التأثيرات التراكمية وغير التراكمية للمستخلصات المائية وبعض مستخلصات المذيبات العضوية لنبات الدفلة على يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus*

ثائر عبد القادر صالح* ، طارق محمد الفهداوي** و عبد علي ذاكر***
* كلية العلوم/ جامعة الانبار
** كلية الزراعة/ جامعة الانبار
*** كلية التربية/ جامعة الانبار

الخلاصة

تم دراسة المستخلص المائي وبعض المستخلصات العضوية لأوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* في هلاكات الأطوار اليرقية لبعوض *Culex quinquefasciatus* حيث أوضحت النتائج بان المستخلصات العضوية كانت اكثر تاثيراً من المستخلص المائي وان هناك فروق في التاثير بين المستخلصات العضوية ايضاً وكان أشدها تاثيراً المستخلص البترولي في التأثيرات التراكمية وغير التراكمية وأن يرقات الطور الأول كانت أكثر الأطوار تأثرا بالمستخلصات المائية والعضوية وأن أقل الأطوار تأثرا" كان الطور اليرقي الرابع ولجميع المستخلصات ، أن المستخلص البترولي لنبات الدفلة قد عزلت منه مكونتان وهي B,A وحسب تصاعد قيم R_f ، حيث كانت المكونة A أشد تأثيراً على يرقات البعوض من المكونة B ، حصلت تشوهات مظهرية في جميع المستخلصات لليرقات المعاملة مقارنة مع السيطرة ، إضافة إلى الزيادة في المدة الزمنية للطور اليرقي المعامل بالمستخلصات مقارنة مع معاملة السيطرة .

Accumulative and non-accumulative effects of Nerium oleander extracts on the larvae of *Culex quinquefasciatus*

Thaer A. Kader* , Tarik M. Abid and Abid A. Thaker*****
*** College of Science/ University of Al-Anbar**
**** College of Agriculture/ University of Al-Anbar**
***** College of Education/ University of Al-Anbar**

Abstract

This study was conducted to investigate the accumulative and non-accumulative effects of water and organic leaves extracts of *Nerium oleander* on larval instars of *Culex quinquefasciatus*. The organic extracts were more effective on larval instars *of Culex* and the petroleum ether extract was the most effective one. The first larval instars had the least resistance to water and organic extracts in comparison to other instars. The petroleum ether extract of *Nerium oleander* produced 2 constituents on thin layer chromatography A and B, the first one (A) was the most effective on larval instars of *Culex*.

المقدمة

يعد البعوض من أكثر المفصليات الماصة للدم شهرة إذ أنه بحكم طبيعة تغذية إناثه على الدم فأنها تهاجم الإنسان والحيوان مسببة القلق و الإزعاج بصورة مباشرة فضلا" عن فقدان كمية دم من العائل و الإصابة بالحساسية التي من شأنها أن تؤدي إلى ضعف النشاط وقلة الإنتاج، ومن جهة أخرى فأن البعوض يشكل واسطة مهمة في نقل العديد من مسببات الأمراض بين الإنسان والحيوان أو تلك الأمراض المشتركة بينهما وذلك بحكم تردد الحشرة على عدة عوائل لإكمال وجبة الدم اللازمة ، وقد يكون البعوض ناقلا" آليا" للمسببات المرضية ويكون دوره بمثابة أداة تلويث من غذاء إلى آخر أومن جرح إلى أخر (1). أن أهم المسببات المرضية التي ينقلها البعوض للإنسان والحيوان هي الأبتدائيات و الرواشح والديدان الخيطية (2). ولكون البعوض ناقلا" للكثير من الأمراض وكونه مسبب رئيسي للقلق والإزعاج فقد قام الإنسان بالبحث عن وسيلة للتخاص من البعوض ، و من المعروف أن الإنسان ومنذ فترة بعيدة عرف أهمية المركبات الثانوية النباتية كمواد طاردة أو قاتلة أو سامة للحشرات الضارة، فكان يستخدم أزهار و أوراق و جذور و ثمار بعض النباتات الحاوية على مواد سامة لقتل أو طرد الحشرات (3، 4 و 5)، ومن النباتات المهمة اقتصادياً هو نبات الدفلة *Nerium oleander* وقد استطاع بعض الباحثين من عزل بعض المركبات الثانوية من نبات الدفلة، فقد عزل المركب Oleanderin إضافة إلى كلايكوسيدات أخرى (6). يعد نبات الدفلة من النباتات الطبية ويعتبر ساماً بأكمله وذلك لاحتوائه على المادة السامة Oleandrin glycosides المؤثرة في عضلة القلب كما يحتوي على اللبن النباتي الحاوي فضلاً عن Oleandrin glycosides على كلايكوسايد Neriine و Folinerin و Neriantine و Neriodorein و Rosaginine و Neriodorein giloxigenine و Pseudocurarine وأحتوائه على زيوت طيارة وشمع ومواد دبغية Tannic acid ومواد راتنجية (7، 8). نفذت التجربة الحالية لمعرفة التاثيرات التراكمية وغير التراكمية في يرقات البعوض *Culex quinquefasciatus*.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات النباتية :

جمعت العينة النباتية من أوراق الدفلة المستخدمة في البحث من حدائق جامعة الانبار مقابل كلية العلوم والتي شخصت في معشـب كلية العلوم/ جامعة بغداد خلال شهري (تشرين الأول وتشرين الثاني) عام 2003، وبعد جمع النماذج النباتية تم تنظيفها من الأتربة وغسلها بشكل جيد بالماء ، ثم نشرت على مساطب بلاستك بدرجة حرارة المختبر (25 م ±5) آنذاك لغرض تجفيفها مع مراعاة تقليبها بشكل مستمر ، وبعد أن جفت بشكل تام تم طحنها بواسطة مطحنة كهربائية اعتيادية ووضعت في أكياس نايلون وحفظت بدرجة حرارة المختبر لحين الاستعمال .

