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

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۵، شماره ۲، سال ، (۸۳-۹۴)

جداسازی نماتد *Steinernema feltiae* و بررسی بیمارگری آن روی سرخرطومی برنج *Sitophilus oryzae* (Col.: Curculionidae)

مهرناز رودکی[۱]، مصطفی حقانی[۲*]، محمد عبدالهی[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۲- به‌ترتیب استادیار و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

چکیده

استفاده از سموم شیمیایی آفت‌کش در انبار غلات و حبوبات اثرات سوء زیادی روی موجودات غیر هدف، بروز مقاومت حشرات در مقابل سموم، آلودگی‌های زیست محیطی و غیره دارد. امروزه عوامل غیرشیمیایی در کنترل آفات کشاورزی مورد توجه هستند که در این راستا استفاده از عوامل بیولوژیک در کنترل آفات اهمیت خاصی یافته‌اند. یکی از این عوامل بیوکنترل، نماتدهای بیمارگر حشرات هستند. به منظور بررسی وجود نماتدهای بیمارگر حشرات در خاک‌های استان کهگیلویه و بویراحمد، در سال ۱۳۸۹ تعداد ۶۹ نمونه خاک از سراسر استان جمع‌آوری شد. در بین گونه‌های بیمارگر حشرات، *Steinernema feltiae* (Filipjev)، *S. carpocapsae* Weiser و یک گونه از جنس *Panagrolaimus* از خاک‌های جمع‌آوری شده جدا گردید. این آزمایش به منظور تعیین کارآیی *S. feltiae* بر سرخرطومی برنج *Sitophilus oryzae* (L.)، که آفت بسیار مهم محصولات انباری است، اجرا گردید. در شرایط آزمایشگاهی حشرات کامل سرخرطومی برنج در درجه حرارت‌های ۲۵، ۲۷/۵، ۳۰ و ۳۲/۵ درجه سلسیوس در برابر غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لارو عفونت‌زای نماتد در هر میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفتند. حشرات روی کاغذ صافی آغشته به یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون نماتد در داخل پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری قرار داده شدند و هر ۲۴ ساعت یک بار تعداد حشرات مرده ثبت گردید. بیشترین میزان مرگ و میر سرخرطومی برنج ۷۷/۵ درصد بود که در غلظت ۲۰۰۰ نماتد پس از ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس ایجاد شد.

واژه‌های کلیدی: سرخرطومی برنج، نماتد بیمارگر حشرات، کنترل بیولوژیک، *Steinernema feltiae*، *Sitophilus oryzae*

مقدمه

سرخرطومی برنج *Sitophilus oryzae* (L.) حشره همه‌جایی کوچکی است که خاستگاه آن احتمالاً هند است و در حال حاضر حدود پراکندگی آن در جهان، بیشتر از سرخرطومی گندم است. این حشره در نقاط گرمسیری و نیمه گرمسیری زندگی می‌کند. خسارت عمده‌ی این حشره در درجه‌ی اول مربوط به لارو آن است اما حشره کامل نیز در طول

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: haghanima@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله (۹۰/۱۱/۱۵) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۱/۱۰/۱۸)

زندگی از دانه‌ها تغذیه می‌کند. سرخرطومی برنج نه تنها به برنج، بلکه به تمام غلات انباری مانند گندم، جو، ذرت و چاودار نیز حمله می‌کند و همچنین می‌تواند از آرد و سبوس نیز تغذیه کند. این حشره گاهی به دانه‌های بقولات نیز حمله می‌کند، ولی لاروها در همان اوایل مراحل رشدی از بین می‌روند. میزان خسارت آن روی غلات مختلف بسیار شدید است، به‌طوری که در بعضی کشورها تا ۷۵ درصد محصول می‌رسد (Bagheri Zenuz, 1996).

طبق گزارشات تاماس، خسارت وارده توسط این عوامل در مناطق مختلف جهان با هم متفاوت است، به طوری که در آفریقا ۴۳/۳، آمریکای جنوبی ۴۱/۶، چین ۳۳، آمریکای شمالی ۲۹/۷، اقیانوسیه ۲۸/۷ و در اروپا ۲۵ درصد محصول می‌باشد (Tamas, 1990). طبق گزارش باقری زنوز، در ایران بر اساس گزارش وزارت جهاد کشاورزی هر ساله به طور متوسط ۱۰ تا ۲۰ درصد محصولات کشاورزی در انبارها به وسیله آفات و سایر عوامل خسارت‌زا از بین می‌رود (Bagheri Zenuz, 1996). بر اساس گزارش شایا و همکاران، خسارت آفات روی غلات و حبوبات در کشورهایی که تکنولوژی پیشرفته انبارداری ندارند ۱۰ تا ۴۰ درصد کل محصول می‌باشد (Shayya *et al.,* 1997). مدرس نجف آبادی میزان خسارت آفات انباری در مناطق روستایی را به دلیل سنتی بودن و شرایط نامناسب انبارها بین ۱۰ تا ۸۰ درصد محصول گزارش نموده است (Modarres Najaf Abadi, 2002).

