

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی

تاثیر نمکهای فلزات سنگین (مس، روی و آهن) بر سامانه ایمنی سلولی و
شاخص تغذیه بید آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep:Pyralidae)

نگارنده: بیژن آهنگی رشتی

استاد راهنما

دکتر مریم عجم حسنی

شهریور ۱۴۰۰

ماحصل آموختہ ہایم را تقدیم میکنم بہ

استوارترین تکیہ گاہم

پدر عزیزتر از جانم...

شکرشایان نثار ایزدمنان که توفیق را رفیق را هم ساخت تا این
پایان نامه را به پایان برسانم...

از استاد کرامت‌مردم سرکار خانم دکتر مریم عجم حسنی که همواره بنده را مورد
لطف، محبت و راهنمایی خود قرار داده‌اند، کمال تشکر را دارم...

از زحمات بی دریغ و راهنمایی‌های ارزشمند اساتید ارجمند گروه گیاه پزشکی

جناب آقای دکتر علی درخشان شادمهری و جناب آقای دکتر مسعود

حکیمی تبار طی دو مقطع کارشناسی و کارشناسی ارشد سپاسگزارم...

تعمدنامه

اینجانب بیژن آهنگی رشتی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته حشره‌شناسی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه تاثیر نمک‌های فلزات سنگین (مس، روی و آهن) بر سامانه ایمنی سلولی و شاخص تغذیه بید آرد (*Ephestia kuehniella* Zeller (Lep:Pyrilidae) تحت راهنمایی دکتر مریم عجم‌حسینی متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

بخش مهمی از آلودگی‌های محیط زیست مربوط به تاثیرات فلزات سنگین است که عواملی همچون فرسایش، آتشفشان‌ها و آب چشمه‌ها، فعالیت‌های انسانی نظیر استفاده از سوخت‌های فسیلی و کشاورزی و استخراج از معادن باعث تجمع این دسته از فلزات در خاک و سمیت برای گیاهان، جانوران و جوامع انسانی می‌شود. در تحقیق حاضر، تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر فراوانی هموسیت‌ها، شاخص تغذیه و خصوصیات زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) در شرایط آزمایشگاهی (دمای 25 ± 3 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 40 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۴:۱۰ ساعت (تاریکی : روشنایی) مورد بررسی قرار گرفت. لاروهای سن چهارم این آفت انباری، با نمک فلزات آهن، روی و مس در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. نتایج ایمنی شناسی نشان داد که در تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز اختلاف معناداری در سطح احتمال ۱٪ با شاهد وجود دارد. نمک فلز آهن در غلظت‌های ۲۵ در هر دو بازه زمانی و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از ۲۴ ساعت سبب کاهش و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث افزایش معنادار تعداد کل سلول‌ها نسبت به شاهد شد. نمک فلزات مس و روی در تمامی غلظت‌ها سبب افزایش تعداد کل سلول‌ها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به شاهد شدند. نمک فلز آهن در تمامی غلظت‌ها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، مس در غلظت ۲۵ پس از گذشت ۲۴ ساعت و روی در غلظت ۵۰ پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت سبب کاهش معنی دار پلاسموتوسیت‌ها نسبت به شاهد شدند. آهن در تمام غلظت‌ها و در همه زمانها بیشترین تاثیر را در افزایش گرانولوسیت‌ها نسبت به سایر تیمارها نشان داد. در اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز، نمک فلز آهن و روی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بالاترین تاثیر را در افزایش فعالیت آنزیم نشان دادند در حالیکه آهن با غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب کاهش معنی دار فعالیت این آنزیم پس از گذشت ۲۴ ساعت نسبت به سایر تیمارها شد. در مبحث شاخص‌های تغذیه،

نمک فلز مس در غلظت ۲۵ میلی گرم/کیلوگرم سبب افزایش در نرخ رشد نسبی نسبت به شاهد گردید. در ارزیابی شاخص نرخ مصرف نسبی غذا و شاخص بازدهی غذای بلعیده شده، در هیچ یک از غلظت‌های نمک فلزات آهن و روی و مس، تفاوت معناداری نسبت به شاهد مشاهده نشد. شاخص بازدارندگی تغذیه در بین همه تیمارها تفاوت معنی داری داشتند. نمک فلزات فوق بر ویژگی‌های زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد موثر بودند. به طوری که مس و روی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم بیشترین تاثیر را بر افزایش طول دوره لاروی و کاهش درصد خروج حشرات کامل و مس در غلظت ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم بیشترین تاثیر را بر افزایش طول دوره شفیرگی و کاهش وزن شفیره داشتند. هیچ یک از فلزات، تاثیر معناداری بر طول عمر حشرات کامل نداشتند. تحقیق حاضر نشان داد که فلزات سنگین بر ویژگی‌های زیستی و ایمنی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، بسیار تاثیر گذارند.

واژگان کلیدی: ایمنی سلولی، شاخص تغذیه، خصوصیات زیستی، فلزات سنگین، شب‌پره مدیترانه‌ای

آرد، *Ephestia kuehniella*

فهرست

فصل ۱ مقدمه و کلیات.....	۱
فصل ۲ بررسی منابع.....	۵
۱-۲- غلات	۶
۲-۲- آفات انباری.....	۶
۱-۲-۲- روش‌های کنترل آفات انباری.....	۷
۳-۲- ایمنی در حشرات.....	۹
۱-۳-۲- ایمنی غیر اختصاصی	۹
۲-۳-۲- ایمنی اختصاصی	۹
۱-۲-۳-۲- اجسام چربی.....	۱۰
۲-۲-۳-۲- ایمنی سلولی	۱۱
۱-۲-۳-۲- آنزیم فنل اکسیداز	۱۱
۳-۲-۳-۲- ایمنی هیومرال	۱۲
۴-۲- فلزات سنگین	۱۳
۱-۴-۲- روی (Zn)	۱۴
۲-۴-۲- مس (Cu)	۱۶
۳-۴-۲- آهن (Fe)	۱۶
۴-۴-۲- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیرات فلزات سنگین بر حشرات	۱۷
۵-۲- شاخص‌های تغذیه	۲۲
۱-۵-۲- مطالعات انجام شده در زمینه شاخص‌های تغذیه	۲۲
فصل ۳ مواد و روش‌ها.....	۲۵
۱-۳- پرورش و تهیه کلنی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد	۲۶
۲-۳- تهیه غلظت‌های نمک فلزات سنگین آهن، مس و روی	۲۶
۳-۳- بررسی تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، مس و روی تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد.....	۲۶
۴-۳- تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز	۲۸
۵-۳- بررسی شاخص‌های تغذیه‌ای لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس	۲۹
۶-۳- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر خصوصیات زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد.....	۳۰

فصل ۴ نتایج و بحث	۳۱
۴-۱-ایمنی سلولی.....	۳۲
۴-۱-۱-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر تعداد کل سلول های خونی (Total Hemocyte Count).....	۳۲
۴-۱-۲-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر تعداد پلاسموتوسیت ها.....	۳۵
۴-۱-۳-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر میانگین تعداد گرانولوسیت ها.....	۳۷
۴-۱-۴-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز (Phenol Oxidase).....	۳۹
۴-۲-ارزیابی شاخص های تغذیه	۴۲
۴-۲-۱-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس روی بر رشد نسبی (Relative Growth Rate).....	۴۲
۴-۲-۲-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر نرخ مصرف نسبی غذا (Relative Consumption Rate).....	۴۴
۴-۲-۳-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (Efficacy of Conversion Of Ingested Food).....	۴۵
۴-۲-۴-تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر شاخص بازدارندگی تغذیه (Feeding Deterrent Index).....	۴۶
۴-۳-تاثیر غلظت های مختلف نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر روی مراحل مختلف زیستی شب پره مدیترانه ای آرد	۴۷
۴-۳-۱-تاثیر غلظت های مختلف نمک فلزات سنگین بر طول دوره لاروی	۴۷
۴-۳-۲-تاثیر غلظت های مختلف نمک فلزات سنگین بر طول دوره شفیرگی	۴۹
۴-۳-۳-تاثیر غلظت های مختلف نمک فلزات سنگین بر وزن شفیره	۵۰
۴-۳-۴-تاثیر غلظت های مختلف نمک فلزات سنگین بر درصد خروج حشرات کامل	۵۲
۴-۳-۵-تاثیر غلظت های مختلف نمک فلزات سنگین بر طول عمر حشرات کامل	۵۳
۴-۴-نتیجه گیری کلی	۵۴
منابع	۵۵

فهرست شکل‌ها

- شکل ۳-۱- (الف) آماده سازی تیمارها - (ب) قرار دادن پلیت‌های تیمار و شاهد در ژرمیناتور ۲۷
- شکل ۳-۲- (الف) جمع آوری همولنف با میکروپیپت از لارو سن ۴ شب‌پره مدیترانه‌ای آرد - (ب) قرار دادن همولنف مخلوط شده با محلول تایسون بر لام نئوبار به منظور شمارش سلول‌های خونی ۲۸
- شکل ۳-۳- (الف) تجمیع همولنف ۴۰ لارو سن ۴ شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در میکروتیوب - (ب) قرار دادن میکروتیوب‌ها در سانتیفریوژ - (ج) قرار دادن مایع حاصل از سانتیفریوژ در پلیت ۹۶ خانه جهت خواندن طول موج توسط دستگاه Elisa reader (ELx800) ۲۹
- شکل ۴-۱- میانگین تعداد کل سلول‌های خونی لارو سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ۳۲
- شکل ۴-۲- میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌های لارو سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ۳۵
- شکل ۴-۳- میانگین گرانولوسیت‌های لارو سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ۳۷
- شکل ۴-۴- میانگین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز لارو سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ۳۹
- شکل ۴-۵- نرخ رشد نسبی (RGR) لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* ۴۲
- شکل ۴-۶- نرخ مصرف نسبی غذا (RCR) لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* ۴۴
- شکل ۴-۷- شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (ECI) لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* .. ۴۵
- شکل ۴-۸- شاخص بازدارندگی تغذیه (FDI) لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* ۴۶
- شکل ۴-۹- میانگین طول دوره لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی ۴۷
- شکل ۴-۱۰- میانگین طول دوره شفیرگی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی ۴۹
- شکل ۴-۱۱- میانگین وزن شفیره شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی ۵۰
- شکل ۴-۱۲- میانگین درصد خروج حشرات کامل شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی ۵۲
- شکل ۴-۱۳- میانگین طول عمر حشرات کامل شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی ۵۳

فصل ۱

مقدمه و کلیات

از جمله عواملی که در پیشرفت جوامع بشری نقش مهمی دارد، توانایی انسان در استخراج فلزات است (Baghban *et al.*, 2018). با این که فلزات دامنه استفاده وسیعی دارند اما استفاده از آن‌ها هزینه‌های بسیاری به محیط زیست وارد می‌کند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ورود فلزات سنگین از طرق مختلف به طبیعت اشاره کرد (Han *et al.*, 2002). بخش مهمی از آلودگی‌های محیط زیست مربوط به تأثیرات فلزات سنگین است که باعث شده سلامت جوامع انسانی (Duruibe *et al.*, 2007) و موجودات خشکی‌زی و آبی به خطر بیافتد (Sanchez, 2008). به غیر از مناطق در معرض منابع آلودگی، مقدار فلزات سنگین در سایر مناطق کم است اما آنچه که در مبحث ورود فلزات سنگین به طبیعت حائز اهمیت است، تجمع و ماندگاری طولانی مدت این فلزات در محیط زیست و سمیت و اثری است که بر روی اکوسیستم دارد (Malakar *et al.*, 2009). ثابت شده است در بعضی از حشرات گیاه‌خوار، فلزات سنگینی مانند روی، مس و کادمیوم تجمع یافته‌اند (Lindqvist, 1992). تأثیرات مستقیم منفی فلزات سنگین روی موجودات زنده به طور کلی وابسته به غلظت است که بر فرآیندهای زیستی موجودات اثر گذاشته و در مواردی منجر به مرگ و میر می‌شود. در کنار تأثیرات سوء فلزات سنگین، برخی از فلزات و عناصر غذایی کم مصرف مانند روی، مس و آهن از جمله فلزات ضروری برای بدن محسوب می‌شوند؛ به این معنا که بدن موجودات زنده برای فرآیندهای زیستی مختلف مانند رشد و نمو و سوخت و ساز به این یون‌های فلزی نیازمند است اما مقادیر بالای این فلزات هم موجب مسمومیت می‌شود (Van Ooik *et al.*, 2007). همچنین فلزاتی مانند سرب، کادمیوم و جیوه جزء فلزات غیرضروری شناخته می‌شوند که حتی مقادیر پایین آن‌ها نیز موجب ایجاد مسمومیت در موجودات زنده می‌شود (Emre *et al.*, 2013). بر اساس گزارش‌ها، فلزات سنگین اثراتی بارز روی نرخ رشد (Warington, 1987) و مرگ و میر حشرات (Mitterbock and Fuhrer, 1988) و فیزیولوژی آن‌ها (Ilijin *et al.*, 2009; Baghban *et al.*, 2014) دارند.

عوامل موثر بر رشد و تولیدمثل مبنای بیشتر پژوهش‌های انجام گرفته طی سالیان گذشته بر روی حشرات بوده است. اگر فلزات می‌توانند بر روی رشد حشره تأثیر بگذارند، پس قادرند روی سامانه‌های

دیگر حشرات همچون سامانه ایمنی آنزیم‌های سم زدا مانند گلوکاتایون اس ترانسفرازها و رفتار تغذیه‌ای حشرات نیز اثر گذار باشند. (Sun et al., 2008).

غالب پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه ایمنی در برابر آلودگی فلزات سنگین بیشتر معطوف به بی‌مهرگانی همچون دوکفه‌ای‌ها، حلزون‌ها و خرچنگ‌ها بوده است و در زمینه تغذیه آفات از مواد غذایی آلوده به فلزات سنگین و چگونگی پاسخ فیزیولوژیک حشره نیز تحقیقاتی صورت گرفته است (نقل از Van Ooik et al., 2007).

آفات انباری یکی از مشکلات اساسی در انبارداری محصولات کشاورزی هستند که پس از برداشت تا زمان مصرف خسارت ایجاد می‌کنند و خسارت حاصله باعث تغییر ترکیبات شیمیایی، رنگ و مزه محصول شده در نتیجه نه تنها ارزش تجاری و مرغوبیت آن به شدت کاهش می‌یابد بلکه گاهی مشکلات بهداشتی قابل توجهی را نیز برای مصرف‌کنندگان اعم از انسان، دام و طیور به بار می‌آورند (Shabani-nejad et al., 2016).

شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* یکی از آفات مهمی است که سالانه خسارت زیادی را به محصولات کشاورزی انباری وارد می‌کند و پراکنش جهانی دارد (مستقیمی و همکاران، ۱۳۹۱). لاروهای این آفت در درجه اول غلات آرد شده را ترجیح داده به طوری که آرد و سبوس، غذای اصلی آن‌ها را تشکیل می‌دهند ولی به دلیل چندین خوار بودن این گونه، دانه‌های غلاتی مانند گندم، ذرت، برنج و میوه‌های خشک نظیر کشمش، انجیر، زردآلو و حتی قارچ تازه و خشک شده نیز مورد تغذیه لاروها قرار می‌گیرند (مهرخو و ترلک، ۱۳۹۴). شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در اغلب مناطق ایران در سیلوها و انبارهای آرد دیده می‌شود (مستقیمی و همکاران، ۱۳۹۱).

با توجه به افزایش روزافزون آلودگی‌های زیست محیطی و تجمع مواد آلاینده در خاک و گیاه، تاثیر جانبی آن در حشرات قابل توجه خواهد بود؛ در این تحقیق سعی شده است تاثیرات جانبی این مواد بر سامانه ایمنی و شاخص‌های تغذیه‌ای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مورد بررسی قرار گیرد.

بنابراین اهدافی که در این تحقیق دنبال شده است عبارتند از:

۱- بررسی تاثیر روی، آهن و مس بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

۲- بررسی تاثیر فلزات فوق بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

۳- بررسی تاثیر فلزات فوق بر شاخص‌های تغذیه آفت

۴- بررسی تاثیر فلزات فوق بر خصوصیات زیستی آفت

فصل ۲

بررسی منابع

۲-۱- غلات

بیش از ۷۰ درصد انرژی دو سوم مردم جهان از غلات که به عنوان پرمصرف‌ترین و قدیمی‌ترین گیاهان زراعی محسوب می‌شوند، تامین می‌گردد. عمده روش مصرف غلات در جهان به صورت نان و فرآورده‌های آردی است (سیدی کهنه شهری، ۱۳۹۴). در بین دانه‌های غلات، گندم از اهمیت بالایی برخوردار بوده و محصولی جهانی می‌باشد. بیش از ۱۷ درصد کل زمین‌های زراعی جهان، به کشت گندم اختصاص دارد (رجب‌زاده، ۱۳۹۳).

سالانه بخش عمده‌ای از گندم تولیدی در سیلوهای غلات و انبارها ذخیره می‌شود تا نیاز مردم را در تمام طول سال تامین نمایند. از این رو، گندم و آرد از گزند حشرات آفت مصون نبوده و و دارای آفات مختلفی می‌باشند که از مهمترین آن‌ها می‌توان به آفات انباری اشاره کرد (Shabani-nejad *et al.*, 2016).

۲-۲- آفات انباری

عدم رعایت اصول بهداشتی در انبارداری، موجب شده است که حشرات زیان‌آور انباری در تمام نقاط دنیا، سالانه میلیون‌ها تن خسارت (۱۰ تا ۱۵ درصد کل تولید دانه‌های انباری) به محصولات و فرآورده‌های انباری وارد کنند. این دسته از آفات با وارد کردن ضررهای کمی و بهداشتی به فرآورده‌های انباری، سبب خسارت‌های سنگینی می‌گردند (سیدی کهنه شهری، ۱۳۹۴). خسارت ناشی از آفات انباری در تمام کشورها یکسان نیست؛ به طوری که در کشورهای توسعه یافته ۹ درصد و در کشورهای در حال توسعه به ۲۰ درصد می‌رسد (Philips and Throne, 2009). حدود ۷۰ گونه بالپولکدار، ۳۵۵ گونه کنه و بیش از ۶۰۰ گونه سخت‌بالپوش، به محصولات گیاهی و حیوانی انباری حمله کرده و موجب زیان‌های کمی و کیفی می‌گردند (Rajendran and Sriranjini, 2008). خسارت کمی در انبارها به صورت کاهش در وزن محصول در اثر تغذیه حشره‌ی آفت نمایان می‌شود و هرچه تعداد حشرات بیشتر شود، این نوع از خسارت نیز بیشتر خواهد شد. نوع دیگری از خسارت به صورت کیفی است؛ به طوری که کیفیت محصول (حتی بدون خسارت کمی قابل توجه) کاهش می‌یابد و از

ارزش محصول کاسته می‌شود. کاهش ارزش غذایی محصولات انباری به دلیل تجمع بقایای حشرات و فضولات آن‌ها، از جمله زیان‌های کیفی است. همچنین در نوع دیگری از خسارت که به صورت بهداشتی است، سلامت مصرف کننده به علت وجود فضولات و بقایای آفت به خطر می‌افتد (پناهی اصل، ۱۳۹۵).

شب‌پره مدیترانه‌ای آرد (*Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) از جمله آفات مهم و زیان‌بار انباری است که در اغلب نقاط جهان باعث خسارت کمی و کیفی به محصولات انباری می‌باشد (مستقیمی و همکاران، ۱۳۹۱). این حشره دانه‌های شکسته را ترجیح داده و به ندرت به دانه‌های کامل حمله می‌کند. تغذیه لارو این آفت مخرب از آرد و سبوس به عنوان غذای اصلی و سایر دانه‌های غلات مانند ذرت، برنج و گندم و میوه‌های خشک مانند انجیر، کشمش، زردآلو و همچنین بیسکویت سبب خسارت بالای آن است (مهرخو و ترلک، ۱۳۹۴). آردهای آلوده به این آفت به دلیل وجود پوسته‌های لاروی فراوان، فضولات حاصل از تغذیه و تارهای تنیده شده توسط لاروها ارزش ناوایی خود را از دست می‌دهند و به دلیل افزایش رطوبت و تخمیر آرد، بوی نامطبوعی از آن‌ها به مشام می‌رسد (خداپرست، ۱۳۹۴). از شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به علت تغذیه لاروها از منابع غذایی مختلف، پرورش آسان و رشد و نمو در طیف وسیعی از رطوبت و دما، جهت پرورش دشمنان طبیعی مانند پارازیتوئیدها و شکارگرها در برنامه‌های کنترل بیولوژیک استفاده می‌شود (Xu et al., 2008). زنبورهای پارازیتوئید *HabroBracon hebetor* Say (Saber and Abedi, 2013) و جنس *Trichogramma* sp. (Yusuf et al., 2015) و شکارگرهایی مانند سن‌های جنس *Orius* sp. (Bonte et al., 2017) از جمله حشراتی هستند که می‌توان با استفاده از شب‌پره مدیترانه‌ای آرد پرورش داد.

