دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ۴۶۶۸-۲۰۰۸
www.entomologicalresearch.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد۶ ، شماره ۱، سال ۱۳۹۳، (۱۳-۲۵)

بررسی اثر کاربرد توام حشره‌کش پیری پروکسی فن و قارچ بیمارگر *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) روی موریانه خاک‌زی *Amitermes vilis* (Hagen) در شرایط آزمایشگاهی

مرضیه رشید[*1]، *احمد بغدادی*[2]، *عزیز شیخی گرجان*[3]، *مهران غزوی*[3]

۱-دانش آموخته بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه پردیس ابوریحان، تهران
۲- استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران
۳- به‌ترتیب استادیار و دانشیار، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران، تهران

چکیده

موریانه‌ها یکی از مهم‌ترین حشرات خسارت‌زا در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران هستند. کاربرد حشره کش‌های تنظیم کننده رشد(IGRs) و مواد بیولوژیک یکی از راهبردهای برنامه مدیریت تلفیقی بااین نوع حشرات است. در این بررسی اثر توام حشره کش پیری پروکسی فن با قارچ *anisopliae* روی موریانه *Amitermes vilis* مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور تعیین LC_{50} حشره کش‌های مورد آزمایش، آزمایش‌های زیست‌سنجی روی موریانه‌های کارگر *A. vilis* انجام شد. نتایج آزمایش‌های زیست‌سنجی نشان داد که LC_{50} قارچ *M. anisopliae* $۸/۵\times۱۰^{۳}$ اسپور بر میلی‌لیتر و پیری پروکسی فن ۹/۵۶ ppm می‌باشد. برای تعیین دامنه کشندگی مخلوط قارچ و حشره‌کش روی موریانه‌های کارگر، سه غلظت از قارچ بیمارگر حشرات شامل $۱۰^{۳}$ ،۵×۱۰^{۲} و ۵×۱۰^{۱} اسپور بر میلی‌لیتر *anisopliae* . با ۰/۵ میلی‌گرم برلیتر از پیری پروکسی فن برابر با LC_{15} مخلوط شدند. نتایج نشان داد اثر متقابل قارچ *M. anisopliae* با حشره کش مذکور اثر افزایشی است و می‌توان قارچ *M. anisopliae* و پیری پروکسی فن را به صورت مخلوط در کنترل این آفت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پیری پروکسی فن، قارچ *M. anisopliae*، موریانه، سازگاری و اثر افزایشی

*نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *m100.rashid@yahoo.com*
تاریخ دریافت مقاله (۹۱/۶/۳۰) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۱/۱۲/۲)

مقدمه

خسارت موریانه‌ها باعث تخریب محصولات کشاورزی، گیاهان جنگلی و انهدام غذای ذخیره شده و اجناس نگهداری شده در منازل می‌شود (Kramm *et al.*,1982; Milner, *et al.*,1998).غذای موریانه‌ها مواد سلولزی می‌باشد و در اکوسیستم‌های کشاورزی و مناطق شهری و روستایی خسارت وارد می‌کنند. میزان خسارت موریانه‌ها سالیانه حدود ۲۲ میلیارد دلار برآورد شده است(Fuchs *et al.*, 2004) .در کشورهای آمریکا و آسیا هزینه خسارت موریانه به ساختمان‌ها میلیون‌ها دلار می‌باشد و هزینه خسارت سالیانه در بعضی از کشورها بیشتر از بلاهای طبیعی و آتش سوزی می‌باشد(Pearce, 1997).

موریانه *Amitermes vilis* در جهان در کشورهای افغانستان، اردن، عراق و شبه جزیره عربستان گزارش شده است.این گونه در اکثر مناطق ایران در استان‌های تهران، قم،اصفهان و فارس انتشار دارد.(Ghayourfar,2005)

مصرف حشره کش‌های شیمیایی برای کنترل حشرات خاکزی مثل موریانه‌ها، مشکلاتی از قبیل آلودگی محیط زیست و نابود شدن موجودات غیرهدف را ایجاد می‌نماید.استفاده از ترکیبات بیولوژیک مانند قارچ‌های بیمارگر حشرات، برای کنترل آفات خاکزی تاکید می‌شود. کنترل موثر آفات تنها در پرتو مدیریت تلفیقی(IPM) با استفاده از روش‌های مختلف و با تکیه هرچه بیشتر بر عوامل کنترل بیولوژیک و کاهش مصرف آفت کش‌ها عملی می‌باشد (Mahr *et al.*, 2001). لذا کاربرد تلفیقی قارچ بیمارگر و ترکیبات تنظیم کننده رشد حشرات اثر کنترلی مؤثری در طولانی مدت می‌تواند روی موریانه داشته باشد که با محیط زیست نیز سازگار است.

قارچ‌های بیمارگر حشرات در تحقیقات کنترل میکروبی موریانه‌ها کانون توجه هستند. چنین قارچ‌هایی باعث بروز تغییراتی درکلنی موریانه‌ها شده و در نهایت موجب زوال تدریجی کلنی آنها می‌شوند (Hanel and Watson, 1983).

