

بررسی حساسیت لاروهای سنین اول تا سوم (*Spodoptera exigua* (Hübner) نسبت به باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* در شرایط گلخانه

پیمان نامور، محمدحسن صفرعلیزاده و علی اصغر پورمیرزا^۱

چکیده

در این پژوهش حساسیت سه سن اول لاروی *Spodoptera exigua* در برابر باکتری *Bacillus thuringiensis* بررسی گردید. برای تخمین LC_{50} از شش غلظت مختلف باکتری، که با فواصل لگاریتمی محاسبه شده بودند، به همراه یک شاهد برای هر سن لاروی به طور جداگانه استفاده شد.

مقادیر LC_{50} برای لاروهای سن اول، که تنها ۱-۴ ساعت پس از خروج از تخم تیمار شدند، ۳۱۱/۶۱۷ پی پی ام، و برای لاروهای سنین دوم و سوم به ترتیب ۱۳۵۶/۹۵ و ۲۷۰۸/۲۷ پی پی ام برآورد گردید. بدین ترتیب مشخص شد که حساسیت لاروها با افزایش سن کاهش می یابد، و در نتیجه برای کنترل این آفت در مزرعه بهتر است همزمان با اوج تفریح تخمها باکتری پاشی شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری *Bacillus thuringiensis*، برگ‌خوار چغندررقند

مقدمه

(۱۱). این وضعیت منجر به افزایش هزینه‌های مربوط به کنترل آفت و فزونی آثار سوء جانبی کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی گردیده است. بنابراین، برای کاهش آثار سوء جانبی و کنترل بهینه آفت، کوشش‌های بسیاری در استفاده از روش‌های گوناگون مبارزه، از جمله استفاده از سموم میکروبی مختلف می‌شود.

پروانه (*Spodoptera exigua* (Hübner) آفتی پلی‌فاژ و جزو آفات درجه یک بسیاری از محصولات مهم کشاورزی مانند چغندررقند، ذرت و سویا در سرتاسر دنیا است. خسارت‌زایی بسیار زیاد و مقاوم شدن در برابر حشره‌کش‌های شیمیایی، میزان استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی را افزایش داده است (۳ و

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

این حشره را هدف قرار داد، و نیز دز مصرفی باید بیشتر از حد معمول (۳۳۶۲ تا ۴۴۸۳ گرم در هکتار) باشد.

آندوتوکسین‌های تولید شده به وسیله جدایه‌های مختلف این باکتری منجر به مرگ بسیاری از گونه‌های حشرات راسته‌های بال پولک‌داران، سخت بال‌پوشان و دوبالان می‌شود. پروتوکسین باکتری باید به وسیله میزبان خورده شود تا درون دستگاه گوارش آزاد گردد، و پس از گذشتن از موانع فیزیکی و شیمیایی بی‌شماری در بدن میزبان اثر خود را اعمال کند. غشای دور غذا (Peritrophic membrane) به عنوان لایه نگهدارنده سلول‌های اپیتلیوم عمل می‌کند؛ بنابراین نخستین مانع محسوب می‌شود (۴ و ۱۰).

در حل شدن و تبدیل پروتوکسین به فرم فعال آن، آنزیم‌های گوارشی و pH معده نقش بسیار مهمی دارند (۹). توکسین‌های باکتری به گیرنده‌های ویژه روی سلول‌های اپیتلیوم معده متصل شده و یک کانال عبور انتخابی برای کاتیون‌ها به وجود می‌آورند. در نتیجه عبور یون‌های K^+ و نیز آب، سلول‌های اپیتلیوم تخریب می‌شوند. تغییرات پاتولوژیک بافت‌ها شامل نکروزه شدن لوله گوارش، دژنره شدن غشای دور غذا و سلول‌های اپیتلیوم، و بروز عفونت عمومی (Septicemia) است (۵).

