



علمی پژوهشی

## تأثیر اگزیندول و حشره کش بیولوژیک بایولپ® بر سمیت، شاخص‌های تغذیه‌ای، آنزیم‌های گوارشی و ذخایر انرژی کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hubner (Lep.: Noctuidae)

عادل باغبان<sup>۱</sup>، غلامحسین مروج<sup>۱\*</sup> و جلال جلالی سندی<sup>۲</sup>

۱- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، ۲- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۲۳)

### چکیده

اگزیندول (Oxindole) یک مهار کننده سیگنال ایکوزانوئید است و سامانه ایمنی در حشرات را مهار می‌کند. یکی از مهم‌ترین مشکلات عوامل بیولوژیک نظیر باکتری *Bacillus thuringiensis* Kurstaki (BtK) کارایی پایین و کندی اثرگذاری آن‌ها است. در این تحقیق اثر اگزیندول و فرآورده بیولوژیک بایولپ® بر پایه BtK، روی سمیت، شاخص‌های تغذیه‌ای، ذخایر انرژی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی کرم قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera* Hubner (Lep.: Noctuidae)) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اگزیندول باعث افزایش تلفات لاروها و کاهش  $LC_{50}$  و  $LT_{50}$  بایولپ® شد. شاخص‌های تغذیه‌ای کرم قوزه پنبه تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده باکتری و اگزیندول تغییر یافت. در غلظت ۰/۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم غذا نسبت به شاهد، نرخ رشد نسبی کاهش و شاخص قابلیت هضم شونده افزایش نشان داد. کاربرد اگزیندول همراه با باکتری باعث کاهش فعالیت آنزیم گوارشی لیپاز نیز شد. گلیکوژن به عنوان یک منبع ذخیره انرژی در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم غذا همراه با غلظت زیرکشنده بایولپ® نسبت به غلظت زیرکشنده بایولپ® به تنهایی، کاهش نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد با افزودن اگزیندول به عنوان یک بازدارنده سیگنال ایکوزانوئید و سامانه ایمنی به رژیم غذایی کرم قوزه پنبه، اثرگذاری حشره کش بایولپ® افزایش یافته و فیزیولوژی تغذیه آفت تحت تأثیر قرار گرفت.

**واژه‌های کلیدی:** اگزیندول، ذخایر انرژی، زیست سنجی، شاخص تغذیه، کرم قوزه پنبه

## مقدمه

کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hubner یکی از آفات مهم پنبه و سایر محصولات زراعی است. این آفت دارای چهار ویژگی مانند چندین خوار بودن، قدرت تحرک خیلی زیاد، قدرت باروری بالا و وجود دیاپوز<sup>۱</sup> اختیاری است که باعث می شود به عنوان آفت مهم تلقی شده و سالانه برای کنترل این آفت چندین مرتبه مزارع مختلف سم پاشی می شوند (Matthews, 1999) که باعث آلودگی های زیست محیطی، بیماری های مختلف در انسان و از بین رفتن جانوران و حشرات مفید و غیر هدف می شود (Sharma and Singhvi, 2017).

باکتری *Bacillus thuringiensis* Kurstaki (BtK) به عنوان مهم ترین و شاخص ترین عامل کنترل بیولوژیک آفات گیاهی شناخته می شود و آفت کش های بر پایه این باکتری ۵۵ درصد از بازار آفت کش های زیستی را تشکیل می دهند (Jallouli et al., 2020). این باکتری روی راسته های دوبالان<sup>۲</sup>، بال پولکداران<sup>۳</sup> و سخت بالپوشان<sup>۴</sup> اثر می گذارد و قدرت بیماری زایی آن با توجه به جدایه، کریستال پروتئینی، توکسین هایی که تولید می کند و گونه حشره متفاوت است (Kogan and Bajwa, 1999). آفت کش های بیولوژیک مختلفی بر پایه اسپور و کریستال های این باکتری علیه آفات مختلف به ویژه بال-پولکداران تولید و مورد استفاده قرار گرفته است (Carrière et al., 2015). فرآورده های این باکتری سالیانه در چندین میلیون هکتار علیه بال پولکداران آفت محصولات کشاورزی، جنگلی و محصولات انباری مورد استفاده قرار می گیرد. این باکتری در مرحله اسپورزایی یک یا چند کریستال درون سلولی تولید می کند که خاصیت حشره کشی دارند، ولی برای انسان، مهره داران و گیاهان غیر سمی است و به راحتی تجزیه می شود (Xu et al., 2014). یکی از راه کارهای جدید و اثرگذار در مدیریت آفات و حفاظت از گیاهان، ترکیب چند عامل با یک دیگر

است که اگر مواد اثر متفاوتی داشته باشند میزان مقاومت آفات، دز مصرفی و هزینه را کاهش می دهد (Sudo et al., 2018). کاربرد هم زمان باکتری BtK و حشره کش گیاهی آزادیراختین<sup>۵</sup> روی پروانه سفید آمریکایی *Hyphantria cunea* Drury و سنین مختلف سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* Say باعث اثر تشدید کنندگی باکتری BtK شد (Igrc Barčić et al., 2006; Alimohamadian et al., 2022). ترکیب BtK و قارچ بیمارگر حشرات - *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Fungi: Ascomycota) روی سوسک کلرادوی سیب زمینی نیز نشان داد اثر هر کدام به تنهایی بسیار کم تر از اثر کاربرد هم زمان آنها است (Wraight and Ramos, 2005).

ایکوزانوئید طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه اکسیژنازی اسید آراشیدونیک و دو اسید چرب غیر اشباع ۲۰ کربنه دیگر را شامل می شود که فعالیت های بیولوژیک خاصی را انجام می دهند (Stanley, 2011). پس از ورود عامل بیگانه به همولنف حشرات و اتصال به گیرنده های سطح هموسیت های همولنف، در اولین مرحله در داخل هموسیت ها، آنزیم فسفولیپاز A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) فسفولیپید غشای سلول را به اسید آراشیدونیک هیدرولیز می کند. سپس بسته به فرآیندهای خاص آنزیمی در هموسیت ها، اسید آراشیدونیک ممکن است به عنوان سوبسترا در سامانه سیکلوژناز<sup>۶</sup> یا لپوکسیژناز<sup>۷</sup> مورد استفاده قرار گیرد. سامانه های بیان شده منجر به تولید فرآورده هایی می شود که در واکنش های ضد التهابی با ایجاد پاسخ ایمنی مناسب نسبت به عوامل بیگانه در حشرات دخیل هستند (Kim and Stanley, 2021).

بررسی ها نشان داده است که دو روش برای سرکوب یا بازدارندگی پاسخ ایمنی حشره وجود دارد. اولین روش، فعالیت روی خاموشی ژن های کدکننده آنزیم های فعال در سیگنال ایکوزانوئید است. این پژوهش ها با توجه به هزینه

1. Diapause
2. Diptera
3. Lepidoptera
4. Coleopteran

5. Azadirachtin
6. Cyclooxygenases (COX)
7. Lipoxygenases (LOX)

FGV) که شامل سه پپتید فیل الانین، گلايسين و والين است، در بازار وجود ندارد (Sadekuzzaman and Kim, 2017). در سال ۲۰۱۲ سئو و همکاران (Seo et al., 2012) عنوان کردند که Oxindole استخراج شده از باکتری *X. nematophila* همراه با باکتری *Bacillus thuringiensis* درصد مرگ و میر بالاتری را نسبت به دیگر متابولیت‌ها همچون Indole و BZA (Benzylideneacetone) روی شب‌پره پشت الماسی (*Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) دارد، اما BZA قدرت مهارکنندگی بیشتری روی فعالیت آنزیم PLA<sub>2</sub> و فنل اکسیداز نسبت Oxindole دارد. همچنین، در بازدارندگی فرآیند گره‌زایی، Oxindole موثرتر از BZA بود. ایوم و همکاران (Eom et al., 2014) پس از بررسی متابولیت‌های استخراج شده از باکتری همزیست نماتد *X. S. carpocapsae* باکتری *nematophila* بیان کردند که Oxindole به عنوان اولین ماده، بازدارنده سنتز ایکوزانویید است و دیگر متابولیت‌ها پس از فعال شدن این متابولیت توانایی از بین بردن برگ-خوار چغندر قند (*Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) را دارند. در این تحقیق عنوان شد که BZA و PY (proline-tyrosine) به صورت اختصاصی باعث تجزیه هموسیت‌شدند.

بررسی‌های انجام گرفته در رابطه با مهارکننده‌های سامانه ایکوزانویید روی سامانه ایمنی در همولنف حشرات تمرکز داشته‌اند، اما در زمان استفاده از عامل بیولوژیکی همچون BtK اولین پاسخ ایمنی در معده میانی اتفاق می‌افتد (Bravo et al., 2011). زمانی که BtK وارد معده میانی می‌شود، سلول‌های پوششی معده میانی در پاسخ به حضور باکتری در فضای معده شروع به تولید و ترشح پپتیدهای ضد میکروبی می‌کنند. تولید پپتیدهای ضد میکروبی به دلیل فعال شدن سیگنال ایکوزانویید است (Kim and Lee, 2014). پپتیدهای ضد میکروبی موجب بیان ترکیبات اکسیژنی واکنش‌زا می‌شوند و اولین خط دفاعی نسبت به باکتری

فراوان و کاربرد دشوار آن در کشاورزی در حد آزمایش‌های *in vitro* انجام شده و تاکنون بازده چندانی نداشته است. دومین روش، استفاده از مهارکننده مختص این آنزیم‌ها در حشرات است (Stanley, 2011). تاکنون مهارکننده آنزیم مهم PLA<sub>2</sub> به عنوان موتور محرک سیگنال ایکوزانویید ماده‌ای به نام دگزامتازون<sup>۱</sup> بوده است که یک داروی غیر استروئیدی از خانواده NSAIDS است و برای پستانداران، به‌ویژه انسان کاربرد دارد. پس از بررسی‌های مولکولی مختلف مشخص شد توالی ژن کد کننده آنزیم‌های دخیل در شکل‌گیری سیگنال ایکوزانویید در پستانداران و حشرات با یکدیگر بسیار متفاوت هستند. همین امر باعث شد که روی این ماده به عنوان یک بازدارنده اختصاصی سیگنال ایکوزانویید در حشرات استفاده نشود (Sadekuzzaman and Kim, 2017).

