تحقیقات آفات گیاهی
۸- ۱۳۹۷ (۲): ۲۵-۳۹

تاثیر افزودن پروتئین های کازئین و زئین به رژیم غذایی بر برخی از شاخص‌های تغذیه‌ای و ایمنی‌شناختی *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae)

مریم قاسمی[۱]، جلال جلالی سندی[۱*] و آرش زیبایی[۱]
۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۶)

چکیده

تخم‌ها و لاروهای شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae)، به‌طور وسیع در برنامه‌های کنترل بیولوژیک به‌منظور پرورش پارازیتوئیدها و شکارگرها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این پژوهش، واکنش‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سن چهارم همراه با برخی پارامترهای ایمنی‌شناسی *E. kuehniella* روی رژیم غذایی حاوی پروتئین های کازئین و زئین در شرایط آزمایشگاهی بررسی شدند. لاروهای سن چهارم پرورش‌یافته روی رژیم غذایی حاوی پروتئین کازئین بیش‌ترین مقدار نرخ مصرف نسبی (۰/۲±۵/۹) و شاخص رشد نسبی (۰/۳±۱۱/۳) را دارا بودند. بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت لیپاز، تریپسین، الاستاز، کربوکسی پپتیداز و آمینو پپتیداز به‌ترتیب در لاروهای تغذیه کرده از پروتئین‌های کازئین و زئین بود. در بحث ایمنی‌شناسی تزریق توئین و *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin در تیمار با پروتئین کازئین باعث افزایش معنی‌دار تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ماهیت پروتئین موجود در رژیم غذایی اثرات متفاوتی بر سازوکار فیزیولوژی تغذیه و هم‌چنین پاسخ ایمنی دارد.

واژه‌های کلیدی: واکنش‌های تغذیه‌ای، کازئین، زئین، آنزیم‌های گوارشی، ایمنی سلولی

*نویسنده مسئول: jjalali@guilan.ac.ir

مقدمه

شب‌پره آرد یا بید مدیترانه‌ای آرد با نام علمی *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) یکی از مهم‌ترین آفات انباری محسوب می‌شود (Jacob and Cox, 1997). لاروهای این آفت از آرد و مواد نشاسته‌ای و هم‌چنین از میوه‌های خشک تغذیه می‌کنند. این لاروها چنان در آرد فعالیت می‌کنند که آن را غیرقابل مصرف می‌سازند و چون طی دوره تکاملی خود تارهای نازکی می‌تنند در صورت حمله شدید تمام سطح مواد غذایی از این تارها پوشیده می‌شود (Johnson *et al.*, 1997). اگرچه این آفت به صدها محصول انباری با ارزش‌های غذایی و ویژگی‌های فیزیکی متفاوت خسارت وارد می‌کند، اما از تخم بید آرد به‌عنوان یک میزبان جایگزین برای پرورش پارازیتوئیدها و شکارگرهایی مثل *Trichogramma brassicae* (Bezdenko) (Hym.: Trichogrammatidae) و *Orius albidipennis* (Reuter) (Hem.: Anthocoridae) در واحدهای پرورش انبوه استفاده می‌شود (Nasirian *et al.*, 2014). به همین دلیل یکی از ضرورت‌های اساسی در بسیاری از سامانه‌های پرورشی، تولید اقتصادی مقادیر متنابهی از تخم‌های *E. kuehniella* با کیفیت بالا است. همچنین اندازه و کیفیت تخم این آفت به‌عنوان میزبان اثر قابل توجهی بر شایستگی زنبورهای پارازیتوئید دارد (Abroun *et al.*, 2013). تولید انبوه یک میزبان آزمایشگاهی با در نظر گرفتن مسائل اقتصادی همراه با توجه به مسائل زیست‌شناختی حشره مانند میزان نشو و نما، قدرت باروری، نسبت جنسی، درصد مرگ‌ومیر و غیره موجب شده است تا مواد غذایی مختلف جهت پرورش شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مورد آزمایش و بررسی قرار گیرند. در رژیم‌های غذایی مصنوعی، وجود مقادیر بالای پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین ترکیبات غذایی حشرات برای رشد مطلوب حشرات حائز اهمیت بوده است (Panizzi and Parra, 1991) به‌نحوی‌که کیفیت و کمیت این ترکیبات نقش مهمی در ویژگی‌های زیستی، اکولوژیکی و فیزیولوژیکی حشرات دارد (به نقل از بندانی،۱۳۹۲). کیفیت غذا از طریق اندازه‌گیری مقدار غذای خورده شده و هضم شده توسط لارو در قالب شاخص‌های تغذیه‌ای تعیین می‌شود. از آن‌جا که کارایی تبدیل غذای خورده شده و هضم شده به میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی بستگی دارد، به همین جهت ترکیبات موجود در رژیم غذایی مورد استفاده می‌توانند روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز مؤثر باشند. حشرات از آنزیم‌های گروه‌های مختلف به‌منظور هضم مواد غذایی استفاده می‌کنند (Bakker and Woo, 1985). این آنزیم‌ها وظیفه‌ی تجزیه‌ی ماکرومولکول‌ها را داشته و بدین طریق انرژی مورد نیاز را برای رشد و نمو تامین می‌کنند (Jouanin *et al.*, 1998). میزان انرژی به‌دست‌آمده تحت تاثیر کیفیت و کمیت رژیم غذایی مورد استفاده است، به‌نحوی‌که تفاوت در کیفیت و کمیت مواد غذایی موجود در میزبان می‌تواند منجر به افزایش تعداد سنین لاروی و افزایش یا کاهش طول این دوران شود و کارایی سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار دهد. غذاهایی که کیفیت پایینی دارند، موجب کاهش دفعات پوست‌اندازی، نرخ رشد و اندازه بدن خواهند شد و در مقابل کیفیت بالای غذا منجر به این خواهد شد که حشره سیکل زندگی خود را سریع‌تر کامل کرده و به بلوغ برسد (Mullin and Brooks, 1970; Vijverberg, 1989).