برای کنترل آفات انباری، امروزه بیشتر از سموم شیمیایی گازی و گاهی از اشعه‌های رادیواکتیو استفاده می‌شود که خطرات جبران ناپذیری برای انسان و محیط پیرامون وی دارد. برای کنترل آفات انباری به طور عمده از متیل بروماید و فسفین استفاده می‌شده است، اما مصرف این دو ترکیب به دلیل سمیت فوق‌العاده روی انسان و سایر عوارضی که ایجاد کرده است در حال محدود شدن می‌باشد. بر اساس بررسی‌های هاک و همکاران، متیل بروماید یکی از آلاینده‌های مؤثر بر لایه‌ی ازن به شمار می‌رود (Haque *et al.*, 2000) که مصرف آن در کشورهای پیشرفته از سال ۲۰۰۵ ممنوع اعلام شده است. همچنین تاکنون مقاومت آفات انباری نسبت به سم فسفین در ۴۵ کشور دنیا گزارش شده است (Bell & Wilson, 1995; Daglish & Collins, 1999; Shayya *et al,*. 1997; Lee *et al.,* 2001).

کاربرد بی‌رویه‌ی سموم شیمیایی اثرات سوء در محیط زیست و همچنین اثرات مخرب بر سلامتی انسان دارد (Herrman, 1993; Richardson, 1996). با توجه به این اثرات، محققین بیش از پیش به فکر استفاده از عوامل غیرشیمیایی در کنترل آفات کشاورزی هستند و در این راستا استفاده از عوامل بیولوژیک را در سرلوحه و دستور کار کنترل آفات قرار داده‌اند (Aramideh *et al.,* 2005). طبق بررسی‌های صورت گرفته توسط لیسی و همکاران و همچنین، شاف و لاساله، یکی از مهم‌ترین ابزارها در کنترل بیولوژیک، شناسایی دقیق آفت و موجود زنده‌ی مفیدی است که مورد استفاده قرار می‌گیرد (Schauff & LaSalle, 1998; Lacey *et al.,* 2001).

نماتدها از جمله موجودات زنده‌ای هستند که برای کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حال حاضر نماتدهای جنس *Steinernema* (Steinernematidae) مهم‌ترین نماتدهای مورد استفاده در تحقیقات کنترل بیولوژیک در آزمایشگاه‌های مهم جهان هستند. این نماتدها قادرند به صورت انتخابی روی بسیاری از حشرات و برخی بندپایان تأثیر گذارند بدون این که اثر سویی بر پستانداران یا گیاهان داشته باشند. مرگ نسبتاً سریع (۲۴–۴۸ ساعت پس از آلودگی) و دامنه‌ی وسیع میزبانی این نماتدها از علل استفاده از این موجودات زنده به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک و همچنین تولید تجاری آن‌ها در سطح کوچک، به شمار می‌آید. گونه‌های بسیار زیادی از *Steinernema* به‌عنوان نماتدهای مهم بیماری‌زای حشرات گزارش شده است و تعداد بسیار زیادی گونه‌ی ناشناخته نیز موجود می‌باشد (Abdollahi, 2009). علی‌رغم این که این نماتدها از قرن ۱۷ شناخته شده‌اند، ولی تا قبل از دهه ۱۹۳۰ در برنامه مبارزه بیولوژیک مورد توجه جدی قرار

نگرفتند. از آن زمان تاکنون، تعداد بسیاری از گونه‌های بیماری‌زا در حشرات یافت شدند (Poinar, 1990). سهولت در تولید انبوه و عدم نیاز به استفاده از تجهیزات سرمایشی در نگهداری این نماتدها از دلایل عمده موفقیت در تجاری شدن این روش مبارزه با آفات بوده است. امروزه این روش در اروپا، امریکای شمالی، ژاپن، چین و استرالیا در سطوح بزرگ مورد استفاده دارد و در برخی موارد برای مبارزه با آفاتی که با سایر روش‌ها به سختی کنترل می‌شده‌اند، به‌کار رفته است (Grewal *et al.,* 2006; Georgis *et al.,* 2006).

Yee & Lacey حساسیت مراحل لاروی، شفیرگی و حشره کامل مگس گیلاس Curran *Rhagoletis indifferens* را در برابر سه نماتد از جنس *Steinernema* بررسی کردند (Yee & Lacey, 2003). Schroer & Ehlers نماتد *S. carpocapsae* را علیه شب‌پره پشت الماسی (L.) *Plutella xylostella* بررسی کرده و نتایج قابل قبولی به دست آوردند (Schroer & Ehlers, 2005). Oestergaard و همکاران اثر .sp *Steinernema* را روی لاروهای نئونات مگس چمن Meigan *Tipula paludosa* بررسی کردند که در این تحقیق، *S. carpocapsae* بیش از ۸۰٪ و *S. feltiae* کمتر از ۵۰٪ این آفت را کنترل کرد (Oestergaard *et al.,* 2006). Trdan و همکاران تحت شرایط آزمایشگاهی فعالیت چهار گونه نماتد بیماری‌زا، *S. carpocapsae*، *S. feltiae*، *Heterorhabditis bacteriophora* و *H. megidis* را علیه سرخرطومی گندم و شپشه دندانه‌دار برنج مورد بررسی قرار دادند (Trdan *et al.,* 2006). Ramos-Rodriguez و همکاران، توان بیماری‌زایی دو گونه نماتد *S. feltiae* و *S. carpocapsae* را روی مراحل مختلف لارو، شفیره و حشره کامل شش گونه آفت شامل شب‌پره هندی، شپشه دندانه‌دار برنج، دو گونه سوسک آرد، شپشه آرد و شب‌پره آرد بررسی کردند (Ramos-Rodriguez *et al.,* 2006).

