

تغییرات نرخ تنفس و اسیدهای چرب غشاهای سلولی در شفیره‌های سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) در طول زمستان

مریم عطاپور

پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، تهران، ایران
مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: atapou@irost.org

چکیده

غشاهای سلولی در برابر دماهای پایین بسیار حساس بوده و به منظور جلوگیری از این صدمه دچار تغییرات و سازگاری‌هایی می‌شوند. یکی از رایج‌ترین تغییرات، افزایش نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در فسفولیپیدها است که سبب افزایش سیالیت غشاء در دماهای پایین می‌شود. در مطالعه حاضر، شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* در جریان ماه‌های آبان تا فروردین جمع‌آوری شد. به منظور بررسی رکود متابولیسم، گازهای تنفسی (O_2 و CO_2) و نرخ تنفس (CO_2/O_2) در آنها با دستگاه GC اندازه‌گیری شد. پس از استخراج چربی کل، فسفولیپیدها با روش SPE از سایر چربی‌ها جدا شده و اسیدهای چرب و تغییرات آنها با GC بررسی شد. نرخ تنفس با کاهش ۳۰ درصدی از ۰/۹ در آبان به ۰/۶ در بهمن و اسفند کاهش یافت که نشان می‌دهد متابولیسم در این دو ماه به کمترین حد رسیده و حشره در عمق دیاپوز به سر می‌برد. دو اسید چرب ۱۶ کربنه و چهار اسید چرب ۱۸ کربنه در غشاهای سلولی این آفت شناسایی شد. طی ماه‌های زمستان بیشترین کاهش در دو اسید چرب اشباع $C16:0$ و $C18:0$ و بیشترین افزایش در اسید چرب $C16:1$ مشاهده شد. به طور کلی نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع طی ماه‌های زمستان حدود ۴۰ درصد افزایش داشت. نتایج نشان داد، علی‌رغم کاهش سطح متابولیسم بدن، در راستای افزایش تحمل به دماهای پایین، تغییر و تبدیلات پویایی در غشاهای سلولی به وقوع پیوسته تا امکان تطابق حشره با شرایط سخت زمستان را فراهم نماید.

واژه‌های کلیدی: غشا سلول، اسیدهای چرب، سفیده بزرگ کلم، تنفس، دیاپوز

Changes of respiration rate and fatty acid composition in cell membranes of pupae of the large cabbage white, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) during winter

Maryam Atapour

Institute of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.

Corresponding author, E-mail: atapour@irost.org

Abstract

Cell membranes are very sensitive to low temperatures and undergo changes and adaptations to prevent this damage. One of the most common changes is the increase in unsaturated to saturated fatty acids ratio of phospholipids, which leads to increase the fluidity of membranes at low temperatures. In this study, overwintering pupae of the large cabbage white, *Pieris brassicae* were collected during November 2014 to April 2015. To investigate the metabolic quiescent, changes in respiratory gases (O_2 and CO_2) and respiration rate (CO_2/O_2) were measured using GC. After extracting the whole body lipids, phospholipids were separated from other lipids by solid phase extraction (SPE) and then fatty acids and their changes were investigated using the GC. Respiration rate decreased about 30% from 0.9 in November to 0.6 in February and March, indicating that metabolism has reached to its lowest level during these period and insect has been in deep pupal diapause. Two 16-carbon and four 18-carbon

fatty acids were identified in cell membranes. During winter, the highest decrease was observed in two saturated fatty acids C16: 0 and C18: 0 and the highest increase occurred in C16: 1. In general, unsaturated/saturated fatty acids ratio increased about 40 percent during the winter months. The results indicated that in spite of decreasing metabolism level in the whole body, in order to enhance the cold-hardiness, dynamic changes occurred in cell membranes, allowing insect to adapt successfully to winter hard conditions.

Keywords: cell membrane, fatty acids, *Pieris brassicae*, respiration, diapause

Received: 17 July 2018, Accepted: 22 November 2018

مقدمه

در بسیاری از گونه‌های حشرات که متحمل رکود (Quiescence) عمیق یا دیاپوز (Diapause) می‌شوند، یکی از شاخص‌های قابل اطمینان در خصوص کاهش نرخ متابولیسم، اندازه‌گیری میزان تنفس (مصرف اکسیژن) و مقایسه آن قبل و پس از دوره رکود می‌باشد (Danks, 1987). در بسیاری از گونه‌های مورد مطالعه، این مقدار حدود ۱۰-۲۰ درصد کاهش از خود نشان می‌دهد هر چند در گونه‌هایی که دارای فعالیت کمتری هستند، نظیر برخی سوسک‌ها، این مقدار می‌تواند تا یک پنجم دوره رشد عادی نیز کاهش پیدا کند (Thompson & Davis, 1981; Saito *et al.*, 1982; Danks *et al.*, 1994).

