دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (ص ۷۸-۶۹)

اثرات عصارهٔ اکدایستروئیدی گیاه *Silene aucheriana* و هالوفنوزاید در کنترل موریانهٔ *Reticulitermes* sp. (Isoptera: Rhinotermitidae) در شرایط آزمایشگاهی

آرزو شاهینی[۱]، بهزاد حبیب‌پور[۲*]، سعید محرمی‌پور[۳] و مینا کوه جانی گرجی[۴]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳. دانشیار گروه حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۴. دانشجوی دکتری حشره‌شناسی، دانشکدهٔ کشاورزی، گروه حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۲۶)

چکیده

امروزه ترکیبات اکدایستروئیدی، از جمله فیتواکدایستروئیدها و آنالوگ‌های اکدایسون، به دلیل توانایی کنترل آفات مورد توجه قرار گرفته‌اند. آگونیست‌های هورمون پوست‌اندازی با اختلال در پوست‌اندازی باعث مرگ زودرس آفت می‌شوند و برای موجودات غیرهدف، ایمن‌اند. هدف از این مطالعه بررسی اثرهای ترکیبات اکدایستروئیدی موجود در گیاه سیلن ایرانی *Silene aucheriana* در مقایسه با آفت‌کش هالوفنوزاید[۵] روی موریانهٔ *Reticulitermes* sp. و محاسبهٔ مقادیر LT_{50} و LT_{90} ترکیبات ذکرشده روی موریانهٔ *Reticulitermes* sp. در قالب آزمون‌های انتخابی و غیرانتخابی است. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش پروبیت نشان داد که با افزایش غلظت، زمان مرگ‌ومیر (LT_{50} و LT_{90}) کاهش یافت. درصد مرگ‌ومیر محاسبه‌شده در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام هالوفنوزاید در آزمون انتخابی به‌ترتیب ۵۴، ۶۰، ۷۶ و ۸۰ درصد و برای عصارهٔ گیاه *S. aucheriana* در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد به‌ترتیب ۵۸، ۶۸، ۷۵ و ۸۹ درصد بود. این ترکیبات (هالوفنوزاید و عصارهٔ سیلن) سبب ایجاد بدشکلی و اختلال در پوست‌اندازی در موریانهٔ *Reticulitermes* sp. شد. نتایج نشان داد که این ترکیبات (هالوفنوزاید و عصارهٔ سیلن) می‌توانند راه حل مناسبی برای کنترل موریانهٔ *Reticulitermes* sp. باشند. بنابراین برای کنترل موریانه‌ها لازم است مطالعات جامعی روی ترکیبات اکدایستروئیدی انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنالوگ اکدایسون، ترکیبات اکدایستروئیدی، فیتواکدایستروئید، *Reticulitermes*.

مقدمه

با توجه به اثرهای سوء آفت‌کش‌ها بر موجودات غیرهدف و بقایای آنها در محیط زیست، استفاده از ترکیبات کم‌خطر با اثر اختصاصی ضروری به نظر می‌رسد (Rao *et al.*, 1993). در این میان ترکیبات تنظیم‌کنندهٔ رشد حشرات توجه زیادی را برای کنترل آفات به دلیل ایجاد نکردن آثار سوء زیست‌محیطی و رابطهٔ اختصاصی با آفت در سالیان اخیر به خود معطوف داشته‌اند (Pedigo, 2002). این ترکیبات هم به‌صورت سنتتیک و هم به‌صورت طبیعی در تعدادی از گیاهان وجود دارند و با تقلید از هورمون پوست‌اندازی (۲۰-هیدروکسی اکدایسون) باعث پوست‌اندازی نابهنگام و ناقص و سبب از دست‌رفتن هم‌ولمف و مرگ زودهنگام حشره می‌شود (Dhadialla *et al.*, 1998; Dinan,

* تلفن: ۰۹۱۶۳۰۷۳۹۴۷
E-mail: Habibpour_b@scu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

2001). ترکیبات سنتتیک شبه‌اکدایسونی اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط شرکت Rohm and Haas ساخته شد. هالوفنوزاید از جمله ترکیبات آگونیست اکدایسون است که تسریع‌کنندهٔ تغییر جلد محسوب می‌شود و سمیت بالایی برای بال‌پولک‌داران آفت دارد. اکدایستروئیدهای گیاهی نیز پتانسیلی بالا برای حفاظت از محصولات کشاورزی در برابر حشرات آفت دارند (Lafont, 1997). این ترکیبات برای انسان و دیگر پستانداران کم‌خطرند و احتمال بروز مقاومت آفات در برابر این سموم بسیار کم است، به این دلیل که ترکیبات اکدایستروئیدی مشابه هورمون حشرات است و حشرات نسبت به هورمون‌های خود مقاوم نمی‌گردند (Dinan, 1995; Slama & Lafont, 1995). با اینکه سالیانه میلیون‌ها دلار صرف کنترل موریانه‌ها در سراسر جهان می‌شود که هشتاد درصد از این هزینه‌ها مربوط به خسارت واردشده توسط موریانه‌های زیرزمینی و هزینه‌های ناشی از کنترل آن است، پژوهش‌های اندکی دربارهٔ خواص حشره‌کشی ترکیبات اکدایستروئیدی بر موریانه‌ها انجام گرفته است. در این پژوهش گونهٔ *Silene aucheriana* Boiss و ترکیب آفت‌کش هالوفنوزاید برای بررسی اثرات آنها بر موریانهٔ *Reticulitermes* sp. به‌کار گرفته شدند. موریانهٔ تحت بررسی در این تحقیق اجتماعات خود را درون درختان زنده مستقر می‌کند و باعث مرگ گیاهانی مانند درختان مو در شهرکرد (ایران) می‌شود. با توجه به خسارتی که موریانهٔ *Reticulitermes* sp. ایجاد می‌کند و نیز مقاومت این گونه از آفات به سموم شیمیایی، هدف از این مطالعه بررسی نقش ترکیبات اکدایستروئیدی گیاهی در راستای کنترل آفات و مقایسه با ترکیب قوی سنتتیک آگونیست اکدایسون (هالوفنوزاید) و بررسی امکان استفاده از مواد سمی کند اثر برای کنترل موریانه‌های زیرزمینی بود. استفاده از این ترکیبات می‌تواند یکی از استراتژی‌های مهم و قابل اتکا در مدیریت تلفیقی موریانه‌ها محسوب شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و نگهداری موریانه‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها از شهر فرخشهر واقع در استان چهارمحال‌وبختیاری (″۱۱/۰۳۹۴ ′۱۲ °۳۲ شمال، ″۲۸/۶ ′۱۸ °۵۱ شرق) شامل طبقات مختلف موریانه، از طریق تله‌های تعبیه‌شده در خاک باغ، متشکل از رول‌های دستمال کاغذی انجام گرفت. پس از نمونه‌برداری، موریانه‌ها به کمک قلم‌مو جداسازی و درون ظروف محتوی کاغذهای صافی مرطوب برای تغذیه، قرار داده شدند. این ظروف به منظور رفع استرس از موریانه‌ها در انکوباتور تاریک در دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۸۰ درصد نگهداری شدند. در انجام آزمون‌ها از موریانه‌های کارگر و تعدادی پورهٔ بال‌دار استفاده شد. موریانه‌های بالغ کارگر و پوره‌های بال‌دار از طریق خصوصیات ظاهری تفکیک و انتخاب شدند. شناسایی موریانه‌ها توسط فرد متخصص موریانه‌شناس (نویسندهٔ مسئول مقاله) و بهره‌گیری از منابع علمی شامل کلیدهای شناسایی انجام گرفت.