در ایران، پرویزی و همکاران برخی نماتدهای انگل حشرات در ایران را گزارش کردند (Parvizi *et al.,* 1994). در سال‌های ۱۳۷۵-۱۳۷۶ کارآیی دو گونه .sp *Steinernema* و *H. bacteriophora* جمع‌آوری شده از آذربایجان غربی علیه آفات متداول منطقه شامل سفیده کلم، سوسک کلرادوی سیب زمینی، خرطوم کوتاه چغندرقند، هلیوتیس نخود، کارادرینا و کرم سفید ریشه در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد (Parvizi *et al.*, 1998). پرویزی جهت بررسی کارآیی نماتدهای بیماری‌زای حشرات در کنترل سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (Say) *Leptinotarsa decemlineata* آزمایشاتی با دو نماتد .sp *Steinernema* و .sp *Heterorhabditis* انجام داد که با دز ۱۶۰ نماتد در سانتی‌متر مربع به‌ترتیب ۸۳/۷۵٪ و ۹۰٪ لاروها پارازیته شدند (Parvizi, 2000).

برای بررسی کارآیی نماتدهای بیماری‌زای کرم سفید ریشه، آزمایش‌هایی در قالب کرت‌های کاملا تصادفی با نماتدهای .sp *Steinernema* و *H. bacteriophora* ترتیب داده شد (Parvizi, 2001). در این مطالعات مشخص گردید که دز ۵×۱۰^{۵} نماتد در هر مترمربع، به‌طور متوسط ۴۰ درصد لاروهای سن سوم کرم سفید ریشه پارازیته می‌شوند. در استان کهگیلویه و بویراحمد نیز پژوهش‌هایی در زمینه کارآیی نماتدهای بیمارگر حشرات در کنترل برخی آفات صورت گرفته است. رودکی و همکاران اثر *S. feltiae* و فلاحی و همکاران اثر *S. carpocapsae* بر سرخرطومی یونجه *Hypera postica* (Gyllenhal) را در مطالعات جداگانه‌ای مورد بررسی قرار دادند و اثر *S. carpocapsae* بر شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* (Hubner) توسط رودکی و همکاران مطالعه گردید (Roodaki *et al.,* 2011; 2012; Falahi *et al.,* 2011). همچنین از این استان نماتدی از جنس *Panagrolaimus* با پتانسیل حشره‌کشی بالا گزارش شده است (Abdollahi *et al.,* 2012).

با توجه به استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی آفت‌کش در انبار، استفاده از عوامل غیرشیمیایی در کنترل آفات کشاورزی را باید مورد توجه قرار داد. هدف از انجام این آزمایش بررسی امکان استفاده از نماتد بیمارگر حشرات *S. feltiae* در کنترل سرخرطومی برنج *S. oryzae* بوده است (Abdollahi, 2010).

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

جهت پرورش سرخرطومی برنج، گندم رقم الوند عاری از سم را در شش ظرف ریخته و ۵۰ عدد حشره کامل به نسبت جنسی ۱:۱ داخل هر ظرف رهاسازی و در دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰ درصد نگه‌داری شدند.

جمع‌آوری نمونه‌های خاک

برای جمع‌آوری نمونه‌های خاک، طی سال‌های زراعی ۱۳۸۸-۱۳۸۹ و ۱۳۸۹-۱۳۹۰ به مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد سفر کرده و از نقاط مختلف اعم از مزارع، مراتع و حواشی جویبارها نمونه‌برداری انجام شد. پس از کنار زدن خاک سطحی، با بیلچه از عمق ۱۰-۱۵ سانتی‌متری، که محیط زندگی این نماتدها است، نمونه‌برداری به صورت تصادفی انجام گردید. جمعا تعداد ۶۹ نمونه خاک، هریک به میزان تقریبی ۲ کیلوگرم، در طول مدت آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. پس از انتقال خاک به آزمایشگاه، نمونه‌ها به صورت مجزا در دمای ۲۰-۳۰ درجه سلسیوس که برای نماتد قابل تحمل است، نگه‌داری شدند.

جداسازی نماتدهای بیمارگر حشرات از خاک

جداسازی نماتدهای بیمارگر حشرات از خاک به روش طعمه‌گذاری و با استفاده از لارو زنده پروانه موم‌خوار بزرگ، *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)، انجام شد. در نتیجه تکثیر نماتد در داخل بدن لارو، در طی دو هفته لارو تلف شد و پس از مرگ حشره، نماتدها از لاشه آن خارج شدند. پروانه موم‌خوار بزرگ روی محیط غذایی تهیه شده از عسل (۹۰۰ گرم)، موم زنبور عسل (۲۰۰ گرم)، گلیسیرین (۹۰۰ گرم)، آرد برنج (۱۳۰۰ گرم) و مخمر (۴۰۰ گرم) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پرورش داده شد (Wiesner, 1993).

