نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران، ۲٤: (۱)، ۱۳۸۳

مقایسه برخی از ماکرومولکول‌های همولنف کرم ابریشم *Bombyx mori* (Lep.: Bombycidae)

کیوان اعتباری [۱] و لیلا متین دوست [۱]

چکیده

شناخت ماهیت بیوشیمیایی همولنف حشرات می‌تواند در بررسی‌های فیزیولوژیک راهگشا باشد. به منظور تعیین فراوانی و دامنه تغییرات مقدار برخی از ماکرومولکول‌های موجود در همولنف کرم ابریشم، مقدار گلوکز، کلسترول، اوره و اسید اوریک لاروهای سن چهارم و پنجم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که در سن پنجم لاروی میزان این ترکیبات به غیر از اورهٔ در همولنف نسبت به سن چهارم افزایش پیدا می‌کند. مقدار اوره اندازه گیری شده در لاروهای سن چهارم۳/۰۵ ±٤۸/۹٤ میلی گرم بر میلی لیتر بوده در حالی که میزان آن دژ لاروهای سن پنجم با بیش از ۸۷٪ کاهش به ٦/۱۸±۲/٤ میلی گرم بر میلی لیتر رسید که مهمترین علت این پدیده وارد شدن اوره در متابولیسم سنتز تار ابریشمی توسط غدد ابریشم ساز بود. مقدار گلوکز، اسید اوریک و کلسترول به ترتیب در لاروهای سن چهارم ۱/۰۳ ±۷/۵۸، ۰/٦۱ ±۱/۸۹ و ۲/۰۳±۱۱/۵۲ میلی گرم بر دسی لیتر محاسبه شد در حالیکه فراوانی همین ترکیبات در ششمین روز سن پنجم لاروی به ترتیب ۲/٤± ۱۸/۹ ، ۱/۰۹±۳/۲۲ و ۲/۳۵±۲٤/٦۵ میلی گرم بر دسی لیتر بود. به نظر می‌رسد فعالیت متابولیکی بیشتر در سن پنجم مهمترین عامل افزایش این ترکیبات باشد.

واژگان کلیدی: کرم ابریشم، گلوکز، اوره، اسید اوریک، کلسترول

۱- گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، صندوق پستی ۱۱٤٤ Email: eteban@guilan.ac.ir

این مقاله در تاریخ ۸۲/۵/۲۵ دریافت و چاپ آن در تاریخ ۸۳/۳/۱۲ به تصویب نهایی رسید.

مقدمه

مطالعه تغییرات بیوشیمیایی همولنف در حشرات نمایانگر فعل و انفعالات ضروری جهت تامین انرژی می‌باشد. عوامل متعددی از جمله غذا، مرحله سنی، جنسیت، تغییرات فصلی و بیماری‌های مختلف روی ترکیبات همولنف حشرات تاثیر چشمگیری بر جا می‌گذارند (۱، ۲، ۳، ۵، ٦ ، ۲۱ و ۲۵). شناخت نحوه تغییر و دامنه نوسان این ترکیبات می‌تواند در تفسیر داده‌های حاصل از بررسی‌های فیزیولوژیک و درک صحیح از متابولیسم بسیار مفید فایده باشد. کرم ابریشم *Bombyx mori* L. علاوه بر اینکه به عنوان پایه و اساس صنعت نوغانداری مطرح بوده با توجه به جثه و سایر شرایط مناسب به یک مدل آزمایشگاهی مطلوب جهت بررسی‌های فیزیولوژیک تبدیل گشته است و بسیاری از جنبه‌های زندگی آن مورد مطالعه قرار گرفته است.

ازآنجائیکه متابولیسم پروتئین در ارتباط با سنتز تار ابریشم و عملکرد تولید پیله می‌باشد بررسی های زیادی در خصوص این ترکیب و ارزیابی تغییرات غلظت آن در همولنف کرم ابریشم انجام پذیرفته و گزارشات متعدد دیگری نیز وجود دارد که حاکی از تغییرات مقدار برخی از آنزیم‌ها و سایر ماکرومولکول‌های بیوشیمیایی ناشی از اختلاف سن لاروی در حشرات می‌باشد (۱۸، ۲۱ و ۲۵).

اعتباری در سال ۱۳۸۱ گزارش نمود که با افزایش سن لاروی، مقدار پروتئین در همولنف کرم ابریشم افزایش پیدا می‌کند (۱). تحقیقات انجام شده روی هیبرید ایرانی ۱۰٤×۱۰۳ نشان داده که متوسط مقدار پروتئین کل در همولنف این سری از لاروها بین ۲۵/٦-۲۱/۸ میلی گرم بر دسی لیتر در نوسان بوده و جیره غذایی حاوی نیتروژن توانست این مقدار رابه ٦۲/۰۲۵ میلی گرم بر دسی لیتر برساند (۲).