در زمینه اثرات رژیم غذایی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی بید مدیترانه‌ای آرد پژوهش‌های گسترده‌ای صورت گرفته است. بیدار (Bidar, 2014) واکنش‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیم‌های گوارشی بید مدیترانه‌ای آرد را روی آرد ارقام مختلف جو مورد بررسی قرار دادد. نتایج نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در شاخص‌های تغذیه‌ای و آنزیم‌های گوارشی لاروهای تغذیه کرده از ارقام مختلف بود. شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای سن پنجم بید مدیترانه‌ای آرد روی آرد نه رقم گندم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج نشان داد لاروهای سن پنجم پرورش‌یافته روی رقم Pishtaz بیش‌ترین کارایی تبدیل غذای خورده شده را دارا بودند (Abdi *et*

al., 2014). جعفرلو و همکاران (Jafarlu *et al.*, 2013) فعالیت آمیلولیتیک روده‌ی میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد را بررسی کردند که بالاترین فعالیت آمیلولیتیک را متعلق به لارو ماده‌ی سن پنجم گزارش کردند. مرادی ناصرآبادی (Moradi-Naserabadi, 2018) خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم فنل‌اکسیداز سلول‌های خونی بید آرد را روی سه رژیم غذایی آرد، سبوس و ترکیب آرد و سبوس مورد مطالعه قرار دادند. سنجش فعالیت فنل اکسیداز در دو رژیم غذایی آرد و ترکیب آرد و سبوس نشان داد که فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در ترکیب آرد و سبوس بالاتر است. به دلیل وجود پروتئین-های پیچیده‌تر در رژیم آرد و سبوس نسبت به رژیم آرد، لاروهای پرورش‌یافته در این رژیم فعالیت فنل اکسیداز بالاتری را به علت فعالیت بالای گلوکز اکسیداز از خود نشان دادند و درنتیجه خسارت واردشده آفت در این رژیم نسبت به رژیم آرد بیشتر است.

علی‌رغم اهمیت تخم و لارو بید مدیترانه‌ای آرد در پرورش دشمنان طبیعی تاکنون تحقیقات چندانی در زمینه تاثیر کیفیت پروتئین موجود در رژیم غذایی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک بید مدیترانه‌ای آرد صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این تحقیق تعیین اثر کیفیت پروتئین‌های کازئین و زئین موجود در جیره غذایی بر شاخص‌های تغذیه‌ای و ایمنی‌شناختی بید مدیترانه‌ای آرد به‌منظور شناسایی بهترین رژیم غذایی است.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

جمعیت اولیه شب‌پره آرد از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور در تهران تهیه و در ظروف پلاستیکی به ابعاد ۹×۱۷ سانتی‌متر روی رژیم غذایی مصنوعی حاوی آرد گندم (۸۰۰ گرم)، مخمر (۱۶۰ گرم)، عسل (۲۰۰ میلی‌لیتر) و گلیسرین خوراکی (۲۰۰ میلی‌لیتر) و در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (Lima *et al.*, 2001). جهت تخم‌گیری از حشرات کامل از قیف‌های تخم‌گیری (قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر) که دهانه‌ها و سوراخ‌های آن با پارچه توری ۱۰ مش مسدود شده بودند، استفاده شد. در ادامه از تخم‌های گذاشته‌شده برای انجام آزمایش استفاده شد.

شاخص‌های تغذیه‌ای

به‌منظور بررسی تاثیر کیفیت دو نوع پروتئین کازئین و زئین به‌صورت مکمل در جیره غذایی بر برخی از شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای شب‌پره آرد، از دو تیمار غذایی به شرح زیر استفاده شد: تیمار اول: آرد گندم+ مخمر+ عسل+ گلیسرین خوراکی+ پروتئین کازئین (۹۷/۵ گرم ماده غذایی+ ۲/۵ گرم پروتئین کازئین)، تیمار دوم: آرد گندم+ مخمر+ عسل+ گلیسرین خوراکی+ پروتئین زئین (۹۷/۵ گرم ماده غذایی+ ۲/۵ گرم پروتئین زئین)، شاهد: آرد گندم+ مخمر+ عسل+ گلیسرین خوراکی (۱۰۰ گرم ماده غذایی). به ازای هر تیمار ۱۰۰ لارو سن اول بیرون آمده از تخم‌های مورد نظر، به‌صورت جداگانه روی رژیم‌های غذایی ذکرشده پرورش داده شدند. آزمایش با ۱۰ تکرار و هر تکرار با ۵ لارو در ۷ روز انجام گرفت. لاروهای سن چهارم تازه پوست‌اندازی کرده (کم‌تر از ۲۴ ساعت) با ترازوی دیجیتال با دقت ۴ رقم اعشار وزن شدند و میانگین وزن هر تکرار به‌صورت جداگانه یادداشت شد. هر دو روز، غذا جایگزین شده و غذای قبلی و فضولات تولیدشده درون آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس وزن شدند. پس از ۷ روز لاروها نیز جمع-آوری شده و درون آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و پس از آن وزن شدند. هم‌چنین برای تصحیح وزن غذا و لاروها، وزن خشک مقداری غذا و تعدادی لارو اندازه‌گیری شد. شاخص‌های تغذیه‌ای لاروهای سن سوم بید مدیترانه‌ای آرد روی دو پروتئین کازئین و زئین با استفاده از رابطه‌های ۱ تا ۵ محاسبه شدند (Waldbauer, 1968):

(۱) شاخص قابلیت هضم نسبی

$$AD = 100 (E – F)/E$$

(۲) کارایی تبدیل غذای خورده شده به بیوماس حشره

$$ECI =100 P/E$$

(۳) کارایی تبدیل غذای هضم شده به بیوماس حشره

$$ECD= 100 P/(E-F)$$

(۴) نرخ رشد نسبی

$$RGR = P/TA$$

(۵) شاخص مصرف نسبی

$$RCR = E/AT$$

تهیه عصاره آنزیمی

برای آزمون بیوشیمیایی، ابتدا لاروهای سن پنجم بید مدیترانه‌ای آرد که به‌مدت ۷ روز با رژیم غذایی حاوی پروتئین تیمار شده بودند به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. برای استخراج آنزیم از کل بدن استفاده شد. به این صورت که کل بدن لارو تیمار شده با استفاده از هموژنایزر دستی در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر هموژنایز شده و درنهایت نمونه‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند و مایع رونشین به‌عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین فعالیت تری گلیسرید- لیپاز

اندازه‌گیری فعالیت تری گلیسرید-لیپاز با استفاده از روش سوجیتا و همکاران (Tsujita *et al.*, 1989) انجام شد. بیست میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۴۰ میکرولیتر پارانیتروفنیل بوتیرات (*p*-nitrophenyl butyrate) ۲۷ میلی‌مولار (به‌عنوان سوبسترا) با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷، ۲۰ میلی‌مولار) ترکیب شده و به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از این مدت، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم یک مولار به هر میکروتیوپ برای توقف واکنش اضافه شد و جذب در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

سرین پروتئینازها (اندوپپتیدازها)

