌بندی شدند. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه در نهایت با استفاده از تمام شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده به روش سلسله مراتبی Ward (1963) خوشه‌بندی شدند. در بخش مولکولی نیز جایگاه هر یک از باندهای پروتئینی روی ژل از طریق حرکت نسبی آن‌ها مشخص و به‌صورت اعداد کمی بیان گردید. براساس وجود (عدد یک) یا عدم وجود هر باند (عدد صفر) در فواصل مختلف، ماتریس دوطرفه ژنوتیپ‌ها و متغیرها به‌دست آمد. تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد و از آزمون UPGMA با کمک نرم‌افزار NTSYS pc-2.02 و از روش تجزیه به محورهای اصلی برای تفسیر ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد. بعد از تجزیه خوشه‌ای جهت آزمون برازش مناسب دندروگرام با داده‌های کیفی، ماتریس کوفنتیک محاسبه گردید. جهت تشخیص رابطه میزان هم‌بستگی بین دندروگرام‌های حاصل از داده‌های نشانگری و گلخانه‌ای با هم‌دیگر از آزمون مانتل (Mantel, 1967) به‌کمک نرم‌افزار xlstat 2015 استفاده گردید.

نتایج

آنتی‌زنوز: نتایج تجزیه واریانس بین تعداد لاروهای سرخرطومی برگ یونجه‌ی جلب شده پس از ۳ ساعت اختلاف معنی‌داری نشان داد (P = ۰/۰۰۰۱، df = ۱۵ و F = ٥/۳٦٤). در این زمان، بیشترین میانگین تعداد لارو روی ژنوتیپ یزدی و ناراگامت (با میانگین ۰/۸٦٦ ± ٥/٥۰) و کمترین مقدار آن روی ژنوتیپ سفیدبوران قزوین ۹۹ (با میانگین۰/۰۲٥۰ ± ۰/۲٥) به ثبت رسید (جدول ۱). هم‌چنین بین میانگین تعداد لاروهای سرخرطومی برگ یونجه پس از ٦ ساعت نیز در ژنوتیپ‌های مختلف یونجه اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P = ۰/۰۰۰۱، df = ۱۵ و F = ۱۱/۱۰۹). به‌طوری که بیش‌ترین تعداد لارو جلب شده مربوط به ژنوتیپ‌های یزدی و محلات ۲۵ (به‌ترتیب با میانگین ۰/٤۰۸ ± ٦ و ۰/٦٤٥ ± ٥/٥۰) و کمترین تعداد آن مربوط به ژنوتیپ محلی‌بمی (با میانگین ۰/۲۸۸ ± ۰/٥) بود (جدول ۱). نتایج این مطالعه هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف گیاه یونجه از نظر تعداد لاروهای جلب شده پس از ۹ ساعت از شروع آزمون نشان داد (P = ۰/۰۰۰۱، df = ۱۵ و F = ۱۲/۲۰۸) که طی آن ژنوتیپ یزدی (با میانگین ۰/٤۷۸ ± ٦/۲٥) بیشترین مقدار و ژنوتیپ سفیدبوران قزوین ۹۹ (با میانگین ۰/۰٥ ± ۰/٥) کمترین مقدار را دارا بودند (جدول ۱). در مجموع نیز، بیشترین و کمترین میانگین تعداد لاروها به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های یزدی و سفیدبوران قزوین ۹۹ مشاهده شد (P = ۰/۰۰۰۱، df = ۱۵ و F = ۱۹/۸٤۳).

داده‌های حاصل از مقایسه میانگین تراکم کرک موجود در پشت برگ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه، ازنظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار بودند (P = ۰/۰۰۰۱، df = ۱۵ و F = ۸۷/۲٦۹). نتایج نشان داد که بیشترین میانگین تراکم کرک را ژنوتیپ همدانی ٥٤ (با میانگین ٤/۳٥۸ ± ۲٦۱) و کمترین آن را

ژنوتیپ همدانی (با میانگین ٦/٥٦٥ ± ٥٢/٣٣) دارا بودند (جدول ٢).

بین میزان کلروفیل برگ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P = ٠/٠٠٠١، df = ١٥ و F = ٥/١١٤). ژنوتیپ همدانی ١٠٦ (با میانگین ١/٠٩٥ ± ٦٠/٨٥) بیشترین و ژنوتیپ همدانی ٥٤ (با میانگین ٤/٠٠٧ ± ٣٩/٧٥) کمترین میزان کلروفیل برگ را دارا بودند (جدول ٢). مقایسه میانگین درصد آسیب ژنوتیپ‌های یونجه (P = ٠/٠٠٠١، df = ١٥ و F = ٦/٠٢٣) نشان داد که ژنوتیپ یزدی (با میانگین ٥ ± ٧٥) دارای بیشترین درصد آسیب و ژنوتیپ رینالی (با میانگین٢/٥ ± ١٢/٥٠) دارای کمترین درصد آسیب به آفت بودند (جدول ٢).

