Archive of SID

DOI: 10.22092/vj.2018.121654.1456
شماره ۱۲۳ تابستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مقایسه سه روش تجویز سم عقرب (تزریقی، اسپری و خوراکی) در برابر آفت ساقه‌خوار نیشکر *(Sesamia nonagrioides (Lef.))*

• **فاطمه ثعلبی (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
• **هدیه جعفری**
استادیار گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
• **محمود نظری**
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی- دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
• **حسین موذن رضا محله**
موسسه تحقیقات و آموزش نیشکر و صنایع جانبی خوزستان، اهواز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۲-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۸-۱۶
Email: fat_sa_2012@yahoo.com

چکیده

کرم ساقه‌خوار نیشکر (*S. nonagrioides* (Lef.)) در خوزستان یکی از مهم‌ترین آفات نیشکر محسوب می‌شود. در این مطالعه اثر سمیت زهر عقرب *Hottentotta saulcyi* در برابر آفت ساقه‌خوار نیشکر (*S. nonagrioides* (Lef.)) به سه روش تزریقی، اسپری و خوراکی بررسی شد. برای این منظور، سم عقرب جمع‌آوری شد و پس از اندازه‌گیری میزان پروتئین آن، دوزهای مختلف زهر تهیه گردید. دوزهای مختلف زهر (۰/۱۵، ۰/۳۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و ۱ میکروگرم) به ۵ گروه آزمایشی با ۱۵ لارو در هر گروه تزریق گردید و درصد مرگ و میر در طول آزمایش بصورت روزانه ثبت شد. در نهایت LD50, LD100 و واحد سمیت (TU) با استفاده از روش تحلیل آماری پروبیت (Probit Analysis) محاسبه گردید. بر اساس نتایج حاصل از تزریق، *S.nonagrioides* تحت تاثیر زهر عقرب قرار گرفت. مقادیر LD100، LD50 و واحد سمیت (TU) برای لاروهای ساقه‌خوار نیشکر پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق زهر به ترتیب ۰/۹۶، ۲/۲۳ میکروگرم بر میلی‌گرم و ۱۰۴/۱۷ به دست آمد. تزریق سم بلافاصله باعث فلج حرکتی و به دنبال آن مرگ تمام لاروهای تیمار شده با دوز بالای سم (۰/۷۵ و ۱ میکروگرم) پس از ۴۸ ساعت شد. در حالی که نتایج اثر تجویز پوستی و خوراکی غلظت‌های مختلف سم عقرب بر میزان مرگ و میر لاروها معنی‌دار نبود. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشانگر کشندگی زهر عقرب در روش تزریقی بوده در حالی که لاروها نسبت به تجویز اسپری و خوراکی زهر عقرب مقاومت نشان دادند.

کلمات کلیدی: ساقه‌خوار نیشکر، کنترل بیولوژیکی، *Sesamia nonagrioides*، سم عقرب

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 123 pp: 66-74

Comparison Of Three Administration Methods (Orally, Microinjection And Spraying Through Skin Contact) Of Scorpion Venom Against Stem Borer (*Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae))

By: Salabi, F., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Venomous Animals and antivenom production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Khuzestan, Iran. Jafari, H., Assistant Professor, Department of Venomous Animals and antivenom production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Khuzestan, Iran. Nazari, M., Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran. and Moazen Reza Mahaleh, H., Research and Development Institute of Khuzestan Sugarcane Industry, Ahvaz, Iran.

Received: 2018-05-12 **Accepted: 2018-11-07**

Email: fat_sa_2012@yahoo.com

Polyphagous *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) is an important pest of sugarcane in Khuzestan province. This study aimed to evaluate the toxicity effects of *Hottentotta Saulcyi* scorpion venom on *S. nonagrioides* using three methods; orally, microinjection and spraying through skin contact. After the venom collection and measuring the protein content of the venom, different venom doses were prepared. larvae were injected with five doses of venom (0.15µg, 0.35µg, 0.5µg, 0.75µg and 1µg; fifteen larvae per each dose) and the mortality percentage were recorded during the experiment. Finally, lethal doses (LD50 and LD100) and toxicity unit (TU) were calculated using Probit analysis. According to the results, *S. nonagrioides* was affected by the toxicity of scorpion venom. LD50, LD100 and TU values for stem borer larvae at 24h was obtained 0.96, 2.23 µg/mg and 104.17 respectively. This study demonstrated that injection of *H. Saulcyi* venom immediately causes locomotive paralysis and then death in all larvae injected by high doses of scorpion venom (1µg and 0.75µg) after 48h. The effect of orally and spraying through skin contact administration of different doses of scorpion venom in stem borer mortality were not statically significant. The results of this study indicated that the scorpion venom was effective in the injection method while larvae showed resistance to spraying and oral administration of the venom.

