Archive of SID

مقاله تحقیقی

تأثیر اسید اسکوربیک و کربوهیدرات‌های سوربیتول و مانیتول بر شاخص‌های تغذیه‌ای و سامانه ایمنی شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

مریم عجم‌حسنی، سونیا امیری جامی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

مسئول مکاتبات: مریم عجم‌حسنی، پست الکترونیک: shahroodm@gmail.com.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۳۰ ۷(۲)۷۷-۹۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۰۶

چکیده

نقش غذا در رشد، تولیدمثل، پارامترهای ایمنی و فعالیت آنزیم‌های مؤثر در هضم به اثبات رسیده است. چنان‌چه حشرات از غذای مطلوب و با ارزش غذایی بالاتر بهره‌مند شوند سامانه ایمنی قوی‌تری داشته و بهتر می‌توانند با عوامل بیگانه مقابله کنند. به علاوه، تغذیه کافی در دوران لاروی منجر به تولید حشراتی با توان بارآوری مناسب می‌شود که این موضوع از اهداف مهم پرورش حشرات میزبان واسط انگل واره‌ها است. لذا در تحقیق حاضر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک شب‌پره آرد با تغذیه از ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول به‌عنوان مکمل غذایی در شرایط آزمایشگاهی تعیین شد. حشرات در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۴۵٪ و دوره روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت) پرورش داده شدند و از لاروهای سن سوم در آزمایشات استفاده شد. تیمارها شامل تیمار اول :آرد (۹۹ گرم) + اسید اسکوربیک (یک گرم)، تیمار دوم آرد (۹۷ گرم)+ سوربیتول (سه گرم)، تیمار سوم آرد (۹۷ گرم) + مانیتول (سه گرم)، تیمار چهارم (شاهد) آرد (۱۰۰ گرم) بود. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. نرخ نسبی رشد (RGR) در همه تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. لاروهای سن سوم بید آرد پرورش یافته روی رژیم غذایی حاوی ویتامین C و مانیتول به ترتیب بیشترین کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI) (۰/۶۶±۷/۶۶ درصد) و بالاترین شاخص هضم نسبی (FDI) (۲/۷۲±۳۷/۲ درصد) را دارا بودند. بالاترین شاخص تبدیل غذای هضم شده به زیست توده (ECD) (۰/۹±۱۶/۳۸ درصد) مربوط به لاروهایی بود که از غذای حاوی ویتامین C تغذیه کردند. فعالیت کیموتریپسین (۰/۰۳±۱/۰۵) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین در لاروهای تغذیه کرده از غذای حاوی ویتامین C افزایش معنی‌داری داشت. در حالی‌که فعالیت پروتئاز دیگر یعنی تریپسین توسط هر دو تیمار قندی و ویتامین C نسبت به شاهد افزایش یافت. رژیم‌های غذایی حاوی قندهای سوربیتول و مانیتول فعالیت آنزیم‌های کربوهیدرازی آلفا گلوکوزیداز (۰/۰۷±۰/۷۴) و بتا گلوکوزیداز را به میزان (۰/۰۰۸±۰/۴۴) میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین نسبت به سایر تیمارها تغییر دادند و فعالیت لیپاز در لاروهای تغذیه کرده از غذای حاوی سوربیتول به مقدار (۰/۰۶±۱/۳۰) و ویتامین C به مقدار (۰/۰۱±۰/۶) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین کاهش معنی‌داری نشان داد. مانیتول بر فعالیت لیپاز تأثیر مثبت یا منفی نشان نداد. در بحث ایمنی شناسی تزریق جدایه ۴۷ از قارچ *Beauveria bassiana* (غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر) به لاروهای سن سوم، سبب پاسخ همولنف به شکل افزایش معنی‌دار تعداد کل سلول‌های خونی و ایمنوسیت‌ها در زمان چهار ساعت پس از تیمار بود که نقش ویتامین C از سایر تیمارها در تغییر تعداد سلول‌های خونی به میزان (۴۸/۷± ۶۲۵) عدد در میلی‌متر مکعب خون بارزتر بود. تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت روند کاهشی نشان داد. به طور کلی، در میان تیمارها، ویتامین C و قند مانیتول می‌توانند به عنوان گزینه‌های مناسبی در رژیم غذایی شب‌پره آرد لحاظ شوند. به نظر می‌رسد بهبود کیفیت غذای لاروها در میزان هضم غذا، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و توان دفاع فیزیولوژیک حشره مؤثر بوده و می‌توان امیدوار بود که پرورش شب‌پره آرد به‌عنوان میزبان جایگزین برای دشمنان طبیعی با قوت بیشتری محقّق شود.

واژه‌های کلیدی: اسید اسکوربیک، قندهای سوربیتول و مانیتول، ویژگی‌های فیزیولوژیکی، شب‌پره آرد

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پرورش حشرات در انسکتاریوم‌ها معمولاً با استفاده از گیاهان زنده، قسمت‌های مختلف گیاهی مانند غده‌ها، میوه‌ها و سایر بخشها و یا رژیم‌های غذایی آماده صورت می‌گیرد. عمدتاً رژیم‌های غذایی آماده آسان‌تر از محصولات زنده گیاهی تهیه شده و در دسترس عامل بیولوژیک قرار داده می‌شود، هرچند که گاه عوامل زیستی به ترکیبات غذای آماده شده حساس بوده و واکنش نشان می‌دهند (Etzel & Legner, 1999). در زمان تهیه رژیم‌های غذایی توجه به کیفیت و کمیت غذا بسیار اهمیت دارد. غذاهای با کیفیت پایین که غنی از ترکیبات لازم برای رشد نباشند، سامانه پرورشی را تضعیف نموده و تولید اقتصادی را کاهش می‌دهند. امروزه از تخم و لارو بید آرد به عنوان یک میزبان جایگزین برای پرورش انگل واره‌ها و شکارگرهایی مانند *Trichogramma brassicae* (Bezdenko) (Hym.: Trichogrammatidae) و *Orius albidipennis* (Reuter) (Hem.: Anthocoridae) در واحدهای پرورش انبوه استفاده می‌شود (Nasirian *et al*, 2014). در کشور ما از تخم بید غلات *Sitotroga cerealla* Olivier (Lep.: Gelechiidae) نیز در پرورش زنبورهای تریکوگراما استفاده می‌شود ولی پرورش شب‌پره آرد آسانتر بوده و اندازه بزرگتر و تعداد بسیار بالای تخم شب‌پره آرد در مقایسه با تخم بید غلات، آن را به گزینه بهتری برای پرورش تبدیل کرده است (Yazdanian, 2000). بررسی ها نشان داده که نوع مواد غذایی مصرف شده توسط میزبان بر دوره رشد، اندازه بالغین، طول عمر، نرخ تولید مثل، میزان زنده‌مانی و نسبت جنسی نوزادان زنبور انگل واره تاثیر می‌گذارد (Tillman &Cate, 1993). وجود مقادیر بالای پروتئین‌ها و قندها به عنوان ترکیبات اصلی غذایی در رژیم‌های غذایی مصنوعی برای رشد بهینه حشرات و مقاومت آن‌ها در برابر آلودگی‌ها حائز اهمیت می‌باشد (Mason *et al.*, 2014; Manjula *et al* , 2020). ویتامین C یک آنتی اکسیدان محلول در آب و کوفاکتور آنزیمی ضروری برای رشد و سوخت و ساز جانوران و گیاهان است (Chapmann, 1998). در مهره‌داران، آنتی اکسیدان‌هایی مانند ویتامین C در بهبود و ترمیم اندامک‌های سلولی، غشا، چربی، اسید نوکلئیک‌هایی که در برابر آلودگی آسیب دیده‌اند مثبت عمل می‌کند (Beck *et al.*, 2004; Jaspers *et al.*, 2007). در پستانداران، ویتامینC محلول در آب مقاومت بدن را در برابر بیمارگرهای مختلف و تنش‌های محیطی افزایش می‌دهد (Wintergerst *et al.*, 2006). اسید اسکوربیک یک ویتامین ضروری برای رشد حشرات شناخته شده است (Kanafi *et al.*, 2007). به علاوه مشخص شده حتی بعضی حشرات قادر به سنتز مقادیر محلول ویتامین C از گلوکز هستند (Chippendale *et al.*, 1965). کمبود ویتامین C در حشرات موجب اختلال‌هایی در رشد و پوست‌اندازی می‌شود که نشان‌دهنده اثر ویتامین C بر فعالیت آنزیم اکسیداز در فرآیند اسکلروتیزاسیون و ملانیزاسیون کوتیکول است. به همین دلیل بعضی پژوهشگران ذکر کرده‌اند که اسید آسکوربیک در حشرات سبب تنظیم عمل آنزیم فنل‌اکسیداز کوتیکول نیز می‌شود (Nation, 2002).