توجه به اهمیت آفت مذکور و لزوم کاهش مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی بر علیه آن در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات، و نیز افزایش اهمیت باکتری *Bacillus thuringiensis* از دلایل انجام این پژوهش است.

مواد و روش‌ها

میزبان

لاروهای مورد نیاز از کلنی پرورشی موجود در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تأمین شد. کلنی‌ها از تخم‌های پروانه‌های حاصل از پرورش لاروهای جمع‌آوری شده از مزارع چغندر قند به دست آمده‌اند. این حشرات در تابستان ۱۳۷۷ در شرایط گلخانه (۲۷±۲) درجه سانتی‌گراد و ۶۰±۵

بررسی با ویروس MbNPV روی تخم و مراحل مختلف لاروی پروانه کارادرینا مشخص نموده است که این ویروس از قدرت بیماری‌زایی زیادی در لاروهای این حشره برخوردار است، و می‌تواند عامل مهمی در کنترل آن به شمار آید (۲). از دیگر ترکیبات میکروبی باکتری *Bacillus thuringiensis* است، که کاربرد آن در جهان علیه آفات مختلف، از جمله *S. exigus*، رو به افزایش است (۹). از این باکتری تاکنون جدایه‌های بسیاری به دست آمده، که از میان صدها جدایه، مهم‌ترین و کاربردی‌ترین آنها زیرگونه *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* است. از ویژگی‌های بارز این جدایه‌ها تولید یک یا چند بلور لوزی شکل است. مدت کوتاهی پس از هضم در معده حشرات حساس، این بلورها در محیط پیش‌معه لارو تجزیه شده، ترکیب پروتئینی آنها توسط پروتئاز معده به پپتید تبدیل می‌شود. به یک یا چنددی از آنها که یک توکسین سیتولیتیک برای سلول‌های اپیتلیوم معده لاروها تولید کنند دلتا آندوتوکسین گفته می‌شود (۷). این باکتری دارای فرمولاسیون‌های تجاری متعدد است، که بر اساس نوع زیرگونه و سویه فرموله شده و دامنه میزبانی گسترده‌ای دارد. بر علیه برگ‌خوار چغندر قند، *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* مؤثرترین زیرگونه شناخته شده است. این زیرگونه از سروتیب 3a و 3b در ترکیبات تجاری همچون دلفین (Delfin)، توریساید (Turicide)، باکتوسپین (Bactospeine) و دایپل (Dipel) فرموله می‌شود.

ترکیب تجاری جدیدی که از سویه *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* NRD-12 (Javelline) می‌باشد، که بنا بر پژوهش موآر و همکاران (۹) در سال ۱۹۸۶، این سویه در مقایسه با سویه‌های دیگر برای کارادرینا مؤثرتر است.

پژوهش‌های انجام شده توسط برخی از پژوهندگان نشان می‌دهد که حشره برگ‌خوار چغندر قند دارای مقاومت نسبی به این باکتری می‌باشد (۶ و ۹). بر پایه گزارش نامبردگان، برای کنترل مؤثر این حشره در مزارع سویا باید لاروهای سنین ۱ و ۲

درصد رطوبت نسبی) روی گلدان‌های چغندر قند پرورش داده شدند.

برای به دست آوردن لاروهای هم‌سن، از چغندر قندهای کاشته شده در گلدان‌ها استفاده گردید. بدین ترتیب که روی هر گلدان چند برگ بزرگ و شاداب انتخاب شد، و بدون جدا کردن آنها از بوته، داخل ظروف بستنی یک کیلویی (به قطر ۱۵ و بلندی ۷ سانتی‌متر) از شیاری که در لبه آنها تعبیه شده بود قرار داده شد، و برای آسیب نرسیدن به دمیگ در داخل شیار، دور آنها پنبه گذاشته شد، و دهانه ظرف پرورش به وسیله پارچه سفید مسدود گردید.