علاوه بر تغییر نرخ تنفس در دماهای پایین، غشاهای سلولی نیز متحمل تغییرات زیادی در تطابق با این شرایط می‌شوند (Danks, 1987; Shimuzu, 1992). در واقع در دماهای پایین فواصل بین اجزاء غشا که در حالت عادی با کمک پیوندهای ضعیفی کنار هم قرار گرفته‌اند کم شده در نتیجه اجزاء نسبت به حالت عادی به شکل محکم‌تری با هم مرتبط می‌شوند و این مسأله روی عملکرد غشاء اثر سوء گذاشته و تراوایی آن را کاهش می‌دهد. در این حالت غشاء در اصطلاح از حالت سیال و فاز مایع (Liquid crystalline phase) به فاز ژل (Gel phase) تبدیل می‌شود. چربی‌های موجود در غشا در پاسخ به این تحولات دچار تغییرات و سازگاری‌هایی می‌شوند که به آن "Homeoviscous adaptation" گویند (Singer & Nicolson, 1972; Sinensky, 1974). یکی از متداول‌ترین این سازگاری‌ها، تغییر در نسبت اسیدهای چرب غشا می‌باشد (Bashan & Cakmak, 2005). در بسیاری از حشرات مشخص شده است که در زمان مواجه شدن آنها با دماهای پایین بر مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع افزوده شده و نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع زیاد می‌شود (Bennett & Lee, 1997). دلیل اصلی این مسأله تأثیر دماهای پایین روی غشاهای سلولی و عکس‌العمل سلول به منظور جلوگیری از صدمه به غشاء است. زیرا میزان سیالیت غشا علاوه بر طول اسیدهای چرب، به درصد اسیدهای چرب غیر اشباع نیز وابسته است و سلول به این وسیله در دماهای پایین مانع از بین رفتن سیالیت و تراوایی غشا می‌شود (Sinensky, 1974).

سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* (L.) از آفات مهم کلمیان است که در بسیاری از مناطق ایران پراکنش داشته و با افزایش سطح زیر کشت دانه‌های روغنی بر اهمیت آن افزوده شده است. این آفت دارای ۲-۴ نسل در سال بوده و زمستان‌گذرانی آن به صورت شفیره روی گیاهان میزبان یا پناهگاه مناسب می‌باشد. مواجه شدن لاروهای سنین ۲ یا ۳ این حشره با دوره روشنایی کمتر از ۱۵ ساعت سبب القاء دیاپوز در شفیره‌های آنها می‌شود که حدود ۵ ماه طول می‌کشد (Jogar *et al.*, 2005). بررسی متابولیسم کربوهیدرات‌های سفیده کلم طی دوره رشدی عادی و دیاپوزی با کمک گلوکز نشاندار ($U-^{14}C$) نشان داد، ترهالوز نقش مهمی در تحمل به سرمای این آفت ایفا می‌کند (Moreau *et al.*, 1981). در مطالعات دیگر نیز اهمیت سوربیتول و ترهالوز به عنوان ترکیبات محافظ سرما در این حشره مشخص شده است (Pullin & Bale, 1989; Atapour, 2017). تاکنون در ارتباط با تغییرات اسیدهای چرب غشاء در دماهای پایین در این حشره مطالعه‌ای انجام نگرفته است، بر این اساس هدف

این مطالعه بررسی تغییرات اسیدهای چرب غشاهای سلولی طی ماه‌های سرد سال و در زمان رکود متابولسمی شفییره‌های آفت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری حشرات زمستان‌گذران

شفیره‌های سفیده بزرگ کلم طی ماه‌های آبان ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴ به طور ماهانه از مزارع کلزای اطراف گرگان جمع‌آوری شدند و به منظور جلوگیری از وارد آمدن تنش دمایی، در داخل ظرف پلاستیکی دوجداره با حجم ۱/۵ لیتر گذاشته و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. این شفیره‌های زمستان‌گذران بیشتر بر روی تنه درختان یا گیاهان و بناهای اطراف به صورت عمودی و با کمک یک کمربند ابریشمی بسیار نازک خود را مستقر ساخته بودند.

اندازه‌گیری گازهای تنفسی

به منظور بررسی زمان وارد شدن شفیره‌ها به رکود متابولسمی، از روش اندازه‌گیری گازهای تنفسی استفاده شد. در هر ماه سه شفیره جمع‌آوری شده پس از توزین به سرنگ‌های مخصوص با حجم ۱۰ میلی‌لیتر منتقل شدند. سر سرنگ‌ها به گونه‌ای مسدود شدند که هیچگونه امکان تبادل هوایی وجود نداشته باشد. پس از ۲۴ ساعت میزان افزایش CO₂ و کاهش O₂ با تزریق ۴ میلی‌لیتر از هوای داخل سرنگ به دستگاه GC (GC Agilent, 7890A, USA) و مقایسه آن با نمونه شاهد (نمونه فاقد حشره که تنها با هوا پر شده بود) به دست آمد. آشکار ساز دستگاه از نوع TCD (Thermal Conductivity Detector) با دمای ۲۵۰ درجه سلسیوس بود. دمای آون ظرف یک دقیقه به ۶۰ درجه سلسیوس رسانده شد و آنگاه با سرعت ۲۰°C/min به دمای ۸۰ درجه سلسیوس رسید. سپس با سرعت ۳۰°C/min به دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس رسانده شده و ۳/۷ دقیقه در این دما نگه داشته شد. مدت زمان کلی ثبت کروماتوگرام گازها حدود ۷ دقیقه بود.

