جداسازی و شناسایی قارچ‌های مرض‌آور حشرات از خاک‌های ولایت بدخشان و میزان تأثیر آن‌ها بالای موریانهٔ نوع (Anacanthotermes vagan)

پوهنیار محمدحسین فلاح‌زاده و پوهاند محمد سلیم رحیمی[۱۵]
تقریظ‌دهنده: پوهاند داکتر سلیم جمیلی

مجلهٔ علمی- تحقیقی حوزهٔ علوم طبیعی پوهنتون کابل، ۱ (۳) ۱۳۹۹

چکیده

در یک نمونه‌برداری به‌منظور دریافت قارچ‌های مرض‌آوری حشرات از ولایت بدخشان دو نوع آن یعنی Metarhizium anisopliae و Metarhizium robertsii پس از مطالعهٔ دقیق مورفولوژیکی و مالیکیولی شناسایی گردید. بررسی میزان تولید کونید یا M. Robertsii بومی افغانستان و Beauveria bassiana بومی ایران روی چهار محیط طبیعی جامد متفاوت که شامل میده‌گی برنج، میده‌گی گندم، ماش سبز و بورهٔ اره بوده در شرایط معیاری مورد آزمایش قرار گرفتند. یک نوع قارچ شناسایی‌شده از خاک‌های ولایت بدخشان با دو نوع قارچ‌های (Beauveria bassiana، Beauveria varroa) شناسایی‌شده از خاک‌های ایران در شرایط آزمایش‌گاهی و نیمه‌آزمایش‌گاهی با غلظت‌های شامل 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کونیدیا برفی‌لیتر در قالب یک طرح کاملاً تصادفی آزمون فاکتوریل علیه موریانه نوع Anacanthotermes vagans انجام شد که بیشترین مرگ‌ومیر را غلظت 10^8 نشان داد. نتیجه تجزیهٔ ارقام نشان‌داد که قارچ مرض‌آوری حشرات بومی افغانستان (M. Robertsii) بیشترین اثر مرگ‌ومیر را روی موریانه‌ها داشت.

اصطلاحات کلیدی: دشمنان طبیعی حشرات؛ شناسایی مرض‌آورهای حشرات؛ شناسایی مورفولوژیکی؛ شناسایی مالیکیولی؛ کنترل بیولوژیکی؛ قارچ‌های مرض‌آور حشرات

Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from the soil of Badakhshan province and their mycoinsecticidal effects against subterranean termite (Aanacanthotermes vagans)

Jr. Teaching Asstt. M. Hussain Fallahzadah & Professor M.Salim Rahimi

Abstract

In a survey of entomopathogenic fungi (EPF) in the Badakhshan province, two species i.e. Metarhizium robertsii and Metarhizium anisopliae were identified by using morphological and molecular methods. For mass production of EPF two isolates including B.bassiana and M. robertsii with four different raw substrates (broken rice, broken wheat, green gram, and saw dust) solid-state fermentation was used. The M. robertsii strain had the highest total conidial yields which obtained after 18 days on broken rice. For B. bassiana, the highest conidial yields were obtained after 18 days on green gram. The conidia suspension was applied against subterranean termite, Anacanthotermes vagans at four different concentrations (1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 conidia ml^{-1}). The highest mortality rate was obtained from 1×10^8 conidia ml^{-1} for both M.robertsii and B. bassiana. In general, the indigenous isolate sample M. robertsii was more virulent than B. bassiana while B. varroa does not effect on termites.

Keywords: Insect natural enemy; Entomopathogen; Morphological identification; Molecular identification; Biocontrol; Entomopathogenic fungi

ارجاع

فلاح‌زاده، محمدحسین، رحیمی، محمد سلیم. (۱۳۹۹). جداسازی و شناسایی قارچ‌های مرض‌آور حشرات از خاک‌های ولایت بدخشان و میزان تأثیر آن‌ها بالای موریانه نوع (Anacanthotermes vagan). مجلهٔ علمی- تحقیقی حوزهٔ علوم طبیعی پوهنتون کابل، شمارهٔ ۱ (۳)، صص ۱۸۱ – ۱۹۳.

---

[۱۵] استادان پوهنځی زراعت، پوهنتون کابل

مقدمه

هدف کنترل بیولوژیکی عبارت از کاهش جمعیت آفت به‌وسیلهٔ دشمنان طبیعی به تراکم پائین‌تر از سطح خسارهٔ اقتصادی، به صورت دائمی یا مؤقتی می‌باشد. دشمنان طبیعی آفت‌ها به‌عنوان عوامل کنترول تلفیقی نیز شناخته می شوند که شامل شکارگرها، پرازیتوئیدها و مرض‌آورها می‌باشند. هدف از کنترل بیولوژیکی، ریشه‌کن کردن آفاتی که به نباتات خساره وارد می‌کنند، نیست بلکه هدف کاهش جمعیت آن‌ها به‌حدی است که کم‌ترین خساره را به زراعت یا محیط‌زیست وارد کند [٦]. در حقیقت این روشی است که با عکس‌العمل محیطی بین موجودات زنده که خود می‌توانند آفات را کنترل کند. در یک محیط طبیعی یعنی جایی‌که بشر کمترین دخالت را در اکوسیستم دارد آفات و مرض‌آورهای نباتی همیشه وجود دارند اما در صورت عدم دخالت مستقیم بشر جمعیت آن‌ها همیشه در حال تعادل و به‌حد نارمل است [۱، ۳].

