تحقیقات آفات گیاهی
۸۱-۷۱ : (۴) ۴- ۱۳۹۳

مقایسه‌ی شاخص‌های بیوشیمیایی هیبریدهای کرم ابریشم *Bombyx mori* L. در برابر تنش دمایی

حسام الدین امینی[۱]، جلال جلالی سندی*[۲]، سید حسین حسینی مقدم[۳]، حسین غفوری[٤] و محبوبه شریفی[٥]

۱، ۲ و ۵ - گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، ۳- گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، ۴. گروه بیوشیمی دانشکده علوم، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۸)

چکیده

از لارو پروانه کرم ابریشم *Bombyx mori* L. جهت مطالعه و بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر کاتالاز (CAT)، پروکسیداز (POD)، گلوتاتیون- اس- ترانسفراز (GST) و برخی از ماکرومولکول‌ها نظیر پروتئین و تری‌گلیسرید در دو دمای ۲۴ و ۳۹ درجه سلسیوس استفاده شد. به این منظور لاروها در شرایط بهینه پرورش هم‌سن‌سازی شده و از روز دوم سن پنجم لاروی، به مدت ۸ ساعت در روز با دمای ۳۹ درجه سلسیوس تیمار شدند. رطوبت هوا در شرایط بهینه ۵۵ درصد و در زمان تیمار ۷۵ درصد بود. نمونه‌برداری از همولنف و بافت چربی در روز چهارم سن پنجم لاروی صورت گرفت، سپس برخی از شاخص‌های اقتصادی آن نظیر وزن قشر پیله نر، درصد قشر پیله نر، وزن پیله نر، وزن قشر پیله ماده، درصد قشر پیله ماده، وزن پیله ماده و تلفات آن بررسی شد. نتایج نشان دادند که دمای بالا باعث کاهش تمام شاخص‌های اقتصادی و میزان ماکرومولکول‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. مقایسه نتایج فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدان و شاخص‌های اقتصادی بین دو هیبرید ایرانی و چینی نشان داد که در هیبرید چینی، دما تغییر معنی‌دار در وزن پیله ماده ایجاد می‌کند و با استناد به این نتایج از بین هیبریدهای مورد آزمایش، هیبرید چینی ۶۷ نسبت به گرما مقاوم‌تر است.

واژه‌های کلیدی: *Bombyx mori*، آنتی‌اکسیدان، کاتالاز (CAT)، پروکسیداز (POD)، گلوتاتیون-اس-ترانسفراز (GST)

*نویسنده مسئول: jjalali@guilan.ac.ir

مقدمه

کرم ابریشم *Bombyx mori* L. به‌طور معمول با هدف تولید نخ ابریشم برای تهیه‌ی منسوجات و بافت فرش دست بافت استفاده می‌شود (Hosseini Moghaddam, 2008). همچنین یکی از حشرات مهم اقتصادی است که در صنایع دیگر نظیر داروسازی، دام و طیورکاربرد دارد و به‌دلیل ویژگی‌هایی نظیر بالا بودن اطلاعات ژنتیکی، پرورش آسان و اندازه بزرگ دارای اهمیت فراوانی در پژوهش‌های زیستی است (Mita *et al*., 2004; Xia *et al*., 2004).

ارزیابی تنوع زیستی در کرم ابریشم و شناخت تفاوت بین هیبریدهای مختلف در اصلاح نژاد این حشره بسیار مورد توجه بوده و استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی نظیر ماکرومولکول‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها جهت یافتن تفاوت‌ها و شباهت‌های میان هیبریدهای مختلف ضروری است و امروزه کاربرد وسیعی در حشره‌شناسی دارد. به‌طور مثال، در سال ۱۹۸۹ از نشانگرهای بیوشیمیایی برای بررسی وجود تفرق ویژگی‌های زیستی در گونه‌های مختلف لارو هلیوتیس استفاده شد (Bartlett, 1989). لوکسدال و بروکز در سال ۱۹۹۰ از ماکرومولکول‌ها برای شناسایی بیوتیپ‌های شته سبز شاه‌توت *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775) استفاده کردند (Loxdale and Brookes,1990).

درجه حرارت نقش مهمی در رشد و بهره‌وری کرم ابریشم ایفا می‌کند و به این دلیل، گونه‌های مقاوم به گرمای این حشره از کشورهایی مانند چین و ژاپن گزارش شده‌اند (Bartlett, 1989). به‌همین دلیل، بررسی‌های گسترده نشان داده‌اند که بیشترین بازده کرم ابریشم در دماهای ۲۲ تا ۲۷ درجه سلسیوس می‌باشد و دمای بالاتر از آن بر کیفیت محصول تاثیر منفی می‌گذارد (Krishnaswami *et al*., 1973). اثرات تخریبی دمای بالاتر از ۳۰ درجه سلسیوس در این حشره در سال‌های ۱۹۶۴ و ۱۹۷۷ به ترتیب توسط تاکوچی و همکارانش و اوهی و یاماشیتا مورد بررسی قرار گرفت (Ohi and Yamashita, 1977; Takeuchi *et al*., 1964).

