فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد۶ ، شماره ۱، سال ۱۳۹۳، (۵۳-۶۵)

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

بررسی اثرات ضد تغذیه‌ای غلظت‌های زیرکشنده قارچ‌های *Beauveria bassiana* ،*Beauveria brongniartii* Saccardo،Balsamo و *Metarhizium anisopliae* Metsch روی لارو سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* Prell

مسعود لطیفیان[۱*] *و بهار راد*[۲]

۱- استادیار، موسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور
۲- موسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور

چکیده

در این پژوهش توانایی غلظت‌های زیر کشنده قارچ‌های *Beauveria bassiana*، *Beauveria brongniartii* و *Metarhizium anisopliae* در کاهش قدرت تغذیه لارو سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* و اثرات آن‌ها بر شاخص‌های هضم، جذب و دفع سیستم تغذیه مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ضمن محاسبه غلظت‌های زیر کشنده کاهش دهنده توانایی تغذیه (EC_{50} وEC_{90})، شاخص‌های فیزیولوژیک، کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI)، کارایی تبدیل غذای هضم شده (ECD) و میانگین سرعت رشد نسبی (MRG) محاسبه گردیدند. نتایج نشان داد که جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae* به‌طور متفاوتی توانایی بالایی در کاهش توانایی تغذیه لارو سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* دارند. به طوری‌که قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* به ترتیب با EC_{50} معادل $۴/۲۷\times۱۰^{۴}$ و $۷/۹۵\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر دارای بالاترین و پایین‌ترین توانایی ضد تغذیه‌ای لارو بودند. بین میانگین عوامل فیزیولوژیک تغذیه در تیمارهای گونه قارچ‌های بیمارگر، غلظت کاربردی آن‌ها و همچنین اثرات متقابل آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. به طوری که در هر سه گونه قارچ‌های بیمارگر با افزایش غلظت اسپور قارچ، مقادیر شاخص‌های MRG، ECI و ECD کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضد تغذیه‌ای، قارچ‌های بیمارگر، *Oryctes elegans*

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *masoud_latifian@yahoo.com*
تاریخ دریافت مقاله (۹۱/۶/۱۳) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۲/۱/۲۸)

مقدمه

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) یکی از مهم‌ترین درختان میوه ایران است. این درخت مورد حمله آفات متعددی قرار می‌گیرد (Al- Bahely, 2004، Al – Beker, 1972 و Zaid, 2002). یکی از مهم‌ترین آفات نخل خرما در بسیاری از مناطق خرماخیز جهان و ایران سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* Prell است (Hussain, 1974 ،Dhiab *et al*., 1979). عوامل کنترل کننده بیولوژیک متعددی در شرایط طبیعی روی جمعیت گونه‌های مختلف سوسک‌های جنس *Oryctes* فعال می‌باشند. در میان عوامل بیولوژیک، قارچ‌های بیمارگر متنوعی از جمله *Cordyceps sp*، *Metarhizium anisopliae* Metsch، *Beauveria bassiana* Balsamo، *Beauveria tenella* Sacc، *Beauveria brongniartii* Saccardo ، *Plaecilomyces fumosoroseus* Apopka و *Spicaria rileyi* Farlow روی جمعیت گونه‌های مختلف سوسک‌های جنس *Oryctes* گزارش شده‌اند (Sundara *et al*., Prior and Arura, 1985 ; 1983). در ایران قارچ *M. anisopliae* از حشرات کامل و *B. bassiana* از شفیره‌های سرخرطومی حنایی خرما Olivier *Rhynchophorus ferrugineus* جداسازی شده‌اند.(Ghazavi & Avand-Faghih, 2002).

جنبه‌ای از کارآیی عوامل بیمارگر حشرات که تقریباً همیشه از نظر دور می‌ماند، تأثیرات غلظت زیرکشنده[1] بیمارگر است. در غلظت زیر کشنده حشره نمی‌میرد، ولی جنبه‌های مختلفی از فیزیولوژی آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد. برای مثال ممکن است تغذیه حشره کاهش یافته یا باروری آن نقصان یابد که این خود می‌تواند خسارت آفت را کاهش دهد. این مسئله در مورد ملخ *Zonocerus variegatus* Batko آلوده شده با قارچ *M anisopliae* var *acridum* Gams & Rozsypal در آفریقا (Fragues *et al*.,1994) و ملخ *Rhamatocerus schistocercoides* Rehn در برزیل نیز مشاهده گردیده است (Faira *et al*., 1999). ملخ قهوه‌ای *Locustana pardalina* Walker پس از آلودگی به *M. anisopliae* var *acridum* با سهولت بیش‌تری توسط دشمنان طبیعی شکار می‌شود (Aruthurs & Thomas, 1998).

تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توانند از طریق آسیب‌های مکانیکی ناشی از رشد میسلیوم در بدن آن‌ها، مصرف مواد غذایی مورد نیاز و ترشح توکسین، رشد بدن میزبان‌شان را تحت تأثیر قرار دهند (Boucias, *et al*., 1995، Charnley, 1992 و Iwana & Ashida. 1986). به‌عنوان مثال مطالعات انجام شده بر روی سوسک ذرت به نام *Diabrotica virgifera* LeConte نشان داده است که استرس‌های فیزیولوژیکی ناشی از کاربرد غلظت‌های زیر کشندگی قارچ *B. bassiana* بر روی حشرات‌کامل، قدرت بقاء و رشد وزنی بدن را کاهش می‌دهند (Mulock & Chand, 2001).

حشرات از سه راه در معرض متابولیت‌های قارچی قرار می‌گیرند. این را ها عبارت از دستگاه گوارش، تماس با کوتیکول و تولید زهرابه درون هموسل. حشرات هنگام تغذیه در طبیعت از دو راه اول در معرض زهرابه‌های قارچی که توسط قارچ‌ها در حالت ساپروفیتی روی محیط غذایی آن‌ها تولید شده است قرار می‌گیرند (Roberts, 1981) .مجرای غذایی حشرات عموماً مکان مناسبی برای رشد و نمو قارچ‌ها نمی‌باشد. علی‌رغم این که روده پیشین و پسین دارای پوشش کوتیکولی هستند و این کوتیکول در مناطق وسیعی اسکلروتیزه نشده و از اسکلریت‌های خارجی نسبت به آنزیم‌های بیمارگر حساس‌تر هستند، نفوذ قارچ از این مکان‌ها به ندرت اتفاق می‌افتد. تصور عمومی بر این است که وجود شرایط بی‌هوازی، آنزیم‌های گوارشی، pH نامناسب، سرعت عبور غذا از مجرای گوارشی و غشاهای دور غذایی از

[1] Sublethal

مهم‌ترین موانع در آلودگی به بیماری‌های قارچی از طریق دستگاه گوارش هستند. در مورد ملخ صحرایی گروهی از فنل‌های ضد قارچی توسط فلور باکتریایی روده پسین تولید می‌شوند که در هنگام گرسنگی که حرکات دودی روده وجود نداشته و غذا از دستگاه گوارش عبور نمی‌کند، حشره را درمقابل بیماری قارچی حفظ می‌نمایند. فنل‌های ضد قارچ مشابه در دیگر حشرات نیز مشاهده شده اند (Dillon and Charnley, 1991).

با توجه به اهمیت این موضوع در این پژوهش ضمن تعیین غلظت‌های زیر کشنده قارچ‌های *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae* روی کاهش توانایی تغذیه لارو سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*، اثرات آن‌ها بر شاخص‌های هضم، جذب و دفع سیستم تغذیه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره میزبان

حشرات کامل اولیه سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* از نخلستان‌های آلوده اطراف آبادان جمع‌آوری گردیدند. این حشرات درون ظروف پلاستیکی مخصوص به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۷ سانتی‌متر که حاوی ۴۰۰ گرم بافت مریستم انتهایی پاجوش خرما به عنوان منبع تغذیه بود به آزمایشگاه منتقل شدند. برای پرورش حشرات در شرایط آزمایشگاه نیز از ظروف مشابه استفاده شد. به این ترتیب که هر جفت سوسک نر و ماده درون یک ظرف حاوی ۴۰۰ گرم بافت مریستم انتهایی پاجوش خرما به عنوان منبع تغذیه و محل تخم‌گذاری بود، منتقل می‌شدند. ظروف درون انکوباتور در درجه حرارت ۵±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت‌نسبی ۵±۷۵ درصد نگهداری شدند. تخم‌های آفت به صورت روزانه از طریق خرد کردن بافت مریستم جداسازی شده و به ظروف مشابه جدید منتقل شدند تا لاروها ظاهر گردند.

کشت جدایه‌های قارچی

جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر مورد استفاده در این تحقیق از طریق موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شدند. پس از خالص‌سازی، جدایه‌های قارچ مورد نظر در محیط غذایی SDAY[1] کشت شد. برای تهیه محیط کشت SDAY از ترکیب آگار ۱۵ گرم، دکستروز ۲۰ گرم، باکتوپپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم و آب مقطر به میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد. پس از حل کردن مواد درون ارلن و به وسیله همزن الکتریکی حرارتی، ارلن‌های حاوی محیط کشت جهت ضدعفونی به دستگاه اتوکلاو با فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه منتقل شدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۴-۱۲ روزه) سطح محیط کشت با سوزن انتقال خراش داده شد و اسپورها در داخل ارلن‌هایی که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰[2] بود جمع‌آوری شد. سوسپانسیون فوق به مدت ۵ دقیقه به‌طور پاندولی به هم زده شد. سپس سوسپانسیون حاصل از پارچه ململ دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسیلیوم از آن جدا شدند. برای جدا شدن اسپورها از هم و عدم تشکیل زنجیر در هنگام شمارش، درون لوله‌های حاوی سوسپانسیون قارچ، مهره‌های شیشه‌ای ریخته و برای چند دقیقه به شدت تکان داده شد. جهت شمارش اسپورها و تهیه تراکم‌های مختلف اسپور در واحد حجم از لام گلبول شمار[3] استفاده شد. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپورها روز قبل از آزمایش ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 5×10^{6} اسپور در میلی‌لیتر از جدایه‌های قارچ روی محیط کشت SDA داخل تشتک

