

ارزیابی توانایی کشندگی قارچ *Metarhizium anisopliae* در مقابل موریهانه *Microcerotermes diversus* (Isoptera : Termitidae)

امیر چراغی*، بهزاد حبیب پور

گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

مخرب‌ترین موریهانه در استان خوزستان گونه *Microcerotermes diversus* (Isoptera : Termitidae) می‌باشد. در این پژوهش توانایی کشندگی قارچ *Metarhizium anisopliae* جدایه سراوان (DEMI 001) در مقابل موریهانه *M. diversus* در آزمون زیست‌سنجی غیرانتخابی به دو روش آغشته‌سازی کاغذ صافی و غوطه‌ورسازی موریهانه‌ها در سوسپانسیون اسپور قارچ و همچنین در آزمون زیست‌سنجی انتخابی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که غلظت و زمان کشندگی در روش آغشته‌سازی مقادیر بالاتری را در مقایسه با روش غوطه‌ورسازی دارند. کمترین میزان LC_{50} و LT_{50} مربوط به آزمون زیست‌سنجی غیرانتخابی به روش غوطه‌ورسازی بود که به ترتیب برابر با $3/1 \times 10^4$ اسپور در میلی‌لیتر و $1/0.2$ روز بودند. میزان تغذیه از کاغذ صافی تیمار شده و تیمار نشده در آزمون انتخابی به خوبی نشان داد که سوسپانسیون اسپور قارچ مورد نظر در غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق برای موریهانه هدف دورکنندگی نداشت. در مجموع این پژوهش نشان داد که میزان کشندگی قارچ بیمارگر *M. anisopliae* در مقابل موریهانه *M. diversus* با روش ارائه قارچ در جمعیت ارتباط دارد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌سنجی، قارچ بیمارگر حشرات، کنترل بیولوژیک، موریهانه

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : amircheraghi2009@gmail.com

تاریخ دریافت : ۹۰/۱۲/۱۱، تاریخ پذیرش : ۹۱/۹/۱۸

مقدمه

بررسی‌ها نشان می‌دهد که مهم‌ترین و مخرب‌ترین موربانه در استان خوزستان گونه *Habibpour*, (*Microcerotermes diversus* Silvestri (Isoptera: Termitidae) می‌باشد (Habibpour, 1994). این موربانه در کشورهای ایران، عراق، امارات، کویت، عربستان سعودی و عمان انتشار دارد (Edwards & Mill, 1986) و یکی از آفات مهم نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) در کشورهای ایران، عراق و عربستان سعودی است (Logan & El Bakri, 1990). این گونه در ایران از استان‌های خوزستان، بوشهر، سیستان و بلوچستان و یزد گزارش شده است (Habibpour, 1994). مدیریت معمول موربانه‌های زیرزمینی در ایران شامل استفاده از حشره‌کش‌های خاک کاربرد می‌باشد که به منظور کاهش یا حذف جمعیت جستجوگر موربانه‌ها استعمال می‌شوند (Habibpour, 2006). با این حال استفاده مداوم از موربانه‌کش‌های شیمیایی در محیط زیست نگران کننده است (Verma et al., 2009). کنترل بیولوژیک به عنوان یکی از روش‌های جایگزین آفت‌کش‌های موجود در کنترل موربانه‌ها محسوب می‌شود (Bayon et al., 2000). مطالعه بیمارگرها برای کنترل موربانه‌ها از اوایل سال ۱۹۶۵ آغاز شد (Wang & Powell, 2004). تمرکز اکثر تحقیقات روی دو گونه قارچ بیمارگر حشرات به نام‌های *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Metschnikoff) Sorokin بوده است. بیمارگری قارچ مهم‌ترین معیار برای انتخاب و بکارگیری آن جهت کنترل میکروبی موربانه‌هاست (Wang & Powell, 2004). یکی از مشهورترین قارچ‌های بیمارگر حشرات *M. anisopliae* می‌باشد که به عنوان عامل بیماری موسکاردین سبز حشرات، قارچی مهم در کنترل بیولوژیک حشرات آفت محسوب می‌شود. قارچ مذکور پارازیت اختیاری بوده و در غیاب میزبان‌های حساس در خاک باقی مانده و وارد فاز ساپروفیتی می‌شود (Tajick Ghanbalani et al., 2009). تحقیقات زیادی در دنیا در زمینه کاربرد قارچ‌های بیمارگر حشرات در مقابل موربانه‌ها انجام گرفته است (Bayon et al., 2000; Chouvinc et al., 2009; Habibpour et al., 2011; Hoe et al., 2009; Krutmuang & Mekchay, 2005; Mburu et al., 2009; Yanagawa et al., 2011). با توجه به این که پژوهش‌های بسیار کمی در مورد تأثیر قارچ *M. anisopliae* روی موربانه *M. diversus* در سطح دنیا صورت گرفته است؛ این پژوهش با هدف بررسی تأثیر کشندگی قارچ ذکر شده در مقابل موربانه مورد نظر انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری موربانه

