

## اثر تغذیه از برگ توت غنی شده با ترکیبات نیتروژن، فسفر و پتاسیم در برخی صفات بیولوژیک و بیوشیمیایی کرم ابریشم [*Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae)]

کیوان اعتباری و محمد فضیلتی<sup>۱</sup>

### چکیده

به منظور بررسی تأثیر ترکیبات معدنی به عنوان مکمل‌های غذایی کرم ابریشم (*Bombyx mori*)، آزمایشی در چارچوب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار، شامل غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ درصد ترکیب مولتی مینرال (شامل نیتروژن، فسفر و پتاسیم) و یک تیمار شاهد عادی، که در آن از هیچ ماده‌ای به عنوان تیمار استفاده نشده بود، و یک تیمار آب مقطر انجام پذیرفت. لاروها تا سن چهارم از برگ توت تازه از واریته شین ایچه نویسه (SI) تغذیه می‌شدند و از آغاز سن چهارم روزانه یک نوبت از برگ‌های غنی شده استفاده می‌نمودند. غنی‌سازی برگ‌ها به وسیله افشاندن محلول‌ها روی آنها انجام می‌گرفت. مقدار پروتئین کل و اسید اوریک موجود در همولف لاروهای روز ششم سن پنجم اندازه‌گیری گردید.

مقدار پروتئین کل در کلیه تیمارها افزایش چشم‌گیری را در مقایسه با شاهد نشان داد، و این در حالی است که وزن لاروی از روز سوم سن پنجم نیز اختلاف معنی‌داری با شاهد پیدا نمود، ولی وزن غده ابریشم‌ساز تغییر چندانی نشان نداد. مقدار اسید اوریک اندازه‌گیری شده در خون حشره با وجود تغییرات جزئی، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با حشرات شاهد نداشت. با وجود این، وزن پيله، قشر ابریشمی و سفیره نیز در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد، به طوری که این افزایش در حشرات ماده بیش از حشرات نر بود. با توجه به افزایش شمار تخم در پروانه‌ها، در مقایسه با شاهد، از لحاظ آماری تنها در تیمار ۱۰٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. ترکیبات مزبور باعث کاهش درصد تفریح تخم‌ها شد. وزن تخم‌ها نیز در کلیه تیمارها در یک سطح آماری قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: کرم ابریشم، مولتی مینرال، برگ توت، صفات بیولوژیک، صفات بیوشیمیایی، پروتئین کل، اسید اوریک

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره‌شناسی و استادیار بیوشیمی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

## مقدمه

کرم ابریشم اهلی [*Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae)] به عنوان پایه و اساس صنعت نوغانداری مطرح است. رشد مطلوب این حشره و برآورد نیازهای تغذیه‌ای آن به طور کامل به گیاه میزبان وابسته است (۳۰). این گونه که صرفاً از برگ توت تغذیه می‌کند، به میزان معینی قند، ویتامین، اسیدهای آمینه و مواد معدنی برای رشد و تولید ابریشم نیازمند است (۱۵ و ۲۵).

مواد معدنی ترکیباتی هستند که وجود آنها برای ادامه زندگی کرم ابریشم الزامی است (۱۳ و ۱۵). به طور میانگین ۱۰٪ وزن خشک برگ توت را ترکیبات معدنی تشکیل می‌دهد. این درصد در ارقام و واریته‌های مختلف توت، متفاوت گزارش شده است (۱۵).

هوری (۱۳) چهار عنصر پتاسیم، فسفر، منیزیم و روی را برای رشد و نمو لاروها ضروری معرفی می‌کند، و این در حالی است که تمامی این عناصر در حد مناسب در برگ توت وجود دارد. ولی استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای به منظور غنی‌سازی جیره غذایی بسیاری از جانداران از جمله انسان نیز از دیرباز مرسوم بوده است. بسیاری از ویژگی‌های بیولوژیک و صفات اقتصادی کرم ابریشم با استفاده از برگ توت غنی شده به وسیله مکمل‌های غذایی مختلف بهبود می‌یابد و ارزش تغذیه‌ای برگ توت با استفاده از ترکیبات بسیاری همچون گلوکز، گلیسین، شمار زیادی از ویتامین‌ها و نمک‌های معدنی افزایش خواهد یافت (۱۸، ۲۱، ۲۲ و ۲۳).

استفاده از مواد معدنی به منظور افزایش عملکرد پرورش کرم ابریشم را پژوهندگان بسیاری بررسی کرده‌اند (۱، ۲، ۷، ۸، ۹ و ۱۹). کاربرد چنین ترکیباتی به صورت محلول‌پاشی روی درختان توت داخل توتستان نیز افزون بر این که سبب افزایش تولید برگ می‌شود، در افزایش ویژگی‌های بیولوژیک و اقتصادی کرم ابریشم بسیار اهمیت دارد (۷ و ۳۱). بسیاری از نمک‌های معدنی نیز به عنوان مکمل غذایی برای کرم ابریشم استفاده می‌شوند. یدید پتاسیم، پرمنگنات پتاسیم و سولفات مس

از جمله نمک‌هایی هستند که سبب افزایش چشم‌گیر در عملکرد تولید ابریشم خواهند شد (۸، ۹ و ۱۹). برخی از پژوهندگان حتی استفاده از آب باران را، به لحاظ دارا بودن املاح معدنی مانند آهن، کلسیم و منیزیم، به منظور افزایش عملکرد زیستی و اقتصادی کرم ابریشم گزارش کرده‌اند (۲۷).

در مبحث مکمل‌های غذایی در تغذیه کرم ابریشم، مسیر متابولیسم مواد در داخل گیاه کوتاه‌تر بوده و یا حذف شده، و عمل غنی‌سازی صرفاً با افزودن مواد مغذی هنگام تغذیه حشره به برگ‌ها انجام می‌گیرد.