قارچ‌های بیمارگر حشرات قادرند تأثیرات بیولوژیک متنوعی روی حشرات شامل مسمومیت عصبی، کاهش فعالیت سیستم ایمنی بدن و فعال‌سازی کانال‌های کلسیم در ماهیچه بدن داشته باشند (Vilicinskas *et al.*, 1997). تکثیر مجدد قارچ‌ها در طبیعت، بی‌خطر بودن برای موجودات غیر هدف و داشتن طبیعت غیر دور کنندگی برای موریانه‌ها آن‌ها را کاندیدای مطلوبی جهت کنترل بیولوژیک موریانه‌ها کرده است (Zoberi & Grace, 1990).

با انجام آزمایش روی موریانه‌های *Coptotermes* spp Wasmann و *Nasutitermes* sp. Dudley با بکارگیری سه ایزوله از قارچ *M. anisopliae* موفق به کنترل موریانه‌ها (با استفاده از روش اسپورخشک) در آزمایشگاه شد و سپس موثرترین ایزوله را شناسایی و از آن برای انجام آزمایشات و مطالعات صحرایی استفاده گردید (Milner ,1992).هم‌چنین توانسته‌اند با استفاده از قارچ *M. anisopliae* موریانهٔ *Reticulitermes flavipes* (Kollar) را(با استفاده از اسپور خشک)در آزمایشگاه کنترل کنند.در آزمایش‌های زیست‌سنجی نیز به این نتیجه رسیدند که موریانه‌های آلوده به قارچ قادر به انتقال بیماری به موریانه‌های سالم بوده، باعث بروز مرگ و میر سریع و قابل توجه در جمعیت موریانه‌ها می‌شود(۱۰۰ درصد تلفات در مدت زمان ۴۸ ساعت) و می‌توانند به‌عنوان تله برای کنترل موریانه‌ها بکار برده شوند(Zoberi ,1995).

قارچ *M. anisopliae* و ایمیداکلوپراید را در کلنی موریانه‌های *Reticulitermes flavipes* به کار بردند و نشان دادند که ایمیداکلوپراید رفتار اجتماعی موریانه‌ها را تغییر می‌دهد و با کاهش قدرت دفاع، آن ها را به پاتوژن‌های بیمارگر حشرات حساس می‌کند.(Ramakrishnan *et al.*, 1999).

طعمه‌های مسموم با سمیت کم ازجمله طعمه‌های ساخته شده با ترکیبات تنظیم کننده رشد موریانه‌های زیر زمینی را کنترل می‌کنند (Su, 1991).

با توجه به پراکنش و میزان خسارت موریانه‌ها در ایران باید مبارزه با موریانه‌ها مورد تاکید قرار گیرد. با توجه به مسأله ایجاد مقاومت در برابر حشره کش‌ها،حشره کش‌های شیمیایی به تنهایی روی موریانه‌ها کارآیی مناسب ندارد.

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی خاصیت حشره کشی پیری پروکسی فن و قارچ بیمارگر *M. anisopliae* به‌صورت جداگانه و توام روی موریانه خاکزی *A. vilis* (Hagen) می‌باشد.

روش بررسی

جمع آوری و پرورش آزمایشگاهی موریانه

جهت جمع آوری موریانه‌های خاکزی بنای تاریخی مسجد جامع ساوه انتخاب گردید. برای این منظور با استفاده از سیستم طعمه‌گذاری تعدادی تله در ساختمان نصب گردید. جهت نصب تله‌ها، چاله‌هایی به عمق ۵۰ سانتی‌متر و عرض ۲۰ سانتی‌متر کنده شد و سپس در داخل هر چاله یک لولهٔ پلیکا به طول ۴۰ سانتی‌متر و قطر ۱۵ سانتی‌متر قرار داده شد. در داخل هر لولهٔ پلیکا ۵ قطعه چوب (چوب کهنه نهاندانگان) به طول ۲۵ سانتی‌متر و عرض ۶ سانتی‌متر و قطر ۰/۵ سانتی‌متر گذاشته شد. پس از یک ماه تله‌ها مورد بازدید قرار گرفته و تله‌های حاوی موریانه‌های کارگر و سرباز در ظروف مخصوص پلاستیکی قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال موریانه‌ها به آزمایشگاه ، در یک محیط تاریک و رطوبت بالای ۷۰ درصد نگهداری گردید. قابل ذکر است کلنی‌های مورد آزمایش شامل سرباز و کارگر بودند.

قارچ بیمارگر *M. anisopliae*

در این پژوهش از جدایه سراوان با کد (DEMI 001) که از روی سخت بالپوش سرخرطومی حنایی خرما (Olivier) *Rhynchophorus ferrugineus* جمع آوری شده بود و در کلکسیون بخش تحقیقات حشره شناسی کشاورزی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور وجود دارد، استفاده شد. برای کشت این جدایه پس از آلوده کردن لارو*Galleria mellonella* به قارچ،از اسپورهایی که در سطح لاشه لارو ظاهر شده بود، برای کشت در محیط Sabourauds Dextrose Agar (SDA) با یک درصد عصاره مخمر (Y) استفاده شد.