Key words: Stem borer, Biological pest management, *Sesamia nonagrioides*, Scorpion venom

مقدمه

نیشکر گیاهی چندساله است که از لحاظ دامنه میزبانی چندخوار بوده و از گیاهان زراعی بسیار مهم ایران و بخصوص استان خوزستان بشمار می‌رود (۱۰، ۲۳). این گیاه همانند سایر محصولات کشاورزی دیگر مورد هجوم آفات کشاورزی قرار می‌گیرد که شایع‌ترین این آفات، کرم‌های ساقه‌خوار می‌باشد. در کشت و صنعت نیشکر دعبل خزایی خوزستان یکی از گونه‌های ساقه‌خوار به‌نام ساقه‌خوار نیشکر سزامیا*Sesamia* (*nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae)) از مهمترین آفات نیشکر محسوب می‌شود که خسارت اقتصادی قابل توجهی را علاوه‌بر نیشکر به محصولات دیگر وارد می‌سازد (۱، ۱۱، ۲۳). در حال حاضر استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی بزرگترین استراتژی مدیریتی جهت کنترل آفات کشاورزی به‌ویژه کرم ساقه‌خوار، به‌حساب می‌آید. با این وجود، باتوجه به سابقه طولانی استفاده از این آفت‌کش‌های شیمیایی مخاطرات زیست محیطی بسیار زیادی از جمله اختلال در سلامت محیط زیست، ظهور مقاومت و افزایش مقاومت آفات به سموم شیمیایی مصرفی و همچنین کاهش و نابودی جمعیت دشمنان طبیعی در زنجیره غذایی و اکوسیستم زراعی میزبان را به دنبال داشته است که دلیل آن را می‌توان عملکرد غیر اختصاصی آفت‌کش‌ها دانست. علاوه بر آن برجاماندن بقایای سموم کشاورزی بر محصولات سبب بروز آثار زیان باری بر سلامت افراد جامعه می‌شود. از این‌رو امروزه کنترل بیولوژیک آفات و همچنین دستکاری‌های ژنتیکی گیاهان جهت مقام‌سازی آن‌ها در برابر آفات، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (۱، ۲۷).

اخیرا بخاطر خواص بیولوژیکی و پروتئینی و همچنین وجود منبع بالقوه مواد زیست فعال و حشره‌کش‌ها که بیشتر آن‌ها پلی‌پپتیدهایی با اثرات سمی بر بافت عصبی هستند و خاصیت نوروتوکسینی دارند، سم عقرب به‌عنوان یک عامل کنترل کننده در مدیریت بیولوژیکی آفات مورد توجه قرا گرفته است. از مزایای کلیدی زهر عقرب که باعث فلجی یا کشته شدن طعمه می‌گردد، وجود ترکیبات مختلفی از قبیل پلی‌پپتیدهای

www.SID.ir

Archive of SID

توکسینی و غیرتوکسینی، نوکلئوتیدها، لیپیدها، پروتئین‌های مخاطی، آمین‌های بیوژنیک و مواد ناشناخته دیگر است (۲، ۶، ۱۳). سم عقرب، منابع غنی از ترکیبات با وزن مولکولی کم است که به طور کلی عصبی هستند. برخی از این ترکیبات مختص حشرات و بعضی دیگر مختص پستانداران هستند، در حالی که برخی بر هر دو آنها موثر می‌باشند (۱۸). با کشف اولین نوروتوکسین اختصاصی حشرات (۶، ۹)، این زهر به‌عنوان یک جایگزین مناسب جهت توسعه حشره‌کش‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفت و دریچه‌ای به‌سوی استفاده از این سم به‌عنوان آفت‌کش طبیعی گشوده شد. مطالعات متعددی عمدتا در حشرات انجام شده که تاثیر زهر عقرب یا پپتیدهای مشتق شده از آن را بر حشرات ارائه داده‌اند که رفتارهای مختلفی در حشرات گزارش شده است (۵، ۶، ۱۶، ۱۸، ۲۶). داوان و همکاران (۵) اثر یک پپتید مشتق شده از زهر عقرب (BtITx3) را بر کرم ذرت (*Helicoverpa armigera*) بررسی کردند. در پژوهش دیگری استفاده از زهر عقرب در مدیریت بیولوژیکی گونه‌های مختلف حشرات مورد بررسی قرار گرفته است (۱۸). در مطالعه‌ای وان دی واک و همکاران (۲۶) به مقایسه اثر سم خام عقرب با بخش محلول سم در کرم خاکی پرداختند.

در این مطالعه از عقرب *Hottentotta saulcyi* استفاده شد که از خانواده بوتیده می‌باشد و دوز کشنده (LD50) تزریقی آن برای موش mg/kg ۱/۰۱ گزارش شده است (۱۱). با وجود تحقیقات گسترده موجود، تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر سمیت زهر عقرب بر آفت ساقه‌خوار نیشکر *S. nonagrioides* گزارش نشده است. از این رو در این مطالعه، اثر سم عقرب بر میزان مرگ و میر و علائم بالینی ناشی از مسمومیت در لارو ساقه‌خوار نیشکر بررسی شد و لاروهای ساقه‌خوار به سه شکل، خوراکی، تزریقی و اسپری بر پوست تحت تاثیر سم قرار گرفتند و سپس میزان سمیت زهر عقرب در این سه روش مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفت.

روش بررسی

بررسی فعالیت سمیت‌زایی زهر عقرب در مقابل آفت ساقه‌خوار نیشکر (*Sesamia nonagrioides* (Lef.)) به سه روش (تزریقی، خوراکی و اسپری پوستی) بطور همزمان انجام شد. برای انجام آزمایش‌ها ابتدا تعداد زیادی از حشرات در آزمایشگاه پرورش داده شدند و برای هر تیمار پانزده تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش دو بار تکرار شد.