طعمه‌گذاری با استفاده از دو شیوه انجام شد:

۱- در شیوه اول از روش Bedding & Akhurst استفاده گردید (Bedding & Akhurst, 1975). تعداد ۲-۳ لارو سن آخر پروانه موم‌خوار با استفاده از پنس و بدون آسیب رساندن به آن‌ها در درون ظروف پلاستیکی درپوش‌دار مجزا با حجم ۲۵۰ سانتی‌متر مکعب قرار داده شد و به مقدار کافی از خاک‌های جمع‌آوری شده روی این لاروها ریخته شد تا ظرف پر شود و درپوش ظروف که سوراخ‌های ریزی به‌منظور تبادل هوا روی آن‌ها ایجاد شده بود، قرار داده شد. بدون تغذیه لاروهای طعمه، ظروف به‌مدت ۵-۷ روز در دمای تقریبی ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

۲- در شیوه دوم از لوله اپندورف با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر استفاده گردید. روی اپندورف چند سوراخ ایجاد گردید و یک عدد لارو سن آخر پروانه موم‌خوار درون آن قرار داده شد. اپندورف‌ها درون ظروف پلاستیکی که به مقدار کافی از خاک‌های جمع‌آوری شده درون آن ریخته شده بود، قرار داده شدند. ظروف به مدت ۵-۷ روز در دمای تقریبی ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Laznik & Trdan, 2012).

روزانه لاروهای موجود در خاک بررسی شدند و لاروهای مرده پروانه با استفاده از روش Woodring & Kaya، به تله‌ی وایت منتقل شدند (Woodring & Kaya, 1988) و پس از ۴۸ ساعت، نماتدهای خارج شده از لاشه برای انجام مراحل بعدی آزمایش جمع‌آوری و در یخچال با دمای ۷-۸ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید.

آزمون بیماری‌زایی

آزمایش فاکتوریل با سه فاکتور زمان (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، غلظت (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لارو عفونت‌زا [IJ[1]] در هر میلی‌لیتر) و دما (۲۵، ۲۷/۵، ۳۰ و ۳۲/۵ درجه سلسیوس) به صورت کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد. برای به دست آوردن غلظت‌های لازم نماتدها، از روش رقیق کردن متوالی استفاده گردید. برای هر غلظت و هر تکرار، یک پتری دیش شیشه‌ای با قطر ۹ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. کف هر پتری دیش با ۲ لایه کاغذ صافی به قطر ۹ سانتی‌متر پوشانده شد و تعداد ۱۰ عدد حشره کامل هم‌سن در هر یک قرار داده شد. ظروف پتری به‌مدت ۳ روز در دماهای ۲۵، ۲۷/۵، ۳۰ و ۳۲/۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگه‌داری و میزان مرگ و میر حشرات کامل سرخرطومی برنج به‌صورت روزانه یادداشت‌برداری گردید.

تجزیه آماری

جهت مقایسه میانگین تیمارها، با کمک نرم افزار SPSS 16، از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way-ANOVA) و آزمون توکی و جهت ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. با روش تجزیه پروبیت LC_{50} محاسبه گردید.

نتایج و بحث

یک گونه نماتد بیماری‌زای حشرات، *S. feltiae* با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی و مورفومتریکی، با استفاده از کلید شناسایی Lucskai تشخیص داده شد (Lucskai, 1999) و روی پروانه موم خوار بزرگ *Galleria mellonella* تکثیر یافت. با استفاده از روش کخ، آزمون بیماری‌زایی به‌منظور تایید بیماری‌زایی نماتدهای جمع‌آوری شده انجام شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های آماری اثر *S. feltiae* روی حشره کامل سرخرطومی برنج در شرایط آزمایشگاهی، در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس جدول تجزیه واریانس، تمامی تیمارها نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. همچنین اثر تیمارهای مورد آزمایش (دما، زمان و غلظت‌های متفاوت نماتد بیمارگر)، و اثر متقابل دما در غلظت نماتد و زمان در غلظت نماتد دارای اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۱٪ است. با توجه به معنی‌دار بودن اختلافات، مقایسه میانگین‌های تیمارهای مورد آزمایش انجام شد که نتایج مقایسه میانگین در جدول ۲ درج شده است.

1 Infective Juvenile

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نماتد *S. feltiae* بر سرخرطومی برنج *S. oryzae*

Table 1- Analysis of variance of the effect of *Steinernema feltiae* on adult of *Sitophilus oryzae*

Source of variance	df	Mean Square
Temperature	3	8.787 **
Time interval	2	174.862 **
IJ*s	4	76.733 **
Temperature×IJs	12	2.367 **
Time interval×IJs	8	13.633 **
Time interval×Temperature×IJs	24	0.717 ns
Error	180	0.768

* Infective Juvenile

ns و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

جدول ۲- درصد مرگ و میر حشرات کامل سرخرطومی برنج بر اثر نماتد *S. feltiae* در زمان‌ها و دماهای مختلف

Table 2- Percentage mortality of adult *S. oryzae* due to effect of *S. feltiae* in different temperatures and times