با توجه به این‌که بسیاری از مناطق مستعد پرورش کرم ابریشم ایران در آب و هوای گرمسیر قرار دارند، برنامه‌ریزی برای دستیابی به هیبریدهای مقاوم از جمله اهداف این صنعت در ایران است. به‌همین منظور، بررسی تاثیر طولانی مدت افزایش دما بر شاخص‌های فیزیولوژیک کرم ابریشم هیبرید ضروری است (Hosseini Moghaddam, 2008). استرس اکسیداتیو در نتیجه تنش‌های محیطی و فعالیت اکسیژن آزاد واکنش‌گر ROS[1] ایجاد شده که یک فعالیت دفاعی در مقابل رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود. رادیکال‌های آزاد برای بدن بسیار سمی بوده و باعث آسیب به پروتئین‌ها، اسیدهای‌آمینه و نوکلئوتیدها می‌شود (Hermes-Lima and Zenteno-Savın, 2002) ، همچنین با طول عمر سلول‌ها ارتباط داشته (Sohal *et al*., 1990; Parkes *et al*.,1999; Orr and shoal, 1994) و ایجادکننده نوعی سیگنال است که منجر به فعال شدن پدیده مرگ سلولی و رشد سرطانی سلول‌ها در بافت‌ها می‌شود (Suzuki *et al*., 1997)، به‌همین دلیل است که ROS نقش معنی‌داری در سیستم ایمنی ذاتی حشره ایفا می‌کند (Hao *et al*., 2003; Kumar *et al*., 2003). آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان مهارکننده‌ی ROS شناخته شده‌اند (Felton and Summers, 1995) و در برخی از گیاهان به‌عنوان عامل محافظتی نسبت به گرما و خشکی معرفی شده‌اند (Almeselmani *et al*., 2006)، این آنتی‌اکسیدان‌ها عبارتند از کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون-اس-ترانسفراز و غیره. همچنین GST تنظیم‌کننده طبیعی برای فعالیت هیدروکسیدهای تولید شده در استرس اکسیداتیو می‌باشد. دمای بالا بر تمام فعالیت‌های فیزیولوژیکی، بیولوژیکی و بیوشیمیایی این حشره تاثیرگذار است و باعث تغییر در کیفیت و کمیت محصول می‌شود.

گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند که کرم ابریشم در سن‌های چهارم و پنجم لاروی خود نسبت به دماهای بالا حساسیت بیشتری دارد، بنابراین سن پنجم این حشره بهترین زمان جهت غربال‌گری آن است. از این رو، در این پژوهش تغییرات شاخص‌های اقتصادی مانند وزن قشر یک پیله ماده، وزن یک پیله ماده، وزن قشر یک پیله نر، وزن یک پیله نر به

1.Reactive oxygen species

همراه تلفات آن و تغییر در فعالیت آنزیم‌هایی چون کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیو-اس-ترنسفراز، پروتئین، تری‌گلیسرید در دو دمای ۲۴ و ۳۹ درجه سلسیوس در روز چهارم از سن پنجم لاروی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

هیبرید ۱۰۴×۱۰۳ کرم ابریشم از شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم ایران و هیبرید ۶۷ از کشور چین وارد شد. پرورش این لاروها در فصل بهار (ماه خرداد) در مرکز تحقیقات کرم ابریشم ایران واقع در شهر پسیخان رشت انجام شد. لاروها به وسیله برگ توت نژاد اصلاح شده کن موچی [۲] تغذیه شده و برای هر هیبرید سه تکرار و هر تکرار ۲۰۰ لارو در نظر گرفته شد.

تیمار حرارتی

دمای محیط پرورش برای حشرات شاهد ۲۴ درجه سلسیوس و دمای محل پرورش لاروهای تیمار ۳۹ درجه سلسیوس بودکه تقریبا مطابق با مناطق گرم‌سیر ایران است. این دما به‌وسیله بخاری برقی درون اتاق پرورش از روز دوم سن پنجم لاروی به مدت هشت ساعت از ۹ صبح تا ۵ عصر تا روز هفتم اعمال شد. پس از اعمال تنش حرارتی، لاروها به‌وسیله سینی‌های دایره‌ایی شکل به قطر ۲۵ سانتیمتر جهت نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شدند. تمام لاروهای مورد آزمایش روزانه سه بار تغذیه شدند. رطوبت اتاق پرورش، ۵۵ درصد و در زمان اعمال افزایش دما ۷۵ درصد بود که توسط رطوبت‌ساز برقی تامین شد.