۲-۱- روش‌های کنترل آفات انباری

آن چه که امروزه در کنترل آفات انباری اهمیت دارد، استفاده از روش‌های کم خطر و بی‌خطر برای سلامت انسان در کنترل این دسته از حشرات است. روش‌های انبارداری ضعیف و عدم رعایت اصول بهداشتی باعث شده است تا بسیاری از آفات انباری به محصولات و فرآورده‌های انباری حمله کرده و

خسارت قابل توجهی را به بار بیاورند. از جمله روش‌هایی که جهت کنترل آفات انباری استفاده می‌شود، می‌توان به استفاده از بیمارگرهای حشرات، تنظیم کننده‌های رشد، تله‌های فرومونی و امواج مایکروویو و یونیزان اشاره کرد. در کنار روش‌های بیان شده، تحقیقات نشان داده است که استفاده از ترکیبات گیاهی علاوه بر این که دارای اثرات دورکنندگی و بازدارندگی تخم‌ریزی در حشرات است، اثر سوء بر محیط زیست نداشته و ماندگاری آن‌ها بر روی غلات بسیار کمتر از آفت‌کش‌های مصنوعی بوده و ایمن‌تر و روشی مناسب جهت کنترل این دسته از آفات است. همچنین استفاده از دماهای پایین و تهویه مناسب، باعث تقویت روش‌های کنترل تلفیقی آفات انباری سخت‌بالپوش و بالپولکدار است (Upadhyay and Ahmad, 2011).

در کنترل آفات انباری همانند سایر آفات، پیشگیری از آلودگی مهم‌ترین اصل است. به همین منظور پیش از انبار کردن محصول جدید، باید بقایای محصول قبلی را از انبار خارج و در صورت لزوم انبار را با سموم مخصوص سم‌پاشی و تمیز نمود (باقری زنوز، ۱۳۸۶).

روش‌های معمول متعددی در کنترل آفات انباری استفاده می‌شود که می‌توان به کنترل فیزیولوژیکی شامل استفاده از ترکیباتی همچون هورمون جنسی، هورمون تنظیم کننده رشد و هورمون جوانی جهت ایجاد تغییر در متابولیسم آفت و کاهش زادآوری آن (باقری زنوز، ۱۳۸۶)، کنترل فیزیکی شامل استفاده از روش پرتوتابی (پرتوهایی مانند اشعه گاما، اشعه ایکس و الکترون‌های با انرژی بالا)، به کارگیری دماهای بالا و پایین و استفاده از مواد ساینده همچون گردهای سیلیکایی و خاک‌های دیاتومه جهت ایجاد تغییرات فیزیکی در محیط فعالیت آفت (Banks and Fields, 1995; Bakri et al., 2005) و کنترل بیولوژیک شامل استفاده از شکارگرها، بیمارگرها و پارازیتوئیدها جهت کنترل این آفات اشاره کرد (Subramanyam, 1995; Faroni et al., 2000; Sheeba et al., 2001).

از روش‌های جدید کنترل آفات انباری نیز می‌توان به استفاده از ادویه‌ها به صورت پودر در اختلاط با محصولات غذایی جهت دورکنندگی (Shayesteh and Ashouri, 2010)، استفاده از امواج صوتی و فراصوتی برای ایجاد اختلال در جفت‌گیری و تولیدمثل (Eriksson et al., 2012)، استفاده از سموم

گیاهی همچون استریکنین، روتنون، نیکوتین، پیرترین و نیم و جدیداً اسانس‌ها اشاره نمود (Miresmailli and Isman, 2014).

۲-۳- ایمنی در حشرات

۲-۳-۱- ایمنی غیر اختصاصی

حشرات در طول زندگی خود با تنش‌های متفاوتی رو به رو هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به شکار شدن توسط سایر جانداران و میزبانی برای پارازیتوئیدها اشاره کرد. لذا برای در امان ماندن از این عوامل، ویژگی‌ها و راهکارهای دفاعی خاصی در هر حشره با توجه به گونه وجود دارد که شامل واکنش‌های رفتاری، ترکیبات شیمیایی مترشحه از حشره، ساختارهای دفاع مورفولوژیکی و سیستم ایمنی می‌باشند (Lill and Marquis, 2003). به عنوان مثال دفاع شیمیایی شامل ترشح فرومون‌های خطر، تجزیه ترکیبات سمی و ترکیبات گیاه میزبان، ترکیبات شیمیایی کانتاریدین در سوسک‌های خانواده Meloidae و غیره، دفاع رفتاری شامل نیش زدن، فرار کردن و استتار کردن، دفاع مورفولوژیک شامل تغییر رنگ، استفاده از خارهای جلد و موهای حساسیت‌زا می‌باشد (عجم حسنی، ۱۳۹۱).

۲-۳-۲- ایمنی اختصاصی

شاخص مهم حساسیت میزبان به آلودگی، واکنش ایمنی حشرات است؛ به طوری که میزبان‌های مقاوم می‌توانند پیشرفت آلودگی را متوقف کنند (Ebrahimi and Ajamhassani, 2020). از جمله واکنش‌های ایمنی بدن حشرات که بعد از شناسایی عامل مهاجم و تشخیص خسارت وارده به غشای پایه صورت می‌گیرد، می‌توان به دفاع سلولی و دفاع هیومرال اشاره کرد (Lavine and Strand, 2002). دفاع سلولی سریع در حالی که دفاع هیومرال چند ساعت بعد از آلودگی رخ می‌دهد (Stanly and Miller, 2006). سلول‌های خونی که از مهم‌ترین بخش دفاع سلولی هستند، با بیگانه‌خواری، کپسوله کردن و گره‌زایی ایمنی سلولی را تنظیم می‌کنند. واکنش‌هایی که در دفاع سلولی رخ می‌دهد، سبب تغییراتی از نظر شکل و تعداد در سلول‌های خونی می‌گردد که این امر نشان دهنده مصرف

بالای انرژی در این واکنش‌ها می‌باشد. در همین راستا کاهش قطرات چربی و گلیکوژن با افزایش تعداد میتوکندری نشان دهنده این است که چربی و گلیکوژن منابع انرژی برای فعالیت‌های ایمنی هستند (Borges et al., 2008).

سیستم پروفنل اکسیداز، پروتئین‌های ضد باکتری و واسطه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن با فعالیت خود دفاع هیومرال حشره را شامل می‌شوند. اجسام چربی و سلول‌های خونی در دفاع هیومرال همچون دفاع سلولی حائز اهمیت هستند؛ چرا که به طور عمده منابع تولید کننده فنل اکسیداز و پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشند (Bulet et al., 1999). پروفنل اکسیداز به آلودگی‌های قارچی و ارگانسیم‌های پر سلولی واکنش نشان می‌دهد در صورتی که معمولاً واکنش به آلودگی باکتریایی به لیزوزیم مربوط می‌گردد. سکروپین‌ها، لیزوزیم‌ها و دیگر پروتئین‌ها موجب متلاشی شدن دیواره سلولی باکتری و تجزیه و رسوب کردن غشای آن می‌گردند (Freitak et al., 2007).

۲-۳-۱- اجسام چربی

مکان اصلی متابولیسم‌های واسطه حشرات، اجسام چربی لاروها است که کارکردی مشابه کبد در مهره‌داران دارد. لایه یا رشته‌هایی نازک، تشکیل دهنده اجسام چربی هستند که عموماً یک یا دو لایه سلول به صورت گره‌های کوچک در هموسل معلق بوده و در کل بدن حشره توزیع شده‌اند (Roma et al., 2010). اجسام چربی مسئول ساخت بیشتر پروتئین‌های همولنف بوده و منبع ذخیره پروتئین، لیپید و کربوهیدرات نیز می‌باشند. همچنین اجسام چربی بافت هدف همه‌هورمون‌های اصلی از جمله هورمون‌های عصبی، جوانی و اکدایزون (Keeley, 1985) بوده و مکان پاسخ به آلودگی میکروبی نیز می‌باشند. چندین پروتئین ضد باکتریایی و دو ایمنولکتین شامل پروتئیناز فعال کننده پیش فنل اکسیداز و یک بازدارنده سرین پروتئاز از خانواده سرپین توسط اجسام چربی موجود در بالپولکداران سنتز و رهاسازی می‌شود (Zhu et al., 2003).

۲-۳-۲-۲-ایمنی سلولی

دفاع سلولی به وسیله سلول‌های خونی با واکنش‌های بیگانه‌خواری، کپسوله کردن، تشکیل گره و انعقاد خون صورت می‌پذیرد. اولین قدم پاسخ ایمنی از نوع سلولی یا هیومرال، شناسایی عامل بیگانه است. تشخیص عامل بیگانه در حشرات بر اساس پپتیدهایی است که از طریق الگوی مولکولی وابسته به بیمارگر عامل غیرخودی را شناسایی می‌کنند (Tsakas and Marmaras, 2010).

این پپتیدها روی غشای پلاسمایی گرانولوسیت‌ها، سلول‌های اجسام چربی یا به صورت محلول در همولنف وجود دارند و پس از شناسایی کربوهیدرات‌ها و لیپیدهایی که توسط میکروارگانیسم ساخته می‌شود نظیر لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی، پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت و بتا 1-3 گلوکان دیواره سلولی قارچ‌ها به آن‌ها متصل می‌گردند (Nappi and Ottavaiani, 2000; Yu et al., 2002; Marmaras and Lampropoulou, 2009). الفاکنده جریان پروفنل اکسیداز، سنتز پپتیدهای ضد میکروبی و یا پاسخ‌های ایمنی سلولی نظیر فاگوسیتوز، تشکیل گره یا کپسول، اتصال الگوهای مولکولی روی سطح بیمارگر به پروتئین‌های شناسایی کننده الگوها است (Brivio et al., 2005).

۲-۳-۲-۱-آنزیم فنل اکسیداز

آنزیم فنل اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی است که باعث اکسیداسیون سوبسترا از طریق انتقال الکترون از مولکول سوبسترا به مولکول‌های دیگر می‌شود (Boyce and Tipton, 2001). آنزیم مذکور حاوی مس بوده و با هموسیانین در بندپایان از نظر تکاملی ارتباط نزدیکی دارد؛ به طوری که شباهت بین این دو پروتئین به ۳۰ تا ۴۰ درصد می‌رسد (Chan et al., 2006). فنل اکسیداز در حشرات به دو دسته تقسیم می‌شود: تیپ تیروزیناز که طی هیدروکسیله کردن تیروزین، دی‌فنل را به کوئینون اکسید می‌کند (Gorman et al., 2007) و تیپ لاکاز که در سخت و رنگی شدن کوتیکول نقش دارد (Arakane et al., 2005; Dittmer et al., 2004). این آنزیم از مهم‌ترین اجزای ایمنی اختصاصی در بی‌مهرگان است و نقش مهمی در ملانیزاسیون، انعقاد خون و بهبود زخم دارد (Cerenius and Soderhall, 2004). در همولنف حشرات، فنل اکسیداز به صورت یک پروآنزیم غیرفعال به نام پروفنل

اکسیداز وجود دارد که طی پاسخ به تنش‌هایی نظیر گرسنگی، تغییرات دما، حمله پارازیتوئیدها و پارازیت‌ها فعال می‌شود. از منابع بالقوه تولید پروفنل اکسیدازها می‌توان به سلول‌های خونی اشاره کرد؛ به طوری که در بالپولکداران، اونوسیتوئیدها به عنوان سلول تولید کننده پروفنل اکسیدازها شناخته شده‌اند (Xu et al., 2019).

۲-۳-۲-۳- ایمنی هیومرال

در بالپولکداران، اجزای ایمنی هیومرال شامل ترکیبات ضد میکروبی، آنزیم‌های دفاعی مانند آنزیم فنل اکسیداز (Hyrse, 2011) و الگوهای تشخیص پروتئین (Wilson and Ratcliffe, 2000) می‌باشد. دفاع هیومرال می‌تواند به صورت اختصاصی جهت کنترل پاتوژنی خاص و یا غیر اختصاصی برای کنترل پاتوژن‌های مختلف رخ دهد؛ همچنین این نوع واکنش ایمنی می‌تواند به دو طریق صورت گیرد: پاسخ به صورت موضعی که می‌تواند در معده رخ دهد چرا که معده شایع‌ترین محل تهاجم پاتوژن‌های باکتریایی است و یا به صورت پاسخ سیستمیک از طریق تشخیص پاتوژن‌ها توسط گیرنده‌های شناسایی الگو و تنظیم سنتز سطح دوم دفاعی یا AMP در اجسام چربی و همولنف صورت گیرد (Broderick et al., 2009). هنگامی که میزبان در معرض پاتوژن‌ها اعم از باکتری‌ها، ویروس‌ها و یا قارچ‌ها قرار می‌گیرد، سنتز پپتیدهای ضد میکروبی که از اجزای مهم دفاع هیومرال هستند، در بافت‌های ویژه مانند هموسیت‌ها و اندام چربی القا می‌گردد و در نهایت این پپتیدها در همولنف حشره آزاد می‌شوند (Huffman et al., 1996). پپتیدهای ضد میکروبی در دو مسیر Toll و Immune deficiency (Imd) ساخته می‌شوند. فعال شدن هر یک از این مسیرها وابسته به مواجهه با یک عامل خارجی خاص است که بر اساس ساختار به سه دسته‌ی پپتیدهای غنی از سیستمین مانند دروسوماپسین و دفنسنین، پپتیدهای غنی از گلاپسین/پرولین مانند گلوورین، لبوسین و آتاسین و پپتیدهای آلفا هلیکال مانند مروسین و سکروپین تفکیک می‌گردند که در بین این‌ها آتاسین‌ها، دفنسنین‌ها و سکروپین‌ها بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند (He et al., 2015). در برابر باکتری‌های گرم مثبت مانند *Bacillus subsp*، *Aerococcus viridians* و *Staphylococcus aureus*، باکتری

گرم منفی *Escherichia coli* و برخی قارچ‌ها، دفن‌سین فعال می‌شود (Lee et al., 2004; Yi et al., 2014). در بسیاری از گونه‌های بالپولکداران مانند *Bombyx mori* L. (Sugiyama et al., 1995)، *Manduca sexta* L. (Rao and Yu, 2010)، *Hyalophora cecropia* L. (Hultmark et al., 1983)، *Heliothis virescens* F. (Ourth et al., 1994) و لارو *Spodoptera exigua* Fabricius. (Bang et al., 2012)، آتاسین‌ها بعد از مواجهه با باکتری‌های گرم منفی فعال می‌شوند. همچنین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی سبب القای سکروپین‌ها می‌گردند که این مورد اولین بار در *Hyalophora cecropia* L. شناسایی شد (Hultmark et al., 1983).

۲-۴- فلزات سنگین

در حال حاضر، فراوانی و تنوع حشرات در سراسر جهان رو به کاهش است و عوامل مختلفی در این کاهش نقش دارند (Sanchez-Bayo and Wyckhuys, 2019; Wagner, 2020). علاوه بر عوامل بیولوژیکی، تخریب زیستگاه و تغییر آب و هوا، آلودگی‌های انسانی نیز یکی از عوامل مهم کاهش جمعیت حشرات است (Goulson, 2013; Goulson et al., 2015; Collison et al., 2016; Sanchez-Bayo et al., 2016; Sanchez-Bayo and Wyckhuys, 2019; Wagner, 2020). آلاینده‌های انسانی مانند آفت‌کش‌ها، فلزات سنگین یا ریزگردهای معلق در هوا که از منابع کشاورزی یا صنعتی منشاء می‌گیرند، ممکن است اثرات سمی کشنده یا زیرکشنده بر حشرات داشته باشند (Collison et al., 2016; Sanchez-Bayo et al., 2016; Sanchez-Bayo and Wyckhuys, 2019; Wagner, 2020). همچنین این آلاینده‌های انسانی می‌تواند اثرات زیرکشنده‌ی چشمگیر مانند افزایش حساسیت به بیماری‌ها (Aufauvre et al., 2012; Di Prisco et al., 2013; Fauser-Misslin et al., 2014; Collison et al., 2016; Sanchez-Bayo et al., 2016; Czerwinski and Sadd, 2017; Hernandez Lopez et al., 2017; O'Neal et al., 2018) یا کاهش تحمل نسبت به عوامل استرس‌زای دیگر بر حشرات داشته باشد (Di Pasquale et al., 2013; Di Pasquale et al., 2016; Kaluza et al., 2018; Branchiccela et al., 2019). علاوه بر این، مشخص شده است که چنین

آلاینده‌هایی بر توانایی یادگیری موجودات یا سایر سطوح زندگی آن‌ها تأثیر منفی می‌گذارند (Gill et al., 2012; Gill and Raine, 2014; Arce et al., 2017; Lunardi et al., 2017; Sivakoff and al., 2019; Gardiner, 2017; Siviter et al., 2018; Colin et al., 2019) که ممکن است حشرات را حتی بیشتر به خطر بیندازد (Gill et al., 2012; Stanley et al., 2016; Arce et al., 2017).

تحقیقات نشان داده است که علاوه بر عوامل محیطی همچون فرسایش، آتشفشان‌ها و آب چشمه‌ها، فعالیت‌های انسانی نظیر استفاده از سوخت‌های فسیلی و کشاورزی و استخراج از معادن نیز باعث تجمع فلزات سنگین در خاک و سمیت برای گیاهان و جانوران می‌شود (Sharma and Agrawal, 2010; Boyd, 2010). تأثیری که آلودگی فلزات سنگین بر روی جانوران می‌گذارد، به صورت یک تأثیر منفی مستقیم و معمولاً با نشانه‌هایی همچون مسمومیت و مرگ و میر است (Boyd, 2010). امکان دارد که آلودگی فلزات سنگین بر ساختار غذایی جانوران اثر بگذارد (Fleeger et al., 2003). این اثر از آن جهت قابل توجه است که می‌تواند بر روابط بین پارازیت‌ها و پارازیتوئیدها و رابطه‌ی شکار و شکارگری در جوامع خشکی و آبی تأثیر گذار باشد (Mcpherson et al., 2004; Van Ooik et al., 2007). بیشتر تحقیقات انجام گرفته در مورد اثرات آلودگی فلزات سنگین بر روی جانوران آبی انجام شده است و به دلیل تفاوت اساسی زیستگاهی که بین جانوران خشکی‌زی و آبی وجود دارد، تأثیرات آلودگی فلزات سنگین در خشکی‌زی‌ها بسیار متفاوت است (Zimmer and Zimmer, 2008). بر همین مبنا، تحقیقات صورت گرفته نشان داده است که اگر محیط زندگی جانوران آلوده به فلزات سنگین باشد، مقدار این فلزات در محیط زندگی جانوران آبی که آب است، نسبت به محیط زندگی جانوران خشکی‌زی که هوا می‌باشد، بیشتر است (Boyd, 2010).

۲-۴-۱- روی (Zn)

روی عنصری به رنگ سفید متمایل به آبی در گروه ۱۲ جدول تناوبی با نماد Zn و عدد اتمی ۳۰ است. این فلز در مجاورت رطوبت هوا تیره شده و به هنگام سوختن رنگ سبز براقی تولید می‌کند (Maret, 2001). این فلز دارای ۵ ایزوتوپ شاخته شده در طبیعت است که بیشترین تنوع آن مربوط

ایزوتوپ ^{64}Zn با ۴۹ درصد فراوانی است (Audi *et al.*, 2003). روی به نسبت سایر فلزات دمای ذوب پایینی (۴۱۹/۵ درجه سانتی‌گراد) داشته و رسانای نسبتاً خوبی برای الکتریسیته است (Hammond, 2004). روی از نظر فراوانی عناصر در پوسته زمین، بیست و چهارمین فلز بوده و 75 ppm از پوسته زمین را در بر گرفته است. همچنین جو دارای ۰/۱ تا ۴ میکروگرم بر متر مکعب روی بوده و آب دریاها نیز 300 ppb روی را در خود جای داده‌اند (Emsley, 2011).

روی از عناصر ضروری برای میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، حیوانات و انسان به شمار می‌رود (Broadly *et al.*, 2007; Prasad, 2008; Maret, 2013). اهمیت این فلز به قدری مهم است که در بدن موجودات زنده دومین فلز بعد از آهن بوده و تنها فلزی است که در تمامی طبقه‌بندی‌های آنزیمی شرکت می‌کند (Broadly *et al.*, 2007). تحقیقات نشان داده است که یون‌های روی در پروتئین‌ها، بیشتر همراه با آمینواسیدهای سیستئین، آسپارتیک، هیستیدین و گلوتامیک هستند (Brandt *et al.*, 2009). با این حال اگرچه روی از عناصر ضروری برای موجودات زنده محسوب می‌شود اما مقادیر بالای آن مضر بوده و سبب کاهش جذب آهن و مس می‌گردد (Fosmire, 1990). پژوهش‌ها نشان داده است که یون آزاد روی بسیار سمی بوده به طوری که یک میلی‌مولار از این یون می‌تواند بسیاری از جانداران را نابود سازد؛ به عنوان مثال شش میکرومولار از این یون باعث مرگ و میر ۹۳ درصد دافنی‌ها در آب شده است (Muysen *et al.*, 2006).

مشخص شده است که دلیل طبیعی ورود روی به خاک، هوازدگی صخره‌ها است اما عوامل انسانی نظیر استخراج از معادن، استفاده از سوخت‌های فسیلی، فاضلاب، خرده‌های سطوح گالوانیزه و کودهای فسفاته سبب بالا رفتن روی در خاک می‌گردند؛ علاوه بر این ثابت شده است که مقادیر بالای این فلز برای گیاهان سمی است اگرچه سمیت آن گسترش خیلی کمی دارد (Broadly *et al.*, 2007). از تاثیرات منفی فلز روی بر گیاهان می‌توان به این مورد اشاره کرد که مقادیر بالای 500 ppm از این فلز، سبب کاهش جذب منگنز و آهن توسط ریشه گیاه در خاک می‌شود (Emsley, 2011).

