گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٥، شماره ۲، تابستان ١٤٠١

doi 10.22055/ppr.2022.17573

واکنش بیوشیمیایی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) به سمیت ترانس آنتول

مرتضی شهریاری[۱]، نجمه صاحب زاده[۲]* و آرش زیبایی[۳]

۱- دانش آموخته‌ی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲- * **نویسنده مسوول**: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران (n.sahebzadeh@uoz.ac.ir)
۳- دانشیار گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۴

چکیده

ترکیبات مونوترپنوئیدی از اجزای اصلی اسانس‌های گیاهی بوده و با ایجاد اختلال در عملکردهای فیزیولوژیکی و رفتاری حشرات، می‌توانند در مدیریت آفات مورد استفاده قرار گیرند. شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lep.: Pyralidae) علاوه بر ایجاد خسارت روی محصولات انباری، به دلیل سهولت پرورش در شرایط آزمایشگاهی، به عنوان یک حشره‌ی مدل در آزمایش‌های سم‌شناسی و بیوشیمیایی مورد توجه محققین قرار دارد. در این پژوهش به منظور درک بهتر سازوکار عمل ترانس آنتول به‌عنوان یکی از مهمترین متابولیت‌های ثانوی گیاهان تیره چتریان، اثر غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}=۷/۰۳ µL g^{-1}) این ترکیب بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، سم‌زدا و مواد موثر در متابولیسم حد واسط لاروهای سن ٤ شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مورد ارزیابی قرار گرفت. کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آلفا-آمیلاز، آلفا و بتاگلوکوزیداز، لیپاز) و پروتئازهای اختصاصی (تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، آمینو و کربوکسی پپتیداز) مشاهده شد در حالی‌که فعالیت آنزیم‌های سم زدا (استرازها و گلوتاتیون اس ترنسفرازها) در حشرات تیمارشده افزایش نشان داد. تغییرات افزایشی در فعالیت آمینو ترنسفرازها (آلانین، آسپارتات و گاما گلوتامیل) و کاهشی در فعالیت لاکتات دهیدروژناز، اسید و آلکالین فسفاتاز به‌عنوان آنزیم‌های دخیل در متابولیسم حد واسط لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مشاهده شد. میزان ذخایر درشت‌مولکول‌های ذخیره‌ای (پروتئین کل، گلیکوژن، تری‌گلیسرید) در حشرات تیمارشده کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داد. القاء و بازدارندگی فعالیت آنزیم‌ها پس از تیمار با غلظت LC_{50} ترانس آنتول، نشان‌دهنده کارایی استفاده از این ترکیب در ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی در شب‌پره مدیترانه‌ای آرد است.

کلیدواژه‌ها: اختلال فیزیولوژیکی، ترانس آنتول، سم‌زدایی، ذخایر انرژی، متابولیسم حد واسط

دبیرتخصصی: دکتر بهرام ناصری

Citation: Shahriari, M., Sahebzadeh, N. & Sheikhi Zibaee, A. (2022). Biochemical response of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) to the toxicity of trans-anethole. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(2), 121-136. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2022.17573.

مقدمه

شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lep.: Pyralidae) حشره‌ای با پراکنش جهانی و یکی از آفات مهم محصولات انباری است. این حشره به دلیل سهولت پرورش در شرایط آزمایشگاهی، به عنوان یک حشره‌ی مدل در آزمایش‌های سم‌شناسی و بیوشیمیایی شناخته می‌شود (Gallego et al., 2022). لاروهای این آفت از آرد و میوه‌های خشک تغذیه و آن‌ها را به شدت آلوده می‌کنند. لاروها در تمام دوره‌ی تکاملی خود تارهای نازکی می‌تنند به‌طوری که در صورت حمله‌ی شدید، تارهای مزبور تمام سطح مواد غذایی مورد حمله را می‌پوشاند. همچنین با به‌جا گذاشتن پوسته بدن و فضولات خود در میان مواد غذایی، سبب خسارت شدید می‌شود (Shahriari et al., 2017a, b).

علاوه بر آفات خسارت‌زا به محصولات کشاورزی در مزارع و باغات، محصولات انباری مختلف توسط بیش از ۶۰۰ گونه سخت بال‌پوش، ۷۰ گونه بال‌پولک و بیش از ۳۵۵ گونه کنه مورد حمله قرار گرفته که باعث ایجاد خسارات کمی و کیفی فراوان می‌گردند (Rajendran & Sriranjini, 2008). لذا اهمیت استفاده از آفت‌کش‌ها در نگه‌داری از مواد غذایی و تأمین غذای انسان، اجتناب ناپذیر می‌شود. علاوه بر روش‌های کنترل فیزیکی، میکروبی و بیولوژیکی، طیف وسیعی از آفت‌کش‌ها (مانند سموم تدخینی و سموم فسفره)، فرومون‌ها، مختل‌کننده‌های رشد و سموم گیاهی در مدیریت حشرات آفت استفاده می‌شوند. کاربرد آفت‌کش‌های مختلف با از بین بردن دشمنان طبیعی، تعادل زیستی را به‌هم زده و موجب طغیان آفات ثانویه می‌شود. همچنین تأثیر آفت‌کش‌ها بر موجودات غیر هدف، باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در طبیعت و نیز هزینه‌های تولید آفت‌کش‌های شیمیایی از مواردی هستند که نیاز به استفاده اصولی و متفکرانه از این مواد را بیشتر نشان می‌دهند (Scott et al., 2003).

گیاهان در طول میلیون‌ها سال دوران تکامل خود به ترکیبات گوناگونی مجهز شده‌اند که آن‌ها را در برابر حشرات گوناگون محافظت می‌کنند. این ترکیبات به نام متابولیت‌های ثانویه معروف بوده و نقش عمده‌ای در دفاع گیاهان در مقابل حشرات گیاه‌خوار برعهده دارند (Isman, 2006). متابولیت‌های گیاهی به‌دلیل داشتن ویژگی‌هایی نظیر تجزیه سریع در محیط و کاهش بروز مقاومت در حشرات آفت می‌توانند تا حدی جایگزین حشره‌کش‌های شیمیایی شوند (Kumrungsee et al., 2014). سازوکار اثر ترکیبات گیاهی روی حشرات متنوع است. به‌عنوان مثال اسانس‌های گیاهی می‌توانند اثرات کشندگی، تخم‌کشی، بازدارندگی تغذیه‌ای، دورکنندگی و عقیم‌کنندگی روی حشرات داشته باشند (Sousa et al., 2015; Rajaei et al., 2021). نقطه اثر اصلی منوترپنوئیدهای گیاهی، بازدارندگی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز گزارش شده است (Kim et al., 2013).