استخراج چربی کل

به منظور استخراج چربی کل از روش Folch تغییر یافته (Modified Folch method, Folch *et al.*, 1967) استفاده شد. در هر تیمار ۳ تکرار و در هر تکرار یک حشره مورد آزمایش قرار گرفت. پس از توزین و همگن نمودن با متانول و کلروفرم (به نسبت ۱ به ۲)، نمونه‌ها در دور ۵۰۰۰ g برای ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ شده، به قسمت بالایی نمونه، محلول نمک پتاسیم کلرید ۰/۸۸ درصد به میزان یک چهارم حجم محلولی که به نمونه اضافه شده بود، اضافه شد و پس از سانتیفریوژ مجدد، فاز رویی که آب و متانول بود، با یک میکروپیپت خارج و به فاز پائینی که حاوی چربی و کلروفرم بود ۰/۵ میلی‌لیتر محلول آب دو بار تقطیر و متانول (به نسبت مساوی) اضافه شد و به طور مجدد دو فاز شکل گرفت که فاز رویی دور ریخته شد و فاز زیرین در داخل آون تحت خلاء در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا حلال آن به طور کامل تبخیر گردد.

جداسازی چربی‌های غشاء (فسفولیپیدها) از سایر چربی‌ها

به این منظور از روش استخراج با فاز ثابت (Solid Phase Extraction) و کارتریج‌های NH₂ (500 mg aminopropyl-modified silica, 3 ml; Macherey-Nagel (MN), Germany)، استفاده شد (Choi *et al.*, 1993; Michaud & Denlinger, 2006; Bahrdorff *et al.*, 2007; Overgaard *et al.*, 2008). در این

روش محلول حاوی چربی، از درون فاز ساکن (سیلیکا) عبور داده شده و طی مراحل مختلف با کمک حلال‌های مختلف، فسفولیپیدها (قطبی) از سایر چربی‌ها (غیر قطبی) جدا شدند. این آزمایش در چهار مرحله انجام شد:

مرحله اول: آماده‌سازی

در این مرحله به منظور فعال سازی و آماده شدن فاز ساکن جامد (سیلیکا)، از ۳ میلی لیتر n-hexane برای هر کاتریج استفاده شد.

مرحله دوم و سوم: جذب و شستشو

در این مرحله ۳ میلی لیتر کلروفرم در داخل لوله حاوی چربی ریخته شد و از داخل کاتریج عبور داده شد. از آنجا که کلروفرم و فاز ساکن، غیر قطبی هستند تمام چربی‌های تغذیه‌ای حشره (neutral lipids) با کلروفرم شسته شده و از کاتریج خارج می‌شود در حالی که فسفولیپیدها که تقریباً تنها چربی‌های قطبی هستند، جذب فاز ساکن شده و در آن می‌مانند.

مرحله چهارم: شویش

در مرحله آخر، فسفولیپیدهای متصل به فاز ساکن جامد با استفاده از ۳ میلی لیتر متانول شسته و از روی فاز ساکن جدا و از کاتریج خارج و جمع‌آوری شدند. سپس متانول با کمک جریان گاز N₂ تبخیر شد.

مشتق‌سازی اسیدهای چرب

به منظور مشتق‌سازی اسیدهای چرب و اندازه‌گیری آنها از روش (Metcalf *et al.* (1966) استفاده شد:

مرحله هیدرولیز

به لوله‌های آزمایش حاوی فسفولیپید یک میلی لیتر هگزان اضافه شد. پس از تبخیر هگزان، ۵ میلی لیتر سود متانولی ۲ درصد (۲ گرم سود در ۱۰۰ میلی لیتر متانول) به نمونه‌ها اضافه گردیدند و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش با در بسته قرار داده شدند.

تهیه متیل استر اسیدهای چرب

پس از سرد شدن لوله‌ها، ۲/۱۷۵ میلی لیتر محلول BF₃ (بور تری‌فلوراید متانولی) ۱۴ درصد به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. بعد از سرد شدن مجدد، به آنها ۱/۵ میلی لیتر هگزان افزوده شده و سریعاً ۲ فاز شکل گرفت. این محلول‌ها را به آرامی تکان داده و یک میلی لیتر نمک طعام اشباع (۳۰۰ گرم در لیتر) به آنها اضافه گردید و سپس به شدت تکان داده شد تا مولکول‌های گلیسرول رسوب داده شود. فاز روئی که حاوی هگزان و متیل استرها بود از رسوب گلیسرول جدا و به میکروتیوب منتقل شده و ۰/۲ میکرولیتر از نمونه‌ها به ترتیب به دستگاه گاز کروماتوگرافی (Unicam 4600, USA) تزریق شدند.

