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

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۶، شماره ۳، سال۱۳۹۳، (۲۰۳-۲۱۳)

قابلیت سازگاری و بررسی آزمایشگاهی اثر برخی حشره‌کش‌ها و اسانس‌های گیاهی با قارچ بیمارگر حشرات، *Lecanicillium longisporum*

امید پناهی [*۱]، *مجتبی قانع جهرمی* [۲]، *آزاده لونی* [۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه ارومیه
۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۳- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور

چکیده

قارچ‌های بیمارگر یکی از عوامل موثر در کنترل حشرات آفت می‌باشند. زنده‌مانی کنیدی‌های قارچ‌ها، در اثر عوامل محیطی و حشره‌کش‌های شیمیایی که برای حفاظت گیاهان استفاده می‌شوند، تغییر می‌یابند. در این پژوهش، اثر حشره‌کش‌های ایمیداکلوپراید، استامی‌پراید و اسانس‌های گیاهی نعناع (*Mentha spicata* L.) از تیره Lamiaceae، زیره‌سبز (*Cuminum cyminum* L.) از تیره Apiaceae و لیموترش (*Citrus aurantifolia* L.) از تیره Rutaceae روی رشد میسلیوم و میزان جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & Gams بررسی شد. غلظت‌های مورد استفاده برای این حشره‌کش‌ها و اسانس‌های گیاهی شامل ۲۵۰µl/l (0.5 MC)، ۵۰۰µl/l (MC) و ۱۰۰۰µl/l (2 MC) بودند. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و اثر حشره‌کش‌ها و اسانس‌ها در سه غلظت با چهار تکرار در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس روی محیط کشت SDA بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر سه اسانس گیاهی و دو حشره‌کش مورد استفاده روی پارامترهای میزان رشد میسلیوم و درصد جوانه‌زنی قارچ بیمارگر حشرات *L. longisporum* در مقایسه با تیمار شاهد در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بودند. اسانس زیره‌سبز و حشره‌کش استامی‌پراید به ترتیب با ۲۰/۱۹، ۲۱/۱۸، ۲۳/۳۷ و ۲۳/۴۳ درصد بیشترین و اسانس‌های لیموترش و نعناع نیز به ترتیب با ۷/۶۹، ۹/۵۶، ۱۵/۰۱ و ۱۴/۲۱ درصد کمترین درصد بازدارندگی در رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ را داشتند. نتایج نشان داد که قارچ مورد مطالعه در برابر اسانس لیموترش عکس‌العملی از خود نشان نداده و اسانس زیره‌سبز و حشره‌کش استامی‌پراید دارای اثر قارچ‌کشی می‌باشند. همچنین مشخص شد که با افزایش درصد مهار رشد میسلیومی قارچ، میزان تولید کنیدیوم در هر تشتک پتری به طور قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند. اسانس‌های لیموترش و نعناع با توجه به اثر قابل توجه و کم‌خطر بودنشان برای انسان و محیط زیست نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی، می‌توانند در برنامه کنترل تلفیقی آفات به همراه این قارچ بیمارگر و یا به عنوان مدلی برای ساخت آفت‌کش‌های جدید با قابلیت سازگاری بالا مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اسانس گیاهی، حشره‌کش، بیمارگر حشرات، قابلیت سازگاری

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *opalia.20@gmail.com*

تاریخ دریافت مقاله (۹۱/۵/۵) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۲/۴/۱)

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

هر محصول دارای تنوعی از آفات و بیماری‌ها است که از دیدگاه کشاورز، همه آن‌ها بایستی کنترل شوند. برای مهار خسارت آفات، گاهی گیاهان را تا چندین بار در سال سم‌پاشی می‌کنند که این کار، سبب افزایش میزان مصرف آفت کش‌های شیمیایی و آلودگی محیط زیست می‌شود. از پیامدهای اساسی کاربرد حشره‌کش‌ها، تأثیر سوء این ترکیبات روی جانوران غیرهدف به‌ویژه حشرات مفید است (Casida & Quistad, 1998). کاهش تراکم جمعیت دشمنان طبیعی (شکارگرها و پارازیتوئیدها)، بر اثر مرگ‌ومیر بسیار زیاد و جابجایی یا مهاجرت از کشتزارهای تحت سم‌پاشی به کشتزارهای هم‌جوار و یا دور دست، یکی از نمودهای زیان‌بار حشره‌کش‌های شیمیایی روی دشمنان طبیعی است که نتیجه این امر، افزایش تراکم جمعیت آفات و زیان‌های آن‌ها می‌باشد (Brust *et al*., 1985). گسترش و طغیان آفات گیاهی، ضرورت بازنگری در کنترل شیمیایی برای کاهش میزان مصرف آفت‌کش‌ها، تشخیص و بکارگیری روش‌های غیرشیمیایی به‌ویژه کنترل بیولوژیک را ایجاب می‌کند. در میان عوامل کنترل بیولوژیک، بیمارگرهای حشرات از موفقیت ویژه‌ای برخوردار هستند. قارچ‌های بیمارگر حشرات نمی‌توانند به عنوان یک عامل همه جانبه در مورد آفات به کار روند و به تنهایی در کنترل جمعیت حشرات، مفید واقع شوند. یکی از ویژگی‌های مثبت قارچ‌های بیمارگر حشرات علی‌الخصوص در مورد *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & Gams، سازگاری آن‌ها با اغلب آفت‌کش‌های رایج، به‌ویژه حشره‌کش‌ها و برخی از قارچ‌کش‌ها مانند پریمیکارب، کاربارِیل، پرمترین، دیفلوبنزوران، میرونیل، هیدروکسید مس، آیپرودیون، دینوکاپ و دیکوفول می‌باشد. این عوامل کنترل بیولوژیک را می‌توان همراه با آفت‌کش‌های مصنوعی، ترکیبات گیاهی و یا به تنهایی برای کنترل آفات کلیدی از قبیل پسیل معمولی پسته *Aganiscena pistaciae* Burck & Laut. (Alizadeh *et al*., 2007)، سفیدبالک برگ نقره‌ای *Bemisia argentifolii* Bellows (James & Elzen, 2001)، به خوبی به کار برد و با کمک آن‌ها می‌توان استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی را به میزان قابل توجهی کاهش داد. همچنین، جدایه‌هایی از این قارچ، توان آلوده‌سازی برخی عوامل بیماریزای گیاهی از جمله سفیدک‌های سطحی، زنگ‌ها، لکه‌برگی‌ها و نماتدهای انگل گیاهی را دارد. جدایه‌های مختلفی از این قارچ در حال حاضر برای کنترل آفات مهمی از قبیل شته‌ها و آلرودها به صورت تجاری تولید و عرضه شده‌اند (Lacey *et al*., 1999).