1 -Suberbed Dextrose Agar + Yeast extract
2- Tween 80
3 - Improved Neubar

پتری به صورت یک لایه نازک پوشش داده شد. درب تشتک پتری با پارافیلم بسته و تشتک‌های پتری در دمای ۲±۲۶ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شدند. ۱۵–۱۸ ساعت پس از تلقیح یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۰۵ درصد به‌منظور توقف جوانه زنی اسپورها به داخل هر تشتک ریخته شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر تشتک پتری با بزرگ‌نمایی ۴۰X محاسبه شد (جدول ۱). روز بعد فقط از کشت‌هایی استفاده شد که بیش از ۸۵ درصد اسپورهای آن جوانه زده بودند (Ghazavi and Avand-Faghih, 2002).

جدول ۱- مشخصات قارچ‌های بیمارگر مورد آزمایش علیه سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*

Table 1-Specifications of fungal species used against *O. elegans*

Species	Isolate	Origin of isolate	Locality/Country	%Germination± SE
Beauveria bassiana	IRAN 441C	*Rhynchophorus ferrugineus*	Saravan, Iran	92.7±1.4
Beauveria brongniartii	DEB1 013	Soil	Varamin, Iran	95.2±1.6
Metarhizium anisopliae	DEMID 01	*Rhynchophorus ferrugineus*	Saravan, Iran	98.6±2.1

بررسی اثرات قارچ‌های بیمارگر بر تغذیه لارو

پنج غلظت لگاریتمی شامل 5×10^{3}، 5×10^{4}، 10^{4}، 5×10^{5} و 10^{5} اسپور در میلی‌لیتر از هر جدایه قارچ تهیه و آزمون‌های حیاتی با آن‌ها انجام شد. آزمایش‌ها در ۶ تیمار (غلظت‌های مختلف و شاهد) و ۴ تکرار انجام گرفت. برای هر تکرار ۲۰ عدد لارو استفاده شد. برای آلوده ساختن لاروها، آن‌ها را به مدت ۲۰ ثانیه درون سوسپانسیون اسپور فرو برده و پس از خروج درون انکوباتور با درجه حرارت ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت‌نسبی ۵±۸۵ درصد برای دو روز نگه‌داری شدند. برای اطمینان از این که کلیه حشرات یک تیمار غلظت‌های مشابهی دریافت نموده اند، برای هر لارو سوسپانسیون جداگانه‌ای تهیه شد. لاروهای آلوده شده برای روزهای بعد در رطوبت نسبی۴۰٪ و دوره روشنایی (۱۲L : ۲D) قرار گرفتند. لاروهای تیمار شاهد به مدت ۲۰ ثانیه درون محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ قرار داده شدند. لاروهای تیمار شده درون ظروف پلاستیکی مخصوص به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۷ سانتی‌متر منتقل شدند. درون هر کدام از ظروف ۱۰۰ گرم بافت مریستم انتهایی خرما (پنیرخرما) به عنوان منبع تغذیه قرار داده شد. بافت مریستم انتهایی قبلاً توسط کلرید سدیم یک درصد ضدعفونی و با آب مقطر استریل شستشو شده بود (Schroeder, 2004). وزن تر بافت مریستم تغذیه نشده پس از ۱۴ روز برآورد شد. سپس وزن خشک آن نیز از طریق قرار دادن درون آون[1] به مدت ۱۲۰ ساعت در درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد برآورد شد. وزن خشک ۴۰۰ گرم مریستم اولیه نیز قبلاً به همین روش محاسبه شده بود. تفاوت وزن خشک در ابتدا و انتهای دوره نشان دهنده میزان مصرف غذا توسط هر لارو بود. مواد دفعی هر لارو ازکف ظروف پرورش جمع‌آوری شده و با قرار دادن آن درون آون به مدت ۱۲۰ ساعت در درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد وزن آن‌ها محاسبه شد. میانگین وزن هر لارو در ابتدای آزمایشات و پس از ۱۴ روز که از طریق توزین با ترازوی دقیق با دقت ۰/۰۰۰۱ به طور جداگانه برآورد گردید (Schroeder, 2004).

برای نرمال کردن توزیع پراکنش، داده‌های درصد کاهش طبیعی تغذیه براساس روش آبوت تصحیح (Abbott, 1925) و سپس درصدها به $ASin\sqrt{x}$ تبدیل شدند (SAS Institute. 1990). میانگین غلظت ۵۰ و ۹۰ درصد کاهش تغذیه (EC_{50} و EC_{90}) با استفاده از رگرسیون لجستیک تخمین زده شدند (Gomez and Gomez 1984).

