تحقیقات آفات گیاهی
۱۴۰۱ -۱۲(۱): ۱۵-۲۵

علمی پژوهشی

بررسی اثر کشندگی جدایه‌های قارچ بیمارگر *Metarhizium anisopliae* روی پوره سن دوم شته فندق *Myzocallis coryli*

رعنا آقازاده[۱]، محمدرضا زرگران[۱*]، شهرام آرمیده[۲] و مهدی رزمی[۲]

۱- گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۲۰)

چکیده

بیشترین خسارت وارده به محصول فندق ناشی از آفات است. شته فندق *Myzocallis coryli* Goetze یکی از آفات مهم این محصول است. هدف از انجام این پژوهش استفاده از روش مهار زیستی بر پایه قارچ‌های بیمارگر حشرات در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی بود. در این بررسی از چهار جدایه DEMI001، IRAN 715C، M14 و V245 قارچ *Metarhizium anisopliae* (Metsch) برای بررسی اثر کشندگی روی پوره سن دوم شته فندق *M. coryli* در شرایط آزمایشگاهی (۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت تاریکی: روشنایی) و صحرایی (۳±۳۰ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶±۵۵ درصد و دوره نوری ۱۴:۱۰ ساعت (تاریکی: روشنایی)) استفاده شد. به‌منظور ارزیابی سمیت چهار جدایه، از شاخص غلظت کشنده پنجاه درصد جمعیت (LC_{50}) با استفاده از برنامه پروبیت در نرم‌افزار SPSS v.21 استفاده شد. نتایج LC_{50} حاصل از تأثیر جدایه‌های DEMI001، IRAN715C، M14 و V245 روی پوره سن دوم شته فندق در شرایط آزمایشگاه به‌ترتیب ۰/۵۱×۱۰^{۶}، ۳×۱۰^{۶}، ۰/۳۱×۱۰^{۶} و ۱/۱۱×۱۰^{۶} (اسپور در میلی‌لیتر) و در شرایط صحرایی ۰/۵۰×۱۰^{۶}، ۱/۸۱×۱۰^{۶}، ۰/۴۳×۱۰^{۶} و ۱/۵۰×۱۰^{۶} (اسپور در میلی‌لیتر) به دست آمد. نتایج این بررسی نشان داد جدایه M14 روی پوره سن دوم فندق بسیار مؤثر بوده و هم‌چنین، برای کنترل مرحله پورگی شته در شرایط صحرایی به غلظت بالاتری از سوسپانسیون قارچی در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی نیاز است. در بررسی اثر تلفیقی جدایه‌ها، اثر افزایشی و هم‌افزایی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: شته فندق، فندق، قارچ بیمارگر حشرات، مهار زیستی

نویسنده مسئول: m.zargaran@urmia.ac.ir

مقدمه

فندق یکی از محصولات مهم تجاری میوه‌ی درختی *Corylus avellana* L. متعلق به راسته Fagales، از تیره غان (Betulaceae) و جنس (*Corylus*) است (Ericisli and Read, 2001). فندق دارای ۲۵ گونه است که ۹ گونه آن از نظر اقتصادی و به‌نژادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Hossein-Ava *et al*., 2017). این گیاه در بیش از ۲۰ کشور جهان کشت می‌شود و از مراکز اصلی تولید فندق می‌توان به ترکیه، ایتالیا، آمریکا، چین و ایران اشاره کرد (Noori and Ziarati, 2015). ایران در رده هفتم تولید فندق در دنیا قرار دارد (Amini-Noori *et al*., 2016). در ایران استان‌های گیلان، اردبیل، قزوین، گلستان، مازندران و قم از مناطق اصلی فندق‌کاری به شمار می‌روند (Rahim and Javadi, 2000). آفات و بیماری‌ها نگرانی عمده برای کاهش تولید این محصول ارزشمند می‌باشند. بیش‌ترین خسارت وارده به محصول فندق ناشی از آفات است (Aliniazee, 1994). شته فندق *Myzocallis coryli* (Goetze) از آفات مهم فندق در ایران می‌باشد (Alikhani *et al*., 2010; Yarahmadi and Rajabpour, 2012). این شته باعث آسیب مستقیم و غیرمستقیم به درختان فندق شده و با تغذیه بیش‌ازحد باعث ریزش برگ‌ها می‌شود. با افزایش جمعیت آفت برگ‌ها خشک شده و در نتیجه کیفیت محصول پایین می‌آید (Gantner, 2000; Aker and Abaci, 2016). هم‌چنین، در اثر تولید عسلک فراوان برگ را مستعد ابتلا به قارچ *Fumagina capnodium citri* می‌کند که این قارچ باعث کاهش فتوسنتز درخت می‌شود (Alford, 2007; Aguilera *et al*., 2014). کاربردآفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل شته اغلب به‌دلیل وجود برخی از مشکلات مانند بروز مقاومت نسبت به حشره‌کش‌ها، کاهش اثربخشی دشمنان طبیعی و هم‌چنین آلودگی محیط‌زیست توصیه نمی‌شود (Tuncer *et al*., 2001; Aker and Tuncer, 2016). استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل شته فندق به دلیل کاهش عوارض مضر زیست‌محیطی به‌عنوان یک اولویت در نظر گرفته شده‌اند (Ajamhasani *et al*., 2013). در حدود ۱۰۰۰ گونه از قارچ‌ها به‌عنوان عوامل بیمارگر حشرات معرفی شده‌اند که بسیاری از آن‌ها پتانسیل زیادی برای کنترل آفات دارند (Aker and Tuncer, 2016; Lacey, 2017). یکی از این قارچ‌ها *Meterhizium anisoplia* است که می‌تواند ۲۰۰ گونه از حشرات را آلوده و کنترل نماید (Aker and Abaci, 2016). دامنه میزبانی وسیع این قارچ بیش‌تر مربوط به شته‌های خانواده Aphididae است (Talepour *et al*., 2015). در بررسی انجام‌شده در مورد کنترل افراد کامل شته چشم‌بلبلی توسط *B. bassiana* و *M. anisopliae* نتایج نشان‌دهنده توانایی کنترل این شته به‌وسیله هر دو قارچ بود (Ekesi *et al*., 2008). در پژوهشی با هدف تعیین بهره‌وری از قارچ *B. bassiana* و *Metarhizum* sp. برای کنترل شته *Lipaphis erysimi* هر دو قارچ دارای کشندگی مطلوبی روی این شته بودند (Arauio *et al*., 2009). آکر و آباسی (Aker and Abaci, 2016) در بررسی اثر قارچ *M. anisopliae* در کنترل شته فندق *M. corily* به این نتیجه رسیدند که این قارچ دارای پتانسیل بالقوه در کنترل بیولوژیک پوره‌های شته بوده و در کنترل بیولوژیک پوره‌های شته فندق بسیار توانا می‌باشد. در راستای رسالت حفاظت از محیط‌زیست و کاهش آلودگی‌های ناشی از کاربرد سموم شیمیایی و هم‌چنین در جهت کاهش جمعیت آفت شته فندق *M. corily* که خسارت سنگینی به این گیاه وارد می‌کند، استفاده از روش کنترل بیولوژیک بر پایه قارچ‌های بیمارگر از اهداف اصلی این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها

بررسی حاضر در باغ تحقیقاتی و آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. چهار جدایه مختلف قارچ بیمارگر *M. anisopliae* که از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی بخش مبارزه بیولوژیک – تهران تهیه شده بود، در آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. برخی از ویژگی‌های این جدایه‌ها در جدول ۱ بیان شده است.

جدول ۱- جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر مورد استفاده

Table 1. The used isolates of the entomopathogenic fungi

Isolates	Host	Location	Fungi
IRAN 715C	Locust (Orthoptera: Acrididae)	Ahvaz-Iran	*M. anisopliae*
DEMI001	*Rhynchophorus* (Coleoptera: Curculionidae)	Saravan-Iran	*M. anisopliae*
M14	Soil	Garmsar-Iran	*M. anisopliae*
V245	Soil	Finland	*M. anisopliae*

پرورش شته فندق *M. coryli*

جمعیت اولیه شته از بخش‌های آلوده باغ فندق دانشگاه ارومیه انتخاب شد. برگ درختان آلوده نشانه‌گذاری شده و داخل ظروف پتری پلاستیکی با درب حاوی تور که مانع ورود دشمنان طبیعی بود، قرار گرفتند.

تکثیر و تعیین غلظت جدایه‌های قارچی

برای تکثیر جدایه‌های قارچی از محیط کشت Sabouraud dextrose agar (SDA) استفاده شد. برای تهیه محیط کشت، ۶۵ گرم پودر SDA با آب مقطر استریل مخلوط و حجم آن به یک لیتر رسانده شد. عمل استریل کردن در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. بعد از خارج کردن محیط کشت از اتوکلاو و خنک شدن آن، محیط کشت در زیر هود و در کنار شعله، به درون تشتک‌های پتری استریل ۸ سانتی-متری ریخته شد. جدایه‌های قارچی داخل تشتک‌های پتری کشت شدند. کشت دادن و تکثیر قارچ در زیر هود و در کنار شعله چراغ گاز در شرایط کاملاً استریل انجام گرفت. عمل کشت توسط لوپ استریل انجام شد. نمونه برداشته‌شده از محیط کشت مادر به محیط کشت جدید منتقل و درب آن سریع مسدود شد. بعد از کشت قارچ روی محیط کشت بیان شده، ظروف پتری به مدت ۱۵ روز در انکوباتور با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ و دوره نوری و تاریکی معادل ۸:۱۶ ساعت نگه‌داری شدند تا اسپورزایی قارچ به‌اندازه کافی انجام گیرد.

برای تهیه سوسپانسیون اسپور، از کشت‌هایی که در آن‌ها اسپورزایی به‌صورت کامل صورت گرفته بود (۱۵روز پس از کشت) استفاده شد. اسپورها توسط تیغه آزمایشگاهی استریل از محیط کشت خراش داده شد و داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل که به آن ۰/۰۵ درصد Tween-80 اضافه‌شده بود، به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. درب لوله‌ها بسته‌شده و لوله‌ها به‌خوبی تکان داده شدند و سپس، از پارچه ململ چند لایه عبور داده شدند تا میسلیوم‌ها و احتمالاً قطعات محیط کشت حذف شوند. برای تهیه سوسپانسیون با غلظت بالا، لوله‌های آزمایش در دمای اتاق برای مدت ۱ ساعت قرار داده شده و پس از ته‌نشین شدن اسپورها، آب مقطر رویی دور ریخته شده و اسپورهای چند لوله باهم مخلوط شدند. برای تعیین تراکم اسپوری از لام نئوبار تصحیح یافته (گلبول شمار) استفاده شد.