ردی و همکاران (۲۸) نشان دادند که مقدار پروتئین در همولنف لاروهای کرم ابریشم تاسار[1] با افزایش سن زیاد می‌شود. در این خصوص مقدار برخی از ترکیبات نظیر RNA تغییرات معکوسی داشته و مقدار DNA نیز تا روز هفتم سن آخر لاروی افزایش یافته و پس ازآن کاهش می‌یابد. مقدار پروتئاز موجود در مایع معده میانی لاروهای کرم ابریشم نیز با بالا

1- *Antheraea mylitta*

رفتن سن در دوره تغذیه تا روز هفتم سن پنجم افزایش می‌یابد (۱۸). همچنین گزارش شده است که مقدار آنزیم سوکراز نیز تحت تاثیر سن لاروی تغییرات قابل ملاحظه‌ای را از خود نشان می‌دهد. مقدار این آنزیم در سن چهارم بسیار کم بوده و با افزایش سن لاروها در پنجمین روز پس از چهارمین جلد اندازی یعنی کمی قبل از مرحله شفیرگی افزایش قابل توجه‌ای پیدا می‌نماید و این به خاطر نیاز شدید لاروها به انرژی جهت گذراندن این مرحله از زندگی است، زیرا بخش مهمی از کربوهیدراتهای جیره غذایی کرم ابریشم را ساکارز تشکیل می‌دهد (۳۷).

اسیدهای آمینه از ترکیباتی هستند که تغییرات قابل توجهی را در مراحل مختلف لاروی از خود نشان می‌دهند. تحقیقات نشان داده که مقدار اسید گاماآمینوبوتریک در همولنف لاروهای پروانه موم خوار[1] با افزایش سن لاروها در دوره پیش شفیرگی زیاد شده و در خلال دگردیسی به اوج خود خواهد رسید (۱۲). دای و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که اسید آمینه گلیسین نیز دو بار در خلال سن پنجم کرم ابریشم افزایش چشمگیری پیدا می‌کند و این در ارتباط با تولید ابریشم توسط غدد ابریشم ساز می‌باشد. ژانگریس و همکاران (۲۰) گزارش نمودند که مقدار کلسیم و پتاسیم همولنف لاروهای کرم ابریشم سکروپیا[2] در خلال دوره تکاملی و تغییر جیره غذایی، دچار تغییرات قابل ملاحظه‌ای می‌شوند.

تری‌هالوز به‌عنوان قند خون اکثر حشرات و همچنین کرم ابریشم تغییرات قابل ملاحظه‌ای را در مراحل مختلف زیستی از خود نشان می‌دهد. مشاهدات شیمادا و کامادا در سال ۱۹۸۰ موید آنست که مقدار این قند در غدد ابریشم ساز کرم ابریشم نیز کمی قبل از تنیدن پیله به بالاترین حد خود می‌رسد و با هیستولیز غدد ابریشم ساز مقدار آن کاهش می‌یابد (۳۳). عموماً مقدار این قند در همولنف لاروها نیز از ۷۲ ساعت پس از چهارمین جلداندازی شروع به افزایش می‌کند. بنابراین آگاهی از تغییرات ترکیبات زیستی می‌تواند در توجیه دقیق مکانیزم‌های متابولیکی و تغییر آنها به نحوی که برای ما مفید باشد، بسیار حائز اهمیت است.

1- *Galleria mellonella*
2- *Hyalophora cecropia*

این تحقیق در راستای شناسایی نشانگرهای بیوشیمیایی مرتبط با صفات تولیدی در کرم ابریشم به منظور تعیین دامنه تغییرات مقدار برخی از ترکیبات بیوشیمیایی عمده موجود در همولنف لاروهای کرم ابریشم هیبرید ایرانی انجام پذیرفت تا بتوان با نتایج حاصل از این تحقیق علاوه بر مقایسه تاثیر سن لاروی بر میزان این ترکیبات و درک علل این وقایع زیرسازه‌ای برای تحقیقات آتی را فراهم نمود. برای این منظور میزان چهار ترکیب از دسته‌های مختلف شامل گلوکز، کلسترول، اوره و اسید اوریک مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تخم نوغان هیبرید تجاری ۱۰۷× ۱۱۰ از شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم ایران- رشت تهیه گردید. لاروها مطابق با شرایط استاندارد پرورش یافتند (۲٤). به منظور نمونه‌برداری لازم جهت مطالعات بیوشیمیایی از بسترهای پرورش در چهارمین روز سن چهارم و ششمین روز سن پنجم ۳۰ لارو بطور تصادفی جمع آوری گردید. برای استخراج همولنف یکی از پاهای شکمی لاروها (ترجیحاً پای عقبی) با استفاده از یک قیچی تیز و نوک باریک بطور عرضی قطع گردید(۲۷) و سپس بدون هیچگونه فشاری، همولنف لاروها در چند لوله کوچک اپندورف بطور جداگانه جمع‌آوری شد و برای جلوگیری از فعالیت آنزیم پروفنل اکسیداز که سبب ملانیزه شدن همولنف می‌گردد مقداری فنیل تیو اوره به نمونه‌ها اضافه شد (۲۷). کلیه نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند و سپس مایع بالایی آنها با استفاده از میکروپیپت برداشته و به میکروتیوب‌های جدید منتقل گردید. تمامی نمونه‌ها تا شروع آزمایش‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری گلوکز از روش ارائه شده توسط ریختریخ (۳۰) و از کیت شرکت زیست شیمی استفاده گردید. اساس این روش آنزیماتیک بر پایه تاثیر آنزیم گلوکز اکسیداز روی گلوکز بوده که سبب تشکیل اسید گلوکورونیک و پراکسید هیدروژن می‌گردد. پراکسید هیدروژن حاصله تحت تاثیر آنزیم پراکسیداز در حضور ٤-آمینو فنازن و فنل ایجاد کمپلکس