باتوجه به تأثیر قابل توجه ترکیبات ثانوی گیاهان به ویژه گیاهان دارویی، توجه محققین به شناسایی گونه‌های گیاهی مناسب به منظور معرفی ترکیبات دارای اثربخشی علیه آفات کشاورزی، جلب شده است (Isman, 2020). تاکنون گونه‌های گیاهی فراوانی که بیشتر متعلق به تیره‌های Apiaceae، Araceae، Asteraceae، Brassicaceae، Chemopodiaceae، Cupressaceae، Graminaceae، Lamiaceae، Lauraceae، Liliaceae، Myrtaceae، Pinaceae، Rutaceae و Zingiberaceae هستند، به‌عنوان گیاهان مناسب با خواص آفت‌کشی معرفی شده‌اند (Rajendran & Sriranjini, 2008). بنابراین بررسی نقش ترکیبات ثانوی گیاهان به ویژه گیاهان دارویی در کنترل آفات، می‌تواند گامی موثر در کاهش مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی و مدیریت سالم‌تر آن‌ها باشد. در سال‌های اخیر مطالعه‌های بسیاری روی خواص حشره‌کشی ثانوی گیاهان از

تیره‌های مختلف گیاهی انجام شده است که در این میان آن‌ها، گیاهان تیره چتریان (Apiaceae) نتایج امیدبخشی در کنترل آفات انباری داشته‌اند (Rosa et al., 2020). گیاهان تیره چتریان با حدود ۳۰۰۰ گونه‌ی گیاهی، بیشتر در نواحی معتدل نیم‌کره شمالی پراکنش دارند. گیاهان این تیره، علاوه بر مصارف خوراکی و دارویی، سرشار از متابولیت‌های ثانوی بوده و می‌توانند باعث ایجاد خواص کشندگی، بازدارندگی فیزیولوژیکی و رفتاری روی حشرات آفت شوند (Pavela et al., 2018). یکی از مهمترین ترکیبات موثره گیاهان این تیره، فنیل پروپانوئیدی به نام ترانس آنتول است که ترکیب عمده‌ی گیاهانی از قبیل رازیانه (*Foeniculum vulgar* Mill, Apiaceae)، انیسون (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae) و گلپر (*Heracleum persicum* Desf., Apiaceae) است (Ghanem et al., 2013; Pavela et al., 2018). تأثیر بیولوژیکی و فیزیولوژیکی ترانس آنتول روی برخی آفات مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال، تأثیر حشره‌کشی این ترکیب روی حشرات کامل شپشه برنج (*Sitophilus oryzae*, Col.: Curcolionidae)، لاروهای شپشه آرد (*Tribolium castaneum*, Col.: Tenebrionidae)، شب‌پره تک‌نقطه‌ای برنج (*Pseudaletia unipuncta*, Lep.: Noctuidae)، کرم برگ‌خوار پائیزه (*Spodoptera frugiperda*, Lep.: Noctuidae)، زنجره *Mahanarva spectabilis* (Hemi.: Cercopidae) و شته سبز هلو (*Myzus persicae*, Hemi., Aphididae) گزارش شده است (Kim et al., 2013; Sousa et al., 2015; Shahriari et al., 2016; Cruz et al., 2017; Dias et al., 2019; Pascual-Villalobos et al., 2020). همچنین اثر این ترکیب باعث القای فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی فعالیت آنزیم کولین استراز شب‌پره مدیترانه‌ای آرد شده است (Shahriari et al., 2018).

برخی از مزایای استفاده از آفت‌کش‌های گیاهی در تجزیه سریع، تأثیر فوری، سمیت کم برای موجودات خونگرم، انتخابی بودن و تأثیر حداقل بر گیاهان تیمارشده با آن‌ها منعکس می‌شود. آن‌ها از پایداری کمتری در محیط برخوردار بوده و بنابراین تأثیر منفی کمتری بر موجودات مفید و غیرهدف دارند (Isman, 2006; Xavier et al., 2015). با توجه به تجزیه سریع آفت‌کش‌های گیاهی در محیط، استفاده از آن‌ها در قالب فرمولاسیون‌های مختلف می‌تواند در مدیریت مبارزه با آفات کلیدی و اجتناب از مسمومیت موجودات غیرهدف و نداشتن تأثیر در زنجیره غذایی موثر باشد (Athanassiou et al., 2014). بنابراین با این هدف، در تحقیق حاضر سمیت گوارشی ترکیب ترانس آنتول به‌عنوان یکی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی بر لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد ارزیابی و جهت درک بهتر مکانیسم عمل این ترکیب، فعالیت آنزیم‌های گوارشی، سم‌زدا و مواد موثر در متابولیسم حد واسط این آفت پس از تیمار با غلظت کشنده‌ی LC_{50} ترانس آنتول مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از بخش کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی آمل تهیه و تا زمان بلوغ، روی آرد گندم نگه‌داری شدند. سپس حشرات کامل برای جفت‌گیری و تخم‌ریزی از کلنی جدا شده و درون قیف‌های پلاستیکی (قطر ۲۰ سانتی‌متر) قرار داده شدند. در فواصل زمانی ۳-۴ روزه، تخم‌های آنها جمع‌آوری و برای پرورش به ظروف پلاستیکی مکعبی (۸×۹×۱۷سانتی‌متر) حاوی مخلوطی از ۴۳ گرم آرد گندم، ۶ گرم مخمر و ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرین خوراکی منتقل و در شرایط دمایی ۲۵±۱ درجه سلسیوس، رطوبت

نسبی ۵±۷۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند (Lima et al., 2001; Goharrostami & Sendi, 2018).

زیست سنجی

ترانس آنتول (۹۸ درصد ماده موثر) مورد استفاده در این بررسی از شرکت سیگما-آلدریچ (مادرید-اسپانیا)[1] تهیه شد. آزمایش زیست‌سنجی به‌صورت گوارشی و با استفاده از روش بیان شده توسط Shahriari et al.(2017a) انجام شد. لاروهای سن چهارم (۱ تا ۲ روزه) شب‌پره مدیترانه‌ای آرد براساس اندازه طول بدن و عرض کپسول سر Tavakoli and Ajam Hosni (2018) به طور تصادفی انتخاب و درون ظروف پتری ۶ سانتی متری حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم غذای آغشته به غلظت‌های نهایی ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ میکرولیتر بر گرم ترانس آنتول منتقل شدند. غلظت‌های نهایی ترکیبات بر اساس آزمایش مقدماتی با محدوده غلظتی ۰/۵ تا ۲۰ میکرولیتر بر گرم انتخاب شدند. بسته به غلظت مورد نظر، مقادیر مشخصی از استون به عنوان حلال برای ساختن غلظت‌ها استفاده شد. در هر تیمار ۳۰ عدد لارو مورد استفاده قرار گرفت (۳ تکرار). لاروهای شاهد با غذای آغشته به استون خالص تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت تغذیه، تعداد تلفات لاروها ثبت و با نرم افزار POLO-Plus نسخه-ی ۲، میزان LC_{50} تخمین زده شد.