کیفیت غذا با محاسبه پارامترهای شاخص تغذیه تعیین می‌شود. از طرفی میزان غذای هضم شده و تبدیل شده به بیوماس با فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ارتباط است. از این رو، ترکیبات تشکیل دهنده رژیم غذایی می‌تواند روی فعالیت این آنزیمها تاثیرگذار باشد. آنزیم‌های گوارشی با شکستن مولکول‌های درشت، انرژی لازم برای رشد و زنده‌مانی و فعالیت‌های حیاتی حشره را تامین می‌کنند (Jouanin *et al.*, 1998). در واقع چنان‌چه غذای مورد استفاده حشره از کیفیت لازم برخوردار نباشد، انرژی حاصل از سوخت و ساز ناکافی بوده و منجر به اختلال در دوره رشدی، وزن بدن و به دنبال آن حجم همولنف شده و حتی کارایی سامانه ایمنی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Ghasemi *et al*, 2018).

در زمینه اثرات رژیم غذایی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی بید مدیترانه‌ای آرد پژوهش‌های گسترده‌ای صورت گرفته است .شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای سن پنجم بید مدیترانه‌ای آرد روی آرد نه رقم گندم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج نشان داد لاروهای سن پنجم پرورش یافته روی رقم پیشتاز بیش‌ترین کارایی تبدیل غذای

www.SID.ir

Archive of SID

خورده شده را دارا بودند (Abdi *et al.*, 2014). مرادی ناصرآبادی (۲۰۱۸) گزارش کرد که نوع رژیم غذایی بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز شب‌پره آرد معنی‌دار است چنان‌که لاروها از رژیم حاوی آرد و سبوس تغذیه کنند در مقایسه با لاروهای تغذیه کرده از آرد فعالیت فنل اکسیداز بالاتری نشان می‌دهند (Moradi–naserabadi, 2018). قاسمی و همکاران (۱۳۹۷) با افزودن پروتئین‌های زئین و کازئین به رژیم غذایی بید آرد دریافتند که کازئین تاثیر معنی‌داری بر مولفه‌های شاخص تغذیه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز، تریپسین و الاستاز دارد (Ghasemi *et al.*, 2018).

هرچند که تحقیقاتی در راستای اثر نوع غذا بر ویژگیهای زیستی و بیوشیمیایی شب‌پره آرد انجام گرفته اما با توجه به اهمیت بالای تخم و لارو این حشره در واحدهای پرورش انبوه، تاکنون گزارشی مبنی بر تاثیر ویتامین‌ها و قندهای مکمل رژیم غذایی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک آن ثبت نشده است بنابراین در تحقیق حاضر، بررسی تاثیر اسیداسکوربیک و قندهای سوربیتول و مانیتول بر شاخص‌های تغذیه و ایمنی شب‌پره آرد به منظور شناسایی رژیم غذایی با ارزش تر، ملاک کار قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کلنی اولیه تخم شب‌پره آرد از سازمان جهاد کشاورزی استان سمنان تهیه شد. بستر پرورش لاروهای حشره در سازمان، آرد سبوس‌دار به همراه مقداری مخمر بود و جهت تغذیه حشرات کامل نیز از محلول قندی استفاده می‌شود. آرد محتوی تخم‌های حشره پس از انتقال به آزمایشگاه در ظروف پلاستیکی قرار داده شدند و در اتاقک رشد با دمای۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵٪ و دوره روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت مستقر شدند. با ظهور لاروهای سن اول، آرد سبوس‌دار تازه جهت تغذیه لاروها در اختیار قرار می‌گرفت. پس از یک نسل پرورش، از تخم‌های حاصل از حشرات کامل در آزمایش‌ها این تحقیق استفاده شد.

شاخص‌های تغذیه

آزمایش شاخص‌های تغذیه، شامل چهار تیمار بود تیمار اول :آرد (۹۹ گرم) + اسید اسکوربیک (یک گرم)، تیمار دوم آرد (۹۷ گرم)+ سوربیتول (سه گرم)، تیمار سوم آرد (۹۷ گرم) + مانیتول (سه گرم)، تیمار چهارم شاهد آرد (۱۰۰ گرم) (Ghasemi *et al*, 2018). به ازای هر تیمار ۲۰ عدد لارو سن سوم دو روزه برای آزمایش شاخص تغذیه انتخاب شدند (در مجموع ۸۰ عدد لارو برای چهار تیمار). لاروهای مورد آزمایش با ترازوی حساس و با دقت چهار رقم اعشار وزن شدند. همزمان غذای هر لارو نیز توزین شده و به همراه لارو درون یک پتری قرار داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، لاروها و میزان غذای باقیمانده مجدد وزن شدند. فضولات لاروها نیز در آون با دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شده و توزین شدند. شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای سن سوم شب‌پره آرد با تغذیه روی ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه شدند (Waldbauer, 1968).

- نرخ نسبی رشد Related Growth Rate (RGR)= (A–B)/(B.Day)
  تابعی از افزایش وزن موجود زنده است
- نرخ نسبی مصرف Related Consumption Rate (RCR)= D/(B.Day)
  شاخصی است که در اندازه‌گیری سرعت بهره‌برداری حشره از غذا به کار می‌رود.
- کارایی تبدیل غذای خورده‌شده Efficiency of Conservation of Ingested food (ECI)= RGR/RCR.100
  این شاخص قابلیت استفاده از غذای بلعیده شده برای رشد و تولید بافت را نشان می‌دهد.
- کارایی تبدیل غذای هضم‌شده به بیوماس Efficiency of Conservation of digested Food (ECD)= D.100/C–T
  مشخص‌کننده بخشی از غذایی است که به بافت زنده حشره تبدیل می‌شود.
- شاخص نسبی قابلیت هضم Feeding Detterence Index (FDI)=(C–T)/C.100

www.SID.ir

Archive of SID

شاخصی است که برای به دست آوردن میزان اجتناب حشره از تغذیه به‌کار می‌رود.

تهیه عصاره آنزیمی

برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، از روده میانی لاروهای سن سوم استفاده شد. به این صورت که لاروهای تغذیه کرده از تیمارها جداگانه روی یخ قرار داده شده تا کمی بی‌حس شوند. سپس روده میانی آنها استخراج شده و در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر قرار گرفت. در هر میکروتیوب ۱۰ عدد روده شب‌پره آرد قرار داده شد و حدود ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر به آنها اضافه شد. سپس با کمک یک هموژنایزر دستی محتویات میکروتیوب‌ها، هموژنایز شد. نمونه‌ها در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از مایع رونشین به‌عنوان منبع آنزیمی در برآوردهای آنزیمی استفاده شد. لازم به ذکر است که نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- نگهداری می‌شدند.

