

بررسی اثر کاربرد توام حشره‌کش پیری پروکسی فن و قارچ بیمارگر *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) روی مورپانه خاک‌زی *Amitermes vilis* (Hagen) در شرایط آزمایشگاهی

مرضیه رشید^{۱*}، احمد بغدادی^۲، عزیز شیخی گرجان^۳، مهران غزوی^۳

۱- دانش آموخته بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه پردیس ابوریحان، تهران
۲- استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران
۳- به‌ترتیب استادیار و دانشیار، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران، تهران

چکیده

مورپانه‌ها یکی از مهم‌ترین حشرات خسارت‌زا در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران هستند. کاربرد حشره‌کش‌های تنظیم‌کننده رشد (IGRs) و مواد بیولوژیک یکی از راهبردهای برنامه مدیریت تلفیقی باین نوع حشرات است. در این بررسی اثر توام حشره‌کش پیری پروکسی فن با قارچ *anisopliae* روی مورپانه *Amitermes vilis* مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور تعیین LC_{50} حشره‌کش‌های مورد آزمایش، آزمایش‌های زیست‌سنجی روی مورپانه‌های کارگر *A. vilis* انجام شد. نتایج آزمایش‌های زیست‌سنجی نشان داد که LC_{50} قارچ *M. anisopliae* $10^3 \times 1/5$ اسپور بر میلی‌لیتر و پیری پروکسی فن $9/56$ ppm می‌باشد. برای تعیین دامنه‌کشدگی مخلوط قارچ و حشره‌کش روی مورپانه‌های کارگر، سه غلظت از قارچ بیمارگر حشرات شامل 10^3 ، 10^2 و $10^1 \times 5$ اسپور بر میلی‌لیتر *anisopliae* با $0/5$ میلی‌گرم برلیتر از پیری پروکسی فن برابر با LC_{15} مخلوط شدند. نتایج نشان داد اثر متقابل قارچ *M. anisopliae* با حشره‌کش مذکور اثر افزایشی است و می‌توان قارچ *M. anisopliae* و پیری پروکسی فن را به صورت مخلوط در کنترل این آفت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پیری پروکسی فن، قارچ *M. anisopliae*، مورپانه، سازگاری و اثر افزایشی

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: m100.rashid@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله (۹۱/۶/۳۰) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۱/۱۲/۲)

مقدمه

خسارت موریه‌ها باعث تخریب محصولات کشاورزی، گیاهان جنگلی و انهدام غذای ذخیره شده و اجناس نگهداری شده در منازل می‌شود (Kramm et al., 1982; Milner, et al., 1998). غذای موریه‌ها مواد سلولزی می‌باشد و در اکوسیستم‌های کشاورزی و مناطق شهری و روستایی خسارت وارد می‌کنند. میزان خسارت موریه‌ها سالانه حدود ۲۲ میلیارد دلار برآورد شده است (Fuchs et al., 2004). در کشورهای آمریکا و آسیا هزینه خسارت موریه به ساختمان‌ها میلیون‌ها دلار می‌باشد و هزینه خسارت سالانه در بعضی از کشورها بیشتر از بلاهای طبیعی و آتش سوزی می‌باشد (Pearce, 1997).

موریه *Amitermes vilis* در جهان در کشورهای افغانستان، اردن، عراق و شبه جزیره عربستان گزارش شده است. این گونه در اکثر مناطق ایران در استان‌های تهران، قم، اصفهان و فارس انتشار دارد (Ghayourfar, 2005). مصرف حشره کش‌های شیمیایی برای کنترل حشرات خاکزی مثل موریه‌ها، مشکلاتی از قبیل آلودگی محیط زیست و نابود شدن موجودات غیرهدف را ایجاد می‌نماید. استفاده از ترکیبات بیولوژیک مانند قارچ‌های بیمارگر حشرات، برای کنترل آفات خاکزی تاکید می‌شود. کنترل موثر آفات تنها در پرتو مدیریت تلفیقی (IPM) با استفاده از روش‌های مختلف و با تکیه هرچه بیشتر بر عوامل کنترل بیولوژیک و کاهش مصرف آفت کش‌ها عملی می‌باشد (Mahr et al., 2001). لذا کاربرد تلفیقی قارچ بیمارگر و ترکیبات تنظیم کننده رشد حشرات اثر کنترلی مؤثری در طولانی مدت می‌تواند روی موریه داشته باشد که با محیط زیست نیز سازگار است.

قارچ‌های بیمارگر حشرات در تحقیقات کنترل میکروبی موریه‌ها کانون توجه هستند. چنین قارچ‌هایی باعث بروز تغییراتی در کلنی موریه‌ها شده و در نهایت موجب زوال تدریجی کلنی آنها می‌شوند (Hanel & Watson, 1983). قارچ‌های بیمارگر حشرات قادرند تأثیرات بیولوژیک متنوعی روی حشرات شامل مسمومیت عصبی، کاهش فعالیت سیستم ایمنی بدن و فعال‌سازی کانال‌های کلسیم در ماهیچه بدن داشته باشند (Vilicinskas et al., 1997). تکثیر مجدد قارچ‌ها در طبیعت، بی‌خطر بودن برای موجودات غیر هدف و داشتن طبیعت غیر دورکنندگی برای موریه‌ها آنها را کاندیدای مطلوبی جهت کنترل بیولوژیک موریه‌ها کرده است (Zoberi & Grace, 1990).