فعالیت پروتئینازهای تریپسین و الاستاز به‌عنوان دو زیرگروه از سرین پروتئینازها با استفاده از غلظت یک میلی مولار از BApNA (Nabenzoyl- L- arginine- *p*- nitroanilide) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین و SAAApNA (N- succinyl- alanine- alanine- alanine- *p*- nitroanilide) به‌عنوان سوبسترای اختصاصی الاستاز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۳۵ میکرولیتر بافر تریس-هیدروکلراید (اسیدیته ۹)، ۲۰ میکرولیتر از سوبستراهای ذکر شده و ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی بود (Oppert *et al.*, 1997). مخلوط واکنش به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شده و درنهایت در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

اگزوپپتیدازها

فعالیت دو اگزوپپتیداز با استفاده از دو ترکیب Hippuryl- L- Arginine و Hippuryl- L- Phenilalanine به‌ترتیب به‌عنوان سوبستراهای اختصاصی کربوکسی و آمینوپپتیداز اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از سوبستراهای ذکر شده و ۵ میکرولیتر محلول آنزیمی به ۳۵ میکرولیتر بافر تریس-هیدروکلرید (اسیدیته ۸) اضافه شده و پس از ۱۰ دقیقه جذب در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد (Oppert *et al.*, 1997).

روش محاسبه و واحدهای آنزیم‌ها

واحد اندازه‌گیری برای امیلاز، لیپاز و پروتئاز اختصاصی به‌صورت U/mg protein است که با در نظر گرفتن ضریب خاموشی غلظت پروتئین و سایر فاکتورهای آزمایش در قالب فرمول تعریف‌شده محاسبه شد. برای پروتئاز کل صرفا جذب گزارش شده است.

ایمنی‌شناسی

بررسی اثر کیفیت پروتئین موجود در رژیم غذایی بر سیستم ایمنی لاروهای بید مدیترانه‌ای آرد در دو گروه تیمار انجام شد. گروه اول و دوم لاروهایی بودند که از سن اول تا رسیدن به سن چهارم در رژیم غذایی فاقد پروتئین پرورش یافتند، اما به‌محض تبدیل‌شدن به سن چهارم به ترتیب در رژیم غذایی حاوی پروتئین کازئین و زئین تغذیه شدند. این روند تا رسیدن به سن پنجم لاروی ادامه یافت. هرکدام از گروه‌های فوق به سه زیرگروه تقسیم شدند. زیرگروه اول دست‌نخورده،

زیرگروه دوم و سوم به ترتیب با محلول توین ۸۰ و غلظت $۱۰^{۴}$ اسپور بر میلی‌لیتر قارچ *Beauveria bassian* isolate Fashandتوسط سرنگ انسولین تزریق شد. پس از ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت ۱۰ میکرولیتر از همولمف لاروها گرفته شده و تعداد کل و تفکیک‌شده سلول‌های خونی ارزیابی شد (Haine *et al.*, 2008). در هر گروه از ۶۰ لارو در سه تکرار استفاده شد.

شمارش کل (THC) و تفرقی (DHC) سلول‌های خونی

جهت تعیین اثر اسپورهای قارچی بر تعداد سلول‌های خونی، یک میکرولیتر از محلول توین ۸۰ حاوی غلظت $۱۰^{۴}$ از اسپورهای قارچی جدایه‌ی فشند، به حدفاصل دومین و سومین پای ناحیه شکمی لارو سن پنج بید مدیترانه‌ای آرد تزریق شد. در ضمن از محلول توین ۸۰ به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس محل زخم به‌منظور جلوگیری از خروج همولمف با پارافین مذاب پوشانده شد. پس از گذشت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تزریق موارد ذکرشده، همولمف از حداقل ۵ لارو در هر بازه زمانی برای هر تیمار با لوله مویین جمع‌آوری شده و در میکروتیوپ‌های حاوی ۶۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد (۰/۰۹۸ M NaOH، ۰/۱۸۶ M NaCL، ۰/۰۱۷ M EDTA، ۰/۰۴۱ M اسیدسیتریک، pH ۴/۵) به نسبت ۱ به ۳ ریخته شد. تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها توسط لام نئوبار شمارش شدند. برای شمارش تفرقی سلول‌های خونی ابتدا سطح شکمی لاروها با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شده، سپس با بریدن پای کاذب مقدار ۵ میکرولیتر همولمف جمع‌آوری شد. شمارش تفرقی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus BH-2 و با شمارش ۲۰۰ سلول از چهار گوشه لام انجام شد. THC و DHC در سه تکرار و هر تکرار با ۱۰ لاور انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج

بررسی اثر پروتئین موجود در جیره غذایی بر شاخص‌های تغذیه‌ای بید مدیترانه‌ای آرد

در پژوهش حاضر مشخص شد که کاربرد دو پروتئین کازئین و زئین اثر معنی‌داری بر مقدار شاخص‌های تغذیه‌ای لارو سن سوم بید مدیترانه‌ای آرد دارد. بیش‌ترین مقدار نرخ مصرف نسبی (۵/۹±۰/۲) در لاروهای تغذیه کرده از جیره غذایی حاوی پروتئین کازئین و کم‌ترین مقدار آن (۱/۰۵±۰/۰۱) در گروه کنترل مشاهده شد. بیش‌ترین (۹/۶±۰/۰۲) و کم‌ترین (۰/۷±۰/۲) شاخص بازدهی تبدیل غذای هضم شده به زیست‌توده نیز به ترتیب در لاروهای تغذیه کرده از پروتئین کازئین و گروه کنترل مشاهده شد. بیش‌ترین شاخص رشد نسبی (۱۱/۳±۰/۳) در افراد تغذیه کرده از پروتئین کازئین بود. این در حالی بود که بین افراد تغذیه کرده از پروتئین زئین و گروه کنترل در مقدار شاخص رشد نسبی تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. مقدار شاخص هضم‌پذیری نسبی و بازدهی تبدیل غذای بلعیده‌شده در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین بیش‌تر بود، هرچند این تفاوت از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با لاروهای تیمار شده با پروتئین زئین و گروه کنترل نداشت (جدول ۱).