هیچ هم‌بستگی معنی‌داری بین تراکم تریکوم برگ ژنوتیپ‌های بادمجان و درصد آسیب مشاهده نشد. اما یک هم‌بستگی معنی‌دار و مثبت بین میزان کلروفیل برگ و درصد آسیب (٠/٥٥٣) به ثبت رسید.

آنتی‌بیوز: بررسی مقادیر شاخص مقاومت آنتی‌بیوز نشان داد که ژنوتیپ‌های همدانی ٥٤، محلی بمی، کدی ١٠٨ و همدانی ١٠٦ (به‌ترتیب با شاخص آنتی‌بیوز ٠/٩، ٠/٩٧، ٠/٦٨ و ٠/٦٦) دارای مقاومت نسبی هستند. سایر ژنوتیپ‌ها (با شاخص آنتی‌بیوز بالاتر از ١) از حساسیت بالایی برخوردار بوده و این حساسیت به‌ویژه در ژنوتیپ 811utece بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود (جدول ٣). بیشترین درصد مرگ‌ومیر لاروهای سرخرطومی در ژنوتیپ‌های کدی ١٠٨ و لاداک مشاهده شد و کمترین مقدار درصد مرگ‌ومیر مربوط به ژنوتیپ ناراگامت بود (جدول ٣).

جدول ١- تعداد لاروهای سرخرطومی برگ مستقر شده روی ١٦ ژنوتیپ یونجه مورد مطالعه طی بررسی سازوکار آنتی‌زنوز در شرایط گلخانه‌ای.

Table 1. Number of weevil larvae settled on the 16 studied alfalfa genotypes under greenhouse conditions during the study mechanism antixenosis.

Row	Genotype	Mean ± Standard Error			
		After 3 hours	After 6 hours	After 9 hours	Total
1	Ladak	1 ± 0.408 de	2 ± 0.408 def	1 ± 0.408 g-i	1.33 ± 0.235 gh
2	Vernal	1.75 ± 0.478 cde	3.5 ± 0.288 bcd	0.75 ± 0.478 hi	2 ± 0.136 fg
3	Hamedani 54	2.25 ± 0.478 cde	1.25 ± 0.478 ef	1.25 ± 0.478 f-i	1.58 ± 0.284 gh
4	Tafresh 42	3 ± 0.408 bcd	1.55 ± 0.288 ef	2.5 ± 0.655 c-f	2.33 ± 0.192 efg
5	Mahali- Bami	3 ± 0.408 bcd	0.5 ± 0.288 f	2.5 ± 0.25 d-g	1.91 ± 0.083 fg
6	Hamedani 87	4.75 ± 0.853 ab	5 ± 0.408 ab	1 ± 0.408 g-i	3.58 ± 0.416 cd
7	Kodi 108	1.25 ± 0.25 de	4.5 ± 0.645 abc	3 ± 0.408 b-d	2.91 ± 0.25 def
8	Hamedani 106	1.75 ± 0.478 cde	1 ± 0.408 ef	2.5 ± 0.288 c-f	1.75 ± 0.159 g
9	Yazdi	5.5 ± 0.866 a	6 ± 0.408 a	6.25 ± 0.478 a	5.91 ± 0.284 a
10	Naragamet	5.5 ± 1.707 a	4.5 ± 0.645 abc	4 ± 0.408 b	4.66 ± 0.593 b
11	Talent 2	3.75 ± 0.75 abc	3.25 ± 0.478 cd	1.5 ± 0.288 e-i	2.83 ± 0.419 def
12	811utece	2.5 ± 0.645 de	2.5 ± 0.288 de	2 ± 0.707 d-h	2.33 ± 0.43 efg
13	Mahalat 25	4 ± 0.408 abc	5.5 ± 0.645 a	3.75 ± 0.25 bc	4.41 ± 0.159 bc
14	Sefeedbouran-Ghazvin 99	0.25 ± 0.025 e	1.25 ± 0.946 ef	0.5 ± 0.05 i	0.66 ± 0.471 h
15	Faze 43	5.75 ± 1.30 a	4.5 ± 0.288 abc	4 ± 0.408 b	4.75 ± 0.369 b
16	Reinaly	4 ± 0.912 a	3.25 ± 0.853 cd	2.75 ± 0.25 b-e	3.33 ± 0.235 de

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (Tukey-b ($p < 0.01$)).

جدول ۲- مقایسه میانگین تراکم کرک موجود در پشت برگ، میزان کلروفیل و درصد آسیب ۱٦ ژنوتیپ مورد مطالعه یونجه.

Table 2. Comparison of mean trichome density on the leaves, chlorophyll content and percent injuried of the studied 16 alfalfa genotypes.