تهیه نمونه برای بررسی‌های بیوشیمیایی

برای آزمون بیوشیمیایی، ابتدا لاروهای سن چهار (۱ تا ۲ روزه) شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به صورت تصادفی انتخاب و با غلظت LC_{50} ترانس آنتول مشابه روش فوق تیمار شدند. سپس همولنف، معده میانی و اجسام چربی لاروها، ۲۴ ساعت پس از تیمار، به صورت مجزا استخراج شدند. بدین منظور، انتهای بدن لارو به وسیله‌ی قیچی تشریح برش زده و همولنف خارج‌شده (۵۰ عدد لارو برای هر تیمار استفاده و از هر لارو ۳ میکرولیتر همولنف جداسازی شد)، جمع‌آوری و درون ۵۰۰ میکرولیتر محلول ضدانعقاد خون (اتیلن‌دی‌آمین ترا استیک اسید ۰/۰۱ مولار، گلوکز ۰/۱ مولار، کلرید سدیم ۰/۰۶۲ مولار و اسید سیتریک ۰/۰۲۶ مولار با اسیدیته ۴/۶) نگه‌داری شد. سپس لاروها تشریح و معده میانی (۲۰ عدد لارو برای هر تیمار) آن‌ها جداسازی و درون ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر همگن شد. باقی مانده بدن لاروها به عنوان اجسام چربی در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر همگن شدند. نمونه‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند و مایع رونشین به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Shahriari & Sahebzadeh, 2017). به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های سم زدا و حدواسط از عصاره‌ی همولنف و برای بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان درشت‌مولکول‌ها، به ترتیب از عصاره بافت معده و بافت چربی استفاده شد. همه آزمون‌های بیوشیمیایی زیر در سه تکرار انجام شدند.

سنجش فعالیت آلفا-آمیلاز

فعالیت آلفا-آمیلاز با استفاده از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS)[2] و محلول نشاسته ۱ درصد (حل شده در آب سرد) به‌عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد (Bernfeld, 1955). بیست میکرولیتر از هر نمونهٔ آنزیمی با ۷۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (گلایسین سوکسینات MES[3]، ۲۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸) و ۴۰ میکرولیتر نشاسته به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DNS و حرارت دادن مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش متوقف شد و جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت آلفا- و بتا-گلوکوزیداز

فعالیت آلفا- و بتا-گلوکوزیداز بر اساس روش Silva and Terra (1995) با استفاده از "پی ان آلفا

1- Sigma-aldrich (Madrid-Spain)
2- Dinitrosalicylic acid
3- 2-morpholinoethan sulfunic acid

جی"[1] به‌عنوان سوبسترای آلفا-گلوکوزیداز و "پی ان بتا جی"[2] به عنوان سوبسترای بتا-گلوکوزیداز اندازه‌گیری شد. طی یک واکنش، ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (MES، ۲۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸)، ۳۰ میکرولیتر از هر سوبسترا و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با هم مخلوط شدند و پس از ۱۰ دقیقه، جذب نوری مخلوط واکنش در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت لیپاز

اندازه‌گیری فعالیت لیپاز به روش Tsujita et al. (1989) انجام شد. پانزده میکرولیتر از عصارهٔ آنزیمی معده و ۴۰ میکرولیتر "پی نیتروفتیل بوتیرات[3]" (۲۷ میلی-مولار، به‌عنوان سوبسترا) با ۱۰۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (MES، ۲۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۸) ترکیب شد و به مدت ۱۲ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از این مدت، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم یک مولار به هر میکروتیوب برای توقف واکنش، اضافه و جذب نوری مخلوط واکنش در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت سرین پروتئینازها

فعالیت پروتئینازهای تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز به عنوان سه زیرگروه از سرین پروتئینازها با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار از BApNA[4]، SAAPPpNA[5] و SAAApNA[6] به ترتیب به عنوان سوبستراهای اختصاصی تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (MES، ۲۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۸)، ۳۰ میکرولیتر از هر سوبسترا و ۱۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود (Oppert et al., 1997). مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری و جذب نوری آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت اگزوپپتیدازها

فعالیت دو اگزوپپتیداز با استفاده از دو ترکیب هیپوریل ال آرژنین[7] و هیپوریل ال فنیل آلانین[8] به ترتیب به عنوان سوبستراهای اختصاصی کربوکسی- و آمینوپپتیداز اندازه گیری شد. برای این منظور ۳۰ میکرولیتر از سوبستراهای ذکرشده و ۱۵ میکرولیتر محلول آنزیمی به ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (MES، ۲۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۸) اضافه و پس از ۱۰ دقیقه، جذب نوری مخلوط واکنش در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد (Oppert et al., 1997).

سنجش فعالیت استراز عمومی

سنجش فعالیت استراز عمومی طبق روش Han et al. (1998) با استفاده از دو سوبسترای آلفا نفتیل استات[9] و بتا نفتیل استات[10] به صورت جداگانه انجام شد. پانزده میکرولیتر از هر سوبسترا (۱۰ میلی‌مولار) به همراه ۲۵ میکرولیتر RR-Salt Blue (۱ میلی‌مولار) جداگانه با ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات (۲۰ میلی‌مولار) مخلوط شد. سپس ۱۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی استخراج‌شده به طور جداگانه اضافه شد. پس از ۵ دقیقه نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز طبق روش Oppenoorth et al. (1979) با استفاده از دو معرف کلرو دی نیترو بنزن[11] و دی کلرو نیترو بنزن[12] انجام شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات (۲۰ میلی‌مولار) و ۱۵ میکرولیتر گلوتاتیون احیاشده با ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از معرف‌ها

1- *p*-nitrophenyl- α-D-glucopyranoside (pNαG)
2- *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNβG)
3- *p*- nitrophenyl butyrate
4- Na-benzoyl-L-arginine-*p*- nitroanilide
5- N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg- *p*- nitroanilide
6- succinyl- alanine-alanine- alanine- *p*- nitroanilide
7- Hippuryl- L- Arginine
8- Hippuryl- L- Phenilalanine
9- α-naphthyl acetate
10- β-naphthyl acetate
11- 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)
12- 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB)

به طور جداگانه با هم مخلوط شدند و ۱۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی استخراج‌شده از لاروهای آفت مورد مطالعه اضافه شد. پس از ۵ دقیقه نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز

این دو آنزیم با استفاده از روش Thomas (1998) اندازه‌گیری شدند. بر اساس این روش، آلانین در اثر فعالیت آنزیم آمینوترانسفراز در حضور ۲-اگزوگلوتامات تولید گلوتامات و پیرووات می‌کند. آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز، اسیدآمینه آسپارتات را در حضور ۲-اگزوگلوتارتارات به اگزالواستات وگلوتامات تبدیل میکند که خواندن جذب نوری رنگ‌های حاصله در طول موج ۳۴۰ نانومتر، نشان‌دهنده فعالیت این آنزیم در نمونه است. برای سنجش فعالیت این دو آنزیم از کیت بیوشیمیایی شرکت تشخیصی بایوکم[1] (تهران، ایران) استفاده شد. محلول ۱ و ۲ به نسبت ۴ به ۱ مخلوط شده و با اضافه کردن نمونه آنزیمی و نگهداری به مدت ۶۰ دقیقه، فعالیت این دو آنزیم در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد.