با انجام آزمایش روی موریه‌های *Coptotermes spp* Wasmann و *Nasutitermes sp.* Dudley با بکارگیری سه ایزوله از قارچ *M. anisopliae* موفق به کنترل موریه‌ها (با استفاده از روش اسپورخشک) در آزمایشگاه شد و سپس موثرترین ایزوله را شناسایی و از آن برای انجام آزمایشات و مطالعات صحرایی استفاده گردید (Milner, 1992). هم‌چنین توانسته‌اند با استفاده از قارچ *M. anisopliae* موریه *Reticulitermes flavipes* (Kollar) را (با استفاده از اسپور خشک) در آزمایشگاه کنترل کنند. در آزمایش‌های زیست‌سنجی نیز به این نتیجه رسیدند که موریه‌های آلوده به قارچ قادر به انتقال بیماری به موریه‌های سالم بوده، باعث بروز مرگ و میر سریع و قابل توجه در جمعیت موریه‌ها می‌شود (۱۰۰ درصد تلفات در مدت زمان ۴۸ ساعت) و می‌توانند به‌عنوان تله برای کنترل موریه‌ها بکار برده شوند (Zoberi, 1995).

قارچ *M. anisopliae* و ایمیداکلوپراید را در کلنی موریه‌های *Reticulitermes flavipes* به کار بردند و نشان دادند که ایمیداکلوپراید رفتار اجتماعی موریه‌ها را تغییر می‌دهد و با کاهش قدرت دفاع، آن‌ها را به پاتوژن‌های بیمارگر حشرات حساس می‌کند (Ramakrishnan et al., 1999).

طعمه‌های مسموم با سمیت کم از جمله طعمه‌های ساخته شده با ترکیبات تنظیم کننده رشد موریه‌های زیر زمینی را کنترل می‌کنند (Su, 1991).

با توجه به پراکنش و میزان خسارت موریانه‌ها در ایران باید مبارزه با موریانه‌ها مورد تاکید قرار گیرد. با توجه به مسأله ایجاد مقاومت در برابر حشره‌کش‌ها، حشره‌کش‌های شیمیایی به تنهایی روی موریانه‌ها کارایی مناسب ندارد. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی خاصیت حشره‌کشی پیری پروکسی فن و قارچ بیمارگر *M. anisopliae* به صورت جداگانه و توأم روی موریانه خاکزی (*A. vilis* (Hagen) می‌باشد.

روش بررسی

جمع آوری و پرورش آزمایشگاهی موریانه

جهت جمع آوری موریانه‌های خاکزی بنای تاریخی مسجد جامع ساوه انتخاب گردید. برای این منظور با استفاده از سیستم طعمه‌گذاری تعدادی تله در ساختمان نصب گردید. جهت نصب تله‌ها، چاله‌هایی به عمق ۵۰ سانتی‌متر و عرض ۲۰ سانتی‌متر کنده شد و سپس در داخل هر چاله یک لوله پلیکا به طول ۴۰ سانتی‌متر و قطر ۱۵ سانتی‌متر قرار داده شد. در داخل هر لوله پلیکا ۵ قطعه چوب (چوب کهنه نهاندانگان) به طول ۲۵ سانتی‌متر و عرض ۶ سانتی‌متر و قطر ۰/۵ سانتی‌متر گذاشته شد. پس از یک ماه تله‌ها مورد بازدید قرار گرفته و تله‌های حاوی موریانه‌های کارگر و سرباز در ظروف مخصوص پلاستیکی قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال موریانه‌ها به آزمایشگاه، در یک محیط تاریک و رطوبت بالای ۷۰ درصد نگهداری گردید. قابل ذکر است کلنی‌های مورد آزمایش شامل سرباز و کارگر بودند.

قارچ بیمارگر *M. anisopliae*

در این پژوهش از جدایه سراوان با کد (DEMI 001) که از روی سخت بالپوش سرخرطومی حنایی خرما (Olivier) *Rhynchophorus ferrugineus* جمع آوری شده بود و در کلکسیون بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور وجود دارد، استفاده شد. برای کشت این جدایه پس از آلوده کردن لارو *Galleria mellonella* به قارچ، از اسپورهایی که در سطح لاشه لارو ظاهر شده بود، برای کشت در محیط Sabourauds Dextrose Agar (SDA) با یک درصد عصاره مخمر (Y) استفاده شد.

برای تهیه مایه تلقیح، با گذشت زمان ۱۰ تا ۱۴ روز که کاملاً اسپورزایی انجام شد، با استریل کردن مواد و وسایل به وسیله *Spatula* استریل سطح محیط کشت را خراش داده و در شیشه مک کارتنی ریخته و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول Tween80 ۰/۰۵٪ به آن افزوده و بهم زده تا یک سوسپانسیون یکنواختی درست شود.