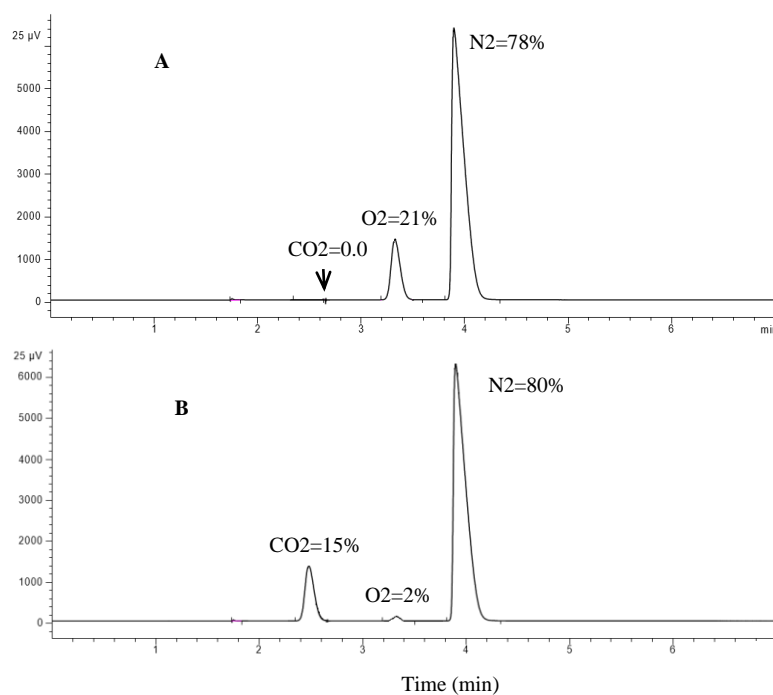
ستون مورد استفاده از نوع کاپیلاری (BPX70, 30m×0.25mm, 0.22μm) و آشکارساز آن از نوع FID (Flame Ionization Detector) بوده و از هلیوم ۹۹/۹۹ درصد (SGE, Australia) به عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای آن با سرعت ۲۰ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۱۶۰ درجه سلسیوس رسانده شد و به مدت ۶ دقیقه در این دما نگه داشته شد. آنگاه با همان سرعت به دمای ۱۸۰ درجه سلسیوس رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد و سپس به ۱۹۰ درجه سلسیوس افزایش یافت. مدت زمان کلی ثبت کروماتوگرام اسیدهای چرب حدود ۴۰ دقیقه بود.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با کمک تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) تجزیه و مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با کمک آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ver. 16.0) انجام شد. در نهایت نتایج به دست آمده، به صورت خطای استاندارد \pm میانگین گزارش شدند.

نتایج و بحث

در شکل ۱ کروماتوگرام مربوط به شناسایی و اندازه‌گیری گازهای تنفسی شفیره‌ها و در جدول ۱ تغییرات آنها در ماه‌های مختلف نشان داده شده است. میزان گاز دی‌اکسیدکربن دفع شده و اکسیژن جذب شده شفیره‌ها به طور معنی‌داری طی ۳ ماه زمستان کاهش یافت (به ترتیب $F_{5,18}=33.08; P<0.01$ و $F_{5,18}=19.27; P<0.01$ برای CO_2 و O_2) و به طور مجدد در فروردین افزایش پیدا کرد (جدول ۱). پایین‌ترین نرخ تنفس (میزان دی‌اکسیدکربن دفع شده به اکسیژن جذب شده) طی دو ماه بهمن (0.67 ± 0.02) و اسفند (0.65 ± 0.04) ثبت شد (شکل ۲).



شکل ۱- کروماتوگرام GC مربوط به گازهای تنفسی نمونه هوا (A) و یک نمونه شفیره زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم (*Pieris brassicae*) جمع‌آوری شده در دی سال ۱۳۹۳ (B).

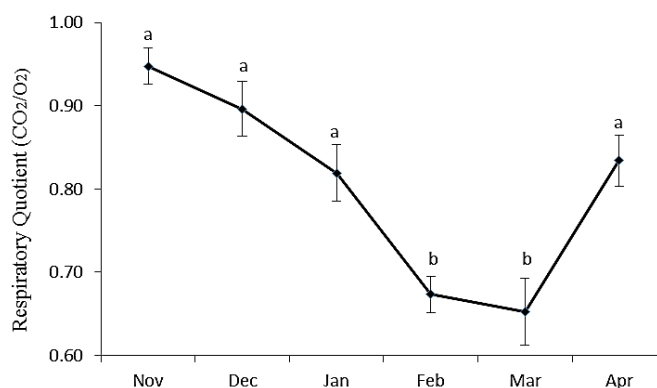
Fig. 1. GC chromatogram of respiration gases of an air sample (A) and a sample of overwintering pupa of large cabbage white, *Pieris brassicae*, collected in January 2015.