آماده‌سازی نمونه

نمونه‌برداری به روش جاگادیش کومار (Jagadeesh Kumar, 2005) انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های GST، POD، CAT، پروتئین، تری‌گلیسرید و کلسترول از همولنف ۴ تا ۵ لارو که به‌صورت تصادفی انتخاب شده بودند، استفاده شد. به‌این منظور یکی از پاهای قفسه‌سینه‌ی لاروها با قیچی قطع و برای جلوگیری از عمل آنزیم فنل‌اکسیداز به سرعت با میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فنیتروتیون اوره یک میلی‌مولار داخل میکروتیوب مخلوط و تکان داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و برای اندازه‌گیری کاتالاز مقدار ۰/۵گرم از بافت چربی استخراج شده از لارو، در ۲۰۰میکرولیتر محلول بافر فسفات پتاسیم۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷ قرار داده شده و هموژنایز شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و از مایع رونشین برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی

اندازه‌گیری پروتئین

سنجش میزان پروتئین براساس روش لوری ۱۹۵۱ (Lowry, 1951) با استفاده از کیت شرکت بیوکم ایران انجام شد و جذب آن در طول موج ۵۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Awareness Technology USA Inc.) تعیین شد.

اندازه‌گیری تری‌گلیسرید

برای اندازه‌گیری از روش فوساتی و پرینسیب (Fossati and Prencipe, 1982) استفاده شد.۱۰۰ میکرولیترمعرف و۲۰ میکرولیتر از نمونه در میکروپلیت الایزا ریخته شده و پس از ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شده و با طول موج ۵۴۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر (Awareness Technology USA Inc.) تعیین شد. برای بلانک به جای نمونه از ۲ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد.

اندازه‌گیری پروکسیداز (POD)

واکنش در حجم ۰/۵ میلی‌لیترانجام گرفت که شامل ۲۲۵ میکرولیتر H_2O_2 ۲۲۵ میلی‌مولار (مرک آلمان) و ۲۲۵ میکرولیتر گایاکول ۴۵ میلی‌مولار (Chemlab, Belgium) بود و از۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ به عنوان بلانک استفاده شد. سپس واکنش گایاکول در طول موج۴۷۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتوفوتومتر (Cary 3) خوانده شد و از۶/ ۲۶ بر

2.Kenmochi

میلی‌مولار بر سانتیمتر[۳] به‌عنوان ضریب جذب مولی استفاده شد (Bergmeyer, 1974).

اندازه‌گیری گلوتاتیون- اس- ترانسفراز (GST)

برای اندازه‌گیری این آنزیم از روش (Habig *et al.*, 1974) استفاده شد. به‌این منظور میزان CDNB (1-choloro-2,4dinitrobenzene) و (1,2-Dichloro-4-nitrobenzene) DCNB مرک (آلمان) با غلظت ۱/۲ میلی‌مولار به‌عنوان سوبسترا و ۱۵ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از GSH ۱۰ میلی‌مولار (گلوتاتیون احیا) مرک (آلمان) در میکروپلیت ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه فعالیت آن به‌وسیله دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌صورت مداوم خوانده شد.

اندازه‌گیری کاتالاز (CAT)

برای اندازه‌گیری فعالیت کاهشی کاتالاز از روش (Aebi, 1984) استفاده شد. بدین منظور ۲۲۵ میکرولیتر از H_2O_2و ۲۲۵ میکرولیتر از محلول بافر فسفات پتاسیم ۷۰ میلی‌مولار با pH=۷ به همراه ۵۰ میکرولیتر از نمونه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتوفوتومتر (Cary 3) مشاهده شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های اقتصادی

برای انداه‌گیری شاخص‌های تجاری سه تکرار به هر هیبرید اختصاص داده شد که هر تکرار شامل ده لارو می‌باشد.

اندازه‌گیری میانگین وزن یک پیله

پس از برداشت پیله، شمارش و تفکیک آن‌ها، پیله‌های سالم برای هر تیمار شمارش و وزن این پیله‌ها اندازه‌گیری شد و متوسط وزن پیله برای هر هیبرید تعیین شد.

اندازه‌گیری وزن قشر پیله

پس از خارج کردن شفیره از پیله، قشر پیله هر هیبرید وزن شد و بر تعداد آن تقسیم شد.