حشره‌کش مورد استفاده

در این تحقیق از پیری پروکسی فن EC10% فرموله شده در داخل کشور استفاده شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی پیری پروکسی فن روی موریانه *A. vilis*

ابتدا ۵ تا ۶ غلظت برای حشره‌کش پیری پروکسی فن در نظر گرفته شد. آزمایش‌های مقدماتی جهت به‌دست آوردن غلظت‌هایی که تلفات بین ۲۵ تا ۷۵ درصد را سبب می‌شوند صورت گرفت. زیست‌سنجی‌ها با استفاده از موریانه‌های کارگر سالم و هم‌اندازه در داخل پتری‌های شیشه انجام شد. تمام سطوح داخلی پتری‌ها آغشته به پیری پروکسی فن گردید. پس از خشک شدن پتری‌ها درون هر پتری یک قطعه پنبه مرطوب جهت تامین رطوبت مورد نیاز موریانه‌ها قرار داده شد. در نیمه دیگر کف پتری دستمال کاغذی جهت سهولت حرکت موریانه‌ها قرار گرفت و سپس موریانه‌ها با قلم

موی نازک به پتری‌ها منتقل گردیدند که غذایی برای موربانه‌ها در پتری وجود نداشت و این پتری‌ها در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شد. در این آزمون‌ها از شاهد که با آب مقطر تیمار شده بود استفاده شد و تلفات در مدت ۱۰ روز ثبت شد. این آزمایش‌ها سه بار در طول زمان تکرار شد و غلظت‌هایی که تلفات بین ۲۵ تا ۷۵ درصد ایجاد می‌کردند برای پیری پروکسی فن (۵ ppm، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) به دست آمد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی جدایه قارچ *M. anisopliae* روی موربانه

به منظور انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی ۸ غلظت جدایه قارچ و نیز یک شاهد در نظر گرفته شد. مرگ و میر جمعیتی به‌طور روزانه و به مدت ۱۰ روز ثبت شد.

پس از فراهم شدن سوسپانسیون ایزوله، اقدام به رقیق‌سازی و تهیه سری غلظت‌ها شد. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین غلظت‌های حداقل (10^1) و حداکثر (10^8)؛ ۸ غلظت لگاریتمی شامل غلظت‌های 10^1 ، 5×10^1 ، 10^2 ، 5×10^2 ، 10^3 ، 10^4 ، 10^6 و 10^8 اسپور در میلی‌لیتر تهیه و آزمایش‌های زیست‌سنجی با آن‌ها انجام شد. زیست‌سنجی با استفاده از موربانه‌های کارگر با قرار دادن هر موربانه به‌طور جداگانه درون ظرف‌های پلاستیکی یک‌بار مصرف (به قطر ۵ سانتی‌متر و حاوی سوراخی روی درب برای تهویه) که از نظر رطوبت هر روز کنترل می‌شد انجام گردید. شاهد شامل محلول ۰/۰۵ درصد Tween80 بدون اضافه نمودن اسپور قارچ بود. برای هر غلظت ۳۰ موربانه کارگر سالم هم اندازه منظور گردید. برای آلوده ساختن موربانه‌ها، از سوسپانسیون‌های تهیه شده استفاده گردید. برای انجام روش غوطه‌ورسازی مطابق روش (Butt & Goettel (2000) از قیف بوخنر استفاده شد.

به‌منظور انجام زیست‌سنجی از ۸ غلظت در محدوده ۲۵ الی ۷۵ درصد غلظت‌ها تعیین شد. برای هر غلظت ۳۰ عدد موربانه کارگر هم اندازه در نظر گرفته شد که این آزمایش‌های زیست‌سنجی سه بار در طول زمان تکرار گردید. ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مورد نظر که به‌وسیله هم‌زن خوب به هم زده شده بود، داخل لوله استریل ریخته و برای تلقیح، هر گروه ۱۰ تایی از موربانه‌ها روی کاغذ صافی ۱۰ سانتی‌متری در قیف بوخنر قرار داده شد. سپس از هر غلظت ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون روی موربانه‌ها ریخته و بعد از ۵ ثانیه کاغذ صافی را روی دستمال کاغذی قرار داده شد تا سوسپانسیون اضافی جذب دستمال کاغذی گردد و محلول اضافی از طریق پمپ مکش دستگاه تخلیه شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی مخلوط جدایه قارچ *M. anisopliae* و پیری پروکسی فن

حشره کش سازگار با قارچ بیمارگر حشرات پیری پروکسی فن بود که به‌صورت مخلوط با قارچ در این مرحله مورد آزمایش قرار گرفتند (Rashid et al., 2010). برای انجام این آزمایش سه غلظت از قارچ *M. anisopliae* که شامل LC_{50} (10^3 اسپور در میلی‌لیتر) (جدول ۱) و دو غلظت کمتر از LC_{50} قارچ (5×10^1 و 5×10^2 اسپور در میلی‌لیتر) در نظر گرفته شد و مقدار LC_{15} پیری پروکسی فن (۵ ppm) در لوله آزمایش با سوسپانسیون قارچ مخلوط گردید و برای آلوده ساختن موربانه‌ها از ترکیب سوسپانسیون‌های تهیه شده و حشره کش پیری پروکسی فن استفاده شد و شاهد شامل محلول ۰/۰۵ درصد Tween80 بدون اضافه نمودن اسپور قارچ بود.

در این آزمایش از روش غوطه‌ورسازی همان گونه که قبلاً ذکر شد استفاده گردید که برای هر تکرار ۱۰ موربانه کارگر سالم هم سن و هم اندازه منظور شد. پس از آلوده شدن موربانه‌ها، یک عدد موربانه در هر ظرف پلاستیکی حاوی پنبه

مرطوب و دستمال کاغذی قرار داده شد و مرگ و میر آن‌ها به مدت ۱۰ روز ثبت گردید و درصد مرگ و میر تجمعی محاسبه و توسط فرمول ابوت اصلاح گردید.