رنگی می‌نماید. جهت اندازه‌گیری اسید اوریک مطابق روش تریودی و همکاران (۳۸) عمل شد. اسید اوریک در اثر تاثیر آنزیم اوریکاز به آلانتوئین و آب اکسیژنه تبدیل شده که نهایتاً در اثر پراکسیداز و در مجاورت آمینوآنتی پیرین به کینون قرمز رنگ تبدیل می‌شود. جذب رنگ حاصله در طول موج ۵۰۰ نانومتر متناسب با غلظت اسید اوریک در محیط می‌باشد. اوره بر اساس تاثیر دو آنزیم اوره آز و گلوتامات دهیدروژناز در نمونه‌ها طبق روش توصیف شده بوسیله فوالکنر و کینگ (۱۱) اندازه گیری شد. برای اندازه گیری کلسترول کل همولنف بر اساس روش ریکموند (۲۹) عمل گردید. اصول این روش بر مبنای هیدرولیز استرهای کلسترول توسط آنزیم‌های کلسترول اکسیداز، کلسترول استراز و پراکسیداز پایه گذاری شده است.

کلیه داده‌ها جهت دستیابی به حداقل اختلاف معنی‌دار طی آزمون t در سطح ۵٪ با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۰ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تاثیر سن لاروی در میزان مقدار ترکیبات بیوشیمیایی مورد بررسی در لاروهای سن چهارم و پنجم کرم ابریشم در شکل‌های یک الی ٤ ارائه شده است.

مقایسه مقدار گلوکز در لاروهای سن چهارم و پنجم: میانگین مقدار گلوکز (±Sd) در همولنف لاروهای سن پنجم ۲/٤ ± ۱۸/۹۹ میلی گرم بر دسی لیتر بوده که به مراتب بیش از سن چهارم است بطوریکه در این لاروها مقدار گلوکز همولنف۱/۰۳ ± ۷/۵۸ میلی گرم بر دسی‌لیتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱). دامنه تغییرات مقدار این ترکیب در لاروهای سن چهارم بین ۸/٦-٦/٥٤ میلی گرم بر دسی لیتر تعیین گردید. همین مشخصه برای لاروهای سن پنجم بین ۲۱/۳۸-۱٦/۵۸ میلی گرم بر دسی لیتر در نوسان بود.

اندازه‌گیری گلوکز خون در حشرات می‌تواند تاحد بسیار زیادی نمایانگر متابولیسم کربوهیدرات‌ها باشد. با وجود اینکه تری‌هالوز قند غالب همولنف اکثر حشرات می‌باشد ولی

ارزیابی مقدار گلوکز خون در کرم ابریشم و سایر حشرات بعنوان قند قابل دسترس سلولی حائز اهمیت است (۱، ۳۱ و ۳٤).

سیگرت در سال ۱۹۸۷ نشان داد که مقدار گلوکز همولنف در لاروهای سن ٤ و ٥ کرم شاخدار تنباکو[1] نسبت به سایر مراحل زندگی افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. این در حالیست که مقدار این ماده در سن پنجم تاحدی بیش از سن چهارم می‌باشد (۳٤). همین محقق اعتقاد دارد که گلوکز موجود در همولنف بین ۲۰-۱۵٪ از کل کربوهیدرات‌های خون را در این مرحله تشکیل می‌دهد (۳٤). ساتاکه و همکاران (۳۱)، مقدار گلوکز خون لاروهای سن پنجم کرم ابریشم را ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری نمودند. اعتباری (۱) نشان داد که افزایش مقدار گلوکز در خون بی ارتباط با بهبود عملکرد زیستی حشره نمی‌باشد.

گزارش گردیده که از نیمه دوم سن پنجم مقدار گلوکز در همولنف لاروهای کرم شاخدار تنباکو کاهش پیدا می‌کند. مقدار گلوکز در این لاروها کمی قبل از آخرین جلداندازی کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. این مطلب نشان‌دهنده اهمیت گلوکز در فرآیند جلداندازی است زیرا حشرات از این ترکیب برای سنتز کیتین استفاده می‌کنند (۳٤). گلوکز علاوه براین‌که در بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی در حشرات دخالت داشته در رهاسازی هورمون‌های مغز نیز نقش مهمی ایفا می‌کند. ماسومورا و همکاران (۲٦) گزارش نمودند که رهاسازی هورمون بومبیکسین از مغز کرم ابریشم به غلظت گلوکز در خون وابسته است. مکانیزم کنترل این هورمون دقیقاً مشابه هورمون انسولین در پستانداران می‌باشد.

