آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۸، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۹

بررسی تغییرات نقطه انجماد و ذخایر گلیکوژن در نمونه‌های زمستان‌گذران و آزمایشگاهی کرم برگخوار چغندر *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) جهت تعیین استراتژی سرماسختی آفت

Changes in supercooling point and glycogen reserves in overwintering and lab-reared samples of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) to determining of cold hardiness strategy

مریم عطاپور و سعید محرمی‌پور*
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه حشره‌شناسی کشاورزی
(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۸؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۹)

چکیده

کرم برگخوار چغندر، *Spodoptera exigua* حشره‌ای با دامنه میزبانی وسیع بوده که از بسیاری از گیاهان زراعی و علف‌های هرز تغذیه می‌کند. به منظور درک چگونگی بقاء کرم برگخوار چغندر طی دماهای پایین زمستان، تغییرات نقطه انجماد در نمونه‌های جمع آوری شده از مزرعه طی ماه‌های مختلف و نمونه‌های پرورش یافته آزمایشگاهی بررسی گردید. حشرات زمستان گذران جمع آوری شده از مزرعه در طول پاییز و زمستان به صورت لاروهای کامل تیره رنگ داخل برگ‌های خشکیده فرو افتاده و یا سطح خاک بودند. نقطه انجماد این لاروها به طور معنی‌داری ($P<0.01$) از ۱۲- درجه سلسیوس در آبان به ۶- درجه در اسفند افزایش یافت و این لاروها توانستند در دماهای پایین‌تر از این نقطه نیز زنده بمانند. این در حالی بود که لاروهای آزمایشگاهی نتوانستند در دماهای پایین‌تر از نقطه انجماد خود زنده بمانند. نقطه انجماد مراحل مختلف سنی در نمونه‌های پرورش یافته در آزمایشگاه نیز به طور

* **Corresponding author:** moharami@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

معنی‌داری (P<0.001) تغییر نمود و کمترین میزان خود را در تخم‌ها دارا بود (۲۸- درجه سلسیوس). ترهالوز، گلوکز، گلیسرول و سوربیتول به عنوان مهم‌ترین ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین شناسایی شدند. میزان گلیکوژن به طور معنی‌داری (P<0.01) در لاروهای زمستان گذران بهمن و اسفند نسبت به لاروهای جمع آوری شده در آبان و آذر ماه کمتر بود (بیش از ۷۰ درصد). این میزان همچنین طی مراحل مختلف سنی برگخوار چغندر پرورش یافته در آزمایشگاه نیز تغییر نمود و بالاترین میزان را در شفیره‌ها دارا بود. به این ترتیب به نظر می‌رسد که لاروهای زمستان گذران کرم برگخوار چغندر متحمل به یخ زدگی بوده و گلیکوژن یکی از ذخایر مهم بدن بوده که حشره را در پشت سر گذاردن ماه‌های سرد زمستان یاری می‌رساند.

واژه‌های کلیدی: کرم برگخوار چغندر، *Spodoptera exigua*، نقطه انجماد، ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین، گلیکوژن.

Abstract

The beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), is a highly polyphagus insect that feeds on many cultivated hosts and weeds. To understand how well this pest survives in cold temperature during winter, seasonal variation in the supercooling points (SCPs) were studied in field-collected and lab-reared samples. In this study, the beet armyworm overwintered as dark mature larvae in dried fallen leaves or on the soil surface. Their SCPs increased significantly (P<0.01) from -12°C in November to -6°C in March and these larvae could survive below their SCPs. However lab-reared ones could not survive below their SCPs. Supercooling points of different stages of lab-reared samples changed significantly (P<0.001) and it was lowest in eggs (-28°C). Trehalose, glucose, glycerol and sorbitol were identified as main cryoprotectants. Glycogen contents were significantly (P<0.01) decreased (more than 70%) in larvae collected in February and March rather than overwintering larvae collected in November and December. In different stages of lab-reared samples it changed significantly and was highest in pupae. So, it seems that overwintering larvae of beet armyworm are freeze tolerant and glycogen is a major reserve for overwintering during cold months.

Key words: Beet armyworm, *Spodoptera exigua*, supercooling points, cryoprotectants, glycogen.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بسیاری از حشرات ساکن مناطق معتدل در طول دوره زندگی خود با تغییرات محیطی متنوعی مواجه هستند. این حشرات جهت مصون ماندن از این شرایط که می‌تواند بقاء آنها را تهدید کند، روش‌های تطابقی بسیاری را به کار می‌بندند. مواجه شدن با دماهای پایین طی ماه‌های سرد زمستان یکی از متداول‌ترین این شرایط است. طیف وسیعی از حشرات در پاسخ به این دماها مکانیسم دیاپوز را در پیش می‌گیرند که در آن رشد حشره دچار وقفه عمیقی می‌شود (Denlinger, 1991; Kostal, 2006). با این وجود تعداد دیگری از حشرات نظیر برگخوار چغندر فاقد مکانیسم دیاپوز هستند اما به خوبی قادرند دماهای پایین ماه‌های سرد سال را پشت سر گذارند. این توانایی تحمل به سرما به استراتژی سرماسختی آفت و چگونگی تغییرات در یک سری ترکیبات بیوشیمیایی بدن طی این ماه‌ها مربوط می‌شود (Mikkola, 1970; Kim and Kim, 1997).