برای تهیه مایه تلقیح، با گذشت زمان ۱۰ تا ۱۴ روز که کاملا اسپورزایی انجام شد، بااستریل کردن مواد و وسایل به‌وسیله Spatula استریل سطح محیط کشت را خراش داده و در شیشه مک کارتنی ریخته و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول Tween80 ۰/۰۵٪ به آن افزوده و بهم زده تا یک سوسپانسیون یکنواختی درست شود.

حشره‌کش مورد استفاده

در این تحقیق از پیری پروکسی فنِ EC10% فرموله شده در داخل کشور استفاده شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی پیری پروکسی فن روی موریانه *A. vilis*

ابتدا ۵ تا ۶ غلظت برای حشره‌کش پیری پروکسی فن در نظر گرفته شد.آزمایش‌های مقدماتی جهت بدست آوردن غلظت‌هایی که تلفات بین ۲۵ تا ۷۵ درصد را سبب می‌شوند صورت گرفت. زیست سنجی‌ها با استفاده از موریانه‌های کارگر سالم و هم‌اندازه در داخل پتری‌های شیشه انجام شد. تمام سطوح داخلی پتری‌ها آغشته به پیری پروکسی فن گردید.پس از خشک شدن پتری‌ها درون هر پتری یک قطعه پنبه مرطوب جهت تأمین رطوبت مورد نیاز موریانه‌ها قرار داده شد. در نیمه دیگر کف پتری دستمال کاغذی جهت سهولت حرکت موریانه‌ها قرار گرفت و سپس موریانه‌ها با قلم

موی نازک به پتری‌ها منتقل گردیدند که غذایی برای موریانه‌ها در پتری وجود نداشت و این پتری‌ها در دمای۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. در این آزمون‌ها از شاهد که با آب مقطر تیمار شده بود استفاده شد و تلفات در مدت ۱۰روز ثبت شد. این آزمایش‌ها سه باردر طول زمان تکرار شد و غلظت‌هایی که تلفات بین ۲۵ تا ۷۵ درصد ایجاد می‌کردند برای پیری پروکسی فن (۵ ppm، ۵۰ ،۱۰۰ ،۵۰۰، ۱۰۰۰) به دست آمد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی جدایه قارچ *M. anisopliae* روی موریانه

به منظور انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی ۸ غلظت جدایه قارچ و نیز یک شاهد در نظر گرفته شد. مرگ و میر تجمعی به‌طور روزانه و به مدت ۱۰ روز ثبت شد.

پس از فراهم شدن سوسپانسیون ایزوله، اقدام به رقیق‌سازی و تهیه سری غلظت‌ها شد. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین غلظت‌های حداقل ($۱۰^{۱}$) و حداکثر ($۱۰^{۸}$)؛ ۸ غلظت لگاریتمی شامل غلظت‌های $۱۰^{۱}$، ۵×۱۰^{۱}، $۱۰^{۲}$،۵×۱۰^{۲} ، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۸}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه و آزمایش–های زیست‌سنجی با آن‌ها انجام شد.

زیست‌سنجی با استفاده از موریانه‌های کارگر با قرار دادن هر موریانه به‌طور جداگانه درون ظرف‌های پلاستیکی یک‌بار مصرف (به قطر ۵ سانتی‌متر وحاوی سوراخی روی درب برای تهویه)که از نظر رطوبت هر روز کنترل می‌شد انجام گردید. شاهد شامل محلول ۰/۰۵ درصدTween80 بدون اضافه نمودن اسپور قارچ بود. برای هر غلظت ۳۰ موریانه کارگر سالم هم اندازه منظور گردید. برای آلوده ساختن موریانه‌ها،از سوسپانسیون‌های تهیه شده استفاده گردید. برای انجام روش غوطه‌ورسازی مطابق روش Butt & Goettel (2000) از قیف بوخنر استفاده شد.

به‌منظور انجام زیست‌سنجی از ۸ غلظت در محدوده ۲۵ الی ۷۵ درصد غلظت‌ها تعیین شد. برای هر غلظت ۳۰ عدد موریانه کارگرهم اندازه در نظر گرفته شد که این آزمایش‌های زیست‌سنجی سه بار در طول زمان تکرار گردید.۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مورد نظر که به‌وسیله هم‌زن خوب به هم زده شده بود، داخل لوله استریل ریخته و برای تلقیح، هر گروه ۱۰ تایی از موریانه‌ها روی کاغذ صافی ۱۰ سانتی‌متری در قیف بوخنر قرار داده شد. سپس از هر غلظت ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون روی موریانه‌ها ریخته و بعد از ۵ ثانیه کاغذ صافی را روی دستمال کاغذی قرار داده شد تا سوسپانسیون اضافی جذب دستمال کاغذی گردد و محلول اضافی از طریق پمپ مکش دستگاه تخلیه شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی مخلوط جدایه قارچ *M. anisopliae* و پیری پروکسی فن

حشره‌کش سازگار با قارچ بیمارگر حشرات پیری پروکسی فن بود که به‌صورت مخلوط با قارچ در این مرحله مورد آزمایش قرار گرفتند(Rashid et al., 2010). برای انجام این آزمایش سه غلظت از قارچ *M. anisopliae* که شامل LC_{50} ($۱۰^{۳}$ اسپور در میلی‌لیتر) (جدول۱) ودو غلظت کمتر از LC_{50} قارچ (۵×۱۰^{۱} و ۵×۱۰^{۲} اسپور در میلی‌لیتر)در نظر گرفته شد و مقدار LC_{15} پیری پروکسی فن (۰/ ۵ ppm) در لوله آزمایش با سوسپانسیون قارچ مخلوط گردید و برای آلوده ساختن موریانه‌ها از ترکیب سوسپانسیون‌های تهیه شده و حشره کش پیری پروکسی فن استفاده شد و شاهد شامل محلول ۰/۰۵ درصد Tween80 بدون اضافه نمون اسپور قارچ بود.

