حساسیت دو گونه آفات انباری به قارچ *Metarhizium anisopliae* Sorokin بر اساس دو روش زیست سنجی

فرشید شخصی زارع*[۱]، رضا وفایی شوشتری[۲]، حسین فرازمند[۳]، عارف معروف[۴]، مهران غزوی[۵] و علی محمدی پور[۶]

۱- دانشجوی سابق دکتری گروه حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، (shakhsi.zare@gmail.com)

۲- دانشیار گروه حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی اراک

۳- ۴، ۵ و ۶- به ترتیب دانشیار، استادیار، دانشیار و محقق مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۹/۱۵

چکیده

حساسیت دو گونه آفت انباری شپشه آرد *Tribolium confusum* (Col., Tenebrionidae) و شپشه دندانه دار *Oryzaephilus surinamensis* (Col., Silvanidae) به دو جدایه ایرانی قارچ *Metarhizium anisopliae*، سراوان (DEMI001) و نور (DEMI002) با استفاده از دو روش زیست سنجی غوطه‌ورسازی و اسپور خشک ارزیابی شد. در این بررسی پس از کشت انبوه هر جدایه در شرایط آزمایشگاهی (دوره نوری ۱۶:۸، دمای ۲۸±۱°C و RH ٪۶۵±۵) و تهیه سوسپانسیون مادری، در روش غوطه‌ورسازی، پنج غلظت بر اساس فواصل لگاریتمی تعیین شد و تیمار حشرات بر اساس آنها انجام گردید. در روش اسپور خشک، به منظور تهیه دزهای مناسب، یک گرم اسپور خشک در ۱۰ میلی‌لیتر محلول Tween 80 به صورت سوسپانسیون مخلوط شد و تعداد کنیدی‌های آن محاسبه گردید. سپس بر اساس آن معادل وزنی چهار دز برای هر جدایه مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آزمایشات در چهار تکرار انجام و در هر تکرار از ۲۰ عدد حشره کامل ۱۰-۷ روزه استفاده گردید. نتایج نشان داد، در هر دو روش، شپشه دندانه‌دار حساسیت بیشتری به هر دو جدایه در مقایسه با شپشه آرد داشت و جدایه سراوان با LD_{50} $۲/۳۷\times۱۰^{۵}$ و $۵/۳۵\times۱۰^{۴}$ کنیدی بر میلی‌لیتر در روش غوطه‌ورسازی و $۹/۵\times۱۰^{۹}$ و $۸/۲\times۱۰^{۸}$ کنیدی بر میلی‌لیتر در روش اسپور خشک به ترتیب بر روی شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار، بیماریزایی بالاتری نسبت به جدایه نور بر روی هر دو گونه حشره داشت. نتایج مقایسه دو روش زیست سنجی، حاکی از کارایی بالاتر روش غوطه‌ورسازی نسبت به روش دیگر بود.

کلید واژه‌ها: قارچ متاریزیوم، شپشه آرد، شپشه دندانه‌دار، سراوان، نور

مقدمه

هر ساله مقادیر بسیاری از محصولات انباری در دنیا توسط حشرات مختلف آلوده شده و از بین می‌روند. بطوریکه سالانه ۵۰٪ کل محصول غله آسیا و آفریقا بر اثر خسارت آفات انباری از بین می‌رود (Abd El-Aziz, 2011) و در ایران این مقدار ۱۰٪ کل محصولات انباری را شامل می‌شود (Zolfagharieh, 2002). دو گونه از مهمترین سوسک‌های آفت انباری در ایران و دیگر نقاط دنیا سوسک‌های شپشه آرد (*Tribolium confusum* Du Val) و شپشه دندانه‌دار (*Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus) می‌باشند. شپشه‌های آرد حشراتی همه‌جایی و چندخوار به طول ۴-۳ میلی‌متر و به رنگ قرمز تیره می‌باشند که طیف وسیعی از محصولات انباری را به صورت مستقیم و یا با برجای گذاشتن اجساد، پوسته‌های لاروی و فضولات خود آلوده می‌سازند و از مرغوبیت آن‌ها به شدت می‌کاهند. شپشه دندانه‌دار که به معنی واقعی

همه‌جایی است، حشرات کوچکی به طول ۳/۵-۲/۵ میلی‌متر و به رنگ قرمز روش تا قهوه‌ای هستند که به طیف وسیعی از فرآورده‌های گیاهی مانند گندم و جو و میوه‌های خشک و دانه‌های روغنی حمله می‌کنند و خسارت‌های زیادی را به وجود می آورند (Bagheri-Zenouz, 2011).

بروز مقاومت به حشره‌کش‌های سنتی مورد استفاده در کنترل آفات محصولات انباری و افزایش تقاضا برای محصولات غذایی عاری از سموم شیمیایی محققان مختلف را واداشت تا روش‌های جایگزین دیگری را مورد بررسی و آزمایش قرار دهند (Kavallieratos et al., 2006).