پرورش حشرات

نمونه‌های لارو آفت ساقه‌خوار *S. nonagrioides* در استان خوزستان، شهرستان اهواز و از مزارع کشت و صنعت نیشکر دعبل خزایی واقع در ۴۰ کیلومتری جنوب اهواز جمع‌آوری گردیدند. سپس لاروها روی ساقه‌های نرم و تازه نیشکر در ظروف پلاستیکی شفاف استوانه‌ای در دمای ۲۹ درجه و رطوبت ۶۰ تا ۷۰ درصد با نور طبیعی پرورش داده شدند. سر ظروف با توری نازک و با منافذ ریز پوشش داده شد که لاروها نتوانند از ظرف خارج شوند و هوا هم جریان داشته باشد. آزمایشات در آزمایشگاه عقرب موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور- اهواز انجام شد. فلجی حرکتی ناشی از مسمومیت و همچنین میزان مرگ و میر لاروها به‌طور روزانه ثبت شد و لاروهای مرده از بقیه جداسازی گردید. هر دو روز یکبار ساقه‌های تازه در اختیار لاروها گذاشته شد.

تهیه و آماده سازی زهر

عقرب‌های *Hottentotta saulcyi* از شهرهای باغملک و رامهرمز استان خوزستان در فصل پاییز جمع‌آوری گردیدند و بصورت زنده به آزمایشگاه بندپایان موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اهواز منتقل شدند. در آزمایشگاه، زهر عقرب‌ها به روش شوک الکتریکی آماده گردید و در دستگاه خشک کن، لیوفیلیزه گردیده و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در پژوهش‌های انجام شده میزان LD50 زهر عقرب *Tityus serrulatus* بر نوعی لارو نیشکر، ۱/۰۵۷ میکروگرم بر میلی‌گرم گزارش شده است (۱۸ و ۲۶) بر همین اساس محدوده کشندگی زهر عقرب *H. Saulcyi* (Range Finding Test) بر لارو ساقه‌خوار نیشکر بین ۰/۱۵ تا ۱ میکروگرم در نظر گرفته شد. بنابراین جهت تست سمیت، ابتدا محلول استوک از زهر عقرب با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. به این صورت که، یك میلی‌گرم از زهر خام لیوفیلیزه در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و محلول حاصل تا هموژنیزه شدن کامل ورتکس شد. سپس جهت حذف موکوس و مواد اضافی، به مدت ۲۰ دقیقه در دور g ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و محلول رویی که حاوی پپتیدها و پروتئین‌های زهر می‌باشد از قسمت نامحلول که حاوی موکوپروتئین‌ها به‌صورت رسوب می‌باشد جدا گردید. مایع شفاف به‌دست آمده جهت آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان پروتئین سم عقرب *H. Saulcyi*

میزان پروتئین زهر عقرب براساس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از روش لوری اندازه‌گیری شد (۱۷).

آزمایش تعیین سمیت زهر عقرب به روش تزریقی

به‌منظور بررسی میزان سمیت زهر عقرب بر لارو ساقه‌خوار نیشکر به روش تزریقی، پنج دوز مختلف (۰/۱۵، ۰/۳۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و ۱ میکروگرم در میکرولیتر) از سم اولیه تهیه گردید. رقیق‌سازی استوک اولیه سم برای همه دوزها بجز ۱ میکروگرم با فسفات بافر سالین صورت گرفت. در نهایت یک میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده، در قسمت خلفی بدن لاروها بصورت داخل جلدی تزریق شد. به منظور بررسی اثر فسفات بافر سالین و اطمینان از عدم تداخل اثر آن با اثر زهر عقرب بر حشرات، گروه شاهد در نظر گرفته شد و به لاروهای این گروه یک میکرولیتر فسفات بافر سالین تزریق گردید. پس از تزریق، لاروها درون ظروف نگهداری حاوی ساقه‌های نیشکر تازه، پرورش داده شدند. به این منظور ۶ گروه آزمایشی (پنج گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف زهر و گروه شاهد) با پانزده تکرار مشخص شد.

آزمایش تعیین سمیت زهر عقرب به روش خوراکی

جهت تعیین سمیت خوراکی زهر عقرب بر لارو ساقه‌خوار نیشکر به میزان یک میلی‌لیتر از تمام غلظت‌های مختلف سم (۰/۱۵، ۰/۳۵، ۰/۵۰،

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۷۵ و ۱ میکروگرم در میکرولیتر) تهیه شد. پس از آماده‌سازی رقت‌های مورد آزمایش از سم، غلظت‌های تهیه شده با باگاس نیشکر مخلوط گردیده و سپس در اختیار گروه‌های آزمایشی قرار گرفت. در این آزمایش یک میلی‌لیتر فسفات بافر سالین با باگاس نیشکر مخلوط گردیده و در اختیار لاروهای گروه شاهد قرار گرفت. بنابراین این آزمایش نیز نظیر آزمایش بالا شامل ۶ گروه آزمایشی (پنج گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف زهر و گروه شاهد) با پانزده تکرار بود.