برگ‌های چغندر قند به نحوی درون ظروف قرار گرفتند که امکان خروج لاروها وجود نداشت. داخل هر ظرف روی هر برگ دسته تخم‌های چند ده‌تایی گذاشته شد. لاروها پس از تفریح از تخم، از برگ تغذیه می‌نمودند. در صورت اتمام برگ، که با رشد و افزایش تغذیه لاروها سریع‌تر می‌گردید، برگ دیگری به داخل ظرف هدایت می‌شد. بدین ترتیب پرورش لاروها تا پایان مرحله رشد و نمو لاروی ادامه یافت.

عامل بیماری‌زا

الف) باکتری: باکتری مورد نظر از ترکیب تجاری دلفین (Delfin) که حاوی *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* و سویه HD-1 بود تأمین شد. این ترکیب دارای فرمولاسیون میکروگرانول بوده و واحد استاندارد آن برابر با 53×10^9 SU/kg از فراورده می‌باشد.

ب) بررسی حساسیت سنین مختلف: برای بررسی تلفات ایجاد شده در لاروهای سنین اول، دوم و سوم و تخمین LC_{50} ، شش غلظت باکتری تهیه گردید. این آزمایش با هفت تیمار (شش غلظت باکتری به علاوه یک تیمار شاهد) و سه تکرار برای هر تیمار در چارچوب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. روش کار بدین ترتیب بود که پس از آلوده‌سازی برگ‌های مورد نظر آنها درون ظروف بستنی محصور شده و سپس ۱۰ لارو هم‌سن و هم‌اندازه، که با استفاده از روش اندازه‌گیری عرض

کپسول سر تفکیک می‌شدند، در ظروف رهاسازی گردید. شرایط نگهداری لاروهای آزمایش کاملاً مشابه شرایط پرورش بود. شمارش تلفات هر ۲۴ ساعت به مدت ۹۴ تا ۱۲۰ ساعت ادامه داشت. تلفات حاصل به طور جداگانه برای هر سن لاروی، با استفاده از فرمول آبوت (Abbot) اصلاح گردید.

نتایج حاصل از آزمایش‌ها با استفاده از برنامه MSTATC به روش پروبیت بررسی و مقادیر LC_{50} محاسبه و نمودارها با برنامه Excel رسم گردید.

ج) طرز تهیه غلظت‌های مختلف باکتری: غلظت‌های مختلف باکتری با فواصل لگاریتمی بین حداکثر و حداقل غلظت تهیه و انتخاب گردید. برای این منظور نخست آزمایش‌های مقدماتی بسیاری برای به دست آوردن غلظت حداکثر و حداقل روی هر کدام از سنین لاروی مورد آزمایش انجام شد. در آزمایش‌های مقدماتی ابتدا غلظت‌های مختلف (شامل ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۵۰ و ۲۵ پی‌پی‌ام)، از آمیختن مقدار مشخصی از باکتری (که توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شده بود) با آب مقطر به دست آمد، و با استفاده از اسپری دستی به حجم ۲۵۰ سانتی‌متر مکعب، روی برگ‌های چغندر قند پاشیده شد. پس از خشک شدن رطوبت برگ‌ها، هر کدام از آنها به روشی که ذکر شد در داخل ظروف بستنی قرار گرفته و ۱۰ لارو هم‌سن در هر یک رهاسازی گردید. پس از پایان یافتن آزمایش، شمارش مرگ و میر به فاصله هر ۲۴ ساعت به مدت تا هفت روز انجام شد.

با توجه به تفاوت حساسیت بین لاروهای سن اول تا سوم، برای تهیه غلظت‌های مختلف، لاروها به دو گروه تقسیم شدند، که گروه اول شامل لاروهای سن اول و دوم، و گروه دوم شامل لاروهای سن سوم بودند.