جدول ۱- تغییرات گازهای تنفسی (CO_2 و O_2) در شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* جمع‌آوری شده طی آبان ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴.

Table 1. Changes of respiration gases (CO_2 and O_2) of the overwintering pupae of large cabbage white (*Pieris brassicae*) collected from November 2014 to April 2015.

Months	Respiration ($\mu\text{l/g/h}$) (Mean \pm SE)	
	CO_2	O_2
Nov	397.82 \pm 19.47 a*	419.72 \pm 16.33 a
Dec	340.86 \pm 16.68 ab	379.97 \pm 8.06 ab
Jan	203.26 \pm 13.20 cd	250.76 \pm 23.98 cd
Feb	172.39 \pm 9.34 d	256.22 \pm 12.78 d
Mar	158.79 \pm 9.86 d	244.35 \pm 12.09 d
Apr	277.58 \pm 26.23 bc	330.85 \pm 22.97 bc

* حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی می‌باشد.
*The values in each column labeled with the same letters are not significantly different at 5% probability level using Tukey's test.



شکل ۲- نرخ تنفس (میزان CO_2 دفع شده به O_2 جذب شده) در شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* جمع‌آوری شده طی آبان ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون Tukey می‌باشد.

Fig. 2. Changes of respiration ratio (CO_2/O_2) of the overwintering pupae of large cabbage white, *Pieris brassicae* collected from November 2014 to April 2015. The values labeled with the same letters are not significantly different at 5% probability level using Tukey's test.

به این ترتیب مشخص شد که میزان متابولیسم شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده کلم طی ماه‌های زمستان و به ویژه بهمن و اسفند به پایین‌ترین حد خود کاهش یافته و مجدد با آغاز بهار شدت می‌یابد. طی مطالعه قبلی بر روی شفیره‌های این آفت (Atapour, 2016)، با استفاده از روش تشخیصی شناور ماندن شفیره‌های غیر دیاپوزی سفیده کلم و غرق شدن شفیره‌های دیاپوزی در آب مشخص شد که شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم در سه ماه زمستان در دیاپوز به سر می‌برند. اساس این روش که اثبات گردیده راه مطمئنی جهت تشخیص وضعیت دیاپوز این حشره می‌باشد بر وجود حفره داخلی بزرگ بین قفسه سینه و شکم و در نتیجه وزن مخصوص زیر ۱/۰ در شفیره‌های غیر دیاپوزی است که سبب شناور ماندن آنها در آب می‌شود در حالی که شفیره‌های دیاپوزی حفره کوچکتر و وزن مخصوص بالاتر از یک داشته و در نتیجه در آب غرق می‌شوند (Kaneko & Katagiri, 2007).

2006). بررسی گازهای تنفسی در مطالعه کنونی نیز مشخص کرد، متابولیسم در سه ماه زمستان و در زمان دیپوز حشره، کاهش یافته و با توجه به نرخ تنفس به نظر می‌رسد در دو ماه بهمن و اسفند، حشره در عمق دیپوز خود به سر برد. بررسی انجام گرفته روی گازهای تنفسی و نرخ تنفس با روشی مشابه در شفیره‌های کرم برگ‌خوار کلم، *Mamestra brassicae* L. نیز نشان داد که میزان تنفس شفیره‌ها، پس از یک ماه قرارگیری در معرض دمای ۵ درجه سلسیوس به طور معنی‌داری کاهش یافته و از مقدار ۲۵۰-۲۷۵ $\mu\text{l/g/h}$ به حدود ۷۵-۱۰۰ $\mu\text{l/g/h}$ می‌رسد (Ding et al., 2003). چنین کاهشی در لاروهای سن آخر دیپوزی کرم ذرت آسیایی *Ostrinia furnacalis* (Guenee)، نیز مشاهده شد (Goto et al., 2001). کاهش میزان تنفس در حشرات زمستان‌گذران با مقوله جیره‌بندی انرژی در ارتباط است و موفقیت حشره در این جیره‌بندی ضامن بقا وی در شرایط سخت نظیر ماه‌های زمستان خواهد بود. در زمستان این انرژی از یک سو باید پاسخگوی نیازهای مربوط به تحمل به سرما نظیر تولید ترکیبات محافظ سرما باشد، از سوی دیگر باید سایر نیازمندی‌های حیاتی جاندار را که به صورت غیر فعال در پناهگاه در حال سپری کردن زمستان است را تامین کند. (Irwin & Lee, 2003).

شش اسیدچرب پالمیتیک اسید (C16:0)، پالمیتولئیک اسید (C16:1)، استئاریک اسید (C18:0)، اولئیک اسید (C18:1)، لینولئیک اسید (C18:2) و لینولنیک اسید (C18:3) در غشاهای سلولی شفیره‌های سفیده کلم شناسایی و تغییرات آنها بررسی شد. در این بین بیشترین تغییرات به دو اسید چرب ۱۶ کربنه مربوط بود (جدول ۲).