با توجه به اینکه مدیریت اکوسیستم‌های انباری در مقایسه با اکوسیستم مزرعه ساده‌تر می‌باشد، استفاده از عوامل بیماریزای حشرات و یا فرآورده‌هایی بر پایه آنها می‌تواند راه حل مناسبی در کنترل آفات محصولات انباری باشد (Navarro and Donahaye, 2005). قارچ‌ها گروه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها هستند که یوکاریوت، هتروتروف، تک سلولی و یا رشته‌ای بوده و قادرند اسپورهای جنسی و یا غیرجنسی تولید کنند (Butt and Goettel, 2000). قارچ‌های بیمارگر حشرات قادرند موجب بروز اختلالات فیزیولوژیک در حشرات شده و با پیشرفت بیماری باعث انهدام آنها می‌شوند. قارچ‌های بیمارگر در مقایسه با دیگر میکروارگانیسم‌ها قادرند حشرات زیادتری را آلوده کنند (Kaya and Munyi, 1995). تاکنون گونه‌های قارچی مختلفی در ارتباط با حشرات شناسایی شده‌اند که برخی از آنها قادرند بیماری‌های حادی را روی حشرات ایجاد کنند. با این وجود، تعداد معدودی از آنها به عنوان کنترل کننده آفات، مورد استفاده قرار گرفته‌اند و دورنمای استفاده از بسیاری از آنها نیز مشخص نمی‌باشد. با این حال، افزایش تعداد محصولات تجاری به ثبت رسیده حاکی از تمایل رو به افزایش استفاده از قارچ‌ها در کنترل آفات می‌باشد (Alexopolous et al., 1996; Butt et al., 2001).

در سال‌های اخیر توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل آفات انباری خصوصاً حشرات راسته سخت بالپوشان توسط محققین مختلف مورد بررسی قرارگرفته و به اثبات رسیده است (Batta, 2004; Khashaveh et al. 2008; Khashaveh et al. 2008; Mahdneshin et al., 2009; Shams et al., 2011). در بین قارچ‌های بیمارگر حشرات، جنس‌های *Metarhizium* و *Beauvaria* به دلیل توانایی تنوع تأثیر بر حشرات آفت و کنترل زیستی آنها توجهات بسیاری را به خود معطوف نموده‌اند. هر دو جنس به سهولت به تعدادی زیادی از حشرات حمله می‌کنند و همچنین قادر به تولید توکسین خاص در سطح گونه و حتی جدایه می‌باشند، که این مسئله نقش مهمی در کارایی حشره‌کشی آنها ایفا می‌کند. جدایه‌های این دو قارچ به عنوان قارچ‌هایی که در غلظت‌های پایین اسپوری باعث مرگ تدریجی شده و اثر کشندگی زیادی دارند شناخته شده‌اند (Burges and Hussey, 1971; Hanel and Watson, 1983).

قارچ بیمارگر گونه *Metarhizium anisopliae* Sorokin (Ascomycota: Hypacreales) دارای گسترش جهانی بوده و از روی تعداد بسیاری از گونه‌های حشرات جداسازی شده است و به عنوان عامل کنترل بیولوژیک طیف وسیعی از حشرات راسته‌های مختلف حشرات شناخته می‌شود (Kaake et al., 1997; Pria Junior et al., 2008). بطوریکه بیش از ۲۰۴ گونه حشره از راسته‌های مختلف به ویژه سخت بالپوشان توسط این قارچ آلوده می‌شوند (Goettel et al., 2005). از دلایل مهم استفاده از این قارچ به عنوان عامل بیولوژیک، قدرت بیماریزایی بالا، نحوه تولید مثل و محیط کشت پرورش آن، تنوع ژنتیکی زیاد و همچنین قدرت بیماریزایی متنوع جدایه‌های مختلف آن روی حشرات می‌باشد (Almeida and Batista, 2001).

در تحقیق حاضر اثرات حشره‌کشی دو جدایه ایرانی (سراوان و نور) قارچ *M. anisopliae* بر اساس دو روش زیست سنجی مورد بررسی قرار گرفت و میزان حساسیت حشرات کامل دو گونه آفت انباری شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار به جدایه‌های مختلف این گونه قارچی مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

حشرات مورد استفاده

حشرات مورد استفاده در انجام این آزمایش دو گونه شپشه آرد، *Tribolium confusum* (Col: Tenebrionidae) و شپشه دندانه‌دار، *Oryzaephilus surinamensis* (Col: Sivanidae) بودند که جمعیت‌های اولیه آنها از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) تهیه گردیدند و برای ۷ نسل در شرایط آزمایشگاهی (۲۵ ±۱°C، RH ۶۵±۵ درصد و در تاریکی) پرورش داده شدند. در انجام آزمایشات از حشرات کامل ۱۰-۷ روزه هر دو گونه که مخلوطی از حشرات نر و ماده بودند استفاده گردید.

جدایه‌های قارچی مورد استفاده

جدایه‌های قارچی سراوان (DEMI001) و نور (DEMI002) از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) تهیه گردیدند. خصوصیات جدایه‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ آمده است.

به منظور تکثیر جدایه‌های قارچی از محیط کشت Sabourauds Dextrose Agar (SDA) همراه با یک درصد مخمر استفاده شد. این محیط کشت با دارا بودن محیطی اسیدی (PH=5.6) از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری نموده و باعث تولید اسپور به اندازه کافی می‌گردد (Poinar and Thomas, 1984). به منظور کشت انبوه، هر کدام از جدایه‌های قارچی در انکوباتوری با شرایط دمایی ۱±۲۸ درجه سیلیسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری روشنایی:تاریکی، ۱۶:۸ نگهداری شدند. مدت زمان لازم برای اسپوردهی بین ۱۰ تا ۱۵ روز متغیر بود. با توجه به اینکه جهت انجام آزمایشات بایستی مقدار جوانه زنی اسپورها بیش از ۸۵ درصد باشد (Jenkins et al., 1998)، آزمون زنده‌مانی اسپورها (Viability) در ارتباط با هر جدایه به صورت جداگانه انجام گردید. برای این منظور پس از تهیه سوسپانسیون لازم از هر جدایه و کشت مقداری از آن در محیط کشت Water Agar و نگهداری در شرایط آزمایشگاهی، پس از مدت ۱۸-۱۲ ساعت تعداد اسپورهای جوانه زده شمارش و درصد جوانه زنی اسپورها محاسبه گردید.

