

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف بوراکس بر میزان پراکسیداسیون لیپید و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی *Microcerotermes diversus* (Isoptera: Termitidae) آنزیمی در موریانه

مینا درمیانی^۱، بهزاد حبیب‌پور^{۲*} و پیمان حسیبی^۲

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۵)

چکیده

موریانه *Microcerotermes diversus* Silvesteri یکی از مهم‌ترین آفات محصولات چوبی و سلولزی در مناطق مختلف کشور از جمله استان خوزستان به شمار می‌آید. از سموم سازگار با محیط‌زیست که از طریق اختلال در فیزیولوژی و متابولیسم (سوخت‌وساز) حشرات تأثیر گذارند می‌توان به بورات‌ها از جمله بوراکس اشاره کرد. هدف از این بررسی تعیین نشانگرهای زیستی با استفاده از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پاداکسندگی) و میزان پراکسیداسیون لیپید (چربی) در ایجاد تنش اکسیداتیو (اکسایشی) تحت تأثیر حشره‌کش است. بدین منظور تأثیر چهار غلظت ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ درصد بوراکس بر شاخص‌های مهم تنش اکسیداتیو از جمله مالون دی‌آلدهاید (MDA) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) در طبقه کارگر بررسی شد. همه آزمایش‌ها در چهار تکرار انجام شد. نتایج حاصل نشان داد، با افزایش غلظت حشره‌کش، میزان غلظت MDA در همولف نسبت به شاهد به صورت معناداری افزایش و فعالیت دو آنزیم GR و APX با افزایش غلظت کاهش می‌یابد، بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم SOD به ترتیب در تیمارهای ۲ و ۳ درصد، آنزیم CAT در تیمارهای ۳ و ۴ درصد و آنزیم POX در تیمارهای ۴ و ۳ درصد مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد، تیمار موریانه‌ها با غلظت‌های مختلف مورد نظر از بوراکس بر شاخص تنش مالون دی‌آلدهاید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT، POX، GR، APX، SOD) تأثیر گذار است و می‌توان از آن‌ها به عنوان یک نشانگر زیستی برای تعیین تأثیر حشره‌کش در بدن موریانه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بورات، تنش اکسیداتیو، مالون دی‌آلدهاید، نشانگر زیستی.

The effects of different concentrations of borax on lipid peroxidation and antioxidant enzyme system activities of *Microcerotermes diversus* (Isoptera: Termitidae)

Mina Darmiani¹, Behzad Habibpour^{2*} and Payman Hassibi²

1, 2. M.Sc. Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
(Received: Sep. 28, 2017 - Accepted: Mar. 6, 2018)

ABSTRACT

Microcerotermes diversus is an important pest of wooden and cellulosic products in diverse landscapes across Iran, including Khuzestan province. Borate toxicants (including borax) as environmentally sound pesticides affect insects by disrupting their physiology and metabolism. In this study, we measured activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation as biomarkers to determine the level of added oxidative stress in *M. diversus* caused by exposure to borax different concentrations. Then we measured the effects of four concentrations of borax, 1.5, 2, 3 and 4%, on oxidative stress biomarkers such as malondialdehyde (MDA) as a product of lipid peroxidation, and activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), ascorbat peroxidase (APX) and peroxidase (POX) on worker caste of termites. Each of trials was carried out in four replicates. Results showed that with increasing of borax concentration, the concentration of MDA significantly increased and GR and APX significantly decreased. The highest and lowest SOD activity compared with the control treatment occurred with the 2% and 3% borax treatments, respectively. The highest and lowest amount of CAT activity occurred in the 3% and 4%, and POX activity 4% and 3% borax treatments, respectively. Results showed that of the treatments termites' with different concentrations of borax affected the stress biomarker including malondialdehyde, POX, CAT, GR, APX and SOD antioxidant enzyme levels. Therefore, antioxidant enzymes and MDA can be used as biomarkers to determine the effects of insecticides in the termite body.

Keywords: Biomarker, borates, oxidative stress, malondialdehyde.

* Corresponding author E-mail: habibpour_b@scu.ac.ir

مقدمه

موریانه‌ها از مهم‌ترین آفات محصولات سلولزی زنده و غیرزنده موجود در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری کشور از جمله استان خوزستان به شمار می‌آیند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد، مهم‌ترین موریانه در استان خوزستان گونه *Microcerotermes diversus* Silvesteri (Isoptera: Termitidae) است که به‌عنوان حریص‌ترین و مخرب‌ترین موریانه شناخته شده و توانایی ایجاد اجتماعات ثانویه در دیوارها و سقف ساختمان‌ها و نیز بر درختان را دارد (Habibpour, 2006). بورات‌ها از جمله بوراکس، اسید بوریک و نمک‌های بور ترکیباتی بی‌بو، غیرفرار، کند اثر با خاصیت عدم دورکنندگی داشته که در غلظت‌های کم تبدیل مواد سلولزی به مشتقات قندی را متوقف کرده، موریانه‌ها گرسنه مانده و تلف می‌شوند (Grace, 1997). بورات‌ها از آفت‌کش‌های سازگار با محیط‌زیست به‌شمار می‌آیند که منجر به اختلال در عملکرد فیزیولوژیک بدن حشرات شده و برای کنترل (مه‌ار) حشرات از جمله موریانه‌ها استفاده می‌شوند (Maistrello et al., 2001; Usta et al., 2009). آفت‌کش‌ها، تأثیر بیولوژیکی (زیستی) خود را بر سلول (یاخته) حشرات از طریق تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر (Reactive Oxygen Species (ROS)) نظیر رادیکال‌های OH^\cdot ، O_2^\cdot ، H_2O_2 اعمال و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو یا اکسایشی (Oxidative Stress) در سلول می‌شوند (Hermes-Lima & Zenton-Savina, 2002; Kalow & Grant, 1995). مجموعه‌ای از مکانیسم (سازوکار)‌های دفاعی از جمله دفاع آنتی‌اکسیدانی (پاداکسندگی) در ساختار بدن موجودات وجود دارد که آن‌ها را از آسیب‌های سلولی ROS ناشی از استعمال آفت‌کش‌ها حفاظت می‌نماید. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز (Catalase)، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase)، پراکسیداز (Peroxidase)، گلووتاتیون‌ردوکتاز (Gluthatione Reductase)، آسکوربات پراکسیداز (Ascorbat Peroxidase) و گلووتاتیون اس-ترانسفراز (Gluthatione S-Transferase) از طریق مقابله با عمل سوء ROS قادر به مهار آن‌ها بوده (Ahmad, 1992; Prapanthadara et al., 1993) و از آسیب سلولی و مولکولی جلوگیری به