یکی از عوامل مهم برای شروع کار کنترل بیولوژیکی، آشنایی با مراحل مختلف رشد آفات و شناسایی مرحله‌ای است که بیشترین خساره را به نباتات وارد می‌کنند. بیشتر روش‌های کنترل بیولوژیکی بر پایهٔ جذب بیشتر حشرات مفیده در مزارع و باغ‌ها پایه‌گذاری شده‌اند. مرض‌آورها، گروه بسیار مهم در کنترل طبیعی بندپایان محسوب می‌شوند. برخی مواقع انتشار خود به‌خودی مرض‌آورها در جمعیت آفات اتفاق می‌افتند. مثل انتشار قارچی و ویروسی که به‌صورت دوره‌ای تلفات بالایی را در جمعیت لاراوهای Lamantria dispar در آمریکای شمالی وارد کرده است [١٤]. مهم‌ترین مرض‌آورهای بندپایان شامل باکتریاها، ویرس‌ها، قارچ‌ها و نیماتودها می‌باشند. [۲، ۱۲].

مروری بر آثار گذشته

قارچ‌های مرض‌آوری حشرات توانایی مصابیت طیف گسترده از حشرات را دارند و این موضوع بااهمیت اقتصادی آن‌ها در تنظیم تلفیقی آفات نیز همراه است [۱۵، ۱۸]. سلسله‌ی قارچ‌ها طور تقریبی با یک‌صد‌وده‌هزار نوع توصیف‌شده است [۹، ١٤] که در حدود ۷۵۰ نوع در نود جنس به‌عنوان مرض‌آورهای حشرات شناخته شده اند [٦]. از جنبه‌ی کاربردی، در مبارزه‌ی تلفیقی بیشتر از بیست نوع قارچ‌های مرض‌آور استفاده نمی‌شود [۹].

به‌طور عمده یازده جنس Lagenidium Hirsutella، Erynia ،Entomophthora ،Entomophaga ،Beauveria Peacilomyces, Nomuraea Neozygite، Metarhizium، و Verticillium قرار دارند. قارچ‌های B.bassiana و M.anisopliae وسعت میزبانی گسترده دارند [۲، ۸]. این قارچ‌ها بیشترین تأثیر را روی افراد

ردیف‌های فلس‌دار بالان، بال غشائیان، راست‌بالان، سخت‌بال‌پوشان و دو بالان دارند. از جنس Beauveria تاکنون هفت نوع معرفی‌شده است. از این میان دو نوع B.bassiana و B.brongniartii به‌عنوان حشره‌کش میکروبی برای مبارزه با آفات مختلف زراعتی و خاکزی مورد استفاده قرارگرفته اند [۱۷]. قارچ مرض‌آور B.bassiana نوعی خاکزی است و تجریدهای آن معمولاً حشراتی راکه داخل خاک زندگی می‌کنند یا با خاک در تماس هستند، مصاب می‌سازد. نوع‌های جنس Beauveria در محلات مختلف از قبیل خاک، مواد در حال پوسیدن و مواد غذایی یافت می‌شوند. در ضمن باید یادآور شد که برخی از نوع‌های این جنس از حشرات جدا شده اند [۱۱]. قارچ مرض‌آور M.anisopliae با بیش از دوصد نوع میزبان که بیش‌تر آن‌ها خاکزی هستند، امروزه در سطح وسیع توسط محققان متعدد برای مبارزه با آفات نباتات زراعتی و جنگلی استفاده می‌شود [۷، ۱۳].

در شرایط مزرعه، اغلب موارد قارچ های مرض‌آور حشرات را می‌توان از خاک و حشرات آن اکوسیستم جداسازی و مشاهده نمود [۲، ٤]. فراوانی، گستردگی و نقش مهم قارچ‌های مرض‌آور در تنظیم جمعیت حشرات باعث شده است تا مطالعات زیاد روی شناسایی این عوامل صورت گیرد. نوع‌های بومی قارچ‌های مرض‌آور، در بسیاری از موارد به‌عنوان یک عامل مؤفق مبارزۀ تلفیقی برای آفات یک منطقه مطرح هستند. به نظر می‌رسد، سازگاری بهتر قارچ‌های مرض‌آور با سایر حشرات موجود در یک سیستم طبیعی و نیز تعادل آن‌ها با شرایط آب‌وهوای منطقه باعث می‌شود تا انواع بومی از نظر کارایی بهتر در مقایسه با انواع تجارتی از خود نشان دهند. در نتیجه، تلاش برای جداسازی و شناسایی نوع بومی قارچ‌های مرض‌آور که دارای توافق بیشتر با محیط اطراف خود هستند، باعث می‌شود تا مؤثریت بهتر نسبت به انواع تجارتی در تنظیم تلفیقی آفات منطقه داشته باشند [۱، ۸، ۱۹].

استفاده از انواع بومی قارچ‌های مرض‌آور برای مبارزه با آفات توسط محققان زیاد مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۳]. زیرا این عوامل به‌خوبی می‌توانند حشرات را در محیط‌های طبیعی مصاب کنند Kim و Kim (۲۰۰۸). از انواع بومی و تجارتی قارچ‌های مرض‌آوری حشرات برای مبارزه با شپشک پنبه Aphis gossypii (Glovet) استفاده کردند. در این مطالعه، فیصدی مرگ‌ومیر شپشک‌هایی که با تجریدهای بومی قارچ‌های مرض‌آور استفاده شده بودند، بیشتر از انواع تجارتی برآورد شد. مطابق به نتیجۀ مطالعات این محققان، تجریدهای بومی به‌دلیل داشتن سازگاری بالا با محیط اطراف خود قدرت کشندگی بیشتری روی شپشک‌ها ایجاد می‌کنند. از سوی دیگر، قدرت جوانه‌زنی و نفوذ در تجریدهای بومی قارچ‌های مرض‌آوری حشرات بیشتر از انواع تجارتی برآورد شده است [١٤].