۲-۴-۲- مس (Cu)

مس عنصری در گروه ۱۲ جدول تناوبی با نماد Cu و عدد اتمی ۲۹ است. این فلز به صورت خالص نرم و چکش‌خوار بوده و در مجاورت هوای آزاد به رنگ قرمز متمایل به نارنجی در می‌آید. علاوه بر این رسانای بسیار خوبی برای الکتریسیته و گرما است (Hammond, 2004). این فلز دارای ۲۹ ایزوتوپ است که پایدارترین آن‌ها ایزوتوپ‌های ^{63}Cu و ^{65}Cu هستند؛ ایزوتوپ ^{63}Cu حدود ۶۳ درصد ایزوتوپ‌های مس را شامل می‌شود (Audi, 2003). غلظت مس در پوسته زمین 50 ppm تخمین زده شده است (Emsley, 2011). مس با این قابلیت که برای باکتری‌ها سمی بوده به طوری که آن‌ها توانایی رشد بر روی آن را ندارند، به فلزی بیواستاتیک تبدیل شده است (Edding *et al.*, 1995). پروتئین‌های حاوی مس دارای نقشی اساسی در انتقال اکسیژن و الکترون هستند (Vest *et al.*, 2013). علاوه بر این ثابت شده است که این فلز در سیتوکروم اکسیداز C موجودات، در تنفس هوازی نقش دارد و به همراه آهن سبب واکنش کاهشی اکسیژن در این فرآیند می‌شود (Lippard and Berg, 1994). این فلز، به عنوان یک عنصر ضروری برای اکثر جانوران و گیاهان شناخته شده است (Adelstein and Vallee, 1961).

۲-۴-۳- آهن (Fe)

آهن عنصری در گروه ۸ جدول تناوبی با نماد Fe و عدد اتمی ۲۶ است. این فلز چهارمین عنصر فراوان در پوسته‌ی زمین با مقدار تقریبی 41000 ppm می‌باشد. آهن دارای سطح صاف و نقره‌ای براق مایل به خاکستری است و هنگامی که در مجاورت هوا قرار می‌گیرد، به رنگ قرمز یا قهوه‌ای در می‌آید. این فلز، جزء فراوان‌ترین عناصر فلزی در شهاب سنگ‌ها و در هسته فلزی متراکم در سیاراتی مثل زمین است (Heath, 1987). آهن دارای چهار ایزوتوپ پایدار ^{54}Fe ، ^{56}Fe ، ^{57}Fe و ^{58}Fe است که ایزوتوپ ^{56}Fe با فراوانی تقریبی ۹۲ درصد فراوان‌ترین ایزوتوپ این فلز است (Audi, 2003).

آهن یک عنصر ضروری برای موجودات زنده است و این عنصر در تعدادی از پروتئین‌های مهم بیولوژیک مانند سیتوکروم‌ها، هموگلوبین‌ها و در بسیاری از آنزیم‌های اکسید-احیایی، دارای نقش

مهمی است (صالحی پور تمبانوئی، ۱۳۹۶). یون‌های آهن می‌توانند در دو فرم Fe^{2+} و Fe^{3+} به عنوان جزء کاتالیزوری آنزیم‌ها در فرآیندهای کلیدی سلول همچون تولید انرژی و سنتز و تکثیر DNA نقش داشته باشند. اگرچه یکی از موانع رشد ارگانیسم‌ها کمبود آهن است اما مقادیر زیاد از این عنصر نیز مضر است؛ به طوری که افزایش Fe^{2+} در داخل سلول‌ها منجر به تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق واکنش فنتون شده (Morant et al., 2008; Rudrappa et al., 2008) که به نوبه خود می‌تواند سبب آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA شود (Meiser et al., 2011). آهن دارای نقشی مهم و پیچیده در ایمنی گیاه است که شامل تعادل سه جانبه بین پاتوژن، گیاه و جمعیت مفید میکروبی اطراف رایزوسفر است (Römhild, 1987; Aznar et al., 2015).

۲-۴-۴- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیرات فلزات سنگین بر حشرات

به دلیل تغذیه شکارگران از حشرات و همچنین تغذیه بسیاری از حشرات از غذای انسان، مطالعه در مورد تاثیرات فلزات سنگین بر حشرات مهم و حیاتی است؛ چرا که حشرات یکی از حلقه‌های اتصال در زنجیره غذایی بوده و می‌توانند موجب انتقال فلزات به سطوح بالاتر شوند. از حشرات بسیاری جهت ارزیابی آلودگی‌های زیست محیطی به عنوان نمونه زیستی استفاده شده است (Vlahovic et al., 2014). به عنوان مثال می‌توان به استفاده از لارو پشه‌های خانواده Chironomidae جهت ارزیابی آلودگی رسوبات کف رودخانه‌ها (Servia et al., 1998)، بهره‌گیری از مورچه‌ها برای اندازه‌گیری آلودگی جنگل‌ها (Peck et al., 1998) و استفاده از زنبورها و شکارگران خصوصاً زنبورهای عسل جهت پایش آلودگی‌های حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و فلزات سنگین در طبیعت اشاره کرد (Balestra et al., 1992; Ghini et al., 2004; Urbini et al., 2006; Nummelin et al., 2007).

تاثیر آلودگی فلزات سنگین روی حشرات در راسته‌های مختلف بسیار متفاوت است (Koricheva et al., 1998). نتایج پژوهشی در مورد تاثیر فلز مس بر دوره‌های مختلف رشدی پشه *Chironomus decorus* Johanssen حاکی از این بود که غلظت ۹۰۰ تا ۴۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از این فلز سبب کاهش رشد لاروهای یک تا پانزده روزه می‌شود و غلظت‌های بالای ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

سبب تاخیر در ظهور حشرات بالغ می‌شود. همچنین غلظت ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مس باعث بد شکلی قطعات دهانی لاروها می‌شود (Kosalwat and Knight., 1987).

نتایج تحقیقات Wu و همکاران (2006) نشان داد که میزان رشد لارو مگس *Boettcherisca peregrine* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae) با غلظت کادمیم رابطه معکوس دارد؛ به طوری که با افزایش غلظت کادمیم طول دوره لاروی کاهش و میزان کربوهیدرات و پروتئین در همولنف افزایش می‌یابد.

در مطالعه‌ای دیگر که اثر فلزات سنگین بر رشد شکارگر *Podisus maculiventris* Say (Hemiptera: Pentatomidae) را بررسی کرده بودند، نتایج نشان داد در اثر تغذیه‌ی شکارگر *P. maculiventris* از کرم برگ‌خوار مصری *Spodoptera lituralis* Boisduval که با فلزات سنگین نیکل، کبالت، روی و مس تیمار شده بود، هیچ کدام از فلزات باعث مرگ و میر در شکارگر نشدند و نیکل قابلیت انتقال به سطوح غذایی بالاتر را داشته و روی و مس در گیاه‌خوار و شکارگر تجمع زیستی داشتند و کمینه غلظت این دو فلز سبب کاهش وزن حشرات بالغ و افزایش زمان تبدیل مراحل نابالغ به بالغ می‌شوند (Cheruiyot et al., 2013).

در تحقیقی که به بررسی جدول زندگی ابریشم‌باف ناجور *Lymantria dispar* L. با تیمار کادمیم توسط Mircic و همکاران (2010) انجام گرفت، نتایج نشان داد که استفاده از این فلز سنگین سبب کاهش طول عمر حشره، وزن شفیره و طول دوره شفیرگی می‌گردد.

نتایج تحقیق Huang و همکاران (2010) مشخص کرد که تحت تاثیر غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از مس طول دوران شفیرگی کرم برگ‌خوار مصری *Spodoptera litura* Fabricius افزایش یافت ولی تحت تاثیر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از این فلز، طول دوره لاروی کاهش پیدا کرد. همچنین در غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نرخ زنده‌مانی لاروهای سن چهار و پنج کاهش معنی‌داری نشان داد.

همچنین Vlahovic و همکاران (2014) دریافتند که وزن لاروها و فعالیت آنزیم پروتئاز معده میانی در *Lymantria dispar* L. در اثر ۳۰ میکروگرم کادمیم کاهش می‌یابد. علاوه بر این نتایج تحقیقی دیگر نشان داده بود که مقدار لیپید موجود در همولنف *Lymantria dispar* L. در تیمار با سرب و غلظت کمینه مس تغییری نمی‌کند در حالی که با تیمار روی و کادمیم کاهش می‌یابد (Ortel, 1995). طبق تحقیقات Fountain and Hopkins (2001) که اثر فلزات سنگین روی، مس، کادمیم و سرب را بر دم فتری (*Folsomia candida* Willem (Insecta: Collembola) بررسی کردند، نتایج نشان دهنده آن بود که حشره‌ی مذکور به دلیل پوست‌اندازی و دفع فلزات سنگین از طریق مخرج، نسبت به تغذیه از این آلاینده‌ها مقاوم است.

در آزمایشی دیگر تغذیه کارگران زنبور عسل با غلظت زیرکشنده کادمیوم نشان داد که پس از ۳ روز به طور قابل توجهی از تکثیر باکتری *Escherichia coli* (که همزیست با این حشره است) جلوگیری می‌شود (Polykretis et al., 2016; Feldhaar and Otti 2020).

در پژوهشی ثابت شده است که طول عمر و باروری حشره بالغ و بقای لاروهای *Chromatomyia milii* Kaltenbach (Diptera: Agromyzidae) با افزایش قرار گرفتن در معرض کادمیوم کاهش می‌یابد (Scheier et al., 2006). همچنین مشخص شده جیرجیرک‌ها و ملخ‌هایی که برگ‌های *Brassica juncea* L. و *Stanleya pinnata* Britton را به همراه غلظت بالای سلیوم مصرف می‌کنند، از بین می‌روند (Freeman et al., 2007). نتایج بررسی‌های دیگر نیز نشان داده است که کلم و گیاه تربچه آلوده به روی یا کادمیوم تأثیرات مخربی بر رشد شته‌ها دارد (Görür, 2010). علاوه بر این مشخص شده که بقای *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) با افزایش مقادیر روی و کادمیوم کاهش می‌یابد (Kazemi-Dinan et al., 2014). طی مطالعه Tupkara and Yanar (2020) نتایج نشان داد که مقدار مصرف غذا توسط *Hyphantria cunea* Drury با افزایش مقادیر آهن و مس به رژیم غذایی کاهش می‌یابد. آن‌ها بیان کردند که فلزات سنگین می‌توانند اثرات بازدارندگی تغذیه بر حشرات داشته باشند که در نتیجه آن مراحل رشد حشرات دستخوش تغییرات و

تأثیرات منفی می‌شوند. آن‌ها دریافتند که در تیمارهای حاوی نیکل و کبالت، وزن شفیره بیشتر از تیمار شاهد است و با افزایش میزان روی در رژیم غذایی، وزن شفیره افزایش می‌یابد.

Wu و همکاران (2014) دریافتند که در سویه های حساس *Boettcherisca peregrina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae)، وزن بدن لاروها با افزایش مقدار مس کاهش می‌یابد. در مطالعه دیگری که در آن *Panolis flammea* Denis & Schiffermüller (Lepidoptera: Noctuidae) و *Bupalus piniarius* Linnaeus (Lepidoptera: Geometridae) مورد استفاده قرار گرفت، مشخص شد شفیره‌هایی که مواد مغذی لارو آن‌ها به منبع انتشار فلز سنگین نزدیکتر است، اندازه کوچکتری دارند (Heliövaara et al., 1989). کاهش اندازه شفیره حشرات بر باروری آن‌ها تأثیر می‌گذارد (Barah & Sengupta, 1991). اگر باروری تحت تأثیر منفی قرار گیرد، به این معنی است جمعیت نیز دچار تغییر می‌شود.

تأثیر فلز روی (Zn^{2+}) بر سیستم ایمنی کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner نشان داد بعد از تیمار این آفت با فلز روی در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تعداد کل سلول‌های خونی افزایش یافت اما در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معناداری با شاهد نداشت؛ غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از روی باعث کاهش معنادار در تعداد تفرقی پروهموسیت‌ها نسبت به شاهد شد اما تعداد اونوسیتوئیدها در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معناداری نسبت به شاهد افزایش داشت. علاوه بر این تیمار با روی سبب افزایش تعداد گره تشکیل شده به دلیل تزریق لاتکس بید در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی نسبت به شاهد (توئین-۸۰) شد (Baghban et al., 2015).

علاوه بر این نتایج تحقیق Baghban و همکاران (2018) که تأثیر عناصر ضروری و غیر ضروری بر سیستم ایمنی سلولی کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner را بررسی کردند، نشان داد تعداد کل هموسیت‌ها در غلظت ۱۲,۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم به طور قابل توجهی کاهش یافته است اما در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم و تمام تیمارهای مس، تعداد کل

هموسیت‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافته است. شمارش تفرقی سلول‌های خونی نشان داد که تعداد پروهموسیت‌ها در غلظت ۱۲,۵ میلی گرم بر کیلوگرم تیمار کادمیوم و تمام تیمارهای مس کاهش یافت؛ در حالی که تعداد گرانولوسیت‌ها در تمام تیمارهای کادمیوم افزایش یافته بود. همچنین فعالیت فنل اکسیداز و گره‌زایی در مقابل قارچ *Beauveria bassiana* و ذرات لاتکس افزایش یافت. تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر روی هموسیت‌های پروانه موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* L. نشان داد تعداد هموسیت‌هایی که در معرض دی اکسید تیتانیوم با غلظت 100 ppm قرار گرفته بودند، به طور قابل توجهی افزایش یافت؛ اما در گروه‌هایی که در معرض دی اکسید تیتانیوم با غلظت‌های 500 ppm و 1000 ppm قرار داشتند تعداد هموسیت‌ها با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (Zorlu et al., 2015).

در تحقیقی بر روی *Galleria mellonella* L.، تغذیه لاروها با غلظت پایین نیکل به مقدار ۱۰ میکروگرم بر گرم ماده غذایی، سبب افزایش میزان کپسوله کردن و فعالیت فنل اکسیداز نسبت به رژیم غذایی عاری از نیکل شد و تغذیه با غلظت زیرکشدگی به میزان ۵۰ میکروگرم بر گرم ماده غذایی سبب افزایش نرخ کپسوله کردن و کاهش میزان فعالیت فنل اکسیداز شد (Dubovskiy et al., 2011).

آزمایش دیگری بر روی پروانه *Epirrita autumnata* Borkhausen نیز نشان داد که در مقادیر کم مس (۱۰۳/۵ میکروگرم بر گرم ماده غذایی) نسبت به مقادیر زیاد مس (۲۰۷ میکروگرم بر گرم ماده غذایی) نرخ کپسوله کردن بیشتر بوده و این به آن معناست که افزایش مقدار مس در همولنف حشره باعث افزایش فعالیت سامانه ایمنی سلولی می‌شود (Van Ooik et al., 2008).

علاوه بر این زمانی که لاروهای *Spodoptera litura* Fabr. در معرض سرب به اندازه‌ی ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم رژیم غذایی مصنوعی قرار گرفتند، مصرف تماسی و تغذیه‌ای با آفت کش سایپرترین سبب کاهش مرگ و میر و افزایش وزن شد. دلیل افزایش وزن تولید دو آنزیم سم‌زدا به نام‌های cyp6B47 و cyp9A39 در روده و اجسام چربی و ایجاد مقاومت بوده است (Zhou et al., 2012).

۲-۵- شاخص‌های تغذیه

در مطالعه تغذیه حشرات، یکی از بخش‌های مهم مربوط به ارزیابی شاخص‌های تغذیه است (Baghban *et al.*, 2014). در واقع کارایی هضم یا استفاده از رژیم غذایی یا ترکیبات رژیم غذایی که چگونگی تبدیل غذا توسط حشره به بیوماس است، توسط این شاخص‌ها تعریف و توصیف می‌شوند. با محاسبه شاخص‌های تغذیه، کیفیت غذا تعیین می‌شود و اندازه‌گیری میزان غذای خورده شده، هضم و کاهش وزن، مشخص کننده اثرات ضد تغذیه‌ای ترکیبات بر روی غذا می‌باشد (Rezaei *et al.*, 2006). تحقیقات نشان داده است که فعالیت آنزیم‌های گوارشی با میزان غذای هضم و تبدیل شده به بیوماس در ارتباط است؛ به همین دلیل ترکیبات تشکیل دهنده رژیم غذایی بر روی فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی تاثیر گذار است. این آنزیم‌ها انرژی لازم برای رشد، زنده‌مانی و فعالیت‌های حیاتی حشره را با شکستن مولکول‌های درشت تامین می‌کنند (Jouanin *et al.*, 1998; Ajamhassani and Amiri Jami, 2020). در واقع در صورت نبود کیفیت در غذای مورد استفاده حشره، انرژی حاصل از سوخت و ساز ناکافی بوده که به نوبه خود منجر به اختلال در دوره رشدی، وزن بدن و متعاقب آن حجم همولنف و تحت تاثیر قرار دادن کارایی سامانه ایمنی می‌گردد (Ghasemi *et al.*, 2018). در مطالعاتی که به منظور ارزیابی شاخص‌های تغذیه‌ای صورت گرفته است، فاکتورهای موثری مانند نرخ رشد نسبی (Relative Growth Rate)، نرخ مصرف نسبی (Relative Consumption Rate)، شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (Efficacy of conversion Of Ingested Food) و شاخص بازدارندگی تغذیه (Feeding Deterrent Index) محاسبه شده است.

۲-۵-۱- مطالعات انجام شده در زمینه شاخص‌های تغذیه

مطالعه شاخص‌های تغذیه می‌تواند اطلاعات مفید بسیاری را درباره‌ی تأثیر مثبت یا منفی اجزا یا کل غذا و سازگاری تغذیه حشرات مورد آزمایش برای اهداف گوناگون ارائه نماید. مطالعات بسیاری درباره تاثیر عوامل مختلف همچون سموم، اسانس گیاهان، فلزات سنگین و غیره بر روی شاخص‌های تغذیه حشرات گوناگون صورت گرفته است. به عنوان مثال در تحقیقی که کارایی

اسانس نانو کپسوله شده گیاه درمنه *Artemisia sieberi* Besser بر شاخص‌های تغذیه شب پره پشت الماسی *Plutella xylostella* L. بررسی شد، نتایج نشان داد که نانوکپسول اسانس درمنه به طور معناداری نرخ رشد نسبی، شاخص‌های کارایی تبدیل غذای بلعیده شده، کارایی تبدیل غذای هضم شده و شاخص تقریبی هضم‌شوندگی غذا را در مقایسه با اسانس فرموله نشده کاهش داده است (Negahban et al., 2013).

علاوه بر این، نتایج مطالعه Baghban و همکاران (2014) بر روی تاثیر فلزات سنگین کادمیوم، مس و روی بر شاخص‌های تغذیه و ذخایر انرژی کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner نشان داد که غلظت بالای کادمیوم به طور قابل توجهی هضم تقریبی را افزایش می دهد؛ همچنین نرخ رشد نسبی (RGR) با غلظت ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم مس به طور قابل توجهی افزایش یافت. با افزایش غلظت مس (۲۵ و ۵۰ میلی گرم/ کیلوگرم)، شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (Efficacy of conversion Of Ingested Food) به طور قابل توجهی افزایش یافت. همچنین میزان کلسترول با غلظت ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم کادمیوم افزایش یافت در حالی که مقدار تری گلیسیرید در کلیه تیمارهای کادمیوم بطور معنی داری کاهش یافت. گلیکوژن، پروتئین و کلسترول در همه تیمارهای مس به طور قابل توجهی افزایش داشت. مقدار تری گلیسیرید در ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم مس به طور قابل توجهی افزایش یافت. گلیکوژن در تمام تیمارهای روی به طور قابل توجهی افزایش نشان داد. سطح پروتئین و کلسترول با غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم روی کاهش قابل توجهی نشان داد در حالی که تری گلیسیرید با غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم روی افزایش داشت.

همچنین تغذیه از برگ‌های *Betula pubescens* Ehrh. آلوده شده با نیکل و مس نشان داد که نرخ رشد نسبی (RGR) در شب‌پره *Ephirrita autumnata* Borkhausen در مقایسه با شاهد به شکل معنی داری کاهش یافته و آلودگی فلز سنگین به عنوان یک بازدارنده رشد عمل کرده است (Van Ooik et al., 2007).

همچنین در *Spodoptera litura* Fabr. مقادیر بالای نیکل باعث کاهش نرخ رشد نسبی و مقادیر پایین نیکل باعث افزایش این شاخص می شود (Sun et al., 2011).

فصل ۳

مواد و روش‌ها

۳-۱- پرورش و تهیه کلنی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

کلنی اولیه لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه و به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود منتقل شد. پرورش انبوه این حشره در ظروف پلاستیکی ضدعفونی شده به ابعاد $10 \times 8 \times 10$ سانتی‌متر محتوی ۱۰۰ گرم آرد گندم و سه درصد مخمر در ژرمیناتور در دمای 25 ± 3 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 40 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۴:۱۰ ساعت (تاریکی : روشنایی) انجام شد (توکلی و عجم‌حسینی، ۱۳۹۶). تخم‌های گذاشته شده توسط حشرات ماده جدا و پس از خروج لاروها با آرد گندم حاوی مخمر پرورش داده شدند. برای مشخص کردن سنین مختلف لاروی از طول بدن و عرض کپسول سر (قانون دایار) استفاده شد که به وسیله کاغذ میلی‌متری صورت می‌گیرد. در این پژوهش از لارو سن چهارم یک روزه استفاده شد.

