

## بررسی زهرآگینی و نحوه تندش کنیدی جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria bassiana*

فرزانه‌سادات سیدطالبی<sup>۱</sup>، سیدعلی صفوی<sup>۲</sup>، رضا طلایی حسنلویی<sup>۳\*</sup> و علیرضا بندانی<sup>۳</sup>  
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه  
۳. استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱)

### چکیده

در پژوهش حاضر، جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria bassiana* از خاک مناطق مختلف و بررسی زهرآگینی آن‌ها علیه سن گندم *Eurygaster integriceps* (Hem.: Scutelleridae)، سوسک *Ephestia morio* (Col.: Tenebrionidae) و شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae) انجام شد. از نمونه‌های خاک مناطق کرج، ارومیه، ماکو و دزفول، ۲۳ جدایه قارچ *B. bassiana* با استفاده از تله گالریا، جداسازی و شناسایی شد. حشرات به روش غوطه‌وری با این جدایه‌ها آلوده شدند. بر اساس نتایج، پوره‌های سن ۵ سن گندم و لاروهای سن ۴ شب‌پره آرد به تمام جدایه‌ها حساس بودند درحالی که لارو سن آخر سوسک مقاوم بود و هیچ مرگی ثبت نشد. بیشترین تلفات به‌وسیله جدایه‌های TV و TZ با حدود ۹۰ درصد مرگ روی هر دو میزبان *E. kuehniella* و *E. integriceps* مشاهده شد که در بالاترین گروه زهرآگینی قرار گرفتند. بر اساس زهرآگینی، جدایه‌ها به سه دسته تقسیم‌بندی شدند: جدایه‌های با زهرآگینی کم (ایجاد ۱۰ تا ۳۳ درصد مرگ)، جدایه‌های با زهرآگینی متوسط (ایجاد ۳۴ تا ۶۷ درصد مرگ) و جدایه‌های با زهرآگینی زیاد (ایجاد ۶۸ تا ۱۰۰ درصد مرگ). روی محیط کشت PDA دو نوع تندش یک‌طرفه و دوطرفه برای کنیدی‌های جدایه‌ها تشخیص داده شد. درصد این دو نوع تندش بین جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت اما بین نوع تندش و زهرآگینی همبستگی معنی‌داری ثبت نشد.

واژه‌های کلیدی: قارچ بیمارگر حشرات، جداسازی، کنترل میکروبی، حشره میزبان.

## Study of the virulence and conidial germination types for some *Beauveria bassiana* isolates

Farzaneh Sadat Seyed Talebi<sup>1</sup>, Seyed Ali Safavi<sup>2</sup>, Reza Taleai-Hassanlou<sup>3\*</sup> and Ali Reza Bandani<sup>3</sup>

1, 2. Ph. D. Candidate and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Mar. 10, 2016 - Accepted: Dec. 31, 2016)

### ABSTRACT

In the present study, some isolates of *Beauveria bassiana* were isolated from different soil samples and their virulence was investigated against Sunn pest *Eurygaster integriceps* (Hem., Scutelleridae), flour moth, *Ephestia kuehniella* (Hym., Pyralidae), and king meal worm, *Zophobas morio* (Col., Tenebrionidae). Twenty-three isolates were isolated using *Galleria*-baiting method from collected soil samples in different regions; Karaj, Urmia, Mako and Dezful and were identified. The insect hosts were infected using dipping method. The results showed that the fifth nymphal instars of Sunn pest and fourth larval instars of flour moth were susceptible to all isolates of *B. bassiana* while last larval instars of the beetle were resistant and no mortality was observed. The most virulent isolates were TV and TZ with approximately 90% mortality on *E. kuehniella* and *E. integriceps*. The isolates were categorized broadly into three classes: low virulent (0-33% mortality), medium virulent (34-67% mortality) and high virulent (68-100% mortality). On PDA medium, two distinct germination types of conidia were revealed including conidia with single and dual germ tubes. There were significant differences among isolates in their percentages of germination types but there was no significant correlation between virulence and conidial germination types here in our research.

