گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٦، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۲

doi 10.22055/ppr.2023.42895.1676

ارزیابی زهرآگینی جدایه‌های ایرانی قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل میکروبی شب‌پره آرد، *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae)

محدثه مقسم[۱]، منیژه جمشیدی[۲*]، رضا خاک ور[۳]، و سویل نعمت اللهی[۲]

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاداسلامی، تبریز، ایران
۲- ***نویسنده مسوول:** استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران (ma.jamshidi@yahoo.com)
۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۷

چکیده

قارچ‌های بیمارگر حشرات در برگیرنده طیف وسیعی از گونه‌هایی هستند که از نظر اکولوژیکی بسیارمتنوع بوده، بسیاری از آن‌ها برای حشرات بیماری‌زا و دارای تخصص میزبانی هستند. استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌عنوان راهکار جایگزینی برای کاربرد وسیع آفت‌کش‌های شیمیایی در محصولات انباری محسوب می‌شود. شب‌پره آرد، *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)، یکی از آفات جدی و عمومی غلات انباری است. این پژوهش به منظور بررسی کارایی جدایه‌های ایرانی قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل میکروبی *E. kuehniella* انجام شد، که طی آن چهار جدایه (BVA، BVB، BVE و BVF) از قارچ *Beauveria bassiana* و دو جدایه (LCA و LC) از قارچ *Lecanicillium lecanii* با استفاده از روش تله خاکی با لارو *E. kuehniella* از خاک باغات مناطق مختلف آذربایجان شرقی جداسازی و شناسایی شد. برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده، آلوده‌سازی لاروهای سن چهارم *E. kuehniella* به روش غوطه‌وری با جدایه‌ها در پنج غلظت 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر در سه تکرار ارزیابی شد. جدایه‌های BVB و BVA با کم‌ترین LC_{50} به‌ترتیب با مقادیر $2/8\times10^5$ و $2/5\times10^5$ کنیدی بر میلی‌لیتر، بیشترین زهراگینی و جدایه BVF با بیشترین LC_{50} با مقدار $2/2\times10^7$ کنیدی بر میلی‌لیتر، کمترین زهراگینی را روی لارو شب‌پره آرد داشت. میزان زهرآگینی بین جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت. نتایج نشان داد که از میان جدایه‌های بومی مورد مطالعه در منطقه آذربایجان، جدایه BVA با غلظت کمتر و در زمان کوتاه‌تر کارایی زیستی بالاتری روی لارو شب‌پره آرد داشته و می‌تواند در راستای استفاده بهینه از آفت‌کش‌ها و تدوین برنامه‌های مدیریتی مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: کنترل بیولوژیک، آذربایجان شرقی، آفت انباری، *Beauveria bassiana*، *Lecanicillium lecanii

دبیر تخصصی: دکتر لاله ابراهیمی

Citation: Jamshidi, M., Moghassem, M., Khakvar, R. & Nematollahi, S. (2023). Assessing the virulence of Iranian entomopathogenic fungi isolates in control of *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae) (Zeller). *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *46*(2), 73-86. https://10.22055/ppr.2023.42895.1676.

مقدمه

استفاده نادرست از آفت‌کش‌های شیمیایی باعث بروز اثرات منفی زیاد در محیط زیست و موجودات غیر هدف شده و سلامت مصرف کنندگان را به خطر انداخته است. اثرات سوء آفت‌کش‌ها در اکوسیستم‌های کشاورزی توجه محققان را به استفاده از ابزارهای مدیریتی جایگزین جلب کرده است (Bidochka et al., 2010). باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و نماتدهای بیمارگر حشرات به عنوان حشره‌کش‌های میکروبی یکی از ابزارهای جایگزین در مدیریت آفات محسوب می‌شوند. این عوامل کنترلی برای حشرات میزبان بیماری‌زا بوده ولی اغلب برای انسان و محیط زیست بی‌خطر می‌باشند (Christos et al., 2017). در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها، به قارچ‌های بیمارگر حشرات توجه بیشتری شده است، زیرا آن‌ها به طور فوق‌العاده‌ای بیماری‌زا هستند و به عنوان عوامل کشنده حشرات آفت عمل می‌کنند، همچنین به صورت طبیعی جمعیت حشرات را کنترل کرده و قادر به حمله به تمام مراحل زندگی حشرات از جمله مراحل شفیرگی هستند (khan & Ahmad, 2015). قارچ‌های بیمارگر حشرات به علت ویژگی‌هایی مانند تخصص میزبانی، نحوه عمل و سهولت تولید و کاربرد، عوامل بالقوه‌ای برای کنترل آفات هستند و می‌توانند به عنوان یک جایگزین مناسب یا حداقل مکمل آفت‌کش‌های شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند (Lacey, 2017). قارچ‌های بیمارگر حشرات اغلب متعلق به دو راسته Hypocreales و Entomophthorales بوده و قادرند در ۲۰ راسته از ۳۰ راسته حشرات ایجاد آلودگی کنند (Araújo & Hughes, 2016). جدایه‌های مختلف این قارچ‌ها مانند *Beauveria* sp.، *Lecanicillium* sp. و *Metarhizium* sp. توسط محققان از منابع مختلف (خاک و میزبان‌های مختلف) جداسازی و زهرآگینی آن‌ها علیه آفات مختلف آزمایش شده است. دو گونه قارچ *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) و *Lecanicillium longisporum* (Zimm.) به دلیل نحوه تأثیر بر روی حشره، سمی نبودن برای انسان و محیط زیست و داشتن میزبان تخصصی دارای بیشترین اهمیت می‌باشند (Franco et al., 2009). قارچ *L. lecanii* بیمارگر شپشک‌های خانواده Coccidae است، هر چند مواردی از ایجاد بیماری در روی سخت‌بالپوشان، دوبالان و پادمان نیز مشاهده شده است (Malarvannan et al., 2010). کاربرد قارچ *L. lecanii* در کنترل ملخ *Melanoplus sanhuinipes* (Fabricius) و سفیدبالک *Bemisia tabaci* (Gennadius) موثر گزارش شده است (Faria & Wraight, 2007). همچنین محققان کارایی سه گونه قارچ بیمارگر متعلق به جنس *Lecanicillium* را در کنترل سه گونه شته (Kaltenbach) *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas)، *Aulacorthum solani* (Kaltenbach) و *Myzus persicae* (Sulzer) بررسی و دریافتند که هر سه گونه قارچ بیمارگر در کنترل هر سه گونه شته نقش موثری دارند (Kim et al., 2007). محصول تجاری *L. lecani* با عنوان Vertalec علیه شته‌ها و با عنوان Mycotal علیه سفیدبالک‌ها و تریپس‌ها فرموله می‌شود. کنترل زیستی حشرات با بیمارگرهای قارچی مانند *B. bassiana*، *Metarhizium* spp.، *Lecanicillium* spp. و *Isaria fumosorosea* (Wize) در سراسر جهان به‌طور وسیع مورد توجه است. این قارچ‌ها جزء اولین میکروارگانیسم‌های استفاده شده برای کنترل بیولوژیک آفات هستند (Khan & Ahmad, 2015).