در صد مرگ و میر بدست آمده با در صد مرگ میر مورد انتظار حاصل از مخلوط قارچ بیمارگر و حشره کش تعیین و با آزمون χ^2 طبق فرمول زیر اثر افزایشی (additive) مخلوط دو عامل محاسبه شد.

$$E = O_{\text{Pyriproxyfen}} + O_{\text{Metarhizium}} (1 - O_{\text{Pyriproxyfen}})$$

$$\chi^2 = \{ (O - E)^2 \} / E.$$

E: در صد تلفات مورد انتظار مربوط به مخلوط ppm ۵ / ۰ حشره کش پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisoplia*

$O_{\text{Pyriproxyfen}}$: در صد تلفات مربوط به حشره کش پیری پروکسی فن

$O_{\text{Metarhizium}}$: در صد تلفات مربوط به قارچ *M. anisoplia*

O: در صد تلفات مشاهده شده مربوط به مخلوط ppm ۵ / ۰ حشره کش پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisopliae* (Trisyono & Whalon, 1999; Hummelbrunner & Isman, 2001).

نتایج

زیست‌سنجی حشره کش‌ها روی موریانه *A. vilis*

نتایج حاصل از مرگ و میر تجمعی در طی ده روز نشان داد که حداکثر مرگ و میر ایجاد شده توسط حشره کش پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisopliae* در روز دهم مشاهده گردید. (نمودار ۱ و ۲). مقدار LC_{50} پیری پروکسی فن، ppm ۹/۵۶ و مقدار LC_{50} قارچ $8/5 \times 10^3$ اسپور بر میلی‌لیتر محاسبه گردید (جدول ۱).

زیست‌سنجی مخلوط جدایه (DEM001) قارچ *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن

برای تعیین دامنه کشندگی مخلوط قارچ *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن سه غلظت قارچ با یک غلظت زیر کشندگی حشره کش (Batista Filho et al., 2001) ترکیب گردید. طبق فرمول اثر افزایشی دو عامل باهم در طی روزهای سوم، پنجم، هفتم و دهم در جداول ۲، ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است.

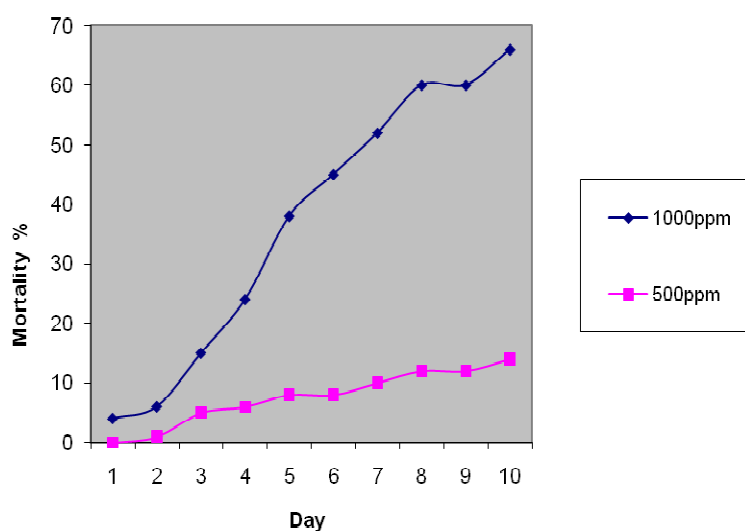
بر اساس فرمول افزایشی تست χ^2 انجام شد که نشان داد تأثیر قارچ *M. anisopliae* با حشره کش مذکور حالت افزایشی دارد. طبق جدول χ^2 ، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح خطا ۰/۵ برابر با ۷/۸۲ بود و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در مدل افزایشی صدق می‌کند و حالت افزایشی دارد (جدول ۲، ۳، ۴ و ۵).

قارچ‌های بیمارگر حشرات مهم‌ترین عامل کنترل‌کننده بسیاری از حشرات آفت می‌باشد (Carruthers & Hural, 1990). در سال‌های اخیر برای کنترل جمعیت موریانه‌ها از دشمنان طبیعی مانند شکارگرها، پارازیتوئیدها و پاتوژن‌ها استفاده می‌شود (Culliney & Grace, 2000). قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله دشمنان طبیعی موثر در کنترل بیولوژیک موریانه‌ها می‌باشند (Grace, 1997).