Time interval (hours)	No. of IJs	Mean mortality of *S. oryzae*			
		25 ºC	27.5 ºC	30 ºC	32.5 ºC
24	**2000**	17.50(8.54)	7.50(2.50)	7.50(2.50)	5.00(5.00)
	1000	15.00(5.00)	5.00(2.89)	5.00(2.89)	10.00(4.08)
	500	7.50(4.79)	7.50(2.50)	2.50(2.50)	2.50(2.50)
	250	2.50(2.50)	2.50(2.50)	0.00(0.00)	2.50(2.50)
	Control	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)
48	**2000**	40.00(7.07)	25.00(2.89)	45.00(6.46)	20.00(4.08)
	1000	25.00(5.00)	15.00(2.89)	27.50(4.79)	15.00(2.89)
	500	20.00(5.77)	15.00(2.89)	17.50(4.79)	12.50(2.50)
	250	15.00(2.89)	7.50(2.50)	5.00(2.89)	12.50(2.50)
	Control	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	0.00(0.00)
72	**2000**	62.50(10.31)	57.50(4.79)	77.50(6.29)	52.50(6.29)
	1000	50.00(10.00)	37.50(8.54)	52.50(4.79)	30.00(4.08)
	500	42.50(2.50)	37.50(4.79)	40.00(4.08)	22.50(2.50)
	250	30.00(4.08)	35.00(6.46)	22.50(8.54)	27.50(4.79)
	Control	2.50(2.50)	0.00(0.00)	0.00(0.00)	5.00(2.89)
LSD5%		**2.8744**			
LSD1%		**3.3181**			

- تعداد تکرار چهار، میانگین در خارج از پرانتز و خطای استاندارد در داخل پرانتز آورده شده است.

نتایج این بخش با نتایج به‌دست آمده توسط Aydin & Susurluk مطابقت دارد (Aydin & Susurluk, 2004). نتایج تجزیه پروبیت به‌منظور تعیین LC_{50} در جدول ۳ و شکل ۱ آورده شده است. با توجه به این جدول و نمودار، مشاهده می‌شود که بهترین نتیجه در این آزمایش در اثر تیمار ۳۰ درجه سلسیوس پس از ۷۲ ساعت (LC_{50}=۷۶۳) حاصل شده است.

جدول ۳- مقادیر LC_{50} نماتد *S. feltiae* روی حشره بالغ *S. oryzae* در دماها و زمان‌های مختلف

Table 3- Values of LC_{50} for *S. feltiae* on adults of *S. oryzae* at different temperatures and times

Time interval (hours)	LC50			
	25ºC	27.5 ºC	30 ºC	32.5 ºC
24	12990	12055381	27056	1260267
48	4677	17175	2353	610729
72	910	1623	763	2771

در بررسی صورت گرفته توسط Glazer & Navon روی قدرت آلوده‌سازی نماتدهای Heterorhabditidae و Steinernematidae روی سنین لاروی *Heliothis* نشان داده شد که لاروهای سنین بالا نسبت به لاروهای سنین پایین به غلظت‌های نماتد حساس‌ترند (Glazer & Navon, 1990). Athanassioua و همکاران نیز نتایج مشابهی گرفته‌اند، به طوری که ۷۹-۱۰۰ درصد لارو و حداکثر ۶۶٪ حشره کامل سوسک آرد توسط *S. feltiae* کنترل شد (Athanassioua *et al.*, 2008). Yee & Lacey حساسیت مراحل لاروی، شفیرگی و حشره کامل مگس گیلاس غربی را در برابر سه گونه از جنس *Steinernema* بررسی کردند که مرگ و میر آفت در آزمایشگاه ۱۰-۶۲٪ بود (Yee & Lacey, 2003). Shahina & Salma اثر *S. carpocapsae* روی سرخرطومی برنج را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که ۵۵-۳۷۰ نماتد به ازای هر حشره کامل باعث به‌دست آمدن بهترین نتیجه می‌شود و می‌توان از این نماتد در کنترل سرخرطومی برنج استفاده نمود (Shahina & Salma, 2010).