موربانه‌ها در منطقه اهواز در فصل تابستان به وسیله تله‌های تعبیه شده در خاک، از جنس بلوک‌های چوب تجاری مورد علاقه موربانه‌ها، چوب راش (*Fagus orientalis* Lipsky)،

جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال یافتند. بلوک‌های چوبی در ابعاد $3 \times 6 \times 20$ سانتی‌متر تهیه گردیدند. موریانه‌های کارگر بالغ در انکوباتور تاریک در دمای 28 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 85 ± 5 درصد نگهداری و برای انجام آزمایش‌ها استفاده شدند.

جدایه قارچ و تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ

در این تحقیق از قارچ *M. anisopliae* جدایه سراوان (DEMI 001) که از سرخرطومی حنایی خرما (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Col.: Curculionidae) جمع‌آوری و در کلکسیون بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور وجود دارد، استفاده شد. برای کشت قارچ از محیط کشت $SDA+Y^1$ استفاده گردید. پتری‌های کشت در انکوباتور در دمای 28 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 85 ± 5 درصد نگهداری گردیدند. قارچ‌های کشت داده شده بعد از ۲ تا ۳ هفته، اسپورزایی مناسبی داشتند و برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. سوسپانسیون اسپور قارچ با برش سطح محیط کشت از طرق روش اسکالپینگ^۲ و اضافه کردن آن به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۰/۰۱ درصد توئین^۳ ۸۰ تهیه گردید و غلظت سوسپانسیون توسط لام نئوبار^۴ تعیین شد. پیش از انجام آزمون‌های زیست‌سنجی، بیمارگری قارچ مورد نظر توسط مراحل مربوط به آزمون کخ بر روی موریانه هدف اثبات شد.

آزمون غیرانتخابی زیست‌سنجی به روش آغشته‌سازی کاغذ صافی

در این آزمون یک کاغذ صافی واتمن^۵ با قطر ۹ سانتی‌متر در پتری دیش پلاستیکی با قطر ۹ سانتی‌متر و ارتفاع یک سانتی‌متر قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ *M. anisopliae* به وسیله پیپت روی کاغذ صافی به صورت یکنواخت پخش گردید. غلظت‌های مورد استفاده 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 و 10^7 اسپور در میلی‌لیتر بودند که پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی انتخاب گردیدند. سپس ۵۰ موریانه کارگر روی سطح کاغذ صافی قرار داده شد. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. در تیمار شاهد از محلول توئین ۰/۰۱ درصد استفاده گردید. پتری دیش‌ها درون انکوباتور تاریک در دمای 28 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 85 ± 5 درصد قرار داده شدند. مرگ و میرها به مدت ۱۴ روز ثبت گردیدند.

آزمون غیرانتخابی زیست‌سنجی به روش غوطه‌ورسازی موریانه‌ها

در روش غوطه‌ورسازی ۵۰ موریانه کارگر در سوسپانسیون تهیه شده برای مدت ۱۰-۱۵ ثانیه غوطه‌ور گردیدند و سپس روی سطح کاغذ صافی واتمن با قطر ۹ سانتی‌متر در پتری

¹- Sabouraud Dextrose Agar yeast extract

²- Scalping

³- Tween 80® (polysorbate monoleate)

⁴- Haemocytometer

⁵- Whatman No. 1

دیش پلاستیکی با قطر ۹ سانتی‌متر و ارتفاع یک سانتی‌متر منتقل شدند. غلظت‌های مورد استفاده و شرایط آزمون مانند آزمون شرح داده شده در بالا بودند.

آزمون زیست‌سنجی به روش انتخابی

در این آزمون از ۲ نیمه کاغذ صافی واتمن استفاده شد که با فاصله یک سانتی‌متری از هم در یک پتری دیش پلاستیکی قرار داده شدند. برای تهیه قطعات کاغذ صافی مورد نیاز در این آزمون، کاغذ صافی واتمن طوری از وسط برش داده شد که در مجموع یک سانتی‌متر وسط کاغذ حذف شد. یک نیمه از کاغذ صافی با آب مقطر استریل آغشته گردید و نیمه دیگر بعد از رنگ آمیزی با محلول رنگی ۰/۲۵ درصد Nile Blue، به وسیله سوسپانسیون اسپور قارچ آغشته گردید. غلظت‌های مورد استفاده 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^6 و 10^7 اسپور در میلی‌لیتر بودند که پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی انتخاب گردیدند. در تیمار شاهد هر دو نیمه کاغذ صافی با آب مقطر استریل آغشته گردیدند. تعداد ۵۰ موریانه کارگر درون هر واحد آزمایشی قرار داده شد. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. پتری دیش‌ها درون انکوباتور تاریک در شرایط ذکر شده قبلی قرار داده شدند. مرگ و میرها به مدت ۱۴ روز ثبت گردیدند. همچنین وزن کاغذهای صافی برای بررسی کاهش وزن و پی بردن به اثرات ضد تغذیه‌ای قارچ بیمارگر قبل و بعد از انجام آزمون ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمون‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شدند. غلظت‌های کشنده (LC_{50} و LC_{90}) و زمان مرگ و میر (LT_{50} و LT_{90}) به وسیله آنالیز پروبیت توسط نرم‌افزار SAS(9.1) تعیین شدند. برای مقایسه اثر غلظت سوسپانسیون اسپور قارچ روی موریانه مورد نظر از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین از آزمون LSD در سطح ۰/۵٪ استفاده شد. نمودارها به وسیله نرم افزار Excel 2007 رسم گردیدند.

