آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۱، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۲

زیست سنجی دو جدایه‌ی ایرانی قارچ *Metarhizium anisopliae* روی تخم، پوره‌ی سن دوم و حشرات کامل سن گندم (*Eurygaster integriceps*) و تاثیر روغن EC در میزان بیمارگری

ندا صدیقی[۱]، حسن عسکری[۲]✉، حبیب عباسی پور[۱]، عزیز شیخی گرجان[۲] و جابر کریمی[۱]
۱- دانشگاه شاهد، گروه گیاهپزشکی، تهران؛ ۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران
(تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۰؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۱)

چکیده

در این تحقیق بیمارگری و زهرآگینی دو جدایه‌ی ایرانی قارچ *Metarhizium anisopliae* شامل جدایه‌های M_{14} و IRAN 437_C با زیست‌سنجی به روش غوطه‌ور نمودن تخم و اسپری‌کردن پوره‌ی سن دوم و حشرات کامل تابستان‌گذران سن گندم با غلظت‌های 10^3، 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر، در ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر سوسپانسیون‌های 10^6 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر از قارچ همراه با روغن EC بر میزان مرگ و میر روی نمونه‌های سن گندم تابستان‌گذران مطالعه شد. مرگ و میر حشرات در تمام تیمارها به صورت روزانه بررسی شد. تیمار M_{14} تفریخ تخم را به‌طور میانگین به میزان ۳±۴۰٪ کاهش داد. LC_{50} محاسبه شده برای جدایه‌های IRAN437_C و M_{14} روی حشرات بالغ به ترتیب $4/3\times10^7$ و $1/4\times10^6$ کنیدی بر میلی‌لیتر و روی پوره‌های سن دوم $4/8\times10^4$ و $2/3\times10^3$ کنیدی در میلی‌لیتر برآورد گردید که نشان‌دهنده‌ی حساسیت بیشتر پوره‌ها به این قارچ بیمارگر در مقایسه با سن‌های بالغ می‌باشد. همچنین LT_{50} جدایه‌های IRAN 437_C و M_{14} با استفاده از غلظت 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر به ترتیب روی حشرات تابستان‌گذران ۲۹/۶۴ و ۱۱/۹ روز و روی پوره‌ی سن دوم ۳/۲۳ و ۲/۲۲ روز تعیین شد. به طور کلی نتایج زیست‌سنجی نشان داد که جدایه M_{14} با غلظت کمتر در زمان کوتاه‌تری روی مراحل مختلف زندگی سن گندم مرگ و میر ایجاد می‌کند. افزودن روغن EC به میزان سه در هزار به سوسپانسیون قارچ در جدایه M_{14} موجب شد تا LT_{50} به میزان ۵۴/۴۵ درصد نسبت به قارچ همراه با آب مقطر و توئین (۰/۰۴ درصد)، کاهش یابد.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، سن معمولی گندم، *Eurygaster integriceps, Metarhizium anisopliae*، زیست سنجی.

Bioassay with two Iranian isolates of *Metarhizium anisopliae* on eggs, 2th nymphal instars and adults of the sunn pest, *Eurygaster integriceps* and the effect of EC oil on pathogenicity

N. SEDIGHI[1], H. ASKARY[2]✉, H. ABBASIPOUR[1], A. SHEIKHI GORJAN[2] and J. KARIMI[1]
1- Shahed University, Tehran, Iran; 2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

In this study pathogenicity and virulence of two *Metarhizium anisopliae* isolates (IRAN 437_C and M_{14}) were evaluated against egg (using dipping method), 2nd nymphal instar and summer generation adults (aestivation population) of sunn pest, *E. integriceps* (Hem., Scutelleridae) using direct spray technique. Different concentrations consisted 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 and 10^8 conidia/ml and experiment replicated 4 time. Effect of fungal suspensions of 10^6 and 10^8 conidia/ml in EC oil was also studied on sunn pest adults (aestivation population) using direct spraying method. Mortality in all of treatments was daily recorded. Results showed that isolate M_{14} reduced egg hatching by 40%. Estimated LC_{50} value for each isolates (IRAN 437_C and M_{14}) was 4.3×10^7 and 1.4×10^6 conidia/ml on adults and 4.8×10^4 and 2.3×10^3 conidia/ml on 2nd nymphal instar, respectively. Also, the calculated LT_{50} value using concentration of 10^8 conidia/ml for each isolates (IRAN 437_C and M_{14}) on adults were 29.64 and 11.9 days, and for nymphal stage were 3.23 and 2.22 days, respectively. The bioassay results showed that M_{14} isolate was more effective on both stages of the sunn pest. Although, nymphal stage was more susceptible compared to adult. In addition, EC oil (0.3 %) decreased LT_{50} of *M. anisopliae* to 54.45 percent compared with distilled water mixed with wetting agent (Tween 80). Adding oil carriers to a fungus suspension increased the pathogenicity.
Key words: biological control, *Eurygaster integriceps*, *Metarhizium anisopliae*, bioassay, sunn pest.