روش غوطه‌ورسازی

برای این منظور ابتدا سوسپانسیون مادری از هر جدایه آماده و با استفاده از لام نئوبار غلظت آن تعیین گردید و غلظتهای 10^2، 10^4، 10^6 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. سپس مقدار پنج میلی‌لیتر از هر غلظت به طور جداگانه داخل بشری ریخته شد و تعداد ۲۰ عدد حشره کامل ۱۰-۷ روزه از هر کدام از حشرات مورد آزمایش به طور جداگانه به مدت ۵ ثانیه در داخل آن غوطه‌ور گردیدند. این کار در ۴ تکرار انجام شد. از محلول ۰/۰۵ درصد Tween 80 (همراه با آب مقطر) نیز به عنوان شاهد استفاده گردید.

جدول ۱- خصوصیات جدایه‌های ایرانی قارچ *Metarhizium anisopliae* مورد آزمایش

Table 1. Iranian fungal isolates of *M. anisopliae* characteristics used in the experiments

Fungal Isolate	Code	Host	Host Name in Persian	Local of Collection
Saravan	DEMI001	*Rhynchophorus ferrugineus* (Col.: Curculionidae)	سرخرطومی حنایی خرما	Saravan (Sistan and Baluchestan)
Nour	DEMI002	*Parandra caspica* (Col.: Cerambycidae)	سوسک شاخک بلند خزر	Nour Forest (Mazandaran)

حشرات مورد آزمایش پس از تیمار با غلظت‌های معین در داخل پتری‌های کوچکی که قبلاً استریل‌شده بودند قرار داده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت، حشرات مرده حذف گردیدند و زنده‌ها به ظروف استریل دیگری که حاوی یک گرم گندم خرد شده به عنوان غذا و پنبه مرطوب شده با آب مقطر استریل (به مقدار ۵ میلی‌لیتر) بود، منتقل شدند. ظروف مذکور در داخل انکوباتوری با شرایط دمایی ۲±۲۹ درجه سلیسیوس و رطوبت ۵±۶۵٪ و در تاریکی قرارداده شدند و تعداد تلفات هر کدام از حشرات در تیمار با هر جدایه قارچی در زمان هفت روز پس از تیمار، شمارش و ثبت گردید.

روش اسپور خشک

به منظور بدست‌آوردن معادل وزنی تعداد اسپورهای مادری، مقدار یک گرم اسپور خشک در ۱۰ میلی‌لیتر محلول Tween به‌صورت سوسپانسیون مخلوط شد. سپس تعداد کنیدی‌های این مخلوط با استفاده از لام گلبول‌شمار محاسبه گردید. سپس جهت انجام آزمایشات، معادل وزنی تعداد ۴×۱۰^{۶}، ۴×۱۰^{۸}، ۴×۱۰^{۱۰} و ۴×۱۰^{۱۲} عدد از اسپور خشک محاسبه‌شد. مقادیر بدست آمده که به ترتیب معادل ۰/۰۰۱، ۰/۱، ۱۰ و ۱۰۰ گرم اسپور خشک بود، به طور جداگانه در ظروفی که هر کدام حاوی یک کیلوگرم بذر گندم رقم فلات بودند، ریخته شد و با تکان دادن ظرف کاملاً یکنواخت گردید. سپس مقدار ۴۰۰ گرم از محتویات هر ظرف برداشته شد و به ۴ قسمت ۱۰۰ گرمی تقسیم گردید (۴ تکرار) و در داخل ظروف استوانه ای شکلی به حجم ۳۵۰ میلی لیتر ریخته شد. سپس حشرات کامل هر گونه به طور جداگانه در هر کدام از این ظروف رهاسازی گردیدند و تلفات آنها پس از زمان هفت روز شمارش گردید.

کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت آزمون فاکتوریل انجام گرفتند. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 انجام شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت پذیرفت. به منظور اصلاح مرگ و میر شاهد نیز از فرمول Abbott (1925) استفاده شد. مقادیر LC_{50} و LC_{20} با استفاده از نرم افزار Stat Direct محاسبه گردید. نسبت سمیت (Toxicity Ratio) در دو روش زیست سنجی غوطه‌ورسازی و اسپور خشک جدایه‌های نور و سراوان قارچ *M. anisopliae* به طور جداگانه بر روی دو گونه حشره مورد بررسی با استفاده فرمول زیر محاسبه گردید (Robertson et al., 2007):

$$T.R=\frac{LC_{50}\ A}{LC_{50}\ B}$$

A: روش اسپور خشک

B: روش غوطه‌ورسازی

نتایج

غوطه‌ورسازی

بررسی کارایی حشره‌کشی دو جدایه قارچ *M. anisopliae* بر روی شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار نشان داد، با افزایش مقدار غلظت هر جدایه، مقدار تلفات حشرات کامل نیز افزایش یافت (شپشه آرد: ۷۴/۴۶۱= $F_{4,10\ DEMI001}$، $F_{4,10\ DEMI002}$ =۹۸/۲۸۳ ؛ P <۰/۰۵ ، P <۰/۰۵)؛ (شپشه دندانه‌دار: ۹۶/۳۷۲= $F_{4,10\ DEMI001}$ ، $F_{4,10\ DEMI002}$ =۱۲۱/۳۴۸ ؛ P <۰/۰۵ ، P <۰/۰۵). میانگین درصد تلفات حشرات کامل هر دو گونه در تیمار با دو جدایه نور و سراوان در جدول ۲ درج شده است.