نتایج

با توجه به جدول یک میزان LC_{50} و LC_{90} برای آزمون زیست‌سنجی غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی کاغذ صافی با سوسپانسیون اسپور قارچ، به ترتیب برابر $10^5 \times 1/2$ و $10^6 \times 2/6$ اسپور در میلی‌لیتر به دست آمدند. همچنین میزان LC_{50} و LC_{90} برای آزمون زیست‌سنجی غیرانتخابی به روش غوطه‌ورسازی موریانه‌ها در سوسپانسیون اسپور قارچ، به ترتیب برابر 3×10^4 و 4×10^5 اسپور در میلی‌لیتر بدست آمدند. با توجه به جدول دو کمترین میزان LT_{50} و LT_{90} در آزمون زیست‌سنجی غیرانتخابی در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر بدست آمد. این مقادیر برای روش آغشته‌سازی به ترتیب برابر با $3/64$ و $5/98$ روز و برای روش غوطه‌ورسازی به ترتیب

برابر با ۱/۰۲ و ۱/۰۳ روز بدست آمدند. جدول یک همچنین مقادیر LC₅₀ و LC₉₀ برای آزمون زیست‌سنجی انتخابی تاثیر سوسپانسیون اسپور قارچ *M. anisopliae* در مقابل موربانه‌های کارگر *M. diversus* را نشان می‌دهد. میزان LC₅₀ برابر با $10^7 \times 1/7$ اسپور در میلی‌لیتر و LC₉₀ برابر با $10^{10} \times 1/1$ (اسپور در میلی‌لیتر) به دست آمد. همچنین مطابق جدول دو در آزمون انتخابی با توجه به این که تنها در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر میانگین کل مرگ و میر بیشتر از ۵۰ درصد بود بنابراین تنها در این غلظت مقادیر LT₅₀ و LT₉₀ بدست آمدند.

جدول ۱- مقادیر غلظت‌های کشنده برای آزمون‌های زیست‌سنجی غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی و غوطه‌ورسازی و آزمون زیست‌سنجی انتخابی

Table 1. The values of lethal concentrations for no-choice bioassay test by method of smearing and immersion methods and choice bioassay test

Bioassay tests	LC ₅₀ (95% Fiducial limits)	LC ₉₀ (95% Fiducial limits)	X ²	Estimate ±SE
Non-choice (Smearing)	1.2×10^5 ($6 \times 10^4 - 2.2 \times 10^5$)	2.6×10^6 ($1.1 \times 10^6 - 9.8 \times 10^6$)	74	0.94 ± 0.11
Non-choice (Immersion)	3×10^4 ($1.6 \times 10^4 - 5.4 \times 10^4$)	4×10^5 ($1.9 \times 10^5 - 1.1 \times 10^6$)	71	1.5 ± 0.14
Choice	1.7×10^7 ($4.3 \times 10^6 - 2.2 \times 10^8$)	1.1×10^{10} ($6.3 \times 10^8 - 5.8 \times 10^{12}$)	68	0.45 ± 0.07

- مقادیر LC₅₀ و LC₉₀ بر حسب اسپور در میلی‌لیتر هستند.

- LC₅₀ and LC₉₀ values are based on spores per ml.

جدول ۲- مقادیر زمان کشندگی بدست آماده برای آزمون‌های زیست‌سنجی غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی و غوطه‌ورسازی و آزمون زیست‌سنجی انتخابی

Table 2. Lethal time values to get ready for non-choice bioassay test by smearing and immersion methods and choice bioassay test.