در مطالعات متعددی پتانسیل قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل موفق گونه‌های مختلف آفات انباری در شرایط آزمایشگاهی و انباری گزارش شده است. در یک بررسی سوسپانسیون‌های مختلف قارچ‌های *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) و *L. lecani* از طریق مخلوط کردن با دانه‌های انباری در معرض افراد کامل سوسک *Bruchidus incarnates* (Boh.) قرار داده شد. نتایج این پژوهش بیانگر حساسیت حشرات به جدایه‌های مورد مطالعه بود. همچنین مشخص شد روغن‌های گیاهی می‌توانند در تأثیرگذاری قارچ روی میزبان نقش داشته باشند (Sabbour & Abd-El-Aziz, 2010). علاوه بر این،کنترل لاروهای سن آخر شب‌پره هندی، *Plodia* (Hubner)

interpunctella، توسط جدایه‌های قارچ‌های *B. bassiana*، *L. lecanii* و *M. anisopliae* گزارش شده است (Buda & Peciulyte, 2008). در میان آفات انباری، شب‌پره آرد، *Ephesita kuehniella* Zeller، یکی از آفات جدی و همگانی غلات انباری است. لاروهای این آفت در درجه اول غلات آرد شده را ترجیح می‌دهند، به‌طوری‌که آرد و سبوس غذای اصلی آن‌ها می‌باشد (Esmaili et al., 2011). بررسی‌ها نشان داد جدایه‌هایی از قارچ *B. bassiana* در شرایط انبارداری خرما جمعیت لاروهای آفت *E. kuehniella* را تا ۹۶ درصد کاهش داد (Lacey, 2017). این قارچ روی راسته‌های گوناگون حشرات، کنه‌ها و سایر بندپایان بیماری ایجاد می‌کند؛ با وجود این بین جدایه‌های آن تخصص میزبانی قابل توجهی دیده می‌شود (Herlinda, 2010). توان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria* روی آفات انباری مانند *Oeyzaeophilus surinamensis* L. اغلب بیش از سایر قارچ‌های بیماری‌زای حشرات است (Mora et al., 2016). در تحقیقات انجام شده کاربرد قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* علیه شب‌پره‌های *E. kuehniella* و *P. interpunctella* در شرایط انبارداری غلات اثرکنترلی قابل توجهی مشاهده شد (Christos et al., 2017). در بررسی بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر *M. anisopliae* روی لاروهای سن چهارم *E. kuehniella*، مشخص شد که جدایه‌های بومی قارچ بیمارگر مذکور پتانسیل بیماری‌زایی بالایی روی لاروهای این شب‌پره داشتند (Moghassem et al., 2023).

توسعه قارچ‌کش‌های میکروبی مؤثر علیه آفات، بستگی به انتخاب جدایه زهراگین و فرمولاسیون مناسب دارد (Jenkins et al., 1998). جدایه‌های غیر بومی قارچ‌های بیمارگر که برای استفاده به عنوان عوامل کنترل آفات در کشورهای مختلف رواج پیدا کرده‌اند به علت تفاوت‌های جدایه و عوامل زیست محیطی ممکن است بی‌تأثیر باشند (Bidochka et al., 2010). بر این اساس، جداسازی و شناسایی جدایه‌های بومی برای استفاده عملی از قارچ‌های بیمارگر در کنترل آفات ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر آن می‌تواند منبعی از عوامل بالقوه کنترل بیولوژیک را فراهم کرده و به آگاهی از تنوع زیستی قارچ‌های بیمارگر در منطقه کمک نماید. تحقیقات نشان می‌دهد که تنوع بالایی از قارچ‌های بیمارگر در زیستگاه‌های خاکی به ویژه خاک‌های غنی از مواد آلی وجود دارد (Mora et al., 2016; Mehrmoradi et al., 2020; Ghodrati et al., 2022). با توجه به اینکه بررسی اثر جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات روی میزبان‌های حشره‌ای می‌تواند درک بهتری از پتانسیل کنترلی این عوامل را سبب شود (Zare et al., 2014)، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیمارگر بومی منطقه آذربایجان، با استفاده از طعمه حشره‌ای و بررسی کشندگی آن‌ها روی لارو *E. kuehniella* انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

برای تهیه لارو شب‌پره آرد، مقدار هشت گرم تخم آفت (هر گرم تخم شب‌پره آرد معادل حدود ۵۰۰۰۰ عدد تخم) از انسکتاریوم طاهری در شهر گرگان تهیه شد. به منظور تدارک بستر پرورش، داخل دو تشتک با ابعاد ۱۰×۳۰×۴۰ سانتی‌متر آرد گندم و سبوس به نسبت چهار به یک ریخته شد و سپس بر روی سطح آرد و سبوس هر کدام از تشتک‌ها مقدار چهار گرم تخم که بر روی یک ورق کاغذ A5 قرار داشت، گذاشته شد. روی تشتک‌ها با پارچه مشکی پوشانیده شد. این بستر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در شرایط آزمایشگاهی پس از ۱۶ روز، لارو سن چهارم ظاهر گردیده و با استفاده از الک مناسب لاروها از آرد جدا شده و در آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند (Heping et al., 2008).

جداسازی جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات

جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ از نمونه‌های خاکی با استفاده از روش طعمه‌گذاری با لارو *E. kuehniella* انجام شد. برای این کار ابتدا ۲۰ نمونه خاک از باغات مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی و از عمق ۲۰ سانتی‌متری سطح خاک جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه منتقل

و الک شدند. ابتدا مقدار ۵۰ گرم خاک داخل ظروف یکبار مصرف به ابعاد ۳×۴×۵ سانتی‌متر ریخته شد. سپس به هر کدام از ظروف پنج عدد لارو سن چهارم شب‌پره آرد اضافه شد. قبلا لاروها داخل آب ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه قرار داده شدند تا قدرت تار تنیدن آن‌ها از بین برود. به منظور تهویه، منافذ با استفاده از سوزن در روی در پوش ظروف ایجاد و سپس داخل انکوباتور با دمای ۱±۲۵ سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شد. از روز سوم به مدت ۱۴ روز حشرات مرده جدا گردید. لاروها بعد از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم دو درصد روی کاغذ صافی مرطوب منتقل شده و سپس در انکوباتور قرار داده شد. رشد پوشش قارچی روی لاروها هر دو روز یکبار به مدت ۱۴ روز بررسی شد (Meyling & Eilenberg, 2007).

کشت جدایه‌های قارچی روی محیط کشت Sabroud Dextrose +Yeast extract (SDAY) Agar

آزمایش بر اساس روش‌های استاندارد آزمون عوامل بیمارگر قارچی انجام شد (Yoshinori & Kaya, 1992; Boucias & Pendl &, 1998). برای جداسازی جدایه‌های قارچی، از محیط کشت Yeast extract (SDAY) +Sabroud Dextrose Agar استفاده شد. این محیط کشت با دارا بودن شرایط اسیدی (pH= ۵/۶) از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری می‌نماید. بدین ترتیب بعد از کامل شدن رشد قارچ روی بدن لاروها، میسلیوم‌های روی بدن لارو بر روی محیط کشت، در شرایط استریل در زیر هود لامینار کشت داده شد و کشت‌ها به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا به‌طور کامل کنیدی‌زایی نمایند (Gillespie & Clayton, 1989). لازم به ذکر است با بررسی جدایه‌های به‌دست آمده براساس ویژگی‌های ماکرو و میکرومورفولوژیکی از روش کشت اسلاید برای شناسایی جدایه‌های قارچی استفاده شد و اسلایدهای میکروسکوپی از نمونه‌ها تهیه شد. از کلید شناسایی هامبر برای شناسایی جدایه‌ها به صورت *Sensu lato* استفاده شد و جدایه‌های قارچی تا سطح گونه شناسایی شدند (Humber, 2005).

تهیه سوسپانسیون قارچ

در این تحقیق برای به‌دست آوردن کنیدی به‌منظور آلوده‌سازی شب‌پره آرد از روش‌های استاندارد آزمون عوامل بیمارگر قارچی با اندکی تغییرات استفاده شد (Jenkins et al., 1998). برای این منظور پس از خالص‌سازی به روش تک اسپور، جدایه قارچی مورد نظر در محیط غذایی SDAY کشت گردید. پس از اینکه اسپورزایی قارچ به‌طور کامل انجام شد (بعد از گذشت ۱۴ تا ۲۰ روز از کشت قارچ)، در شرایط استریل زیر هود، سطح کشت را با تیغ استریل، تراش داده و به آن (قسمت خراشیده) ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به همراه پنج میلی‌لیتر محلول توئین ۸۰ به غلظت ۰/۰۲ درصد اضافه گردید و به منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها، به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. جهت جداسازی قطعات هیف و میسلیوم، سوسپانسیون بدست آمده را از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده و جهت تعیین غلظت کنیدی‌ها، شمارش اسپور توسط لام هموسیتومتر انجام شد. بعد از تعیین غلظت سوسپانسیون با رقیق کردن، غلظت‌های 10^4 تا 10^8 کنیدی بر میلی‌لیتر با افزودن حجم مشخصی از آب مقطر استریل تهیه شدند.