عمل می‌آورند (Livingston, 2001). مالون‌دی‌آلدهاید (Malondialdehyd) یک شاخص زیستی مهم در تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید است که می‌تواند با اسید نوکلئیک، پروتئین، آنزیم‌ها و دیگر مولکول‌های زیستی واکنش داده و منجر به آسیب اکسیداتیو در سلول شود (Janero, 1990). Hyrsl et al. (2007) با بررسی تأثیر سمیت اسید بوریک بر ایجاد تنش اکسیداتیو و تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در همولنف و اجسام چربی مراحل لاروی و شفیرگی شب‌پره *Galleria mellonella* نشان دادند که این حشره‌کش منجر به افزایش میزان MDA در همولنف و اجسام چربی لارو و نیز اجسام چربی در شفیره شده، اما میزان آن در همولنف شفیره کاهش یافت، همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT، GPX و آنزیم GST در همولنف و اجسام چربی لارو و شفیره تغییر یافت. همچنین Buyukguzel et al. (2013) با بررسی تأثیر اسید بوریک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید در لارو پروانه *G. mellonella* نشان دادند، این حشره‌کش موجب افزایش میزان MDA و تغییر در فعالیت آنزیم SOD، CAT، GPX و GST می‌شود. با وجود برتری‌های ترکیبات بر به‌عنوان حشره‌کش عملکرد سمیت ناشی از این آفت‌کش‌ها به خوبی شناخته نشده است (Gentz & Grace, 2006). به همین دلیل نیاز به بررسی بیشتر عملکرد سمیت بوراکس و ترکیبات بور در موریانه‌ها وجود دارد. به دلیل تنوع در ساختار شیمیایی آفت‌کش‌ها و تأثیر متفاوت آن‌ها بر حشرات مختلف، بررسی‌های مقدماتی برای درک تأثیر این آفت‌کش‌ها بر فیزیولوژی و سیستم‌های بیوشیمیایی حشرات ضروری است، بنابراین نیاز به اندازه‌گیری و شناخت بخشی از سیستم‌های دفاعی مانند آنتی‌اکسیدان‌های حشرات برای خنثی کردن تأثیر آفت‌کش‌ها (رادیکال‌های آزاد) و نیز نیاز به اندازه‌گیری میزان تنش وارده بر حشرات تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده آفت‌کش است. از این‌رو بررسی و آگاهی از وضعیت این نشانگرها نه‌تنها برای ارزیابی‌های مقایسه‌ای آفت‌کش‌ها مفید است، بلکه اطلاعاتی را در زمینه فیزیولوژی حشره فراهم می‌آورد و انتظار می‌رود که بتوان در آینده از این اطلاعات، در مدیریت کنترل آفات

(آب مقطر) در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از خشک شدن، کاغذهای صافی آغشته به حشره‌کش با ترازوی چهار رقم اعشار توزین و به هر پتری‌دیش ۲۵۰ عدد موربانه کارگر سن چهارم اضافه شد. برای تعیین میزان تأثیر غلظت‌های مختلف بوراکس بر حشره، وزن موربانه پیش از قرار گرفتن در پتری‌دیش‌ها با استفاده از ترازوی چهار رقم اعشار توزین و واحدهای آزمایشی به انکوباتور تاریک انتقال داده شده و نمونه‌های شاهد تنها با آب مقطر مرطوب شدند. در هر تیمار پس از گذشت مدت‌زمان ده روز، تعداد موربانه‌های غیرفعال و ضعیفی که در فعالیت‌های اجتماعی و انجام وظایف از جمله تغذیه و تیمارگری مشارکت نکردند (Tothe, 2000; Evans, 2009; Aki et al., 2016)، ثبت و به لوله فالكون منتقل و تا پایان آزمایش، برای انجام آزمون بیوشیمیایی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در پایان دوره آزمایش با توزین دوباره هر کاغذ صافی و وزن ثانویه موربانه‌ها، میزان تغذیه و تغییرات وزنی موربانه‌ها با کاغذ تیمار شده با نمونه‌های شاهد مقایسه شد.