Bioassay tests	Concentration	LT ₅₀ (95% Fiducial limits)	LT ₉₀ (95% Fiducial limits)	X ²	Estimate ± SE
Non-choice (Smearing)	10^6	5.26 (4.66 - 5.82)	13 (11.34 - 15.62)	53.6	3.26 ± 0.27
	10^7	3.64 (3.51 - 3.77)	5.98 (5.75 - 6.25)	40.4	5.95 ± 0.24
Non-choice (Immersion)	10^5	4.5 (3.64 - 5.25)	17.96 (14.16 - 26.1)	52.2	2.13 ± 0.24
	10^6	1.71 (1.53 - 1.87)	3.12 (2.94 - 3.34)	43.1	4.93 ± 0.41
	10^7	1.02 (1.01 - 1.31)	1.03 (1.02 - 1.45)	41.4	5.87 ± 0.36
Choice	10^7	8.76 (7.31 - 11)	72 (34 - 230)	32.2	1.4 ± 0.21

- مقادیر زمان کشندگی بر اساس روز هستند.

- Lethal time values are based on day.

با توجه به جدول سه میانگین کل مرگ و میر در روش آغشته‌سازی در غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری داشت و بیشترین میزان مرگ و میر در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر

بدست آمد که برابر با ۱۰۰٪ بود. در غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر میانگین مرگ و میر برابر با ۸۶٪ بدست آمد که با غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر و غلظت های پایین تر از خودش تفاوت معنی دار داشت. میانگین مرگ و میر در غلظت 10^3 اسپور در میلی لیتر برابر با ۹/۵٪ شد که با تیمار شاهد تفاوت معنی دار نداشت ($P < 0.0001$, $F=33$, $df=5$). همچنین با توجه به جدول سه میانگین مرگ و میر در روش غوطه وری در غلظت های مختلف تفاوت معنی دار داشت. بیشترین میزان مرگ و میر در غلظت های 10^6 و 10^7 اسپور در میلی لیتر بدست آمد که برابر با ۱۰۰٪ جمعیت موجود در آزمایش بود. میانگین مرگ و میر در غلظت 10^5 اسپور در میلی لیتر ۸۱/۵٪ که با غلظت های بالاتر و پایین تر از خودش تفاوت معنی دار داشت. میانگین مرگ و میر در غلظت 10^3 اسپور در میلی لیتر برابر با ۹/۵٪ شد که با تیمار شاهد تفاوت معنی دار نداشت ($P < 0.0001$, $F=34$, $df=5$). همچنین جدول ۳ میانگین درصد مرگ و میر موربانه های کارگر *M. diversus* در آزمون انتخابی تاثیر سوسپانسیون اسپور قارچ *M. anisopliae* در مقابل موربانه های کارگر *M. diversus* را نشان می دهد. بیشترین میزان مرگ و میر در غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر به دست آمد که بعد از گذشت ۱۴ روز ۶۰٪ از جمعیت موربانه های موجود در آزمایش از بین رفتند. در غلظت های پایین تر از 10^7 اسپور در میلی لیتر میزان مرگ و میر به طور مشخص کمتر از ۲۰٪ بود که تفاوت معنی داری با غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر داشت. میزان مرگ و میر در تیمار شاهد پایین تر از سایر تیمارها بود و با آنها تفاوت معنی دار داشت ($P < 0.0001$, $F=29$, $df=5$).

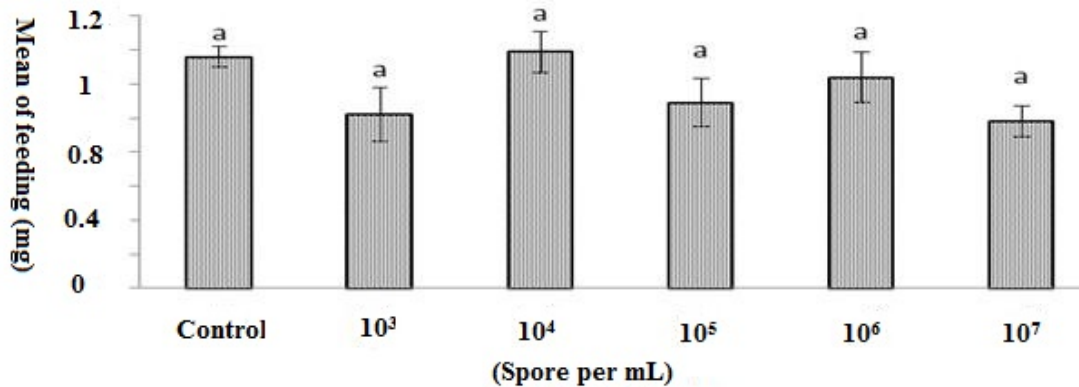
جدول ۳- میانگین کل مرگ و میر در آزمون های زیست سنجی غیرانتخابی به روش آغشته سازی و غوطه وری و آزمون زیست سنجی انتخابی بعد از ۱۴ روز

Table 3. Average of total mortality in no-choice bioassay test by smeary and immersion methods and choice bioassay test after 14 days.