1 - Gallen Kamp مدل Sanyo OMT

محاسبه شاخص‌های فیزیولوژیکی تغذیه

در این پژوهش شاخص‌های فیزیولوژیک کارایی تبدیل غذای خورده شده[1]، کارایی تبدیل غذای هضم شده[2] و میانگین سرعت رشد نسبی[3] براساس روابط یک تا سه محاسبه گردیدند (Huang *et al.*, 1998).

رابطه ۱ ECI= (کارایی تبدیل غذای خورده شده) (B/I).100

رابطه ۲ ECD= (کارایی تبدیل غذای هضم شده) [B/(I-F)].100

رابطه ۳ MRG= (میانگین سرعت رشد نسبی) $[(F_w-I_W)/T]$

در این روابط I وزن کل غذای خورده شده به ازای هر لارو، B تفاوت وزن لارو در ابتدا و انتهای آزمایش، T مدت زمان آزمایش، F_w وزن لارو در انتهای آزمایش، I_w وزن لارو در ابتدای آزمایش و F وزن کل فضولات تولید شده توسط هر لارو می‌باشد.

میانگین تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیکی تغذیه محاسبه شده برای لاروهای سوسک شاخ‌دار خرما در شرایط شاهد و غلظت‌های مختلف جدایه قارچ‌های بیمارگر مورد آزمایش براساس روش SNK[4] در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند(Schroeder, 2004) .

نتایج

غلظت‌های زیر کشنده مؤثر قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae* بر کاهش توانایی تغذیه لارو سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* محاسبه شد که نتایج آن در جدول۲ منعکس شده است.

همان‌طور که در جدول ۲ ملاحظه می‌گردد، قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* *B. brongniartii* و *M. anisopliae* توانایی بالایی در کاهش توانایی تغذیه لارو سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* داشتند. توانایی قارچ‌های بیمارگر در کاهش توانایی تغذیه متفاوت بود. به طوری‌که قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* به ترتیب با EC_{50} معادل $۴/۲۷\times۱۰^{۴}$ و $۷/۹۵\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر دارای بالاترین و پایین‌ترین قدرت کاهش تغذیه لارو بودند.

جدول ۲-غلظت‌های زیرکشنده قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae* و اثر آن بر کاهش توانایی تغذیه لارو سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*

Table 2.-Sublethal concentration values of fungi *B. bassiana*,*B. brongniartii* and *M. anisopliae* and their effects on feeding reduction of *O. elegans* larvae

Fungi	EC_{50}(95% fiducial limits)	EC_{90}(95% fiducial limits)	Slope	χ^2-test
B. bassiana, IRAN 441C	7.95×10^4 (4.87×10^4-2.08×10^5)	1.12×10^6 (9.56×10^5-2.41×10^6)	5.61 ±1.5	52
B. brongniartii, DEB1 013	4.99×10^4 (3.12×10^4-2.04×10^5)	1.07×10^6 (2.89×10^5-2.84×10^6)	6.5 9±0.01	56
M. anisopliae, DEMID 01	4.27×10^4 (5.46×10^3-5.02×10^4)	1.29×10^5 (7.49×10^4-2.46×10^5)	6.35 ±0.02	39

Four replicates/treatment of 20 insects. bd.f. = 1.

[1] - Efficiency of conversion of inegested food (ECI)
[2] - Efficiency of digested food (ECD)
[3] - Mean Rate of growth (MRG)
[4] - Student–Newman–Keuls test

تاثیر نوع و غلظت جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر بر فیزیولوژی تغذیه لارو

تأثیر غلظت‌های زیرکشنده قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae* بر شاخص‌های فیزیولوژیک تغذیه لارو سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* شامل کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI)، کارایی تبدیل غذای هضم شده (ECD) و میانگین سرعت رشد نسبی (MRG) تجزیه واریانس گردید که نتایج آن در جدول ۳ درج شده است.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های زیرکشنده قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae* بر شاخص‌های تغذیه لارو

Table 3- Variance analysis of the effectd of entomopathogenic fungi *B. bassiana, B. brongniartii* and *M. anisopliae doses* on larval nutrition of indices

Source	Df	MS		
		MGR	ECI	ECD
Treatments	15	0.002**	49.303**	55.63**
Error	48	0.0001	0.016	0.001
CV		6.79	1.69	1.37

** significant difference at probability level of 1%

همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد بین میانگین عوامل فیزیولوژیک تغذیه شامل میانگین سرعت رشد نسبی (MRG)،کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI) و کارایی تبدیل غذای هضم شده (ECD) براساس نوع گونه قارچ و غلظت کاربردی آن‌ها تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. در ادامه به بررسی نحوه تأثیر نوع گونه و غلظت قارچ‌های بیمارگر بر شاخص‌های فیزیولوژیک تغذیه از طریق مقایسه تفاوت بین میانگین آن‌ها در تیمارهای مختلف پرداخته خواهد شد.