سرماسختی به معنای ظرفیت موجود زنده برای بقا در دماهای پایین‌تر از صفر درجه سلسیوس از طریق فرآیندهای فیزیولوزیکی و بیوشیمیایی است (Bale, 1987; Denlinger, 2002). دو استراتژی اصلی جهت سرما سختی در حشرات وجود دارد: تحمل به یخ‌زدگی (Freeze tolerance) و اجتناب از یخ‌زدگی یا حساسیت به یخ زدگی (Freeze avoidance or freeze susceptible). قندها و پلی‌الها (پلی هیدروکسیل الکل‌ها)، عوامل مولد هسته یخ و پروتئین‌های ضد یخ سه گروه متفاوت از ترکیبات حائز اهمیت در این دو گروه هستند که البته نقششان در هر یک متفاوت است (Bale, 2002; Lee and Denlinger, 1991). ملاک اصلی جهت تعیین نوع استراتژی سرماسختی نقطه انجماد بدن می‌باشد. نقطه انجماد (supercooling point) و یا دمای تبلور (crystallization temperature) دمایی است که در آن آب بدن به طور ناگهانی یخ زده و هسته‌های یخ شکل می‌گیرند (Lee, 1989). گونه‌های حساس به یخ زدگی، که بیشتر حشرات در این گروه قرار می‌گیرند، حشراتی هستند که در صورت یخ زدن آب بین سلولی، از بین می‌روند و به همین دلیل برای گریز از یخ زدگی به طرق مختلف با شروع فصل سرما نقطه انجماد بدن آن‌ها کاهش می‌یابد. این گروه از حشرات در دماهای پایین‌تر از نقطه انجماد بدن خواهند مرد. گروه دوم گونه‌های متحمل به یخ زدگی هستند که قادرند حتی در شرایطی

Archive of SID

www.SID.ir

که آب بین سلولی یخ زده باشد زنده بمانند. این حشرات می‌توانند وجود بلورهای یخ در بدنشان را تحمل کنند و بنابراین بر خلاف گروه قبلی، درطول زمستان نقطه انجماد آنها به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد و قادرند در دماهای پایین‌تر از نقطه انجماد خود نیز زنده بمانند (Lee and Denlinger, 1991; Bale, 2002). به طور کلی به نظر می‌رسد که در حشرات استراتژی اجتناب از یخ‌زدگی، در مقایسه با توسعه روش‌ها و مکانیسم‌هایی جهت تحمل به یخ‌زدگی ارزش پایین‌تری داشته باشد چرا که مستلزم صرف انرژی بیشتری است. به این جهت حشراتی که قدرت تحمل در برابر یخ‌زدگی را دارند در مقایسه با آنهایی که از یخ‌زدگی اجتناب می‌کنند موفق‌تر و متکامل‌تر هستند (Layne and Kuharsky, 2000).

یکی از ویژگی‌های مشترک حشرات حساس و متحمل به یخ زدگی، افزایش غلظت قندها و پلی‌ال‌ها طی ماه‌های سرد در بدن می‌باشد. این مواد که به ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین (cryoprotectants) موسوم هستند در حشرات عموماً شامل گلیسرول و یا ترهالوز می‌باشند. اگرچه که ترکیبات دیگری همچون سوربیتول، مانیتول، مایوایتوزیتول، اینوزیتول، اتیلن گلیکول، ریبیتول، فروکتوز و گلوکز در حشرات زمستان گذران گزارش شده است (Lee and Denlinger, 1991; Kostal *et al*., 2001). بر اساس مطالعات صورت گرفته به نظر می‌رسد که یکی از مهم‌ترین منابع افزایش ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین طی ماه‌های سرد، استفاده از ذخایر گلیکوژن و کاهش آن طی این زمان باشد (Lí *et al*., 2002).

کرم برگخوار چغندر *Spodoptera exigua* (Hübner)، بومی‌نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر آسیای جنوبی بوده اما در حال حاضر در بسیاری از نقاط دنیا انتشار دارد (Capinera, 2001). این گونه دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی بوده به طوریکه در حالت طغیان مهم‌ترین آفت چغندر، سیب‌زمینی و پنبه به شمار می‌رود. با این حال گیاهان زراعی دیگری از جمله یونجه، ذرت، گوجه فرنگی، بادمجان، هویج، توتون، سویا، لوبیا، باقلا، نخود، کرچک، کاهو، کلم، شلغم و حتی برخی علف‌های هرز نظیر سروف، پیچک، خرفه و غیره مورد تغذیه این آفت قرار می‌گیرند. این حشره دارای توانایی مهاجرت و فاقد مکانیسم دیاپوز بوده و در مناطق معتدل ۲- ۴ نسل در سال تولید می‌کند و زمستان گذرانی آن عموماً به صورت شفیره در محفظه‌های گلی در عمق چند سانتی متری خاک می‌باشد (Kheiri, 1976; Tingle and Mitchell,

Archive of SID

www.SID.ir

1977; Butler and Henneberry, 1990; Khanjani, 2006). متأسفانه در حال حاضر به دلیل توسعه فضای گلخانه‌ها که بستر مناسبی را برای رشد برگخوار چغندر طی ماه‌های سرد سال فراهم می‌سازد، به طور روز افزون بر جمعیت این آفت افزوده شده و خسارت بیشتری را بر محصولات مختلف زراعی به ویژه سبزیجات وارد می‌سازد. با وجود این که این آفت دارای دشمنان طبیعی زیادی است اما چون تحت شرایط طغیانی کنترل بیولوژیک علیه آن پاسخ گو نیست و نیز با توجه به سهولت کاربرد سموم، عموماً علیه این آفت کنترل شیمیایی صورت می‌گیرد. متأسفانه به دلیل سم پاشی‌های مکرر و زیاد، برگخوار چغندر علیه بسیاری از سموم شیمیایی از خود مقاومت نشان داده و مسأله مقاومت تبدیل به یکی از مهم‌ترین مشکلات در مدیریت این آفت گشته است (Capinera, 2001). تشخیص نوع استراتژی سرماسختی برگخوار چغندر و انواع تغییرات به وقوع پیوسته در ترکیبات بیوشیمیایی بدن می‌تواند کمک شایانی به شناخت بیشتر این آفت و در نهایت مدیریت بهتر آن خصوصاً طی ماه‌های سرد به انجام رساند. در مطالعه انجام گرفته روی برگخوار چغندر توسط Kim and Kim (1997) این آفت به عنوان حشره ای حساس به یخ زدگی شناخته شد چرا که تمامی‌مراحل سنی در دماهای حتی بالاتر از نقطه انجماد خود می‌مردند و توانایی زنده ماندن را نداشتند. با این حال در مطالعه فوق چگونگی سرماسختی و تغییرات نقطه انجماد بر روی حشرات پرورش یافته در آزمایشگاه – و نه حشرات زمستان گذران جمع آوری شده از مزرعه – صورت گرفته و به این جهت نتایج آن‌ها جهت اظهار نظر قطعی در خصوص استراتژی سرما سختی این آفت ناکافی به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی نوسانات نقطه انجماد بدن، تعیین نوع استراتژی تحمل به سرما و بررسی تغییرات به وقوع پیوسته در میزان ذخایر گلیکوژن در نمونه‌های آزمایشگاهی و نیز نمونه‌های زمستان گذران جمع آوری شده از طبیعت می‌باشد تا به این وسیله استراتژی و چگونگی سرماسختی برگخوار چغندر در برابر دماهای پایین روشن شود.

