

ارزیابی دو رنگ مورد استفاده در روش Mark-Release-Recapture برای علامتگذاری موربانه *Microcerotermes diversus* Silvestri (Isoptera:Termitidae)

مرجان اختلاط^۱، بهزاد حبیب پور^۲، فرحان کچیلی^۳ و محمد سعید مصدق^۴

۱- نویسنده مسئول: دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره شناسی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز (marjan_ekhtelat@yahoo.com)

۲ و ۳- استادیاران، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

۴- استاد، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۴

چکیده

از روش های Mark-Release-Recapture به منظور تعیین قلمروی جستجوگری کلنی موربانه ها و ارزیابی جمعیت موربانه های جستجوگر استفاده می شود. در این تحقیق، علامت گذاری موربانه ها با استفاده از دو رنگ (NB) Nile Blue و Neutral Red (NR) به منظور تعیین غلظت های مناسب از این دو رنگ که در کوتاه ترین زمان ممکن باعث رنگ شدن موربانه ها شوند، انجام شد. تیمارها شامل ۳ غلظت ۱/۰، ۲۵/۰ و ۵۰/۰ درصد از هر یک از رنگ های NB و NR بودند. برای تیمار شاهد از یک میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. هر تیمار با چهار تکرار و هر تکرار شامل ۵۰ موربانه کارگر، در انکوباتور تاریک (در دمای 28 ± 2 درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی 90 ± 5 درصد) درپتری هایی به قطر ۹ سانتی متر حاوی کاغذ صافی (واتمن شماره ۱ به قطر ۹ سانتی متر) نگهداری شدند. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS و آزمون مقایسه میانگین ها (LSD) انجام شد. در مقایسه میانگین تیمارهای NB و NR با تیمار شاهد از نظر بقا، درصد رنگ آمیزی (بعد از تبدیل درصد ها به $\text{Arcsin } \sqrt{X\%}$) و کاهش وزن کارگرها، غلظت های ۱/۰ و ۲۵/۰ درصد NB و غلظت های ۲۵/۰ و ۵۰/۰ درصد NR اختلاف معنی داری با شاهد نشان ندادند. در نتیجه به منظور تعیین مناسب ترین غلظت با کمترین مدت زمان رنگ آمیزی، آزمایش دیگری با تشنه نگه داشتن موربانه ها به مدت ۸ ساعت قبل از آزمایش انجام شد که غلظت های ۱/۰ درصد NB و ۵۰/۰ درصد NR پس از ۲۴ ساعت باعث رنگ شدن ۹۰ درصد موربانه ها شدند. بنابراین به منظور سرعت بخشیدن به زمان رنگ آمیزی می توان از غلظت های ۱/۰ درصد NB و ۵۰/۰ درصد NR همراه با تشنگی استفاده نمود. بررسی های آزمایشگاهی و مطالعات اولیه صحرائی نشان داد که می توان از این رنگ ها برای ارزیابی رفتار جستجوگری، تعیین تعداد کلنی، تشخیص هم آشیانه ای در آزمایش های رفتارهای تهاجمی و آزمایش های انتقال سموم بین موربانه ها، در موربانه *Microcerotermes diversus* استفاده نمود.

کلید واژه ها: موربانه *Microcerotermes diversus* روش Mark-Release-Recaptur، رنگ
Neutral Red و Nile Blue

مقدمه

بلوچستان و یزد گزارش شده است (۱). این موربانه به صورت زیر زمینی زندگی می کند و خسارت اقتصادی زیادی را به منازل مسکونی، مزارع و

موربانه *Microcerotermes diversus* Silvestri مخرب ترین گونه موجود در استان خوزستان بوده و در ایران از استان های خوزستان، بوشهر، سیستان و

انجام می‌گیرد. کاربرد این روش ساده و مدت زمان لازم برای رنگ آمیزی موریانه‌ها کوتاه می‌باشد، اما دارای معایبی از جمله عدم دوام کافی، از بین رفتن رنگ در اثر تیمارگری و تمیز کردن یکدیگر و پوست اندازی می‌باشد (۳).

رایج‌ترین روش علامتگذاری موریانه‌ها، استفاده از رنگ آمیزی سیستم گوارشی و بافت چربی^۵ می‌باشد. اگرچه این نوع علامت‌گذاری عیب‌هایی مانند رنگ آمیزی غیر یکنواخت (همه موریانه‌ها به یک میزان رنگ آمیزی نمی‌شوند) و احتمال انتقال به وسیله هم‌خواری^۶ و تغذیه دهان به دهان دارد^۷ اما با همه این اشکالات در حال حاضر بهترین و مقبول‌ترین روش است (۴). مزایای این روش بدین صورت است که چون بافت چربی موریانه رنگ آمیزی می‌شود توسط پوست اندازی یا تیمارگری از بین نمی‌رود و کاربرد آنها برای جمعیت‌های زیاد خیلی ساده است، چون رنگ به غذای موریانه‌ها اضافه می‌شود و دوام خیلی زیادی هم دارد (۳).