زیست‌سنجی

بر اساس نتایج زیست سنجی جدایه‌های قارچ *M. anisopliae* بر روی حشرات کامل شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار (جدول ۳)، جدایه سراوان با مقدار LC_{50} برابر با $۲/۳۷\times۱۰^{۵}$ و $۵/۳۵\times۱۰^{۴}$ کنیدی در میلی لیتر به ترتیب بر روی شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار دارای اثر حشره‌کشی بیشتری نسبت به جدایه نور بود.

جدول ۲- میانگین درصد تلفات حشرات کامل شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار در تیمار با غلظت‌های مختلف دو جدایه از قارچ *M. anisopliae* در زمان هفت روز پس از تیمار به روش غوطه‌ور سازی

Table 2- Mortality mean percentage of red flour beetle and saw-tooth grain beetle adults treated with different dosage of two fungal isolates of *M. anisopliae*, 7 days after exposure in suspension method

Species	Fungal isolate	Lethal dose (conidia per milliliter) Mortality (%)±SE				
T. confusum	DEMI001	5.3×10^3	2.3×10^4	1.8×10^5	5.8×10^6	7.1×10^8
		8.28±2.65d	25.18±2.21c	41.47±1.72b	64.82±2.04b	87.31±2.33a
	DEMI002	4.7×10^4	6.6×10^5	2.3×10^6	4.5×10^7	6.7×10^7
		8.33±1.68d	33.38±2.18cd	48.61±2.29c	72.35±1.92b	89.27±1.76a
O. surinamensis	DEMI001	1.2×10^2	3.6×10^3	1.5×10^5	4.2×10^5	1.3×10^6
		7.24±1.28d	29.6±1.92c	53.21±3.19b	61/91±2.50b	84.21±2.18a
	DEMI002	8.7×10^2	7.4×10^4	1.4×10^6	5.5×10^6	3.8×10^7
		6.64±3.28d	28.73±2.24cd	59.66±2.31b	61.12±2.89b	92.00±3.21a

[1] Means within a row followed by the same letters are not significantly different (Duncan's test, $P > 0.05$).
[2] Saravan (DEMI001) and Nour (DEMI002)

جدول ۳- زیست سنجی قارچ *M. anisopliae* بر حشرات کامل شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار در زمان هفت روز پس از تیمار به روش غوطه‌ورسازی

Table 3. Bioassay of *M. anisopliae* on red flour beetle and saw-tooth grain beetle adults, 7 days after exposure in suspension method

Species	Fungal Isolate	Letal dose (conidia per milliliter) Confidence Level (95%)		Slope±SE	χ	*P*-value
		LC50	LC20			
T. confusum	DEMI001	2.37×10^5 (1×10^5-6.1×10^5)	2×10^4 (4×10^3-5.1×10^4)	0.783±0.05	0.461	0.927
	DEMI002	3.10×10^6 (1.18×10^6-7.8×10^6)	2.14×10^5 (3.26×10^4-6.24×10^5)	0.727±0.02	1.326	0.722
O. surinamensis	DEMI001	5.35×10^4 (1.43×10^4-1.9×10^5)	1.27×10^3 ($7.55\times10^5.68\times10^3$)	0.518±0.02	1.576	0.664
	DEMI002	5.27×10^5 (1.50×10^5-1.6×10^6)	2.06×10^4 (1.70×10^3-8.2×10^4)	0.598±0.04	1.240	0.743

Saravan (DEMI001) and Nour (DEMI002)

اسپور خشک

بررسی کارایی حشره‌کشی دو جدایه قارچ *M. anisopliae* بر روی شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار نشان داد، با افزایش مقدار غلظت هر جدایه، مقدار تلفات حشرات کامل نیز افزایش یافت (جدول ۴). (شپشه آرد: $F_{3,6\ DEMI001}$ =۵۳/۳۵۲ ، $P<0.05$ ؛ $F_{3,6\ DEMI002}$ =۱۵۱/۷۳ ، $P<0.05$)؛ (شپشه دندانه‌دار: $F_{3,6\ DEMI001}$ =۳۳/۹۸۱ ، P <۰/۰۵ ؛ $F_{3,6\ DEMI002}$ =۳۹/۳۲ ، P <۰/۰۵). میانگین درصد تلفات حشرات کامل هر دو گونه در تیمار با دو جدایه نور و سراوان در جدول ۴ درج شده است.

زیست سنجی

نتایج زیست سنجی جدایه‌های نور و سراوان قارچ *M. anisopliae* بر روی حشرات کامل شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار نشان داد جدایه سراوان دارای اثر حشره‌کشی بیشتری نسبت به جدایه نور بر روی هر دو گونه حشرات مورد آزمایش بود (جدول ۵).

با توجه به نتایج درج شده در جدول ۶، روش غوطه‌ورسازی در ارتباط با هر دو جدایه قارچی و بر روی هر دو گونه حشره مورد آزمایش چندین برابر اثرات حشره‌کشی بالاتری نسبت به روش اسپور خشک داشت و این نسبت در مورد جدایه سراوان بر روی شپشه آرد بیشتر از بقیه بود.