جمع وتربية البعوض

جمعت الأطوار غير البالغة لبعوض *C. quinquefasciatus* (يرقات وعذارى) من أحد أماكن تصريف المياه في مدينة الرمادي والتي شخصت في متحف التاريخ الطبيعي/بغداد ، حيث تم أخذ العينات بواسطة قناني زجاجية إلى المختبر خلال شهري تشرين الأول والثاني عام 2003 ، وضعت اليرقات والعذارى في أحواض بلاستيكية طولها 55 سم وعرضها 30 سم وعمقها 15 سم حاوية على مـاء الحنفية

مخلوط معه ماء المجمع المائي بمقدار 10 لتر للحوض الواحد وبواقع 7 أحواض بلاستيكية . وأضيف بعد ذلك الغذاء المكون من (فتات الخبز) ثم وضعت هذه الأحواض البلاستيكية في قفص ذات أعمدة ألمنيوم ومغطى بشبكة من قماش التول ذات فتحات صغيرة لا يمكن لبالغات البعوض اختراقها يبلغ طول أعمدة القفص 210 سم وعرضها 100 سم وارتفاعها 120 سم ووضع في المختبر بدرجة حرارة (25 م ±5) ورطوبة نسبية مابين (50- 70 %) وبدرجات إضاءة متفاوتة ما بين الضوء والظلام وقد تم قياسها بوساطة جهاز Thermohygrograph . إضافة إلى هذه الأحواض البلاستيكية الكبيرة فقد وضعت معها أحواض بلاستيكية أصغر منها حيث كان حجمها 30 سم طول و 10سم عرض و 10 سم عمق وبواقع 4 أحواض لأستخدامها في التجارب المختلفة . بعد ذلك ظهرت البالغات في القفص وبأعداد كبيرة ، وضعت قطعة قطن مشبعة بالمحلول السكري تركيز 10 % في إناء بلاستيكي صغير سعة 100 سم^3. ولغرض الحصول على رفتات البيوض لمتابعة دورة حياة كاملة للبعوض إذ تم تغذية إناث البعوض على دم الطيور وذلك بوضع طيرين حمام بعد إن أزيل الريش من ظهرها وجناحيها حتى يسهل على إناث البعوض أخذ وجبة دم لغرض إنتاج البيض (9)، بعد الحصول على رفتات البيوض وذلك بجمع قوارب البيض Egg rafts الموضوعة من قبل الإناث المتغذية على وجبة الدم وذلك بواسطة فرشاة صغيرة ونقلت إلى أحواض أخرى في أقفاص أخرى لغرض الحصول على جيل آخر من اليرقات وتنشأتها وتحديد الأعمار اليرقية التي تمر بها (10). وبعد الحصول على يرقات الطور الأول وضعت كل 20 يرقة في إناء بلاستيكي سعة 200 سم^3 ووضع فيه 100سم^3 من ماء الحنفية ووضع لها الغذاء مع تبديل الماء كل (يومين – ثلاثة أيام) لتلافي تكون طبقة تعفن على سطح الماء فتم معرفة تحول اليرقات إلى الطور الثاني عن طريق الانسلاخات الموجودة على سطح الإناء البلاستيكي ومن تغير حجم اليرقة أيضا .

تحضير المستخلصات المائية

حضرت المستخلصات المائية لمسحوق أوراق نبات الدفلة، باخذ 20 غم من مسـحوق المادة الجافة لأوراق النبات، ووضعت في دورق مخروطي زجاجي سعة 500 سم^3 يحتوي على 200سم^3 ماء مقطر. خلطت المادة النباتية بالماء بأستخدام الخلاط المغناطيسي لمدة نصف ساعة وبدرجة حرارة المختبر، بعد ذلك رشح المحلول بقطعة قماش من التول أو بقطعة شاش للتخلص من المخلفات النباتية، وبعدها تم استخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة للحصول على مستخلص نباتي رائق (11 و 12). وضع المحلول الرائق في الحاضنة لحد درجة حرارة 35 م لحين جفاف المستخلص، بعدها اخذ وزن (1 غم) من المستخلص الجاف وأكمـل الحجم إلى 100 سم^3 مـاء مقطـر وبـذلك تم الحصـول على محلول اساس تركيزه 10000 جزء بالمليون حيث مزج بواسطة دورق حجمي بعد إغلاقه أو بواسطة الخلاط المغناطيسي لمدة 15 دقيقة لحين الذوبان الكامل للمستخلص، ومن هذا المحلول تم تحضير بقية التراكيز والتي كانت (1000، 2000، 3000، 4000، 5000، 6000، 7000 جزء بالمليون)، أما محلول السيطرة فكان ماء الحنفية فقط .

تحضير مستخلصات المذيبات العضوية

اتبعت طريقة Ladd واخرون (13) للحصول على المستخلصات العضوية لأوراق نبات الدفلة ، إذ تم اختيار ثلاث مذيبات عضوية مختلفة القطبية وهي الكحول الاثيلي تركيزه99.5% كمذيب قطبي والثاني

خلات الاثيل بتركيزه 99.5% كمذيب متوسط القطبية والثالث عديم القطبية وهو الايثر البترولي (50–70م) بتركيزه 99.5% .

تحضير مستخلص الايثر البترولي.