با استفاده از این رنگ‌ها می‌توان از وجود عملیات شکارگری شکارگرهایی مانند لاروهای Campodeiform و کنه‌های شکارگر که از موریانه‌ها تغذیه می‌نمایند، آگاه شد. بدین ترتیب که لارو و کنه‌های شکارگر ضمن تغذیه از موریانه‌های رنگی، بدنشان رنگی می‌شود و دیگر نیاز به تشریح بدن این لارو یا کنه برای بررسی وجود موریانه نیست. روش رنگ آمیزی بافت‌های چربی به دوصورت انجام می‌گیرد (۳):

۱- رنگ آمیزی کند^۸ (روش مرسوم) ۲- رنگ آمیزی سریع^۹

ساختمان‌های اداری وارد می‌سازد. این حشره همچنین توانایی ایجاد اجتماعات ثانویه در دیوارها و سقف اماکن و نیز روی درختان را دارد و لذا ریشه کنی و کنترل آن به سهولت میسر نیست (۱). کنترل موریانه‌های زیرزمینی در ساختمان‌ها از طریق مدیریت محلی جمعیت^۱ (تعیین کلنی و تخمین جمعیت موریانه) و استفاده از طعمه‌های سمی که کمترین اثرات منفی محیطی را دارند بهترین روش موجود می‌باشد. موفقیت در روش طعمه‌گذاری نیازمند تعیین محل جمعیت و همچنین تعیین حوزه جستجوگری^۲ موریانه‌های زیرزمینی می‌باشد که بهتر است این کار قبل از طراحی روش طعمه‌گذاری در مناطق آلوده انجام گیرد (۱۱). جهت تعیین قلمرو جستجوگری موریانه‌های زیرزمینی، تخمین جمعیت موریانه‌های جستجوگر با استفاده از روش علامتگذاری - رها سازی - شکار دوباره^۳ (MRR)، تعیین تعداد کلنی‌ها، تشخیص هم‌آشیانه‌ای بودن و آزمایش‌های تعیین انتقال سموم بین کارگرها از روش علامت‌دار کردن موریانه‌ها استفاده می‌شود. علامتگذاری موریانه‌ها بخاطر نرم و ظریف بودن بدن و زیاد بودن تعدادشان (جمعیت بالا) تاحدی مشکل است و چون بدن موریانه‌ها نرم و ظریف است (عکس ۱). استفاده از روش‌های علامتگذاری مانند اتیکت زدن یا بریدن قسمتی از بدن امکان‌پذیر نمی‌باشد و باعث مرگ آنها می‌شود. همچنین به دلیل جمعیت خیلی زیاد موریانه‌ها بهتر است از روشی استفاده شود که ضمن حفظ موریانه‌ها، آنها را در مدت زمان کمتری علامتگذاری نماید (۴).

جهت علامتگذاری موریانه‌ها، روش‌های مختلفی وجود دارد از جمله پاشیدن رنگ‌ها^۴، که رنگ آمیزی موریانه‌ها از طریق سطح خارجی بدن

5- Histological stains

6- Cannibalism

7- Trophalaxis

8- Slow marking

9- Fast marking

1- Local population management

2- Foraging territory

3- Mark - release - recapture

4- Spray paints

NR و NB از جمله رنگ های قابل حل در بافت چربی می باشند که جهت مطالعه رفتاری و اکولوژیکی موربانه های زیادی بکار رفته است و نسبت به رنگهای دیگر ماندگاری و دوام بیشتری دارند (۳). از آنجا که غلظت رنگ بکار رفته و مدت زمان رنگ آمیزی بسته به نوع موربانه مورد مطالعه خیلی متفاوت است، آزمایش هایی در رابطه با ارزیابی این دو رنگ محلول در آب به دو روش رنگ آمیزی مرسوم و سریع برای موربانه *M. diversus* جهت انجام مطالعات اکولوژیکی و رفتاری انجام شد.

مواد و روش ها

آزمایش شماره ۱: رنگ آمیزی کند (مرسوم)
ابتدا موربانه های زیرزمینی *M. diversus* از تله های چوبی (چوب تجارتي راش) تعبیه شده در خاک منطقه ای واقع در دانشکده کشاورزی اهواز در تاریخ نوزدهم فروردین سال ۱۳۸۷ جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه به آرامی از تله ها خارج شدند و قبل از آزمایش، جهت کاهش استرس، به مدت چند ساعت در ظرف های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب (واتمن شماره ۱ به قطر ۹ سانتی متر) نگهداری شدند. بر اساس یک سری آزمایش های اولیه، در این آزمایش از ۳ غلظت ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد از هر یک از رنگ های NR و NB (شرکت مرک آلمان) جهت بررسی و انتخاب مناسب ترین غلظت از نظر بقای موربانه ها و کیفیت رنگ (قابل رویت بودن رنگ) استفاده گردید. پس از تهیه این غلظت ها، کاغذهای صافی دایره ای شکل (واتمن شماره ۱ به قطر ۹ سانتی متر) با یک میلی لیتر از غلظت های مختلف هر دو رنگ NR و NB به طور جداگانه و به صورت یکنواخت رنگ شد و سپس به مدت نیم ساعت در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا رطوبت آنها تبخیر و خشک شوند. سپس کاغذهای صافی رنگی خشک شده و کاغذهای

