

اثر محدودیت غذایی بر قابلیت هضم، آنزیم‌های گوارشی و صفات اقتصادی کرم ابریشم

سید حسین حسینی مقدم^{۱*}، داوود آزیدهاک^۲، محمد قدمیاری^۳، عباسعلی قیصری^۴

۱- استادیار گروه علوم دامی و گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- کارشناس ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)
۳- دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)

(تاریخ دریافت ۹۲/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۹)

چکیده

جهت بررسی اثر تنش گرسنگی بر صفات مهم اقتصادی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و قابلیت هضم برگ توت در کرم ابریشم از ۱۶۵۰ لارو سن چهارم استفاده شد. لاروهای سه سن اول به صورت گروهی و از سن چهارم در ۱۵ سینی برای چهار تیمار به همراه شاهد (T₁) پرورش داده شدند. از سن چهارم در تیمارهای T₂ و T₃ به ترتیب یک سوم و دو سوم نیاز غذایی و از سن پنجم در تیمارهای T₄ و T₅ به ترتیب یک سوم و دو سوم نیاز غذایی لاروها تامین و قابلیت هضم در هر سن اندازه‌گیری شد. در روز چهارم سن پنجم، فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آلفا-آمیلاز در ۱۰ لارو از هر سینی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آلفا-آمیلاز در T₂ به ترتیب ۱۶/۴۹، ۴۷/۸ و ۲۱۱/۷ و در T₃ ۱۵/۷۶، ۴۷/۱ و ۴۷/۱ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ بود که از شاهد (به ترتیب ۸/۱۶، ۲۳ و ۱۰۱) بیشتر بودند ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز T₄ به ترتیب ۱۶/۷۷ و ۵۵/۱ و در T₅ ۱۴/۳۷ و ۶۵/۵ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ بودند که از شاهد بیشتر بود ($P < 0.05$). در نتیجه تنش شدید گرسنگی قابلیت هضم ماده خشک برگ توت مصرفی T₂، ۴۸/۲۶ و در T₄، ۴۱/۲۹ درصد بود که نسبت به T₁ (۳۹/۸۵) افزایش نشان داد ($P < 0.05$). محدودیت غذایی سبب کاهش وزن پيله تر و سفیره شد، ولی اثر معنی‌داری بر وزن قشر پيله نداشت ($P < 0.05$). این نتایج نشان می‌دهد که در شرایط محدودیت غذایی ضمن افزایش طول دوره لاروی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو افزایش یافته تا با هضم حداکثری پروتئین، ابریشم مورد نیاز پيله تنی و قشر پيله را تامین نماید.

واژه‌های کلیدی: آلفا-آمیلاز، آنزیم‌های گوارشی، پروتئاز، کرم ابریشم، لیپاز، محدودیت غذایی

مقدمه

کرم ابریشم یکی از حشرات گیاه‌خوار^۱ بوده که نوع اهلی آن به طور انحصاری از برگ توت تغذیه می‌کند. موفقیت در پرورش کرم ابریشم مستلزم تغذیه مستمر لاروهای کرم ابریشم با برگ توت از زمان تفریح تخم تا پیلته‌نی است که حدود ۲۶ روز طول می‌کشد. لاروهای کرم ابریشم دورگ (هیبرید) ایرانی در دوره پرورش لارو، ۶۳۰۰ تا ۶۶۰۰ برابر رشد می‌نمایند که مواد مورد نیاز برای این حجم توده زیستی بعلاوه انرژی لازم برای پوست اندازی و پیلته‌نی با مصرف بسیار زیاد برگ توت که حدود ۳۲ تا ۳۶ گرم به ازای هر لارو است تامین می‌شود (حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۹۰a). مقدار برگ مورد نیاز روزانه برای هر سه وعده غذایی در طول روز و برای تمام سنین لاروی بر اساس آزمایش‌های تغذیه‌ای در جدول‌هایی ارائه می‌شود (حسینی مقدم، ۱۳۸۴). پرورش‌دهندگان کرم ابریشم به دلایل مختلف از جمله اشتباه در برآورد برگ توت مورد نیاز، سرمازدگی، آفت زدگی و آلودگی به سموم شیمیایی برگ‌های توت و یا مشکلات شخصی ممکن است در تامین برگ مورد نیاز لاروها و یا برگ‌دهی دچار مشکل شوند. لذا در این شرایط کاهش برگ‌دهی و کاهش مصرف برگ به وسیله لاروها اتفاق خواهد افتاد. چنانچه کاهش مصرف برگ توت زیاد نباشد به‌عنوان مثال تا ۱۰ درصد مقادیر نیاز غذایی (حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۹۰b) و حتی ۳۰ درصد کمتر از شاهد (Mathur et al., 2002) از نظر آماری بر قابلیت هضم تاثیر معنی‌داری نخواهد داشت، لیکن تداوم گرسنگی احتمالاً ضمن کاهش میزان مصرف و هضم و جذب، متابولیسم، سنتز آنزیم‌ها و ذخیره غذایی و سایر فعالیت‌ها نظیر میزان رشد، زمان بلوغ، وزن نهایی لارو، مقدار مواد ابریشمی، ماندگاری و تولیدمثل را تغییر خواهد داد. البته به جز مقدار مصرف برگ توت، دفعات تغذیه (حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۸۵)، نوع هیبرید کرم ابریشم (Mathur et al., 2002)، عوامل محیطی (Rahmathulla and Suresh, 2012؛ حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۸۷) و برخی عوامل دیگر بر شاخص‌های تغذیه‌ای تاثیر گذارند. به‌منظور بررسی تغییرات تغذیه بر فعالیت‌های گوارشی لازم است پارامترهای تغذیه‌ای و آنزیم‌های گوارشی اندازه‌گیری و با تغییرات صفات اقتصادی مقایسه شوند.