Bioassay tests	Non-choice test (Smeary of filter paper)	Non-choice test (Immersion of termites)	Choice test
	Mean of mortality (%) ± SE	Mean of mortality (%) ± SE	Mean of mortality (%) ± SE
Control	4.5 ± 0.63 ^{e*}	4 ± 0.22 ^d	3 ± 0.64 ^c
10^3	9.5 ± 0.85 ^e	9.5 ± 0.47 ^d	11 ± 1.25 ^b
10^4	20.5 ± 0.59 ^d	24.5 ± 0.95 ^c	12.5 ± 1.03 ^b
10^5	45.5 ± 0.56 ^c	81.5 ± 0.64 ^b	12.5 ± 0.94 ^b
10^6	86 ± 0.87 ^b	100 ± 0 ^a	19 ± 1.5 ^b
10^7	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	60 ± 1.02 ^a

* مقایسه میانگین ها توسط آزمون LSD و در سطح ۵٪ انجام گرفت. حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار هستند. مقایسه ها باید در هر ستون صورت بگیرند. بین ستون ها نباید مقایسه صورت بگیرد.

* Mean comparison LSD test was performed at the 5% level. Similar letters indicate no significant differences are. Comparisons should be carried out in each column. Between the columns cannot be compared.

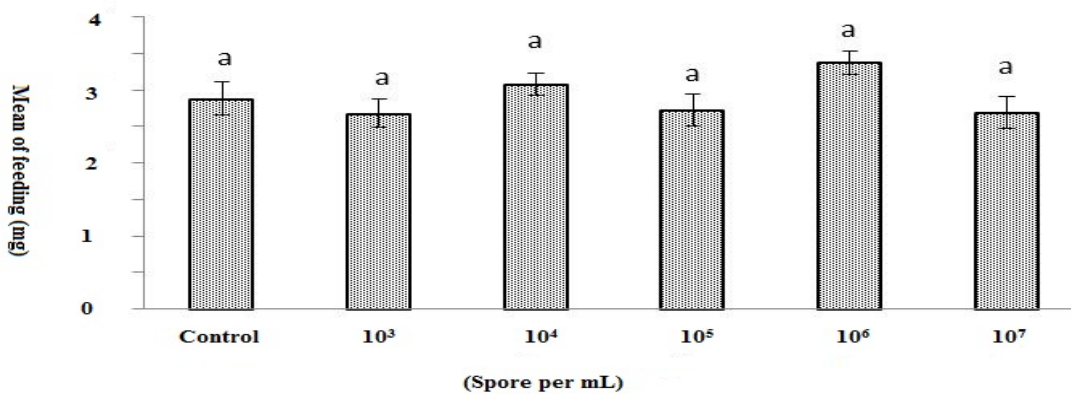


* برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح ۵٪ استفاده شد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار هستند.

* For mean comparison, LSD test at 5% level was used. Similar letters indicate no significant differences are.

شکل ۱- میانگین تغذیه از کاغذ صافی تیمار شده (آبی رنگ) در آزمون زیست‌سنجی انتخابی تأثیر سوسپانسیون اسپور قارچ *M. anisopliae* در مقابل موربانه *M. diversus*

Figure 1. Average of feeding from treated filter paper (blue) at choice bioassay test of effect of spore suspension of *M. anisopliae* against termites *M. diversus*



* برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح ۵٪ استفاده شد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار هستند.

* For mean comparison, LSD test at 5% level was used. Similar letters indicate no significant differences are.

شکل ۲- میانگین تغذیه کل (تغذیه از کاغذ صافی تیمار شده و تیمار نشده) در آزمون زیست‌سنجی انتخابی تأثیر سوسپانسیون اسپور قارچ *M. anisopliae* در مقابل موربانه *M. diversus*

Figure 2. average of total feeding (feeding from treated and untreated filter paper) at choice bioassays test of the effect of spore suspension of *M. anisopliae* against termite *M. diversus*

شکل یک میانگین تغذیه از کاغذ صافی تیمار شده (آبی رنگ) در آزمون انتخابی تأثیر سوسپانسیون اسپور قارچ *M. anisopliae* در مقابل موربانه *M. diversus* را نشان می‌دهد. به

طور کلی بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار وجود نداشت ($P=0/2272$, $F=1/55$, $df=5$). شکل دو میانگین تغذیه کل یعنی تغذیه از کاغذ صافی تیمار شده و کاغذ صافی تیمار نشده در آزمون انتخابی تاثیر سوسپانسیون اسپور قارچ *M. anisopliae* در مقابل موربانه‌های کارگر *M. diversus* را نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف با تیمار شاهد وجود نداشت ($P=0/031$, $F=3/24$, $df=5$).