در رنگ آمیزی مرسوم زمان مورد نیاز برای رنگ شدن موربانه ها حدود ۴ تا ۱۰ روز می باشد که احتمال می رود با طولانی شدن این مدت، موربانه ها آسیب ببینند (۴)، در صورتی که در رنگ آمیزی سریع این مدت به یک تا دو روز تقلیل می یابد. به هر حال ماده رنگی انتخاب شده در روش های رنگ آمیزی نباید بر روی سلامتی، بقاء، خصوصیات رفتاری و اکولوژیکی موربانه ها تاثیر منفی بگذارد (۴). جهت مطالعه رفتاری و اکولوژیکی موربانه ها از رنگ های مختلفی استفاده شده است: اونس و همکاران^۱ (۴) جهت ارزیابی جمعیت موربانه *Coptotermes acinaciformis* Frogatt خانواده Rhinotermitidae از رنگ Nile Blue (NB) استفاده نمودند. گریس و ابدالی^۲ (۶، ۷ و ۸) از رنگ های Sudan Red و Sudan Blue جهت مطالعات رفتاری و جستجوگری *Reticulitermes flavipes* Kollar (Rhinotermitidae) استفاده کردند. تسونودا و همکاران^۳ (۱۳) جهت تعیین قلمرو و جمعیت جستجوگر موربانه *R. speratus* از رنگ NB به غلظت ۰/۰۵ درصد، مارینی و فراری^۴ (۱۰) نیز جهت ارزیابی جمعیت موربانه *R. lucifugus* از دو رنگ NB و Neutral Red (NR) به غلظت ۰/۲ درصد استفاده نمودند. سو و همکاران^۵ (۱۲) رنگ Sudan Red را برای مطالعات جستجوگری موربانه *C. formosanus* مورد بررسی قرار دادند. زینگ پینگ و فانگ^۶ (۱۴) از غلظت ۰/۱ درصد NB جهت بررسی رابطه تهاجمی بین دو موربانه زیرزمینی *C. formosanus* و *R. flavipes* استفاده نمودند. تاثیر مواد رنگی محلول در چربی بر وزن، بقاء و درصد رنگ آمیزی بین گونه های مختلف متفاوت است (۳). دو رنگ

1- Evans et al.

2- Grace & Abdallay

3- Tsunoda et al.

4- Marini & Ferrari

5- Su et al.

6- Xing-ping & Fang

درصد، NR ۰/۲۵ درصد و NR ۰/۵ درصد به همان طریق که در آزمایش شماره ۱ توصیف شد، منتقل شدند. برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در اتاقک رشد تاریک در شرایط رطوبت نسبی 90 ± 5 درصد دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این آزمایش وزن موربانه‌های کارگر و وزن کاغذهای صافی مربوط به تکرارهای هر تیمار، قبل و بعد از آزمایش اندازه‌گیری شدند. تعداد تلفات شمارش و نسبت موربانه‌های رنگ آمیزی شده نیز بعد از مدت ۲۴ ساعت تعیین شدند. پس از انجام تبدیل درصد به $\text{Arcsin} \sqrt{\%x}$ ، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و آزمون مقایسه میانگین‌ها (LSD) انجام گرفت.

نتایج و بحث

آزمایش ۱: رنگ آمیزی مرسوم
در این آزمایش طی مدت ۴ روز، درصد موربانه‌های رنگ آمیزی شده در اثر تغذیه از کاغذهای صافی رنگی، در بعضی غلظت‌ها به بیش از ۹۰ درصد رسید. به همین دلیل تجزیه و تحلیل داده‌های بقا، اختلاف وزن موربانه‌ها، اختلاف وزن کاغذهای صافی و درصد موربانه‌های رنگ آمیزی شده پس از مدت ۴ روز انجام گرفت. از نظر میزان بقا بین تیمارهای ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد از رنگ NR و تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار وجود نداشت ($F=0/55$ ، $P=0/65$ ، $df=3$) (جدول ۱). از نظر تغییر در وزن کارگرها نیز تفاوت معنی‌داری بین این ۳ تیمار (۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵) با تیمار شاهد مشاهده نشد ($F=0/90$ ، $P=0/47$ ، $df=3$) (جدول ۱). از لحاظ درصد رنگ آمیزی (قابل رویت بودن رنگ در بدن موربانه)، تیمار ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد در یک سطح آماری و به ترتیب ۶۳/۷ و ۷۰/۴ درصد بودند و با تیمار NR ۰/۱ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند ($F=6/64$ ، $P=0/01$ ، $df=2$) (جدول ۱).

صافی غیر رنگی مربوط به تیمار شاهد (عکس ۱) با ترازوی دیجیتالی توزین گردید تا وزن اولیه شان بدست آید. ظرف‌های پتری حاوی کاغذهای صافی رنگی خشک شده و ظرف‌های پتری حاوی کاغذهای صافی غیر رنگی مربوط به تیمار شاهد بایک میلی لیتر آب مقطر مرطوب شده و تعداد ۵۰ موربانه کارگر با وزن معین (که قبل از آزمایش وزن شده اند) در آنها قرار گرفتند. هر تیمار شامل ۴ تکرار بود. پس از آن هر کدام از واحدهای آزمایشی در انکوباتور تاریک (اتاقک رشد) در شرایط رطوبت نسبی 90 ± 5 درصد و دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شدند. روزانه تعداد تلفات و تعداد موربانه‌های رنگ آمیزی شده (که ماده رنگی در بدن آنها به خوبی قابل رویت باشد) شمارش شدند. وزن کاغذهای صافی و موربانه‌ها نیز در پایان آزمایش دوباره تعیین شد (اختلاف وزن کاغذهای صافی، قبل و بعد از آزمایش، میزان تغذیه را نشان می‌دهند). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) و آزمون مقایسه میانگین‌ها (LSD) انجام شد. چون درصدها توزیع نرمال نداشتند به $\text{Arcsin} \sqrt{\%x}$ تبدیل شدند.