۳-۲- تهیه غلظت‌های نمک فلزات سنگین آهن، مس و روی

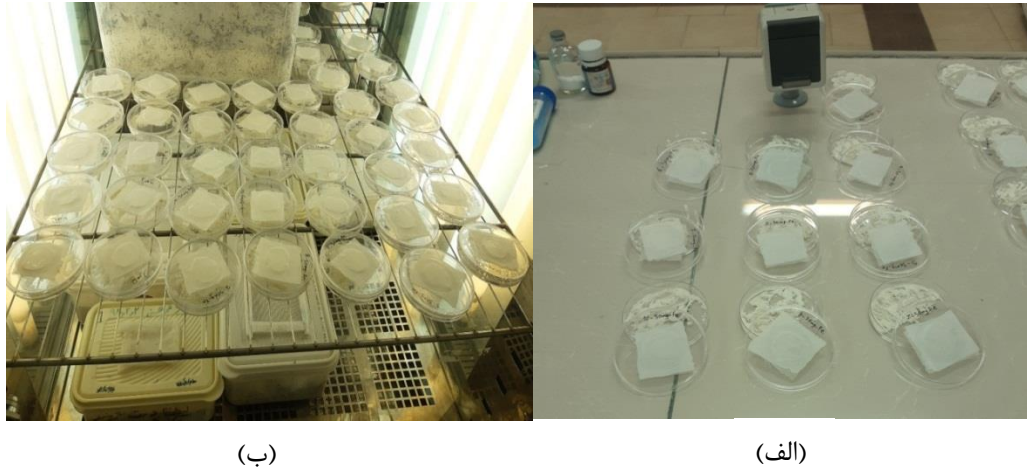
برای این منظور، غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نمک فلز سنگین/کیلوگرم آرد گندم بر اساس گزارشات منابع، در نظر گرفته شد (Parizanganeh et al., 2010; Nazir et al., 2011). مقادیر ذکر شده از نمک فلزات سنگین آهن (FeSO_4)، مس (CuSO_4) و روی (ZnSO_4) در آب حل شد و غلظت پایه 2000 ppm تهیه گردید و به مقدار مشخص آرد حاوی مخمر اضافه شد. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد (Baghban et al., 2014).

۳-۳- بررسی تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، مس و روی تعداد کل و تفرقی سلول‌های

خونی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

هر تیمار شامل ۴ تکرار و هر تکرار حاوی ۴ عدد لارو، ۱ گرم آرد گندم حاوی مخمر و غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نمک فلزات سنگین آهن (FeSO_4)، مس (CuSO_4) و روی (ZnSO_4) به صورت محلول 2000 ppm بود. تیمارها در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. تیمار

شاهد نیز شامل ۴ تکرار و هر تکرار حاوی ۴ عدد لارو و ۱ گرم آرد گندم حاوی مخمر و آب مقطر بود (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳ - (الف) آماده سازی تیمارها - (ب) قرار دادن پلیت‌های تیمار و شاهد در ژرمیناتور

۲ میکرولیتر همولنف از هر لارو با استفاده از میکروپیپت جمع‌آوری شد و مجموع همولنف ۴ عدد لارو (۸ میکرولیتر) با مقدار ۱۶ میکرولیتر بافر فیزیولوژیک (محلول ضد انعقاد تایسون (Mahmood & Yousuf, 1985)) رقیق گردید. با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus BH2، سلول‌های خونی شمارش شد (شکل ۲-۳) و شمارش کل با محاسبه تعداد سلول‌های خونی موجود در ۵ خانه از لام نئوبار (هر کدام به ابعاد یک میلی‌متر مربع) انجام شد (Jones, 1967) و با فرمول (۱-۳)، محاسبه گردید (Jones, 1962):

$$\text{تعداد کل سلول‌های خونی} = \frac{\text{عمق خانه‌های لام گلبول شمار} \times \text{میزان رقت} \times 1 \text{ mm}^2 \times \text{تعداد سلول‌های خونی}}{\text{تعداد خانه‌های شمارش شده از لام}}$$

فرمول (۱-۳)

بدین ترتیب و با استفاده از فرمول فوق، تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌های لاروهای تیمار شده شمارش شدند و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS 9.2 و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت.



(ب)

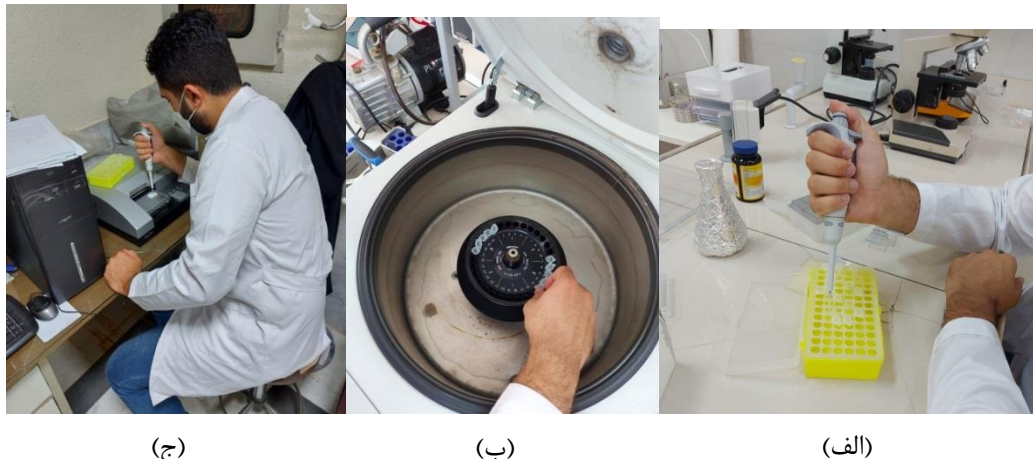
(الف)

شکل ۳-۲- (الف) جمع آوری همولنف با میکروپیپت از لارو سن ۴ شب‌پره مدیریتانه‌ای آرد - (ب) قرار دادن همولنف مخلوط شده با محلول تاپسون بر لام نئوبار به منظور شمارش سلول‌های خونی

۳-۴- تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

جهت تعیین اثر نمک فلزات سنگین بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز لاروهای مورد آزمایش، از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (Leonard *et al.*, 1985). در این روش، ۸۰ میکرولیتر همولنف ۴۰ لارو سن چهار تیمار شده با نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس جمع آوری شد و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روشن‌شین حذف و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PH=7) به رسبات اضافه شد و سپس هموژنیزه گردید. محلول به دست آمده مجدد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ها به ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) و ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و طول موج نمونه‌ها در طول ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه Elisa reader (ELx800) خوانده شد (شکل ۳-۳). آزمایش ذکر

شده در ۴ تکرار برای هر غلظت انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار SAS 9.2 انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام گرفت.



شکل ۳-۳- (الف) تجمع همولنف ۴۰ لارو سن ۴ شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در میکروتیوب - (ب) قرار دادن میکروتیوب‌ها در سانتی‌فیوژ - (ج) قرار دادن مایع حاصل از سانتی‌فیوژ در پلیت ۹۶ خانه جهت خواندن طول موج توسط دستگاه (ELx800) Elisa reader

۳-۵- بررسی شاخص‌های تغذیه‌ای لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس

جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین بر شاخص‌های تغذیه‌ای، برای هر تیمار، ۴ لارو سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در مقدار یک گرم آرد گندم حاوی مخمر و غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین در نظر گرفته شد و تیمار شاهد شامل ۴ لارو سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در مقدار یک گرم آرد گندم حاوی مخمر و عاری از نمک فلزات سنگین بود که در ژرمیناتور در دمای 25 ± 3 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 40 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۴:۱۰ ساعت (تاریکی : روشنایی) قرار گرفتند. هر تیمار شامل ۱۰ تکرار بود. داده‌های تغذیه شامل مجموع وزن حشرات زنده، مجموع وزن اولیه حشرات، مقدار غذای خورده شده، وزن غذای مصرف شده در تیمار و وزن غذای مصرف شده در شاهد اندازه گیری شد و متعاقب آن، تاثیر فلزات سنگین در غلظت‌های به دست آمده روی شاخص‌های تغذیه نظیر شاخص نرخ رشد نسبی، شاخص نرخ مصرف نسبی غذا، شاخص بازدهی

غذای بلعیده شده و شاخص بازدارندگی تغذیه با استفاده از روش ارائه شده توسط (Huang and Ho, 1998) به شرح زیر پس از گذشت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت:

الف: نرخ رشد نسبی (Relative Growth Rate): $RGR = (A-B) / B \times \text{Day}$

A: مجموع وزن حشرات زنده (گرم) بعد از سه روز، B: مجموع وزن اولیه حشرات (گرم)

ب: نرخ مصرف نسبی غذا (Relative consumption Rate): $RCR = D / (B \times \text{Day})$

D: مقدار غذای خورده شده (گرم)، B: مجموع وزن اولیه حشرات (گرم)

ج: شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (Efficacy OF Conversion Of Ingested Food):

$$ECI (\%) = (RGR / RCR) \times 100$$

د: شاخص بازدارندگی تغذیه (Feeding Deterrent Index): $FDI (\%) = (C-T) \times 100 / C$

C: وزن غذای مصرف شده در شاهد (گرم)، T: وزن غذای مصرف شده در تیمار (گرم)

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام گردید.

۳-۶- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر خصوصیات

زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

برای این منظور، در هر تیمار، مجموعاً ۴۰ عدد لارو سن چهار یک روزه شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مورد بررسی قرار گرفت. هر تیمار شامل ۴ تکرار و هر تکرار حاوی ۱۰ عدد لارو، ۱ گرم آرد گندم حاوی مخمر و غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نمک فلزات سنگین آهن، مس و روی بود. پس از تیماردهی، تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین آهن، مس و روی بر طول دوره لاروی سن ۴ و ۵، طول دوره شفیرگی، وزن شفیره‌ها، درصد خروج حشرات کامل و طول عمر حشرات کامل مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام گردید.

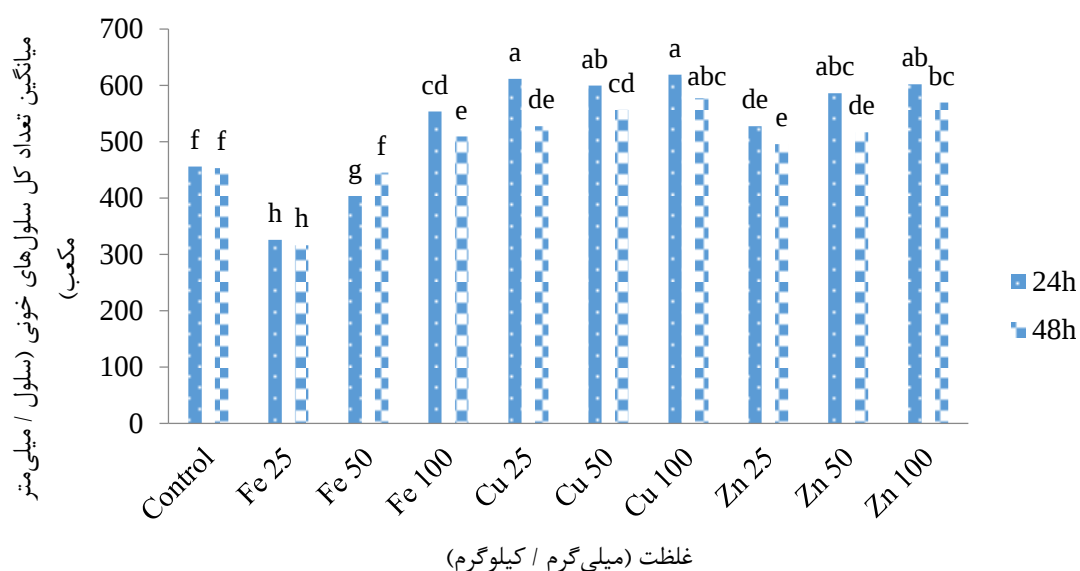
فصل ۴

نتایج و بحث

۱-۴- ایمنی سلولی

۱-۱-۴- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر تعداد کل سلول‌های خونی (Total Hemocyte Count)

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر میانگین کل سلول‌های خونی (THC) نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمارها و شاهد در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=80.06$; $df_{t,e}=19, 60$; $P=0.0001$) (شکل ۱-۴).



شکل ۱-۴- میانگین تعداد کل سلول‌های خونی لارو سن چهار شب‌پره مدیریت‌شده‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت

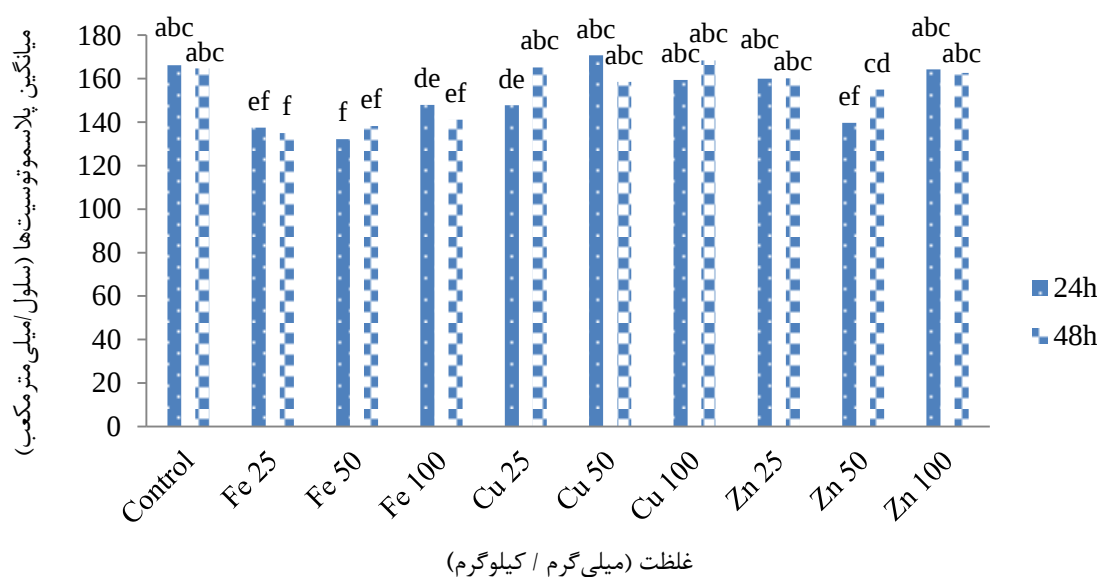
بر اساس نتایج، در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز مس پس از گذشت ۲۴ ساعت ($611/86 \pm 5/14$ سلول/میلی‌مترمکعب) بیشترین افزایش و نمک فلز آهن پس از گذشت ۴۸ ساعت ($316/43 \pm 10/42$ سلول/میلی‌مترمکعب) بیشترین کاهش را در میانگین تعداد کل سلول‌های خونی نسبت به تیمارهای شاهد داشته‌اند. در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز مس پس از گذشت ۲۴ ساعت ($599/92 \pm 9/75$ سلول/میلی‌مترمکعب) بیشترین افزایش و نمک فلز آهن پس از گذشت ۲۴ ساعت ($403/67 \pm 16/89$ سلول/میلی‌مترمکعب) بیشترین

کاهش را در میانگین تعداد کل سلول‌های خونی نسبت به تیمارهای شاهد داشته‌اند. همچنین مشابه با غلظت ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، نمک فلز مس در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ ساعت ($619/25 \pm 10/17$ سلول/میلی‌مترمکعب) بیشترین افزایش را در میانگین تعداد کل سلول‌های خونی نسبت به تیمارهای شاهد داشته است. به طور کلی پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، در تیمار با نمک فلز آهن در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش در تعداد کل سلول‌های خونی نسبت به تیمارهای شاهد مشاهده شد. در تیمار با نمک فلزات مس و روی در تمامی غلظت‌ها، میانگین تعداد کل سلول‌های خونی نسبت به تیمارهای شاهد افزایش یافت (شکل ۴-۱). تحقیقات نشان داده است که تعداد و انواع سلول‌های خونی در موفقیت سیستم دفاعی نقش بسزایی دارد (Ajamhassani, 2019). بر همین اساس، بررسی تعداد سلول‌های خونی به عنوان معیاری جهت اندازه‌گیری میزان تنش بسیاری از بی‌مهرگان پیشنهاد شده است (Correia, 2008). پژوهش‌ها حاکی از آن است که هموسیت‌ها می‌توانند فلزات را توسط سیتوپلاسم و یا داخل وزیکول‌های لیزوزومی در داخل سلول انتقال دهند (Robinson and Ryan, 1988). ثابت شده است که هموسیت‌های بی‌مهرگان مانند صدف‌های دوکفه‌ای توانایی تجمع مقادیر بالای فلزات سنگین را در لیزوزوم‌های خود دارند (Matozzo et al., 2001). بر همین اساس، هنگامی که این دسته از جانوران در معرض آلودگی فلزات سنگین قرار گیرند، پاسخ دفاعی آن‌ها، افزایش تعداد سلول‌های خونی است (Pipe and Coles, 1995; Coles et al., 1995; Mayrand et al., 2005) که نتایج تحقیق اخیر در برخی غلظت‌ها، منطبق بر تحقیقات بالا و (Baghban et al., 2018) می‌باشد. البته طبق نتایج محققان، ثابت شده است که همواره در تنش‌های محیطی تعداد سلول‌های خونی افزایش نمی‌یابد و ممکن است تعداد سلول‌های خونی به دلایل متفاوت همچون انتقال سلول‌ها و تحلیل سلول‌ها کاهش یابد (Pipe and Coles, 1995). بر همین مبنا، علت کاهش تعداد سلول‌های خونی لاروهای سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلز آهن نسبت به شاهد را می‌توان این طور بیان کرد که سلول‌ها به بافت‌ها مهاجرت کرده‌اند و سمیت این غلظت‌ها آنقدر زیاد

نبوده است که پاسخ ایمنی شدیدی ایجاد شود. تحقیقات بر روی اپی تلیوم آبشش *Mytella falcate* (d'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae) حاکی از آن بوده است که تعداد هموسیت‌ها در این بافت پس از قرار گیری در معرض آلودگی فلزات سنگین افزایش یافته است (David *et al.*, 2008). پژوهش دیگر محققین، علت این امر را فساد بافت و پاسخ ایمنی به آن بیان کردند (Nogarol and Fontanetti, 2010). نتایج تحقیقات Roesijadi و همکاران (1997) نشان داد که فلزات سنگین مانند کادمیم سبب تولید متالوتیونین توسط هموسیت‌ها می‌شوند. متالوتیونین‌ها که پروتئین‌هایی غنی از سیستئین هستند، عهده‌دار هموستازی و سم‌زدایی فلزات سنگین می‌باشند. این پروتئین‌ها ضمن اتصال به فلزات سنگین، مقدار یون‌های آزاد در دسترس را کاهش داده و زمان نیاز، آن‌ها را به سامانه برمی‌گردانند (Marino *et al.*, 1998). به علت این عکس‌العمل، مهاجرت هموسیت‌ها به بافت‌ها همچون بافت چربی و اماکن ذخیره فلزات سنگین یا پاسخ ایمنی توسط هموسیت‌ها در مقابله با فساد بافت، قابل توجه است. همچنین بر اساس مطالبی که پیش‌تر بیان شد، هموسیت‌ها توانایی انتقال فلزات سنگین را توسط سیتوپلاسم و یا داخل وزیکول‌های لیزوزومی دارند؛ بر همین مبنا، در تحقیق اخیر احتمالاً در برخی غلظت‌ها فلزات درگیر این انتقال شده‌اند و همین امر سبب افزایش تعداد سلول‌های خونی شده است. در این تحقیق مشابه با پژوهش (Baghban *et al.*, 2018)، در اثر تیمار لاروها با نمک فلز مس، تعداد کل سلول‌های خونی افزایش یافت. به طور کلی در تحقیق اخیر همانطور که بیان شد، محتمل‌ترین دلیل برای افزایش تعداد سلول‌های خونی در مواجهه با فلزات سنگین می‌تواند نقش هموسیت‌ها در تولید متالوتیونین باشد که پیش‌تر نیز طی پژوهش‌های مختلف به اثبات رسیده است (Roesijadi *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2001; Coutinho and Barbosa, 2007).

۴-۱-۲- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر تعداد پلاسموتوسیت‌ها

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمارها و شاهد در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=10.72$; $df_{t,e}=19, 60$; $P=0.0001$) (شکل ۴-۲).