آزمون بیمارگری

آلوده‌سازی لاروهای سن چهارم شب‌پره آرد با سوسپانسیون کنیدی با غلظت‌های 10^4 تا 10^8 به‌روش غوطه‌وری انجام شد (Al-Deghairi, 2008). ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به همراه پنج میلی‌لیتر محلول توئین ۸۰ به غلظت ۰/۰۲ درصد به عنوان شاهد استفاده شد. آزمایش با شش جدایه، هر جدایه در سه تکرار و هر تکرار شامل ۱۲ لارو سن چهارم انجام شد. لاروها به مدت ۳۰ ثانیه به‌روش غوطه‌ورسازی در معرض غلظت‌ها قرار گرفته و سپس به منظور آبگیری و خشک شدن روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. سپس لاروها همراه با غذا (یک قاشق چایخوری آرد و سبوس به نسبت چهار به یک) به ظروفی به ابعاد ۳×۴×۵ سانتی‌متر انتقال داده شدند و به‌منظور جریان یافتن هوا داخل ظرف، منافذی با سوزن روی درپوش ظروف ایجاد شد. لاروها در نهایت، داخل انکوباتور در شرایط ذکر شده قرار گرفتند و میزان مرگ و

میر هر روز شمارش و تا ۱۰ روز برای همه غلظت‌ها ثبت گردید و شاخص‌های LC_{50} و LT_{50} محاسبه گردید (Majidi-Shilsar et al., 2003).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری برای هر جدایه به‌طور جداگانه، در غلظت‌های مختلف آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی صورت گرفت. درصد میانگین و خطای استاندارد با نرم افزار Excel و تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (Ver. 9.3) انجام شد. از آزمون F-LSD برای مقایسه میانگین تیمارها و از نرم‌افزار Polo-Plus برای تعیین مقادیر LC_{50} جدایه‌های مختلف استفاده گردید. لازم به ذکر است برای تصحیح درصد مرگ و میر در تیمارها به خاطر تلفات شاهد از فرمول Schneider-Orelli's استفاده شد. مقادیر LT_{50} جدایه‌ها نیز با کمک نرم‌افزار SPSS (Ver. 22) محاسبه شد. برای دخالت دادن اثر شیب خط در مقدار کشندگی، ضریب تداخل شیب Slope intervention factor (SIF) در مقادیر LC_{50} و LT_{50} از فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$SIF_C = \frac{100 - Slope}{Log(Corresponding\ LC_{50}\ value)}$$

$$SIF_T = \frac{100 - Slope}{Corresponding\ LT_{50}\ value}$$

برای مقایسه مقادیر LC_{50} به دست آمده برای هر یک از جدایه‌ها از شاخص فعالیت نسبی (Relative activity (RA)) استفاده شد که در آن $LC_{50}(H)$ بیشترین مقدار LC_{50} در بین جدایه‌ها و $LC_{50}(T)$ مربوط به جدایه مورد بررسی (تیمار) است (Shapiro & Argauer, 2001):

$$RA(\%) = \frac{LC_{50}(H) - LC_{50}(T)}{LC_{50}(H)} \times 100$$

درصد سرعت نسبی کشندگی (Relative speed of kill (RSK)) نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. در این فرمول $LT_{50}(H)$ بیشترین مقدار LT_{50} در بین جدایه‌ها و $LT_{50}(T)$ مربوط به جدایه مورد بررسی (تیمار) است (Shapiro & Argauer, 2001).

$$RSK(\%) = 100 - \frac{LT_{50}(T) \times 100}{LT_{50}(T)}$$

نتایج

جداسازی جدایه‌ها

در این بررسی از ۱۴ جدایه بدست آمده چهار جدایه به قارچ بیمارگر *B. bassiana* و دو جدایه به قارچ *L. lecanii* تعلق داشت (جدول ۱). ویژگی‌های میکروسکوپی دو گونه *B. bassiana* و *L. lecanii* به همراه تصویر حشره پوشیده شده از قارچ در شکل ۱و۲ ارائه شده است.

جدول ۱. جدایه‌های قارچ های بیمارگر به‌دست آمده ازخاک باغات مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی

Table 1. Different strains of entomopathogenic fungi extracted from different orchards soils in East Azarbaijan province

fungal species	Isolates	Locations
Metarhizium anisopliae	MTB	East Azarbaijan - lighvan Valley-Cherry Garden
Aspergillus oryzae	MZ619143	East Azarbaijan –Herbi- Apple Garden
Lecanicillium lecanii	LCA	East Azarbaijan -Herbi - Fruit Garden
Penicillium citrinum	MZ611703	East Azarbaijan -Azarshahr- Cherry Garden
Purpureocillium lilacinum	MZ576506	East Azarbaijan -Fathabad - Fruit Garden
Beauveria bassiana	BVB	East Azarbaijan - lighvan Valley-Apple Garden
Metarhizium anisopliae	MTE	East Azarbaijan -Khalat Poushan- Apple Garden
Metarhizium anisopliae	MTF	East Azarbaijan –Basmenj- Apple Garden
Metarhizium anisopliae	MTV	East Azarbaijan -Fathabad - Cherry Garden
Lecanicillium lecanii	LC	East Azarbaijan -Basmenj-Apple Garden
Beauveria bassiana	BVE	East Azarbaijan -Khalat Poushan- Fruit Garden
Beauveria bassiana	BVF	East Azarbaijan -Fathabad- Cherry Garden
Metarhizium anisopliae	MTA	East Azarbaijan -Khalat poushan- Apple Garden
Beauveria bassiana	BVA	East Azarbaijan -Azarshahr- Cherry Garden

۱- *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv) Vuill. (1912)

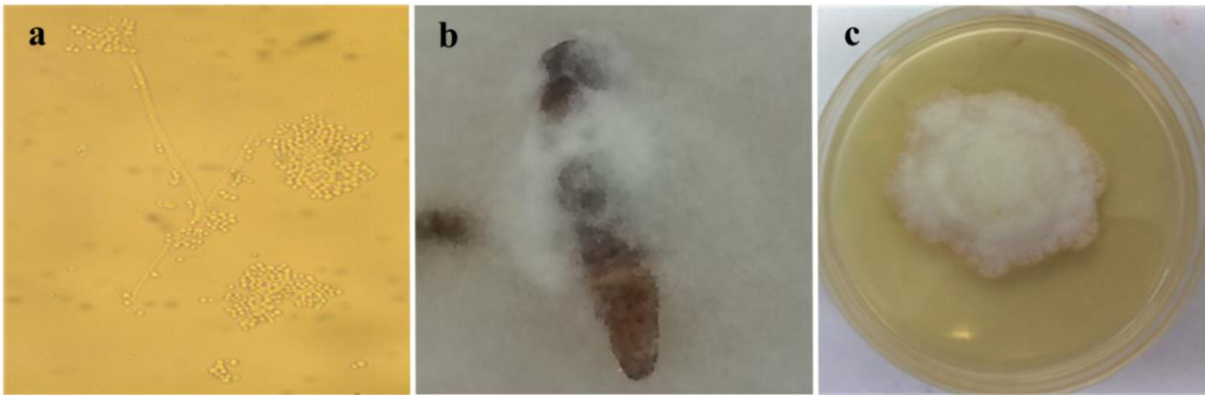
پرگنه قارچ *B. bassiana* روی محیط کشت Sabroud Dextrose Agar (SDA)، پنبه‌ای پودری به رنگ سفید (از پشت تشتک پتری بی‌رنگ تا سفید مایل به زرد) با کنیدیوفورهای منفرد و نامنظم و کنیدی‌های گرد تا بیضی‌شکل به طول ۱/۵ تا ۳/۵ میکرون بود. سلول کنیدی‌زا دارای محور زیگزاکی بوده که هر کنیدی توسط یک دندانه به آن متصل و تجمع خوشه‌ای شکل داشت (Humber, 2012; Samson et al., 2013) (شکل ۱).