سنجش فعالیت گاما گلوتامیل ترانسفراز

اندازه‌گیری فعالیت گاما گلوتامیل ترانسفراز به روش Szasz (1976) و با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی[2] (تهران، ایران) انجام شد. طی یک واکنش، ۵۰ میکرولیتر از محلول بافر، ۲۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitrianilide) و ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت لاکتات دهیدروژناز

میزان فعالیت لاکتات دهیدروژناز با استفاده از روش King (1965) اندازه‌گیری شد. برای استاندارد کردن مخلوط واکنش، ۲۰۰ میکرولیتر NAD^+ و آب مقطر به میکروتیوب‌ها اضافه شد. به هر میکروتیوب، ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا-بافر (معرف R_1) و ۱۰ میکرولیتر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگی ۲،۴ دی نیتروفنیل هیدرازین[3] اضافه و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. پس از سرد شدن روی یخ، ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۴۰۰ میلی‌مولار اضافه و پس از یک دقیقه، جذب نوری مخلوط واکنش در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری اسید و آلکالین فسفاتاز

بر اساس روش Bessey et al. (1954)، ۵۰ میکرولیتر بافر تریس-هیدروکلرید (۲۰ میلی مولار، با اسیدیته ۶ برای اسید فسفاتاز و اسیدیته ۹ برای آلکالین فسفاتاز)، ۳۰ میکرولیتر "پی نیتروفنول فسفات[4]" و ۱۰ میکرولیتر از نمونه همولنف با هم مخلوط و پس از ۵ دقیقه، جذب نوری مخلوط واکنش در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری میزان تری‌گلیسرید

سنجش میزان تری‌گلیسرید به روش Fossati and Prencipe (1982) و با استفاده از کیت بیوشیمیایی شرکت بیوکم (تهران، ایران) انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر معرف R و ۲۰ میکرولیتر محلول رونشین حاصل از سانتریفیوژ اجسام چربی برای شاهد و تیمارها و ۱۰۰ میکرولیتر معرف و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر به‌عنوان بلانک، جداگانه در پلیت الایزا ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس میزان جذب نوری مخلوط واکنش در ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری میزان گلیکوژن

جهت اندازه‌گیری میزان گلیکوژن، بافت چربی حاصل از ۲۰ لارو، جداسازی و به میکروتیوب حاوی نیم میلی‌لیتر محلول ۳۰ درصد هیدروکسید پتاسیم و سولفات سدیم منتقل شدند.

1- BioChem Diagnostic Co., Tehran, Iran
2- ZistChem Diagnostic Co., Tehran, Iran
3- 2,4-dinitrophenyl hydrazine
4- *p*-nitrophenol-phosphate

تیوب‌های حاوی نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن‌ماری (دمای ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس) قرار داده شدند و ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به آن‌ها اضافه شد. سپس تیوب‌های حاوی نمونه‌ها تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ گذاشته شدند. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و یک میلی‌لیتر آب مقطر به بخش ته‌نشین اضافه شد. سپس با اضافه نمودن محلول فنل ۵ درصد به نمونه‌ها، نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انجام شد. استاندارد گلیکوژن نیز در غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در نهایت، جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر خوانده شدند (Chun & Yin, 1993).

اندازه‌گیری میزان پروتئین کل

سنجش میزان پروتئین به روش Lowry et al. (1951) و با کیت شرکت زیست‌شیمی انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی (برای استاندارد، ۱۰ میکرولیتر پروتئین سرم گاوی به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ۵۰ میکرولیتر معرف R_1 اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد.

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه پروبیت داده‌های حاصل از مرگ و میر برای محاسبه میزان LC_{50} توسط نرم افزار Polo-Plus انجام شد. به منظور اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. تفاوت‌های آماری نمونه‌های شاهد و تیمار با آزمون t-test در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار Minitab نسخه‌ی ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه پروبیت، میزان LC_{50} ترانس آنتول روی لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، ۲۴ ساعت پس از تیمار به صورت گوارشی، ۷/۰۳ میکرولیتر بر گرم به دست آمد (جدول ۱). Shahriari et al. (2016) میزان LC_{50} سمیت گوارشی ترانس آنتول را روی لاروهای شپشه آرد (*Tribolium castaneum* Herbst, Col.: Tenebrionidae) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار به ترتیب ۸/۵۲ و ۶/۴۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به دست آوردند. در مطالعه‌ای دیگر، سمیت تماسی ترکیبات موثره برخی گیاهان تیره چتریان علیه مراحل بالغ و نابالغ شب پره تک نقطه‌ای برنج (*P. unipuncta*) مورد بررسی قرار گرفت که در بین این ترکیبات، آلفاپینن، استراگول، گاماترپینن و ترانس آنتول بیشترین میزان کشندگی را در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هوا از خود نشان دادند (Sousa et al., 2015). همچنین Kim et al. (2013) میزان LC_{50} سمیت تنفسی ترانس آنتول را روی حشرات کامل شپشه برنج *S. oryzae* در ۲۴ ساعت پس از تیمار، ۵/۰۲ میکرولیتر در لیتر هوا به دست آوردند.

فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد شاهد و تیمار تفاوت‌های معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲). میزان فعالیت آلفا-آمیلاز در لاروهای تیمارشده با ترانس آنتول به طور معنی‌داری در مقایسه با لاروهای شاهد کاهش یافت (جدول ۲).

جدول ۱- تخمین غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد ترانس آنتول روی لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *Ephestia kuehniella* در ٢٤ ساعت پس از تیمار

Table 1. Estimation of median lethal concentration (LC_{50}) of trans-anethole on the fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* at 24 h post treatment.

Treatment	N	LC_{50} (95% Cl)	X^2 (df)	Slope± SE
trans-anethole	150	7.03 (4.88 – 11.88) µL g^{-1}	0.821 (3)	1.369 ± 0.273

فعالیت آلفا- و بتا-گلوکوزیداز در لاروهای تیمار و شاهد نیز تفاوت معنی‌داری داشتند به طوری که فعالیت این دو آنزیم در ۲۴ ساعت پس از تیمار به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۲). فعالیت لیپاز گوارشی لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تغذیه‌شده با LC_{50} ترانس آنتول کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داد (جدول ۲). فعالیت پروتئازهای اختصاصی از قبیل تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، آمینو- و کربوکسی پپتیداز در لاروهای تیمار به طور معنی‌داری کمتر از لاروهای شاهد بود (جدول ۳). کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های گوارشی در لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تیمارشده با ترانس آنتول در مقایسه با شاهد، می‌تواند به طور مستقیم باعث اختلال در هضم مواد غذایی خورده‌شده توسط حشره شود. نتایج مشابه در میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات تیمارشده با متابولیت‌های ثانویه گیاهی گزارش شده است. تغذیه‌ی لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از غلظت LC_{50} ترکیبات دی‌آلیل دی‌سولفاید و آلفاپینن نیز منجر به کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های گوارشی ذکر شده نسبت به شاهد شد (Shahriari & Sahebzadeh, 2017; Shahriari et al., 2017b). همچنین در مطالعه دیگری، ترکیبات دی‌آلیل سولفاید و دی‌آلیل دی‌سولفاید باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های گوارشی در لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* Meyrick, Lep.: Gelechiidae) شدند (Talepour et al., 2021). این‌گونه می‌توان نتیجه گرفت که کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در حشرات تغذیه‌شده با متابولیت‌های ثانویه گیاهی و هرنوع ماده شیمیایی (آفت‌کش‌های گیاهی و یا مصنوعی) می‌تواند به سمیت سلولی این ترکیبات بر سلول‌های پوششی معده میانی نسبت داده شود. به طور کلی، سلول‌های پوششی معده در ترشح آنزیم‌های گوارشی نقش دارند و از بین رفتن این سلول‌ها باعث کاهش ترشح و فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌شود و نهایتا در هضم مواد غذایی اختلال ایجاد می‌شود (Zibaee & Bandani, 2010; Ramzi et al., 2014).

