فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
۱۳۹۷- ۹(۱): ۵۹-۶۹

# تاثیر قارچ های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* روی لارو خراط *Zeuzera pyrina* (Lepidoptera, Cossidae) در شرایط آزمایشگاهی

**زهرا میرافضلی[1*]، سید محمد رضا خوشرو[2]**

*۱- گروه زیست شناسی (میکروبیولوژی)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، سیرجان، ایران*

*۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران*

## چکیده

کرم خراط *Zeuzera pyrina* (Linnaeus, 1761) آفتی پلی فاز بوده که از بیش از ۱۰۰ گونه گیاهی تغذیه می کند. قارچ ها از عوامل محدود کننده جمعیت حشرات آفت در طبیعت به شمار می آیند از مهم ترین و کاربردی ترین قارچ ها *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* هستند. در این تحقیق تاثیر این دو قارچ روی لاروهای سن یک و دو کرم خراط در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. قارچ های *B. bassiana* و *M. anisopliae* به صورت خالص از بانک میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور بر روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) تهیه شد. لاروهای سن یک و دو کرم خراط از سرشاخه های درختان گردو جدا و با محلول کلرورجیوه به مدت ۳ دقیقه و سه مرتبه با آب مقطر استریل ضدعفونی سطحی و در پتری های استریل حاوی کاغذ صافی استریل قرار داده شد. زیست سنجی با ۳ تکرار با استفاده از سه غلظت$۱/۵\times۱۰^{۶}$ ،$۱/۵\times۱۰^{۷}$ و$۱/۵\times۱۰^{۸}$ کنیدی بر میلی لیتر از دو قارچ مذکور به روش اسپری توسط سرنگ انجام شد. سپس پتری ها در انکوباتور با دما ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار داده شدند. کمترین مقدار $LC_{50}$ (حداقل غلظت کشندگی) درحضور *B. bassiana* (۱۶روز)، *M. anisopliae*(۱۲روز) و ترکیب دو قارچ (۵۰:۵۰) *B. bassiana* و *M. anisopliae* (۹روز) به ترتیب $۱/۵\times۱۰^{۴/۵}$ ،$۱/۵\times۱۰^{۳/۹}$ ۱ و$۱/۵\times۱۰^{۲/۳}$ ۱ کنیدی بر میلی لیتر بود، بنابراین ترکیب دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* بهترین تأثیر را در کوتاهترین زمان و قارچ *M. anisoplaie* تأثیر بهتری نسبت به قارچ *B. bassiana* به تنهایی داشت. در مطالعه حاضر استفاده همزمان از دو

[*] مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Zahra.mirafzali@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۵

قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* باعث مرگ و میر ۱۰۰ درصدی لاروهای خراط در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ کنیدی بر میلی لیتر در ۱۶ روز شد.

**واژه های کلیدی:** کنترل بیولوژیک، کرم خراط، درخت گردو، *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae*

**مقدمه**

کرم خراط (پروانه فری) با نام علمی *Zeuzera pyrina* (Linnaeus, 1761) از خانواده Cossidae آفتی پلی فاز بوده که از بیش از ۱۰۰گونه گیاهی تغذیه می کند. مناسب ترین میزبان های این آفت درختان سیب، گلابی، آلو، بید، بلوط و گردو می باشد (Patanita & Vargas, 2005). درختان گردو نسبت به بقیه میزبان ها در برابر این آفت مقاوم هستند ولی تراکم جمعیت زیاد آفت باعث خسارت زیاد به این گونه گیاهی می شود (Behdad, 1991). لاروهای جوان این آفت از محل دمبرگ به شاخه وارد آن شده و به تدریج با جا به جا شدن، شاخه‌های ضخیم را مورد حمله قرار می‌دهند (Vatanparast *et al.*, 2011) که باعث پوک شدن شاخه‌ها شده و موجب شکسته شدن شاخه در اثر وزن خود آنها یا وزن میوه می‌شود و گاهاً صدمات جبران ناپذیر شدیدی برای برداشت‌کنندگان محصول که از درخت بالا رفته‌اند ایجاد می‌کند. کنترل این آفت بسیار مشکل است زیرا لاروها داخل شاخه و تنه زندگی می‌کنند و دوره ظهور حشرات کامل تقریباً طولانی و بسته به اقلیم و منطقه از اواسط اردیبهشت تا شهریور ماه طول می کشد (Weir, 1998). دلایلی که برای افزایش جمعیت این آفت و همچنین افزایش خسارت آن بیان شده متعدد است که عمده ترین آنها شامل تغییر نسبی شرایط آب و هوایی و نداشتن زمستان های سرد و یخبندان، کاهش فعالیت دشمنان طبیعی آفت، عدم رعایت بهداشت باغ و هرس مناسب درختان، عدم رعایت اصول قرنطینه گیاهی و وارد کردن نهال آلوده به مناطق عاری از آلودگی، ضعف عمومی درختان در باغ ها است که این آفت در مناطق مرکزی و شرقی کشور از جمله شهرستان بافت گسترش بیشتری داشته است (Hegazia *et al.*, 2009).