۲- *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (2001)

پرگنه قارچ *L. lecanii* روی محیط کشت SDA، سفیدرنگ، نسبتا متراکم به شکل دهانه آتشفشان (در سطح زیرین به‌رنگ کرم تا مایل به زرد روشن) و فیالیدها اکثرا کوتاه به ابعاد ۰/۵-۰/۸ × (۰/۳-) × (۲۳/۷-) ۴/۱۴-۶/۴ (-۲) میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها در انتهای فیالیدها اکثرا به صورت منفرد و به اشکال بیضوی، تخم مرغی، دوکی شکل تا تقریبا استوانه‌ای، و متفاوت از نظر اندازه، اکثرا کوتاه، به ابعاد (۱/۵-) ۱/۳-۱ (۰/۸-) × (۶/۷-) ۲/۶-۴/۱ (۱/۷-) میکرومتر بودند (Zare & Gams, 2008; Samson et al., 2013) (شکل ۲).

زهرآگینی جدایه‌ها

نتایج حاصل از زیست‌سنجی نشان داد که تمامی جدایه‌ها دارای خاصیت بیماری‌زایی روی میزبان مورد مطالعه بودند. در بین جدایه‌ها بیشترین تلفات به وسیله جدایه‌های BVA و BVBدر غلظت 10^8 کنیدی بر میلی‌لیتر با حدود ۹۰ درصد مرگ و میر روی *E. kuehniella* مشاهده شد (جدول ۲).



شکل ۱. a) عکس میکروسکوپی قارچ *Beauveria bassiana*، b) رشد کنیدی‌های قارچی در سطح بدن لارو، c) پرگنه جدایه روی محیط کشت SDA

Fig 1. a) Microscopic image of the fungus *Beauveria bassiana*, b) Fungal growth on larval body, c) Colony of the isolate on SDA medium

شکل ۲. a) عکس میکروسکوپی قارچ *Lecanicillium lecanii* ، b) رشد کنیدی‌های قارچی در سطح بدن لارو، c) پرگنه جدایه روی محیط کشت SDA

Fig 2. a) Microscopic image of the fungus *Lecanicillium lecanii*, b) Fungal growths on the larval body, c) Colony of the isolate on SDA medium

جدول ۲. میانگین درصد مرگ و میر (± خطای معیار) ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف، *Beauveria bassiana* (BVA، BVB، BVE و BVF) و *Lecanicillium lecanii* (LCA و LC) روی لاروهای سن چهارم (*EK*) *Ephestia kuehniella* در غلظت‌های 10^4 تا 10^8 کنیدی بر میلی‌لیتر

Table 2. Mean percentage of mortality (±SE) caused by different isolates of *Beauveria bassiana* (BVA, BVB, BVE, BVF) and *Lecanicillium lecanii* (LCA, LC) on fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* (*EK*) at the concentrations of 10^4-10^8 conidia/mL

	Mortality (%)				
Isolates	**10^4**	**10^5**	**10^6**	**10^7**	**10^8**
LCA	16.6±4.8^{d}	25.1±1.2^{bc}	36.1±2.7^{b}	47.2±2.8^{d}	63.8±0.78^{b}
BVB	25±4.81^{b}	44.4±2.7^{a}	61.1±2.8^{a}	72.2±2.7^{a}	86.1±2.78^{a}
LC	22.2±2.7^{bc}	27.7±1.7^{b}	36.1±0.7^{b}	50 ± 4.8^{c}	63.8±5.5^{b}
BVE	13.8 ± 2.6^{de}	19.4± 5.5^{c}	36.1±2.3^{b}	41.6±1.1^{f}	50 ± 4.8^{c}
BVF	11.1 ±2.7^{e}	19.4±1.7^{c}	27.7±2.9^{c}	44.44±2.5^{e}	63.8±1.7^{b}
BVA	27.7±2.8^{a}	44.4±2.1^{a}	61.1±2.7^{a}	69.4±2.7^{b}	83.3± 0.1^{a}

Means with different letters within the same column are significantly different

نتایج بدست آمده نشان داد که زهرآگینی در جدایه BVA (F=76.00 ; df=12,5 & P <0.001)، جدایه BVB، (F=52.64 ; df=12,5 & P <0.001)، جدایه BVE، (F=16.56 ; df=12,5 & P <0.001)، جدایه BVF (F=57.56 ; df=12,5 & P <0.001)، جدایه LCA، (F=37.33 ; df=12,5 & P <0.001) و جدایه LC (F=18.65 ; df=12,5 & P <0.001) روی لارو شب‌پره آرد متفاوت و معنی‌دار بود (جدول ۲). دسته‌بندی جدایه‌ها بر اساس درصد ایجاد مرگ و میر نشان داد که ۶۶/۶ درصد جدایه‌ها زهرآگینی متوسطی داشتند و در گروه B قرار گرفتند (جدول ۳).

قدرت بیماریزایی

به‌منظور مقایسه قدرت بیماریزایی و انتخاب جدایه‌های دارای بالاترین پتانسیل کشندگی، LC_{50} مربوط به ۵۰ درصد تلفات مشخص شد (جدول ۴). جدایه‌های BVB و BVA با کمترین میزان LC_{50} به مقدار $۲/۸\times۱۰^{۵}$ و $۲/۵\times۱۰^{۵}$ کنیدی بر میلی‌لیتر، بیشترین میزان زهراگینی و جدایه BVF با بیشترین میزان LC_{50} به مقدار $۲/۲\times۱۰^{۷}$ کنیدی بر میلی‌لیتر، کمترین میزان زهراگینی را داشتند. در مقایسه LC_{50}، جدایه‌های مورد آزمایش از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. دلیل این امر هم‌پوشانی محدوده‌های مقادیر LC_{50} می‌باشد. ولی در مجموع، جدایه BVA با مقدار ۹۸/۸۶ درصد بیشترین میزان فعالیت زیستی (RA%) و جدایه BVF با مقدار ۳۵/۳۶ درصد کمترین میزان فعالیت زیستی را داشتند. ضریب تداخل شیب در غلظت (SIF) برای دخالت دادن اثر شیب خط در مقدار کشندگی جدایه‌ها می‌باشد (جدول۴). ضرایب به دست آمده هیچ تغییری در روند زهرآگینی جدایه‌ها نشان ندادند، که تاییدی بر روش مورد استفاده برای مقایسه مقادیر LC_{50} می‌باشد.

در کاربرد جدایه BVA روی لاروهای سن چهارم *E. kuehniella* کمترین مقدار LT50 به میزان ۶/۷۵ روز بدست آمد. هم¬پوشانی محدوده‌های مقادیر LT50 با حدود اطمینان ٪۹۵ بین جدایه¬ها مشاهده گردید. لذا اختلاف آماری بین مقادیر LT50 غیر معنی‌دار در نظر گرفته شد. بالاترین درصد سرعت نسبی کشندگی (RSK٪) به میزان ۴۴/۴۴ درصد مربوط به جدایه BVA بود. ضریب تداخل شیب در زمان (SIFT) نیز در توافق با سرعت نسبی کشندگی جدایه¬ها بوده و همچنان در جدایهBVA بیشترین مقدار را داشت (جدول ۵).