الف: میانگین سرعت رشد نسبی (MRG)

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع قارچ بیمارگر و غلظت‌های آن بر عامل میانگین سرعت رشد نسبی براساس روش SNK در جدول ۴ درج گردیده است. همان‌طور که در جدول ۴ ملاحظه می‌گردد، میانگین شاخص سرعت رشد نسبی در تیمار لارو با گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر و غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و شاهد نشان می‌دهد به طوری که کم‌ترین شاخص سرعت رشد نسبی در تیمارهای ۵×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر از قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *M. anisopliae* و *B. brongniartii* شده است. بین میانگین این شاخص در این غلظت برای سه قارچ مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کم‌ترین مقدار این شاخص در قارچ *M. anisopliae* و سپس به ترتیب در قارچ‌های *B. brongniartii* و *B. bassiana* ثبت گردید.

جدول ۴- مقایسه میانگین سرعت رشد نسبی لارو *O. elegans* تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae*

Table 4-Comparison of the mean Rate of growth of *O. elegans* larvae affected by different sub lethal doses of the entomopathogenic fungi *B. bassiana, B. brongniartii* and *M. anisopliae*

Fungal species	Concentration (conidia mL^{-1})	MRG(±SE)
Control	0	0.085±0.002a
B. bassiana	5.0×10^3	0.07± 0.002 b
	10^4	0.053±0.032 bcd
	5.0×10^4	0.035±0.002 cde
	10^5	0.028±0.0604 def
	5.0×10^5	0.011±0.006 f
B. brongniartii	5.0×10^3	0.058±0.003 bc
	10^4	0.047±0.002 cd
	5.0×10^4	0.024±0.002 ef
	10^5	0.017±0.003 ef
	5.0×10^5	0.009±0.003 f
M. anisopliae	5.0×10^3	0.053±0.007 cd
	10^4	0.038±0.008 cde
	5.0×10^4	0.025±0.005 def
	10^5	0.012±0.004 f
	5.0×10^5	0.011±0.004 f

ب: کارایی تبدیل غذای خورده شده (ECI)

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع قارچ بیمارگر و غلظت‌های آن بر عامل کارایی تبدیل غذای خورده شده براساس روش SNK در جدول ۵ درج گردیده است. همان‌طور که در جدول ۵ ملاحظه می‌گردد، میانگین شاخص کارایی تبدیل غذای خورده شده در تیمار لارو با گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر و غلظت‌های مختلف اسپور تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و شاهد نشان می‌دهد. به طوری‌که کم‌ترین کارایی تبدیل غذای خورده شده در تیمارهای 5×10^4 اسپور در میلی‌لیتراز قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *M. anisopliae* و *B. brongniartii* شده است. بین میانگین این شاخص در این غلظت برای سه قارچ مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به‌طوری که کم‌ترین مقدار این شاخص در قارچ *M. anisopliae* و سپس در قارچ‌های *B. brongniartii* و *B. bassiana* ثبت گردیدند.

جدول ۵- مقایسه میانگین کارایی تبدیل غذای خورده شده لارو *O. elegans* تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae*

Table 5-Comparison of the mean efficiency of conversion of ingested food of *O. elegans* larvae affected by different sub lethal doses of the entomopathogenic fungi *B. bassiana*, *B. brongniartii* and *M. anisopliae*

Fungal species	Concentration (conidia mL^{-1})	ECI (±SE)
Control	0	14.322 ±0.4a
B. bassiana	5.0×10^3	8.794±0.3 g
	10^4	7.333±0.2 i
	5.0×10^4	5.097±0.2 l
	10^5	3.571±0.1 n
	5.0×10^5	2.907±0.09 o
B. brongniartii	5.0×10^3	10.527±0.4 d
	10^4	9.208±0.3 f
	5.0×10^4	6.277±0.2 j
	10^5	5.702±0.3 k
	5.0×10^5	3.521±0.2 n
M. anisopliae	5.0×10^3	12.907±0.5 b
	10^4	11.874±0.6 c
	5.0×10^4	9.527±0.4 e
	10^5	8.518±0.5 h
	5.0×10^5	4.425±0.2 m

ج: کارایی تبدیل غذای هضم شده (ECD)

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع قارچ بیمارگر و غلظت‌های آن بر عامل کارایی تبدیل غذای هضم شده براساس روش SNK در جدول ۶ درج گردیده است. همان‌طور که در جدول ۶ ملاحظه می‌گردد، میانگین شاخص کارایی تبدیل غذای هضم شده در تیمار لارو با گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر در غلظت‌های مختلف و شاهد تفاوت معنی-دار نشان می‌دهد به طوری‌که

کم‌ترین کارایی تبدیل غذای هضم شده در تیمارهای ۵×۱۰^۴ از قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana*، *M. anisopliae* و *B. brongniartii* شده است. بین میانگین این شاخص در این غلظت برای سه قارچ مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد . کم‌ترین مقدار این شاخص در قارچ *B. bassiana* و سپس به ترتیب در قارچ‌های *B. brongniartii* و *M. anisopliae* ثبت گردید.