کاربرد قارچ‌های مرض‌آوری حشرات به‌عنوان عوامل تنظیم‌کننده آفات در منطقه‌ای خاص، نیازمند اطلاعات در مورد سایر دشمنان طبیعی موجود در اکوسیستم نیز می‌باشد. ورود یک عوامل کنترل بیولوجیکی خارجی به یک محیط، ممکن است سایر جمعیت‌های طبیعی را تحت تأثیر قرار داده و این سبب شکست برنامه‌های تنظیم تلفیقی شود [۸]. ذکر این نکته ضروری است که قارچ‌های مرض‌آور حشرات را می‌توان از طریق تله‌گذاری با خاک مصاب به این عوامل جداسازی و سپس آن‌ها را خالص نمود [۱۹].

برای جداسازی قارچ‌های مرض‌آور حشرات روش تله‌گذاری با استفاده از لاروا پروانهٔ موم‌خوار بزرگ Galleria mellonella (Linnaeus) یا حشرات دیگر مانند کرم آرد Tenebrio molitor (Linnaeus) بسیار متداول است. این روش نخستین دفعه توسط Zimmerman (۱۹۸٦)، برای نیماتودها و قارچ‌های مرض‌آور معرفی و جای‌گزین بسیاری از روش‌های سنتی و قدیمی گردید [۱، ۵].

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری طی سال ۱۳۹۷ از ولایت بدخشان از سه محل متفاوت که شامل خاک‌های چمن‌زارهای کنار دریا، باغ‌ها و کشت زارها بودند صورت گرفته و به آزمایش‌گاه کنترل بیولوژیکی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال داده شد. به‌منظور قارچ‌های مرض‌آور حشرات از لارواهاي سن اخیر پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ استفاده گردید. لارواهای مرده با توجه به علایم و نشانه‌های مصابیت به‌وسیلهٔ قارچ‌ها به تله وایت (White 1929) انتقال داده شد. تجریدهای قارچ‌های که لاروا پروانه موم‌خوار را مصاب کرده بودند به‌نام‌های F 01، F02 و F 03 اسم‌گذاری شدند. جهت شناسایی مورفولوژیکی قارچ‌های مرض‌آور از کلید هامبر (۲۰۰۵)، استفاده گردید. جهت شنا سایی مالیکیولی نوع قارچ‌های مرض‌آوری حشرات DNA آن‌ها بر طبق دستورالعمل با استفاده از کیت ژنومی کیاژن (Qiagen Genomic DNA Kits) استخراج گردید. درنهایت، DNA های به‌دست‌آمده تا زمان استفاده، در فریزر با حرارت ۱ ± ۲۰- درجهٔ سانتی گرید نگه‌داری گردید.

واکنش زنجیره‌ای پولیمراز PCR

به‌منظور شناسایی مالیکیولی انواع قارچ‌های مرض‌آور جمع‌آوری‌شده از تکثیر ناحیه‌ی ژنی ITS4-5 استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پولیمراز برای تکثیر ناحیهٔ ITS4-5 در حجم بیست‌وپنج میکرو لیتر انجام پذیرفت. سلسله‌یابی محصول PCR در یک دستگاه DNAanalyzer با ارسال به شرکت سلسله‌یابی بایونری کوریای جنوبی انجام پذیرفت. کروماتوگرام سلسله‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار BioEdit بررسی گردیده و ترتیب شدند. رشته‌های مستقیم و معکوس با استفاده از

نرم‌افزار BioEdit باهم اتصال داده شدند. توالی‌ها با دیتاهای معتبر در بانک جین (GeneBank) از طریق NCBI جهت شناسایی انجام پذیرفت.

بررسی تولید کونیدیای قارچ‌های مرض‌آوری حشرات روی محیط‌های طبیعی جامد

به‌منظور بررسی میزان تولید کونید یا یک نوع قارچ مرض‌آور (Metarhizium robertsii) بومی افغانستان و یک نوع قارچ مرض‌آور (Beauveria bassiana) بومی ایران روی چهار محیط طبیعی جامد متفاوت که شامل میده‌گی برج، میده‌گی گندم، ماش سبز و بوره اره بودند، در شرایط معیاری مورد آزمایش قرار گرفتند. محیط‌های مورد استفاده برای سه تا هفت ساعت (میده‌گی برنج و میده‌گی گندم به مدت سه‌ساعت بورۀاره و ماش‌سبز به مدت هفت ساعت) قبل از تلقیح در آب تر کرده شدند و دوباره آب آن‌ها خارج شده و برای یک ساعت در اوتوکلف تعقیم شدند. بعد از سرد شدن، بالای هریک محیط‌های جامد سه میلی‌لیتر محلول حاوی قارچ تحت شرایط کاملاً تعقیم شده اضافه گردید. تمامی مواد غذایی پس از مصاب کردن به کونیدیای قارچ در جرمنیتور با شرایط معیاری به مدت ۱۸ روز قرار گرفتند.

بررسی مرض‌آوری قارچ‌ها روی موریانه در شرایط آزمایش‌گاهی

در این تحقیق از سه نوع قارچ‌های مرض‌آور که شامل M. robertsii، B. bassiana و B. varroa استفاده گردید است. قارچ‌های مرض‌آور با غلظت‌های شامل 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8کونیدیا فی میلی‌لیتر یک طرح کاملاً تصادفی آزمون فاکتوریل با پنج تریتمنت و سه تکرار انجام شد. برای تعیین غلظت‌های مختلف کونیدیا از استفاده نیوبارهموسایتومتری (Neubauer Haemocytometry) استفاده گردید. از پتری دیش‌های ۹سانتی‌متری برای انجام این آزمایش استفاده گردید. در هرپتری دیش حاوی کاغذ صافی ۶۰۰ مایکرولیترمحلول (ماده تعلیق شده) قارچی ریخته شد و به مدت یک دقیقه گذا شته شد تاکمی خشک شوند. بعداً ده موریانه داخل هر پتری دیش قرار داده شده و در جرمنیتور با شرایط معیاری (1 ± 28) نگه‌داری شدند. بعد از بیست‌وچهار ساعت میزان مرگ‌ومیر به‌صورت روزانه و به مدت ده روز ثبت شد.