باکتری (*Xenorhabdus nematophila* (Bacteria: Enterobacteriaceae) یک باکتری گرم منفی همزیست نماتد بیمارگر حشرات، *Steinernema carpocapsae* (Steinernematidae) است. نماتد این توانایی را دارد که از اسپیراکل‌ها، دهان و مخرج وارد بدن حشرات شده و پس از ورود، باکتری همزیست را از طریق لوله گوارش خود وارد بدن حشره کند (Kaya and Gaugler, 1993). باکتری با ترشح متابولیت‌های سرکوب‌کننده ایمنی هم از خود و هم از نماتد در برابر ایمنی سلولی و هیومرال حشره محافظت می‌کند و در نهایت، باکتری پس از نزدیک به ۱۶ ساعت باعث مرگ حشره می‌شود (Eom et al., 2014). تاکنون ۸ نوع متابولیت مختلف از *X. nematophila* استخراج شده است (Seo et al., 2012) که از این تعداد ۷ متابولیت Oxindole، Indole، Benzylideneacetone، Hydroxypropionic acid (BZA)، Hydroxyphenylacetic acid، Cyclo-Pro-Tyr، H- Pro-tyr و Pro-Tyr-OH در بازار به صورت تجاری موجود است و Acetylated Phe-Gly-Val (Ac-

1. Dexamethasone
2. Non-steroidal anti-inflammatory drugs

استوانه‌ای به ارتفاع ۳۵ سانتی‌متر و قطر ۲۵ سانتی‌متر که توسط توری پوشیده شده بود پرورش داده شدند. برای تحریک تخم‌ریزی نیز از برگ شمعدانی در ظروف استفاده شد. به منظور هم‌سن‌سازی، روزانه توری‌هایی که تخم‌ریزی روی آن‌ها انجام شده بود جدا شده و تا تفریح تخم‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی نگه‌داری شدند. پس از تفریح تخم‌ها، لاروهای نئونات روزانه به ظروف غذای مصنوعی منتقل شده و تا ابتدای سن سوم به صورت دسته‌جمعی و بعد از آن برای جلوگیری از هم‌خواری<sup>۱</sup> به صورت انفرادی در ظروف به ابعاد ۱۰×۵×۵ سانتی‌متر نگه‌داری می‌شدند.

### آزمایش‌های زیست‌سنجی

در آزمایش‌های زیست‌سنجی برای تیمار کرم قوزه پنبه با حشره کش بیولوژیک بایولپ® و اگزیندول از روش ناون و همکاران (Navon *et al.*, 1990) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا غذای مصنوعی تهیه و غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۵ و ۰/۱ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی به غذا اضافه شد. مقدار اگزیندول تولید شده توسط باکتری همزیست نماتدهای بیمارگر حشرات کم است (۹ میکروگرم اگزیندول بر لیتر) (Seo *et al.*, 2012) و این مقدار به صورت تغذیه‌ای اثری نشان نداد؛ به همین دلیل مقادیر انتخاب‌شده با توجه به گزارش‌های مختلف از اگزیندول در گیاه پنجه‌گره (*Uncaria tomentosa* (Rubiaceae)) انتخاب شدند (Yunis Aguinaga *et al.*, 2014). از دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) به عنوان حلال اگزیندول استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌گرم اگزیندول در ۱۰ میلی‌لیتر DMSO حل و در آزمایش‌های مختلف استفاده شد. در غلظت صفر اگزیندول فقط از DMSO استفاده شد. آگار به صورت جداگانه حرارت داده و به غذای مصنوعی افزوده شد. سپس، غذای مصنوعی وارد حمام بن ماری با دمای ۳۷ درجه سلسیوس شد و غلظت‌های مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر / کیلوگرم غذای مصنوعی حشره کش بایولپ® در غذای مصنوعی حل شد. به محض اضافه کردن محلول حاوی بایولپ® غذا از حمام

BtK فعال می‌شود (Sajjadian and Kim, 2020). این سامانه، سامانه اکسیدازی دوگانه روده ناشی از باکتری (DUOX)<sup>۱</sup> نامیده می‌شود. فعال‌کننده این خط دفاعی در معده میانی سیگنال ایکوزانوئید است. زمانی که این سیگنال مهار شود به دلیل اختلال در تولید پپتیدهای ضد میکروبی و ترکیبات اکسیژنی واکنش‌زا، امکان خسارت توسط باکتری به سلول‌های معده بیشتر شده و ورود باکتری به همولنف سریع‌تر اتفاق می‌افتد (Sajjadian and Kim, 2020). در تحقیق حاضر، با توجه به اهمیت استفاده از عوامل بیولوژیک و روش‌های نوین برای کنترل آفات، اثر تشدیدکنندگی اگزیندول به صورت گوارشی روی بیماری باکتری BtK در مرگ‌ومیر، شاخص‌های زیستی و فیزیولوژی تغذیه کرم قوزه پنبه مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### ترکیبات مورد استفاده در آزمایش‌ها

آفت کش بیولوژیک بایولپ® بر پایه اسپور و کریستال‌های پروتئینی باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* از شرکت بایوران (ایران، کرج) تهیه شد. اتانول ۹۶٪ و اسید سولفوریک ساخت شرکت Merck و اگزیندول، پی‌نیترو فنیل آلفا گلو کوپیرانوزید و پی نیترو فنیل بتا گلو کوپیرانوزید، دی نیترو سالیسیلیک اسید، پی نیترو فنیل بوتیرات، آزوکازین و دی متیل سولفو کساید ساخت شرکت Sigma-Aldrich بود.

#### جمع‌آوری و پرورش کرم قوزه پنبه

در اواخر فصل بهار و اوایل فصل تابستان سال ۱۳۹۸ لاروهای سنین مختلف کرم قوزه پنبه از مزارع گوجه فرنگی آستانه اشرفیه در استان گیلان جمع‌آوری شدند. کلنی در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۶±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵±۱۰ درصد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی روی غذای مصنوعی (Shorey and Hale, 1965) در گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان پرورش داده شد. حشرات بالغ برای تخم‌ریزی در ظروفی

بن ماری خارج شد تا دمای بالا بر باکتری تاثیر منفی نگذارد. غذا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد و سپس، لاروهای سن سه (شش روز پس از تفریخ از تخم) که ۲۴ چهار ساعت گرسنگی داده شده بودند، با غذای مصنوعی تغذیه شدند. ۴۸ ساعت پس از تیمار تلفات ثبت شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی در ۴ تیمار اگزیندول و هر تیمار با ۱۰ غلظت از حشره‌کش بایولپ<sup>®</sup> انجام گرفت.

برای اندازه‌گیری  $LT_{50}$ ، از غلظت  $LC_{50}$  به دست آمده در آزمایش‌های زیست‌سنجی که برابر با ۶/۱۴۳ میلی‌لیتر بایولپ<sup>®</sup> در کیلوگرم ماده غذایی بود و غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵، ۰/۰۵ استفاده شد. برای اندازه‌گیری  $LT_{50}$  روزانه تلفات لاروها تا ۷۲ ساعت یادداشت شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی برای به دست آوردن  $LC_{50}$  در سه تکرار و هر تکرار با ۱۰ لارو انجام شد و آزمایش‌های  $LT_{50}$  در سه تکرار و هر تکرار با ۱۵ لارو انجام گرفت.

برای تعیین شاخص‌های تغذیه از فرمول‌های ارائه شده توسط ولدباثر (Waldbauer, 1968) استفاده شد. شاخص‌های اندازه‌گیری شده شامل شاخص درصد قابلیت هضم نسبی، درصد کارایی غذای خورده شده به بیوماس حشره، درصد کارایی غذای هضم شده، نرخ رشد نسبی و نرخ مصرف نسبی<sup>۵</sup> بودند. برای محاسبه شاخص درصد قابلیت هضم نسبی از فرمول  $AD\% = 100 \times (E-F)/E$  استفاده شد که در آن E وزن خشک غذای خورده شده و F وزن خشک فضولات تولید شده بود. شاخص درصد کارایی غذای خورده شده به بیوماس حشره ( $ECI\%$ ) بر اساس فرمول  $ECI\% = 100 \times P/E$  محاسبه شد. در این فرمول، P وزن خشک بیوماس لارو است. برای ارزیابی درصد کارایی غذای هضم شده ( $ECD\%$ ) از فرمول

### اندازه‌گیری شاخص‌های تغذیه

برای اندازه‌گیری شاخص‌های تغذیه از فرمول  $ECD\% = 100 \times P/E - F$  استفاده شد. برای محاسبه نرخ رشد نسبی از فرمول  $RGR = P/TA$  استفاده شد که در آن، T مدت زمان آزمایش و A میانگین وزن خشک لاروها در مدت زمان T بود. همچنین برای محاسبه نرخ مصرف نسبی (RCR) از فرمول  $RCR = E/AT$  استفاده شد. لاروهای سن سوم تازه پوست‌اندازی کرده (کم‌تر از ۲۴ ساعت) با ترازوی دیجیتال با دقت ۴ رقم اعشار توزین و میانگین وزن هر تکرار به صورت جداگانه یادداشت شد. غذای مصنوعی حاوی غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ گرم اگزیندول، به علاوه غلظت زیرکشنده از آفت‌کش بیولوژیک بایولپ<sup>®</sup> ( $LC_{30} = 1.837 \text{ ml/kg diet}$ ) و همچنین، شاهد به صورت تویی شکل وزن شده و در اختیار لاروها قرار گرفت. هر روز، غذا جایگزین شده و غذای قبلی و فضولات تولید شده درون آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس وزن شدند. پس از ۳ روز لاروها نیز جمع‌آوری و درون آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و سپس وزن شدند. برای تصحیح وزن غذا و لاروها، وزن خشک مقداری غذا و تعدادی لارو اندازه‌گیری شد. آزمایش شاخص‌های تغذیه در ۳ تکرار و هر تکرار با ۱۰ لارو انجام گرفت.

### آزمایش‌های بیوشیمیایی

لاروهای سن سوم ۲۴ ساعته روی غذای مصنوعی حاوی آفت‌کش بیولوژیک بایولپ<sup>®</sup> با غلظت زیرکشنده ( $LC_{30} = 1.837 \text{ ml/kg diet}$ ) و اگزیندول قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت تغذیه برای استخراج درشت مولکول‌ها<sup>۶</sup> (پروتئین، تری‌گلیسرید و گلیکوژن) از کل بدن لارو استفاده شد. کل بدن لاروهای تیمار شده با استفاده از یک همزن دستی داخل آب مقطر همگن شدند و سپس، در  $19000 \times g$  به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. قسمت رویی نمونه‌ها به‌عنوان منبع آنزیمی جدا و داخل میکروتیوب‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Rahimi et al., 2018).