به منظور بررسی اثر غلظت بر میزان مرگ و میر لاروها مقایسه میانگین و گروه‌بندی جدایه‌ها انجام و مشخص شد که در همه جدایه‌ها با افزایش غلطت، مرگ و میر لاروها به طور معنی‌داری افزایش یافته و روند زهرآگینی بین جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۳).

جدول ۳. دسته بندی جدایه‌های قارچ‌های *Beauveria bassiana* (BVA، BVB، BVE و BVF) و *Lecanicillium lecanii* (LCA و LC) بر اساس مرگ لاروهای سن چهارم (*EK*) *Ephestia kuehniella*

Table 3. Grouping of isolates of *Beauveria bassiana* (BVA, BVB, BVE, BVF) and *Lecanicillium lecanii* (LCA, LC) based on the mortality of fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* (*EK*)

Group	Number of isolates	Percentage of isolates	Isolates
A	0	0	…..
B	4	66.6	BVE^{bc}
			BVF^{dec}
			LCA^{bc}
			LC^{bc}
C	2	33.3	BVA^{a}
			BVB^{a}

Different letters are indicating significant differences among isolates (F-LSD, P<0.05)
A- Low virulence (0-33% mortality), B- Medium virulence (34-67% mortality) and C- High virulence (68-100% mortality)

جدول ٤- واکنش‌های تجزیه پروبیت غلظت-کشندگی لاروهای سن چهارم (*EK*) *Ephestia kuehniella* نسبت به جدایه‌های مختلف، *Beauveria bassiana* (BVA، BVB، BVE و BVF) و *Lecanicillium lecanii* (LCA و LC)

Table 4. Probit analysis of concentration-mortality responses of fourth instar larvae of of *Ephestia kuehniella* (*EK*) to different isolates of *Beauveria bassiana* (BVA, BVB, BVE, BVF) and *Lecanicillium lecanii* (LCA, LC)

Isolates	LC_{50} (×10^6conidia/ml) (95% C L)	Slop±SE	(df=13)$\chi^{2\alpha}$	RA^{β} (%)	$SIFc^{\gamma}$
LCA	11(8.67-29.91)	0.326±0.07	2.069	50.00	16.49
LC	9(2.56 -16.37)	0.14±0.285	2.820	59.09	16.74
BVB	0. 28 (1.1- 3.8)	0.17±0.42	1.825	98.72	22.39
BE	14 (11.1-47.71)	0.19±0.291	1.221	35.36	16.22
BVF	22 (16.61-31.21)	0.12±0.377	1.877	0.00	15.70
BVA	0.25 (0.93-4.9)	0.14±0.17	1.553	98.86	22.70

$^{\alpha}$All rows are insignificant at P < 0.05; $^{\beta}$Relative activity; $^{\gamma}$Slope intervention factor for concentration

بحث

جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات از خاک با روش طعمه‌گذاری حشره یک روش استاندارد در مطالعه آن‌ها است. طبق بررسی محققان در اغلب موارد قارچ‌های بیمارگر حشرات را می‌توان از طریق طعمه‌گذاری حشرات در خاک، از آن اکوسیستم جداسازی نمود (Keller & Zimmerma, 1989). بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر نیز روش طعمه حشره‌ای روش مناسبی برای قارچ‌های بیمارگر محسوب می‌شود. بسیاری از گونه‌های متعلق به آسکومیست‌ها مانند *Metarhizium* sp. و *Beauveria* sp. قسمتی از چرخه زیستی خود را خارج از میزبان و در خاک طی می‌کنند، بنابراین خاک زراعی حاوی مقادیر بالایی از قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌باشد. خاک نگهدارنده طبیعی قارچ‌ها بوده و دما و رطوبت مناسب را برای زنده‌مانی قارچ فراهم می‌کند و ریسه‌های حساس آن‌ها را از اثر نامطلوب پرتوی فرابنفش آفتاب (UV) محافظت می‌نماید (Bidochka et al., 2010). این امر خاک را به یک محیط ایده‌آل برای کنترل زیستی حشرات توسط بیمارگرهای قارچی تبدیل می‌کند. بررسی‌ها نشان داده است نیمه عمر بسیاری از عوامل بیماری‌زای حشرات در خاک بیش از سایر محیط‌ها می‌باشد (Balachander et al., 2012). قارچ‌های بیمارگر حشرات باید در مرحله مناسبی از رشد حشره استفاده گردد تا کنترل موثر آفت حاصل شود. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پیش‌نیاز آغاز آلودگی به بیماری قارچی در حشرات چسبیدن و جوانه زدن اسپور قارچ در سطح کوتیکول جلد حشرات حساس است. به دلیل جثه بزرگ حشره طبیعی است که اسپور بیشتری به بدن لارو سن چهارم در مقایسه با لاروهای سنین پایین‌تر بچسبد (Buda & Peciulyte, 2008; Al-Fargues, 1984; Deghairi, 2008).

جدول ۵. تجزیه پروبیت زمان-کشندگی لاروهای سن چهارم (*EK*) *Ephestia kuehniella* نسبت به جدایه‌های مختلف، *Beauveria bassiana*(BVA، BVB، BVE و BVF) و *Lecanicillium lecanii* (LCA و LC)

Table 5. Probit analysis of time-mortality responses of fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* (*EK*) *to* different isolates of *Beauveria bassiana* (BVA, BVB, BVE, BVF) and *Lecanicillium lecanii* (LCA, LC)

Isolates	LT_{50} (95% C L) (Days)	Slop±SE	$\chi^{2\alpha}$ (df=13)	RSK^{β} (%)	SIF_T^{γ}
LCA	5.16 (2.62-19.71)	14.24±1.07	2.089	23.55	16.62
LC	4.82 (3.55 -14.33)	12.25±0.64	2.843	28.59	18.21
BVB	4.21 (2.2- 13.8)	9.34±0.87	1.725	37.62	21.53
BVE	5.84 (4.1-32.81)	15.21±1.19	1.421	13.48	14.51
BVF	6.75 (3.31-43.21)	17.37±1.18	1.917	0.00	12.24
BVA	3.72 (1.03-7.9)	7.74±1.11	1.643	44.44	24.80

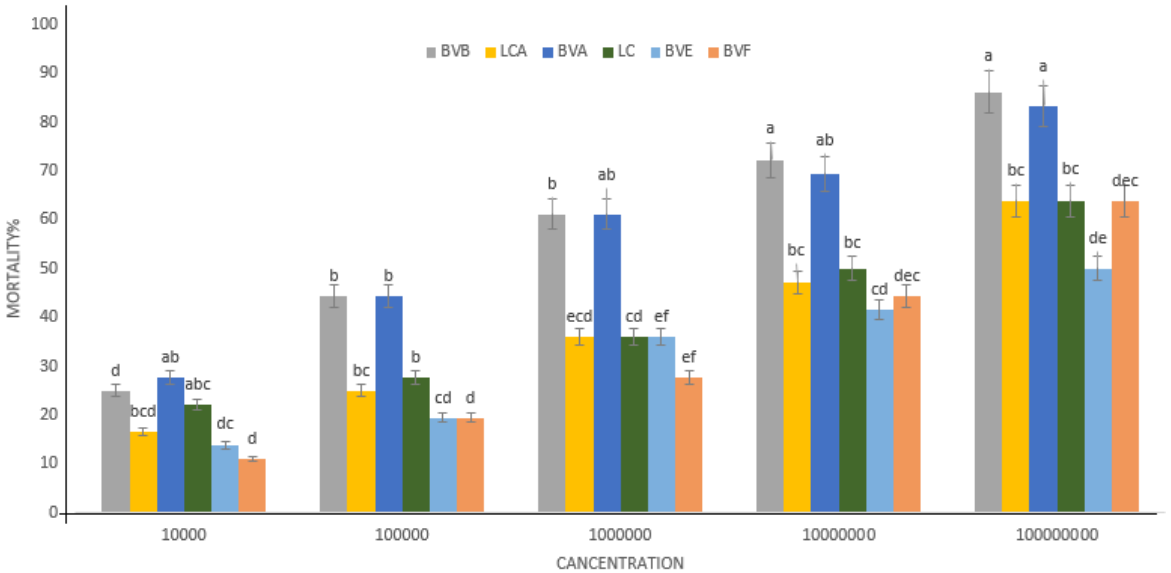
Concentration used for the LT_{50} calculations was 1×10^7 conidia/ml; $^{\alpha}$All rows are insignificant at $P < 0.05$; $^{\beta}$Relative speed of kill; $^{\gamma}$Slope intervention factor for time