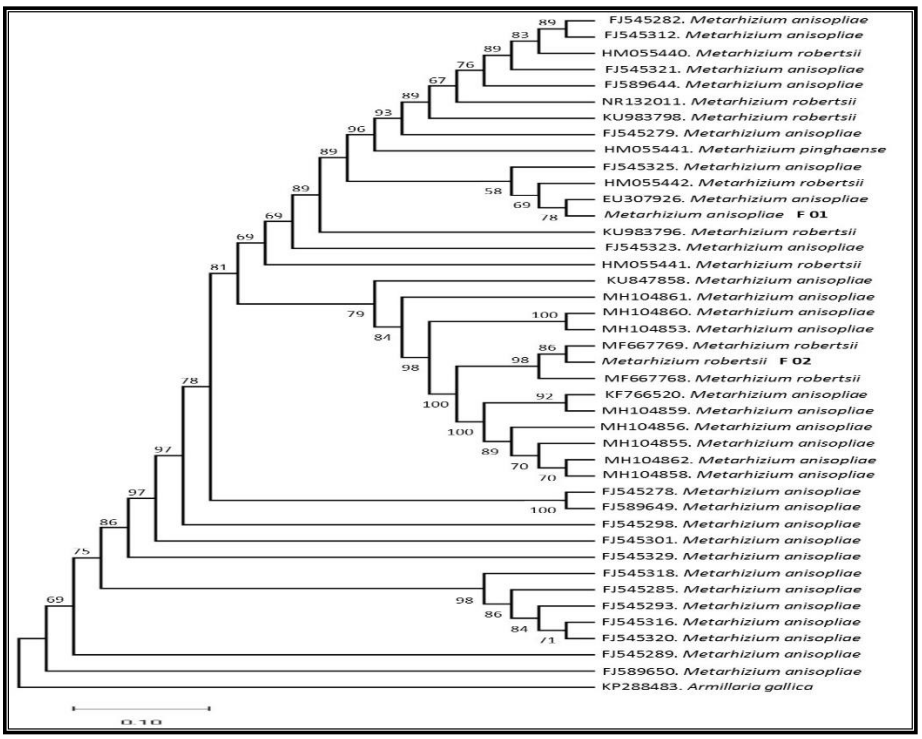
بررسی اثرات بیماری‌زایی در شرایط نیمه‌طبیعی

در این تحقیق از دو نوع قارچ‌های مرض‌آور که شامل B. Bassiana و M. robertsii ا ستفاده گردید. قارچ‌های مرض‌آور با غلظت‌های شامل 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8کونیدیا فی میلی‌لیتر یک طرح کاملاً ت صادفی آزمون فاکتوریل با پنج تریتمنت و سه تکرار انجام شد. از ظروف پلاستیکی ۱۲ سانتی‌متری برای انجام این آزمایش ا ستفاده گردید. ظروف روی خاک جا سازی شده و مقدار بورۀ اره به آن‌ها ا ضافه

گردید سپس در هر ظرف ده دانه موریانه رها گردیده و به‌مقدار ۱۰۰۰ مایکرو لیتر محلول قارچی با ادویه‌پاش دستی کوچک ادویه‌پاشی گردید. بعد از بیست‌وچهار ساعت میزان مرگ‌ومیر به‌صورت روزانه و به مدت دوازده روز ثبت شد.

نتایج حاصله

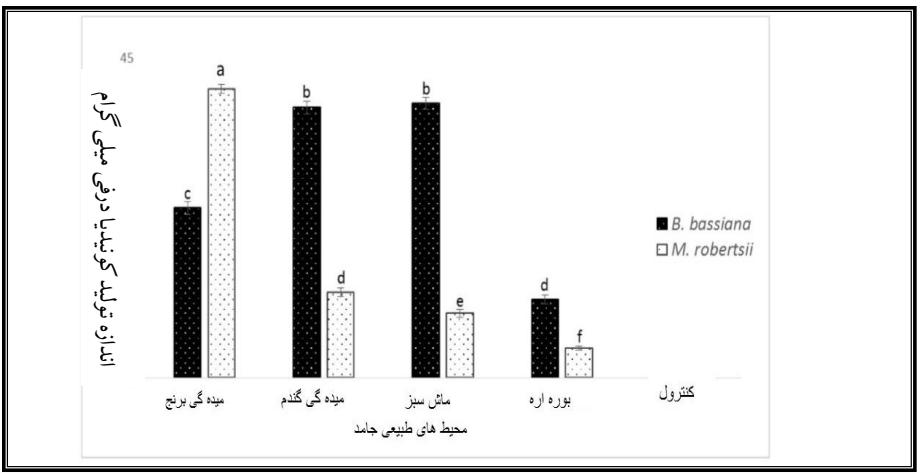
نتایج حاصل از این تحقیق در دو بخش جداگانه ارائه می‌شود. بخش اول شامل شناسایی تجریدهای بومی قارچ‌های مرض‌آور حشرات جمع‌آوری‌شده از خاک و سپس در ادامه، بخش مربوط به زهریت و سایر آزمایش انجام‌شده قارچ‌های مرض‌آور روی موریانه می‌باشد. پس از مطالعه دقیق مورفولوژیکی و مالیکیولی دریافت گردید که تجریدهای قارچ مرض‌آور حشرات جمع‌آوری شده از خاک‌های ولایت بدخشان متعلق به یک جینس (Metarhizium) می‌باشد. انواعی قارچ‌های مرض‌آور پس از تکثیر توالی یابی ناحیه ژینی ITS4-5، و رسم شجره جنیتکی مشخص گردید که تجرید F 01 متعلق نوع M. anisopliae، F 02 و F 03 متعلق به نوع M. Robertsii می‌باشند (شکل ۱).