جدول ۲- تغییرات اسیدهای چرب پالمیتیک (C16:0)، پالمیتولئیک اسید (C16:1)، استئاریک (C18:0)، اولئیک (C18:1)، لینولئیک (C18:2) و لینولنیک اسید (C18:3) و نرخ اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع (UFA/SFA) در شفیره‌های زمستان‌گذران سفیده بزرگ کلم (*Pieris brassicae*) جمع‌آوری شده از آبان ۱۳۹۳ تا فروردین ۱۳۹۴.

Table 2. Changes of palmitic (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and linolenic acid (C18:3) and unsaturated to saturated fatty acids ratio (UFA/SFA) of the overwintering pupae of large cabbage white (*Pieris brassicae*) collected from November 2014 to April 2015.

Month	Fatty acids (%) (Mean \pm SE)						UFA/SFA
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
Nov	31.8 \pm 4.6 ab*	8.59 \pm 0.75 b	7.7 \pm 1.58 ab	27.9 \pm 4.04 a	5.3 \pm 0.35 a	18.8 \pm 2.68 a	1.65
Dec	39.2 \pm 2.71 a	5.46 \pm 2.13 b	4.8 \pm 0.75 b	27.6 \pm 4.28 a	4.6 \pm 0.42 a	18.3 \pm 3.78 a	1.29
Jan	22.0 \pm 1.56 b	7.58 \pm 2.12 b	6.3 \pm 0.91 ab	38.8 \pm 2.27 a	7.1 \pm 0.78 a	18.2 \pm 2.49 a	2.57
Feb	22.5 \pm 0.75 b	17.0 \pm 0.68 a	4.4 \pm 0.22 b	36.9 \pm 0.92 a	6.7 \pm 0.90 a	12.5 \pm 0.46 a	2.72
Mar	23.9 \pm 1.38 b	12.4 \pm 1.1 ab	5.6 \pm 0.48 ab	34.8 \pm 0.59 a	6.2 \pm 0.66 a	17.1 \pm 1.26 a	2.41
Apr	28.5 \pm 2.05 ab	8.11 \pm 2.04 b	10.5 \pm 0.98 a	25.3 \pm 5.62 a	9.6 \pm 3.04 a	18.0 \pm 4.27 a	1.59

*حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی می‌باشد.

*The values in each column labeled with the same letters are not significantly different at 5% probability level using Tukey's test.

پالمیتیک اسید به طور معنی‌داری طی ماه‌های مختلف تغییر نمود ($F_{5,12}=7.01$; $P<0.05$) به طوری که در سه ماه زمستان به طور متوسط نسبت به دو ماه قبل در پایین حدود ۳۵ درصد کاهش داشت و مجدد در فروردین کمی افزایش داشت. به طور معکوس اسید چرب غیر اشباع پالمیتولئیک اسید، به ویژه در دو ماه بهمن و اسفند افزایش چشمگیر و معنی‌داری را نشان داد ($F_{5,12}=6.89$; $P<0.05$). پالمیتولئیک اسید (C16:1) دارای یک باند دوگانه در وسط زنجیر ۱۶ کربنی خود است که به نظر می‌رسد جایگاه بسیار خوبی برای قرارگیری پیوند دوگانه برای افزایش سیالیت غشا باشد (Starling et al., 1993).

علاوه بر پالمیتیک اسید، دومین اسید چرب اشباع شناسایی شده، استئاریک اسید، نیز به طور معنی‌داری کاهش داشت ($F_{5,12}=3.81$; $P<0.05$; جدول ۲). هر چند تغییرات اسیدهای چرب غیر اشباع ۱۸ کربنه طی ماه‌های مختلف معنی‌دار نبود اما به طور متوسط نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در سه ماه زمستان حدود ۴۲ درصد نسبت به ماه‌های آبان و آذر افزایش نشان داد (از حدود ۱/۴ به ۲/۵). چنین تغییراتی در نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع، در سایر حشرات مطالعه شده در برابر دماهای پایین مشاهده شده است. به عنوان مثال در *Eurosta solidaginis* (Fitch) (Storey & Storey, 1988)، *Sarcophaga crassipalpis* (Macquart) (Michaud & Denlinger, 2007)، *Delia antiqua* (Meigen) (Kayukawa et al., 2007)، *Chymomyza costata* Zetterstedt (Atapour et al., 2007) و *Chilo suppressalis* (Walker) (Kostal et al., 2000) (Khani et al., 2007) نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در دماهای پایین افزایش می‌یابد. در مطالعه انجام شده روی کرم ساقه خوار ذرت *Ostrinia nubilalis* Hubn. افزایش نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در طول دوره دیابوز به افزایش پالمیتولیک و اولئیک اسید و متعاقب آن کاهش دو اسید چرب اشباع پالمیتیک و لینئولیک اسید مرتبط بود (Vukašinović et al., 2013, 2015). البته در کنار این موارد، استثنائاتی نیز گزارش شده است به عنوان مثال در سن *Pyrhocoris apterus* (L.) افزایش نسبی 1-palmitoyl-2-linoleyl-sn-GPEtn به 1,2-dilinoleyl-sn-GPChol سبب مقداری کاهش در نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع می‌گردد (Tomcala et al., 2006).