آزمایش زیست‌سنجی در آزمایشگاه

بعد از تهیه غلظت‌های قارچی (غلظت‌هایی که ۲۰ تا ۹۰ درصد تلفات ایجاد کردند)، برای هر غلظت تعداد ۱۰ عدد پوره سن دوم شته در هر تکرار روی برگ گیاه که پیش‌تر استریل شده بودند و شته ها در آن مستقر شده بودند به آرامی به مدت ۱۰ ثانیه در سوسپانسیون‌های قارچی غوطه‌ور و بعد از خشک شدن به درون پتری‌های استریل منتقل شدند. درون پتری یک قطعه پنبه برای تأمین رطوبت قرار داده شد. ارزیابی آلودگی یا بیماری‌زایی روی پوره‌ها بعد از گذشت ۱۰ روز ادامه یافت. هر تیمار دارای سه تکرار بود. برای تیمار شاهد در شرایط یکسان از آب مقطر استریل همراه با ۰/۰۵ درصد Tween-80 استفاده شد. شته‌هایی که مشکوک به آلودگی بودند و با نزدیک کردن سوزن به بدن آن‌ها حرکتی نداشتند، درون پتری حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب قرار داده شدند و مجموعه به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس منتقل شد. پتری‌ها هر روز بررسی شده و در صورت وجود پوشش قارچی در سطح شته‌ها، به‌عنوان حشرات آلوده‌شده توسط قارچ محاسبه شدند (Kassa *et al.*, 2002). آزمایش‌های زیست‌سنجی در ۳ تکرار صورت گرفت. برای محاسبه LT_{50} جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی غلظت‌های

10^7 و 10^8 (اسپور بر میلی‌لیتر) تعداد ۳۰ عدد پوره سن دوم (در سه تکرار) به روش مورد اشاره در بالا تیمار شدند و مرگ‌ومیر آن‌ها در زمان‌های مختلف (هر ۱۲ ساعت تا ۷ روز) ثبت شدند.

آزمایش‌های زیست‌سنجی در شرایط صحرایی

زیست‌سنجی مقدماتی با غلظت‌های مختلف جدایه‌های قارچی روی پوره‌های سن دوم شته فندق انجام گرفت. غلظت‌هایی که تلفات ۲۰ تا ۹۰٪ ایجاد کردند، مشخص شد. این غلظت‌ها به‌عنوان غلظت کمینه و بیشینه انتخاب و در حد فاصل آن‌ها نیز ۵ غلظت با فاصله لگاریتمی برای زیست‌سنجی انتخاب شدند. برای آزمایش‌های زیست‌سنجی از هر جدایه قارچی ۷ غلظت به همراه شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در نمونه‌های مساوی در هر واحد آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. برای پاشیدن غلظت‌های مختلف روی پوره‌های سن دو شته روی برگ گیاه فندق از سم‌پاش دستی استفاده شد. به این ترتیب که برگ فندق در فاصله ۲۵ سانتی‌متری نازل سم‌پاش دستی به‌صورت عمودی نگه داشته و سوسپانسیون موردنظر به‌صورت یکنواخت روی برگ‌ها و پوره‌ها پاشیده شد. پس از اسپور پاشی، برگ‌ها به همراه پوره داخل ظروف پتری که دارای درب توری بودند قرار گرفت و به‌وسیله کش پول روی برگ ثابت شدند. سپس درب ظرف بسته شد. روزانه پوسته‌های پورگی و پوره‌های تازه متولدشده با قلم‌مو به‌آرامی جمع‌آوری و از محیط آزمایش حذف شدند. واحدهای آزمایشی بازدید و بعد از ۱۰ روز میزان مرگ‌ومیر ثبت شدند. برای اثبات بیمارگری قارچ، شته‌های مرده با استفاده از لام و لامل و آب مقطر استریل در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

برای محاسبه سمیت نسبی در شرایط آزمایشگاهی و صحرائی از معادله ۱ استفاده شد (Sun, 1950).

معادله ۱

$$\text{سمیت نسبی} = \left(\frac{\text{LC50 کم‌اثرترین‌سم}}{\text{LC50ترکیب‌دیگر}}\right)$$

برای اندازه‌گیری LT_{50} نیز دو غلظت 10^{11} و 10^{12} (اسپور بر میلی‌لیتر) روی ۳۰ عدد پوره در صحرا پاشیده شد و مرگ‌ومیر در زمان‌های مختلف (هر ۱۲ ساعت تا چه مدت۷ روز) شمارش شده و به ثبت رسید.

تأثیر تلفیقی دو جدایه

این آزمایش به‌منظور بررسی خاصیت تلفیقی دو جدایه مؤثر M14 و DEMI001 طراحی شد. برای این منظور بعد از تعیین مقادیر LC_{50} و LC_{25} هر دو قارچ اثرات مصرف هم‌زمان آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر هر دو قارچ بر اساس مقدار LC_{50} و LC_{25} تعیین و آزمایش در چهار تیمار شامل (LC_{50} M14، LC_{50} DEMI001، LC_{25} M14+LC_{25} DEMI001 و شاهد) و هر تیمار در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تلفات پس از ۱۰ روز با مشاهده پوره‌هایی که خشک شده و تغییر رنگ داده بودند و یا به‌آسانی از برگ جدا می‌شدند، به‌عنوان مرده محسوب و شمارش شدند.