ترکیبات به‌کاررفته

ترکیبات عبارتند از: هالوفنوزاید (سوسپانسیون ۲۳٪، تهیه‌شده در دانشگاه گنت کشور بلژیک) که از گروه ترکیبات آگونیست اکدایسون است (از آب به عنوان حلال استفاده شد)؛ عصارهٔ استخراج‌شده از گیاه *S. aucheriana* (از متانول به عنوان حلال استفاده شد). برای عصاره‌گیری اکدایستروئید از کارتریج Chromabond C18 متعلق به شرکت Macherey-Nagel استفاده شد (Kohjani-Gorji *et al.*, 2014). برای آزمایش، غلظت‌های تحت نظر بر حسب پی‌پی‌ام (وزنی/ حجمی) و درصد (حجمی/ حجمی) تهیه شدند. غلظت‌های به‌کارگرفته‌شده، هالوفنوزاید شامل ۱۰۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام بود و عصارهٔ استخراج‌شده از گیاه *S. aucheriana* شامل ۲، ۵، ۲۰ و ۴۰ درصد که به‌وسیلهٔ رقیق‌سازی نوبتی با حلال پایه به‌دست آمد. برای تهیهٔ غلظت‌ها ابتدا آزمون‌های مقدماتی انجام گرفت، سپس حدود غلظتی مناسب انتخاب شد.

استخراج عصاره

۵۰ گرم از قسمت هوایی گیاه *S. aucheriana* متعلق به تیرهٔ Caryophillaceae در هوای اتاق خشک شد و

Archive of SID

www.SID.ir

با آسیاب به‌صورت پودر درآمد و به آن ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد اضافه شد. سپس به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجهٔ سلسیوس درون حمام اولتراسونیک مدل Power Sonic 510 (ساخت کشور کره) قرار گرفت. پس از سرد شدن، عصارهٔ متانولی به شیشه‌ای درپوش‌دار منتقل و شیشه در یخچال نگهداری شد. به رسوب به‌دست‌آمده دو بار دیگر ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد اضافه گردید و هر بار ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. عصارهٔ متانولی حاصل به شیشهٔ قبلی منتقل شد. حلال عصارهٔ به‌دست‌آمده توسط دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس و دور متوسط تبخیر گردید. عصارهٔ تغلیظ‌شده حدود ۵ میلی‌لیتر و وزن تقریبی آن ۱۰ گرم بود. برای جداسازی اکدایستروئیدها از کارتریج Chromabond C18 متعلق به شرکت Macherey-Nagel استفاده شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از عصارهٔ غلیظ‌شده به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۱۰ درصد، درون لولهٔ فالکون ریخته شد و سانتریفیوژ گردید. پس از برداشتن مایع رویی این کار سه بار تکرار شد. پس از فعال کردن کارتریج، مایع رویی حاصل از مراحل قبل از کارتریج عبور داده شد و سپس ۵ میلی لیتر متانول با درصدهای ۲۵، ۶۰ و ۱۰۰ درصد از کارتریج عبور داده شد. مایع به‌دست‌آمده از محلول متانولی ۶۰ درصد حاوی بیشترین میزان فیتواکدایستروئید است.

تجزیه و شناسایی اکدایستروئیدها با کمک دستگاه HPLC/MS انجام گرفت. دستگاه مجهز به پمپ پیستونی و دتکتور Mass بود. ستون فاز معکوس Diasorb C16/T و اندازهٔ ذرات ۵ میکرومتر است. حلال‌ها شامل آب، استونیتریل و تتراهیدروفوران به نسبت (۱۰۰: ۱۶: ۴) با سرعت ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه است. محلول‌هایی با غلظت متفاوت از ۲۰- هیدروکسی اکدایسون خالص، برای کالیبراسیون دستگاه استفاده می‌گردد (دینان و همکاران، ۲۰۰۱). برای شناسایی فیتواکدایستروئیدها، عصارهٔ تهیه‌شده از گیاه *S. aucheriana* به دستگاه HPLC (Column Zorbax-SIL (5µm) 250 mm long, 4.6 mm i.d) تزریق شد. فاز متحرک: دی کلرومتان- ایزوپروپانول- آب (۳: ۴۰: ۱۲۵)، سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه مجهز به شناساگر UV تزریق و جذب در ۲۵۴ نانومتر خوانده شد.

روش اجرای آزمون‌های انتخابی و غیرانتخابی

آزمون غیرانتخابی

هدف از این آزمایش بررسی تأثیر ترکیبات اکدایستروئیدی روی موریانه در شرایطی بود که مجبور به تغذیه از کاغذ صافی تیمارشده باشد. ابتدا درون هر پتری‌دیش پلاستیکی با قطر ۹ سانتی‌متر، کاغذ واتمن ۱ قرار گرفت و هر کاغذ به یک میلی‌لیتر از غلظت‌های ترکیبات مورد نظر به‌صورت یکنواخت آغشته گردید و به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرارگرفت تا حلال تبخیر شد. کاغذ صافی پس از خشک شدن و وزن کردن، با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مرطوب شد. نمونه‌های شاهد تنها با آب مقطر مرطوب شدند. سپس ۵۰ موریانهٔ کارگر و ۲۰ پورهٔ بال‌دار در هر پتری دیش قرار گرفت. واحدهای آزمایشی به انکوباتور تاریک در دمای ۲۸±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۸۰ درصد منتقل شدند. میزان مرگ‌ومیر هر ۲۴ ساعت یک‌بار به‌مدت ۳ هفته ثبت شد (موریانه‌هایی که با تحریک کردن حرکت نداشتند، به عنوان مرده ثبت شدند). در پایان دورهٔ آزمایش، با وزن کردن مجدد کاغذ صافی، میزان تغذیهٔ موریانه‌ها از کاغذ تیمارشده با نمونه‌های شاهد مقایسه شد. برای هر کدام از ترکیبات ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