أخذ 50غم من مسحوق المادة الجافة لأوراق نبات الدفلة ، وتم استخلاص المواد منها بصورة متتابعة بواسطة جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet Extractor . ووضع مسحوق المادة الجافة لأوراق النبات في جهاز الاستخلاص المستمر ووضع في الدورق الخاص بالمذيب 500سم3 من مذيب Petroleum Ether وبدأت عملية الاستخلاص لمدة 8 ساعات بدرجة حرارة 50-60 م ، بعدها تم رفع النموذج وركز المحلول الناتج بواسطة جهاز المبخر الدوار Vacuum Rotary Evaporator على درجة حرارة 35 م (13). بعد ذلك وضعت في المجفف Dryer بدرجة حرارة 30 م لمدة ساعة للتخلص من كمية المذيب المتبقية. ولغرض تحضير المحلول الأساس تم اخذ (1غم) من المستخلص ووضع في دورق حجمي سعة 100 سم^3 وأضيف إليه 5 سم^3 من المذيب الثنائي Acetone : Ethanol بتركيز 99.5 لكل مذيب بمقدار 1:1. رج النموذج لحين الذوبان بعدها أكمل الحجم إلى 100 سم 3 من الماء المقطر ، وبذلك تم الحصول على محلول اساس تركيز 10000 جزء بالمليون ومنه تم تحضير بقية التراكيز ، أما السيطرة Control فقد تم اخذ 5 سم^3 من المذيب الثنائي واكمل الحجم إلى 100 سم^3 من الماء المقطر حيث كانت التراكيز (10، 25، 50 ، 100، 200، 300، 400، 500 جزء بالمليون) للمستخلص والسيطرة .

تحضير مستخلص خلات الاثيل والكحول الاثيلي

بعد الاستخلاص بمذيب الايثر البترولي اخذ المسحوق نفسه من جهاز الاستخلاص المستمر وتم نشره على أكياس نايلون لغرض تجفيفه واستخلاص المركبات منه بمذيب أخر ، حيث تم اخذ المسحوق المجفف ووضع مرة ثانية في جهاز الاستخلاص المستمر ووضع مذيب خلات الاثيل في الدورق بمقدار 500 سم^3 وبدأت عملية الاستخلاص نفسها بعد إكمال الاستخلاص اخذ المستخلص ووضع في المبخر الدوار لغرض تركيز المحلول وبعدها وضع في الحاضنة وبعد تجفيفه ذوب 1 غم من المستخلص الجاف بواسطة 5 سم^3 من المذيب الثنائي (AE) وبنسبة (1:1) حيث كان تركيز المذيبين 99.5 % وبعدها اكمل الحجم إلى 100 سم^3 ماء مقطر واعتبر محلول اساسي Stock Solution تركيزه 10000 جزء بالمليون ومنه حضرت بقية التراكيز ، أما السيطرة Control فقد تم اخذ 5 سم^3 من المذيب الثنائي (AE) واكمل الحجم إلى 100 سم^3 من الماء المقطر، وقد تم تحضير التراكيز الاتية من المستخلص: (250، 500، 750، 1000، 1250، 1500 جزء بالمليون)، وبعدها استخلص بنفس الطريقة بواسطة الكحول الاثيلي

تحديد الفعالية الحيوية للمستخلصات ضد يرقات البعوض

تأثير المستخلصات المائية :

بعد تغذية إناث البعوض على وجبة دم بدأت الإناث بوضع قوارب البيض egg raffts، وبعد فقس البيوض إلى يرقات ، أخذت يرقات بعمر اليوم الأول أي منذ بدأ الفقس حيث كانت شفافة وصغيرة الحجم حيث وضعت 20 يرقه في كل إناء بلاستيكي سعة 200سم^3 وضع فيه 100سم^3 ماء حنفية ووضع لها الغذاء ، وتم متابعتها منذ الفقس وحتى تكون العذارى حيث تم اخذ (7) مكررات للمعاملة الواحدة ، ولغرض معرفة نسبة الهلاكات التراكمية لليرقات حيث كانت اليرقات الميتة تزال يومياً بواسطة فرشاة صغيرة وكذلك

ملاحظة التشوهات الحاصلة في تلك اليرقات ، وبعد حساب نسبة الهلاكات عُدلت بـواسطة معـادلة Abbat (14) المصححة للهلاكات معادلة Abbott= هلاك المعاملة %- هلاك السيطرة %/100%– هلاك السيطرة % × 100 المعدلة للهلاكات، وكذلك تم حساب مدة نمو الدور اليرقي مقارنة بالسيطرة، حيث تم اخذ التراكيز (1000، 2000، 3000، 4000، 5000، 6000، 7000 جزء بالمليون). وقد استخدمت هذه المعادلة في جميع التجارب اللاحقة الاخرى .

ولغرض معرفة تأثير المستخلصات المائية في الأطوار الأربعة تم اخذ كل طور على انفراد وتم إجراء التجارب عليها بواقع 7 مكررات لكل طور وبنفس التراكيز ، حيث تم معرفة كل طور من خلال تربيتها ومتابعتها منذ فترة الفقس ومن خلال الانسلاخات الموجودة على سطح الإناء ومن خلال حجم اليرقة غير المعاملة بعد .

تأثير مستخلصات المذيبات العضوية في الأطوار اليرقية لبعوض *culex quinquefasciatus*

مستخاص الايثر البترولي

كررت جميع التجارب المشار إليها في تأثير المستخلصات المائية من حيث التأثيرات التراكمية ونسب الهلاكات بالظروف البيئية نفسها من درجة حرارة ورطوبة نسبية ماعدا الاختلاف في التراكيز للمعاملات والسيطرة حيث تم اخذ التراكيز التالية (10، 25، 50، 100، 150، 200، 300، 400، 500 جزء بالمليون).

مستخاص خلات الاثيل والكحول الاثيلي

أُعيدت نفس التجارب في تأثير المستخلصات المائية مع مراعاة تغير التراكيز حيث تم اخذ التراكيز التالية للمعاملات والسيطرة (250، 500، 750، 1000، 1250، 1500 جزء بالمليون).

الكشف عن مكونات المستخاص البترولي لنبات الدفلة باستخدام تقنية ألـ Thin Layer Chromatography .