تجزیه تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از مرگ‌ومیر و پوره‌های آفت بعد از اصلاح با فرمول ابوت (Abbott, 1925) به روش تجزیه Probit در نرم‌افزار (SPSS 21) تجزیه و تحلیل شد و مقادیر LC_{25} و LC_{50} محاسبه شدند. هم‌چنین مرگ‌ومیر ناشی از تیمارهای مختلف بعد از تغییر شکل داده‌ها در صورت نرمال نبودن آن‌ها و معنی‌دار نشدن تست لون به فرم $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ انجام و تجزیه واریانس ANOVA و مقایسه میانگین‌ها به روش HSD-TUKEY در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel v. 2010 استفاده شد.

نتایج

واکنش غلظت-کشندگی پوره‌های سن دوم شته *M. coryli* نسبت به جدایه‌های مختلف قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی

نتایج حاصل از تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisoplia* روی سن دوم پورگی شته فندق در شرایط

آزمایشگاهی و صحرایی نشان داد که با توجه به LC_{50} محاسبه شده و سمیت نسبی جدایه M14 زهرآگینی خوبی روی این مرحله از زندگی آفت دارد. همچنین، نتایج نشان داد جدایه M14 در شرایط آزمایشگاهی زهرآگینی بیشتری نسبت به شرایط مزرعه ای دارد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه پروبیت واکنش‌های غلظت-مرگ‌ومیر پوره‌های سن دوم شته *Myzocallis coryli* نسبت به جدایه‌های مختلف قارچ *Metarhizium anisoplia* در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی

Table 2. Probit analysis of concentration-mortality responses of second instar nymphs of *Myzocallis coryli* to different isolates of *Metarhizium anisoplia* under laboratory and field conditions

	Treatments	Slop± SE	χ^2 (df=2)	LC_{50} ($\times10^6$ spores/ml) (95% CLs)	LC_{90} ($\times10^8$ spores/ml) (95% CLs)	Relative activity
Laboratory	IRAN715C	0.46±0.06	0.5	0.51 (0.19-1.06)	3.20 (0.92-26.10)	5.88
	DEMI001	0.41±0.06	0.7	3.00 (1.35-6.62)	40.40 (6.75-101.00)	1
	M14	0.69±0.08	4.4	0.31 (0.23-1.62)	0.21 (3.48-111.10)	9.68
	V245	0.51±0.06	4.2	1.11 (0.41-11.90)	3.49 (0.23-121.80)	2.70
Field	IRAN715C	0.45±0.08	1.4	0.50 (0.19-1.04)	3.35 (0.94-28.80)	3.62
	DEMI001	0.34±0.05	0.3	1.81 (0.63-4.52)	106.00 (10.80-1133.00)	1
	M14	0.64±0.07	8	0.43 (0.32-2.61)	4.44 (5.20-182.40)	4.20
	V245	0.48±0.06	4	1.50 (0.02-21.00)	0.07 (0.38-1.60)	1.20

واکنش زمان-مرگ‌ومیر پوره‌های سن دوم شته *Myzocallis coryli* نسبت به جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی

نتایج حاصل از تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* در غلظت‌های 10^7 و 10^8 (اسپور بر میلی‌لیتر) در شرایط آزمایشگاهی و 10^{11} و 10^{12} (اسپور بر میلی‌لیتر) در شرایط صحرایی روی پوره سن دوم شته فندق نشان داد که با توجه به LT_{50} محاسبه شده جدایه M14 روی سن دوم این شته عملکرد بهتری دارد. همچنین، نتایج نشان داد جدایه M14 در شرایط آزمایشگاهی در زمان کمتری موجب کشندگی ۵۰ درصد پوره شته های فندق نسبت به شرایط مزرعه ای شده است (جدول‌های ۳ و ۴).

جدول ۳- تجزیه پروبیت واکنش‌های زمان-مرگ‌ومیر پوره‌های سن دوم شته *Myzocallis coryli* نسبت به جدایه‌های مختلف قارچ *Metarhizium anisopliae* در غلظت‌های $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ (اسپور بر میلی‌لیتر) در شرایط آزمایشگاهی

Table 3. Probit analysis of time-mortality responses of second instar nymphs of *Myzocallis coryli* to different isolates of *Metarhizium anisoplia* at the concentrations of 10^7 and 10^8 (spores/ml) under laboratory conditions

Dosage / Treatments		Slop± SE	χ^2 (df=8)	LT_{50} (95% CLs) (h)
10^7 (spores/ml)	IRAN715C	3.94±0.32	3.8	7.84 7.37-8.42
	DEMI001	3.12±0.27	3.1	8.08 7.47-8.86
	M14	3.13±0.25	11	7.11 6.62-7.71
	V245	4.47±0.04	1.8	9.14 8.56-9.92
10^8 (spores/ml)	IRAN715C	3.37±0.23	5.8	5.66 5.31-6.04
	DEMI001	2.81±0.22	3.1	6.88 6.37-7.50
	M14	3.57±0.22	4.1	3.71 3.45-3.97
	V245	3.49±0.27	7.1	7.18 6.73-7.72