روش بررسی

حشرات مورد نیاز و اطلاعات هواشناسی: پرورش نمونه‌های آزمایشگاهی در اتاقک رشد در دمای۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت

Archive of SID

www.SID.ir

روشنایی و ۸ ساعت تاریکی صورت پذیرفت. جهت تغذیه لاروها از برگ چغندر و جهت تغذیه حشرات کامل از محلول آب و عسل ۱۰ درصد استفاده شد. به منظور جمع آوری ماهیانه نمونه‌ها، و به علت دشواری و عملاً ناممکن بودن جمع آوری نمونه‌های زمستان گذران از خاک مزرعه، در مهر ماه لاروهای سن آخر از مزرعه جمع آوری و در داخل قفس‌های توری حاوی گلدان‌های چغندر برگی رهاسازی شدند. این قفس‌ها که دارای ابعاد ۱۲۰×۸۵×٦٥ سانتی متر بودند در جوار مزارع دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس قرار داده شدند و نمونه‌های زمستان گذران در هر ماه به شکل کاملاً تصادفی از داخل این قفس‌ها جمع آوری گردیدند. جهت کسب ویژگی‌های دمایی مورد نیاز، از اطلاعات ایستگاه هواشناسی چیتگر که در جوار مزارع دانشکده کشاورزی مستقر می‌باشد استفاده گردید.

اندازه‌گیری نقطه انجماد بدن: اندازه گیری نقطه انجماد نمونه‌ها به روش Neven (1999) صورت گرفت. هر آزمایش حداقل در ٦ تکرار (یک حشره به عنوان یک نمونه در هر تکرار) انجام پذیرفت. نمونه‌ها شامل حشرات جمع شده از طبیعت (به صورت لاروهای سن آخر) طی ماه‌های آبان تا اسفند و نمونه‌های پرورش یافته آزمایشگاهی در مراحل تخم، لارو سن ۵، پیش شفیره، شفیره و حشره کامل که همگی در یک سن قرار داشتند می‌شدند. به این منظور حسگر (sensor) جنس نیکل – کرم ثبت کننده دما (Testo, model 177-T4) در تماس با بدن نمونه قرار داده شد و در محل خود با کمک چسب نواری تثبیت و سپس به دستگاه سرد کننده قابل برنامه ریزی(Binder, Model MK 53) منتقل گردید. دستگاه به گونه ای برنامه ریزی شد که از دمای ۲۰+ تا ۲۵– درجه سلسیوس با سرعت تقریبی ۰/۵ درجه سلسیوس در دقیقه به تدریج سرد شده و طی این مدت هر ۳۰ ثانیه دمای بدن حشره ثبت گردید. نقطه‌ای که پس از آن، افزایش سریع دما به خاطر آزاد شدن گرمای درونی رخ می‌دهد، به عنوان نقطه انجماد منظور شد. سپس دستگاه به شکل معکوس دما را به ۲۰+ درجه سلسیوس رسانده و نمونه‌ها از آن خارج گردیدند. در مورد اندازه گیری نقطه انجماد تخم‌ها دما تا ۳۵– درجه سلسیوس کاهش یافت.

شناسایی ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین در نمونه‌های زمستان گذران: به این منظور ۳ نمونه از لاروهای جمع آوری شده از طبیعت در دی ماه مورد آزمایش قرار گرفتند.

Archive of SID

www.SID.ir

هر نمونه در۲ میلی لیتر اتانول۸۰ درصد همگن گردید و پس از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت g ۱۲۰۰۰ در آون تحت خلاء گذاشته شد تا حلال آن تبخیر گردد. پس از تبخیر کامل حلال، ۲۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر (HPLC grade) به هر نمونه افزوده شد و نمونه‌ها پس از تصفیه با فیلتر سر سرنگی (Millex, USA) جهت تزریق به دستگاه HPLC (Waters, USA) آماده شدند (Pullin and Bale, 1989). فاز متحرک مورد استفاده آب (HPLC grade) بود. برای جداسازی از ستون مخصوص کربوهیدرات‌ها (Ca, 59305-U, 300×7.8 mm, Supelco, USA) استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه و آشکار ساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست (RI) بود. جداسازی‌ها در دمای محیط انجام پذیرفت. پس از انجام تنظیمات دستگاه و پایدار شدن آن، ۲۰ میکرولیتر از نمونه به وسیله سرنگ‌هامیلتون کشیده شده و به دستگاه تزریق و کروماتوگرام مربوطه ثبت شد.

اندازه‌گیری گلیکوژن: استخراج گلیکوژن از لاروهای زمستان گذران و نیز نمونه‌های پرورش یافته در آزمایشگاه به روش Pullin and Bale (1989) انجام پذیرفت. البته به دلیل اندازه بسیار کوچک تخمها و نیاز به تعداد بسیار زیاد تخم، این آزمایش استثنائاً بر روی این مرحله سنی صورت نگرفت. به این منظور پس از همگن کردن نمونه‌ها در اتانول ۸۰ درصد ، به هر کدام ۱ میلی لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد اضافه گردید. پس از ٢٤ ساعت که محلول کاملاً یکنواخت شد، ۰/۸ میلی لیتر محلول رسوب گذاری (دو قسمت NaCl دو درصد و ۷ قسمت اتانول ۹۵ درصد) جهت رسوب گلیکوژن به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها به یخچال منتقل شدند. پس از گذشت حداقل ۳ ساعت محلول رویی (هیدروکسید پتاسیم) دور ریخته شد. پس از دو بار آبشویی نمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد و آب دو بار تقطیر، به هر کدام ۵ میلی لیتر واکنشگر الکلی (reagent alcohol) (شامل ۲۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۳۰ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۲ درصد، ۳۰ میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱ درصد و ۳۰ میلی لیتر آب مقطر) به عنوان معرف، اضافه شده و میزان گلیکوژن موجود در نمونه‌ها با کمک دستگاه طیف سنج UV-Vis در طول موج ٦٦٠ نانومتر اندازه گیری گردید. غلظت گلیکوژن در نمونه‌ها به روش رسم منحنی درجه بندی (جذب در برابر غلظت) تعیین شد. به این ترتیب که غلظت‌های مختلفی از استاندارد گلیکوژن (Merck) آماده، پس از اضافه نمودن مقدار ثابتی از

Archive of SID

www.SID.ir

معرف، میزان جذب آنها در دستگاه خوانده شد و بر اساس آنها منحنی درجه بندی به دست آمد و از آن جهت به دست آوردن غلظت نمونه‌ها استفاده گردید.