در این آزمایش از روش غوطه‌ورسازی همان گونه که قبلاً ذکر شد استفاده گردید که برای هر تکرار ۱۰ موریانه کارگر سالم هم سن و هم‌اندازه منظور شد. پس از آلوده شدن موریانه‌ها، یک عدد موریانه در هر ظرف پلاستیکی حاوی پنبه

مرطوب و دستمال کاغذی قرار داده شد و مرگ و میر آن ها به‌مدت ۱۰ روز ثبت گردید و درصد مرگ ومیر تجمعی محاسبه و توسط فرمول ابوت اصلاح گردید.

در صد مرگ و میر بدست آمده با در صد مرگ میر مورد انتظار حاصل از مخلوط قارچ بیمارگر و حشره کش تعیین و با آزمون χ^2 طبق فرمول زیر اثر افزایشی (additive) مخلوط دو عامل محاسبه شد.

$$E=O_{Pyriproxyfen}+O_{Metarhizium}\ (1_\ O_{Pyriproxyfen})$$
$$\chi^2 = \{\ (O\ _\ E)^2\ \}/E.$$

E: در صد تلفات مورد انتظار مربوط به مخلوط ppm ۵ /۰ حشره کش پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisoplia*

$O_{Pyriproxyfen}$: در صد تلفات مربوط به حشره کش پیری پروکسی فن

$O_{Metarhizium}$: در صد تلفات مربوط به قارچ *M. anisoplia*

O : در صد تلفات مشاهده شده مربوط به مخلوط ppm ۵ /۰ حشره کش پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisopliae* (Trisyono and Whalon, 1999; Hummelbrunner and Isman, 2001).

نتایج

زیست‌سنجی حشره کش‌ها روی موریانه *A. vilis*

نتایج حاصل ازمرگ و میر تجمعی در طی ده روز نشان داد که حداکثر مرگ و میر ایجاد شده توسط حشره کش پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisopliae* در روز دهم مشاهده گردید.(نمودار ۱و ۲).مقدار LC_{50} پیری پروکسی فن، ppm ۹/۵۶ و مقدار LC_{50} قارچ $۸/۵\times۱۰^{۳}$ اسپور بر میلی‌لیتر محاسبه گردید(جدول ۱).

زیست‌سنجی مخلوط جدایه (DEM001) قارچ *M. anisopliae* وحشره کش پیری پروکسی فن

برای تعیین دامنه کشندگی مخلوط قارچ *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن سه غلظت قارچ با یک غلظت زیر کشندگی حشره کش (Batista Filho *et al*., 2001) ترکیب گردید. طبق فرمول اثر افزایشی دو عامل باهم در طی روزهای سوم ،پنجم ،هفتم و دهم در جداول ۲، ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است.

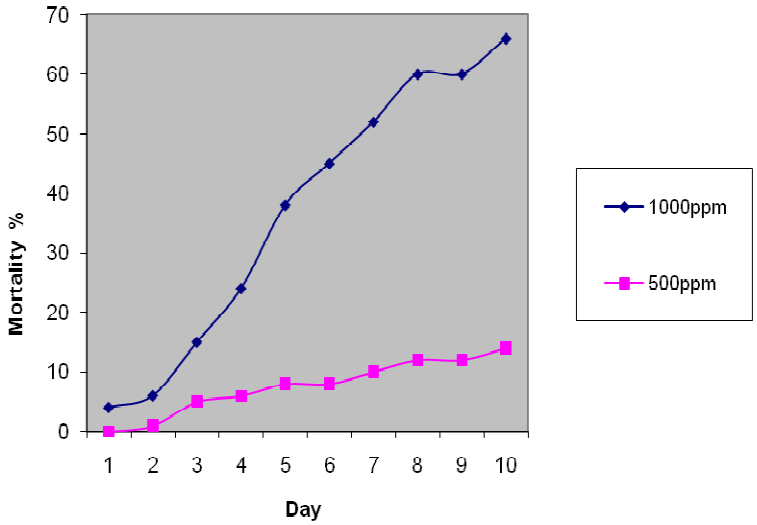
براساس فرمول افزایشی تست χ^2 انجام شد که نشان داد تأثیر قارچ *M. anisopliae* با حشره کش مذکور حالت افزایشی دارد. طبق جدول χ^2، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح خطا ۵٪ برابر با ۷/۸۲ بود و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در مدل افزایشی صدق می کند و حالت افزایشی دارد (جداول ۲، ۳، ۴ و۵).