مقایسه مقدار کلسترول در لاروهای سن چهارم و پنجم: همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد مقدار این ماده در لاروهای سن پنجم ۲/۳۵±۲٤/٦٦ میلی گرم بر دسی لیتر بوده که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری را در سطح ٥٪ با مقدار کلسترول در لاروهای سن چهارم نشان می‌دهد . مقدار این ترکیب در چهارمین روز سن چهارم ۲/۰۳±۱۱/۵۲ میلی گرم بر دسی لیتر اندازه گیری شد، بطوریکه دامنه تغییرات آن بین ۱۳/۵٦-۹/٤۸ میلی گرم بر دسی لیتر در

1- *Manduca sexta*

نمونه‌های مختلف در نوسان بود. همین مشخصه در ششمین روز سن پنجم بین ۲۷-۲۲/۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. تصور می‌شود افزایش مقدار کلسترول در لاروهای سن پنجم به علت افزایش کارآیی جذب مواد غذایی در معده میانی لاروها و فعال شدن متابولیسم چربی در آنها باشد چراکه این لارو به مراتب بیش از لاروهای سن چهارم به انرژی نیاز دارند بطوریکه فعالیت متابولیکی آنها نیز در سن آخر بیش از سن چهارم گزارش شده است (۱۷).

متابولیسم کلسترول و سایر استرول‌ها در حشرات به اندازه کافی مطالعه نشده است. ولی نتایج مبین آنست که استرول‌ها یکی از ترکیبات بسیار مهم برای رشد و نمو بوده که در لاروهای کرم ابریشم عموماً از طریق تغذیه بدست می‌آیند (٦). اعتقاد بر اینست که با پائین آمدن مقدار استرول‌ها در خون حشرات رشد و نمو آنها دچار کاهش می‌شود (٦). عموماً بیش از ۱۳٪ از کلسترول جذب‌شده در همولنف وجود دارد و لیپوفورین‌ها تنها حامل آن در همولنف حشرات می‌باشند (۱۹). جونی و همکاران (۱۹) دریافتند که ۹۹٪ از کلسترول موجود در همولنف لاروهای کرم شاخدار تنباکو بصورت آزاد هستند در حالی‌که در اندام چربی این حشرات فرم‌های استری آن نیز مشاهده می‌گردد و مقدار آن تابعی از مراحل مختلف زندگی یا سن لاروها و همچنین جنسیت آنها می‌باشد. تغییرات مقدار آن در همولنف همین لاروها مورد بررسی قرارگرفت نتایج حاکی از آنست که مقدار این ماده کمی قبل از جلداندازی کاهش شدیدی پیدا می‌کند که این به علت نقش مهم کلسترول در ساختمان غشای سلولی و سنتز هورمون جلداندازی است (۱۹).

مقایسه مقدار اسید اوریک در لاروهای سن چهارم و پنجم: تغییرات مقدار اسید اوریک همولنف در لاروهای کرم ابریشم در شکل ارائه شده است. مقدار این ترکیب در لاروهای سن چهارم و پنجم به ترتیب ۰/٦۱ ± ۱/۸۹۲ و ۱/۰۹ ± ۳/۲۲ میلی گرم بر دسی لیتر بود که دامنه نوسان آن در چهارمین روز سن چهارم و پنجم به ترتیب بین ۲/۵-۱/۲۸ و ٤/۳۱-۲/۱۳ میلی گرم بر دسی لیتر تعیین شد.

اسید اوریک به‌عنوان یکی از مهمترین ترکیبات دفعی مواد نیتروژنه در بسیاری از حشرات گزارش شده است (۸، ۹، ۱۰و ۱٤). سنتز اسیداوریک از لحاظ مصرف انرژی یک مکانیزم بسیار هزینه برداری برای حشرات بوده و عموماً در لوله‌های مالپیگی، بافت‌چربی و قسمتهای انتهایی دستگاه گوارش انجام می‌شود (٤) کرم ابریشم نیز به مانند بسیاری از حشرات یک گونه اوریکوتلی[1] بوده، یعنی محصول نهایی کاتابولیسم ترکیبات نیتروژن دار آن اسید اوریک می‌باشد. در کرم ابریشم و بسیاری از بالپولکداران در خلال دوره لاروی این ترکیب از اندام چربی به همولنف رها می‌گردد (۲۳). در ابتدا گزانتین از دآمیناسیون بازهای گوآنین و هیپوگزانتین از آدنین تشکیل می‌گردند. این ترکیبات تحت تاثیرآنزیم‌های اکسید کننده به اسید اوریک تبدیل می‌شوند. اکسیداسیون گزانتین یک واکنش بسیار فعال در بافت چربی کرم ابریشم بوده، در حالیکه از لوله‌های مالپیگی و معده میانی در حد کمی گزارش شده است. فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز در بافت‌های مزبور با افزایش مقدار پروتئین در جیره غذایی افزایش پیدا می‌کند (۱۷).

دان‌ژرن و برایگل (۸)، نشان دادند که فعالیت آنزیم گزانتین دهیدروژناز با افزایش مقدار پروتئین در خون مورد تغذیه پشه‌ها افزایش می‌یابد. همچنین در این حشرات نیز افزایش تولید اسید اوریک با مقدار پروتئین مورد تغذیه ارتباط مستقیم دارد (۸). کوبایاشی و همکاران در سال (۲۳) نشان دادند که اگر لاروهای کرم ابریشم ازجیره غذائی غنی‌شده با پروتئین تغذیه نمایند اسید اوریک بعنوان یک ترکیب دفعی غالب افزایش پیدا می‌کند. مطالعات متعددی نشان دهنده آنست که مقدار پروتئین در سن پنجم در همولنف لاروهای کرم ابریشم افزایش پیدا می‌کند بنابراین می‌توان چنین متصور بود که با افزایش مقدار پروتئین درلاروهای سن پنجم، متابولیسم سبب تولید اسید اوریک بیشترنسبت به لاروهای سن چهارم می‌گردد.