بیشترین و کمترین غلظت برای لاروهای سن اول به ترتیب ۱۵۰۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام تعیین شد که در آزمایش‌های مقدماتی به ترتیب ۸۵ و ۲۵ درصد تلفات ایجاد کرده بودند. سپس بر اساس روش مراد اسحق‌قی و پورمیرزا (۱) غلظت‌های بین این دو، به روش لگاریتمی محاسبه شد، که ارقام حاصله عبارت‌اند

ساعت اول مرگ و میر برابر با صفر است، و در غلظت‌های ذکر شده تلفات عملاً از ۷۲ ساعت به بعد آغاز شده، تا ۱۲۰ ساعت ادامه می‌یابد و پس از آن ثابت می‌ماند.

لارو سن سوم

شکل ۱ پروبیت درصد تلفات لاروهای سن سوم را که از غلظت‌های مختلف *Bacillus thuringiensis* تغذیه کرده بودند، پس از ۱۲۰ ساعت نشان می‌دهد. نمودار مذکور گویای این است که با افزایش غلظت باکتری، مرگ و میر افزایش می‌یابد. مقدار LC_{50} محاسبه شده برای این سن لاروی برابر با $270.8/27$ پی‌پی‌ام است.

بررسی روند تلفات تیمارهای مختلف در زمان‌های گوناگون نشان می‌دهد که با وجود افزایش سن لاروی و افزایش مقاومت حشره در برخی از تیمارها، در ۲۴ ساعت اول مرگ و میر وجود دارد. مرگ و میر به طور تقریباً منظم و یک‌نواخت تا ۱۲۰ ساعت ادامه می‌یابد و پس از آن ثابت می‌ماند. میزان LC_{50} محاسبه شده برای لاروهای سن یک، که تنها پس از ۱-۴ ساعت تغذیه از برگ‌های سالم به روی تیمارها منتقل شده بودند، برابر با $311/617$ پی‌پی‌ام بود، که ۵۰ درصد تلفات در لاروهای سن یک ایجاد می‌نماید.

اینوفو و همکاران (۶) میزان LC_{50} این باکتری را در لاروهای سن اول برابر $233/8$ پی‌پی‌ام محاسبه کردند. تفاوت این دو رقم چندان نیست (کمتر از ۸۰ پی‌پی‌ام)، و به نظر می‌رسد که این تفاوت جزئی تا حد زیادی مربوط به شرایط متفاوت دو آزمایش باشد، زیرا این پژوهندگان از غذای مصنوعی، شرایط محیطی کاملاً کنترل شده آزمایشگاهی و نیز فرمولاسیون متفاوت *Bacillus thuringiensis* (Dipel 2x) استفاده کردند، ولی در پژوهش حاضر شرایط آزمایش تقریباً طبیعی بود و از فرمولاسیون میکروگرانول دلفین استفاده شده است.

موآر و همکاران (۹) میزان LC_{50} باکتری مذکور را در برابر لاروهای سن یک برگ‌خوار چغندر 399 پی‌پی‌ام برآورد کردند،

از: ۵۰، ۱۰۴، ۲۰۴، ۳۸۹، ۷۷۶ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام. با توجه به افزایش مقاومت لاروهای سن دوم، غلظت حداکثر باکتری با رعایت فواصل لگاریتمی یک رده بالاتر برده شد (2850 پی‌پی‌ام) و غلظت حداقل (50 پی‌پی‌ام) از پایین حذف گردید. برای لاروهای سن سوم غلظت حداکثر و حداقل به ترتیب عبارت بود از 5000 و 1000 پی‌پی‌ام، که در آزمایش‌های مقدماتی به ترتیب ۷۰ و ۲۵ درصد تلفات ایجاد کرده بودند. غلظت‌های دیگر نیز مانند بالا به روش لگاریتمی محاسبه شدند، که عبارت‌اند از: 1000 ، 1386 ، 1909 ، 2630 ، 3622 و 5000 پی‌پی‌ام.