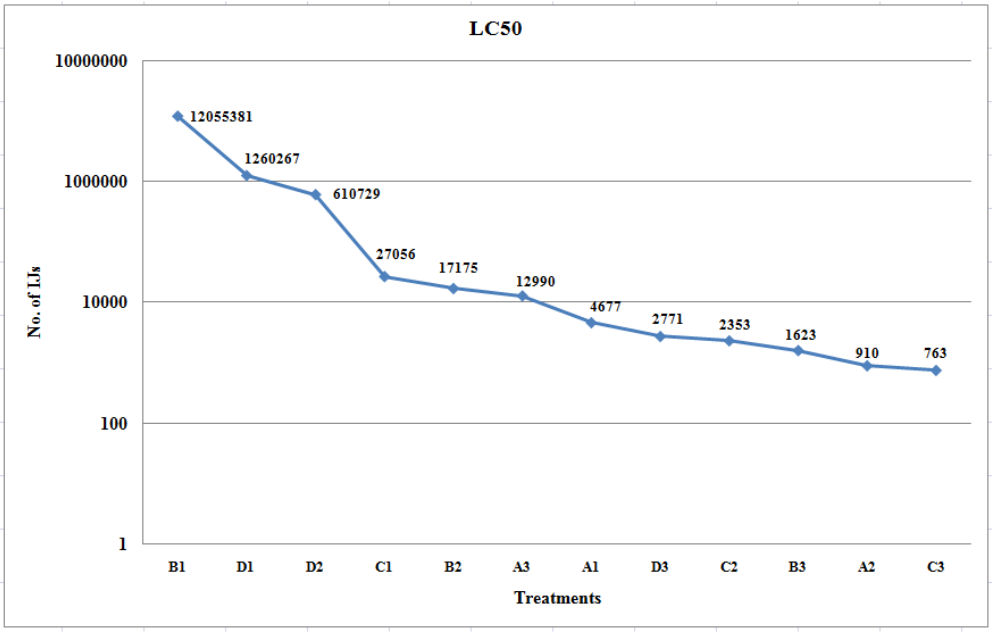
Laznik و همکاران با بررسی اثر *S. feltiae* روی حشره کامل *S. oryzae* در چهار دمای مختلف، نتایج مشابه این تحقیق را به دست آوردند، به‌طوری که با افزایش دما، میزان مرگ و میر سرخرطومی برنج نیز افزایش یافت (Laznik *et al.*, 2010). در تحقیقی که توسط Aydin & Susurluk انجام شد، تاثیر *S. feltiae* را روی لارو سن آخر *Tenebrio molitor* L. در دماهای ۱۲، ۱۸ و ۲۵ درجه سلسیوس آزمایش کردند و بهترین نتیجه را در ۲۵ درجه سلسیوس با ۹۷/۵٪ مرگ و میر گزارش کردند که با نتایج این تحقیق مشابهت دارند (Aydin & Susurluk, 2004).

نتایج آزمایش تاثیر *S. feltiae* بر سرخرطومی برنج نشان داد که غلظت ۲۰۰۰ لارو عفونت‌زای نماتد در میلی‌لیتر، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و پس از ۷۲ ساعت بیشترین تلفات را سبب شده است و لذا دارای بیشترین تاثیر می‌باشد. از طرف دیگر، نه تنها غلظت نماتد در کنترل این آفت تاثیرگذار است، بلکه دمای محیط و مدت زمان پس از تلقیح نماتد بیمارگر بر افزایش کارآیی نماتد نقش مهمی دارد، به‌طوری که با بالا رفتن دما تا ۳۰ درجه سلسیوس، کارآیی این بیمارگر نیز افزایش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد که افزایش در میزان تحرک، تغذیه، حجم بدن و در نتیجه افزایش اندازه و ابعاد منافذ طبیعی (دهان، مخرج و سوراخ‌های تنفسی)، سن حشره و به احتمال قوی حساسیت مرحله رشدی آفت به باکتری همزیست (*Xenorhabdus nematophilus*) با نماتد بیمارگر از دلایل عمده تاثیر دما در این مرحله از رشد حشره بوده است. می‌توان گفت که دلیل احتمالی مشاهده تاثیرات متفاوت در درجه حرارت‌های مختلف روی کارآیی نماتدهای بیمارگر این است که متابولیسم نماتد و باکتری همزیست با آن، همراه با افزایش درجه حرارت تا ۳۰ درجه سلسیوس افزایش می‌یابد (Susurluk, 2006). بنابراین، نه تنها درصد نفوذ نماتدها افزایش می‌یابد، بلکه تولید سم و رشد باکتری همزیست بسیار زیاد می‌شود (Forst & Nealson, 1996; Forst & Clarke, 2002; Glazer, 2001). به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود که گونه *S. feltiae* جدا شده از استان کهگیلویه و بویراحمد در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بیشترین

تاثیر را روی سرخوطومی برنج داشته است. زمان نیز تاثیر معنی‌داری روی مرگ و میر داشت به‌طوری که بیشترین مرگ و میر پس از ۷۲ ساعت مشاهده گردید.

شکل ۱- تاثیر *S. feltiae* بر روی تعداد لارو عفونی لازم برای کشتن ۵۰٪ حشره بالغ *S. oryzae* مورد آزمایش (LC_{50})

Fig. 1. Influence of *S. feltiae* on the concentration needed to kill 50% (LC_{50}) of *S. oryzae* adult



***Treatments:** **A1:** 25 ºC, 48hr; **A2:** 25 ºC, 72hr; **A3:** 25ºC, 24hr; **B1:** 27.5 ºC, 24hr; **B2:** 27.5 ºC, 48hr; **B3:** 27.5 ºC, 72hr; **C1:** 30 ºC, 24hr; **C2:** 30 ºC, 48hr; **C3:** 30 ºC, 72hr; **D1:** 32.5 ºC, 24hr; **D2:** 32.5 ºC, 48hr; **D3:** 32.5 ºC, 72hr

References

Abdollahi, M. 2009. A survey on entomopathogenic nematodes in Kohgiluyeh and Boyerahmad province. Final report of research project,Yasouj University, Yasouj, Iran. 116pp.