قارچ‌های بیمارگر حشرات مهم‌ترین عامل کنترل کننده بسیاری از حشرات آفت می‌باشد (Carruthers & Hural, 1990). در سال‌های اخیر برای کنترل جمعیت موریانه‌ها از دشمنان طبیعی مانند شکارگرها، پارازیتوئیدها و پاتوژن‌ها استفاده می‌شود (Culliney & Grace, 2000). قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله دشمنان طبیعی موثر در کنترل بیولوژیک موریانه‌ها می‌باشند (Grace,1997).

جدول۱– حشره‌کش‌های آزمایشی روی موریانه *A. vilis*

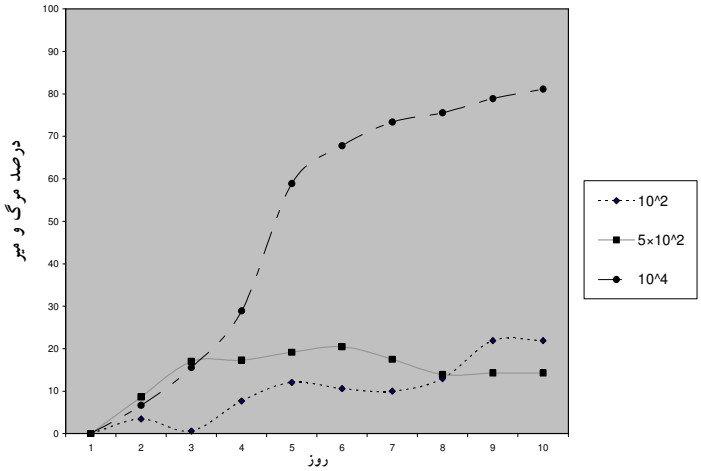
Table 1- LC_{50} values of pyriproxyfen and *M. anisopliae* against *Amitermes vilis*

Insecticide	No. tested insects	No. concentrations	Slope (±SE)	LC_{50} (95% CI) (ppm)	X^2	Probability
pyriproxyfen	150*3	5	0.57±0.11	9.56 (3.89-24.36)	1.53	0.67
M. anisopliae	210*3	7	1.10±0.25	8.5×10^3 (4×10^3 -2×10^4)	1.76	0.88



شکل۱- روز – مرگ و میر حشره‌کش پیری پروکسی فن در مدت ۱۰روز بعد از تیمار

Fig.1 - Cumulative mortality percentage of *Amitermes vilis* during 10 days after treatment with pyriproxyfen



شکل۲- روز – مرگ و میر در جدایه (DEM001) قارچ *M. anisopliae*

Fig.2- Cumulative mortality percentage of *Amitermes vilis* during 10 days after treatment with *M. anisopliae* for

جدول۲- میزان درصد مرگ و میر موریانه‌های کارگر در غلظت‌های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن (۰/ ۵ppm) در روز سوم

Table 2- mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen(0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 3th day after treatment

Concentration Fungus (spores mL^{-1})	Concentration pyriproxyfen (ai, ppm)	mortality % fungus ($O_{Metarhizium}$)	mortality % pyriproxyfen $O_{Pyriproxyfen}$	Expected mortality % in mixture(E)	Observated mortality % in mixture(O)	χ^2 a
5×10^1	0.5	10 ± 0.08	8.33 ± 0.02	17.5	5 ± 0.08	3.95×10^{-7}
5×10^2	0.5	13.33 ± 0.08	8.33 ± 0.02	20.55	16.66 ± 0.08	10^{-6} $4.26\times$
10^3	0.5	16.66 ± 0.06	8.33 ± 0.02	23.61	13.33 ± 0.06	$4.\times10^{-7}$ 61

a χ^2: طبق جدول χ^2، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۵٪ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 a محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی (Trisyono &Whalon,1999;Hummelbrunner & Isman,2001) صدق می‌کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

جدول۳- میزان درصد مرگ و میر موریانه‌های کارگر در غلظت‌های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن(۰/۵ ppm) در روز پنجم

Table 3- mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen(0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 5th day after treatment

Concentration Fungus (spores mL^{-1})	*Concentration pyriproxyfen (ai, ppm)*	*mortality % fungus ($O_{Metarhizium}$)*	*mortality % pyriproxyfen $O_{Pyriproxyfen}$*	*Expected mortality % In mixture(E)*	*Observated mortality % In mixture(O)*	χ^2 [a]
5×10^1	0.5	25 ± 0.16	12.5 ± 0.03	34.37	10 ± 0.16	5.14×10^{-12}
5×10^2	0.5	23.33 ± 0.06	12.5 ± 0.03	32.91	23.33 ± 0.06	0.2×10^{-8}
10^3	0.5	43.33 ± 0.06	12.5 ± 0.03	50.41	36.66 ± 0.06	5.14×10^{-5}

[a] χ^2: طبق جدول χ^2، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۵٪ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی(Trisyono &Whalon,1999;Hummelbrunner & Isman,2001) صدق می‌کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

جدول۴- میزان درصد مرگ و میر موریانه در غلظت‌های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن(۰/۵ ppm) در روز هفتم

Table 4- mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen(0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 7th day after treatment.