آزمایش تعیین سمیت زهر عقرب به روش اسپری (تماسی)

برای تشخیص سمیت زهر عقرب از راه تماس پوستی بر لارو ساقه‌خوار نیشکر، ابتدا پنج غلظت مختلف از سم اولیه، مشابه فوق تهیه شد. از هر غلظت سم به‌میزان یک میلی‌لیتر تهیه شد و درون پتری دیش کوچک ریخته شد سپس لاروهای هر گروه آزمایشی درون سم مورد نظر به خوبی غلطانده شده و در تماس مستقیم پوستی با آن دوز سم قرار داده شدند. لاروهای گروه شاهد نیز در یک میلی‌لیتر فسفات بافر سالین که مشابه بالا درون پتری دیش کوچک ریخته شده به خوبی غلطانده شدند. در نهایت لاروها به ظروف نگهداری حاوی ساقه‌های نیشکر منتقل شدند.

علائم مسمومیت در لاروهای تیمار شده با زهر عقرب از دقایق اولیه تا ۷۲ ساعت پس از تجویز سم در هر سه آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

روش آنالیز نتایج

فلجی حرکتی در هر گروه آزمایشی و میزان مرگ و میر در تیمارها در فاصله زمانی۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در هر سه آزمایش ثبت گردید. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین درصد مرگ و میر لاروها در گروه‌های مختلف مورد آزمایش به وسیله تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) صورت گرفت.

در نهایت LD50، LD100 و واحد سمیت (Toxicity Unit:TU) با استفاده از روش تحلیل آماری پروبیت (Analysis Probit) با سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین شد. میزان (TU) از معادله ۱ محاسبه شد (۳). آنالیز پروبیت با نرم‌افزار SPSS جهت تعیین LD50 و حدود بالا و پایین آن انجام شد.

$$TU= ٪۱۰۰/ LD50$$

رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

میزان پروتئین سم عقرب *H. Saulcyi*، ۸/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. بروز علائم مسمومیت در تیمارهای تزریق شده، بلافاصله پس از تزریق سم آغاز گردید. این علائم شامل: سقوط از ساقه به بیرون، بیقراری در حرکت، فلجی کامل و سیاه شدن دست و پا و سپس قسمت‌های دیگر بدن بودند. در این تیمارها، بلافاصله پس از تزریق سم عقرب، لاروها فلج گردیده (اولین نشانه مسمومیت لاروها با زهر عقرب) و تشخیص زنده بودن آن‌ها تنها از طریق بررسی گردش خون در زیر استریو میکروسکوپ (لوپ) امکان‌پذیر بود چرا که این حشرات قدرت تحرک خود را به‌طور کامل از دست داده بودند و دچار فلج حرکتی کامل گردیده بودند و از نظر ظاهری مرده تلقی می‌شدند و تنها راه تشخیص زنده بودن آن‌ها بررسی جریان خون آن‌ها بود. یکی از عادات رفتاری لاروهای ساقه‌خوار نیشکر اینست که از همان مرحله آغاز زندگی کانالی درون ساقه گیاه میزبان حفر کرده و تمام مراحل زندگی لاروی خود را درون این کانال سپری می‌کنند اما پس از تزریق سم به‌دلیل فلجی تحرکی این لاروها توان نگه‌داشتن خود را درون ساقه نداشته و به خارج از ساقه پرتاب می‌شدند که این دومین علامت ظاهری مسمومیت حشرات بود این در صورتی است که مرگ و میر در تیمارها کمی دیرتر صورت گرفت. سومین نشانه مسمومیت لاروها سیاه شدن قسمتی از بدن آن‌ها بود که نشانه قریب الوقوع بودن مرگ آن‌ها نیز بود.

نتایج اثر تزریق دوزهای مختلف سم عقرب بر میزان مرگ و میر لارو ساقه‌خوار نیشکر از دقایق اولیه تا ۷۲ ساعت پس از تزریق در جدول ۱ و درصد مرگ و میر لاروها در گروه‌های آزمایشی مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. همچنین در شکل ۱، مقایسه میانگین درصد مرگ و میر لاروهای ساقه‌خوار نیشکر در برابر رقت‌های مختلف زهر عقرب از ۱۲ تا ۷۲ ساعت پس از تزریق سم ارائه شده است.

درصد مرگ و میر لاروها در گروه‌های آزمایشی مختلف متفاوت بود و

جدول ۱- تعداد لاروهای تلف شده از گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف سم در زمان‌های مختلف آزمایش در تست سمیت (تعداد لاروها ۱۵ عدد).

زمان پس از تزریق	غلظت‌های سم مورد استفاده بر حسب میکروگرم					
	شاهد	۰/۱۵	۰/۳۵	۰/۵۰	۰/۷۵	۱
۱۲ ساعت	۰	۰	۰	۰	۲	۳
۲۴ ساعت	۰	۲	۲	۳	۳	۵
۴۸ ساعت	۰	۴	۶	۶	۱۰	۷
۷۲ ساعت	۲	۰	۰	۳	۰	۰

www.SID.ir

Archive of SID

بسته به دوز سم تزریقی بین یک تا ۴۸ ساعت دیرتر از زمان بروز علائم مسمومیت حشرات رخ داد (جدول ۱). در این مطالعه در گروه شاهد تا ۴۸ ساعت تقریبا هیچ مرگ و میری مشاهده نشد در حالی که در اثر تزریق دوزهای ۱ و ۰/۷۵ میکروگرم، تلفات ۱۰۰ درصد مشاهده گردید. بر اساس نتایج بدست آمد، تزریق سم عقرب به لاروها باعث افزایش میزان مرگ و میر در لاروهای نیشکر گردید. بیشترین میزان مرگ و میر لاروها در تمام طول مدت آزمایش متعلق به تیمارهای تزریق شده با دوز بالا (۱ و ۰/۷۵ میکروگرم) می‌باشد (شکل ۱).