تم الكشف عن مكونات المستخاص البترولي لأوراق النبات باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة إذ استعملت في هذه التقنية صفائح زجاجية (20 × 5 سم) مطليـة بهـلام السـليكا Silica Gel GF 245 بسمك (0.25 ملم) وقد تم تنشيط هذه الصفائح بوضعها في فرن بدرجة 100 م لمدة ساعة واحدة ، واستعملت باتجاه الصاعد باستخدام المذيب Cyclohexane : Acetone بنسبة (3 : 7) بعد تحميلها (10) مايكروليتر لكل بقعة Spot واستغرقت عملية الفصل بحدود (60 دقيقة) بعدها جففت الصفيحة من المذيب بواسطة Hair Dryer ، وتم الكشف عن البقع المفصولة للزيت المستخاص باستعمال محلول كلوريد الانتيمون الكلوروفورمي بنسبة (20%) لتظهير البقع المفصولة (11، 15 و 16)، وحددت قيم R_f (Relative flow) للبقع المفصولة وفق المعادلة التالية :

قيمة التحرك النسبي R_f = المسافة التي قطعها المركب / المسافة التي قطعها المذيب (17) . وتم تجنب لمس كلوريد الانتيمون باليد أثناء العمل لكونه مادة متلفة للجلد.

فصل مكونات المستخلص البترولي لأوراق نبات الدفلة بواسطة تقنية العمود Column Chromatography

تم عزل مكونات المستخلص البترولي لأوراق النبات ، حيث استعمل في هذه التقنية عمود زجاجي (سحاحة 100 سم^3) أبعادها (2 × 65 سم) مملوءة بمستحلب Sularry هلام السليكا Silica gel G60 (Mesh 230-400 µm) وبواقع 35 غم من مادة السليكا في 50 سم^3 من السائل المفرق Elunet الذي كان عبارة عن مزيج من (Cyclohexane : Acetone) بنسبة (3 : 7) على التوالي، أذيب 1 غم من المستخلص البترولي لأوراق النبات المراد فصل مكوناته في 5 سم^3 من السائل المفرق وأضيف بلطف إلى سطح السليكا بعدها تم حقن العمود بالسائل المفرق لحين انتهاء عملية الفصل حيث تم وضع قمع فصل Separation Funnel في أعلى السحاحة تقطر من السائل المفرق بقدر السائل الذي يخرج من اسفل السحاحة ، حيث كان معدل السريان Flow rate في العمود مقداره 5 سم^3 / دقيقة ، وقد تم استلام وتجميع العينات المنفصولة من نهاية العمود بواسطة أنابيب اختبار ذات سداد بلاستك لتمنع تطاير المذيب وبواقع 10 سم^3 لكل أنبوبة ، بعدها فحصت مكونات العينات بواسطة (T.L.C) وتم تظهيرها بواسطة كلوريد الانتيمون الكلوروفورمي (20%) ، حيث جمعت العينات ذات المسارات المتشابهة (R_f) وذات لون واحد في عملية التظهير معاً ضمن مجموعة واحدة (11).

دراسة تأثير المكونات المعزولة من المستخلص البترولي لأوراق نبات الدفلة على الأطوار اليرقية للبعوض.

اختبرت كفاءة مكونات المستخلص البترولي المعزولة من النبات على يرقات البعوض وبتراكيز كانت (250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 جزء بالمليون)، حيث أخذت المكونة الواحدة وجففت وأذيبت بالمذيب الثنائي (AE) وجربت على يرقات بعمر اليوم الأول ، ويتم عزل اليرقات الميتة يومياً بواسطة فرشاة صغيرة واستمرت العملية الى ان تحولت اليرقات الحية عذارى ، حيث وضعت 20 يرقة لكل كوب بلاستيكي يحتوي على 100 سم^3 ماء وبواقع 5 مكررات للمعاملة الواحدة وكذلك السيطرة، سجلت النتائج بعدها وصححت بواسطة معادلة (14) المعدلة للهلاكات ، أما التأثير غير التراكمي فقد أخذت يرقات بعمر الطور الأول منذ بداية فقس البيوض ولحين وصولها إلى يرقات الطور الثاني ، وأخذت يرقات بعمر الطور الثاني على حدة والثالث كذلك والرابع ايضاً على حدة وتم معاملتها بنفس الطريقة في الطور اليرقي الأول . وسجلت النتائج للمعاملة والسيطرة للمكونة الواحدة وبنفس التراكيز والمكررات.

التحليل الإحصائي .

أتبع نظام التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C.R.D.) في تنفيذ التجارب، ثم تبع ذلك استعمال طريقة تحليل التباين Analysis Of Variance (ANOVA) لتحليل النتائج، تبعه بعد ذلك أختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D.) للتأكد من معنوية الفروقات بين معدلات المعاملات المختلفة (18) .

النتائج والمناقشة

تأثير المستخلصات المائية للنبات المدروس

أوضحت النتائج بان المستخلص المائي لأوراق نبات الدفلة أبدى تفوق في كفاءته الحيوية للتأثير التراكمي وغير التراكمي على يرقات البعوض *C. quinquefasciatus* وأن هذه الكفاءة ترتبط ارتباطا"