تجزیه آماری: اطلاعات به دست آمده به صورت میانگین ± خطای معیار گزارش شدند. تجزیه داده‌ها با کمک تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه‌های میانگین تیمارهای مختلف با کمک آزمون توکی در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS (16.0) انجام پذیرفت.

نتیجه و بحث

اولین نکته قابل توجهی که در این مطالعه مشاهده گردید این بود که علی رغم زمستان سرد در این سال (میانگین حداقل دما در دی ماه ۰/۸- درجه سلسیوس و حداقل دمای ثبت شده ۲۲- درجه در همین ماه، شکل ۱)، این حشره به صورت لاروهای کامل (سن پنجم) در داخل برگ‌های خشکیده و منافذ و شیارهای خاک زمستان گذرانی نمود. رنگ این لاروها نسبت به لاروهای فعال تیره تر بود، به طوری که تشخیص آنها را از خاک بسیار دشوار می‌نمود. اندازه گیری نقطه انجماد بدن طی ماه‌های آبان تا اسفند روی این لاروها صورت گرفت و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده گردید ($F_{4, 28}$= 6.32; P<0.01). پایین ترین نقطه انجماد مشاهده شده مربوط به آبان (۰/۹۳±۱۲/۱- درجه سلسیوس) و بالاترین آن مربوط به اسفند ماه (۰/٤۷ ±٦/٦- درجه سلسیوس) می‌شد. به طور کلی نقطه انجماد از آبان تا اسفند ماه تدریجاً افزایش یافت (شکل ۲). ضمن اینکه در تمامی‌ماه‌ها علی رغم این که لاروها در حین اندازه گیری نقطه انجماد با دمای بسیار پایین‌تری از نقطه انجماد خود (۲۵- درجه سلسیوس) مواجه شده بودند اما همگی پس از آب شدن یخ بدن زنده ماندند. بنابر این نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که علی رغم این که لاروها نتوانسته بودند به فرم رایج زمستان گذران خود (شفیره) برسند ولی توانستند به همین صورت شرایط سخت و سرمای زیر صفر در زمستان را با موفقیت پشت سر گذارند. این نتایج حاکی از تطابق بالای حشره می‌باشد و لذا باید در برنامه مدیریت این آفت توجه نمود که ذخایر جمعیت سال زراعی بعد تنها نمی‌تواند منحصر به فرم شفیره‌های تشکیل شده در خاک باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه گیری نقطه انجماد در مراحل مختلف سنی نمونه‌های پرورش یافتـه در آزمایـشگاه نیز اختلاف معنی داری را نشان داد ($F_{4, 38}$= 175.9; P<0.001). پایین ترین نقطه انجماد مـشاهده شده مربوط به مرحله تخم (۲۸/۱±۰/۲۸- درجه سلسیوس) و بـالاترین آن مربـوط بـه مرحلـه شفیرگی (۸/۹±۰/۵۱- درجه سلسیوس) می‌شد. با این وجود بین مراحل لاروی (سـن پـنجم)، پیش شفیرگی، شفیرگی و حشرات کامل از این نظر اختلاف معنی داری وجود نداشت (شـکل ۳). نقطه انجماد لاروهای سن ۵ آزمایشگاهی۰/۷٤ ±۹/٤- درجه سلسیوس بود که با لاروهـای زمستان گذران سن ۵ جمع آوری شده از طبیعت اختلاف معنی داری را از خود نشان نداد امـا هیچیک از این لاروها، بر خلاف لاروهای زمستان گذران جمع آوری شده از طبیعت، پـس از مواجه شدن تا دمای ۲۵- درجه نتوانستند زنده بمانند و بعد از آب شدن یخ بدن، تیره و آبکـی شده و از بین رفتند. به این ترتیب به نظر می‌رسد که لاروهـای زمـستان گـذران ایـن آفـت از استراتژی تحمل به یخ زدگی استفاده نمایند. چرا که طی سردترین ماه‌ها نقطه انجماد بدن آنهـا افزایش یافت و لاروها قادر بودند در دماهای پایین تر از این نقطه نیز به خوبی زنده بمانند. در حالی که لاروهای پرورش یافته در آزمایشگاه نتوانستند یخ زدگی آب بدن را تحمـل نماینـد و همگی از بین رفتند. در یکی از معدود مطالعات صورت گرفته در ایـن زمینـه در کـره جنـوبی (Kim and Kim, 1997) که سایر مقالات نیز به آن استناد نموده اند، تنها یکبار نمونـه بـرداری از لاروهای فعال در مزرعه حدوداً در شهریور ماه صورت پذیرفت و بنابراین نقطـه انجمـاد بـدن لاروهای زمستان گذران طی ماه‌های مختلف اندازه گیری نشد و روند تغییـرات آن بـه دسـت نیامد. در مطالعه مذکور نقطه انجماد لاروهای جمع آوری شده از مزرعه بین ۸- الی ۹- درجـه سلسیوس و میانگین نقطه انجماد لاروهای سن ۵ آزمایـشگاهی حـدود ۱۰- درجـه سلـسیوس گزارش گردید و از آنجا که هچیک از آنها نتوانستند در دماهـای پـایین‌تـر از ایـن نقطـه زنـده بمانند، برگخوار چغندر به عنوان حشره ای حساس به یخ زدگی معرفی گردید. ولی بر اسـاس این مطالعه به نظر می‌رسد که نمونه‌های زمستان گذران این آفت از اسـتراتژی تحمـل بـه یـخ زدگی بهره می‌برند. باید توجه داشت که نقطه انجماد حشرات حساس به یخ زدگی عموماً در طول ماه‌های سرد سال بسیار پایین‌تر و در حدود ۲۰- الی ۳۰- درجه سلسیوس می‌باشـد البتـه به استثناء برخی حشرات ساکن قطب که نقطه انجماد بدن آنها حتی به پایین تر از ٦۰- درجـه