جدول ۶- مقایسه میانگین کارایی تبدیل غذای هضم شده لارو *O. elegans* تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* *B. brongniartii* و *M. anisopliae*

Table 6- Comparison of the mean efficiency of digested food of *O. elegans* larvae affected by different sub lethal doses of the entomopathogenic fungi *B. bassiana, B. brongniartii* and *M. anisopliae*

Fungal species	Concentration (conidia mL^{-1})	ECD (±SE)
Control	0	15.88±0. 1a
B. bassiana	5.0×10^3	8.941±0.3 g
	10^4	7.485±0.2 h
	5.0×10^4	5.358±0.1 l
	10^5	3.851±0.2 n
	5.0×10^5	3.188±0.2 o
B. brongniartii	5.0×10^3	10.754±0.4 e
	10^4	9.443±0.3 f
	5.0×10^4	6.383±0.2 i
	10^5	6.165±0.3 j
	5.0×10^5	4.582±0.2 m
M. anisopliae	5.0×10^3	13.188±0.6 b
	10^4	13.144±0.7 c
	5.0×10^4	11.006±0.6 d
	10^5	11.052±0.5 c
	5.0×10^5	6.062±0.2 k

بحث

نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داد که قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* به ترتیب با LC_{50} معادل $۵/۶۹\times۱۰^{۸}$ و $۱/۵۳\times۱۰^{۹}$ اسپور در میلی‌لیتر دارای بالاترین و پایین‌ترین قدرت کشندگی در روش غوطه‌ورسازی روی لارو سوسک شاخ‌دار خرما بوده است (پژوهش منتشر نشده نگارنده). اما مرگ حشرات توسط یک قارچ بیمارگر تنها به صورت مستقیم نبوده بلکه به عوامل متنوعی مانند مسمومیت، گرسنگی (خواه در اثر رقابت بین میزبان و قارچ برای مواد غذایی، خواه در اثر توقف تغذیه در حشره بیمار) و بالاخره تأثیر منفی عامل بیمارگر روی فیزیولوژی میزبان نسبت داده شده است (Charnley, 1992). افزایش قدرت کشندگی عوامل بیمارگر در قالب تولید یک عامل مؤثر کنترل بیولوژیک با بالا بردن نقش زهرابه‌ها مؤثر بر فیزیولوژی میزبان به وسیله انتخاب از موارد دیگر عملی‌تر است (Charnley, 1992). به توجه به اهمیت این موضوع در کنترل میکروبی کاربردی در این پژوهش نیز اثرات ضد تغذیه‌ای هر سه گونه بیمارگر *B. bassiana* *B. brongniartii* و *M. anisopliae* ثابت شد. به طوری که در این شرایط نیز قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* به ترتیب با EC_{50} معادل $۴/۲۷\times۱۰^{۴}$ و $۷/۹۵\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر دارای بالاترین و پایین‌ترین توانایی ضد تغذیه‌ای لارو بودند.

پژوهش‌های مشابه نشان داده‌اند که عوامل مختلفی در بروز واکنش‌های ضد تغذیه‌ای قارچ‌های بیمارگر حشرات مؤثرند. قارچ‌های جنس‌های *Entomophtora* و *Lagenidium* میزبان‌های حساس را با مصرف مواد غذایی موجود در هموسل آن‌ها می‌کشند و برای غلبه بر میزبان به زهرابه‌ها متکی نیستند. اما قارچ های ناقص که اغلب گونه‌های مهم قارچ‌های بیمارگری حشرات مانند *M. anisopliae* و *B. bassiana* را شامل می‌شوند از زهرابه‌های دارای وزن مولکولی پائین نیز جهت غلبه بر میزبان کمک می‌گیرند(Roberts, 1981). نتایج این تحقیق نیز نتایج مشابهی داشته است به طوری‌که قارچ *M. anisopliae* که دارای بالاترین قدرت کشندگی بوده است از حداکثر قدرت کاهش دهنده توانایی تغذیه برخوردار بوده است.

در این پژوهش نیز اثرات فیزیولوژیک ضد تغذیه‌ای هر سه گونه بیمارگر *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *M. anisopliae* ثابت گردید و مشخص شد که سه گونه قارچ‌های بیمارگر با افزایش غلظت اسپور قارچ شاخص‌های فیزیولوژیک MRG، ECI و ECD را کاهش می‌دهند. مقایسه شاخص‌های بدست آمده در سه قارچ نشان داد که قارچ *M. anisopliae* بیش‌ترین تأثیر را در کاهش شاخص‌های فیزیولوژیک تغذیه آفت داشته است. نتایج این پژوهش با تحقیقات مشابه در این مورد همخوانی دارد. پژوهش‌های مشابه نشان داده است که دستروکسین‌ها[1] که از دپسی پپتیدهای حلقوی هستند توسط قارچ *M. anisopliae* ترشح می‌گردند و مقدار ترشح آن‌ها به حدی است که بتوان آن را با ایجاد مسمومیت و زهرآگینی افتراقی جدایه‌های مختلف در مقابل برخی حشرات ارتباط داد. دستروکسین‌ها روی برخی از اندامک‌های سلولی (مانند میتوکندری‌ها، شبکه‌های اندوپلاسمیک و غشاهای هسته) اثر نموده و سلول ها را فلج می‌نمایند و باعث اختلال در عمل روده میانی، لوله‌های مالپیگی، سلول‌های خونی و بافت‌های عضلانی می‌گردند و در نهایت کارایی فیزیولوژی تغذیه میزبان را کاهش می‌دهند (Samuels *et al*., 1988).