شاخص‌های تغذیه‌ای

شاخص‌های تغذیه‌ای در روش‌های آزمایشی برای حشره‌کش با استفاده از روش (Hu et al., 2007) و برای تعیین تغییرات وزنی از رابطه نرخ رشد نسبی حشرات به روش (Waldbauer, 1968) استفاده شد.

$$F_w = \left(\frac{W_2 - W_1}{T} \right)$$

$$F = \left(1 - \frac{W_1}{W_2} \right) \times 100$$

$$S = \left(1 - \frac{W_1 - W_2}{F_S} \right) \times 100$$

$$RGR = (W_2 - W_1) / (T \times W_1)$$

پارامترهای رابطه‌های بالا شامل:

W_1 : وزن اولیه کاغذ صافی برحسب گرم، W_2 : وزن ثانویه کاغذ صافی برحسب گرم، F : درصد تغذیه، P : تعداد موربانه مورد آزمایش، F_w : وزن خشک تغذیه برحسب گرم، T : مدت‌زمان آزمایش، F_s : میانگین تغذیه موربانه از کاغذ صافی برحسب گرم، S : درصد کاهش تغذیه نسبت به شاهد، RGR : نرخ رشد نسبی،

بهربرداری کرد. تأثیر سمیت آفت‌کش بوراکس بر سیستم آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید در این موربانه تاکنون بررسی نشده است و در این بررسی هدف ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف بوراکس بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز پراکسیداسیون لیپید و تعیین نشانگرهای زیستی برای اندازه‌گیری میزان تنش وارد شده در نتیجه کاربرد حشره‌کش به‌منظور پرهیز از انجام آزمون‌های هزینه‌بر و زمان‌بر رایج است.

مواد و روش‌ها

گردآوری حشرات

موربانه‌ها در فرایند نمونه‌برداری از تیمار تا همراه سال ۱۳۹۵ از نخلستان دانشگاه شهید چمران اهواز با استفاده از بلوک‌های چوبی راش در ابعاد ۲×۶×۲۰ سانتی‌متر که به‌عنوان تله در خاک قرار داده شده بود گردآوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از نمونه‌برداری، موربانه‌ها به کمک قلم‌مو جداسازی و درون پتری‌دیش‌های پلاستیکی محتوای کاغذ صافی مرطوب برای تغذیه قرار داده شدند. این ظروف به‌منظور رفع تنش از موربانه‌ها در انکوباتور (اتاقک رشد) تاریک در دمای ۲۸±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰±۵ درصد نگهداری شدند.

آزمون زیست‌سنجی

پس از آزمون‌های مقدماتی و با توجه به نتایج تحقیقات صورت گرفته توسط محققان مختلف (Grace, 1997; Hickey, 2006; Freeman et al., 2009) غلظت‌های ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ درصد (حدود غلظتی بین یک‌هشتم تا یک‌چهارم غلظت‌های کشنده و توصیه‌شده در بازار برای کنترل موربانه‌ها) در این تحقیق استفاده شد. جهت تهیه از بوراکس (گروه بورات‌ها) به‌صورت ماده تکنیکال (ساخت شرکت مرک آلمان) تهیه و به‌صورت محلول با آب مقطر تهیه و استفاده شد. پس از تهیه غلظت‌ها در هرکدام از پتری‌دیش‌های پلاستیکی با قطر ۹ سانتی‌متر، یک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ قرار داده شد و سپس با ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مورد نظر به‌صورت یکنواخت آغشته شدند و به مدت دو ساعت جهت تبخیر حلال

W_1 : وزن اولیه حشرات پیش از تغذیه برحسب میلی‌گرم، W_2 : وزن ثانویه حشرات پس از تغذیه از رژیم غذایی در مدت‌زمان T_1 برحسب میلی‌گرم، T_1 : مدت‌زمان تغذیه حشره از غذا (روز).

آزمون بیوشیمیایی

آماده‌سازی نمونه

حشرات برای عصاره‌گیری در ابتدا با ترازوی دیجیتال چهار رقم اعشار توزین شدند آنگاه برای هموژنیزه شدن به هاون چینی که درون ظرف حاوی یخ قرار گرفته شده بود منتقل و با اضافه کردن بافر فسفات پتاسیم (pH 7/4) همگن شدند. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۵ دقیقه با $5000 \times g$ سانتریفیوژ شده و سپس در فریزر در دمای -20 درجه سلسیوس برای انجام آزمایش‌ها قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پروتئین و مالون‌دی‌آلدهاید به روش طیف‌سنجی نوری (دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV-2100 SPECTEROPHOTOMETRIC در دمای آزمایشگاه 25 ± 5 درجه سلسیوس) اندازه‌گیری شد.

تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC. 1.11.1.6) با استفاده از روش Beers & Sizer (1952) سنجیده شد. فعالیت این آنزیم بر اساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت‌زمان ۱۲۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد ($\epsilon=0.0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC. 1. 15. 1) به روش Beyer & Fridovich (1987) سنجیده شد. سپس تغییرات جذب از طریق اندازه‌گیری توانایی آنزیم در جلوگیری از احیا نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز (GR, EC. 1. 8. 1. 7) با روش Carlberg & Mannervik (1985) اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب بر اساس احیاء گلوکاتایون اکسید شده (GSSG) و با مصرف NADPH در طول موج ۳۴۰ نانومتر در مدت‌زمان ۱۲۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX, EC. 1. 11. 1. 7) با روش Poll *et al.* (1994) اندازه‌گیری شد. تغییرات جذب بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت‌زمان ۱۸۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد ($\epsilon=26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1. 11. 1. 11) بر اساس Nakano & Asada (1981) سنجیده شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار (pH 7)، آب اکسیژنه ۱ درصد، سدیم آسکوربات ۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب بر اساس کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۱۲۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد ($\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). فعالیت ویژه آنزیم‌ها به صورت گزارش شد (U/mg protein).