1. Approximate Digestibility (AD%)
2. Efficiency of Conversion Ingested food (ECI%)
3. Efficiency of Conversion Digested food (ECD%)
4. Relative Growth Rate (RGR)
5. Relative Consumption Rate (RCR)

### اندازه گیری میزان تری گلیسرید

اندازه گیری میزان تری گلیسرید به روش فوساتی و پرنسیپ (Fossati and Prencipe, 1982) و استفاده از کیت بیوشیمیایی شرکت زیست کم انجام شد. در این روش تری گلیسرید توسط آنزیم لیپاز هیدرولیز شده و اسیدهای چرب و گلیسرول آزاد می‌کند. سپس، طی مراحل، پراکسید هیدروژن آزاد می‌شود که با ۴-آمینوآنتی پیرین و فنل و در مجاورت آنزیم پراکسیداز کمپلکس رنگی کینونیمین تشکیل می‌شود. ۷۰ میکرولیتر معرف با ۱۰ میکرولیتر محلول رونشین (۱۰ میکرولیتر آب مقطر در مورد بلانک) داخل چاهک دستگاه ایزا ریدر ریخته شد و پس از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نوری در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

### اندازه گیری میزان پروتئین کل

میزان پروتئین با روش لوری و همکاران (Lowry, 1951) و با استفاده از کیت بیوشیمیایی شرکت بیو کم اندازه گیری شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر معرف بر پایه یون‌های مس و معرف فولین سیوکالتوا همراه ۲۰ میکرولیتر (۲۰ میکرولیتر آب مقطر در مورد بلانک) محلول رونشین به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس، جذب با استفاده از دستگاه ایزا ریدر در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

### اندازه گیری آنزیم‌های گوارشی

#### فعالیت آلفا-آمیلاز گوارشی

از روش برنفلد (Bernfeld, 1955) برای سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گوارشی استفاده شد. در این روش از محلول نشاسته یک درصد به عنوان سوبسترا استفاده شد. ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی به همراه ۲۰ میکرولیتر سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در آون قرار گرفت. سپس، با اضافه کردن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) واکنش متوقف شد و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش در بن‌ماری قرار داده شد.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی، لاروهای تیمار شده روی یخ بی‌حس شدند و لوله گوارش آن‌ها خارج شد. لوله گوارش داخل میکروتیوب قرار داده شد و پس از اضافه کردن ۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر، به وسیله همزن دستی همگن شدند. سپس، در  $19000 \times g$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رونشین در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی نگهداری شد (Rahimi et al., 2018). تمام آزمون‌های بیوشیمیایی در سه تکرار و هر تکرار با ۱۰ لارو انجام شد. در زمان اندازه گیری جذب نمونه، جذب در سه تکرار به علاوه بلانک خوانده شد.

### اندازه گیری ذخایر انرژی

#### اندازه گیری میزان گلیکوژن

برای اندازه گیری میزان گلیکوژن از روش چان و این (Chun and Yin, 1998) استفاده شد. در این روش، ۵۰۰ میکرولیتر  $KOH/Na_2SO_4$  به میکروتیوب حاوی لارو تیمار شده کرم قوزه پنبه اضافه شد و ۳۰ دقیقه در آب جوش در حمام بن‌ماری قرار گرفت. پس از آن، نمونه‌ها ورتکس و روی یخ نگهداری شدند. برای حذف اثر قند از ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد استفاده شد. پس از آن نمونه‌ها ورتکس و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در  $19000 \times g$  سانتریفیوژ شدند. مایع رونشین هر میکروتیوب خالی و سپس به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و تا حل شدن ورتکس شد. پس از آن به هر یک از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر فنول ۵ درصد اضافه شد و ۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۹۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد و به سرعت به آن اسید سولفوریک ( $H_2SO_4$ ) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی ظرف یخ انکوبه شدند. در نهایت، در هر چاهک‌ها ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه ریخته شد و جذب طول موج در ۴۹۰ نانومتر با دستگاه ایزا ریدر (Stat fax 3200) خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد گلیکوژن از غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرو گرم گلیکوژن بر میلی لیتر استفاده شد.

آلفا گلوکوپیرانوزید ۵ میلی مولار به عنوان سوبسترا برای آلفا گلوکوزیداز و پی نیتروفیل بتا گلوکوپیرانوزید ۵ میلی مولار به عنوان سوبسترای بتا گلوکوزیداز انکوبه شد. سپس، به هر کدام از محلول‌ها ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط الیزا ریدر خوانده شد. فعالیت آنزیم به صورت جذب بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. منحنی استاندارد پروتئین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) رسم شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های زیست‌سنجی از نرم افزار آماری Polo-Plus استفاده شد. آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) روی داده‌های حاصل از شاخص‌های تغذیه‌ای، ذخایر انرژی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد توسط نرم‌افزار SAS انجام شد.

### نتایج

#### تأثیر غلظت‌های مختلف اگزیندول و آفت کش

**بیولوژیک بایولپ® بر زیست‌سنجی کرم قوزه پنبه**  
جدول ۱ تجزیه پروبیت و نتایج حاصل از اندازه‌گیری LC<sub>50</sub> در غلظت‌های مختلف اگزیندول و آفت کش بیولوژیک بایولپ® را نشان می‌دهد. LC<sub>50</sub> آفت کش بایولپ® روی لارو سن سوم کرم قوزه پنبه پس از ۴۸ ساعت برابر با ۶/۱۴۳ میلی‌لیتر بر کیلوگرم ماده غذایی برآورد شد. با افزودن غلظت‌های مختلف اگزیندول به غذای مصنوعی، میزان LC<sub>50</sub> کاهش یافت؛ به طوری که در غلظت ۰/۰۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی برابر با ۴/۱۸۹ میلی‌لیتر بایولپ® بر کیلوگرم ماده غذایی، در غلظت ۰/۱ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی برابر با ۲/۳۸۹ میلی‌لیتر بایولپ® بر کیلوگرم ماده غذایی و در غلظت ۰/۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی برابر با ۲/۱۶ میلی‌لیتر بایولپ® بر کیلوگرم ماده غذایی اندازه‌گیری شد. جدول ۲ تجزیه پروبیت و نتایج حاصل از اندازه‌گیری LT<sub>50</sub> حشره-

فعالیت آنزیم به صورت جذب در ۵۴۰ نانومتر بر میزان پروتئین نمونه گزارش شد.

### فعالیت لیپاز

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز مطابق روش سوچیتا و همکاران (Tsuji et al., 1989) صورت گرفت. در این روش مقدار ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی و ۱۰ میکرولیتر *p*-نیترو فیل بوتیرات (۵۰ میلی‌مولار) به عنوان سوبسترا به همراه ۱۷۲ میکرولیتر بافر Tris-HCl (۱ مولار) (اسیدیته ۷) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه و ۱۵۰ میکرولیتر NaOH به محلول اضافه شده و در نهایت، جذب تحت طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم به صورت میزان جذب نمونه تقسیم بر میزان پروتئین به عنوان منبع آنزیمی ارائه شده است.

### فعالیت پروتئین‌های عمومی

برای تعیین فعالیت پروتئین‌های عمومی از سوبسترای آزوکازئین یک درصد بر اساس روش گارسیا و هارد (García-carreño and Haard, 1993) استفاده شد. برای اندازه‌گیری چاهک حاوی ۱۵ میکرولیتر بافر Tris-HCl (۲ میلی‌مولار) و ۵۰ میکرولیتر آزوکازئین ۱ درصد و ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود. پس از ۳ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس در آون هیدرولیز پروتئین آزوکازئین با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف شد. برای بلانک از تری کلرواستیک اسید و آزوکازئین استفاده شد. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه حفظ در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس دوباره با سرعت  $19000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت، پس از مخلوط کردن محلول آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر از هیدروکسید سدیم ۲ مولار، فعالیت آنزیم در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم به صورت میزان جذب در ۴۴۰ نانومتر تقسیم بر مقدار پروتئین نمونه گزارش شد.

### فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز

فعالیت این آنزیم‌ها با استفاده از روش سیلوا و ترا (Silva and Terra, 1995) انجام شد. بدین ترتیب ۱۵ میکرولیتر محلول آنزیمی همراه با ۳۰ میکرولیتر پی نیتروفیل

۴۶/۵۲، در غلظت ۰/۱ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی برابر با ۳۷/۳۱ و در غلظت ۰/۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی برابر با ۳۴/۵۱ ساعت تعیین شد.

کش بیولوژیک بایولپ<sup>®</sup> را تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اگزیندول نشان می‌دهد. LT<sub>50</sub> آفت کش بیولوژیک بایولپ<sup>®</sup> در غلظت ۶/۱۴۳ برابر با ۴۹/۸۷ ساعت اندازه گیری شد. با افزودن اگزیندول، LT<sub>50</sub> کاهش پیدا کرد و در غلظت ۰/۰۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی برابر با

جدول ۱- داده‌های مربوط به برآورد غلظت‌های کشنده (میلی لیتر بر کیلوگرم غذا) بایولپ<sup>®</sup> تحت تاثیر غلظت‌های مختلف

اگزیندول روی لاروسن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* پس از ۴۸ ساعت

Table 1. Data related to the estimation of lethal concentrations (ml/kg diet) of Biolep<sup>®</sup> under the influence of different oxindole concentrations against the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera* after 48h

Oxindole concentration (g/kg diet)	Biolep <sup>®</sup> Lethal concentration (ml/ kg diet)			Slope ± SE	X <sup>2</sup> (df)
	LC <sub>30</sub> (95% CL)	LC <sub>50</sub> (95% CL)	LC <sub>90</sub> (95% CL)		
Control	1.84 (1.12-2.72)	6.14 (4.25-9.02)	117.37 (61.32-306.42)	1.00 ± 0.11	1.315 (8)
0.05	1.47 (0.94-2.10)	4.19 (3.00-5.85)	54.19 (31.89-115.41)	1.15 ± 0.12	4.419 (8)
0.1	0.85 (0.51-1.24)	2.39 (1.68-3.31)	30.01 (18.25-61.05)	1.17 ± 0.13	6.384 (8)
0.5	0.74 (0.43-1.10)	2.16 (1.49-3.03)	29.99 (18.02-62.27)	1.12 ± 0.12	5.102 (8)