آفت‌کش‌ها با منشأ گیاهی حامل طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه فرار هستند که در روابط متقابل گیاه و حشره نقش مهمی دارند. بر اساس نتایج پژوهش‌های انجام شده برخی از این ترکیبات می‌توانند برای کنترل حشرات آفت و یا به عنوان روشی برای ساخت ترکیبات آفت‌کش جدید مورد استفاده قرار گیرند (Lentz *et al*., 1998). در سال‌های اخیر شرکت‌های تجاری از نتایج پژوهشی در مورد خواص آفت‌کشی اسانس‌های گیاهی استفاده نموده و ترکیبات آفت‌کشی را به بازار عرضه نموده‌اند. شرکت Mycotech فرآورده‌ای را تحت نام Cinnamite™ به عنوان یک قارچ‌کش برای استفاده در گلخانه‌ها و فرآورده Valero™ را به عنوان یک ترکیب کنه‌کش و قارچ‌کش برای استفاده روی گیاهانی همانند انگور و مرکبات و میوه‌های خشک عرضه نموده است (Liu *et al*., 2001). بررسی‌هایی که روی فعالیت کنه‌کشی اسانس نعناع روی کنه‌های بالغ *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval (Aslan *et al*., 2004)، تأثیر اسانس گیاهان معطر از جمله نعناع در کنترل جمعیت سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Wang *et al*., 2006)، اثر اسانس سه گونه گیاهی شامل *Satureja hortensis* L.، *Ocimum basilicum* L. و *Thymus vulgaris* L. روی حشرات کامل و پوره‌های عسلک پنبه *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Aslan *et al*., 2004)، فعالیت حشره‌کشی اسانس گیاهی زیره‌سبز علیه حشرات کامل شپشه‌ی آرد *Tribolium castaneum* (Herbst) (Chaubey, 2008)، نشان داده است که اسانس‌های

Archive of SID

www.SID.ir

گیاهی دارای مواد شیمیایی گوناگونی بوده و دارای اثر آفت‌کشی بالایی هستند. به هر حال کاربرد قارچ‌ها به تنهایی اغلب در کنترل آفات ناکافی بوده و استفاده از مواد شیمیایی سازگار در فرمولاسیون‌های قارچی ممکن است اثرات قارچ روی حشرات آفت را افزایش دهند (Furlong & Groden, 2001; Ying *et al*., 2003). همچنین اسانس‌های گیاهی و حشره‌کش‌های بیولوژیک مورد استفاده، ممکن است همانند سموم شیمیایی روی قارچ‌های بیمارگر حشرات تأثیر بگذارند. استفاده نابجا و نادرست این قبیل محصولات شیمیایی جهت کنترل آفات، ممکن است مانع توسعه و تولیدمثل بیمارگرهای مهم حشرات شوند (Duarte *et al*., 1992; Malo, 1993). از سوی دیگر، استفاده از این گونه ترکیبات با خاصیت انتخابی، یکی از راهکارهای مهم در برنامه‌ی مدیریت تلفیقی آفات محسوب می‌شود. در برخی موارد نیز، کاربرد تلفیقی برخی از ترکیبات با قارچ‌های بیمارگر ممکن است سبب افزایش میزان کنترل آفات شوند (Moino & Alves, 1998; Quintela & McCoy, 1998).

با در نظر گرفتن اهمیت اسانس‌های گیاهی (که امروزه تلاش می‌شود جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی شوند) در کنترل جمعیت آفات و ناشناخته بودن چگونگی تأثیر و برهم‌کنش این مواد با عوامل کنترل بیولوژیک مانند قارچ‌ها، انجام بررسی‌هایی در این زمینه، ضروری به نظر می‌رسد. باید اطمینان داشت که هر ترکیب طبیعی جدید مانند یک عامل میکروبی، یک ترکیب ثانویه، یک ترکیب گیاهی و یا حیوانی برای محیط و مصرف‌کننده، هیچ گونه زیانی نداشته باشد. اگرچه بیشتر آفت‌کش‌های زیستی دارای خطر بسیار کمی برای موجودات غیرهدف هستند، ولی مهم این است که طبیعی بودن یک ترکیب دلیلی بر بی‌خطر بودن آن نیست (Izadi & Samih, 2006). در این پژوهش میزان سازگاری و برهمکنش هم‌افزایشی (سینرژیستی) و برضدهمی (آنتاگونیستی) سه اسانس گیاهی و دو حشره‌کش با قارچ بیمارگر حشرات *L. longisporum* و نیز مقایسه اثر اسانس‌ها و حشره‌کش‌ها روی این قارچ بررسی می‌گردد. در صورت سازگار بودن، استفاده از اسانس‌های گیاهی مورد استفاده در کنترل آفات می‌توان خطرات زیست محیطی آفت‌کش‌های زیست محیطی را کاهش داد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس‌های گیاهی، جدایه قارچ و کشت آن روی محیط کشت

اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه از شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان (Barij Essence Pharmaceutical Co.) خریداری و شامل اسانس نعناع (*Mentha spicata* L.)، اسانس زیره‌سبز (*Cuminum cyminum* L.) و اسانس لیموترش (*Citrus aurantifolia* L.) بودند. در این پژوهش، جدایه‌ای از قارچ *L. longisporum* با کد LRC195 که از کشور انگلستان و از روی نوعی ناجوربال جدا شده بود، استفاده گردید. برای اثبات بیماریزایی قارچ، ابتدا در شرایط گلخانه‌ای پوره‌های جوان سفیدبالک با غلظت 10^5 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر از قارچ بیمارگر در شرایط دمایی ۲±۲۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۷۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی آلوده گردیدند. پس از ۵ روز از زمان آلوده‌سازی، کنیدی‌هایی که در سطح بدن پوره‌های سفیدبالک ظاهر شده بودند، برای کشت روی محیط کشت SDA (Sabouraud Dextrose Agar) در شرایط دمایی ۱±۲۷ درجه سلسیوس و دوره روشنایی ۱۲ ساعت استفاده شدند. از کنیدی‌های حاصل از رشد میسلیومی قارچ بعد از گذشت ۱۵ روز، جهت انجام آزمایشات استفاده شد.

www.SID.ir

بررسی برهم‌کنش قارچ با هر یک از تیمارها

تأثیر اسانس‌ها و حشره‌کش‌ها بر رشد میسلیومی قارچ

برای بررسی اثر سازگاری اسانس‌های تهیه شده و حشره‌کش‌های ایمیداکلوپراید و استامی‌پراید روی رشد میسلیومی قارچ *L. longisporum* از روش اختلاط اسانس و حشره‌کش با محیط کشت استفاده شد. بدین منظور با اندازه‌گیری رشد رویشی قارچ روی محیط کشت حاوی اسانس و حشره‌کش، ابتدا قارچ *L. longisporum* در چند تشتک‌پتری حاوی محیط کشت SDA کشت داده شد و به این صورت چند منبع تهیه گردید. فلاسک‌های حاوی محیط کشت SDA پس از اتوکلاو، در دمای اتاق قرار داده شد تا دمای آن‌ها به ۴۵±۵ درجه سلسیوس کاهش بیابد. محیط کشت SDA به همراه غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر اسانس و حشره‌کش در لیتر محیط کشت طبق روش و مطالعات ده‌اولیوریا و نوز به ترتیب به عنوان غلظت‌های نصف غلظت میانگین (0.5 MC)، غلظت میانگین (MC) و دو برابر غلظت میانگین (2 MC) در نظر گرفته شد (De Olivera & Neves, 2004) و به فلاسک‌های حاوی محیط SDA اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت به وجود آید. برای به دست آوردن غلظت میانگین، میانگین ریاضی غلظت‌های مختلف سموم ایمیداکلوپراید و استامی‌پراید که توسط شرکت‌های مختلف سازنده روی محصولات مختلف توصیه شده بود، انتخاب گردید. بر این اساس با توجه به بررسی انجام شده توسط علیزاده و همکارن، غلظت نیم در هزار به عنوان غلظت میانگین در نظر گرفته شد (Alizadeh *et al*., 2007). سپس محیط‌های حاصل درون تشتک‌های پتری به قطر ۸ سانتی‌متر تقسیم (مقدار تقریبی ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر) و اجازه داده شد تا محیط جامد گردد. سپس دیسک‌های قارچی به قطر ۵ و ضخامت ۱ میلی‌متر توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن از حاشیه کشت‌های جوان قارچ *L. longisporum* تهیه و یک دیسک قارچ در قسمت وسط تشتک پتری حاوی محیط کشت در شرایط سترون قرار داده شد. برای هر یک از غلظت‌ها ۴ تکرار و ۴ تکرار نیز بدون اسانس و حشره‌کش (محیط کشت شاهد)، در نظر گرفته شد. پتری‌های مایه‌زنی شده در انکوباتور در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره روشنایی ۱۲ ساعت قرار داده شدند. برای جلوگیری از خروج ترکیبات فرار اسانس، با کمک پارافیلم، اطراف تشتک‌های پتری کاملا مسدود گردید. قطر رشد میسلیوم قارچ‌ها در تیمارهای مختلف هر سه روز یک‌بار و به مدت ۱۵ روز با استفاده از خط‌کش مندرج بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید. اندازه‌گیری در دو جهت مختلف که بیشترین میزان رشد را داشته، انجام و از میانگین حاصله برای انجام محاسبات آماری استفاده شد. آزمایشات در طول زمان، دوبار تکرار شدند. برای محاسبه درصد مهار رشد رویشی میسلیوم قارچ در تیمارهای مختلف، از فرمول I=[(T-C)/C]×100 استفاده شد، که در آن C قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد، T قطر رشد قارچ در تیمار حاوی اسانس و حشره‌کش و I درصد مهار رشد میسلیوم قارچ در تیمار مربوطه را نشان می‌دهد.