شکل ۱: رسم شجره جنیتکی را نشان می‌دهد که برمبنای ناحیه جینی ITS به‌وسیله نرم‌افزار میگا با روش Maximum Likelihood بازسازی‌شده و تجریدهای شناسایی شده از خاک‌های ولایت بدحشان با تجریدهای دارای شماره دست‌رسی MF667769 و EU307926 در یک شاخه قرارگرفته است.

نتایج تولید کونیدیای قارچ‌های مرض‌آور روی محیط‌های طبیعی جامد

در این تحقیق رشد کونیدیا قارچ های M. Robertsii و B. bassiana تحت شرایط معیاری روی چندین مواد جامد طبیعی به شمول میده‌گی برنج، میده‌گی گندم، ماش سبز و بوره اره بررسی گردید. پس از تجزیه ارقام به‌وسیلۀ نرم‌افزار SAS میزان تولید کونید یا بعد از ۱۸ روز دارای تفاوت قابل‌ملاحظۀ، بین مواد‌های جامد [F= 4706.74, df= (4, 20),]، انواع قارچ‌ها [F= 2061.04, df= (1, 20), P<0.0001] و اثر متقابل بین مواد جامد و انواع قارچ‌ها [F= 655.93, df= (4, 20), P<0.0001] بودند (شکل ۲).



شکل ۲: اوسط کونیدیای (±SE) تولیدشده به‌وسیله قارچ‌های M. Rorbertsii و B.bassiana را بالای چهار محیط‌طبیعی جامد نشان می‌دهد و تیرهای چارت نشان‌دهنده انحراف معیاری از توسط آن‌ها است. حروف مختلف نشان می‌دهد که تفاوت قابل‌ملاحظه‌ی تولید کونیدیای قارچ ها بالای محیط‌های طبیعی جامد براساس LSMEAN وجود دارد.

نتایج آزمایش بیماری‌زایی قارچ‌های مرض‌آور حشرات در محیط آزمایش‌گاهی بالای موریانه A. Vagans.

فیصدی مرگ‌ومیر ا صلاح شده‌ی تجمعی در موریانه طی چهار روز پس از ا ستفاده انواعی مختلف قارچ‌ها یعنی M.robertsii، B bassiana و B. Varroa مشاهده شدند. پس از تجزیه ارقام به‌وسیلۀ نرم‌افزار SAS میزان اثر انواعی مختلف قارچ در مرگ‌ومیر موریانه‌ها دارای تفاوت قابل ملاحظه بود ند [(F=104.08, df= (2, 30), p<0.0001)]. به‌همین منوال اثرات غلظت های قارچ‌های مرض‌آور حشرات بر مرگ‌ومیر موریانه‌ها دارای تفاوت قابل‌ملاحظه بودند [(F=28.98, df= (4, 30), p<0.0001)]. و اثر متقابل بین انواع قارچ ها و غلظت‌های مختلف هم

دارای تفاوت قابل‌ملاحظه بودند [(F=7.10, df= (8, 30), p<0.0001)]. نتیجه تجزیه ارقام نشان داد که قارچ مرض‌آور حشرات بومی افغانستان (M. robertsii) دارای اثر قابل‌ملاحظه بوده و بیشترین اثر مرگ‌ومیر را روی موریانه‌ها داشته‌اند [(F=33.34, df= (4, 30), p<0.0001)] . و B. Bassiana روی مرگ‌ومیر موریانه ها هم دارای اثر قابل‌ملاحظه بوده [(F=9.47, df= (4, 30), p<.0001)]. و در نهایت B. Varroa روی مرگ‌ومیر موریانه‌ها دارای اثر قابل‌ملاحظه نبود [(F=.0.38, df=(4, 30), p<0.8246)]. بیشترین مرگ‌ومیر موریانه‌ها در غلظت 10^8 کونید یا فی میلی‌لیتر چهار و شش روز پس از مصابیت برای قارچ‌های مرض‌آوری حشرات M. Robertsii و B. bassiana به‌ترتیب ثبت شد (جدول ۱).

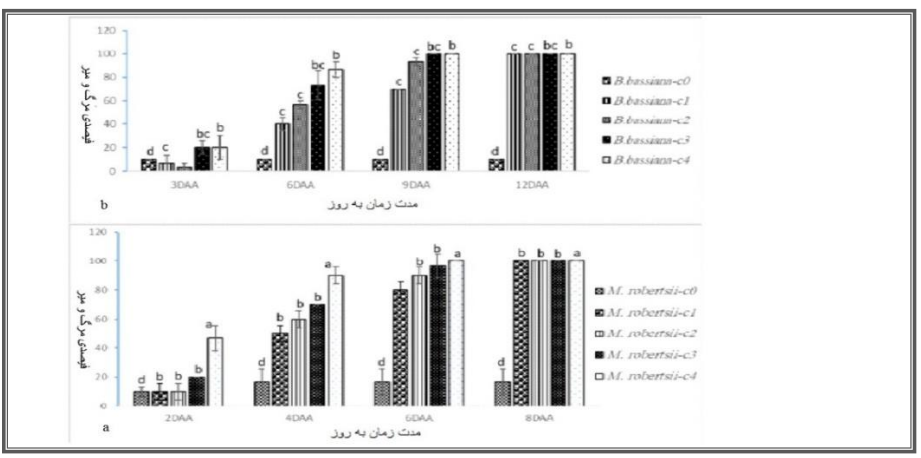
جدول ۱: نشاندهندهٔ مرض‌آوریی قارچ‌های مرض‌آور حشرات B. Bassiana, B. vorroa و M. robertsii در شرایط لابراتواری می‌باشند.