آزمایش ۲: رنگ آمیزی سریع موربانه

پس از تعیین غلظت‌هایی از NR و NB در آزمایش شماره ۱ که از لحاظ کیفیت رنگ و بقا در بهترین وضعیت نسبت به سایر غلظت‌ها بودند، آزمایش دیگری به منظور کاهش زمان رنگ آمیزی با داشتن حداقل تلفات انجام گرفت. ابتدا ۵۰ موربانه کارگر *M. diversus* برای هر یک از غلظت‌های انتخاب شده، هر کدام در ۴ تکرار به مدت ۸ ساعت روی کاغذ صافی خشک (بدون رطوبت) در دمای اتاق قرارداد شدند. کاغذهای صافی و موربانه‌های کارگر (برای هر تکرار) قبل از آزمایش وزن شدند. پس از مدت ۸ ساعت تشنگی، موربانه‌ها به ظروف پتری حاوی کاغذ صافی با غلظت‌های NB ۰/۱

جدول ۱- میانگین درصد بقا، درصد موربانه های رنگ آمیزی شده (پس از تبدیل درصد به $\text{Arcsin} \sqrt{\%x}$)، تغییرات وزنی کارگرهای رنگ شده و میزان مصرف کاغذ صافی (میزان تغذیه) موربانه *M. diversus* بعد از مدت ۴ روز رنگ آمیزی با غلظت های مختلف Nile Blue و Neutral Red

تیمار	غلظت (درصد)	درصد بقا	درصد موربانه های رنگ آمیزی شده	میزان تغذیه (mg)	تغییرات وزن کارگرها (mg)
شاهد		$75/41 \pm 1/43$ a		$10/50 \pm 0/65$ a	$13/75 \pm 2/84$ a
Nile Blue	۰/۱	$72/09 \pm 3/72$ a	$69/89 \pm 1/22$ ab	$8/75 \pm 0/95$ ab	$17/25 \pm 1/93$ ab
	۰/۲۵	$70/42 \pm 1/96$ a	$73/81 \pm 1/84$ a	$6/00 \pm 0/91$ bc	$19/75 \pm 1/80$ ab
	۰/۵	$69/43 \pm 1/53$ a	$66/21 \pm 1/30$ b	$4/50 \pm 1/44$ c	$23/75 \pm 1/89$ b
	۰/۱	$77/43 \pm 1/79$ a	$44/36 \pm 8/71$ b	$10/05 \pm 0/87$ a	$13/75 \pm 1/97$ a
Neutral Red	۰/۲۵	$74/74 \pm 2/70$ a	$63/73 \pm 1/95$ a	$9/25 \pm 0/48$ ab	$16/00 \pm 1/41$ a
	۰/۵	$73/89 \pm 1/99$ a	$70/42 \pm 1/80$ a	$7/25 \pm 0/63$ b	$18/25 \pm 2/59$ a

میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون با یکدیگر در آزمون LSD در سطح $\alpha = 5\%$ اختلاف معنی دار ندارند. اعداد موجود در پرانتز شامل (اشتباه معیار \pm میانگین) می باشند و تعداد تکرار برای هر تیمار برابر با چهار (df=۳ و n=۴) می باشد.

لحاظ میزان رنگ آمیزی و بقا در یک سطح و از نظر میزان تغذیه هم تفاوت چندانی با هم نداشتند، می توان هر دو غلظت را برای رنگ آمیزی استفاده نمود که البته از نظر اقتصادی غلظت ۰/۲۵ با صرفه تر می باشد. مقایسه میانگین تیمارهای NB با شاهد نیز در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه میانگین تیمارهای NB با تیمار شاهد از لحاظ بقا تفاوت معنی داری نداشتند (df=۳، P=۰/۳۳، F=۱/۲۵) (جدول ۱). از نظر میزان رنگ آمیزی نیز غلظت های ۰/۱ و ۰/۲۵ درصد NB در یک سطح آماری بودند و با تیمار ۰/۵ درصد اختلاف معنی دار نشان دادند (df=۲، P=۰/۰۱، F=۶/۶۲) (جدول ۱). از نظر مقایسه تغییرات وزن، تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲۵ درصد تفاوت معنی داری با شاهد نشان ندادند اما غلظت ۰/۵ درصد اختلاف معنی دار با شاهد داشت (df=۳، P=۰/۰۳، F=۳/۸۲) (جدول ۱). از

