ارزیابی بیمارگری قارچ *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana* روی سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* Muller (Col., Chrysomelidae)

جعفر ابراهیمی‌فر[۱]، ارسلان جمشیدنیا[۲]* و رضا صادقی[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد حشره‌شناسی، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- **نویسنده مسوول:** استادیار گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران (jamshidnia@ut.ac.ir)

۳- استادیار گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۱

چکیده

در پژوهش حاضر بیمارگری دو قارچ *Metarhizium anisopliae* Sorokin و *Beauveria bassiana* Vuellemin با روش غوطه‌وری و اسپری (پاششی) روی حشرات کامل سوسک برگ‌خوار نارون با غلظت‌های 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 اسپور در میلی‌لیتر همراه با تیمار شاهد (آب مقطر و توین) مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش‌ها در شرایط کنترل شده در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و دوره نوری ۱۲:۱۲ ساعت (روشنایی: تاریکی) در اتاقک رشد انجام گرفت و میزان مرگ‌ومیر حشرات در هر دو روش در تمام تیمارها به مدت ۱۰ روز (به فاصله زمانی ٤٨ ساعت) شمارش و ثبت گردید. مقادیر LC_{50} و LC_{90} محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana* در روش غوطه‌وری به‌ترتیب $10^6 \times 2/7$ و $10^6 \times 7/72$ اسپور در میلی‌لیتر و در روش اسپری به‌ترتیب $10^6 \times 7/75$ و $10^6 \times 35/05$ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد. در حالی‌که این مقادیر برای قارچ *M. anisopliae* در روش غوطه‌وری به‌ترتیب $10^6 \times 2/68$ و $10^6 \times 7/99$ و در روش اسپری به‌ترتیب $10^6 \times 8/38$ و $10^6 \times 46/8$ اسپور در میلی‌لیتر برآورد شد. کمترین مقدار LT_{50} و LT_{90} برای قارچ *B. bassiana* در غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر به‌ترتیب ۳/۳۹ و ۱۳/۱۲ روز بود. در حالی‌که این مقادیر برای قارچ *M. anisopliae* به‌ترتیب ٤/٥١ و ١٥/٠٣ روز برآورد شد. به‌طورکلی نتایج نشان داد که قارچ *B. bassiana* در هر دو روش غوطه‌وری و اسپری در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به قارچ *M. anisopliae* مرگ‌ومیر ایجاد می‌کند. لذا با توجه به این یافته‌ها، قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* روی سوسک برگ‌خوار نارون بیماری‌زا بوده و بنابراین استفاده از این عوامل میکروبی علیه آفت مذکور توصیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: کنترل بیولوژیک، قارچ بیمارگر حشرات، سوسک برگ‌خوار نارون.

مقدمه

سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* Muller (Col., Chrysomelidae) مهم‌ترین آفت تک‌خوار درختان نارون (*Ulmus* spp.) در مناطق شهری و فضای سبز است (Alford, 2012). این آفت علاوه بر خسارت مستقیم، مقاومت درختان نارون را به بیماری مرگ هلندی نارون که توسط سوسک‌های پوستخوار نارون منتقل می‌شوند، کاهش می‌دهد. این حشره بومی اروپا، آفریقای شمالی و آسیا می‌باشد و در اکثر نقاط جهان خسارت این آفت گزارش شده است (Gregory, 2001). حشرات کامل برگ‌های درختان را سوراخ کرده و لاروها با فعالیت در سطح زیرین برگ‌ها از پارانشیم برگ تغذیه نموده و فقط رگبرگ‌ها باقی می‌مانند و برگ‌ها حالت توری پیدا می‌کنند به‌طوری‌که درختان نارون از دور سفید رنگ دیده می‌شوند. خسارت لاروها و حشرات کامل، زیبایی درخت

را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این آفت با ایجاد ضعف در درخت، مشکلات ثانویه‌ای از جمله حمله سوسک‌های چوبخوار و پوست‌خوار، آلودگی درخت به عوامل بیماری‌زا، بدشکل شدن تاج پوشش[1] گیاه، کاهش فتوسنتز و قوه‌نامیه گیاه، ناهنجاری‌های فیزیولوژیکی و در نهایت شکستن درخت در اثر باد را به دنبال خواهد داشت (Brewer, 1973). استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی ابزاری برای کنترل این آفت است اما از پیامدهای جدی آن می‌توان مسمومیت انسان‌ها و حیوانات، آلودگی آب، هوا و خاک، باقی مانده سموم در غذا، بروز مقاومت در آفات و تأثیر روی حشرات مفید (دشمنان طبیعی) را ذکر کرد (Huerta et al., 2010).