از دیگر زهرابه‌های شناخته شده قارچ های بیمارگر حشرات که در کاهش کارایی فیزیولوژیک حشره میزبان مؤثرند می‌توان به لوسینواستاتین[2] و افراپپتین[3] اشاره کردکه پپتیدهای خطی که به ترتیب توسط قارچ‌هایی از جنس‌های *Paecilomyces* و *Tolypocladium* ترشح می‌شوند. هم‌چنین ترکیب سیتوکالازین[4] در قارچ *M. anisopliae* که سلول میزبان را فلج می‌نماید، نام برد. تجربیات نشان می‌دهد که تأثیر جدایه‌ها بر تغذیه و دستگاه گوارش بسته به گونه مورد آزمایش متفاوت می‌باشد و پایین بودن اثر یک جدایه هنگامی که به صورت خوراکی مصرف می‌شود نشانه اثر کم آن از طریق جلد نیست. یکی از دلایل این امر می‌تواند بی اثر شدن قسمت اعظم هاگ‌هایی که وارد دستگاه گوارش می‌شوند، باشد. زیرا فقط درصد کمی از آن‌ها که در چین‌های غشاء آترودیال[5] قطعات دهانی به دام می‌افتند قادر به نفوذ به بدن حشره هستند (Hajek & St. Leger, 1994). در این پژوهش نیز قارچ *M. anisopliae* اثرات ضد تغذیه‌ای بیشتری نسبت به قارچ‌های *B. bassiana*، و *B. brongniartii* نشان داد.

با شناسایی جنبه‌های مختلف این سیستم و اثرات فیزیولوژیک آلوده شدن حشرات به بیماری‌ها می‌توان از راه کارهای مناسب برای غلبه بر آفات استفاده نمود. برای مثال با شناسایی و تعیین خصوصیات زهرابه‌های قارچی که فیزیولوژی تغذیه حشره را مختل می‌نمایند. می‌توان از آن‌ها برای بالا بردن اثر جدایه‌های با زهرآگینی پائین استفاده نمود. به عنوان مثال ماده پلی‌وینیل پایرولیدون[6] می‌تواند فنل‌های ضد قارچ موجود در دستگاه گوارش حشرات را جذب نماید. بنابراین فرموله کردن هاگ‌های قارچ با PVP یا دیگر مواد مناسب می‌تواند تأثیر قارچ را از راه دستگاه گوارش را افزایش دهد(Jaronski and Goettel, 1997.).

[1] - Destrucins
[2] - Leucinostatin
[3] - Efrapeptin
[4] - Cytochalasin
[5] - Arthrodial
[6] - Poly venyl pyirolodon (PVP)

References

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18, 265–267.

Al- Bahely, A. Z. A. 2004. Study of biological and chemical control of date palm long horn stem borer.Jebusaea hammerscmidti Reiche (Cerambycidae: Coleoptera) M. Sc.Thesis. Coll.of Agric. Basra University. pp. 90.

Al– Beker, A. J. 1972. The date palm: A review of its past, present and recent advances in its culture industry and trade. Al- Watan Publ.Co.pp.1085.

Aruthurs, S. P. and Thomas, M. B. 1999. Factors affecting horizontal transmission of entomopathogenic fungi in locusts and grasshoppers. In: Thomas, M. B. and Kewards, T. (eds.) Challenges in Applied Population Biology. 53: 89-97**.**

Boucias, D. G. G. I., Pendla, J., Pendland. 1995. Comparative analysis of the in vivo and in vitro metabolites produced by the entomopathogen *Beauveria bassiana*. Canandian Journal of Botechnology. 73(1): 1092- 1 099.

Charnley, A. K. 1992. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts.In: Biological control of locusts and grasshoppers , Proceeding of a workshop held at International Institute of Tropical Agriculture Cotonou , Republic of Benin . eds. C. J. Lomer and C. Prior .CAB International UK.

Dhiab, I. M., Swayir, I. A. and Abdul-Hadi, I. 1979. Investigation on palm – stem borer *Pseudophilus testasceus* Gah. (Coleoptera: Cerambycidae). Yearbook of Plant Protection .2(1):1o3 – 112.

Dillon, R. J. and Charnley, A. K. 1991. The rate of fungal spores in the insect gut. In : Cole, G. T. and Hoch, H. C. (eds), The fungal spore and disease initiation in plants and animals, pp. 267-287 . Plenum Press, New York.

Faria, M. R.; Almeida, D.; Magalhaes, B. P.; de Faira, M. R. and de-O-Almeida. 1999. Food consumption of *Rhamatocercus schistocercoides* Rehn (Orthoptera: Acrididae) infected by fungus *Metarhizium anisopliae* Gams & Rozsypal. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil. 28: 91-99.