بحث

مقایسه مقادیر LC_{50} و LC_{90} بین آزمون زیست‌سنجی غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی کاغذ صافی و غوطه‌ورسازی موربانه‌ها و آزمون زیست‌سنجی انتخابی به خوبی نشان داد که اعداد بدست آمده به عنوان LC_{50} و LC_{90} در آزمون انتخابی بزرگتر از آزمون غیرانتخابی هستند. از طرفی مقایسه مقادیر LC_{50} و LC_{90} بین دو روش آغشته‌سازی کاغذ صافی و غوطه‌ورسازی موربانه‌ها نشان می‌دهد که مقادیر بدست آمده برای روش غوطه‌ورسازی کوچکتر از روش آغشته‌سازی کاغذ صافی هستند. این نتایج و مقایسه‌ها به خوبی بیان می‌کنند که روش ارائه اسپوره‌های قارچ در بین جمعیت موربانه‌ها روی کمیت‌های مختلف (غلظت و زمان کشندگی و میزان مرگ و میر) مؤثر می‌باشد. از طرفی در آزمون غیرانتخابی به روش غوطه‌ورسازی موربانه‌ها، حشره در سوسپانسیون اسپور قارچ غوطه‌ور گشته و سطح بدن آن مملو از اسپوره‌های قارچ بیمارگر می‌شد. این در حالی است که در آزمون غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی کاغذ صافی، حشره روی سطحی قرار می‌گرفت که دارای اسپوره‌های قارچ بیمارگر بود و با فعالیت روی این سطح به مرور اسپوره‌های قارچ بیمارگر را دریافت می‌کرد. همین شرایط برای آزمون انتخابی نیز وجود داشت با این تفاوت که سطح حاوی اسپوره‌های قارچ بیمارگر کمتر شده بود و از طرفی سطوح بدون اسپوره‌های قارچ بیمارگر هم در واحدهای آزمایشی وجود داشتند که امکان دریافت اسپوره‌های قارچ بیمارگر را کاهش می‌داد. بنابراین با کاهش احتمال دریافت اسپوره‌های قارچ بیمارگر، همانطور که انتظار می‌رفت اعداد بدست آمده برای LC_{50} و LC_{90} بزرگتر شدند. مقایسه مقادیر LT_{50} و LT_{90} بین آزمون غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی کاغذ صافی و غوطه‌ورسازی موربانه‌ها و آزمون انتخابی نیز روندی مشابه با تغییرات LC_{50} و LC_{90} نشان داد. بیشترین میزان LT_{50} و LT_{90} مربوط به آزمون انتخابی بود. به عبارت دیگر مدت زمان لازم برای از بین رفتن ۵۰٪ یا ۹۰٪ از جمعیت موجود در آزمایش در آزمون انتخابی بیشتر از آزمون‌های غیرانتخابی بود. به عنوان مثال میزان LT_{50} در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر در آزمون غیرانتخابی به روش غوطه‌ورسازی موربانه‌ها برابر با ۱/۰۲ روز، در آزمون غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی کاغذ صافی برابر با ۳/۶۴ روز و در آزمون انتخابی برابر با ۸/۷۶ روز شد. اختلاف مقدار LT_{50} در آزمون غیرانتخابی به روش غوطه‌ورسازی موربانه‌ها با آزمون