بسیط و اشفق (۲) گزارش کردند که لاروهای کرم ابریشم با تغذیه از برگ توت غنی شده با پتاسیم (۰/۳٪)، فسفر (۰/۱٪)، نیتروژن (۰/۲٪)، کلسیم (۰/۱٪) و منگنز (۰/۱۵٪)، در بسیاری از ویژگی‌های حیاتی نظیر مصرف غذا، نسبت جذب غذا، وزن لاروی، طول تار ابریشمی و عملکرد تولید ابریشم افزایش نشان می‌دهند، زیرا پتاسیم نقش مهمی در تغذیه کرم ابریشم داشته و سبب افزایش تولید تار ابریشم می‌گردد (۳۰ و ۳۲). ژانگریس و همکاران (۱۶) نشان دادند که مقدار پتاسیم همولنف در لاروهای پروانه سکروپیا (*Hyalophora cecropia*) دو تا چهار روز پیش و پس از آغاز تنیدن پيله کاهش شدیدی پیدا می‌کند. این به خاطر اهمیت پتاسیم در این دوره می‌باشد. فسفر نیز به عنوان یک ماده ضروری در بسیاری از فعالیت‌های متابولیک حشرات وارد می‌شود. فسفولیپیدها و فسفوپروتئین‌های غشای سلولی، سوربیتول ۶- فسفات، گلوکز ۶- فسفات، و نیز NADP و ATP، از ترکیبات مهمی هستند که فسفر در ساختمان آنها دخالت دارد. گزارش‌های بسیاری نشان دهنده وجود فسفر به صورت اسیدی و استرهای با شاخه فسفات در همولنف لاروهای کرم ابریشم است (۲۴). نیتروژن که به عنوان ترکیب اصلی در ساختمان پروتئین‌ها شرکت دارد، نقش مهمی در فیزیولوژی حشرات و موجودات دیگر دارد (۳).

بسیاری از کودهای شیمیایی و ریز مغذی‌ها دارای ترکیبات غذایی مهمی برای کرم ابریشم می‌باشند (۷). این بررسی نیز با استفاده از یک ترکیب مولتی مینرال، که به عنوان کود مایع در

و هفتم سن پنجم لاروی، وزن ۱۰ لارو اندازه‌گیری، و میانگین وزن به عنوان شاخص وزن هر تیمار در هر نوبت محاسبه شد. در روز هفتم سن پنجم، پنج لارو از هر تیمار توزین، و پس از تشریح، غده ابریشم‌ساز جداسازی و وزن آن اندازه‌گیری شد. پس از تنیدن پیله در پانزدهمین روز پس از چهارمین پوست‌اندازی، ۳۰ پیله از هر تیمار توزین، و سپس وزن شفیره، وزن قشر ابریشمی، و درصد قشر ابریشمی در حشرات نر و ماده به طور جداگانه اندازه‌گیری و محاسبه گردید. در هر تیمار، از ۲۰ پروانه ماده تخم‌گیری شد و شمار تخم در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت اول پس از جفت‌گیری به طور جداگانه یادداشت گردید. تخم‌ها ۲۴ ساعت در سردخانه پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری و به منظور ارزیابی درصد تفریخ اسیدآلایی شدند. برای این کار تخم‌ها به مدت پنج دقیقه در محلول اسید کلریدریک (با غلظت ۱/۰۷۵٪) با دمای  $47 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، و سپس با آب سرد شست‌شو و پس از خشک شدن در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از ۱۲ روز درصد تفریخ تخم‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد.

برای اندازه‌گیری تغییرات بیوشیمیایی همولنف لاروهای روز ششم سن پنجم، از هر تیمار ۱۰ لارو انتخاب و همولنف آن توسط قطع یکی از پاهای شکمی در میکروتیوب‌های اپندورف (Eppendorf) جمع‌آوری گردید. سپس مقداری فنیل تیواوره برای جلوگیری از فعالیت آنزیم فنل اکسیداز و ملانیزه شدن همولنف به آنها افزوده شد. نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی نمونه‌ها جمع‌آوری گردید و تا آغاز آزمایش‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مقدار پروتئین کل از روش بایوره (۲۸) اندازه‌گیری شد. در این روش پروتئین‌ها با محلول قلیایی مس تشکیل کمپلکس آبی متمایل به بنفش می‌دهند، که میزان جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر، نسبت مستقیم با مقدار پروتئین همولنف دارد. اسید اوریک با روش تریودی و همکاران (۲۹) اندازه‌گیری شد.

تغذیه گیاه فرموله شده، انجام گردید تا اثر آن در ویژگی‌های بیولوژیک و اقتصادی کرم ابریشم ارزیابی شود. آگاهی از وضعیت بیوشیمیایی همولنف، افزون بر این که نقش مهمی در فرمولاسیون و توازن مواد مغذی برای جیره غذایی حشرات دارد (۱۶)، می‌تواند اطلاعات جامعی از برهم‌کنش ترکیبات غذایی ارائه نماید. از این رو، ویژگی‌های بیوشیمیایی همولنف لاروها نیز بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

تخم کرم ابریشم هیبرید دو نسله  $103 \times 104$  از شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم ایران تهیه و در شرایط آزمایشگاهی با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $75 \pm 5$  درصد، در اتاق پرورش کرم ابریشم واقع در واحد تحقیقات شرکت ابریشم شهرستان رشت پرورش داده شد. پس از سومین پوست‌اندازی و آغاز سن چهارم، لاروها به پنج تیمار تقسیم شدند، که هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار ۱۰۰ لارو بود. برای تغذیه لاروها از برگ‌های تازه توت (*Morus alba*) از واریته اصلاح شده شین ایچه نویسه (SI) استفاده شد، و لاروها به طور روزانه در سه نوبت تغذیه شدند.

به منظور غنی‌سازی برگ توت با مکمل غذایی، از ترکیب مولتی مینرال، شامل ازت (۹٪)، فسفر (۹٪) و پتاسیم (۷٪)، در سه غلظت ۱، ۵ و ۱۰ درصد استفاده شد. برگ‌ها پس از برداشت با محلول‌های تهیه شده محلول‌پاشی، در مجاورت هوا خشک و سپس در اختیار لاروها گذاشته شد. در کنار این سه تیمار یک تیمار شاهد، که در آن از هیچ گونه ماده‌ای استفاده نشده بود، و یک تیمار آب مقطر قرار داشت. مقدار محلول برای هر ۵۰-۱۰۰ گرم برگ ۱۵-۲۵ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. برگ‌ها روی یک سطح صاف پهن و سعی شد محلول‌ها به وسیله افشانه به طور دقیق به دو سطح برگ‌ها پاشیده شود. لاروها به طور روزانه یک بار از برگ‌های غنی شده تغذیه گردیدند.