به‌طور معمول پارامترهای مهم تغذیه‌ای عبارت از غذای مصرفی، غذای هضمی، قابلیت مصرف، قابلیت هضم و راندمان غذای مصرفی و هضمی به وزن لارو، وزن پیلته و وزن قشر پیلته هستند (حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۹۰a). پارامتر قابلیت مصرف و قابلیت هضم وابسته به کیفیت برگ توت و قابلیت‌های کرم ابریشم یا به عبارتی هر دو عامل خوراک و موجود زنده است. لذا ضروری است تمامی لاروهای آزمایشی از نظر ژنتیکی یکسان بوده و برگ توت مصرفی نیز از یک وارسته معین باشد.

پارامترهای تغذیه‌ای حشرات تحت تاثیر فیزیولوژی دستگاه گوارش است (Chapman, 1998). هضم در کرم ابریشم بطور عمده در روده میانی انجام می‌شود. چون قسمت اعظم تار ابریشمی پروتئین است لذا متابولیسم ترکیبات ازت‌دار و اسیدهای آمینه حایز اهمیت است. برگ توت منبع انحصاری تامین پروتئین، کربوهیدرات، چربی و مواد معدنی کرم ابریشم است. مقدار درصد پروتئین برگ حدود ۲۵ تا ۳۵ درصد است. قابلیت هضم پروتئین خام برگ توت در همه سنین لاروی حدود ۶۲ درصد است. مقدار درصد چربی برگ توت نیز حدود ۳ الی ۶ درصد ماده خشک و قابلیت هضم چربی خام برگ توت حدود ۵۸/۵ درصد است. کربوهیدرات‌ها که بخش مهمی از برگ توت را تشکیل می‌دهند، شامل نشاسته، ساکارز و گلوکز هستند (Ito, 1978). هضم کربوهیدرات‌ها در دو مرحله انجام می‌شود. مقدار کمی از پلی ساکاریدها در حشرات همانند سایر موجودات به وسیله غدد بزاقی هضم شده و هضم کامل پلی ساکاریدها در روده میانی انجام می‌شود (Kfir et al., 2002).

اندازه‌گیری قابلیت هضم مواد در موجودات زنده‌ای که مدفوع و ادرارشان به‌طور جداگانه دفع می‌شود آسان است ولی در کرم ابریشم ادرار نیز داخل مجرای روده تخلیه شده و مواد به صورت مدفوع چندوجهی دفع می‌شوند. در حشرات گیاه‌خوار نسبتی از غذای هضم شده که به طور واقعی هضم شده است قابلیت هضم تقریبی^۲ نامیده می‌شود (Lindroth, 1993). آنزیم‌های گوارشی عمده در کرم ابریشم که در بررسی‌های تغذیه‌ای اندازه‌گیری می‌شوند شامل پروتئازها، آمیلازها و لیپازها هستند. فعالیت آنزیم‌های گوارشی میان روده کرم ابریشم به وسیله

۴- یک سوم مقدار غذای شاهد با شروع محدودیت از سن پنجم لاروی.

۵- دو سوم مقدار غذای شاهد با شروع محدودیت از سن پنجم لاروی.

صفات مورد اندازه‌گیری عبارت بودند از: مقدار برگ خشک مصرفی، مقدار مدفوع خشک، وزن پيله، وزن شفیره، وزن قشر پيله، درصد قشر پيله و طول دوره لاروی. وزن خشک برگ و مدفوع بر اساس دستورالعمل حسینی مقدم و همکاران (۱۳۸۵) اندازه‌گیری شد. برای تثبیت تعداد لارو در هر سینی پرورش کرم ابریشم و جلوگیری از مشکلات تنوع تعداد افراد، لاروهای بیمار و ضعیف با لاروهای سالمی جایگزین شدند که در شرایط مشابه با تیمارهای آزمایشی پرورش یافته بودند. برای اندازه‌گیری قابلیت هضم تقریبی از روش ارزیابی شده به وسیله Horie and Wanatabe (1983)، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از روش Garcia-Bernfeld (1955) و فعالیت آنزیم پروتئاز از Carreno and Haard (1993) و Gholamzadeh Chitgar (2013) *et al.* با اندکی تغییرات استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی

از هر تکرار تعداد ۱۰ لارو در روز چهارم سن پنجم تشریح شدند و روده میانی آنها در شرایط سرد، جداسازی و درون ظرف پتری حاوی محلول سرد کلرید سدیم ۰/۷ درصد شستشو داده شده و پس از شستشوی مجدد با آب مقطر سرد به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. روده میانی بعد از هموژنایز شدن در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار pH= ۸ با دستگاه هموژنایز دستی، در ۳۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده، سپس از بخش رویی نمونه‌ها به‌عنوان منبع آنزیمی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز استفاده شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آمیلاز واکنش در محیط بافری فسفات سدیم و با استفاده از سوپسترای نشاسته (۱/۱) و معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) انجام شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Awareness (Stat Fax 3200®) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج بر حسب میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

محققین مختلف اندازه‌گیری شده است، به عنوان مثال Lokesh *et al.* (2012) فعالیت آنزیم پروتئاز و مقدار پروتئین؛ Vitthalrao and Sucheta (2012) آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز؛ Manjula *et al.* (2011) آنزیم آمیلاز و Ponnuel *et al.* (2003) فعالیت آنزیم لیپاز را اندازه‌گیری کرده‌اند.