همچنین نتایج نشان می‌دهد که کمترین میزان مرگ و میر لاروها در ۷۲ ساعت آزمایش متعلق به تیمار تزریق شده با ۰/۱۵ میکروگرم سم است (جدول ۲ و شکل ۱). نتایج ارائه شده در جدول ۲، نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌داری در درصد کل میزان مرگ و میر بین گروه‌های تزریق شده با سم و گروه شاهد می‌باشد ($p<0/05$) در حالی که این اختلاف بین دو گروه تزریق شده با ۰/۱۵ و ۰/۳۵ میکروگرم سم، معنی‌دار نمی‌باشد. تزریق دوزهای ۱ و ۰/۷۵ میکروگرم زهر عقرب بلافاصله باعث فلج لوکوموتیو گردید و سپس منجر به مرگ تمام لاروهای گروه تیمار در عرض ۴۸ ساعت پس از تزریق سم شد (جدول ۱). این در حالی است که درصد مرگ و میر در سایر گروه‌ها به نسبت کاهش دوز تزریقی کمتر بود. مرگ و میر لاروها در تمام گروه‌های مورد آزمایش (به استثنای گروه تیمار شده با ۰/۵۰ میکروگرم زهر عقرب) تا ۴۸ ساعت پس از تجویز سم پایان یافت (جدول ۱) و پس از آن علائم مسمومیت در لاروهای زنده مانده (از گروه‌های آزمایشی تیمار شده با دوز پایین‌تر زهر) از بین رفته و لاروها به روند عادی زندگی خود برگشتند. بر اساس نتایج به‌دست آمده تنها ۳۵/۴۱ و ۲۹/۱۶ درصد از لاروهای تزریق شده با دوز ۰/۳۵ و ۰/۱۵ میکروگرم سم به ترتیب از بین رفتند (جدول ۱) و بر اساس مشاهدات بقیه لاروهای این گروه‌ها بهبود یافته و فلجی موقت حرکتی در آن‌ها از بین رفته و دوباره به درون کانال خود در داخل ساقه بازگشته و به تغذیه و ادامه حیات پرداختند.

نتایج دوز کشنده (LD50) سم عقرب *H. saulcyi* و حدود اطمینان تعیین شده در هر یک از گروه‌های آزمایشی و همچنین واحد سمیت (TU) زهر عقرب بر اساس مدل پروبیت به تفکیک در ساعات ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در جدول شماره ۳ آمده است. در تحقیق حاضر مقدار LD50 لارو ساقه‌خوار در مواجهه با سم عقرب پس از گذشت مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۳۵ میکروگرم بر میلی‌گرم سم محاسبه شد و نشان داده شده که با افزایش زمان مواجه با زهر عقرب، میزان LD50 کاهش یافته است در حالی که واحد سمیت از ۱۰۴/۱۷ به ۲۸۵/۷۱ افزایش یافت که نشانگر افزایش میزان سمیت می‌باشد. با توجه به داده‌های بدست آمده، لاروهای ساقه‌خوار متاثر از سمیت زهر عقرب بوده و مطابق نتایج جدول ۲ بین غلظت زهر عقرب و میزان مرگ و میر لاروهای نیشکر ارتباط مستقیمی وجود دارد.

مقایسه مقادیر LD50 و LD100 در ساعات مختلف پس از وارد کردن داده‌ها به نرم‌افزار (SPSS) در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی نتایج در شکل ۲، پایین رفتن میزان شاخص LD50 و LD100 را با افزایش زمان نشان می‌دهد.

نتایج اثر سمیت پوستی و خوراکی غلظت‌های مختلف سم عقرب بر میزان مرگ و میر لاروها معنی‌دار نبود و در اینجا ذکر نشده است. بر اساس این نتایج در طول مدت ۱۲ تا ۷۲ ساعت از تجویز سم بصورت خوراکی یا اسپری بر روی پوست، میزان مرگ و میر در تیمارها در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود و در معرض قرار دادن سم بر سطح پوست لاروها و همچنین تجویز خوراکی آن هیچ‌گونه اثر معنی‌داری بر میزان مرگ و میر لاروها نداشت. علاوه‌بر آن وقتی سم بصورت خوراکی یا اسپری بر پوست تجویز شد، در تمام دوره آزمایش هیچ گونه علائم مسمومیتی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که تنها راه اعمال اثر حشره‌کشی سم عقرب بر لارو ساقه‌خوار نیشکر از طریق تزریق آن به لارو می‌باشد و لاروها

جدول ۲- مقایسه میانگین (±خطای معیار) درصد مرگ و میر لاروها در گروه‌های آزمایشی در زمان‌های مختلف پس از تزریق پنج دوز سم *H. saulcyi*.