پس از چهارمین پوست‌اندازی در روزهای اول، سوم، پنجم

لاروهای *Spodoptera eridania* مستقل از مقدار نیتروژن جیره غذایی آنها است. افزایش بیش از حد مقدار نیتروژن به جیره غذایی مصنوعی این لاروها نه تنها سبب افزایش وزن لاروی نگردد، بلکه کاهش نسبی وزن را نیز به دنبال داشت. همچنین، میزان بقای لاروها تحت تأثیر نیتروژن اضافی کاهش می‌یابد.

پتاسیم نیز تأثیر چشم‌گیری در افزایش کارایی تغذیه حشرات دارد. هنگامی که کرم ابریشم موگا (*Antheraea assama*) از برگ‌های حاوی پتاسیم بیشتری تغذیه می‌کند ویژگی‌های حیاتی آنها بهبود می‌یابد. جای‌گزینی  $KH_2PO_4$  با  $K_2HPO_4$  در جیره غذایی سبب افزایش عملکرد تغذیه لاروها می‌شود، که این به دلیل بالا رفتن غلظت پتاسیم است (۳۰). یافته‌های بسیاری وجود دارد که نشان دهنده اهمیت پتاسیم در تغذیه کرم ابریشم است (۱۵ و ۳۰).

از بررسی ضرایب رگرسیونی ناشی از شیب منحنی وزن لاروی در روزهای مختلف برای غلظت‌های مورد تیمار (جدول ۱) می‌توان دریافت که سه تیمار مزبور با سرعتی بیش از شاهد سبب افزایش وزن لاروها شده‌اند، که این افزایش وزن می‌تواند به علت تحریک تغذیه‌ای و یا افزایش مصرف و جذب غذا باشد. چنان‌که مونیانندی و همکاران (۲۱) نشان دادند هنگامی که مخلوط ویتامین و مواد معدنی بر لاروهای سن پنج تیمار گردد، افزایش وزن لاروی با افزایش فعالیت‌های متابولیک از جمله مقدار هضم و جذب غذا در آنها بروز می‌کند. در همین زمینه، زمان و همکاران (۳۳) گزارش کرده‌اند که با غنی‌سازی برگ توت به وسیله محلول ۰/۲٪ نیتروژن و ۰/۱۵٪ منیزیم، می‌توان تا ۵۵/۹٪ میزان مصرف غذا را در لاروهای کرم ابریشم افزایش داد. این در حالی است که با تیمار آب مقطر نیز توانسته‌اند ۳۷/۴۱٪ مقدار مصرف غذا را افزایش دهند، که در نتیجه آن وزن لاروی و عملکرد تولید پیله در این گروه از لاروها افزایش نشان داده است (۳۳). در بررسی حاضر تیمار آب مقطر نتوانسته سبب افزایش وزن لاروی گردد، که این می‌تواند به دلیل شرایط اقلیمی منطقه و نوع برگ مورد استفاده باشد. همچنین، شاخص درصد افزایش وزن روزانه در سن

اساس این روش بر پایه تأثیر آنزیم اوریکاز روی اسید اوریک است، که سبب تشکیل آلانتونین و پراکسید هیدروژن شده، سپس با تأثیر آنزیم پراکسیداز سبب تشکیل کروماژن در محلول می‌گردد، که در نتیجه جذب اندازه‌گیری شده در طول موج ۵۰۰ نانومتر متناسب با مقدار اسید اوریک موجود در نمونه خواهد بود.

کلیه نتایج با نرم افزارهای EXCEL (نسخه ۹۷) و IRRISTAT (نسخه ۹/۲) با آزمون چند دامنه دانکن در چارچوب طرح کاملاً تصادفی تجزیه آماری گردید.

## نتایج و بحث

تأثیر به کارگیری ترکیب مولتی مینرال به عنوان مکمل غذایی کرم ابریشم در واریته شین ایچه نویسه در جداول ۱ تا ۳ خلاصه شده است.

## ویژگی‌های لاروی

چنان‌که جدول ۱ نشان می‌دهد، در روز اول سن پنجم اختلاف معنی‌داری بین وزن لاروها دیده نشد. در صورتی که در روز سوم در تیمار ۵٪، ۱۱/۶ درصد افزایش وزن لاروی در مقایسه با شاهد ایجاد شده، و این افزایش وزن در روز پنجم تیمار فوق به ۱۶/۲ درصد رسید، که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد دارد، ولی در غلظت‌های مختلف تفاوت چشم‌گیری مشاهده نشد. در روز هفتم نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و شاهد وجود دارد، به طوری که در غلظت ۱۰٪، ۱۵/۲ درصد افزایش وزن در مقایسه با شاهد دیده می‌شود، ولی در میان غلظت‌ها این اختلاف از لحاظ آماری محسوس نیست. نتایج مشابهی نیز از غنی‌سازی برگ توت با استفاده از ترکیبات معدنی و ویتامین‌ها در پژوهش‌های دیگر به دست آمده است (۱، ۲، ۶ و ۳۳).

زمان و همکاران (۳۳) دریافتند که افزایش ۰/۲٪ نیتروژن به جیره غذایی کرم ابریشم می‌تواند سبب افزایش وزن لاروها گردد، ولی کارو و مارتین (۱۷) نشان دادند که رشد نسبی

جدول ۱. تأثیر غنی‌سازی برگ توت با ترکیب مولتی مینرال بر ویژگی‌های لاروی کرم ابریشم (*B. mori*)