عوامل متعددی سبب کاهش برگ‌دهی و مصرف برگ توت به وسیله لارو کرم ابریشم می‌شود. چنانچه گرسنگی ایجاد شده شدید باشد فراسنجه‌های تغذیه‌ای و فیزیولوژیک تحت تاثیر قرار گرفته و عملکرد صفات اقتصادی را تغییر می‌دهد. در این تحقیق اثر محدودیت غذایی (تنش گرسنگی) بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل پروتئاز، لیپاز و آمیلاز، قابلیت هضم و عملکرد تولیدی کرم ابریشم دورگ تجاری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی محدودیت غذایی در کرم ابریشم، هیبرید ۱۰۳×۱۰۴ (یکی از هیبریدهای تجاری کرم ابریشم ایران) در شرایط استاندارد محیطی در بهار سال ۱۳۹۰ پرورش داده شد. در تمام مراحل از برگ توت رقم کوزوه^۱ به عنوان یک رقم توت اصلاح شده غالب در استان اصفهان، استفاده شد. لاروها ابتدا در شعبه نطنز شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم ایران پرورش داده شده و در اولین روز سن چهارم به صورت کاملاً تصادفی ۱۱۰ لارو در هر تکرار به بسترهای مجزای پرورش که سینی‌هایی چوبی با ابعاد ۵۵ × ۹۰ سانتی‌متر بودند، انتقال یافتند. برای تغذیه لاروهای سن چهارم و پنجم از جدول‌های نیاز غذایی که قبلاً بررسی شده (حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۹۰a؛ حسینی مقدم، ۱۳۸۴) استفاده شد.

در این تحقیق ۵ تیمار در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند که عبارت بودند از:

۱- شاهد که برگ توت مطابق با جدول‌های نیاز غذایی را مصرف کرد.

۲- یک سوم مقدار غذای شاهد با شروع محدودیت از سن چهارم لاروی.

۳- دو سوم مقدار غذای شاهد با شروع محدودیت از سن چهارم لاروی.

جدول ۱- قابلیت هضم تقریبی (درصد) برای تیمارهای محدودیت غذایی برگ توت در سنین چهار و پنج لاروی کرم ابریشم

Table 1. Approximate digestibility (%) for restricted feed treatments of mulberry in fourth and fifth instar of silkworm larvae

Treatments	4 th Instar	5 th Instar			Average
		3 rd Day	5 th Day	8 th Day	
T ₁	37.53±0.6 ^a	40.45 ^b	39.35 ^c	39.73 ^b	39.85±0.04 ^c
T ₂	38.20±0.28 ^a	50.72 ^a	49.79 ^a	44.27 ^a	48.26±0.17 ^a
T ₃	38.23±0.27 ^a	39.78 ^b	38.64 ^c	40.17 ^b	39.53±0.05 ^{cd}
T ₄	-	29.24 ^c	50.33 ^a	44.30 ^a	41.29±0.01 ^b
T ₅	-	31.5 ^c	44.48 ^b	40.08 ^b	38.69±0.07 ^d

^{a-d}: Means in each column with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$)

T₁: Control, T₂: 1/3, from 4th instar, T₃: 2/3, from 4th instar, T₄: 1/3, from 5th instar, T₅: 2/3, from 5th instar

افزایش یافت ولی برای تیمارهای ۳ و ۵ (یعنی تیمارهای دو سوم مقدار نیاز غذایی و شروع محدودیت از سن ۴ و دو سوم مقدار نیاز غذایی و شروع از سن ۵) نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (جدول ۱). مقایسه قابلیت هضم تیمارها در هر یک از سه زمان نمونه‌گیری سن پنجم نیز نشان داد که تفاوت‌ها بین تیمارهای آزمایشی از نظر آماری معنی‌دار بوده ($P > 0.05$) و لاروهای تیمار ۱ که بیشترین محدودیت غذایی را تحمل کرده‌اند بیشترین افزایش قابلیت هضم را داشتند.

تنش شدید گرسنگی روی کرم ابریشم تاکنون بررسی نشده است، لیکن محدودیت کمتر غذایی (حداکثر ۳۰ درصد) بررسی شده (Mathur et al., 2002) و گزارش شد که ۱۰ درصد محدودیت غذایی بر قابلیت هضم هیچکدام از هیبریدهای کرم ابریشم تأثیری نداشت، لیکن ۲۰ و ۳۰ درصد کاهش در غذایی، قابلیت هضم یکی از هیبریدها را کاهش داده و روی هیبرید دیگر بی‌تأثیر بود. همچنین حسینی مقدم و همکاران (۱۳۹۰b) ۵ و ۱۰ درصد کاهش در برگ‌دهی را روی شش هیبرید تجاری کرم ابریشم در هر دو فصل بهار و پاییز بررسی نمودند که تیمارها تفاوت معنی‌داری (بجز یک هیبرید) با شاهد نشان ندادند. به‌ویژه قابلیت هضم برگ توت در هیبرید مورد استفاده در تحقیق فعلی (1.03×10^4) تحت تأثیر محدودیت‌های غذایی مذکور قرار نگرفت.