قارچ‌های بیمارگر گروهی از پاتوژن‌های حشرات هستند که معمولاً در خاک جنگل‌ها نسبت به خاک مزارع بیشتر یافت می‌شوند. قارچ‌های بیماری‌زا غالباً در طبیعت موجب بیماری حشرات می‌شوند و یک عامل مهم تنظیم‌کننده جمعیت حشرات هستند (Ezz, 2012). حشره‌کش‌های بر پایه قارچ‌ها به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک و جایگزین حشره‌کش‌های شیمیایی مورد توجه هستند. قارچ‌های بیماری‌زا *Metarhizium anisopliae* Sorokin و *Beauveria bassiana* Vuellemin عوامل بیوکنترل مفیدی هستند که معمولاً علیه حشرات آفت استفاده می‌شوند. این عوامل بیماری‌زا در کنترل بیولوژیک آفات کشاورزی متنوعی از جمله سفیدبالک‌ها، سخت‌بالپوشان و ملخ‌ها استفاده می‌شوند (Brownbridge et al., 2001؛ De La Rosa et al., 2000). قارچ‌های بیماری‌زا بر خلاف سایر بیمارگرهای حشرات با نفوذ مستقیم از طریق کوتیکول با مکانیسم‌های پیچیده‌ای حشرات را آلوده می‌کنند (Charnley, 1989).

با توجه به وجود درخت زینتی نارون در فضای سبز و مناطق شهری، مبارزه شیمیایی با آفت سوسک برگ‌خوار نارون اثرات ناخوشایند متعددی را در پی دارد و باید از ترکیبات ایمن و دوستدار محیط‌زیست در جهت کنترل این آفت استفاده نمود. در تحقیق حاضر، اثر قارچ‌های بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* روی سوسک برگ‌خوار نارون به روش غوطه‌وری و اسپری (پاششی) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تشکیل کلنی سوسک برگ‌خوار نارون *X. luteola*

لاروهای سوسک برگ‌خوار نارون از روی درختان نارون از محوطه‌ی پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران جمع‌آوری گردید و در اتاقک رشد در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و دوره‌ی نوری ۱۲:۱۲ ساعت (روشنایی: تاریکی) در اتاقک رشد نگهداری شدند (Kohan and Sendi, 2013). لاروها روی برگ‌های نارون پرورش یافتند و بعد از ظهور حشرات کامل، آزمایش‌ها روی حشرات هم‌سن یک روزه انجام گرفت.

تهیه سوسپانسیون اسپور

قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران تهیه گردید. برای خالص‌سازی قارچ‌ها از محیط کشت PDA به روش تک اسپور[2] استفاده شد. برای این منظور یک بلوک میسلیومی از محیط کشت برداشته شد و به لوله‌ی آزمایش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید و لوله‌ی آزمایش به شدت تکان داده شد تا سوسپانسیونی از اسپور به‌دست آید. سپس یک لوپ از سوسپانسیون روی لام قرار داده شد و زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. تعداد اسپور کمتر از ۱۰ عدد در زمینه‌ی میکروسکوپ نوری جهت خالص‌سازی مناسب بود. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل روی سطح محیط کشت پخش گردید تا تراکم‌های یکسانی از اسپور به‌دست آید. سپس ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و در شرایط تاریکی جهت جوانه‌زدن

1- Canopy

2- Single spore

اسپورها نگهداری شدند. پس از طی این مدت، پتری‌ها زیر میکروسکوپ تشریح (بینوکولار) بررسی شدند و اسپورهای جوانه‌زده با استفاده از سوزن سترون به همراه مقداری از محیط کشت اطراف آن برداشته شده و به محیط کشت PDA منتقل شدند (Singleton et al., 1992).

برای تهیه سوسپانسیون اسپور، سطح کلنی قارچ به وسیله یک اسکالپل سترون تراشیده شد و به داخل آب مقطر سترون حاوی دو قطره توین ۸۰ [1] (۰/۵درصد) داخل لوله‌های فالکون افزوده شد. برای جدا شدن اسپورها از هم و عدم تشکیل زنجیره‌ی اسپور، سوسپانسیون مربوطه به مدت یک دقیقه به وسیله شیکر [2] به هم‌زده شد و به این صورت سوسپانسیون یکنواختی از هر قارچ تهیه گردید. جهت شمارش اسپورها و تهیه تراکم اسپور در واحد حجم از لام گلبول شمار [3] (نئوبار) و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی (۴۰×) استفاده شد. برای انجام آزمایش‌ها، از قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* به‌طور جداگانه غلظت‌های 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 اسپور در میلی‌لیتر تهیه گردید. به‌منظور بالا بردن سطح اطمینان غلظت‌های مذکور، شمارش اسپورها سه مرتبه تکرار شد (Butt and Goettel, 2000).

آزمون زنده‌مانی جدایه‌ها

جهت اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی اسپور قارچ‌های مورد نظر از محیط کشت آب-آگار (Water Agar) استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از آزمون زیست‌سنجی سوسپانسیون رقیقی از قارچ‌ها در محلول توین ۸۰ (۰/۵ درصد) تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت داخل ظروف پتری ریخته شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. بعد از گذشت ۱۸ ساعت سه قسمت از ظروف پتری مشخص و تعداد ۱۰۰ اسپور به‌طور تصادفی از هر قسمت به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمائی (۴۰×) شمارش گردید (Butt and Goettel, 2000). اسپورهایی که طول لوله تندشی آن‌ها بیشتر از نصف قطر اسپور بود به‌عنوان اسپورهای جوانه‌زده محسوب شد. سپس از سه قسمت میانگین گرفته و در صورتی که درصد جوانه‌زنی بیش از ۸۵ درصد بود، آزمون زیست‌سنجی انجام شد. درصد جوانه‌زنی اسپورها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