Row	Genotype	Mean ± Standard Error		
		Trichum density	chlorophyll content	injury Percent
1	Ladak	137.33 ± 3.48 bcd	46.32 ± 5.319 d-g	25 ± 7.35 cde
2	Vernal	85 ± 1 de	44.47 ± 4.010 e-g	38.75 ± 4.26 bc
3	Hamedani 54	261 ± 4.358 a	39.75 ± 4.007 g	17.5 ± 2.5 de
4	Tafresh 42	168.33 ± 6.565 bcd	47.92 ± 0.634 c-g	25 ± 6.45 cde
5	Mahali- Bami	116.33 ± 4.055 cde	57.2 ± 1.067 a-c	41.25 ± 8.26 bc
6	Hamedani 87	52.33 ± 6.565 e	57.17 ± 1.142 a-c	36.25 ± 5.54 bcd
7	Kodi 108	112 ± 8.504 cde	54.3 ± 1.926 a-d	40 ± 7.07 bc
8	Hamedani 106	170 ± 2.645 be	60.85 ± 1.095 a	22.5 ± 7.5 cde
9	Yazdi	118.67 ± 5.925 cde	58.42 ± 3.811 ab	75 ± 5 a
10	Naragamet	158.33 ± 8.171 bcd	54.22 ± 0.597 a-d	30 ± 7.07 cde
11	Talent 2	134 ± 7.549 bcde	52.37 ± 1.144 a-e	37.5 ± 4.78 bcd
12	811utece	208.33 ± 5.487 ab	52.42 ± 0.645 a-e	42.5 ± 6.29 bc
13	Mahalat 25	126 ± 6.082 bcde	57.42 ± 3.702 ab	52.5 ± 7.5 b
14	Sefeedbouran-Ghazvin 99	173.33 ± 4.33 bc	49.87 ± 2.385 b-e	25 ± 5 cde
15	Faze 43	103 ± 0.577 cde	42.9 ± 4.341 fg	31.25 ± 6.57 cde
16	Reinaly	108 ± 0.577	44.5 ± 1.69 e-g	12.5 ± 2.5 e

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ((Tukey-b ($p < 0.01$)).

جدول ۳- شاخص مقاومت سازوکار آنتی‌بیوز و تحمل و درصد مرگ‌ومیر ۱٦ ژنوتیپ مورد مطالعه یونجه در شرایط گلخانه‌ای.

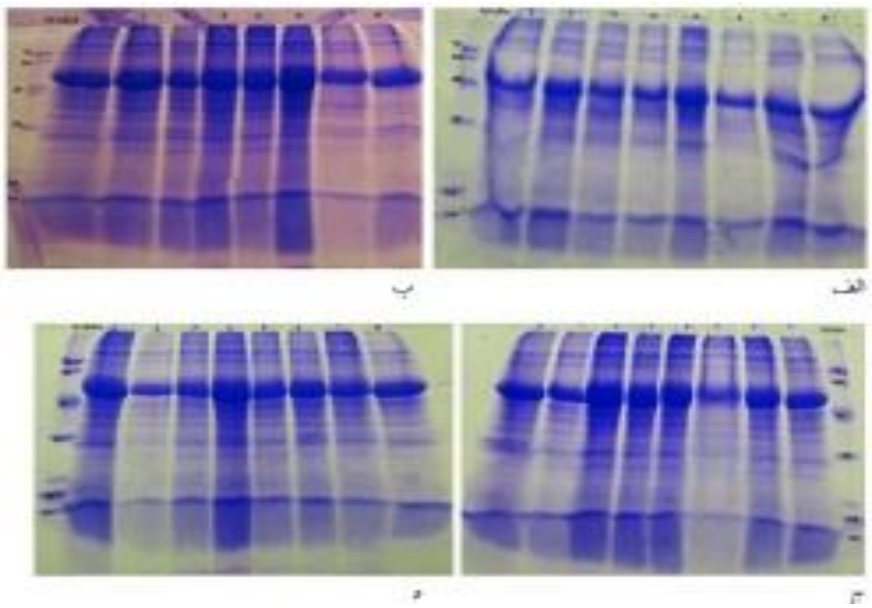
Table 3. Resistance index of antibiosis and tolerance mechanism and mortality rate of 16 studied alfalfa genotypes under greenhouse conditions.

Row	Genotype	Index of antibiosis	Mortality rate	Index of tolerance
1	Ladak	1.30	14.28	0.69
2	Vernal	1.30	10.71	0.64
3	Hamedani 54	0.9	3.57	0.70
4	Tafresh 42	1.25	3.57	1
5	Mahali- Bami	0.97	10.71	1.48
6	Hamedani 87	1.25	3.57	0.27
7	Kodi 108	0.68	17.85	1.33
8	Hamedani 106	0.66	14.28	0.64
9	Yazdi	1.03	7.14	1.02
10	Naragamet	1.2	0	0.70
11	Talent 2	1.35	3.57	0.83
12	811utece	1.8	7.14	0.55
13	Mahalat 25	1.4	7.14	0.61
14	Sefeedbouran- Ghazvin 99	1.3	3.57	0.81
15	Faze 43	1.37	3.57	0.38
16	Reinaly	1.6	10.71	0.31

تحمل: بررسی شاخص تحمل و وزن خشک و تر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که ژنوتیپ‌های لاداک، ورنال، همدانی ٥٤، همدانی ۸۷، همدانی ۱۰٦، ناراگامت، 811utece، محلات ۲٥، رینالی و فیض ٤۳ کاهش عملکرد قابل ملاحظه‌ای در گلدان‌های آلوده نسبت به گلدان‌های سالم داشته‌اند (جدول ۳). در حالی‌که گلدان‌های آلوده متعلق به ژنوتیپ‌های سفیدبوران قزوین۹۹، همدانی ۱۰٦ و کدی ۱۰۸ کاهش عملکرد چشم‌گیری نداشته‌اند.