جدول ۴- تجزیه پروبیت واکنش‌های زمان-مرگ‌ومیر پوره‌های سن دوم شته *Myzocallis coryli* نسبت به جدایه‌های مختلف قارچ *Metarhizium anisoplia* در غلظت‌های $۱۰^{۱۱}$ و $۱۰^{۱۲}$ (اسپور بر میلی‌لیتر) در شرایط صحرایی

Table 4. Probit analysis of time-mortality responses of second instar nymphs of *Myzocallis coryli* to different isolates of *Metarhizium anisoplia* at the concentrations of 10^{11} and 10^{12} (spores/ml) under field conditions

Dosage / Treatments		Slop± SE	χ^2 (df=8)	LT_{50} (95% CLs) (h)
10^{11} (spores/ml)	IRAN715C	3.05±0.23	7.4	6.57 (6.12-7.09)
	DEMI001	2.89±0.25	2.6	8.08 (7.43-8.93)
	M14	3.72±0.24	13.9	4.98 (4.51-5.46)
	V245	3.86±0.34	2.1	8.72 (8.13-9.50)
10^{12} (spores/ml)	IRAN715C	3.67±0.23	3.8	5.61 (5.42-6.82)
	DEMI001	2.30±0.20	3.3	6.58 (6.44-6.78)
	M14	3.38±0.21	4.0	3.81 (3.56-3.84)
	V245	3.45±0.23	10.7	5.33 (4.99-5.67)

ضریب همبستگی بین غلظت‌های مختلف جدایه‌های قارچی و تلفات روی مرحله پورگی شته *M. coryli* در شرایط آزمایشگاهی

تأثیر غلظت جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* روی پوره شته *M. coryli* در آزمایشگاه محاسبه شد. با توجه به ضریب تبیین (R^2) حاصل از تأثیر لگاریتم غلظت‌های جدایه‌های IRAN 715C، DEMI001، V245 و M14 روی مرحله پوره شته *M. corily* در آزمایشگاه که معادل ۰/۹۷۳، ۰/۹۹۱، ۰/۹۳۹ و ۰/۹۱۲ می‌باشد، بیش‌ترین رابطه رگرسیونی و برازش مربوط به جدایه DEMI001 می‌باشد.

ضریب همبستگی بین غلظت‌های مختلف جدایه‌های قارچی و تلفات روی مرحله پورگی شته *M. coryli* در شرایط صحرایی

تأثیر غلظت جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* روی پوره سن دوم شته فندق *M. coryli* در شرایط صحرایی نیز محاسبه شد. با توجه به ضریب تبیین (R^2) حاصل از تأثیر لگاریتم غلظت‌های جدایه‌های IRAN715C، DEMI001، V245 و M14 روی مرحله پوره شته *M. coryli* در آزمایشگاه که به‌ترتیب معادل ۰/۹۱۲، ۰/۹۸۴، ۰/۹۴۰ و ۰/۹۴۰ می‌باشد، بیش‌ترین رابطه رگرسیونی و برازش مربوط به جدایه DEMI001 به ثبت رسید.

اثر تلفیقی

در بررسی اثر تلفیقی، نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تلفات پوره‌های شته فندق ۱۰ روز پس از آزمایش در شرایط آزمایشگاهی در سطح احتمال آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($F(3,8)= 31.133$, $P=0.001$). بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری بین کل تیمار وجود دارد، اما بین تیمارهای تکی قارچ و ترکیبی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و خاصیت هم‌افزایی و افزایشی بین دو جدایه مشاهده نشد (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد تلفات پوره سن دوم شته فندق تحت تأثیر تیمارهای تکی و ترکیبی با استفاده آزمون توکی ($P=0.05$)

Table 5. Comparison of the average mortality of second instar *Myzocallis coryli* under the influence of single and combined treatments using Tukey test ($P=0.05$)

Mean±SE	Treatment
25± 2 [a]	LC_{50}M14
23± 2 [a]	LC_{50}DEMI001
26± 3 [a]	LC_{25}DEMI001+ LC_{25}M14
3± 0.2 [b]	Control

بحث

مقایسه نتایج پژوهش‌های انجام‌شده در مورد کاربرد قارچ‌های بیمارگر حشرات نشان می‌دهد که با توجه به گوناگونی جدایه‌ها و شرایط آزمایش، نتایج یکنواخت نیستند و نمی‌توان یک اصل کلی از آن‌ها استنباط کرد. در بررسی فنگ و همکاران (Feng *et al*., 1990) روی بیماری‌زایی قارچ‌های *Lecanicillium lecanii* و *B. bassiana* روی شش گونه از شته غلات نتایج نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین گونه‌های مختلف شته غلات در حساسیت به دو قارچ بیمارگر مورد استفاده بود. هم‌چنین، بیماری‌زایی هر یک از قارچ‌ها نسبت به گونه‌های شته نیز متفاوت بود. در ارزیابی اثر شش جدایه از قارچ *B. bassiana* روی شته روسی گندم جدایه SGBB601 کم‌ترین LC_{50} و LT_{50} را در بین جدایه‌ها داشت (Feng and Johnson, 1990). در بررسی علیزاده و همکاران (Alizadeh *et al*., 2006) روی تأثیر جدایه‌های قارچ *B. bassiana*، روی پسیل معمولی پسته در شرایط آزمایشگاهی نتایج نشان داد کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت و زمان کشندگی در جدایه‌های DEB1008 و DEB1007 می‌باشد. در بررسی آلودگی طبیعی شته‌های غلات به قارچ‌های حشرات، جدایه SGBB8601 از قارچ