تأثیر اسانس‌ها و حشره‌کش‌ها بر جوانه‌زنی کنیدیوم

برای انجام این آزمایش، محیط کشت‌ها تهیه و اتوکلاو شده و پس از سرد شدن به آن‌ها اسانس نعناع، زیره‌سبز، لیموترش و همچنین سموم ایمیداکلوپراید و استامی‌پراید در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر طبق روش ده‌اولیوریا و نوز اضافه گردید و مقداری از محیط نیز بدون اسانس و حشره‌کش به عنوان شاهد، نگه داشته شد (De Olivera & Neves, 2004). جهت تهیه سوسپانسیون مشخصی از کنیدی‌های قارچ، ابتدا با ضدعفونی کردن مواد و وسایل، به وسیله یک میله، سطح محیط کشت را خراش داده و در ارلن حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و مقدار نیم میلی‌لیتر از محلول توین-۸۰ دو صدم درصد به آن افزوده و به هم زده تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید.

Archive of SID

www.SID.ir

سپس سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ دو لایه عبور داده شده تا قطعات میسلیوم از آن جدا شود. برای شمارش کنیدی‌ها و تعیین غلظت سوسپانسیون از لام هموسیتومتر استفاده گردید. بر اساس مطالعات علیزاده و همکاران غلظت سوسپانسیون به دست آمده 10^4 کنیدی در میلی‌لیتر تعیین شد (Alizadeh *et al*., 2007).

پس از آن، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون خالص تهیه شده روی محیط کشت‌های آماده ریخته شد. برای توزیع یکنواخت کنیدی‌ها، سوسپانسیون روی محیط کشت پخش شد. پس از اطمینان از توزیع کامل سوسپانسیون، اطراف پتری‌ها با پارافیلم به طور کامل مسدود گردید. محیط کشت‌های آماده در انکوباتور در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. پس از این مدت، دایره‌هایی به قطر نیم سانتی‌متر در قسمت زیرین ظروف پتری به صورت تصادفی کشیده شد. در هر یک از این دایره‌ها، یکصد کنیدیوم به طور تصادفی انتخاب و تعداد کنیدیوم‌های جوانه زده و نزده با میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفت. شمارش کنیدیوم‌ها دو بار تکرار شد. کنیدیوم‌ها در صورتی تندش یافته محسوب می‌شدند که طول لوله تندش حداقل برابر با نصف طول کنیدیوم باشد (Asi *et al*., 2010). با محاسبه میزان جوانه‌زنی کنیدی قارچ در هر یک از تیمارها و مقایسه تیمارها با هم، میزان بازداری اسانس و حشره‌کش در جوانه‌زنی قارچ مشخص شد. با به دست آمدن تأثیر اسانس‌ها و حشره‌کش‌ها در بازدارندگی این دو پارامتر، سازگاری قارچ با اسانس و همچنین با حشره‌کش مشخص گردید.

آنالیز داده‌ها

آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. قبل از تجزیه داده‌ها، برقراری شرایط آنالیز واریانس از جهت نرمال بودن و تصادفی بودن خطاها، همگنی واریانس‌ها و همبستگی واریانس‌ها با میانگین با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16.2.1.0 بررسی و تبدیل‌های لازم انجام شد. برای بررسی اثر حشره‌کش‌ها و اسانس‌های گیاهی در مواردی که لازم بود قبل از تجزیه آماری، داده‌ها به $\text{Arcsin}\sqrt{x/100}$ تبدیل شدند تا واریانس‌ها یکنواخت گردد (Snedecor & Cochran, 1989). تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 20 صورت پذیرفت. در صورت معنی‌دار بودن، با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد، مقایسه میانگین‌ها انجام شد.

نتایج و بحث

اثر حشره‌کش‌ها و اسانس‌های استفاده شده روی قارچ به تفکیک غلظت

نتایج نشان داد که پارامترهای میزان رشد میسلیوم و درصد جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ در سطح یک درصد ($p<۰/۰۱$) معنی‌دار بوده است. تمامی متغیرها با استفاده از آزمون توکی در سطح یک درصد گروه‌بندی شدند. نتایج به دست آمده در جدول ۱ نشان داده شده است. حروف مشابه در هر ستون یا برای هر پارامتر در این جدول بیانگر گروه مشابه یا نداشتن اختلاف بین حشره‌کش‌ها و اسانس‌ها در سطح یک درصد می‌باشد. استامی‌پراید بیشترین تأثیر منفی را روی این قارچ بیمارگر داشته است. این حشره‌کش در بالاترین غلظت جوانه‌زنی کنیدیوم را ۳۵/۴۱ درصد و رشد رویشی کلنی را ۴۰/۳۸ درصد کاهش داده است. اسانس نعناع، زیره‌سبز و ایمیداکلوپراید پس از حشره‌کش مزبور بیشترین تأثیر را روی رشد میسلیومی و جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ داشته‌اند. اسانس لیموترش نیز با کاهش ۲۰/۴۱ و ۱۹/۰۳ درصدی رشد میسلیوم و درصد جوانه‌زنی کنیدیوم کمترین تأثیر را روی این قارچ بیمارگر داشته است (نمودار ۱). با نگرش کلی بر نتایج به دست آمده، چنین استنباط می‌شود که کاربرد اسانس نعناع، لیموترش و حشره‌کش ایمیداکلوپراید در غلظت‌های پائین همراه با

Archive of SID
www.SID.ir

قارچ بیمارگر حشرات، می‌تواند در کنترل تلفیقی آفات موفقیت‌آمیز، و اسانس زیره‌سبز و حشره‌کش استامی‌پراید دارای اثر بازدارندگی روی قارچ هستند. اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از آفت‌کش‌های زیستی هستند که کاربرد آن‌ها در سطح جهان با توجه به پیشرفت کشاورزی ارگانیک، تولید و کاربرد آفت‌کش‌هایی که با محیط زیست سازگار و تجدیدپذیر باشند، به‌طور گسترده‌ای رو به افزایش می‌باشند (Katooli *et al*., 2011).