اهمیت کنترل کرم خراط به علت آسیب های جدی است که به درختان گردو وارد می کند از این رو روش های شیمیایی و فیزیکی فراوانی برای کنترل این آفت به کار رفته، با این وجود استفاده مستقیم و زیاد از حشره‌کش های شیمیایی علیه آفت‌های چوب به دلیل تغذیه لاروها داخل تونل ها، گسترده بودن تاج درخت، پرهزینه بودن و اثرات سوءزیست محیطی کنترل شیمیایی با این آفت را تقریباً غیرممکن نموده (Rohani & Samih, 2012) و روش های غیر شیمیایی از جمله استفاده از مفتول سیمی، رعایت اصول باغ داری، کاربرد فرمون های جنسی با تله شکار انبوه و تلفیق روش های مذکور، در باغ ها و مزارع کوچک کاربرد دارند (Ashtari *et*

*al.*, 2011). امروزه روش های کنترل بیولوژیک برای مهار این نوع آفت ها مطرح شده است که به بهره گیری از عوامل و فراورده‌های طبیعی و زنده برای از بین بردن آفات گیاهی اقدام می شود، به طوری که آفت فراوانی کمتری داشته باشد و خساراتی کمتر از آنچه ممکن است وارد کند (Pal & McSpadden, 2006).

دو قارچ *Beauveria bassiana* و *Metarhizium .anisopliae* از قارچهای بیمارگر حشرات هستند که در همه جا موجود می‌باشند و می‌توان آنها را به صورت گسترده از حشرات مختلف و از موارد مختلف جدا کرد (Butt *et al.*, 2001; Shamseldean *et al.*, 2009). در این تحقیق تأثیر دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* جهت کنترل بیولوژیک کرم خراط گردو در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

## مواد و روش ها

### *نمونه گیری (جمع آوری لارو خراط)*

این تحقیق در آزمایشگاه گیاهپزشکی سازمان مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان کرمان انجام شد و جهت جمع آوری کرم خراط، نمونه‌گیری به صورت تصادفی از باغات گردوی آلوده به کرم خراط در مناطق مختلف شهرستان بافت شامل بافت، رابر(منطقه کشکوییه)، ننیز، گنجان، بزنجان، کیسکان، جواران، هنزا انجام شد. نمونه‌ها از سرشاخه های جوان آلوده به آفت کرم خراط که هر شاخه معمولاً دارای یک لارو فعال بود (لاروهای سن اول و دوم) در ماه های تیر، مرداد و شهریور جداسازی و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

### *تهیه و تکثیر قارچ‌های پاتوژن*

قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* به صورت خالص از بانک میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به ترتیب با شماره های 5197 (PTCC) و 5282 تهیه شد. سپس قارچ های *B. bassiana* و *M. anisopliae* جداگانه در سطح محیط (PDA Dextrose Agar Potato) شامل سیب زمینی ۲۵۰گرم، دکستروز ۲۰ گرم، آگار ۱۵ گرم و آب مقطر استریل ۷۵۰ میلی لیتر کشت داده و در انکوباتور در دمای۱±۲۵ درجه سلسیوس، به مدت ۷روز نگهداری شدند .