جدول ٤- میانگین درصد تلفات حشرات *کامل* شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار در تیمار با غلظت‌های مختلف دو جدایه از قارچ *M. anisopliae* در زمان هفت روز پس از تیمار به روش اسپور خشک

Table 4. Mortality mean percentage of red flour beetle and saw-tooth grain beetle adults treated with different dosage of two fungal isolates of *M. anisopliae*, 7 days after exposure in dry conidia method

Concentration	Mortality (%)±SE			
	DEMI001		DEMI002	
	T. confusum	*O. surinamensis*	*T. confusum*	*O. surinamensis*
4×10^{6}	17.5±1.44a	27.50±2.50a	15.00±2.88a	20.00±2.04a
4×10^{8}	36.25±3.75b	41.25±2.39b	28.75±4.26b	36.25±3.14b
4×10^{10}	65.25±3.39c	71.25±4.26c	52.50±3.22c	63.75±2.39c
4×10^{12}	61.23±1.45c	72.50±3.42c	76.33±2.22c	77.50±1.52d

[1] Means within a row followed by the same letters are not significantly different (Duncan's test, $P > 0.05$).
[2] Saravan (DEMI001) and Nour (DEMI002)

جدول ٥- زیست سنجی قارچ متاریزیوم بر حشرات کامل شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار در زمان هفت روز پس از تیمار به روش غوطه‌ورسازی

Table 5. Bioassay of *M. anisopliae* on red flour beetle and saw-tooth grain beetle adults, 7 days after exposure in dry conidia method.

Species	Fungal Isolate	Letal dose (conidia per milliliter) Confidence Level (95%)		Slope±SE	χ	*P*-value
		LC50	LC20			
T. confusum	DEMI001	9.5×10^{9} (2.1×10^{9}-1.1×10^{11})	7.7×10^{6} (2.8×10^{5}-4.4×10^{7})	0.272±0.05	2.418	0.992
	DEMI002	2.8×10^{10} (5.5×10^{9}-5.3×10^{11})	2.6×10^{7} (1.6×10^{6}-1.2×10^{8})	0.277±0.08	4.863	0.900
O. surinamensis	DEMI001	8.2×10^{8} (2.1×10^{8}-3.7×10^{9})	1.1×10^{6} (2.5×10^{4}-7.4×10^{6})	2.290±0.05	4.707	0.909
	DEMI002	3.5×10^{9} (9.6×10^{8}-2.1×10^{10})	5.5×10^{6} (2.8×10^{5}-2.9×10^{7})	0.300±0.02	2.296	0.984

Saravan (DEMI001) and Nour (DEMI002)

جدول ٦- نسبت سمیت (T.R) دو روش غوطه‌ورسازی و اسپور خشک دو جدایه نور و سراوان قارچ *M. Anisopliae* بر روی حشرات کامل شپشه آرد و شپشه دندانه‌دار

Table 6. Toxicity ratio (T.R) of suspension and dry conidia methods for two fungal isolates of *M. anisopliae* (Saravan and Nour) against red flour beetle and saw-tooth grain beetle adults.

Species	Toxicity Ratio (T.R)	
	DEMI001	DEMI002
T. confusum	4×10^{4}	9.03×10^{3}
O. surinamensis	1.53×10^{4}	6.64×10^{3}

Saravan (DEMI001) and Nour (DEMI002)

بحث

بررسی کارایی حشره‌کشی جدایه های سراوان (DEMI001) و نور (DEMI002) قارچ بیمارگر *M. anisopliae* بر روی هر دو گونه مورد بررسی نشان داد، در هر دو روش غوطه‌ورسازی و اسپور خشک، جدایه‌های مورد استفاده، قدرت بیمارگری و کارایی متفاوتی را روی

هر دو گونه حشره مورد بررسی نشان دادند. قارچ‌های بیمارگر حشرات در سطح گونه و حتی جدایه دارای توانایی‌های مختلفی در تولید آنزیم‌های مورد نیاز جهت گذشتن از کوتیکول بدن حشرات و نفوذ به داخل بدن آنها هستند. این موضوع باعث تفاوت در زهرآگینی و قدرت بیمارگری آنها می‌گردد (Burges and Hussey, 1971; Hanel and Watson, 1983). تاکنون تحقیقات بسیاری بر روی بیماریزایی جدایه‌های مختلف قارچی بر روی حشرات آفت انباری انجام شده و در همه آنها اختلاف در کارایی جدایه‌های مختلف گزارش گردیده است (Khashaveh et al., 2008; Batta, 2008; Mahdneshin et al., 2009; Sabbour et al., 2012; Golshan et al., 2013).

در این بررسی، نتایج حاصل از زیست سنجی جدایه‌های مورد استفاده بر روی هر دو گونه حشره مورد بررسی نشان داد، جدایه سراوان در هر دو روش آلوده سازی، دارای زهرآگینی بیشتری نسبت به جدایه نور بود. در تحقیقی که Khashaveh and Chelav (2013) بر روی بیمارگری سه جدایه از قارچ متاریزیوم بر روی گونه های *T. castaneum* و *O. surinamensis* انجام دادند، جدایه سراوان با داشتن LC_{50} معادل $۳/۱×۱۰^{۵}$ برای شپشه دندانه‌دار و $۱/۳×۱۰^{۷}$ کنیدی بر میلی‌لیتر بر روی شپشه قرمز آرد دارای بالاترین مقدار زهرآگینی بود. در تحقیق حاضر نیز جدایه سراوان دارای بیشترین مقدار بیمارگری بر روی شپشه دندانه‌دار بود. همچنین نتایج این بررسی مشابه با نتایج Khashaveh et al. (2008) بود که سه جدایه ایرانی قارچ متاریزیوم را بر روی شپشه گندم مورد آزمون قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که جدایه سراوان با حداکثر تلفات ۸۸٪ بیشتر از جدایه‌های دیگر دارای قدرت بیمارگری بود. Mahdneshin et al. (2009) نیز در بررسی کارایی دو جدایه قارچ متاریزیوم نشان دادند که جدایه سراوان دارای کارایی بالاتری در مقایسه با دیگر جدایه مورد آزمایش بود.