جدول ۲- تأثیر ترانس آنتول بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (U/mg protein) لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *Ephestia kuehniella* در ۲۴ ساعت پس از تیمار

Table 2. Effect of trans-anethole on digestive enzymes activities (U/mg protein) of the fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* at 24 h post treatment.

Enzymes	Control	Treated with LC_{50}	T-value
α-Amylase	0.101±0.003*	0.019±0.006	11.52
α-Glucosidase	2.131±0.01*	0.763±0.03	37.77
β-Glucosidase	0.057±0.005*	0.012±0.004	5.97
Lipase	0.976±0.009*	0.814±0.003	16.51

*Means with asterisks in each row are significantly different at 5% (independent *t*-test).

جدول ۳- تأثیر ترانس آنتول بر فعالیت پروتئازهای اختصاصی (U/mg protein) لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *Ephestia kuehniella* در ۲۴ ساعت پس از تیمار

Table 3. Effect of trans-anethole on specific proteases activities (U/mg protein) of the fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* at 24 h post treatment.

Enzymes	Control	Treated with LC_{50}	T-value
Trypsin	0.152±0.007*	0.058±0.001	12.70
Chymotrypsin	0.282±0.004*	0.063±0.009	21.46
Elastase	0.076±0.004*	0.043±0.005	5.03
Aminopeptidase	0.084±0.004*	0.018±0.003	11.15
Carboxypeptidase	0.194±0.007*	0.028±0.003	19.86

*Means with asterisks in each row are significantly different at 5% (independent *t*-test).

نتایج میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا در لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تیمارشده با غلظت LC_{50} ترانس آنتول، در ۲۴ ساعت پس از تیمار در جدول ۴ نشان داده شده است. تغذیه لاروها روی رژیم غذایی حاوی ترانس آنتول باعث افزایش معنی‌دار فعالیت استراز با دو سوبسترای آلفا- و بتا- نفتیل استات در مقایسه با شاهد شد (جدول ۴). همچنین فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز با استفاده از دو معرف CDNB و DCNB در لاروهای تیمار به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (جدول ۴). استرازها و گلوتاتیون اس- ترانسفرازها دو آنزیم مهم در تجزیه و خنثی سازی ترکیبات سمی در همولنف حشرات هستند. استرازها گروهی از آنزیم‌های هیدرولازی هستند که قادرند ترکیبات مختلف از قبیل پیوندهای استری را هیدرولیز کنند. این آنزیم‌ها با واکنش بین پیوند استری و آب، تولید اسید و الکل می‌کنند (Hemingway & Karunatne, 1998). گلوتاتیون اس-ترانسفرازها یک خانواده‌ی چندمنظوره و متنوع از آنزیم‌ها هستند که در اکثر نقاط بدن جانوران توزیع شده‌اند. گلوتاتیون اس-ترانسفرازها در سم‌زدایی سلول در برابر مواد خارجی شیمیایی و تسهیل چرخه دهیدروکلریناسیون نقش دارند (Li et al., 2007). این آنزیم‌ها اغلب، واکنش پیوند بین ترکیبات الکترون‌دوست با گروه تیول مولکول گلوتاتیون احیاشده را تسهیل می‌کنند که باعث افزایش انحلال در آب و دفع محصول واکنش می‌شوند (Fournier et al., 1987; Zhu et al., 2011). احتمالا افزایش فعالیت این دو آنزیم در لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، به منظور هیدرولیز و دفع اثر ترانس آنتول از بدن حشره بوده است. همچنین Shahriari et al. (2017a) گزارش دادند که اسانس زنیان (*Carum copticum*, Apiaceae) و ترکیب تیمول باعث افزایش میزان فعالیت استراز و گلوتاتیون اس ترانسفراز لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد شدند. در لاروهای بید کلم (*Plutella xylostella*, Lep.: Plutellidae) تیمارشده با ترکیبات تیمول و ۱،۸- سینئول سطح فعالیت استراز و گلوتاتیون اس ترانسفراز افزایش داشت که نشان‌دهنده‌ی سم‌زدایی ترکیبات خارجی توسط این دو آنزیم است (Kumrungsee et al., 2014).

بررسی تغییرات متابولیسم حدواسط لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تغذیه‌شده با غلظت LC_{50} ترانس آنتول از طریق ارزیابی ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی انجام گرفت (جدول ۵). میزان فعالیت هر سه آمینوترانسفراز (آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز و گاما گلوتامیل ترانسفراز) در لاروهای تیمار به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (جدول ۵). آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز، آمینازهای فعال در همولنف و اجسام چربی حشرات فعال بوده که در تبدیل اسیدهای آمینه مختلف به همدیگر، تأمین انرژی مورد نیاز برای واکنش‌های مختلف بیوشیمیایی و انتقال گروه‌های آمینو از اسیدآمینه به کتو اسید و ورود به چرخه‌ی کربس اهمیت دارند.

جدول ٤- تأثیر ترانس آنتول بر فعالیت آنزیم‌های سم‌زدای (U/mg protein) لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *Ephestia kuehniella* در ٢٤ ساعت پس از تیمار

Table 4. Effect of trans-anethole on detoxifying enzymes activities (U/mg protein) of the fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* at 24 h post treatment.

Enzymes	Control	Treated with LC_{50}	T-value
Esterase (α-NA)	0.028±0.004	0.056±0.004*	5.21
Esterase (β-NA)	0.041±0.005	0.068±0.004*	4.04
Glutathione *S*-transferase (CDNB)	0.268±0.009	0.556±0.01*	15.24
Glutathione *S*-transferase (DCNB)	0.163±0.004	0.245±0.008*	8.59

*Means with asterisks in each row are significantly different at 5% (independent *t*-test).

نقش آلانین آمینوترانسفراز، تبدیل اسید آمینه آلانین به پرولین و یا تبدیل اسیدآمینه پرولین به آلانین است در حالی‌که آسپارتات آمینوترانسفراز در تبدیل آسپارتات و آلفا-کتوگلوتارات به اگزالات و گلوتامات طی چرخه‌ی کربس نقش دارد (Klowden, 2007; Nation, 2008). گاماگلوتامیل ترانسفراز یک انتقال دهنده‌ی عصبی در چرخه‌ی ترانس آمیناسیون است که در انتقال پیام عصبی، آماده‌کردن پیش‌سوبسترا برای فعالیت گلوتاتیون و سم‌زدایی از ترکیبات سمی نقش دارد (Ramzi et al., 2014). نتایج حاصل از پژوهش حاضر که نشان‌دهنده افزایش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در لاروهای تیمارشده است، می‌تواند به دلیل تأمین انرژی از طریق متابولیسم پرولین و نیاز به اسیدهای آمینه به دلیل تخریب بافتی ایجادشده توسط ترانس آنتول باشد. افزایش فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز هم در نتیجه تامین انرژی از طریق چرخه کربس به واسطه تبدیل آسپارتات و آلفا کتوگلوتارات به اگزالات و گلوتامات است. علاوه بر این، افزایش میزان فعالیت گاما گلوتامیل ترانسفراز پس از قرارگرفتن در معرض ترانس آنتول را می‌توان به نقش این آنزیم در سم‌زدایی با تولید بیشتر گلوتاتیون نسبت داد. افزایش میزان سطح آمینوترانسفرازها در پژوهش حاضر، سبب افزایش تقاضای انرژی جهت ترمیم بافت‌ها شده که این انرژی درخواستی از تجزیه‌ی پروتئین ذخیره‌ای تأمین می‌گردد. تغذیه لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از رژیم غذایی حاوی اسانس زنیان و ترکیبات تیمول و دی‌آلیل دی‌سولفاید باعث کاهش میزان فعالیت آلانین و آسپارتات آمینوترانسفراز و افزایش سطح فعالیت گاما گلوتامیل ترانسفراز شد (Shahriari & Sahebzadeh, 2017; Shahriari et al., 2017a). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد با غلظت LC_{50} ترانس آنتول باعث کاهش معنی‌دار فعالیت لاکتات دهیدروژناز نسبت به شاهد شد (جدول ۵). لاکتات دهیدروژناز در تبدیل پیرووات به لاکتات و استفاده از الکترون‌ها درتبدیل NADH به NAD^+ نقش داشته و می‌تواند شاخصی برای تخریب بافتی در لاروهای تیمار باشد (Klowden, 2007). همچنین این آنزیم به عنوان شاخصی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها است، بنابراین تغییر در فعالیت این آنزیم در کاهش یا افزایش متابولیسم کربوهیدرات حشرات موثر می‌باشد (Thomas, 1998). کاهش در میزان فعالیت لاکتات دهیدروژناز لاروهای تیمار می‌تواند به علت تبدیل لاکتات به پیرووات برای ورود به چرخه‌ی کربس باشد.