انتخابی در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر حدود ۷/۷۴ روز بود. شاید مهمترین عاملی که در اینجا به عنوان دلیل این اختلافات بتوان ذکر کرد همان تفاوت در روش ارائه اسپورهای قارچ در بین جمعیت موربانه‌های موجود در آزمایش باشد. توجه به مقایسه میانگین مرگ و میر در آزمون غیرانتخابی به دو روش آغشته‌سازی کاغذ صافی و غوطه‌ورسازی موربانه‌ها و آزمون انتخابی نشان می‌دهد که تفاوت زیادی در میزان مرگ و میر موربانه‌ها در یک غلظت مشخص وجود دارد. بطور مثال در غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر در آزمون غیرانتخابی به روش غوطه‌ورسازی موربانه‌ها، میزان مرگ و میر برابر با ۱۰۰٪ بود. در حالی که در آزمون غیرانتخابی به روش آغشته‌سازی کاغذ صافی، در غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر این میزان برابر با ۸۶٪ بود. میزان تلفات در آزمون انتخابی در غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر بسیار کمتر از دو روش قبل و برابر با ۱۹٪ بود. حداکثر میزان مرگ و میر در آزمون انتخابی برابر با ۶۰٪ بود که در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر اتفاق افتاد. این درحالی است که در همین غلظت و در هر دو روش مربوط به آزمون غیرانتخابی میزان مرگ و میر برابر با ۱۰۰٪ بود. بنابراین روش ارائه قارچ بیمارگر در بین جمعیت حشرات از لحاظ میزان تلفات دارای اهمیت می‌باشد و آزمایش‌ها باید به گونه‌ای طراحی شوند که جنبه کاربردی داشته و به شرایط طبیعی نزدیکتر باشند. مقایسه میانگین تغذیه (تغذیه از کاغذ صافی تیمار شده و تغذیه کل) در آزمون انتخابی تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف را نشان نداد. در واقع این آزمون به خوبی نشان داد که سوسپانسیون اسپور قارچ مورد نظر در غلظت‌های مورد استفاده در این تحقیق برای موربانه هدف دورکنندگی نداشت. (Bayon et al. (2000 در تحقیقی که در مورد موربانه *M. anisopliae* Feytaud (Iso.: Rhinotermitidae) و قارچ‌های بیمارگر *M. bassiana* انجام دادند بیان داشتند که مصرف کاغذهای تیمار شده و تیمار نشده تفاوت معنی‌داری نشان نداد و قارچ‌ها برای موربانه دورکننده نبودند. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق آنها مطابقت داشت. (Krutmuang & Mekchay (2005 بیمارگری قارچ *M. anisopliae* را در مقابل موربانه‌های *Coptotermes* sp. و *Microcerotermes* sp. مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان داشتند درصد مرگ و میر موربانه‌ها به غلظت سوسپانسیون اسپور قارچ و جدایه *M. anisopliae* بستگی دارد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق این محققان مطابقت داشت. آنها همچنین اضافه کردند کنترل بیولوژیک به وسیله قارچ‌های بیمارگر نوید جایگزینی کنترل شیمیایی را برای موربانه‌های زیرزمینی داده است. کنترل بیولوژیک بوسیله بیمارگرهای قارچی ضمن دوام و پایداری بیشتر هیچگونه خسارتی را به محیط زیست و موجودات غیر هدف وارد نمی‌کند. *M. anisopliae* یکی از چندین عامل طبیعی است که برای کنترل طیف وسیعی از حشرات از طریق نفوذ مستقیم به درون کوتیکول میزبان عمل می‌کند. (Mburu et al. (2009 ارتباط بین بیمارگری و دورکنندگی را در مورد جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر

Macrotermes michaelseni Sjostedt و *B. bassiana* را در مقابل مورپانه *M. anisopliae* (Iso.: Termitidae) بررسی کردند. آنها بیان داشتند که واکنش مورپانه‌ها در برابر قارچ‌ها ارتباط مستقیمی با میزان خطر قارچ‌ها برای آنها دارد. این موضوع‌ها می‌توانند در مطالعات بعدی در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی در مورد مورپانه *M. diversus* نیز مورد بررسی قرار گیرند. (Chouvenc et al. (2009) حساسیت ۷ گونه مورپانه را به قارچ بیمارگر *M. anisopliae* بررسی کردند. آنها بیان کردند تنوع زیادی بین حساسیت گونه‌های مختلف به قارچ بیمارگر ذکر شده وجود دارد و دلیل آن را مکانیسم‌های مقاومتی متفاوت در بین گونه‌های مختلف دانستند. بنابراین توجه به انتخاب جدایه قارچ بیمارگر و حساسیت مورپانه هدف به آن، دارای اهمیت می‌باشد. (Hoe et al. (2009) در تحقیقی که در مورد تأثیر قارچ *M. anisopliae* روی مورپانه (*Coptotermes curvignathus* Holmgren (Iso.: Rhinotermitidae) انجام دادند بیان کردند این قارچ قابلیت توسعه به عنوان آفت‌کش زیستی را برای کنترل مورپانه *C. curvignathus* دارد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق آنها مطابقت داشت. Yanagawa et al. (2011) مطالعه‌ای را در مورد تغییرات رفتاری در مورپانه زیرزمینی *C. formosanus* و Shiraki که با ۶ جدایه از قارچ‌های *M. anisopliae* (Saccardo) Petch و *B. brongniartii* (Saccardo) Petch و *Isaria fumosorosea* Wize تلقیح شده بودند انجام دادند. مطالعات قبلی بیشتر روی تغییر رفتار مورپانه‌ها در مقابل بیمارگرهایی با بیمارگری بالا تمرکز داشتند. اما ایشان ۶ جدایه از قارچ‌های بیمارگر حشرات، که دارای سطوح بیمارگری متفاوت بودند را انتخاب کردند. آنها بیان داشتند که رفتارهای جلوگیری کننده و بازدارنده^۱ مورپانه‌ها ارتباطی با بیمارگری قارچ بیمارگر ندارد در حالی که بیمارگری قارچ بیمارگر با میزان انتقال افقی در جمعیت ارتباط دارد. بنابراین در انتخاب جدایه قارچ بیمارگر باید به این مسئله توجه کرد. به طور کلی این پژوهش نشان می‌دهد که باید در مورد روش ارائه قارچ در بین جمعیت مورپانه تصمیم‌گیری درستی صورت گیرد. هر اندازه میزان تماس قارچ بیمارگر با مورپانه‌ها بیشتر باشد به همان نسبت کارایی آن در کنترل مورپانه‌ها افزایش می‌یابد. این مسئله به خوبی از مقایسه نتایج حاصل از این پژوهش مشخص می‌شود. همچنین مشخص گردید که قارچ *M. anisopliae* روی مورپانه *M. diversus* تأثیرگذار بوده و قابلیت توسعه در مدیریت تلفیقی این آفت را دارد. بنابراین باید سعی شود که در برنامه‌های تحقیقاتی آینده به جایگاه و نقش قارچ‌های بیمارگر حشرات برای کنترل مورپانه‌ها بیشتر توجه شود؛ تا ضمن کاربردی کردن آنها، در زمینه کاهش مصرف سموم شیمیایی نیز قدم مؤثری برداشته شده باشد.