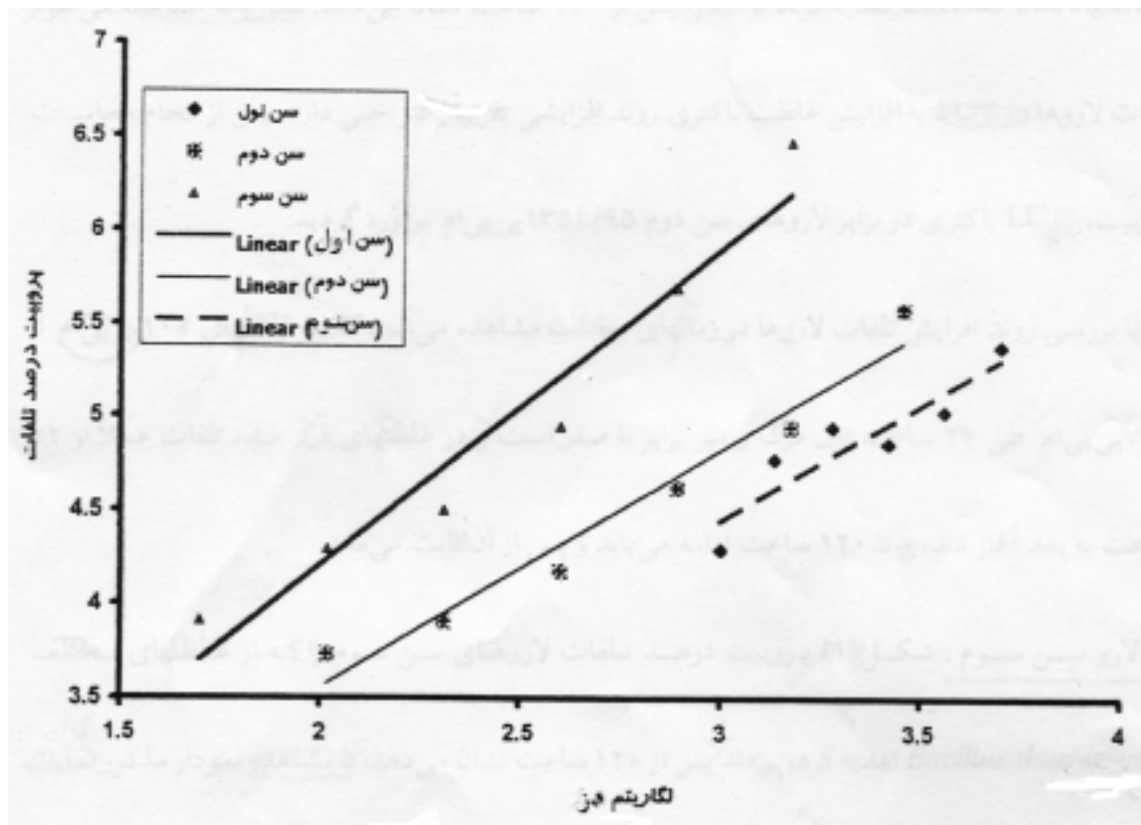
نتایج و بحث

لارو سن اول

شکل ۱ لگاریتم غلظت و پروبیت درصد تلفات لاروهای سن اول را که از غلظت‌های مختلف باکتری تغذیه کرده بودند، پس از ۹۶ ساعت نشان می‌دهد. همان گونه که در نمودار دیده می‌شود، تلفات لاروها روند افزایشی یک‌نواختی را نشان می‌دهد. پس از تجزیه پروبیت داده‌ها، LC_{50} باکتری مذکور برابر با $311/617$ پی‌پی‌ام برآورد شد. با شمارش روند تلفات لاروها در تیمارهای مختلف مشاهده گردید که در دزهای ۵۰ تا 389 پی‌پی‌ام، طی ۴۸ ساعت اول تقریباً تلفات صفر است، و در این تیمارها مرگ و میر از ۷۲ ساعت به بعد آغاز و تا ۹۶ ساعت ادامه یافته، پس از آن ثابت می‌ماند.