وثيقا" بزيادة التركيز المستخدم حيث أعطى التركيز (3000 ppm) نسبة قتل بلغت 100% (جدول 1) ، كما أوضح الجدول (2) أن الطور اليرقي الأول كان أكثر الأطوار تأثراً بالمعاملات ولكافة التراكيز بالنسبة للنبات ، وقد تراوحت نسبة الهلاكات للأطوار اليرقية (الأول والثاني والثالث والرابع) لنبات الدفلة ، وقد كانت هناك وجود تشوهات مظهرية في اليرقات الميتة تمثلت بظهور بقع سوداء على أجسام اليرقات أو أسوداد اليرقة بأكملها أو موت اليرقات أثناء أنسلاخها إلى الطور اليرقي الأخر أو الطور العذري أو ظهور حالات وسط بين اليرقات والعذارى أو ظهور حالة العذراء أو اليرقة الشاحبة (Albino) وموتها بعد ذلك دون أكمال دورة حياتها أو حدوث أستطالة في اليرقات وكبر في حجمها أكثر من الحد الطبيعي لمعاملة السيطرة أو قصر في اليرقات أو تشوهات في حلقات البطن ، مما يدل على الفعل التثبيطي للنبات المدروس على النمو اليرقي لهذا المستخلص الذي يشابه عمل منظمات النمو ، وأن معظم الهلاكات حدثت خلال الانسلاخ والانتقال من طور يرقي إلى أخر ، وقد يكون السبب هو احتواء المستخلص المائي للنبات المدروس على مركبات مانعه لتكوين الكايتين والتي من المحتمل أن تعمل على منع تكوين الكايتين في الأدوار غير البالغة ، إذ أن الطور اليرقي المنسلخ يعجز عن بناء كيوتكل جديد مما يؤدي إلى هلاك الحشرة (19) ، او بسبب تثبيطها لفعالية أنزيم Tyrosinase في يرقات البعوض وهذا الأنزيم هو المسؤول المباشر عن تصلب الكيوتكل مما يؤدي إلى تثبيط نموه وتطوره (20) . وأشار Mohsin واخرون (21) أن مستخلصات نباتية عديدة أثبتت فعاليتها كمبيدات ضد الآفات الحشرية ومن ضمنها البعوض . أن التشوهات الحاصلة ليرقات البعوض ، مشابهة لتلك الناتجة من تأثير منظم النمو Diflubenzuron , Fenoxycarb ضد يرقات بعوض *C. pipiens* (22). أن وجود نسبة هلاكات تراكمية عالية للنبات المدروس في اليرقات يدل على وجود حالات تسمم عالية وتراكم مواد فعالة موجودة في النبات المدروس في القنوات الهضمية لليرقات لذلك حصل هناك ليس فقط هلاكات بل حالات تأخر في النمو وظهور تشوهات كثيرة ، وربما تعود في ذلك إلى تأثير هذه المركبات على الأنزيمات المحللة للمواد الغذائية الموجودة في القناة الهضمية ، وتشير الدراسات السابقة (23) أن الخلايا الطلائية للقناة الهظمية للحشرات تحتوي على مجموعة من الأنزيمات Microsomal oxizuse enzymes وظيفتها إزالة التأثير السام للمركبات الطبيعية في النبات المتغذى عليه وان أي مركب يؤثر على هذه الأنزيمات يؤدي إلى تسمم أنسجة القناة الهظمية للحشرة ومن ثم موتها . وقد دلت نتائج الكواشف الترسيبية الاستدلالية (جدول 3) على احتواء النبات المدروس على مواد فعالة مختلفة من المركبات الثانوية . وأن ظهور يرقات وعذارى ذات لون أبيض شاحب يعود ربما إلى تأثر صبغة الميلانين الموجودة في كيوتكل اليرقة أو العذراء فتصبح اليرقة أو العذراء خالية من هذه الصبغة وبالتالي تضعف مقاومتها للظروف البيئية المحيطة بها ، وتتفق هذه النتيجة مع ما أشار أليه (24) أن هذه الحالة تحدث نتيجة معاملة البعوض بمثبط النمو Mon-0585 الذي يمنع عملية الملننة Melanization (عملية صناعة الميلانين) . كما حصل ارتفاع في المدة الزمنية لفقس اليرقات وقد يعود السبب في ارتفاع المدة الزمنية في المعاملات إلى تثبيط عملية الفسفرة التأكسدية Oxidative phosphorylation للمايتوكوندريا ، إذ وجد أن بعض المستخلصات المائية تثبط عملية الفسفرة التأكسدية للمايتوكوندريا المعزولة من أنسجة القناة الهضمية في بعض الحشرات حرشفية الأجنحة(25) .

جدول (1) التأثير التراكمي للمستخلص المائي لأوراق نبات الدفلة على الأطوار اليرقية لبعوض *C.quinquefascitus*

التركيز PPM	نسبة الهلاكات المصححة لليرقات %
1000	69.28
2000	89.28
3000	100
4000	100
5000	100
6000	100
7000	100

L.S.D. = 17.4541

جدول (2) التأثيرغير التراكمي للمستخلصات المائية لأوراق نبات الدفلة على الأطوار اليرقية لبعوض *C.quinquefascitus*

التركيز PPM	نسبة الهلاكات المصححة لليرقات %			
	ط1S	ط2S	ط3S	ط4 R
1000	56.42	51.42	52.14	25.71
2000	78.57	73.57	73.57	45.71
3000	95.71	90.71	92.14	53.57
4000	100	97.85	100	60.71
5000	100	100	100	64.28
6000	100	100	100	73.57
7000	100	100	100	79.28

*** ط تعني طور *الاحرف المتشابهة تدل على وجود فرق معنوي total of phases L.S.D. = 20.018 N. ol.**
L.S.D.= 10.7628

ومن بيان النتائج في الجدول (2) بأن الطور اليرقي الأول أكثر تأثراً من بقية الأطوار وخصوصاً الطور الرابع الذي كان اقل الأطوار تأثراً في جميع المعاملات فقد يكون السبب في ذلك هو ضعف طبقة الكيوتكل المحيطة باليرقات في الطور اليرقي الأول عند بداية تكوينها أو قد يكون السبب في كون اليرقات الفاقسة حديثاً بحاجة إلى كميات كبيرة من الغذاء لغرض نموها مما يتسبب في دخول كميات كبيرة من المستخلص مع غذائها إلى داخل قناتها الهضمية مؤدياً إلى حدوث التسمم أو قد يكون السبب في أن تكون مركبات هذه المستخلصات مانعة للتغذية Feeding deterrents مما يؤدي إلى هلاك اليرقات بسبب نقص التغذية (26) .