۲. آنزیم‌های گوارشی

تولید آنزیم به کیفیت و مقدار غذای حشره، رفتار تغذیه‌ای حشره (مقدار غذایی که طول روده را طی می‌کند) و همچنین بستگی به شرایط فیزیولوژیک لاروها و عمل هضم و جذب و انتقال در لوله گوارش بستگی دارد. فعالیت

به منظور اندازه‌گیری آنزیم لیپاز از سوپسترای P-نیتروفنل استات و بافر تریس (pH=7، ۲۰ میلی‌مولار) استفاده شد و جذب نوری محصول تولید شده به مدت ۱۰ دقیقه با فاصله زمانی ۴۵ ثانیه و در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. سپس به کمک منحنی استاندارد P-نیتروفنل میزان فعالیت آنزیم لیپاز اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری آنزیم پروتئاز از بافر فسفات با pH=8 و آزوکازئین استفاده و سپس واکنش با تری‌کلرواستیک اسید 10% متوقف شد. محلول سانتی‌فیوژ شده با سود نرمال مخلوط شده و جذب نور در ۴۴۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری پروتئین از روش Bradford (1976) و از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد.

نتایج و بحث

۱. قابلیت هضم

قابلیت هضم بر مبنای میزان ماده خشک برگ مصرفی (درصد) و ماده خشک مدفوع (درصد) در سنین چهار و پنج لاروی اندازه‌گیری شد. با توجه به طولانی بودن طول سن پنجم و پرخوری لارو در این سن قابلیت هضم سه بار شامل روزهای سوم، ششم و هشتم سن پنجم در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول ۱ ارایه شده است. تفاوت در قابلیت هضم برگ توت بین سه تیمار آزمایشی در سن چهارم لاروی معنی‌دار نبود ($P > 0.05$)، اما در سن پنجم و بر مبنای میانگین سه بار اندازه‌گیری، این تفاوت‌ها در بین ۵ تیمار آزمایشی معنی‌دار بودند. داده‌ها نشان داد که برای تیمار ۲ و ۴ (یعنی تیمارهای یک سوم مقدار نیاز غذایی شروع از سن ۴ و یک سوم مقدار نیاز غذایی شروع از سن ۵) قابلیت هضم نسبت به تیمار شاهد

ساخت بسیار زیاد دی ان آ (DNA)، هضم زیاد، ساخت متوسط آر ان آ (RNA) و سنتز کم پروتئین اتفاق می افتد و به نظر می رسد وابسته به هورمون جوانی باشد. سه مرحله بعدی مرتبط با غدد ابریشمی و پروتئین سازی است (Vitalrao and Sucheta, 2012). بنابراین بهترین زمان نمونه گیری بافت های بدن کرم ابریشم برای مطالعات پروتئین ها روز سوم تا پنجم است. در این تحقیق تشریح لاروها و نمونه گیری روده میانی لارو در روز چهارم سن پنجم انجام شد. بعلاوه با توجه به تاثیر سن بر میزان فعالیت آنزیم های گوارشی (Jadav and Kallapur, 1988) تمامی شرایط برای همه لاروهای آزمایشی یکسان بود.

این آزمایش روی یک هیبرید تجاری کرم ابریشم انجام شد. نتایج تحقیقات گذشته نشان می دهد که تفاوت های ژنتیکی در فعالیت آنزیم پروتئاز کرم ابریشم چندان قابل توجه نبوده و نتایج تحقیق حاضر احتمالاً قابل تعمیم به سایر هیبریدهای کرم ابریشم باشد. به عنوان مثال در تحقیقی اثر عوامل مختلف نظیر دما، زمان، pH، غلظت سوبسترا و غیره بر میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در سه نژاد چند نسله کرم ابریشم (فاقد ویژگی دیپوز در تخم) بررسی شد. نتایج تفاوت های جزئی در بین این سه نژاد نشان داد؛ آنزیم پروتئاز نژاد نیستاری^۲ به دلیل دارا بودن km پایین، کاراتر از نژاد کولار گولد^۳ بود (Muniv and Mahesha and Kalpana, 2012). همچنین (Bhawane, 2012). با مقایسه میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در ۱۵ واریته دو نسله کرم ابریشم نشان دادند که فعالیت این آنزیم تنها در دو واریته CSR17 و CSR26 بیشتر از بقیه است و برای ۱۳ واریته تفاوت ها جزئی است.