جدول ۱- حشره کش های آزمایشی روی موریانه *A. vilis*

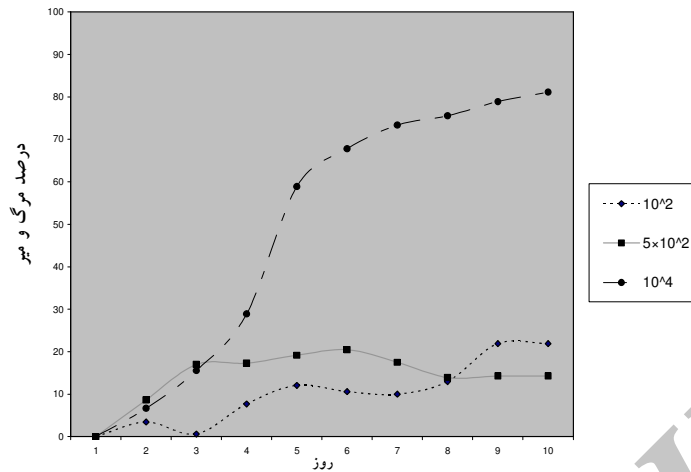
Table 1- LC₅₀ values of pyriproxyfen and *M. anisopliae* against *Amitermes vilis*

| Insecticide | No. tested insects | No. concentrations | Slope (±SE) | LC ₅₀ (95% CI) (ppm) | X ² | Probability |
|----------------------|--------------------|--------------------|-------------|---|----------------|-------------|
| pyriproxyfen | 150*3 | 5 | 0.57±0.11 | 9.56 (3.89-24.36) | 1.53 | 0.67 |
| <i>M. anisopliae</i> | 210*3 | 7 | 1.10±0.25 | 8.5×10 ³ (4×10 ³ -2×10 ⁴) | 1.76 | 0.88 |



شکل ۱- روز - مرگ و میر حشره کش پیری پروکسی فن در مدت ۱۰ روز بعد از تیمار

Fig. 1 - Cumulative mortality percentage of *Amitermes vilis* during 10 days after treatment with pyriproxyfen



شکل ۲- روز - مرگ و میر در جدایه (DEM001) قارچ *M. anisopliae*

Fig. 2- Cumulative mortality percentage of *Amitermes vilis* during 10 days after treatment with *M. anisopliae* for

جدول ۲- میزان درصد مرگ و میر موربانه‌های کارگر در غلظت‌های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن (۵ ppm / ۰٪) در

روز سوم

Table 2- Mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen (0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 3th day after treatment

| Concentration Fungus (spores mL ⁻¹) | Concentration pyriproxyfen (ai, ppm) | mortality % fungus (O _{Metarhizium}) | mortality % pyriproxyfen (O _{Pyriproxyfen}) | Expected mortality % in mixture (E) | Observed mortality % in mixture (O) | χ^2_a |
|---|--------------------------------------|--|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 5x10 ¹ | 0.5 | 10 ± 0.08 | 8.33 ± 0.02 | 17.5 | 5 ± 0.08 | 3.95x10 ⁻⁷ |
| 5x10 ² | 0.5 | 13.33 ± 0.08 | 8.33 ± 0.02 | 20.55 | 16.66 ± 0.08 | 10 ⁻⁷ |
| 10 ³ | 0.5 | 16.66 ± 0.06 | 8.33 ± 0.02 | 23.61 | 13.33 ± 0.06 | 4. × 10 ⁻⁷ |

χ^2_a : طبق جدول χ^2 مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۰.۵ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی (Trisyono & Whalon, 1999; Hummelbrunner & Isman, 2001) صدق می‌کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

جدول ۳- میزان درصد مرگ و میر موربانه های کارگر در غلظت های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن (۰/۵ ppm) در

روز پنجم

Table 3- Mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen (0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 5th day after treatment

| Concentration Fungus (spores mL ⁻¹) | Concentration pyriproxyfen (ai, ppm) | mortality % fungus (O _{Metarhizium}) | mortality % pyriproxyfen O _{Pyriproxyfen} | Expected mortality % In mixture(E) | Observed mortality % In mixture(O) | χ^2_a |
|---|--------------------------------------|--|--|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 5×10 ¹ | 0.5 | 25 ± 0.16 | 12.5 ± 0.03 | 34.37 | 10 ± 0.16 | 5.14 × 10 ⁻¹² |
| 5×10 ² | 0.5 | 23.33 ± 0.06 | 12.5 ± 0.03 | 32.91 | 23.33 ± 0.06 | 0.2 × 10 ⁻⁸ |
| 10 ³ | 0.5 | 43.33 ± 0.06 | 12.5 ± 0.03 | 50.41 | 36.66 ± 0.06 | 5.14 × 10 ⁻⁵ |

χ^2_a طبق جدول χ^2 ، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۰.۵ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی (Trisyono & Whalon, 1999; Hummelbrunner & Isman, 2001) صدق می کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

جدول ۴- میزان درصد مرگ و میر موربانه در غلظت های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن (۰/۵ ppm) در روز هفتم

Table 4- Mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen (0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 7th day after treatment.

| Concentration Fungus (spores mL ⁻¹) | Concentration pyriproxyfen (ai, ppm) | mortality % fungus (O _{Metarhizium}) | mortality % pyriproxyfen O _{Pyriproxyfen} | Expected mortality % In mixture(E) | Observed mortality % In mixture(O) | χ^2_a |
|---|--------------------------------------|--|--|------------------------------------|------------------------------------|--|
| 5×10 ¹ | 0.5 | 35 ± 0.18 | 20.83 ± 0.05 | 48.54 | 15 ± 0.18 | 5.64 × 10 ⁻¹⁶ |
| 5×10 ² | 0.5 | 40 ± 0.03 | 20.83 ± 0.05 | 52.50 | 23.33 ± 0.03 | 10 ⁻ 1.34 × 10 ¹⁵ |
| 10 ³ | 0.5 | 56.66 ± 0.10 | 20.83 ± 0.05 | 65.69 | 50 ± 0.10 | 0.4 × 10 ⁻⁷ |