LC= lethal concentration (ml/ kg diet), CL= confidence limit, SE= standard error, X<sup>2</sup> = chi-square, df = degree of freedom

جدول ۲- برآورد زمان لازم برای کشندگی (ساعت) در سمیت LC<sub>50</sub> بایولپ<sup>®</sup> تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اگزیندول روی

لاروسن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Table 2. Estimation of lethal time values (hour) in the toxicity of Biolep<sup>®</sup> (at LC<sub>50</sub>) under the influence of different oxindole concentrations against the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*

Treatment (concentration)	Lethal time (hour)		Slope ± SE	X <sup>2</sup> (df)
	LT <sub>30</sub> (95% CL)	LT <sub>50</sub> (95% CL)		
Biolep <sup>®</sup> (LC <sub>50</sub> )	36.77 (30.78- 41.80)	49.88 (43.99-57.61)	3.96 ± 0.64	0.568 (4)
Biolep <sup>®</sup> & Oxindole (LC <sub>50</sub> & 0.05 g/kg diet)	34.22 (28.41-39.03)	46.52 (40.95- 53.30)	3.93 ± 0.61	0.839 (4)
Biolep <sup>®</sup> & Oxindole (LC <sub>50</sub> & 0.1 g/kg diet)	28.39 (23.65-32.33)	37.31 (32.82- 41.89)	4.42 ± 0.59	1.881 (4)
Biolep <sup>®</sup> & Oxindole (LC <sub>50</sub> & 0.5 g/kg diet)	26.64 (19.26-32.14)	34.52 (27.80- 41.10)	4.66 ± 0.61	4.7142 (4)

LT= lethal time (hour), CL= confidence limit, SE= standard error, X<sup>2</sup> = chi-square, df = degree of freedom



تاثیر اگزیندول و غلظت زیرکشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ® بر شاخص‌های تغذیه‌ای کرم قوزه پنبه

جدول ۳ نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های تغذیه را نشان می‌دهد. نرخ رشد نسبی (RGR) در تیمار با آفت‌کش بایولپ® نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. همچنین، با افزودن اگزیندول به غذای حشره نرخ رشد نسبی کاهش داشت که در ۰/۵ گرم اگزیندول این مقدار با تیمار آفت‌کش بایولپ® کاهش معنی‌دار داشت (F= 65.84; df = 4; P<0.0001). نرخ مصرف نسبی (RCR) در تیمار با آفت‌کش بیولوژیک بایولپ® نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. همچنین، با افزودن ۰/۵ گرم اگزیندول به غذای مصنوعی حاوی غلظت زیرکشنده بایولپ، نرخ مصرف نسبی (RCR) به طور معنی‌داری نسبت به تیمار با بایولپ® به تنهایی افزایش داشت (F= 20.61; df = 4; P<0.0001). شاخص درصد کارایی غذایی (ECI%) در تیمار با غلظت زیرکشنده بایولپ® و غلظت‌های مختلف اگزیندول نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت (F= 22.19; df = 4; P=0.0035). همچنین، افزایش معنی‌داری در شاخص قابلیت هضم نسبی (AD%) در اثر تیمار غلظت ۰/۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی همراه با غلظت زیرکشنده بایولپ®، در مقایسه با غلظت زیرکشنده بایولپ® به تنهایی حاصل شد (F= 35.46; df = 4; P<0.0001).

جدول ۳- اثر غلظت زیرکشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ® و غلظت‌های مختلف اگزیندول روی شاخص‌های تغذیه‌ای (میانگین ± خطای معیار) لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Table 3. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep® and different oxindole concentrations on feeding indices (mean ± SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*

Treatment (concentration)	AD%	ECD%	ECI%	RGR	RCR
Control	47.61 ± 3.01 <sup>c</sup>	5.48 ± 0.35 <sup>b</sup>	4.46 ± 0.62 <sup>b</sup>	4.023 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.16 <sup>c</sup>
Biolep® (LC <sub>30</sub> ml/kg diet)	64.63 ± 4.28 <sup>b</sup>	12.95 ± 1.59 <sup>a</sup>	7.50 ± 0.44 <sup>a</sup>	2.13 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.91 ± 0.07 <sup>b</sup>
Biolep® & Oxindole (LC <sub>30</sub> ml/kg diet + 0.05 g/kg diet)	67.79 ± 2.32 <sup>b</sup>	12.75 ± 1.00 <sup>a</sup>	7.50 ± 0.40 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.33 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.23 <sup>b</sup>
Biolep® & Oxindole (LC <sub>30</sub> ml/kg diet + 0.1 g/kg diet)	68.01 ± 2.02 <sup>b</sup>	12.71 ± 1.25 <sup>a</sup>	7.51 ± 0.41 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.10 <sup>bc</sup>	2.07 ± 0.27 <sup>ab</sup>
Biolep® & Oxindole (LC <sub>30</sub> ml/kg diet + 0.5 g/kg diet)	78.44 ± 3.98 <sup>a</sup>	12.31 ± 1.33 <sup>a</sup>	7.52 ± 0.48 <sup>a</sup>	1.402 ± 0.15 <sup>c</sup>	2.60 ± 0.22 <sup>a</sup>

Means followed by the same letter in each column do not differ significantly (Tukey, P< 0.05)

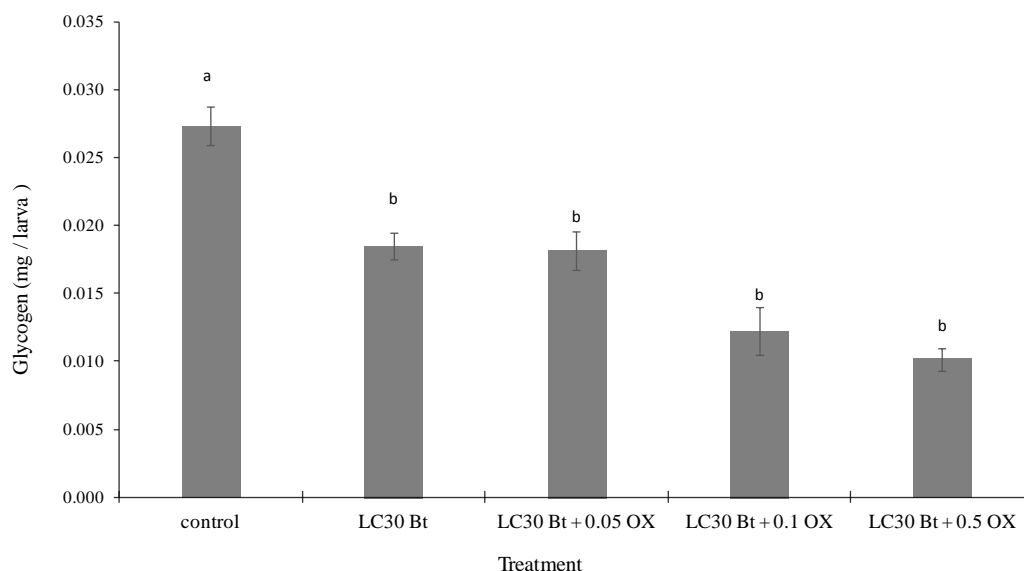
تاثیر اگزیندول و غلظت زیرکشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ® بر شاخص‌های تغذیه‌ای کرم قوزه پنبه

شکل ۱ میزان گلیکوژن را در تیمار با اگزیندول و بایولپ® نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی

داری بین شاهد و تیمار غلظت زیرکشنده بایولپ® وجود داشت. همچنین، با افزایش میزان اگزیندول در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی، میزان گلیکوژن تفاوت معنی‌داری با تیمار بایولپ® به تنهایی نشان داد و باعث کاهش این ذخیره انرژی شد (F= 79.81; df = 4; P<0.0001).

داشت، اما با افزودن غلظت‌های مختلف اگزیندول به غلظت زیرکشنده بایولپ<sup>®</sup> تفاوت معنی‌داری در میزان تری‌گلیسیرید با تیمار بایولپ<sup>®</sup> به تنهایی مشاهده نشد (شکل ۳). (F= 38.19; df = 4; P<0.0001)

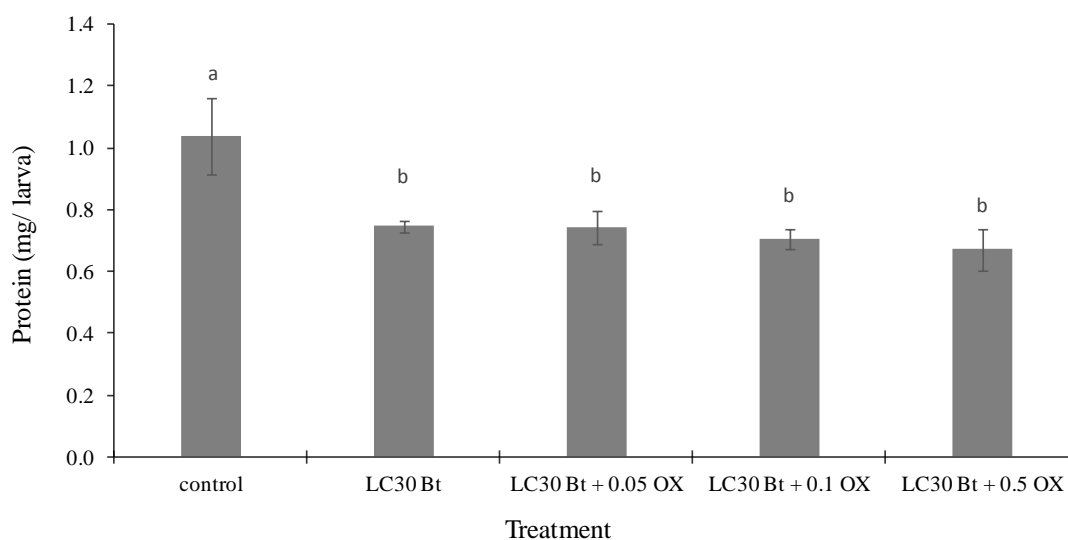
میزان پروتئین کاهش معنی‌داری در تیمارهای اگزیندول و بایولپ<sup>®</sup> نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۲) (F= 13.60; df = 4; P=0.0005). اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید، نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تیمار با غلظت زیرکشنده بایولپ<sup>®</sup> وجود