✉ **Corresponding author: askary2@gmail.com**

مقدمه

از میان گونه‌های مختلف سن‌های غلات، گونه‌ی *Eurygaster integriceps* Put. (Hem., Scutelleridae) Puton یک آفت جدی گندم و جو در ایران، سوریه، عراق، ترکیه، افغانستان، لبنان، بلغارستان، رومانی و شوروی سابق می‌باشد (PPRI (Ankara), 1997). خسارت سن گندم به دو صورت کمی و کیفی بوده و موجب از دست رفتن خاصیت نانوایی و کاهش شدید قوه‌ی نامیه‌ی دانه‌های سن زده می‌شود. دست‌یابی به الگوی مناسب مبارزه با سن گندم که جایگزین جدید، پایدار و از نظر محیطی منطقی باشد، حائز اهمیت است. یکی از زمینه‌هایی که تحقیق کمی روی آن صورت گرفته، استفاده از حشره‌کش‌های زیستی بر اساس بیمارگرهاست. در بین این عوامل، قارچ‌ها یکی از امیدبخش‌ترین بیمارگرها بوده و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. این عوامل حشرات را از طریق نفوذ مستقیم از کوتیکول آلوده می‌کنند. بنابراین در مورد حشراتی که از شیره‌ی گیاهان و یا مایعات بدن جانوران تغذیه می‌کنند تنها راه عملی کنترل میکروبی محسوب می‌شوند (Leger *et al.* 1991). بر اساس اظهار Moore *et al.* (2004)، یکی از راه‌کارهای کنترل سن گندم استفاده از قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin برای کنترل حشرات کامل زمستان‌گذران و جمعیت تابستانه می‌باشد (Moore *et al.* 2004). نتایج بررسی‌هایی که در ایران، سوریه، ترکیه، ازبکستان، قزاقستان، قرقیزستان و روسیه به منظور یافتن قارچ‌های بیمارگر سن گندم انجام شده، نشان داد که چندین جدایه از *B. bassiana* و یک جدایه از *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin بیماریزایی بالایی را روی سن گندم دارند (Parker *et al.* 2003). قارچ *M. anisopliae* دارای بیش از ۲۰۰ گونه میزبان بوده و برای کنترل تعدادی از آفات از قبیل تریپس‌ها و موریانه‌ها نیز به کار می‌رود. کنیدی قارچ پس از تندش، از طریق آپرسوریوم درون کوتیکول نفوذ می‌کند. سپس از آن‌جا وارد همولنف میزبان شده و ضمن تکثیر، به کلیه‌ی بافت‌ها حمله کرده و باعث مرگ میزبان خود می‌شود. سپس از بدن آن خارج شده و با تولید کنیدی و تکثیر در محیط سبب آلودگی و همه‌گیری در بین سایر میزبان‌ها می‌شود (Askary *et al.* 1999; Clarkson and Charnely, 1996). برای ایجاد آلودگی در حشره‌ی هدف باید اسپور قارچ‌های بیمارگر، تماس نزدیکی را با سطح بدن میزبان مربوطه برقرار نمایند. در کاربرد قارچ‌های بیمارگر، اضافه نمودن برخی مواد به سوسپانسیون قارچ موجب تماس بهتر کنیدی با کوتیکول میزبان شده و بیمارگری را تشدید می‌نماید.

به نظر می‌رسد افزودن روغن به سوسپانسیون اسپور قارچ مخصوصاً برای کاربرد در شرایط محیطی خشک، تلاشی در جهت حفظ رطوبت روی کوتیکول حشره و افزایش بیمارگری در شرایط طبیعی باشد. قابلیت زیست کنیدی در دمای بالاتر و حفاظت بیشتر در برابر اشعه‌ی ماورائ بنفش از دیگر مزایای روغن‌ها می‌باشد (Moore and Prior, 1993). کاربرد فرمولاسیون روغنی در مناطق خشک در مقایسه با فرمولاسیون آبی در رطوبت نسبی کمتر از ۳۵ درصد موجب افزایش کارایی قارچ *M. anisopliae* جهت کنترل *L. migratoria* در نیجریه شده است (Kassa, 2003).

یکی از اهداف افزودن مواد همراه به سوسپانسیون قارچ، افزایش کارایی آن در محیط با رطوبت نسبی پایین می‌باشد. این مواد نباید اثر سوئی روی بیمارگری قارچ داشته باشند. در رطوبت پایین، فرمولاسیون‌های روغنی نسبت به فرمولاسیون‌های آبی از کارایی بیشتری برخوردار می‌باشند (Burges and Keith, 1998). از آنجایی‌که توسعه‌ی یک حشره‌کش میکروبی مؤثر علیه سن گندم، امیدبخش به نظر می‌رسد، این تحقیق به منظور دستیابی به اطلاعاتی در خصوص میزان حساسیت مراحل مختلف رشدی سن گندم به دو جدایه‌ی بومی قارچ *M. anisopliae* و تعیین اثر روغن بر شدت بیمارگری قارچ انجام شده است.

روش بررسی

جمع‌آوری و پرورش آزمایشگاهی حشره‌ی میزبان: حشرات کامل سن گندم در اواخر شهریور ماه و اواخر دی ماه سال ۱۳۸۹ از زیر بوته‌های گون و درمنه در کوه‌های منطقه حمامک واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان ورامین جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافتند. تعداد مشخصی از سن‌های زمستان‌گذران جمع‌آوری شده در درون ظروف پلاستیک در دمای محیط ۱±۲۷ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ تا ۷۰ درصد، دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی، روی گندم‌های خشک پرورش داده شد. لوله‌های آزمایش پر از آب که دهانه‌ی آن‌ها با پنبه مسدود شده بود، همراه نوارهای کاغذی جهت تخم‌ریزی در اختیار سن‌ها قرار گرفت. سن‌ها روی نوارهای کاغذی شروع به تخم‌ریزی کردند و هر دو روز یک‌بار تخم‌ها جمع‌آوری شد. پوره‌های سن اول و یا دوم به تعداد ۲۰ تا ۳۰ عدد به ظروف مکعب مستطیل شکل به ارتفاع ۷ و طول ۱۵ و عرض ۹ سانتی‌متر و از جنس پلکسی‌گلاس منتقل شد. برای تغذیه‌ی سن‌ها، از ظروف با دریچه‌های پوشیده شده با توری جهت تهویه استفاده شد که حاوی پنبه‌ی مرطوب و گندم خیس خورده‌ی در حال جوانه‌زنی بود. بدین ترتیب مراحل تخم، پورگی و حشره‌ی کامل مورد نیاز برای انجام آزمایش‌ها به تعداد کافی تامین گردید.