اندازه‌گیری درصد قشر پیله

برای اندازه‌گیری درصد قشر پیله، وزن قشر ابریشمی پیله بر وزن پیله‌ها تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به‌وسیله نرم افزار SAS در قالب طرح کاملا تصادفی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح $p<۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج

شاخص‌های تجاری

با مقایسه مقدار میانگین شش شاخص تجاری در دو دمای ۲۴ درجه سلسیوس و ۳۹ درجه سلسیوس با توجه به جدول ۱ مشاهده شد که استرس دمایی برتمام شاخص‌های تجاری این حشره تاثیر منفی گذاشته است اما بر سه شاخص وزن یک پیله نر، درصد قشر یک پیله نر و درصد قشر یک پیله ماده تاثیر معنی‌داری نداشت. همچنین افزایش دما بر وزن قشر یک پیله نر در هیبرید ایرانی و چینی تاثیر گذاشته است و در سایر صفات فقط در دو هیبرید ایرانی در سطح تاثیر معنی‌داری مشاهده شد. افزایش دما در تمام هیبریدها به افزایش تلفات منتهی شده و در هیبرید چینی کمترین تلفات مشاهده شد که دارای تفاوت معنی‌دار بود.

فعالیت گلوتاتیون-اس-ترانسفراز (GST)

افزایش طولانی مدت دما باعث افزایش فعالیت این آنزیم در هیبرید چینی شماره ۶۷ نسبت به دمای ۲۴ درجه سلسیوس شده و هیبرید شماره ۶۷ بیشترین فعالیت این آنزیم را در دمای ۳۹ درجه سلسیوس دارا می‌باشد و در هیبرید ایرانی شماره ۱۰۴*۱۰۳ در دمای ۲۴ درجه سلسیوس دارای فعالیت بیشتری از این آنزیم نسبت به دمای ۳۹ درجه سلسیوس می‌باشد(شکل ۱).

فعالیت پراکسیداز (POD)

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که افزایش دما باعث افزایش فعالیت این آنزیم در هیبریدهای ایرانی و چینی شده و بالاترین فعالیت در دمای ۳۹ درجه سلسیوس مربوط به هیبرید چینی شماره ۶۷ بود. هیبرید چینی شماره ۶۷ دارای میزان فعالیت کمتری در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نسبت به هیبرید ایرانی می‌باشد (شکل۲).

---

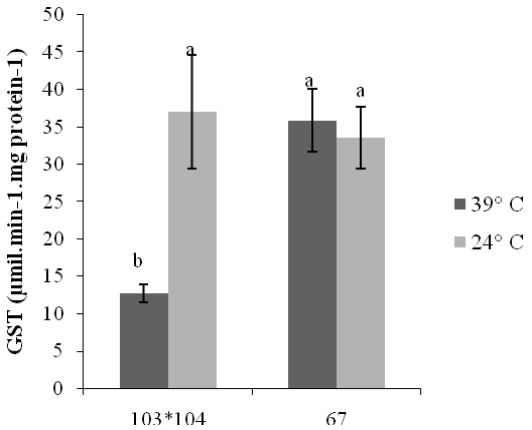
۳ $3.mM^{-1}Cm^{-1}$

جدول۱- بررسی شاخص‌های تجاری دو هیبرید کرم ابریشم .*Bombyx mori* L در دو دمای ۲۴ و ۳۹ درجه سلسیوس

Table 1. Determination of economical indices in two hybrids of *Bombyx mori* L. at 24 and 39 ° C

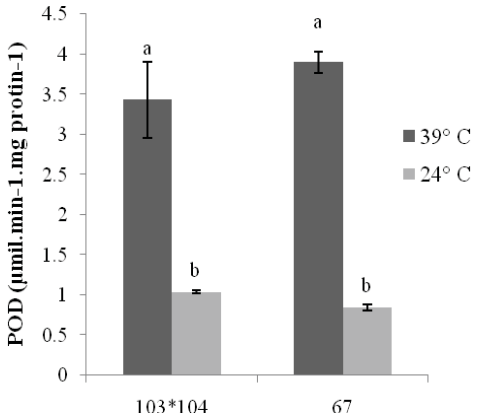
Hybrid	Temperature	Male cocoon shell percentage	Male cocoon shell weight	Male cocoon weight	Female cocoon shell percentage	Female cocoon shell weight	Female cocoon weight	Mortality
67	24±1 °C	22.05^{a}±0.1	0.37^{a}±0.002	1.70^{a}±0.1	18.80^{a}±0.87	0.36^{a}±0.008	2.03^{a}±0.01	16.72^{b}±0.1
	39±1 °C	20.01^{a}±0.1	0.29^{a}±0.045	1.16^{b}±0.1	18.11^{a}±0.1	0.31^{a}±0.012	1.53^{b}±0.1	21.3^{a}±0.87
103*104	24±1 °C	20.78^{a}±0.98	0.36^{a}±0.0032	1.71^{a}±0.12	22.2^{a}±1.02	0.36^{a}±0.01	1.65^{a}±0.098	22.6^{b}±1.97
	39±1 °C	21.01^{a}±0.1	0.256^{b}±0.01	1.22^{b}±0.022	19.09^{a}±0.1	0.27^{b}±0.01	1.49^{a}±0.27	67.43^{a}±2.1