جدول (3) يوضح الكشوفات الاستدلالية للنبات المدروس

نوع الكشف	نتيجة الكشف في مستخلص أوراق نبات الدفلة	نوع الكشف	نتيجة الكشف في مستخلص أوراق نبات الدفلة
كاشف واكنر	-	كاشف كلوريد الحديديك	+
كاشف ماير	-	*كشف الفينولات	+
كاشف دراجندورف	-	*كشف الكومارينات	-
كاشف التانيك	-	*كشف الفلافونيدات	+
كاشف خلات الرصاص	+	كاشف الرغوة	+
كاشف كلوريد الزئبقيك	+	كاشف قطرة الزيت	+
*كشف التربينات	+	كاشف فهلنك	+
*كشف الراتنجات	+	كاشف بندكت	+
كاشفUV	+	*كشف الاحماض الامينية	+

تأثير المستخلصات العضوية للنبات المدروس :

يوضح الجدولان (4، 5) بان نسبة الهلاكات في مستخلص الايثر البترولي كانت أعلى بكثير من نسبة الهلاكات في مستخلصي خلات الاثيل والكحول الاثيلي على الرغم من الاختلاف في تركيز المستخلص البترولي، مما يدل على أن المركبات الأكثر فاعلية الموجودة في النبات قد استخلصت في هذا المذيب، وأيضا تدل على أن المركبات الفعالة أكثرها كانت مركبات غير قطبية وغير ذائبة في الماء. وبما أن هذه المذيبات (العضوية) أعطت نسبة قتل جيدة فهذا يدل على أن هذه المركبات تم استخلاصها بشكل أفضل مقارنة مع الماء، قد يرجع السبب في كون الايثر البترولي أفضل مذيب للمواد الأكثر فاعلية في النبات المدروس من ناحية الهلاكات التراكمية إلى تراكم المركبات المتواجدة في المستخلص (الزيوت الأساسية) في القناة الهضمية للحشرة مما يؤدي إلى تسمم الحشرة، أو قد تتعارض هذه المواد مع عمل نظام الغدد الصم ، مما يؤدي إلى خلل في عملية النمو وزيادة في هلاك الحشرة (27). وقد أحدث هذا المستخلص تشوهات مظهرية في شكل اليرقات والعذارى، وقد حصل تأخر في نمو الأدوار اليرقية أثناء المعاملة، أن اغلب المواد التي يستخلصها مذيب الايثر البترولي هي ذات طبيعة لا قطبية ولذلك يمكنها العبور من خلال الطبقة الشمعية (اللاقطبية) المغلفة لكيوتكل اليرقات وتؤثر فيها، وقد ذكر Lord ; Burt (1968) عن(3) أن المتفق عليه بشكل عام أن المبيدات التي تذوب بالدهون يمكنها العبور بسهولة من خلال جدار جسم الحشرة لتصل إلى مناطق التأثير (وهو مكان ما في الجهاز العصبي) عن طريق الدم، ودلت النتائج في الجدول (4) على إن المستخلص البترولي لنبات الدفلة كانت شديد الفعالية ، وهذا ربما يرجع إلى نوعية المواد (الزيوت الأساسية وغيرها من المواد التي تذوب في البتروليوم أيثر) الموجودة في النبات .

جدول (4) التأثير التراكمي لمستخلصي Ethanol & Ethylacetate لأوراق النبات المدروس على الأطوار اليرقية لبعوض *C.quinquefascitus*

نسبة الهلاكات المصححة لليرقات %		التركيز PPM
Ethanol	Ethyl acetate	
42.85	29.28	**250**
75.71	51.87	**500**
89.28	70.64	**750**
98.57	81.74	**1000**
100	100	**1250**
100	100	**1500**

L.S.D. = 26.8525 Ethyl acetate L.S.D. = 28.285 Ethanol

جدول (5)التأثير التراكمي للمستخاص البترولي لأوراق النبات المدروس على الأطوار اليرقية للبعوض

نسبة الهلاكات المصححة لليرقات %	التركيز PPM
Nerium oleander	
49.28	**10**
55.71	**25**
67.14	**50**
89.39	**100**
98.38	**150**
100	**200**
100	**300**
100	**400**
100	**500**

L.S.D. = 22.7432

جدول (6) التأثير غير التراكمي للمستخاص الايثانولي وخلات الاثيل لأوراق النبات المدروس على الأطوار اليرقية لبعوض *Culex quinquefasciatus*

نسبة الهلاكات المصححة لليرقات%								التركيز PPM
خلات الاثيل				الكحول الاثيلي				
ط4 R	ط3 SR	ط2 SR	ط1 S	ط4 R	ط3 SR	ط2 R	ط1 S	
16.42	20.71	13.57	23.57	9.28	23.57	14.28	37.85	**250**
20.71	46.42	36.42	48.57	16.42	30.71	30.71	63.57	**500**
29.31	63.15	57.89	68.42	28.57	53.57	45.71	82.85	**750**
33.58	78.62	67.94	78.62	34.28	72.14	61.42	95.00	**1000**
39.67	94.44	89.67	94.44	49.28	81.42	69.28	100.00	**1250**
66.13	97.57	94.35	100.00	56.38	89.47	78.94	100.00	**1500**

*** ط تعني طور   *الاحرف المتشابهة تدل على وجود فرق معنوي**

L.S.D. = 32.9788 Ethyl acetate total of phases L.S.D.= 12.5858

L.S.D. = 28.8047 Ethanol total of phases L.S.D.= 12.832

لقد بينت الجداول (6،7) التأثيرات غير التراكمية للأطوار اليرقية وقد كان الطور الأول أكثرها تأثراً وكانت النسب متفاوتة في بقية الأطوار الأخرى وكان المستخاص البترولي أشدها تأثيراً، وقد يعزى

سبب هلاك الطور الأول إلى كونه حساس جداً لأية مادة أو مركب كيميائي يتعرض لها ، ولكون أجسامها وأجهزتها رقيقة ، فضلاً عن كون المادة الفعالة في المستخلص قد تعمل كمادة محددة للتغذية (Feeding determinants) وتمنع اليرقات من التغذية وبالتالي تموت جوعاً (26) .