لارو سن دوم

شکل ۱ پروبیت درصد تلفات لاروهای سن دوم را که از غلظت‌های مختلف *Bacillus thuringiensis* تغذیه کرده بودند، پس از ۱۲۰ ساعت نشان می‌دهد. چنان که دیده می‌شود، تلفات لاروها با افزایش غلظت باکتری روند افزایشی تقریباً یک‌نواختی دارد. پس از انجام محاسبات پروبیت، LC_{50} باکتری در برابر لاروهای سن دوم $1356/95$ پی‌پی‌ام برآورد گردید. با بررسی روند افزایش تلفات لاروها در زمان‌های مختلف مشاهده می‌شود که در غلظت‌های ۱۰۴ تا ۷۷۶ پی‌پی‌ام، طی ۲۴



شکل ۱. پروبیت درصد تلفات و لگاریتم دز در لاروهای سن اول، دوم و سوم

ظرفیت فیزیولوژیک حل کردن، فعال‌سازی و اتصال توکسین‌های *Bacillus thuringiensis* با هم، و به گیرنده‌های مخصوص روی اپیتلیوم تفاوت دارند (۸). افزون بر این، pH معده میانی لاروها با افزایش سن لاروی زیادتر می‌شود، و از آن جا که pH زیاد حلالیت دلتا آندوتوکسین را در معده بیشتر و سریع‌تر می‌کند، سمیت باکتری را در برابر حشره افزایش می‌دهد. بنابراین، روند افزایشی pH معده نیز خود می‌تواند دلیل دیگری برای موضوع باشد (۸).

با مقایسه مقادیر LC_{50} سه سن لاروی آزمایش شده و نیز ضرایب خطوط رگرسیون آنها (جدول ۱)، به خوبی آشکار است که سن اول حساسیت نسبتاً زیادی دارد. برعکس، سن سوم لاروی حدود ۹ بار مقاوم‌تر از سن اول و دو بار مقاوم‌تر از سن دوم است. از این رو، با در نظر گرفتن این مطلب که آزمایش‌های مذکور در شرایط گلخانه صورت گرفته است، باید گفت که لاروهای سن سوم این حشره دارای مقاومت نسبتاً

که به نظر می‌رسد تفاوت حاصل ناشی از استفاده از غذای مصنوعی و شرایط کنترل شده آزمایشگاهی باشد.

در بررسی تلفات لاروهای سن سوم دیده شد که با وجود افزایش سن لاروی، و به دنبال آن افزایش مقاومت لاروها، در بسیاری از تیمارها، بجز غلظت‌های ۱۰۰۰ تا ۹۰۹ پی‌پی‌ام در ۲۴ ساعت اول، تلفات وجود داشته است، در حالی که در مورد لاروهای سن اول با وجود حساسیت بیشتر در غلظت‌های بین ۵۰ تا ۳۰۴ پی‌پی‌ام، و در سن دوم در تیمارهای ۱۰۴ تا ۳۸۹ پی‌پی‌ام، در ۲۴ ساعت اول هیچ تلفاتی مشاهده نگردید. در سن دوم حتی از ۴۸ ساعت به بعد تا ۱۲۰ ساعت تلفات به کندی بروز کرده است. این مسئله به دلیل این است که تغذیه لاروهای سن سوم در مقایسه با سنین اول و دوم بیشتر است؛ بنابراین دز مؤثر را زودتر دریافت می‌کنند. در نتیجه، با وجود زیاد بودن LC_{50} نسبت به سن قبلی، در ۲۴ ساعت اول تلفات حاصل شده است. هم‌چنین، لاروهای سنین اول و سوم احتمالاً از نظر