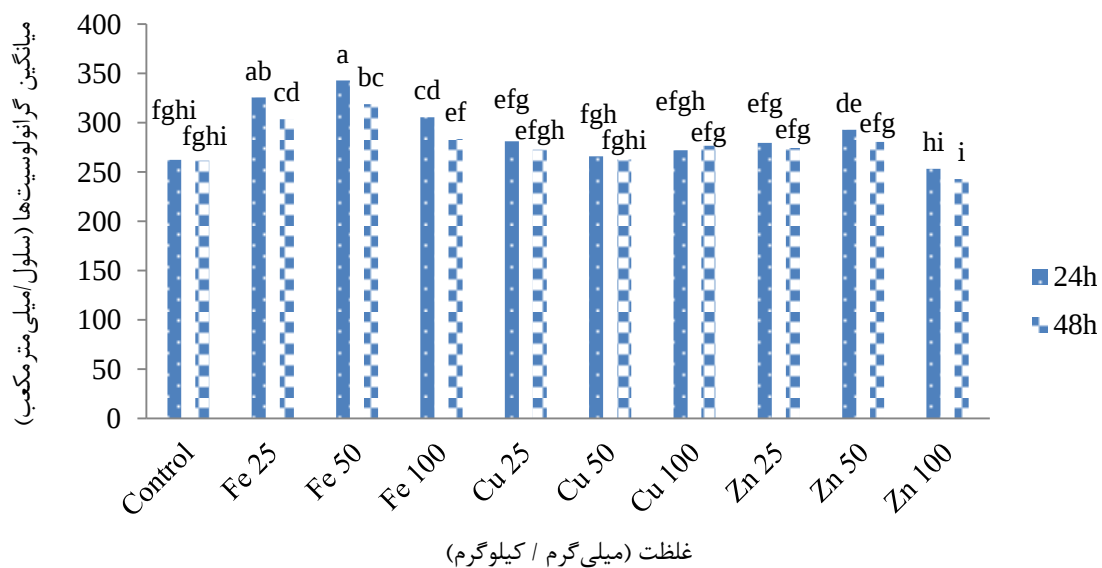
شکل ۴-۲- میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌های لارو سن چهار شب‌پره مدیریت‌شده‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت

بر اساس نتایج، در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز آهن پس از گذشت ۴۸ ساعت ($135 \pm 5/11$ سلول/میلی‌متر مکعب) بیشترین کاهش را در میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد داشت. در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز آهن پس از گذشت ۲۴ ساعت ($132 \pm 5/06$ سلول/میلی‌متر مکعب) بیشترین کاهش را در میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد داشته است. در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز آهن پس از گذشت ۴۸ ساعت ($141 \pm 5/08$ سلول/میلی‌متر مکعب) بیشترین کاهش را در میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد داشت. بر اساس

نتایج، در تیمار با نمک فلز آهن در تمامی غلظت‌ها و در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، کاهش در میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد مشاهده شد. در تیمار با نمک فلز مس در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از ۲۴ ساعت کاهش در میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد مشاهده گردید و در تیمار با نمک فلز روی، میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در هر دو بازه زمانی نسبت به تیمارهای شاهد کاهش یافت (شکل ۴-۲). محققان طی تحقیقات متعدد به این نتیجه رسیده‌اند که وقتی سلول‌ها در اثر آلودگی با فلزات سنگین خسارت دیده و از بین می‌روند، نسبت سلولی تغییر می‌کند (Johansson *et al.*, 2000; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). بر همین اساس در این تحقیق، کاهش معنادار پلاسموتوسیت‌ها در برخی از غلظت‌ها را می‌توان این طور توجیه کرد که به دلیل قرارگیری لاروها در معرض نمک فلزات سنگین، به سلول‌ها خسارت وارد شده است و یا آن‌ها جهت تامین پاسخ ایمنی مناسب، به غشای پایه مهاجرت کرده‌اند که نتایج فوق با نتایج (Baghban *et al.*, 2018) مطابقت دارد.

۳-۱-۴- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمارها و شاهد در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=15.19$; $df_{t,e}=19, 60$; $P=0.0001$) (شکل ۳-۴).



شکل ۳-۴- میانگین گرانولوسیت‌های لارو سن چهار شب‌پره مدیریت‌شده‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت

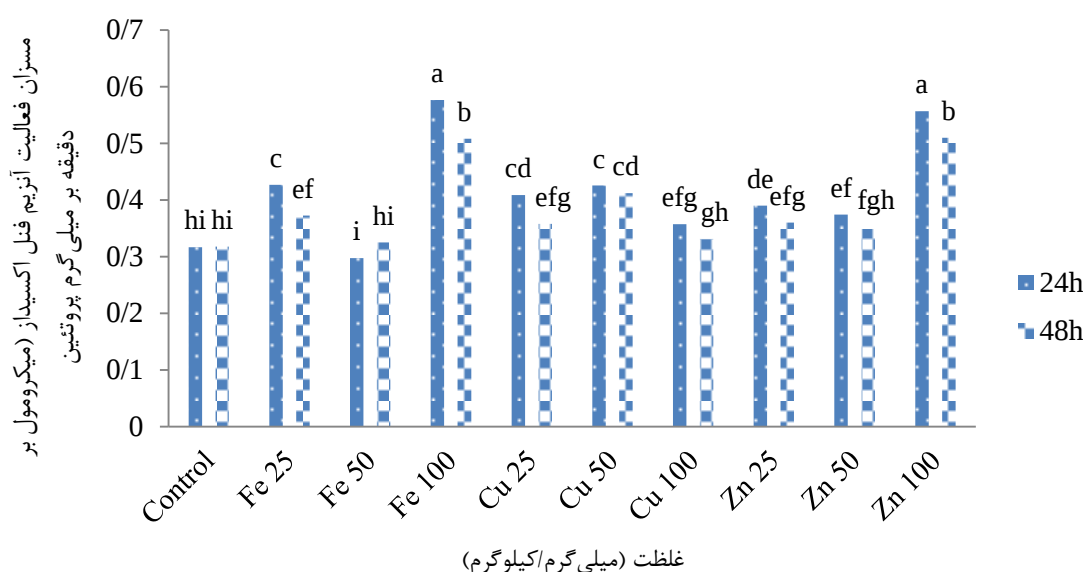
بر اساس نتایج، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلز آهن پس از گذشت ۲۴ ساعت ($325/86 \pm 4/60$ سلول/میلی‌مترمکعب) بیشترین افزایش را در میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد داشته است. بیشترین کاهش در میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد مربوط به نمک فلز روی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($243 \pm 4/20$ سلول/میلی‌مترمکعب) پس از گذشت ۴۸ ساعت بوده است. در تیمار با نمک فلزات آهن و مس در تمامی غلظت‌ها و در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلز روی، در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، افزایش در میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد مشاهده شد. در تیمار با نمک فلز روی در

غلظت ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم در هر دو بازه زمانی، میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها نسبت به تیمارهای شاهد کاهش یافت. (شکل ۴-۳). گزارش مشابه در مورد خرچنگ *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst, 1794)، نشان داد که در اثر آلودگی این جانور سخت‌پوست با فلز سنگین کادمیم، گرانولوسیت‌ها افزایش می‌یابند (Victor et al., 1993). نتایج تحقیق حاضر مبنی بر افزایش میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها با مطالب فوق مطابقت دارد. از آنجا که تحقیقات ثابت کرده است هموسیت‌ها می‌توانند فلزات را در داخل وزیکول‌های غشا انتقال دهند (Robinson and Ryan, 1988)، به نظر می‌رسد گرانولوسیت‌ها به دلیل داشتن دانه‌های پراکنده و فراوان گرانول در سیتوپلاسم خود (Strand, 2008)، حاملی برای انتقال فلزات باشند. در تحقیق حاضر، نتایج نشان داد که در برخی مقادیر نمک فلزات مس، روی و آهن، تعداد گرانولوسیت‌ها به عنوان یکی از سلول‌های خونی اصلی درگیر در واکنش‌های ایمنی بالا رفته است. به احتمال زیاد در این غلظت‌ها در این تحقیق، حشره به مرز مسمومیت ناشی از فلزات سنگین نرسیده است و با کمک سلول‌های خونی در حال تولید متالوتیونین‌ها جهت انتقال فلزات سنگین ذکر شده و جابه‌جایی آن‌ها است. نتایج بدست آمده با نتایج (Baghban et al., 2018) مطابقت دارد.

۴-۱-۴- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز (Phenol

(Oxidase

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر میانگین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمارها و شاهد در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=108.44$; $df_{t,e}=19, 60$; $P=0.0001$) (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴- میانگین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز لارو سن چهار شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه از آرد حاوی نمک‌های آهن، مس و روی در غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهدات نشان داد که در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز آهن پس از گذشت ۲۴ ساعت (0.426 ± 0.009 میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) بیشترین افزایش را در میانگین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز نسبت به تیمارهای شاهد داشته است. در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز مس پس از گذشت ۲۴ ساعت (0.425 ± 0.009 میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و ۴۸ ساعت (0.411 ± 0.005 میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) بیشترین افزایش و نمک فلز آهن پس از گذشت ۲۴ ساعت بر خلاف سایر تیمارها

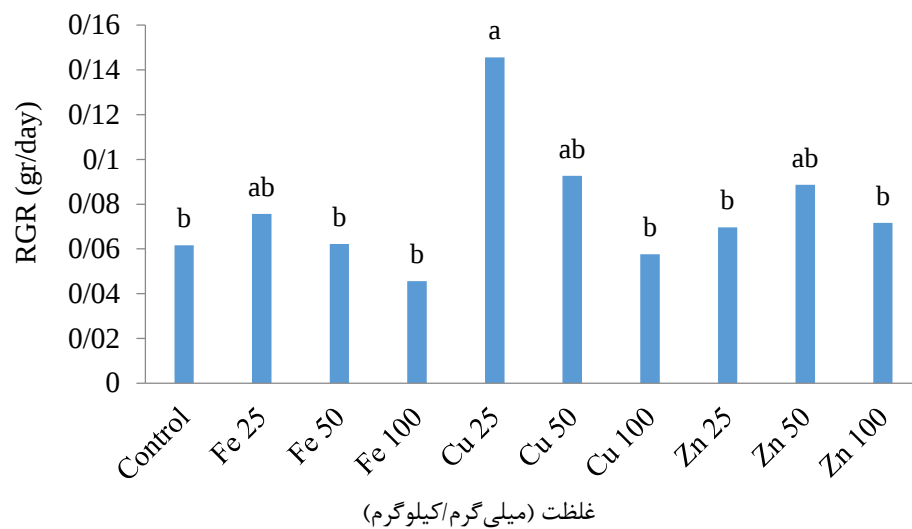
باعث کاهش در میانگین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز نسبت به تیمارهای شاهد شده است. در غلظت ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم نمک فلزات سنگین، نمک فلز آهن ($0/576 \pm 0/007$) میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) و روی ($0/556 \pm 0/008$) میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) پس از گذشت ۲۴ ساعت بیشترین افزایش را در میانگین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز نسبت به تیمارهای شاهد داشته‌اند. در تیمار با نمک فلزات مس و روی در تمامی غلظت‌ها در هر دو بازه زمانی، میانگین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز نسبت به تیمارهای شاهد افزایش یافت. (شکل ۴-۴). نتایج تحقیقات Baghban و همکاران (2018) نشان داد که میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* در تیمار با کادمیم در غلظت ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم و تیمار با روی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم، افزایش و در غلظت ۲۵ میلی گرم/کیلوگرم نمک فلز کادمیم کاهش می‌یابد. طی پژوهشی دیگر، میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در پروانه موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* L. در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم/گرم فلز نیکل کاهش و در غلظت‌های بالاتر افزایش می‌یابد (Dubovskiy et al., 2011). ثابت شده است که افزایش میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز بر اثر تغذیه از غذای حاوی فلزات سنگین، به دلیل افزایش پاسخ ایمنی حشرات است (Van Ooik et al., 2007). در تحقیق حاضر، افزایش فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در اغلب تیمارها نسبت به شاهد می‌تواند به همین دلیل باشد و با تحقیقات دیگر محققان که پیش‌تر ذکر شد، مطابقت دارد. همچنین علت کاهش در میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در مواجهه با فلزات سنگین، خسارت به غشای پایه معده میانی و در نتیجه آن آزادسازی بعضی از میانجی‌های ایمنی به داخل هموسل مطرح شده است (Dobovskiy et al., 2011). در تحقیق اخیر، احتمالاً کاهش فعالیت آنزیم مذکور در غلظت ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم نمک فلز آهن پس از گذشت ۲۴ ساعت به همین دلیل است. در تحقیقات بسیاری ثابت شده است که ایمنی سلولی و ایمنی هیومرال وابستگی زیادی با هم دارند (Lavine and Strand, 2006; Jiravanichpaisal et al., 2002). این احتمال وجود دارد که در تحقیق حاضر، افزایش در تعداد سلول‌های خونی در برخی غلظت‌ها، منجر به بالا رفتن فعالیت آنزیم فنل اکسیداز شده باشد؛ چرا که

در بالپولکدارن روشن شده سلول‌های خونی مانند اونوسیتوئیدها منابع بالقوه تولید فنل اکسیداز می‌باشند (Lavine and Strand, 2002; Baghban *et al.*, 2015). نکته دیگری که می‌توان به آن اشاره کرده این است که یون‌های فلزی در شرایط آزمایشگاهی بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز اثرات متفاوتی می‌گذارند. بر اساس تحقیقات عجم حسنی (۱۳۹۱) که به بررسی واکنش‌های ایمنی پروانه برگ‌خوار سفید اشجار *Hyphantria cunea* (Drury) نسبت به قارچ *Beauveria bassiana* پرداخت، غلظت‌های ۰/۵، ۳ و ۵ میلی‌مولار از فلزات مس و روی، سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم فوق شدند. وی این اتفاق را به دلیل جایگزینی بعضی از یون‌های فلزی در ساختار آنزیم فنل اکسیداز دانسته است. با توجه به این که مولکول فنل اکسیداز دارای دو اتم مس در هسته مرکزی خود می‌باشد، این احتمال که افزایش در میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در تیمار با فلز روی و مس در تحقیق حاضر به علت قدرت بالای جایگزینی این فلزات در مولکول آنزیم مذکور باشد، وجود دارد.

۴-۲- ارزیابی شاخص‌های تغذیه

۴-۲-۱- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس روی بر نرخ رشد نسبی (Relative Growth Rate)

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر نرخ رشد نسبی (RGR)، تفاوت معناداری را در غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد نشان داد ($F=1.48$; $df_{t,e}=9$)، (شکل ۴-۵). ($P=0.0053$; 90)



شکل ۴-۵- نرخ رشد نسبی (RGR) لارو سن چهارم شب‌پره مدیریت‌های آرد *E. kuehniella*

تحقیقات نشان داده است که شاخص RGR تابع وزن بدن لارو است (Srinivasan and Uthamasamy, 2005) و سمیت نمک فلز سنگین آهن، سبب کاهش وزن بدن لارو و در نتیجه آن کاهش نرخ رشد شده است. همچنین گزارش‌ها حاکی از کاهش وزن بدن حشره تحت تاثیر تیمارهای مختلف فلزات سنگین بوده است (Van Capelleveen et al., 1986; Nuorteva et al., 1992; Vlahovic et al., 2014). تحقیقات نشان داده است که طی تیمار حشرات با فلزات سنگین، میزان لیپید بدن آن‌ها کاهش می‌یابد (Emre et al., 2013). کاهش وزن حشره در این آزمایش ممکن است به دلیل افزایش مصرف لیپید و تامین انرژی از دست رفته برای مقابله با مسمومیت ایجاد شده باشد.

تحقیقات نشان داده است که فلزاتی همچون آهن، مس و روی که از عناصر ضروری برای جانداران محسوب می‌شوند، در غلظت‌های بالا، سبب مسمومیت در جانداران می‌گردند (Warrington, 1987). فلزات روی و مس ایفاگر نقش‌های مهمی در متابولیسم همچون عوامل آنزیمی و فرآیندهای زیستی هستند (Cass and Hill, 1980)؛ همچنین این دو فلز توانایی تجمع زیستی دارند (Cheruiyot *et al.*, 2013)؛ بدین معنا که می‌توانند با پروتئین‌های ویژه حامل فلزات مانند متالوتیونین‌ها پیوند برقرار کرده و در زمان کمبود یون‌های فلزات ضروری، آن‌ها را آزاد کنند. نتایج این پژوهش نشان داد که نرخ رشد نسبی (RGR) در لاروهای تیمار شده با نمک فلز سنگین مس در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (0.1456 ± 0.05 میلی‌گرم/گرم روز) نسبت به شاهد (0.0616 ± 0.02 میلی‌گرم/گرم روز) افزایش یافته است (شکل ۴-۵). طی پژوهشی که محققان به بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف مس بر *Spodoptera litura* Fab. پرداخته‌اند، نتایج نشان دهنده این است که در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم این فلز، دوره رشدی لارو این حشره کاهش می‌یابد و در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم طول دوره رشدی افزایش پیدا می‌کند (Huang *et al.*, 2012). در مطالعه سلول‌های اجسام چربی در *Chaetophyes compacta* Walker و *Pectinariophyes* sp. با اشعه ایکس، نتایج نشان داد که مقدار مس و سولفور در حشراتی که از غذای حاوی مس تغذیه می‌کنند، بالاست و این احتمال داده شد که مس با اتصال به متالوتیونین در اجسام چربی ذخیره شده باشد (Marshall, 1983). پیش‌بینی می‌شود که شب‌پره مدیترانه‌ای آرد شرایط و محیطی را ایجاد کرده تا مس و روی را با بالا بردن میزان چربی خود در اجسام چربی، ذخیره کند؛ بنابراین حفظ ویژه فلز سنگین منوط به این است که حشره وزن خود را بالا ببرد. از آنجا که فلز مس قدرت اتصال بالایی با متالوتیونین دارد، افزایش غلظت این فلز سبب افزایش میزان چربی، افزایش وزن و در نتیجه آن افزایش RGR شده است اما در فلز روی چون قدرت اتصال آن با متالوتیونین نسبت به مس کمتر است، افزایش RGR نسبت به مس کمتر بوده که نتایج فوق با نتایج (Baghban *et al.*, 2014) مطابقت دارد. از طرف دیگر به دلیل اینکه از لحاظ درجه بندی، روی بعد از آهن دومین فلز شناخته

شده از نظر متابولیسم و فراوانی در بدن موجودات زنده است (Broadley *et al.*, 2007)، طبیعتاً حشره، مصرف روی بیشتری نسبت به مس دارد.

۴-۲-۲- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر نرخ مصرف نسبی غذا (Relative Consumption Rate)

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر نرخ مصرف نسبی غذا (RCR)، تفاوت معناداری را در غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد نشان نداد ($F=1.10$; $df_{t,e}=9, 90$; $P=0.3692$) (شکل ۴-۶).



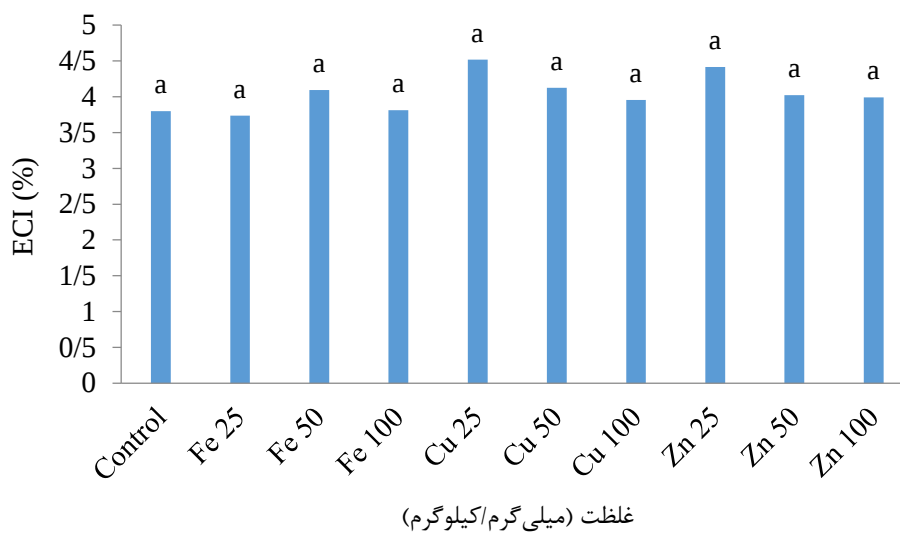
شکل ۴-۶- نرخ مصرف نسبی غذا (RCR) لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella*

نتایج شکل ۴-۶ با نتایج پژوهش (Baghban *et al.*, 2014) مبنی بر عدم معناداری تیمارهای روی و مس در نرخ مصرف نسبی غذا (RCR) مطابقت دارد.

۳-۲-۴- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر شاخص بازدهی غذای بلعیده شده

(Efficacy of conversion Of Ingested Food)

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (ECI)، تفاوت معناداری را در غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد بین تیمارها نشان نداد ($F=1.81$; $df_{t,e}=11, 108$; $P=0.0601$) (شکل ۷-۴).



شکل ۷-۴- شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (ECI) لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella*

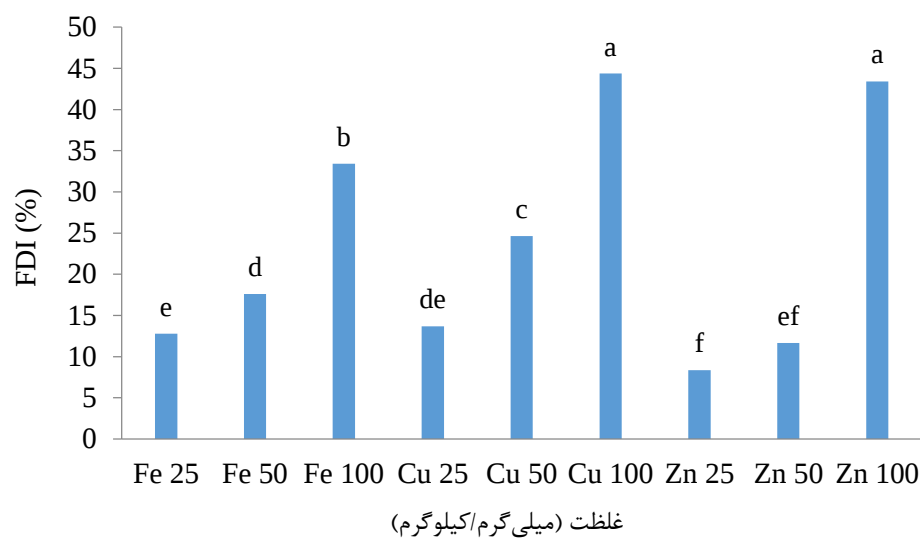
نتایج شکل ۷-۴ با نتایج پژوهش (Baghban *et al.*, 2014) مبنی بر عدم معناداری تیمارهای روی و مس در شاخص بازدهی غذای بلعیده شده (ECI) مطابقت دارد.