تعیین فعالیت سرین پروتئازها

فعالیت پروتئینازهای تریپسین و کیموتریپسین به‌عنوان سه زیرگروه از پروتئینازهای سرین با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار از سوبستراهای اختصاصی آنها به ترتیب شامل بنزوئیل-ال-آرژنین-پی-نیترو آلانید و ساکسینیل-آلانین-آلانین-پرولین-فنیل آلانین-پی- نیترو آلانید اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۸۵ میکرولیتر بافر یونیورسال (اسیدیته ۹)، ۵ میکرولیتر از سوبستراهای ذکر شده و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود (Oppert *et al.*, 1997). با استفاده از میکروپلیت ریدر مقدار فعالیت آنزیمی و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر در زمان کل ۲۰ دقیقه و فواصل زمانی ۵ دقیقه ثبت شد.

تعیین فعالیت لیپاز

با توجه به اینکه لیپاز ها به غشا متصل هستند، بنابراین از بافر فسفات ترایتون دار برای همگن‌نمودن نمونه استفاده شد. حجم ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی را با ۱۸۰ میکرولیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷) مخلوط نموده، سپس ۲۰ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی پارانیتروفنیل بوتیرات اضافه و مخلوط شدند. جذب واکنش در ۴۰۵ نانومتر به طور پیوسته با فاصله زمانی ۱ تا ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد (Tsujita *et al.*, 1989).

تعیین فعالیت α و β گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز بر اساس روش (Low *et al.*, 1986; Parry, 1996) با اندکی تغییر انجام شد. به این منظور ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۸۵ میکرولیتر بافر با اسیدیته ۱۰ در حضور ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی به ترتیب پارا نیتروفنیل آلفا گلوکوپیرانوزید و پارا نیتروفنیل بتا گلوکوپیرانوزید به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید دو مولار واکنش متوقف و میزان پارانیتروفنل آزاد شده توسط میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری و نتایج ثبت شد.

آزمایشات ایمنی‌شناسی

جهت بررسی اثر مکمل‌های ویتامین و قند بر سامانه ایمنی شب‌پره آرد، در مجموع ۲۸۰ عدد لارو سن اول تازه تفریخ‌شده در چهار ظرف پرورش تفکیک شدند به‌طوری‌که هر ظرف شامل یک تیمار مکمل (مانند آزمایش شاخص تغذیه) و ۷۰ عدد لارو بود. به لاروها اجازه داده شد که از تیمارها تغذیه کنند تا به سن سوم برسند. این بازه زمانی در شرایط تعریف‌شده، حدود پنج روز طول کشید. سپس از ۲۰ عدد از لاروهای سن سوم یک روزه در هر تیمار برای آزمایش‌ها استفاده شد. همه لاروها با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر قارچ *Beauveria bassiana* (جدایه ۴۷ جداسازی شده از خاک جنگل ابر شاهرود) تیمار شدند. در واقع تیمار قارچ به شکل تزریق یک میکرولیتر قارچ و محلول توئین ۸۰ از طریق سرنگ هامیلتون به محدوده شکمی لاروها حد فاصل پاهای کاذب دوم و سوم انجام می‌گرفت (برای جلوگیری از به هم چسبیدن اسپورهای قارچ از محلول توئین ۸۰ استفاده شد) و لاروهای شاهد با محلول توئین ۸۰ تزریق شد.

www.SID.ir

Archive of SID

شمارش کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها

پس از گذشت ۱، ۴، ۱۰ و ۲۴ ساعت از تزریق، همولنف از ۱۸ عدد لارو سن سوم (۳ تکرار ۶ تایی) در هر بازه زمانی برای هر تیمار با کمک لوله مویین جمع‌آوری شده و در میکروتیوب حاوی محلول ضد انعقاد تایسون ریخته شد. حجم تایسون دو برابر حجم خون در میکروتیوب در نظر گرفته شد. تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها با استفاده از لام نئوبار و فرمول جونز محاسبه شد (Jones *et al.*, 1969).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایشات در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج

بررسی اثر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر شاخص‌های تغذیه شب‌پره آرد

بر اساس مشاهدات این تحقیق مشخص شد که اثر تیمارهای فوق بر شاخص‌های تغذیه شب‌پره آرد معنی‌دار بوده است. چنان‌که نرخ رشد نسبی در همه تیمارهای غذایی بیشتر از شاهد بود ($F=22$, $df=3$, $P\leq0.001$). بیشترین کارایی تبدیل غذای خورده‌شده ECI در لاروهای تغذیه‌کرده از رژیم غذایی حاوی ویتامین C به مقدار ۰/۶۶±۷/۶۶ درصد و کمترین آن در لاروهای شاهد ۰/۳۲۲±۵/۷۲۲ درصد بود ($F=47.7$; $df=3$, $P\leq0.0001$). همچنین کارایی تبدیل غذای هضم‌شده به زیست توده (ECD) در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذای حاوی ویتامین C به مقدار ۰/۹±۱۶/۳۸ درصد از سایر تیمارها به طور معنی‌داری بالاتر به‌دست آمد ($F=7$, $df=2$, $P\leq0.003$). شاخص نسبی هضم FDI در لاروهای تغذیه کرده از جیره غذایی محتوی قند مانیتول به طور معنی‌داری ۲/۷۲±۳۷/۲ درصد بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($F=9.46$, $df=2$, $P\leq0.0008$). نرخ نسبی رشد RGR و نرخ نسبی مصرف RCR در لاروهای تغذیه شده با ویتامین C بیشتر بود هرچند این مقادیر از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با لاروهای تغذیه کرده از سایر تیمارها نشان نداد (جدول ۱).

جدول ۱– شاخص‌های تغذیه لارو سن سوم بید آرد پس از تیمار با ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی

Table 1. Feeding indices of third instar larvae of *Ephestia kuehniella* fed on wheat flour enriched with vitamin C, sorbitol and mannitol

Treatment	Related growth rate (mg/mg/day)	Related consumption rate (mg/mg/day)	Efficiency of conservation of ingested food (%)	Efficiency of conservation of digested food (%)	Feeding detterence index (%)
Vitamin C	0.105±0.014 a	2.168±0.407a	7.66±0.66a	16.38±0.89a	30±1.1b
Sorbitol	0.097±0.019a	1.90±0.17a	5.29±0.41b	13.90±0.7b	24±1.7c
Mannitol	0.112±0.01 a	1.943±0.212a	6.54±0.45a	11.8±1b	37.2±2.72a
Control	0.076±0.01 b	1.686±0.188a	5.72±0.322	–	–

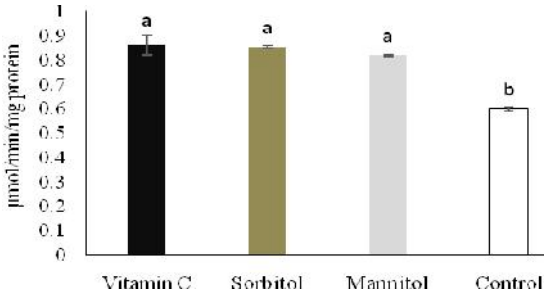
بررسی اثر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی شب‌پره آرد