غلظت ترکیبات معدنی	وزن لارو سن پنجم (g)			ضرایب رگرسیون		وزن غده ابریشم‌ساز	درصد افزایش وزن روزانه
	روز ۱	روز ۳	روز ۵	روز ۷	(a)		
٪۱	۱/۰۴۹ <sup>a</sup>	۲/۶۰۹ <sup>abc</sup>	۴/۳۵۶ <sup>a</sup>	۴/۸۰۱ <sup>ab</sup>	-۰/۰۵	۱/۷۳۱۸ <sup>a</sup>	۶۲/۵۳ <sup>b</sup>
	(۹۹/۴۹)*	(۱۰۳/۸)	(۱۱۰/۷)	(۱۰۷/۹)		(۹۵/۸)	
٪۵	۱/۰۷۸ <sup>a</sup>	۲/۸۰۶ <sup>a</sup>	۴/۵۷۲ <sup>a</sup>	۵/۰۴۶ <sup>a</sup>	-۰/۰۴	۱/۸۳۷۴ <sup>a</sup>	۶۶/۱۳ <sup>a</sup>
	(۱۰۱/۸)	(۱۱۱/۶)	(۱۱۶/۲)	(۱۱۳/۴)		(۱۰۱/۷)	
٪۱۰	۱/۰۹۹ <sup>a</sup>	۲/۷۶۴ <sup>ab</sup>	۴/۴۵۶ <sup>a</sup>	۵/۱۲۴ <sup>a</sup>	-۰/۱۷	۱/۷۵۲۲ <sup>a</sup>	۶۷/۰۸ <sup>a</sup>
	(۱۰۳/۸)	(۱۰۹/۹)	(۱۱۳/۳)	(۱۱۵/۲)		(۹۷)	
شاهد	۱/۰۵۸ <sup>a</sup>	۲/۵۱۳ <sup>abc</sup>	۳/۹۳۴ <sup>b</sup>	۴/۵۲۲ <sup>b</sup>	۰/۰۹	۱/۸۰۶۸ <sup>a</sup>	۵۷/۷۳ <sup>c</sup>
	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)		(۱۰۰)	
آب مقطر	۱/۰۶ <sup>a</sup>	۲/۵۳۵ <sup>abc</sup>	۳/۹۳۴ <sup>b</sup>	۴/۵۲۰ <sup>b</sup>	۰/۱۴	۱/۷۵۲۰ <sup>b</sup>	۵۷/۶۶ <sup>c</sup>
	(۱۰۰/۲)	(۱۰۰/۶)	(۱۰۰)	(۹۹/۹)		(۹۶/۹)	

\* درصد تغییرات در مقایسه با شاهد در هر ستون اعدادی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند.

ابریشمی در کلیه تیمارها اختلاف چشم‌گیری نشان نمی‌دهد. بنابراین، افزایش وزن پيله‌ها صرفاً به خاطر افزایش وزن شفیره آن بوده و تأثیری در مقدار ابریشم حاصله نداشته است (جدول ۲).

نتایج مشابهی نیز در بررسی اوانجلیستا و همکاران (۶) در تأثیر مخلوط ویتامین و مواد معدنی در کرم ابریشم به دست آمده است، به طوری که با وجود افزایش وزن پيله در مقدار تولید ابریشم آن اختلاف معنی‌داری بروز ننمود. هم‌چنین، این نتیجه با توجه به افزایش نیافتن وزن غده ابریشم‌ساز در روز ششم سن آخر پیش‌بینی می‌شد. نکته‌ای که در این جا جلب توجه می‌کند اثر منفی غلظت زیاد (۱۰٪) بر ویژگی‌های پيله و وزن شفیره حشرات ماده مورد بررسی است، که این تأثیر منفی، یا به سخن دیگر، کاهش وزن در این غلظت در حشرات نر دیده نمی‌شود، و حتی همان گونه که ذکر شد، وزن شفیره نر در این تیمار با ۴/۸٪ افزایش، در گروه آماری a جای گرفته است. این موضوع را می‌توان به تحمل و نیازهای فیزیولوژیک متفاوت

پنجم در لاروهای تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان می‌دهد، و این در حالی است که این شاخص در دو غلظت ۵ و ۱۰ درصد بیش از غلظت ۱٪ بوده است. وزن غده ابریشم‌ساز در کلیه تیمارها اختلاف معنی‌داری با شاهد عادی از خود نشان نداد (جدول ۱).

### ویژگی‌های پيله

همان گونه که در جدول ۲ آمده است، وزن پيله، شفیره و قشر ابریشمی حشرات نر و ماده در بیشتر تیمارها اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داده است. ولی همین ویژگی‌ها برای حشرات ماده در غلظت ۱۰٪ کاهش یافت. بیشترین وزن پيله در حشرات ماده (۲/۵۷۰ گرم) در غلظت ۱٪ بوده، که ۴/۵٪ رشد نسبت به شاهد نشان می‌دهد. در خصوص وزن شفیره در حشرات ماده ۴/۸٪ رشد در تیمار ۱ درصد مشاهده می‌شود، که اختلاف معنی‌داری با دیگر گروه‌ها دارد، ولی در حشره نر همین مقدار اختلاف در تیمار ۱۰٪ ایجاد می‌گردد. وزن قشر

جدول ۲. تأثیر غنی‌سازی برگ توت با ترکیب مولتی مینرال بر ویژگی‌های پيله کرم ابریشم (*B. mori*)