جدایه‌های قارچ بیمارگر: از دو جدایه‌ی بومی قارچ *M. anisoplaie* شامل جدایه‌ی M_{14} (جمع‌آوری شده از خاک در گرمسار توسط دکتر مهران غزوی) و جدایه‌ی IRAN 437_c جداشده از کرم ساقه‌خوار برنج، *Chilo suppressalis* در رشت توسط دکتر رسول زارع) استفاده شد.

کشت جدایه‌های قارچ: برای تولید قارچ از روش دو مرحله‌ای استفاده شد (Jenkins *et al.* 1998). ابتدا اینوکلوم قارچی شامل میسلیوم در محیط مایع (عصاره سیب زمینی) درون ارلن‌های شیاردار یک لیتری به مدت چهار روز تکثیر شد و برای تولید کنیدی‌ها به محیط کشت جامد حاوی جو انتقال یافت. این کیسه‌ها داخل اتاق پرورش با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو هفته نگهداری شد. برداشت کنیدی‌ها از محیط کشت با استفاده از آب و توئین-۸۰ (به نسبت ۰/۰۴ درصد) و عبور آن‌ها از پارچه‌ی ململ سه لایه انجام شد. از این سوسپانسیون غلظت پایه تهیه شده و برای آزمایش استفاده شد.

زیست‌سنجی: برای اطمینان از کیفیت مطلوب کنیدی‌ها برای جوانه‌زنی، ابتدا میزان زنده‌مانی کنیدی‌ها روز قبل از انجام آزمایش اندازه‌گیری شد. برای این‌کار ابتدا غلظت 10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر تهیه گردید و ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور در محلول ۰/۰۴ درصد Tween-80 روی محیط SDA (Sabouraud Dexterose Agar) کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت با شمارش یکصد عدد کنیدی درصد جوانه‌زنی آنها محاسبه شد.

۱- زیست سنجی با غلظت‌های 10^6 و 10^8 کنیدی بر میلی‌لیتر برای دو جدایه از قارچ به همراه شاهد (آب مقطر و توین ۸۰ به نسبت ۰/۰۴ درصد) روی تخم‌های یک روزه‌ی سن گندم انجام شد. با توجه به اینکه پاشش سه میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی روی تخم‌ها، آنها را دچار مشکل می‌کرد، لذا در این آزمایش از روش غوطه‌وری استفاده شد. آزمایش چهار مرتبه تکرار گردید و برای هر تیمار از هر تکرار ۳۰ عدد تخم استفاده شد. تخم‌های تیمار شده پس از هوادهی و خشک‌شدن، داخل ظروف پتری استریل قرار گرفت. سپس در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شد. روزانه وضعیت ظاهری و میزان تفریخ تخم‌ها تا ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت.

۲- زیست سنجی روی پوره‌ی سن دوم سن گندم با غلظت‌های مختلف 10^3، 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر با دو جدایه از قارچ انجام شد. این آزمایش در چهار تکرار و در هر تکرار روی ۱۰ عدد پوره‌ی سن دوم حشره‌ی میزبان به روش پاششی انجام گرفت.

آب مقطر استریل به علاوه تویین ۸۰ به نسبت ۰/۰۴ درصد به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پاشیدن سوسپانسیون با تیمار شاهد آغاز و سایر تیمارها از غلظت کم به زیاد توسط یک محلول‌پاش دستی از فاصله‌ی ۲۰ سانتی‌متر به میزان سه میلی‌لیتر اسپری شد. سپس پوره‌های تیمار شده با یک قلم‌مو در داخل ظروف پتری تهویه‌دار، به قطر ۹ سانتی‌متر که کف آن با پارچه‌ی تنظیف پوشیده شده بود، قرار گرفته و با بذر گندم جوانه زده و با پنبه مرطوب تغذیه شد. سپس ظروف در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگه‌داری گردید. وضعیت سن‌های تیمار شده روزانه به مدت ۹ روز مورد بررسی قرار گرفت و تعداد پوره‌های مرده در اثر قارچ ثبت و از ظروف آزمایش حذف شد. برای بررسی وضعیت آلودگی پوره‌ها به قارچ، از همولنف آن‌ها نمونه‌برداری شد تا بلاستوسپور قارچ مشاهده گردید.

۳- زیست سنجی روی حشرات کامل تابستانه‌ی سن گندم با همان تیمارهای استفاده شده برای پوره‌ها، انجام شد. این آزمایش در چهار تکرار صوت گرفت و در هر تکرار ۱۰ عدد سن گندم به کار رفت. برای هر تکرار از هر تیمار میزان ۴ تا ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچ با استفاده از یک محلول‌پاش دستی از فاصله‌ی ۲۰ سانتی‌متری به‌طور یکنواخت روی سن‌ها پاشیده شد. سپس سن‌های تیمار شده به ظرف‌های پلاستیکی تهویه‌دار به ابعاد ۱۶×۱۰×۵ سانتی‌متر منتقل شد. در داخل ظروف، پنبه‌ی مرطوب و دانه‌های گندم برای تغذیه‌ی سن گندم قرار داده شد. ظروف داخل اتاقک رشد با درجه‌ی حرارت ۲۳ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۷۵٪ منتقل شد. به مدت ۴ هفته مرگ و میر به صورت روزانه و تجمعی در جدول مربوطه ثبت شد.

آلودگی حشرات از طریق بروز مشخصاتی هم‌چون خشک شدن بدن آن‌ها مشخص بود. اما برای اطمینان بیشتر حشرات مرده در داخل پتری استریل و مرطوب قرار داده شد. نمونه‌ها داخل اتاقک رشد در دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد تا رشد قارچ مجددا روی آن‌ها مشاهده گردد.