تاثیر تیمارهای نامبرده بر فعالیت آنزیم تریپسین در شکل ۱ آمده است. هر سه تیمار ویتامین C و سوربیتول و مانیتول نسبت به شاهد سبب افزایش معنی‌دار فعالیت تریپسین شدند. در واقع، در روده میانی لاروهای شاهد در مقایسه با سایر تیمارها فعالیت تریپسین پایینتر بوده است ($F=35.26$, $df=3$, $P\leq0.0001$). شکل ۲ فعالیت آنزیم کیموتریپسین را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. تاثیر ویتامین C بر فعالیت کیموتریپسین به طور معنی‌داری بیشتر

www.SID.ir

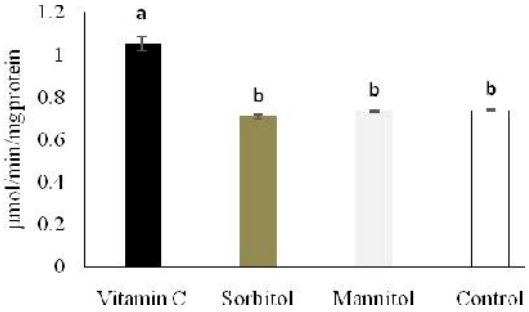
Archive of SID

از قندهای مانیتول و سوربیتول و شاهد مشاهده شد (F=50, df=3, $P\leq0.0001$). این در حالی بود که فعالیت تریپسین را هر سه تیمار نسبت به شاهد افزایش دادند (شکل۱). فعالیت آنزیم لیپاز تحت تاثیر تیمارهای مختلف دستخوش تغییرات معنی‌داری شد. چنان‌که ویتامین C و سوربیتول فعالیت لیپاز را نسبت به شاهد و تیمار مانیتول به طور معنی‌داری کاهش دادند. فعالیت لیپاز در لاروهای تغذیه کرده از غذای حاوی مانیتول و لاروهای شاهد در یک گروه آماری قرار گرفت (F=40.85, df=3, $P\leq0.0001$) (شکل ۳). شکل‌های ۴ و ۵ نشان دهنده تغییرات فعالیت آنزیم‌های آلفاگلوکوزیداز و بتاگلوکوزیداز است. رژیم‌های غذایی حاوی کربوهیدرات‌های سوربیتول و مانیتول سبب افزایش معنی‌دار فعالیت این دو آنزیم کربوهیدرازی شدند. تیمار ویتامین C کاهش چشمگیر فعالیت هر دو آنزیم را نسبت به شاهد و تیمارهای قند به همراه داشت (F=14.28, df=3, $P\leq0.001$) و (F=86.3, df=3, $P\leq0.0001$).



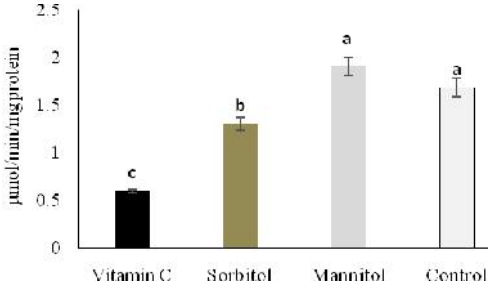
شکل ۱– تاثیر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم تریپسین در لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Figure 1. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on trypsin activity in 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*



شکل ۲– تأثیر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین در لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Figure 2. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on chymotrypsin activity in 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*

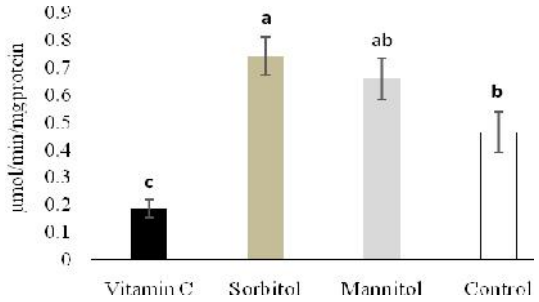


شکل ۳– تأثیر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم لیپاز در لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Figure 3. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on lipase activity in 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*

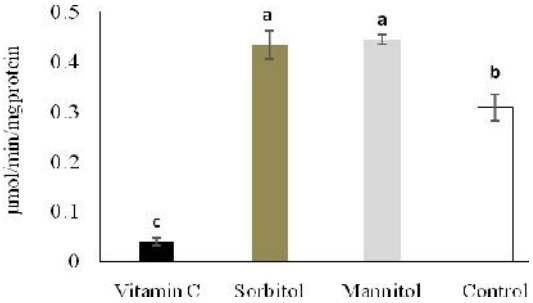
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴– تأثیر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز در لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Figure 4. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on alpha –glucosidase activity in 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*



شکل ۵– تأثیر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز در لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Figure 5. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on beta–glucosidase activity in 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*

بررسی اثر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول بر سامانه ایمنی شب‌پره آرد

نتایج بررسی پاسخ ایمنی شب‌پره آرد در مقابل اسپور قارچ، حاکی از اثر بارز رژیم غذایی بر این سامانه بود. طبق نتایج جدول ۲، بالاترین افزایش تعداد کل سلول‌های خونی ۴ ساعت پس از ورود قارچ به همولنف لارو شب‌پره آرد اتفاق افتاد و تاثیر ویتامین C و قند مانیتول نسبت به شاهد کاملا معنی‌دار بود ($F=45.5, df=3, P\leq0.003$). غذای حاوی سوربیتول نیز سبب افزایش تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای تغذیه‌کرده از این تیمار شد هر چند تفاوت با شاهد معنی‌دار نبود. این فاکتور با گذشت زمان رو به کاستی گذاشت و پس از ۲۴ ساعت تعداد کل سلول‌ها در همه بازه‌های زمانی کاهش داشت. گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها نیز روند مشابهی در تیمارهای مختلف نشان دادند به طوری‌که در زمان ۴ ساعت پس از تزریق قارچ تعداد گرانولوسیت‌ها ($F=22.3, df=3, P\leq0.001$) و پلاسموتوسیت‌های ($F=31.5, df=3, P\leq0.0001$). لارو شب‌پره آرد در تیمار ویتامین C، افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. قند مانیتول در جایگاه دوم تاثیرگذاری به شکل افزایش‌دهنده تعداد گرانولوسیت‌ها پس از ۴ ساعت قرار گرفت و رژیم غذایی حاوی سوربیتول تغییرات قابل توجهی در تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در این بازه زمانی به همراه نداشت. با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت، تراکم سلول‌های مشارکت کننده در ایمنی در همه تیمارها به صورت کاهشی مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲– اثر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Table 2. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on total hemocyte count of 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*

Treatment	1 h	4 h	10 h	24 h
Vitamin C	445±32.6a	625±48.7a	482±35.5a	466±51.3a
Sorbitol	302±12.4c	395±25c	315±12c	257±15.5c
Mannitol	377±21.6b	516±51.5b	405±16b	365±24.5b
Control	252.5±15.6d	330±23 d	256±22.5d	277±31.5c

جدول ۳– اثر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر تعداد پلاسموتوسیت‌های لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Table 3. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on plasmotocyte number of 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*

Treatment	1 h	4 h	10 h	24 h
Vitamin C	97±7.6a	260±27.5a	125±16.6a	124±18.7a
Sorbitol	77±6.6b	122±22.7b	81±16.5b	94±14.6b
Mannitol	91±4.5a	164±31.6ab	112±17.3ab	96±10b
Control	78±12.4ab	72.4±14.4c	66±6.7c	92±12.6b

جدول ۴– اثر ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول در جیره غذایی بر تعداد گرانولوسیت‌های لاروهای سن سوم شب‌پره آرد

Table 4. Effect of vitamin C, sorbitol and mannitol on granulocyte number of 3rd instar larvae of *Ephestia kuehniella*