تعیین غلظت مالون‌دی‌آلدهاید

برای تعیین میزان مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) از روش Stewart & Beweley (1980) استفاده شد. مخلوط واکنش ۱ میلی‌لیتر عصاره استخراج‌شده و ۱ میلی‌لیتر محلول اسیدتیوباربیتوریک بود. مخلوط حاصل در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و پس از آن به‌منظور توقف واکنش، به‌سرعت به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ قرار داده شد. سپس با کمک دستگاه سانتریفیوژ با $4000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۲ طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). برای تعیین غلظت پروتئین محلول در نمونه‌های آنزیمی از روش Lowry *et al.* (1951) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ONE way-ANOVA) و همبستگی بین پارامتر (فراسنجه)ها با نرم‌افزار SPSS Ver. 22، ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی ($P < 0.05$) انجام گرفت. این آزمون در قالب طرح کامل تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

میانگین نرخ رشد نسبی موربانه‌ها با افزایش غلظت به‌صورت معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش رشد در تیمار ۴ درصد مشاهده شد ($F_{(F_3,15)}=70.9/30$, $P<0.001$).

آزمون بیوشیمیایی

نتایج حاصل بیانگر تأثیر معنادار غلظت‌های مختلف بوراکس بر میزان غلظت مالون‌دی‌آلد‌هاید همولنف است. میزان غلظت MDA با افزایش غلظت بوراکس، به‌صورت معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت ($F_{(F_3,15)}=667/85$, $P<0.001$). (شکل ۱-a). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد، در نتیجه کاربرد حشره‌کش، میزان فعالیت آنزیم POX در همولنف به‌صورت معنی‌داری نسبت به شاهد تغییر یافت به‌گونه‌ای که این آنزیم بیشترین و کمترین میزان فعالیت خود را نسبت به شاهد به ترتیب در تیمارهای ۴ درصد و ۳ درصد نشان داد، ولی اختلاف معنی‌داری بین غلظت ۱/۵ و ۲ درصد مشاهده نشد ($F_{(F_3,15)}=75/18$, $P<0.001$). (شکل ۱-b).

نتایج

آزمون زیست‌سنجی و تغذیه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، با مقایسه میانگین موربانه‌های ضعیف و غیرفعال بین تیمارهای مختلف حشره‌کش میزان درصد موربانه‌های ضعیف و غیرفعال با افزایش غلظت به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، که کمترین میزان فعالیت موربانه‌ها در تیمار ۴ درصد ثبت شد ($P<0.001$), $F_{(F_3,15)}=148/67$ (جدول ۱). همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین شاخص‌های تغذیه نیز نشان داد، با افزایش غلظت حشره‌کش، میزان درصد تغذیه ($F_{(F_3,15)}=788/0.4$, $P<0.001$)، وزن خشک تغذیه ($F_{(F_3,15)}=767/388$), $P<0.001$) به‌صورت معنی‌داری کاهش و درصد کاهش تغذیه نسبت به شاهد ($F_{(F_3,15)}=123/98$, $P<0.001$) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت، به‌گونه‌ای که در غلظت ۴ درصد میزان تغذیه موربانه‌ها نسبت به شاهد، ۴ برابر کاهش داشته است. (جدول ۲). بنابر نتایج حاضر در جدول ۱

جدول ۱. مقایسه میانگین درصد موربانه‌های ضعیف و غیرفعال و میزان تغییرات وزنی موربانه *M. diversus* توسط غلظت‌های مختلف بوراکس در آزمون غیرانتخابی بعد از ده روز

Table 1. Means comparison of percentages of moribund termites under different concentrations of borax on *M. diversus* and weight changes in no-choice test after 10 days

Concentrations (%)	Moribund ^a ± SE (%)	RGR ¹ ± SE (Mg/mg.day)
control	0	0.045±0.003 ^a
1.5	21.75±1.6 ^{de}	-0.064±0.003 ^b
2	33.5±1.32 ^c	-0.12±0.002 ^c
3	68.25±4.49 ^b	-0.2±0.005 ^d
4	82.25±3.70 ^a	-0.24±0.005 ^e

* حرف‌های متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده سطح معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ است.

Different letters within columns show significant differences at 0.05 level.

جدول ۲. مقایسه میانگین میزان شاخص‌های تغذیه موربانه *M. diversus* توسط غلظت‌های مختلف بوراکس در آزمون غیرانتخابی بعد از ده روز

Table 2. Means comparison of percentages of feeding indices under different concentrations of borax on *M. diversus* in no-choice test after 10 days

Concentrations (%)	Feeding ^a ± SE (%)	Dry weight loss ± SE (%)	S ² ± SE (%)
Control	8.7±0.1 ^a	1.95±0.02 ^a	-
1.5	4.5±0.11 ^b	1.01±0.026 ^b	43.55±1.43 ^d
2	3.62±0.06 ^c	0.82±0.01 ^c	50.04±0.89 ^c
3	2.58±0.11 ^d	0.59±0.02 ^d	66.61±1.43 ^b
4	2.1±0.04 ^e	0.48±0.01 ^e	72.89±0.67 ^a

* حرف‌های متفاوت در ستون‌ها نشان‌دهنده سطح معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ است.

* Different letters within columns show significant differences at 0.05 level.