**Keywords:** Entomopathogenic fungus, insect pest, isolation, microbial control.

\* Corresponding author E-mail: rtaleai@ut.ac.ir

## تازه‌های تحقیق

۱. سوسک (*Zophobas morio* (Col.: Tenebrionidae) در سن آخر لاروی در برابر قارچ *Beauveria bassiana* مقاوم است.
۲. درصد تندش‌های یک‌طرفه و دوطرفه برای کنیدی‌های جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* با هم متفاوت است.
۳. همبستگی معنی‌داری بین نوع تندش کنیدی‌ها و زهرآگینی آنها روی لاروهای شب‌پره آرد و پوره‌های سن گندم وجود نداشت.

## مقدمه

افزایش روز افزون استفاده از ترکیبات شیمیایی در کنترل آفات در زیست‌بوم‌های کشاورزی، خطرات و اثرات جانبی بسیاری را به دنبال داشته است که از آن جمله می‌توان به پدیده مقاومت، طغیان مجدد آفات، پیدایش آفات ثانویه، خطر بقایای سموم، اثر روی موجودات غیرهدف اشاره کرد. استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک (شکارگرها، پارازیتوئیدها، نماتدها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و ...) به عنوان جز مهم از مدیریت تلفیقی آفات (IPM) مطرح است. در بین بیمارگرهای حشرات، قارچ‌ها یکی از امیدبخش‌ترین عوامل در کنترل آفات به شمار می‌آیند (Goettel et al. 1955, Greathead 1992). از بین ۱۰۰ هزار گونه قارچ شناخته شده حدود ۷۵۰ تا ۱۰۰۰ قارچ بیمارگر حشرات در ۱۰۰ جنس وجود دارد (Vega et al. 2012). امروزه فرمولاسیون‌های تجاری برخی از گونه‌های قارچی برای کنترل انواع آفات مانند شته، تریپس، سفیدبالک، ملخ و پروانه‌ها در سراسر جهان استفاده می‌شود (Faria and Wraight 2007).

قارچ *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. دامنه میزبانی وسیع و متنوعی داشته و روی بیش از ۷۰۰ گونه از راسته‌های گوناگون حشرات، کنه‌ها و سایر بندپایان بیماری ایجاد می‌کند، با این وجود، بین جدایه‌های قارچی تخصص میزبانی قابل توجهی دیده می‌شود (Inglis et al. 2001, Goettel et al. 2001, Charnley 2003) و برخی فرمولاسیون‌های تجاری با تخصص میزبانی به بازار عرضه شده‌اند برای مثال

*Ostrinia nubilalis* Hubner برای *Ostrinil*<sup>®</sup> و *Leptinotarsa decemlineata* Say برای *Boverin*<sup>®</sup> (Riba et al. 1994)، در حالی که *Naturalis*<sup>®</sup> روی بیشتر راسته‌های حشرات مؤثر است (Butt et al. 2001).

جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria* توسط محققان مختلف از منابع مختلف (خاک و میزبان‌های مختلف) جداسازی و زهرآگینی آن‌ها علیه آفات مختلف آزمایش شده است (Todorova et al. 1994, Vandenberg et al. 1998, Talaei-Hassanloui et al. 2006, Santiago-Alvarez et al. 2006, Ngumbi et al. 2011, Sanchez-Pena et al. 2011). در بیشتر پژوهش‌ها، جداسازی جدایه‌های قارچی با انجام زیست‌سنجی روی یک گونه حشره یا حشرات یک راسته انجام شده است (Wraight et al. 2010, Zare et al. 2014) این در حالی است که بررسی اثر جدایه‌های مختلف در دامنه گسترده‌ای از میزبان‌ها می‌تواند درک بهتری از پتانسیل کنترلی این عامل را سبب شود.

شروع روند بیمارگری با اتصال و تندش کنیدی در سطح کوتیکول میزبان همراه است. در مطالعات انجام شده ارتباط بین زهرآگینی و ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی کنیدی چون اندازه، سرعت تندش، ساختار شیمیایی دیواره و ترشح آنزیمی مورد ارزیابی قرار گرفته است (St. Leger et al. 1996, Diane et al. 2005). در این میان بررسی ارتباط بین نحوه تندش کنیدی (قطبیت تندش) در جدایه‌های مختلف قارچی و زهرآگینی کمتر مورد توجه بوده است. طلایی حسنلویی و همکاران در بررسی زهرآگینی جدایه‌های *B. bassiana*، سه نوع تندش کنیدی را (تندش یک‌طرفه، دوطرفه و چند طرفه) از طریق مطالعات الکترون میکروسکوپی گزارش کردند و نشان دادند که زهرآگین‌ترین جدایه‌ها بیشترین میزان تندش یک‌طرفه را داشتند (Talaei-Hassanloui et al. 2007).