B. bassiana بیماری‌زایی به‌نسبت بالایی روی شته‌های غلات از جمله شته روسی گندم نشان داد (Feng and Johnson, 1990). نتایج پژوهش حاضر نیز مبنی بر تفاوت خاصیت حشره‌کشی جدایه های مختلف قارچ *M. anisoplia* روی شته فندق با آزمایش‌های بالا مطابقت دارد. محمدی‌پور و همکاران (Mohammadi Pour *et al*., 2010) زهرآگینی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* روی حشرات کامل شته روسی گندم را بررسی و مشاهده کردند که همه جدایه‌ها قادر به آلوده‌سازی شته مورد بررسی هستند، اما جدایه DEB1002 بیش‌ترین بیماری‌زایی را نسبت به دیگر جدایه‌ها نشان داد. در پژوهش حاضر نیز جدایه M14 قارچ *M. anisoplia* روی پوره سن دوم شته فندق بیش‌ترین قدرت بیماری‌زایی را نشان داد. در بررسی بیمارگری جدایه-های مختلف قارچ *B. bassiana* روی شته رازک (*Phorodon humuli*) نتایج نشان داد بین تاثیر جدایه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد (Dorschner *et al*., 2014)، که با تحقیق حاضر مبنی بر تفاوت در تاثیر جدایه-های مختلف مطابقت و هم‌خوانی دارد. طی تحقیقی تأثیر غلظت‌های مختلف اسپور قارچ‌های بیمارگر روی شته مومی کلم بررسی شد و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسپور و با افزایش مدت‌زمان تماس حشره با قارچ، میزان مرگ‌ومیر نیز افزایش می‌یابد (Asi *et al*., 2009). نتایج تحقیق حاضر به لحاظ تأثیر میزان اسپور و هم‌چنین زمان کشندگی با نتایج تحقیق بیان‌شده مطابقت کامل دارد و نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده رابطه معنی‌دار بین تأثیر غلظت بر مرگ‌ومیر شته فندق است. در تحقیقی تأثیر جدایه‌های قارچ‌های اندوفیت *B. bassiana* و *L. lecanii* روی قدرت زنده‌مانی و تولیدمثل شته جالیز *Aphis gossypii* بررسی شد و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که تماس شته با اسپورهای هر دو قارچ، طول مدت‌زمان تولیدمثل شته را کاهش می‌دهد، ضمن این‌که قارچ‌های *B. bassiana* و *L. lecanii* کشت‌شده در آزمایشگاه به‌طور قابل‌توجهی مرگ‌ومیر حشرات را افزایش دادند (Gurulingappa *et al*., 2011). در پژوهشی اثر جدایه‌های قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* علیه شته *M. persicae* و زنبور پارازیتوئید *Encarsia formosa* و کفشدوزک شکارگر *Cryptolaemus montrouzieri* مطالعه شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت مصرفی از قارچ‌های مورد بررسی، میزان مرگ‌ومیر حشرات افزایش یافت و بین میزان تاثیر جدایه‌های هر دو قارچ تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. نتایج بررسی ابراهیم و همکاران (Ibrahim *et al*., 2011) نیز نتایج مشابهی نشان داد. در بررسی صفوی و همکاران (Safavi *et al*., 2002) نیز میزان مرگ‌ومیر پوره‌های سن دوم شته نخودفرنگی *A. pisun* با فرآورده‌های تجاری ورتالک قارچ *Verticillium lecanii* در بین غلظت‌های مورد استفاده اختلاف معنی‌دار وجود داشته و با افزایش غلظت قارچ، درصد مرگ‌ومیر شته نخودفرنگی افزایش پیداکرد. هم‌چنین با افزایش غلظت اسپورهای قارچ، تولید نتاج نیز کاهش یافت (Butt and Goettel, 2000). در پژوهشی دیگر اثر بیماری‌زایی ۳ قارچ *Paecilomyces fumosoroseus* (n_{32}), *Verticillium lecanii* (V_{16}) و *M. anisopliae* (L_6) (M_{440}) علیه حشرات کامل شته مومی کلم بررسی شد و مشاهده گردید که مرگ‌ومیر با افزایش غلظت اسپور و زمان تماس افزایش پیدا می‌کند. مقادیر LC_{50} برای جدایه‌های *M. anisopliae* (L_6) و *M. anisopliae* (M_{440}) به‌ترتیب ۱۰^{۶} × ۳/۴۸ و ۱۰^{۶}× ۵/۵ اسپور در هر میلی‌لیتر به دست آمد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (Asi *et al*., 2009). در تحقیقی دیگر نیز تأثیر ۲۳ جدایه از قارچ‌های *M. anisopliae* و *M. acridum* روی شته سبز هلو بررسی و نتایج نشان دادند که تمام جدایه‌ها به‌جز یکی از آن‌ها روی این شته، بیماری‌زا می‌باشند (Shan and Feng, 2010). بیماری‌زایی جدایه هایی از قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *M. anisopliae* علیه شته پنبه بررسی و نتایج حاکی از آن بود که تمام جدایه‌ها علیه پوره‌های این آفت بیماری‌زا هستند و نرخ مرگ‌ومیر ۶۴ تا ۹۴ درصد می‌باشد (Herlinda, 2010). چندلر (Chandler, 1997) گزارش کرد که قارچ *M. anisopliae* روی شته کاهو بیماری‌زا بوده و LC_{50} آن ۱۰ روز بعد از آلودگی ۱۰^{۶} × ۲/۴۵ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد و قارچ به‌خوبی روی حشرات مرده اسپورزایی نمود، که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشت. هم‌چنین، در