جدول ۱- شاخص‌های تغذیه‌ای لارو سن چهارم شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* پس از تیمار با پروتئین های کازئین و زئین

Table 1. Nutritional indices of fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* after treatment with Casein and Zein proteins

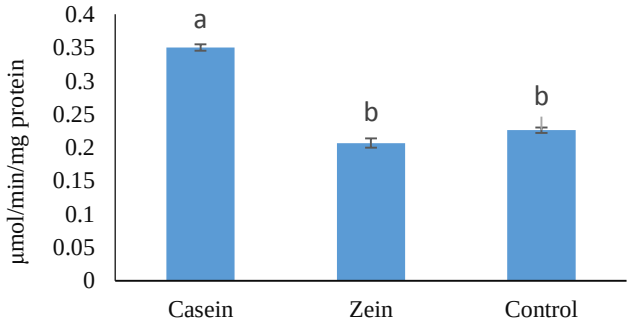
Treatment	RCR*(mg/mg/day)	RGR(mg/mg/day)	ECI(%)	ECD(%)	AD(%)
Casein	5.9±0.2a	11.2±0.2a	0.9±0.2a	9.6±0.02a	98.7±0.01a
Zein	3.5±0.1b	7.9±0.1b	0.9±0.1a	3.1±0.1b	98.8±0.06a
Control	1.05±0.01c	5.9±0.2b	0.8±0.1a	0.7±0.2c	98.2±0.04a

Data with similar letters in each row are not significantly different ($p \leq 0.05$); * RCR; Relative consumption Rate; RGR –relative growth rate; ECI– efficiency of conversion of ingested food; ECD – efficiency of conversion of digested food; AD – approximate digestibility

بررسی اثر پروتئین موجود در جیره غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی شب‌پره آرد

فعالیت لیپاز در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین و زئین در شکل ۱ نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم در تیمار با پروتئین کازئین نسبت به تیمار با پروتئین زئین و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد.

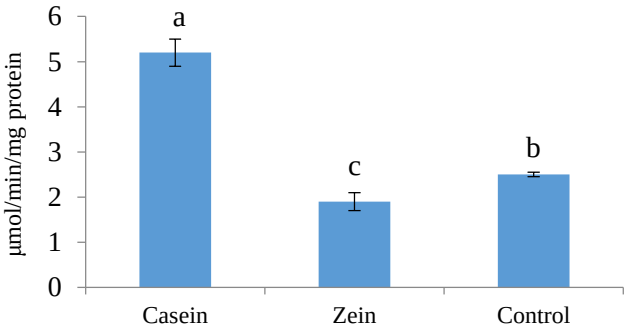
فعالیت آنزیم تریپسین در تیمار با پروتئین کازئین نسبت به تیمار با پروتئین زئین و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. فعالیت تریپسین در لاروهای تیمار شده با پروتئین زئین نسبت به شاهد کاهش یافت. این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۲).



شکل ۱- تاثیر پروتئین کازئین و زئین بر فعالیت آنزیم لیپاز شب‌پره آرد

Figure 1. The effect of Casein and Zein proteins on *Ephestia kuehniella* lipase activity

Different letters show statistical differences among means (Tukey test, $p \leq 0.05$)



شکل ۲- تاثیر پروتئین کازئین و زئین بر فعالیت آنزیم تریپسین شب‌پره آرد

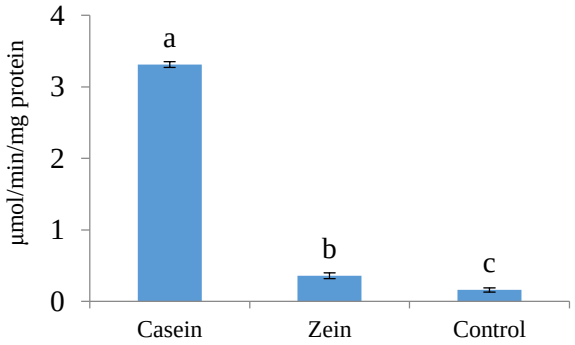
Figure 2. The effect of Casein and Zein proteins on *Ephestia kuehniella* tripsine activity

Different letters show statistical differences among means (Tukey test, $p \leq 0.05$)

فعالیت الاستاز در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین و زئین در شکل ۳ نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم در تیمار با پروتئین کازئین و زئین نسبت به شاهد افزایش معنی-داری نشان داد. این در حالی بود که فعالیت تریپسین در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین نسبت به زئین افزایش یافت. این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود.

فعالیت کربوکسی‌پپتیداز در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین و زئین در شکل ۴ نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم در تیمار با پروتئین کازئین نسبت به تیمار با پروتئین زئین و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. فعالیت کربوکسی‌پپتیداز در شاهد نسبت به زئین بالاتر بود.

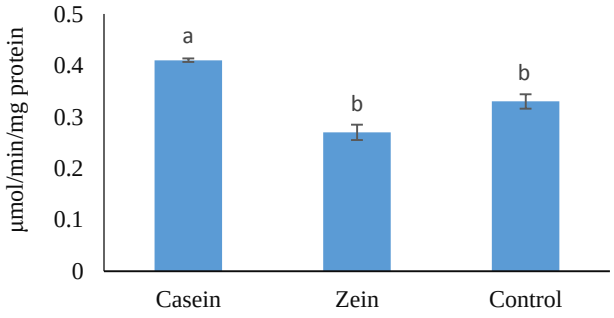
فعالیت آمینوپپتیداز در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین و زئین در شکل ۵ نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم در تیمار با پروتئین کازئین و زئین نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.



شکل ۳- تاثیر پروتئین کازئین و زئین بر فعالیت آنزیم الاستاز شب‌پره آرد

Figure 3. The effect of Casein and Zein proteins on *Ephestia kuehniella* elastase activity

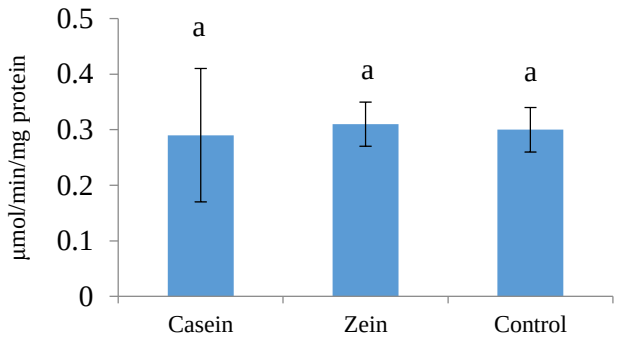
Different letters show statistical differences among means (Tukey test, $p \leq 0.05$)



شکل ۴- تاثیر پروتئین کازئین و زئین بر فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز شب‌پره آرد

Figure 4. The effect of Casein and Zein proteins on *Ephestia kuehniella* carboxy peptidase activity

Different letters show statistical differences among means (Tukey test, $p \leq 0.05$)



شکل ۵- تاثیر پروتئین کازئین و زئین بر فعالیت آنزیم آمینو پپتیداز شب‌پره آرد

Figure 5. The effect of Casein and Zein proteins on *Ephestia kuehniella* amino peptidase activity

Different letters show statistical differences among means (Tukey test, $p \leq 0.05$)

بررسی اثر پروتئین موجود در جیره غذایی بر سامانه ایمنی بید مدیترانه‌ای آرد

در بررسی کل سلول‌های خونی در تیمار ۷ روزه لاروهای بید مدیترانه‌ای آرد ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار شدن با قارچ *B. bassiana*، افزایش معنی‌داری در لاروهای تیمار شده با جیره غذایی حاوی پروتئین کازئین نسبت به شاهد و لاروهای تیمار شده با پروتئین زئین مشاهده شد. کم‌ترین تعداد سلول‌های خونی در افرادی مشاهده شد که با پروتئین زئین تیمار شده بودند.