۴-۲-۴- تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر شاخص بازدارندگی تغذیه (Feeding

(Deterrent Index)

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر شاخص بازدارندگی تغذیه (FDI)، تفاوت معناداری بین غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد مشاهده شد

(F=223.41; dt,e=8, 80; P=0.0001) (شکل ۴-۸).



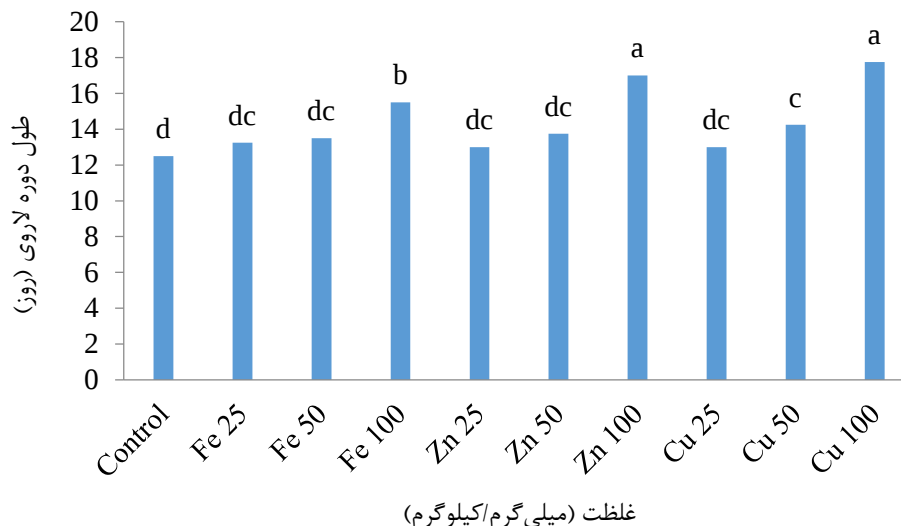
شکل ۴-۸- شاخص بازدارندگی تغذیه (FDI) لارو سن چهارم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella*

به طور کلی با افزایش غلظت نمک فلزات سنگین، شاخص بازدارندگی تغذیه نیز افزایش یافته است (شکل ۴-۸)؛ این مسئله حاکی از آن است که غلظت‌های پایین نیز می‌توانند اثرات ضد تغذیه‌ای داشته باشند. تحقیقات نشان داده است که فلزات سنگین سبب خسارت به غشای اپی‌تلیومی لوله گوارش حشرات می‌شوند (Emre et al., 2013). افزایش FDI در این تحقیق را می‌توان به علت مقابله حشره در برابر سمیت فلزات سنگین و کاهش خسارت به لوله گوارش با عدم تغذیه از غذای حاوی نمک فلزات سنگین دانست.

۳-۴- تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر روی مراحل مختلف

زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

۱-۳-۴- تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین بر طول دوره لاروی

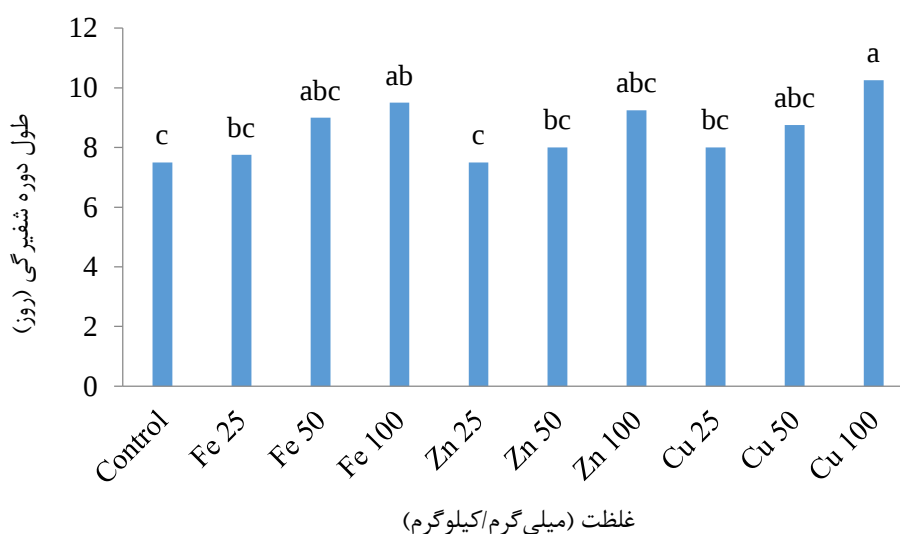


شکل ۴-۹- میانگین طول دوره لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، روی و مس

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر طول دوره لاروی نشان داد که بین نمک فلزات سنگین آهن، روی، مس و شاهد اختلاف معناداری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=19.52$; $df_{t,e}=9, 30$; $P=0.0001$). در غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلزات مس (17.75 ± 0.47 روز) و روی (17 ± 0.4 روز)، طول دوره لاروی افزایش معناداری نسبت به شاهد (12.5 ± 0.28 روز) پیدا کرده است (شکل ۴-۹). با توجه به نتایج به دست آمده افزایش غلظت نمک فلزات سنگین موجب افزایش طول دوره لاروی شده است. در این میان نمک فلز مس و روی بیشترین تاثیر را در افزایش طول دوره لاروی داشته‌اند که علت را می‌توان توانایی بالای این دو فلز در تجمع زیستی و پیوند با متالوتیونین‌ها دانست. در پژوهش Tupkara and Yanar (2020) نیز مشخص شد که با افزایش مقادیر آهن، مس و کبالت به رژیم غذایی، طول دوره لاروی افزایش می‌یابد.

همچنین طی مطالعه Kosalwat and Knight (1987) نتایج نشان داد کمینه غلظت مس در پشه *Chironomus decorus* Johannsen سبب افزایش طول دوره لاروی و شفیرگی و در نتیجه تاخیر در ظهور حشرات بالغ می‌شوند. به طور مشابه، نتایج در تحقیق Cheruiyot و همکاران (2013) بر رشد شکارگر *Podisus maculiventris* Say (Hemiptera: Pentatomidae) حاکی از آن بود که کمینه غلظت فلز روی و مس سبب کاهش وزن حشرات بالغ و افزایش زمان تبدیل مراحل نابالغ به بالغ می‌شوند که نتایج تحقیق اخیر با پژوهش‌های بیان شده مطابقت دارد. با رجوع به مطالبی که پیش‌تر بیان شد، می‌توان استنباط کرد که افزایش طول دوره لاروی می‌تواند به دلیل تغذیه بیشتر جهت افزایش ذخایر چربی و جبران انرژی از دست رفته‌ی ناشی از مسمومیت با نمک فلز سنگین باشد (Baghban et al., 2018).

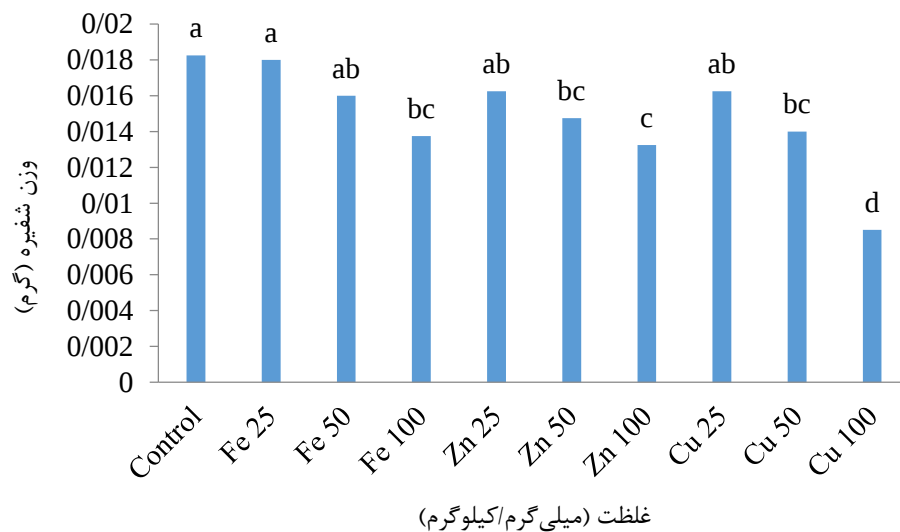
۴-۳-۲- تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین بر طول دوره شفیرگی



شکل ۴-۱۰- میانگین طول دوره شفیرگی شب‌پره مدیریت‌شده‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر طول دوره شفیرگی نشان داد که بین نمک فلزات سنگین آهن، روی، مس و شاهد اختلاف معناداری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=2.86$; $df_{t,e}=9, 30$; $P=0.0147$) (شکل ۴-۱۰). با توجه به نتایج به دست آمده افزایش غلظت نمک فلزات سنگین موجب افزایش طول دوره شفیرگی شده است. در این میان غلظت ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم نمک فلز مس بیشترین تاثیر را در افزایش طول دوره شفیرگی داشت (۸۵/۲۵±۱۰/۱۰ روز) (شکل ۴-۱۰). تحقیقات Huang و همکاران (2012) نشان داده است که مقادیر بالای مس سبب اختلال در عملکرد فیزیولوژیک در *Spodoptera litura* Fab. می‌شود. بنابراین می‌توان این گونه استنباط کرد که افزایش طول دوره شفیرگی به همین دلیل است که با نتایج تحقیق اخیر مطابقت دارد.

۴-۳-۳- تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین بر وزن شفیره



شکل ۴-۱۱- میانگین وزن شفیره شب‌پره مدیریت‌شده‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی

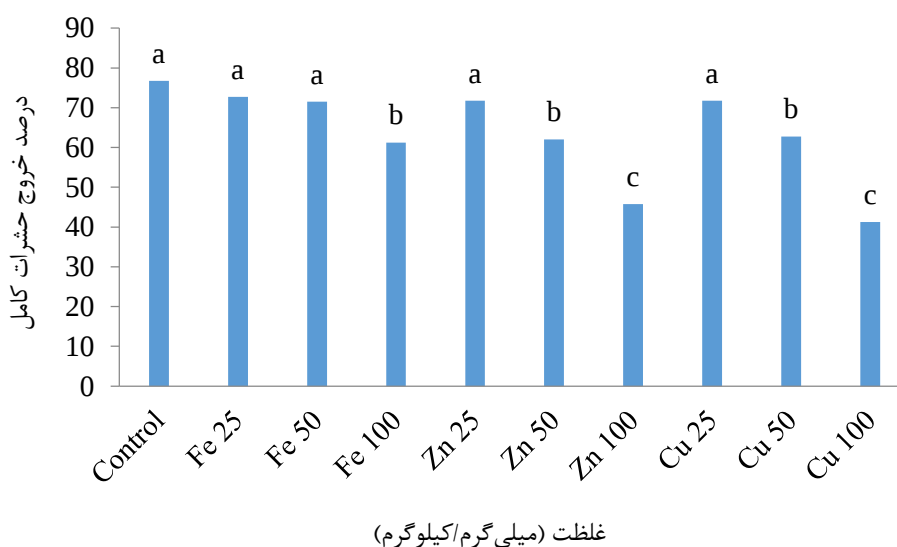
تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر وزن شفیره نشان داد که بین نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس و شاهد اختلاف معناداری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=12.31$; $df_{t,e}=9, 30$; $P=0.0001$) (شکل ۴-۱۱). با توجه به نتایج به دست آمده افزایش غلظت نمک فلزات سنگین موجب کاهش وزن شفیره شده است. در این میان غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلز مس بیشترین تاثیر را در کاهش وزن شفیره داشت (0.006 ± 0.0085 گرم) (شکل ۴-۱۱). Mircic و همکاران (2010) به بررسی جدول زندگی ابریشم‌باف ناجور *Lymantria dispar* L. طی تیمار با کادمیم پرداختند و نتایج نشان داد که استفاده از این فلز سنگین سبب کاهش طول عمر حشره، وزن شفیره و طول دوره شفیرگی می‌گردد.

با مطالعه مطالبی که پیش‌تر بیان شد، علت این امر را می‌توان اینطور استنباط کرد که به علت خسارت به غشای اپی‌تلیومی لوله گوارش (Emre et al., 2013)، تغذیه حشره دچار مشکل شده و در نتیجه آن اختلال در فیزیولوژی گوارش این آفت به وجود آمده که منجر به کاهش وزن شفیره شده

است. علاوه بر موارد گفته شده، تعیین تغییرات مقدار پروتئین کل در کل بدن یا بافت خاصی از حشرات در مشخص شدن این مسئله که آیا مواد موجود در رژیم غذایی توسط حشره به طور موثر مورد استفاده قرار می‌گیرد یا خیر و آیا بر رشد حشره تاثیر گذار است یا خیر، ضروری می‌باشد (Büyükgüzel, 2002; Büyükgüzel & İçen, 2004).

در مطالعه (Tupkara and Yanar (2020 مشخص شد که مقدار پروتئین شفیره *Hyphantria cunea* Drury با افزایش مقدار آهن و مس به رژیم غذایی کاهش می‌یابد و افزایش مقدار پروتئین با افزایش مقدار روی و کبالت مشاهده می‌شود. آن‌ها نتیجه گرفتند که مقدار پروتئین شفیره تحت تأثیر منفی این فلزات قرار می‌گیرد. همچنین وزن شفیره با افزایش مقدار آهن و مس در رژیم غذایی کاهش یافت. بنابراین کاهش مصرف غذا، بر وزن شفیره تأثیر منفی می‌گذارد.

۴-۳-۴- تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین بر درصد خروج حشرات کامل

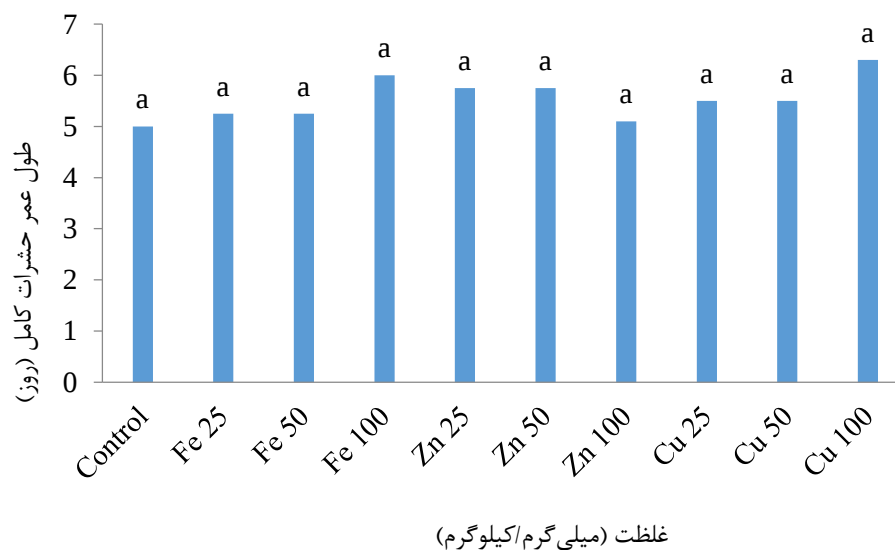


شکل ۴-۱۲- میانگین درصد خروج حشرات کامل شب‌پره مدیریت‌شده‌ای آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر درصد خروج حشرات کامل نشان داد که بین نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس و شاهد اختلاف معناداری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد ($F=34.81$; $df_{t,e}=9, 30$; $P=0.0001$) (شکل ۴-۱۲). با توجه به نتایج به دست آمده افزایش غلظت نمک فلزات سنگین موجب کاهش درصد خروج حشرات کامل شده است. در این میان غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نمک فلز مس همانند پارامترهای دیگر بیشترین تاثیر را در کاهش درصد خروج حشرات کامل داشت ($41/25 \pm 0/085$ ٪) نتایج تحقیقات Huang و همکاران (2012) نشان داد که مقادیر بالای مس سبب تخریب پروتئین و اختلال عملکرد فیزیولوژیک در *Spodoptera litura* Fab. می‌شود. بنابراین در تحقیق حاضر می‌توان استنباط کرد که مسمومیت حاصل از نمک فلزات سنگین به ویژه مس باعث اختلال در فیزیولوژی حشره و کاهش درصد خروج حشرات کامل شده است. به بیانی دیگر از آنجا که هورمون‌های اکلوژن و بورسیکون ماهیت پروتئینی داشته و مسئول جلداندازی حشره و خروج حشرات کامل در بالپولکداران هستند (Yu et al., 2020;)

Kong *et al.*, 2021)، این احتمال وجود دارد که نمک فلزات سنگین به خصوص مس سبب اختلال در این هورمون‌ها شده باشند و بدین ترتیب درصد خروج حشرات کامل کاهش یافته است. ذکر این نکته ضروری است که ساز و کار این امر خیلی روشن نیست و نیاز به تحقیقات تکمیلی دارد.

۴-۳-۵- تاثیر غلظت‌های مختلف نمک فلزات سنگین بر طول عمر حشرات کامل



شکل ۴-۱۳- میانگین طول عمر حشرات کامل شب‌پره مدیریت‌های آرد تحت تاثیر تغذیه با آرد حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌های آهن، مس و روی

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تاثیر نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس بر طول عمر حشرات کامل نشان داد که بین نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس و شاهد اختلاف معناداری در سطح احتمال ۱٪ وجود ندارد (شکل ۴-۱۳).

۴-۴- نتیجه گیری کلی

در منابع مختلف علمی، درباره فلزات سنگین تعاریف متعددی ارائه شده است؛ اما به طور کلی بار منفی در این تعاریف نهفته است. در تحقیق اخیر، نتایج نشان داد که نمک فلزات سنگین آهن، روی و مس تاثیر بسزای در ایمنی سلولی، ایمنی هیومرال، شاخص‌های تغذیه و خصوصیات زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد دارند. نتایج کلی بررسی‌های ایمنی شناسی، نشان داد که با افزایش غلظت نمک فلزات سنگین، سیستم ایمنی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد با افزایش پاسخ ایمنی سلولی و هیومرال، به مقابله با آن می‌پردازد. پاسخ ایمنی حشرات به فلزات سنگین متفاوت است و ساز و کار این پاسخ با توجه به ماهیت هر فلز فرق می‌کند که لازم است با توجه به ویژگی‌های متفاوت فلزات، تحقیقات کامل‌تری در این رابطه صورت گیرد. در بررسی شاخص‌های تغذیه آفت مذکور، سمیت نمک فلز آهن بیش از دو فلز دیگر بود و همین امر باعث شد که شب‌پره مدیترانه‌ای آرد تمام توان خود را صرف مبارزه با سمیت ناشی از فلز آهن کند و در نتیجه آن از ذخایر انرژی خود استفاده ببرد و که این امر سبب کاهش وزن حشره گردید. در مقابل تاثیر نمک فلزات مس و روی بر شاخص‌های تغذیه متفاوت از نمک فلز آهن بود و طی تیمار با فلزات مذکور، در غلظت پایین از نمک فلز مس، نرخ رشد نسبی افزایش قابل توجهی داشت. افزایش RGR برای حشره جنبه‌ای مثبت دارد. در بررسی خصوصیات زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، نمک فلز مس بیشترین تاثیر را بر طول دوره لاروی، طول دوره شفیرگی، وزن شفیره و درصد خروج حشرات کامل داشت. اثرات جانبی نمک فلزات مذکور، می‌تواند به عنوان عاملی موثر جهت کنترل این آفت در نظر گرفته شود و می‌توان از آن‌ها با تحقیقات بیشتر و در نظر گرفتن معیارهای مختلف و همه جانبه در تولید مواد شیمیایی کنترل کننده آفات بهره برد.