χ^2_a طبق جدول χ^2 ، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۰.۵ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی (Trisyono & Whalon, 1999; Hummelbrunner & Isman, 2001) صدق می کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

جدول ۵- میزان درصد مرگ و میر موربانه در غلظت های مختلف *M. anisopliae* و حشره کش پیری پروکسی فن (۰/۵ ppm) در روز دهم

Table 5- Mortality percentage of *Amitermes vilis* after treatment with pyriproxyfen (0.5 ppm) and different concentrations of *Metarhizium anisopliae* on the 10 th day after treatment

| Concentration Fungus (spores mL ⁻¹) | Concentration pyriproxyfen (ai, ppm) | mortality % fungus (O _{Metarhizium}) | mortality % pyriproxyfen O _{Pyriproxyfen} | Expected mortality % In mixture(E) | Observed mortality % In mixture(O) | χ^2_a |
|---|--------------------------------------|--|--|------------------------------------|------------------------------------|--|
| 5×10 ¹ | 0.5 | 50 ± 0.17 | 30 ± 0.02 | 65 | 20 ± 0.17 | 1.08 × 10 ⁻²¹ |
| 5×10 ² | 0.5 | 60 ± 0.05 | 30 ± 0.02 | 72 | 40 ± 0.05 | 10 ⁻ 2.20 × 10 ¹² |
| 10 ³ | 0.5 | 70 ± 0.12 | 30 ± 0.02 | 79 | 56.66 ± 0.12 | 10 ⁻ 3.71 × 10 ⁷ |

χ^2_a طبق جدول χ^2 ، مقدار χ^2 با درجه آزادی (df= ۳) و در سطح ۰.۵ برابر با ۷/۸۲ است و چون χ^2 محاسبه شده کمتر از این عدد است در فرمول افزایشی (Trisyono & Whalon, 1999; Hummelbrunner & Isman, 2001) صدق می کند و بنابراین اثر سم و قارچ حالت افزایشی دارد.

بحث

در این تحقیق غلظت‌های بالای قارچ (10^6 و 10^8 اسپور بر میلی‌لیتر) ۱۰۰ درصد تلفات در مدت زمان ۴۸ ساعت ایجاد کردند ولی غلظت 10^3 اسپور بر میلی‌لیتر در روز دهم تا ۷۰ درصد تلفات ایجاد کرد.

در تحقیق خود تحت عنوان اثرات کنترل کننده بیولوژیک قارچ *M. anisopliae* روی موربانه *Microcerotermes gabrielis* موفق به کنترل این آفت در آزمایشگاه شد و به این نتیجه رسید که این قارچ می‌تواند اثر بیماری‌گری بالایی در موربانه‌ها با تلقیح مستقیم موربانه‌ها به روش غوطه‌ور شدن در آزمایشگاه داشته باشد (Rahimzadeh, 2006).

LC₅₀ جدایه سراوان (DEM001) قارچ *M. anisopliae* روی موربانه *M. gabrielis* 0.79×10^2 اسپور بر میلی‌لیتر بود (Rahimzadeh, 2006) در حالی که LC₅₀ این جدایه در روی موربانه *A. vilis* $8/5 \times 10^3$ اسپور بر میلی‌لیتر بود که نشان می‌دهد موربانه *M. gabrielis* نسبت به این قارچ حساس‌تر می‌باشد.

در یک تحقیقی حشره‌کش‌هایی که به تدریج اثر می‌کنند (مانند حشره‌کش‌های تنظیم کننده رشد حشرات) ۹۰ درصد موربانه‌هایی که در معرض آن‌ها قرار گرفته بودند را در مدت ۱۴ روز از بین بردند (Su et al., 1987).

تاخیر در اثر کشندگی آفت‌کش‌ها باعث می‌شوند که کارگرها فرصت حرکت داشته باشند و فعالیت‌های اجتماعی مثل تغذیه دهان به دهان و غیره را انجام دهند (Soeprono & Rust, 2004). سیستم طعمه‌گذاری با از بین بردن طبقه کارگر باعث می‌شود که کلنی موربانه‌ها نابود شود، زیرا با حذف طبقه کارگر، کلنی موربانه‌ها به علت گرسنگی از بین می‌روند. در سیستم طعمه‌گذاری از ترکیبات ممانعت کننده سنتز کیتین مانند هگزا فلومورون و دیفلوبنزورون و از آفت‌کش‌های گوارشی مانند سولفورآمید و سدیم بورات و از ترکیبات شبه هورمون جوانی مانند فنوکسی کارب استفاده می‌شود (Ghayourfar, 2005). مصرف طعمه مسموم نسبت به محلول‌پاشی برای کنترل موربانه ایمن‌تر و سازگارتر به محیط می‌باشد (Pearce, 1997). در این تحقیق از ترکیبات شبه هورمون جوانی مانند پیری پروکسی فن که در سیستم طعمه‌گذاری مؤثر می‌باشد و آلودگی محیط زیست کمتری ایجاد می‌کند استفاده شد.