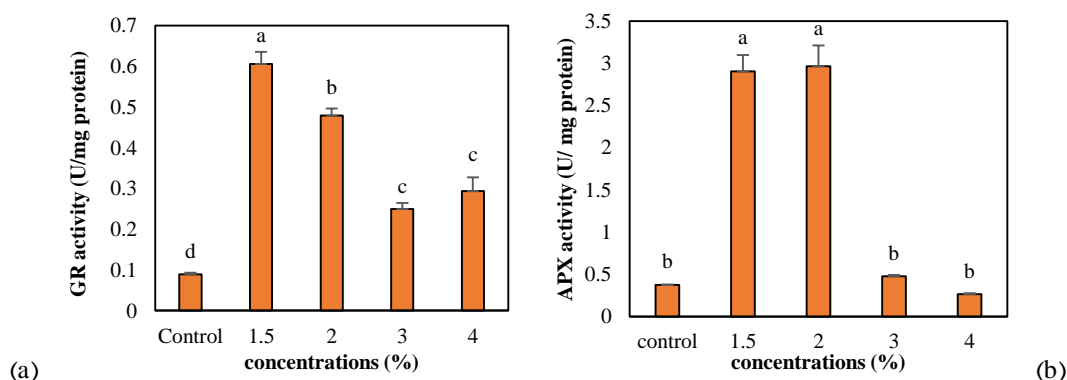
* موربانه‌های ضعیف‌شده و رو به مرگ که در فعالیت‌های اجتماعی کلنی از جمله تغذیه و تیمارگری مشارکت نمی‌کنند.

1. Relative Growth Rate

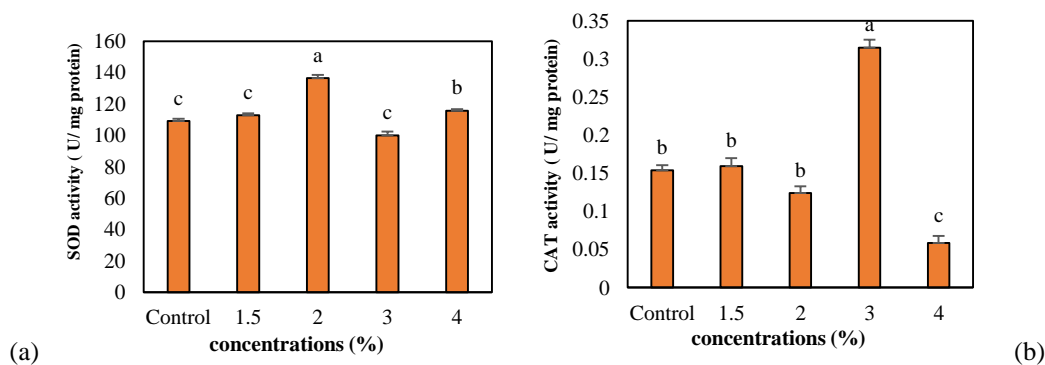
2. Decrease feeding compared to control

مشاهده شد. بین فعالیت آنزیم SOD در تیمارهای ۱/۵ و ۳ درصد با شاهد از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($F_{(۳,۱۵)}=۷۱/۸۳, P<۰/۰۰۱$) (شکل ۳-ب). نتایج همچنین نشان داد، بیشترین فعالیت آنزیم CAT در تیمار ۳ درصد و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار ۴ درصد بود. در فعالیت این آنزیم بین تیمارهای ۱/۵ درصد و ۲ درصد نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($F_{(۳,۱۵)}=۱۰۱/۴۲, P<۰/۰۰۱$) (شکل ۳-ا). نتایج مندرج در جدول ۳ نشان داد، بین فعالیت آنزیم APX با میزان MDA، فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD، فعالیت آنزیم‌های CAT و POX، نرخ رشد نسبی با MDA و نیز مرگ‌ومیر، درصد تغذیه با غلظت MDA همبستگی منفی و بین فعالیت آنزیم‌های GR و APX، درصد تغذیه و نرخ رشد نسبی، وزن خشک تغذیه با نرخ رشد نسبی همبستگی مثبت وجود دارد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس همچنین نشان داد، فعالیت آنزیم APX تحت تأثیر حشره‌کش همزمان با افزایش غلظت حشره‌کش کاهش یافت. بین فعالیت آنزیم APX در تیمارهای ۱/۵ درصد و ۲ درصد اختلاف معناداری مشاهده نشد و فعالیت این آنزیم در تیمار ۳ درصد و ۴ درصد با فعالیت آن در شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($F_{(۳,۱۵)}=۱۰۱/۵۶, P<۰/۰۰۱$) (شکل ۲-ا). با توجه به نتایج به دست آمده، بیشترین فعالیت آنزیم GR در تیمار ۱/۵ درصد و کمترین میزان فعالیت آن نسبت به شاهد در تیمار ۳ درصد مشاهده شد گرچه فعالیت این آنزیم در تیمار ۳ درصد و ۴ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت ($F_{(۳,۱۵)}=۷۸/۲۷, P<۰/۰۰۱$) (شکل ۲-ب). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد، بیشترین فعالیت آنزیم SOD در تیمار ۲ درصد و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۳ درصد



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف بوراکس بر میزان فعالیت آنزیم APX (a) و فعالیت آنزیم GR (b) در همولف موربانه *M. diversus*
Figure 2. Effect of different concentrations of borax on APX activity (a) and GR activity (b) in *M. diversus* hemolymph