^۱- Pathogen- prevention behaviors

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر فراهم آوردن بخشی از امکانات مالی و اجرایی این تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Bayon, I.L., Ansard, D., Brunet, C., Girardi, S. & Paulmier, I. 2000. *Biocontrol of Reticulitermes santonensis by entomopathogenic fungi improvement of the contamination process*. The International Research Group on Wood Protection, IRG/WP/DOC 00-10359.
- Chouvenc, T., Su, N.Y. & Robert, A. 2009. Susceptibility of seven termite species (Isoptera) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology*, 54(3): 723-748.
- Edwards, R. & Mill, A.E. 1986. *Termites in buildings: Their biology and control*. Rentokil Limited, London.
- Habibpour, B. 1994. *Termites (Isoptera) fauna, economic importance and their biology in Khuzestan, (Iran)*. M.Sc. Thesis, College of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
- Habibpour, B. 2006. *Laboratory and field evaluation of bait-toxicants for suppression of subterranean termite populations in Ahvaz*. Ph. D. Thesis, College of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
- Habibpour, B., Cheraghi, A. & Mossadegh, M.S. 2011. Evaluation of cellulose substrates treated with *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin as a biological control agent against the termite *Microcerotermes diversus* Silvestri (Isoptera: Termitidae). *Journal of Entomological & Acarological Research*, 43(2): 269-275.
- Hoe, P.K., Bong, C.F.J., Jugah, K. & Rajan, A. 2009. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates and their effects on subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *American Journal of Agricultural & Biological Science*, 4(4): 289-297.
- Krutmuang, P. & Mekchay, S. 2005. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against termites. *Conference on International Agricultural Research for Development*, 11-13 October, Tropentag.
- Logan, J.W.M. & El Bakri, A. 1990. Termite damage to date palms (*Phoenix dactylifera* L.) in Northern Sudan with particular reference to the Dongola District. *Tropical Science*, 30: 95-108.
- Mburu, 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 entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the termite *Macrotermes michaelseni*. *Journal of Insect Physiology*, 55(9): 1-7.
- Tajick Ghanbalani, M.A., Asgharzadeh, A., Hadizadeh, A.R. & Mohammadi Sharif, M. 2009. A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. *American Journal of Agriculture & Biological Science*, 4(2): 152-155.

- Verma, M., Sharma, S. & Prasad, R. 2009. Biological alternatives for termite control: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 959-972.
- Wang, C. & Powell, J.E. 2004. Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Iso.: Rhinotermitidae). *Biological Control*, 30: 523-529.
- Yanagawa, A., Fujiwara-Tsujii, N., Akino, T., Yoshimura, T. & Yanagawa, T. 2011. Behavioral changes in the termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera), inoculated with six fungal isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107(2): 100-106.

Archive of SID

Evaluation of fatality potential of fungus *Metarhizium anisopliae* against the termite *Microcerotermes diversus* (Isoptera : Termitidae)

Amir CHERAGHI*, Behzad HABIBPOUR

*Department of Plant Protection, College of Agriculture,
Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran*

**(Corresponding author, Email: amircheraghi2009@gmail.com)*

Abstract

Microcerotermes diversus (Iso.: Termitidae) is one of the most destructive termites in Khuzestan province (Iran). In this study, ability of pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae* strain of Saravan (DEMI 001) against termite *M. diversus* was investigated in choice and no-choice bioassay trials by smeary and immersion methods. Results showed that concentration and time of fatality in the smeary method was higher than the immersion method. The lowest level of LC₅₀ and LT₅₀, it related to bioassay test no-choice with immersion method. Those level were 3.1×10^4 spore MI⁻¹ and 1.02 day, respectively. The feeding of treated and untreated filter paper in choice test showed that fungal conidial suspension in concentrations used in this study had no repellency effect against the target termite. Overall, this study showed that the fatality rate of fungal pathogen. *M. anisopliae* against termite *M. diversus* was associated with the fungus population.

Keywords: Bioassay, Entomopathogen fungus, Biological control, Termite