اگر چه از لحاظ آماری تیمارهای ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد در یک سطح بودند اما از نظر کیفیت رنگ، تیمار ۰/۵ درصد در وضعیت مطلوب تری بود. از طرفی مقایسه میزان تغذیه هر یک از این ۳ غلظت (تیمار) با شاهد نشان داد که تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲۵ درصد تفاوت معنی داری نداشتند اما تیمار ۰/۵ درصد تفاوت معنی داری داشت (df=۳، P=۰/۰۱، F=۵/۲۶). تیمار ۰/۵ درصد از لحاظ میزان تغذیه تفاوت چندانی با ۰/۲۵ درصد نداشت (جدول ۱) و به طور کلی میزان تغذیه با افزایش غلظت کاهش یافته بود، اما چون موربانه ها فقط برای مدت محدودی روی کاغذ صافی رنگی قرار می گیرند و سپس رها سازی می شوند، میزان تغذیه در این دوره، عامل خیلی موثری نیست و بیشتر کیفیت رنگ آمیزی و میزان بقا مهم می باشد. بنابراین، چون غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد رنگ NR از

دارد و به نظر سمی می رسد چرا که با وجود مشاهده رنگ آبی مطلوب در بدن موربانه ها، موربانه های رنگ شده بعد از مدت کمی تلف شدند. اما در غلظت ۰/۵ درصد از رنگ NR چنین چیزی مشاهده نشد. مقایسه میزان تغذیه و بقا بین دو رنگ NR و NB هم دلیل دیگری بر اثبات این موضوع می باشد. چون میزان تغذیه و بقا در غلظت های NB کمتر از میزان تغذیه و بقا در غلظت های NR است. از طرفی غلظت ۰/۱ درصد از رنگ NB که کمترین غلظت در این آزمایش می باشد باعث رنگ آمیزی یکنواخت (رنگ آبی مطلوب) موربانه ها شد (عکس ۲) در صورتی که در پایین ترین غلظت NR یعنی ۰/۱ درصد، رنگ آمیزی بصورت غیریکنواخت و کمرنگ بود. بنابراین، غلظت های پایین NB و علاوه بر رنگ آمیزی یکنواخت، از لحاظ بقا و میزان تغذیه هم در سطح مناسبی می باشند. اما در NR با افزایش غلظت، رنگ آمیزی یکنواخت (رنگ قرمز مطلوب) ایجاد شد (عکس ۳). در این آزمایش همه موربانه ها در تیمار شاهد و در سایر تیمارها (NR و NB) کاهش وزن نشان دادند که کاهش وزن در NB و NR با افزایش غلظت بیشتر شده است اما در NR تفاوت معنی داری با شاهد از لحاظ کاهش وزن نشان ندادند.

نظر میزان تغذیه، تیمار ۰/۱ درصد تفاوت معنی داری با شاهد نداشت اما غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد تفاوت معنی داری با شاهد نشان دادند (جدول ۱). $(F=۶/۸۷, P=۰/۰۰۶, df=۳)$. بنابراین چون از نظر میزان تغذیه و کاهش وزن، کارگرهای تیمار شده با غلظت ۰/۱ درصد از رنگ NB باتیمار شاهد اختلاف معنی دار نشان نداد و از لحاظ رنگ آمیزی و بقا نیز در وضعیت مطلوبی بودند، این غلظت انتخاب شد. البته همان طوری که قبلا اشاره شد، چون میزان تغذیه در این دوره، عامل خیلی موثری نیست و بیشتر کیفیت رنگ آمیزی و میزان بقا مهم می باشد در نتیجه غلظت ۰/۲۵ درصد NB را هم می توان استفاده نمود. طبق نتایج بدست آمده از جدول ۱، میزان تغذیه و بقا در هر دو رنگ NR و NB، با افزایش میزان غلظت کاهش یافته است. درصد رنگ شدن موربانه ها با رنگ NR، با افزایش غلظت افزایش یافته، اما در NB با تغییر غلظت از ۰/۱ به ۰/۲۵ درصد، میزان رنگ شدن با افزایش غلظت رابطه مستقیم دارد. اما تغییر غلظت از ۰/۲۵ به ۰/۵ درصد نشان دهنده رابطه عکس میزان رنگ آمیزی با افزایش غلظت می باشد که می توان چنین نتیجه گیری نمود که NB در غلظت های بالا، تاثیر منفی روی بقا و حتی میزان تغذیه



عکس ۱- موربانه های شاهد



عکس ۲- موربانه های رنگ آمیزی شده با رنگ Nile Blue (تیمار ۰/۱ درصد)



عکس ۳- موربانه های رنگ آمیزی شده با رنگ Neutral Red (تیمار ۰/۵ درصد)

تیمارهای رنگی قرار گرفتند، بلافاصله آرواره های شان را داخل کاغذ صافی مرطوب فرو نمودند و برای چند دقیقه راه رفتن را متوقف کردند و درست در همین زمان است که می توان ظاهر شدن رنگ در روده آنها را مشاهده نمود که این نشان دهنده این است که رنگ نوشیده می شود. ولی در آزمایش اول (روش مرسوم رنگ آمیزی)، موربانه ها پس از قرار گرفتن در تیمارهای رنگی، بلافاصله شروع به راه رفتن نمودند و هیچ رفتار نوشیدنی مشاهده نشد. در مدت زمانی که موربانه ها در معرض خشکی (روی کاغذ صافی بدون رطوبت) قرار داشتند، به علت عدم وجود رطوبت، هیچ گونه تغذیه ای انجام ندادند و تغییری هم در وزن کاغذ صافی مشاهده