Concentration Fungus (spores mL^{-1})	*Concentration pyriproxyfen (ai, ppm)*	*mortality % fungus ($O_{Metarhizium}$)*	*mortality % pyriproxyfen $O_{Pyriproxyfen}$*	*Expected mortality % In mixture(E)*	*Observated mortality % In mixture(O)*	χ^2 [a]
5×10^1	0.5	35 ± 0.18	20.83 ± 0.05	48.54	15 ± 0.18	5.64×10^{-16}
5×10^2	0.5	40 ± 0.03	20.83 ± 0.05	52.50	23.33 ± 0.03	1.34×10^{-15}
10^3	0.5	56.66 ± 0.10	20.83 ± 0.05	65.69	50 ± 0.10	0.4×10^{-7}

[a] χ^2: طبق جدول χ^2، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۵٪ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی(Trisyono &Whalon,1999;Hummelbrunner & Isman,2001) صدق می‌کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

جدول۵- میزان درصد مرگ و میر موریانه در غلظت‌های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن(۰/۵ ppm) در روز دهم

Table 5- mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen(0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 10 th day after treatment

Concentration Fungus (spores mL^{-1})	*Concentration pyriproxyfen (ai, ppm)*	*mortality % fungus ($O_{Metarhizium}$)*	*mortality % pyriproxyfen $O_{Pyriproxyfen}$*	*Expected mortality % In mixture(E)*	*Observated mortality % In mixture(O)*	χ^2 [a]
5×10^1	0.5	50 ± 0.17	30 ± 0.02	65	20 ± 0.17	1.08×10^{-21}
5×10^2	0.5	60 ± 0.05	30 ± 0.02	72	40 ± 0.05	2.20×10^{-12}
10^3	0.5	70 ± 0.12	30 ± 0.02	79	56.66 ± 0.12	3.71×10^{-7}

[a] χ^2: طبق جدول χ^2، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۵٪ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی(Trisyono &Whalon,1999;Hummelbrunner & Isman,2001) صدق می کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

بحث

در این تحقیق غلظت‌های بالای قارچ (10^6 و 10^8 اسپور بر میلی‌لیتر) ۱۰۰درصد تلفات در مدت زمان ۴۸ ساعت ایجاد کردند ولی غلظت 10^3 اسپور بر میلی‌لیتر در روز دهم تا ۷۰درصد تلفات ایجاد کرد.

در تحقیق خود تحت عنوان اثرات کنترل کننده بیولوژیک قارچ *M. anisopliae* روی موریانه *Microcerotermes gabrielis* موفق به کنترل این آفت در آزمایشگاه شد و به این نتیجه رسید که این قارچ می‌تواند اثر بیمارگری بالایی در موریانه‌ها با تلقیح مستقیم موریانه‌ها به روش غوطه‌ور شدن در آزمایشگاه داشته باشد(Rahimzadeh,2006) .

LC_{50} جدایه سراوان (DEM001) قارچ *M. anisopliae* روی موریانه *M. gabrielis* $۰/۷۹\times10^2$ اسپور بر میلی‌لیتر بود (Rahimzadeh,2006)در حالی‌که LC_{50} این جدایه در روی موریانه *A. vilis* $۸/۵\times10^3$ اسپور بر میلی‌لیتر بود که نشان می‌دهد موریانه *M. gabrielis* نسبت به این قارچ حساس‌تر می‌باشد.

در یک تحقیقی حشره کش‌هایی که به تدریج اثر می‌کنند (مانند حشره‌کش‌های تنظیم کننده رشد حشرات) ۹۰ درصد موریانه‌هایی که در معرض آن‌ها قرار گرفته بودند را در مدت ۱۴ روز از بین بردند (Su *et al*., 1987).

تاخیر در اثر کشندگی آفت کش‌ها باعث می‌شوند که کارگرها فرصت حرکت داشته باشند و فعالیت‌های اجتماعی مثل تغذیه دهان به دهان و غیره را انجام دهند (Soeprono &Rust ,2004). سیستم طعمه‌گذاری با از بین بردن طبقه کارگر باعث می‌شود که کلنی موریانه‌ها نابود شود، زیرا با حذف طبقه کارگر، کلنی موریانه‌ها به علت گرسنگی از بین می‌روند. در سیستم طعمه‌گذاری از ترکیبات ممانعت کننده سنتز کیتین مانند هگزافلومورون و دیفلوبنزورون و از آفت کش‌های گوارشی مانند سولفورآمید و سدیم بورات و از ترکیبات شبه هورمون جوانی مانند فنوکسی کارب استفاده می‌شود (Ghayourfar, 2005). مصرف طعمه مسموم نسبت به محلول‌پاشی برای کنترل موریانه ایمن‌تر و سازگارتر به محیط می‌باشد (Pearce, 1997). در این تحقیق از ترکیبات شبه هورمون جوانی مانند پیری پروکسی فن که در سیستم طعمه‌گذاری مؤثر می‌باشد و آلودگی محیط زیست کمتری ایجاد می‌کند استفاده شد.