۴- تأثیر روغن در بیمارگری قارچ: هدف از انجام این آزمایش تعیین میزان تأثیر روغن بر شدت بیمارگری قارچ روی حشره بالغ سن گندم بود. برای این کار روغن امولسیون شونده EC که شامل حداقل ۹۰٪ روغن مایع معدنی و یک تا ۱۰ درصد امولسیفایر مخلوط آنیونیک+کاتیونیک بود، به میزان ۳ در هزار به غلظت‌های 10^6 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر، اضافه شد. تیمار شاهد شامل آب مقطر استریل به همراه روغن مذکور بود. هر آزمایش دارای ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ عدد سن گندم بود. ظروف حاوی تیمارها در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۷۵٪ نگه‌داری شد.

تجزیه و تحلیل آماری: مقدار LC_{50} توسط نرم افزار آماری SAS (Version 9.2) محاسبه گردید. برای رسم خط رگرسیون از نرم افزار Priprobit (1982-2000) استفاده شد. بدین ترتیب که داده‌های حاصل از Priprobit به نرم افزار Excel منتقل و منحنی‌های خطی و سیگموئید مربوطه رسم گردید. داده‌های مربوط به مرگ و میر تجمعی توسط نرم افزار Curve expert 1.3 پردازش و بهترین مدل رگرسیون بر اساس بالاترین ضریب هم‌بستگی برای هر مرحله انتخاب و سپس با کمک فرمول مربوطه زمان کشندگی ۵۰٪ (LT_{50}) محاسبه گردید.

نتیجه و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که سن گندم یکی از میزبان‌های قارچ *M. anisoplaie* بوده (شکل ۱) و جدایه‌های IRAN 437$_c$ و M_{14} علائم بیماری‌زایی را روی مراحل مختلف رشدی سن گندم نشان دادند. بر اساس نتایج بدست آمده، تخم‌های تیمار شده با جدایه‌ی IRAN437$_c$ نیز همانند تیمار شاهد همگی بعد از ۱۰ روز تفریخ شدند. در صورتی که غلظت 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر جدایه M_{14} موجب ۳±۴۰٪ مرگ و میر در تخم‌ها شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت ($F=23.2, P<0/01$). علائم تلفات روی تخم‌ها

در مراحل اولیه با سیاه شدن رنگ قابل رویت بود.

مقدار عددی LC_{50} (غلظتی از قارچ که موجب ۵۰ درصد مرگ و میر در جمعیت پوره‌ها و سن‌های بالغ تابستان‌گذران گردید) محاسبه و در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از برنامه Curve Expert 1.3 برای محاسبه‌ی LT_{50} در جدول ۲ ارائه شده است. کمترین مقدار LC_{50} محاسبه شده روی هر دو مرحله‌ی پوره‌ی سن دوم و حشرات کامل تابستان‌گذران به ترتیب $۲/۳\times۱۰^{۳}$ و $۱/۴\times۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر، مربوط به جدایه‌ی M_{14} بود. به این ترتیب در بین دو جدایه‌ی استفاده شده در این پژوهش، جدایه‌ی M_{14} با پایین‌ترین زمان تأثیر (در غلظت $۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر) در پوره‌ها با ۲/۲ روز و در حشرات بالغ (غلظت $۱۰^{۹}$ کنیدی در میلی‌لیتر) با ۸/۵ روز مؤثرترین جدایه، برای کنترل سن گندم معرفی گردید.

افزودن روغن EC به سوسپانسیون اسپور قارچ سبب افزایش سرعت تاثیر آن شد و پس از ۱۰ روز مرگ و میر قابل توجهی را در جمعیت‌های تابستان‌گذران ایجاد کرد (جدول ۳). روغن EC، میزان LT_{50} محاسبه شده برای جدایه‌های M_{14} و $Iran437_c$ را در غلظت $۱۰^{۸}$ اسپور در میلی‌لیتر نسبت به آب مقطر و توئین به ترتیب ۵۴/۴ و ۷۲/۰۳ درصد کاهش داد. استفاده از روغن و آب در فرمولاسیون ضمن تأمین رطوبت کافی برای اسپورها، نفوذ قارچ به کوتیکول حشره را تسهیل کرد و موجب کوتاه شدن چرخه‌ی بیماری گردید.

شکل ۱- سن‌های تابستان‌گذران آلوده شده به قارچ *M. anisopliae*

Fig. 1. Infected summer sunn pest population with *M. anisopliae.*

همانطور که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود مرگ و میر حشرات تیمار شده با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. روند گسترش بیماری نیز در مراحل مختلف زیستی سن گندم متفاوت بود (شکل ۴). همانطور که از شکل‌ها استنباط می‌شود در ۲۴ ساعت اولیه مرگ و میری مشاهده نمی‌شود که نشان دهنده‌ی این واقعیت است که قارچ به مدت زمانی حدود ۴۸ تا ۷۲ ساعت برای تندش و نفوذ در کوتیکول حشره نیاز دارد. نتایج نشان می‌دهد که حساسیت پوره‌های سن دوم سن گندم بیشتر از حشرات کامل تابستان‌گذران است و برای هر دو جدایه مقایسه‌ی حدود بالا و پایین Lc_{50}، تایید کننده‌ی این موضوع است (شکل ۵).

Talaei-Hassanloui (1999) در بررسی میزان حساسیت تخم سن گندم به قارچ *B. bassiana*، مرحله‌ی نشو و نمای جنین در هنگام تیمار و رطوبت نسبی محیط را به عنوان عوامل تاثیرگذار معرفی نمود. در تحقیق حاضر مشخص شد که جدایه‌ی M_{14} موجب ۴۰٪ مرگ و میر در تخم‌ها گردید. درحالی که جدایه $Iran437_c$ نتوانست در تخم‌های سن گندم ایجاد بیماری نماید. این مطلب نشان‌دهنده‌ی این نکته است که علاوه بر عواملی که ذکر شد، جدایه‌های مختلف قارچ نیز تأثیر متفاوتی روی تفریخ تخم سن گندم دارند.