### *تهیه سوسپانسیون قارچی B. bassiana و M. anisopliae*

قارچ های *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی محیط PDA برای دو هفته کشت داده شدند و سپس اسپورها با یک اسکالپل استریل از روی محیط کشت تراشیده و در یک لوله آزمایش استریل ریخته شدند .سپس ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به همراه ۰/۰۲درصد توئین ۸۰ به لوله آزمایش اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با مگنت همگن شدند و بعد محتویات از میان صافی

۲ لایه استریل برای جداسازی میسیلیوم‌ها از مایع عبور داده شد. و از هر قارچ سه غلظت متفاوت ۱۰^۶/۵×۱،۱۰^۷/۵× ۱و۱۰^۸/۵× ۱ کنیدی بر میلی لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر تهیه گردید.

***بررسی اثر قارچ B. bassiana و M. anisopliae روی لارو خراط***

روش زیست سنجی (Bioassay): به هر پتری‌دیش برای حفظ رطوبت یک میلی لیتر از محلول گلیسیرین و آب مقطر استریل با نسبت (۵۰:۵۰) با پیپت پاستور اضافه شد سپس در کف پتری‌دیش، یک کاغذ صافی استریل قرار داده شد و یک تکه چوب گردو استریل شده توسط الکل (۷۰٪) جهت تغذیه لارو به پلیت ها افزوده، سپس ۳ عدد لارو خراط را که قبلاً کاملاً استریل شده (توسط کلرور جیوه۱/۱۰۰۰ و آب مقطر استریل دو مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه) در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۱±۲۵ سلسیوس) در پلیت‌ها رهاسازی شدند. لاروهای داخل هر پتری‌دیش را با ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون جدایه های *B. bassiana* و *M. anisopliae* با سه غلظت متفاوت ۱/۵×۱۰^۶ ،۱/۵×۱۰^۷و۱/۵×۱۰^۸ کنیدی بر میلی لیتر (CFU/ml) از دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* به صورت مجزا و ترکیب (۵۰:۵۰) از دو قارچ اسپری شد به نحوی که به طور میانگین به هر حشره ۱/۵×۱۰^۶ ،۱/۵×۱۰^۷و۱/۵×۱۰^۸ کنیدی رسید و در انکوباتور در دمای ۲۵±۱°c و ۷۰ درصد رطوبت و در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. سه تکرار برای هر قارچ انجام شد. تراکم اسپور (کنیدی) روی حشره با شمارش تعداد کنیدی روی لام هموسیتومتر (یک شبکه کامل در لام شامل ۹ مربع است که هر کدام یک میلی متر مربع می‌باشند که ناحیه شمارش مرکزی آن شامل ۲۵ مربع بزرگ است و هر مربع بزرگ دارای ۱۶ مربع کوچکتر است. تنها سلول‌هایی را که بر روی خطوط دو لامل قرار گرفته و بر روی مربع‌های بزرگ هستند شمارش شده تا از شمارش دوباره سلول‌ها اجتناب شود) غلظت سلولی به وسیله فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Total cells/ml} = \text{Total cells counted} \times \frac{\text{dilution factor}}{\text{\# of Squares}} \times 10{,}000 \text{ cells/ml}$$

*dilution factor* = میزان رقیق شدگی  *# of squares* = تعداد مربع ها

در تمام آزمایش ها ۵ پتری دیش به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که فقط آب مقطر استریل روی لاروها پاشیده و به مدت ۱۶ روز نگهداری شدند. روزانه میزان رشد قارچ و مرگ و میر لاروها در هرتیمار محاسبه شد.

### *آنالیز آماری*

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش پروبیت توسط نرم افزار SPSS v22 انجام شد. جهت پیش بینی غلظت های مورد نیاز از معادله خط رگرسیون (Y=aX +b) استفاده شد. در این معادله پروبیت=Y و غلظت=X می باشند که پس از تجزیه و تحلیل میزان LC50 (X=۵۰) (غلظت کشنده برای ٪۵۰ نمونه های مورد آزمایش) محاسبه شد.