آزمایش ۲: رنگ آمیزی سریع موربانه پس از مدت زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد که موربانه های موجود در غلظت ۰/۱ درصد NB به طور یکنواخت رنگ آمیزی شدند. اما موربانه های موجود در غلظت ۰/۲۵ درصد NR به طور غیر یکنواخت رنگ آمیزی شدند و رنگ صورتی کم رنگی به خود گرفتند. در نتیجه از غلظت ۰/۵ درصد رنگ NR که در آزمایش شماره ۱، تفاوت معنی داری هم با غلظت ۰/۲۵ درصد از نظر میزان بقا نداشت، استفاده شد. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد که موربانه ها به طور یکنواخت رنگ آمیزی شدند. در رنگ آمیزی سریع، وقتی موربانه ها بعد از ۸ ساعت تشنگی (در معرض خشکی بودن) در

سریع و مرسوم، از لحاظ بقا و سطح رنگ آمیزی، اختلاف معنی داری با هم داشتند ($P=0/3$ ، $df=1$) ($F=23/03$ ، $P=0/01$ ، $df=1$) ($F=9/91$ ، $P=0/01$ ، $df=1$) (جدول ۳) و میزان بقا و سطح رنگ آمیزی هر دو در روش رنگ آمیزی سریع بیشتر بود (جدول ۳). مقایسه تیمارهای ۰/۵NR درصد، از لحاظ بقا اختلاف معنی داری با هم نداشتند اگرچه از لحاظ مقدار عددی میزان بقا در روش رنگ آمیزی سریع بیشتر بود اما از لحاظ آماری در یک سطح بودند (جدول ۳) ($F=1/76$ ، $P=0/23$ ، $df=1$). اما درصد رنگ آمیزی تیمارهای ۰/۵NR درصد در هر دو روش (رنگ آمیزی مرسوم و سریع) اختلاف معنی داری با هم داشتند و میزان رنگ آمیزی در روش رنگ آمیزی سریع بیشتر بود ($P=0/01$ ، $df=1$) ($F=13/02$ ، $P=0/001$ ، $df=1$) (جدول ۲). در مقایسه کاهش وزن بین دو روش نیز، موریانه ها در رنگ آمیزی سریع وزن کمتری نسبت به رنگ آمیزی مرسوم از دست دادند (جدول ۱ و ۲).

نشد و همه موریانه ها هم کاهش وزن نشان دادند. بعد از انتقال موریانه ها به کاغذهای صافی رنگی برای مدت ۲۴ ساعت، آنها از لحاظ میزان تغذیه، بقا و درصد رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج رنگ آمیزی مرسوم مورد مقایسه قرار گرفت. از لحاظ میزان تغذیه، در مدت ۲۴ ساعت، هیچ گونه تغذیه ای صورت نگرفته بود که این خود دلالت بر نوشیدن مایع رنگی می کند در صورتیکه در آزمایش شماره ۱ (رنگ آمیزی مرسوم) تغذیه صورت گرفته بود. وزن موریانه ها نیز بطور متوسط ۷/۵ میلی گرم کاهش نشان داد که اختلاف معنی داری بین شاهد و رنگ های ۰/۵ درصد NR و ۰/۱ درصد NB مشاهده نشد و همه به یک میزان کاهش وزن نشان دادند ($F=0$ ، $P=1/00$ ، $df=1$) (جدول ۲). از لحاظ بقا نیز بین تیمار شاهد با این تیمارها تفاوت معنی دار وجود نداشت و همه در یک سطح آماری بودند (جدول ۲) ($F=0/32$ ، $df=1$) و ($F=0/05$ ، $P=0/82$ ، $df=1$) ($F=1/13$ ، $P=0/32$ ، $df=1$). طبق نتایج بدست آمده، مقایسه تیمارهای ۰/۱NB درصد، در دو روش رنگ آمیزی

جدول ۲- میانگین درصد بقا (پس از تبدیل درصد به $\text{Arcsin} \sqrt{\%x}$)، تغییرات وزن کارگرهای رنگ شده موریانه *M. diversus* بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت در روش رنگ آمیزی سریع با Nile Blue و

Neutral Red

تیمار	غلظت (درصد)	درصد بقا	تغییرات وزن کارگرها (mg)
شاهد		$85/08 \pm 2/92$ a	$7/50 \pm 2/50$ a
Nile Blue	۰/۱	$85/93 \pm 2/35$ a	$7/50 \pm 2/50$ a
Neutral Red	۰/۵	$79/81 \pm 3/99$ a	$7/50 \pm 2/50$ a

میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون با یکدیگر در آزمون LSD در سطح $\alpha=5\%$ اختلاف معنی دار ندارند. اعداد موجود در پرانتز شامل (اشتباه معیار \pm میانگین) می باشند و تعداد تکرار برای هر تیمار برابر با چهار ($n=4$ و $df=3$) می باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد بقا و درصد موربانه های رنگ آمیزی شده (پس از تبدیل به $\text{Arcsin} \sqrt{\%x}$) تیمارهای NB ۱/۱ درصد و ۵NR ۰/۵ درصد در دوروش رنگ آمیزی سریع و مرسوم