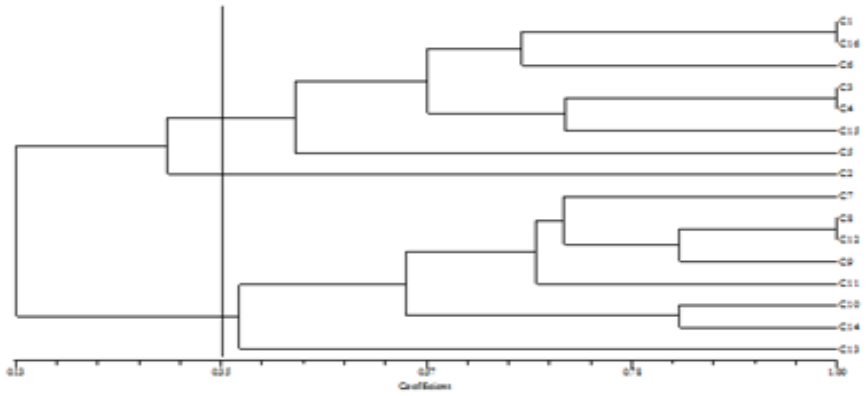
شکل ۲ (الف، ب، ج و د) ژل‌های حاصل از الکتروفورز یک‌بعدی ۱٦ ژنوتیپ مورد مطالعه یونجه را در شرایط تغذیه و عدم‌تغذیه سرخرطومی برگ یونجه نشان می‌دهد.

دندروگرام حاصل از داده‌های کیفی سازوکارهای گلخانه‌ای براساس حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی و ضریب تشابه جاکارد با ضریب کوفنتیک مطلوب r = ۰/۹۲ به‌صورت شکل ۲ به‌دست آمد. خط برشی دندروگرام در مقیاس۰/۳۵ رسم گردید و براساس آن ژنوتیپ‌ها در سه گروه خوشه‌بندی شدند. ژنوتیپ‌های لاداک، رینالی، همدانی، همدانی ٥٤، تفرش ٤۲، فیض ٤۳ و محلی‌بمی (به ترتیب با شماره‌های ۱، ۱٦، ٦، ۳، ٤، ۱٥ و ٥) در خوشه اول، ژنوتیپ ورنال (شماره ۲) در خوشه دوم و ژنوتیپ‌های کدی ۱۰۸، همدانی ۱۰٦، 811utece، یزدی، تالنت ۲، ناراگامت، سفیدبوران قزوین ۹۹ و محلات ۲٥ (به‌ترتیب با شماره‌های۷، ۸، ۱۲، ۹، ۱۱، ۱۰، ۱٤ و ۱۳) در خوشه سوم قرار گرفتند. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نیز توسط داده‌های کیفی سازوکارهای گلخانه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد از ۰/۱ تا ۱ متغیر بود. بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های همدانی ٥٤ و تفرش ٤۲، لاداک و رینالی، کدی ۱۰۸ و یزدی، همدانی ۱۰٦ و یزدی، همدانی ۱۰٦ و 811utece، یزدی و 811utece مشاهده شد. نتایج حاصل از نمودار خوشه‌ای با نتایج حاصل از ماتریس ضرایب تشابه جاکارد در انطباق با هم و هم‌سو بودند که مورد انتظار می‌باشد. آزمون مانتل نشانگر پروتئینی به‌منظور بررسی هم‌بستگی پیرسون داده‌های گل‌خانه‌ای و داده‌های مولکولی حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها، در شکل ۳ نشان داده شده است. براساس این آزمون (r(AB) ns = - 0.050 ،p-value (Two tailed) = 0.628 و Alpha = 0.05) هیچ هم‌بستگی معنی‌داری بین این داده‌ها مشاهده نشد.



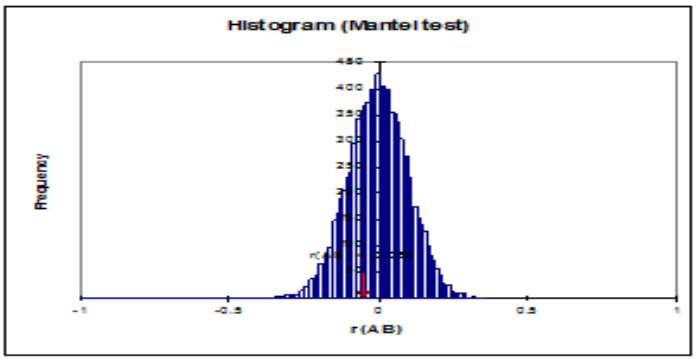
شکل ۱- باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئین برگ ژنوتیپ‌های یونجه. الف- (تفرش ٤۲، رینالی، لاداک، سفیدبوران قزوین ۹۹)، ب- (کدی ۱۰۸، ناراگامت، همدانی، همدانی ٥٤)، ج- (یزدی، Lutece 81، فیض ٤۳، همدانی ۱۰٦) و د- (تالنت۲، ورنال، محلی‌بمی، محلات ۲٥).