طبق جدول ۳ و ۴ بیش‌ترین تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار با پروتئین کازئین مشاهده شد. تعداد گرانولوسیت‌ها در افراد تیمار شده با پروتئین زئین نسبت به شاهد در همه بازه‌های زمانی مورد مطالعه کاهش یافت.

جدول ۲- اثر پروتئین کازئین و زئین بر میانگین± خطای معیار شمارش کل سلول‌های خونی (THC)

Table 2. The effect of Casein and Zein proteins on total hemocytes count (THC)

Treatment		6	12	24	48
Control	Intact	165±7.07b	150±7.07b	240±4.08b	155±4.08a
Casein	Intact	345±7.07a	275±24.83a	555±12.24a	245±22.73a
Zein	Intact	95±17.79c	80±17.79b	200±16.32c	70±14.71c
Control	Tween	260±14.71b	240±25.49b	425±24.83ab	260±24.83b
Casein	Tween	610±26.7a	435±28.28a	520±42.62a	405±18.70a
Zein	Tween	145±4.08c	125±4.08b	265±18.70b	135±7.07c
Control	Fungi	470±17.79b	325±24.83b	535±17.79b	380±32.65ab
Casein	Fungi	855±32.4a	610±26.77a	1110±32.40a	505±29.43a
Zein	Fungi	290±14.71c	230±10.80b	335±14.71c	260±10.80b

Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey's test, P<0.05).

جدول ۳- اثر پروتئین کازئین و زئین بر میانگین± خطای معیار تعدادگرانولوسیت‌ها

Table 3. The effect of Casein and Zein proteins on granulocyte number

Treatment		6	12	24	48
Control	Intact	95±4.08b	105±7.07a	185±28.57b	60±18.70b
Casein	Intact	195±12.24a	155±31.88a	335±17.79a	170±16.32a
Zein	Intact	50±14.71b	55±10.80a	130±22.73b	40±14.71b
Control	Tween	150±12.24b	135±18.70b	250±21.60b	150±30.82a
Casein	Tween	360±25.49a	255±25.49a	380±29.43a	245±14.71a
Zein	Tween	55±8.16c	120±21.21b	175±17.79b	125±17.79a
Control	Fungi	235±10.80b	205±4.08b	335±24.83b	195±18.70b
Casein	Fungi	500±40.82a	445±60.96a	655±72.57a	325±18.70a
Zein	Fungi	140±10.80b	135±14.14b	180±18.70b	165±18.70b

Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey's test, P<0.05).

جدول ۴- اثر پروتئین کازئین و زئین بر میانگین± خطای معیار تعداد پلاسماتوسیت‌ها

Table 4. The effect of Casein and Zein proteins on plasmatocyte number

Treatment		6	12	24	48
Control	Intact	70±4.08b	50±4.08b	125±26.77b	155±14.71ab
Casein	Intact	150±7.07a	120±7.07a	140±8.16a	275±21.21a
Zein	Intact	45±7.07b	40±8.16b	60±7.07b	135±37.41b
Control	Tween	110±16.32b	105±14.14b	130±17.79a	275±90.92a
Casein	Tween	250±4.08a	165±7.07a	220±14.71a	285±60.96
Zein	Tween	90±12.24b	40±8.16c	75±7.07a	140±10.80a
Control	Fungi	225±18.70b	120±7.07b	200±21.60b	340±35.59b
Casein	Fungi	355±10.80a	180±7.07a	455±44.90a	785±45.46a
Zein	Fungi	150±7.07c	95±10.80b	155±10.80b	170±32.65b

Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey's test, P<0.05).

بحث

رشد و نمو، بقا و نرخ تولید مثل حشرات روی گیاهان مختلف متفاوت بوده و در انتخاب میزبان‌های گیاهی توسط حشرات تعیین‌کننده می‌باشند. رشد حشرات تا اندازه‌ای به توانایی تغذیه‌ای آن ها و استفاده‌ی بهینه از ترکیبات مواد غذایی استفاده‌شده بستگی دارد و اختلاف در مقدار تغذیه، اندازه استقرار آن‌ها را روی میزبان‌های گیاهی مختلف تحت تاثیر قرار می‌دهد (Singh *et al.*, 1988). نرخ مصرف نسبی (RCR) شاخصی است که در اندازه‌گیری سرعت بهره‌برداری حشره از غذا به کار می‌رود و ارتباط بین نرخ تغذیه و وزن حشره در زمان مشخص را نشان می‌دهد (Rezaei *et al.*, 2001). نرخ مصرف نسبی در حشرات به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی گیاه میزبان ازجمله میزان پروتئین بستگی دارد (Srinivasan and Uthamasamy, 2005). در پژوهش حاضر، بیش‌ترین نرخ مصرف نسبی لاروها درمجموع سنین لاروی در افرادی دیده شد که با پروتئین کازئین تیمار شده بودند که این امر ممکن است به علت وجود مواد غذایی مطلوب‌تر برای لارو باشد. پژوهشگران بر این باورند که نرخ مصرف نسبی غذا ارتباط نزدیکی با قابلیت هضم غذا و بازدهی تبدیل غذای بلعیده‌شده داشته (Batista Pereira *et al.*, 2002) و افزایش میزان مصرف غذا می‌تواند نشان‌دهنده بالا بودن ارزش غذایی میزبان مورد تغذیه باشد (Nathan *et al.*, 2005). بنابراین می‌توان این‌گونه استنباط کرد که بالا بودن

نرخ مصرف نسبی روی رژیم غذایی حاوی پروتئین کازئین ممکن است به دلیل کیفیت بالای این رژیم غذایی برای تبدیل به بافت بدن لارو باشد.