جدول (7) يوضح تأثير المستخلص البترولي لأوراق النبات المدروس في الهلاكات غير التراكمية ليرقات بعوض *C.quinquefascitus*

التركيز PPM	نسبة الهلاكات المصححة لليرقات %			
	S1ط	S2ط	S3ط	S4ط
10	33.57	20.71	34.28	12.14
25	49.28	36.42	49.28	26.42
50	63.71	57.14	66.42	42.14
100	87.87	74.23	90.14	52.27
150	96.77	91.94	95.96	66.98
200	100	100	100	69.74
300	100	100	100	73.58
400	100	100	100	80.60
500	100	100	100	90.73

*** ط تعني طور *الاحرف المتشابهة تدل على وجود فرق معنوي petrolum ether total of phases L.S.D. = 26.72**
L.S.D.= 12.624

تأثير الأجزاء المفصولة من المستخلص البترولي لنبات الدفلة

بينت النتائج في الجدول (8) ونتائج كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) بان المستخلص البترولي لنبات الدفلة قد اظهر مكونتين (Spots) على الصفيحة في الطور المتحرك (Cyclohexan: acetone) وبنسبة 7:3 حيث سميت المكونات المفصولة حسب تصاعد قيم R_f لها حيث كان R_f للمكونة A = 0.4 وB = 0.64 وحسب لون البقع المفصولة حيث كان لون البقعة A قبل إضافة الكاشف خضراء وأصبح لونها حمراء بعد إضافة الكاشف (كلوريد الانتيمون الكلوروفورمي 20%)، أما بالنسبة للبقعة B فكانت صفراء قبل إضافة الكاشف وأصبحت خضراء بعد إضافة الكاشف (الصورة 1). حيث دلت النتائج بان المكونتين A و B كانت ذات تأثير فعال في يرقات بعوض *C. quinquefasciatus* التراكمية وغير التراكمية وبدون فرق معنوي بينهما ، حيث كان تأثير المكونة A بين 25- 60.82% و B بين 17 -45.36% في التركيز ما بين (250 – 1500 ppm)، دلت النتائج على إن المكونة A ذات تأثير اكبر وأقوى من المكونة B ، كما حصلت تشوهات طفيفة في اليرقات المعاملة إضافة إلى إطالة في العمر اليرقي وزيادة في نسبة الهلاكات بزيادة التركيز. وان زيادة مدة دورة الحياة ممكن إن تكون بسبب تثبيط الفسفرة التأكسدية في المايتوكوندريا الموجودة في خلايا أنسجة القناة الهضمية الوسطى(25) . كما انه حصل هناك إطالة في عمر اليرقات المعاملة، ان تأخر او تثبيط النمو نتيجة المعاملة بالمستخلصات قد يمنع أو يؤخر تحرر هرمون بزوغ البالغات Edyson hormone من منطقة معقد الدماغ – غدد الأجسام القلبية corpus cardiacum –Brain complex والذي يطلق بصورة طبيعية بعد الانخفاض المفاجـئ لمستوى الانسلاخ في الدم وعند تأخر هبوط مستوى الأخير سوف يتأخر تحرير هرمون البزوغ وبذلك تطول مدة نمو الأدوار غير البالغة (28، 29).

جدول (8) التأثير التراكمي للمكونات المفصولة من المستخاص البترولي لأوراق النبات

التركيز PPM	نسبة الهلاكات المصححة لليرقات %	
	المكوناتA S	المكوناتB S
250	25	17
500	33	24
750	39	29
1000	48	34
1250	53	39
1500	60.82	45.36

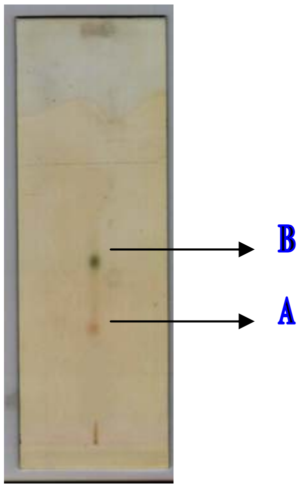
*الاحرف المتشابهة تدل على وجود فرق معنوي L.S.D. = 15.6558

جدول (9) التأثير غير التراكمي للاجزاء المفصولة لمستخاص نبات الدفلة على الاطوار اليرقية للبعوض

التركيز PPM	نسبة الهلاكات المصححة لليرقات %							
	المكونات A S				المكونات B S			
	ط1 S	ط2 SR	ط3 S	ط4 R	ط1 S	ط2 S	ط3 S	ط4 S
250	20	12	20	6	12	9	11	2
500	28	17	26	10	19	12	17	6
750	37	22	35	17	24	19	21	11
1000	44	29	41	20	30	23	28	18
1250	51	33	48	26	41	30	39	22
1500	58.76	42.26	57.73	30.92	53.60	38.14	48.45	28.86

* ط تعني طور phases of *N. oleander* ، *الاحرف المتشابهة تدل على وجود فرق معنوي L.S.D. =15.6558
14.88 A , 15.40 B

وقد بينت النتائج في الجدول (9) بان المكونة A كانت أكثر تأثيراً من الناحية غير التراكمية في يرقات البعوض تليها المكونة B . كما وبينت النتائج إن هناك علاقة طردية بين التركيز ونسبة الهلاكات ، وأن الطور الأول كان أكثر تأثرا"من بقية الأطوار اليرقية الأخرى، ربما يعود السبب في كون الطور الأول أكثر الأطوار تأثرا" عن بقية الأطوار إلى كون الطور الأول يكون حساس جدا" ويحتاج إلى تغذية عالية فحصول تراكم في المواد الموجودة في المكونات المفصولة ربما تعمل كمانعات تغذية أو مثبطات نمو وبالتالي يتأثر بشكل كبير أو يكون السبب في كون المركبات المعزولة من النبات ربما تخترق الفم أو الطبقة الخارجية لجسم الحشرة وتؤثر على عمل الغدد الصم أو ربما تعمل كمنظمات نمو حشرية (25) .