آزمون انتخابی

هدف از این آزمایش تعیین تمایل موریانه به تغذیه از کاغذ آغشته به ترکیبات اکدایستروئیدی تحت نظر در غلظت‌های معین بود. در این آزمون کاغذ صافی واتمن ۱ به دو نیم تقسیم شد؛ به‌طوری که وقتی کاغذها درون هر یک از ظروف پتری دیش به قطر ۹ سانتی‌متر قرار داده شد، بین دو نیمه از کاغذ صافی فاصلهٔ ۱/۵ سانتی‌متری ایجاد گردید. یک نیمه از کاغذ به ۰/۵ میلی‌لیتر از ترکیبات تحت نظر به‌صورت یکنواخت آغشته شد و به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا حلال تبخیر شد. کاغذ صافی پس از خشک شدن و وزن شدن، با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مرطوب گردید و

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌های شاهد تنها با آب مقطر مرطوب شدند. سپس ۵۰ موریانهٔ کارگر و ۲۰ پورهٔ بال‌دار در هر پتری‌دیش قرار گرفت. واحدهای آزمایشی به انکوباتور تاریک در دمای ۲۸±۲° سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۸۰ درصد منتقل شدند. میزان مرگ‌ومیر هر ۲۴ ساعت یک‌بار به‌مدت ۳ هفته ثبت شد (موریانه‌هایی که با تحریک کردن حرکت نداشتند، به عنوان مرده ثبت شدند). در پایان آزمایش با وزن کردن مجدد هر کاغذ صافی میزان تغذیهٔ موریانه‌ها از کاغذ تیمارشده با نمونه‌های آزمایش با شاهد مقایسه شد. برای هر کدام از ترکیبات ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

تجزیهٔ داده‌ها

برای آنالیز واریانس (ANOVA) از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد. از آزمونLSD در سطح اطمینان آماری ۹۵ درصد برای مقایسهٔ میانگین‌ها استفاده شد و نمودارهای مرتبط با استفاده از نرم‌افزار EXCEL 2007 رسم گردید. آنالیز پروبیت با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 برای تخمین مقادیر LT_{50} وLT_{90} انجام گرفت.

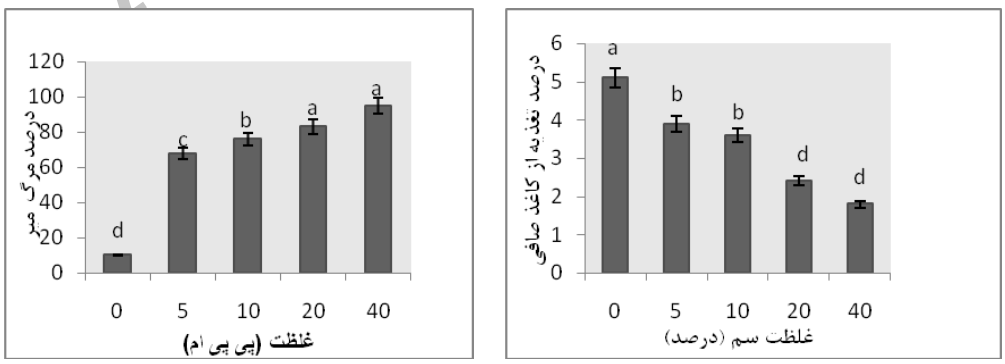
نتایج و بحث

آزمون تغذیه‌ای غیرانتخابی عصارهٔ *S. aucheriana* روی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

بر اساس نتایج، مقایسهٔ میزان تغذیه از کاغذ صافی تفاوت معناداری میان میزان تغذیهٔ موریانه‌ها در اثر غلظت‌های مختلف عصارهٔ سیلن نشان داد. به‌طوری که با افزایش غلظت، تغذیه کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱، df=۴، F=۱۰/۴۹) (شکل ۱- الف). میزان مرگ‌ومیر با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت. مقایسهٔ میانگین مرگ‌ومیر موریانه‌ها بین غلظت‌ها تفاوت معناداری را در سطح سطح اطمینان آماری ۹۵ درصد نشان داد (P<۰/۰۰۰۱، df=۴، F=۲۳۷/۲) (شکل ۱-ب). با محاسبهٔ مقادیر LT_{50} و LT_{90} بر اساس آنالیز پروبیت مشخص شد که با افزایش غلظت، زمان کشندگی کاهش یافته است. کمترین میزان LT_{50} و LT_{90} در بالاترین غلظت به‌کاررفته یعنی ۴۰ درصد به‌دست آمد. این مقادیر به‌ترتیب ۴ و ۱۳/۱ روز بود. روند شیب بیانگر افزایش سرعت تلفات با افزایش غلظت است (جدول ۱). اثرات مخرب عصاره روی موریانه‌ها در بیشتر غلظت‌ها مشاهده شد (شکل ۲- الف).

جدول ۱. تجزیهٔ پروبیت زمان کشندگی در اثر غلظت‌های مختلف عصارهٔ اکدایستروئیدی *S. aucheriana* در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی در جمعیت آزمایشگاهی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

غلظت (درصد)	تعداد	df	LT_{50} (حدود اطمینان ۹۵٪) (روز)	LT_{90} (حدود اطمینان ۹۵٪) (روز)	خطای استاندارد ± شیب	χ^2	*P*-value
۵	۲۰۰	۴	۹/۳ (۸/۹-۹/۸)	۴۸/۱ (۴۲/۴-۵۵/۷)	۱/۸۰ ±۰/۰۷۲	۲۱/۱	۰/۵۳۳
۱۰	۲۰۰	۴	۸/۱ (۷/۷-۸/۵)	۳۹/۱ (۳۵/۱-۴۴/۳)	۱/۸۷ ± ۰/۰۷۱	۱۶/۳	۰/۴۲۶
۲۰	۲۰۰	۴	۴/ ۳(۴/۱-۴/۶)	۱۴/۸ (۱۳/۹-۱۵/۷)	۲/۴۱ ±۰/۰۷۴	۲۶/۷	۰/۳۲۳
۴۰	۲۰۰	۴	۴ (۳/۸-۴/۳)	۱۳/۱ (۱۲/۴-۱۳/۹)	۲/۵۲±۰/۰۷۶	۲۱/۷	۰/۳۲۱