یکی از مواد شیمیایی تنظیم کننده رشد حشرات که در سیستم طعمه‌گذاری مورد استفاده قرار می‌گیرد،آنالوگ‌های هورمون جوانی[1] می‌باشد که خاصیت دور کنندگی ندارند. مکانیسم عمل آنالوگ‌های هورمون جوانی جلوگیری از تمایزیابی طبقات موریانه[2] می‌باشد. زیرا تمایزیابی طبقات کارگر، سرباز و جنسی در داخل کلنی موریانه‌ها توسط میزان ترشح هورمون جوانی تنظیم می‌گردد(Noirot, 1970). در این تحقیق روی اثر کشندگی پیری پروکسی فن روی کارگرهای موریانه در آزمایشگاه بررسی شد ولی روی تمایز یابی طبقات موریانه بررسی انجام نگرفت.

Delgado *et al.* (1999) تاثیر قارچ *B. bassiana* به تنهایی و حشره کش دیفلوبنزورن به همراه جدایه قارچ را روی ملخ بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد ۱۴ روز پس از تیمار افراد جمعیت مورد مطالعه، تیمار جدایه قارچ به تنهایی ۳۸٪ مرگ و میر، تیمار آفت کش به تنهایی ۲۹/۴٪ مرگ و میر و تیمار دیفلوبنزرون به همراه قارچ توانست ۵۵/۲٪ تلفات در جمعیت ملخ ایجاد کند، و این نشان از اثر افزایشی[3] تلفیق دو عامل است. ولی در آزمایش ما درصد مرگ و میر قارچ *M. anisopliae* در 10^3 اسپور بر میلی‌لیتر در روی موریانه *A. vilis* در روزهای ۳ ، ۵، ۷ و۱۰به ترتیب ۱۶/۶۶، ۴۳/۳۳، ۵۶/۶۶، و ۷۰ درصد بود و درصد مرگ و میر پیری پروکسی فن ppm ۸/۳۳، ۱۲/۵، ۲۰/۸۳ و۳۰ درصد بود در حالی‌که ترکیب پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisopliae* ۱۳/۳۳، ۳۶/۶۶، ۵۰ و ۵۶/۶۶ درصد تلفات ایجاد کرد. بنابراین تأثیر

[1]. Juvenoids
[2]. Caste differentiation
[3]. Additive

کشندگی قارچ *M. anisopliae* به تنهایی روی موریانه در طی ۱۰ روز بیشتر از ترکیب قارچ *M. anisopliae* و پیری پروکسی فن می‌باشد که برخلاف نتایج Delgado *et al.* (1999) می‌باشد. در کلنی موریانه‌ها به دلیل این که پیری پروکسی فن در طولانی مدت اثر کرده به مرور زمان ترکیب قارچ و پیری پروکسی فن مؤثرتر خواهد بود و از طرفی با افزایش آلودگی به قارچ در بین کلنی موریانه‌ها میزان مرگ میر بیشتر خواهد شد.

در رابطه با اثر متقابل کاربرد دو آفت کش به صورت مخلوط اثر افزایشی (جمع پذیری هر یک از عامل‌ها)، آنتاگونیستی و سینرژیستی ممکن است اتفاق بیافتد که برای آن ها فرمول‌های زیادی ارائه شده است که مورد قبول بیولوژیست‌ها نمی‌باشد و تنها یک فرمول افزایشی مورد قبول واقع شده است که اگر داده‌ها در این فرمول صدق کند اثر افزایشی وجود دارد و اگر تلفات مشاهده شده از تلفات مورد انتظار بیشتر باشد اثر سینرژیستی وجود دارد و اگر خیلی کمتر باشد اثر آنتاگونیستی وجود دارد که داده‌های ما در این فرمول صدق کرده و اثر افزایشی وجود داشت.

نتایج نشان داد با پایین بودن χ^2 احتمال و جود اثر آنتاگونیستی بین قارچ و حشره کش وجود ندارد و می‌توان این دوعامل را با هم به کاربرد (جداول ۲، ۳، ۴ و ۵). ارزیابی زیست‌سنجی قارچ *M. anisopliae* به تنهایی و حشره کش پیری پروکسی فن به تنهایی و مخلوط قارچ و حشره کش پیری پروکسی فن روی موریانه در روز دهم نشان داد که در طولانی مدت ممکن است مخلوط آن ها مؤثرتر باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای مهندس علیرضا رحیم‌زاده جهت جمع آوری موریانه‌های زیرزمینی از آثار باستانی مسجد جامع ساوه قدردانی می‌شود.

References

Batista Filho, A., Almeid, J .E. M. and Lamas, C. 2001. Crop protection effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. Neotropical Entomology 30, 437-447.

Butt, T. M. and Goettel, M. S. 2000. In: Navon, A. and Ascher, K.R.S. (eds) Bioassay of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International, Walling ford, UK, pp.141-195.

Carruthers, R. I. and Hural, K. 1990 .Fungi as naturally occurring entomopathogens. UCLA Symposium of Molecular Cell Biology.(USA) 112:115-138.

Culliney, T. W. and Grace, J. K. 2000. Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. Bulletin of Entomological Research 90, 9–21.

Delgado, F. x., Britton, J. H., Onsey, J. A. & Swearingen, w. 1999. Field Assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with Diflubenzuron for control of savanna Grasshopper complex (Orthoptera) in Mail. Invertebrate Pathology 73,34-9.

Fuchs, A., Schreyer, A., Feuerbach, S. and Korb, J. 2004. A new technique for termite monitoring using computer tomography and endoscopy. International Pest Management, No .50(1): 63-66.