Means with same letters in each column indicate no significant difference (Tukey test at p<0.05)



شکل ۱- فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس‌ترانسفراز GST در همولنف هیبریدهای کرم ابریشم .*Bombyx mori* L شرایط کنترلی و تحت استرس دمایی

Figure 1. The amount of Gluthation-S-Transferase (GST) activity in 67 and 103×104 hybrids of *Bombyx mori* L. in control and heat stressed treatments

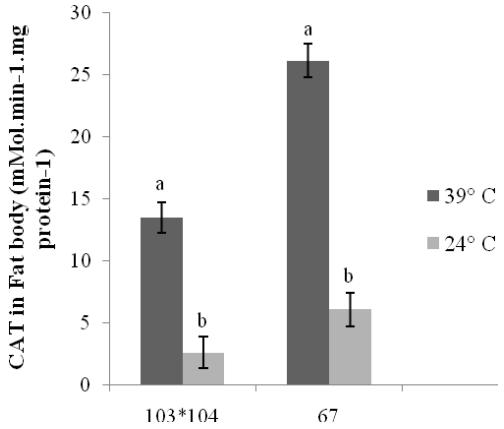


شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز POD در همولنف هیبریدهای کرم ابریشم .*Bombyx mori* L در شرایط کنترل و تحت استرس دمایی

Figure 2. The amount of Peroxidase (POD) activity from hemolymph of two hybrids of *Bombyx mori* L. in control and heat stressed treatments

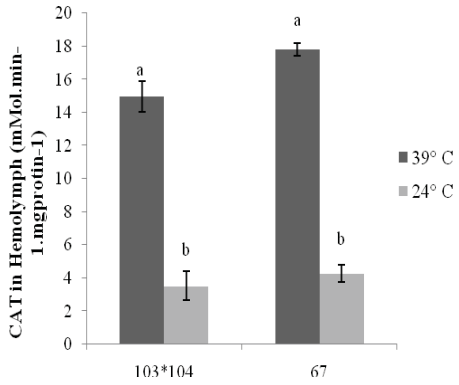
فعالیت کاتالاز (CAT) در بافت چربی و همولنف

سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در دو بافت مختلف این حشره نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو دمای مختلف وجود دارد و همچنین بیشترین فعالیت این آنزیم در بافت چربی استخراج شده، مشاهده شد. بیشترین سطح فعالیت مربوط به دمای ۳۹ درجه سلسیوس است. بررسی فعالیت این آنزیم در بافت چربی نشان داد که تیمار در دمای ۳۹ درجه سلسیوس کمترین فعالیت را در هیبرید شماره ۱۰۴*۱۰۳ سبب شده و بالاترین فعالیت مربوط به هیبرید چینی شماره ۶۷ می‌باشد. در دمای ۲۴ درجه سلسیوس کمترین فعالیت این آنزیم در هیبرید ایرانی و بیشترین فعالیت در هیبرید چینی مشاهده شد (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت چربی هیبریدهای کرم ابریشم *Bombyx mori* L در شرایط کنترل و تحت استرس دمایی

Figure 3. The amount of Catalase (CAT) activity in the fat body of two hybrids of *Bombyx mori* L. in control and heat stressed treatments



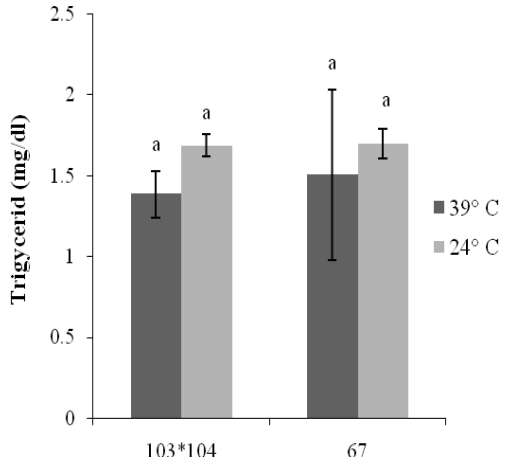
شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در همولنف هیبریدهای کرم ابریشم *Bombyx mori* L در شرایط کنترل و تحت استرس دمایی

Figure 4. The amount of CAT activity in the hemolymph from two hybrids of *Bombyx mori* L.in control and heat stressed treatments

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز در همولنف کرم ابریشم نشان داد که فعالیت این آنزیم در دمای ۲۴ درجه سلسیوس پایین‌تر از فعالیت آن در بافت چربی می‌باشد. بیشترین فعالیت آنزیم در همولنف مربوط به هیبرید چینی و در دمای ۲۴ درجه سلسیوس تقریبا دارای میزان فعالیت یکسانی می‌باشد.