Treatment	1 h	4 h	10 h	24 h
Vitamin C	220±12.3a	352.6±9.7a	248±34.8a	264±15a
Sorbitol	124±24.2c	192±14c	156±31.8b	155±7.6b
Mannitol	182±14.5b	274±10b	190±27b	180±23.4b
Control	116±10c	115±17d	122±28.6c	134±8.7c

بحث

موفقیت مهار زیستی به میزان بالایی به پرورش موفق و با کیفیت میزبان‌های آزمایشگاهی انگل واره‌ها و شکارگرها وابسته می‌باشد که در این راستا شناسایی و انتخاب یک گونه میزبان واسط که هم از نظر پرورش انبوه و هم مطلوبیت غذایی برای عامل زیستی مناسب باشد، به پیشرفت و اجرای موفق مهار زیستی کمک می‌کند. با توجه به اینکه برای پرورش زنبورهای خانواده Braconidae و سن‌های Miridae و Anthocoridae از لاروهای شب‌پره آرد، بعنوان میزبان آزمایشگاهی استفاده می‌شود، پیش‌بینی راهبردهایی برای بالا بردن کیفیت پرورش این میزبان از مهمترین نکات می‌باشد (Yazdanian, 2000). یکی از پارامترهای مهم در این راستا، نوع رژیم غذایی است. هر چه کیفیت غذای لاروهای شب‌پره آرد بالاتر و از مولکول‌های موثر در رشد غنی‌تر باشد، فرایند پرورش انبوه حشره و متعاقباً تولید و تکثیر دشمنان طبیعی آن با اطمینان بیشتری انجام خواهد گرفت.

میزان تغذیه در حشرات وابسته به نوع غذای مصرف شده آنهاست. غذاهای مطلوب و غنی از کربوهیدرات و پروتئین مورد پسند بیشتری قرار گرفته و شاخص‌های رشد، ایمنی، میزان زنده‌مانی و تولیدمثل را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Adamo *et al.*, 2016). نرخ نسبی رشد RGR تابعی از افزایش وزن موجود زنده است (Srinivasan & Uthamasamy, 2005). در تحقیق حاضر نرخ رشد نسبی در لاروهایی که از مکمل‌های غذایی تغذیه کرده بودند به طور معنی‌داری بیشتر از لاروهای شاهد بود که این امر نشان دهنده مطلوبیت بیشتر عناصر غذایی موجود در این رژیم‌های غذایی برای رشد بید آرد است. در واقع بر اساس نتایج، هم ویتامین C و هم قندهای سوربیتول و مانیتول توانستند بر نرخ رشد نسبی لاروهای شب‌پره آرد تاثیر مثبت افزایشی را به

www.SID.ir

Archive of SID

همراه داشته باشند. شاخص تغذیه‌ای دیگر، ECI یا کارایی تبدیل غذای خورده شده است. این شاخص قابلیت استفاده از غذا را به تولید بافت زنده نشان می‌دهد (Koul *et al.*, 2004). در این پژوهش، میزان ECI در لاروهای پرورش یافته روی رژیم غذایی حاوی ویتامین C و قند مانیتول بیشتر بود. این نکته نشان‌دهنده آن است که ترکیبات موجود در این جیره‌های غذایی قابلیت بیشتری برای تبدیل به بافت بدن در مقایسه با رژیم‌های دیگر داشته‌اند. ECD کارایی تبدیل غذای هضم‌شده به زیست توده است. این فاکتور نشان‌دهنده قسمتی از غذای جذب شده است که به بافت بدن تبدیل می‌شود و بنابراین حاکی از مطلوبیت غذا برای حشره است (Koul *et al.*, 2004). غذاهای با کیفیت پایین قطعاً سبب کاهش این شاخص می‌شوند. لذا بالابودن شاخص کارایی تبدیل غذای هضم‌شده به بافت زنده در لاروهایی که از ویتامین C تغذیه کرده بودند نشان دهنده کیفیت بهتر این رژیم غذایی برای لاروهای شب‌پره آرد است. FDI شاخصی است که میزان جذب غذا از طریق دیواره معده را نشان می‌دهد. این شاخص تابعی از مقدار الیاف غذا یا میزان آب بافت بدن موجود زنده است (Srinivasan & Uthamasamy, 2005). شاخص هضم نسبی در مشاهدات این تحقیق، در لاروهای رشد یافته روی رژیم غذایی مانیتول و ویتامین C بیشتر از سایر تیمارها بود. آنزیم‌های گوارشی ترشح‌شده از سلول‌های ستونی معده حشرات نقش اساسی در هضم و جذب غذا را دارند. در واقع، ۸۰–۹۰٪ گوارش انواع کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها توسط این دسته از سلول‌های معده صورت می‌گیرد. شکستن مولکول‌های درشت مواد غذایی به میکرومولکول‌ها به منظور تامین انرژی برای رشد و نمو حشرات ضروری است (Chapmann, 1998). ثابت شده که پروتئازها نقش اصلی تجزیه پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه را به عهده دارند و در بسیار از حشرات به ویژه بال‌پولکداران، سرین پروتئازها شامل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز آنزیم‌های دخیل در هضم پروتئین‌ها هستند. استفاده از بازدارنده‌های سنتز پروتئازها روشی قطعی در کنترل حشرات آفت محسوب می‌شود (Hilder *et al.*, 1992). Nouri–Ganbalani *et al.* (2017) بالاترین فعالیت پروتئولیتیک را در لاروهای سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (Coleoptera: chrysomelidae) *Leptinotarsa desemelinata* (say) که روی ارقام اگریا، سانته و لوتا سیب‌زمینی تغذیه کرده بودند، گزارش کردند. قاسمی و همکاران (۱۳۹۷) نشان دادند لاروهای شب‌پره آرد که از آرد حاوی پروتئین کازئین تغذیه کرده بودند فعالیت پروتئازی بالاتری نسبت به لاروهایی داشتند که روی آرد پرورش داده شدند (Ghasemi *et al.*, 2018). بر اساس نتایج این تحقیق، هر سه رژیم غذایی مکمل شامل ویتامین C و قندهای سوربیتول و مانیتول سبب افزایش معنی‌دار فعالیت تریپسین شد و فعالیت آنزیم کیموتریپسین فقط با تغذیه از ویتامین C بالا رفت. اسید آسکوربیک برای تعداد زیادی از حشرات به‌عنوان محرک تغذیه‌ای عمل می‌کند. اضافه کردن اسید آسکوربیک به جیره غذایی پروانه آرد سبب بهبود رشد آنها می‌شود. همچنین این ویتامین بر رشد و ایمنی کرم غوزه *Heliothis virescens* (Fabricus) نیز موثر است (Holly & Kent, 2009). در واقع، بهبود رشد این حشرات به اثرات آنتی اکسیدان اسید آسکوربیک نسبت داده شده است، زیرا اسید آسکوربیک مانع از بین رفتن اسیدهای چرب ضروری و ویتامین‌های گروه B می‌شود. اگر اسید اسکوربیک قادر به بهبود وضعیت رشدی بید آرد است پس این انتظار می‌رود که بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز تاثیرگذار باشد. مشخص شده که ویتامین‌ها، برخی اسیدهای آمینه ضروری و استرول‌ها در اجسام چربی حشرات تولید می‌شوند (Nation, 2002). ولی به نظر می‌رسد افزودن مقدار اندکی ویتامین C به جیره غذایی بید آرد، فعالیت پروتئازهای این حشره را تحت تاثیر قرار می‌دهد. همچنین افزایش فعالیت پروتئازها پس از تغذیه از رژیم‌های حاوی قند سوربیتول و مانیتول احتمالا به‌دلیل وجود مقادیری پروتئین در ساختار این قندهای سنتزی می‌باشد. چربی‌ها شامل تری اسیل گلیسیریدها، فسفولیپیدها، اسیدهای چرب و استرول‌ها از اجزای اصلی بدن حشرات هستند که در فرایندهای متعدد بیولوژیک مانند ساخت دیواره‌های سلولی، سوخت و ساز و ایمنی شرکت می‌کنند (Klowden, 2007). لیپاز آنزیمی است که هیدرولیز چربی