تیمار	غلظت (درصد)	درصد بقا	درصد موربانه های رنگ آمیزی شده
رنگ آمیزی سریع	۰/۱ Nile Blue	۸۵/۹۳ ± ۲/۳۵ a	۸۵/۰۸ ± ۲/۹۲ a
	۰/۵ Neutral Red	۷۹/۸۱ ± ۳/۹۹ a	۸۲/۱۹ ± ۲/۷۲ a
رنگ آمیزی مرسوم	۰/۱ Nile Blue	۷۲/۰۹ ± ۳/۷۲ b	۶۹/۸۹ ± ۱/۲۲ b
	۰/۵ Neutral Red	۷۳/۸۹ ± ۱/۹۹ a	۷۰/۴۲ ± ۱/۸۰ b

میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون با یکدیگر در آزمون LSD در سطح ۵٪ α اختلاف معنی دار ندارند. اعداد موجود در پرانتز شامل (اشتباه معیار \pm میانگین) می باشند و تعداد تکرار برای هر تیمار برابر با چهار (df=۳ و n=۴) می باشد.

در نتیجه موربانه ها بجای ۴ تا ۱۰ روز به مدت ۲۴ ساعت از کلنی های شان دور هستند که این خود چندین مزیت دارد: موربانه برای مدت زیادی روی کاغذ صافی نگه داری نمی شود چون کاغذ صافی برای تامین نیازهای غذایی موربانه ها کافی نیست که یکی از دلایل کاهش وزن موربانه ها نیز همین می باشد (۵). از طرفی کاهش مدت زمان رنگ آمیزی موربانه ها باعث کاهش تلفات و آسیب رسانی به آنها می شود و در زمان کمتری هم می توان آنها را رها سازی و در وقت صرفه جویی نمود. طولانی شدن مدت رنگ آمیزی ممکن است به فون تک سلولی های همزیست دستگاه گوارش موربانه ها (باکتری ها و آغازیان) آسیب رساند و سبب کاهش تعداد آنها و در نتیجه کاهش میزان تغذیه و بقای آنها گردد (۲). ممکن است دلیل کاهش میزان تغذیه و بقا در روش رنگ آمیزی مرسوم نسبت به رنگ آمیزی سریع نیز همین موضوع باشد. افزایش غلظت رنگ نیز ممکن است

بررسی های آزمایشگاهی ثابت نموده اند که میزان بقا و سطح رنگ آمیزی در علامتگذاری (رنگ آمیزی) سریع موربانه *M. diversus* معادل یا بیشتر از روش رنگ آمیزی مرسوم می باشد. اونس در مقایسه دو روش رنگ آمیزی سریع و مرسوم (که برای رنگ آمیزی سریع علاوه بر تشنگی دادن موربانه ها به مدت ۶ ساعت، غلظت های رنگ را نیز ۲ برابر کرده بود) نشان داد که میزان بقا و سطح رنگ آمیزی موربانه ها در روش رنگ آمیزی سریع بیشتر از مرسوم می باشد و حتی بیان نموده که موربانه ها در رنگ آمیزی سریع کاهش وزن کمتری نشان می دهند (۵). در این آزمایش ما نیز با استفاده از رنگ آمیزی سریع (۸ ساعت تشنگی دادن موربانه ها بدون ۲ برابر کردن غلظت ها) توانستیم در مدت زمان کوتاهی به میزان بقا و سطح رنگ آمیزی معادل یا بیشتر از رنگ آمیزی مرسوم دست یابیم. از مزایای رنگ آمیزی سریع این است که موربانه ها طی ۲۴ ساعت بطور موفقیت آمیزی رنگ می شوند

گونه موریانه و نوع رنگ متفاوت می باشد (۳). سو و همکاران^۲ (۱۲) گزارش نمودند که Sudan Red7B بعد از مدت ۶ هفته در موریانه C. formosanus کمرنگ می شود و در R. flavipes کمتر از ۲ هفته ماندگاری دارد. هاگ سما و راست^۳ (۹) نشان دادند که Sudan Red7B در مدت ۱۲ روز و Sudan RedIV در مدت ۶ روز در کارگرهای R. hesperus کمرنگ می شوند در حالی که NR و NB برای حداقل ۱۱ هفته در این موریانه ها دوام دارند. بررسی های آزمایشگاهی و مطالعات اولیه صحرایی ما با رنگ های ۰/۱ درصد رنگ NB و ۰/۵NR درصد برای تعیین حوزه جستجوگری نشان داد که دوام این رنگ ها در موریانه M. diversus حدود ۶ ماه می باشد. بنابراین، روش رنگ آمیزی سریع با رنگ های بادوام و غلظت های غیر سمی برای رنگ آمیزی موریانه ها یکی از بهترین روش ها می باشد که می تواند جایگزین رنگ آمیزی مرسوم در مطالعات اکولوژیکی و رفتاری موریانه ها شود. چون علاوه بر رنگ آمیزی موریانه ها در مدت زمان کوتاه، تلفات و صدمات کمتری هم به آنها وارد می شود و در واقع یک روش سازگار با فون همزیست دستگاه گوارش موریانه ها می باشد. البته این موضوع یعنی ارتباط بین رنگ، مدت زمان رنگ آمیزی و فون تک سلولی های دستگاه گوارش موریانه ها، باید مورد مطالعه دقیق تری قرار گیرد تا رنگ مورد استفاده کمترین اثر منفی را بر فعالیت جستجوگری و میزان تغذیه و بقای موریانه داشته باشد.

سیاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر فراهم آوردن بخشی از

به فون تک سلولی های دستگاه گوارش آسیب برساند. دلاپلان و لافاژ^۱ (۲) طی بررسی هایی با رنگ Sudan Red7B نشان دادند که میزان بقای موریانه در غلظت ۱ درصد کمتر از غلظت ۰/۵ درصد می باشد. نامبردگان همچنین گزارش نمودند که تعداد پروتوزئوهای همزیست در موریانه هایی که تحت غلظت ۱ درصد بودند کمتر از تعداد پروتوزئوهای موریانه هایی است که در غلظت ۰/۵ درصد بودند. در نتیجه پیشنهاد نمودند که با افزایش غلظت رنگ، فون همزیست موریانه ها دچار آسیب و تعدادشان کاهش می یابد. در نتیجه بقای موریانه ها را نیز تحت تاثیر قرار می دهند (۲). احتمال می رود که کاهش میزان تغذیه، بقا و حتی کاهش وزن با افزایش غلظت رنگ های NR و NB که در رنگ آمیزی مرسوم مشاهده شده است، ناشی از آسیب دیدن باکتری های همزیست باشد. همچنین احتمال می رود که نوع رنگ نیز در تحت تاثیر قرار دادن این فون های همزیست نقش داشته باشند و بعضی رنگ ها روی این باکتریها و پروتوزئوها بیشتر تاثیر گذار هستند. به طور نمونه غلظت ۰/۵NB درصد تلفات بیشتر و میزان تغذیه کمتری نسبت به NR ۰/۵ درصد نشان داده است. بنابراین پاسخ های زنده مانده (واکنش های بقا) به رنگ ها، بسته به گونه های موریانه، نوع رنگ، غلظت آن و مدت زمان رنگ آمیزی متفاوت می باشد. میزان بقا در پاسخ به رنگ ها حتی در گونه های یکسان مربوط به زیستگاه های مختلف، متفاوت می باشد که این تفاوت ممکن است ناشی از اختلافات ژنتیکی در جمعیت ها یا تفاوت فیزیولوژیکی در اثر زیستگاه باشد (۲). بنابراین باید سمیت رنگ ها قبل از استفاده در آزمایش ها، جهت مطالعات اکولوژیکی بررسی شوند. دوام و ماندگاری رنگ نیز عامل مهم دیگری است که باید در نظر گرفته شود. دوام رنگ بسته به

2- Su et al.

3- Hagsma & Rust

1- Delaplane & Lafage

امکانات مالی و اجرائی این طرح صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱. حبیب پور، ب. ۱۳۷۳. بررسی فون، زیست شناسی و اهمیت اقتصادی موربانه های استان خوزستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده کشاورزی، ۱۴۳ ص.
2. Delaplane, K.S., and Lafage, J.P. 1989. Suppression of termite feeding and symbiotic protozoans by the dye, sudan red 7B. *Entomological Experimentalis et Applicata*, 50:265-270.
3. Evans, T.A. 1997. Evaluation of markers for Australian subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae & Termitidae). *Sociobiology*, 29 (3):277- 292.
4. Evans, T.A., Lenz, M., and Gleeson, P.V. 1999. Estimating population size and forager movement in a tropical subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Environmental Entomology*, 28(5):823-830.
5. Evans, T.A. 2000. Fast marking of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 35 (3):517-532.
6. Grace, J.K., and Abdallay, A. 1989. Evaluation of the dye marker sudan red 7B with *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 15(1):71-77.
7. Grace, J.K. 1990. Mark-recapture studies with *Reticulitermes flavipes* (Isoptera:Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 16(3): 297-303.
8. Grace, J.K., and Abdallay, A. 1990. A short – term dye for marking eastern subterranean termites (*Reticulitermes flavipes* Koll.) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Applied Entomology*, 109:71-75.
9. Haagsma, K.A., and Rust, M.K. 1993. Two marking dyes useful for monitoring field populations of *Reticulitermes hesperus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, 23:155-166.
10. Marini, M., and Ferrari, R. 1998. A population survey of the Italian subterranean termite *Reticulitermes lucifugus lucifugus* Rossi in Bagnacavallo (Ravenna, Italy), using the triple mark recapture technique (TMR). *Zoological Science*, 15: 963-969
11. Nobre, T., Nunes, L., and Bignell, D.E. 2004. Evaluation of mark- release-recapture dyes for *Reticulitermes grassei* Clement (Isoptera: Rhinotermitidae). The International Research Group on Wood Preservation, IRG / WP Doc 04- 20305
12. Su, N.Y., Tamashiro, M., Yates, J.R., Lai, P.Y., and Haverty, M.I. 1983. A dye, sudan red 7B, as a marking material for foraging studies with the Formosan subterranean termite. *Sociobiology*, 8(2):91-97.

13. Tsunoda, K., Matsuoka, H., Yoshimura, T., and Tokoro, M. 1999. Foraging populations and territories of *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(3):604-609.
14. Xing-ping, H., and Fang, Z. 2003. Aggressive relationship between two subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Acta Zoologica Sinica*, 49(3): 295-302.