عوامل متعددی با تاثیر در جذب، متابولیسم و کاتابولیسم بر مقدار ماکرومولکول‌های زیستی در حشرات تاثیر گذار هستند. مقدار pH معده میانی می‌تواند یکی از مهمترین دلایل در تغییر جذب برخی از ماکرو مولکول‌ها در مراحل مختلف زندگی باشد (۳۲ و ۳۵). شولتز و

1- Uricotely

لخوّیکز (۳۲) نشان دادند که در سن آخر لاروی پروانه ابریشم باف ناجور[1] pH معده میانی تابعی از سن لاروها است. همچنین اسپنس و کاواتا (۳۵) گزارش نمودند که نفوذ پذیری غشاء دور غذا[2] در لاروهای سن پنجم کرم شاخدار تنباکو با افزایش طول عمر در یک سن لاروی تغییر می‌کند. و با شروع مرحله سرگردانی[3] یا پیش شفیره در این لارو نفوذپذیری این غشا کم خواهد شد. این عامل نیز می‌تواند باعث تغییر در مقدار جذب ترکیبات گوناگون در مراحل مختلف لاروی باشد.

مقایسه مقدار اوره در لاروهای سن چهارم و پنجم: اوره بعنوان یک ترکیب دفعی ناشی از متابولیسم ترکیبات نیتروژن دار نقش مهمی را در تولید پیله ابریشمی بر عهده دارد. همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد مقدار این ماده برخلاف سایر ترکیبات در سن چهارم بیش از سن پنجم بوده بطوریکه مقدار آن در پایان سن پنجم با بیش از ۴۰٪ کاهش به ۲۸/۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر رسید. دامنه تغییرات این ترکیب در لاروهای سن چهارم بین ۵۱/۹۹-۴۵/۸۹ و میانگین ۴۸/۹۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

تغییرات غلظت اوره در همولنف لاروهای کرم ابریشم به عوامل زیادی از جمله مرحله سنی و جیره غذایی وابسته است. این تغییرات در ارتباط مستقیم با متابولیسم نیتروژن و اسیدهای آمینه می‌باشد (۳۶). سومیدا و همکاران (۳۶) مقدار اوره هولنف لاروهای سن چهارم و پنجم کرم ابریشم‌هایی را که از غذای مصنوعی و برگ تازه توت تغذیه می‌کردند به ترتیب ۰/۲-۰/۱ و ۰/۰۵-۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش نمودند. هیرایاما و همکاران (۱۳) بیان داشتند که مقدار اوره در همولنف لاروهای کرم ابریشم به نسبت سایر حشرات از سطح بالایی برخوردار می‌باشد (۱۳). همچنین مقدار این ترکیب در معده‌میانی کرم ابریشم بین ۴-۲ میکرومول بر گرم گزارش شده است (۱۴). در منابع مختلف و با استفاده از روش‌های متفاوت مقدار اوره را در همولنف لاروهای کرم ابریشم متفاوت گزارش نموده‌اند. داده‌های مربوط به