غلظت	صفات پيله منفرد ماده			صفات پيله منفرد نر			درصد قشر	وزن پيله	وزن شفیره	وزن قشر	درصد قشر
	وزن پيله (g)	وزن شفیره (g)	وزن قشر (g)	وزن پيله (g)	وزن شفیره (g)	وزن قشر (g)					
٪۱	۲/۵۷۰ <sup>a</sup>	۲/۰۲۶ <sup>a</sup>	۰/۵۴۶۰ <sup>a</sup>	۱/۹۵۰ <sup>ab</sup>	۱/۴۵۴ <sup>ab</sup>	۰/۴۹۶۸ <sup>a</sup>	۲۵/۵۰	۱/۹۵۰ <sup>ab</sup>	۱/۴۵۴ <sup>ab</sup>	۰/۴۹۶۸ <sup>a</sup>	۲۵/۵۰
	(۱۰۴/۵)*	(۱۰۳/۲)	(۱۰۳/۲)	(۹۹/۴)	(۱۰۰/۲)	(۹۷/۹)	(۹۸/۵)	(۹۹/۴)	(۱۰۰/۲)	(۹۷/۹)	(۹۸/۵)
٪۵	۲/۵۳۶ <sup>ab</sup>	۱/۹۹۰ <sup>ab</sup>	۰/۵۴۶۴ <sup>a</sup>	۲/۰۱۰ <sup>a</sup>	۱/۴۹۴ <sup>ab</sup>	۰/۵۱۵۲ <sup>a</sup>	۲۵/۶۵	۲/۰۱۰ <sup>a</sup>	۱/۴۹۴ <sup>ab</sup>	۰/۵۱۵۲ <sup>a</sup>	۲۵/۶۵
	(۱۰۳/۱)	(۱۰۲/۹)	(۱۰۳/۳)	(۱۰۲/۵)	(۱۰۲/۹)	(۱۰۱/۶)	(۹۹/۱)	(۱۰۲/۵)	(۱۰۲/۹)	(۱۰۱/۶)	(۹۹/۱)
٪۱۰	۲/۴۲۶ <sup>c</sup>	۱/۹۲۲ <sup>b</sup>	۰/۵۱۹۸ <sup>a</sup>	۲/۰۲۲ <sup>a</sup>	۱/۵۲۲ <sup>a</sup>	۰/۵۰۰۴ <sup>a</sup>	۲۴/۷۴	۲/۰۲۲ <sup>a</sup>	۱/۵۲۲ <sup>a</sup>	۰/۵۰۰۴ <sup>a</sup>	۲۴/۷۴
	(۹۸/۶)	(۹۹/۴)	(۹۸/۲)	(۱۰۳/۱)	(۱۰۴/۸)	(۹۸/۷)	(۹۵/۶)	(۱۰۳/۱)	(۱۰۴/۸)	(۹۸/۷)	(۹۵/۶)
شاهد	۲/۴۶۰ <sup>bc</sup>	۱/۹۳۴ <sup>b</sup>	۰/۵۲۹۲ <sup>a</sup>	۱/۹۶۲ <sup>ab</sup>	۱/۴۵۲ <sup>ab</sup>	۰/۵۰۷۲ <sup>a</sup>	۲۵/۸۸	۱/۹۶۲ <sup>ab</sup>	۱/۴۵۲ <sup>ab</sup>	۰/۵۰۷۲ <sup>a</sup>	۲۵/۸۸
	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)	(۱۰۰)
آب مقطر	۲/۴۱۶ <sup>c</sup>	۱/۹۳۰ <sup>b</sup>	۰/۵۱۹۰ <sup>a</sup>	۱/۹۰۰ <sup>b</sup>	۱/۴۴۰ <sup>b</sup>	۰/۴۹۶۸ <sup>a</sup>	۲۴/۱۳	۱/۹۰۰ <sup>b</sup>	۱/۴۴۰ <sup>b</sup>	۰/۴۹۶۸ <sup>a</sup>	۲۴/۱۳
	(۹۸/۲)	(۹۹/۸)	(۹۸/۱)	(۹۶/۸)	(۹۹/۲)	(۹۷/۹)	(۹۳/۳)	(۹۶/۸)	(۹۹/۲)	(۹۷/۹)	(۹۳/۳)

\* : درصد تغییرات در مقایسه با شاهد در هر ستون اعدادی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند.

جنس نر و ماده به مواد غذایی مختلف نسبت داد. برودبک و همکاران (۳) نشان دادند که مقدار نیتروژن موجود در شیره نباتی گیاه تأثیر مستقیم در آهنگ رشد، زادآوری و مرگ و میر گونه‌ای از زنجیرک‌ها دارد، و این تأثیر کاملاً به جنسیت حشرات وابسته است، زیرا حشرات ماده در فرایند تولید مثل نیاز غذایی بیشتری به پروتئین دارند.

### ویژگی‌های تخم

شمار تخم در کلیه تیمارها بیش از شاهد بوده است، ولی تنها در غلظت ۱۰٪ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد وجود داشته است (جدول ۳). اشفق و همکاران (۱) نیز نشان دادند که غنی‌سازی برگ توت با محلول نیتروژن ۱٪ می‌تواند تا بیش از ۳۱ درصد شمار تخم پروانه‌ها را افزایش دهد. در حالی که تغذیه لاروها با محلول‌های شامل غلظت‌های مختلف نیتروژن و فسفر می‌تواند در بهترین حالت تا ۴۳٪ این ویژگی را افزایش دهد (۱).

نکته شایان توجه در پژوهش حاضر کاهش درصد تفریح

بوده است. نیروانی و کالیوال (۲۲) هنگامی که اسید فولیک را به عنوان مکمل غذایی استفاده نمودند باعث کاهش درصد تفریح تخم‌ها شدند. گرچه وزن تخم در کلیه تیمارها افزایشی نسبت به شاهد داشته است، ولی اختلاف آماری معنی‌داری دیده نمی‌شود (جدول ۳). نکته‌ای که از مقایسه جداول ۲ و ۳ به نظر می‌رسد تأثیر منفی (اثر کاهشنده وزن) غلظت ۱۰٪ بر وزن پيله و شفیره در حشرات ماده، در برابر افزایش مقدار تخم‌ریزی در همین حشرات است. تصور می‌شود که در این غلظت انرژی حاصله از تغذیه بیشتر صرف فرایند تولید مثلی و تکامل تخمدان‌ها شده است، که در نتیجه آن سبب افزایش تخم‌ریزی شده و نمی‌تواند اثر سوء غلظت باشد، زیرا در غیر این صورت هر دو جنس نر و ماده و نیز وزن لاروی می‌بایست تحت تأثیر قرار می‌گرفتند.

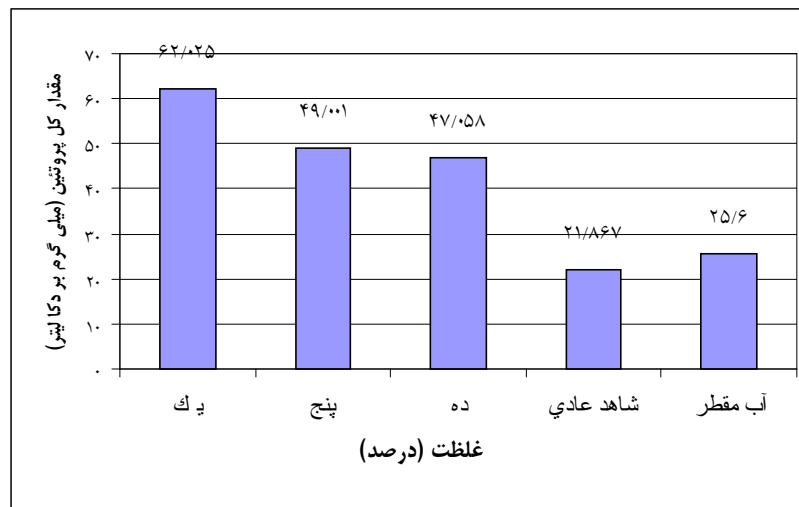
### ویژگی‌های بیوشیمیایی همولنف

تغییرات مقدار پروتئین و اسید اوریک همولنف لاروهای مورد بررسی در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