در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که حشرات مختلف دارای حساسیت‌های متفاوتی نسبت به قارچ‌های بیمارگر می‌باشند (Batta, 2008; Khashaveh et al., 2011; Sabbour et al., 2012). در تحقیق حاضر شپشه دندانه‌دار در هر دو روش آلوده‌سازی و در تیمار با هر دو جدایه قارچ حساسیت بیشتری نسبت به شپشه آرد داشت، بطوریکه بالاترین مقدار تلفات در تمامی تیمارها مربوط به این گونه بود. همچنین در تحقیق مشابهی که Khashaveh et al. (2011) بر روی کارایی جدایه‌های قارچ *B. bassiana* بر روی سه گونه شپشه گندم، شپشه دندانه‌دار و شپشه آرد انجام دادند، شپشه دندانه‌دار دارای حساسیت بیشتری نسبت به شپشه آرد بود. به‌طورکلی دلایل مختلفی باعث اختلاف حساسیت گونه‌های مختلف حشرات نسبت به قارچ‌های بیمارگر می‌گردد. ضخامت لایه‌های کوتیکولی حشرات مختلف متفاوت است و در نتیجه نفوذ قارچ به داخل بدن در حشرات مختلف متفاوت خواهد بود. انواع مواد لیپیدی و اسیدهای چرب در کوتیکول بدن حشرات بسیار متفاوت است و سطوح مقاومتی مختلفی را در برابر آنزیم‌های مترشحه قارچ به منظور نفوذ ایجاد می‌کند (Butt and Goettel, 2000). در تحقیقی که Wakefield (2006) در بررسی دلایل حساسیت بیشتر شپشه دندانه‌دار نسبت به شپشه آرد در تیمار با قارچ جنس *Beauvaria* انجام داد، سه دلیل اصلی برای این موضوع بیان نمود: ۱- موهای روی بدن شپشه دندانه‌دار بیشتر و بلندتر از شپشه آرد است. این موها هوای اطراف کوتیکول حشره را که دارای مقادیر زیادی رطوبت حاصل از تبخیر و تنفس است، در درون خود نگه می‌دارد که برای جوانه‌زنی اسپورها مطلوب است. ۲- مجموعه لیپیدهای کوتیکولی در این دو حشره متفاوت است و بر نفوذ سوزن تلقیح تأثیر دارند. ۳- همچنین احتمال می‌رود برخی بازدارنده‌های جوانه زنی اسپور قارچ بر روی کوتیکول شپشه آرد وجود داشته باشد. گونه‌های جنس *Tribolium* به ترشح کینون‌های دفاعی بر روی بدنشان مشهورند و این احتمال وجود دارد که این مواد بتوانند

باعث عدم جوانه‌زنی اسپور قارچ شوند (St. Leger et al., 1991). از دیگر دلایلی که باعث اختلاف حساسیت جمعیت‌های یک گونه و اختلاف نتایج آزمایشات بیمارگری بر روی آنها می‌شود می‌توان به اختلاف حساسیت افراد یک گونه با طول عمرهای متفاوت، در تیمار با قارچ اشاره کرد. در تحقیقی Khashaveh and Chelav (2013) بر روی بیمارگری سه جدایه قارچ متاریزیوم روی شپشه دندانه‌دار سه روزه انجام دادند، مقدار LC_{50} جدایه سراوان $۳/۱×۱۰^{۵}$ کنیدی بر میلی‌لیتر و جدایه نور $۲/۴×۱۰^{۶}$ کنیدی بر میلی‌لیتر بود. در بررسی حاضر، حشرات کامل شپشه دندانه‌دار مورد بررسی ۱۰-۷ روزه بودند و مقدار LC_{50} جدایه سراوان $۵/۲۷×۱۰^{۵}$ کنیدی بر میلی‌لیتر محاسبه گردید که این مقدار حدوداً دو برابر نتایج آنها بود. این نتیجه این فرضیه را تأیید می‌کند که افزایش سن حشره باعث کاهش حساسیت آن در برابر قارچ‌ها می‌گردد. البته انجام آزمایشاتی دقیق بر روی گونه‌های متفاوت در سنین مختلف ضروری است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، دو جدایه مورد استفاده در هر دو روش غوطه‌ورسازی و اسپور خشک دارای قدرت بیمارگری متفاوتی روی حشرات مورد بررسی بودند. بطوریکه در حالت اول تلفاتی بین ۷ تا ۹۲ درصد و در حال دوم ۱۵ تا ۷۱ درصد بر روی حشرات مورد آزمایش ایجاد گردید. نتایج حاصل از زیست سنجی این دو جدایه در دو حالت غوطه‌ورسازی و اسپور خشک حاکی از مقدار بالاتر LC_{50} در روش اسپورپاشی و در نتیجه کارایی بالاتر روش غوطه‌ورسازی نسبت به آن بود. Kavallieratos et al. (2006) درتحقیقی اثرات حشره‌کشی قارچ *M. anisopliae* را با دو روش اسپور خشک و غوطه‌ورسازی بر روی سه گونه آفت انباری مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها حاکی از کارایی بالاتر روش اسپورپاشی بود. از جمله دلایلی که باعث اختلاف نتایج تحقیق حاضر با نتایج آنها گردید، اختلاف در روش غوطه‌ورسازی در این دو تحقیق بود. در آزمایشات آنها دانه‌های غله با سوسپانسیون قارچی آلوده شدند و سپس حشرات روی آن رهاسازی گردیدند. اما در تحقیق حاضر، حشرات مستقیماً در داخل غلظت‌های مختلف سوسپانسیون آماده شده غوطه‌ور گردیدند و سپس غله به عنوان غذا در اختیار آنها قرار گرفت. چسبیدن کنیدی‌ها به کوتیکول مهمترین فرآیند در آغاز عفونت قارچی می‌باشد (St. Leger et al., 1991). از جمله دلایل بیشتر بودن کارایی روش سوسپانسیون نسبت به اسپورپاشی در این تحقیق، بالاتر بودن احتمال برخورد کنیدی‌ها با سطح بدن حشره در روش غوطه‌ور شدن و احتمالاً بیشتر بودن مقدار چسبندگی اسپورها به بدن حشرات در این روش بوده است. در تحقیقی Khashaveh et al. (2011) کارایی جدایه‌های مختلف قارچ *Beauvaria bassiana* را به روش کنیدی خشک بر روی سه گونه آفت انباری شپشه آرد، شپشه گندم و شپشه دندانه‌دار مورد بررسی قرار دادند. در بررسی آنها که تلفات در سه زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از تیمار مورد آزمون قرار گرفت، بالاترین مقدار تلفات، مربوط به شپشه دندانه‌دار (۸۸٪) در دز ۱۰۰۰ میلی‌گرم کنیدی در کیلوگرم و در روز دهم بود. در تحقیق حاضر، مقدار LC_{50} جدایه سراوان $۹/۵×۱۰^{۹}$ کنیدی بر کیلوگرم (معادل ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ثبت گردید. بیشتر بودن مقدار دز مصرفی در این تحقیق نسبت به تحقیق آنها در درجه اول مربوط به تفاوت در قارچ مورد استفاده است. لازم به ذکر است در بسیاری از تحقیقات انجام شده قارچ *B. bassiana* نسبت به قارچ *M. anisopliae* دارای قدرت بیمارگری بالاتری بوده و تحقیقات بسیاری نیز این موضوع را تأیید می‌کند (Samodra and Ibrahim, 2006; Mahdneshin et al., 2009; Sabbour et al., 2011). دیگر اینکه بالاترین تلفات تحقیق آنها در روز دهم محاسبه شده بود ولی در تحقیق حاضر این مقدار در روز هفتم به ثبت رسید.