## نتایج

تأثیر دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* جهت کنترل لارو خراط در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در لاروهای خراط، بارزترین عوارض برای لاروهای خراط تغییر رنگ و همچنین خال های سطح بدن (کوتیکول)، کاهش تحرک لاروها (فلج شدن)، عدم تعادل، تیرگی پوست و بی تحرکی بود.

در مورد قارچ *B. bassiana* در مراحل اولیه مسمومیت، تیرگی سطح بدن قابل توجه بود و با تداوم مسمومیت منجر به فلجی و مرگ لاروها شد (شکل۱).

**شکل ۱**- مراحل تأثیر قارچ *B. bassiana* روی لارو خراط از چپ به راست

**Figure 1.** The effect of *B. bassiana* on *Z. pyrina* from left to right

در مورد قارچ *M. anisoplaie* و ترکیب دو قارچ ابتدا در قسمت پشت لارو خال های قهوه ای ظاهر و با گسترش مسمومیت خال ها بزرگ و بزرگتر شد و تمام سطح کوتیکول لارو را در بر گرفت و در نهایت منجر به مرگ لاروها شد. پاسخ های رفتاری لاروهای آزمایشی طی مدت ۱۶ روز پس از شروع آزمایش بررسی شد (شکل۲).

**شکل ۲**- مراحل تأثیر قارچ *M. anisoplaie* روی لارو خراط از چپ به راست

**Figure 2.** The effect of *M. anisoplaie* on *Z. pyrina* from left to right

در گروه شاهد، ، فعالیت طبیعی و رنگ طبیعی قابل مشاهده بود (شکل۳).

**شکل ۳**- گروه شاهد

**Figure 3.** Control

غلظت$^{۶}$۱۰×۱/۵ کنیدی بر میلی لیتر از هر دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* تا ۱۰ روز اول فعالیت نسبتاً طبیعی نشان دادند این در حالی است که با اسپری قارچ با غلظت$^{۷}$۱۰×۱/۵ کنیدی بر میلی لیتر پس از ۷ روز کاهش فعالیت در مقایسه با گروه شاهد، در آنها قابل مشاهده بود. در غلظت$^{۸}$۱۰×۱/۵کنیدی بر میلی لیتر در لارو ها پس از ۴ روز از در معرض گذاری قارچ کاهش فعالیت و تلفات قابل مشاهده بود .

میزان تلفات لاروهای خراط در حضور *B. bassiana*، *M. anisoplaie* و ترکیب دو قارچ مذکور با غلظت های $^{۶}$۱۰×۱/۵ ،$^{۷}$۱۰×۵/ و$^{۸}$۱۰×۵/ ۱ کنیدی بر میلی لیتر طی مدت ۱۶ روز پس از شروع آزمایش (۱۵ =*n* در ۳ تکرار) در جدول ۱ نشان داده شده است.

با افزایش غلظت قارچ، تلفات لاروهای خراط در معرض قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* و ترکیب دو قارچ طی ۵ تا ۱۶ روز پس از شروع آزمایش روند افزایشی نشان داد (جدول ۱).

نتایج درصد تلفات لاروهای خراط هنگام مواجهه با قارچ های *B. bassiana* و *M. anisoplaie* و ترکیب (۵۰:۵۰) دو قارچ *B. bassiana* و *M.anisoplaie* نشان داد که میزان مرگ و میر لارو خراط توسط قارچ *B. bassiana* در غلظت های $^{۶}$۱۰×۱/۵، $^{۷}$۱۰×۵/ و$^{۸}$۱۰×۵/ ۱ کنیدی بر میلی لیتر طی ۱۶ روز بررسی به ترتیب ۴۷٪، ۷۴٪و ۱۰۰٪ و میزان مرگ و میر لارو خراط توسط قارچ *M. anisoplaie* در غلظت های $^{۶}$۱۰×۱/۵ ،$^{۷}$۱۰×۵/ و$^{۸}$۱۰×۵/ ۱ کنیدی بر میلی لیتر به ترتیب طی ۱۶روز ۶۰٪، ۸۷٪و طی ۱۲ روز ۱۰۰٪ و میزان مرگ و میر لارو خراط