Fig. 1. Protein patterns of alfalfa genotypes leaf protein electrophoresis (a) (Tafresh42, Reinaly, Ladak, Sefeedbouran-Ghazvin 99), B (kodi108, Naragamet, Hamadani, Hamadani54), C (Yazdi, Lutece 81, Faze43, Hamadani106) and (d) (Talent2, Vernal, Mahali-Bami, Mahalat25).



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های کیفی سازوکارهای‌های گلخانه‌ای ۱٦ ژنوتیپ مورد مطالعه یونجه براساس ضریب تشابه جاکارد.

Fig. 2. Qualitative data dendrogram of greenhouse mechanisms 16 genotypes studied based on Jaccard coefficient.



شکل ۳- هیستوگرام آزمون مانتل نشانگر پروتئینی ۱٦ ژنوتیپ مورد مطالعه یونجه در شرایط تغذیه سرخرطومی برگ یونجه با داده‌های گلخانه‌ای.

Fig. 3. Mantel test Histogram of protein marker 16 genotypes studied alfalfa in condition feeding alfalfa weevil with greenhouse data.

بحث

پراکنش کرک‌ها روی برگ در گیاه نسبت به تغذیه گیاه‌خوارها مقاومت ایجاد می‌کند (Levin, 1973). واریته های یونجه دارای کرک‌های غده‌ای، نسبت به سرخرطومی برگ یونجه مقاومت آنتی‌زنوزی نشان می دهند (Danielson *et al.*, 1987). مطالعات ژنتیکی نشان می‌دهد که از نظر تراکم و تعداد کرک در ژنوتیپ‌های یونجه تنوع‌ژنتیکی بالایی وجود دارد (Agren & Schemske, 1994; Mauricio & Rausher, 1997; Roy *et al.*, 1999; Clauss, 2006). هم‌چنین، پذیرش یک گیاه توسط یک آفت به فاکتورهای مختلفی ارتباط دارد که ازجمله می‌توان به تست کردن گیاه با استفاده از اندام‌های حسی حشره، فرو بردن قطعات دهانی به داخل بافت و یا سلول گیاهی و در نهایت تغذیه حشره از گیاه مورد نظر خود اشاره نمود (Smith, 1989). در نتیجه، مقدار زیاد تراکم تریکوم در ژنوتیپ‌های با مقاومت نسبی یونجه می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور نسبی عدم ترجیح (به‌علت هم‌بستگی منفی ولی غیرمعنی‌دار) این ژنوتیپ‌ها توسط لارو

سرخرطومی برگ باشد. نتایج این مطالعه با نتایج Danielson *et al*.(1987) مطابقت داشت.

در موارد خاصی ایجاد مقاومت آنتی‌زنوزی از طریق ایجاد تغییر در رنگ شاخه و برگ و یا تفاوت در میزان کلروفیل گیاهان میسر شده است (Smith, 1989). در واقع، هر چه برگ یک رقم سبزتر و شاداب‌تر باشد، تعداد لاروهای بیشتری را به خود جلب خواهد نمود. در نتیجه، اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر میزان کلروفیل، نشان‌دهنده تفاوت در ارزش تغذیه‌ای هر کدام از ژنوتیپ‌ها در برابر لاروهای سرخرطومی برگ یونجه بوده است. چرا که Toress *et al*., (2001) ابراز نمودند که بیشتر حشرات، مکان‌هایی از گیاه را برای تغذیه و تخم‌گذاری انتخاب می کنند که دارای ارزش تغذیه‌ای فراوانی نسبت به سایر مکان-ها باشد. هم‌چنین حشرات بوته‌های دارای برگ‌های تازه‌تر، جوان‌تر و با میزان کلروفیل برگ بیشتر را نسبت به سایر بوته‌ها بیشتر ترجیح می‌دهند (Shararbar, 2014).

وجود سازوکار تحمل در ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه، اغلب با مقایسه وزن خشک (عملکرد) در گیاهان آلوده و غیرآلوده ژنوتیپ موردنظر تعیین می‌شود (Seyyedi-Sahebari, 2007). براساس منابع، اندازه‌گیری آسیب حشرات به گیاهان معمولاً مفیدتر از اندازه‌گیری رشد و تمرکز جمعیت حشرات روی آن‌ها می‌باشد؛ چرا که هدف نهایی اغلب برنامه‌های به‌نژادی کاهش میزان خسارت و در نتیجه افزایش عملکرد و کیفیت محصول می‌باشد (Smith, 1989). در این مطالعه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفت درصد آسیب، تنوع وجود داشت که این موضوع دامنه انتخاب به‌نژادگر را جهت انتخاب ژنوتیپ مقاوم به آفت سرخرطومی در برنامه اصلاح گیاه یونجه افزایش می‌دهد. Shararbar (2014) نیز در مطالعه سازوکارهای مقاومت برخی ژنوتیپ‌های بادمجان نسبت به شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی، این ژنوتیپ‌ها را دارای تنوع معرفی نمود.