Archive of SID

www.SID.ir

سلسیوس نیز می‌رسد (Somme, 1982). این در حالی است که طی این بررسی، در طول سردترین ماه‌ها نقطه انجماد بین ۶- الی ۸- درجه ثبت گردید. در مورد نقطه انجماد مراحل مختلف رشدی نتایج به دست آمده از این مطالعه بسیار مشابه نتایج مطالعه انجام شده در کشور کره جنوبی می‌باشد. در مطالعه مذکور نیز بین مراحل لاروی، پیش شفیرگی، شفیرگی و حشره کامل اختلاف معنی داری از نظر نقطه انجماد وجود نداشت ولی نقطه انجماد تخم‌ها بسیار پایین (۲/۹±۲۶/۸- درجه سلسیوس) بود. به نظر می‌رسد که این نقطه انجماد بسیار پایین در این مرحله به سایز کوچک تخم‌ها مربوط باشد. مطالعات فیزیکی آب نشان داده که ظرفیت سرد شدن آب با حجم نمونه نسبت عکس دارد (Angell, 1982). حشرات با توجه به اندازه کوچکشان در حقیقت بسته‌های کوچک آب به شمار می‌آیند و در واقع بدون حضور عوامل مولد هسته یخ - که به عنوان کاتالیزوری جهت شکل گیری کریستال یخ عمل می‌نمایند- به شکل ذاتی ظرفیت سرد شدن فوق العاده (supercooling capacity) بالایی دارند (Lee, 1989). گونه‌های خیلی کوچک و یا تخم برخی حشرات می‌توانند بدون این که یخ بزنند تا دمای ۲۰- الی ۳۰- درجه سلسیوس سرد شوند (Somme, 1982). به این ترتیب می‌توان پایین بودن چشمگیر نقطه انجماد تخم نسبت به سایر مراحل رشدی را در این مطالعات توجیه نمود.

کروماتوگرام حاصل از HPLC وجود چهار ترکیب ترهالوز، گلوکز، گلیسرول و سوربیتول را در لاروهای زمستان گذران برگخوار چغندر مشخص ساخت (شکل ۴). متداول ترین ترکیبات ضد یخ در حشرات زمستان گذران گلیسرول و ترهالوز گزارش شده است (Somme, 1964; Baust, 1973; Zachariassen, 1985). با این وجود ترکیبات دیگری نیز در کنار این دو حائز اهمیت می‌باشند. به عنوان مثال در لاروهای شب پره هندی، *Plodia interpunctella* Hübner، گلیسرول و ترهالوز (Naeemullah *et al*., 1999) و یا در لاروهای جوانه خوار صنوبر، *Choristoneura fumiferana* (Clemens)، گلیسرول مهمترین ترکیب می‌باشند (Han and Bauce, 1995) اما در حشرات کامل سن *Pyrrhocoris apterus* L. ریبیتول، سوربیتول، مانیتول و آرابینیتول (Kostal *et al*., 2001)، در شفیره‌های مگس ریشه کلم، *Delia radicum* L.، گلیسرول، اریتریتول، گلوکز، مایواینوزیتول و ترهالوز (Kostal and Simek, 1995)، و در لاروهای ساقه خوار برنج، *Chillo suppressalis* Walker، گلیسرول، گلوکز و ترهالوز

Archive of SID

www.SID.ir

(Atapour and Moharramipour, 2009) به عنوان مهم‌ترین ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین مورد شناسایی قرار گرفته اند. در هر صورت در حشرات متحمل به یخ زدگی، این ترکیبات با کمک مکانیسم‌هایی همچون: کاهش بالقوه فاصلهٔ مولکول‌های آب و در نتیجه کاهش احتمال توسعهٔ کریستال یخ، حفظ ثبات الکترولیت‌های بافری و ساختار پروتئین‌ها، کاهش جریان یافتن آب از میان غشاء و حفظ حجم سلول در شرایط دماهای پایین بروز صدمات احتمالی ناشی از یخ‌زدگی نظیر صدمات مکانیکی در محل یخ‌زدگی، عدم تعادل الکترولیت‌ها، بحرانی شدن حجم سلول، کریستاله شدن و انجماد مجدد را کاهش می‌دهند (Bale, 2002). به طور کلی این ترکیبات در حشرات متحمل به یخ‌زدگی میزان آب قابل دسترس برای انجماد و به دنبال آن میزان آبگیری سلول را کنترل کرده و شوک اسمزی حاصل از یخ‌زدگی را کاهش می‌دهند (Kostal *et al*., 2001). به این ترتیب به نظر می‌رسد که این ترکیبات در پشت سر گذاشتن ماه‌های سرد سال در لاروهای زمستان گذران برگخوار چغندر نقش به سزایی را ایفا نمایند.

بررسی غلظت گلیکوژن در نمونه‌های زمستان گذران و نمونه‌های پرورش یافته در آزمایشگاه با کمک دستگاه طیف سنج UV-Vis در طول موج ٦٦٠ نانومتر انجام پذیرفت. لاروهای زمستان گذران از نظر میزان گلیکوژن بین ماه‌های آبان تا اسفند اختلاف معنی داری را نشان دادند ($F_{4, 14}$= 8.54; P<0.01). میزان گلیکوژن در آبان ماه بالاترین غلظت را در نمونه‌ها دارا بود (۱/۰۹±۱۳/۸ میلی گرم) وبا ماه‌های آذر و دی اختلاف معنی داری نداشت اما مقدار آن در بهمن واسفند ماه به پایین ترین حد خود رسید (به ترتیب۰/۷ ±۵/۹ و ۰/۸±۴/۵ میلی گرم) و با ماه‌های آبان و آذر اختلاف معنی دار نشان داد (شکل ۵). با توجه به کاهش بیش از ۷۰ درصدی گلیکوژن به نظر می‌رسد که این ترکیب از مهمترین منابع تأمین انرژی و ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین می‌باشد. میان کاهش ذخایر گلیکوژن و کاهش دما تا بهمن ماه همخوانی وجود داشت اما در بهمن و اسفند ماه با وجود افزایش تقریبی دمای محیط، میزان گلیکوژن همچنان کاهش یافت. این مسأله را می‌توان چنین توجیه نمود که از آنجا که حشره همچنان در فاز زمستان گذرانی است و تغذیه‌ای ندارد، از این روست ممکن است که ذخایر گلیکوژن هنوز به منظور تأمین انرژی و یا ترکیبات ضد یخ (جهت مواجه شدن با سرماهای