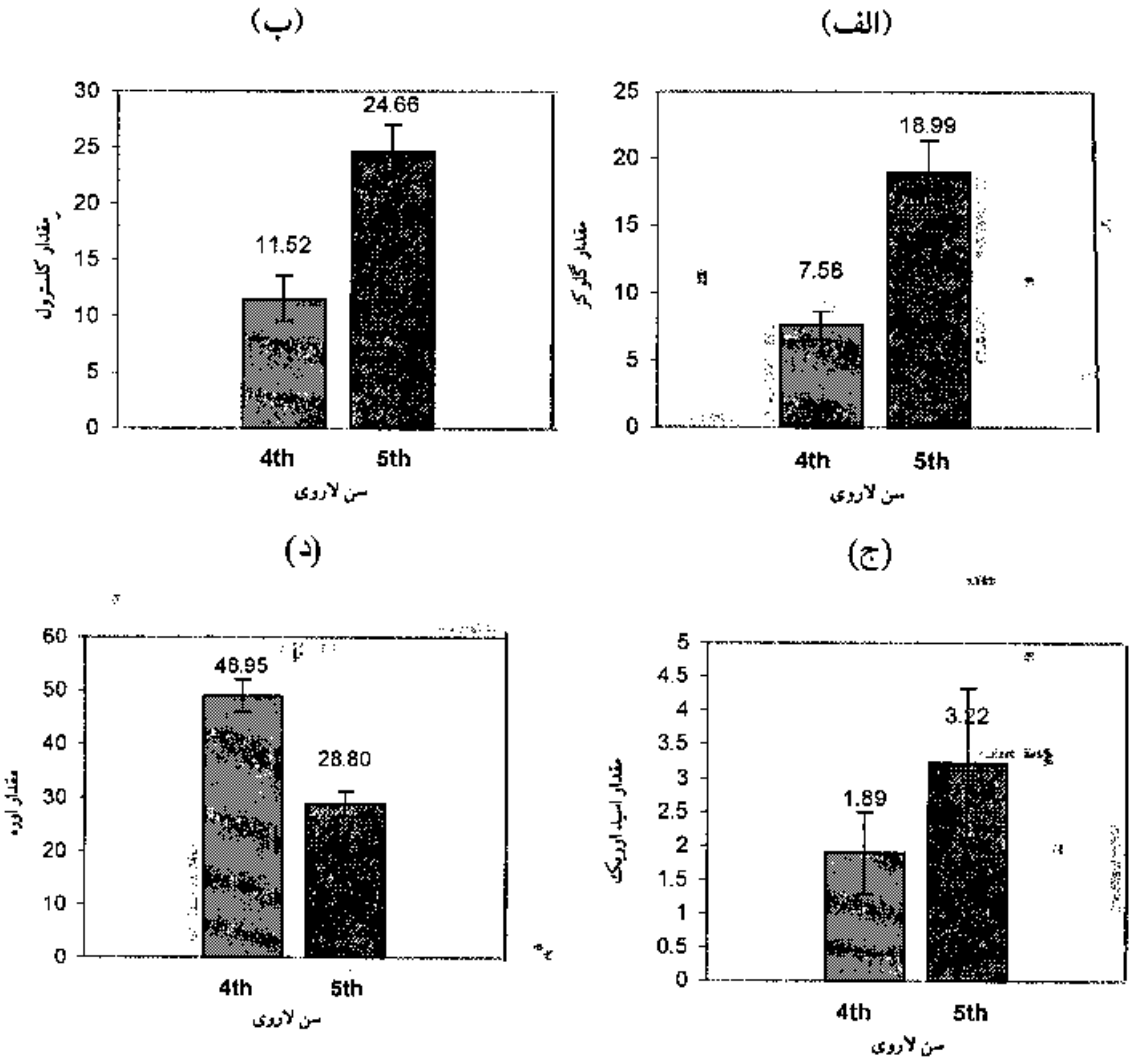
1- *Lymantria dispar*
2- Peritrophic membrane
3- Wandering

این تحقیق که ناشی از اندازه‌گیری نیتروژن اوره‌ای[1] با روش‌های آنزیماتیک می‌باشد مقادیر بالایی از اوره را در همولنف لاروهای سن چهارم اندازه‌گیری نمود که شاید در مقایسه با نتایج سومیدا (۳۶) بسیار بیشتر بوده ولی نکته‌ای که حائز اهمیت است مدل تغییرات اوره در دو سن آخر لاروی میباشد که نتایج این دو تحقیق بر هم منطبق می‌باشد.

نتایج مربوط به این تحقیق نشان داده که مقدار اوره در ششمین روز سن پنجم کاهش معنی‌داری را نسبت به سن چهارم نشان می‌دهد و مقدار اوره همولنف در این مرحله کاهش می‌یابد. آرژیناز آنزیمی مهم برای تولید اوره در همولنف کرم ابریشم بوده که در بسیاری از بافت‌ها فعالیت می‌کند و این فعالیت در سن ۵ لاروی به اوج خود می‌رسد و سپس آنزیم اوره‌آزی که از برگ توت داخل بدن حشره شده است وارد عمل می‌شود و سبب تشکیل آمونیوم می‌گردد(۱۵، ۱۶ ، ۲۲ و ۲۳) و این شاید از آغاز تنیدن اولین تارهای ابریشمی (تقریباً از روز هفتم سن پنجم) به بعد باشد. یکی از جنبه‌های جالب توجه در متابولیسم نیتروژن در کرم ابریشم بازجذب آمونیوم تشکیل شده، جهت تولید پروتئین ابریشم طی مسیرهای خاص متابولیکی می‌باشد(۱۵ و ۱۶). آنزیم اوره‌آزی که از برگ درختان توت وارد دستگاه گوارش کرم ابریشم می‌شود سبب می‌گردد که فعالیت آنزیم پروتئاز در معده کرم ابریشم کاهش پیدا نماید و مانع بروز اثرات ممانعت کنندگی رشد توسط این آنزیم می‌شود. آمونیاک حاصل از تجزیه اوره توسط این آنزیم، در فرآیند سنتز اسید گلوتامیک مصرف خواهد شد (۱۶). هیرایاما و همکارانش(۱۶) نشان دادند که آمونیوم می‌تواند بعنوان یک منبع تامین نیتروژن در ترکیب اسیدهای آمینه غیر ضروری برای لاروهای کرم ابریشم محسوب شوند.

درک نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند بعنوان بستر تحقیقات بیوشیمیایی در کرم ابریشم را فراهم نماید. جای دارد با مطالعه بیشتر بر روی لاین‌ها و هیبریدهای تجاری کرم ابریشم به یک رابطه همبستگی معنی دار بین فراوانی این ماکرومولکول‌ها با عملکرد زیستی و تولیدی کرم ابریشم دست یافت و از این شاخص‌ها بعنوان یک نشانگر بیوشیمیایی مرتبط با صفات تولیدی و ماندگاری در برنامه‌های اصلاح نژادی کرم ابریشم استفاده نمود.