شکل ۱- اثر غلظت زیرکشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ<sup>®</sup> و غلظت‌های متفاوت اگزیندول روی میزان گلیکوژن (میانگین ± خطای معیار)

لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

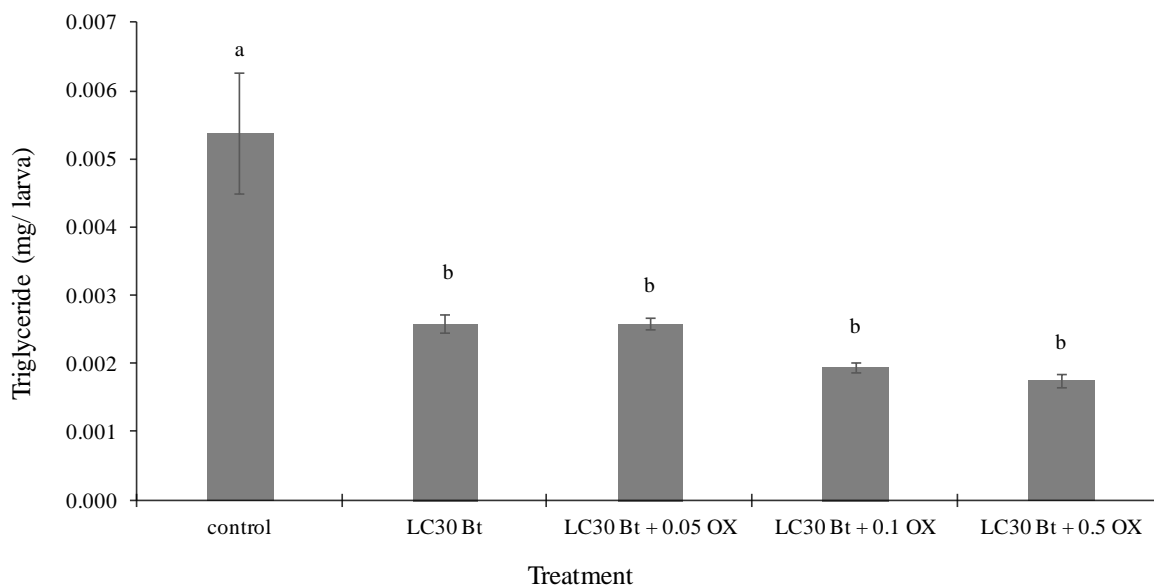
Figure 1. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep<sup>®</sup> and oxindole concentrations on glycogen content (mean ± SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*  
Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, P< 0.05).



شکل ۲- اثر غلظت زیرکشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ<sup>®</sup> و غلظت‌های متفاوت اگزیندول روی میزان پروتئین (میانگین ± خطای معیار)

لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Figure 2. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep<sup>®</sup> and different oxindole concentrations on protein content (mean ± SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*  
Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, P< 0.05).



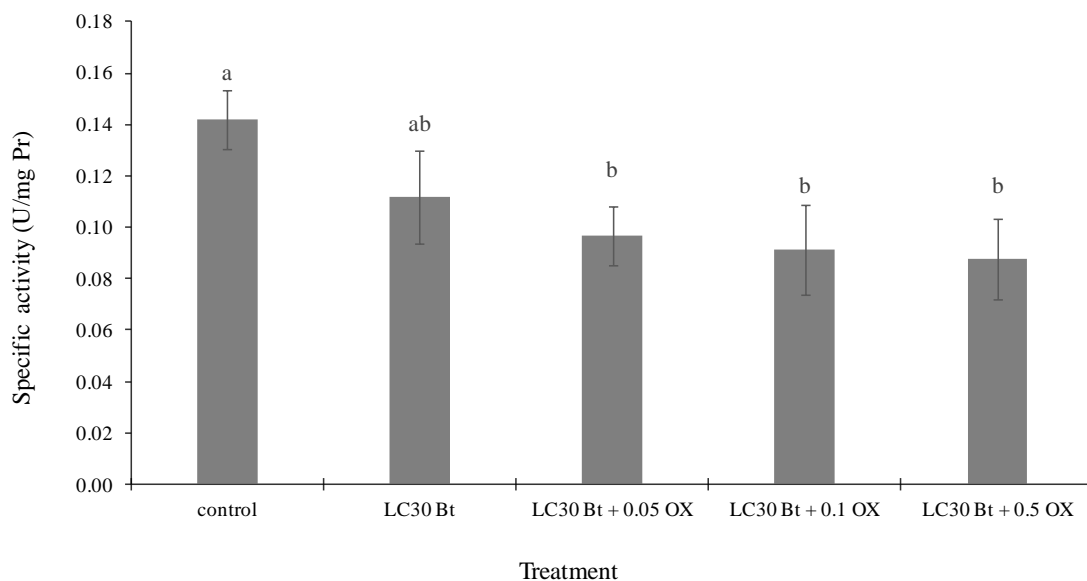
شکل ۳- اثر غلظت زیر کشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ® و غلظت‌های متفاوت اگزیندول روی میزان تری گلیسرید (میانگین ± خطای

معیار) لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Figure 3. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep® and different oxindole concentrations on triglyceride content (mean ± SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*  
Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, P< 0.05).

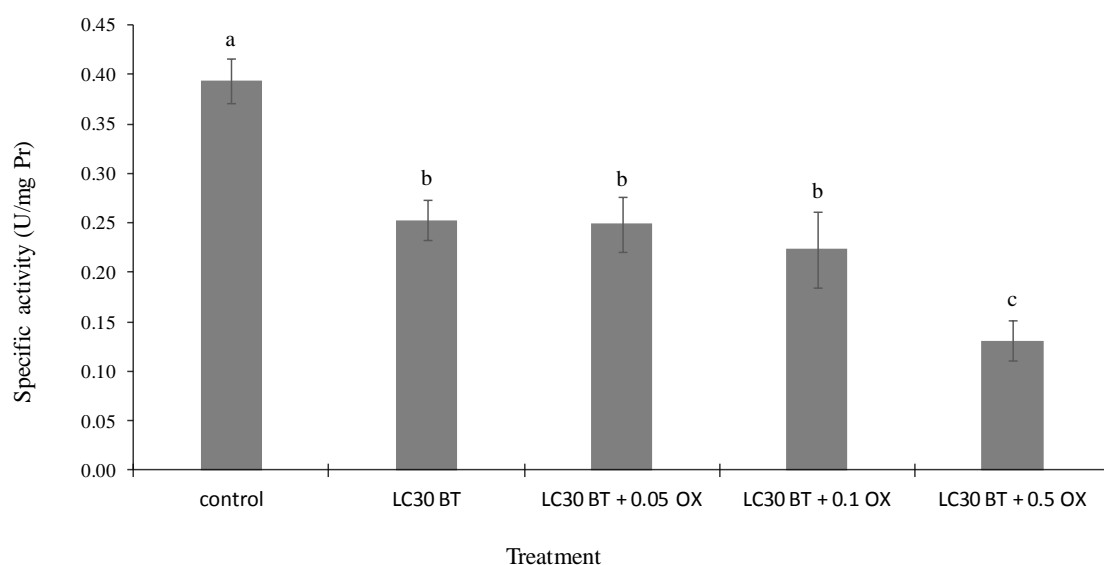
معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل ۶) (F= 83.88; df = 4; P<0.0001) فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز نیز در تیمار با بایولپ® به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داشت. تفاوت معنی‌داری در فعالیت تیمارها با غلظت‌های متفاوت اگزیندول مشاهده نشد (شکل ۷) (F= 13.44; df = 4; P=0.0005). شکل ۸ فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که فعالیت این آنزیم در تیمار با بایولپ® نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت، اما میان تیمارهای اگزیندول تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (F= 25.33; df = 4; P<0.0001).

شکل ۴ میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز را نشان می‌دهد. در تیمارهایی که از غلظت زیر کشنده بایولپ® به همراه اگزیندول استفاده شده بود، فعالیت آنزیم کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد (F= 6.48; df = 4; P= 0.0077). فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار با غلظت زیر کشنده بایولپ® نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. در غلظت ۰/۵ گرم اگزیندول بر کیلوگرم ماده غذایی حاوی غلظت زیر کشنده بایولپ® فعالیت این آنزیم کاهش معنی‌داری نسبت به اثر بایولپ® به تنهایی نشان داد (شکل ۵) (F= 37.61; df = 4; P<0.0001). در تمام تیمارها حاوی غلظت زیر کشنده بایولپ®، فعالیت آنزیم پروتئاز به طور



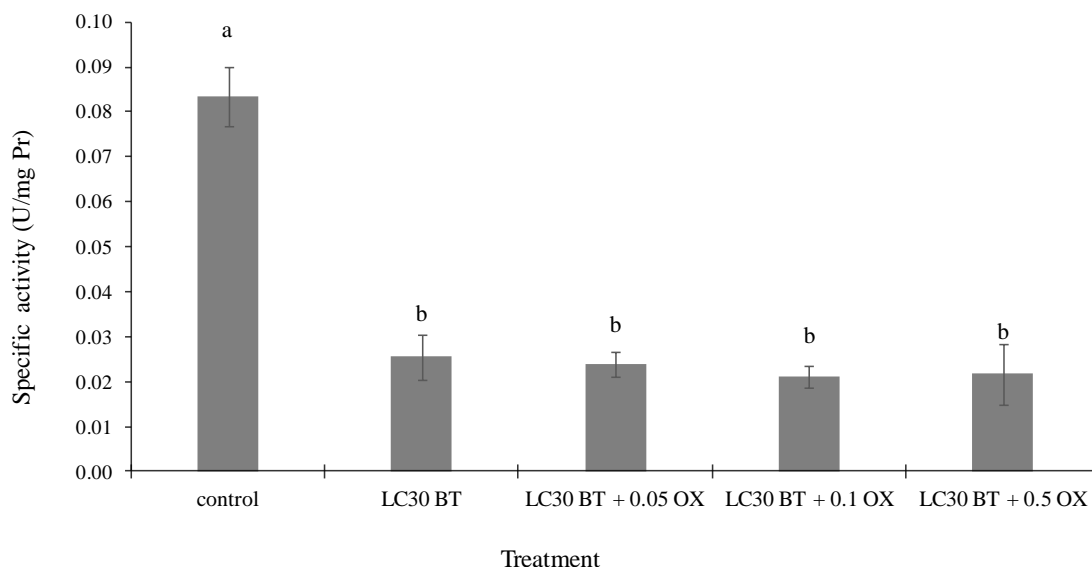
شکل ۴- اثر غلظت زیر کشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ<sup>®</sup> و غلظت های متفاوت اگزیندول روی فعالیت ویژه آنزیم آلفا آمیلاز (میانگین ± خطای معیار) لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Figure 4. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep<sup>®</sup> and different oxindole concentrations on  $\alpha$ -amylase enzyme specific activity (mean  $\pm$  SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*. Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, P < 0.05)