بر این اساس، لاروهای سن چهارم برای مطالعه انتخاب شدند و تاثیر هر یک از جدایه‌های قارچ‌های *B. bassiana* و *L. lecanii* بر روی آن‌ها بررسی شد. در مطالعات فنوتیپی تحقیق حاضر بیشترین تعداد جداسازی شده قارچ‌های بیمارگر جدایه‌های قارچی مربوط به *B. bassiana* بود. در بررسی صد و شصت و یک نمونه از خاک‌های مزارع شاهرود مشخص شد در ۷۸ درصد نمونه‌ها بیش از ۴۰ درصد جدایه‌ها به *B. bassiana* تعلق داشته و فراوان‌ترین قارچ بود. یافته‌آن‌ها همسو با نتایج این تحقیق بود (Derakhshan, 2008). از نظر بیماری‌زایی، جدایه‌های BVA و BVB از قارچ بیمارگر *B. bassiana* با حدود ۹۰ درصد مرگ و میر در غلظت 10^8 کنیدی بر میلی‌لیتر، دارای بیشترین تاثیر بودند. مطالعات سایر محققین در اثبات قدرت بیمارگری بالای بیشتر جدایه‌های *B. bassiana* تاییدی بر نتایج تحقیق اخیر است. میزان بیماری‌زایی جدایه‌های بومی از قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی شب‌پره آرد توسط Soleimani et al. (2022) بررسی شد. جدایه‌های مورد مطالعه آن‌ها از نمونه‌های خاک منطقه جیرفت (استان کرمان)، منطقه خسروشهر (استان آذربایجان شرقی) و خاک‌های اطراف تبریز (استان آذربایجان شرقی) جداسازی شدند. نتایج بدست آمده نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین جدایه‌ها از لحاظ بیماریزایی بود. به طوری‌که جدایه JS2 از قارچ *B. bassiana* با کمترین میزان LC_{50} ($۱/۰۹\times۱۰^۵$ کنیدی بر میلی‌لیتر) بیشترین زهراگینی را روی آفت داشت. کارایی بالای جدایه‌های بومی، در کنترل زنجره *Orosanga japonica* Melichar توسط قارچ *B. bassian* نیز اثبات شده است (Gholami Ghavamabad et al., 2023). مشابه نتایج تحقیق حاضر در مطالعه Moghassem (2023) et al. در مورد تاثیر جدایه‌های بومی از قارچ *M. anisopliae* روی شب‌پره آرد حاصل گردید. همچنین، Draganova & Markova (2006) گزارش کردند لارو سن آخر شب‌پره آرد به آلودگی توسط قارچ‌های *B. bassiana*، *M. anisopliae* و *L. lecanii* حساس بود اما جدایه‌های *B. bassiana* بیشترین مقدار مرگ و میر را ایجاد نمودند. علاوه براین، Devi et al. (2008) اثر ۲۹ جدایه مختلف از قارچ *B. Bassiana* را روی هشت گونه حشره از راسته‌های متفاوت (چهار گونه بال‌پولک‌دار، دو گونه سخت‌بال‌پوش، یک گونه جوربال، یک گونه ناجوربال و یک گونه زنبور) بررسی کرده و نشان دادند که همه جدایه‌ها دارای قدرت بیمارگری بودند. این جدایه‌ها از لحاظ زهراگینی اغلب در درجه‌بندی A قرار داشتند.

نتایج این پژوهش بیانگر میزان حساسیت متفاوت شب‌پره آرد به جدایه‌های مختلف بود و جدایه‌ها نیز اثر متفاوتی را از خود نشان دادند. اختلاف در میزان زهرآگینی جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات روی میزبان، توسط محققین دیگر نیز مطالعه شده است. جدایه‌هایی از *B. bassiana* روی پسیل معمولی پسته در شرایط آزمایشگاهی توسط Alizadeh et al. (2006) مطالعه گردید و کمترین و

بیشترین غلظت و زمان کشندگی در جدایه‌های DEBI008 (۳/۹۱×۱۰^{۲} کنیدی بر میلی‌لیتر و ۵/۶ روز) وDEBI007 (۳/۶۳×۱۰^{۴} کنیدی بر میلی‌لیتر و ۳/۴ روز) بدست آمد. در مطالعه دیگری، Faraji et al. (2013) زهرآگینی ۱۰ جدایه از قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* را در کنترل لاروهای *E. kuehniella* مطالعه و به ۸۸ درصد مرگ و میر توسط جدایه‌هایی از قارچ *B.bassiana* روی شب‌پره آرد دست یافتند. در مطالعه کارآیی جدایه ایرانی قارچ *B. bassiana* با نام IRAN44IC در کنترل میکروبی *E. kuehniella*نشان داده شد که کمترین LC_{50} مربوط به مرحله تخم و بیشترین میزان این شاخص مربوط به مرحله شفیرگی بود (Bahmani et al., 2012).

نتایج تجزیه واریانس و گروه‌بند جدایه‌ها بیانگر افزایش معنی‌دار مرگ و میر لاروها با افزایش غلظت قارچ‌های *L. lecanii* و *B. bassiana* بود. در این رابطه (2003) kuepper گزارش نمود که غلظت بالا و شرط تماس اسپور به بدن حشره از عوامل موفقیت در بیماریزایی قارچی به شمار می‌آید، زیرا با افزایش تراکم کنیدی شانس تماس بدن حشره با کنیدی افزایش می‌یابد. مطالعات Safavi et al. (2010) نیز نشان دهنده وجود رابطه معنیدار و قابل قبولی بین میزان غلظت مصرفی از قارچ *B. bassiana* با میزان مرگ و میر کرم ساقه خوار اروپایی ذرت (Lepidoptera: Pyralidae) *Ostrinia nubilalis* Hubner بود (Safavi et al., 2010). در تحقیقی دیگر به منظور تعیین غلظت موثر سوسپانسیون اسپور *L. lecani* برای کنترل شته پنبه و سفیدبالک‌ها نتایج مشابهی بدست آمد، به‌گونه‌ای که غلظت ۱۰^{۴} تا ۱۰^{۷} کنیدیوم بر میلی‌لیتر مرگ و میر نسبتا پایینی ایجاد کرد، ولی پنج روز بعد از کاربرد غلظت ۱۰^{۸} کنیدیوم بر میلی‌لیتر کنترل نزدیک به ۹۹ درصد مشاهده شد (Kim et al., 2007). در پژوهش دیگر، ۱۲ جدایه قارچ *B. bassiana* با غلظت ۱۰^{۸} کنیدی بر میلی‌لیتر روی لارو *E. kuehniella* در شرایط آزمایشگاهی آزمون شد. در این بررسی چهار جدایه از قارچ *B. bassiana* جمعیت شب‌پره آرد را به صورت صد در صد کنترل کردند (Mora et al., 2016). در مطالعه حاضر مشخص شد غلظت‌های مختلف جدایه‌های قارچ *B. bassiana* و *L. lecanii* مرگ و میر متفاوتی را ایجاد کردند.