آزمایشی اثر بیماری‌زایی قارچ *M. anisopliae* روی شته مومی کلزا در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی شد و نتایج حاکی از این بود که درصد تلفات در اثر قارچ به‌طور معنی‌داری بیش از درصد تلفات طبیعی بود (Hemmati *et al*., 2002). با توجه به کنترل آفات با استفاده از عوامل بیولوژیک و کاهش میزان مصرف سموم شیمیایی می‌توان بیان نمود که کنترل شته فندق با قارچ *M. anisopliae* می‌تواند مؤثرتر و کم‌خطرتر باشد (Wu *et al*., 2010).

با توجه به نتایج این بررسی جدایه M14 روی پوره سن دوم فندق بسیار مؤثر بوده و می‌توان در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی در مدیریت تلفیقی این افت مورد استفاده قرار داد.

References

Aguilera, A., Neeulman, W. R. and Rebolledo, R. 2014. Predatory capacity of *Adalia angulifera* (Coleoptera: Coccinellidae) larvae on *Myzocullis coryli* (Hemiptera: Aphadidae) in Chine. **Cienciae Investigacion Agrari** 41(1): 81-88.

Ajamhasani, M., Sendi, J. J., Zibaee, A., Akary, H. and Farsi, M. J. 2013. Immunoliogical responses of *Hyphantria cunea* (drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi *Beauveria bassina* (Bals-criy) and *Isaria farinosae* (Holmk). **Journal of Plant Protection Research** 53(2): 110-118.

Aker, O. and Abaci, S. H. 2016. Entopatogenicity of *Metarhizum anisopliae* and some fungi toward the Filbert aphid, *Myzocollis coryli* Goetze (Hemiptera: Aphididae). **International Journal of Fauna and Biologi Studies** 3(5): 32-37.

Aker, O. and Tuncer, C. 2016. Efficacy of some entomopathogenic fungi in controlling filbert aphid, *Myzocullis coryli* (Hemiptera: Aphadidae). **International Journal of Entomology Research** (1): 49-53.

Alford, D. V. 2007. Pestes of fruit crops: a color hand book. Academic Press. Burlington. ISBN, 461 pp.

Alikhani, M., Rezvani, A., Rakhshani, E. and Madani, S. M. J. 2010. Survey of aphids (Hem.: Aphidoidea) and their host plants in central parts of Iran. **Journal of Entomological Research** 2: 7-16.

Aliniazee, M. T. 1994. Insect pest management in hazelnut orchards of north America. **Horticulture** 3 (59): 543-550.

Alizadeh, A., Kharrazi Pakdel, A., Talebi–Jahromi, K. H. and 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, 6 p.

Amini-Noori, F., Ziarati, P. and Jafarpour, A. 2016. Nutritive value of Persian hazelnut (*Corylus avellana L.*) orchards. **Journal of Pharmaceutical and Health Sciences** 4(1): 71-77.

Arauio, J. M., Marques, E. J. and Oliveria, J. V. 2009. Potential of *Metarhizium* and *Beauveria bassiana* isolates and neem oil to control the Aphid *lipaphis erysimi* (kalt) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology** 38(4): 520-525.

Asi, M. R., Bashir, M. H., Afzal, M. and Imran, S. 2009. Effect of conidial concentration of entomopathogenic fungi on mortality of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences** 2: 175-180.

Butt, T. M. and Goettel, M. S. 2000. Bioassays of entomogenus fungi In: Novon, A. and Ascher, K. R.S. (eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International Wallingford, UK, 141-195 pp.

Chandler, D. 1997. Selection of an isolate of insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* virulent to the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius*. **Biocontrol Science and Technology** 7: 95-104.

Dorschner, K. W., Guanfeng, M. and Baird, C. 2014. Virulence of an aphid – derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) to the hop aphid *Phorodon humuli* (Hemiptera: Aphididae). **Environmental Entomology** 20(2): 690-693

Ekesi, S., Akpa, A. D., Onu, L. and Ogunlana, M. O. 2008. Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizum anisopliae* to the cowpea aphid *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae). **Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection** 33(2): 171-180.

Ericisli, S. and Read, P. H. 2001. Propagation of hazelnut by soft wood and semi – hard wood cuttings under Nebraska condition. **Acta Horticulturae** 556: 275-278.

Feng, M. G. and Johnson, J. B. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Hom.: Aphididae). **Environmental Entomology** 19: 785-790.

Feng, M., Johnson, J. B. and Kish, L. P. 1990. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal infesting aphids (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology** 19: 815-820.

Gantner, M. 2000. Aphid of auna of hazel bushes (*Corylus avellana* L.) on apropected plantation, an unprotected plantation and in a forest. **Annals UMCS** 2: 455-456.

Gurulingappa, P., Mcgee, P. A. and Sword, G. 2011. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. **Crop Protection** 30: 349-353.

Hemmati, F., Farrokhi, S. and Mehrabi, A. 2002. Efficacy of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* on *Brevicoryne brassicae* on rapeseed in the laboratory and greenhouse conditions. In: Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection congress, Kermanshah. pp. 59.