زمان پس از تزریق	غلظت‌های سم مورد استفاده بر حسب میکروگرم					
	شاهد	۰/۱۵	۰/۳۵	۰/۵۰	۰/۷۵	۱
۱۲ ساعت	۰	۰	۰	۰	۱۰/۴۱±۲/۰۹ b	۱۸/۷۵±۲/۰۸ a
۲۴ ساعت	۰	۱۰/۴۱±۲/۰۸ d	۱۲/۵±۲/۴۱ d	۲۲/۹۲±۲/۰۷ c	۳۵/۴۱±۲۱/۰۹ b	۵۰±۳/۴ a
۴۸ ساعت	۲/۰۸±۲/۰۶ d	۲۷/۰۸±۲/۰۷ c	۳۳/۳۳±۳/۴۰ c	۵۸/۳۳±۳/۴۲ b	۱۰۰ a	۱۰۰ a
۷۲ ساعت	۱۲/۵۰±۲/۴۱ d	۲۹/۱۶±۲/۴۰ c	۳۵/۴۱±۲/۰۸ c	۶۴/۵۸±۲/۰۹ b	۱۰۰ a	۱۰۰ a

Significant difference between control and treated group using one-way ANOVA ($p<0.05$). values are means±SE (n=15). Statistical differences are indicated: a>b>c>d>e.

www.SID.ir

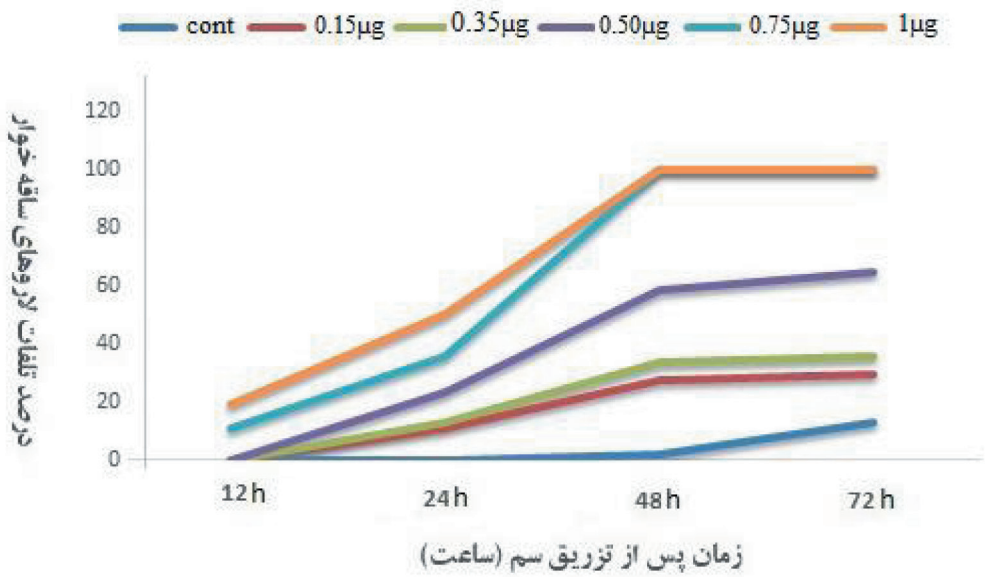
Archive of SID

نسبت به تجویز زهر عقرب بصورت اسپری و خوراکی مقاومت نشان دادند. در این مطالعه نتایج بدست آمده از روش تزریقی بیانگر این است که مناسب‌ترین دوز برای از بین بردن و مبارزه با آفات کشاورزی در ۲۴ ساعت اولیه پس از تجویز سم، ۰/۹۶ میکروگرم است و غلظت‌های بالاتر از آن غیر ضروری و غلظت‌های پایین‌تر آن در این فاصله زمانی ناموثر می‌باشد در حالی که در فاصله زمانی ۷۲ ساعت پس از تجویز سم دوز مناسب ۰/۳۵ میکروگرم می‌باشد. در پژوهش‌های متعددی اثر حشره‌کشی زهر خام عقرب یا برخی از فرکشن‌های جداسازی شده از آن به روش تزریقی بررسی شده است (۶، ۱۵، ۱۸، ۲۴). در مطالعه‌ای محققان استفاده از زهر عقرب در مدیریت بیولوژیکی گونه‌های مختلف حشرات: زنبور عسل (*Apis mellifera*)، ملخ (*Grillus assimilis*) و لارو نیشکر (*Diatraea saccharalis*) و راسته راست بالان Orthoptera (*Acheta domesticus* and *Grillus bimaulatus)* را مورد بررسی قرار داده‌اند (۶، ۱۸، ۲۶). در نتایج این تحقیق گزارش شده است که سم عقرب *Tityus serrulatus* بر گونه‌های Diptera و Orthoptera تنها اثرات فلج کنندگی داشته در صورتی که در زنبور عسل اثر کشندگی داشت. داوان و همکاران (۵) نیز با بررسی اثر یک پپتید مشتق شده از زهر عقرب (BtITx3) بر کرم ذرت (*Helicoverpa armigera*) گزارش

جدول ۳- دوز کشنده (LD50) سم عقرب *H. saulcyi* و حدود اطمینان تعیین شده در هر یک از گروه های لارو در فواصل زمانی مختلف مورد آزمایش.