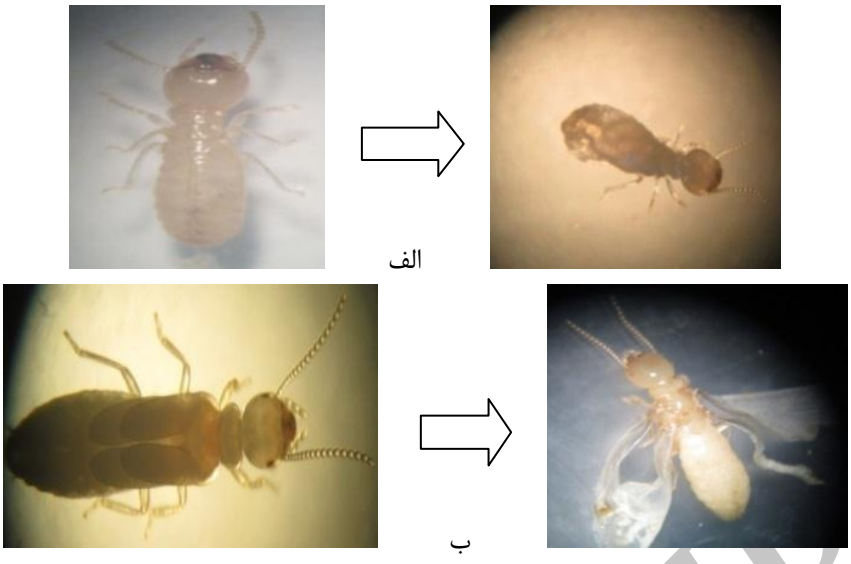
الف) درصد تغذیه از کاغذ صافی ب) درصد مرگ‌ومیر

شکل ۱. پاسخ‌های موریانهٔ *Reticulitermes* sp. در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی از کاغذ صافی آغشته به سیلن پس از ۳ هفته

* میانگین‌هایی‌که حداقل یک حرف مشترک دارند، با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنادار ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. ناهنجاری‌های رشدی ایجادشده ناشی از تأثیر ترکیبات اکدیستروئیدی در موریانهٔ *Reticulitermes* sp.
الف) ابلق شدن بدن موریانه بعد از کاربرد عصارهٔ سیلن
ب) پیچیدگی بال در موریانهٔ بال‌دار پس از پوست‌اندازی در اثر کاربرد هالوفنوزاید روی پورهٔ بال‌دار

آزمون تغذیه‌ای انتخابی عصارهٔ *S. aucheriana* روی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

مقایسهٔ میزان تغذیه از کاغذ صافی تفاوت معناداری میان میزان تغذیهٔ موریانه‌ها در اثر غلظت‌های مختلف عصاره نشان داد. با افزایش غلظت عصاره، تغذیه کاهش یافته است ($F=۱۶۴/۵$، $df=۴$، $P<۰/۰۰۰۱$) (شکل ۳- الف). میزان مرگ‌ومیر با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت. مقایسهٔ میانگین مرگ‌ومیر موریانه‌ها بین غلظت‌ها تفاوت معناداری را نشان داد. با افزایش غلظت، مرگ‌ومیر نیز افزایش یافت ($F=۷۵/۲۶$، $df=۴$، $P<۰/۰۰۰۱$) (شکل ۳- ب). مقادیر LT_{50} و LT_{90} محاسبه و مشخص شد که با افزایش غلظت، زمان کشندگی کاهش یافته است. کمترین میزان LT_{50} و LT_{90} در بالاترین غلظت به‌کاررفته یعنی ۴۰ درصد به دست آمد. این مقادیر به‌ترتیب ۵/۲ و ۱۸/۴ روز بود. مقادیر شیب نشان داد که با افزایش غلظت، سرعت تأثیر سم افزایش یافت (جدول ۲). اثرات مخرب عصاره روی موریانه‌ها در بیشتر غلظت‌ها مشاهده شد (شکل ۲- الف).

جدول ۲. تجزیهٔ پروبیت زمان کشندگی در اثر غلظت‌های مختلف عصارهٔ اکدایستروئیدی *S. aucheriana* در شرایط تغذیهٔ انتخابی در جمعیت آزمایشگاهی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

غلظت (درصد)	تعداد	df	LT_{50} (حدود اطمینان ۹۵٪) (روز)	LT_{90} (حدود اطمینان ۹۵٪) (روز)	خطای استاندارد±شیب	χ^2	*P*-value
۵	۲۰۰	۴	۱۳/۶ (۱۲/۷-۱۴/۶)	۹۸/۸ (۸۰/۶-۱۲۶/۲)	۱/۴۸±۰/۰۷۰	۱۰/۳	۰/۴۳۵
۱۰	۲۰۰	۴	۱۱/۶ (۱۱-۱۲/۳)	۶۷/۹ (۵۸-۸۱/۸)	۱/۶۷ ±۰/۰۷۲	۱۱/۲	۰/۵۲۴
۲۰	۲۰۰	۴	۱۰/۴ (۹/۸-۱۱)	۵۸/۷ (۵۰/۸-۶۹/۴)	۱/۷۰±۰/۰۷۰	۲۶/۴	۰/۴۶۲
۴۰	۲۰۰	۴	۵/۲ (۴/۸-۵/۶)	۱۸/۴ (۱۶/۹-۲۰/۲)	۲/۳۵ ±۰/۰۹۵	۳۱	۰/۳۲۶

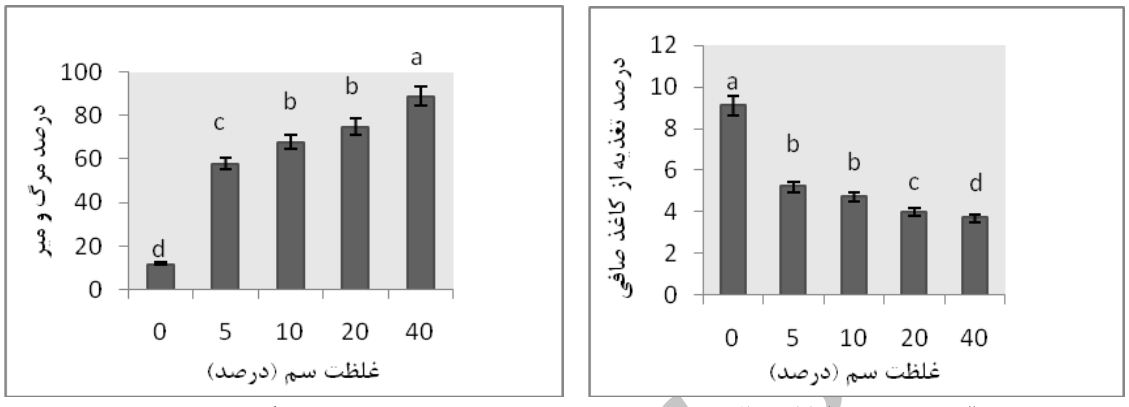
آزمون تغذیه‌ای غیرانتخابی هالوفنوزاید روی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