صورة (1) توضح الأجزاء المفصولة من المستخلص البترولي لأوراق نبات الدفلة

المصادر

1.أبو الحب ، جليل كريم . (1979) . الحشرات الطبية والبيطرية في العراق (الجزء النظري) . كلية الزراعة / جامعة بغداد ، 450 صفحة .

2. James , M.T. and Harwood . R.F. (1969) . Herm's medical Entomology 6th Ed. Academic press New York . London . P : 98-256 .

3.قريشي ، م. سعيد . (1990) . المكافحة الكيميوحيوية وتأثيراتها على الاقتصاد والبيئة والانتخاب الطبيعي . (ترجمة) هاني جهاد العطار . مطبعة جامعة الموصل . 363 صفحة .

4. Nathan S. S. (2007). The use at *Eucalyptus tereticornis* sm. (myrtaceae) oil (reafextract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anophfles stephens*. Liston (Diptera: Culicidae) Bioresource Technology, Vol. 98, No. 9, 1856–1860.

5. Nathan. S. S., Savitha G. , Gearge D. K., Narmadha A., Suganya L. and Chung P. G. (2006). Efficacy Of *Melia azedarach* L . extact on the malarial vector *Anopheles Stephnesi* Liston (Dipterai culidae) . Bioresource Technology Vol . 97 , No . 11 , 1316 – 1323 .

6. Vartaniane , M. T. S. (1979) . Phytochemistry invastigation of *Nerium oleander* L. grown in Iraq . M. Sc. Thesis . College of Pharmacy , Univercity of Baghdad .

7. AL-Rawi , Ali and Chakravarty , H.L. (1964) . Medicinal plant of Iraq . ministry of Agriculture and Irrigation of Iraq . two edition . 173 PP .

8.المنظمة العربية للتنمية الزراعية . (1988) . النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي . جامعة الدول العربية . الخرطوم .

9. Mohsen , Z.H. and Mehdi , N.S. (1989) . Effect of insect growth inhibitor alsystin on *Culex quinquefasciatus* say. (Diptera : Culicidae) Insec. Sci. Appli. , 10 (1) : 29-33

10. Osgood , C.E. (1971) . An oviposition pheromone associated with the egg rafts of *Culex tersalis* . J. Econ . Entomol . , 64 : 1038-1041 .

11. Harborne , J. B. (1973) . Phytochemical methods . Halsted press . John Wiely & Sons , New York . 278 PP .

12. ألسلامي ، وجيه مظهر . (1998) . تأثير مستخلصات نبات المديد *Convolvulus arvenisis* والهندال *Ipomea cairica* في الأداء الحيوي لحشرة منّ الحنطة *Schizaphis graminum* . أطروحة دكتوراه فلسفة – كلية العلوم / جامعة بابل ، 111 صفحة .
13. Ladd , T.L. , Jacobson , M. and Buriff , C.R. (1978) . Japanese beetles : Extracts from neem tree seeds as feeding deterrents . J. Econ . Entomol . , 71 : 810-813 .
14. Abbott , W.S. (1925) . Amethod of Computing the effectiveness of an insecticides .J. Econ . Entomol . , 18 : 265-267.
15. خطاب . سعدية حسين حسني . (1979) . مبادئ عن كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Then Layer Chromatography. مطبعة جامعة بغداد .
16. Weissberger, A. Perry, E. S. (1967). Thin – layer chromatography in technique of organic chemistry. U.S.A., Vol: 12. 788 pp.
17. Harborne , J. B. (1984) . Phytochemical methods . Aguid to modern techniques of plant anlysis . Chapman & Hall , 2nd Ed . New York . 288 PP .
18. Little,T.M. and Hills,F.J. (1972) .statistical methods in agricultural research .Agricultural extension university of California.242 pp .
19. الجلبي ، بديعة محمود . (1998) . تأثير مستخلصات نبات سرطان الثيل *Euphorbia granulata* في الأداء الحياتي لبعوضة *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) رسالة دكتوراه – كلية العلوم / جامعة بغداد ، 216 صفحة .
20. Evans , D. A. and Kaleysa , R. R. (1992) . Effects of quassin on the metabolism of catechol amines in different life cycle stages of *Culex quinquefasciatus* . Indian . Jor . Biochem . Biophys . , 29 (4) : 360-363
21. Mohsen , Z.H. , Jawad , A.L.M. , Al – Chalabi , B.M. and Al – Naib , A.(1989). Insecticidal activity of *Vinca rosea* against *Culex quinquefasciatus* . J. Biol. Sci . Res. , 20 (3) : 437-441 .
22. Mohsen , Z. H. , Zahid , Z. R. , Al – Chalabi , B. M. and Mehdi , N. S. (1986). Biological activity of the IGR diflubenzuron on larvae of *Culex quinquefasciatus* say. Jor. Biol. Sci. Res., 17 (1): 279-288.
23. Wigglesworth , V. B. (1972) . The principle of insects physiology chapman and Hall , London . 827 PP.
24. Busvine , R. J. (1978) . The prospects of pest control by distruption of arthropod development . Pestic . Sci . 9 : 266-271.
25. Taniguchi , M. , M. Yamaguchi , I . Kubo and T. Kubota , (1979) . Inhibitory effect of isodon diterpenoids on growth and Mitochondrial oxidative phosphorylation in lepidopterous insects . Agric . Biol . 43 (1) : 71-74 . (Abstract) .
26. Frankel , G. S. (1969) . Evaluation off our thoughts on secondary plant substances . Enomol . Exp . & Appl . , 12 : 473-486 .
27. Halify , N. and Al- Zubaidi , F. (1989) . The effects of different host plant on the biology of lemon butterfly , *Papilio demoleus* (Papilionidae : Lepidoptera) . Proc . 5th Sci . Conf . SRC . 1 (8) : 57-68
28. Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem . tree , . *Azadirachta indica* . Ann . Reu . Entomol . 35 : 271-279 .
29. Mordue , A.J. and Black well , A. (1993) . Azadirachtin : an update . J Insect . Physiol . 39 : 903-924 .