زمان	LD50 (µg/mg)	حدود اطمینان ۹۵ درصد		TU واحد سمیت
		حد پایین	حد بالا	
۱۲	۱/۲۶	۱/۰۹	۱/۷۳	۷۹/۳۶
۲۴	۰/۹۶	۰/۸۴	۱/۱	۱۰۴/۱۷
۴۸	۰/۳۹	۳۵	۴۵	۲۵۶/۴
۷۲	۰/۳۵	۰/۳۰	۰/۴۰	۲۸۵/۷۱

شکل ۱- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر لاروهای ساقه‌خوار نیشکر از ۱۲ ساعت تا ۷۲ ساعت پس از تزریق سم.



www.SID.ir

Archive of SID

کردند که تزریق فرکشن BtITx3 جداسازی شده از سم عقرب منجر به فلجی و مرگ و میر لاروها در عرض ۲۴ ساعت گردید. لازورویسی و همکاران (۱۶) در آزمایشی اثر فرکشن‌های مختلف زهر عقرب اسکورپیونیده را روی ملخ و مگس بررسی کردند و گزاش کردند که یکی از فرکشن‌های جداسازی شده از سم عقرب منجر به فلجی برگشت پذیر و دیگری سبب فلجی غیرقابل برگشت و مرگ حشرات گردید. این محققان گزارش کردند که برخلاف سم ضدحشره‌ای عقرب‌های خانواده بوتیده که منجر به بروز فلجی فوری حشرات می‌شود، سم عقرب‌های خانواده اسکورپیونیده باعث بروز فلج پیشرونده می‌گردد. اختلافات مشاهده شده در تحقیقات مختلف بستگی به نوع سم، مقدار سم، روش تجویز سم، گونه مورد آزمایش و شرایط آزمایشگاهی دارد (۴، ۱۵، ۱۸، ۲۶). یکی از دلایل اصلی اختلاف در نتایج بدست آمده در پژوهش‌های مختلف، در نوع سم استفاده شده و اجزای سازنده آن می‌باشد. زیرا سمیت زهر عقرب‌ها می‌تواند ناشی از اثرات متقابل اجزای سازنده سم باشد (۱۶).

مطالعه حاضر نشان‌دهنده بروز مقاومت در لاروهای ساقه‌خوار نیشکر نسبت به تجویز زهر عقرب بصورت خوراکی می‌باشد. در راستای نتایج این تحقیق نیز در مطالعه‌ای آمده که تجویز خوراکی سم فاقد پیامدهای مسمومیت جدی می‌باشد (۲۱). دیدگاه کلی غیر فعال‌سازی زهر در دستگاه گوارشی به‌واسطه آنزیم‌های گوارشی یا تجزیه شیمیایی رد شده است. محققان در مطالعه‌ای سم را با آنزیم تریپسین تیمار کرده و گزارش کردند که این آنزیم سبب از بین رفتن آثار مسمویت‌زایی در زهر می‌شود. این امر ممکن است به دلیل تغییر ساختار پروتئین‌ها و پپتیدهای سازنده سم توسط آنزیم‌های گوارشی باشد (۷). تاکنون آزمایشی جهت بررسی اثر سمیت زهر عقرب به دو روش خوراکی و اسپری در حشرات طراحی نشده است ولی مطابق با این آزمایش، مقاومت پرندگان و موش‌ها در برابر تجویز خوراکی سم عقرب بررسی شده و در گزارش آن آمده که تجویز خوراکی سم عقرب هیچ اثر سمیت جدی بر موش و پرندگان نداشته و هیچ مرگ و میر ناشی از مسمومیت نیز گزارش نشده است (۱۲، ۱۴). این محققان دلیل اثر غیرسمی ناشی از مصرف خوراکی زهر عقرب را در موش‌ها، مسمومیت‌زدایی زهر به‌وسیله آنزیم‌های گوارشی یا pH دستگاه گوارش دانسته‌اند و افزوده‌اند که زهر عقرب پس از غیرفعال شدن در دستگاه گوارش جذب خون می‌شود. علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن‌است که برای کنترل آفت کشاورزی لارو ساقه‌خوار نیشکر از روش اسپری سم عقرب بر محصولات کشاورزی نیز نمی‌توان استفاده کرد چرا که این روش بر لاروهای ساقه‌خوار موثر نبود. پاتوفیزیولوژی

شکل ۲- مقایسه نتایج تست‌های LD50 و LD100 در ساعات مختلف پس از تزریق سم.

www.SID.ir

Archive of SID

مسمومیت بسیار پیچیده است و تاکنون به‌درستی شناخته نشده است. گزارش شده رهاسازی نوروترانسمیترها که نشان‌دهنده درگیرشدن سیستم اعصاب مرکزی است، عامل بسیاری از علائم مسمومیت باشد (۱۹). برای اینکه اجزای سم بتوانند سیستم اعصاب مرکزی را تحریک سازند و نوروترانسمیترها آزاد شوند باید نوروتوکسین‌های سم بتوانند به جایگاه گیرنده (Receptor site) خود متصل شوند که لازمه این هم جذب سم است. در برخی تحقیق‌های صورت گرفته کانال‌های یونی بعنوان جایگاه گیرنده اجزای سم معرفی شده‌اند (۸، ۲۲، ۲۵). در کل، در دو حالت تجویز زهر بصورت تزریقی و خوراکی، جذب اجزای سم و حضور آن‌ها در گردش خون میزبان به اثبات رسیده است اما تا کنون آزمایشی برای بررسی میزان جذب سم از طریق پوست انجام نشده است. ممکن است یکی از دلایل ناکارامدی سم در حالت تجویز بصورت اسپری عدم جذب اجزای سازنده آن از طریق پوست باشد. در هر صورت به نظر می‌رسد که قابلیت جذب اجزای سم اولین مسئله است که باید مورد توجه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

1. Bocquené, G., Carbamates and Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. Copenhagen,, Denmark: International Council for the Exploration of the Sea.