مقایسهٔ میزان تغذیه از کاغذ صافی تفاوت معناداری میان میزان تغذیهٔ موریانه‌ها در اثر غلظت‌های مختلف نشان داد. با افزایش غلظت هالوفنوزاید، تغذیه کاهش یافت ($F=۱۲۸/۶$، $df=۴$، $P<۰/۰۰۰۱$) (شکل ۴- الف). میزان مرگ‌ومیر با افزایش غلظت هالوفنوزاید افزایش یافت. مقایسهٔ میانگین مرگ‌ومیر موریانه‌ها بین

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت‌ها تفاوت معناداری نشان داد (P<۰/۰۰۰۱، df=۴، F=۳۴۶/۷) (شکل ۴- ب). با محاسبهٔ مقادیر LT_{50} و LT_{90} بر اساس آنالیز پروبیت مشخص شد که با افزایش غلظت، زمان کشندگی کاهش یافت. کمترین میزان LT_{50} و LT_{90} در بالاترین غلظت به‌کاررفته یعنی ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام به‌دست آمد. این مقادیر به‌ترتیب ۳/۴ و ۹/۸ روز بود. روند شیب بیانگر افزایش سرعت تلفات با افزایش غلظت است (جدول ۳). اثرات مخرب هالوفنوزاید روی موریانه‌ها در بیشتر غلظت‌ها مشاهده شد (شکل ۲- ب).

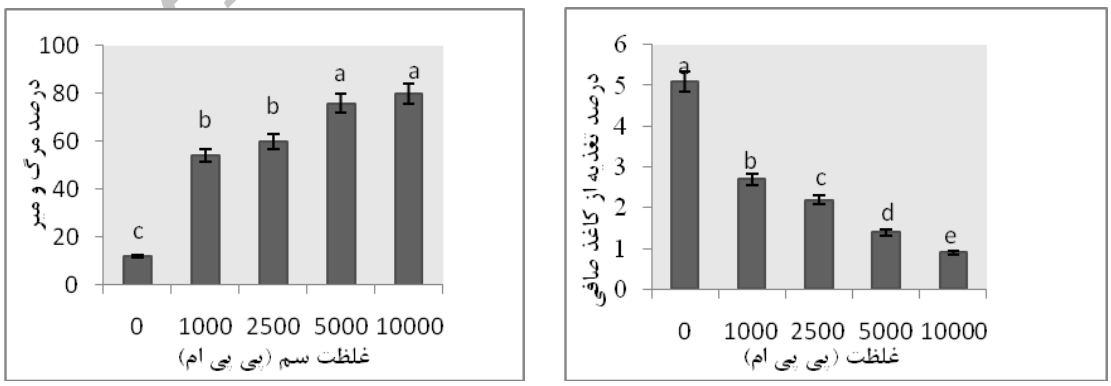


الف) درصد تغذیه از کاغذ صافی ب) درصد مرگ‌ومیر

شکل ۳. پاسخ‌های موریانهٔ *Reticulitermes* sp. در شرایط تغذیهٔ انتخابی از کاغذ صافی آغشته به عصارهٔ سیلن پس از ۳ هفته
*میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند با استفاده از آزمون LSD در سطح ٪۵ درصد اختلاف معنادار ندارند.

جدول ۳. تجزیهٔ پروبیت زمان کشندگی در اثر غلظت‌های مختلف هالوفنوزاید در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی در جمعیت آزمایشگاهی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

غلظت (پی‌پی‌ام)	تعداد	df	LT_{50} (حدود اطمینان ٪۹۵) (روز)	LT_{90} (حدود اطمینان ٪۹۵) (روز)	خطای استاندارد ± شیب	χ^2	*P*-value
۱۰۰۰	۲۰۰	۴	۷/۶ (۷/۲-۸)	۳۳/۷ (۳۰/۵-۳۷/۶)	۱/۹۸±۰/۰۷۲	۲۲/۱	۰/۴۵۲
۲۵۰۰	۲۰۰	۴	۶/۴ (۶-۶/۷)	۲۳/۵ (۲۱/۹-۲۵/۵)	۲/۲۶±۰/۰۷۵	۱۸/۱	۰/۴۶۲
۵۰۰۰	۲۰۰	۴	۳/۸ (۳/۴-۴/۲)	۱۲/۶ (۱۱/۵-۱۳/۹)	۲/۵۰±۰/۱۲۳	۴۸	۰/۶۵۳
۱۰۰۰۰	۲۰۰	۴	۳/۴ (۳/۲-۳/۶)	۹/۸ (۹/۴-۱۰/۴)	۲/۸۱±۰/۰۸۵	۱۲/۸	۰/۶۵۶



الف) درصد تغذیه از کاغذ صافی ب) درصد مرگ‌ومیر

شکل ۴. پاسخ‌های موریانهٔ *Reticulitermes* sp. در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی از کاغذ صافی آغشته به هالوفنوزاید پس از ۳ هفته
* میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند با استفاده از آزمون LSD در سطح ٪۵ درصد اختلاف معنادار ندارند.

Archive of SID

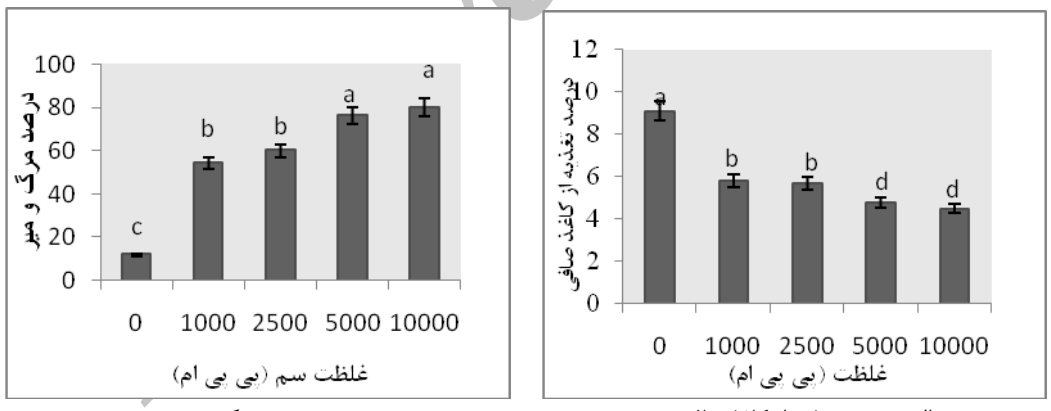
www.SID.ir

آزمون تغذیه‌ای انتخابی هالوفنوزاید روی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