روزهای بعد از استعمال	2	4	6	8	10
	(فیصدی مرگ‌ومیر (± SE)		انواع قارچ‌ها (غلظت‌های کونیدیا فی میلی‌لیتر)		
B. bassiana					
0.05% Tween-80	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.33 ± 3.3	6.7 ± 3.3	6.7 ± 3.3 ^{f}
1×10^5 conidia ml^{-1}	3.3 ± 3.3	13 ± 6.7	43.3 ± 6.7	63 ± 3.3	100 ± 0.0 ^{ef}
1×10^6	3.3 ± 3.3	20 ± 5.7	63.2 ± 3.3	90 ± 5.7	100 ± 0. ^{def}
1×10^7	6.7 ± 3.3	23 ± 8.8	70 ± 11.5	100 ± 0.0	100 ± 0.0 ^{def}
1×10^8	13.4 ± 3.3	40 ± 5.7	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0 ^{bcd}
B. vorroa					
0.05% Tween-80	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 3.3	6.67 ± 3.3	6.67 ± 3.3 ^{f}
1×10^5 conidia ml-1	3.3 ± 3.3	3.3 ± 3.3	3.3 ± 3.3	10.0 ± 3.3	23.3 ± 3.0 ^{f}
1×10^6	3.3 ± 3.3	3.3 ± 3.3	6.7 ± 3.3	13.3 ± 3.3	26.7 ± 3.3 ^{f}
1×10^7	3.3 ± 3.3	3.3 ± 3.3	10.0 ± 5.7	23.3 ± 3.3	30.0 ± 0.0 ^{f}
1×10^8	0.0 ± 0.0	10 ± 3.3	20.0 ± 5.7	30.0 ± 7.7	40.0 ± 7.7 ^{ef}
M. robertsii					
0.05% Tween-80	5.0 ± 5.0	10 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10 ± 0.0	10.0 ± 0.0 ^{ef}
1×10^5 conidia ml^{-1}	10 ± 6.7	40 ± 10	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0 ^{cde}
1×10^6	13.3 ± 3.3	56 ± 10	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0 ^{bc}
1×10^7	23.3 ± 8.8	76 ± 8.8	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0 ^{ab}
1×10^8	53.3 ± 12	100 ± 8.8	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0 ^{a}

جدول فوق نشان‌دهنده تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌های مرض‌آوری حشرات M. robertsii، B. vorroa و B. bassian بالای موریانه نوع Anacantotermes vagans در مدت زمان ۱- ۱۰ روز پس از استعمال است. اعداد بعد ± نشان‌دهندهٔ انحراف معیاری از توسط آن‌ها است. حروف مختلف نشان می‌دهد که تفاوت قابل‌ملاحظه‌ی بین تأثیر انواع و غلظت‌ها براساس LSMEAN وجود دارد.

اثرات مرض‌آوری دو نوع قارچ مرض‌آور حشرات در شرایط نیمه‌طبیعی روی موریانه A. Vagans

بنابر اثر کشندگی فوق‌العاده که M. Robertsii و B. bassiana روی موریانه‌ها در شرایط آزمایش‌گاهی داشتند. به‌همین دلیل اثرات مرض‌آوری‌شان در شرایط نیمه‌طبیعی هم مورد بررسی قرار گرفتند. فیصدی مرگ‌ومیر اصلاح‌شده‌ی تجمعی در موریانه، طی پنج روز پس از استفاده انواعی قارچ M.robertsii و B. Bassiana مشاهده شدند. پس از تجزیه ارقام میزان اثر هر دو نوع قارچ در مرگ و میر موریانه‌ها دارای تفاوت قابل‌ملاحظه بودند [(F=64.22, df= (1, 20), p<0.0001)]. اثرات غلظت‌های قارچ‌های مرض‌آوری حشرات بر مرگ‌ومیر موریانه‌ها هم دارای تفاوت قابل‌ملاحظه بوند [(F=65.22, df= (4, 20), p<0.0001)]. و اثر متقابل بین انواعی قارچ‌ها و غلظت‌های مختلف دارای تفاوت قابل‌ملاحظه‌ی نبود [(F=7. 2.56, df= (4, 20), p<0.0706)]. نتیجه تجزیه ارقام در شرایط نیمه‌طبیعی هم مانند شرایط آزمایش‌گاهی نشان داد که قارچ مرض‌آور حشرات بومی افغانستان (M. Robertsii) دارای اثر قابل‌ملاحظه‌ی بوده و بیشترین اثر مرگ‌ومیر را روی موریانه‌ها داشته اند [(F= 45.72, df=(4,30), p<.0001)]. و B. Bassiana هم روی مرگ‌ومیر موریانه‌ها دارای اثر قابل‌ملاحظه بود [(F= 22.06, df=(4,30), p<0.0001)] (شکل ٤).



شکل ۳: نشان‌دهنده تاثیر غلظت‌های مختلف (c0، c1، c2، c3، c4 = غلظت‌ها) قارچ‌های مرض‌آور حشرات نوع M. Robertsii (a) و B. bassiana (b) بالای موریانه نوع Anacantotermes vagans درمدت زمان ۱-۱۲ روز پس از ا ستعمال است (DAA: روزهایی پس از استعمال). تیرهای چارت نشان‌دهنده انحراف معیاری از توسط آن‌ها است.حروف مختلف نشان می‌دهد که تفاوت قابل‌ملاحظه‌ی بین تأثیر انواع و غلظت‌ها بر اساس LSMEAN وجود دارد.

ذکر این نکته ضروری است پنج‌روز پس از نگه‌داری اجساد مردۀ موریانه‌های اسپری‌شده با غلظت‌های مختلف قارچ‌های مرض‌آور، علایم مصابیت پیشرفته با رشد سپور قارچ‌ها روی اجساد دیده شد.