Kivan (2006) بیماری‌زایی ۴ جدایه از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه از قارچ *M. anisopliae* را به روش غوطه‌وری روی حشرات کامل سن گندم مورد بررسی قرار داد. در غلظت $۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر میزان مرگ و میر سن گندم توسط جدایه‌های قارچ *B. bassiana* ۴۰ تا ۸۲/۵٪ بعد از ۸ روز نشان داده شد، در حالی که قارچ *M. anisoplaie* با ۱۰۰٪ مرگ و میر موثرترین قارچ شناخته شد (Kivan, 2006). بررسی‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین قارچ *M. anisoplaie* و *B. bassiana* وجود دارد. اختلاف بین میزان مرگ و میر در این تحقیق با نتایج ایشان به چند دلیل قابل بررسی است.

جدول ۱- غلظت‌های کشندگی محاسبه شده برای جدایه‌های قارچ *M. anisoplaie* روی سن‌های تابستان‌گذران (۲۲ روز پس از آلوده‌سازی) و روی پوره‌ی سن دوم شش روز بعد از آلوده‌سازی

Table 1. Estimated lethal concentrations for *M. anisoplaie* isolates on aestivation population of sunn pest, (22 days after inoculation) and 2th nymphal instar (6 days after inoculation)

Pr	Chi-square	Slop	Log LC_{90} (conidia/ml) Lower limit-Upper limit	Log LC_{50} (conidia/ml) Lower limit-Upper limit	Isolates	Stages
0.8	4.55	0.38±0.9	12 (10.31-16.77)	7.64 (6.97-8.61)	$IRAN437_c$	نمونه‌های تابستان‌گذران Aestivation speciments
0.98	4.18	0.52±0.07	9.29 (8.49-10.57)	6.15 (5.69-6.63)	M_{14}	
0.9	4.74	0.41±0.08	8.63 (7.54-10.93)	4.06 (3.89-5.29)	$IRAN437_c$	پوره‌ی سن دوم 2th nymphal instar
0.95	3.87	0.44±0.1	7.04 (6.15-9.06)	3.37 (2.05-4.05)	M_{14}	

جدول ۲- LT_{50} محاسبه شده برای جدایه‌های قارچ *M. anisoliae* روی مراحل مختلف رشدی سن گندم

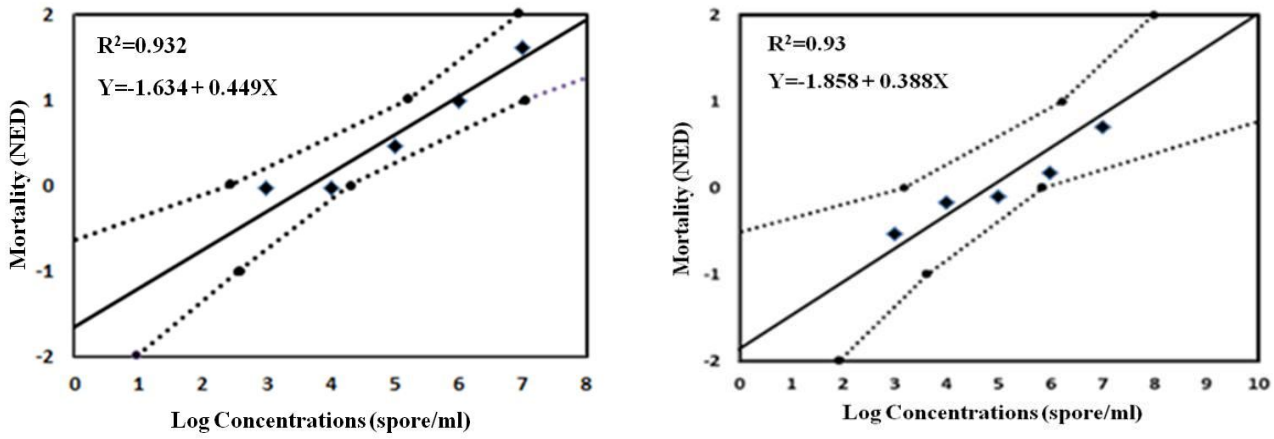
Table 2. LT_{50} values for isolates of *M. anisoplaie* on different stages of the sunn pest

LT_{50} (Day)	Isolates	Concentrations (conidia/ml)	Stages
16.89	M_{14}	10^7	حشرات کامل تابستان گذران Aestivation speciments
-	$IRAN437_c$		
11.9	M_{14}	10^8	
29.64	$IRAN437_c$		
8.5	M_{14}	10^9	
23.58	$IRAN437_c$		
6.72	M_{14}	10^3	پوره سن دوم 2th nymphal instar
-	$IRAN437_c$		
6.13	M_{14}	10^4	
6.76	$IRAN437_c$		
4.6	M_{14}	10^5	
6.43	$IRAN437_c$		
4.44	M_{14}	10^6	
5.26	$IRAN437_c$		
2.86	M_{14}	10^7	
4.55	$IRAN437_c$		
2.22	M_{14}	10^8	
3.23	$IRAN437_c$		

جدول ۳- LT_{50} محاسبه شده برای قارچ *M. anisopliae* همراه با روغن EC روی سن گندم