یکی از مواد شیمیایی تنظیم کننده رشد حشرات که در سیستم طعمه‌گذاری مورد استفاده قرار می‌گیرد، آنالوگ‌های هورمون جوانی^۱ می‌باشد که خاصیت دور کنندگی ندارند. مکانیسم عمل آنالوگ‌های هورمون جوانی جلوگیری از تمایزیابی طبقات موربانه^۲ می‌باشد. زیرا تمایزیابی طبقات کارگر، سرباز و جنسی در داخل کلنی موربانه‌ها توسط میزان ترشح هورمون جوانی تنظیم می‌گردد (Noirot, 1970). در این تحقیق روی اثر کشندگی پیری پروکسی فن روی کارگرهای موربانه در آزمایشگاه بررسی شد ولی روی تمایزیابی طبقات موربانه بررسی انجام نگرفت.

Delgado et al. (1999) تاثیر قارچ *B. bassiana* به تنهایی و حشره‌کش دیفلوبنزورون به همراه جدایه قارچ را روی ملخ بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد ۱۴ روز پس از تیمار افراد جمعیت مورد مطالعه، تیمار جدایه قارچ به تنهایی ۳۸٪ مرگ و میر، تیمار آفت‌کش به تنهایی ۲۹/۴٪ مرگ و میر و تیمار دیفلوبنزورون به همراه قارچ توانست ۵۵/۲٪ تلفات در جمعیت ملخ ایجاد کند، و این نشان از اثر افزایشی^۳ تلفیق دو عامل است. ولی در آزمایش ما درصد مرگ و میر قارچ *M. anisopliae* در 10^3 اسپور بر میلی‌لیتر در روی موربانه *A. vilis* در روزهای ۳، ۵، ۷ و ۱۰ به ترتیب ۱۶/۶۶، ۴۳/۳۳، ۵۶/۶۶ و ۷۰ درصد بود و درصد مرگ و میر پیری پروکسی فن ppm ۸/۳۳، ۱۲/۵، ۲۰/۸۳، ۳۰ درصد بود در حالی که ترکیب پیری پروکسی فن و قارچ *M. anisopliae* ۱۳/۳۳، ۳۶/۶۶، ۵۰، ۵۶/۶۶ درصد تلفات ایجاد کرد. بنابراین تاثیر

¹. Juvenoids

². Caste differentiation

³. Additive

کشندگی قارچ *M. anisopliae* به تنهایی روی موربانه در طی ۱۰ روز بیشتر از ترکیب قارچ *M. anisopliae* و پیری پروکسی فن می باشد که برخلاف نتایج (Delgado et al., 1999) می باشد. در کلنی موربانه ها به دلیل این که پیری پروکسی فن در طولانی مدت اثر کرده به مرور زمان ترکیب قارچ و پیری پروکسی فن مؤثرتر خواهد بود و از طرفی با افزایش آلودگی به قارچ در بین کلنی موربانه ها میزان مرگ میر بیشتر خواهد شد.

در رابطه با اثر متقابل کاربرد دو آفت کش به صورت مخلوط اثر افزایشی (جمع پذیری هر یک از عامل ها)، آنتاگونیستی و سینرژیستی ممکن است اتفاق بیافتد که برای آن ها فرمول های زیادی ارائه شده است که مورد قبول بیولوژیست ها نمی باشد و تنها یک فرمول افزایشی مورد قبول واقع شده است که اگر داده ها در این فرمول صدق کند اثر افزایشی وجود دارد و اگر تلفات مشاهده شده از تلفات مورد انتظار بیشتر باشد اثر سینرژیستی وجود دارد و اگر خیلی کمتر باشد اثر آنتاگونیستی وجود دارد که داده های ما در این فرمول صدق کرده و اثر افزایشی وجود داشت.

نتایج نشان داد با پایین بودن χ^2 احتمال وجود اثر آنتاگونیستی بین قارچ و حشره کش وجود ندارد و می توان این دو عامل را با هم به کاربرد (جداول ۲، ۳، ۴ و ۵). ارزیابی زیست سنجی قارچ *M. anisopliae* به تنهایی و حشره کش پیری پروکسی فن به تنهایی و مخلوط قارچ و حشره کش پیری پروکسی فن روی موربانه در روز دهم نشان داد که در طولانی مدت ممکن است مخلوط آن ها مؤثرتر باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای مهندس علیرضا رحیم زاده جهت جمع آوری موربانه های زیرزمینی از آثار باستانی مسجد جامع ساوه قدردانی می شود.