Fragues, J.; Delmas, J. C. and Le Brun, R. A. 1994. Leaf consumption by larvae of Colorado potatoe beetle (Coleoptera:Chrysomelidae) infected with the entomopathogen , *Beauveria bassiana* . In: Butt, T. M.; Jackson, C. and Magan, N. (eds.) Fungi as biocontrol agents, pp. 23-69. Progress, Problems and Potentials. CAB International, Wallingford UK.

Ghazavi, M. and Avand-Faghih, A. 2002. Isolation of two entomopathogenic fungi on red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Col., Curculionidae) in Iran. Appl. Entomol. Phytopathol. 9:44-45.

Gomez, K. A., Gomez, A. A. 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. 2nd end. New York, NY, USA: John Wiley and Sons. pp. 116–140.

Hajek, A. E. and R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology . 39 : 293-322. Roberts, D. W. 1981. Toxins of Entomopathogenic Fungi. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Ed. Burges, pp.441-464. London: Academic Press.

Hung, y. S. H. Ho. 1998. Toxicity and antifeedant activity of cinnamaldehyde against the grain storage insect, *Tribolium castaneum* and *Sitophilus zeamais*. Journal stored product research. 34: 11-17.

Hussein, A. A. 1974. Date palms and dates with their pests in Iraq. University of Baghdad. Ministry of High Education and Scientific Researches .Iraq, pp.166.

Iwana, R. and M. Ashida. 1986. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry. 16:547-555.

Jaronski, S. T and M. S., Goettel . 1997. Development of *Beauveria bassiana* for control of grasshoppers and locusts . Memoirs of the Entomolological Society of Canada 171: 225-237

Mulock, S. and L. D. Chand. 2001. Effect of *Beauveria bassiana* on the fecundity of Western corn Rootworm *Diabrotica vigrifera*. Biol. Control. 22: 16-21.

Prior, C. and Arura, M. 1985. The infectivity of *Metarhizium anisopliae* to two insect pests of coconuts. J. Invertebr. Pathol. 45:187-194.

Roberts, D. W. 1981. Toxins of Entomopathogenic Fungi. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Ed. Burges, pp.441-464. London: Academic Press.

SAS Institute. 1990. SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. SAS Institute (1999–2001) SAS/STAT User's Guide, Version 8.01. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.

Schroeder, J. W. 2004. Quality forage – storage, sampling and measuring. NDSU Extension Service Circular AS-1255.

Samuels, R. I.; Charnley, A. K. and Reynolds, S. E. 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobbaco horn worm, *Manduca sexta*. Mycopathologia 104: 51- 58.

Sundara, B. P. C., Balasubramanian, M. and Jayaraj, S. 1983. Studies on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. major in *Oryctes rhinocerous*. Research publication, Tamil Nadu Agriculture university. 32pp.

Zaid, A. 2002. Date palm cultivation, FAO Plant Production and Protection. Paper NO. 156. Pp.292.

Journal of Entomological Research

Volume 6, Issue 1, pages: 53-65

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

Anti-feeding effects of sublethal concentrations of fungus *Beauveria bassiana* Balsamo, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch on the date's horn beetle larvae *Oryctes elegans* Prell

M. Latifian[1*], B. Rad[2]

1- Assistant Professor, Date palm and tropical fruits research institute of Iran, Ahwaz, Iran
2- Date palm and tropical fruits research institute of Iran, Ahwaz, Iran

Abstract

The effects of sub-lethal doses of the fungi ,*B.bassiana* ,*B.brongniartii* and *M. anisopliae* on feeding ability of the larvae of the date horned beetle and the indices of digestion ,absorption and excretion of this pest were studied in laboratory condition. First, the sub-lethal doses of 50 and 90% of reducing power ability (EC50 and EC90)was calculated and then the physiological feeding indices including Relative Consumption Rate) RCR), Efficiency of Conversion of Ingested food (ECI, Efficiency of Digested food (ECD), Approximate Digestibility (AD) were estimated .The results showed that the isolates of all three pathogenic fungi had a significant different high ability to reduce the feeding efficiency of the date- pest larvae .The highest and lowest abilities belonged to *M. anisopliae* and *B. bassiana* with the EC50 of 4.27 ۱۰۴×and 7.95 ۱۰۴×spores/ml ,respectively. There was a significant difference between physiological feeding indices of the pest larvae when they were exposed to applied doses of spores .In all three pathogenic fungi species, increasing doses of spore decreased the values of MRG, ECI ,ECD and AD, but increased the value of PCR. The highest of the regression lines of the indices on log scale of doses was recorded in *M. anisopliae* and then the two other species ,*B .brongniartii* and *B. bassiana* .

Key words: anti-nutritional effects, Entomopathogenic fungi, *Oryctes elegans*

*Corresponding author, E-mail: *masoud_latifian@yahoo.com*
Received: 3 sep. 2012 - Accepted: 17 April. 2013