۴. آنزیم آلفا- آمیلاز

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بر مبنای میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین در جدول ۲ ارائه شده است. داده ها نشان می دهد میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای ۲ و ۳ بیشتر از ۴ و ۵ است. به عبارتی طولانی شدن تنش سبب افزایش فعالیت این آنزیم شده است. داده ها نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین تیمارهای ۴ و ۵ سن پنجم لاروی با شاهد وجود ندارد. این می تواند به دلیل مدت کوتاه تنش گرسنگی باشد زیرا نمونه گیری در روز چهارم

آنزیم های گوارشی در لوله گوارش می تواند تحت تاثیر مصرف نامتعادل غذا، افزایش حرکات دودی^۱ روده و هر نوع استرس قرار گیرد (Chapman, 1998). در این تحقیق فرض شد که محدودیت غذایی که منجر به گرسنگی شدید در دوران پرخوری لاروها می شود می تواند فعالیت آنزیم های گوارشی را تحت تاثیر قرار دهد.

۳. آنزیم پروتئاز

این بررسی نشان داد که میانگین فعالیت آنزیم پروتئاز در بافت روده میانی لاروهای شاهد ۸/۱۶ (میکرومول/دقیقه/میلی گرم پروتئین) است ولی در تمام تیمارهای تنش گرسنگی میزان این فعالیت تقریباً دو برابر شده است (جدول ۲). داده ها نشان می دهد که فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمارهای یک سوم مقدار نیاز غذایی بیشتر از تیمارهای دو سوم مقدار نیاز غذایی بود و بین خود این تیمارها نیز اختلاف معنی دار نبود ($P > 0.05$). به نظر می رسد فعالیت تقریباً دو برابری فعالیت پروتئاز در راستای تامین پروتئین مورد نیاز برای پبله تنی در لاروهای کرم ابریشم باشد.

ترکیب شیمیایی برگ توت اگر چه متاثر از عوامل محیطی و محل آن روی شاخه است، با وجود این وابسته های اصلاح شده دارای مقدار پروتئین زیاد و فیبر کم نسبت به گیاهان علفی (Vu et al., 2011) بوده و برگ توت مصرفی کرم بالغ بین ۲۴ تا ۲۷ درصد پروتئین خام دارد (Ito and Kobayashi, 1978). از طرف دیگر غدد ابریشمی لارو کرم ابریشم از روز سوم سن پنجم رشد فزاینده ای داشته و طی ۲ تا سه روز قسمت اعظم حفره بطنی را اشغال می کند. با توجه به اینکه محتویات غدد ابریشمی پروتئینی است، لذا برای این حجم پروتئین سازی لازم است پروتئازها که عمل هیدرولیز پروتئین برگ توت را برعهده دارند فعالیت بیشتری داشته باشند تا بتوانند پروتئین های مورد نیاز برای تولید ابریشم (فیبروئین و سریسین) را تأمین نمایند.

رشد در لارو سن آخر حشرات متعلق به راسته پروانگان چهار مرحله دارد که شامل آماده سازی (دو روز اول)، انباشته سازی (روز سوم تا پنجم)، پسرفت (روز ششم) و مرحله تحلیل (شروع پبله تنی به بعد) است. در مرحله اول

جدول ۲- میانگین فعالیت آنزیم‌های گوارشی در تیمارهای مختلف کرم ابریشم بر حسب میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین
Table 2. Mean of digestive enzymes activity in different treatments of silkworm by $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein

Treatments	Protease	α -Amylase	Lipase
T ₁	8.16 ^d	101 ^c	23 ^d
T ₂	16.49 ^{ab}	211.7 ^b	47.8 ^c
T ₃	15.76 ^{bc}	408.3 ^a	47.1 ^c
T ₄	16.77 ^a	130 ^c	55.1 ^b
T ₅	14.37 ^c	112.7 ^c	65.5 ^a

a-e: Means in each column with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$)

T₁: Control, T₂: 1/3, from 4th instar, T₃: 2/3, from 4th instar, T₄: 1/3, from 5th instar, T₅: 2/3, from 5th instar

(Ito and Kobayashi, 1978) که نسبت به پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها خیلی کمتر است.

صفات اقتصادی

۱. وزن پيله تر، وزن قشر ابریشمی و درصد قشر پيله: در جدول ۳ مقادیر صفات مرتبط با پيله ارایه شده است. مقایسه تیمارها نشان می‌دهد که بیشترین وزن پيله تر با تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها متعلق به تیمار شاهد بوده و پس از آن به ترتیب تیمارهای دو سوم نیاز غذایی شروع از سن ۴ هستند که خود تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند و در رتبه‌های بعدی هم تیمارهای یک سوم نیاز غذایی شروع از سن ۵ و یک سوم نیاز غذایی شروع از سن ۴ که اینها نیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند قرار می‌گیرند (جدول ۳). بیشترین وزن قشر پيله مربوط به تیمار ۵ بود که محدودیت غذایی کمتری داشت، هرچند که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت. در صفت درصد قشر پيله نیز کمترین درصد قشر پيله را تیمار شاهد دارا بود که نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان داد. در این صفت هیچ یک از تیمارها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند اگرچه مقادیر تیمارهای ۲ و ۴ بیشتر از ۳ و ۵ بود.