References

- Batista Filho, A., Almeida, J. E. M. and Lamas, C. 2001.** Crop protection effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, 30: 437-447.
- Butt, T. M. and Goettel, M. S. 2000.** In: Navon, A. and Ascher, K.R.S. (eds) Bioassay of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International, Wallingford, UK, pp.141-195.
- Carruthers, R. I. and Hural, K. 1990.** Fungi as naturally occurring entomopathogens. *UCLA Symposium of Molecular Cell Biology*, (USA), 112: 115-138.
- Culliney, T. W. and Grace, J. K. 2000.** Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. *Bulletin of Entomological Research*, 90: 9-21.
- Delgado, F. x., Britton, J. H., Onsey, J. A. and Swearingen, w. 1999.** Field Assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with Diflubenzuron for control of savanna Grasshopper complex (Orthoptera) in Mail. *Invertebrate Pathology*, 73:34-9.
- Fuchs, A., Schreyer, A., Feuerbach, S. and Korb, J. 2004.** A new technique for termite monitoring using computer tomography and endoscopy. *International Pest Management*, 50(1): 63-66.
- Ghayourfar, R. 2005.** Termites of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection. Nashre Amozesh Keshvarzi Press, Karaj, Iran.
- Grace, J. K. 1997.** Biological control strategies for suppression of termites. *Agricultural Entomology*, 14: 281-289.
- Hanel, H. and Watson, J. A. L. 1983.** Preliminary field tests on the use of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). *Bulletin of Entomological Research*, 73: 305-313.
- Hummelbrunner, L. A. and Isman, M. B. 2001.** Acute, sublethal, antifeedant and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobaccocutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Agricultural and Food Chemistry*, 49:715-720.
- Kramm, K. R., West, D. F. and Rockenbach, P. G. 1982.** Termite pathogens: Transfer of the entomopathogen, *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *Invertebrate Pathology*, 40: 1-6.
- Mahr Cloyd, S. E., Maher, R. A. and Sadof, C. S. 2001.** Biological control of insects and other pest of Green house crop. University of wisconsin, 99p.
- Milner, R. J. 1992.** Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. PP.200-207. In: *Biological Control and Grasshoppers*. (eds. Lomer, C. J. and Prior, C.) CAB International in associated with International Institute of Tropical Agriculture.
- Milner, R. J., Staples, J. A. and Luttoon, G. G. 1998.** The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae* for control of termites in Australia. *Biological Control*, 11: 240-247.
- Noirot, Ch. 1970.** Formation of castes in higher termites, in K. Krishna and F. Weesner, eds. *Biology of termites*, vol 1. Academic press, New York, PP:311-350.
- Pearce, M. J. 1997.** *Termites Biology and Pest Management*. CAB International.
- Rahimzadeh, A. R. 2005.** A survey on the control effects of *Metarhizium anisopliae* on the *Microcerotermes gabrielis* termite in the laboratory. A thesis presented for master of science degree in medical entomology and vectors control, 138pp
- Ramakrishnan, R., Suiter, D. R., Nakatsu, C. H., Humber, R. A. and Bennett, G. W. 1999.** Imidacloprid-enhanced *Reticulitermes flavipes* Shiaki, (Isoptera:Rhinotermitidae) susceptibility to the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Economic Entomology*, 92(5): 1125-1132.

- Rashid, M., Baghdadi, A., Sheikhi, A., Pourian, H. R. and Ghazavi, M. 2010.** Compatibility of *Metarhizium anisopliae*(Ascomycota:Hypocreales) with several insecticides. Plant Protection, 50(1): 23-27.
- Soeprono, A. M. and Rust, M. K. 2004.** Effect of delayed toxicity of chemical barriers to control Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). Economic Entomology, 97: 2021-2028.
- Su, N. Y., Tamashiro, M. and Haverty, M. I. 1987.** Characterization of slow-acting insecticides for remedial control of the *Formosan subterranean* termite (Isoptera: Rhinotermitidae). Economic Entomology, 80: 1-4.
- Su, N. Y. 1991.** Evaluation of bait-toxicants for suppression of subterranean termite populations. Sociobiology, 19: 211-220.
- Trisyono, A. and Whalon, M. E. 1999.** Toxicity of neem applied alone and in combinations with *Bacillus thuringiensis* to *Colorado potato* beetle (Coleoptera:Chrysomelidae). Economic Entomology, 92: 1281-1288.
- Vilcinskis, A., Matha, V. and Gotz, p. 1997.** Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from wax moth, *Galleria mellonella*. Insect physiology, 43(12): 1149-1159.
- Zoberi, M. 1995.** *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). Mycologia, 87: 354-359.
- Zoberi, M. H. and Grace, J. K. 1990.** Isolation of the pathogen *Beauveria bassiana* from *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology, 16: 289-296.

Archive of SID

The effect of simultaneous application of pyriproxyfen and The entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) on the subterranean termite *Amitermes vilis* (Hagen) under Laboratory conditions

M. Rashid^{*1}, *A. Baghdadi*², *A. Sheykhi garjan*³, *M. Ghazavi*³

1- Plant Protection Department, Aboureihan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agricultural Science, Payame Noor University, PO Box 19395-3697, Tehran, Iran

3- Respectively Assistant professor and Associate professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

Termites are one of the most important insect pests in many countries of the world such as Iran. The use of Insect growth regulators (IGRs) together with entomopathogenic fungi is one of the strategies of IPM against these pests. In this study, The effect pyriproxyfen with *M. anisopliae* was assayed on worker termite of *Amitermes vilis*. In order to determine the LC₅₀ of insecticides, bioassay tests were carried out on worker termites. The LC₅₀ of *M. anisopliae* was 8.5×10^3 spores/ml and LC₅₀ for pyriproxyfen was 9.56 mg/L. Three concentrations of entomopathogenic fungus including 5×10^1 , 5×10^2 and 10^3 spores/ml were mixed with LC₁₅ (0.5 ppm) of pyriproxyfen. The bioassay of the three mixtures on worker termites showed that *M. anisopliae* and pyriproxyfen had an additive interaction and the mixture of fungi concentrations with pyriproxyfen can be used for termite control.

Key words: Pyriproxyfen, *M. anisopliae*, Termite, Compatibility, Additive effect

* Corresponding author, E-mail: m100.rashid@yahoo.com

Received: 20 Sep. 2012 - Accepted: 20 Feb. 2013