جداسازی جدایه‌های مختلف قارچی و انجام زیست‌سنجی روی میزبان‌های مختلف با در نظر گرفتن عوامل تأثیرگذار در زهرآگینی درک کامل‌تری از عملکرد این عوامل کنترلی فراهم خواهد کرد. تحقیق حاضر به منظور جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* از خاک مناطق مختلف و بررسی تأثیر نحوه تندش

گندم، شب‌پره آرد و سوسک زوفوباس در این تحقیق پرورش داده شدند. سن گندم از مزارع گندم ورامین جمع‌آوری شد و در جعبه‌های پلاستیکی با اندازه  $30 \times 30 \times 50$  سانتی‌متر روی دانه‌های گندم خیس شده (رقم پیش‌تاز) در انکوباتور نگهداری شدند. برای تخم‌ریزی نوارهای کاغذی چین خورده در ظروف آویزان شد. بعد از تفریح تخم‌ها، پوره‌ها به قفسه‌های پلاستیکی حاوی گلدان‌های سبز شده گندم و دانه‌های خیس شده منتقل شدند و از پوره‌های سن پنج این حشره برای آزمایش استفاده شد. شب‌پره آرد از کلنی موجود در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک آفات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه و در ظروف پلاستیکی حاوی آرد و مخمر (به ازاء هر کیلو آرد سبوس‌دار ۱۰ گرم مخمر) پرورش داده شد. از لاروهای سن چهار این حشره برای آزمایش‌ها استفاده شد. کلنی اولیه سوسک *Z. morio* از مرکز فرآوری خوراک حیوانات خانگی تهیه شد و در ظروف پلاستیکی حاوی سبوس گندم و تکه‌های سیب زمینی در انکوباتور پرورش داده شد. از لاروهای سن آخر نسل جدید (سه ماهه) این حشره برای آزمایش‌ها استفاده شد. شرایط نگهداری برای هر سه گونه حشره، دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی  $70 \pm 5$  دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود.

#### آزمون زهرآگینی نسبی جدایه‌ها

برای تعیین زهرآگینی جدایه‌های قارچی از لاروها یا پوره‌های هم‌سن این حشرات استفاده شد. بر اساس آزمایش‌های اولیه، سوسپانسیون قارچی با سه غلظت مشخص  $10^6$ ،  $10^7$  و  $10^8$  کنیدی بر میلی‌لیتر برای تیمار سن گندم، شب‌پره آرد و سوسک تهیه شد. برای شاهد آب مقطر استریل و تویین-۸۰ (۰/۰۲ درصد) استفاده شد. آزمون با روش غوطه‌وری به مدت ده ثانیه در ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی انجام گرفت. برای هر جدایه ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۰ حشره در نظر گرفته شد. ظروف حاوی حشرات (ظروف پلاستیکی  $4 \times 5 \times 7$  سانتی‌متر با درپوش توری و حاوی ماده غذایی) به انکوباتور منتقل شد، مرگ لاروها طی ده روز ثبت شد و کل آزمایش یک‌بار دیگر تکرار شد.

کنیدی در زهرآگینی آن‌ها علیه سه میزبان سن گندم *Eurygaster Puton* (Hem.: Scutelleridae) *Zophobas morio* Fabricius سوسک *integriceps* Zeller (Lep.: و شب‌پره آرد (Col.: Tenebrionidae) *Ephestia kuehniella* Pyralidae) انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی جدایه‌های قارچ *B. bassiana*