۲. طول دوره لاروی:

کاهش مقدار خوراک مصرفی در تمام تیمارها سبب طولانی شدن طول دوره لاروی از ۴/۴ روز تا ۸/۴ روز شد. مقایسه بین ۴ تیمار محدودیت غذایی نشان می‌دهد (جدول ۳) که تیمارهایی که کمترین غذا را مصرف کرده‌اند (یک سوم مقدار جداول غذایی) طول دوره لاروی آنها افزایش بیشتری یافته است. بیشترین افزایش طول دوره لاروی را تیمار یک سوم مقدار نیاز غذایی با شروع محدودیت از سن ۴ با ۸/۴ روز دارا بود. طول دوره لاروی

سن پنجم انجام شده و لاروها تنها سه روز محدودیت غذایی داشته‌اند. گزارش شده که فعالیت این آنزیم که سبب هضم پلی‌ساکاریدها و تبدیل آن به دی و تری ساکاریدها در روده میانی لارو می‌شود در نژادهای بدون دیاپوز مناطق گرمسیری بیشتر و گسترده‌تر از نژادهای دیاپوزدار مناطق معتدله است (Abraham *et al.*, 1992). بررسی‌های گذشته نشان داده است که فعالیت آلفا-آمیلاز با صفات اقتصادی کرم ابریشم نظیر وزن لارو، وزن پيله، وزن قشر پيله و طول دوره لاروی مرتبط است (Chatterjee *et al.*, 1992). آمیلاز داخل همولنف نیز شناسایی شده است که عمل آن به خوبی شناخته نشده است (Abraham *et al.*, 1992).

۵. آنزیم لیپاز

جدول ۲ نشان می‌دهد که محدودیت غذایی در تمام تیمارها سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیپاز شد. با مقایسه داده‌ها معلوم می‌شود فعالیت این آنزیم در تیمارهایی که از سن چهارم شروع شده است (تیمارهای ۲ و ۳) تقریباً دو برابر شاهد و در تیمارهایی که از سن پنجم شروع می‌شود (تیمارهای ۴ و ۵) این فعالیت بیش از دو برابر بوده به طوریکه تفاوت این دو گروه نیز معنی‌داری بود. در مقایسه بین فعالیت انواع آنزیم‌ها فعالیت آنزیم‌های گوارشی لیپاز و پروتئاز در تمامی تیمارها بیشتر از تیمار شاهد بود که این امر می‌تواند اهمیت بیشتر هضم چربی‌ها و پروتئین‌ها را برای این موجود در شرایط تنش نشان دهد. تحقیق چندانی در خصوص فعالیت آنزیم لیپاز کرم ابریشم تاکنون گزارش نشده است و تنها (Ponnuvel *et al.*, 2003) به دلیل ارتباط لیپاز با یک پروتئین مرتبط با ایمنی کرم ابریشم در برابر عفونت‌های ویروسی این آنزیم را مورد بررسی قرار داد. البته لازم به ذکر است که مقدار چربی خام ماده خشک برگ توت مصرفی نیز حدود ۳ درصد است

جدول ۳- میانگین برخی صفات اقتصادی مهم کرم ابریشم در شاهد و تیمارهای آزمایشی

Table 3. Mean of some important economic characters of silkworm in control and treatments groups

Treatments	Cocoon Weight (gr)	Cocoon Shell Weight (gr)	Pupa Weight (gr)	Cocoon Shell Ratio (%)	Larval Duration (Day)
T ₁	1.99 ^a	0.52 ^a	1.46 ^a	26.2 ^b	26.7 ^d
T ₂	1.77 ^d	0.53 ^a	1.23 ^d	30.2 ^a	35.1 ^d
T ₃	1.8 ^{bc}	0.53 ^a	1.27 ^{bc}	29.4 ^a	32.5 ^{bc}
T ₄	1.78 ^{cd}	0.54 ^a	1.24 ^{cd}	30.2 ^a	34.6 ^{ab}
T ₅	1.82 ^b	0.54 ^a	1.28 ^b	29.8 ^a	31.1 ^c

a-e: Means in each column with the same letter are not significantly different by Duncan test ($P < 0.05$)T₁: Control, T₂: 1/3, from 4th instar, T₃: 2/3, from 4th instar, T₄: 1/3, from 5th instar, T₅: 2/3, from 5th instar

قابلیت هضم اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که قابلیت هضم برگ توت در کرم ابریشم تحت تاثیر محدودیت غذایی شدید و طولانی مدت (تنش شدید گرسنگی) قرار می‌گیرد. تنش گرسنگی در ابتدا ممکن است تاثیری بر قابلیت هضم نداشته (تیمارهای ۲ و ۳ مربوط به سن ۴) و یا سبب کاهش قابلیت هضم شود (تیمارهای ۴ و ۵، داده های روز سوم از سن پنجم)، اما با ادامه تنش و عادت‌پذیری نسبت به گرسنگی، لاروها به منظور بقا و تامین نیازهای خود، قابلیت هضم را افزایش داده تا حداکثر مواد مغذی به بدن برسد. همچنین تغییرات هرسه آنزیم گوارشی نیز برای نخستین بار در کرم ابریشم اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که طولانی شدن تنش سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز می‌شود. شاید افزایش فعالیت در جهت استفاده حداکثری از منابع غذایی باشد تا بتواند با غذای کمتر انرژی مورد نیاز خود را تامین نموده، بعلاوه ذخیره کافی پروتئین برای ساخت پیله که از پروتئین ابریشم است را داشته باشد. پروتئین بودن ابریشم سبب اهمیت بیشتر متابولیسم پروتئین در لارو کرم ابریشم می‌شود و لذا در شرایط محدودیت غذایی اهمیت پروتئاز دوچندان شده و بروز آن در سلول‌های روده لاروها افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت محترم شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم شعبه نطنز به دلیل همکاری در پرورش کرم ابریشم و از سرکار خانم محبوبه شریفی دانشجوی دکتری دانشگاه گیلان به‌خاطر همکاری در اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

به عنوان یک صفت مهم اقتصادی تحت تاثیر شرایط محیطی و مقدار و دفعات تغذیه است (حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۸۷).