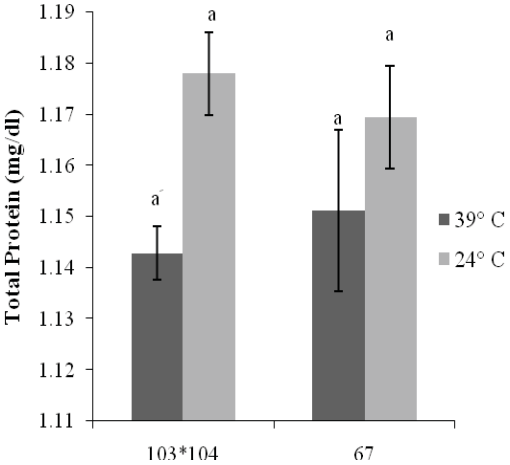
فعالیت ماکرو مولکول‌ها (پروتئین، و تری‌گلیسرید)

بررسی مقدار ماکرومولکول‌ها نشان داد که افزایش دما باعث کاهش مقدار آن‌ها در هیبرید چینی ۶۷ شده است. افزایش دما باعث کاهش میزان پروتئین در دو هیبرید ایرانی و چینی شد. بیشترین و کمترین مقدار پروتئین به ترتیب در دمای ۲۴ درجه سلسیوس و ۳۹ درجه سلسیوس در هیبرید ایرانی دیده شد. مقدار تری‌گلیسرید در دمای ۳۹ درجه سلسیوس کاهش یافته و بیشترین فعالیت مربوط به دمای ۲۴ درجه سلسیوس بود که در هر دو هیبرید تقریبا مشابه می‌باشد (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۵- میزان تری‌گلسیرید در همولنف هیبریدهای کرم ابریشم *Bombyx mori* L. در شرایط کنترل و تحت استرس دمایی

Figure 5. The amount of triglyceride in the hemolymph from two hybrids of *Bombyx mori* L .in control and heat stressed treatments



شکل ۶- میزان پروتئین در همولنف هیبریدهای کرم ابریشم *Bombyx mori* L در شرایط کنترلی و تحت استرس دمایی

Figure 6. The amount of protein in hemolymph from two hybrids of *Bombyx mori* L. in control and heat stressed treatments

بحث

سلول‌های بدن جانوران با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند در برابر آسیب‌های ناشی از وجود انواع اکسیژن‌های واکنش‌گر (ROS) دفاع کنند. آنتی‌اکسیدان‌های مختلف ممکن است میزان پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش دهند. سامانه دفاعی آنتی‌اکسیدان حشرات شامل چندین آنزیم آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز ، پراکسیداز و غیره است. این آنزیم‌ها در شرایط تنش و تیمار حشرات با مواد شیمیایی و بیمارگرها القا می‌شوند و ممکن است به‌عنوان نشان‌گر زیستی هم استفاده شوند. از آن‌جایی که آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز فرآورده‌های پراکسیداسیون یا هیدروپراکسیدها را از سلول حذف می‌کند می‌توان به این آنزیم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان اشاره کرد (Hosseininaveh and Ghadamyari, 2013).

در بررسی تاثیر شوک دمایی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی روی مگس میوه[4] مشاهده شد که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پروکسیداز و گلوتاتیون-اس-ترنسفراز به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (Fu-xian *et al*, 2011). در بررسی حاضر رابطه معنی‌داری میان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر کاتالاز، پروکسیداز و گلوتاتیون-اس-ترنسفراز با افزایش دما دیده شد. همچنین مشاهده شد که با افزایش مقدار این آنزیم‌ها کمترین تلفات در هیبرید چینی دیده می‌شود (شکل‌های ۱-۴).

افزایش دما باعث سرعت بخشیدن انجام واکنش‌های شیمیایی یعنی هر دو نرخ تشکیل ROS و فعالیت آنتی-اکسیدان‌ها می‌شود (Costantini, 2010). نبی‌زاده و کومار در سال۲۰۱۱ (Nabizadeh and Kumar, 2011) تفاوت میزان فعالیت کاتالاز را در هیبریدهای مختلف کرم ابریشم بررسی کرده و آنزیم اصلی در جلوگیری از فعالیت ROSرا در کرم ابریشم مربوط به کاتالاز (BmCAT) دانستند. با توجه به نتیجه نمونه‌برداری از همولنف، دستگاه گوارش و بافت چربی بیشترین فعالیت این آنزیم مربوط به بافت چربی بود.