www.SID.ir

Archive of SID

ذخیره‌ای حشرات را تسریع می‌کند (Terra & Ferreira, 2012). فعالیت لیپاز در تیمارهای سوربیتول و ویتامین C نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرد ولی در تیمار مانیتول تغییر معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان نداد. بنابراین می‌توان چنین استنتاج کرد که نه تنها در ساختار این مکمل‌ها، مقادیری از اسید چرب و استرول وجود ندارد بلکه برهمکنش این ترکیبات با بستر پایه پرورش یعنی آرد به گونه ایست که سبب کاهش چربی موجود در آرد و بالتبع، کاهش معنی‌دار فعالیت لیپاز در معده حشره می‌شود. آلفا و بتاگلوکوزیدازها آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ای هستند که پیوندهای α–D–(1,4)–glucan را در گلیکوژن و سایر کربوهیدرات‌های مرتبط کاتالیز می‌کنند (Franco *et al.*, 2000). در پژوهش حاضر، رژیم های غذایی حاوی قندهای سوربیتول و مانیتول سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز شدند که با توجه به ماهیت ساختار ترکیبات مکمل استفاده شده (قندها)، این نتیجه منطقی به نظر می‌رسد. از طرف دیگر، اسید اسکوربیک کاهش معنی‌دار فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز را به همراه داشت. به‌نظر می‌رسد ویتامین C تاثیر منفی بر واکنش‌های آنزیمی مربوط به ترکیبات آرد داشته به طوریکه ترکیبات قند موجود در آرد را دچار اختلال و یا اضمحلال می‌نماید و این امر به نوعی منتج به کاهش فعالیت کربوهیدرازهای نامبرده شده است.

در یافته‌های این تحقیق، تعداد کل سلول‌های خونی ۴ ساعت پس از ورود عامل بیگانه به همولنف به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در سایر تحقیقات نیز به وضوح به این نکته اشاره شده که ایمنی سلولی در همان ساعات اولیه ورود عامل مهاجم به همولنف رخ می‌دهد (Stanley & Miller, 2006). و ایمنی هیومرال معمولا پس از ایمنی سلولی با فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی صورت می‌گیرد. دفاع سلولی در حشرات پس از شناسایی عامل بیگانه، با مداخله سلول‌های خونی و تغییر در شکل و تراکم آن‌ها صورت می‌گیرد (Lavin & Strand, 2002). گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها مهمترین سلول‌های شرکت‌کننده در بیگانه‌خواری و یا گره‌زایی بوده و شمار آنها در مقابله با عامل مهاجم به شدت دستخوش تغییر می‌شود. روند تراکم ایمنوسیت‌ها در ابتدای دفاع فیزیولوژیک معمولا افزایشی است و این افزایش به دلیل تقسیمات میتوزی گرانولوسیت‌ها و پروهموسیت‌ها می‌باشد. پروهموسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های پایه نقش اشتقاق به سایر سلول‌ها را در زمان ورود تنش و یا عامل آلوده به عهده دارند. این سلول‌ها به طور پیوسته با هماتوپویزیز ساخته شده و به همولنف وارد می‌شوند (Barreda & Belosevic, 2001). بر اساس مشاهدات این پژوهش، لاروهایی که از رژیم غذایی حاوی اسید اسکوربیک و قندهای سوربیتول و مانیتول تغذیه کرده بودند پس از گذشت ۴ ساعت از زمان ورود اسپور قارچ به همولنف افزایش معنی‌داری در تعداد کل سلول‌های خونی نسبت به لاروهای شاهد نشان دادند. در واقع، نقش مکمل‌های غذایی در پاسخ ایمنی بید آرد کاملا مثبت بود و در این میان، تیمار ویتامین C تاثیر معنی‌دار بیشتری در تغییرات فراوانی گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌های بید آرد در پاسخ به قارچ بیمارگر به همراه داشت. با گذشت زمان، به تدریج از تعداد کل سلول‌های خونی و پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها کاسته شد و تا ۲۴ ساعت این روند کاهشی ادامه یافت. نقش ویتامین C بر واکنش‌های ایمنی ماهی‌ها (Lee & Shiau, 2003)، پستانداران (Wintergerst *et al*, 2006) و بی‌مهرگانی مانند حشرات ثابت شده است. چنانچه سطوحی از ویتامین C به رژیم غذایی پشه آنوفل *Anopheles gambiae* Giles اضافه شود قدرت ایمنی حشره افزایش خواهد یافت (Kumar *et al.*, 2003). افزودن ویتامین C به غذای مصنوعی کرم سیب *Cydia pomonella* (L.) مقاومت لاروها را در برابر آلودگی ناشی از *Bacillus thuringiensis* و قارچ بیمارگر *B. bassiana* بالا می‌برد (Pristavko Dobzhenok & 1974). همچنین ایمنی لاروهای سفیده بزرگ کلم *Pieris brassicae* L. در مقابل گرانولوویروس‌ها با مصرف مقادیری ویتامین C افزایش قابل توجهی یافت (David *et al.*, 1972).

در این تحقیق، علاوه بر ویتامین C، رژیم‌های غذایی حاوی قند نیز نسبت به شاهد پاسخ ایمنی بید آرد را در

www.SID.ir

Archive of SID

مقابل قارچ بیمارگر *B. bassiana* به طور معنی‌داری افزایش دادند. به نظر می‌رسد رژیم‌های غذایی غنی‌تر و با کیفیت بالاتر توانسته‌اند با تغییر در تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها، دفاع سلولی حشره را تحریک کنند و این نتیجه به ویژه در بازه زمانی ۴ ساعت پس از تزریق اسپور قارچ، کاملا مشهود بود. تحقیقات بسیاری در این زمینه، موید تاثیر نوع رژیم غذایی بر فعالیت‌های ایمنی حشرات است.