یک هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪ بین درصد آسیب با تعداد لارو و میزان کلروفیل برگ وجود داشت. این موضوع نشان می‌دهد که هرچه میزان کلروفیل برگ بیشتر باشد، احتمالاً لاروهای سرخرطومی، برگ‌های یونجه را تازه‌تر و خوشمزه‌تر دیده و مقدار تغذیه بیشتری داشته‌اند. بنابراین ما شاهد آسیب زیادی روی ژنوتیپ‌های با میزان کلروفیل بیشتر، بوده‌ایم. به عبارت دیگر، تعداد زیاد لارو روی هر ژنوتیپ احتمالاً تغذیه زیاد و متعاقباً آسیب زیاد را باعث شده است. در واقع ممکن است تغذیه هر یک از لاروها بسیار ناچیز بوده باشد، اما چون تعداد آن‌ها زیاد بوده است، آسیب زیادی ایجاد کرده‌اند. Seyyedi-Sahebari (2007)، نیز در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه خود در بررسی سازوکار آنتی‌زنوز برخی ژنوتیپ های یونجه نسبت به سرخرطومی برگ یونجه، ژنوتیپ‌های با کمترین تعداد لارو جلب شده را دارای مقاومت نسبی دانست، درحالی‌که(Rattcliffe & Elgin, 1990)، در مطالعات آزمایشگاهی گیاهچه‌های یونجه ابراز نمودند که تنها عامل مقاومت مربوط به سازوکار تحمل می‌باشد.

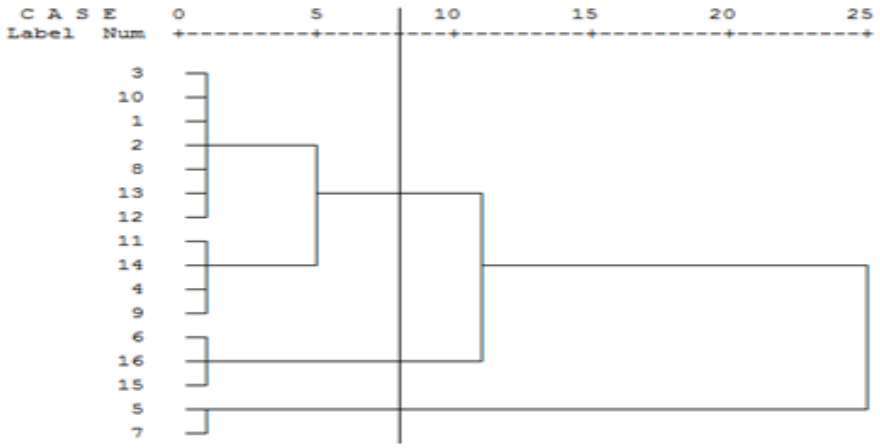
مطالعات پیشین ثابت می‌کنند که افزایش رشد یک جمعیت نه‌تنها به مقدار ماده غذایی، بلکه به کیفیت ماده غذایی نیز ارتباط دارند (Hesler, 2005). از طرفی، در حشرات گیاه‌خوار، نرخ بقای بالا و درصد مرگ‌ومیر پایین نشان‌دهنده بهتر بودن کیفیت تغذیه می‌باشد (Awmack *et al*., 2002; Greenberg *et al*., 2002; Pereyra & Sanchez., 2006). در واقع، درصد مرگ‌ومیر بالا و کاهش وزن می‌تواند ناشی از اثرات آنتی‌بیوزی باشد. براساس نتایج، ژنوتیپ‌های کدی ۱۰۸، همدانی ۱۰٦ و همدانی ٥٤، نه‌تنها دارای شاخص آنتی‌بیوزی پایین‌تر از ۱ بوده‌اند، بلکه درصد مرگ‌ومیر لاروی آن‌ها نیز نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها بیشتر بوده است. بنابراین می‌توان این ژنوتیپ‌ها را به‌عنوان ژنوتیپ‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوزی معرفی کرد. Seyyedi-Sahebari

(2007) نیز ارقام یونجه با شاخص آنتی‌بیوزی پایین‌تر از ۱ و مرگ‌ومیر بالا را ارقام با بیشترین تأثیر آنتی‌بیوزی روی لاروهای سرخرطومی برگ و در نتیجه ارقام مقاومی دانست.براساس شاخص تحمل ژنوتیپ‌های لاداک، ورنال، همدانی ٥٤، همدانی ۸۷، همدانی ۱۰٦، ناراگامت، 811utece، محلات ۲۵، رینالی و فیض ٤۳ توانایی چندانی به جبران خسارت ناشی از تغذیه لاروهای سرخرطومی برگ یونجه ندارند. درحالی‌که ژنوتیپ‌های سفیدبوران قزوین ۹۹، همدانی ۱۰٦ و کدی ۱۰۸ با افزایش رشد رویشی و قدرت جوانه‌زنی خود قادرند خسارت ناشی از تغذیه لاروهای سرخرطومی برگ یونجه را جبران نموده و به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها در این مطالعه معرفی می‌گردند که این نتایج با نتایج مطالعات Seyyedi-Sahebari (2007) روی برخی ژنوتیپ‌های یونجه نسبت به سرخرطومی برگ یونجه مطابقت داشت.