مقایسهٔ میزان تغذیه از کاغذ صافی تفاوت معناداری میان میزان تغذیهٔ موریانه‌ها در اثر غلظت‌های مختلف هالوفنوزاید نشان داد. با افزایش غلظت، تغذیه کاهش یافته است (P<۰/۰۰۰۱، df=۴، F=۱۰۵/۲) (شکل ۵- الف). تجزیهٔ آماری داده‌های مربوط به مرگ‌ومیر موریانهٔ *Reticulitermes* sp. حاصل از کاربرد هالوفنوزاید و تیمار شاهد در چهار غلظت نشان داد که میزان مرگ‌ومیر با افزایش غلظت سم افزایش یافت. مقایسهٔ میانگین مرگ‌ومیر موریانه‌ها بین غلظت‌ها تفاوت معناداری را نشان داد. با افزایش غلظت، مرگ‌ومیر نیز افزایش یافت (P<۰/۰۰۰۱، df=۴، F=۶۰/۸۶) (شکل ۵- ب). مقادیر LT_{50} و LT_{90} محاسبه و مشخص شد که با افزایش غلظت، زمان کشندگی کاهش یافته است. کمترین میزان LT_{50} و LT_{90} در بالاترین غلظت به‌کاررفته یعنی ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام به‌دست آمد. این مقادیر به‌ترتیب ۷/۴ و ۳۴/۵ روز بود. مقادیر شیب نشان داد که با افزایش غلظت سرعت تأثیر سم افزایش یافت (جدول ۴). آثار مخرب هالوفنوزاید روی موریانه‌ها در اکثر غلظت‌ها مشاهده شد (شکل ۲- ب).

جدول ۴. پروبیت زمان کشندگی در اثر غلظت‌های مختلف هالوفنوزاید در شرایط تغذیهٔ انتخابی در جمعیت آزمایشگاهی موریانهٔ *Reticulitermes* sp.

غلظت (پی‌پی‌ام)	تعداد	df	LT_{50} (حدود اطمینان ۹۵٪) (روز)	LT_{90} (حدود اطمینان ۹۵٪) (روز)	خطای استاندارد± شیب	χ^2	*P*-value
۱۰۰۰	۲۰۰	۴	۲۴/۶ (۱۳/۶-۱۵/۸)	۱۱۹ (۹۴/۵-۱۵۷/۱)	۱/۴۰ ± ۰/۰۹	۱۸	۰/۵۳۲
۲۵۰۰	۲۰۰	۴	۱۲/۵ (۱۱/۷-۱۳/۴)	۹۸/۴ (۸۰-۱۲۶/۱)	۱/۴۳±۰/۰۶۸	۹	۰/۴۶۳
۵۰۰۰	۲۰۰	۴	۱۰/۲ (۹/۶-۱۰/۷)	۵۸/۳ (۵۰/۵-۶۸/۹)	۱/۶۹ ±۰/۰۶	۲۷/۴	۰/۶۳۵
۱۰۰۰۰	۲۰۰	۴	۷/۴ (۷-۷/۸)	۳۴/۵ (۳۱/۲-۳۸/۶)	۱/۹۲ ±۰/۰۷۰	۲۹	۰/۳۶۸



ب) درصد مرگ‌ومیر　　الف) درصد تغذیه از کاغذ صافی

شکل ۵. پاسخ‌های موریانهٔ *Reticulitermes* sp. در شرایط‌تغذیهٔ انتخابی از کاغذ صافی آغشته به هالوفنوزاید پس از ۳ هفته
* میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنادار ندارند.

ترکیبات اکدایستروئیدی هنوز در سطح وسیع استفاده نشده‌اند، اما از لحاظ ایمنی و انتخابی بودن بسیار مناسب‌اند (Dallaire *et al.*, 2004). حدود ۶ درصد از گونه‌های گیاهی آزمایش‌شده قادر به سنتز اکدایستروئیدها هستند و تنها کمتر از ۲ درصد از گیاهان برای وجود این ترکیبات بررسی شده‌اند (Dinan, 2001). در بسیاری از پژوهش‌ها مطالعاتی در زمینهٔ تأثیر ترکیبات اکدایستروئیدی روی دیگر آفات از جمله بال‌پولک‌داران آفت انجام گرفته است. به‌طور مثال، تغذیه از فیتواکدایستروئیدها در بال‌پولک‌دارانی مانند *Aglais urticae* L.، *Cynthia cardui* L. و *Inachis io* L. از خانوادهٔ Nymphalidae (Blackford