توسط ترکیب (۵۰:۵۰) دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* در غلظت های $۱/۵\times۱۰^{۶}$، $۱/۵\times۱۰^{۷}$ و $۱/۵\times۱۰^{۸}$ کنیدی بر میلی لیتر طی ۱۶ روز به ترتیب۸۰٪، ۹۵٪ و طی۱۲ روز ، ۱۰۰٪ بود. این نتایج نشان می دهد با افزایش غلظت قارچ ها درصد مرگ و میر لاروها افزایش و تعداد روزهایی که قارچ باعث مرگ لاروها شده کاهش یافته است. همچنین مرگ و میر حاصل از *M.anisoplaie* زودتر و مؤثرتر از *B. bassiana* و مرگ و میر حاصل از ترکیب (۵۰:۵۰) دو قارچ *B. bassiana* و *M.* anisoplaie زودتر و مؤثرتر از مرگ و میر حاصل از دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* به صورت جداگانه بوده است (جدول ۱).

جدول ۱- تلفات لاروهای کرم خراط در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۶}$، $۱/۵\times۱۰^{۷}$ و $۱/۵\times۱۰^{۸}$ کنیدی بر میلی لیتر از قارچ ها طی ۱۶ روز پس از آزمایش (۱۵ =*n* در ۳ تکرار)

Table 1. Mortality of larvae of *Zeuzera prrina* at concentrations of $1.5\times10^{6}$, $1.5\times10^{7}$ and $1.5\times10^{8}$ (CFU/ml) of fungi within 16 days of the experiment (n = 15, 3 replicates)

| various concentrations of fungi (CUF/ml) | | cumulative mortality of larvae at different days after the start of the experiment (percent) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 5 days | 6 days | 9 days | 12 days | 14 days | 16 days |
| $1.5*10^{6}$ | *B. bassiana* | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (7%) | 1 (7%) | 3 (20%) | 7 (47%) |
| | *M. anisoplaie* | 0 (0%) | 0 (0%) | 4 (27%) | 4 (27%) | 7 (47%) | 9 (60%) |
| | *B.bassiana* & *M.anisoplaie* | 0 (0%) | 0 (0%) | 6 (40%) | 6 (40%) | 10 (67%) | 12 (80%) |
| $1.5*10^{7}$ | *B. bassiana* | 0 (0%) | 0 (0%) | 5 (43%) | 5 (43%) | 8 (54%) | 11 (74%) |
| | *M. anisoplaie* | 0 (0%) | 2 (14%) | 7 (47%) | 7 (47%) | 10 (67%) | 13 (87%) |
| | *B.bassiana* & *M.anisoplaie* | 0 (0%) | 3 (20%) | 10 (67%) | 10 (67%) | 12 (80%) | 14 (95%) |
| $1.5*10^{8}$ | *B. bassiana* | 0 (0%) | 3 (20%) | 11 (74%) | 11 (74%) | 14 (94%) | 15 (100%) |
| | *M. anisoplaie* | 4 (20%) | 8(54%) | 13(80%) | 15(100%) | - | - |
| | *B.bassiana* & *M.anisoplaie* | 4(27%) | 8(55%) | 13(87%) | 15(100%) | - | - |

مقادیر $LC_{50}$ از قارچ های *B. bassiana* و *M. anisoplaie* و ترکیب دو قارچ، اسپری شده به لاروهای خراط در روزهای ۵، ۶، ۹،۱۲، ۱۴و ۱۶ پس از شروع آزمایش در جدول ۲ نشان داده شده است.