(تعداد کل /تعداد اسپورهای جوانه‌زده) = درصد جوانه‌زنی اسپورها

۱۰۰ × اسپورها

اثبات آزمون بیماری‌زایی

جهت اثبات آزمون بیماری‌زایی روی حشرات کامل سوسک برگ‌خوار نارون از غلظت‌های هر دو قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* (غلظت‌های 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر) چهار تکرار و یک شاهد در نظر گرفته شد. تیمار شاهد آب مقطر به‌علاوه دو قطره توین ۸۰ (۰/۵ درصد) بود. برای هر تکرار از غلظت‌ها تعداد ۳۰ حشره سوسک برگ‌خوار نارون هم‌سن و سالم استفاده گردید. ابتدا به‌منظور ضدعفونی سطحی و حذف ساپروفیت‌ها از سطح بدن حشرات، آن‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم یک درصد غوطه‌ور نموده و نیز برای ۳۰ ثانیه در آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس، حشرات مذکور جهت حذف آب اضافی به مدت یک دقیقه روی کاغذ صافی واتمن قرار داده شدند (Meyling and Eilenbery, 2007).

برای مایه‌زنی حشرات سوسک برگ‌خوار نارون از دو روش اسپری (پاششی) و غوطه‌وری استفاده شد. برای اطمینان از این‌که هر یک از حشرات هر تیمار نسبت یکسانی از غلظت را دریافت کنند همه‌ی حشرات به‌طور همزمان در سوسپانسیون غوطه‌ور و یا اسپری شدند (Butt and Goettel, 2000). مقدار ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر کدام از غلظت‌ها در داخل ظروف پتری شیشه‌ای ریخته شد و برای هر تکرار حشرات کامل برگ‌خوار نارون به مدت ۳۰ ثانیه به داخل این سوسپانسیون فرو برده شدند. سپس از سوسپانسیون خارج و با استفاده از یک کاغذ صافی واتمن سترون سوسپانسیون اضافی از

1- Tween 80
2- Tube shaker
3- Haemocytometer = Improved neubauer

بدن آن‌ها حذف گردید. داخل هر ظرف پتری یک گلوله پنبه سترون مرطوب جهت تأمین رطوبت قرار داده شد. در روش اسپری نیز مقدار ۵ میلی‌لیتر از هر کدام از غلظت‌های دو قارچ به‌طور جداگانه روی حشرات کامل سوسک برگ‌خوار نارون اسپری گردید. درب ظروف پتری با پارافیلم پوشیده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت حشرات مرده و پنبه مرطوب حذف گردید و برگ‌های نارون جدید در اختیار حشرات گذاشته شد و ظروف پتری با درب توری‌دار پوشانده شد. جهت تغذیه، روزانه به حشرات برگ‌های استریل شده نارون داده شد. ظروف پتری در دستگاه اتاقک رشد با شرایط کنترل شده، دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و دوره نوری ۱۲:۱۲ ساعت (تاریکی: روشنایی) قرار گرفت. میزان مرگ‌ومیر ناشی از قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* به مدت ۱۰ روز (به فاصله زمانی ۴۸ ساعت) در هر دو روش اسپری و غوطه‌وری شمارش و ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

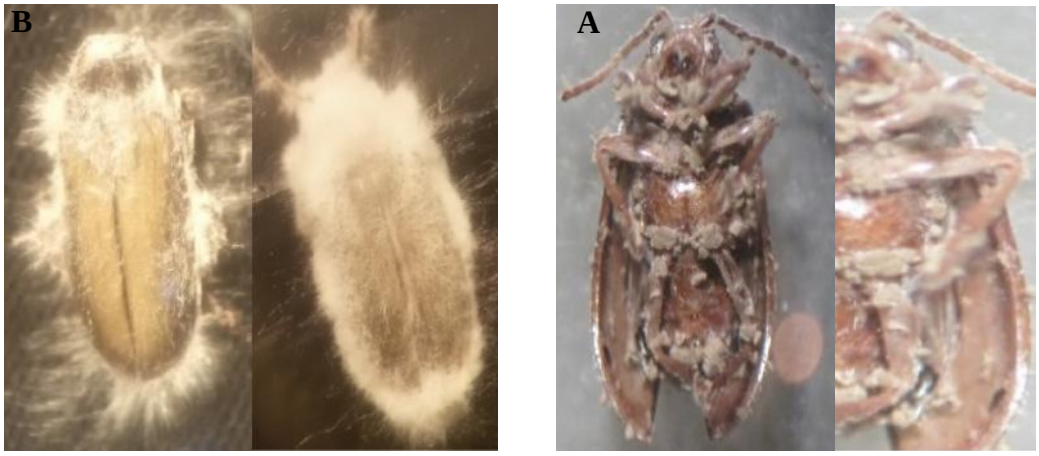
برای تعیین غلظت‌های کشنده (LC_{95}، LC_{90} و LC_{50})، زمان‌های کشنده (LT_{50} و LT_{90})، مقایسه بیماری‌زایی قارچ‌ها و معادله رگرسیونی از نرم‌افزار SPSS (vr. 24) استفاده گردید. به‌منظور بررسی غلظت‌های مختلف قارچ بر میزان مرگ‌ومیر سوسک برگ‌خوار نارون از تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. مقایسه مرگ‌ومیر ناشی از دو قارچ با آزمون t-student با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