www.SID.ir

از *Acrolepiopsis assectella* Zeller و (*et al*., 1997) خانوادهٔ Acrolepiidae (Arnult *et al*., 1986) باعث کاهش وزن و افزایش مرگ‌ومیر لاروها و ایجاد بدشکلی می‌شود. مطالعات کمی دربارهٔ فیتواکدایستروئیدها و آنالوگ‌های اکدایسون روی موریانه‌ها انجام گرفته است. در این پژوهش عصارهٔ اکدایستروئیدی گیاه سیلن و هالوفنوزاید باعث افزایش مرگ‌ومیر و ایجاد بدشکلی در موریانه‌ها شد. در موریانهٔ (Isoptera: Rhinotermitidae) *Coptotermes formosanus* Shiraki نیز هالوفنوزاید باعث کاهش شایان توجهی در میزان تخم‌ریزی و نهایتاً مرگ در اثر تشکیل کوتیکول ناقص در موریانهٔ *C. formosanus* شد (Raina *et al*., 2003). نتایج این تحقیق با تحقیق حاضر مطابقت دارد. اثرات هالوفنوزاید روی سوسک‌های *Aubeonymus mariaefranciscae* و *Leptinotarsa decemlineata* Say بررسی شده است که نتایج آن تشکیل شفیرهٔ ناسالم، ایجاد بدشکلی، کاهش میزان تخم‌ریزی و کاهش پروتئین زرده و مقدار کل پروتئین تخمدان را نشان داد (Farinos, 1999). اثرات هالوفنوزاید روی *Spodoptera* Boisduval *littoralis* نشان داد که هالوفنوزاید سبب پوست‌اندازی زودرس در این آفت می‌شود (Smagghe *et al*., 2000). بررسی اثر طعمهٔ سمی حاوی لوفنورون، دیفلوبنزورون و نویفلورون علیه موریانهٔ *C. formosanus* نشان داد که این ترکیبات باعث تشکیل کوتیکول ناقص در موریانه می‌شود و مرگ‌ومیر با افزایش غلظت این ترکیبات افزایش می‌یابد (Gautam *et al*., 2014). طعمهٔ سمی حاوی هگزافلومورون در کنترل موریانه‌های زیرزمینی *Reticulitermes flavipes* Kollar و *Reticulitermes virginicus* Banks روی فیزیولوژی موریانه‌ها اثر گذاشت و در طول عمر و تولید مثل آنها اختلال ایجاد کرد و سبب افزایش مرگ‌ومیر در آنها شد و با افزایش غلظت، تغذیه کاهش یافت (Stansly *et al*., 2001). اثرات فلوروکس (بازدارندهٔ سنتز کیتین) روی موریانهٔ *Microcerotermes diversus* Silvestri (Isoptera: Termitidae) اختلالات رشدی و مرگ‌ومیر ایجاد کرد (Habibpour, 2008). این پدیده در حشرات دیگر تغذیه کرده از ترکیبات اکدایستروئیدی مشاهده شده است. آنالوگ اکدایسون RH-5849 و تبوفنوزاید روی آفات انباری *Teribolium castaneum* Herbst، *Sitophilus oryzae* L. و *Rhizopertha dominica* Fabricius سبب کاهش تشکیل شفیره در سن آخر لاروی و موجب بدشکلی‌های مرفولوژی در حشرات تحت آزمایش و نهایتاً سبب مرگ در طول تعویض جلد شد (Kostyukovsky *et al*., 2000). نتایج تحقیق حاضر با نتایج این تحقیقات مطابقت داشت. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهد که لاروهای شب‌پرهٔ آرد در صورتی که از ترکیبات اکدایستروئیدی گیاه اسفناج تغذیه کنند، این ترکیبات موجب مرگ‌ومیر حشرات، اختلال در جفت‌گیری و کاهش تخم‌ریزی خواهد شد (Sahaf & Moharramipour, 2013). در این پژوهش لاروها و حشرات کامل بدشکل مشاهده شد. بیشترین اختلالات مشاهده‌شده در زمان پوست‌اندازی یا دگردیسی حشره دیده شد که این پدیده بیانگر اثر هورمونی موجود در این ترکیبات است؛ زیرا ترکیبات تنظیم‌کنندهٔ رشد حشرات نظیر اکدایستروئیدها و ترکیبات شبه‌هورمون جوانی چنین علائمی را از خود بروز می‌دهند. ترکیب استخراج‌شده از گیاه سیلن را می‌توان در گروه ترکیبات تنظیم‌کنندهٔ رشد حشرات (IGRs) قلمداد کرد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات اکدایستروئیدی گیاه سیلن و سم هالوفنوزاید به‌طور گسترده‌ای می‌توانند موجب اختلال در رشد موریانهٔ تحت نظر شود. زمان کشندگی سموم کند اثر گوارشی وابسته به دزی است که موریانه از طریق طعمه کسب می‌کند. از سوی دیگر یک حشره‌کش با اثر کند کشندگی، به عنوان مادهٔ سمی معرفی می‌شود که بعد از ۲۴ ساعت از زمان در معرض قرارگیری، سبب کمتر از ۱۵ درصد تلفات روی موریانه‌های تحت آزمایش و ۹۰ درصد تلفات بعد از ۱۴ روز می‌شود (Logan *et al*., 1990). در این آزمایش LT_{50} محاسبه‌شدهٔ هالوفنوزاید در غلظت‌های ۱۰۰۰۰ و ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام و عصارهٔ *S. aucheriana* در غلظت‌های ۴۰ و ۲۰ درصد به ۱۴ روز نزدیک است. از طرفی میزان تغذیهٔ موریانه‌ها در غلظت ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام هالوفنوزاید (۰/۰۹٪) و غلظت ۴۰ درصد عصارهٔ *S. aucheriana* (۱/۸٪) در آزمون غیرانتخابی و غلظت ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام هالوفنوزاید (۲/۳٪) و تیمار ۴۰ درصد عصارهٔ

Archive of SID

www.SID.ir

S. aucheriana (۳/۲٪) در آزمون انتخابی است که این میزان نسبت به میزان مرگ‌ومیر در گروه شاهد آزمون انتخابی (۵/۱٪) و آزمون غیرانتخابی (۸/۱٪) کاهش یافت. همچنین مقایسهٔ میانگین نشان داد که تفاوت معناداری بین میزان تغذیه موریانه‌ها در اثر غلظت‌های مختلف سم وجود دارد. با افزایش غلظت تغذیه کاهش یافت. در تحقیقات آزمایشگاهی بایستی LT_{50} و LT_{90} ناشی از اثر طعمه بر موریانه‌ها در آزمون انتخابی نیز محاسبه شود تا شرایط آزمایش به شرایط موجود در طبیعت نزدیک‌تر شود و اثر منابع رقابت‌کنندهٔ سلولزی و رقیق‌کنندهٔ دز سم در بدن موریانه در افزایش مقادیر LT_{50} و LT_{90} به‌دست آید (Henderson *et al.*, 1994). در این تحقیق مقدار LT_{90} طعمه در آزمون انتخابی حدود ۲ برابر LT_{90} در آزمون غیرانتخابی بود. دورهٔ طولانی‌تر مورد نیاز برای این که سمیت این ترکیبات از طریق تغذیه در آزمون انتخابی (نسبت به آزمون غیرانتخابی) ظاهر شود ممکن است از این نظر سودمند باشد که مطمئن شویم این مادهٔ سمی قبل از آنکه علائم سمیت ترکیبات اکدایستروئیدی در موریانه‌های حامل ظاهر شود، در همهٔ اجتماع موریانهٔ هدف (ظروف پتری حامل موریانه) پخش و حمل می‌شود. بنابراین مادهٔ مؤثر سم به همهٔ افراد هم می‌رسد. در تحقیق حاضر مقادیر LT_{50} و LT_{90} با غلظت رابطهٔ عکس دارند و با افزایش غلظت، کاهش می‌یابند و مقادیر LT_{50} و LT_{90} این ترکیبات برای موریانهٔ *Reticulitermes* sp. وابسته به غلظت است که این یکی از خصوصیات سموم کند اثر است. شیب خط به‌دست‌آمده نیز بیانگر مرگ‌ومیر سریع‌تر در غلظت بالاتر است (جدول‌های ۱، ۲، ۳، ۴). نتایج این بررسی نشان داد که روند مرگ‌ومیر موریانهٔ *Reticulitermes* sp. ناشی از تأثیر ترکیبات اکدایستروئیدی وابسته به غلظت بوده است. بنابراین موریانه‌های کارگری که از کاغذهای صافی آغشته به این ترکیبات تغذیه می‌کنند می‌توانند این مادهٔ سمی را قبل از آنکه تلف شوند به بقیهٔ افراد اجتماع خود انتقال دهند. در آزمایش‌های انجام‌گرفته، اثرات مخرب این ترکیبات روی موریانهٔ *Reticulitermes* sp. مشاهده شد. این اثرات به‌صورت پیچیدگی بال در موریانه و ابلق شدن بدن موریانه بود (شکل ۲- الف و ب). از طرفی، نتایج نشان داد که با افزایش میزان عصارهٔ گیاه سیلن مرگ‌ومیر نیز افزایش یافت و از ۶۹/۵ درصد (در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی) و ۵۸ درصد (در شرایط انتخابی) برای غلظت ۵ درصد به ۹۵ درصد (در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی) و ۸۹ درصد (در شرایط انتخابی) برای غلظت ۴۰ درصد رسید. برای هالوفنوزاید، از ۷۸/۵ درصد (در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی) و ۵۴ درصد (در شرایط انتخابی) برای غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به ۹۷/۵ درصد (در شرایط تغذیهٔ غیرانتخابی) و ۸۰ درصد (در شرایط انتخابی) برای غلظت ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام رسید. بر اساس نتایج داده‌های مربوط به مرگ‌ومیر موریانه‌ها، هالوفنوزاید بیشترین تأثیر را در القای مرگ‌ومیر موریانه‌ها در آزمون غیرانتخابی داشته است.