Abdollahi, M. 2010. Report of *Steinernema feltiae* in Kohgiluyeh and Boyerahmad province, Iran. In: Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress. 31 July to 3 August, Iranian Research Institute of Plant Protection, Evin, Tehran, Iran. Vol II, P. 589.

Abdollahi, M., Falahi, M. and Haghani, M. 2012. Entomopathogenic potential of *Panagrolaimus* sp. Isolated from Kohgiluyeh and Boyer Ahmad province, Iran. In: Proceedings of the 20th Iranian Plant Protection Congress, 25-28 August, Shiraz University, Shiraz, Iran, Vol II, P. 650.

Aramideh, Sh., Safarali Zadeh, M. A., Purmirza, A. A. and Parvizi, R. 2005. Study of sensitivity of larvae, pupa and pre-pupa stages of *Spodoptera exigua* H. to *Steinernema carpocapsae* under laboratory condition and on sugar cane plant. Journal of Agricultural and Natural Sources, 12(5): 159-166.

Athanassioua C. G., Palyvosa, N. E. and Kakouli-Duarte, T. 2008. Insecticidal effect of *Steinernema feltiae*) Filipjev (Nematoda: Steinernematidae) against *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in stored wheat. Journal of Stored Products Research, 44: 52-57.

Aydin, H. and Susurluk, A. 2004. Competitive abilities of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the same host at different tempratures. Turkish Journal of Biology, 29: 35-39.

Bagheri Zenuz, A. 1996. The Pest of the Stored Products and Methods of Control. Sepehr Nashr, 309pp.

Bedding, R. A. and Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil, Nematologica, 21**:** 109-110.

Bell, C. H. and Wilson, S. M. 1995. Phosphine tolerance and resistance in *Trogoderma granarium* (Everts) (Coleoptera: Dermestidae). Journal of Stored Products Research, 31: 199-205.

Daglish, G. J. and Collins, P. J. 1999. Improving the relevance of assays for phosphine resistance, pp. 584-503. In: Jin, X., Q., Liang, Y. S., Liang, X. C., Tan and Guan, L.H. (eds.), Stored product protection. Publishing House of Science and Technology, Chengdu, China.

Falahi, M., Abdollahi, M., Roodaki, M. and Haghani, M. 2011. Efficacy of *Steinernema carpocapsae* for control of the adults of alfalfa weevil, *Hypera postica*. In: National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies (MAST). September 10-12, 2011. Zanjan, Iran. pp: 518-521.

Forst, S. and Clarke, D. 2002. Bacteria-Nematode symbiosis, pp. 57-77. In: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology, CABI Publishing.

Forst, S. and Nealson, K. 1996. Molecular biology of the symbiotic pathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. Microbiology Review, 60: 21-43.

Georgis, R., Koppenhofer, A. M., Lacey, L. A., Be´lair, G., Duncan, L. W., Grewal, P. S., Samish, M., Tan, L., Torr, P., and van Tol, R. W. H. M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. Biological Control, 38:103-123.

Grewal, P. S., Ehlers, R. U. and Shapiro-Ilan, D. 2006. Nematodes As Biocontrol Agents. CAB publishing, CAB International, Oxon. 505 pp.

Glazer I. 2001. Survival Biology**,** pp: 169-187. In: Gaugler R. (ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing.

Glazer, I. and Navon, A. 1990. Activity and persistence of entomoparasitic nematodes tested against *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 83: 1795-1800.

Haque, M. A., Nakakita, H., Ikenaga, H. and Sota, N. 2000. Development inhibiting activity of some tropical plants against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research, 36: 281-287.

Herrman, J. 1993. The role of the world health organization in the evaluation of pesticides. Regul. Toxicology and Pharmacology, 17: 182-186.

Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K. and Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? Biological Control, 21: 230-248.

Laznik, Z., Toth, T., Lakatos, T., Vidrih, M. and Trdan, S. 2010. The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against Adult of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. Journal of Food, Agriculture and Environment, 8(1): 150-154.

Laznik, Z. and Trdan, S. 2012. Entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) in Slovenia: From Tabula Rasa to Implementation into Crop Production Systems, Insecticides – Advances, pp: 627-656. In: Farzana P. (ed.), Integrated Pest Management, Rijeka, InTech, str.

Lee, B. H., Choi, W. S., Lee, S. E. and Park, B. S. 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. Crop Protection, 20: 317-320.

Lucskai, A. 1999. Identification key to entomopathogenic nematode species. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 34(4): 317-325.

Modarres Najaf Abadi, S. 2002. Evaluation of Stored Product Pests Damage to Wheat and Barley in Sistan. In: 15th Plant Protection Congress of Iran. September 7-11, Kermanshah, Iran. p. 144.

Oestergaard, J., Belau, C., Strauch, O., Ester, A., van Rozen, K. and Ehlers, R. U. 2006. Biological control of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) using entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.) and *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. Biological Control, 39: 525-531.

Parvizi, R., Barooti, Sh. and Adldoost, H. 1994. Report on insect parasitic nematodes in Iran. Journal of Plant Pests and Diseases, 62: 109.

Parvizi, R., Barooti, Sh. and Adldoost, H. 1998. Entomopathogenic nematodes on some crown borer pests in West Azerbaijan . In: Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress. August 23-27, Karaj, Iran. p. 315.