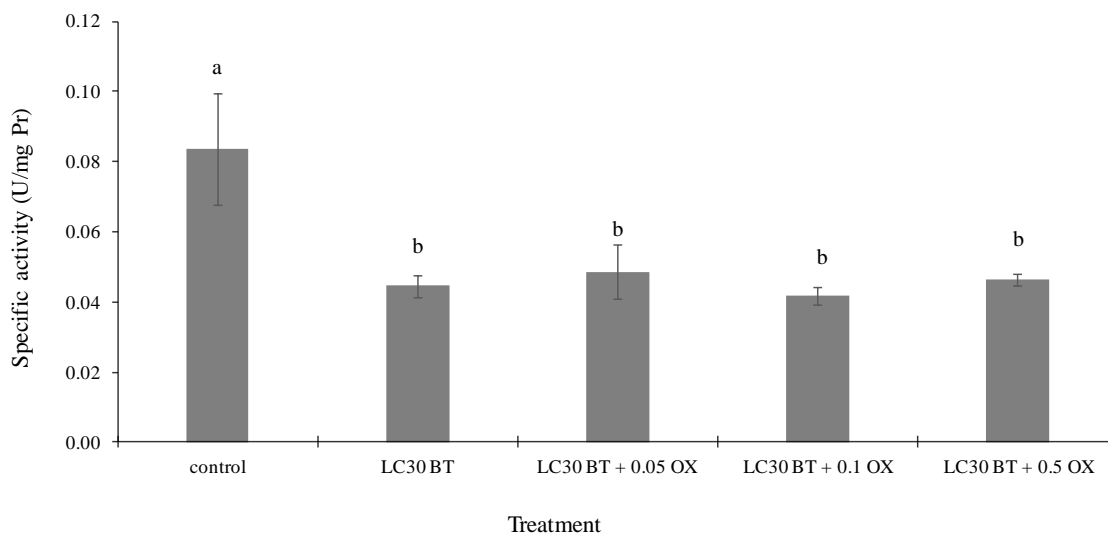
شکل ۵- اثر غلظت زیر کشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ<sup>®</sup> و غلظت های متفاوت اگزیندول روی فعالیت ویژه آنزیم لیپاز (میانگین ± خطای معیار) لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Figure 5. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep<sup>®</sup> and different oxindole concentrations on lipase enzyme specific activity (mean  $\pm$  SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*. Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, P < 0.05)



شکل ۶- اثر غلظت زیر کشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ® و غلظت‌های متفاوت اگزیندول روی فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز (میانگین ± خطای معیار) لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

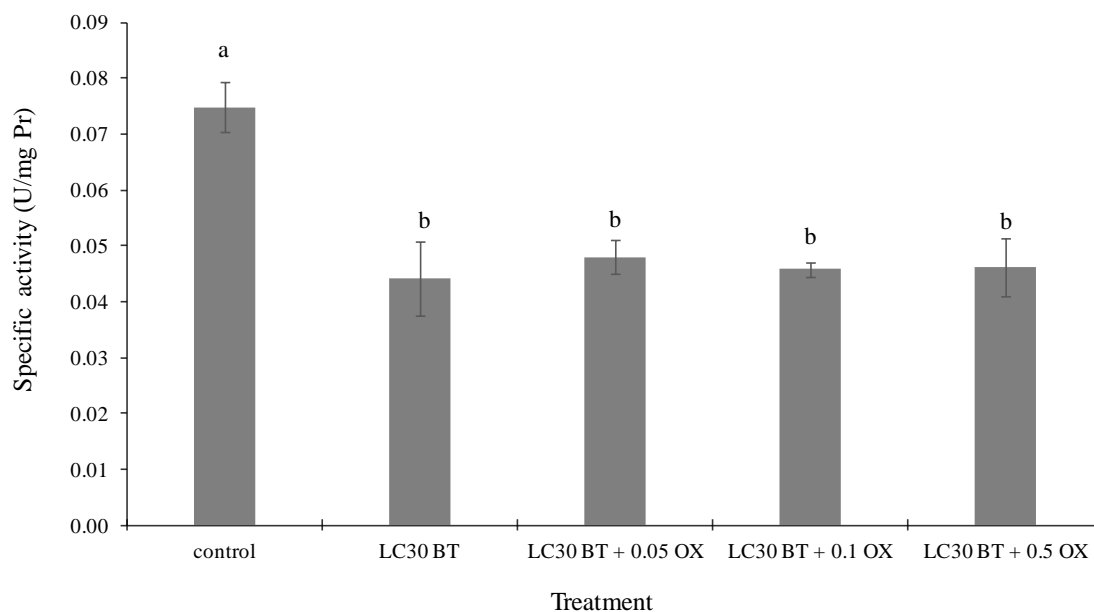
Figure 6. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep® and different oxindole concentrations on protease enzyme specific activity (mean ± SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*. Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, P < 0.05)



شکل ۷- اثر غلظت زیر کشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ® و غلظت‌های متفاوت اگزیندول روی فعالیت ویژه آنزیم آلفاگلوکوزیداز (میانگین ± خطای معیار) لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Figure 7. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep® and different oxindole concentrations on  $\alpha$ - glycosidase enzyme specific activity (mean ± SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*.

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



شکل ۸- اثر غلظت زیر کشنده (LC<sub>30</sub>) بایولپ® همراه با غلظت‌های متفاوت اگزیندول روی فعالیت ویژه آنزیم بتاگلوکوزیداز (میانگین ± خطای معیار) لارو سن سوم کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera*

Figure 8. The effect of sublethal concentration (LC<sub>30</sub>) of Biolep® and different oxindole concentrations on  $\beta$ -glycosidase enzyme specific activity (mean  $\pm$  SE) of the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *Helicoverpa armigera*

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

اگزیندول به حشره کش بیولوژیک BtK باعث می‌شود تلفات در حشره *P. xylostella* افزایش یابد. اگزیندول در تحقیق حاضر به عنوان یک مهارکننده سامانه ایکوزانوئید عمل کرد و نتایج حاصل از زیست‌سنجی نشان داد که با افزایش غلظت اگزیندول میزان تلفات بیشتر می‌شود. با مهار سامانه ایمنی، سرعت اثرگذاری باکتری BtK افزایش پیدا کرد و باعث شد LT<sub>50</sub> در غلظت بالای اگزیندول تقریباً ۳۴/۵ ساعت اندازه‌گیری شود؛ در حالی که این شاخص در تیمار با باکتری بدون اگزیندول نزدیک ۵۰ ساعت برآورد شد. احتمالاً اگزیندول توانسته با سرکوب سامانه ایمنی حشره سرعت تکثیر و آلودگی باکتری را بالا برده و به طبع آن، تلفات افزایش پیدا کند. سجادیان و کیم (Sajjadian and Kim, 2020) گزارش کردند که BZA به عنوان بازدارنده سنتز ایکوزانوئید، در صورت استفاده از BtK، میزان مرگ و میر *P. xylostella* را افزایش می‌دهد. این پژوهشگران دلیل افزایش مرگ و میر را اختلال در سامانه اکسیدازی دوگانه معده ناشی از باکتری (DUOX) در معده میانی *P. xylostella* به دلیل بازدارندگی BZA روی

## بحث

زمانی که حشره وارد چالش با یک عامل بیگانه می‌شود، سامانه ایمنی به صورت آنی وارد عمل می‌شود و در این میان، سیگنال ایکوزانوئید نقش بسیار مهمی در پاسخ سریع ایفا می‌کند (Kim and Stanley, 2021). ایکوزانوئیدها علاوه بر همولنف، در معده میانی نیز این سیگنال را تولید می‌کنند که باعث ایجاد پاسخ ایمنی نسبت به عوامل بیمارگر می‌شود (Sajjadian and Kim, 2020). استنلی ساموئلسون عنوان می‌کند که ایکوزانوئیدها به عنوان واسطه در پاکسازی باکتری‌های تزریق شده به همولنف کرم شاخدار توتون (*Manduca sexta* (Lepidoptera: sphingidae) عمل می‌کنند (Stanley-Samuelson, 1994). سئو و همکاران (Seo et al., 2012) در زیست‌سنجی متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری *X. nematophila* متوجه این موضوع شدند که متابولیت اگزیندول به عنوان یک مهارکننده سیگنال ایکوزانوئید، در غلظت‌های بالا حتی می‌تواند خاصیت حشره‌کشی داشته باشد. این پژوهشگران گزارش کردند اضافه کردن

جذب غذا در بدن حشره به کار می‌رود (Emre *et al.*, 2013; Yazdani *et al.*, 2014). در زمان ورود BtK به معده بالپولکداران خسارت به غشای اپی تلیال وارد می‌شود. این خسارت به دلیل اثر کریستال‌های تولید شده توسط باکتری است که باعث ایجاد سوراخ در غشای سلولی و از بین رفتن سلول در محیط قلیایی معده میانی بالپولکداران می‌شود. در ادامه این خسارت باعث می‌شود که باکتری بتواند از راه معده وارد همولنف حشره شده و عفونت ایجاد کند و در نهایت باعث مرگ حشره شود (Bietlot *et al.*, 1989; Broderick *et al.*, 2006). با خسارت به سلول‌های معده میانی حشره، میزان آنزیم‌های گوارشی به دلیل خسارت به سلول‌های ترشح‌کننده آنزیم گوارشی کاهش می‌یابد و به طبع آن حشره قدرت هضم غذا را از دست می‌دهد و همچنین، سلول‌هایی که در جذب نقش داشتند به دلیل سمیت BtK از بین می‌روند و حشره قدرت جذب غذا را از دست می‌دهد (Spies and Spence, 1985; Loeb *et al.*, 2001). این اتفاق باعث می‌شود حشره میزان غذای بیشتری برای جبران کاهش هضم و جذب مصرف کند و ممکن است به دلیل طولانی شدن دوره لاروی (Sedaratian *et al.*, 2013) و افزایش میزان تغذیه و به دنبال آن حفظ طولانی مدت غذا در لوله گوارش شاخص‌های تغذیه ECD%، ECI% و AD% افزایش پیدا کند. نتایج همچنین نشان داد که شاخص RGR در تیمار با حشره کش بایولپ<sup>®</sup> و آگزیندول نسبت به شاهد کاهش داشته است. RGR شاخصی است که تابع وزن بدن لارو است (Srinivasan and Uthamasamy, 2005) و کاهش وزن بدن لارو در اثر ایجاد سمیت باکتری باعث کاهش نرخ رشد شده است. آگزیندول زمانی که با یک عامل بیولوژیک ترکیب شود به دلیل بازدارندگی سیگنال ایکوزانوئید و اختلال در عملکرد سامانه ایمنی باعث تقویت سمیت عامل بیولوژیک می‌شود (Seo *et al.*, 2012). نتایج نشان داد که شاخص RGR در غلظت ۰/۵ گرم بر کیلوگرم ماده غذایی همراه با غلظت زیرکشنده بایولپ<sup>®</sup> کاهش معنی‌داری نسبت به اثر غلظت زیرکشنده بایولپ<sup>®</sup> به تنهایی دارد.

ایکوزانوئیدها عنوان می‌کنند. سامانه اکسیدازی دوگانه زمانی فعال می‌شود که باکتری وارد معده میانی شود. بررسی‌ها نشان داده است با ورود باکتری به محیط داخلی معده میانی حشرات، ایکوزانوئیدها باعث تولید پپتیدهای ضد میکروبی می‌شوند و پپتیدهای ضد میکروبی باعث تولید ترکیبات اکسیژنی واکنش‌زا در معده میانی برای مقابله با باکتری می‌شوند. آگزیندول توانایی مهار آنزیم PLA<sub>2</sub> به عنوان اولین آنزیم در سامانه ایکوزانوئید را دارد. با مهار PLA<sub>2</sub> سیگنال ایکوزانوئید مختل شده و تولید پپتیدهای ضد میکروبی در معده میانی کاهش می‌یابد. کاهش در تولید پپتیدهای ضد میکروبی باعث کاهش تولید ترکیبات اکسیژنی واکنش‌زا شده و آفت قدرت مقابله با عامل مهاجم (BtK) را از دست می‌دهد. همین امر احتمالاً باعث افزایش تلفات در تحقیق حاضر شده است.

نتایج حاضر همچنین نشان داد که استفاده از آگزیندول و باکتری BtK باعث تغییر در شاخص‌های تغذیه کرم قوزه پنبه می‌شود. شاخص ECD% نشان‌دهنده کارایی غذای هضم شده برای رشد حشره است و اگر غذا مناسب باشد و سمیتی نداشته باشد، اندازه این شاخص در تیمارها یکسان است (Koul *et al.*, 2004). نتایج نشان داد که ECD% با اضافه شدن حشره کش بیولوژیک بایولپ<sup>®</sup> به غذای مصنوعی حشره افزایش پیدا می‌کند. افزایش ECD% احتمالاً به این دلیل است که حشره برای جبران ضعف خود در جذب مواد غذایی، میزان غذای بیشتری را مصرف کرده است. نتایج مشابهی توسط جانمات و همکاران (Janmaat *et al.*, 2014) گزارش شده است که نشان می‌دهد غلظت‌های پایین از باکتری BtK باعث افزایش شاخص ECD% می‌شود. فتحی‌پور و همکاران (Fathipour *et al.*, 2019) گزارش کردند غلظت‌های زیرکشنده از باکتری BtK باعث افزایش شاخص تغذیه ECD%، ECI% و AD% می‌شود. افزایش AD% را می‌توان به خاطر تلاش حشره برای جبران جذب کمتر ترکیبات و در نتیجه، عدم سودمندی غذا برای رسیدن به نرخ‌های رشد بالاتر به حساب آورد (Senthil *et al.*, 2006). این شاخص برای تخمین سهولت

شدن سامانه اکسیدازی شده و ترکیبات اکسیژنی واکنش‌زا را تولید می‌کنند (Kim and Lee, 2014). همین امر احتمالاً باعث می‌شود ترشح آنزیم‌های گوارشی به خاطر درگیر شدن سلول‌های اپی‌تلیال در واکنش‌های ایمنی کاهش یابد. حال اگر مقدار باکتری از حدی بیشتر شود که ایمنی داخل معده میانی نتواند پاسخ دفاعی مناسب ایجاد کند، خسارت به سلول‌ها معده میانی اتفاق می‌افتد (Broderick *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016) که خود نیز باعث کاهش تولید آنزیم‌های گوارشی خواهد شد. در تحقیق پیش‌رو فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز، پروتاز، لیپاز، آلفا گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز تحت تاثیر BtK کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند که نشان از خسارت به سلول‌های پوششی معده میانی کرم قوزه پنبه دارد. نتایج پژوهشگران دیگر نشان داده است هرگونه خسارت به سلول‌های پوششی معده میانی باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌شود (Senthil Nathan *et al.*, 2006; Zibae *et al.*, 2008; Zibae *et al.*, 2010).

پاسخ ایمنی نسبت به عوامل بیمارگر تنها در همولنف اتفاق نمی‌افتد. اگر عامل بیولوژیک باکتری BtK باشد اولین پاسخ ایمنی در معده میانی رخ می‌دهد. مهار پاسخ ایمنی در معده میانی به دلیل کاهش پپتیدهای ضد میکروبی و ترکیبات اکسیژنی واکنش‌زا باعث می‌شود سامانه گوارشی آفات سریع‌تر و شدیدتر دچار خسارت شود. درک این موضوع که سامانه گوارشی آفت چگونه تحت تاثیر پاسخ ایمنی قرار می‌گیرد، می‌تواند راهکارهای مفیدی برای کنترل آفات داشته باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد اگزیندول همراه با باکتری بیمارگر *B. thuringiensis* علیه لاروهای کرم قوزه پنبه منجر به افزایش مرگ‌ومیر و کاهش زمان لازم برای کشتندگی شد. همچنین، اگزیندول به واسطه تغییرات در شاخص‌های تغذیه‌ای لاروها از جمله کاهش نرخ رشد نسبی و افزایش شاخص قابلیت هضم شونده، باعث تضعیف سامانه ایمنی و بهبود کارایی باکتری بیمارگر شد. کاهش میزان فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی معده نظیر لیپاز و محتوای ذخایر انرژی بدن نظیر گلیکوژن از

احتمالاً علت این امر تاثیر هم‌افزایی اگزیندول روی اثر باکتری BtK است.

درشت مولکول‌ها از جمله گلیکوژن، تری‌گلیسیرید و پروتئین تامین‌کننده بخش عظیمی از انرژی مورد نیاز در حشرات هستند. بررسی‌های بیوشیمیایی نشان داد که ذخایر انرژی به طور معنی‌دار در زمان استفاده از اگزیندول کاهش پیدا می‌کنند. کاهش در تری‌گلیسیرید به عنوان یک منبع مهم تولید انرژی می‌تواند این موضوع را نشان دهد که احتمالاً حشره در چالش برای تامین انرژی شروع به کاهش اجسام چربی کرده است. با بالا رفتن غلظت اگزیندول به دلیل افزایش بیماری‌زایی BtK، میزان گلیکوژن نیز کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند. همچنین کاهش میزان پروتئین را می‌توان به عدم توانایی حشره در سنتز پروتئین و یا مصرف متابولیکی پروتئین سلول‌ها به منظور جبران انرژی مورد نیاز در فرایندهای سم‌زدایی نسبت داد (Vijayaraghavan *et al.*, 2010). از طرفی دیگر کاهش سودمندی غذا و خسارت به غشای معده میانی به دلیل حضور باکتری باعث کاهش ذخایر انرژی می‌شود. این امر احتمالاً به دلیل از بین رفتن سلول‌های تولیدکننده آنزیم‌های گوارشی و در نتیجه کاهش فعالیت این آنزیم‌ها و کاهش توانایی معده میانی برای جذب غذا است (Nouri-Ganbalani *et al.*, 2016).

حشره برای جبران خسارت به معده میانی، تغییراتی در میزان تولید و ترشح آنزیم‌های گوارشی ایجاد می‌کند. تحقیقاتی که توسط برندت و همکاران (Brandt *et al.*, 2004) انجام شده است نشان می‌دهد زمانی که حشرات توانایی جذب و هضم غذا را از دست می‌دهند شروع به تغییر در تولید آنزیم‌های گوارشی خود می‌کنند. این راهکار باعث می‌شود امکان جذب مواد غذایی ضروری همچون اسید آمینه‌های دخیل در رشد و نمو حفظ شود. با ورود BtK به معده میانی سلول‌های معده شروع به تولید پپتیدهای ضد میکروبی می‌کنند. این پپتیدها حاصل فعالیت سیگنال‌های ایمنی هم‌چون ایکوزانویید هستند. پپتیدها باعث فعال



پژوهش حاضر حاصل بخشی از نتایج رساله دکتری نویسنده اول با کد مصوب ۳/۴۷۸۷۷ می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد کمال تشکر را دارند. از سرکار خانم مهندس زهرا افزاره به خاطر همیاری در انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی سپاسگزاری می‌شود. از مساعدت گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان جهت در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاه و امکانات لازم برای پرورش کرم قوزه پنبه و انجام آزمایش‌ها صمیمانه قدردانی می‌شود.

جمله تاثیرات مشهود کاربرد آگزیندول در این پژوهش بود. آگزیندول با اختلال در سامانه ایکوزانویید باعث بازدارندگی پاسخ ایمنی در معده میانی حشرات می‌شود و سرعت تاثیرگذاری عوامل بیولوژیک را افزایش می‌دهد. ضمن تاکید بر لزوم انجام پژوهش‌های بیشتر روی فراورده‌های مختلف تجاری کنترل بیولوژیکی در شرایط صحرائی، استفاده از آگزیندول همراه با باکتری *B. thuringiensis* در مدیریت تلفیقی کرم قوزه پنبه پیشنهاد می‌شود.

### سپاسگزاری

### References

- Alimohamadian, M., Aramideh, S., Mirfakhraie, S. and Frozan, M.** 2022. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki in combination with neemarin and silica nanoparticles in the control of second instar larvae of sugar beet, *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae) in laboratory condition. **Applied Biology** 34: 148-163 (In Farsi)
- Bernfeld, P.** 1955. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . **Methods in Enzymology** 1:149-158.
- Bietlot, H., Carey, P., Choma, C., Kaplan, H., Lessard, T. and Pozsgay, M.** 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. **Biochemical Journal** 260: 87-91.
- Brandt, S. L., Coudron, T. A., Habibi, J., Brown, G. R., Ilagan, O. M., Wagner, R. M. Wright, M. K., Backus, E. A. and Huesing, J. E.** 2004. Interaction of two *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with the digestive system of *Lygus hesperus*. **Current Microbiology** 48: 1-9.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. and Soberón, M.** 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 41: 423-431.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F. and Handelsman, J.** 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103: 15196-15199.
- Carrière, Y., Crickmore, N. and Tabashnik, B. E.** 2015. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology** 33: 161-168.
- Chun, Y. and Yin Z. D.** 1998. Glycogen assay for diagnosis of female genital *Chlamydia trachomatis* infection. **Journal of Clinical Microbiology** 36: 1081-1082.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun O. and Cogun, H. Y.** 2013. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. **Annals of the Entomological Society of America** 106: 371-377
- Eom, S., Park, Y. and Kim, Y.** 2014. Sequential immunosuppressive activities of bacterial secondary metabolites from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Microbiology** 52: 161-168.
- Fathipour, Y., Sedaratian, A., Bagheri, A. and Talaei-Hassanlouei, R.** 2019. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. **Physiological Entomology** 44: 178-186.
- Fossati, P. and Prencipe, L.** 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry** 28: 2077-2080.
- García-carreño, F. L. and Haard, N. F.** 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. **Journal of Food Biochemistry** 17: 97-113.
- Igrc Barčić, J., Bažok, R., Bezjak, S., Gotlin Čuljak, T. and Barčić, J.** 2006. Combinations of several insecticides used for integrated control of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say., Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Pest Science** 79: 223-232.

- Jallouli, W., Driss, F., Fillaudeau, L. and Rouis, S.** 2020. Review on biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* since 1990: Focus on bioprocess parameters. **Process Biochemistry** 98: 224-232.
- Janmaat, A. F., Bergmann, L. and Ericsson, J.** 2014. Effect of low levels of *Bacillus thuringiensis* exposure on the growth, food consumption and digestion efficiencies of *Trichoplusia ni* resistant and susceptible to Bt. **Journal of Invertebrate Pathology** 119: 32-39.
- Kaya, H. K. and Gaugler, R.** 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology** 38: 181-206.
- Kim, S. H., and Lee, W. J.** 2014. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 3: 116.
- Kim, Y. and Stanley, D.** 2021. Eicosanoid signaling in insect immunology: New genes and unresolved issues. **Genes** 12: 211.
- Kogan, M. and Bajwa, W. I.** 1999. Integrated pest management: a global reality? **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 28: 01-25.
- Koul, O., Singh, G., Singh, R., Singh, J., Daniewski, W. and Berlozecki, S.** 2004. Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. **Journal of Biosciences** 29: 409-416.
- Loeb, M. J., Martin, P. A., Hakim, R. S., Goto, S. and Takeda, M.** 2001. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Insect Physiology** 47: 599-606.
- Lowry, O. H.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry** 193: 265-275.
- Matthews, M.** 1999. Heliothine moths of Australia. A guide to pest bollworms and related noctuid groups. CSIRO Publishing.
- Navon, A., Klein, M. and Braun, S.** 1990. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera littoralis* larvae based on standardized diets. **Journal of Invertebrate Pathology** 55: 387-393.
- Nouri-Ganbalani, G., Borzoui, E., Abdolmaleki, A., Abedi, Z. and George Kamita, S.** 2016. Individual and combined effects of *Bacillus thuringiensis* and azadirachtin on *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Insect Science** 16 (95): 1-8.
- Rahimi, V., Hajizadeh, J., Zibae, A. and Sendi, J. J.** 2018. Toxicity and physiological effects of an extracted lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 101: 38-45.
- Sadekuzzaman, M. and Kim, Y.** 2017. Specific inhibition of *Xenorhabdus hominickii*, an entomopathogenic bacterium, against different types of host insect phospholipase A2. **Journal of Invertebrate Pathology** 149: 97-105.
- Sadekuzzaman, M., Park, Y., Lee, S., Kim, K., Jung, J. K. and Kim, Y.** 2017. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus hominickii* ANU101, produces oxindole and suppresses host insect immune response by inhibiting eicosanoid biosynthesis. **Journal of Invertebrate Pathology** 145: 13-22.
- Sajjadian, S. M. and Kim, Y.** 2020. Dual oxidase-derived reactive oxygen species against *Bacillus thuringiensis* and its suppression by eicosanoid biosynthesis inhibitors. **Frontiers in Microbiology** 11: 528.
- Sedaratian, A., Fathipour, Y., Taleai-Hassanloui, R. and Jurat-Fuentes, J.** 2013. Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology** 137: 540-549.
- Senthil Nathan, S., Chung, P. G. and Murugan, K.** 2006. Combined effect of biopesticides on the digestive enzymatic profiles of *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee)(the rice leaffolder)(Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 64(3): 382-389.
- Seo, S., Lee, S., Hong, Y. and Kim, Y.** 2012. Phospholipase A2 inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. **Applied and Environmental Microbiology** 78: 3816-3823.
- Sharma, N. and Singhvi, R.** 2017. Effects of chemical fertilizers and pesticides on human health and environment: a review. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology** 10: 675-680.

- Shorey, H. and Hale, R.** 1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 58: 522-524.
- Silva, C. P. and Terra, W. R.** 1995. An  $\alpha$ -glucosidase from perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. Purification and properties. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 25: 487-494.
- Spies, A. and Spence, K.** 1985. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. **Tissue and Cell** 17: 379-394.
- Srinivasan, R. and Uthamasamy, S.** 2005. Studies to elucidate antibiosis resistance in selected tomato accessions against fruitworm, *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Resistant Pest Management Newsletter** 14(2): 24-26.
- Stanley-Samuelson, D. W.** 1994. Prostaglandins and related eicosanoids in insects. pp. 115-212 *Advances in Insect Physiology*. Elsevier.
- Stanley, D.** 2011. Eicosanoids: progress towards manipulating insect immunity. **Journal of Applied Entomology** 135: 534-545.
- Sudo, M., Takahashi, D., Andow, D. A., Suzuki, Y. and Yamanaka, T.** 2018. Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: Heterogeneous timing of selection and interpatch dispersal. **Evolutionary Applications** 11: 271-283.
- 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.
- Vijayaraghavan, C., Sivakumar, C., Kavitha, Z. and Sivasubramanian, P.** 2010. Effect of plant extracts on biochemical components of cabbage leaf webber, *Crocidolomia binotalis* Zeller. **Journal of Biopesticides** 3: 275.
- Waldbauer, G.** 1968. The consumption and utilization of food by insects. pp. 229-288 *Advances in Insect Physiology*. Elsevier.
- Wraight, S. and Ramos, M.** 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology** 90: 139-150.
- Xu, J., Huigens, M. E., Orr, D. and Groot, A. T.** 2014. Differential response of *Trichogramma* wasps to extreme sex pheromone types of the noctuid moth *Heliothis virescens*. **Ecological Entomology** 39: 627-636.
- Yazdani, E., Sendi, J. J. and Hajizadeh, J.** 2014. Effect of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. essential oils on toxicity, food consumption, and biochemical properties of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Plant Protection Research** 54(1): 53-61.
- Yunis Aguinaga, J., Claudiano, G. S., Marcusso, P. F., Ikefuti, C., Ortega, G. G., Eto, S. F., da Cruz, C., Moraes, J. R., Moraes, F. R. and Fernandes, J. B.** 2014. Acute toxicity and determination of the active constituents of aqueous extract of *Uncaria tomentosa* bark in *Hyphessobrycon eques*. **Journal of Toxicology** 2014: Article ID 412437, <https://doi.org/10.1155/2014/412437>.
- Zhang, F., Peng, D., Cheng, C., Zhou, W., Ju, S., Wan, D., Yu, Z., Shi, J., Deng, Y. Wang, F. and Ye, X.** 2016. *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry6Aa triggers *Caenorhabditis elegans* necrosis pathway mediated by aspartic protease (ASP-1). **PLoS Pathogens** 12(1): e1005389.
- Zibae, A., Bandani, A. and Ramzi, S.** 2008. Lipase and invertase activities in midgut and salivary glands of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae), rice striped stem borer. **Invertebrate Survival Journal** 5: 180-189.
- Zibae, I., Bandani, A., Sendi, J., Talaie-Hassanloei, R. and Kouchaki, B.** 2010. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki and medicinal plants on *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). **Invertebrate Survival Journal** 7: 251-261.



Research paper

**The effect of oxindole and biological insecticide Biolep® on toxicity, feeding indices, digestive enzymes and energy reserves of American cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner (Lep.: Noctuidae)**

**A. Baghban<sup>1</sup>, G. Moravej<sup>1\*</sup> and J. Jalali Sendi<sup>2</sup>**

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran

(Received: August 10, 2022- Accepted: October 15, 2022)

**Abstract**

Oxindole is an inhibitor of the eicosanoid signal leading to inhibiting the immune system of insects. One of the important problems of using biological agents such as *Bacillus thuringiensis* Kurstaki (BtK) is their low efficiency and slowness of effect. In this research, the effect of oxindole and Biolep® based on BtK, were investigated on toxicity, feeding indices, energy reserves, and digestive enzyme activity of *Helicoverpa armigera* Hubner (Lep.: Noctuidae) larvae. The results showed that oxindole increased larval mortality and decreased LC<sub>50</sub> and LT<sub>50</sub> values of Biolep®. The feeding indices of cotton bollworm were changed under the influence of sub-lethal concentrations of bacteria and oxindole. At the concentration of 0.5 g oxindole/ kg diet the relative growth rate (RGR) decreased and the approximate digestibility (AD%) increased compared to the absence of oxindole. The use of oxindole along with bacteria also decreased lipase activity. Glycogen as an energy reserve was adversely affected by simultaneous application of oxindole concentrations of 0.1 or 0.5 g.kg<sup>-1</sup> and the sub-lethal concentrations of Biolep® compared to sub-lethal concentrations of Biolep® only. The results of this research showed that by adding oxindole as an inhibitor of eicosanoid signal and immune system to the diet of cotton bollworm, the effectiveness of Biolep® increased and the feeding physiology of the pest was affected.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, energy reserves, bioassay, feeding indices, Oxindole

\* Corresponding Author: moravej@um.ac.ir