علایم مرگ‌ومیر در مراحل اولیه با ایجاد لکه‌های تیره روی بدن حشرات قابل رویت بود. نتایج نشان داد که قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی سوسک برگ‌خوار نارون ایجاد بیماری می‌کند (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصل، قارچ *B. bassiana* در بالاترین غلظت (10^8 اسپور در میلی‌لیتر) و پایین‌ترین غلظت (10^5 اسپور در میلی‌لیتر) به‌ترتیب ۸۲/۵ و ۲۵ درصد مرگ‌ومیر در روش غوطه‌وری و در روش اسپری به‌ترتیب ۵۰/۵ و ۲۳/۲۵ درصد مرگ‌ومیر داشت. در حالی‌که قارچ *M. anisopliae* در بالاترین و پایین‌ترین غلظت در روش غوطه‌وری به‌ترتیب ۷۲/۵ و ۱۷/۵ درصد و در روش اسپری ۳۶/۰۱ و ۱۴/۵ درصد مرگ‌ومیر ایجاد کرد. همچنین میزان مرگ‌ومیر ناشی از قارچ *B. bassiana* ($df=3$, $F=42.565$, $P<0.0001$) و قارچ *M. anisopliae* ($df=3$, $F=53.857$, $P<0.0001$) در غلظت‌های مختلف روش غوطه‌وری تفاوت معنی‌دار آماری داشت. در حالی‌که بین میزان مرگ‌ومیر ناشی از قارچ *B. bassiana* ($df=3$, $F=1.15$, $P=0.361$) و قارچ *M. anisopliae* ($df=3$, $F=1.56$, $P=0.238$) در روش اسپری تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد (جدول ۱). مرگ‌ومیر ناشی از دو قارچ نیز باهم تفاوت معنی‌دار آماری نشان داد ($df=3$, $t=5.55$, $P=0.01$). در واقع این نتایج مؤید این است که قارچ *B. bassiana* نسبت به *M. anisopliae* روی سوسک برگ‌خوار نارون مؤثرتر بود. این درحالی است که میزان مرگ‌ومیر قارچ *B. bassiana* روی حشرات سوسک پوست‌خوار نارون *Scolytus scolytus* Fabricius در غلظت 10^5 و 10^7 اسپور در میلی لیتر به‌ترتیب ۷۰ و ۸۰ درصد، و میزان مرگ‌ومیر ناشی از قارچ *M. anisopliae* روی همین حشره در دو غلظت مذکور به‌ترتیب ۳۰ و ۷۰ درصد بود (Doberski, 1981). تفاوت بین میزان مرگ‌ومیر در تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین احتمالاً به دلیل نوع حشره مورد آزمایش و نوع جدایه پاتوژن است که در میزان بیماری‌زایی مؤثر می‌باشد. از طرفی میزان رطوبت نسبی در میزان تأثیر قارچ روی میزبان نقش مهمی دارد زیرا تأثیر مهمی بر شروع و میزان فعالیت اینوکلوم قارچ دارد (Bateman et al., 1993). همچنین قارچ‌ها

برای جوانه‌زنی، رشد و اسپورزایی نیاز به رطوبت دارند (Hall, 1981). میزان رطوبت نسبی در تحقیق حاضر ۵±۷۵ درصد بود درحالی‌که آزمایش‌های محققین مذکور در رطوبت بالای ۹۰ درصد انجام شد. میانگین مرگ‌ومیر قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* با غلظت ۱۰ میلی‌گرم کنیدی در ۱۰۰ حشره بالغ روی سوسک ژاپنی *Popillia japonica* (Col., Scarabaeidae) به‌ترتیب ۶۰-۴۵ و ۷۶-۵۶ درصد گزارش شده است (Lacey et al., 1994). نتایج حاصل از پژوهش حاضر همسو با نتایج این محققین می‌باشد. این تطابق احتمالاً به خاطر استفاده از پاتوژن‌های یکسان و اعمال رطوبت مناسب جهت رشد قارچ‌ها است.

میزان مرگ‌ومیر ناشی از قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی سوسک برگ‌خوار نارون در روش غوطه‌وری بعد از ۵ روز در غلظت 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر به ۵۰ درصد رسید در حالی بعد از ۱۰ روز میزان مرگ‌ومیر این دو قارچ به ۹۰ درصد افزایش یافت. این در حالی است که میزان مرگ‌ومیر در روش اسپری نسبت به روش غوطه‌وری کمتر بود و در هر دو روش اسپری و غوطه‌وری بین غلظت 10^8 و 10^7 در هر دو قارچ تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱- حشرات سوسک برگ‌خوار نارون آلوده به قارچ *M. anisopliae* (A) و *B. bassiana* (B) (اصلی)

Figure 1. Infected elm leaf beetles with *M. anisopliae* (A) and *B. bassiana* (B) (Original)