نتیجه‌گیری

ترکیبات اکدایستروئیدی شامل عصارهٔ گیاه سیلن و هالوفنوزاید پتانسیل بالایی برای کنترل موریانهٔ *Reticulitermes* sp. دارند و استفاده از آنها به عنوان پایه و اساسی برای توسعهٔ روش‌های نوین و بی‌خطر کنترل آفات کشاورزی پیشنهاد می‌شود.

Archive of SID

REFERENCES

1. Arnult, C. & Slama, K. (1986). Dietary effects of phytoecdysones in the leek-moth, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera: Acrolepiidae). *Journal of Chemistry Ecology*, 12, 1979-1986.
2. Blackford, M. J. P. & Dinan, L. (1997). The effect of ingested phytoecdysteroids on the larvae of *urticae, Aglais Inachis io, Cynthia cardui* (Lepidoptera, Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera, Arctiidae). *Journal of Insect Physiology*, 43, 315-327.
3. Dallaire, R., Labrecque, A., Marcotte, M., Bauce, E. & Delisle, J. (2004). The sublethal effects of tebufenozide on the precopulatory and copulatory activities of *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 112, 169-181.
4. Dhadialla, T. S., Carlson, G. R. & Le, D. P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 43, 545-569.
5. Dinan, L. (1995). A strategy for the identification of ecdysteroid receptor agonists and antagonists from plants. *European Journal of Entomology*, 92, 271-283.

www.SID.ir

6. Dinan, L. (2001). Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry*, 57, 325-339.
7. Farinos, P. G., Smagghe, G., Tirry, L. & Castanera, P. (1999). Action and Pharmacokinetics of a Novel Insect Growth Regulator, Halofenozide, in Adult Beetles of *Aubeonymus mariaefranciscae* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 41, 201-213.
8. Gautam, B. K. & Henderson, G. (2014). Comparative Evaluation of Three Chitin Synthesis Inhibitor Termite Baits Using Multiple Bioassay Designs. *Sociobiology*, 61(1), 82-87.
9. Habibpour, B. (2008). Laboratory evaluation of Flurox, a chitin synthesis inhibitor, on the termite, *Microcerotermes diversus*. *Journal of Insect Science*, 10(2), 1-8.
10. Henderson, G., Kirby, M. L. & Chen, J. (1994). Feeding stimulants to ehnance bait acceptance by Formosan termites. *Proceeding of the 25th Annual Meeting on Wood Preservation*, Bali, Indonesia, P. 513.
11. Kostyukovsky, M., Chen, B., Atsmi, Sh. & Shaaya, E. (2000). Biological activity of two juvenoids and two ecdysteroids against three stored product insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 891-897.
12. Kouhjani-Gorji, M., Moharramipour, M. & Kamali, K. (2014). Phytoecdysterid compounds of *Silene aucheriana* and its nutritional effects on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 37(3), 37-47. (in Farsi)
13. Lafont, R. (1997). Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35, 3-20.
14. Logan, J. W. M. & Abood, F. (1990). Laboratory trials on the toxicity of hydramethylnon to *Reticulitermes santonensis* (Isoptera: Rhinotermitidae) and *Microtermes leppidus* (Isoptera: Termitidae). *Bulletin of Entomological Research*, 80, 19-26.
15. Pedigo, L. P. (2002). Entomology and pest management. 4th Edition, Prentice Hall, Hardbound, USA. 724p.
16. Raina, A. K., Park, Y. I. & Hruska, Z. (2003). Ecdysone agonist halofenozide affects corpora allata and reproductive physiology of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus. Journal of Insect Physiology*, 49, 677-683.
17. Rao, P. S. C., Bellin, C. A. & Brusseau, M. L. (1993). Coupling biodegradation of organic chemicals to sorption and transport in soils and aquifers: paradigms and paradoxes. In: Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil. *Sociobiology*, 32, 1-26.
18. Sahaf, B. Z. & Moharramipour, S. (2013). Effects of ecdysteroidal extract of *Spinacia oleracea* on demographic parameters of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae*). Journal of Crop Protection*, 2(2), 109-116.
19. Slama, K. & Lafont, R. (1995). Insect hormones-ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *European Journal of Entomology*, 92, 355-377.
20. Smagghe, G., Carton, B., Heirman, A. & Tirry, L. (2000). Toxicity of Four Dibenzoylhydrazine orrelates with Evagination–Induction in the Cotton Leafworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 49-58.
21. Stansly, P.A., Su, N.Y. & Conner, J.M. (2000). Management of subterranean termites, *Reticulitermes* spp. (Isoptera: Rhinotermitidae) in a citrus orchard with hexaflumuron bait. *Crop Protection*, 20, 199-206.

Archive of SID

www.SID.ir