منابع

- (۱) باقری زنوز، ا. (۱۳۸۶). "آفات و عوامل زیان آور انباری و مدیریت کنترل آنها" انتشارات دانشگاه تهران، ۴۴۹ صفحه.
- (۲) پناهی اصل، ر. (۱۳۹۵). پایان نامه ارشد: "بررسی سمیت تنفسی اسانس گیاه پونه *Mentha longifolia* L. روی مراحل مختلف شب پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep:Pyralidae)"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا.
- (۳) توکلی ب. و عجم‌حسینی م. (۱۳۹۶) "بررسی تاثیر آفت‌کش‌های پالیزین، دیفلوبنزورون، کلروپایریفوس، هگزافلومورون و دلتامترین بر روی خصوصیات زیستی - جمعیتی و شاخص‌های تغذیه‌ای شب پره آرد *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lep: Pyralidae)" **مجله گیاه‌پزشکی کاربردی**، جلد ۶، شماره ۱، ص ۳۳-۲۵.
- (۴) خداپرست، س. (۱۳۹۴). پایان نامه ارشد: "بررسی فسفولیپیدها و تری‌گلیسریدهای بید مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep:Pyralidae) در رژیم‌های غذایی متفاوت" دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- (۵) سیدی کهنه شهری، ح. (۱۳۹۴) پایان نامه ارشد: "مطالعه شاخص‌های تغذیه‌ای و فعالیت آنزیم‌های گوارشی شب پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep:Pyralidae) روی سه میزبان مختلف غلات" دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.
- (۶) صالحی پور تمبانوئی، ح. (۱۳۹۶) پایان نامه ارشد: "بررسی و اندازه گیری فلزات سنگین (آهن و نیکل) و ارزیابی ریسک خطر ناشی از تاثیر این آلودگی‌ها در بافت عضله ماهی طلال در خلیج فارس" دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان.
- (۷) عجم حسینی، م. (۱۳۹۱) رساله دکتری: "واکنش‌های ایمنی پروانه برگ‌خوار سفید اشجار *Hyphantria cunea* (Drury) نسبت به قارچ *Beauveria bassiana*" دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان.
- (۸) مستقیم‌ن.، فتحی س. ع. ا.، نوری قنبلانی ق.، رزمجو ج. و رفیعی دستجردی ه. (۱۳۹۱) "تاثیر تراکم‌های مختلف لاروهای بید آرد *Ephestia kuehniella* و شب پره هندی *Plodia interpunctella* در کارایی پارازیت‌یسم زنبور *Habrobracon hebetor*" **مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران**، جلد ۴۳، شماره ۲، ص ۲۴۳-۲۵۰.
- (۹) مهرخو ف. و ترلک پ. (۱۳۹۴) "دموگرافی شب پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) روی ارقام مختلف گندم" **مجله آفات و بیماری‌های گیاهی**، جلد ۸۳، شماره ۲، ص ۱۶۱-۱۷۰.
- (10) Adelstein, S. and B. Vallee. (1961) "Copper metabolism in man" **J. of. The New England Medicine.**, 265, pp 892.
- (11) Ajamhassani, M. (2019). "Study on morphology and frequency of hemocytes in *Osphranteria coerulescense* (Redt) (Coleoptera: Cerambycidae) and *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) larvae, two wood boring insects of Iran." **Iranian Journal of Forest and Range Protection Research.**, 17, 1 pp 96-106.

- 12) Ajamhassani, M. and Amiri Jami, S. (2020). "Effect of ascorbic acid, sorbitol and mannitol carbohydrates on feeding indices and immune system of *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae)" **J. of. Biocontrol in Plant Protection.**, 7, 2, pp 77-90.
- 13) Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kanost, M.R. and Kramer, K.J. (2005). "Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning" **J. of. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 102, pp 11337-11342.
- 14) Arce, A.N., David, T.I., Randall, E.L., Rodrigues, A.R., Colgan, T.J., Wurm, Y. and Gill, R.J. (2017). "Impact of controlled neonicotinoid exposure on bumblebees in a realistic field setting" **J. of. Appl. Ecol.**, 54, pp 1199–1208.
- 15) Ashida, M. (1997). "Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade" **J. of. Molecular Mechanism of Immune Responses in Insects.**, pp 135-172.
- 16) Audi, G., Bersillon, O., Blachot, J. and Wapstra. A. (2003). "The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties" **J. of. Nuclear Physics A.**, 729 pp 3-128.
- 17) Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Vigues, B., Belzunces, L.P., Delbac, F. and Blot, N. (2012). "Parasite-insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee" **J. of. Sci. Rep.**, 2, pp 326.
- 18) Aznar, A., Chen, NWG., Thomine, S., Dellagi, A. (2015). "Immunity to plant pathogens and iron homeostasis" **J. of. Plant Sci.**, 240, pp 90–97.
- 19) Baghban, A., Jalali Sendi, J. and Zibae, A. (2015) "The effect of zinc (Zn²⁺) on cellular immune system of American cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae)" **J. of. Plant Pest Research.**, 5, 3, pp 71-84.
- 20) Baghban, A., Jalali Sendi, J. and Zibae, A. (2018) "Effect of essential and non-essential elements on cellular immune system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)" **J. of. ISJ.**, 15, pp 158-168.
- 21) Baghban, A., Jalali Sendi, J., Zibae, A. and Khosravi, R. (2014) "Effect of heavy metals (Cd, Cu, and Zn) on feeding indices and energy reserves of the cotton boll worm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)" **J. of. Plant Protection Research**, 54, 4, pp 367-373.
- 22) Bakri, A., Mehta, K., & Lance, D. R. (2005). "Sterilizing insects with ionizing radiation. In sterile insect technique" **J. of. Springer Netherlands.**, pp 233-268.
- 23) Balestra, V., Celli, G., and Porri, C. (1992). "Bees, honey, larvae and pollen in biomonitoring of atmospheric pollution" **J. of. Aerobiologia.**, 8, pp 122-126.
- 24) Bang, K., Park, S., Yoo, J., and Cho, S. (2012). "Characterization and expression of attacin, an antibacterial protein-encoding gene, from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)" **J. of. Molecular Biology Reports B.**, 39, pp 5151–5159.
- 25) Banks, H. J., & Fields, P. G. (1995). "Physical methods for insect control in stored-grain ecosystems" **J. of. Marcel dekker, new york.**, vol. 353.
- 26) Barah, A. & Sengupta, A.K. (1991). "Correlation and regression studies between pupal weight and fecundity of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae) on four different food plants." **J. of. Acta Physiologica Hungarica**, 78, 3 pp 261-264.
- 27) Bonte, J., Van de Walle, A., Conlong, D. and De Clercq, P. (2017). "Eggs of *Ephestia kuehniella* and *Ceratitis capitata*, and motile stages of the astigmatid

- mites *Tyrophagus putrescentiae* and *Carpoglyphus lactis* as factitious foods for *Orius* spp.” **J. of Insect Science.**, **24**, pp 613-622.
- 28) Borges, A., Santos, P., Furtado, A. and Figueiredo, R. (2008). “Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)” **J. of. Micron.**, **39**, pp 486-494.
 - 29) Boyce, S. and Tipton, K. F. (2001). “Enzyme Classification and Nomenclature” **J. of. Encyclopedia of Life Sciences.**, pp 1-11.
 - 30) Boyd, R. S. (2010). “Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers” **J. of. Chemical Ecology.**, **36** pp 46-58.
 - 31) Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Diaz-Cetti, S., Invernizzi, C., de la Escalera, G.M., Mendoza, Y., Santos, E., Silva, C., Zunino, P. and et al. (2019). “Impact of nutritional stress on the honeybee colony health” **J. of. Sci. Rep.**, **9**, pp 1-11.
 - 32) Brandt, E. G., Hellgren, M., Brinck, T., Bergman, T., and Edholm, O. (2009). “Molecular dynamics study of zinc binding to cysteines in a peptide mimic of the alcohol dehydrogenase structural zinc site” **J. of. Physical Chemistry Chemical Physics.**, **11**, pp 975-983.
 - 33) Brivio, M.F., Mastore, M. and Pagani, M. (2005). “Parasite-host relationship: a lesson from a professional killer” **J. of. Insect Science.**, **2**, pp 41-53.
 - 34) Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. p., Zelko, I. and Lux, A. (2007). “Zinc in plants” **J. of. New Phytologist.**, **173**, pp 677-702.
 - 35) Broderick, N. A., Welchman, D. P., & Lemaitre, B. (2009). “**Recognition and response to microbial infection in *Drosophila***” Oxford University Press: New York, NY, USA. pp 13-33.
 - 36) Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J-L. and Hoffmann, D. (1999). “Antimicrobial peptides in insects structure and function” **J. of. Developmental & Comparative Immunology.**, **23**, pp 329-344.
 - 37) Büyükgüzel, K. & İçen, E. (2004). “Effects of gyrase inhibitors on the total protein content of *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larvae reared on an artificial diet.” **J. of. Entomological Science**, **39**, **1** pp 108-116.
 - 38) Büyükgüzel, K. (2002). “Antimicrobial agents: their combined effects on total protein content of the endoparasitoid *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae).” **Turkish Journal of Zoology**, **26**, **2** pp 229-237.
 - 39) Cass, A., and Hill, H. (1980). “Copper proteins and copper enzymes” **J. of. Biological Roles of Copper.**, pp 71-85.
 - 40) Cerenius, L. and Soderhall, K. (2004). “The prophenoloxidase-activating system in invertebrates” **J. of. Immunol. Rev.**, **198**, pp 116–126.
 - 41) Chan, Q. W., Howes, C. G., & Foster, L. J. (2006). “Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph” **J. of. Molecular & Cellular Proteomics**, **5**, **12**, pp 2252-2262.
 - 42) Cheruiyot, D. J., Boyd, R. S., Coudron, T. A. and Cobine, P. A. (2013). “Biotransfer, bioaccumulation and effects of herbivore dietary Co, Cu, Ni, and Zn on growth and development of the insect predator *Podisus maculiventris* (Say)” **J. of. Chemical Ecology.**, **39**, pp 764-772.
 - 43) Coles, J. A., Farley, S. R. and Pipe, R. K. (1995). “Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium” **J. of. Diseases of Aquatic Organisms.**, **22**, pp 59-65.

- 44) Collison, E., Hird, H., Cresswell, J. and Tyler, C. (2016). “Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health—A critical analysis” **J. of. Biol. Rev.**, **91**, pp **1006–1019**.
- 45) Correia, A. A. (2008). “Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss)” **J. of. Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco**.
- 46) Coutinho, H. D., and Barbosa, A. R. (2007). “Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização” **J. of. Silva Lusitana.**, **15**, pp **103-117**.
- 47) Czerwinski, M.A. and Sadd, B. (2017). “Detrimental interactions of neonicotinoid pesticide exposure and bumblebee immunity” **J. of. Exp. Zool. Part A-Ecol. Integr. Physiol.**, **327**, pp **273–283**.
- 48) De Oliveira David, J. A., Salaroli, R. B. and Fontanetti, C. S. (2008). “The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments” **J. of. Micron.**, **39**, pp **1293-1299**.
- 49) Di Pasquale, G., Alaux, C., Le Conte, Y., Odoux, J.F., Pioz, M., Vaissiere, B.E., Belzunces, L.P. and Decourtye, A. (2016). “Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health” **J. of. PLoS ONE.**, **11**, pp **1-15**.
- 50) Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.L. and Alaux, C. (2013). “Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter?” **J. of. PLoS ONE.**, **8**, pp **1-13**.
- 51) Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G. and Pennacchio, F. (2013). “Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees” **J. of. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **110**, pp **18466–18471**.
- 52) Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J. and Kanost, M.R. (2004). “Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*” **J. of. Insect Biochem. Mol. Biol.**, **34**, pp **29-41**.
- 53) Dubovskiy, I. M., Grizanova, E.V., Ershova, N.S., Rantala, M.J. and Glupov, V.V. (2011) “The effect of dietary nickel on detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*.” **J. of. Chemosphere.**, **85** pp **92-96**.
- 54) Duruibe, J., Ogwuegbu, M., and Ekwurugwu, J. (2007). “Heavy metal pollution and human biotoxic effects” **International J. of. Physical Sciences.**, **2**, pp **112-118**.
- 55) Ebrahimi, M & Ajamhassani, M. (2020). “Investigating the effect of starvation and various nutritional types on the hemocytic profile and phenoloxidase activity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae).” **J. of. ISJ** **17** pp **175-185**.
- 56) Edding, M. E., Flores, H. and Claudio, M. (1995). “Experimental Usage of Copper-Nickel Alloy Mesh in Mariculture. Part 1: Feasibility of usage in a temperate zone; Part 2: Demonstration of usage in a cold zone” **J. of. Final report to the International Copper Association Ltd**.

- 57) Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O. and Cogun, H.Y. (2013). "Changes in Antioxidative Enzyme Activity, Glycogen, Lipid, Protein, and Malondialdehyde Content in Cadmium-Treated *Galleria mellonella* Larvae" **J. of. Annals of the Entomological Society of America.**, **106**, pp 371-377.
- 58) Emsley, J. (2011). "Nature's building blocks: an AZ guide to the elements" Oxford University Press.
- 59) Eriksson, A., Anfora, G., Lucchi, A., Lanzo, F. & Virant-Doberlet, M. (2012). "Exploitation of insect vibrational signals reveals a new method of pest management" **J. of. Pone.**, pp 1-5.
- 60) Faroni, I. D. A., Guedes, R. N. C., & Mاتيoli, A. L. (2000). "Potential of *acarophenax lacunatus* (prostigmata: acarophenacidae) as a biological control agent of *rhyzopertha dominica* (coleoptera: bostrichidae)" **J. of. stored products research.**, **36**, **1**, pp 55-63.
- 61) Fauser-Misslin, A., Sadd, B., Neumann, P. and Sandrock, C. (2014). "Influence of combined pesticide and parasite exposure on bumblebee colony traits in the laboratory" **J. of. Appl. Ecol.** **51**, pp 450–459.
- 62) Feldhaar, H and Otti, O. (2020) "Pollutants and Their Interaction with Diseases of Social Hymenoptera" **J. of. Insects.**, **11**, pp 153.
- 63) Fleeger, J. W., Carman, K.R. and Nisbet, R.M. (2003). "Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems" **J. of. Science of the Total Environment.**, **317**, pp 207-233.
- 64) Fosmire, G. J. (1990). "Zinc toxicity". **The American J. of. clinical nutrition.**, **51**, pp 225-227.
- 65) Fountain, M. T., and Hopkin, S.P. (2001). "Continuous Monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a Metal Exposure Test" **J. of. Ecotoxicology and Environmental Safety** **48**, pp 275-286.
- 66) Freeman, J.L., Stormy Dawn, L., Quinn, C.F., Sirine, F., Marcus, M.A. & Pilon-Smits, E.A.H. (2007). "Selenium accumulation protects plants from herbivory by Orthoptera via toxicity and deterrence." **J. of. New Phytologist**, **175**, 3 pp 490-500.
- 67) Freitak, D., Wheat, C.W., Heckel, D.G. and Vogel, H. (2007). "Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*" **J. of. BMC Biology.**, **5**, pp 56.
- 68) Ghasemi, M., Jalali Sendi, J. & Zibae, A. (2018). "Effect of casein and zein as additives on some nutritional and immunological indices of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep: Pyralidae)" **J. of. Plant Pest Research.**, **8**, 2 pp 25–39. (In Persian with English summary)
- 69) Ghasemi, V., Moharramipour, S. and Sendi, J. (2013). "Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell.(Lep: Pyralidae) and their response to thermal stress" **J. of. Invertebrate Survival.**, **10**, pp 128-140.
- 70) Ghini, S., Fernandez, M., Pico, Y., Marin, R., Fini, F., Manes, J. and Girotti, S. (2004). "Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators" **J. of. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.**, **47**, pp 479-488.
- 71) Gill, R.J. and Raine, N.E. (2014). "Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure" **J. of. Funct. Ecol.**, **28**, pp 1459–1471.

- 72) Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. and Raine, N.E. (2012). "Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees" **J. of. Nature.**, **491**, pp 105–119.
- 73) Gorman, M.J., Wang, Y., Jiang, H. and Kanost, M.R. (2007). "*Manduca sexta* hemolymph proteinase 21 activates prophenoloxidase-activating proteinase 3 in an insect innate immune response proteinase cascade" **J. of. Biol. Chem.**, **282**, pp 11742-11749.
- 74) Görür, G. (2010). "Zinc and cadmium accumulation in cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) host plants and developmental instability." **J. of. Insect Science.**, **16** pp 65-71.
- 75) Goulson, D. (2013). "An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides" **J. of. Appl. Ecol.**, **50**, pp 977–987.
- 76) Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. and Rotheray, E.L. (2015). "Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers" **J. of. Science.**, **347**, 1255957.
- 77) Hammond, C. R. (2004). "**The Elements, in Handbook of Chemistry and Physics 81st edition**" CRC press.
- 78) Han, F. X., Banin, A., Su, Y., Monts, D.L., Plodinec, J.M., Kingery, W.L. and Triplett, G.E. (2002). "Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere" **J. of. Naturwissenschaften.**, **89**, pp 497-504.
- 79) Hare, L. (1992). "Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity" **J. of. CRC Critical Reviews in Toxicology.**, **22**, pp 327-369.
- 80) Heath, A. G. (1987). "Water Pollution and Fish Physiology" **J. of. CRC Press.**, **2**, pp 245.
- 81) Heliövaara, K., Väisänen, R. & Kemppe, E. (1989). "Change of pupal size of *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Bupalus piniarius* (Geometridae) in response to concentration of industrial pollutants in their food plant." **J. of. Oecologia**, **79** pp 179-183.
- 82) Hernandez Lopez, J., Krainer, S., Engert, A., Schuehly, W., Riessberger-Gallé, U. and Crailsheim, K. (2017). "Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae" **J. of. Sci. Rep.**, **7**, 40853.
- 83) Huang, D., Kong, J. and Seng, Y. (2012). "Effects of the heavy metal Cu²⁺ on growth, development, and population dynamics of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)" **J. of. Economic Entomology.**, **105**, pp 288-294.
- 84) Huang, Y. and Ho, S. H. (1998) "Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch" **J. of. Stored Products Research.**, **34**, **1**, pp 11-17.
- 85) Huffman, R., Fuchs, T., Benedict, J., Parker, R., Sparks, S., Norman, J., Leser, J., Knuston, A., Minzenmayer, R., and Frisbie, R. (1996). "Management guidelines for the beet armyworm on cotton" **J. of. Texas A and M University; Texas Agriculture Extension Service Bulletin.**, **11** pp.
- 86) Hultmark, D., Engstrom, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., and Boman, H.G. (1983). "Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*." **J. of. EMBO.**, **2**, pp 571–576.

- 87) Hyrsel, P. (2011). "Pathogenicity of four entomopathogenic nematodes species to *G. mellonella* larvae" **J. of. Karaelmas Science and Engineering**, **1**, **1**, pp 1-6.
- 88) Ilijin L., Periać-Mataruga V., Radojičić R., Lazarević J., Nenadović V., Vlahović M., Mrdaković M. (2009) "Effects of cadmium on protocerebral neurosecretory neurons and fitness components in *Lymantria dispar* L." **J. of. Folia. Biol. (Krakow)** **58**, (1-2), pp 91-99.
- 89) Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., & Kanost, M. R. (1997). "Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1" **J. of. Insect biochemistry and molecular biology**, **27**, **10**, pp 835-850.
- 90) Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. and Söderhäll, K. (2006). "Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization" **J. of. Immunobiology**, **211**, pp 213-236.
- 91) Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyaluksana, K. and Söderhäll, K. (2000). "Crustacean haemocytes and haematopoiesis" **J. of. Aquaculture**, **191**, pp 45-52.
- 92) Jones, J. C. (1962). "Current concepts concerning insect hemocytes" **J. of. American Zoologist**, pp 209 - 246.
- 93) Jones, J. C. (1967). "Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus)" **J. of. The Biological Bulletin**, **132**, **2**, pp 211-221.
- 94) Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G. & Giband, M. (1998). "Transgenic plants for insect resistance" **J. of. Plant Science**, **131**, **1**, pp 1-11.
- 95) Kazemi-Dinan, A., Thomaschky, S., Stein, R.J., Krämer, U. & Müller, C. (2014). "Zinc and cadmium hyperaccumulation act as deterrents towards specialist herbivores and impede the performance of a generalist herbivore." **J. of. New Phytologist**, **202** pp 628-639.
- 96) Keeley, L.L. (1985). "Physiology and biochemistry of the fat body. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*" **Pergamon Press, Oxford, UK**. pp: 211-248.
- 97) Kong, H., Jing, W., Yuan, L., Dong, C., Zheng, M., Tian, Z., Hou, Q., Cheng, Y., Zhang, L., Jiang, X & Luo, L. (2021). "Bursicon mediates antimicrobial peptide gene expression to enhance crowded larval prophylactic immunity in the oriental armyworm, *Mythimna separate*." **J. of. Developmental & Comparative Immunology**, **115**, pp 1-9.
- 98) Koricheva, J., Larsson, S. and Haukioja, E. (1998) "Insect performance on experimentally stressed woody plants: a meta-analysis" **J. of. Annual Review of Entomology**, **43**, **1**, pp 195-216.
- 99) Kosalwat, P. and Knight, A. W. (1987). "Chronic toxicity of copper to a partial life cycle of the midge, *Chironomus decorus*" **J. of. Archives of Environmental Contamination and Toxicology** **16**, pp 283-290.
- 100) Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). "Insect hemocytes and their role in immunity" **J. of. Insect biochemistry and molecular biology**, **32**, **10**, pp 1295-1309.
- 101) Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S. Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Ryu, K.S., Seo, S.J., Kim, C.H., and Lee, I.H. (2004). "Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*" **J. of. Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **13**, pp 65-72.