Archive of SID

www.SID.ir

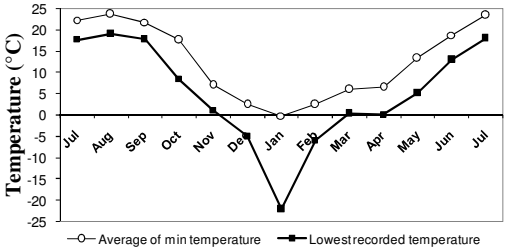
ناگهانی دراواخر زمستان و یا اوایل بهار) در حال مصرف شدن باشد.

چنین کاهش چشمگیری در زمان افت دما در برخی حشرات دیگر نیز گزارش شده است. به عنوان مثال در شفیره‌های *Hyphantria cunea* Drury (Li *et al*., 2001)، *Mamestra brassicae*L. (Ding *et al*., 2003) و یا لاروهای *Enosima leucotaeniella* (Ragonot) (Goto *et al*., 1998) همزمان با کاهش دما میزان گلیکوژن نیز کاهش چشمگیری یافته و در کنار این کاهش میزان ترهالوز به عنوان مهمترین ترکیب ضد یخ افزایش معنی داری داشت. به نظر می‌رسد آنزیم‌هایی نظیر گلیکوژن فسفوریلاز، هگزوکیناز و فسفوفروکتوکیناز در کاهش و تبدیل ذخایر گلیکوژن به ترکیبات ضدیخی همچون گلیسرول و ترهالوز نقش اساسی را ایفا نمایند (Storey and Storey, 1988). در مطالعات صورت گرفته روی کرم سافه خوار برنج (*C. suppressalis*) مشخص شده است که گلیکوژن به عنوان مهمترین منبع افزایش گلیسرول طی ماه‌های سرد سال عمل می‌کند (Goto *et al*., 2001; Atapour *et al*., 2008; Atapour and Moharramipour, 2009). تحقیقات صورت گرفته روی آنزیم‌های فعال در این فرایند نشان داده اند که کاهش ذخایر گلیکوژن و به تناسب آن، افزایش گلیسرول با فعال شدن آنزیم‌های گلیکوژن فسفوریلاز و گلیسرول سنتتاز، خصوصاً گلیسر آلدهید – ۳– فسفاتاز، و غیر فعال شدن آنزیم فروکتوز –۱ و ۶– بی فسفاتاز همراه است (Tsumuki and Kanehisa, 1980a,b; Li *et al*., 2002).

میزان گلیکوژن طی مراحل مختلف سنی نمونه‌های پرورش یافته در آزمایشگاه نیز به طور معنی داری تغییر نمود ($F_{3, 15}$= 18.8; P<0.001). در بین مراحل مختلف، حشرات کامل دارای کمترین میزان گلیکوژن (۳/۴±۰/۳۷ میلی گرم) و شفیره‌ها دارای بالاترین میزان (۱۶/۶±۱/۷ میلی گرم) بودند (شکل ۶). به نظر می‌رسد علت افزایش گلیکوژن از مرحله لاروی، پیش شفیرگی و نهایتاً شفیرگی نیاز مبرم حشره به این ذخایر در دوران حشره کامل باشد. چرا که با ظهور حشرات کامل، احتمالا میزان بالایی از ذخایر گلیکوژن جهت فرایندهای تولید مثلی و خصوصاً ویتلوژنز مصرف شده و به همین علت مقدار گلیکوژن در حشره کامل پایین می‌آید (Nation, 2002).

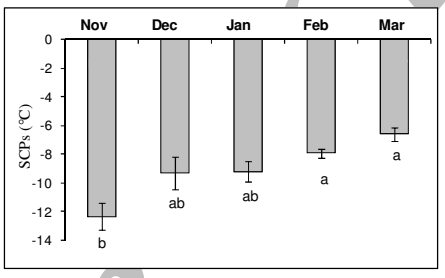
Archive of SID

www.SID.ir



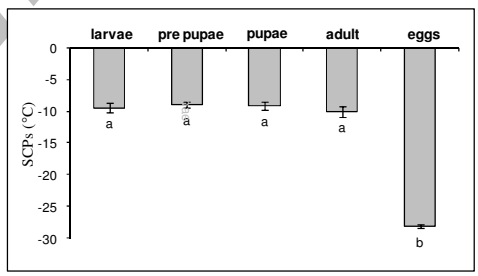
شکل ۱- میانگین حداقل دمای ماهیانه و پایین‌ترین دمای ثبت شده طی ماه‌های تیر۱۳۸۷ تا تیر ۱۳۸۸

Fig. 1. Monthly mean of minimum temperature and the lowest recorded temperature from July 2008 to July 2009



شکل ۲- نقطه انجماد بدن لاروهای زمستان گذران برگخوار چغندر، *S. exigua* طی ماه‌های آبان تا اسفند سال ۱۳۸۷. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در آزمون Tukey می‌باشد

Fig. 2. Supercooling points (SCPs) of the overwintering larvae of beet armyworm, *S. exigua* from November 2008 to March 2009. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA

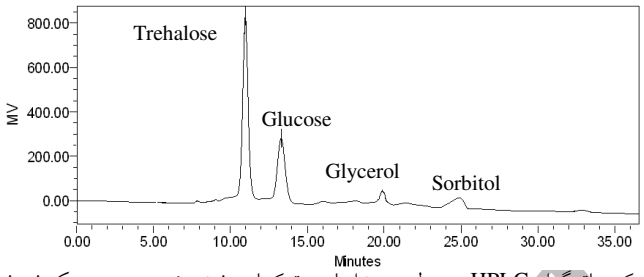


شکل ۳- نقطه انجماد بدن کرم برگخوار چغندر پرورش یافته در آزمایشگاه طی مراحل مختلف سنی. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در آزمون Tukey می‌باشد

Fig. 3. Supercooling points (SCPs) of the lab reared beet armyworm during different stages. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA.