2. Boyer, L.V., Theodorou, A.A., Berg, R.A., Mallie, J., Chávez-Méndez, A., García-Ubbelohde, W., Hardiman, S., Alagón, A., 2009. Antivenom for critically ill children with neurotoxicity from scorpion stings. *New England Journal of Medicine*, 360(20), pp.2090-2098.

3. CCME., 1999. Canadian Environmental Quality Guidelines. Canada: Canadian Council of Ministers of the Environment.

4. Chen, C.X., Chen, J.Y., Kou, J.Q., Xu, Y.L., Wang, S.Z., Zhu, Q., Yang, L., Qin, Z.H., 2015. Suppression of inflammation and arthritis by orally administrated cardiotoxin from *Naja naja atra.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015.

5. Dhawan, R., Joseph, S., Sethi, A. and Lala, A.K., 2002. Purification and characterization of a short insect toxin from the venom of the scorpion *Buthus tamulus. FEBS letters*, 528(1-3), pp.261-266.

6. Eitan, M., Fowler, E., Herrmann, R., Duval, A., Pelhate, M., Zlotkin, E., 1990. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: Purification, primary structure, and mode of action. *Biochemistry*, 29(25), 5941-5947.

7. Giorgi, R., Bernardi, M., Cury, Y., 1993. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*; 31(10):1257-65.

8. Gordon, D., 1997. "A new approach to insect-pest control—combination of neurotoxins interacting with voltage sensitive sodium channels to increase selectivity and specificity," *Invertebrate Neuroscience,* vol. 3, no. 2-3, pp. 103–116.

9. Gurevitz, M., Zilberberg, N., Froy, O., Urbach, D., Zlotkin, E., Hammock, B.D., Hermann, H., Moskowitz, H., Chejanovsky, N., 1997. Utilization of scorpion insecticidal neurotoxins and baculoviruses for the design of novel selective biopesticides. In Modern agriculture and the environment (pp. 81-96): Springer.

10. Halabian, A.H., Cheraghi, S., Cheraghi, S., Pourreza, J., 2013. Performance evaluation of biological control of sugarcane stem borers wasp (*Telenomus busseolae*). *World Applied Sciences Journal,* 21(12), 1770-1775.

11. Hassan, F., 1984. Production of scorpion antivenom. In: Tu AT. (ed.). Handbook of Natural Toxins. Vol. 2, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 577–605.

12. Hosseini, Z., Khosravi, M., Ghorbanpoor, M., Mayahi, M., 2017. Oral Absorption of *Mesobuthus eupeus* Scorpion Venom in Mice. *Iranian Journal of Toxicology Volume,* 11(2).

13. Karataş, A., Karataş, A., 2003. *Mesobuthus eupeus* (Cl Koch, 1839)(scorpiones: Buthidae) in turkey. Euscorpius, 2003(7), 1-6.

14. Khosravi M, Mayahi M, Jalali SM, Hosseini Z, Taghavi-Moghadam A, Hadinasab H., 2015. The resistance of mice and poultry to oral administration of scorpion venom. National congress of veterinary medicine in the service of community health and animal hygiene.

15. Khosravi, M., Mayahi, M., Jalali, S., Rezaie, A., Moghadam, A., Hosseini, Z., Barzegar, S.K., Azadmanesh, S., 2017. Effects of experimental mesobuthus eupeus scorpion envenomation on chicken. *Archives of Razi Institute*, 72(1), 23-31.

16. Lazarovici, P., Yanai, P., Pelhate, M. and Zlotkin, E., 1982. Insect toxic component from the venom of a chactoid scorpion, Scorpio maurus palmatus (Scorpionidae). *Journal of Biological Chemistry*, 257(14), pp.8397-8404.

17. Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological Chemistry* 193(1): 265-275.

18. Manzoli-Palma, M., Gobbi, N., Palma, M., 2003. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 9(2), 174-185.

19. Mebs, D., 2002. "Scorpions and snakes, such as cobras, mambas and vipers made the African continent famous for venomous animals," *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, vol. 95, no. 3, p. 131.

20. Mebs, D., 2002. Scorpions and snakes, such as cobras, mambas and vipers made the African continent famous for venomous animals. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* (1990), 95(3),

www.SID.ir

Archive of SID

p.131.
21. Mikaelian A., 2012. Polarized scorpion venom solution and a method for making polarized scorpion venom solution. Google Patents.
22. Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., Sabatier, J. M., 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochemical Journal*, 378(3), 717-726.
23. Ortego, F., Ruíz, M., Castanera, P., 1998. Effect of dimboa on growth and digestive physiology of *Sesamia nonagrioides* (lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of insect physiology*, 44(2), 95-101.
24. Padilla, A., T. Govezensky, L. D. Possani, C. Larralde., 2003. Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon* 41, 959-965.
25. Petricevich, V.L., 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. Mediators of inflammation.
26. Van der Valk, T. and van der Meijden, A., 2014. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. *Toxicon*, 88, pp.38-43.
27. Zacharia, J.T., 2011. Ecological Effects of Pesticides, Pesticides in the Modern World-Risks and Benefits, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-458-0, InTech.

www.SID.ir