فعالیت بیشتر کاتالاز در بافت چربی نشان دهنده سوخت وساز بالا در این بافت و محل ذخیره این آنزیم‌ها است که در مواجه با استرس‌های مختلف آزاد و باعث فعالیت بیشتر این آنزیم می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها در پستانداران هم گزارش شده‌اند و در آزمایش روی موش بیشترین فعالیت از کبد این جاندار به‌دست آمده است (Furuta *et al*., 1986; Lin *et al*., 1997)، که بیان‌گر تشابه جالب میان بافت چربی حشرات و کبد پستانداران است. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز نشان داد که با افزایش دما فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها نیز افزایش یافت.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کرم ابریشم واکنش‌های متفاوتی نسبت به دمای بالا نشان می‌دهد. از میان مواد بیوشیمیایی موجود، آنتی-اکسیدان‌هایی نظیر کاتالاز، پیروکسیداز و گلوتاتیون-اس-ترانسفراز نشانگرهای قابل اعتمادی برای بررسی مقاومت به دمای بالا محسوب می‌شوند. غربال‌گری هیبریدهای مختلف کرم ابریشم این امکان را فراهم خواهد آورد تا پرورش کرم ابریشم در مناطق گرمسیری میسر شود و یا بر اثر افزایش ناگهانی دما در مناطق معتدله دچار رکود نشود. اگرچه درک ساز و کار آنتی‌اکسیدان‌ها در حشرات نیازمند اطلاعات جامع‌تر از ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آن‌ها در حشرات و به ویژه کرم ابریشم است.

4. Fruit fly

References

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. **Methods Enzymology** 105: 121–126.

Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., Kushwaha, S .R. and Singh, T. P. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. **Plant Science** 171: 382–388.

Barros, M. P. and Bechara, E. J. H. 2001. Daily variations of antioxidant enzyme and luciferase activities in the luminescent click-beetle Pyrearinus termitilluminas: cooperation against oxygen toxicity. **Insect Biochemistry Molecular Biology** 31: 393–400.

Bartlett, A. C. 1989. The genetics of morphological and biochemical markers in two Heliothis species. Acta Phytopathol. **Entomology Hungarica** 24: 49-53.

Benchamin, K. V. and Jolly, M. S. 1986. Principles of silkworm rearing. In: Proceedingof the seminar on problems and prospects of sericulture, S., Mahalingam (Ed).Vellore, India pp. 63–108.

Bergmeyer, H. U. 1974. Methods of enzymatic analysis, vol II, Academical Press**,** New York. pp. 495-496.

Costantini, D. 2010. Redox physiology in animal function: the struggle of living in an oxidant environment**. Current Zoology** 56: 125–150

Felton, G. W. and Summers, C. B. 1995. Antioxidant system in insects. **Archive of Insect Biochemistry and Physiology** 29: 187–197.

Fossati, P. and Prencipe, L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry** 28 (10): 2077-80.

Fu Xian, J., Wei, D. and Wang, J. 2011. Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist** 94 (4): 221-243.

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biology and Chemistry** 249: 7130-7139.

Hao, Z., Kasumba, I. and Aksoy, S. 2003. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidiae**). Insect Biochemisry amd Molccular Biology** 33: 1155–1164.

Hermes-Lima, M. and Zenteno-Savın, T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology** 133: 537–556.

Hosseini Moghaddam, S. H. 2008. Principles of sericulture. Guilan University Press. pp. 155.

Hosseininaveh, v. and Ghadamyari, M. 2013. Principles and Concepts of Experimental Methods in Insect Biochemistry, Physiology and Toxicology. Tehran University Press. 577pp.

Jagadeesh Kumar, T. S. 2005. Studies on embryonic diapause development in relation to economic traits of Mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Thesis submitted to the University of Mysore for the award of doctor of philosophy in sericulture Mysore-570 006, India p. 27.

Jovanovic-Galovic, A., Blagojevic, D. P., Grubor-Lajsˇic, G., Worland, R. and Spasic, M. B. 2004. Role of antioxidant defense during different stages of pre-adult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubner): diapause and metamorphosis. **Archive of Insect Biochemistry and Physiology** 55: 79–89.

Krishnaswami, S. 1978. New technology of silkworm rearing. Bulletin no. 2**.** Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India p.23.

Krishnaswami, S., Narasimhanna, M. N., Suryanarayana, S. K. and Kumararaj, S. 1973. Silkworm rearing, Bulletin 15/2, FAO Agriculture Services. United Nations Organizations, Rome pp. 53–90.