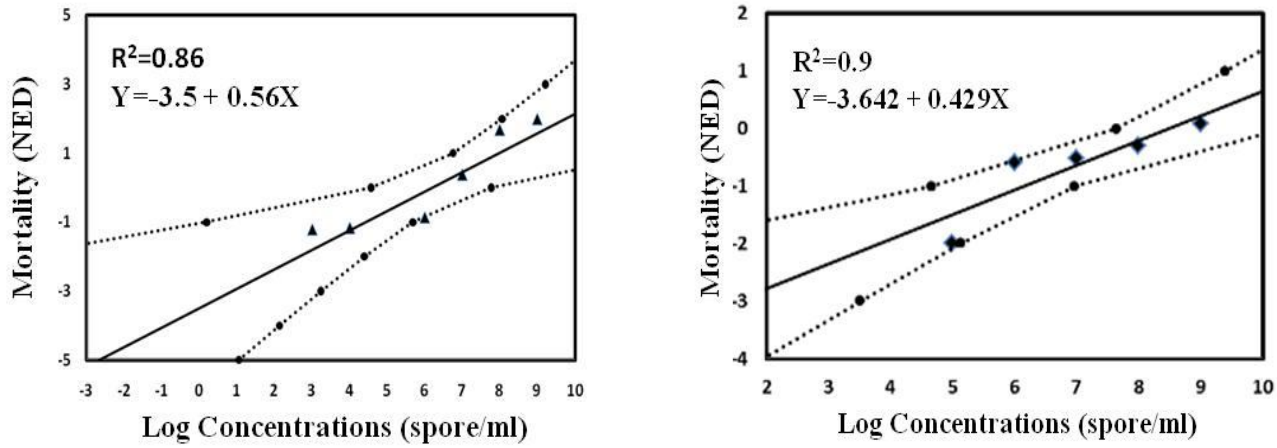
Table 3. Estimated LT_{50} values for M_{14} and $IRAN437_c$ isolates of *M. anisopliae* with EC oil

LT_{50}±SE (Day)	Concentrations (conidia/ml)	Isolates
11.8±2.24	10^6	M_{14}
5.42±3.32	10^8	
12±3.29	10^6	$IRAN437_c$
8.29±2.75	10^8	



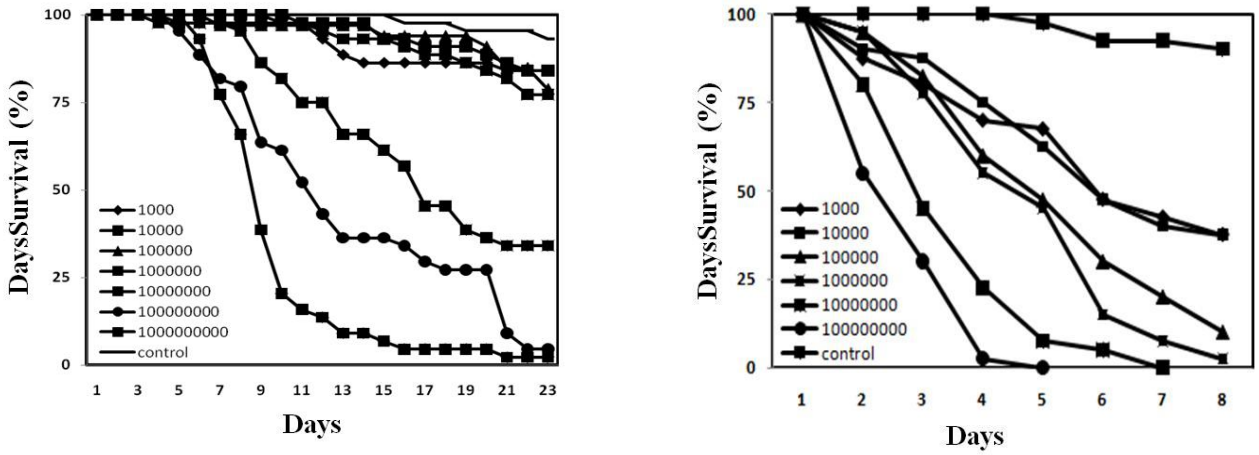
شکل ۲- غلظت-مرگ و میر برای جدایه‌های M_{14} (چپ) و $Iran437_c$ (راست) از قارچ *M. anisopliae* روی پوره‌ی سن دوم

Fig. 2. Concentration-Mortality curve of isolates M_{14} (left) and $Iran437_c$ (right) of *M. anisopliae* in 2nd nymphal instar



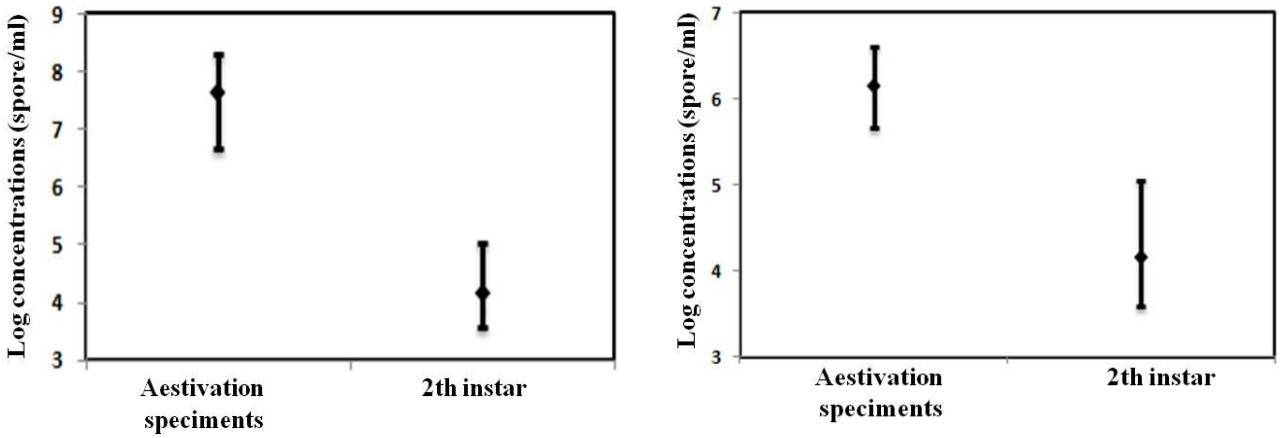
شکل ۳- غلظت-مرگ و میر برای جدایه‌های M_{14} (چپ) و $Iran437_c$ (راست)از قارچ *M. anisopliae* روی نمونه‌های تابستان‌گذران