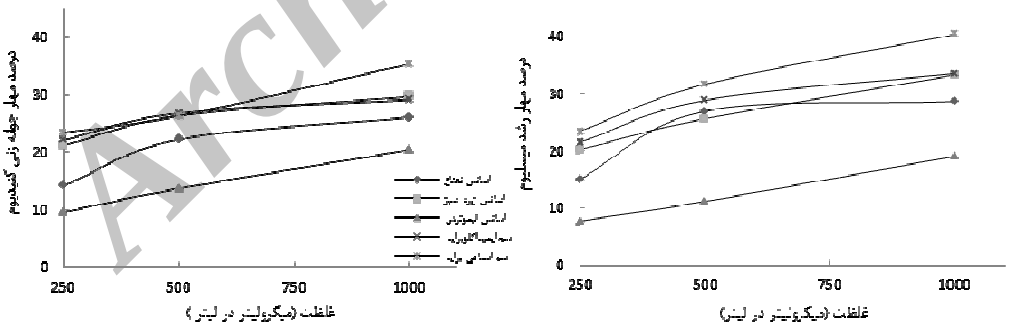
جدول ۱- مقایسه میانگین‌های (±SE) مربوط به اثر سه اسانس گیاهی و دو حشره‌کش در سه غلظت روی رشد میسلیوم و درصد جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ بیمارگر حشرات *L. longisporum* روی محیط کشت SDA

Table 1- Effect of essential oils and insecticides in three different concentrations on conidia germination and vegetative growth of the entomopathogenic fungus, *L. longisporum* in studies conducted on SDA media

Treatment	Concentration	Conidial germination*	Germination (%) reduction	Vegetative growth (cm)*	Vegetative growth (%) reduction
Mentha spicata	250	83.01±1.08^{b}	14.21	4.42±0.04^{b}	15.01
	500	75.25±1.31^{c}	22.23	4.02±0.07^{c}	26.91
	1000	71.51±1.32^{c}	26.08	3.71±0.04^{c}	28.65
Cuminum cyminum	250	76.25±1.31^{b}	21.18	4.15±0.06^{b}	20.19
	500	71.23±0.47^{bc}	26.37	3.87±0.03^{b}	25.57
	1000	68.00±1.47^{c}	29.71	3.47±0.02^{c}	33.26
Citrus aurantifolia	250	87.50±0.64^{b}	9.56	4.80±0.04^{b}	7.69
	500	83.50±1.19^{b}	13.69	4.62±0.04^{b}	11.15
	1000	77.00±1.23^{c}	20.41	4.21±0.09^{c}	19.03
Control	0	96.75±0.48^{a}	0	5.20±0.08^{a}	0
Imidaclopride	250	74.75±0.62^{b}	22.13	4.10±0.04^{b}	21.45
	500	70.25±0.62^{c}	26.82	3.72±0.04^{bc}	28.73
	1000	68.00±1.01^{c}	29.16	3.47±0.13^{c}	33.52
Acetamipride	250	73.50±0.28^{b}	23.43	4.00±0.05^{b}	23.37
	500	70.75±2.42^{b}	26.31	3.57±0.04^{c}	31.61
	1000	62.00±1.22^{e}	35.41	3.10±0.07^{d}	40.38
Control	0	96.00±0.71^{a}	0	5.22±0.04^{a}	0

حروف مشابه در ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری یک درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشد.

*Means in the column followed by different letters indicate significant difference at 0.01 levels.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف اسانس و حشره‌کش روی مهار رشد میسلیومی و جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ

Fig. 1- Effect of different concentrations of essential oils and insecticides on vegetative growth and conidial germination of the entomopathogenic fungus, *L. longisporum*

در این تحقیق، اسانس‌های گیاهی تأثیرات متفاوتی روی قارچ بیمارگر مورد نظر از خود نشان داده‌اند. با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، بین درصد مهار رشد میسلیوم قارچ توسط اسانس‌های گیاهی و هم‌چنین سموم حشره‌کش، تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بر اساس این نتایج استامی‌پراید بیشترین و اسانس لیموترش، کمترین اثر مهارکنندگی را روی قارچ