جدول ۱ - تجزیه پروبیت سنین لاروی اول تا سوم

LC ₅₀	R ²	عرض از مبدأ (a)	شیب (b)	ضریب همبستگی
				سن لاروی
۳۱۱ / ۶۱۷۸۹	۰ / ۹۴۲۹	۰ / ۷۷۸۸۰۵	۱ / ۶۹۲۷۶۶۱	سن اول
۱۳۵۶ / ۹۵۶۲	۰ / ۹۳۶۷	۰ / ۸۰۸۴۸۸۳	۱ / ۳۳۸۰۴۴۲	سن دوم
۲۷۰۸ / ۲۷۶۱	۰ / ۹۱۶۸	۰ / ۶۰۳۳۶۶۷	۱ / ۲۸۰۸۱۱۷	سن سوم

سپاسگزاری

از آقای مهندس مسعود دانیالی پژوهنده بخش تحقیقات مبارزه بیولوژیک تهران، و نیز آقای مهندس رحیم اسلامی زاده پژوهنده بخش آفات مرکز تحقیقات کشاورزی دزفول، به خاطر کمک‌ها و همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

زیادی هستند، و برای کاربرد مؤثرتر *Bacillus thuringiensis* در مزرعه، باید هم‌زمان با تفریح بیش از ۵۰ درصد تخم‌ها عمل باکتری‌پاشی را انجام داد تا در کنترل لاروهای این آفت بهترین نتیجه گرفته شود.

منابع مورد استفاده

۱. مراد اسحق، م. ج. و ع. ا. پورمیرزا. ۱۳۵۳. بررسی مقاومت سنین مختلف لارو شب‌پره هندی (*Poldia interpunctella* Hb.) در برابر حشره‌کش میکروبی *Bacillus thuringiensis*. نامه انجمن حشره‌شناسان ایران ۲(۱): ۲۵-۳۴.
۲. منطری، ش.، م. ج. صفرعلیزاده، ع. خرازی و ع. ا. پورمیرزا. ۱۳۷۹. آسیب‌شناسی و بررسی تأثیر ویروس NBNPV روی سنین مختلف لاروی پروانه برگ‌خوار چغندرقد، (*lep. Noctuidae*) *Spodoptera exigua* Hb. آفات و بیماری‌های گیاهی ۶۸(۱ و ۲):
3. Benz, G. 1975. Action of *Bacillus thuringiensis* preparations against larch bud moth (*Zeiraphera diniana*) enhanced by Beta exotoxin and DDT. *Experimentia* 31: 1288-1290.
4. English, L. and S. L. Slattin. 1992. Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22: 1-7.
5. Gibson, D. M., L. G. Gallo, S. B. Krasnoff and R. E. B. Ketchum. 1995. Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in combination with tannic acid. *J. Econ. Entomol.* 88: 270-277.
6. Ignoffo, C. M., D. L. Hostetter, R. E. Pinnel and C. Garcia. 1977. Relative susceptibility of six soybean caterpillars to standard preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *J. Econ. Entomol.* 70: 60-63.
7. Kurstak, E. and P. Tissen. 1982. Microbial and viral pesticides. PP. 3-45. In: E. Kurstak (Ed.), *Microbial and Viral Pesticides*. Marcel Dekker, Inc., New York.
8. Liu, Y. B., B. E. Tabashnik and M. W. Johnson. 1995. Larval age affects resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond back moth. *J. Econ. Entomol.* 88: 788-792.
9. Moar, W. J., W. L. A. Oslernik and J. T. Trumble. 1986. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* with thuringiensin on beet armyworm. *J. Econ. Entomol.* 79: 1443-1446.
10. Ogiwara, K., L. S. Indrasth, S. Asano and H. Hori. 1992. Processing of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-173 by gut juices of various insect larvae. *J. Inverteb. Pathol.* 60: 121-126.
11. Takai, M. 1991. Insecticide resistance of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hubner). *Shokubutu Boeki (Plant Protection)* 45: 238-241.