Parvizi, R. 2000. Possibility of biological control of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, with entomopathogenic nematodes. In: Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress. September 4-7, Esfahan, Iran. p. 66.

Parvizi, R. 2001. Survey on pathogenicity of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* sp. and *Heterorhabditis bacteriophora* infesting larval *Polyphylla olivieri*. Journal of Entomological Society of Iran, 21: 63-72.

Poinar, G. O. 1990. Taxonomy and Biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: R. Gaugler and H.K. Kaya (ed.) *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*, New York: Marcel Dekker, pp: 23-61.

Ramos-Rodriguez, O., Campbell, J. F. and Ramaswamy, S. B. 2006. Pathogenicity of three species of entomopathogenic nematodes to some major stored-product insect pests. Journal of Stored Products Research, 42: 241-252.

Richardson, H. 1996. Pesticide application and community health hazard. Agriculture Engineering Australia, 25: 13-19.

Roodaki, M., Haghani, M., Falahi, M. and Abdollahi, M. 2011. The response of the alfalfa weevil, *Hypera postica,* adults to *Steinernema feltiae* In vitro. In: National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies (MAST). September 10-12, 2011. Zanjan, Iran. pp: 514-517.

Roodaki, M., Haghani, M. Falahi, M. and Abdollahi, M. 2012. The effect of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) on mortality of the last instar larvae and pupae of *Plodia interpunctella* (Huebner) under laboratory conditions. Plant Pest Research, 2(2): 33-40.

Schauff, M. E. and LaSalle, J. 1998. The relevance of systematics to biological control: protecting the investment in research. In: Zaluki, M.P., Drew, R.A.I. and White, G.G. (Ed.) Pest Management Future Challenges. Proceedings of the Sixth Australasian Applied Entomological Research Conference. Brisbane, pp: 425–436.

Schroer, S., and Ehlers, R. U. 2005. Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). Biological Control, 33:81–86.

Shahina, F and Salma, J. 2010. Laboratory evaluation of seven pakistani strains of entomopathogenic nematode against stored grain insect pest *Sitophlus oryzae* L. Pakistan Journal of Nematology, 28(2): 295-305.

Shayya, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J. and Sukprakarn, C. 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. Journal of Stored Products Research, 33: 7-15.

Susurluk, A. 2006. Effectiveness of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae* against *Tenebrio molitor* (Yellow Mealworm) larvae in different soil types at different temperatures. Turkish Journal of Biology, 30: 199-205.

Tamas, K. T. 1990. Study on the production possibilities of botanical pesticides in developing African countries. Unido Press, 98pp.

Trdan, S., Vidrih, M. and Valič, N. 2006. Activity of four entomopathogenic nematode species against young adults of *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) under laboratory conditions. Journal of Plant Diseases and Protection, 113:168-173.

Wiesner, A. 1993. Die Induktion der Immunabwehr eines Insekts *(Galleria mellonella,* Lepidoptera*)* durch synthetische Materialien und arteigene Haemolymphfaktoren. PhD Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany, 107 pp.

Woodring, J. L. and Kaya, H. K. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes*:* A Handbook of Biology and Techniques. Southern Cooperative Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayettville, Arkansas, 30 pp.

Yee, W. L. and Lacey, L. A. 2003. Stage-specific mortality of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) exposed to three species of *Steinernema* nematodes, Biological Control, 27: 349-356.

Journal of Entomological Research

Volume 5, Issue 2, pages: 83-94

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

Isolation of *Steinernema feltiae* and its pathogenicity on rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Col.: Curculionidae)

M. Roodaki[1], M. Haghani[2*], M. Abdollahi[2]

1- Graduated student of Entomology, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
2- Respectively Assistant Professor and Associate Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

Abstract

Extreme use of pesticides on stored grains is hazardous for non-target organisms and result in resistance of the insects to the pesticides, pollution of the environment and etc. Nowadays, non-chemical methods, including biological agents are considered as safe methods to control the stored grain pests. Entomopathogenic nematodes are one of the most important biocontrol agents. A survey was designed to investigate the presence and efficiency of entomopathogenic nematodes in the soils of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Iran. Sixty nine soil samples were collected from different regions of the province in 2010. *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae* and *Panagrolaimus* sp. were isolated. Because of danger in the use of chemical pesticides to protect the stored products, this study was performed to determine the efficiency of *S. feltiae* on adults of rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.), one of the most important pests of stored products. Under laboratory condition, adult insects were received different concentrations of infective juveniles (Ij) (0, 250, 500, 1000 and 2000 per ml) at different temperatures (25, 27.5, 30 and 32.5ºC). Insects were placed on a double layered filter paper saturated with 1 ml of IJs suspension in 9 cm petri dishes. Mortality of the insects recorded every 24hrs, for three days. The best result (77.5% mortality) observed after 72 hours of exposure at concentration of 2000 IJs in 30ºC.

Key words: Entomopathogenic nematode, *Sitophilus oryzae*, *Steinernema feltiae*, stored product

* Corresponding Author, E-mail: *haghanima@yahoo.com*
Received: 4 Feb. 2012 - Accepted: 8 Jan. 2012