1- Blood Urea Nitrogen



شکل ۱- مقایسه مقدار برخی از ماکرومولکول‌های همولنف در لاروهای سن چهارم و پنجم کرم ابریشم (میلی گرم بر میلی‌لیتر)

الف- (گلوکز)، ب- کلسترول، ج- اسید اوریک، د- اوره

سپاسگزاری

این پژوهش از محل اعتبارات تحقیقاتی گروه پژوهشی کرم ابریشم دانشگاه گیلان انجام شده است بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می‌گردد. همچنین

همکاری شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم ایران نیز در اجرای این تحقیق شایسته تقدیر است.

منابع

۱- اعتباری، ک. ۱۳۸۱. تاثیر غنی سازی برگ توت (*Morus alba*) بوسیله تعدادی از ویتامین‌ها و ترکیبات نیتروژن‌دار بر برخی از صفات اقتصادی و خصوصیات فیزیولوژیک کرم ابریشم *Bombyx mori* (Lep., Bombycidae) پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۱۱۸ صفحه.

۲- اعتباری، ک. و م. فضیلتی. ۱۳۸۲. اثر تغذیه از برگ توت غنی شده با ترکیبات نیتروژن، فسفر و پتاسیم دربرخی صفات بیولوژیک و بیوشیمیایی کرم ابریشم *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae). مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد هفتم، شماره۱، صفحات ۲۴۴-۲۳۳

3- Bosquet, G., 1976. Glycine incorporation during starvation in *Bombyx mori*. Relation to respiratory metabolism. J. Insect Physiol., 22:541-545.

4- Bursell, E., 1970. An Introduction to Insect Physiology, Academic Press, London

5- Canavoso, L. and E.R. Rubiolo, 1998. Metabolic post-feeding changes in fat body and hemolymph of *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janerio, 93: 225-230.

6- Chapman, R.F., 1998. The Insect Structure and Function, 4th edition, Cambridge University Press, Cambridge.

7- Dai, Y., 1997. Regulation of juvenile hormone analogue on protein synthesis in the Silk gland and fat body of silkworm *Bomboxy mori*. Acta Entomologica Sinica. 40:45-50

8- Dungern, P. and H., Briegel , 2001a. Enzymatic analysis of uricotelic protein catabolism in the mosquito Aedes aegypti. J. Insect Physiol., 47:73-82.

9- Dungern, P. and H., Briegel , 2001b. Protein catabolism in mosquitoes: ureotely and uricotely in larval and imaginal Aedes aegypti. J. Insect Physiol., 47:131-141.

10- Ehresmann, D.D., Buckner, J. S. and G. Graf. 1990. Uric acid tranlocation from the fat body of *Manduca sexta* during the pupal-adult transformation: effects of 20-hydroxyecdysone. J. Insect Physiol. 36:173-180.

11- Faulkner, W.R. & J.W., King, 1976. In "Fundamentals of Clinical Chemistry". Titez, N.W., (ed) W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 993.

12- Hanzal, R. and A., Jegorov. 1991. Changes in free amino acid composition in haemolymph of larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* L., during cold acclimation. Com. Biochem. Physiol. (A). 100(4): 957-962.

13- Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H. and M. Nakamura, 2000. Host plant urease in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, J. Insect Physiol., 46:1415-1421.

14- Hirayama, C., Sugimura, M. and H., Shinbo, 1999. Recycling of urea associated with the host plant ureas in the silkworm larvae, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 45: 15-20.

15- Hirayama, C., Konno, K. and H., Shinbo, 1997. The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombyx mori* L, J. Insect Physiol., 43(10): 959-964.

16- Hirayama, C., Konno, K. and H., Shinbo, 1996. Utilization of ammonia as a nitrogen source in the silkworm, *Bombyx mori*", J. Insect Physiol., 42(10): 983-988.

17- Ito, T., 1978. Silkworm Nutrition, In "The Silkworm an Important Labratory Tool", Tazima, Y., (ed), Kodansha Ltd., Tokyo, pp.121-157.

18- Jadhav, G. and V.L., Kallapur, 1988. Influence of age, sex and feeding on the protease activity of certain tissues of fifth instar silkworm *Bombyx mori*. Entomon. 13(3-4):289-293.

19- Jouni , Z.E., Zamora, J. and M. A. Wells. 2002. Absorption and Tissue Distribution of Cholesterol in *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 49, 167–175.

20- Jungreis, A.M., Jatlow, P. & G.R. Wyatt, 1973. Inorganic ion composition of haemolymph of the cecropia silkmoth: changes with diet and ontogeny. J. Insect Physiol., 19: 225-233.

21- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J. and A., Zilberstein. 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. Insect Biochem. Mol. Biol. 26(4): 365-373.

22- Khanikor, D., Unni, B.G., Rai, A.K. and R., Baruah, 1998. Biochemical aspects of protein biosynthesis in the fat body of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood during larval and spinning period, Ad. Bios. 17(1): 89-98.