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف بوراکس بر میزان فعالیت آنزیم CAT (a) و آنزیم SOD (b) در همولف موربانه *M. diversus*
Figure 3. Effect of different concentrations of borax on CAT activity (a) and SOD activity (b) in *M. diversus* hemolymph

جدول ۳. ضریب همبستگی بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، MDA، موربانه‌های ضعیف و غیرفعال، نرخ رشد نسبی و شاخص‌های تغذیه‌ای در موربانه *M. diversus*

Table 3. Correlation coefficient between antioxidant enzymes, MDA, Moribund, relative growth rate and nutritional indices in *M. diversus*

	MDA	POX	APX	CAT	SOD	GR	RGR	Moribund	Feeding	Dry Weight loss	Decrease in feeding compared to control
MDA	-										
POX	0.39	-									
APX	-0.541*	-0.39	-								
CAT	-0.18	-0.78**	-0.12	-							
SOD	0.18	0.45*	0.4	-0.76**	-						
GR	-0.18	-0.33	0.83**	-0.16	0.35	-					
RGR	-0.86**	0.04	0.19	-0.05	-0.21	-0.14	-				
Moribund	0.95**	0.067	-0.36	0.04	0.14	0.009	-0.96**	-			
Feeding	-0.71**	0.18	-0.08	-0.04	-0.28	-0.40	0.95**	-0.88**	-		
Dry weigh loss	-0.71**	0.18	0.08	-0.04	-0.29	-0.41	0.95**	-0.87**	1.00**	-	
Decrease feeding compared to control	-0.91**	-0.45	0.88**	0.01	-0.016	0.90**	-0.97**	-0.95**	-1.00**	-1.00**	-

* P<0.05, ** P<0.001

تولیدی ناشی از حشره‌کش (Buyukguzel, 2006; Hyrsel *et al.*, 2007) و ناکارآمد بودن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن حشره در پاک‌سازی ROS (Buyukguzel, 2013; Hyrsel *et al.*, 2007) دانست. تغییرات در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یک مکانیسم پاسخی در برابر افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید است (Hyrsel *et al.*, 2007). آنزیم SOD به‌عنوان نخستین خط دفاعی سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی سلول شناخته شده که رادیکال خطرناک سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند (Aucoin *et al.*, 2002; Weirich *et al.*, 1991). نتایج حاصل نشان داد، آنزیم SOD در تیمار ۲ درصد کارآمدی بالاتری نسبت به سایر غلظت‌ها دارد (شکل ۳-ب). کاهش فعالیت SOD در ROS و اثر متقابل آن با آنزیم‌ها باشد (Buyukguzel, 2009). H₂O₂ تولیدی توسط SOD به کمک آنزیم‌های CAT، POX، APX و GR به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود (Felton & Summer, 1995). آنزیم CAT یکی از آنزیم‌های اندک سلول، اما با ظرفیت بالا جهت پاک‌سازی غلظت بالای H₂O₂ در میتوکندری و پراکسیزوم سلول است (Raha & Rabinson, 2002). این آنزیم توانایی حذف H₂O₂ در غلظت‌های پایین را نداشته و این مسئولیت به عهده دو آنزیم POX و APX است

بحث

حشرات مانند دیگر جانداران با داشتن مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اختصاصی مانند SOD، CAT، POX، APX و GR می‌توانند برای بقای خود ROS را که در فرایندهای تنش توسط مواد سمی در بدن آن‌ها ایجاد می‌شود پاک‌سازی کنند (Asada *et al.*, 1987; Felton & Summers, 1995; Hao *et al.*, 2003). آنتی‌اکسیدان‌ها همچنین ممکن است میزان پراکسیداسیون لیپید را کاهش دهند. تنش اکسیداتیو ناشی از کاربرد حشره‌کش در موجودات زنده را می‌توان با استفاده از نشانگرهای مهم زیستی تنش از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (Vecera *et al.*, 2011) و همچنین MDA (به‌عنوان آخرین محصول پراکسیداسیون لیپید)، اندازه‌گیری و میزان صدمات اکسیداتیو را تجزیه و تحلیل کرد (Mates *et al.*, 1999; McCord, 2000). با توجه به نتایج، افزایش میزان غلظت حشره‌کش، افزایش میزان محتوای MDA را در پی داشت. همچنین همبستگی مثبتی بین افزایش MDA و کاهش فعالیت در موربانه‌ها و نیز همبستگی منفی بین شاخص‌های تغذیه از جمله درصد تغذیه و وزن خشک تغذیه و نیز نرخ رشد نسبی با میزان MDA مشاهده شد (جدول ۳). که این افزایش میزان MDA در همولنف را می‌توان نتیجه تجمع گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ROS)