نرخ رشد نسبی (RGR) تابعی از افزایش وزن بدن موجود زنده است (Srinivasan and Uthamasamy, 2005). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیش‌ترین نرخ رشد نسبی مجموع سنین لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در افرادی است که روی پروتئین کازئین تغذیه کرده‌اند که این امر نشان‌دهنده مطلوبیت بیشتر عناصر غذایی موجود در این رژیم غذایی برای رشد شب‌پره آرد است. کاهش نرخ رشد نسبی در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی حاوی پروتئین زئین نسبت به کازئین می‌تواند ناشی از کاهش نرخ مصرف نسبی و کارایی تبدیل غذای بلعیده‌شده یا هر دو باشد (Lazarevic *et al.*, 2003). به همین دلیل می‌توان گفت پایین بودن میزان ECI روی رژیم غذایی حاوی پروتئین زئین از دلایل اصلی پایین بودن شاخص RGR در این جیره غذایی است. یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تغذیه‌ای، بازدهی غذای بلعیده‌شده (ECI) است که در تعیین کیفیت غذا برای حشره به کار می‌رود. در حقیقت این شاخص قابلیت استفاده از غذای بلعیده‌شده برای رشد و تولید بافت را نشان می‌دهد (Koul *et al.*, 2004). در این پژوهش میزان ECI در لاروهایی تغذیه کرده از جیره غذایی حاوی پروتئین کازئین بیش‌تر بود، هرچند این تفاوت معنی‌دار نبود. این نکته بیان‌گر آن است که ترکیبات موجود در این جیره غذایی قابلیت بیش‌تری برای تبدیل‌شدن به بافت بدن لاروهای بید مدیترانه‌ای آرد در مقایسه با دیگر رژیم‌های غذایی مورد مطالعه داشته است (Abisgold and Simpson, 1987).

ECD شاخص مهمی در ارتباط با سودمندی غذای هضم شده است. کارایی تبدیل غذای هضم شده مشخص‌کننده بخشی از غذای جذب شده است که درواقع به بافت زنده‌ی حشره تبدیل می‌شود. غذاهای با کارایی تبدیل پایین اغلب ممکن است برای حشره نامطلوب بوده و یا هزینه‌ی هضم و جذب مواد غذایی آن‌ها بالا باشد. کارایی تبدیل غذای هضم شده‌ی بالاتر نشان‌دهنده‌ی مطلوبیت غذا است (Koul *et al.*, 2004). لذا بالا بودن کارایی تبدیل غذای هضم شده‌ی مربوط به رژیم غذایی حاوی پروتئین کازئین نسبت به رژیم غذایی حاوی پروتئین زئین و شاهد نشان‌دهنده کیفیت بهتر غذا و هم‌چنین وجود مواد غذایی لازم برای حشره در پروتئین کازئین است. به‌هرحال تغییر در ECD نشان‌دهنده افزایش یا کاهش نسبی هضم غذای متابولیزه برای تولید انرژی است. بالا بودن این عامل در رژیم غذایی حاوی پروتئین نشان‌دهنده آن است که لاروهای بید مدیترانه‌ای آرد روی این رژیم غذایی بهتر توانسته‌اند از غذای متابولیزه شده در تولید بافت بدن استفاده کنند.

در پژوهش حاضر، بیش‌ترین مقدار شاخص تقریبی هضم شوندگی (AD) درمجموع سنین لاروی بید مدیترانه‌ای آرد روی رژیم غذایی حاوی پروتئین کازئین بود. این شاخص نشان‌دهنده میزان جذب غذا از طریق دیواره معده است. مقادیر متفاوت شاخص AD روی رژیم‌های غذایی مختلف مورد مطالعه می‌تواند ناشی از عواملی مانند تفاوت در میزان مواد غذایی، میزان الیاف و مقدار آب موجود در بافت میزبان باشد (Srinivasan and Uthamasamy, 2005).

کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های محلول، به‌طور مؤثر توسط حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد و بسیاری از گونه‌های حشرات بیشتر مواد مغذی خود را از این مواد به دست می‌آورند. در حشرات میزان استفاده از مواد مغذی، تاثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی دارد و این آنزیم‌ها مسئولیت تامین انرژی و تغذیه برای نشو و نمای حشره را بر عهده دارند. بنابراین برای در دسترس بودن مواد مغذی مورد نیاز، تنظیم ترشح آنزیم‌های گوارشی ضروری است (به نقل از بندانی، ۱۳۹۲).

آنزیم لیپاز باعث شکسته شدن پیوندهای کربوکسیل استر در تری آسیل گلیسرول‌ها، فسفولیپیدها و گالاکتولیپیدها می‌شود. این گروه از آنزیم‌ها در ذخیره، استفاده و تحرک لیپیدها

در حشرات نقش اساسی دارند. هم‌چنین لیپازها زیربنای بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی حشرات مانند رشدونمو، تولید مثل و دفاع در مقابلبیمارگرها هستند (Chapman, 1998). تحقیق حاضر نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم لیپاز در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری با شاهد دارد. فعالیت آنزیم لیپاز در لاروهای تیمار شده با پروتئین زئین نسبت به شاهد کاهش یافت و این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود. افزایش فعالیت آنزیم لیپاز در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین احتمالا ناشی از وجود مقادیر قابل توجهی از مواد مغذی مانند اسیدهای چرب و کلسترول در این پروتئین است (Vanderzant, 1966).

هیدرولیز پیوند پپتیدی در حشرات به عهده‌ی گروهی از آنزیم‌ها موسوم به پروتئازها است. توانایی پروتئازها در هیدرولیز پیوندهای پپتیدی با یکدیگر متفاوت است. این آنزیم‌ها اهمیت زیادی در هضم مواد پروتئینی خورده شده توسط حشره را بر عهده دارند که پروتئین‌های غذا را به اسیدهای آمینه مورد نیاز حشره تجزیه می‌کنند، اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه با مهار هضم پروتئین به‌عنوان یک هدف کلیدی به‌منظور استفاده در کنترل حشرات آفت است (Hilder *et al.*, 1992). در بسیاری از حشرات به‌ویژه بالپولک داران، تریپسین، کیمو تریپسین و الاستاز آنزیم‌های اصلی هضم پروتئین هستند.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در لاروهای تیمار شده با پروتئین کازئین نسب به شاهد و افراد تیمار شده با پروتئین زئین افزایش یافته است. عابدی و همکاران (Abedi *et al.*, 2014) در بررسی اثر چهار رقم گندم بر فعالیت فیزیولوژیکی شب‌پره آرد نشان دادند که به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت پروتئولیتیک لاروها روی رقم N-86-7 و N-80-19 بود. نوری قنبلانی و همکاران (Nouri-Ganbalani *et al.*, 2017) بالاترین فعالیت پروتئولیتیک را در لاروهای *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.: Chrysomelidae) که روی ارقام اگریا، سانته و لوتا سیب‌زمینی تغذیه کرده بودند، گزارش کردند. حشره ترشح آنزیم‌های پروتئاز را بر مبنای میزان پروتئین غذا انجام می‌دهد. اگر افزایش فعالیت را معادل افزایش ترشح در نظر بگیریم، این‌چنین نتیجه‌گیری می‌شود که هرچه پروتئین غذا بالا رود، حشره فعالیت پروتئازی را افزایش داده تا بیشترین استخراج پروتئین صورت گیرد و در جایی که میزان پروتئین کاهش یافته، حشره با مقدار کم آنزیمی نیز توانسته استخراج تمام اسیدآمینه‌های ضروری را انجام دهد و بنابراین نیازی به ترشح بیش‌تر آنزیمی نبوده است. نتایج نشان داد که بالاترین فعالیت پروتئازی در لاروهای تغذیه‌شده با پروتئین کازئین بود که احتمالا دلیل آن بالا بودن کیفیت این پروتئین است.