23- Kobayashi, M., Mukaiyama, F. and K., Hamano, 1980. Studies on the nitrogenous compounds in urine of mature silkworm larvae, *Bombyx mori*, Appl. Ent. Zool., 15(1): 60-65.

24- Lim, S.H., Kim, Y.T., Lee, S.P., Rhee, I.J., Lim, J.S. and B.H., Lim, 1990. Sericulture training manual, FAO, Agricultural Services Bulletin, Rome, p. 103.

25- Manjula A. C., Revanasiddaiah, H.M., Rajanna K.L. and P.R. Yadav. 1993. Age and sex dependent alterations in protein and esterase isozymes in a bivoltine strain of silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). Biochem. Arch. 9(3):241-251.

26- Masumura, M., Satake, S., Saegusa, H. and A. Mizoguchi, 2000. Glucose stimuates the release of Bomboxin, an Insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori* L., General Comp. Endocrinol., 118(2): 393-399.

27- Nath, B.S., Suresh, A., Mahendra Varma, B. and R.P. Kumar, 1997. Changes in Protein Metabolism in Hemolymph and Fat Body of the Silkworm, *Bombyx mori* L., in responce to Organophosphorus Insecticides toxicity, Ecotoxicology and Envirnomental Safety, 36:169-173.

28- Reddy, K.D., Chaudhuri, A. and K. Thangavelu, 1994. Effect of L-thyroxine-sodium-pentahydrate on protein and nucleic acid turnover in fat body during fifth larval stage of non-diapausing tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury. Indi. J. Exp. Biol. 32(6):413-417

29- Richmond, W., 1973. Preparation and properties of cholesterol oxidase from Nocardia sp. and its application to enzymatic assay of total cholesterol in serum, Clin. Chem. 19(12): 1350-1356.

30- Richterich, R,. 1971. Clinical Chemistry, Theory and practice", London/New York, Academic press.

31- Satake, S., Kawabe, Y. and A. Mizoguchi, 2000. Carbohydrate metebolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori* L., Arch. Insect Biochem. Physiol., 44:90-98.

32- Schultz, J. C. and M. J. Lechowicz. 1986. Hostplant, larval age, and feeding behavior influence midgut pH in the gypsy moth (*Lymantria dispar*). Oecologia. 71(1):133-137

33- Shimada, S. and A., Kamada, 1980. Effect of Metoprene on trehalose content and trehalase activity in the silk glands of the silkworm, *Bombyx mori* L., Appl. Ent. Zool. 15 (3) : 270-274.

34- Siegert, K.J., 1987. Carbohydrate metabolism in *Manduca sexta* During late larval development, J. Insect Physiol. 33 (6): 421-427.

35- Spence K. D. and M.Y. Kawata. 1993. Permeability characteristics of the peritrophic membranes of *Manduca sexta* larvae. Journal of Insect Physiology. 39(9): 785-790.

36- Sumida, M., Haga, K., Tanaka, Y., Shimabukuro, J., Ichida, M. and F. Matsubara, 1993. Developmental changes in urea in the haemolymph (determined by a urease-indophenol method) in hybrid strains of the silkworm, *Bombyx mori* and the effect of starvation in the fifth instar larvae, fed an arteficial diet, on urea level in subsequnt development, Comp. Biochem. Physiol(A). 105(3):563-570.

37- Sumida, M., Yuan, X. L., Mah, Y. L, Mori, H. and F. Matsubara.1990. Changes in kinetic parameters and total activity of midgut sucrase in the silkworm, *Bombyx mori* during larval-pupal-adult development. Comp. Biochem. Physiol. 96B (3): 605-611.

38- Trivedi, R.C., Rebar, L., Berta, E. and L., Stong, 1978. New enzymatic method for serum uric acid at 500nm, Clin. Chem., 24 (11): 1908-1911.

Journal of Entomological Society of Iran. 24(1), 2004

A study on the Effects of Larval Age on Biochemical Macromolecules Abundance of Haemolymph in Silkworm *Bombyx mori* (Lep. Bombycidae)

K. Etebari[1] and L. Matindoost[1]

Abstract

The knowledge of biochemical characteristics of insects haemolymph can be a solution in physiological analysis. To determine the abundance and the range of some biochemical macromolecules in silkworm haemolymph, the amount of glucose, cholesterol, urea and uric acid in fourth and fifth instar larvae were analyzed. The results showed that except for urea as larval age increased, the abundance of these compounds in the larval haemolymph has enhanced. The amount of measured urea in fourth instar larvae were 48.94±3.05mg/ml while its occurance in the fifth instar larvae with over 87% decrease reached to 6.18±2.4. This is mostly because of the entering of urea to synthesis process of the silkworm shell by silk glands. The amount of glucose, uric acid and cholesterol in the fourth instar larvae were 7.85±1.03, 1.89±0.61 and 11.52±2.03 mg/dl respectively. While the abundance of these compounds were 18.9±2.4, 3.22±1.09, 24.65±2.35 mg on deciliter, respectively for the 6th day of fifth instar larvae.

Key words: Silkworm, Glucose, Urea, Uric acid, Cholesterol

1- Dept. of Sericulture, College of Natural Resources, Univ. of Guilan , Somehe Sara, P.O. Box 1144, E-mail: etebari@guilan.ac.ir