Archive of SID

www.SID.ir

مورد مطالعه نشان دادند. همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که، بین اثر غلظت‌های مختلف اسانس و حشره‌کش‌های مورد مطالعه روی مهارکنندگی رشد قارچ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با افزایش غلظت، درصد مهارکنندگی رشد میسلیوم قارچ افزایش می‌یابد. اسانس‌های گیاهی و آفت‌کش‌های شیمیایی می‌توانند مراحل مختلف زیستی رشد و نمو قارچ‌های بیمارگر حشرات را تحت تأثیر قرار دهند (Asi *et al*., 2010). نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعات انجام گرفته توسط هیروس و همکاران و همچنین آلوارز کاستلانوس و همکاران مطابقت دارد (Hirose *et al*., 2001; Alvares-Castellanos *et al*., 2001). طبق نظر این محققین با افزایش غلظت مواد شیمیایی، میزان رشد میسلیومی قارچ‌های بیمارگر به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. ضمناً با افزایش غلظت در اسانس‌ها و حشره‌کش‌های مورد بررسی، درصد مهار رشد میسلیوم قارچ‌ها افزایش مشابهی نداشته و حداقل در برخی از مواد آفت‌کش با افزایش غلظت، درصد مهار رشد قارچ از شدت کمتری برخوردار بوده است. در بین مواد آفت‌کش به کار رفته در این پژوهش، استامی‌پراید بیشترین، ایمیداکلوپراید و زیره‌سبز در غلظت‌های کم و اسانس لیموترش و نعناع در تمامی غلظت‌ها، کمترین اثر را بر میزان رشد میسلیوم قارچ داشتند. نتایج این تحقیق با یافته‌های حاصل از مطالعات هیروس و همکاران مطابقت دارد. طبق نظر این افراد با افزایش غلظت روغن چریش، میزان رشد رویشی قارچ بیمارگر *B. bassiana* Balsam و *M. anisopliae* Metsch به‌طور قابل توجهی کاهش و با افزایش غلظت ماده سمی، درصد مهار رشد میسلیوم افزایش می‌یافت. بیشترین تأثیر مربوط به بالاترین غلظت (دوبرابر غلظت میانگین) سموم بود (Hirose *et al*., 2001). مطالعات علیزاده و همکاران نشان داد که ایمیداکلوپراید در غلظت‌های پائین، تأثیر ناچیزی بر رشد میسلیوم قارچ *Verticillium lecanii* (Zimm) داشته است، در صورتی که سایر سموم حشره‌کش از جمله آمیتراز، فلوفنوکسرون و اندوسولفان تأثیر منفی بر میزان رشد رویشی و درصد جوانه‌زنی کنیدی قارچ مذکور داشته‌اند (Alizadeh *et al*., 2007). همچنین بر اساس تحقیقات جئونگ و کیو ایمیداکلوپراید در غلظت‌های کم، هیچ تأثیر منفی بر میزان رشد رویشی قارچ *L. attenuatum* Zare & Gams نداشته است (Jeong & Kyu, 2007)، که نتیجه تحقیق حاضر با نتایج این افراد مطابقت دارد.

یکی از جنبه‌های مهم در سازگاری بین قارچ‌های بیمارگر و موادی که به عنوان آفت‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرند، میزان درصد جوانه‌زنی کنیدیوم می‌باشد (Neves *et al*., 2001; Hirose *et al*., 2001). این موضوع شاید به این علت بسیار مهم و ضروری است که اولین قدم برای ایجاد آلودگی و تشکیل اپیدمی توسط قارچ‌های بیمارگر، جوانه‌زنی کنیدیوم و نفوذ آن به درون بافت بدن میزبان می‌باشد (Oliveria *et al*., 2003; De Oliveria & Neves, 2004). نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس‌های گیاهی و سموم حشره‌کش، تأثیر کمتری بر جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ در مقایسه با مهار رشد میسلیومی داشته‌اند. کاهش درصد جوانه‌زنی کنیدیوم برای ایمیداکلوپراید ۲۷ درصد گزارش شده است (Alizadeh *et al*., 2007). میزان کاهش جوانه‌زنی کنیدیوم در تیمار دوبرابر غلظت میانگین در بررسی حاضر برای ایمیداکلوپراید ۲۹٫۱۶ درصد به دست آمد، که به نظر می‌رسد با توجه به حساسیت‌های مختلف جدایه‌ها نسبت به سموم شیمیایی و نوع محیط کشت مورد استفاده قابل توجیه باشد. چرا که آزمایشات اولمرت و کنث نشان داد که جدایه‌های مختلف قارچ در برابر قارچ‌کش‌ها، حساسیت متفاوتی دارند (Olmert & Kenneth, 1974). چنین به نظر می‌رسد که علت تأثیر کمتر اسانس‌های گیاهی و سموم شیمیایی بر جوانه‌زنی کنیدی‌ها در مقایسه با رشد میسلیومی، مربوط به مدت زمان آزمایش باشد. میزان رشد میسلیومی قارچ در این پژوهش پس از گذشت پانزده روز، در صورتی که میزان جوانه‌زنی کنیدیوم، ۲۴ ساعت پس از تیمار، محاسبه و برآورد گردید. مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که برخی از سموم حشره‌کش

www.SID.ir

ممکن است با قارچ *L. longisporum* سازگاری نداشته باشند (Cagon & Uhlikk, 2001; Neves *et al*., 2001, De Olivera & Neves, 2004; Alizadeh *et al*., 2007). در این تحقیق مشخص گردید که استامی‌پراید در مقایسه با ایمیداکلوپراید تأثیر منفی بیشتری بر قارچ مذکور دارد. همچنین اثر تشدیدکنندگی حشره‌کش ایمیداکلوپراید با قارچ‌های بیمارگر حشرات نیز بررسی شده است (Lacey *et al*., 1999; Furlong & Groden, 2001; Ying *et al*., 2003). در این پژوهش نیز، حشره‌کش ایمیداکلوپراید تأثیر چندانی روی جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ نداشت.