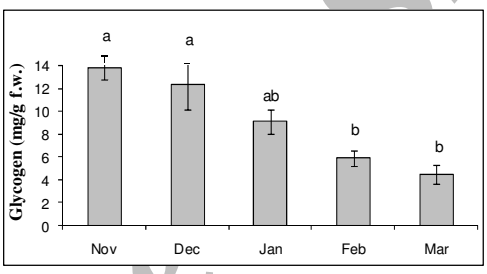
Archive of SID

www.SID.ir



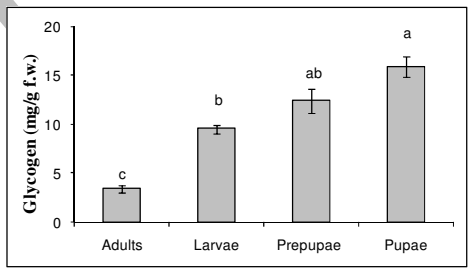
شکل ٤- کروماتوگرام HPLC مربوط به جداسازی ترکیبات ضد یخ موجود در یک نمونه از لارو سن ٥ زمستان گذران برگخوار چغندر جمع آوری شده در دی ماه ١٣٧٨

Fig. 4. HPLC chromatogram of cryoprotectant sepration in a sapmle of the overwintering 5th instar larvae of beet armyworm collected in January 2009



شکل ٥- تغییرات غلظت گلیکوژن در لاروهای زمستان گذران کرم برگخوار چغندر از آبان تا اسفند سال ١٣٨٧. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ٥ درصد در آزمون Tukey می‌باشد

Fig. 5. Glycogen content changes in the overwintering larvae of beet armyworm from November 2008 to March 2009. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA



شکل ٦- تغییرات غلظت گلیکوژن مراحل مختلف سنی کرم برگخوار چغندر پرورش یافته در آزمایشگاه. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ٥ درصد در آزمون Tukey می‌باشد

Fig. 6. Glycogen content changes in the different stages of the lab reared beet armyworm. Values labeled with the same letters are not significantly different at the 5% level by Tukey's test after ANOVA

Archive of SID

www.SID.ir

از سوی دیگر چنانچه حشره به صورت شفیره وارد فاز زمستان گذرانی گردد هم این ذخایر به عنوان منبع تأمین انرژی و نیز افزایش ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین بسیار مورد نیاز هستند. بنابر این بالا بودن چشمگیر و قابل توجه گلیکوژن در شفیره‌ها می‌تواند نقش موثری برای مرحله زمستان گذرانی این آفت داشته باشد. خصوصاً از آنجا که زمستان گذرانی شفیره‌ها در داخل خانه‌های گلی انجام می‌گیرد حشره در این مرحله چه از نظر فیزیولوژیکی و چه از نظر شرایط محیطی و پناهگاه جهت زمستان گذرانی آماده تر می‌باشد و از این روست که در اکثر منابع زمستان گذرانی آن به صورت شفیره گزارش شده است. اگرچه در این مطالعه مشخص شد که چنانچه این حشره به فرم لارو نیز زمستان گذرانی نماید باز هم ذخایر گلیکوژن را در خود افزایش می‌دهد. میزان گلیکوژن در لاروهای سن ۵ جمع آوری شده در آبان ماه (۱/۰۹±۱۳/۸ میلی گرم) با لاروهای سن ۵ آزمایشگاهی (۱/۱۷±۷/۱ میلی گرم) اختلاف کاملاً معنی داری داشت ($F_{1, 7}$= 16.57; P<0.001). از آنجا که حشرات عموماً قبل از ورود به فاز زمستان گذرانی متحمل تغییرات فیزیولوژیکی مهمی‌می‌شوند که آنها را در پشت سر گذاشتن این دوره یاری می‌نماید (Kostal, 2006)، به نظر می‌رسد که افزایش حدوداً ۲ برابری ذخایر گلیکوژن در لاروهای زمستان گذران برگخوار چغندر نسبت به لاروهای آزمایشگاهی نیز یکی از مهمترین این تغییرات باشد که قبل از شروع ماه‌های سرد در حشره افزایش یافته و احتمالا در طول این ماه‌ها با کاهش و تبدیل خود به ترکیبات ضد یخ با وزن مولکولی پایین و نیز تأمین انرژی به بقاء حشره در فصل زمستان کمک می‌کند. با این وجود به نظر می‌رسد که انجام مطالعات بیشتر خصوصاً در زمینه بررسی سرماسختی آفت در دماهای پایین تر از نقطه انجماد (به عنوان مثال ۱۵- درجه سلسیوس) به مدت طولانی‌تر (حداقل چند الی ۲۴ ساعت) جهت اظهار نظر قطعی در مورد استراتژی زمستان گذرانی آفت لازم باشد. همچنین جهت پی بردن به مهمترین ترکیب ضد یخ و روند تغییرات این ترکیبات طی ماه‌های سرد مطالعات کامل‌تری بایستی انجام گیرد. امید است مطالعات تکمیلی در این زمینه ماهیت و چگونگی زمستان گذرانی کرم برگخوار چغندر را به طور کامل برای ما روشن سازد*.

* **نشانی نگارندگان:** دکتر مریم عطاپور و دکتر سعید محرمی‌پور، دانشگاه‌تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه حشره شناسی کشاورزی، صندوق پستی ۳۳٦-۱٤۱۱۵، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

ANGELL, C. A. 1982. Supercooled water. In: Franks, F. (ed.), Water, a comprehensive treatise. Plenum Press, New York. pp. 1-82.

ATAPOUR, M. and S. MOHARRAMIPOUR, 2009. Changes of Cold hardiness, Supercooling Capacity and Major Cryoprotectants in Overwintering Larvae of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Environ. Entomol. 38 (1): 260-265.

ATAPOUR, M., S. MOHARRAMIPOUR, B. BARZEGAR and A. KHANI, 2008. Some cryoprotectants of overwintering larvae of rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) in north parts of Iran. Appl. Ent. Phytopath. 75 (2): 27-38. (In Persian with English summary)

BALE, J. S. 1987. Insect cold hardiness: Freezing and supercooling. An ecophysiological perspective. J. Insect Physiol. 35: 291-298.