یکی از مهمترین اولویت‌ها در اجرای صحیح یک برنامه مدیریت تلفیقی آفات در درجه اول انتخاب فرمولاسیون مناسب و روشی کاربردی در اجرای برنامه کنترلی است. در این تحقیق، هنگامی که غله به صورت جداگانه به روش غوطه‌ورسازی با جدایه‌های قارچی تیمار گردید، پس از زمان ۱۰ روز، سطح رویی غله تیمارشده توسط لایه‌ای سبزرنگ از قارچ متاریزیوم پوشیده شد و آن را غیرقابل مصرف گردانید (بر اساس مشاهدات نگارنده). از طرفی به منظور تیمار غله در داخل انبار استفاده از روش غوطه‌ورسازی به دلیل افزایش مقدار رطوبت عملاً امکان پذیر نمی‌باشد. لذا، استفاده از روش اسپور خشک با استفاده از جدایه سراوان به منظور کنترل آفات انباری حساس کارایی بیشتری خواهد داشت. البته در ادامه انجام آزمایشات تکمیلی جهت یافتن جدایه‌های کارآمدتر و استفاده از روش‌های تلفیقی به منظور افزایش کارایی قارچ‌های بیمارگر حشرات ضروری به نظر می‌رسد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) به دلیل در اختیار قرار دادن جدایه‌های قارچی و جمعیت اولیه حشرات قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of insecticides. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

Abd El-Aziz, S.E. 2011. Control Strategies of Stored Product Pest. Journal of Entomology. 8(2): 101-122.

Alexopolous, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. 4th Edition. John Wiely and Sons, New York.

Almeida, J.E.M., and Batista, A. 2001. Banco de microrganismos entomopatogênicos. Review of Biotecnology Ciênc Desenvolvimento, 20(2): 30-33.

Bagheri-Zenouz, E. 2011. Pests of stored products and management to maintain (Biology of insects, acari and microorganism). 3rd Edition. University of Tehran Press, Tehran, Iran (in Farsi).

Batta, Y.A. 2004. Control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. Crop Protection, 23(2): 103–108.

Batta, Y.A. 2008. Control of main stored-grain insects with new formulations of entomopathogenic fungi in diatomaceous earth dusts. International Journal of Food Engineering, 4(1): 1-16

Burges, H.D., and Hussey, H.W. 1971. Microbial control of insects and mites. Academic Press. London.

Butt, T.M., and Goettel, M.S. 2000. Bioassay of entomogenous fungi. *In:* Navon A and Ascher KRS (ed.) Bioassay of entomopathogenic microbs and nematods. CAB International, Willing ford. UK. pp: 141-195.

10. Butt, T.M., Jackson, C., and Magan, N. 2001. Introduction: Fungal biological control agents: Progress, problems and potential. CABI Publishing. Wallingford. UK.

Goettel, M.S., Eilenberg, J., and Glare, T.R. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In Gillbert, L.I., Iatrou, K.K., and Gill, S. (ed.), Comprehensive molecular insect science. Elsevier. pp: 361-406.

Golshan, H., Saber, M., Majid-Shilsar, F., and Karimi, F. 2013. Efficacy of nine isolates of *Beauvaria bassiana* against adults of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Acta Entomologica Sinica, 56(2): 201-206.

Hanel, H., and Watson, J.A.L. 1983. Preliminary fields' tests on the use of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera: Termitidae). Bulletin of Entomological Research, 73: 305-313.

Jenkis, N.E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A.J., and Lomer, C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use of mycopesticides. Biocontrol News and Information, 15: 33-41

Kaake, W., Reid, B.L., Bohnert, T.J., and Bennet, G.W. 1997. Toxicity of imidacloprid in German cockroach (Dictyoptera: Blattellildae), and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). Journal of Economic Entomology, 90(2): 473-82.