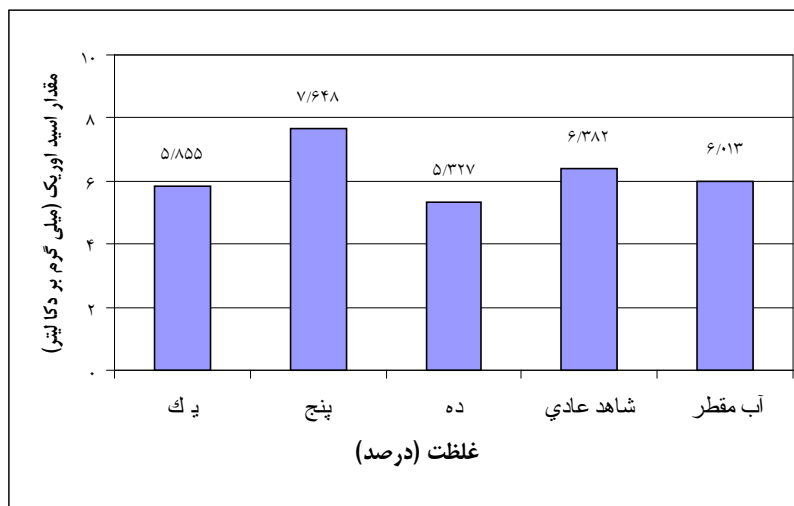
جدول ۳. تأثیر غنی‌سازی برگ توت با ترکیب مولتی مینرال بر ویژگی‌های تخم پروانه کرم ابریشم (*B. mori*)

وزن ۵۰ تخم (mg) (±SE)	شمار لارو ظاهر شده	درصد تفریح تخم (±SE)	شمار تخم		غلظت ترکیبات معدنی
			۴۸ ساعته	۲۴ ساعته	
۳۲/۷۷±۰/۲ <sup>b</sup>	۶۵۸/۸۶	۹۷/۲۵±۰/۲۹ <sup>ab</sup>	۷۳۲/۴ <sup>b</sup>	۶۷۷/۵۰ <sup>b</sup>	%۱
۳۳/۴۳±۰/۲ <sup>b</sup>	۶۳۰/۲۸	۹۲/۲۳±۰/۲ <sup>c</sup>	۸۰۹/۶ <sup>a</sup>	۶۸۳/۳۸ <sup>b</sup>	%۵
۳۳/۰۳±۰/۲ <sup>b</sup>	۷۰۸/۰۲	۹۵/۶۳±۰/۹ <sup>b</sup>	-	۷۴۰/۳۸ <sup>a</sup>	%۱۰
۳۲/۶۷±۰/۳ <sup>b</sup>	۶۴۲/۷۷	۹۷/۹۱±۱/۲ <sup>a</sup>	۸۲۸/۵ <sup>a</sup>	۶۵۶/۵ <sup>b</sup>	شاهد
۳۴/۵۰±۰/۳ <sup>a</sup>	۶۷۱/۴۶	۹۷/۷۲±۰/۴۷ <sup>a</sup>	۸۲۹/۲ <sup>a</sup>	۶۸۷/۱۳ <sup>b</sup>	آب مقطر

در هر ستون اعدادی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند.



نمودار ۱. تأثیر ترکیب مولتی مینرال بر تغییرات مقدار پروتئین موجود در همولنف لاروهای روز ششم سن پنجم کرم ابریشم



نمودار ۲. تأثیر ترکیب مولتی مینرال بر تغییرات مقدار اسید اوریک موجود در همولنف لاروهای روز ششم سن پنجم کرم ابریشم

همواره با افزایش مقدار نیتروژن در جیره غذایی حشرات مقدار تولید اسید اوریک نیز افزایش یابد، چون هیچ تضمینی وجود ندارد که تمامی این نیتروژن مصرفی وارد متابولیسم گردد. همچنین، هیچ گاه افزایش کمی نیتروژن یا پروتئین در جیره غذایی حشرات نمی تواند یک شاخص مناسب برای رشد حشرات گیاه خوار باشد، بلکه کیفیت نیتروژن مصرفی نیز بسیار حائز اهمیت است (۱۷).

گزارش شده هنگامی که لاروهای کرم ابریشم از زئین تغذیه می نمایند، تولید اسید اوریک در آنها نسبت به هنگامی که از کازئین تغذیه می کنند بیشتر می شود (۱۴). ولی در لاروهای *S. eridania*، عکس این مسئله صادق است (۱۷). بنابراین، نوع پروتئین مصرفی و نیازهای تغذیه ای در نتیجه مسیره های متابولیک در حشرات مختلف یک راسته نیز متفاوت است. همچنین، کارو و مارتین (۱۷) نشان دادند که در دو گروه از لاروهای مزبور که تفاوت مقدار پروتئین جذب شده آنها بیش از ۲۷٪ بوده است، تولید اسید اوریک اختلاف معنی داری با هم نداشته، زیرا هر دو گروه لاروها از یک نوع پروتئین تغذیه شده بودند. در این باره گزارش شده است که دفع آمونیوم و یا تولید سلول های اورات در بافت چربی سوسری آمریکایی کاملاً به سطوح نیتروژن مورد تغذیه وابسته است، هر چند عواملی چون مقدار کاتیون مصرفی و آب قابل دسترسی نیز در تسریع این مکانیزم مؤثر هستند (۲۰). بنابراین، افزایش ترکیباتی مانند پتاسیم در جیره غذایی و سرانجام افزایش شکل کاتیونی آن در اندام چربی، نیز سبب تحریک تولید اسید اوریک در سوسری آمریکایی شده است (۲۰). ژانگریس و همکاران (۱۶) گزارش کردند که میان افزایش پتاسیم و مقدار اسید اوریک در اندام چربی پروانه سکروپیا در خلال دوره شفیرگی ارتباطی وجود دارد.

از آن جایی که با افزایش مقدار پروتئین در همولنف لاروهای کرم ابریشم می بایست تغییراتی نیز در متابولیسم دفعی ترکیبات نیتروژنه مشاهده می گردید، ولی اندازه گیری مقدار اسید اوریک در همولنف لاروها این موضوع را نشان نمی دهد.