در تحقیق حاضر که بررسی محدودیت شدید غذایی (یک سوم مقادیر جداول غذایی) بود، این تاثیر نیز بیشتر بوده، سبب کاهش بیشتر صفات اقتصادی پیله و افزایش بیشتر طول دوره لاروی شد. نتایج نشان داد که محدودیت کمی تغذیه عوارض بسیار شدیدتری نسبت به محدودیت زمانی (سن شروع محدودیت) روی لاروهای کرم ابریشم می‌گذارد. مقایسه تیمار محدودیت شدید (یک سوم غذای شاهد) با محدودیت ملایم (دو سوم غذای شاهد) نشان داد که هنگام اعمال تنش شدید گرسنگی در سنین چهارم و پنجم لاروی، قابلیت هضم کاهش یافت، ولی با ادامه محدودیت، قابلیت هضم برگ توت مصرفی افزایش یافته و حتی بالاتر از لاروهای شاهد شد. در این شرایط، فعالیت آنزیم‌های اصلی گوارشی لاروها به‌طور چشمگیری افزایش یافت که شاید یکی از دلایل بالا رفتن قابلیت هضم نیز همین مورد باشد. طول دوره لاروی نیز بیشترین تاثیر را از محدودیت کمی غذا پذیرفت و آنقدر طول دوره لاروی افزایش یافت تا لاروهای سن پنجم بتوانند ذخیره کافی پروتئین برای تولید فیبروئین و سریسین مورد نیاز برای تولید ابریشم و پیله تنی را تامین نمایند. لذا به این دلیل وزن قشر ابریشمی تحت تاثیر محدودیت غذایی قرار نگرفت. بنابراین در شرایط محدودیت شدید غذایی، لارو کرم ابریشم با انطباق با شرایط موجود ادامه حیات داده و پیله تولید می‌نماید.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق که در ادامه پژوهش‌های قبلی انجام شد اثر گرسنگی شدید غذایی بر شاخص مهم تغذیه‌ای

فهرست منابع

- حسینی مقدم س. ح. ۱۳۸۴. اصول پرورش کرم ابریشم. انتشارات دانشگاه گیلان.
- حسینی مقدم س. ح.، اعتباری ک.، و میرحسینی س. ض. ۱۳۸۵. بررسی اثرات دفعات تغذیه روی صفات تولیدی و تغذیه‌ای کرم ابریشم. علوم کشاورزی ایران، ۳۷: ۲۲-۲۸.
- حسینی مقدم س. ح.، میرحسینی س. ض.، غنی پور م.، صیداوی ع. و بیژن نیا ع. ۱۳۸۷. تاثیر سال، فصل و سطح تغذیه بر عملکرد هیبریدهای کرم ابریشم. مجله پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه)، ۳۱: ۷۵-۹۰.
- حسینی مقدم س. ح.، میرحسینی س. ض.، غنی پور م. و صیداوی ع. ۱۳۹۰. بررسی برخی از شاخص‌های تغذیه‌ای هیبریدهای تجارتي کرم ابریشم در پنج سن لاروی. پژوهش‌های علوم دامی ایران، ۳: ۳۱۱-۳۲۳.
- حسینی مقدم س. ح.، میرحسینی س. ض.، غنی پور م.، صیداوی ع. و بیژن نیا ع. ۱۳۹۰. تاثیر سطوح مختلف مصرف برگ بر پارامترهای تغذیه‌ای چند آمیخته کرم ابریشم. دانش و پژوهش علوم دامی، ۸: ۶۶-۷۷.
- Abraham E. G., Nagaraju J. and Datta R. K. 1992. Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombyx mori* L.: comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 22: 867-873.
- Bernfeld P. 1955. Amylase, α and β . *Methods in Enzymology*, 1: 149-151.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chapman R. F. 1998. *The insects: Structure and function* (4thed.). Cambridge University Press.
- Chatterjee S. N., Rao C. G. P., Chatterjee G. K. and Ashwath S. K. 1992. Genetic variability of amylase activity in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. and its significance. *Sericologia*, 32: 671-683.
- Garcia-Carreno F. L. and Haard N. 1993. Characterization of protease classes in *Langostilla (Pleuroncodes planipes)* and crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17: 97-113.
- Gholamzadeh Chitgar M., Ghadamyari M. and Sharifi M. 2013. Identification and characterisation of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). *Plant Protection Sciences*, 49 (1): 19-26.
- Horie Y. and Watanabe K. 1983. Effect of various kinds of dietary protein and supplementation with limiting amino acids on growth, haemolymph components and uric acid excretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 29: 187-199.
- Ito T. 1978. *The Silkworm an Important Laboratory Tools*(Ed.), *Silkworm Nutrition* (pp. 121-157). Tokyo: Kodansha LTD.
- Ito T. and Kobayashi M. 1978. *The Silkworm: an important laboratory tool* (Ed.), *Rearing of the silkworm* (pp. 83-102). Tokyo: Kodansha LTD.
- Jadav G. and Kallapur V. L. 1988. Influence of age, sex and feeding on protease activity of certain tissues of fifth instar silkworm, *Bombyx mori*. *Entomon*, 13: 289-293.
- Kfir R., Overholt W. A., Khan Z. R. and Polaszek A. 2002. Biology and management of economically important lepidopteran cereal stem borers in Africa. *Annual Review Entomology*, 47: 701-731.
- Lindroth R. L. 1993. Insect food conversion efficiencies. *The Food Insects Newsletter*, 6(1) from <http://www.food-insects.com>.
- Lokesh G., Ananthanarayana S. R. and Yogananda Murthy V. N. 2012. Changes in the activity of digestive enzymes in response to chemical mutagen diethyl sulfate in the silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Asian Journal of Applied Sciences*, 5: 431-437.
- Mahesha J. and Kalpana G. V. 2013. Biochemical studies on the total midgut protease activity and total midgut protein in different bivoltine silkworm breeds of *Bombyx mori* L. *Advanced Biotechnology*, 12: 08-11.
- Manjula S., Sabhanayakam S., Mathivanan V. and Saravanan N. 2011. Studies on the nutritional supplement of mulberry leaves with Cowpeas (*Vigna unguiculata*) to the silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) upon the activities of midgut digestive enzymes. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 1:157-162.
- Mathur V. B., Rahmathulla V. K. and Vijaya Bhaskar O. 2002. Consumption and conversion efficiency of food in new elite bivoltine hybrid silkworm, *Bombyx mori* L. under restricted feeding levels. *International Journal of Industrial Entomology*, 5: 213-216.
- Muniv Y. S. and Bhawane G. P. 2012. Comparative study on the characteristics of midgut protease in different multivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L. *Biological Forum*, 4: 75-78.
- Ponnuvel K. M., Nakazawa H., Furukawa S., Asaoka A., Ishibashi J., Tanaka H. and Yamakawa M. 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 77: 10725-10729.