نتایج نشان دادند که مقدار $LC_{50}$ (مرگ و میر ۵۰٪ لاروها) در روز پنجم در حضور *B. bassiana* $۱/۵\times۱۰^{۱۱}$ کنیدی بر میلی لیتر بود در حالی که در حضور *M.anisoplaie* در همین روز $۱/۵\times۱۰^{۷}$ کنیدی بر میلی لیتر و در حضور هر دو قارچ $۱/۵\times۱۰^{۵}$ کنیدی بر میلی لیتر است. بنابراین حداقل غلظت کشندگی برای *B. bassiana* بیشتر از *M. anisoplaie* بود در حالی که ترکیب (۵۰:۵۰) دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie*کمترین غلظت کشندگی را نشان میدهند یعنی ترکیب دو قارچ در همان روز اول حداقل غلظت کشندگی را نشان دادند و در این غلظت ۵۰٪ از لاروهای خراط از بین رفتند.

**جدول ۲**- مقادیر $LC_{50}$ قارچ های *B. bassiana* و *M. anisoplaie* و ترکیب دو قارچ، اسپری شده به لاروهای خراط در روزهای ۵، ۶،۹، ۱۲، ۱۴و ۱۶ پس از شروع آزمایش

**Table 2.** $LC_{50}$ values of *B. bassiana* and *M. anisoplaie* and combining *B. bassiana* and *M. anisoplaie* on days 5, 6, 9, 12, 14 and 16 after the start of the experiment

| $LC_{50}$ values of fungi *B. bassiana* and *M. anisoplaie* | Fungicidal concentration(CFU/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 days | 6 days | 9 days | 12 days | 14 days | 16 days |
| *B. bassiana* | $1.5*10^{1.1}$ | $1.5*10^{7}$ | $1.5*10^{5.5}$ | $1.5*10^{4.7}$ | $1.5*10^{4.6}$ | $1.5*10^{4.5}$ |
| *M. anisoplaie* | $1.5*10^{6}$ | $1.5*10^{4.5}$ | $1.5*10^{4.1}$ | $1.5*10^{3.9}$ | $1.5*10^{4.6}$ | $1.5*10^{4.5}$ |
| *B.bassiana* & *M.anisoplaie* | $1.5*10^{5}$ | $1.5*10^{4}$ | $1.5*10^{2.2}$ | $1.5*10^{3.5}$ | $1.5*10^{4.3}$ | $1.5*10^{5.5}$ |

کمترین مقدار $LC_{50}$ لاروها در روز ۱۶ در حضور قارچ *B. bassiana* $۱/۵ \times ۱۰^{۴/۵}$ کنیدی بر میلی لیتر است در حالی که کمترین مقدار $LC_{50}$ در روز ۱۲ در حضور قارچ *M. anisoplaie* $۱/۵ \times ۱۰^{۳/۹}$ کنیدی بر میلی لیتر و کمترین مقدار *LC50* در روز ۹ در حضور هر دو قارچ *B. bassiana* و *M.anisoplaie* $۱/۵ \times ۱۰^{۲/۲}$ کنیدی بر میلی لیتر است. بنابراین لاروها باید روزهای بیشتری (۱۶ روز) در معرض قارچ *B. bassiana* قرار بگیرند تا ۵۰٪ تلفات مشاهده شود در حالی که قارچ *M. anisoplaie* در روز ۱۲بیشترین تلفات لاروی را نشان داد و ترکیب (۵۰:۵۰) دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* در روز ۹ بیشترین تلفات لاروی را داشته-اند. این بدین معنی است که ترکیب دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* بهترین تأثیر را در کوتاهترین زمان دارند (جدول ۲).

## بحث

بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۱ و ۲) مشخص شد که استفاده از دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* باعث مرگ و میر لاروهای خراط شده است.

در مطالعه انجام شده توسط (Deseo *et al*., 1984; Deseo & Docci, 1985) در خصوص تأثیر دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* نیز کاهش تعداد لارو خراط گزارش شده است. در باغ های سیب ایتالیا، نشان داده شد که تیمارهای قارچ *B. bassiana* و باکتری *Bacillus thuringiensis*، به میزان ۹۵/۸درصد مرگ و میر ایجاد نمود، اما گونه *M.anisoplaie* ۷۵/۵ درصد مرگ و میر ایجاد کرد.