سامانه ایمنی ذاتی در حشرات آخرین و مهم‌ترین بازدارنده‌ی دفاعی است که بیمارگرها یا انگل‌های حشرات با آن روبرو می‌شوند و اغلب نقشی تعیین‌کننده در بقای حشرات دارد. این سامانه از دو بخش سلولی و هومرال تشکیل شده است که به‌صورت هم‌افزایی برای کنترل گسترش آلودگی عمل می‌کنند. ایمنی سلولی شامل بیگانه‌خواری، تشکیل کپسول و گره است که توسط انواع سلول‌های خاص انجام می‌گیرد، درحالی‌که ایمنی هومرال شامل چندین عامل است که بین آن‌ها پپتیدهای ضدمیکروبی و اجزای سامانه پروفنل اکسیداز اهمیت بالایی دارند (Bulet and Stöcklin, 2005). سلول‌های خونی رکن اصلی واکنش‌های ایمنی سلولی حشرات به عوامل میکروبی را تشکیل داده (Lavine and Satrand, 2002) و تغییر در تعداد کل سلول‌های خونی حشرات، توانایی سامانه ایمنی حشرات در بروز واکنش‌هایی از قبیل بیگانه‌خواری، تشکیل گره و هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز را به شکل معنی‌داری تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این رابطه پایش تعداد سلول‌های خونی به‌عنوان ملاکی برای اندازه‌گیری استرس در بسیاری از بی‌مهرگان پیشنهاد شده است (Mayrand *et al.*, 2005; Correia, 2008).

رژیم غذایی حاوی پروتئین با کیفیت پایین منجر به افزایش مرگ‌ومیر، کاهش رشد، به تاخیر افتادن نرخ رشد و کاهش تولید مثل می‌شود (Felton, 1996; Lee, 2007). نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نشان داد که کیفیت پروتئین موجود در رژیم غذایی می‌تواند واکنش ایمنی حشرات را در مقابل بیمارگرهای قارچی تحت تاثیر قرار دهد. تعداد کل سلول‌های خونی ، تعداد گرانولوسیت‌ها و تعداد پلاسماتوسیت‌ها در لاروهایی که با رژیم غذایی حاوی پروتئین کازئین تیمار شده بودند افزایش و با گذشت زمان کاهش یافت. این در حالی بود که تعداد سلول‌های خونی در لاروهای تیمار شده با پروتئین زئین در تمام بازه‌های زمانی نسبت به شاهد کاهش یافت. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش با نتایج به‌دست‌آمده توسط لی و همکاران (Lee *et al.*, 2008) در تطابق بود. آن‌ها نشان دادند که آن دسته از لاروهای *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lep.: Noctuidae) که از رژیم غذایی با کیفیت حاوی پروتئین کازئین تغذیه کردند، دارای نرخ زنده‌مانی و رشد سریع‌تری در مقایسه با لاروهایی بودند که بر رژیم غذایی کم کیفیت حاوی پروتئین زئین رشد یافتند. هم‌چنین فعالیت ضد میکروبی در لاروهای تغذیه کرده از کازئین افزایش یافت. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان این‌گونه استنباط کرد که اندک زمانی پس از ورود قارچ بیمارگر به حفره عمومی لارو *E. kuehniella*، سامانه دفاع یاخته‌ای تحریک شده و شمار کل یاخته‌های خونی در واکنش به آن بی‌درنگ افزایش یافته است. شمارش افتراقی یاخته‌های خونی در همان فاصله زمانی نشان داد که قسمت عمده افزایش تراکم یاخته‌های خونی مربوط به انواع گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها است. گرانولوسیت‌ها، یاخته‌های به‌شدت چسبنده هستند که شمار زیادی مولکول‌های شناسایی کننده تولید می‌کنند که عمل شناسایی عامل بیگانه را ساده و آسان می‌کند. بنابراین، افزایش مشاهده شده در شمار گرانولوسیت‌ها طی زمان اولیه‌ی ورود قارچ بیمارگر، نشان‌دهنده عملکرد آن در فعال‌سازی سامانه دفاعی حشره در برابر عامل بیرونی است (Beckage, 2008) و هم‌چنین پلاسماتوسیت‌ها در کنار گرانولوسیت‌ها به‌عنوان یاخته‌های خونی مهم دخیل در پاسخ ایمنی حشرات شناخته شده‌اند (Pech and Strand, 1996). با گذشت زمان حضور قارچ بیمارگر در هموسل حشره منجر به کاهش شمار کل یاخته‌های خونی و به دنبال آن شمار پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها شد، افزایش فعالیت سامانه ایمنی در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی با پروتئین کازئین احتمالا ناشی از کیفیت بالای این پروتئین است زیرا تحقیقات قبلی نشان داده است که رژیم غذایی حاوی پروتئین با کیفیت بالا منجر به افزایش عملکرد سامانه ایمنی می‌شود.

با مقایسه‌ی شاخص‌های تغذیه‌ای، فیزیولوژی آنزیم‌های گوارشی و سامانه ایمنی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد روی جیره‌ی غذایی حاوی پروتئین می‌توان اذعان نمود که کم‌ترین تعداد سلول‌های خونی در لاروهای پرورش‌یافته روی رژیم غذایی حاوی پروتئین زئین بود که حاکی از نامناسب بودن این پروتئین برای پرورش *E. kuehniella* است. از آن‌جا که بالاترین بازدهی تبدیل غذای بلعیده‌شده و تعداد کل و تفکیک‌شده سلول‌های خونی روی جیره غذایی حاوی پروتئین کازئین بود، لذا می‌توان این پروتئین را به‌عنوان ترکیب مناسب در رژیم غذایی برای تغذیه و پرورش انبوه *E. kuehniella* معرفی کرد.