به‌طور کلی سازگاری بین قارچ‌های بیمارگر با سموم حشره‌کش توسط پژوهشگران مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است امّا در مورد سازگاری بین قارچ‌های بیمارگر و اسانس‌های گیاهی مطالعات اندکی انجام گرفته است. طبق مطالعات آگودا و همکاران، روغن چریش تأثیر منفی بر رشد میسلیومی و میزان جوانه‌زنی کنیدی قارچ *M. anisopliae* داشته است (Aguda *et al*., 1988). بورگیو و همکاران اثر اسانس *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) را روی قارچ بیمارگر *M. anisopliae* مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش نمودند که اسانس استخراج شده از برگ و ریشه گیاه *O. sanctum* سازگاری قابل توجهی با قارچ مورد نظر داشته و می‌توان آن‌ها را به طور هم‌زمان جهت کنترل آفات در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به کار برد (Borgio *et al*., 2008). نتایج این تحقیق نشان داد که سایر اسانس‌ها به جز لیموترش، اثر معنی‌داری روی رشد کنیدیوم قارچ داشته‌اند. جیمز و الزن سرنوشت ترکیبات شیمیایی در شرایط مزرعه را مورد آزمایش قرار دادند (James & Elzen, 2001). با وجودی که مضر بودن این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسید، بی‌شک اثر انتخابی آن‌ها در مزرعه از بین خواهد رفت. به عبارتی دیگر، سمیت بالای فرمولاسیون‌های خاص این ترکیبات در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند دلیلی بر سمیت مشابه آن‌ها در شرایط مزرعه‌ای باشد، امّا آنچه در شرایط مزرعه مهم و ضروری می‌باشد، ممانعت از جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها بوده که نقش اصلی را در ایجاد آلودگی ایفا می‌کنند (Neves *et al*., 2001; James & Elzen, 2001).

بررسی‌های علیزاده و همکاران نشان داد که سموم ایمیداکلوپراید، آمیتراز و فلوفنوکسرون با قارچ *B. bassiana* بیشترین مرگ و میر را در پوره‌های پسیل پسته داشته است. نکته‌ی قابل توجه در این پژوهش این است که جدایه قارچ به همراه نصف دز حشره‌کش ایمیداکلوپراید توانسته مرگ و میری به اندازه استفاده تنهای حشره‌کش را ایجاد و این مسأله در مدیریت کنترل تلفیقی آفات بسیار مهم است که ما بتوانیم با کم کردن دز مصرفی حشره‌کش، آفت را کنترل کنیم (Alizadeh *et al*., 2006). با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، می‌توان عنوان کرد که ترکیب غلظت‌های بسیار پائین ایمیداکلوپراید و اسانس‌های لیموترش و نعناع با قارچ *L. longisporum* مشکلی را ایجاد نمی‌کند، ولی بهتر است زمانی که با استامی‌پراید و اسانس زیره‌سبز استفاده می‌شود احتیاط‌های لازم صورت گیرد. با این وجود پژوهش‌های تکمیلی برای بررسی شمار بیشتری از اسانس‌ها و حشره‌کش‌ها و بررسی میزان سازگاری آن‌ها با قارچ در شرایط آزمایشگاه و کشتزار لازم است تا اثرات آن‌ها روی دشمنان طبیعی و سایر عوامل کنترل بیولوژیک مشخص گردید چنان‌چه تلفیق این قارچ با سموم و اسانس‌ها در شرایط طبیعی انجام شود می‌توان توصیه‌های مطمئن‌تری را ارایه نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

Aguda, R. M., Rombach, M. C. and Roberts, D. W. 1988. Effect of pesticides on germination and growth of three fungi of rice insect. International Rice Research Institute, 13(6): 39-40.

Alvares-Castellanos, P. P., Bishop, C. D. and Pascual-Villaobos, M. J. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland Chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochemistry, 57: 99-102.

Alizadeh, A., Kharrazi-Packed, A., Talebi-Jahromi, Kh. and Samih, M. A. 2006. The effect of combination of some pesticide and *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill. on common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae* Burk & Laut. P. 132. In: Proceeding of the 8th European Congress of Entomology, 17-22 Sep. Kusadasi, Izmir, Turkey.

Alizadeh, A., Samih, M. A. and Izadi, H. 2007. Compatibility of *Verticillium lecanii* (Zimm.) with several pesticides. Communication in Agricultural and Applied Biological Science, 72(4): 1011-1015.

Asi, M. R., Bashir, M. H., Afzal, M., Ashfaq, M. and Sahi, S. T. 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticide. Pakistan Journal of Botany, 42(6): 4207-4214.

Aslan, İ., Özbek, H., Çalma, Ö. and Sahin, F. 2004. Toxicity of essential oil vapors to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Industrial Crops and Products, 19: 167–173.

Borgio, J. F., Bency, B. J. and Sharma, N. 2008. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. with *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) (Lamiaceae) extracts. Ethnobotanical Leaflets, 12: 698-704.

Brust, G. E., Stinner, B. R. and Mccartney, D. A. 1985. Tillage and soil insecticide effects on predator-black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) interactions in corn agroecosystems. Journal of Economic Entomology, 78(6): 1389-1392.

Cagon, L. and Uhlikk, V. 2001. Influence of insecticides to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Acta Fytothecnica ET Zootechnica, 4: 300-302.

Casida, J. E. and Quistad, G. B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present or future. Annual Review of Entomology, 43: 1-16.

Chaubey, M. K. 2008. Toxicity of essential oils from *Cuminum cyminum* (Umbelliferae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 1719- 1727.