تاثیر ماکرومولکول‌های رژیم غذایی بر سامانه ایمنی لاروهای *Spodoptera litura* و *Samia cyntiaricini* ثابت شده است (Manjula *et al*., 2020)، (Tungjitwitayakul & Tatun, 2019). در مطالعه روی تاثیر رژیم‌های غذایی بر فعالیت‌های ایمنی زنبور عسل *Apis mellifera* L.، غلظت هموسیت‌ها در حشراتی که از منابع غذایی دارای پروتئین تغذیه کرده بودند، بالاتر از شاهد بود. این حشرات مقاومت بیشتری در برابر بیماری‌ها نشان دادند. در واقع، خون حشراتی که از منابع دارای پروتئین بهره‌مند شده بودند حاوی گرانولوسیت و پلاسموتوسیت بیش‌تری بود، در نتیجه فعالیت دفاعی آن‌ها در برابر بیماری‌ها بیش تر مشاهده شد (Alaux *et al*., 2010). در تحقیقی دیگر Vogelweith *et al.* (2015) با هدف ارزیابی تغییرات عملکردهای ایمنی *Eupoecilia ambiguella*، تحت تاثیر رژیم‌های غذایی، گزارش کردند که درصد عصاره‌ی انگور در رژیم‌های غذایی بر عملکرد سیستم ایمنی *E. ambiguella* تاثیرگذار بوده است. به این معنا که تنوع در واکنش‌های ایمنی این حشره با تغذیه از ارقام مختلف انگور، به علت تفاوت ترکیبات مغذی در گیاه میزبان است چنان‌که لاروهای تغذیه کرده از انگورهای با میزان قند بالا، ایمنی قوی‌تری در برابر باکتری *Bacillus cereus* و قارچ *B. bassiana* نشان دادند. در همین راستا Adamo *et al.* (2016) نشان دادند رژیم غذایی روی تمامی متغیرهای مربوط به تولید انرژی و عملکردهای سیستم ایمنی کرم شاخدار تنباکو *Manduca sexta* (L.) اثر قابل توجهی دارد، چنان‌چه لاروهایی که از رژیم‌های غذایی با ارزش خیلی پایین تغذیه کردند، میزان چربی کم‌تری داشته و غلظت گلوکز و ترهالوز و تعداد کل پروتئین در آن‌ها تا حد زیادی کاهش یافت. به علاوه، لاروهای کرم شاخدار تنباکو که از رژیم‌های غذایی با ارزش بالا (درصد بالای کربوهیدرات) تغذیه کردند، سریع‌تر مراحل رشدی خود را طی کرده و تعداد کل سلول‌های خونی آن‌ها به طور معنی‌داری بیش‌تر از لاروهای تغذیه کرده از رژیم های غذایی کم ارزش بود. Ebrahimi & Ajamhassani (2017) ثابت کردند که غذای مصنوعی (عسل و آرد گندم و مخمر) ایمنی شب‌پره هندی را با افزایش معنی‌دار ایمنوسیت‌ها در مقایسه با رژیم‌های با محتوای غذایی کمتر مانند نخود و پسته بالا می‌برد. Ghosh *et al.* (2018) گزارش کرد که پروفایل هموسیت‌های لاروهای *Hyposidra* sp. تحت تاثیر رژیم غذایی طبیعی (برگ چای) و مصنوعی به شدت تغییر می‌کند.

نتایج این بررسی نشان داد که افزودن ترکیبات مکمل به رژیم غذایی شب‌پره آرد، هر یک به نوعی بر فیزیولوژی تغذیه و واکنش ایمنی این حشره تاثیرگذار می‌باشد. ویتامین C و قندهای مانیتول و سوربیتول قدرت دفاع سلولی شب‌پره آرد را افزایش دادند. قندهای سوربیتول و مانیتول بر فعالیت کربوهیدرازی تاثیر مثبت نشان دادند و ویتامین C به‌طور بارزی فعالیت پروتئاز گوارشی را افزایش داد. بنابراین یافته‌ها، می‌توان امیدوار بود که چنانچه ترکیباتی مانند اسیداسکوربیک و قند مانیتول به بستر آرد اضافه شوند، کیفیت و ارزشمندی غذای شب‌پره آرد را ارتقا بخشیده و این مسئله در بهبود برنامه‌های کنترل بیولوژیک و پرورش زنبورهای پارازیتوئید مؤثر خواهد بود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه صنعتی شاهرود برای حمایت مالی از انجام این تحقیق در قالب طرح پژوهشی با کد ۳۱۰۵۳ قدردانی می‌نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Abdi, A., Naseri, B. & Fathi, S. 2014. Nutritional indices, and proteolytic and digestive amylolytic activities of *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae): response to flour of nine wheat cultivars. Journal of Entomological Society of Iran, 33(4): 29–41.

Adamo, S.A., Davies, G., Easy, R., Kovalko, I. & Turnbull, K.F. 2016. "Reconfiguration of the immune system network during food limitation in the caterpillar *Manduca sexta*". Journal of Experimental Biology, 219(5), 706–718.

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. & Le Conte, Y. 2010. "Diet effects on honeybee immunocompetence". Biology Letters, 6: 562–565.

Barreda, D.R. & Belosevic, M. 2001. Transcriptional regulator of hemopoiesis. Developmental and Comparative Immunology, 25: 763–789.

Beck, M.A., Handy, J. & Levander, O.A. 2004. Host nutritional status: the neglected virulence factor. Trends in Microbiology, 12: 417–423.

Carr, A.C. & Frei, B. 1999. Toward a new recommende dietary allowance for vitamin c based on antioxidant and health effects in humans. The American Journal of Clinical Nutrition, 69: 1086–1107.

Chapman, R.F. 1998. The Insects Structure and function, 4th edition, Cambridge University Press, Cambridge. 782.

Chippendale G.M., Beck, S.D. & Strong, F.M. 1965. Nutrition of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubn.)–I Some requirements for larval growth and wing development. Journal of Insect Physiology, 11: 211–223.

David WAL Ellaby, S. & Taylor, G. 1972. The effect of reducing the content of certain ingredients in a semisynthetic diet on the incidence of granulosis virus disease in *Pieris brassicae*. Journal of Invertebrate Pathology, 20: 332–340.

Ebrahimi, M. & Ajamhassani, M. 2017. The effects of starvation stresses and nutritional diets on the immune system of Indian meal moth, *Plodiainterpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae). 2nd Iranian International Congress of Entomology.

Etzel, L.K., & Legner, E.F. 1999. Culture and colonization. In: Handbook of Biological Control. Bellows, T.S., Fisher, T.W. (eds). Academic Press, 125–198.

Franco, O.L., Riggen, D.J., Melo, F.R., Bloch, C., Silva, C. & Grossi–de–Sa, M.F. 2000. Activity of wheat a–amylase inhibitors towards bruchid á–amylases and structural explanation of observed specificities. European Journal of Biochemistry, 267: 2166–2173.

Ghasemi, M., Jalali Sendi, J. & Zibaee, A. 2018. Effect of casein and zein as additives on some nutritional and immunological indices of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep: Pyralidae). Plant Pest Research, 8(2): 25–39. (In Persian with English summary)

Ghosh, S., Prasad, A.K. & Mukhopadhyay, A. 2018. Effects of feeding regimes on hemocyte counts in two congeners of *Hyposidra* (Lepidoptera: Geometridae). Entomologia Generalis, 1: 73–82.

Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R. & Boulter, D. 1992. Transgenic plants conferring insect tolerance: proteinase inhibitor approach. In: Transgenic Plants, Vol 1. Academic Press, New York, 317–338.

Holly, J.R. & Kent, S. 2009. Ascorbic acid influences the development and immunocompetence of larval *Heliothis virescens*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 133: 57–64.

Jaspers, I., Zhang, W., Brighton, L.E., Carson, J.L., Styblo, M. & Beck, M.A. 2007. Selenium deficiency alters epithelial cell morphology and responses to influenza. Free Radical Biology and Medicine, 42: 1826–1837.

Jones, J.C. & Liu, D.P. 1969. The effects of ligaturing *Galleria mellonella* larvae on total haemocyt counts and on mitotic indices among haemocytes. Journal of Insect Physiology, 15:1703–1708.

Jouanin, L., Bonadé–Bottino, M., Girard, C., Morrot, G. & Giband, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. Plant Science, 131(1): 1–11.

Kanafi, R.R., Ebadi, R., Mirhosseini, S.Z., Seidavi, A.R., Zolfaghari, M. & Etebari, K. 2007. A review on nutritive effect of mulberry leaves enrichment with vitamins on economic traits and biological parameters of silkworm *Bombyx mori* L. Invertebrate Survival Journal, 4: 86–91.

Klowden, M.J. 2007. Physiological systems in insects. 2nd ed. 688 pp. New York, NY: Elsevier.

Koul, O., Singh, G., Sing, R. & Singh, J. 2004. Bioefficacy and mode–of–action of some limonoids of salanin group from *Azadirachta indica, A.* Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. Journal of Bioscience, 29: 409–416.

Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B. & Han, Y.S. 2003. The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 100: 14139–14144.

Lavine, M. & Strand, M. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32: 1295–1309.

www.SID.ir

Archive of SID

Lee, M.H. & Shiau, S.Y. 2003. Increase of dietary vitamin C improves hemocyte respiratory burst response and growth of juvenile grass shrimp, Penaeus monodon, fed with high dietary copper. Fish & Shellfish Immunology, 14: 305–315.

Low, N.H., Vong, V. & Spornest, P. 1986. "A new enzyme, β– glucosidase, in honey bee".Journal of Apical Research, 25: 178–181.

Manjula, P. Lalitha, K., Vengateswari, G., Patil, J., Senthil, S.N. & Shivakumar, M.S. 2020. Effect of *Manihot esculenta* (Crantz) leaf extracts on antioxidant and immune system of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 23: 1–9.

Manjula, P., Lalitha, K. & Shivakumar, M.S. 2020. Diet composition has a differential effect on immune tolerance in insect larvae exposed to Mesorhabditis belari, Enterobacter hormaechei and its metabolites. Journal of Experimental Parasitology, 208: 1–7.

Mason, A.P., Smilanich, A.M. & Singer, M.S. 2014. Reduced consumption of protein–rich foods follows immune challenge in a polyphagous caterpillar. Journal of Experimental Biology, 217(13): 2250–2260.

Moradi–Naserabadi, N**.** 2018. Comparison of Phenol Oxidase enzyme activity in hemocyte cell of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) in three different diets and the effect of *Bacillus thuringiensis* Endotoxin on it. MSc. Thesis. The University of Tabriz. (In Persian with English summary)

Nasirian, R., Naseri, B. & Razmjou, J. 2014. Feeding performance and some biological parameters of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) on artificial diets containing bran of different wheat cultivars. Journal of Crop Protection, 3(3): 295–304.

Nation, J. 2002. Insect Physiology and Biochemistry. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Nouri–Ganbalani, G., Borzoui, E., Nouri, A. & Tajmiri, P. 2017. Effect of different potato cultivars on nutritional indices and activity of some digestive enzymes of *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chrysomelidae). Iranian Journal of Plant Protection Science, 48(1): 109–118.

Oppert, B., Kramer, K.J. & McGaughey, W.H. 1997. Rapid microplate assay of proteinase mixtures. Journal of Biotechnology, 23: 70–72.

Parry, M.W. 1996. A study of the interaction of some fungal metabolites with the insect species *Drosophila melanogaster*. Brikeck, University of London, 215 pp.

Pristavko, V.P. & Dobzhenok, N.V. 1974. Ascorbic acid influence on larval blood cell number and susceptibility to bacterial and fungal infection in the codling moth, *Laspeyresia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Invertebrate Pathology, 24: 165–168.

Srinivasan, R. & Uthamasamy, S. 2005. Trichome density and antibiosis affect resistance of tomato to fruitborer and whitefly under laboratory conditions. Journal of vegetable science, 11(2): 3–17.

Stanley, D. & Miller, J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. Entomologia Experimentalis et Applicata, 119: 1–13.

Tillman, P.G., & Cate, J.R. 1993. Effect of host size on adult size and sex ratio of *Bracon melitor* (Hymenoptera: Braconidae). Environmental Entomology, 22: 1161–1165.

Terra, W.R. & Ferreira, C. 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion. pp. 365–418 in Gilbert, L. I. (Ed.) Insect Molecular Biology and Biochemistry. 563 pp. Academic Press, London.

Tsujita, T., Ninomiya, H. & Okuda, H. 1989. P–nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone–sensitive lipase from bovine adipose tissue. Journal of Lipid Research, 30: 997–1004.

Tungjitwitayakul, J. & Tatun, N. 2019. Hemocyte types based on total and differential counts in *Samia cynthia* ricini (Lepidoptera: Saturnidae) reared on host plants versus an artificial diet. Naresuan University Journal: Science and Technology, 27(3): 82–94.

Vogelweith, F., Moreau, J., Thiéry, D. & Moret, Y. 2015. "Food–mediated modulation of immunity in a phytophagous insect: An effect of nutrition rather than parasitic contamination". Journal of insect physiology, 77: 55–61.

Waldbauer, G.P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. Advances in Insect Physiology, 5: 229–288.

Wintergerst, E.S., Maggini, S. & Horning, D.H. 2006. The immuneenhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. Annals of Nutrition and Metabolism, 50: 85–94.

Yazdanian, M. 2000. Study on growth and fecundity rate of *Anagasta kuehniella* (Lep., Pyralidae) on some dry and wet diets of flor. M.Sc thesis in entomology. Faculty of Agriculture, Tabriz University. (In Persian with English summary)

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of ascorbic acid, sorbitol and mannitol carbohydrates on feeding indices and immune system of *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

Maryam Ajamhassani, Sonia Amiri Jami

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

Corresponding author: Maryam Ajamhassani: shahroodm@gmail.com

Received: May, 19, 2020 7(2) 77-90 Accepted: July, 27, 2020

Abstract

It is proved that nutrients have an important role in growth, reproduction, immune and activity digestive enzyme. If insects feed on suitable and valuable food, they will have a strong immune capacity and could be better against foreign agents. In addition, larval feeding lead to produce of insects that they have high fecundity potention. This is important purpose of rearing of intermediate hosts for parasitoides. So, in the present study, some physiological properties of *Ephestia kuehniella* by feeding with vitamin C and sorbitol and mannitol were determined as a dietary supplement *in vitro*. Condition of rearing was 25±1 ºC, RH=45% and L: D=14:10 h. Treatments were including first treat: flour (99 g) + ascorbic acid (1 g), second treat: flour (97g) +sorbitol (3 g), third treat: flour (97 g) +mannitol (3 g) and forth treat: flour (100 g) as control. Experiments were done with completely randomized design. Relative growth rate (RGR) showed a significant increase in all treatments compared to control. Third instar larvae reared on nutritional diet containing vitamin C and mannitol had the highest efficiency of conversation of ingested food (ECI) (7.66±0.66%) and highest feeding deterrent index (FDI) (37.2±2.72%). The highest index of efficiency of conversation of digested food to biomass (ECD) (16.38±0.9%) was found in larvae fed on diet containing vitamin C. Chymotrypsin activity significantly increased in larvae fed on vitamin C–enriched food. Whereas, the activity of another protease, trypsin, increased by both sugars and vitamin C treatments compared to those of control. Nutritional diets containing sorbitol and mannitol sugars increased the activity of carbohydrase enzymes, alpha (0.74±0.07) and beta glucosidase (0.44±0.008) µmol/min/mg protein compared to other treatments, and decreased lipase activity in larvae fed on diet containing sorbitol (1.3±0.06) and vitamin C (0.6±0.01) µmol/min/mg protein. Mannitol did not have a positive or negative effect on lipase activity. Regarding immunology, injection of *Beauveria bassiana* (isolate 47) to third instar larvae resulted in a significant increase in total blood cell and immunocyte counts 4 h after treatment. In fact, the role of vitamin C was clearer in altering blood cell counts (625±48.7) in mm^3 hemolymph compared with other treatments. The number of blood cells showed a decreasing trend over time up to 24 hours. In general, among the treatments, vitamin C and mannitol sugar can be considered as good choices in the Mediterranean flour moth diet. It seems that improving the quality of the larval food is effective in their digestion, digestive enzymes, and insect physiological defense potential and the objective of rearing of *Ephestia kuehniella* as an alternative host to natural enemies will be achieved more strongly.

Keywords: ascorbic acid, sorbitol and mannitol sugars, physiological properties, Mediterranean flour moth

www.SID.ir