Herlinda, S. 2010. Spore density and viability of entomopathogenic fungal isolates from indoneesia, and their virulence against aphis *Gossypii glover* (Homoptera: aphididae). **Tropical life Science Research** 21(1): 11-19.

Hossein-Ava, S., Keshavarzi, M. and Saedi, Zh. 2017. Adaptability of some Local and Introduced Cultivar of *Corylus avellana* in Alamout Condition. **Seed and Plant Production** 32(1): 83-93. (In Farsi)

Ibrahim, L., Hamieh, A., Ghanem, H. and Ibrahim, S. K. 2011. Pathogenicity of entomopathogenic fungi from Lebanese soils against aphid, whitefly and non-target beneficial insects. **International Journal of Agriculture Science** 3(3): 156-164.

Kassa, A., Zimmermann, G., Stephn, D. and Vidal, S. 2002. Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Horn) (Col.: Bostrichidae) to entomopathogenic fungi from Ethiopia. **Biocontrol Science Technology** 12: 727-736.

Mohammadi Pour A., Ghazavi, M., Baghdadi, A. and Sheikhi Garjan, A. 2010. An investigation of the efficacy of two iranian isolates of *Metarhizium anisopliae* against Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* under laboratory conditions. **Iranian Journal of Plant Science** 41(2): 353-359. (In Farsi).

Noori, F. M. and Ziarati, P. 2015. Chemical composition of hazelnut (*Corylus avellana*) varieties in Iran, a association with ecological conditions. **Biosciences Biotechnology Research** 12(3): 2053-2060.

Rahim, M. and Javadi, D. 2000. Effect of pollen source on nut and kernel characteristics of hazelnut. **Acta Horticulture** 556: 371-376.

Safavi S. A., Rasulian, G. R., Kharazi Pakdel A. and Askari, H. 2002. Pathogenicity and virulence of entomogenous fungus, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas on the Pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris). **Water and Soil Science** 6(1): 255-264. (In Farsi)

Shan, L. T. and feng, M. G. 2010. Evaluation of the biocontrol potential of various *Metarhizum* isolates against green peach aphid *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Pest Management Sience, UK, London, 592 pp.

Sun, Y. P. 1950. Toxicity indexes an improved method of comparing the relative toxicity of insecticides. **Journal of Economic Entomology** 43: 45-53.

Talepour, F., Rashki, M. and Shirvani, A. 2015. Control of green peach aphid by using fungus, *Metarhizium anisopliae*, and Imidacloprid, on three Canola cultivars, under microcosm conditions. **Journal of Plant Protection** 28(4): 589-595. (In Farsi).

Tuncer, C., Akca, I. and Saruhan, I. 2001. Integrated pest management in Turkish hazelnut orchards. **Horticulturae** 556(63): 419-435.

Wu, J. H., Ali, S., Huang, Z., Ren, S. X. and Cai, S. J. 2010. Media composition influences growth, enzyme activity and virulence of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Pakistan Journal of Zoology** 42: 451-459.

Yarahmadi, F. and Rajabpour, A. 2012. Seasonal population dynamics and spatial distribution of *Myzocallis coryli* Goeze on *Corylus avellana* in Iran. **Asian Journal of Biological Science** 5(1): 52-56.

Plant Pest Research
2022- 12 (1): 15-25

Research paper

The lethal effects of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* isolets against 2nd nymphal stage of filbert aphid *Myzocallis coryli*

R. Aghazadeh[1], M. R. Zargaran[1*], S. Aramideh[2] and M. Razmi[2]
1. Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran, 2. Department of Plan Protection, Faculty of Agriculture , Urmia University, Urmia, Iran

(Received: April 7, 2022- Accepted: February 27, 2022)

Abstract

The greatest damage to hazelnut is due to its pests. Filbert aphid *Myzocallis coryli* is one of the important pests of this tree. In order to reduce the population of hazelnut aphids, which causes severe damage to this plant, the use of biological control method based on insect pathogenic fungi in laboratory and field conditions is purposed. In this study, the effects of four isolates DEMI001, IRAN 715C, M14, V245 of *M. anisopliae* were used and evaluated on the second instar nymphs in laboratory (25±1 °C, 65±5% relative humidity and photoperiod 16: 8 hours dark: light) and field conditions (30±3 °C, 55±6% relative humidity and photoperiod 14:10 dark hours: Ligh). In order to evaluate the effects of four isolates from the lethal concentration for 50% of the population (LC_{50}) probit analyses program of SPSS-21 software was used. The LC_{50} value achieved from the effect of, IRAN 715C, DEMI001, M14 and V245 isolates on the second instar nymphs of the aphid in laboratory and field conditions were 5.13×10^7, 3.00×10^6, 3.09×10^7, 1.11×10^6 (spores/ml) and 5.03×10^7, 1.81×10^6, 0.43×10^6, 1.5×10^6 (spores/ml), respectively. The results of this study showed that the isolate M14 is more effective on the second instar nymphs of this aphid. Also, for controlling the aphids' nymphs in field conditions, a higher concentration of fungal suspension is required compared to experimental conditions. In evaluate interaction between two isolates additive or synergistic effect was not observed.

Key words: Filbert aphid, Hazelnut, Entomopathogenic fungi, Biological control

Corresponding author: m.zargaran@urmia.ac.ir