BALE, J. S. 2002. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. Philos. T. Roy. Soc. 357 (B): 849- 862.

BAUST, J. G. 1973. Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems. Cryobiology. 10: 197– 205.

BUTLER, J. and T. J. HENNEBERRY, 1990. Cottonseed oil and safer insecticidal soap: effects on cotton and vegetable pests and phytotoxicity. Southwest. Entomol. 15:257-264.

CAPINERA, J. L. 2001. Handbook of vegetable pests. Academic Press, San Diego. 729 pp.

DENLINGER, D. L. 1991. Relationship between cold hardiness and diapause. In: Lee, R. E. and D. L. Denlinger (eds.), Insect at Low Temperature, Chapman and Hall, New York. pp. 174- 198.

DENLINGER, D. L. 2002. Regulation of diapause. Annu. Rev. Entomol. 47: 93-122.

DING, L., Y. LI and M. GOTO, 2003. Physiological and biochemical changes in summer and winter diapause and non-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. during long-term cold acclimation. J. Insect Physiol. 49: 1153-1159.

GOTO, M., M. FUJII, K. SUZUKI and M. SAKAI, 1998. Factors affecting carbohydrate and free amino acid content in overwintering larvae of *Enosima leucotaeniella.* J. Insect Physiol. 44 (1): 87-94.

Archive of SID

www.SID.ir

GOTO, M., Y. LI and T. HONMA, 2001. Changes of diapause and cold hardiness in the shonai ecotype larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker during overwintering. Jpn. J. Appl. Entomol. Z. 36(3): 323-328.

HAN, E. N. and E. BOUCE, 1995. Glycerol synthesis by diapausing larvae in response to the timing of low temperature, and implications for overwintering survival of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. J. Insect Physiol. 41 (11): 981-985.

KHANJANI, M. 2006. Vegetable pests in Iran. Bu-Ali Sina University Publication, 2nd Edition. 467 pp. (in Persian).

KHEIRI, M. 1976. Investigation on outbreak on the beet armyworm *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae). Ent. Phytopath. Appl. 42: 1-15. (In Persian with English summary).

KIM, Y. and N. KIM, 1997. Cold hardiness in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Physiol. Chem. Ecol. 26 (5): 1117-1123.

KOSTAL, V. 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. J. Insect Physiol.52: 113-127.

KOSTAL, V. and P. SIMEK, 1995. Dynamics of cold hardiness. Supercooling and cryoprotectants in diapausing and non-diapausing pupae of the cabbage root fly, *Delia radicum* L. J. Insect Physiol. 41 (7): 627-637.

KOSTAL, V., M. SLACHTA and P. SIMEK, 2001. Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). J. Insect Physiol. 130(B): 365-374

LAYNE, J. R. and D. K. KUHARSKY, 2000. Effects of prolonged freezing and supercooling on body composition, puparation, and adult emergence of *Eurosta solidaginis*. Environ. Entomol. 30 (1): 12- 16.

LEE, R. E. 1989. Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze?. Bioscience. 39: 308-313.

LEE, R. E. and D. L. DENLINGER, 1991. Insects at Low Temperature. Chapman and Hall, New York. 513 pp.

LEE, R. E. 1989. Insect cold-hardiness: to freeze or not to freeze?. Bioscience. 39: 308-313.

LI, Y. P., M. GOTO, L. DING and H. TSUMUKI, 2002. Diapause development and acclimation regulation enzymes associated with glycerol synthsis of the shonai ecotype of the rice stem borer larva, *Chilo suppressalis* Walker. J. Insect Physiol. 48: 303-310.

LI, Y-P., M. GOTO, S. ITO, Y. SATO, K. SASAKI and N. GOTO, 2001. Physiology of diapause and cold hardiness in the overwintering pupae of the fall webworm

Archive of SID

www.SID.ir

Hyphantria cunea in Japan. J. Insect Physiol. 47: 1181-1187.

MIKKOLA, K. 1970. The interpretation of long-range migrations of Spodoptera exigua Hb. (Lepidoptera: Noctuidae). J. Anim. Ecol. 39: 593-598.

NAEEMULLAH, M., K. TANAKA, H. TSUMUKI and M. TAKEDA, 1999. Relationship of cold tolerance to developmental determination in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella.* Jpn. J. Appl. Entomol. Z. 34(2): 267-276 .

NATION, J. L. 2002. Insect physiology and biochemistry. CRC Press, New York, USA, 485 pp.

NEVEN, L. G. 1999. Cold hardiness adaptation of codling moth, *Cydia pomonella*. Cryobiology. 38: 43-50.

PULLIN, A. S. and J. S. BALE, 1989. Effects of low temperature on diapausing *Aglais urticae* and *Inachis io* (Lepidoptera: Nymphalidae): overwintering physiology. J. Insect Physiol. 35: 283-290.

SOMME, L. 1964. Effects of glycerol on cold hardiness in insects. Can. J. Zool. 42: 89– 101.

SOMME, L. 1982. Supercooling and winter survival in terresterial arthropods. Biochem. Physiol. 73(A): 519-543.

STOREY, K. B. and J. M. STOREY, 1988. Freeze tolerance in animals. J. Insect Physiol. 68: 27-84.

TINGLE, F. C. and E. R. MITCHELL, 1977. Seasonal populations of armyworms and loopers at Hastings, Florida. Fla. Entomol. 60: 115- 122.

TSUMUKI, H. and K. KANEHISA, 1980a. Changes in enzyme activities related to glycerol synthesis in hibernating larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. Jpn. J. Appl. Entomol. Z. 15(3): 285-292.

TSUMUKI, H. and K. KANEHISA, 1980b. Enzyme activities associated with glycogen metabolism in diapausing and developing larvae of the rice stem borer *Chilo suppressalis* (Walker). Jpn. J. Appl. Entomol. Z. 18: 31-41.

ZACHARIASSEN, K. E. 1985. Physiology of cold tolerance in insects. Physiol. Rev. 65: 799– 832.

Address of the authors: Dr. M. ATAPOUR and Dr. S. MOHARRAMIPOUR, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. P. O. Box: 14115-336, Tehran, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir