

<https://dx.doi.org/10.22034/arpp.0621.16150>

تاثیر نوع گرده در جیره غذایی مصنوعی بر برخی مؤلفه‌های زیستی و فیزیولوژیکی شب‌پره موم‌خوار *Galleria mellonella* بزرگ،

عباس دوستی^۱، رضا فرشباف پورآباد^{۱،۲}، شبنم عاشوری^۳، داود محمدی^۴

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اژه، ۳۵۱۰۰ ازمیر، ترکیه. پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. shashouri@aeoi.org.ir

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰

چکیده

شب‌پره موم‌خوار بزرگ، *Galleria mellonella* از مهم‌ترین آفات کندو و شان زنبور عسل در ایران و دنیا بوده و منجر به مرگ کلنی‌های ضعیف زنبور عسل می‌شود. همچنین این حشره میزبان آزمایشگاهی مهمی برای جداسازی و تولید انبوه قارچ‌ها و نماتدهای بیمارگر حشرات است. در این پژوهش، اثر چند رژیم غذایی مصنوعی حاوی گرده گل گیاهان مختلف شامل شقایق، کلزا، کلزای وحشی و سیب روی برخی مؤلفه‌های فیزیولوژیکی و زیستی این حشره مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین میزان پروتئین روده لاروهای سن آخر در رژیم غذایی حاوی گرده شقایق (۲۰/۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ثبت شد و بین بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیش‌ترین فعالیت نسبی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پکتیناز گوارشی در روده لاروهای سن آخر مربوط به رژیم غذایی حاوی گرده شقایق (۱۰۰٪) بود و به نسبت آن کم‌ترین فعالیت آنزیم‌ها در رژیم غذایی حاوی گرده کلزا (به ترتیب ۵۱/۱۲ درصد و ۷۶/۳۵ درصد) ثبت شد. لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی حاوی گرده شقایق و سفیره‌های حاصل از آن‌ها میانگین وزنی بیش‌تری (به ترتیب ۳۲۵ و ۱۷۵ میلی‌گرم) نسبت به بقیه رژیم‌های غذایی داشتند. بیش‌ترین درصد زنده مانده لارو و درصد سفیره شدن به ترتیب مربوط به رژیم‌های غذایی حاوی گرده شقایق (۷۷/۵ و ۷۷/۵ درصد)، سیب (۷۰ و ۶۲/۵ درصد)، کلزا (۵۲/۵ و ۴۷/۵ درصد) و کلزای وحشی (۴۷/۵ و ۳۰ درصد) بود. با این وجود، درصد ظهور حشرات کامل در رژیم‌های غذایی مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. با توجه به نتایج، رژیم غذایی حاوی گرده کلزا و کلزای وحشی به نسبت شقایق و سیب، رژیم مناسبی برای پرورش شب‌پره موم‌خوار بزرگ نیستند و بهتر است در تهیه رژیم غذایی مصنوعی جهت پرورش انبوه این حشره از گرده گل شقایق استفاده گردد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های گوارشی، پروتئین، رژیم غذایی، شب‌پره موم‌خوار بزرگ، مؤلفه‌های زیستی.

The effect of different pollens in artificial diet on some biological and physiological parameters of the greater wax moth, *Galleria mellonella*

Abbas Doosti¹, Reza Farshbaf Pourabad^{1,2}, Shabnam Ashouri³, Davood Mohammadi⁴

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. ²Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ege University, 35100 Izmir, Turkey. ³Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran. ⁴Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz-Iran. shashouri@aeoi.org.ir

Received: 5 March 2023 Revised: 9 April 2023 Accepted: 9 April 2023

Abstract

The greater wax moth, *Galleria mellonella* is one of the most important pests of beehives in Iran and the world. Which leads to the death of weak honey bee colonies. Also, this insect is an important laboratory host for the isolation and mass production of the entomopathogenic fungi and nematodes. In this research, the effect of pollens of different plants including poppy, wild rapeseed, rapeseed and apple in artificial diet, were evaluated on some physiological and biological parameters of this insect. The highest amount of the last instar larval gut protein was recorded in the diet containing poppy pollen (20.22 mg/ml) and no significant difference was observed between the other treatments. The highest relative activity of digestive alpha-amylase and pectinase in the last instar larval gut was related to the diets containing poppy pollen (100 %), and the lowest relative enzymes activity was recorded in the diet containing rapeseed pollen (51.12 and 76.35 %, respectively). Larvae fed with the diet containing poppy pollen and the resulting pupae had a higher weight than the other diets (325 and 175 mg, respectively). The highest percentage of larval survival and pupation was related to the diets containing poppy (77.5 and 77.5 %), apple (62.5 and 70 %), rapeseed (52.5 and 47.5 %) and wild rapeseed (47.5 and 30 %) pollens, respectively. However, there was no significant difference in the percentage of adult emergence in different diets. Consequently, the diets containing rapeseed and wild rapeseed pollens compared to poppy and apple, are not suitable diets for rearing *G. mellonella* and it is better to use poppy pollen in the preparation of artificial diet for the mass rearing of this insect.

Key words: Biological parameters, diet, digestive enzymes, greater wax moth, protein.

How to cite:

Doosti A, Farshbaf Pourabad R, Ashouri Sh, Mohammadi D, 2023. The effect of different pollens in artificial diet on some biological and physiological parameters of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 12 (3): 353-362.

مقدمه

رژیم‌های غذایی آن‌ها متغیر بوده و فیزیولوژی و زیست‌شناسی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Chapman 1998; Varmazyari et al. 2021; Mafi Pashakolaei et al. 2021; Sohrabi et al. 2022). آلفا-آمیلازها آنزیم‌های گوارشی اصلی هستند که در مرحله اول هضم پلی‌ساکاریدها عمل می‌کنند. آن‌ها عمدتاً در روده میانی ترشح می‌شوند، اما در بزاق نیز وجود دارند. پکتینازها گروه ناهمگنی از آنزیم‌ها هستند که بر اساس نحوه عملکرد آن‌ها روی زیرنهیشت به پلی‌گالاکتوروناز (Polygalacturonase)، پکتین‌استراز (Pectin esterase) و پکتین‌لیاز (Pectin lyase) طبقه‌بندی می‌شوند (Li et al. 2017).

تأثیر نوع رژیم غذایی روی مولفه‌های فیزیولوژیکی حشرات در مطالعات قبلی این محققین گزارش شده است، از جمله Nejat et al. (2020) تأثیر چهار رژیم غذایی مختلف را بر تغییرات میزان پروتئین کل، آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پکتیناز گوارشی کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* Hubner (Lep.: Noctuidae) را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که میزان پروتئین و فعالیت آلفا-آمیلاز و پکتیناز گوارشی این حشره به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رژیم‌های غذایی مختلف قرار گرفت. تأثیر ترکیبات مختلف موجود در رژیم غذایی از جمله گرده گیاهان روی مولفه‌های زیستی شب‌پره موم‌خوار بزرگ توسط سایر محققین بررسی شده است (Eischen & Dietz 1990; Coskun et al. 2006; Anwar Mohamed et al. 2021; Mahmoud & Abdel-Rahman 2014). تأثیر نوع و کیفیت گرده بر رشد و نمو، مولفه‌های زیستی و فیزیولوژیکی همچنین تحمل به انگل در زنبور عسل *Apis mellifera* L. (Hym.: Apidae) نیز گزارش شده است (Di Pasquale et al. 2021; Brys et al. 2016; Frias et al. 2013).

Kazek et al. (2019) تأثیر رژیم غذایی بر مقاومت به عوامل بیماری‌زا در شب‌پره موم‌خوار بزرگ را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که رژیم غذایی حشرات می‌تواند تأثیر قابل توجهی در حساسیت و پاسخ دفاعی آن‌ها به عوامل بیماری‌زا داشته باشد. Lou et al. (2020) نشان دادند که مکمل‌سازی جیره پرورش شب‌پره موم‌خوار بزرگ بر مولفه‌های فیزیولوژیکی لارو و تجزیه زیستی پلاستیک توسط آن‌ها تأثیر گذاشته و میکروبیوم هسته روده را تغییر داده است.

در این مطالعه تأثیر رژیم‌های غذایی دارای گرده‌های گیاهان مختلف بر میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پکتیناز گوارشی و میزان پروتئین موجود در روده لاروهای سن آخر شب‌پره موم‌خوار بزرگ و نیز برخی مولفه‌های زیستی مثل

شب‌پره موم‌خوار بزرگ، *Galleria mellonella* F. (Lep.: Pyralidae) از مهم‌ترین آفات کندوها و شان زنبور عسل در ایران و دنیا محسوب می‌گردد. بیش‌ترین خسارت این آفت روی شان‌های کهنه و در انبارهای نگهداری کندوهای عسل روی می‌دهد. تغذیه لاروها به‌ویژه روی ناخالصی‌های موم، پوسته‌های لاروی زنبورها و گرده گل‌ها صورت می‌گیرد. لاروها ضمن تغذیه تونل‌های ابریشمی نیز ایجاد می‌کنند که موجب کاهش کیفیت شان‌ها می‌شود. تخریب شان‌های موم توسط لاروها منجر به مرگ کلنی‌های ضعیف زنبورعسل می‌گردد (Kwadha et al. 2017). گزارش شده است که هم حشره بالغ و هم لارو شب‌پره موم‌خوار بزرگ به عنوان ناقل کنه‌های واروا (انگل‌های خارجی زنبوران عسل) عمل می‌کنند (Rahimi & Parichehreh Dizji 2021). این حشره به عنوان مناسب‌ترین میزبان برای جداسازی، تکثیر آزمایشگاهی و همچنین تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin *Conidiobolus coronatus* و *Paecilomyces lilacinus* Thom (Costantin) Batko (Mc Namara et al. 2017; Mohamed et al. 2021; Kazek et al. 2018) و نماتدهای بیمارگر حشرات از جمله *Heterorhabditis*، *Steinernema carpocapsae* Weiser *H. bacteriophora* Poinar و *sonorensis* Poinar شده است (Biraz et al. 2008; Kotchofa & Baimey 2019; Devi 2021; Hussein et al. 2022). از آن به عنوان موجود زنده مدل برای مطالعات فیزیولوژی حشرات، ژنومیکس و پروتئومیکس، غربال‌گری حشره‌کش‌ها و سم‌شناسی حشرات استفاده می‌شود. همچنین، این حشره به عنوان غذای حیوانات پرورشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Devi 2021).

گرده غذای طبیعی برای لارو شب‌پره موم‌خوار بزرگ است، که حاوی پروتئین، اسیدهای آمینه، نشاسته، استرول‌ها، لیپیدها و نیتروژن است. با این حال، گرده به طور قابل توجهی در بین گیاهان متفاوت بوده و محتوی پروتئین آن از ۲/۵ تا ۶۱ درصد متغیر است (Roulston & Cane 2000). پروتئین‌های موجود در غذا، اسیدهای آمینه مورد نیاز برای ساخت بافت‌ها، آنزیم‌ها و پروتئین‌های جدید را فراهم می‌کنند (Le Gal & Behmer 2014).

میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات بسته به نوع

قرار داده شدند. نمونه‌های آماده شده با دستگاه همگن‌ساز به مدت ۳۰ ثانیه همگن شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Centrifuge) شدند. محلول‌های رویی داخل هر میکروتیوب پس از انتقال به میکروتیوب‌های دیگر، به عنوان نمونه پروتئینی جهت استفاده در آزمایش‌ها به دمای ۲۰- درجه سلسیوس منتقل گردیدند (Nejat et al. 2020).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها

غلظت پروتئین بر اساس روش Bradford (1976) با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) به عنوان پروتئین استاندارد در غلظت‌های ۰/۰۶۳، ۰/۰۳۲، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۰۶۲۵ و ۰/۰۰۳۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شدند. به این صورت که مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی، در پنج تکرار داخل چاهک‌های الیزاریدر (ELISA reader) ریخته و ۱۹۰ میکرولیتر معرف رنگی بردفورد (حاوی ۰/۰۱٪ کوماسی بریلیانت بلو (Coomassie Brilliant Blue) G 250، ۰/۰۸٪ اسید فسفریک و ۰/۰۴٪ اتانول) به چاهک‌ها اضافه شدند. بعد از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه، میزان جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر ثبت شد. با ترسیم نمودار استاندارد غلظت پروتئین شاخص و با استفاده از معادله خط راست، غلظت پروتئین نمونه‌های مورد نظر به دست آمدند.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پکتیناز

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز و پکتیناز با استفاده از روش Bernfeld (1955) با اندکی تغییر انجام شد. از نشاسته و پکتین یک درصد به ترتیب به‌عنوان زیرنهشت آلفا-آمیلاز و پکتیناز استفاده شد. ترکیب واکنش حاوی، ۱۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی، ۶۵ میکرولیتر بافر گلاسیسین (۰/۵ مولار) (اسیدیته ۱۰) و ۲۵ میکرولیتر زیر نهشت، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیتروسالسیلیک اسید (DNS) به هر میکروتیوب اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. بعد از سرد شدن، مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از محلول واکنش به چاهک‌های الیزاریدر ریخته شده و میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید. در تیمار شاهد به جای آنزیم، معادل مقدار آن از بافر گلاسیسین استفاده شد. آزمایش پنج بار تکرار شد و هر تکرار خود شامل سه تکرار تکنیکی بود. فعالیت نسبی آنزیمی به صورت درصدی از فعالیت آلفا-آمیلاز و پکتیناز

میانگین وزن لاروها و شفیره‌ها، درصد زنده‌مانی لاروی، درصد تبدیل شدن به شفیره و درصد ظهور حشرات کامل بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

پرورش شب‌پره موم‌خوار بزرگ

حشره مورد نظر از کلنی موجود در اتاق پرورش حشرات گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شد. کلنی حشرات پس از دو نسل پرورش روی رژیم غذایی فاقد گرده در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز برای این پژوهش آماده شد. پرورش حشرات در دمای 2 ± 30 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 5 ± 50 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام گرفت. برای پرورش از ظروف پلاستیکی نیمه شفاف استوانه‌ای به شعاع ۲۰ و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر استفاده شد و درب این ظروف با پارچه توری ۶۰ مش پوشیده شدند. پس از تهیه رژیم غذایی، داخل هر رژیم ۱۰۰ عدد لارو سن یک انتقال داده شد. لاروها تا زمان رسیدن به مرحله حشره کامل در داخل این ظروف پرورش یافتند. برای تخم‌گیری نیز از همان ظروف استوانه‌ای که دهانه ظروف با توری ۶۰ مش پوشانده شده بود استفاده شد. سپس ظروف به‌صورت وارونه روی یک کاغذ A4 قرار گرفت تا تخم‌گذاری روی آن‌ها انجام شود.

رژیم‌های غذایی مورد آزمایش

از چهار نوع رژیم غذایی مختلف که در نوع گرده با هم متفاوت بودند، استفاده شد. رژیم‌های غذایی شامل موم ۴، مخمر ۱۰، آرد گندم ۴۳، عسل ۲۱، گلیسیرین ۱۷/۵ و گرده گل ۴/۵ درصد بودند (Singh 1977). انواع گرده گل‌ها شامل گرده گیاهان شقایق (Poppy)، کلزای وحشی (Wild rapeseed)، سیب (Apple) و کلزا (Rapeseed) می‌باشد.

تهیه نمونه پروتئینی

از ظروف پرورش هر رژیم غذایی تعداد ۴۰ عدد لارو سن آخر به صورت تصادفی انتخاب شده و به روی یخ خشک قرار داده شد تا بی‌تحرك شوند. سپس داخل ۲۰ عدد میکروتیوب (Microtube) (پنج تکرار) ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته شد. روده هشت عدد لارو تشریح و به داخل هر میکروتیوب انتقال داده شد. کار تشریح با قیچی و پنس‌های ظریف مخصوص انجام شد. در حین تشریح، میکروتیوب‌ها در داخل ظرف یخ

آماري ۱٪ مورد استفاده قرار گرفت. نمودارها با برنامه Microsoft Excel 2010 رسم شدند.

نتایج

تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر میزان پروتئین موجود در روده لارو

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان پروتئین روده لارو شب‌پره موم‌خوار بزرگ تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف در سطح احتمال آماری ۱٪ دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد ($F_{3,19} = 11.927, P = 0.001$) (شکل ۱). بیش‌ترین میزان پروتئین ۲۰/۲۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مربوط به روده لارو تغذیه کرده از رژیم غذایی حاوی گرده شقایق بود. کم‌ترین میزان پروتئین ۱۳/۵۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز مربوط به لارو تغذیه کرده از رژیم غذایی حاوی گرده کلزا بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با میزان پروتئین روده لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی حاوی گرده سیب و کلزای وحشی نداشت.

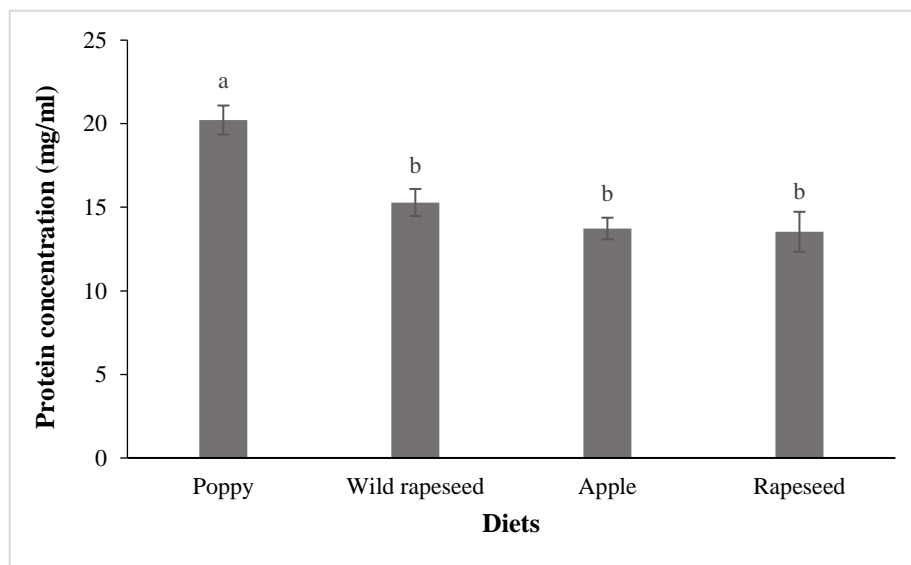
حشرات تغذیه شده از رژیم حاوی گرده شقایق منظور شدند.

بررسی مؤلفه‌های زیستی

جهت بررسی مؤلفه‌های زیستی ابتدا از حشرات کامل، تخم‌گیری انجام گرفت. پس از تفریح تخم‌ها، ده عدد لارو سن یک شمارش و به درون ظروف پلاستیک جداگانه‌ای با ارتفاع ۷ و قطر ۵ میلی‌متر که هر کدام حاوی مقدار ۱۰ گرم از هر رژیم غذایی بودند، انتقال داده شد. به صورت روزانه داده‌برداری از همه تیمارها انجام گرفت. میانگین وزن لاروی، درصد زنده‌مانی لارو، درصد شفیره شدن، میانگین وزن شفیره و درصد ظهور حشرات کامل برای هر رژیم غذایی ثبت شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام گردید (Nejat et al. 2020).

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS Ver. 22 انجام شد. جهت تجزیه واریانس داده‌ها از طرح کاملاً تصادفی یک طرفه استفاده شد. در گروه‌بندی میانگین‌های مربوط به آزمایش‌های مختلف، آزمون توکی در سطح احتمال



شکل ۱. غلظت پروتئین روده لارو سن آخر شب‌پره موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف، حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با آزمون توکی در سطح احتمال آماری ۱٪ می‌باشد.

Figure 1. Protein concentration of greater wax moth, *Galleria mellonella* late instar larval gut fed on different diets, different letters on each column indicate a significant difference ($P = 0.001$) based on Tukey's test.

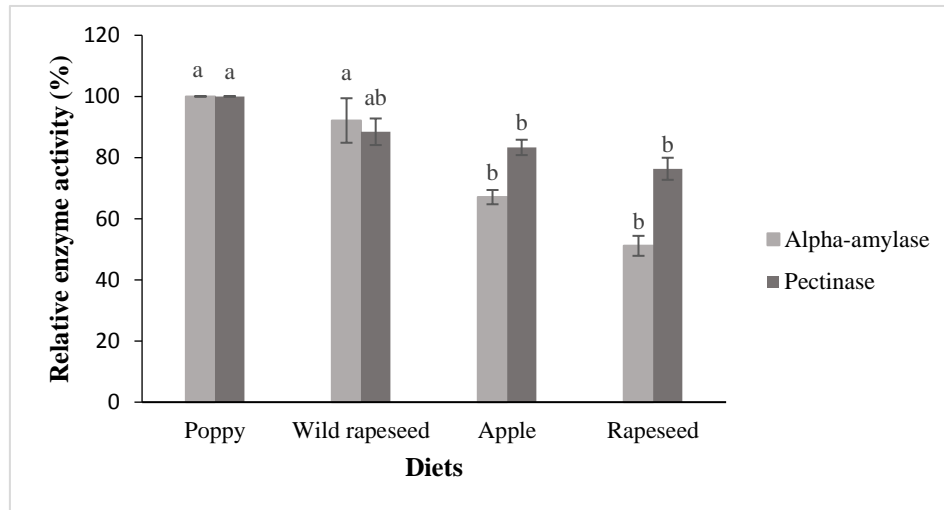
در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم‌های لاروهای تغذیه کرده روی سه رژیم دیگر به صورت فعالیت نسبی نسبت به آن محاسبه شد (شکل ۲). مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی مختلف در سطح

تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر میزان فعالیت آلفا-آمیلاز و پکتیناز روده لارو

میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز و پکتیناز در رژیم غذایی حاوی گرده شقایق که بیش‌تر از بقیه رژیم‌ها بود ۱۰۰ درصد

از رژیم‌های غذایی مختلف در سطح احتمال آماری ۱٪ تفاوت معنی‌دار نشان داد ($F_{3,19} = 10.403, P = 0.001$). کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم پکتیناز در لاروهای تغذیه کرده از رژیم حاوی گرده کلزا (۷۶/۳۵ درصد) بود که تفاوت معنی‌داری با رژیم حاوی گرده سیب (۸۳/۳۲ درصد) و کلزای وحشی (۸۸/۴۴ درصد) نداشت. فعالیت آنزیم پکتیناز در رژیم غذایی حاوی گرده کلزای وحشی با شقایق نیز تفاوت معنی‌داری نشان

احتمال آماری ۱٪ تفاوت معنی‌داری نشان داد ($F_{3,19} = 29.47, P = 0.001$). کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی حاوی گرده کلزا (۵۱/۱۲ درصد) بود که تفاوت معنی‌داری با رژیم حاوی گرده سیب (۶۷/۰۶ درصد) نداشت. رژیم غذایی حاوی گرده شقایق نیز تفاوت معنی‌داری با رژیم غذایی حاوی گرده کلزای وحشی (۹۲/۱۳ درصد) نداشت. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پکتیناز لاروهای تغذیه کرده

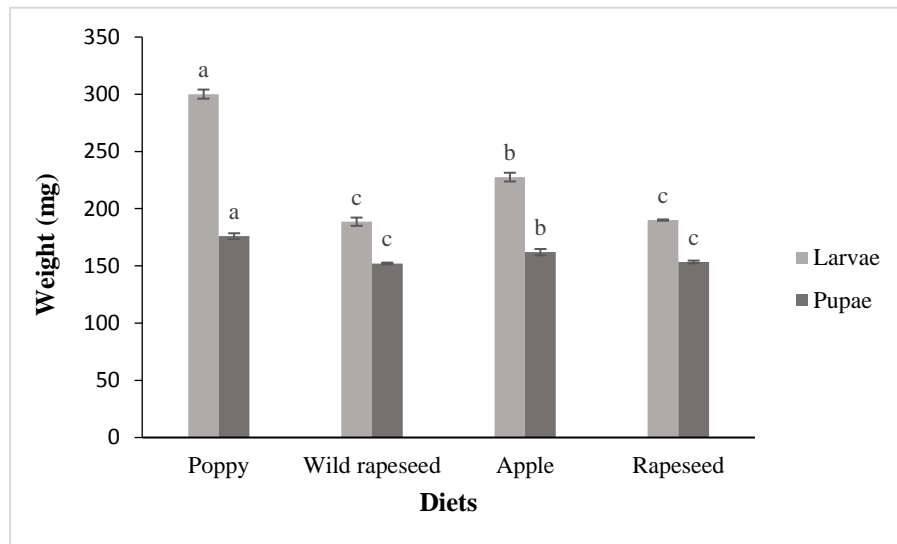


شکل ۲. درصد فعالیت نسبی آلفا-آمیلاز و پکتیناز روده لارو سن آخر شب‌پره موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف، حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با آزمون توکی در سطح احتمال آماری ۱٪ می‌باشد.

Figure 2. Relative late instar larval gut alpha-amylase and pectinase activity of greater wax moth, *Galleria mellonella* fed on different diets, different letters on each column indicate a significant difference ($P = 0.001$) based on Tukey's test.

مقایسه میانگین وزن شفیره‌های تشکیل شده از لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های مختلف در سطح احتمال آماری ۱٪ تفاوت معنی‌دار نشان داد ($F_{3,15} = 30.361, P = 0.001$) (شکل ۳). وزن شفیره‌ها در رژیم غذایی حاوی گرده شقایق (۱۷۵ میلی‌گرم) بیش‌تر از بقیه رژیم‌ها بود. بعد از آن وزن شفیره‌ها در رژیم حاوی گرده سیب (۱۶۲ میلی‌گرم) ثبت شد. کم‌ترین وزن شفیره در دو رژیم حاوی گرده کلزا و کلزای وحشی به ترتیب با ۱۵۳ و ۱۵۲ میلی‌گرم ثبت و بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر وزن لارو و شفیره مقایسه میانگین وزن لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی مختلف در سطح احتمال آماری ۱٪ تفاوت معنی‌دار نشان داد ($F_{3,15} = 250.602, P = 0.001$) (شکل ۳). میانگین وزن لاروها در رژیم غذایی حاوی گرده شقایق (۳۲۵ میلی‌گرم) بیش‌تر از بقیه رژیم‌ها بود. میانگین وزن لاروها در رژیم حاوی گرده سیب (۲۲۷ میلی‌گرم) ثبت شد و بین دو رژیم غذایی حاوی گرده کلزا و کلزای وحشی به ترتیب با ۱۹۰ و ۱۸۸ میلی‌گرم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

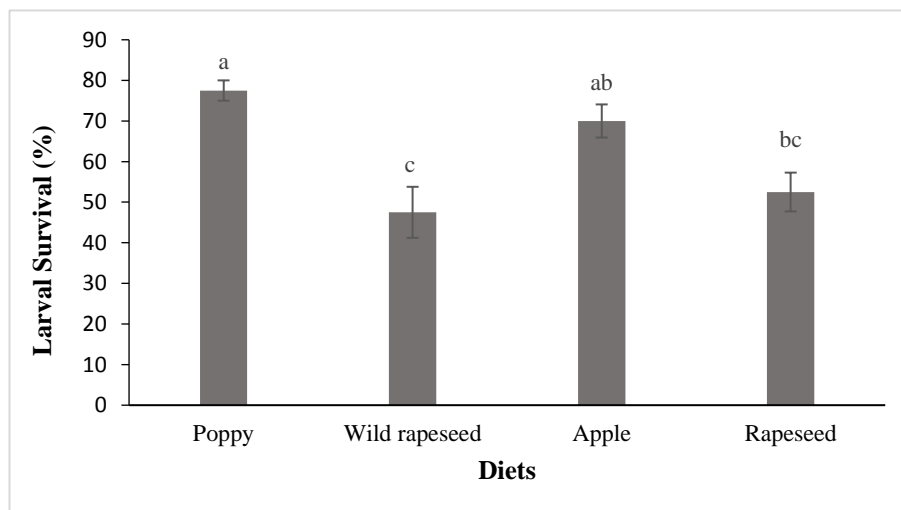


شکل ۳. وزن لارو سن آخر و شفیره‌های شب‌پره موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف. حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با آزمون توکی در سطح احتمال آماری ۱٪ می‌باشد.

Figure 3. Weight of late instar larvae and pupa of greater wax moth, *Galleria mellonella* fed on different diets. Different letters on each column indicate a significant difference ($P = 0.001$) based on Tukey's test.

بیش‌تر از بقیه رژیم‌ها بود که با رژیم حاوی گرده سیب (۷۰ درصد) تفاوت معنی‌داری نداشت. در رژیم حاوی گرده کلزای وحشی (۴۷/۵ درصد) کم‌ترین درصد زنده مانده ثبت شد و در این رژیم با رژیم حاوی گرده کلزا (۵۲/۵ درصد) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

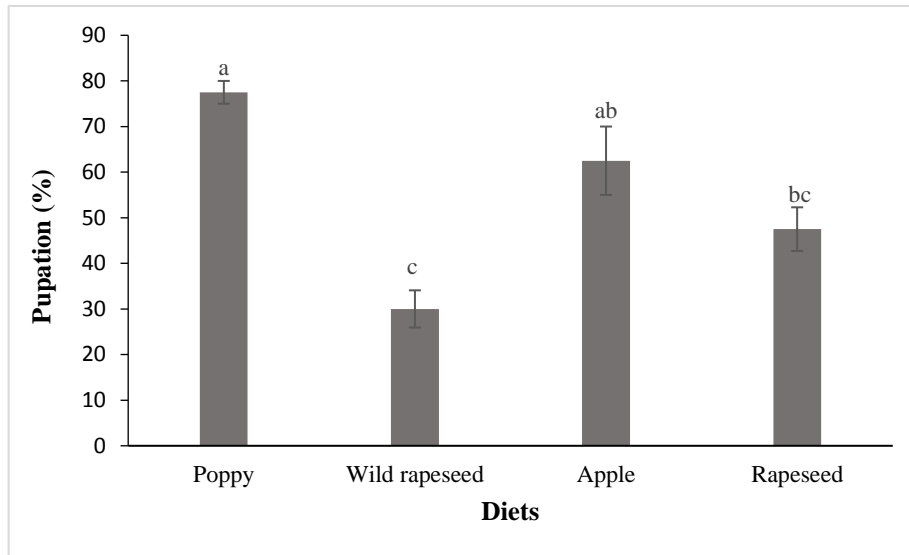
تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر زنده‌مانی لارو، تشکیل شفیره و ظهور حشرات کامل مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های مختلف در سطح احتمال آماری ۱٪ تفاوت معنی‌دار نشان داد ($F_{3,15} = 9.439, P = 0.002$) (شکل ۴). درصد زنده‌مانی لارو در رژیم غذایی حاوی گرده شقایق (۷۷/۵ درصد)



شکل ۴. درصد زنده‌مانی لاروهای شب‌پره موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف. حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با آزمون توکی در سطح احتمال آماری ۱٪ می‌باشد.

Figure 4. Larval survival of greater wax moth, *Galleria mellonella* fed on different diets. Different letters on each column indicate a significant difference ($P = 0.002$) based on Tukey's test.

سیب (۶۲/۵ درصد) تفاوت معنی‌داری نداشت. کم‌ترین درصد شفیره شدن در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی حاوی گرده کلزای وحشی (۳۰ درصد) می‌باشد که تفاوت معنی‌داری با رژیم غذایی حاوی گرده کلزا (۴۷/۵ درصد) نداشت.



شکل ۵. درصد شفیره شدن شب‌پره موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف. حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با آزمون توکی در سطح احتمال آماری ۰/۱ می‌باشد.

Figure 5. Pupaion of greater wax moth, *Galleria mellonella* fed on different diets. Different letters on each column indicate a significant difference ($P=0.001$) based on Tukey's test.

مطلوب‌تر سبب می‌شود تا میزان پروتئین روده و در نتیجه فعالیت آنزیم‌های گوارشی حشرات افزایش یابد، بنابراین رژیم غذایی مصنوعی حاوی گرده گل شقایق از نظر مولفه‌های فیزیولوژیکی مورد بررسی، رژیم مطلوب‌تری برای پرورش این حشره محسوب می‌گردد.

علاوه بر مولفه‌های فیزیولوژیک، در مورد مولفه‌های زیستی مورد مطالعه نیز، غیر از درصد ظهور حشرات کامل، در بقیه مولفه‌ها بین رژیم‌های مختلف تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. هر چه رژیم غذایی مطلوب‌تر باشد این مولفه‌ها بهبود می‌یابند، به طوری که در این پژوهش کم‌ترین درصد زنده مانده لاروها، وزن لاروها، درصد تشکیل شفیره و وزن شفیره در رژیم‌های غذایی حاوی گرده کلزای وحشی و کلزا ثبت شد و در رژیم غذایی حاوی گرده شقایق بیش‌ترین مقادیر این مولفه‌ها نسبت به بقیه رژیم‌های غذایی مشاهده شد.

Eischen & Dietz (1990) گزارش کردند که تقویت رژیم غذایی مصنوعی با پنج درصد گرده، عسل یا موم زنبور عسل به طور قابل توجهی بقای شب‌پره موم‌خوار بزرگ را افزایش می‌دهد. بقاء در رژیم غذایی پایه به طور متوسط ۲۷/۴ درصد بود و

مقایسه میانگین درصد تشکیل شفیره از لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های مختلف در سطح احتمال آماری ۰/۱ تفاوت معنی‌دار نشان داد ($F_{3,15} = 16.2243, P = 0.001$) (شکل ۵). درصد شفیره شدن در رژیم غذایی حاوی گرده شقایق (۷۷/۵ درصد) بیش‌تر از بقیه رژیم‌ها بود که با رژیم غذایی حاوی گرده

مقایسه میانگین درصد ظهور حشرات کامل از لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($F_{3,15} = 0.447, P = 0.724$). درصد ظهور حشرات کامل در رژیم‌های غذایی حاوی گرده کلزای وحشی، شقایق، کلزا و سیب به ترتیب ۹۱/۶۶، ۹۰/۶۲، ۸۴/۵۸ و ۷۹/۹۱ درصد ثبت شد و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند.

بحث

هدف از این تحقیق بررسی زیست‌شناسی و فیزیولوژی سیستم گوارشی شب‌پره موم‌خوار بزرگ به عنوان میزبان پرورش عوامل بیماری‌زای حشرات، تحت تأثیر رژیم‌های غذایی مختلف با نوع گرده گل متفاوت بود. میزان پروتئین موجود در روده لاروها و فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و پکتیناز روده لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی مختلف متفاوت بود. در این آزمایش کم‌ترین مقدار پروتئین روده و فعالیت آنزیم‌های روده لاروهای سن آخر مربوط به رژیم‌های غذایی حاوی گرده کلزا بوده و رژیم حاوی گرده شقایق بیش‌ترین مقادیر را نسبت به بقیه رژیم‌های غذایی نشان داد. از آنجایی که رژیم غذایی

(2018). *al.* سه رژیم غذایی مصنوعی را با رژیم طبیعی مورد مقایسه قرار داده و نشان دادند که جیره حاوی چهار قسمت موم زنبور و یک قسمت گرده شبدر جمع آوری شده توسط زنبور، بهترین جیره برای پرورش این حشره بوده است. برتری این رژیم غذایی کوتاه شدن مدت لاروی (۳۳/۶۰٪)، بقای بیشتر لارو (۸۸/۳۳٪)، افزایش وزن لارو (۱۸۶ میلی‌گرم)، افزایش وزن شفیره (۱۹۳ میلی‌گرم)، کاهش مرگ و میر شفیرگی (۶/۷٪)، افزایش باروری حشره ماده (۱۰۵۶ تخم به ازای هر ماده) و افزایش زادآوری (۹۷/۸۱٪) نسبت به رژیم غذایی پایه بود. (2018). *Akinlabi et al.* تاثیر چهار نوع رژیم غذایی مصنوعی مختلف و موم عسل طبیعی را بر مولفه‌های رشدی و فیزیولوژیکی این حشره در شرایط آزمایشگاهی بررسی کرده و نشان دادند که ترکیب رژیم غذایی با تسریع طول فاز لاروی و افزایش وزن لاروها به چرخه زندگی این حشره کمک می‌کند. در پژوهش حاضر نیز نوع گرده در وزن لاروها تاثیر معنی‌داری داشت. (2020). *Kandel et al.* درصد ظهور حشرات کامل شب‌پره موم‌خوار بزرگ را در جیره غذایی آزمایشگاهی و طبیعی (موم عسل) مقایسه و به ترتیب ۸۳ و ۹۴٪ گزارش نمودند که با نتایج این تحقیق که بین ۷۹ تا ۹۲٪ (بدون تفاوت معنی‌دار) در بین جیره‌های مورد مطالعه به دست آمد، مطابقت داشت. (2021). *Hickin et al.* به طور عجیبی به این نتیجه رسیدند که لاروهای این حشره در جیره دارای مخمر نسبت به گرده به توده لاروی بالاتری دست یافتند. *Mahmoud & Abdel-Rahman* (2021) نشان دادند که در رژیم غذایی حاوی گرده و موم، نسبت به رژیم‌های حاوی عسل و موم، پروپولیس (*Propolis*) و موم و همچنین فقط موم طول دوره رشدی مراحل مختلف از همه کم‌تر بوده است، همچنین وزن لارو و شفیره به ترتیب ۱۷۶/۴ و ۱۵۸/۶ میلی‌گرم به طور معنی‌داری بیش‌تر بوده است، که وزن لارو ثبت شده با گرده به مراتب از حداکثر وزن ثبت شده در تحقیق حاضر روی رژیم گرده شقایق (۳۲۵ میلی‌گرم) کم‌تر می‌باشد. ایشان همچنین بیان کردند که در رژیم حاوی گرده و موم، دوره قبل از تخم‌ریزی کاهش یافته و دوره تخم‌ریزی و بعد از تخم‌ریزی نسبت به رژیم‌های دیگر افزایش یافته است. طول عمر حشرات کامل نر و ماده نیز به طور معنی‌داری در این رژیم افزایش داشته است. *Hussein et al.* (2022). تاثیر چهار نوع رژیم غذایی مصنوعی و یک نوع غذای طبیعی (موم) بر وزن و محتوی چربی کل لارو شب‌پره موم‌خوار بزرگ را بررسی کردند. از نظر آماری، وزن لارو با میزان لیپید لارو همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت.

هنگامی که عسل، گرده یا موم اضافه شد، به ترتیب درصد بقا به ۴۴/۷، ۸۰/۸ و ۹۸/۶ افزایش یافت، که در تحقیق حاضر نیز ۹۱ درصد ظهور حشرات کامل در رژیم حاوی گرده شقایق مشاهده شد. دوره رشد شب‌پره‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۵ درصد گرده یا ترکیبی از گرده، عسل و موم تقریباً دو الی پنج روز نسبت به رژیم فاقد آن‌ها کوتاه‌تر شد. ماده‌های تازه ظهور کرده که در مرحله لاروی با جیره ۱۰۰ درصد گرده، عسل و موم تغذیه شده بودند، ۳۶ درصد بیش‌تر از ماده‌های به دست آمده از لاروهای تغذیه شده با جیره مصنوعی پایه، وزن داشتند. (2006). *Coskun et al.* اثر موم‌های مختلف و مقدار ساکارز در رژیم غذایی مصنوعی را بر رشد لارو شب‌پره موم‌خوار بزرگ بررسی و بیان کردند که طول دوره لاروی و وزن لاروها در رژیم‌های غذایی مختلف تفاوت دارد. در تحقیق حاضر نیز تفاوت در وزن لارو و شفیره در بین رژیم‌های حاوی گرده متفاوت، مشاهده شد. (2008). *Büyüküzgel & Kalender* عنوان کردند که رژیم‌های غذایی اصلاح شده با آنتی‌بیوتیک‌ها در محتوی پروتئین کل افراد بالغ شب‌پره موم‌خوار بزرگ تاثیر می‌گذارد. در این تحقیق نیز نوع گرده در مقدار پروتئین روده لاروها تاثیرگذار بود. (2008). *Birah et al.* در جیره غذای مصنوعی حاوی آرد گندم، سبوس گندم، پودر شیر، آرد ذرت، پودر مخمر خشک، پودر موم، عسل و گلیسرین تا ۹۱/۷٪ بقاء برای این حشره گزارش کردند. (2012). *Metwally et al.* رژیم غذایی مصنوعی کم هزینه برای پرورش انبوه شب‌پره موم-خوار بزرگ نسبت به غذای طبیعی یعنی موم زنبور عسل، معرفی کردند. این دو رژیم در تبدیل غذای مصرفی به وزن نهایی لارو تولید شده بهترین بودند و باعث شدند که پرورش با هزینه کم‌تری انجام شود، بدون اینکه اثرات نامطلوبی بر کمیت و کیفیت لارو تولید شده یا مناسب بودن آن‌ها برای پرورش نژادهای حشره پاتوژن داشته باشد. (2014). *Anwar Mohamed et al.* با بررسی اثر پنج نوع جیره غذایی (با ترکیب گرده) در رشد و نمو و تلفات شب‌پره موم‌خوار بزرگ بیان کردند که گرده در اکثر موارد سبب بهبود مولفه‌های رشدی این حشره از جمله میزان مصرف غذا، طول دوره‌های مختلف رشدی، میزان باروری حشرات ماده و زنده‌مانی گردید که در تایید نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. (2018). *Jorjao et al.* ترکیب رژیم غذایی را پیشنهاد دادند که با تسریع طول فاز لاروی و افزایش وزن لاروها، به پرورش هر چه بهتر این حشره کمک نمود. این رژیم همچنین با افزایش حجم همولف و غلظت هموسیت، سیستم ایمنی این حشره را در مقابل عوامل بیماری‌گر تحریک کرد. *El-Gohary et*

میزان پروتئین روده، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و مؤلفه‌های زیستی مطالعه شده شب‌پره موم‌خوار بزرگ، رژیم غذایی حاوی گرده شقایق بیش‌ترین مطلوبیت را برای پرورش این حشره دارد و رژیم‌های غذایی حاوی گرده کلزا و کلزای وحشی کم-ترین مطلوبیت را دارند. رژیم غذایی حاوی گرده سیب از لحاظ مطلوبیت مابین این رژیم‌ها قرار دارد. بنابراین، توصیه می‌گردد در تهیه رژیم غذایی مصنوعی جهت پرورش انبوه این حشره از گرده گل شقایق استفاده گردد.

References

- Akinlabi RF, Adenigba AP, Olanirano D, 2018. Production of greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory conditions for mass production of entomopathogenic nematodes (EPNs). *Katsina Journal of Natural & Applied Sciences* 7(2): 176–182.
- Anwar Mohamed A, Ansari MJ, Al-Ghamdi A, Mohamed MO, Kaur M, 2014. Effect of larval nutrition on the development and mortality of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Revista Colombiana de Entomología* 40(1): 49–54.
- Bernfeld P, 1955. Amylases, α and β . *Method Enzymology* 1: 149–158.
- Birah A, Chilana P, Shukla UK, Gupta GP, 2008. Mass rearing of greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) on artificial diet. *Indian Journal of Entomology* 70(4): 389–392.
- Bradford M, 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Bryś MS, Skowronek P, Strachecka A, 2021. Pollen diet-properties and impact on a bee colony. *Insects* 12: 798.
- Büyükgüzel E, Kalender Y, 2008. *Galleria mellonella* (L.) survivorship, development and protein content in response to dietary antibiotics. *Journal of Entomological Science* 43(1): 27–40.
- Chapman RF, 1998. The insects: structure and function, Cambridge University Press: Cambridge, UK; ISBN 9780521113892
- Coskun M, Kayis T, Sulanc M, Ozalp P, 2006. Effects of different honeycomb and sucrose levels on the development of greater wax moth *Galleria mellonella* larvae. *International Journal of Agriculture & Biology* 8: 855–858.
- Devi G, 2021. Mass rearing of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella* for entomopathogenic nematodes studies. *The Pharma Innovation Journal* SP-10(12): 1514–1519.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, et al., 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* 8: e72016.
- Eischen FA, Dietz A, 1990. Improved culture techniques for mass rearing *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Entomological News* 101(2): 123–128.
- El-Gohary SG, Yousif-Khalil SI, El-Maghraby MMA, Abd-Alla SM, 2018. Mass rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. *Zagazig Journal of Agricultural Research* 45(2): 495–503.
- Frias BED, Barbosa CD, Lourenço AP, 2016. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie* 47: 15–25.
- Hickin M, Nadel H, Schal C, Cohen AC, 2021. Optimization of a diet for the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) using full factorial and mixture design. *Journal of Economic Entomology* 114(3): 1091–1103.
- Hussein MA, Salem HA, Hala S, Mahmoud S, 2022. Effects of the nutrition of different diets and lipid content of the insect host larvae, *Galleria mellonella* on the efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes. *Journal of Plant Protection Research* 62(3): 265–271.
- Jorjao AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Cristina A, et al., 2018. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence* 9(1): 383–389.
- Kandel MA, Said SM, Abdelaal AAA, 2020. Effect of food types of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) on biological aspects and life table of *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae). *African Journal of Agricultural Research* 16(6): 884–891.

- Kazek M, Kaczmarek A, Wrońska AK, Boguś MI, 2019. Diet influences the bacterial and free fatty acid profiles of the cuticle of *Galleria mellonella* larvae. *PLoS One* 14: 211–220.
- Kazek M, Kaczmarek A, Wrońska AK, Boguś MI, 2021. Dodecanol, metabolite of entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*, affects fatty acid composition and cellular immunity of *Galleria mellonella* and *Calliphora vicina*. *Scientific Reports* 11(1): 1–16.
- Kotchofa R, Baimey H, 2019. In vivo production of entomopathogenic nematodes using *Galleria mellonella*: costs and effect of diets on nematode pathogenicity. *Journal of Nematology* 51: e2019-66.
- Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina K, Fombong AT, 2017. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 8(2): 61.
- Le Gal M, Behmer ST, 2014. Effects of protein and carbohydrate on an insect herbivore: the vista from a fitness landscape. *Integrative & Comparative Biology* 54(5): 942–5.
- Li W, Zhao X, Yuan W, Wu K, 2017. Activities of digestive enzymes in the omnivorous pest *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology* 110(1): 101–110.
- Lou Y, Ekaterina P, Yang SS, Lu B, Liu B, et al., 2020. Biodegradation of polyethylene and polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut microbiome. *Environmental Science & Technology*, 54(5): 2821–2831.
- Mahmoud MA, Abdel-Rahman YA, 2021. Influence of some honey bee products and plant oils on the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology* 14: 9–20.
- Mafi Pashakolaei Sh, 2021. Nutritional indices of lemon butterfly larvae, *Papilio demoleus*, on four commercial citrus varieties in Mazandaran province. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (3): 73–80.
- Mc Namara L, Carolan JC, Griffin CT, Fitzpatrick D, Kavanagh K, 2017. The effect of entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 100: 82–92.
- Metwally HM, Hafez GA, Hussein MA, Hussein MA, Salem HA, et al., 2012. Low cost artificial diet for rearing the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) as a host for entomopathogenic nematodes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 22(1): 15.
- Mohamed HF, Sileem TM, El-Naggar SE, Sweilem MA, Ibrahim AA, et al., 2018. Effect of gamma irradiation and/or certain entomopathogenic fungi on the larval mortality of *Galleria mellonella* L. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28: 1–8.
- Mohamed HO, Amro A, 2022. Impact of different diets' nutrition on the fitness and hemocytic responses of the greater wax moth larvae, *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae). *The Journal of Basic & Applied Zoology* 83(1): 1–11.
- Nejat S, Farshbaf Pourabad R, Ashouri S, 2020. Impact of different diets on some biological and physiological parameters in the *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9(2): 61–74 (In Persian with English abstract).
- Rahimi A, Parichehreh Dizji S, 2021. The biology and management of the greater wax moth, *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758, pest of honeybee colonies wax combs. *Honeybee Science Journal* 11(21): 2-16 (In Persian with English abstract).
- Roulston TH, Cane JH, 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics & Evolution* 222: 187–209.
- Singh P, 1977. Artificial Diets for Insects, Mites and Spiders. Plenum, N.Y. 594 pp.
- Sohrabi F, Habibi H, Moramazi S. 2022. Effect of dietary supplementation with antibiotic and probiotic on biological parameters of yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (3): 77–87.
- Varmazyari A, Farshbaf Pourabad R, Ashouri S, 2022. Effect of feeding from different sugar beet cultivars on *Lixus incanescens* adults gut protein content and α -amylase activity, and the enzyme inhibition by triticale and rye protein extracts. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (3): 41–50.