مناقشه

قارچ‌های مرض‌آور حشرات عوامل مبارزهٔ تلفیقی هستند که هم به‌صورت طبیعی جمعیت حشرات را در سطح تعادل نگه‌می‌دارند و هم می‌توان آن‌ها را تکثیر نموده و به‌عنوان حشره‌کش میکروبی از آن استفاده نمود. هم‌چنین، قارچ‌های مرض‌آور حشرات به‌دلیل عمل‌کرد فیزیولوژیکی متفاوت در بدن میزبان و نیز توانایی نفوذ از طریق جلد، یکی از گزینه‌های احتمالی مناسب برای کنترل آفات زراعتی محسوب می‌شوند. جنس های متعلق به فایلم Entomophthoromycota مانند Beauveria، Metarhizium، Paecilomyces و چند جنس دیگر نماینده‌های مناسب برای تولید انبوه و استفاده برای مبارزه با آفات نباتات زراعتی، هستند[۷، ۱۲]

قارچ‌های مرض‌آور حشرات Metarhizium anisopliae و Beauveria bassiana اثرات کشندگی زیادی بالای حشرات ردیف‌های مختلف نشان می‌دهند محققان از این دو عامل به دفعات برای مبارزه با حشرات ردیف‌های مختلف استفاده کرده‌اند. برخی خصوصیات قارچ‌های مرض‌آور حشرات از قبیل گستردگی طیف تأثیر، پایداری و دوام مناسب در محیط‌زیست، مقاومت کم آفات در برابر آن‌ها، مرگ سریع میزبان، توانایی رشد در محیط‌های ارزان‌قیمت برای تولید و از همه مهم‌تر عدم تأثیر روی موجودات غیر هدف از جمله انسان باعث شده است که قارچ‌های مرض‌آور حشرات به‌عنوان عواملی مطلوب در برنامه‌های مبارزه‌ی تلفیقی شناخته شوند.

سنگ ها همکاران (۲۰۱۰)، غلظت های مختلف B.bassiana و M.anisopliae را بالای موریانه نوع Microtermes obesi در مزرعه و لابراتوار استعمال نمودند بعد از ۵ روز میزان تأثیر B.bassiana ۷۱,۱ فیصد و M.anisopliae ۱۰۰فیصد بود. هضمی و هم کاران (۲۰۱۶)، غلظت‌های مختلف M.anisopliae،B.bassiana و paecilomyces sp. را بالای موریانه نوع Globitermes sulphureus در لابراتواراستعمال نمودند بعد از ۵ روز میزان تأثیر B.bassiana ۷۰فیصد، paecilomyces sp ۸۰ فیصد و M.anisopliae ۱۰۰ فیصد بود. مبورو وهم کاران (۲۰۰۹)، غلظت های مختلف B.bassiana و M.anisopliae را بالای موریانه نوع Microtermes michaelseni در لابراتواراستعمال نمودند بعد از 4 روز میزان تأثیر B.bassiana به‌اندازه قابل‌ملاحظه‌ی نسبت به M.anisopliae کمتر بود.

هاجک و همکاران (۲۰۰۶)، میزان مرگ‌ومیر قانغوزک شاخک‌دراز نوع Anoplophora glabripennis که در معرض قارچ B.bassiana و M.anisopliae قرارگرفته بودند را متفاوت ارزیابی نمودند. میزان کشندگی نوع قارچ B.bassiana را حدود ۸۳.۴ فیصد M.anisopliae را ۶۰,۸ فیصد برآورد کرد. دوبویس و همکاران (۲۰۰۷)، بیماری‌زایی B.brongniartii و M.anisopliae را بالای قانغوزک

شاخک‌دراز نوع A.glabripennis بررسی نمودند. این محققان نشان دادند که B.brongniarti پس از ۹ روز ۷۸ قیصد و M.anisopliae ۶۲,۲ قیصد مرگ‌ومیر داشت.

در تحقیق حاضر غلظت‌های مختلف قارچ‌های شامل B.bassian ، B. varroa و M.anisopliae بالای موریانه نوع A. vagans استعمال گردیده و نتیجه به‌دست‌آمده با نتائج تحقیقات سنگ‌ها و هم‌کاران (۲۰۱۰)، هضمی و هم‌کاران (۲۰۱۶) و مبورو و هم‌کاران (۲۰۰۹) یک‌سان بوده و با نتایج تحقیقات هاجک و همکاران (۲۰۰۶) و دوبویس و همکاران (۲۰۰۷) به علت متفاوت بودن جنس حشره (قانغوزک) متفاوت می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، نشان می‌دهد که قارچ مرض‌آوری نوع M. Robertsii نسبت به قارچ مرض‌آوری حشرات نوع B.bassiana دارای اثرات کشندگی بیشتری بالای موریانه‌ها بوده و قارچ نوع B. varroa با داشتن خصوصیات کنه‌کشی بالای موریانه‌ها تأثیر قابل‌ملاحظه‌ی نداشت.

ازآنجای‌که موریانه‌ها دارای زندگی اجتماعی هستند به‌خاطر کنترل آن‌ها استفاده از عوامل میکروبی مانند قارچ‌های مرض‌آور حشرات گزینۀ خوبی است چون اگر یک موریانه به‌وسیلۀ یک سپور این عوامل میکروبی مصاب شود می‌تواند که تمام کالونی را مصاب کند.

از میان قارچ‌های مرض‌آور حشرات قسم که از این تحقیق و تحقیقات محققین دیگر استنباط می‌شود که انواعی مربوط به جنس Metarhizium بهترین نتیجه را می‌دهند.