کرده که هیدروآسکوربیک اسید نیز با کمک آنزیم دهیدروآسکوربیک اسید ردوکتاز و با گرفتن الکترون از مولکول گلوکاتایون احیا می‌شود. در اثر اکسایش گلوکاتایون، گلوکاتایون دی‌سولفید (GSSG) تولید می‌شود که این مولکول توسط GR و با کمک NADPH به GSH تبدیل می‌شود (Felton & Summers, 1995). بنابراین علت کاهش APX و GR به‌صورت همزمان می‌تواند به علت اختلال آنزیمی در این چرخه باشد. آنزیم APX همچنین با تغییرات وزن همبستگی منفی دارد (جدول ۳) که می‌توان گفت که با کاهش وزن و ایجاد تنش در حشره فعالیت این آنزیم افزایش یافته است. آنزیم POX نیز با داشتن سوبسترای فنلی و حذف H_2O_2 به پاک‌سازی سلول کمک می‌کند (Kashiwagi *et al.*, 1980; Mader *et al.*, 1997). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده این آنزیم در تیمار ۴ درصد بسیار کارآمد ظاهر شده است (شکل ۱-a) که علت این افزایش ممکن است به سبب تحمل تنش شیمیایی تحت تأثیر حشره‌کش توسط حشرات باشد (Kolawole *et al.*, 2014). با توجه به همبستگی منفی موجود بین آنزیم CAT و POX (جدول ۳) می‌توان گفت که این آنزیم در غلظت‌های مختلف برعکس فعالیت آنزیم CAT عمل می‌نماید که علت آن ممکن است به علت تفاوت در تجمع میزان H_2O_2 نسبت داد. این نتایج با نتایج بررسی‌های Hyrsel *et al.* (2007) و Buyukguzel (2013) همخوانی دارد و در هر دو تحقیق، میزان MDA و همچنین تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف حشره‌کش ایجاد شده است.

نتیجه‌گیری کلی

تغییرات در میزان سطح MDA و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌علت تولید میزان ROS ناشی از کاربرد حشره‌کش است (Hyrsel *et al.*, 2007). نتایج حاصل نشان داد، تیمار موربانه‌ها با غلظت‌های مختلف بوراکس منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو در موربانه گشته و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین شاخص تنش MDA را تحت تأثیر قرار می‌دهد، نتایج به‌دست‌آمده در این

(Ahmad *et al.*, 1991). با توجه به نتایج آنزیم CAT بیشترین فعالیت خود را در تیمار ۳ درصد نشان داده است (شکل ۳-a) در صورتی که میزان SOD در این تیمار کمترین فعالیت را دارد. به نظر می‌رسد، آنزیم SOD به علت در اختیار نداشتن سوبسترای (بستره) سوپراکسید کافی برای فعالیت بیشتر آنزیم و اختلال در سنتز (ساخت) آنزیم در این غلظت کمترین میزان فعالیت را دارد، در صورتی که در این غلظت مقادیر کافی سوبسترای پراکسید هیدروژن برای فعالیت بیشتر CAT فراهم بوده است. همبستگی معکوسی که بین SOD و CAT وجود دارد (جدول ۳) را می‌توان همسان نتایج Felton & Summers (1995) دانست. در نتیجه می‌توان افزایش فعالیت آنزیم CAT و کاهش فعالیت SOD را ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد در نتیجه کاربرد حشره‌کش مرتبط باشد (Buyukguzel & Kalender, 2007). همچنین بین فعالیت دو آنزیم SOD و APX همبستگی مثبت وجود دارد (جدول ۳) یعنی همزمان با کاهش فعالیت SOD میزان APX نیز کاهش یافته است که این کاهش در فعالیت هر دو آنزیم را می‌توان به اختلال ایجادشده توسط حشره‌کش در سیستم آنتی‌اکسیدانی نسبت داد. بسیاری از حشرات در بدن خود پراکسیدازهای عمومی (POD) دارند که با کمک بسیاری از مولکول‌ها مانند آسکوربات و گلوکاتایون، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. از جمله این پراکسیدازهای عمومی می‌توان به APX و POX اشاره کرد. آنزیم‌های POD نقش مهمی را در چرخه آسکوربات ایفا می‌کنند. از جمله این آنزیم مهم این چرخه APX است (Felton, 1995) دو آنزیم APX و GR نیز به‌عنوان پاک‌سازی‌کننده H_2O_2 شناخته می‌شوند. نتایج همچنین نشان داد، با افزایش میزان غلظت فعالیت هر دو آنزیم APX (شکل ۲-a) و GR (شکل ۲-b) کاهش یافته است. این همبستگی مثبت بین دو آنزیم (جدول ۳) را می‌توان با توجه به چرخه آسکوربیک اسید- گلوکاتایون توضیح داد. آسکوربیک اسید و گلوکاتایون به عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کمک کرده اما خود آن‌ها نیز به‌تنهایی برای حفاظت سلول در مقابل ROS نیز کاربرد دارد (Summers & Felton, 1994). آنزیم APX، H_2O_2 را با کمک آسکوربات به آب و دهیدروآسکوربیک اسید تبدیل

سیاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه چمران اهواز به خاطر فراهم آوردن بخشی از امکانات مالی و اجرایی این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

بررسی از فرضیه‌ی ما حمایت کرده و در نتیجه می‌توان از آن‌ها به‌عنوان نشان‌گرهای زیستی برای تعیین میزان تنش اکسیداتیو تولیدی ناشی از کاربرد حشره‌کش در حشرات استفاده کرد.