مهمترین اسیدهای چرب مگس گالی *E. solidaginis* که به صورت لاروهای سن ۳ زمستان‌گذرانی می‌نماید، C18: 1، C16: 0، C18: 2 و C18: 0 می‌باشد (Storey & Storey, 1988; Bennett et al., 1997) و افزایش نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در آن بیشتر به افزایش C18:1 و کاهش C16:0 مربوط است (Bennett et al., 1997). مطالعات بر روی لاروهای زمستان‌گذران کرم سیب نیز نشان دادند که مشابه نتایج مطالعه کنونی و همچنین مگس *E. solidaginis*، بیشترین کاهش اسیدهای چرب اشباع مربوط به پالمیتیک اسید بوده، ولی بیشترین افزایش اسیدهای چرب غشا در دماهای پایین در این حشره مربوط به C18:2 بود (Rozsypal et al., 2014).

به این ترتیب مشخص شد در شفیره‌های دیابوزی سفیده بزرگ کلم در طول زمستان، زمانی که سطح تنفس و متابولیسم به حداقل می‌رسد و حشره به ظاهر در رکود به سر می‌برد، تغییر و تبدیلات پویایی در سطح سلولی و در غشاهای سلول به وقوع پیوسته و با افزایش نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع که به طور عمده در اثر کاهش C16:0 و C18:0 و افزایش C16:1 است، سیالیت غشا بالا رفته و در نتیجه حشره برای رویارویی با دماهای پایین زمستان آماده می‌شود. مطالعات تکمیلی بیشتر روی چربی‌های بدن به روش کالریمتری روبشی تفاضلی (Differential scanning calorimetry) و همچنین آنزیم‌ها می‌تواند مشخص نماید که تغییر و تبدیل‌های اسیدهای چرب غشا، ناشی از تاثیر مستقیم دماهای پایین بوده و یا متأثر از تغییرات فیزیولوژیکی درونی پدیده دیابوز می‌باشند.

سپاس‌گزاری

به این وسیله از گروه حشره‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، به ویژه جناب آقای دکتر محرمی پور و همچنین سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به دلیل پشتیبانی این پروژه از نظر مشاوره‌ای، تامین امکانات و مالی قدردانی می‌شود.

References

- Atapour, M.** (2016) Investigation of Overwintering and Cold Tolerance in Pupae of Large Cabbage White, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) in Iran. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 46(2), 269-276. [In Persian with English summary].
- Atapour, M.** (2017) Cryoprotectants in Lab-reared and Overwintering Pupae of Large Cabbage White, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae). *Iranian Journal of Plant Protection Science* 48 (1), 139-150. [In Persian with English summary].
- Atapour, M., Moharramipour, S. & Barzegar, M.** (2007) Seasonal changes of fatty acid compositions in overwintering larvae of rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 10, 33-38.
- Bahrndorff, S., Petersen, S.O., Loeschke, V. Overgaard, J. & Holmstrup, M.** (2007) Differences in cold and drought tolerance of high arctic and sub-arctic populations of *Megaphorura arctica* Tullberg 1876 (Onychiuridae: Collembola). *Cryobiology* 55, 315-323.
- Bashan, M. & Cakmak, O.** (2005) Changes in composition of phospholipid and triacylglycerol fatty acids prepared from prediapausing and diapausing individuals of *Dolycoris baccarum* and *Piezodorus lituratus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Annals of Entomological Society of America* 98, 575-579.
- Bennett, V. A. & Lee, R. E.** (1997) Modeling seasonal changes in intracellular freeze-tolerance of fat body cells of the gall fly *Eurosta solidaginis*. *Journal of Experimental Biology* 200, 185-192.
- Choi, G. T., Casu, M. & Gibbons, W. A.** (1993) N.m.r. lipid profiles of cells, tissues and body fluids. Neutral, non-acidic and acidic phospholipid analysis of Bond Elut chromatographic fractions. *Biochemical Journal*, 290 (3), 717-721.
- Danks, H. V.** (1987) *Insect Dormancy: an Ecological Perspective*. Biological Survey of Canada, Ottawa, 439 pp.
- Danks, H. V., Kukul, O. & Ring, R. A.** (1994) Insect cold hardiness-insights from the arctic. *Arctic* 47, 391-404.
- Ding, L. Li, Y. & Goto, M.** (2003) Physiological and biochemical changes in summer and winter diapause and non-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. during long-term cold acclimation. *Journal of Insect Physiology* 49, 1153-1159.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. H.** (1967) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Goto, M., Sekine, Y., Outa, H., Hujikura, M. & Suzuki, K.** (2001) Relationships between cold hardiness and diapause, and between glycerol and free amino acid contents in overwintering larvae of the oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Journal of Insect Physiology* 47, 157-165.
- Irwin, J. T. & Lee, R. E., Jr.** (2003) Cold winter microenvironments conserve energy and improve overwintering survival and potential fecundity of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Oikos* 100, 71-78.
- Jõgar, K., Metspalu, L., Hiiesaar, K., Luik, A., Martin, A.-J., Mänd, M., Jaaniso, R. & Kuusik, A.** (2005) Physiology of diapause in pupae of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Agronomy Research* 3(1), 21-37.
- Kaneko, J. & Katagiri, C.** (2006) A simple method to discriminate diapause from non-diapause pupae in large and small white butterflies, *Pieris brassicae* and *P. rapae crucivora*. *Naturwissenschaften* 93(8), 393-396.
- Kayukawa, T., Chen, B., Hoshizaki, S., & Ishikawa, Y.** (2007) Upregulation of a desaturase is associated with the enhancement of cold hardiness in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1160-1167.
- Khani, A., Moharramipour, S., Barzegar, M. & Naderi-Manesh, H.** (2007) Comparison of fatty acid composition in total lipid of diapause and non-diapause larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Science*, 14: 125-131.