Kavallieratos, N.G., Arthanassiou, C.G., Michalaki, M.P., Batta, Y.A., Rigatos, H.A., Pashalidou, F.G., Balotis, G.N., Tomanovic, Z., and Vayias, B.J. 2006. Effect of combined use of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin and diatomaeus earth for the control of three stored product beetle species. Crop Protection, 25: 1087-1094.

Kaya, G.P., and Munyi, D.M. 1995. Biocontrol of the entomogenous fungi *Beauvaria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for the test fields (*Glossina* sp.) at developmental site. Journal of Invertebrate Pathology, 66(3): 237-241.

Khashveh, A., and Chelav, H.S. 2013. Laboratory bioassay of Iranian isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against two species of storage pest. Agriculturae Conspectus Scientificus, 78(1): 35-40

Khashaveh, A., Ghosta, Y., Safaralizade, M.H., and Ziaee, M. 2011. The use of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill in assays with storage grain beetles. Journal of Agricultural Science and Technology, 13: 35-43

Khashaveh, A., Safaralizade, M.H., and Ghosta, Y. 2008. Pathogenicity of Three isolates of the fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deutromycotina: Hyphomycetes) against granary weevil, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Biological Science, 8(4): 804-808.

Mahdneshin, Z., Safaralizade, M.H., and Ghosta, Y. 2009. Study on the efficacy of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin against *Rhyzoperta domonica* F. (Coleoptera:Bostrichidae). Journal of Biological Sciences, 9: 170-174.

Navarro, S., and Donahaye, E. 2005. Innovative environmentally friendly technologies to maintain quality of durable agricultural produce. In Ben-Yehoshua, S. (ed.), Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality. Baca Raton, FL: Taylor and Francis eBook. pp: 205-262

Poinar, G.O., and Thomas, G.M. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Pelenum Press, New York.

Pria Junior, W.D., Lacava, P.T., Messias, C.L., Azevedo, J.L., and Lacava, P.M. 2008. Bioassay assessment of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) sorokin (Deuteromycota: Hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (signoret) (Hemiptera: Cicadellidae). Brazilian Journal of Microbiology, 39(1): 128-132.

Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K., and Savin, N.E. 2007. Bioassays with arthropods. Second ed. Boca Raton: CRC Press. 224 pp

Sabbour, M.M., Abd-El-Aziz, S.E., and Adel-Sharif, M. 2012. Efficacy of three entomopathogenic fungal alone or in combination with diatomaceous earth modifications for the control of three pyralid moth in stored grains. Journal of Plant Protection Research, 52(3): 359-363.

Samodra, H., and Ibrahim, Y. 2006. Effect of dust formulations of three entomopathogenic fungal isplates against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Journal Biosains, 17(1): 1-7.

Shams, G., Safaralizadeh, M.H., Imani, S., Shojai, M., and Aramideh, S. 2011. Laboratory assessment of the potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Beauvarin®) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). African Journal of Microbiology Research, 5(10): 1192-1196.

St. Leger, R.J., Goettel, M.S., Roberts, D.W., and Staples, R.C. 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, (58): 168-179.

Wakefield, M.E. 2006. Factors affecting storage insect susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana. In:* the 9th International Working Conference on Stored Product Protection, 15-18 Oct., Campinas, São Paulo, Brazil. 855-862.

Zolfagharieh, H.R. 2002. Irradiation to control *Plodia interpunctella* and *Oryzaphillus surinamensis* in Pistachios and Dates. *In*: Proceeding of a final research coordination meeting organized by the joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, Austria, 101-109.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 39(2) Summer 2016

Susceptibility of two stored product pests to *Metarhizium anisopliae* Sorokin fungi based on two bioassay methods

F. Shakhsi Zare[1]*, R. Vafaei-Shushtari[2], H. Farazmand[3], A. Marouf[4], M. Ghazavi[5] and A. Mohammadi-pour[6]

1. *Corresponding Author: Former Ph.D. student, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Arak, Iran (shakhsi.zare@gmail.com)
2. Associate Professor, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Arak, Iran
3. 4,5,6. Associate Professor, Assistant Professor, Associate Professor and Researcher, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 4 September 2015 Accepted: 6 December 2015

Abstract

This study was conducted to evaluate the susceptibility of two stored product pests, *Tribolium confusum* (Col., Tenebrionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Col., Silvanidae) treated with two Iranian fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* Sorokin, Saravan (DMEI001) and Nour (DMEI002), based on two bioassay methods, suspension and dry conidia. After mass production of fungal isolates under laboratory conditions (16:8 photoperiods, 28 ±1°C, 65±5% R.H) and preparing main suspension, five different conidial concentrations were prepared separately based on the logarithmic distances and then each insect was treated by immersing them in five milliliter of conidial suspensions for five seconds. In dry conidia bioassay method, to prepare the appropriate dosages, one gm dry conidia was blended with 10 milliliter Tween 80 and then the number of its conidia was calculated. Finally, five concentrations of each isolate were prepared, separately. All experiments were carried out in four replicates and for each replication 20 adults (7-10 days old) of each species were treated separately. The results showed that in both bioassay methods, Saw-toothed grain beetle was more susceptible to both fungal isolates and Saravan isolate with LD_{50}, 2.37×10^5 and 5.35×10^4 in suspension method and 9.5×10^9 and 8.2×10^8 conidia per milliliter in dry spore method on red flour beetle and sow-toothed grain beetle, respectively, had higher pathogenicity than Nour isolate. In comparison two bioassay methods, the suspension method had higher efficacy than dry conidia method for both fungal isolates.

Key words: Metarhizium anisopliae, Red Flour beetle, Saw-toothed grain beetle, Saravan, Nour