شکل ۳. میانگین درصد مرگ و میر روی لارو سن چهارم شب‌پره آرد (*EK*) *Ephestia kuehniella* توسط جدایه‌های مختلف *Beauveria bassiana*(BVA، BVB، BVE و BVF) و *Lecanicillium lecanii* (LCA و LC) با پنج غلظت مختلف. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار جدایه‌ها در سطح احتمال پنج درصد است

Fig 3. Percentages (Mean±SE) of mortality caused by different isolates of *Beauveria bassiana* (BVA, BVB, BVE, BVF) and *Lecanicillium lecanii* (LCA, LC) on fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* (*EK*) at five different concentrations. Different letters are indicating significant differences among isolates in each column (F-LSD, P<0.05)

این تفاوت با مسئله زنده‌مانی کنیدی قارچ‌ها قابل توجیه می‌باشد؛ زیرا از عوامل مؤثر در استفاده از قارچ‌ها به عنوان عامل کنترل بیولوژیک، زنده‌مانی و توانایی بیماریزایی اسپورهای قارچ روی میزبان می‌باشد. از دیگر عوامل موثر در این زمینه مورفولوژی گیاه میزبان، ترکیبات شیمیایی سطح گیاه و عوامل غیرطبیعی محیط است که با تغییر گونه گیاهی تغییر پیدا می‌کند (Shrestha et al., 2015).

نتیجه گیری نهایی

در کنترل بیولوژیک کلاسیک، برای مدیریت تراکم جمعیت آفات گیاهی در هر منطقه زیستی، استفاده از دشمنان طبیعی بومی و سازگار با اکوسیستم آن منطقه به دلیل تکامل پایاپای و استقرار حداکثری بسیار مورد توجه است. به‌همین دلیل، شناسایی گونه‌های کارآمد بومی و ارزیابی ظرفیت کنترلی آن‌ها در کاهش جمعیت آفات بسیار ضروری می‌باشد (Van Driesche & Hoddle, 2009). نتایج این تحقیق نشان داد که از دیدگاه اپیدمیولوژی جدایه‌های بومی قابلیت کاربردی بالایی دارند. از این میان جدایه‌های مورد مطالعه، جدایه بومی BVA از قارچ *B. bassiana* برای لارو شب پره آرد بیماری‌زای بیشتری داشته و برای مطالعات بعدی در زمینه امکان استفاده از آن در کنترل تلفیقی شب‌پره آرد مطلوب تر به نظر می‌رسد.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از راهنمایی‌های بی‌دریغ آقای دکتر رضا طلایی حسنلویی عضو هیات علمی گروه گیاه پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و مساعدت‌های خانم دکتر فرزانه سادات سید طالبی تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Al-Deghairi, M.A. (2008). Bioassay evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. against egg and nymphs of *Bemisia tabaci* Genndius (Hom.: Aleyrodidae). *Pakistan Journal* of *Biological Sciences, 11*, 1550-1560.

Alizadeh, A., Kharrazi Pakdel, A., Talebi- Jahromi, K.H., & Samih, M. (2006). The effect of some *Beauveria bassiana* isolates on common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae*. Proceedings of the 17th. *Iranian Plant Protection Congress*.Tehran.

Araújo, J.P.M., & Hughes, D.P. (2016). Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? Lovett, B., St. Leger, R.J, Eds., *Advances in Genetics, Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi, 94*, 1-39.

Bahmani, N., Ostovan, H., Latifian, M., & Rad, B. (2012). Study the lethal doses of suitable isolate of Beauveria bassiana for microbial control of *Ephestia kuehniella* on Sayer date cultivar. *Plant Prot Journal, 4*, 67–81.

Balachander, M., Remadevi, O.K., Sasidharan, T.O., & Sapna Bai, N. (2012).Virulence and mycotoxic effects of *Metarhizium anisopliae* on Mahogany shoot borer, *Hypsipyla robusta* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Forestry Research, 223*, 651-659.

Bidochka, M.J., Clark, C., Milke, W., & Keyhani, N.O. (2010). Could insect phagocytic avoidance by entomogenous fungi have evolved via selection against. *Soil Amoeboid Predators, 156*, 2164-2171.

Boucias, D. G., & Pendland, J. C. (1998). *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publishers. Boston, Masachusetts.

Buda, V, & Peciulyte, D. (2008). Pathogenicity of four fungal species to Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Ekologija, 54* (4), 265–270.

Christos, G., Athanassiou Nickolas, G., Kavallieratos Christos, I., Rumbos, & Demetrius, C. (2017). Influence of Temperature and Relative Humidity on the Insecticidal Efficacy of *Metarhizium anisopliae* against Larvae of *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae) on Wheat. *Journal of Insect Science*, *17*(1), 1-7.

Derakhshan, A. (2008). Natural occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi in shahrood region, northeast of Iran. *International meeting on soil fertility land management and agroclimatology*, *55*, 873-877.

Devi, K.U., Padmavathi, J., Rao C.U.M., Khan, P.A.A., & Mohan, C.M. (2008). A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology*, *18*(10), 975-989.

Draganova, S., & Markova, E. (2006). Bioassays with isolates of Entomopathogenic fungi against *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep.: Pyralidae). *Bulgarian Journal of Agricultural Science, 12* (5), 637-643.

Esmaili, M., Azemayeshfard, P., & Mir-Karimi, A. (2011). *Agricultural Entomology*. Tehran University Press.

Faraji, S., Mehrvar, A., & Derakhshan Shadmehri, A. (2013). Studies on the virulence of different isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metcsn.) Sorokin against Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) African, *Journal of Agricultural Research*, *8*(30), 4157-4161.

Fargues, J. (1984). Adhesion of the fungal spore to the insect cuticul in relation to pathology. In: D.W. Roberts and J.R. Aist (Eds.), *Infection processes in fungi*. The Rockefeller Foundation. pp: 90-110.

Faria, M., & Wraight, P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control, 43*, 237-256.

Franco, J.C., Zada, A., & Mendel, Z. (2009). *Novel approaches for the management of mealybug pests.* Biorational Control of Arthropod Pests. Springer.

Ghodrati, R., Aramideh, S., Frozan, M., & Michaud, J.P. (2022). Interactions of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* and the egg parasitoid, *Trichogramma brassicae* reared on Ephestia kuehniella and Sitotroga cerealella. *Journal of Applied Research in Plant Protection, 11*(2), 47-56.

Gholami Ghavamabad, R., Zamani, S.M., Ahangaran, Y., Kazerani, F. & Zarghani, E. (2023). Efficacy of Indigenous Isolates of *Beauveria bassiana* in Controlling Invasive Planthopper, *Orosanga japonica*. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 45*(4), 149-163.

Gillespie, A. T., & Clayton, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control andthe role of toxin in pathogenesis. *Pesticides Science, 27*, 203-215.

Heping, W., Ling, M., & Baoping, L. **(**2008). Effects of feeding frequency and sugar concentrations on lifetime reproductive success of *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae*). Biological Control*, *45*, 353-359.

Herlinda, S. (2010). Spore density and viability of entomopathogenic fungal isolates from Indonesia, and their virulence against *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Tropical Life Science Research, 21*(1), 11-19.

Humber, R.A. (2005). Entomopathogenic Fungal Identification. Available on: www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place١/907051 0/APSwkshoprev.pdf.

Humber, R.A. (2012). Identification of Entomopathogenic Fungi, Lacey, L.A, Ed., Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition), *Academic press. 23*,151-187.

Ignoffo, C.M., Garcia, C., Hostetter, D.L., Pinnell, R.E. (1977). Laboratory studies of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*: Soil-borne contamination of soybean seedlings and dispersal of diseased larvae of *Trichoplusia ni. Journal of Invertebrate Pathology, 29*(2), 147-152.

Jenkins, N.E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A.J., & Lomer, C.J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol, News and Information, 19*(1), 29-39.