Ghayourfar, R.2005. Termites of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection.Nashre Amozesh Keshvarzi Press, Karaj, Iran.

Grace, J. K. 1997. Biological control strategies for suppression of termites. Agricultural Entomology 14, 281-289.

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

Hummelbrunner, L. A. and Isman, M. B. 2001.Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobaccocutworm,*Spodoptera litura*(Lep.,Noctuidae). Agricultural and Food Chemistry 49,715-720.

Kramm, K. R., West, D. F. and Rockenbach, P. G. 1982. Termite pathogens: Transfer of the entomopathogen, *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. Invertebrate Pathology 40 ,1-6.

Mahr Cloyd, S. E., Maher, R. A. and Sadof, C. S. 2001. Biological control of insects and other pest of Green house crop.University of wisconsim, 99p.

Milner, R. J. 1992. Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. PP.200-207. In: Biological Control and Grasshoppers. (eds. Lomer, C. J. and Prior, C.) CAB International in associated with International Institute of Tropical Agriculture.

Milner, R. J., Staples, J. A. and Luttoon, G. G. 1998. The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae* for control of termites in Australia. Biological Control 11, 240-247.

Noirot, Ch. 1970. Formation of castes in higher termites, in K. Krishna and F. Weesner, eds. Biology of termites, vol 1. Academic press, New York, 311-350.

Pearce, M. J. 1997. Termites Biology and Pest Management. CAB International.

Rahimzadeh, A. R. 2005. A survey on the control effects of *Metarhizium anisopliae* on the *Microcerotermes gabrielis* termite in the laboratory. A thesis presented for master of science degree in medical entomology and vectors control.138pp

Ramakrishnan, R., Suiter, D. R., Nakatsu, C. H., Humber, R. A. and Bennett, G.W. 1999.Imidacloprid-enhanced *Reticulitermes flavipes* Shiaki, (Isoptera:Rhinotermitidae) susceptibility to the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Economic Entomology 92(5),1125-1132.

Rashid, M., Baghdadi, A., Sheikhi, A., Pourian, H. R. and Ghazavi, M. 2010. Compatibility of *Metarhizium anisopliae*(Ascomycota:Hypocreales) with several insecticides. Plant Protection 50(1), 23-27.

Soeprono, A. M. and Rust, M. K. 2004. Effect of delayed toxicity of chemical barriers to control Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). Economic Entomology 97, 2021-2028.

Su, N. Y., Tamashiro, M. and Haverty, M. I. 1987. Characterization of slow-acting insecticides for remedial control of the *Formosan subterranean* termite (Isoptera: Rhinotermitidae). Economic Entomology 80, 1-4.

Su, N. Y. 1991. Evaluation of bait-toxicants for suppression of subterranean termite populations. Sociobiology. 19, 211-220.

Trisyono, A. and Whalon, M. E. 1999. Toxicityof neem applied alone and in combinations with *Bacillus thuringiensis* to *Colorado potato* beetle (Coleoptera:Chrysomelidae). Economic Entomology 92,1281-1288.

Vilicinskas, A., Matha, V. and Gotz, p. 1997. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from wax moth, *Galleria mellonella*. Insect physiology 43(12),1149-1159.

Zoberi, M. 1995. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes (*Isoptera: Rhinotermitidae). Mycologia 87, 354-359.

Zoberi, M. H. and Grace, J. K. 1990. Isolation of the pathogen *Beauveria bassiana* from *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology16, 289-296.

Journal of Entomological Research

Volume 6, Issue 1, pages: 13-25

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
www.entomologicalresearch.ir

The effect of simultaneous application of pyriproxyfen and The entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) on The subterranean termite *Amitermes vilis* (Hagen) under Laboratory conditions

***M. Rashid*[*1], *A. Baghdadi*[2], *A. Shaykhi garjan*[3], *M. Ghazavi*[3]**

1- Plant Protection Department, Aboureihan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Agricultural Science, Payame Noor University, PO Box 19395-3697, Tehran, Iran
3- Respectively Assistant professor and Associate professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

Termites are one of the most important insect pests in many countries of the world such as Iran. The use of Insect growth regulators (IGRs) together with entomopathogenic fungi is one of the strategies of IPM against these pests. In this study, The effect pyriproxyfen with *M. anisopliae* was assayed on worker termite of *Amitermes vilis*. In order to determine the LC_{50} of insecticides, bioassay tests were carried out on worker termites. The LC_{50} of *M. anisopliae* was 8.5×10^3 spores/ml and LC_{50} for pyriproxyfen was 9.56 mg/L. Three concentrations of entomopathogenic fungus including 5×10^1, 5×10^2 and 10^3 spores/ml were mixed with LC_{15} (0.5 ppm) of pyriproxyfen. The bioassay of the three mixtures on worker termites showed that *M. anisopliae* and pyriproxyfen had an additive interaction and the mixture of fungi concentrations with pyriproxyfen can be used for termite control.

Key words: Pyriproxyfen, *M. anisopliae*, Termite, Compatibility, Additive effect

* Corresponding author, E-mail: *m100.rashid@yahoo.com*
Received: 20 sep. 2012 - Accepted: 20 feb. 2013