Fig. 3. Concentration-Mortality curve of isolates M_{14} (left) and $Iran437_c$ (right) *M. anisopliae* on aestivation specimens



شکل ٤- زنده‌مانی پوره‌ی سن دوم سن گندم (راست) و نمونه‌های تابستان‌گذران (چپ) در اثر غلظت‌های مختلف جدایه‌ی M_{14} قارچ *M. anisopliae*

Fig. 4. Survival of 2th instar of *E. integriceps* (right) and aestivation specimens (left) by different concentrations of *M. anisopliae*, isolate M_{14}



شکل ۵- مقایسه‌ی حدود بالا و پایین لگاریتم LC_{50} برای جدایه‌ی $Iran437_c$ (راست) و جدایه‌ی M_{14} (چپ) از قارچ *M. anisopliae* در دو مرحله‌ی زیستی سن گندم

Fig. 5- Comparison between confidence intervals of Log LC_{50} for isolates $Iran437_c$ (right) and M_{14} (left) of *M. anisopliae* for two stages of *E. integriceps*

Kivan (2006) بیماری‌زایی ۴ جدایه از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه از قارچ *M. anisopliae* را به روش غوطه‌وری روی حشرات کامل سن گندم مورد بررسی قرار داد. در غلظت $۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر میزان مرگ و میر سن گندم توسط جدایه‌های قارچ *B. bassiana* ۴۰ تا ۸۲/۵٪ بعد از ۸ روز نشان داده شد، در حالی که قارچ *M. anisoplaie* با ۱۰۰٪ مرگ و میر موثرترین قارچ شناخته شد (Kivan, 2006). بررسی‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین قارچ *M. anisoplaie* و *B. bassiana* وجود دارد. اختلاف بین میزان مرگ و میر در این تحقیق با نتایج ایشان به چند دلیل قابل بررسی است. نخست اینکه در این تحقیق از روش پاششی استفاده شد. در صورتی‌که ایشان از روش غوطه‌وری برای زیست‌سنجی استفاده کرده است. در روش غوطه‌وری احتمال برخورد اسپورها با سطح بدن حشره نسبت به روش پاششی افزایش می‌یابد. دوم اینکه میزان رطوبت نسبی می‌تواند در تأثیرگذاری قارچ روی میزبان نقش داشته باشد. زیرا رطوبت تأثیر مهمی بر شروع و میزان فعالیت اینوکلوم قارچ دارد (Batman *et al.* 1993). همه‌ی قارچ‌ها برای جوانه‌زنی، رشد و اسپورزایی نیاز به رطوبت دارند (Hall, 1981). میزان رطوبت نسبی در آزمایش‌های انجام شده ۵±۷۵٪ بود این در حالی است که آزمایش‌های ایشان در رطوبت بالای ۹۰٪ صورت گرفته است. تفاوت در نوع جدایه عامل دیگری است که باعث اختلاف در نتایج آزمایش‌ها گردیده است.

Bandani *et al.* (2006) بیمارگری دو جدایه‌ی M189 و 4556 از قارچ *M. anisopliae* را روی حشرات بالغ سن گندم در ۵ غلظت $۱۰^{۴}$ تا $۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر به روش غوطه‌وری در رطوبت ۸۰٪ بررسی کردند. LC_{50} جدایه‌های 4556 و M189 به ترتیب $۱۰^{۵}\times$ ۳/۳۸ و $۱۰^{۵}\times$۷/۷۰۴ کنیدی در میلی‌لیتر بود. نتایج آنها نشان داد که جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisoplaie* اثرات مختلفی روی حشرات کامل سن گندم می‌گذارند (Bandani *et al.* 2006). بنابراین شناسایی جدایه‌های متفاوت در آزمایش‌های زیست‌سنجی برای تعیین مؤثرترین جدایه از اهمیت برخوردار می‌باشد.

در این تحقیق جدایه‌های قارچ روی تخم و سن دوم پورگی و حشرات بالغ سن گندم مورد بررسی قرار گرفت تا علاوه بر شناسایی حساس‌ترین مراحل زیستی سن گندم، بتوان در آزمایش‌های مزرعه‌ای تاثیر قارچ قابل تخمین باشد. نتایج حاصل از مقایسه LC_{50} با هم‌پوشانی بین دو مرحله‌ی زیستی پوره‌ی سن دوم و حشرات بالغ تابستان گذران (شکل ۵) نشان داد که اختلاف میزان مرگ و میر در مراحل مختلف

زندگی، معنی‌دار بوده و در هر یک از این مراحل حساسیت متفاوتی ثبت شد. Talaei-Hassanloui (1999) اثر قارچ *B. bassiana* را روی مراحل مختلف سن گندم آزمایش کرد و نشان داد که پوره‌های سن دوم و پنجم بالاترین مرگ و میر را از خود نشان دادند. نتایج پژوهش حاضر نیز با نتایج Talaei-Hassanloui (1999) مطابقت دارد.

توسعه‌ی آفت‌کش‌های قارچی مؤثر، بستگی به انتخاب سویه‌ی زهرآگین، تولید انبوه کافی و فرمولاسیون‌های مناسب دارد (Jenkins *et al*. 1998; Burges and Keith, 1998). مطالعه‌ی اخیر نشان داد که افزودن روغن سبب سرعت بخشیدن به مرگ حشره شد. روغن، سطح آب‌گریز و لیپوفیل بدن حشرات و برگ گیاهان را خیس کرده و در مواجهه با این سطح، قبل از جذب‌شدن به کوتیکول سریعاً پخش می‌شود. فایده‌ی کلیدی آن توزیع گسترده و نتیجه بخش کنیدیوم‌ها در فضای غشائی بین بندهای بدن حشره و محفوظ شدن آنهاست. این قسمت از کوتیکول نرم و نازک و دارای محیط نسبتاً مرطوبی بوده که حتی در شرایط آب و هوایی خشک، جوانه‌زنی سریع و مناسب کنیدیدم‌ها صورت می‌گیرد (Ghazavi, 2003). انتقال کنیدیوم‌ها توسط روغن به میکروکلیمای مرطوب بین بندهای بدن حشره، رمز موفقیت فرمولاسیون‌های روغنی در مناطق خشک می‌باشد (Boucias and Latge, 1988). نتایج تحقیقات محققین نیز اثر روغن را در افزایش اثر قارچ اثبات نموده است (Skrobek, 2001).