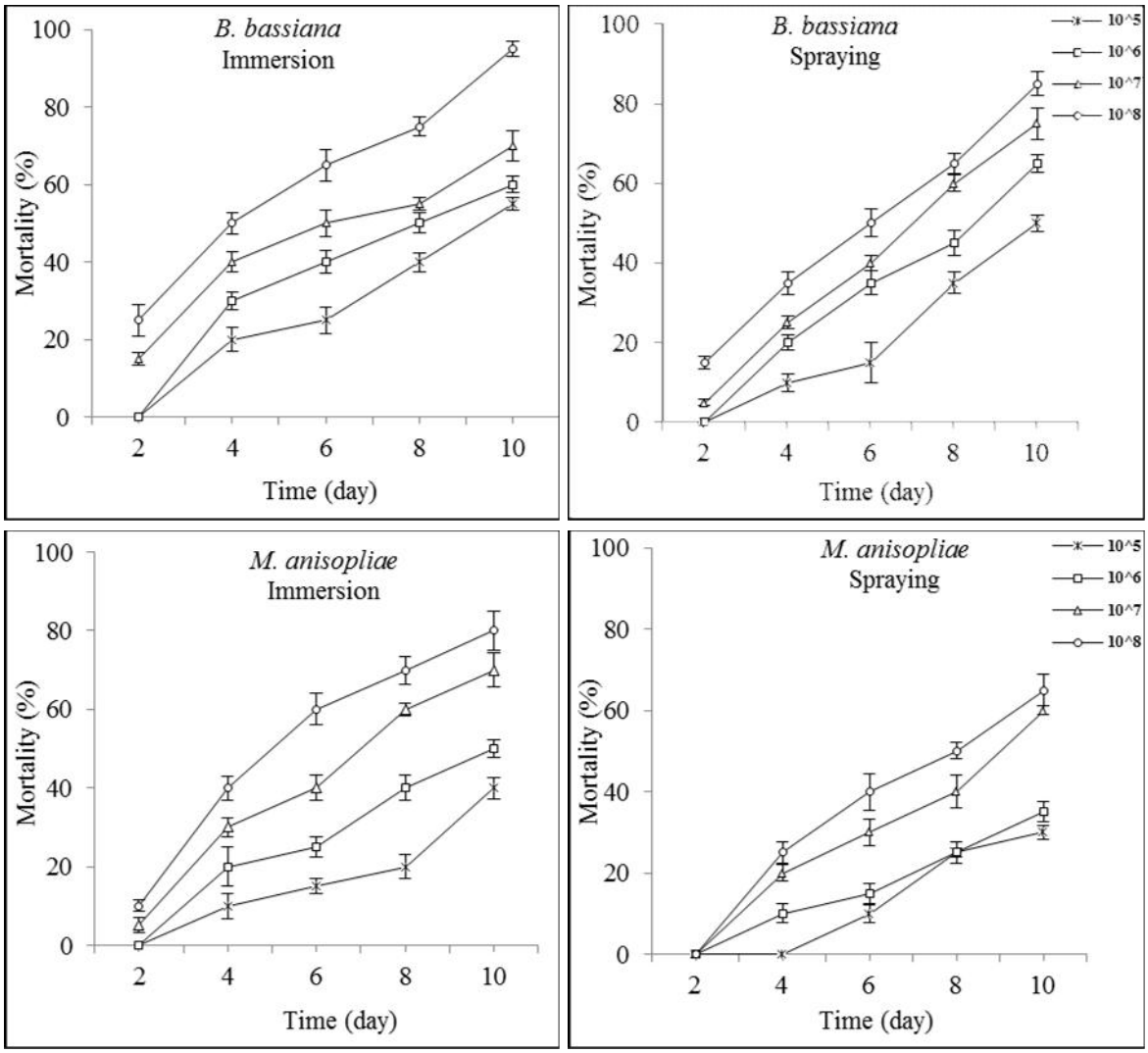
جدول ۱- میانگین (±SE) درصد مرگ‌ومیر حشرات سوسک برگ‌خوار نارون توسط قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* به روش غوطه‌وری و اسپری

Table 1. Mean (±SE) of mortality percent with *B. bassiana* and *M. anisopliae* on elm leaf beetles using immersion and spraying methods

Concentration (spore/ml)	Mortality (%)			
	B. bassiana		*M. anisopliae*	
	Immersion	spraying	Immersion	spraying
10^8	82.5±9.5[a]	50.5±4.05[a]	72.5±5.5[a]	36.01±5.9[a]
10^7	70±8.18[a]	40.02±5[a]	55±5.18[b]	30±9.5[a]
10^6	53±5.71[b]	33.5±4.5[a]	32.5±8.5[c]	17.5±3.4[a]
10^5	25±8.08[c]	23.25±2.5[a]	17.5±2.5[d]	14.5±2.5[a]
Control	5±1.8[d]	1.5±0.5[b]	2.5±2.5[e]	2.5±1.5[b]

The same letters in each column are not statistically significant different at 0.05 level (Tukey's Test).