جدول ۵- تأثیر ترانس‌آنتول بر فعالیت آنزیم‌های موثر در متابولیسم حدواسط (U/mg protein) لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *Ephestia kuehniella* در ۲۴ ساعت پس از تیمار

Table 5. Effect of trans-anethole on enzymes of intermediary metabolism activities (U/mg protein) of the fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* at 24 h post treatment.

Enzymes of intermediary metabolism	Control	Treated with LC_{50}	T-value
Alanine aminotransferases	0.060±0.008	0.113±0.005*	5.43
Aspartate aminotransferases	0.038±0.003	0.058±0.001*	6.05
γ- Glutamyl transferase	0.034±0.001	0.056±0.005*	4.30
Lactate dehydrogenase	0.034±0.003*	0.015±0.002	4.72
Acid phosphatase	0.051±0.002*	0.023±0.002	7.54
Alkaline phosphatase	0.025±0.002*	0.011±0.003	3.65

*Means with asterisks in each row are significantly different at 5% (independent *t*-test).

تیمار آفت‌کش‌های گیاهی مختلف باعث کاهش فعالیت این آنزیم در پروانه پیچاننده برگ برنج، *Cnaphalocrocis medinalis* (Lep.: Pyralidae) و شب‌پره مدیترانه‌ای آرد شد (Shahriari & Sahebzadeh, 2017; Shahriari et al., 2017a, b; Senthil-Nathan, 2006). تغذیه لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد با رژیم غذایی حاوی ترانس آنتول باعث کاهش معنی‌دار میزان فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز در مقایسه با شاهد شد (جدول ۵). اسید و آلکالین فسفاتاز آنزیم‌های هیدرولازی هستند که گروه‌های فسفات را از مولکول‌هایی مانند نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها و آلکالوئیدها در شرایط اسیدی و قلیایی جدا می‌کنند (Klowden, 2007). فعالیت این دو آنزیم نشان‌دهنده کارایی هضم و جذب مواد غذایی در معده و انتقال آن‌ها به اجسام چربی است (Senthil-Nathan, 2006). بنابراین کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در لاروهای تیمارشده، با کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان ذخایر غذایی موجود در چربی مرتبط است؛ زیرا کاهش کارایی هضم منجر به کاهش گروه‌های مواد غذایی در دسترس برای فعالیت فسفاتازها شده است.

میزان ذخایر غذایی از قبیل پروتئین، تری‌گلیسرید و گلیکوژن در لاروهای شاهد و تیمارشده با غلظت LC_{50} ترانس آنتول در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان هر سه مولکول در لاروهای تیمار شده به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. پروتئین در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی حشرات از قبیل تامین انرژی از طریق متابولیسم پرولین، رشد و نمو، دیاپوز و سختی کوتیکول نقش دارد (Klowden, 2007). چربی‌ها در مقایسه با پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها مزیت‌های بیشتری در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف دارند که می‌توان به تولید انرژی بیشتر اشاره کرد. چربی ذخیره‌ای در حشرات تری‌گلیسرید است که به عنوان محصول واکنش بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب برای تولید انرژی در بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Klowden, 2007). گلیکوژن پلی‌مری تشکیل‌شده از واحدهای گلوکزی است که می‌تواند به عنوان منبع انرژی در دسترس، انرژی لازم برای سیستم تولید مثلی، ماهیچه‌های پروازی و متابولیسم‌های سم‌زدایی را فراهم کند (Nation, 2008). از آن‌جایی‌که میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا و آمینوترانسفراز در لاروهای تیمار افزایش یافت، کاهش میزان درشت‌مولکول‌های ذخیره‌ای را می‌توان به کاهش سنتز آن‌ها و یا تجزیه بیشتر آن‌ها به آمینواسید و تامین انرژی درخواستی توسط آنزیم‌های سم‌زدا و آمینوترانسفرازها نسبت داد. کاهش میزان ذخایر غذایی پس از کاربرد آفت‌کش‌های با منشا گیاهی در مطالعات سایر محققین نیز گزارش شده است (Yazdani et al., 2013; Ramzi et al., 2014; Talepour et al., 2021; Ramzi et al., 2022). غلظت LC_{50} ترکیبات دی‌آلیل دی‌سولفاید و آلفا پینن باعث کاهش معنی‌دار میزان گلیکوژن و پروتئین کل در لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد شدند (Shahriari & Sahebzadeh, 2017; Shahriari et al., 2017b).

جدول ٦- تأثیر ترانس آنتول بر میزان ماکرومولکول‌های ذخیره‌ای (U/mg protein) لاروهای سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *Ephestia kuehniella* در ٢٤ ساعت پس از تیمار

Table 6. Effect of trans-anethole on amounts of storage macromolecules (mg/dl) of *Ephestia kuehniella* at 24 h post treatment.

Storage macromolecules	Control	Treated with LC_{50}	T-value
Total protein	1.139±0.008*	1.009±0.008	10.83
Glycogen	0.013±0.0008*	0.008±0.0009	3.43
Triglyceride	0.0129±0.0001*	0.0124±0.0001	2.78

*Means with asterisks in each row are significantly different at 5% (independent *t*-test).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج نشان داد که ترانس آنتول (غلظت LC_{50} برابر با ۷/۰۳ میکرولیتر بر گرم) دارای اثر سمی روی لاروهای سن ۴ شب‌پره مدیترانه‌ای آرد بوده و باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های گوارشی در لاروهای تیمارشده گردید که نشان دهنده اختلال در هضم مواد غذایی خورده‌شده توسط حشره است. تغییرات معنی‌دار در آنزیم‌های دخیل در متابولیسم حدواسط و کاهش ذخایر غذایی نشان داد که ترانس آنتول به عنوان بازدارنده مسیرهای متابولیکی هضم و از طریق کاهش جذب موادغذایی در لارو شب‌پره مدیترانه‌ای آرد قادر است تأثیر منفی بر بافت‌های این حشره گذاشته و در مدیریت این آفت به طور موثر ایفای نقش نماید.