مقدار پروتئین کل در سه تیمار مزبور اختلاف چشم گیری را در مقایسه با شاهد نشان داده است. این در حالی است که هیچ گونه اختلاف معنی داری از لحاظ آماری بین غلظت ها وجود ندارد. به نظر می رسد که این پراکندگی داده ها مربوط به حساسیت روش اندازه گیری پروتئین باشد. هر چند که افزایش مواد نیتروژن دار در همولنف تا یک حد معین، می تواند موجب افزایش ساخت پروتئین گردد، زیرا عموماً افزایش مقدار ساخت پروتئین در ارتباط با مقدار نیتروژن موجود در جیره غذایی است (۱۵). در همین زمینه، کارو و مارتین (۱۷) گزارش کردند که با افزایش کیفی و کمی مقدار نیتروژن در جیره غذایی، مقدار کل نیتروژن در بدن لاروهای *S. eridania* و نیز پروتئین خون آنها افزایش می یابد. آشکار است که نیتروژن به عنوان ساختار اصلی اسیدهای آمینه، در فرم قابل جذب پروتئین ها در فرایندهای متابولیک بسیار حائز اهمیت است. ولی آنچه در تنظیم فرایند رشد و نمو مهم است تعادل بین اسیدهای آمینه است، که پیش تر از آن به عنوان کیفیت نیتروژن مصرفی نام برده شده بود، چون این امکان وجود دارد که بسیاری از مسیره های متابولیک به علت محدودیت یک اسید آمینه دچار اختلال شود، در حالی که بسیاری از اسیدهای آمینه دیگر به فراوانی موجود باشند (۱۷).

با این حال، و با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، چنین دریافت می شود که افزایش وزن لاروی در سه تیمار مزبور با افزایش مقدار پروتئین در بدن لاروها بی ارتباط نیست.

با وجود افزایش مقدار پروتئین در همولنف لاروهای سن پنجم کرم ابریشم، هیچ گونه اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در مقدار اسید اوریک موجود در همولنف این لاروها دیده نشد. اسید اوریک به عنوان یکی از مهم ترین ترکیبات دفعی مواد نیتروژنه در بسیاری از حشرات گزارش شده است (۴، ۵ و ۱۱). تولید اسید اوریک در ارتباط مستقیم با مصرف نیتروژن بوده و اندازه گیری مقدار آن می تواند معیاری برای متابولیسم نیتروژن در بیشتر حشرات باشد (۲۰). هر چند که نمی توان انتظار داشت



به طور خلاصه، از نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که با وجود افزایش وزن پیله حداکثر به مقدار ۰/۴/۵، هیچ گونه افزایش چشم‌گیری در مقدار قشر ابریشمی ایجاد نمی‌گردد، و ترکیبات مزبور هیچ تأثیری در افزایش بازده تولید ابریشم خام نخواهند داشت. هم‌چنین، از آن جا که عمل غنی‌سازی به طریقه‌ای که در مقاله گفته شد، به دلیل مجاورت برگ‌ها با جریان هوا، تا حدی سبب تخریب خواص تغذیه‌ای آنها شده و این موضوع اثر قطعی ترکیبات مزبور را کاهش می‌دهد، ولی جا دارد تا جنبه‌های عملی این مسئله دقیقاً بررسی و مطالعه گردد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان مراتب سپاسگزاری خود را از شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم ایران به خاطر تأمین امکانات پرورش کرم ابریشم، و نیز از گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان برای استفاده از امکانات آزمایشگاهی اعلام می‌دارند. از جناب آقای دکتر رحیم عبادی نیز به خاطر مطالعه نسخه پیش‌نویس این مقاله تقدیر می‌گردد.

مهم‌ترین ترکیبات اولیه ایجاد شده در متابولیسم نیتروژن در کرم ابریشم اوره و آمونیوم است (۵ و ۱۲). تغییرات غلظت اوره در همولف لارو کرم ابریشم به عوامل زیادی، از جمله مرحله سنی و جیره غذایی وابسته است (۲۶). این تغییرات در ارتباط مستقیم با متابولیسم نیتروژن و اسیدهای آمینه می‌باشد (۵ و ۲۶). آرژیناز آنزیمی مهم برای تولید اوره در همولف کرم ابریشم است که در بسیاری از بافت‌ها فعالیت می‌کند. این فعالیت در سن پنج لاروی به اوج خود می‌رسد. سپس آنزیم اوره‌آزی که از برگ توت داخل بدن حشره شده است وارد عمل می‌شود و سبب تشکیل آمونیوم می‌گردد (۱۰، ۱۱ و ۱۲)، و این شاید از آغاز تیندن نخستین تارهای ابریشم (تقریباً از روز هفتم سن پنجم) به بعد باشد. یکی از جنبه‌های جالب توجه در متابولیسم نیتروژن در کرم ابریشم بازجذب آمونیوم تشکیل شده، برای تولید پروتئین ابریشم طی مسیرهای خاص متابولیک است (۱۰). بنابراین، با توجه به نتایج اخیر، تصور می‌شود غلظت اسید اوریک در همولف کرم ابریشم بر خلاف بسیاری از حشرات نمی‌تواند معیار مناسبی برای ارزیابی متابولیسم نیتروژن در این حشره باشد.