مقدار عددی LC_{50}، LC_{90} و LC_{95} برای هر قارچ در دو روش اسپری و غوطه‌وری محاسبه و در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است. مقدار LC_{50} محاسبه شده مربوط به قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی سوسک برگ‌خوار نارون در روش غوطه‌وری به‌ترتیب $۱/۷\times۱۰^{۶}$ و $۲/۶۸\times۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتربود. مقدار LC_{90} و LC_{95} برای قارچ *B. bassiana* روی این آفت در روش غوطه‌وری به‌ترتیب $۷/۷۲\times۱۰^{۶}$ و $۱۰/۲۸\times۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر بود. در حالی که این مقادیر برای قارچ *M. anisopliae* روی این آفت به‌ترتیب $۷/۹۹\times۱۰^{۵}$ و $۱۰/۹۱\times۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شده است. در روش اسپری برای هر دو قارچ بیمارگر، مقدار لازم برای ۵۰ و ۹۰ درصد کشندگی (LC_{90} و LC_{50})، بیشتر بود. بنابراین به مقدار بیشتری زادمایه جهت بیماری‌زایی نیاز است. چون در روش غوطه‌وری احتمال برخورد اسپورها با سطح بدن حشره نسبت به روش اسپری بیشتر است لذا در روش غوطه‌وری میزان مرگ‌ومیر بیشتری مشاهده شد.



شکل ۲- روند مرگ‌ومیر سوسک برگ‌خوار نارون در غلظت‌های مختلف قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* به روش غوطه‌وری و اسپری

Figure 2. Mortality trends of elm leaf beetle at different concentrations for *B. bassiana* and *M. anisopliae* using immersion and spraying method

جدول ۲- غلظت‌های کشنده محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana* روی سوسک برگ‌خوار نارون به روش غوطه‌وری و اسپری

Table 2. Estimated lethal concentrations for *B. bassiana* on elm leaf beetle using immersion and spraying methods

Method	df	LC_{50} (spore/ml) 95% CL	LC_{90} (spore/ml) 95% CL	LC_{95} (spore/ml) 95% CL	Slop (±SE)	χ^2	*P*
Immersion	3	1.7×10^6 (1.34-2.17)	7.72×10^6 (4.29-12.41)	10.28×10^6 (5.58-21.83)	6.5±2.3	0.161	0.96
Spraying	3	7.75×10^6 (3.93-11.42)	35.05×10^6 (31.29-44.01)	66.72×10^6 (61.39-132.12)	4.39±1.07	2.36	0.78

CL: confidence limit, LC: lethal concentration, SE: standard error.

جدول ۳- غلظت‌های کشنده محاسبه‌شده برای قارچ *M. anisopliae* روی سوسک برگ‌خوار نارون به روش غوطه‌وری و اسپری

Table 3. Estimated lethal concentrations for *M. anisopliae* on elm leaf beetle using immersion and spraying methods

Method	df	LC_{50} (spore/ml) 95% CL (Lower-Upper)	LC_{90} (spore/ml) 95% CL (Lower-Upper)	LC_{95} (spore/ml) 95% CL (Lower-Upper)	Slop ±SE	χ^2	*P*
Immersion	3	2.68×10^6 (2.23-3.36)	7.99×10^6 (5.51-8.23)	10.91×10^6 (6.92-30.29)	1±1.06	1.096	0.99
Spraying	3	9.38×10^6 (3.23-8.21)	46.81×10^6 (39.45-47.25)	91.06×10^6 (88.11-96.31)	1.36±0.14	3.35	0.64

CL: confidence limit, LC: lethal concentration, SE: standard error.

میزان مرگ‌ومیر حشرات تیمار شده با افزایش غلظت و زمان افزایش یافت و روند گسترش آلودگی نیز در غلظت و زمان‌های مختلف، متفاوت بود (شکل ۲). همچنین نتایج نشان داد که در ۲۴ ساعت اولیه، هیچ مرگ‌ومیری مشاهده نشد و بعد از ۴۸ ساعت مرگ‌ومیر حشرات شروع شد. این مطلب مؤید آن است که قارچ‌ها به مدت زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت نیاز دارند تا در کوتیکول حشره رخنه و نفوذ کنند و بتوانند جوانه بزنند و مقایسه حدود بالا و پایین LC_{50} تأییدکننده‌ی این موضوع است. مقدار LC_{50} برای قارچ *B. bassiana* جدایه‌ی IRAN 441C و قارچ *M. anisopliae* جدایه‌ی DEMI 01 روی سوسک شاخدار خرما *Oryctes elegans* Prell به روش غوطه‌وری در رطوبت ۷۵ درصد به‌ترتیب $۱/۵۳\times۱۰^{۹}$ و $۵/۶۹\times۱۰^{۸}$ اسپور در میلی‌لیتر گزارش شده است (Latifian and Rad, 2012). همچنین مقدار LC_{50} قارچ *B. bassiana* جدایه‌ی CPD 10 در غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر روی حشرات سوسک برگ لوبیا *Ootheca mutabilis* Shalbery (Col., Chrysomelidae)، $۲/۷\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر بود در حالی‌که مقدار LC_{50} قارچ *M. anisopliae* جدایه‌ی CPD 12 در غلظت مذکور روی همین حشره $۱/۶\times۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر گزارش شده است (Ekesi, 2001). نتایج پژوهش حاضر و بررسی سایر محققین نیز نشان می‌دهد که بیماری‌زایی قارچ‌های پاتوژن حشرات و حتی جدایه‌های مختلف اثرات متفاوتی دارند. به‌علاوه عوامل دیگری نظیر رطوبت نسبی روی بیماری‌زایی قارچ‌ها نیز مؤثر هستند.