REFERENCES

- Ahmad, S., Duval, D. L., Weinhold, L. C. & Pardini, R. S. (1991). Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue specificity. *Insect Biochemistry*, 21, 563-572.
- Ahmad, S. (1992). Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology Journal*, 20, 269-296.
- Aki, S., Maenishi, K., Kawabata, A. & Amada, T. (2016). Efficacy of the novel termiticide guntoner® sc against termites. *Sumitomo Kagaku Report*, 1-10.
- Asada, K. & Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J., Osmond, C.B. & Arntzen, C.J. (Eds), *Photoinhibition Topics in Photosynthesis*. (pp.227-287). Springer Science.
- Aucoin, R. R., Philogene, B. J. R. & Arnason, J. T. (1991). Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous Lepidoptera. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology*, 16, 139-152.
- Beers, R. F. & Sizer, I. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 40-133.
- Beyer, W. F. & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in condition. *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566.
- Buyukguzel, K. (2006). Malathion-induced oxidative stress in a parasitoid wasp: Effect on adult emergence, longevity, fecundity, oxidative and antioxidative response of the *Pimpla turionellae*. *Journal of Economic Entomology*, 99, 1225-1234.
- Buyukguzel, E. & Kalender, Y. (2007). Penicillin- induced oxidative stress: effects on antioxidative response of midgut tissues in instars of *Galleria mellonella*. *Journal of Economic Entomology*, 102(1), 152-159.
- Buyukguzel, E. (2009). Evidance of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to Malathion. *Journal Economic Entomology*, 102(1), 152-159.
- Buyukguzel, E., Buyukguzel, K., Snela, M., Erdem, M., Radtke, K., Zeimnicki, K., & Adamski, Z. (2013). Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell Biology and Toxicology*, 29, 117-129.
- Carlberg, I. & Mannervik, B. A. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymology*, 113, 484-490.
- Evans, T. A. (2009). Rapid elimination on field colonies of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) using bistrifluron solid bait pellets. *Journal of Economic Entomology*, 103(2), 423-432.
- Felton, G. W. & Summers, C. B. (1995). Antioxidant system in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29, 187-197.
- Felton, G. (1995). Antioxidant defenses of invertebrates and vertebrates. In: Ahmad S (Ed), *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. (pp. 356-434.). New York: Chapman & Hall.
- Freeman, M. H., McIntyre, C. R. & Jackson, D. (2009). A critical and comprehensive review of boron in wood preservation. In: Proceedings of the *American Wood Protection Association*, 105, 279-294.
- Gentz, M. & Grace, J. K. (2006). A review of boron toxicity in insects with an emphasis of termites. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 23(4), 201-207.
- Grace, J. K. (1997). Review of recent research on the use of borates for termite prevention. In: Proceedings of the 2nd International Conference on Wood Protection with Diffusible Preservatives and Pesticides, Madison, Wisconsin, USA: 85-92.
- Habibpour, B. (2006). *Laboratory and field evaluation of bait- toxicants for suppression of subterranean termite populations in Ahwaz (Iran)*. Ph. D. Thesis., College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran. 143pp. (in Farsi)
- Hao, Z., Kasumba, I. & Aksoy, S. (2003). Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochemisry and Molocular Biology*, 33, 1155-1164.
- Hermes-Lima, M. & T. Zenteno-Sav, N. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology*, 133, 537-56.
- Hickey, C. D. (2006). *Effects of Disodium Octaborate Tetrahydrate in Ethylene Glycol on consumption and mortality of the eastern subterranean termite*. M.Sc. thesis, University of Florida, USA. 57pp.

23. Hu, X. P., Song, D. & Anderson, C. (2007). Effect of imidacloprid granules on subterranean termite foraging activity in ground touching non-structural wood. *Sociobiology*, 50(3), 1-6.
24. Hyrs, P., Buyukguzel, E. & Buyukguzel, K. (2007). The effects of boric acid-induced oxidative stress on antioxidant enzymes and survivorship in *Galleria mellonella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66, 23-31.
25. Kalow, W. & Grant, D. M. (1995). Pharmacogenetics. In: *The metabolic and molecular based of inherited disease*. (pp. 349-354.) McGraw- Hill Medical.
26. Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Takase, M., Hanada, H. & Nakamura, M. (1997). Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118, 499-503.
27. Kolawole, A. O., Olajuyigbe, F. M., Ajele, J. O. & Aderdire, C. O. (2014). Activity of the antioxidant defense system in a typical bio insecticide and synthetic treated cowpea storage beetle *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Chrysomellidae). *International Journal of Insect Science*, 6, 99-108.
28. Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 9, 515-540.
29. Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666.
30. 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, 453-464.
31. Mader, M., Ungemach, J. & Schloss, P. (1980). The role of peroxidase isozyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta*, 147, 467-470.
32. Maistrello, L., Henderson, G. & Laine, R. A. (2001). Effects of nookatone and a borate compound on Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) and its symbiont protozoa. *Journal of Entomology Science*, 36, 229-236.
33. Mates, J. M., Perez-Gomez, C. & Decastro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595-603.
34. McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108(8), 652-659.
35. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
36. Parapanthadara, L., Hemingway, J. & Ketterman, A. J. (1993). Partial purification and characterization of glutathione s-transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambia*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 47, 119-133.
37. Polle, A., Otter, T. & Seifert, T. (1994). Apoplastic peroxidase and lignification in needles of Norway spruce (*Pinus abies* L.). *Plant Physiology*, 106(1), 53-60.
38. Raha S. & Robinson B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 502-508.
39. Summers, C. B. & Felton, G. W. (1994). Prooxidant effects of phenolics acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24, 43-953.
40. Stewart, R. C. & Beweley J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65, 245-248.
41. Toth, L.T. (2000). Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. *Institute for Laboratory Animal Research*, 41, 72-79.
42. Usta, M., Ustaomer, D., Kartel, S. N. & Ondaral, S. (2009). Termite resistance of MDF panels treated with various boron compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2789-2797.
43. Vecera, J. (2011). *The role of insect adipokinetic hormones in oxidative stress*. Ph.D. thesis. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences. Ceske Budejovice, Czech Republic.
44. Waldbauer, G. P. (1968). The consumption and utilization of foods by insects. *Advance in Insect Physiology*, 5, 229-288.
45. Weirich, G. F., Collins, A. M. & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33, 3-14.