- Rahmathulla V. K. and Suresh H. M. 2012. Seasonal variation in food consumption, assimilation, and conversion efficiency of Indian bivoltine hybrid silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Science, 12: 82, available online: insectscience.org/12.82.
- Vithalrao K. and Sucheta D. 2012. Protein contents and activity of enzymes in the mid gut homogenate of fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori* L. (Race: PM x CSR2) fed with herbal drug (Kho-go) treated mulberry leaves. Research Journal of Recent Sciences, 1: 49-55.
- Vu C. C. Verstegen M. W. A., Hendriks W. H. and Pham K. T. 2011. The Nutritive value of mulberry leaves (*Morus Alba*) and partial replacement of cotton seed in rations on the performance of growing Vietnamese cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24: 1233-1242.

Effect of feed restriction on digestibility, digestive enzymes and economic traits of silkworm

S. H. Hosseini Moghaddam^{1*}, D. Azidehak², M. Ghadamyari³, A. A. Gheisari⁴

1. Assistant Professor, Animal Sciences Department and Sericulture Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan
- 2 Msc. in Animal Nutrition, Animal Sciences Department, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch
3. Associate Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan
- 4- Assistant Professor, Animal Sciences department, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch

(Received: 8-6-2013- Accepted: 30-11-2013)

Abstract

Effect of feed restriction on important economic traits, digestive enzymes and digestibility of mulberry leaves was studied in the 1650 forth instar of silkworm larvae. After mass-reared of first three larval instars, 15 trays of 4th instar of silkworms were reared separately including four treatment plus control (T₁). Dietary restriction treatments were one-third (T₂) and two-third(T₃) of feed requirements starting from fourth and one-third (T₃) and two-third(T₄) starting from fifth larval instar. Digestibility of mulberry leaves was measured in each instar separately. Protease, lipase and α -amylase activities were determined on 4th day of 5th instar in 10 silkworm larvae. The results showed the activity of enzymes protease, lipase and amylase in T₂ were 16.49, 47.8 and 211.7 and in T₃: 15.76, 47.1 and 408.3, which were all more than T₁: 8.16, 23 and 101 μ M/min/mg respectively ($P<0.05$). The activity of enzymes protease and lipase in T₄ were 16.77 and 55.1 and in T₃: 14.37 and 65.5 μ M/min/mg that was more than control ($P<0.05$). Digestibility of dry matter intake in T₂ and T₄ were 48.26 and 41.29%, which were more than T₁: 39.85% significantly ($P<0.05$). Due to food restriction treatments the weight of wet cocoons and the weight of pupae decreased but cocoon shell weight did not change significantly ($P<0.05$). These results indicated that whenever the mulberry leaves feeding is restricted; while the larval duration increases, the activity of digestive enzymes could increase to digest most of feed effectively and produce the required silk protein for cocooning.

Key words: Amylase, Digestive enzymes, Feed restriction, Lipase, Protease, Silkworm

*Corresponding author: hosseini@guilan.ac.ir