De Olivera, R. C. and Neves, P. M. O. J. 2004. Biological control compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. Neotropical Entomology, 33: 353–8.

Duarte, A., Menendez, J. M. and Triguero, N. 1992. Estudio preliminary sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas quimicos. Revista Baracoa, 22: 31-39.

Furlong, M. J. and Groden, E. 2001. Evaluation of synergist interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. Journal of Economic Entomology, 94: 344-356.

Hirose, E., Neves, P. M. O. J., Zequi, J. A. C., Martins, L. H., Peralta, C. H. and Moino, J. A. 2001. Effect of biofertilizers and Neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Brazilian Archives of Biology and Technology, 44(4): 419-423.

Izadi, H. and Samih, M. A. 2006. Biopesticids compounds with novel mode of action. Jahad-e-Dabeshgahi, Tehran.

James, R. R. and Elzen, G. W. 2001. Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidacloprid when combinated for *Bemisia argentifolii* (Hom.: Aleyrodidae) control. Journal of Economic Entomology, 94: 357-361.

Archive of SID

www.SID.ir

Jeong, J. K. and Kyu, C. K. 2007. Compatibility of entomopathogenic fungus *Lecanicillium attenuatum* and pesticides to control cotton aphid, *Aphis gossypii*. International Journal of Industrial Entomology, 14(2): 143-146.

Katooli, N., Maghsodlo, R. and Razavi, S. E. 2011. Evaluation of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 3(2): 41-43.

Lacey, L. A., Horton, D. R., Chauvin, R. L. and Stocker, J. M. 1999. Comparative efficacy of *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, and aldicarb for control of Colorado potato beetle in an irrigated desert agroecosystem and their effects on biodiversity. Entomologia Experimentalis et Applicata, 93(2): 189-200.

Lentz, D. L., Clark, A. M., Hufford, C. D., Grimes, B., Passreiter, C. M., Cordero, J., Ibrahimi, O. and Okunade, A. 1998. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 63: 253-263.

Liu, C. H., Zou, W. X., Lu, H. and Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology, 88: 277-282.

Malo, A. R. 1993. Estudio sobre la compatibilidad hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. Revista Colombiana de Entomologia, 19: 151-158.

Moino, J. A. and Alves, S. B. 1998. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 27: 611-619.

Neves, P. M. O. J., Hirose, E., Techujo, P. T. and Moino, J. A. 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. Neotropical Entomology, 3: 263-268.

Oliveira, C. N., Neves, P. M. O. J. and Kawazoe, L. S. 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. Scientia Agricola, 60: 663-667.

Olmert, I. and Kenneth, R. G. 1974. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. Neotropical Entomology, 33(3): 353-358.

Quintela, E. D. and McCoy, C. W. 1998. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviates* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. Journal of Economic Entomology, 91: 110-122.

Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. 1989. Statistical methods. 8th (Eds.). IOWA State University Press. 503pp.

Wang, T. C., Si, L. S., Xu, K. and Tong, E. J. 2006. Aromatic plants repellant whiteflies as companion plants of tomato. Chinese vegetarian, 7: 21-22.

Ying, S. H., Feng, M. G. and Xu, S. T. 2003. Field efficacy of emulsifiable suspensions of *Beauveria bassiana* conidia for control of *Myzus persicae* population on cabbage. Chinese Journal Applied Entomology, 14: 545-548.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Entomological Research

Volume6, Issue3, pages: 203-213

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

Compatibility and study effect of some insecticides and essential oils with entomopathogenic fungus, *Lecanicillium longisporum* in laboratory condition

***O. Panahi*[*1], *M. Ghane Jahromi*[2], *A. Loni*[3]**

1- Gratuated student, Department of Plant Protection, Urmia University, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture Science, Yasouj University, Yasouj, Iran
3- Lecturer, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

Archive of SID

Abstract

Pathogenic fungi are one of the factors for the insect pest control. Conidia viability of fungi, changes because of the effect of environmental factors and chemical insecticides that are used to protect plants. In this study, the effect of insecticides; imidacloprid and acetamiprid, and essential oils of the mint, *Mentha spicata* L. (Lamiaceae), cumin, *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae) and lemon sole, *Citrus aurantifolia* L. (Rutaceae) on mycelial growth and conidial germination rate of *Lecanicillium longisporum* was studied. Concentrations of insecticides and essential oils used in the study were as 250 µl/l (0.5 MC), 500 µl/l (MC) and 1000 µl/l (2 MC), respectively. This experiment was conducted in a completely randomized design and the effect of insecticides and essential oils with four replicates at three concentrations of 27 ± 1°C on SDA medium was examined. Results showed that the effects of three essential oils and two insecticides on growth parameters of entomopathogenic fungus compared to controls was significant at $p<0.01$. Cumin essential oil and acetamiprid had the highest, lemon and mint essential oils had the lowest percentage inhibition of mycelial growth and fungus conidial germination. The results showed that this fungus resistant to lemon essential oil and to cumin essential oil and acetamiprid are sensitive. It was found that by increasing the percent inhibition of mycelial growth of fungus, conidial production rate in each petri dish was significantly reduced. Lemon and mint essential oils have been investigated with regard to their significant effect and low risk to humans and the environment than chemical insecticides, could be used in integrated pest control program with the fungus or as a model for the construction of new pesticides with high compatibility.

Keyword: Essential oils, insecticide, entomopathogenic, compatibility

* Corresponding Author, E-mail: *opalia.20@gmail.com*
Received:26 july 2012- Accepted: 22 june 2013

www.SID.ir