در ارزیابی و مطالعه مقاومت بین ژنوتیپ‌ها در یک گونه گیاهی خاص، قبل از شناسایی و معرفی روش‌های نوین و جدید، استفاده از نشانگرهای مولکولی صفات ظاهری نقش عمده را ایفا می‌کرد. در سال‌های اخیر دانش بیوتکنولوژی کمک شایانی به تشخیص روابط ژنتیکی مقاومت و تبارشناسی آن‌ها در میان ژنوتیپ‌های گوناگون کرده است. نشانگرهای مولکولی و صفات ظاهری به تنهایی نمی‌توانند ابزار مفید و سودمندی در روش‌های آماری باشند، ولیکن هر دو روش می‌توانند مکمل هم‌دیگر باشند (Mireki *et al*., 2014؛ Martinez *et al*., 2008). ما در این مطالعه تنوع زیادی را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه از نظر پروتئین‌های بیان شده در زمان تغذیه سرخرطومی برگ یونجه یافتیم. ژنوتیپ‌هایی که براساس ماتریس ضریب تشابه جاکارد و نمودار خوشه‌ای دارای شباهت زیاد بودند، در نهایت در یک گروه از نظر مقاومت و حساسیت قرار گرفتند. این موضوع می‌تواند ابزار مفیدی برای تعیین روابط ژنتیکی مقاومت توسط به‌نژادگران باشد. اما هیچ هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری بین مقاومت به سرخرطومی و بیان پروتئین‌ها مشاهده نشد. این موضوع می‌تواند بیانگر آن باشد که ژنوتیپ‌ها از سایر روش‌ها از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه (مانند ساپونین) برای مقاومت به سرخرطومی برگ یونجه بهره گرفته‌اند که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است. از طرف دیگر، با وجود هم‌بستگی غیرمعنی‌دار، پروتئین‌های بیان شده در برخی ژنوتیپ‌ها ممکن است از پروتئین‌های دخیل در مقاومت بوده باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتر از جمله انجام الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌ها به‌منظور شناسایی نقش هر کدام از آن‌ها دارد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی و براساس نمودار خوشه‌ای به‌دست آمده از سازوکارهای آنتی‌زنوز، آنتی‌بیوز و تحمل و نیز بیان پروتئین‌ها (شکل ٤)، ژنوتیپ‌های یونجه در سه سطح مقاومتی به‌صورت زیر دسته‌بندی شدند: ژنوتیپ‌های همدانی ٥٤، ناراگامت، لاداک، ورنال، همدانی ۱۰٦، محلات ۲۵، 811utece، تالنت ۲، سفیدبوران قزوین ۹۹، تفرش ٤۲ و یزدی (به‌ترتیب با شماره ۳، ۱۰، ۱، ۲، ۸، ۱۳، ۱۲، ۱۱، ۱٤، ٤ و ۹) در گروه ژنوتیپ‌های بینابین یا نیمه‌حساس، ژنوتیپ‌های محلی بمی و کدی ۱۰۸ (با شماره‌های ۵ و ۷) در گروه ژنوتیپ‌های مقاوم و ژنوتیپ‌های همدانی، رینالی و فیض ٤۳ (شماره ٦، ۱٦ و ۱۵) در گروه ژنوتیپ‌های حساس. گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای به‌صورت ۱۰۰ درصد مورد تأیید تجزیه تابع تشخیص قرار گرفت. ژنوتیپ‌های محلی بمی، تالنت ۲، همدانی ۱۰٦ و کدی ۱۰۸ با بروز سطوحی از مقاومت، ژنوتیپ‌های امیدبخشی شناخته شده‌اند و مطالعات بیشتر با درنظر گرفتن سایر نکات به‌زراعی و فنی جهت مقابله با خسارت سرخرطومی برگ یونجه پیشنهاد می‌گردد.



شکل ٤- دندروگرام به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای سازوکارهای آنتی‌زنوز، آنتی‌بیوز و تحمل و بیان پروتئین‌های ١٦ ژنوتیپ مورد مطالعه یونجه نسبت به سرخرطومی برگ یونجه براساس روش وارد (١٩٦٣).