- Kostal, V. & Simek, P.** (1998) Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerides after cold acclimation of an aestivating insect prepupa. *Journal of Comparative Physiology (B)* 168, 453–460.
- Kostal, V., Shimada, K. & Hayakawa, Y.** (2000) Induction and development of winter larval diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* 46, 417–428.
- Metcalf, L. C., Schmitz, A. A. & Pelka, J. R.** (1966) Rapid preparation of methyl esters from lipid for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry* 38, 514–515.
- Michaud, M. R. & Denlinger, D.** (2006) Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology* 52(10), 1073–1082.
- Michaud, M. R. & Denlinger, D. L.** (2007) Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 177, 753–763.
- Moreau, R., Olivier, D., Gourdoux, L. & Dutrieu, J.** (1981) Carbohydrate metabolism in *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera); variations during normal and diapausing development. *Comparative Biochemistry and Physiology* 68 (B), 95–99.
- Overgaard, J., Tomčala, A., Sørensen, J.G., Holmstrup, M. Henning Krogh, P. Šimek, P. & KOŠTÁL, V.** (2008) Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 54(3), 619–629.
- Pullin, A. S. & Bale, J. S.** (1989) Influence of diapause and temperature on cryoprotectant synthesis and cold hardiness in pupae of *Pieris brassicae*. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 94, 499–503.
- Rozsypal, J., Košťál, V., Berková, P., Zahradníčková, H. & Šimek, P.** (2014) Seasonal changes in the composition of storage and membrane lipids in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Journal of Thermal Biology* 45, 124–133.
- Saito, A., K. Koga, & B. Sakaguchi.** (1982) Changes in polysome content during development after diapause of *Bombyx mori* embryos. *Federation of European Biochemical Societies* 150(2), 449–453.
- Shimuzu, I.** (1992) Comparison of fatty acid composition in lipids of diapause and non-diapause eggs of *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 102, 713–716.
- Sinensky, M.** (1974) Homeoviscous adaptation; a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 71(2), 522–525.
- Singer, S. J. & Nicolson, G. L.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Starling, A. P., East, J. M. & Lee, A. G.** (1993) Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the [Ca²⁺ - Mg²⁺]-ATPase. *Biochemistry* 32, 1593–1600.
- Storey, K. B. & Storey, J. M.** (1988) Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews* 68, 27–84.
- Thompson, A.C. & F.M. Davis.** (1981) The effect of temperature on the rate of metabolism of lipids and glycogen in diapausing southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* 70(4), 555–558.
- Tomcala, A., Tollarova, M., Overgaard, J., Simek, P. & Kostal, V.** (2006) Seasonal acquisition of chill tolerance and restructuring of membrane glycerophospholipids in an overwintering insect: triggering by low temperature, desiccation and diapause progression. *Journal of Experimental Biology* 209, 4102–4111.
- Vukašinović, E.L., Pond, D.W., Worland, M.R., Kojić, D., Purać, J., Popović, Ž.D. & Grubor-Lajšić, G.** (2015) Diapause induces remodeling of the fatty acid composition of membrane and storage lipids in overwintering larvae of *Ostrinia nubilalis*, Hubn. (Lepidoptera: Crambidae). *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 184, 36–43. doi: 10.1016/j.cbpb.2015.02.003.

Vukašinović, E.L., Pond, W.D., Worland, M.R., Kojić, D., Purać, J., Blagojević, P.D. & Grubor-Lajšić, G. (2013) Diapause induces changes in the composition and biophysical properties of lipids in larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Comparative Bio chemistry and Physiology (B)* 165, 219–225.