### منابع مورد استفاده

1. Ashfaq, M., M. Shafique, S. Iqbal and J. Arif. 1996. Effect of feeding phosphorus and nitrogen treated mulberry leaves on larval growth and silk yield of silkworm (*Bombyx mori* L.). Pakistan Entomologist 18(1-2): 107-108.
2. Basit, M. A. and M. Ashfaq. 1999. Collaborative effect of optimum dosages of N, K, Ca, P and Mn on the larval development and silk yield of *Bombyx mori* (L.). Pakistan J. Biol. Sci. 2(3): 1002-1005.
3. Brodbeck, B. V., P. C. Andersen and R. F. Mizell. 1999. Effects of total dietary nitrogen and nitrogen form on the development of xylophagous leafhoppers. Arch. Insect Biochem. Physiol. 42: 37-50.
4. Dungern, P. and H. Briegel. 2001a. Enzymatic analysis of uricotelic protein catabolism in the mosquito (*Aedes aegypti*). J. Insect Physiol. 47: 73-82.
5. Dungern, P. and H. Briegel. 2001b. Protein catabolism in mosquitoes: ureotely and uricotelically in larval and imaginal *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 47: 131-141.
6. Evangelista, A., A. D. Carvalho, R. Takahashi and A. D. De-Carvalho. 1997. Performance of silkworm (*Bombyx mori* L.) fed with vitaminic and mineral supplement. Revista de Agric. Piracicaba 72(2): 199-204.
7. Ghosh, M. K. and R. C. Srivastava. 1996. Effect of ammonium sulphate on leaf constituents of *Quercus serrata* and its correlation with oak-tasar silkworm (*Antheraea proylei* J.). Nat. Acad. Sci. Letters 19(3-4): 53-58.
8. Govindan, R. M., S. B. Magadum, B.G. Krishna, and V. B. Magadum. 1989. Effect of fortification of potassium iodide and copper sulphate through castor leaf of eri silkworm, *Samia cynthia-ricini* Boisduval on economic traits. Mysore J. Agric. Sci. 23(1): 62-64.

9. Gupta B. K., M. Verma and V. K. Kharoo. 1990. Oral administration of potassium permanganate on silkworm (*Bombyx mori* L.) rearing. *Ann. Entomol.* 8(1): 61-62.
10. Hirayama, C., K. Konno and H. Shinbo. 1997. The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 43(10): 959-964.
11. Hirayama, C., M. Sugimura and H. Shinbo. 1999. Recycling of urea associated with the host plant urease in the silkworm larvae, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 45: 15-20.
12. Hirayama, C., M. Sugimura, H. Saito and M. Nakamura. 2000. Host plant urease in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 46: 1415-1421.
13. Horie, Y. 1995. Recent advances of nutritional physiology and artificial diet of the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan. *Korean J. Seric. Sci.* 37(2): 235-243.
14. Horie, Y. and K. Watanabe. 1983. Effect of various kinds of dietary protein and supplementation with limiting amino acids on growth, haemolymph components and uric acid excretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 29(2): 187-199.
15. Ito, T. 1978. Silkworm nutrition. PP. 121-157. *In: Y. Tazima (Ed.), The Silkworm an Important Laboratory Tool*, Kodansha Ltd., Tokyo, PP. 121-157.
16. Jungreis, A. M., P. Jatlow and G. R. Wyatt. 1973. Inorganic ion composition of haemolymph of the cecropia silkworm: changes with diet and ontogeny. *J. Insect Physiol.* 19: 225-233.
17. Karowe, D. N. and M. Martin. 1989. The effects of quantity and quality of diet nitrogen on the growth, efficiency of food utilization, nitrogen budget, and metabolic rate of fifth-instar *Spodoptera eridania* larvae. *J. Insect Physiol.* 35(9): 699-708.
18. Khan, A. R. and B. N. Saha. 1997. Nutrition of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, on feed supplemented with calcium lactate. *J. Ecobiol.* 9(1): 53-58.
19. Magadam, S. B. 1992. Effect of supplementation of potassium iodide on the economic parameters of the polyvoltine silkworm, *Bombyx mori*. *J. Ecobiol.* 3(3-4): 285-288.
20. Mullins, D. E. 1979. The effects of dietary potassium on fat and whole body ureate storage in *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* 9: 61-67.
21. Muniandy, S., M. Sheela and S. Nirmala. 1995. Effect of vitamins and minerals (Filibon) on food intake, growth and conversion efficiency in *Bombyx mori*. *Environ. and Ecol.* 13(2): 433-435.
22. Nirwani, R. B. and B. B. Kaliwal. 1996a. Increase of silk production and quantitative changes of carbohydrate and protein in the fat body and haemolymph after feeding potassium sulphate to bivoltine *Bombyx mori* L. *Sericologia* 36(3): 523-534.
23. Nirwani, R. B. and B. B. Kaliwal. 1996b. Effect of folic acid on economic traits and the change of some metabolic substances of bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. *Korean J. Seric. Sci.* 38(2): 118-123.
24. Sakamoto, E. and Y. Horie. 1979. Quantitative change of phosphorus compounds in haemolymph during development of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan* 48(4): 319-326.
25. Sengupta, K., B. D. Singh and T. C. Mustafu. 1972. Nutrition of silkworm, *B. mori*. I. Studies on the enrichment of mulberry leaf with various sugars, proteins, aminoacids and vitamins for vigorous growth of silkworms and increased cocoon crop production. *Ind. J. Seric.* 10: 11-19.
26. Sumida, M., K. Haga, Y. Tanaka, J. Shimabukuro, M. Ichida and F. Matsubara. 1993. Developmental changes in urea in the haemolymph (determined by a urease-indophenol method) in hybrid strains of the silkworm, *Bombyx mori*, and the effect of starvation in the fifth instar larvae, fed on artificial diet, on urea level in subsequent development. *Comp. Biochem. Physiol.* 105A(3): 563-570.
27. Thangavelu, K. and H. R. Bania. 1990. Preliminary investigation on effect of minerals in rain water on the growth and reproduction of silkworm, *Bombyx mori*. *Ind. J. Seric.* 29(1): 37-43.

28. Tietz, N. W. 1986. Textbook of Clinical Chemistry. W. B. Saunders, New York.
29. Trivedi, R. C., L. Rebar, E. Berta and L. Stong. 1978. New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. Clin. Chem. 24(11): 1908-1911.
30. Unni, B. G., A. C. Kakoty, A. Choudhury, D. Khanikar and A. C. Ghosh. 1996. Mineral compositions of host plants of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood. Environ. and Ecol. 14(2): 371-373.
31. Viswanath, A. P. and K. Krishnamurthy. 1982. Effect of foliar of micronutrients on the larval development and cocoon characters of silkworm, *Bombyx mori*. Ind. J. Seric. 21: 1-6.
32. Yeasmin, T., N. Absar and A. A. Sarker. 1995. Effect of foliar spray of micronutrients and urea on the nutritional quality of mulberry (*Morus* sp.) leaves. Ind. J. Seric. 34(2): 149-152.
33. Zaman, K., M. Ashfaq and W. Akram. 1996. Effect of feeding Mg and N treated mulberry leaves on larval development of silkworm, *Bombyx mori* L. and silk yield. Pakistan Entomol. 18(1-2): 78-79.