مقدار LT_{50} و LT_{90} برای هر قارچ در غلظت‌های مختلف به روش غوطه‌وری محاسبه و در جدول ۴ ارائه شده است. کمترین و بیشترین مقدار LT_{50} برای قارچ *B. bassiana* به‌ترتیب ۳/۳۹ روز (برای بالاترین غلظت) و ۱۲/۹۲روز (برای پایین‌ترین غلظت) بود. در حالی‌که برای قارچ *M. anisopliae* در بالاترین و پایین‌ترین غلظت به‌ترتیب ۴/۵۱ و ۱۱/۲۴ روز بود. مقدار LT_{90} برای قارچ

B. bassiana و *M. anisopliae* در بالاترین غلظت (10^8 اسپور در میلی‌لیتر) به‌ترتیب ۱۳/۱۲ و ۱۵/۰۳ روز محاسبه شد. مقادیر LT_{50} و LT_{90} برای قارچ *B. bassiana* در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر روی سوسک پوستخوار نارون به‌ترتیب ۸ و ۱۱ روز و برای قارچ *M. anisopliae* در همین غلظت‌ها به‌ترتیب ۱۴ و ۱۶ روز گزارش شده است (Dorschner et al., 1991). مقدار LT50 برای قارچ *B. bassiana* جدایه‌ی IRAN 441C و قارچ *M. anisopliae* جدایه‌ی DEMI 01 روی سوسک شاخدار خرما *Oryctes elegans* Prell به روش غوطه‌وری در رطوبت ۷۵ درصد در غلظت 10^9 اسپور در میلی‌لیتر به‌ترتیب ۱۱/۶۳ و ۸/۳۸ روز گزارش شده است (Latifian and Rad, 2012). با گذشت زمان درصد مرگ‌ومیر نیز بیشتر شده است (شکل ۲). نتایج زمان کشندگی بیانگر رابطه معکوس بین زمان و غلظت می‌باشد (جدول ۳). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققین (Dorschner et al., 1991؛ Feng and Johnson, 1990؛ Latifian and Rad, 2012) مطابقت دارد.

نتایج حاصل از زیست‌سنجی، مؤید بر بیماری‌زا بودن قارچ‌های به‌کار رفته روی حشرات سوسک برگ‌خوار نارون است و با مقایسه غلظت‌های کشندگی دو قارچ نیز می‌توان دریافت که قارچ *B. bassiana* خاصیت زهرآگینی بالاتری نسبت به قارچ *M. anisopliae* دارد و میزان کشندگی در روش غوطه‌وری نسبت به روش اسپری در هر دو بیمارگر بیشتر بود. بر اساس فرضیه ارتباط جدید، پاتوژن‌ها روی میزبان‌هایی که با آن‌ها سابقه ارتباط طولانی و برهمکنش نداشته‌اند با قدرت بیشتری عمل می‌کنند و قادرند آن‌ها را با سهولت بیشتری کنترل نمایند و این امر به دلیل عدم تکامل مکانیزم‌های دفاعی میزبان در مقابل پاتوژن جدید می‌باشد (Ghazavi et al., 2002). با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی سوسک برگ‌خوار نارون بیماری‌زا بوده و لذا استفاده از این عوامل میکروبی سازگار با محیط‌زیست علیه آفت مذکور توصیه می‌شود. البته در شرایط طبیعی (غیرآزمایشگاهی) ممکن است کارایی این قارچ‌ها کاهش یابد، بنابراین برای تعیین غلظت و زمان کشندگی مناسب و شرایط بهینه، انجام آزمایش‌های بیشتر در شرایط طبیعی ضرورت دارد.

جدول ٤- زمان‌های کشندگی محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی سوسک برگ‌خوار نارون به روش غوطه‌وری

Table 4. Lethal time values for *B. bassiana* and *M. anisopliae* on elm leaf beetle using immersion method

Isolate	Concentration (spore/ml)	LT_{50} (day) 95% CL (Lower-Upper)	LT_{90} (day) 95% CL (Lower-Upper)
B. bassiana	10^5	12.92 (9.72 - 26.64)	42.85 (22.52 - 28.41)
	10^6	6.69 (5.64 - 8.16)	19.28 (13.68 - 39.47)
	10^7	5.00 (4.13 - 5.88)	13.94 (10.68 - 22.78)
	10^8	3.39 (2.39 - 4.22)	13.12 (9.53 - 24.19)
M. anisopliae	10^5	11.24 (9.86 - 17.65)	27.73 (13.35 - 57.29)
	10^6	10.22 (8.67 - 15.28)	26.02 (17.05 - 75.99)
	10^7	6.91 (5.63 - 9.08)	25.87 (16.15 - 79.77)
	10^8	4.51 (3.55 - 5.42)	15.03 (10.97 - 27.80)

سپاس‌گزاری

بدینوسیله، نویسندگان از مساعدت و همکاری‌های مسئولین محترم آزمایشگاه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران تقدیر و تشکر می‌نمایند.