برای تمام دهاقین، باغ‌داران و باشندگان منازل که از زیان موریانه دست به‌گریبان هستند سفارش می‌شود که به‌عوض استفاده از ادویه کیمیائی از انواع قارچ‌های مربوط به جنس Metarhizium به‌خاطر کنترل موریانه استفاده نمایند. چون موریانه‌ها زندگی اجتماعی داشته و در سوراخ‌ها زندگی می‌نمایند و رسانیدن ادویه به انتهای سوراخ موریانه کار دشواری است. بناءً اگر یک موریانه به‌وسیلۀ یک سپور قارچ‌های فوق‌الذکر مصاب شود ممکن است که موریانه داخل کالونی شده از بین برود و بعد از مردن موریانه سپور قارچ در داخل و خارج بدن موریانه رشد کرده و منتشر می‌شود و در نهایت تمام موریانه‌های همان کالونی به‌آسانی مصاب شده از بین خواهند رفت.

منابع

[1]. Azmi, W. A., Sulaiman, Z. A., Ishak, I., Kin, P, K., Earn Lin, G. L., and Addis, S. N. K. 2016. Virulence evaluation of entomopathogenic fungi to subterranean termites, Globitermes sulphureus (Insecta: isopteran). Malaysian Journal of Microbiology, 12: 492-497.

[2]. Abaajeh, A. R. 2014. Evaluation of entomopathogenic fungi (ascomycota) for the control of Cydia pomonella (lepidoptera: tortricidae). MSc Thesis, Cape Peninsula University.

[3]. Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J. and De Croos, J. N. A., 2001.Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus Metarhizium anisopliae: Uncovering cryptic species? Journal of Applied and Environmental Microbiology, 67: 1335–1342.

[4]. Dubois, T., Lund, J., Bauer, L. S. and Hajek, A. E. 2007. Virulence of entomopathogenic hypocrealean fungi infecting Anoplophora glabripennis. Biocontrol, 53: 517-528.

[5]. El Kichaoui, A. Y., Abu Asaker, B. A., and El-Hindi, M. W. 2017. Isolation, molecular identification and under Lab Evaluation of the entomopathogenic fungi M. anisopliae and B. bassiana against the red palm weevil R. ferrugineus in Gaza Strip. Scientific Research publishing, 7: 109-124.

[6]. Humber, R. A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. In: Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Lacey, L.A. (Eds). Academic Press, Amsterdam, the Netherlands. Pp: 151-187.

[7]. Habtegebriel, B., Getu, E., Dawd, M., Seyoum, E., Atnafu, G., Khamis, F., Hilbur, Y., Ekesi, S., and Larsson, M. C. 2016. Molecular characterization and evaluation of indigenous entomopathogenic fungal isolates against sorghum chafer, Pachnoda Interrupta (Olivier) in Ethiopia. Journal of Entomology and Nematology, 8: 34-45

[8]. Hussain A., Ahmed, S., and Shahid, M. 2010. Laboratory and field evaluation of Metarhizium anisopliae var. anisopliae for controlling subterranean termites. Neotropical Entomology, 40: 244-250.

[9]. Hajek, A. E., Huang, B., Dubois, T., Smith, M. T., Li, Z. 2006.Field studies of control of Anoplophora glabripennis (Coleoptera: Cerambycidae) using fiber bands containing the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and Beauveria brongniartii. Biocontrol Science and Technology, 16: 329-343.

[10]. Groth, M., Filho, R., Soares, V., and Bernardi, D. 2017. Pathogenicity of Metarhizium anisopliae isolates on Nezara viridula and Dichelops melacanthus in wheat crop. Agriculture insect biology, 84: 1-8.

[11]. Keller, S., Kessler, P. and Schweizer, C. 2003. Distribution of insectpathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to Beauveria brongniartii and Metarhizium anisopliae. Journal of Bio Control, 48:307-319.

[12]. Keller, S. and Zimmerman, G. 1989. Mycopathogens of soil insects. In: Insect-Fungus Interactions, Wilding, N., Collins, N. M., Hammond, P. M. and Webber, J. F. (Eds). Academic Press, London, 239–270.

[13]. Kim, J. J, and Kim, K. C. 2008. Selection of a highly virulent isolate of Lecanicillium attenuatum against cotton aphid. Journal of Asia-Pacific Entomology, 11: 1-4.

[14]. Lacey, L. A. 2017. Entomopathogens Used as Microbial Control Agents. In: L. A. Lacey, 2nd (ed.), microbial control of insect and mite pests. Academic Press is an imprint of Elsevier. PP 3-9.

[15]. Mbburu, D. M., Ochola, L., Maniania, N. K., Njagi, P. G. N., Gitonga, L. M., Ndungu, M. W., Wanjoya, A. K., Hassanali, A. 2009. Relationship between virulence and repellency of entomopathoginic isolates of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana to the termite Macrotermes michaelseni. Journal of Insect Physiology, 55: 774-780.

[16]. Patricia, H. S., Pedro, M. O., Talita, M. A., Daniele, S., Luis, F. A. A. and Maria, H. P. F. 2008. Selection of Beauveria bassiana isolates to control Alphitobius diaperinus.Journal of Invertebrate Pathology, 97: 83–90.

[17]. Roberts, D. W. and Humber, R. A. 1981. Entomogenous fungi. In: Biology of Conidial Fungi, Cole, G. T. and Kendrick, B. (Eds). Academic Press: New York.

[18]. Singha, D., Singha, B., and Dutta, B. K. 2010. Potential of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana in the control of tea termite Microtermes obesi Holmgren in vitro and under field conditions. Journal of Pest Science, 84: 69-75.

[19]. Steinwender, B. M., Enkerli, J., Widmer, F., Eilenberg, J., Thorup-Kristensen, K. and Meyling, N. V. 2014. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal Metarhizium community within an agroecosystem. Journal of Invertebrate Pathology, 123: 6-12.

[20]. Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae and its potential as a biocontrol agent. Journal of Animal Science, 37: 375-379.