سپاس‌گزاری

از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان و زابل به سبب در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر می‌شود.

References

Athanassiou, C. G., Rani, P. U., & Kavallieratos, N. G. (2014). The use of plant extracts for stored product protection. Singh, D. (ed.), Advances in Plant Biopesticides. New Delhi, India. pp. 131-148.

Bernfeld, P. (1955). Amylases, α and β. *Methods in Enzymology*, *1*, 149-158. https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5

Bessey, O. A. (1954). A method for a rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, *207*, 19-23.

Chun, Y., & Yin, Z. D. (1993). Glycogen assay for diagnosis of female genital *Chlamydia trachomatis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(4), 1081-1082. https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.1081-1082.1998

Cruz, G. S., Wanderley-Teixeira, V., Oliveira, J. V., D'assunçã, C. G., Cunha, F. M., Teixeira, A. A. C., et al. (2017). Effect of trans-anethole, limonene and your combination in nutritional components and their reflection on reproductive parameters and testicular apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemico-Biological Interactions*, *63*, 74-80. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.12.013

Dias, M. L., Auad, A. M., Magno, M. C., Resende, T. T., Fonseca, M. G., & Silva, S. E. B. (2019). Insecticidal activity of compounds of plant origin on *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). *Insects*, *10*(10), 1-11. https://doi.org/10.3390/insects10100360

Fossati, P., & Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry*, *28*(10), 2077-2080. https://doi.org/10.1093/clinchem/28.10.2077

Fournier, D., Cuany, A., Pralavorio, M., Bride, J. M., & Berge, J. B. (1987). Analysis of methidathion resistance mechanisms in *Phytoseiulus persimilis* A.H. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *28*, 271-278. https://doi.org/10.1016/0048-3575(87)90025-3

Gallego, F.J., Rodríguez-Gómez, A., Carmen Reche, M., Balanza, V., & Bielza P. (2022). Effect of the amount of *Ephestia kuehniella* eggs for rearing on development, survival, and reproduction of *Orius laevigatus*. *Insects*, *13*(250), 1-8. https://doi.org/10.3390/insects13030250

Ghanem, I., Audeh, A., Alnaser, A.A., & Tayoub, G. (2013). Chemical constituents and insecticidal activity of the essential oil from fruits of *Foeniculum vulgare* Miller on larvae of Khapra beetle (*Trogoderma granarium* Everts). *Herba Polonica*, *59*(4), 86-96. https://doi.org/10.2478/hepo-2013-0026

Goharrostami, M., & Sendi, J.J. (2018). Investigation on endosymbionts of Mediterranean flour moth gut and studying their role in physiology and biology. *Journal of Stored Products Research*, *75*, 10-17. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2017.11.003

Han, Z., Moores, G., Devonshire, A., & Denholm, I. (1998). Association between biochemical marks and insecticide resistance in the Cotton Aphid, *Aphis gossypii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *62*, 164-171. https://doi.org/10.1006/pest.1998.2373

Hemingway, J., & Karunatne, S. H. P. (1998). Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology*, *12*(1), 1-12. https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998. 00082.x

Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, *51*, 45-66. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146

Isman, M.B. (2020). Botanical insecticides in the twenty-first century-fulfilling their promise?. *Annual Review of Entomology*, *65*, 233-249. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025010

Kim, S.W., Kang, J., & Park, I.K. (2013). Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Asia Pacific Entomology*, *16*, 443-447. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.052

King, J. (1965). The dehydrogenases or oxidoreductases. Lactate dehydrogenase, In King, J. (Ed.). Practical clinical enzymology. London: Van Nostrand, pp. 83-93.

Klowden, M. J. (2007). Physiological systems in insects. Second edition, Academic Press, USA.

Kumrungsee, N., Pluempanupat, W., Koul, O., & Bullangpoti, V. (2014). Toxicity of essential oil compounds against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and their impact on detoxification enzyme activities. *Journal of Pest Science*, *87*(4), 721-729. https://doi.org/10.1007/s10340-014-0602-6

Li, X. C., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, *52*, 231-253. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104

Lima, F. M., Favero, S., & Lima, J. O. G. (2001). Production of the Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), on an artificial diet containing corn meal. *Neotropical Entomology*, *30*(1), 37-42. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000100007

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-75. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6

Nation, J. L. (2008). Insect physiology and biochemistry. 2nd edition. CRC Press, New York.

Oppenoorth, F.J., Van der Pas, L., & Houx, N. (1979). Glutathione *S*-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *11*, 176-178. https://doi.org/10.1016/0048-3575(79)90057-9

Oppert, B., Kramer, K.J., & McGaughey, W.H. (1997). Rapid microplate assay of proteinase mixtures. *Biotechnology*, *23*(1), 70-72.

Pascual-Villalobos, M. J., Cantó-Tejero, M., Guirao, P., & López, M. D. (2020). Fumigant toxicity in *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae): Controlled release of (E)-anethole from microspheres. *Plants*, *9*(1), 1-11. https://doi.org/10.3390/plants9010124

Pavela, R., Maggi, F., Cianfaglione, K., Bruno, M., & Benelli, G. (2018). Larvicidal activity of essential oils of five Apiaceae taxa and some of their main constituents against *Culex quinquefasciatus*. *Chemistry and Biodiversity*, *15*(1), 1-12. https://doi.org/10.1002/cbdv.201700382

Rajaei, A., Yazdanian, M., & Asadeh, Gh. (2021). Lethal and sublethal effects of low temperature, alone and in combination with eucalyptus essential oil, against adult Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Plant Protection* (*Scientific Journal of Agriculture*), *43*(4): 91-109. https://doi.org/10.22055/PPR.2021.16769

Rajendran, S., & Sriranjini, V. (2008). Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, *44*(2), 126-135. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2007.08.003

Ramzi, S., Sahragard, A., & Zibaee, A. (2014). Effects of *Citrullus colocynthis* agglutinin on intermediary metabolism of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *17*(3), 273-279. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.01.005

Ramzi, S., Seraji, A., Gonbad, R.A. & Haghighat, S. (2022). Effects of the extract and the essential oil of *Allium sativum* on tea mealy bug, *Pseudococcus viburni* Sigornet (Hemiptera: Pseudococcidae). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *42*,102359. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102359

Rosa, J.S., Oliveira, L., Sousa, R.M.O.F., Escobar, C.B., & Fernandes-Ferreira, M. (2020). Bioactivity of some Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Bulletin of Entomological Research*, *110*(3), 406-416. https://doi.org/10.1017/S0007485319000774

Scott, I. M., Jensen, H., Scott, J. G., Isman, M. B., Arnason, J. T., & Philogène, B. J. R. (2003). Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *54*(4), 212-225. https://doi.org/10.1002/arch.10118

Senthil-Nathan, S. (2006). Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *84*, 98-108. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.05.006

Shahriari, M., & Sahebzadeh, N. (2017). Effect of diallyl disulfide on physiological performance of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Archive of Phytopathology and Plant Protection*, *50*(1) 33-46. https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1253252

Shahriari, M., Sahebzadeh, N., & Zibaee, A. (2017a). Metabolic response of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) to essential oil of Ajwain and thymol. *Toxin Reviews*, *36*(3), 204-209. https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1294605

Shahriari, M., Sahebzadeh, N., & Zibaee, A. (2017b). Effect of *Teucrium polium* (Lamiaceae) essential oil on digestive enzyme activities and energy reserves of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Invertebrate Survival Journal*, *14*(1), 182-189. https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v14i1.182-189

Shahriari, M., Sahebzadeh, N., Sarabandi, M., & Zibaee, A. (2016). Oral toxicity of thymol, α-Pinene, Diallyl Disulfide and Trans-Anethole, and Their Binary Mixtures against *Tribolium castaneum* Herbst larvae (Coleoptera: Tenebrionidae). *Jordan Journal of Biological Sciences*, *9*(4), 213-219.