REFERENCES

Alford, D.V. 2012. Pests of ornamental trees, shrubs and flowers: A colour handbook. CRC Press. P. 477.

Bateman, R., Carey, M., Moore, D., and Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Annuals of Applied Biology, 122: 145-152.

Brewer, J. 1973. Control of the elm leaf beetle in Colorado. Journal of Economic Entomology, 66: 162-164.

Brownbridge, M., Costa, S., and Jaronski, S.T. 2001. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. Journal of Invertebrate Pathology, 77(4): 280-283.

Butt, T.M., and Goettel, M. S. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. In: A. Navon and Ascher, K. R.S. (eds). Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes, CABI Publishing, pp: 141-145.

Charnley, A. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 85-125.

De La Rosa, W., Alatorre, R., Barrera, J.F., and Toriello, C. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. Journal of Economic Entomology, 93(5): 1409-1414.

Doberski, J. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus* to larvae and adults of *Scolytus scolytus*. Journal of Invertebrate Pathology, 37: 188-194.

Dorschner, K.W., Feng, M.G., and Baird, C.R. 1991. Virulence of an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) to the hop aphid, *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae). Environmental Entomology, 20: 690-693.

Ekesi, S. 2001. Pathogenicity and anti-feedant activity of entomopathogenic hyphomycetes to the cowpea leaf beetle, *Ootheca mutabilis* Shalberg. Insect Science and its Application. 21(1): 55-60.

Ezz, N. 2012. Entomopathogenic fungi associated with certain scale insects (Hemiptera: Coccoidea) in Egypt. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, 5(3): 211-221.

Feng, M.G., and Iohnson, J.B. 1995. Relative vivulence of six isolates of *Beauvaria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) on the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). Environmental Entomology, 19: 785-790.

Ghazavi, M., Kharazi pakdel, A., Ershad, J., and Bagheri, E. 2002. Efficacy of iranian isolates of *Beauveria bassiana* against *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). Journal of Applied Entomology and Phytopathology, 69(2): 143-125.

Gregory, A.H. 2001. Elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola*. Entomological notes. Department of Entomology, College of Agriculture Science, Pennsylvania State University.

Hall, R. 1981. Fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980.

Huerta, A., Chiffelle, I., Puga, K., Azua, F., and Araya, J.E. 2010. Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. Crop Protection, 29(10): 1118-1123.

Kohan, R., and Sendi, J.J. 2013. Immune responses of elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* Muller (Coleoptera: Chrysomellidae) to *Beaveria bassiana* and *Artemisia annua* essential oil. Journal of Entomological Studies, 2: 16-25.

Lacey, L.A., Martins, A., and Ribeiro, C. 1994. The pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for adults of the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). European Journal of Entomology, 91: 313-319.

Latifian, M., and Rad, B. 2012. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch to adult *Oryctes elegans* Prell and effects on feeding and fecundity. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4(14): 1026-1032.

Meyling, N.V., and Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control, 43(2): 145-155.

Singleton, L.L., Mihail, J.D., and Rush, C.M. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St. Pual ,Minnesota, USA: American Phytopathological Society.

Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Muller (Col., Chrysomelidae)

J. Ebrahimifar[1], A. Jamshidnia[2]* and R. Sadeghi[3]

1- Former M. Sc. student of Entomology, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
2- ***Corresponding Author:** Asisstant Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran (jamshidnia@ut.ac.ir)
3- Asisstant Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 14 October 2016 Accepted: 31 December 2016

Abstract

In the current study, pathogenicity of two pathogenic fungi, *Beauveria bassiana* Vuellemin and *Metarhizium anisopliae* Sorokin was assessed on adults of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* with four concentrations 10^5, 10^6, 10^7 and 10^8 spore/ml and control treatment using immersion and spraying methods. The experiments were conducted at controllable conditions, 25±1°C, 75±5% RH and photoperiod 12:12 h in a growth chamber. Mortality rates in both methods in all treatments were recorded during 10 days. The values of LC_{50} and LC_{90} for *B. bassiana* were 2.7×10^6 and 7.72×10^6 spore/ml in the immersion method and were 7.75×10^6 and 35.05×10^6 spore/ml in the spraying method while these values for *M. anisopliae* were 2.68×10^6 and 7.99×10^6 spore/ml in the immersion method and were 8.36×10^6 and 46.8×10^6 spore/ml in the spraying method, respectively. It showed higher pathogenicity of *B. bassiana* in comparison with *M. anisopliae*. The lowest LT_{50} and LT_{90} for *B. bassiana* at the concentration of 10^8 spore/ml were 3.39 and 13.12 days while these values for *M. anisopliae* were 4.51 and 15.03 days, respectively. The result showed that *B. bassiana* in both methods, immersion and spraying, causes more mortality during shorter time compared to *M. anisopliae*. According to the findings of the current study, both fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae* can be used in integration with other non-chemicals methods for control of elm leaf beetle.

Keywords: Biological Control, Entomo-pathogenic fungi, Elm leaf beetle