Keller, S., Zimmerman, G. (1989). Mycopathogens of soil insects. In: *Insect-Fungus Interactions*, Wilding, N., Collins, N. M., Hammond, P. M. and Webber, J. F. (Eds). Academic Press, London.

Khan, M.A., & Ahmad, W. (2015). The Management of Spodopteran Pests using Fungal Pathogens, Sree, K.S., Varma, A, (Eds.), *Biocontrol of Lepidopteran Pests*: Vol. 43. *Use of Soil Microbes and their Metabolites Soil Biology*. Springer.

Kim, J.J., Goettel, M.S., Gillespie, D.R. (2007). Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biological Control, 40*, 327-332.

Kuepper, G. (2003). *Colorado Potato Beetle: Organic Control Options*. ATTRA (National Sustainable Agriculture Information Service).

Lacey, L. A. (2017). Entomopathogens used as microbial control agents. pp. 3-12 in Lacey, L. A. (Ed) Microbial Control of Insect and Mite Pests from Theory to Practice. Elsevier Inc

Majidi-Shilsar, FK., Kamali, F., Ershad, J. (2003). Effect of temperature on germination, mycelial radial growth and virulence of *Beauveria bassiana* on *Chilo supressali*s Walker (Lep: Pyralidae). *Appl. Ent. Phytopath*, *71*(1), 123-138 (in Persian with English abstract).

Malarvannan, S., Sujaikumar, G., Purushothaman, D., Shanthakumar, S.P., Prabavathy, V.R., et al. (2010). Laboratory efficacy of *Lecanicillium lecanii* against different stages of *Helicoverpa armigera* and ITS biosafety on *Trichogramm* asp. *Hexapoda*, *17* (1), 49-58.

Mehrmoradi, H., Jamali, S., & Pourian, H.R. (2020). Isolation and identification of entomopathogenic fungi from cultivated and natural soils in Kermanshah province (West of Iran). *Rostaniha, 21*(1), 49-64.

Meyling, N.V. & 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.

Moghassem, M., Jamshidi, M., Khakvar, R., Nematollahi, S. (2023). Toxicity study of different isolates of *Metarhizium anisopliae* extracted from the soil of different orchards of East Azerbaijan on flour moth (*Anagasta kuehniella*). *Journal of Animal Environmental*, *14*(2), 386-393.

Mora, M.A.E., Rouws, J.R.C. & Fraga, M.E. (2016). Occurrence of entomopathogenic fungi in Atlantic forest soils. *Microbiolgy, 4*, 1-11.

Sabbour, M.M., & Abd-El-Aziz, Sh.E. (2010). Efficacy of some bioinsecticides against Bruchidius incarnates (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation during storage. *Journal of Plant Protection Research, 50*(1), 25–31.

Safavi, S., Kharrazi, A., Rasoulian, G.R., & Bandani, A. (2010). Virulence of some isolates of entomopathogenic fangus, *Beauveria bassiana* on *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Journal of Agricultural Science and Tecnology, 12*(1), 13-21.

Samson, R.A., Harry, C., E., & Latge, J.P. (2013). *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer Science and Business Media.

Shapiro, M., & Argauer, R. (2001). Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosisvirus. *Biological and Microbial Control, 94*, 339-43.

Shrestha, G., Enkegaard, A., & Steenberg, T. (2015). Laboratory and semi-field evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) against the lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae). *Biological Control, 85*, 37-45.

Soleimani, P., Mahrvar, A., Vaez N. (2022). Biological indices of the entomopathogenic fungi, Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae, and assessment of their virulence diversity. *Journal of Entomological SociEty of Iran,* 41(4), 281-300.

Van Driesche, R., Hoddle, M., & Centre, T. (2009). *Control of pests and weeds by natural enemies: An Introduction to Biological Control*. John Wiley & Sons.

Yoshinori, T., & Kaya, H. K. (1992). *Insect Pathology*. Academic Press. USA.

Zare, M., Talaei-Hassanloui, R., Fotouhifar, K. (2014). Relatedness of proteolytic potency and virulence in entomopathogenic fungus Beauveria bassiana isolates. *Journal of Crop Protection, 3* (4), 425-434.

Zare, R., & Gams, W. (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*", *Mycological Research, 112* (7), 811-824.

© 2023 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)
46(2), Summer, 2023

10.22055/ppr.2023.42895.1676

Assessing the virulence of Iranian entomopathogenic fungi isolates in control of *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae) (Zeller)

M. Moghassem [1], M. Jamshidi [2*], R. Khakvar [3], S. Nematollahi[2]

1. Ph.D. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran (ma.jamshidi@yahoo.com)
3. Associate Professor Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: 28 January 2023 Accepted: 8 September 2023

Abstract

Background and Objectives

Entomogenous fungi include a wide range of species that are ecologically very diverse. Many of them are pathogenic to insects and mostly show host specificity. Isolation and identification of native entomogenous fungi, especially pathogenic species, and their use as a source of biological control agents is an important safe, environmentally-friendly pest control approach. This survey isolated and characterized entomogenous fungi that naturally occur in soil. Post-harvest infestations cause considerable losses in cereal production. Stored-product insect control is mainly accomplished by chemical means; however, pesticides can affect non-target species, such as plants, animals, and humans. Pesticides increase pest resistance. Another possible negative effect of pesticides is their ability to bioaccumulate and biological magnification. Therefore, alternative agents are needed for managing stored-product insect pests. Biological control of stored-product insects with entomopathogenic fungi is a successful, sustainable alternative to chemical insecticides. Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, is one of the most important insect pests infesting stored grain of cereals worldwide. This study isolated and determined some entomopathogenic fungi's efficacy in flour moth biocontrol, *E. kuehniella*.

Materials and Methods

Different strains of entomopathogenic fungi were isolated from the soils of various districts of Azarbaijan province in the Northwest of Iran. Their virulence against *E. kuehniella* larvae was evaluated. Isolates of various entomopathogenic fungi were isolated and purified using a soil trap from twenty distinct soil specimens. The immersion technique evaluated their pathogenicity against *E. kuehniella* in three replicates. This was done at 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, and 10^8 conidia/mL concentrations. All selected fungal isolates were identified based on morphological features and mycological parameters.

Results

Four isolates of *B. bassiana* (BVA, BVB, BVE, and BVF) and two of *L. lecanii* (LCA and LC) from fourteen isolates were isolated. Six fungal species, namely *Lecanicillium lecanii and Beauveria bassiana*, were identified among the fourteen isolates collected. The bioassay assessment revealed that *E. kuehniella* fourth-instar larvae were susceptible to all isolates and

that the larval death rate increased with rising conidial concentration. The BVA and BVB isolates of *B. bassiana* showed the maximum virulence, with nearly 2.5×10^5 and 2.8×10^5 (conidia/mL) LC_{50}, while the BVF isolate of *B. bassiana* had the least virulence among the other isolates evaluated, with nearly 2.2×10^7 (conidia/mL) LC_{50} on *E. kuehniella*. The lowest LT_{50} value (3.72 days) using a 10^8 conidia/ml concentration on *E. kuehniella* larvae was shown on the BVA isolate.

Discussion

A comparison of the means and grouping of isolates showed a significant difference between isolates and the effectiveness of different concentrations. Also, the BVA isolate of *B. bassiana* had greater efficiency than the other isolates, and therefore, they will be more suitable for use in plant pest biological control programs.

Keywords: Biological control, East Azarbaijan, Stored-product pest, Beauveria bassiana, Lecanicillium lecanii

Associate editor: L. Ebrahimi (Ph.D.)

Citation: Jamshidi, M., Moghassem, M., Khakvar, R. & Nematollahi, S. (2023). Assessing the virulence of Iranian entomopathogenic fungi isolates in control of *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae) (Zeller). *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *46*(2), 73-86. https://10.22055/ppr.2023.42895.1676.