Shahriari, M., Zibaee, A., Sahebzadeh, N., & Shamakhi, L. (2018). Effects of α-pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *150*, 40-47. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.06.015

Silva, C. P., & Terra, W. R. M. (1995). An α-glucosidase from perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells: Purification and properties. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *25*(4), 487-494. https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00088-G

Sousa, R.M.O., Rosa, J.S., Oliveira, L., Cunha, A., & Fernandes-Ferreira, M. (2015). Activities of Apiaceae essential oils and volatile compounds on hatchability, development,

reproduction and nutrition of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Industrial Crops and Products*, *63*, 226-237. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.052

Szasz, G. (1976). Reaction-rate method for gamma-glutamyltransferase activity in serum. *Clinical Chemistry*, *22*(12), 2051-2055.

Talepour, F., Zibaee, A., Seyahooei, M.A., & Sendi, J.J. (2021). Toxicity and physiological effects of diallyl sulfide and dialyl disulfide on *Tuta absoluta* Meyrick. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *116*, 101741. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101741

Tavakoli, B., & Ajam Hosni, M. (2018). Effect of palizin, diflubenzuron, chlorpyrifos, deltamethrin and hexaflumuron on bio- demographic characteristic and feeding index of Flour moth, *Anagasta kuehniella*, (Lep: Pyralidae). *Journal of Applied Plant Protection*, *6*(1), 25-33.

Thomas, L. (1998). Clinical laboratory diagnostic. first ed., TH Books Verlasgesellschaft, Frankfurt.

Tsujita, T., Ninomiya, H., & Okuda, H. (1989). *p*-nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, *30*(7), 997-1004. https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38302-4

Xavier, V. M., Message, D., Picanco, M. C., Chediak, M., Santana Junior, P. A., Ramos, R. S., et al. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of botanical insecticides to honeybees. *Journal of Insect Sciences*, *15*(1), 1-6. https://doi.org/10.1093/jisesa/iev110

Yazdani, E., Sendi, J.J., Aliakbar, A., & Senthil-Nathan, S. (2013). Effect *of Lavandula angustifolia* essential oil against lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep: Pyralidae) and identification of its major derivatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *107*(2), 250-257. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.08.002

Zhu, Y.C., Guo, Z., Chen, M.S., Zhu, K.Y., Liu, X.F., & Scheffler, B. (2011). Major putative pesticide receptors, detoxification enzymes, and transcriptional profile of the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, *106*(2), 296-307. https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.10.007

Zibaee, A., & Bandani, A. R. (2010). Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on digestive enzymes profiles and cellular immune reactions of sun pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauvaria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*, *100*, 185-196.

© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)
45(2), Summer, 2022

doi 10.22055/ppr.2022.17573

Biochemical response of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) to the toxicity of trans-anethole

Morteza Shahriari[1], Najmeh Sahebzadeh[2]*, Arash Zibaee[3]

1. PhD graduate, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran (n.sahebzadeh@uoz.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran

Received: 28 March 2022 Accepted: 25 May 2022

Abstract

Background and Objectives

Essential oils are a variety of compounds, and their monoterpenoids, as the main constituents may impair insects' physiological and behavioral functions and could thus be applied in pest management. In addition to causing damage to stored products, the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lep.: Pyralidae), is actually an easy model to grow in the laboratory and is one of the suitable insects to determine toxicity and in vivo interactions of xenobiotics with physiological systems of insects. In the present study, in order to better understand the mechanism of action of trans-anethole as one of the most important secondary metabolites of the Apiaceae family, the oral toxicity of this compound was evaluated on the activities of digestive and detoxifying enzymes, and metabolites involving in intermediate metabolism of the fourth instar of *E. kuehniella*.

Materials and Methods

Fourth instar larvae of *E. kuehniella* were randomly selected and separately exposed to 1 g of the artificial diet containing 1, 2, 4, 8, and 16 µL/g of trans-anethole while the control larvae fed on the diet containing acetone. The bioassay test was performed in 3 replicates with 10 larvae per replication. Mortality was determined after 24 h and LC_{50} value was calculated by POLO-plus software. *Ephestia kuehniella* larvae were exposed to the LC_{50} value of trans-anethole to determine its effects on the enzymatic and non-enzymatic components. After 24 of exposure, the larvae hemolymph, midgut, and fat bodies were extracted. Hemolymph samples were immediately centrifuged at 15000 × *g* at 4°C for 20 min, while samples of midgut and fat bodies were initially homogenized by a glass pestle and then centrifuged under the same conditions. The hemolymph samples were used to assay the detoxifying enzymes and enzymes of intermediary metabolism, while the midgut samples were used to assess the digestive enzymes. Fat body samples and head capsules were also used for energy reserves.

Results

The LC_{50} value of trans-anethole against the larvae was 7.03 μL g^{-1}. Significant decrease in the digestive enzyme activities (α-amylase, α and β-glucosidase, lipase) and specific proteases (trypsin, chymotrypsin, elastase, amino and carboxy peptidase) were observed. In contrast, the activity of the detoxifying enzymes (esterases, and glutathione *S*- transferase) increased in the treated insects. The activities of amino transferases (alanine, aspartate, and gamma-glutamyl) significantly increased in the treated larvae by trans-anethole. Significant decreases in lactate dehydrogenase and phosphatase (acid and alkaline) were observed after treatment. Moreover, the amount of storage macromolecules (total protein, glycogen, and triglyceride) in the treated insects was significantly decreased compared to the control.

Discussion

Our research revealed that trans-anethole is a toxic compound to *E. kuehniella* by reducing the survival and digestive efficiency of the larvae. Moreover, trans-anethole significantly enhanced the detoxifying enzymes activities. When the larvae were exposed to LC_{50} of trans-anethole, the digestive activity was reduced due to the cytotoxic effects of trans-anethole on epithelial cells of the larval alimentary canal. Our results demonstrated that trans-anethole might have a promising potential to develop as a safe compound to suppress *E. kuehniella* population. For the practical use of trans-anethole to control *E. kuehniella*, it is required to determine the accurate mode of action, and using appropriate formulations to increase its efficacy in long-term applications.

Keyword: ***Physiological disturbance, trans-Anethole, Detoxification, Energy reserves, Intermediary metabolism***

Associate editor: B. Naseri (Prof.)

Citation: Shahriari, M., Sahebzadeh, N. & Sheikhi Zibaee, A. (2022). Biochemical response of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) to the toxicity of trans-anethole. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), *45*(2), 121-136. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2022.17573.