Kumar, S., Christophides, G. K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y. S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F. C. and Barillas-Mury, C. 2003. The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in Anopheles gambiae oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in Anopheles gambiae**.** Proceedins of the National Academy of Sciences USA 100: 14139–14144.

Lin, Z. H., Wang, Y. F., Sarai, A. and Yasue, H. 1997. Swine catalase deduced from cDNA and localization of the catalase gene on swine chromosome 2p16–p15. **Biochemistry Genetics** 35: 297–302.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. **Journal of Biology Chemistry** 193: 265 (The original method).

Loxdale, H. D. and Brookes, C. P. 1990. Temporalgenetic stability within and restricted migration (gene flow) between local populations of the blackberry grain aphid Sitobion avenae in southeast England. **Journal of Animal Ecology** 59: 497-514.

Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., Namiki, N., Kitagawa, M., Yamashita, H., Yasukochi, Y., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Ajimura, M., Ravikumar, G., Shimomura, M., Nagamura, Y., Shin-I, T., Abe, H., Shimada, T., Morishita, S. and Sasaki, T. 2004. The Genome Sequence of Silkworm Bombyx mori. **DNA Research** 11: 27–35.

Nabizadeh, P. and Jagadeesh Kumar, T. S. 2011. Fat body catalase activity as a biochemical index for the recognition of thermotolerant breeds of mulberry silkworm, Bombyx mori L. **Journal of Thermal Biology** 36: 1-6.

Ohi, H. and Yamashita, A. 1977. On the breeding of the silkworm races J137 and C137. **Bulltin Sericulcural Experimental Station** 27: 97–139.

Orr, W. C. and Sohal, R. S. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster. **Science** 263: 1128–1130.

Parkes, T. L., Hilliker, A. J. and Phillips, J. P. 1999. Motorneurons, reactive oxygen, and life span in Drosophila. **Neurobiology Aging Journal** 20: 531–535.

Richmond, W. 1973. Preparation and properties of cholesteroll oxidase from Nocardia sp. andits application to enzymatic assay of total cholesterol in serum. **Clinical Chemistry** 19: 1350–1356.

SAS Institute. SAS users guide: Statistics, version 9, SAS Institute, Cary, NC. 2001.

Sohal, R. S., Arnold, L. and Orr, W. C. 1990. Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxidases, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP+ and NADH/NAD+ in Drosophila melanogaster. **Mechanisms of Ageing and Development** 56: 223–235.

Suzuki, Y. J., Forman, H. J. and Sevanian, A. 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction**. Free Radical Biology Medicine** 22: 269–285.

Takeuchi, Y., Kosaka, T. and Ueda, S. 1964. The effects of rearing temperature upon the amount of food ingested and digested. **Techical Bulletine of the Sericulcural Experimental Station** 84: 1–12.

Xia, Q.Y., Zhou, Z.Y., Lu, C., Cheng, D.J., Dai, F., Li, B., Zhao, P., et al. 2004. A Draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). **Science** 306: 1937–1940.

Plant Pests Research
2015- 4(4): 71-81

Comparative study on biochemical indices of silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrids for their thermal stress

H. Amini[1], J. J. Sendi[*2], S. H. Hosseinimoghaddam[3] , H. Ghafouri[4] and M. Sharifi[5]

1, 2, and 5. Department of Plant Protection, University of Guilan, 3. Department of Animal Sciences, University of Guilan, 4. Department of Biology, University of Guilan

(Received: June 2, 2014- Accepted: August 9, 2014)

Abstract:

The larvae of silkworm, *Bombyx mori* L., were used to determine the activities of catalase (CAT), peroxidase (POD), glutathione-s-transferase (GST) and some macromolecules such as; protein and triglyceride after treatment at 24°C and 39°C. The larvae of fifth instars were treated at 39 ° C for 8 h. The humidity of experiment was set at 55% at 24˚C and increased to 75% at 39˚C. The hemolymph and fat body were removed after four days. Some economic indices were assessed like weight of one male cocoon shell, percentage of male cocoon shell, weight of male cocoon, weight of one female cocoon shell, percentage of female cocoon shell, weight of female cocoon and their mortalities. Results indicated that the higher temperature reduced all the economic indices and the amount of macromolecules. The heat also increased the activities of antioxidant enzymes. The comparison between the antioxidant enzymes and economic indices indicated that Chinese hybrid 67 is more tolerant to temperature.

Keywords: *Bombyx mori,* Silkworm, Antioxidant, Catalase, Peroxidase, Glutathion-s-transferase

*Corresponding author: jjalali@guilan.ac.ir