در بررسی دیگری در باغ های سیب ایتالیا نشان داده شد که کاربرد سوسپانسیون حاوی قارچ های *B. bassiana*، *M. anisoplaie* و باکتری *Bacillus thuringiensis* باعث ۹۵-۹۹٪مرگ و میر در لاروهای آفت شده است. و نیز نشان داده شد که تأثیر ترکیب قارچ های *B.*

*bassiana*، *M. anisoplaie* و باکتری *Bacillus thuringiensis* بیشتر از هر کدام به تنهایی است (Deseo *et al.*, 1984; Deseo & Docci, 1985). در مطالعه حاضر استفاده از قارچ های *B .bassiana* و *M. anisoplaie* با هم باعث مرگ و میر ۱۰۰ درصد لاروهای خراط در غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ کنیدی بر میلی لیتر شد. کنترل بیولوژیک جهت کنترل حشرات آفت از ابعاد گسترده ای حائز اهمیت است. از آنجا که دو قارچ *B. bassiana* و *M .anisoplaie* موجود زنده هستند و توانایی تکثیر دارند می توانند تمام مناطق اطراف لارو را پوشانده و باعث مرگ لارو شوند و همچنین کاربرد دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisoplaie* به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک، با توجه به تست های ایمنی انجام شده بر روی ارگانیسم های غیر هدف، بی خطر و استفاده از آنها هیچ نوع بیماری جدی را در ارگانیسم های غیر هدف ایجاد نمی کند (Tucker *et al*., 2004; Huang *et al*., 2005; Westwood *et al*., 2005 ).

با توجه به مزایای فوق، توجه به کشاورزی پایدار در دراز مدت مستلزم استفاده از چنین ابزار طبیعی در کنترل عوامل بیماری زا و کاهش مصرف سموم و آلاینده های طبیعی می باشد. این دیدگاه مد نظر کشورهای پیشرفته دنیا مخصوصاً در قرن اخیر می باشد. زیرا هرچه کاربرد سموم شیمیایی بیشتر می شود زیان ها و اثرات ناگوار آنها در سیستم های زیستی و انسان و حتی سرطان زایی آنها مشخص تر می شود. اما کنترل کننده های طبیعی مانند قارچ های *B. bassiana* و *M. anisoplaie* به دلیل اینکه در طول دوره تکامل با انسان مجاور هستند، آثار سوء و نامطلوب آنها به مراتب کمتر از مواد شیمیایی مصنوعی است. دانش و عمل کنترل بیولوژیک، در مقایسه با تیمارهای قارچ کش شیمیایی یا بیوکنترل، هنوز در مرحله جوانی است، اما پیشرفت های به دست آمده طی چند سال گذشته تلاش قابل توجهی بوده است و اگر ادامه پیدا کند، استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک در آینده به طور وسیعی گسترش پیدا خواهد کرد.

## منابع


Ashtari, M., Karimi, J., Rezapanah, M. R., & Hassani-Kakhki, M. 2011. Biocontrol of leopard moth, Zeuzera pyrina L.(Lep.: Cossidae) using entomopathogenic nematodes in Iran *IOBC-WPRS Bulletin* 66:333-335.

Behdad, E. 1991. *Pests of Fruit Crop in Iran*, Second Edition. Neshat Publishing, Iran.

Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. 2001. *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential*. CABI. Wallingford, CAB International.

Deseo, K. V., & Docci, R. 1985. Microbiological control against *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae). *La Difesa delle Piante*, 8(2): 285-291.

Deseo, K. V., Grassi, S., FoscHI, F., & Rovesti, L. (1984). A system of biological control against the leopard moth (*Zeuzera pyrina* L.; Lepidoptera, Cossidae). *Atti Giornate Fitopatol*, 2: 403-414.

Hegazi, E., Khafagi, W. E., Konstantopoulou, M., Raptopoulos, D., Tawfik, H., El-Aziz, G. A., Abd El-Rahmanc, S. M. Atwa, A. & Showeil, S. 2009. Efficient mass-trapping method as an alternative tactic for suppressing populations of leopard moth (Lepidoptera: Cossidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102(5): 809-818.

Huang, B., Li, C., Humber, R. A., Hodge, K. T., Fan, M., & Li, Z. 2005. Molecular evidence for the taxonomic status of Metarhizium taii and its teleomorph, Cordyceps taii (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Mycotaxon*, 94(3): 137-147.