Fig. 4. Dendrogram obtained from cluster analysis antixenosis mechanisms, antibiosis and tolerance and protein expression of 16 studied alfalfa genotypes of the alfalfa weevil, according to Ward's method (1963)**.**

سپاسگزاری

از همکاری مطلوب آقای دکتر علی مصطفایی استاد مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه و سرکار خانم مهندس فرناز سیدی صاحباری و همه‌ی عزیزانی که نویسندگان را در جهت غنای گزارش کمک نمودند بسیار سپاسگزاریم.

منابع

Agren, J. & Schemske, D. W. (1994) Evolution of trichome number in a naturalized population of *Brassica rapa*. *American Nature* 143, 1-13.

Awmack, C. S. & Leather, S. R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Vol. 47.

Bowers, W. S. (1980) Chemistry of plant/insect interactions. *In Insect Biology in the Future,* edited by M. Locke and D. S. Smith, New York: Yadavaran Publishing, 633 pp.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Clauss, M. J., Dietel, S., Schubert, G. & Michell-Olds, T. (2006) Glucosinolate and trichome defenses in a natural Arabidopsis lyratapopulation. *Journal of Chemical Ecology* 32, 2351-2373.

Danielson, S. D., Manglitz, G. R. & Sorensen, E. L. (1987) Resistance of perennial glandular-haired Medicago species to oviposition by alfalfa weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomoogicall* 16, 195-197.

Greenberg, S. M., Sappington, T. W., Sétamou, M. & Liu, T. X. (2002) Beetarmyworm (Lepidoptera : Noctuidae) host plant preferences for oviposition. *Environmental Entomology* 31, 142-148.

Hesler, L. S. (2005) Resistance to *Rhopalosiphumpadi* (Homoptera : Aphididae) in three triticale accessions. *Journal of Economic Entomology* 2, 603-610.

Kafie, M. and Mahdavi-Damghani, A. S. (1381) Mechanisms of plant resistance to environmental stress. University Ferdowsi Mashhad Publishing, 467 pp.

Kakaei, M. & Mazahery-Laghab, H. (2014) Evaluation of alfalfa (*Medicago Sativa* L.) germplasm using multivariate statistical analysis. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 22, 125-132. [In Persian].

Khanjani, M. (2009) Field crop Pests in Iran (Insect & Mites). Bu-Ali Sina university Publishing, 467 pp. [In Persian].

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage *T4. Nature* 227, 680-685.

Levin, D. A. (1973) The role of trichomes in plant defence. *Quarterly Review of Biology* 48: 3-15.

Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach, *Cancer Research* 27, 209-220.

Martinez, L., Caragnaro, P., Masuekki, R. & Rodriguez, J. (2008) Evaluation of Biotechnology in Crop Protection: Facts and Fallacies. *British Crop Protection Council, Farnham* 25-33.

Mauricio, R. & Rausher, M. D. (1997) Experimental manipulations of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* 51, 1435-1444.

Mireki, K., Abdolahi, M. & Dehdari, M. (2014) Resistance of some Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Cultivars to Root Knot Nematode (*Meloido gynejavanica*) Based on Microsatellite Marker. *Journal of Plant and Seed Breeding* 30, 367- 382. .[In Persian].

Mostafaie, A. (2003) A Practical Guide and theoretical protein electrophoresis in the gel. Yadavaran Publishing, 184 pp. [In Persian].

Naghavi, M. R., Ghareyazie B. & Hossini Salakdeh, Gh. (2007) Molecular markers. Tehran University Publishing, 254 pp. [In Persian].

Pereyra, P. C. & Sánchez, N. E. (2006) Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 35, 671-676.

Ratcliffe, R. H. & Elgin, J. H. Jr. (1990) Turkish alfalfa cultivars screened for alfalfa weevil resistance. *Crop science* 30, 5-14.

Roy, B. A., Stanton, M. L. & Eppley, S. M. (1999) Effects of environmental stress on leaf hair density and consequences for selection. *Journal of Evolutionary Biological* 12, 1089-1103.

Seyyedi-Sahebari, F. (2007) Evaluation of reaction of alfalfa ecotypes to alfalfa weevil, *Hypera postica* Gyll, (Coloptera : Curculionidae) *Iranian Research Institute of Plant Protection*. 60 pp. [In Persian].

Shararbar, H. (2014) Resistance of some eggplant cultivars and landraces to *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). M. Sc. Thesis of Entomology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. [In Persian].

Smith, C. M. (1989) Plant resistance to insects, A fundamental approach. *John Wiley & Sons. New York.*

Sumers, C. G. & Lehman, W. F. (1976) Evaluation of non- dormant alfalfa cultivars for resistance to the Egyptian alfalfa weevil. *Journal of Economic Entomological* 1, 29-34.

Torres, J. B., Faria, C. A., Evangelista, W. S. & Pratissoli, D. (2001) Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. *International Journal of Pest Management* 47, 173-178.

Ward, J. H. (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* 58, 236-244.

Zare, N., Valizadeh., M., Tohidfar, M., Mohammadi, S. A., Malboobi, M. A. & Habashi, A. A. (2009) Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7, 567-572. [In Persian].