Bandani and Esmailpour(2006) در یک تحقیق اثر ترکیبات روغنی را در شدت بیمارگری قارچ *B. bassiana* روی سن گندم مورد ارزیابی قرار داده و از روش غوطه‌ورکردن استفاده نمودند. نتایج بیانگر این مطلب بود که فرمولاسیون‌های روغنی شدت بیماریزایی قارچ را افزایش می‌دهند. اپی‌کوتیکول اولین لایه‌ی محافظتی حشره در برابر قارچ می‌باشد که استفاده از روغن در فرمولاسیون باعث افزایش چسبندگی اسپور به کوتیکول حشره می‌گردد و نفوذ آن را راحت‌تر می‌نماید (Bandani and Esmailpour, 2006).

براساس تحقیقات انجام شده روی جدایه (M_{14}) قارچ *M. anisopliae* و نحوه‌ی آلوده‌سازی (پاششی) در رطوبت ۷۵٪ و اثر روغن در شدت بیماری‌زایی قارچ، اعتقاد ما بر این است که این جدایه را می‌توان برای کنترل سن گندم در مکان‌های زمستانگذران استفاده نمود. هر چند که پایین بودن رطوبت نسبی در مزارع، ممکن است کاربرد آن را در شرایط صحرایی محدود نماید، ولی استفاده از مواد همراه و تولید فرمولاسیون‌های مناسب به منظور تأمین رطوبت مورد نیاز برای جوانه‌زنی کنیدی و افزایش اثر بیماریزایی قارچ می‌تواند زمینه‌ی استفاده عملی از این جدایه‌ی با ارزش را در کنترل آفات فراهم سازد. بدیهی است برای تعیین غلظت مناسب و یا سایر شرایط بهینه، انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی در شرایط طبیعی ضرورت خواهد داشت.

سپاسگزاری

نگارندگان از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور برای در اختیار قراردادن امکانات لازم، از جناب آقای دکتر مهران غزوی و خانم مهندس آرزو یوسفی به لحاظ همکاری‌های بی‌دریغشان سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

ASKARY, H., N. BENHAMOU and J. BRODUR, 1999. Ultrastructural and characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrate Pathology, 74: 1-13.

BANDANI A. R., M. TORK and G. R. RASSOULIAN, 2006. Comparison of pathogenicity of two isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on adult sunn pest (*Eurygaster integriceps* Puton.). Commonwealth Agricultural and Applied Biological Sciences, 71(2 Pt B):543-8.

BANDANI, A. R. and N. ESMAILPOUR, 2006. Oil formulation of entomopathogenic fungus, *Beauveria*

bassiana, against sunn pest, *Eurygaster integriceps* puton (Heteroptera: Scutelleridae). Commonwealth Agricultural and Applied Biological Sciences, 71(2): 443-8.

BATMAN, R. P., M. CAREY, D. MOORE and C. PRIOR, 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Annals of Applied Biology, 122:145–152.

BOUCIAS, D. G. and J. P. LATGE, 1988. Non- specific induction of germination of *Conidiobolus obscures* and *Nomurraea rileyi* host and non- host cuticle extracts. Journal of Invertebrate Pathology, 43: 288-292.

BURGES, H. D. and A. J. KEITH, 1998. Technology of formulation and application, pp.7-30. In: H.D. Burges, (ed.). Formolation of Microbial Biopsticides: Benefical microorganisms, nematodes and seed treatments: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

CLARKSON, J. M. and A. K. CHARNELY, 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends of Microbiology, 4: 197-203.

GAZAVI, M. 2003. Determination of the Iranian isolates of *Beauveria bassiana* and studying their effects on *Locusta migratoria*. Ph.D. Thesis, 171 pp. University of Tehran.

HALL, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In Burges H. D. (ed): Microbial control of pests and plant disease. Academic Press Inc, London, pp. 483-498.

JENKINS, N. E., G. HEVIEFO, J. LANGEVALD, A. J. CHERRY and C. J. LOMER, 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information, 19(1): 21 N-13N.

KASSA, A. 2003 Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers and storage pests. Thesis, 178 pp. George-August-University, Gottingen, Germany.

KIVAN, M. 2006. Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutelleridae). Entomological Generalis, 30(1): 063–069.

LEGER, R. J., M. S.GOETTEL, D. W. ROBERTS and R. C. STAPLES, 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 58: 168-179.

MOORE D. and C. PRIOR 1993. The potential of mycoinsecticides. Biocontrol News Information, 14: 31–40.

MOORE, D., S. EDUGINGTUN, H. KUTUK and M. EL-BOUHSSINI, 2004. The development of a myco insecticide for the biological control of sunn pest. Proceeding of Second International conference on Sunn pest, Allepo, Syria.

PARKER, B. L., M. SKINNER, S. D. COSTA, S. GOULI, W. REID and M. El-BOUHSSINI, 2003. Entomopathogenic fungi of *Eurigaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): collection and characterization for development. Biological control, 27: 260-272.

PPRI (Ankara), 1997. Strengthening sustainable sunn pest control in Turkey, 5p.

SKROBEK, A. 2001. Investigation on the effect of entomopathogenic fungi on whiteflies. Ph.D. Dissertation, Department of Plant Disease, Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universitate, Bonn.

TALAEI-HASSANLOUI, R. 1999. Laboratory investigation into pathogenicity of *Beauveria bassiana* on sunn pest *Eurygaster integriceps*. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Iran.