Pal, K. K., & Gardener, B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2: 1117-1142.

Patanita, M.I., & Vargas, E. 2006. Preliminary results in Zeuzera pyrina control with mass trapping method in Alentejo (Portugal). *59th International Symposium on Crop Protection*, Gent Belgium. 1: 5.

Revathi, N., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Gomathi, D., & Uma, C. 2011. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi against Helicoverpa armigera. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 2(4): 1-4.

Rohani, M., & Samih, M. A. 2012. The efficiency of pheromone traps in attracting and capturing *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) in walnut orchards. *International Journal of AgriScience*, *2*(7), 583-587.

Shamseldean, M. M., Hasanain, S. A., & Rezk, M. Z. A. 2009. Virulence of entomopathogenic nematodes against lepidopterous pests of horticultural crops in Egypt. *4th Conference on Recent Technologies in Agriculture*, 74-84.

Tucker, D. L., Beresford, C. H., Sigler, L., & Rogers, K. 2004. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical microbiology*, 42(11): 5412-5414.

Vatanparast, M. Hossini Nave, V. Nozari, J. Sajadiyan, S. M. 2011. Carbohydrates digestive *Zeuzera pyrina* (Lep .: Cossidae). *Iranian Journal of Plant Protection*, 43(1): 97-109.

Weir, J. W. 1998. *Chemical and Non-Chemical Pest Control Methods*, Publications Astan Quds Razavi. Iran.

Westwood, G. S., Huang, S. W., & Keyhani, N. O. (2005). Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clinical and Molecular Allergy*, 3(1): 1-8.

**Plant Protection Journal**
**(Islamic Azad University, Shiraz Branch)**
**2018 – 9(2): 59-69**

# A laboratory investigation on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on *Zeuzera pyrina* larvae (Lepidoptera: Coccidae)

**Zahra MIRAFZALI, Sayed Mohammad Reza KHOSHROO**
*1. Department of Biology (Microbiology), Islamic Azad University, Science and Research, Sirjan, Iran (Corresponding author, Email: zahra.mirafzali@yahoo.com)*
*2. Department of Biology, Islamic Azad University, Kerman, Iran*

## Abstract

*Zeuzera pyrina* (Linnaeus, 1761) (Lepidoptera: Coccidae) is a polyphagous pest that feeds more than 100 plant species. Entomophagous fungi are one of the limiting factors to control the population of this pest in nature. In this study, the lethal effect of two fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on the first and second larval instars of *Zeuzera pyrina* was investigated in laboratory conditions. The first and second instar larvae of *Z. pyrinia* were collected from the branches of walnut trees in Baft, Kerman province, Iran. The larvae were transferred to sterile Petri dishes after sterilization with Mercury chloride and distilled water. Spore suspension at concentrations of $1.5 \times 10^{6}$, $1.5 \times 10^{7}$, $1.5 \times 10^{8}$ conidia/ml was prepared, and then mortality rate of adults was examined after 5, 6, 9, 12, 14, 16 days. The lowest value $LC_{50}$ in presence of *B. bassiana* (16 day), *M. anisoplaie* (12day) and two combined fungi (50:50), *M. anisoplaie* and *B. bassiana* (9 day) was $1/5 \times 10^{4.5}$, $1/5 \times 10^{3.9}$ and $1/5 \times 10^{2.2}$ conidia/ml respectively. Therefore, the combination of two *B. bassiana* and *M. anisoplaie* fungi had the best effect in the shortest time and *M. anisoplaie* had better effect than *B. bassiana*. Nowadays, biological control is one of the best and most practical control programs to protect of environment; biological control of pests, chemical pesticides that have harmful effects on humans and other organisms. In this study, the simultaneous use of two fungi *B. bassiana* and *M. anisoplaie* caused to 100% mortality of woodworker worm larvae during 16 days in concentration of$1/5 \times 10^{8}$ conidia/ml.

**Keywords:** Biological control, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Zeuzera pyrina*, walnut tree.