- 102) Leonard, C., Söderhäll, K., & Ratcliffe, N. A. (1985). "Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes" **J. of. Insect Biochemistry.**, **15**, **6**, pp **803-810**.
- 103) Lill, J. T., and Marquis, R.J. (2003). "Ecosystem engineering by caterpillars increases insect herbivore diversity on white oak" **J. of. Ecology.**, **84**, pp **682-690**.
- 104) Lindqvist, L. (1992). "Accumulation of cadmium, copper, and zinc in five species of phytophagous insects" **J. of. Environmental Entomology.**, **21**, pp **160-163**.
- 105) Lippard, S. J., and Berg, J.M. (1994). "**Principles of bioinorganic chemistry**" University Science Books Mill Valley, CA.
- 106) Lunardi, S.J., Zaluski, R. and Orsi, R.O. (2017). "Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides Fipronil and Imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae)" **J. of. Sociobiology.**, **64**, pp **50–56**.
- 107) Mahmood, A., and Yousaf, M. (1985). "Effect of some insecticides on the haemocytes of *Gryllus bimaculatus*" **de Geer. Pak. J. Zool.**, **17**, **1**, pp **71-84**.
- 108) Malakar, C., Ganguly, A. and Haldar, P. (2009). "Influence of cadmium on growth, survival and clutch size of a common Indian short horned grasshopper, *Oxya fuscovittata*." **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences.**, **1**, pp **32-36**.
- 109) Maret, W. (2001). "Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis—recent insights and current trends." **J. of. Biometals.**, **14**, **3**, pp **187-190**.
- 110) Maret, W. (2013). "Chapter 14: Zinc and the Zinc Proteome. In Banci, Lucia (Ed.). Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences 12. Springer. Prasad, A. S. 2008. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells" **J. of. Molecular medicine**, **14**, pp **353- 359**.
- 111) Marino, F., Stürzenbaum, S., Kille, P. and Morgan, A. (1998). "Cu–Cd interactions in earthworms maintained in laboratory microcosms: the examination of a putative copper paradox" **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: J. of. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.**, **120**, pp **217-223**.
- 112) Marmaras, V.J. and Lampropoulou, M. (2009). "Regulators and signaling in insect haemocyte immunity" **J. of. Cell Signal.**, **21**, pp **186-95**.
- 113) Marshall A. (1983). "X-ray microanalysis of copper and sulphur-containing granules in the fat body cells of homopteran insects" **J. of. Tissue and Cell.**, **15**, **2**, pp **311-315**.
- 114) Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D. and Marin, M. (2001). "Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*" **Archives of J. of. Environmental Contamination and Toxicology.**, **41**, pp **163-170**.
- 115) Mayrand, E., St-Jean, S.D. and Courtenay, S.C. (2005). "Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate?" **J. of. Aquaculture Research.**, **36**, pp **962-971**.
- 116) McPherson, T. D., Mirza, R.S. and Pyle, G.G. (2004). "Responses of wild fishes to alarm chemicals in pristine and metal-contaminated lakes." **J. of. Canadian Journal of Zoology.**, **82**, pp **694-700**.

- 117) Meiser, J., Lingam, S. and Bauer, P. (2011). "Posttranslational regulation of the iron deficiency basic helix-loop-helix transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxide" **J. of. Plant Physiol.**, **157**, pp 54–66.
- 118) Mirčić, D., Janković-Tomanić, M., Nenadović, V., Franeta, F. and Lazarević, J. (2010). "The effects of cadmium on the life history traits of *Lymantria dispar* L." **Archives of J. of. Biological Sciences.**, **62**, pp 1013-1020.
- 119) Miresmailli, S. & Isman, M. B. (2014). "Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions" **J. of. Trends in plant science.**, **19**, **1**, pp 29-35.
- 120) Mitterbock, F. and Fuhrer, E. (1988) "Effect of fluoride-polluted spruce leaves on nun moth caterpillars (*Lymantria monacha*)" **J. of. Applied Entomology.**, **105** pp 19-27.
- 121) Morant, AV., Jorgensen, K., Jorgensen, C., Paquette, SM., Sanchez-Perez, R, et al. (2008). "β-Glucosidases as detonators of plant chemical defense" **J. of. Phytochemistry.**, **69**, pp 1795–813.
- 122) Muysen, B. T. A.; De Schamphelaere, K. A. C. and Janssen, C. R. (2006). "Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*". **J. of. Aquatic Toxicology.**, **77**, **4**, pp 393–401.
- 123) Nappi A.J. and Ottavaiani E. (2000). "Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates." **J. of. BioEssays**, **22**, pp 469-480.
- 124) Nazir, A., Malik, R.N., Ajaib, M., Khan, N. and Siddiqui, M.F. (2011). "Hyperaccumulators of heavy metals of industrial areas of Islamabad and Rawalpindi." **Pakistan Journal of Botany.**, **43**, pp 1925-1933.
- 125) Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. and Hashemi, S.A. (2013) "Efficiency of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on nutritional indices of *Plutella xylostella*" **Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, **29**, **3**, pp 692-708.
- 126) Nogarol, L. R., and Fontanetti, C.S. (2010). "Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissue responses of the midgut." **J. of. Micron.**, **41**, pp 239-246.
- 127) Nummelin, M., Lodenius, M., Tulisalo, E., Hirvonen, H. and Alanko, T. (2007). "Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution." **J. of. Environmental Pollution.**, **145**, pp 339-347.
- 128) Nuorteva, P., Nuorteva, S. and Mathur, B. (1992). "Excretory inhibition of bioaccumulation in Lepidoptera." **VIth Int. Conf. Bioindicators Deterioration of Regionis. Pages 362-367 in Proc.**
- 129) O'Neal, S.T., Anderson, T.D. and Wu-Smart, J.Y. (2018). "Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. Curr. Opin." **J. of. Insect Sci.**, **26**, pp 57–62.
- 130) Ortel, J. (1995). "Effects of metals on the total lipid content in the gypsy moth (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepid.) and its hemolymph" **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.**, **55**, pp 216-221.
- 131) Ourth, D.D., Lockey, T.D., and Renis, H.E. (1994). "Induction of cecropin-like and attacin-like antibacterial but not antiviral activity in *Heliothis virescens* larvae." **J. of. Biochemical and Biophysical Research Communications.**, **200**, pp 35–44.
- 132) Parizanganeh, A., Hajisoltani, P. and Zamani, A. (2010). "Concentration, distribution and comparison of total and bioavailable metals in top soils and

- plants accumulation in Zanjan Zinc Industrial Town-Iran.” **J. of. Procedia Environmental Sciences.**, **2**, pp 167-174.
- 133) Park, J. D., Liu, P. and Klaassen, C.D. (2001). “Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals.” **J. of. Toxicology.**, **163**, pp 93-100.
 - 134) Peck, S. L., McQuaid, B. and Campbell, C.L. (1998). “Using ant species (Hymenoptera: Formicidae) as a biological indicator of agroecosystem condition.” **J. of. Environmental entomology.**, **27**, pp 1102-1110.
 - 135) Pipe, R. K., and Coles, J.A. (1995). “Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs.” **J. of. Fish & Shellfish Immunology**, **5**, pp 581-595.
 - 136) Pipe, R., Coles, J., Carissan, F. and Ramanathan, K. (1999). “Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*.” **J. of. Aquatic toxicology.**, **46**, pp 43-54.
 - 137) Polykretis, P., Delfino, G., Petrocelli, I., Cervo, R., Tanteri, G., Montori, G., Perito, B., Branca, J.J.V., Morucci, G. and Gulisano, M. (2016) “Evidence of immunocompetence reduction induced by cadmium exposure in honey bees (*Apis mellifera*)” **J. of. Environ. Pollut**, **218** pp 826–834.
 - 138) Prasad, A. S. (2008). “Zinc in human health: effect of zinc on immune cells” **J. of. Molecular medicine.**, **14**, pp 353- 359.
 - 139) R’omheld, V. (1987). “Different strategies for iron acquisition in higher plants.” **J. of. Physiol. Plant.**, **70**, pp 231–34.
 - 140) Rajendran, S. & Sriranjini, V. (2008). “Plant products as fumigants for storedproduct insect control” **J. of. stored products research.**, **44**, pp 126-135.
 - 141) Rao, X.J., and Yu, X.Q. (2010). “Lipoteichoic acid and lipopolysaccharide can activate antimicrobial peptide expression in the tobacco hornworm *Manduca sexta*.” **J. of. Developmental & Comparative Immunology**, **34**, pp 1119–1128.
 - 142) Rezaei V., Moharramipour S., Fathipour Y., & Talebi A.A. (2006). “Nutritional indices and host preference of American white webworm, *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae) on five host plants.” **J. of. Entomological Society of Iran.**, **26**, **1**, pp 33-43.
 - 143) Robinson, W. and Ryan, D. (1988). “Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*.” **J. of. Marine Biology.**, **97**, pp 101-109.
 - 144) Roesijadi, G., Brubacher, L., Unger, M. and Anderson, R. (1997). “Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium *in Vitro*.” Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **J. of. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.**, **118**, pp 171-176.
 - 145) Roma, G.C., Bueno, O.C. and Camargo-Mathias, M.I. (2010). “Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review.” **J. of. Micron.**, **41**, pp 395-401.
 - 146) Rudrappa, T., Czymmek, KJ., Par’ e, PW. and Bais, HP. (2008). “Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria.” **J. of. Plant Physiol.**, **148**, pp 1547–56.
 - 147) Saber, M and Abedi, Z. (2013). “Effects of methoxyfenozide and pyridalyl on the larval ectoparasitoid *Habrobracon hebetor*.” **J. of. Pest Scince.**, **86**, pp 685–693.

- 148) Sanchez, M. L. (2008). "Causes and Effects of Heavy Metal Pollution." **J. of. Nova Science Publishers, Hauppauge.** p 392.
- 149) Sanchez-Bayo, F. and Wyckhuys, K.A.G. (2019). "Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers" **J. of. Biol. Conserv., 232**, pp 8–27.
- 150) Sanchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K. and Desneux, N. (2016). "Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review." **J. of. Environ. Int., pp 89–90, 7–11.**
- 151) Scheirs, J., Vandevyvere, I., Wollaert, K., Blust, R. & Bruyn, L.D. (2006). "Plant-mediated effects of heavy metal pollution on host choice of a grass miner." **J. of. Environmental Pollution, 143** pp 138-145.
- 152) Servia, M., Cobo, F. and Gonzalez, M. (1998). "Deformities in larval *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818)(Diptera, Chironomidae) and their use as bioindicators of toxic sediment stress." **J. of. Hydrobiologia., 385**, pp 153-162.
- 153) Shabani nejad, A., Ajamhassani, M. and Tafaghodinia, B. (2016). "Optimization of using pesticide deltamethrin against *Galleria mellonella* by response surface method in laboratory conditions" **J. of. Plant Pest Research, 6, 2**, pp 53-62.
- 154) Sharma, R. K., and Agrawal, M. (2005). "Biological effects of heavy metals: an overview." **Journal of Environmental Biology/Academy of Environmental Biology, India 26**, pp 301-313.
- 155) Shayesteh, N., & Ashouri, S. (2010). "Effect of four powdered spices as repellents against adults of *Rhyzopertha dominica* (F.), *Sitophilus granarius* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) in laboratory conditions." **J. of. Julius-Kühn-Archiv, 425**, pp 799.
- 156) Sheeba, G., Seshadri, S., Raja, N., Janarthanan, S. & Ignacimuthu, S. (2001). "Efficacy of *beauveria bassiana* for control of the rice weevil *sitophilus oryzae* (l.)(coleoptera: curculionidae)." **J. of. Applied entomology & zoology, 36, 1**, pp 117-120.
- 157) Sivakoff, F.S. and Gardiner, M.M. (2017). "Soil lead contamination decreases bee visit duration at sunflowers." **J. of. Urban Ecosyst., 20**, pp 1221–1228.
- 158) Srinivasan, R. and Uthamasamy, S. (2005). "Studies to elucidate antibiosis resistance in selected tomato accessions against fruit worm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera :Noctuidae)." **J. of. Resistant Pest Management Newsletter., 14**, pp 24-25.
- 159) Stanley, D.A., Russel, A.L., Morrison, S.J., Rogers, C. and Raine, N.E. (2016). "Investigating the impacts of field-realistic exposure to a neonicotinoid pesticide on bumblebee foraging, homing ability and colony growth." **J. of. Appl. Ecol., 53**, pp 1440–1449.
- 160) Strand, M. R. (2008). "Insect hemocytes and their role in immunity." **J. of. Insect Immunology., pp 25-47.**
- 161) Subramanyam, B. (ed.). (1995). "**Integrated management of insects in stored products**". Crc press.
- 162) Sugiyama, M., Kuniyoshi, H., Kotani, E., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Shimabukuro, M., Chowdhury, S., Xu, J. (1995). "Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins." **J. of. Insect Biochemistry and Molecular Biology., 25**, pp 385-392.
- 163) Sun, H. X., Q. Zhuo, W. C. Tang, Y. H. Shu and G. R. Zhang. (2008) "Effect of dietary Nickel on detoxification enzyme activities in the midgut of *Spodoptera litura fabricus* larvae" **J. of. China Science Bulletin., 53** pp 3324-3330.

- 164) Sun, H. X., Z. Dang, Q. Xia, W.C. Tang and G. R. Zhang. (2011) "The effect of dietary nickel on the immune responses of *Spodoptera litura* Fabricius larvae" **J. of. Insect Physiology.**, **57** pp **954-961**.
- 165) Topkara, E. F and Yanar, O. (2020). "Effects of Heavy Metals with Different Concentrations on Some Biological Properties of *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) Larvae" **J. of. Anatolian Environmental and Animal Sciences.**, **5**, **4** pp **685-690**.
- 166) Tsakas, S. and Marmaras, V.J. (2010). "Insect immunity and its signaling: an overview." **Insect Science Journal.**, **7**, pp **228-238**.
- 167) Upadhyay, R K., & Ahmad, S. (2011). "Management strategies for control of stored grain insect pests in farmer stores and public ware houses." **J. of. World j agric sci**, **7**, pp **527-549**.
- 168) Urbini, A., Sparvoli, E., and Turillazzi, S. (2006). "Social paper wasps as bioindicators: a preliminary research with *Polistes dominulus* (Hymenoptera Vespidae) as a trace metal accumulator." **J. of. Chemosphere.**, **64**, pp **697-703**.
- 169) Van Capelleveen, H., Van Straalen, N., Van Den Berg, M. and Van Wachem, E. (1986). "Avoidance as a mechanism of tolerance for lead in terrestrial arthropods." **Pages 251-254 in Proceedings of the Third European Congress of Entomology, Amsterdam.**
- 170) Van Ooik, T., Pausio, S. and Rantala, M. J (2008). "Direct effects of heavy metal pollution on the immune function of a geometrid moth, *Epirrita autumnata*." **J. of. Chemosphere** **71**, **10** pp **1840-1844**.
- 171) Van Ooik, T., Rantala, M. J. and Saloniemi, I. (2007) "Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*" **J. of. Environmental Pollution.**, **145**, **1**, pp **348-354**.
- 172) Vest, K. E., Hashemi, H.F. and Cobine, P.A. (2013). "Chapter 13: The Copper Metallome in Eukaryotic Cells". In Banci, Lucia (Ed.). **Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences 12. Springer.**
- 173) Victor, B. (1993). "Responses of hemocytes and gill tissues to sublethal cadmium chloride poisoning in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst)." **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.**, **24**, pp **432-439**.
- 174) Vlahović, M., Ilijin, L., Lazarević, J., Mrdaković, M., Gavrilović, A., Matić, D. and Mataruga, V.P. (2014). "Cadmium-induced changes of gypsy moth larval mass and protease activity." **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: J. of. Toxicology & Pharmacology**, **160**, pp **9-14**.
- 175) Wagner, D.L. (2020). "Insect declines in the anthropocene." **J. of. Annu. Rev. Entomol.**, **65**, pp **457-480**.
- 176) Warrington, S. (1987). "Relationship between SO₂ dose and growth of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, on peas." **J. of. Environmental Pollution** **43**, pp **155-162**.
- 177) Wilson, R., and Ratcliffe, N. A. (2000) "Effect of lysozyme on the lectin-mediated phagocytosis of *Bacillus cereus* by haemocytes of the cockroach, *Blaberus discoidalis*." **J. of Insect Physiology.**, **46**, **5**, pp **663-670**.
- 178) Wu, G. X., Ye, G.Y., Hu, C. and Cheng, J. A. (2006). "Accumulation of cadmium and its effects on growth, development and hemolymph biochemical compositions in *Boettcherisca peregrina* larvae (Diptera: Sarcophagidae)." **J. of. Insect Science.**, **13**, pp **31-39**.

- 179) Wu, G., Gao, X., Zhu, J., Hu, C. & Ye, G. (2014). "Copper resistance selection and activity changes of antioxidants in the flesh fly *Boettcherisca peregrina*." **J. of. Insect Science**, **14**, 1 pp 1161.
- 180) Xu, J., Wang, Q. and He, X. Z. (2008). "Emergence and reproductive rhythms of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera:Pyralidae)." **J. of. New zeland palant protection.**, **61**, pp 277-282.
- 181) Xu, L., Ma, L., Wang, W., Li, L. and Lu, Z. (2019). "Phenoloxidases are required for the pea aphid's defence against bacterial and fungal infection." **J. of. Insect Mol Biol.**, **28**, pp 176-186.
- 182) Yi., H.Y., Chowdhury, M., Huang, Y.D., and Yu, X.Q. (2014). "Insect antimicrobial peptides and their applications." **J. of. Applied Microbiology and Biotechnology.**, **98**, pp 5807–5822.
- 183) Yu, X.Q., Zhu, Y.F., Ma, C., Fabrick, J.A. and Kanost, M.R. (2002). "Pattern recognition protein in *Manduca sexta* plasma." **J. of. Insect Biochemistry and Molecular Biology.**, **32**, pp 1287-1293.
- 184) Yu, Z., Shen, J., Li, Z., Yao, J., Li, W., Xue, L., Vandenberg, L and Yin, D. (2020). "Obesogenic Effect of Sulfamethoxazole on *Drosophila melanogaster* with Simultaneous Disturbances on Eclosion Rhythm, Glucolipid Metabolism, and Microbiota" **J. of. Environmental Science & Technology.**, **54**, **9**, pp 5667-5675.
- 185) Yusuf, M.,Ikram, M. and Faisal, M. (2015). "Current status of Indian *Trichogramma* spp. along with their distributional record and host range." **J. of. Indian Forester.** **141**, **7**, pp 806-812.
- 186) Zhou, J., Y. Shu, G. Zhang and Q. Zhou. (2012). "Lead exposure improves the tolerance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to cypermethrin" **J. of. Chemosphere.** **88** pp 507-513.
- 187) Zhu, Y., Johnson, T.J., Myers, A.A. and Kanost, M.R. (2003). "Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body." **J. of. Insect Biochemistry and Molecular Biology.**, **33**, pp 541-559.
- 188) Zimmer, R. K., and Zimmer, C. A. (2008). "Dynamic scaling in chemical ecology." **J. of. Chemical Ecology.**, **34**, pp 822-836.
- 189) Zorlu, T Nurullahoğlu, Z. Ulya and Kaya, S. (2015) "Effects of Titanium dioxide Nanoparticles on Hemocytes of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)" **J. of. ICOCEE – CAPPADOCIA**, May, pp 20-23.

Abstract

An important part of environmental pollution is related to the effects of heavy metals that factors such as erosion, volcanoes and springs, human activities such as the use of fossil fuels and agriculture and mining cause the accumulation of these metals in soil and toxicity to plants, animals and Societies become human. In the present study, the effect of heavy metal salts of iron, zinc and copper on homocyte abundance, nutritional index and biological characteristics of Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep .: Pyralidae) in vitro ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 40 5 5 relative humidity The percentage and light period were 14:10 h (darkness: light). The fourth instar larvae of this storage pest were treated with iron, zinc and copper salts at concentrations of 25, 50 and 100 mg / kg in 24 and 48 hours. Immunological results showed that there was a significant difference in the total hemocyte count, plasmatocytes, granulocytes and the activity of phenol oxidase enzyme at the level of 1% probability with the control. Iron metal salt at concentrations of 25 in both time periods and 50 mg / kg after 24 hours caused a decrease and at a concentration of 100 mg / kg after 24 and 48 hours caused a significant increase in the total hemocyte count compared to the control. Copper and zinc metal salts at all concentrations increased the total hemocyte count after 24 and 48 hours compared to the control. Iron metal salts at all concentrations after 24 and 48 hours, copper at 25 concentrations after 24 hours and zinc at 50 concentrations after 24 and 48 hours caused a significant decrease in plasmatocytes compared to the control. Iron at all concentrations and at all times showed the greatest effect on the increase of granulocytes compared to other treatments. In measuring the activity of phenol oxidase enzyme, iron salt and zinc at a concentration of 100 mg / kg at both 24 and 48 hours showed the highest effect on increasing the activity of the enzyme, while iron at a concentration of 50 mg / kg caused a significant decrease. The activity of this enzyme was increased after 24 hours compared to other treatments. In terms of nutritional indexes, copper metal salt at a concentration of 25 mg / kg caused an increase in relative growth rate compared to the control. In evaluating the relative consumption rate index and Efficacy of Conversion of Ingested Food index, no significant difference was observed in any of the salt concentrations of iron, zinc and copper metals compared to the control. Feeding Deterrent Index was significantly different between all treatments. The salts of the above metals affected the biological properties of the Mediterranean flour moth. So that copper and zinc at a concentration of 100 have the greatest effect on Larval duration , copper at a concentration of 100 has the greatest effect on pupal duration, copper at a concentration of 100 has the greatest effect on pupal weight loss and copper and zinc at a concentration of 100 has the greatest effect on Exit percent of adult. None of the metals had a significant effect on Longevity adult. The present study showed that heavy metals have a great impact on the biological and safety characteristics of Mediterranean flour moths, and understanding the impact of environmental factors and stresses on nutritional behavior and immune responses can be effective in adopting pest control programs.

Keywords: Cellular immunity, nutrition index, biological properties, heavy metals, mediterranean flour meal, *Ephestia kuehniella*



Shahrood University of Technology

Faculaty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Entomology

The effect of heavy metal salts (Copper, Zinc and Iron) on cellular immune system and feeding index of flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae)

By:

Bijan Ahangi Rashti

Supervisor:

Dr. Maryam Ajamhassani

September 2021