References

Abdi, A., Naseri, B. and 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.

Abisgold, J. D. and Simpson, S. J. 1987. The physiology of compensation by locusts for changes in dietary protein. **Journal of Experimental Biology** 129: 329-346.

Abroun, P., Mousavi, S. Gh., Ashouri, A. and Gishani, H. 2013. Effect of different quality of *Ephestia kuehniella* on the parasitism of *Trichogramma brassicae*. The 1st National Conference on Sustainable Agriculture and Natural Resources. 1-8. (in Farsi)

Baker, J. E. and Woo, S. M. 1985. Purification and partial characterization and postembryonic levels of amylase from *Sitophilus orizae* and *Sitophilus granarius*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 2: 415-428.

Bandani, A. 2013. Insect Physiology (Digestion, Excretion, Symbiont Microorganisms and Metabolism). 2nd Edition. University of Tehran Press. 459.

Batista Pereira, G. L., Petacci, F., Fernandes, B. J., Correa, A. G., Vieira, P. C., Fatima da Silva, M. and Malaspina, O. 2002. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science** 58: 503-507.

Beckage, N. E. 2008 Insect Immunology, Academic Press. California.

Bidar, F. 2014. Nutritional reaction and digestive enzymes activity of *Ephestia kuhnila* Zeller (Lep: Pyralidae) on flour of different cultivars. Msc., thesis. The University of Mohagegh Ardebili. (In Farsi)

Bulet, P. and Stocklin, R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and Peptide Letters** 12(1): 3-11.

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

Correia, A. A. 2008. Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Felton, G. W. 1996. Nutritive quality of plant protein: sources of variation and insect herbivore responses. **Insect Biochemistry Physiology** 32: 107-130.

Haine, E. R., Pollitt, L. C., Moret, Y., Siva-Jothy, M. T. and Rolff, J. 2008. Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). **Journal of Insect Physiology** 54(6): 1090-1097.

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

Jacob, T. A. and Cox, P. D. 1977**.** The influence of temperature and humidity on the life-cycle of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research** 13: 107-118.

Jafarlu, M., **Farshbaf Pourabad, R. and Valizadeh, M.** 2013. Effect of Different Compounds on Midgut α-Amylase Activity of the Mediterranean Flour Moth, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep., Pyralidae). **Applied research in plant protection** 2: 1. (In Farsi).

Johnson, J. A., Valero, K. A. and Hannel, M. M. 1997. Effect of low temperature storage on survival and reproduction of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Crop Protection** 16: 519-523.

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

Koul, O., Singh, G., Sing, R. and 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.

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

Lazarevic, J. and Peric-Mataruga, V. 2003. Nutritive stress effects on growth and digestive physiology of *Lymantria dispar* larvae. **Yugoslav Medical Biochemistry** 22: 53-59.

Lee, K. P. 2007. The interactive effects of protein quality and macronutrient imbalance on nutrient balancing in an insect herbivore. **Journal of Experimental Biology** 210: 3236-3244.

Lee, K. P., Simpson, S. J. and Wilson, K. 2008. Dietary protein -quality influences melanization and immune function in an insect. **Functional Ecology** 22: 1052-1061.

Mayrand, E., St-Jena, S. D. and Courtenay, S. C. 2005. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? **Aquaculture Research** 36: 962-971.

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 Farsi)

Mullin, M. M. and Brooks, J. E. R. 1970. Growth and metabolism of two planktonic, marine copepods as influenced by temperature and type of food. In Steele J. H. (ed.), *Marine Food Chains.* University of California Press, Berkeley, CA, pp. 74-95.

Nasirian, R., Naseri, B. and 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.

Nathan, S. S., Chung, P. G. and Murugan, K. 2005. Effect of biopesticides applied separately or together on nutritional indices of the rice leaf older *Cnaphalocrocis medinalis*. **Phytoparasitica** 33: 187-195.

Nouri-Ganbalani, G., Borzoui, E., Nouri, A. and 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. and McGaughey, **W. H.** 1997. Rapid microplate assay of proteinase mixtures. **Journal of Biotechnology** 23: 70-72.

Panizzi, A. R. and Parra, J. R. P. 1991. Ecologia nutricional de insetos esua aplicacao no manejo de Pragas. Manole/ CNPq, Sao Paula, 359 p.

Pech, L. L. and Strand, M. R. 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science** 109(8): 2053-2060.

Rezaei, A. M. and Soltani, A. 2001. Potato Crop Cultivation. SID Publisher. (3th ed). 179 p.

Singh, O. P. and Parihar, S. B. B. 1988. Effect of different hosts on the development of *Heliothis armigera* Hub. **Bulletin of Entomology** 29: 168-172.

Srinivasan, R. and 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.

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

Vanderzant, E. S. 1966. Development, significance and application of artificial diet for insect. **Annual Review of Entomology** 19: 139-405.

Vijverberg, J. 1989. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and in situ conditions. a review**. Freshwater Biology** 21, 317-373.

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

Plant Pest Research
2018- 8(2): 25-39

Effect of casein and zein as additives on some nutritional and immunological indices of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep: Pyralidae)

M. Ghasemi[1], J. Jalali Sendi[1*] and A. Zibaee[1]
1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan

(Received: July 23, 2018 -Accepted: August 28, 2018)

Abstract

The eggs and larvae of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* (Zell.), are widely used to rear parasitoids and predators for biological control programs. In this study, nutritional responses and digestive enzymes activities of the fourth instar larvae, as well as some immunological parameters of *E. kuehniella*, were studied on the diet containing casein and zein proteins under laboratory conditions. The fourth larval instar reared on diet containing casein had the highest relative rate of consumption (5.9 ± 0.2) and relative growth rate (11.3 ± 0.3). The highest and the lowest activity of lipase, tripcine, elastase, carboxypeptidase and aminopeptidase in larvae fed were on casein and zein proteins. In the immunological study, injection of tween and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in larvae treated by casein protein significantly increased the total number of hemocyte and the number of granulocytes and plasmatocytes. This study indicated that the nature of the protein in the diet effects on physiological mechanisms of feeding and affect the immune response.

Key words: Feeding indices, Casein, Zein, Digestive enzyme, Cellular immunity

*Corresponding author: jjalali@guilan.ac.ir