نمونه‌های مختلفی از خاک‌های مزارع و باغات شهرستان‌های کرج (ازبک ۵، تنکمان ۵ و مشکین دشت ۴ نمونه)، ارومیه (نازلو ۴ نمونه)، ماکو (قره تپه ۱ نمونه) و دزفول (زاویه ۷ نمونه) جمع‌آوری شد. هر نمونه حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم خاک از عمق ۲۰ سانتی‌متری زمین بود. برای جداسازی جدایه‌های قارچ *B. bassiana* از روش تله خاکی به‌وسیله لاروهای شب‌پره بزرگ موم‌خوار، *L. Galleria mellonella* استفاده شد (Meyling and Eilenberg 2006). به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم خاک الک شده در ظروف پلاستیکی ریخته شد و ۵ لارو سن آخر شب‌پره موم‌خوار به آن اضافه شد برای جلوگیری از تندش تار توسط لاروها، آن‌ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه در آب ۵۶ درجه سلسیوس قرار گرفته بودند (Meyling and Eilenberg 2006). ظروف به انکوباتور با شرایط دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $70 \pm 5$  درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد، به مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت و لاروهای مرده بعد از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲٪ روی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شد (Meyling 2007). بعد از کامل شدن رشد قارچ بر سطح بدن لاروها، کنیدی‌های روی لارو بر روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) کشت داده شد. برای هر منطقه از هر جدایه تک اسپور تهیه شد. برای شناسایی جدایه‌های قارچی از روش کشت اسلاید استفاده شد و اسلایدهای میکروسکوپی از نمونه‌ها تهیه و از کلید شناسایی هامبر برای شناسایی جدایه‌ها به صورت *Sensu lato* استفاده شد (Humber 2005).

##### پرورش حشرات

سه حشره متعلق به سه راسته‌ی مختلف شامل سن

### بررسی نوع تندش در محیط کشت

برای بررسی نوع تندش و تعیین قطبیت تندشی در جدایه‌های مختلف، تشتک پتری حاوی PDA با ۱۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی با غلظت  $10^6$  کنیدی بر میلی‌لیتر مایه‌کوبی شده و سپس تعدادی لامل روی سطح محیط کشت قرار داده شد بعد از ۲۰ ساعت لامل‌ها برداشته شد و روی لام به همراه یک قطره لاکتوفنل-کاتن بلو قرار گرفت. به این ترتیب اسلایدهای میکروسکوپی برای هر جدایه از ۳ تشتک پتری تهیه شد و حدود ۱۰۰ عکس از کنیدی‌های تندش کرده از هر جدایه به وسیله لنز دیجیتال دینو (Dino-Lite Corp., DinoCapture®, Taiwan) با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر گرفته شد و نحوه تندش کنیدی ثبت شد.

### تجزیه آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (SAS, 2002 ver. 9.1) صورت گرفت، مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از آزمون F-LSD انجام شد. برای تصحیح درصد مرگ‌ومیر در تیمارها به خاطر تلفات شاهد از فرمول Schneider-Orelli's استفاده شد. برای بررسی میزان زهرآگینی و نحوه تندش کنیدی، جدایه‌ها در سه دسته تقسیم بندی شدند: A- با زهرآگینی کم (۱۰ تا ۳۳ درصد تلفات)، B- زهرآگینی متوسط (۳۴ تا ۶۷ درصد تلفات) و C- زهرآگینی زیاد (۶۸ تا ۱۰۰ درصد تلفات) (Yip et al. 1992, Devi et al. 2009) و وجود همبستگی بین نوع تندش و زهرآگینی با ضریب همبستگی پیرسون بررسی شد.

### نتایج و بحث

#### جداسازی جدایه‌ها

از ۲۶ نمونه خاک جمع‌آوری شده، ۲۳ جدایه *B. bassiana* جداسازی و شناسایی شد (جدول ۱). دوره زندگی قارچ‌های بیمارگر حشرات در راسته Hypocreales شامل دو بخش پارازیتی و ساپروفیتی است که زندگی ساپروفیتی را روی جسد میزبان یا در خاک طی می‌کنند (Hajek and St. Leger 1994, Hajek and Shimazu 1996). خاک به دلیل حفظ قارچ

از اشعه فرابنفش خورشید، مهم‌ترین محیط برای پایداری قارچ‌های بیمارگر محسوب می‌شود (Klingensand and Haukeland 2006). جداسازی با تله گالریا از نمونه‌های خاکی روش معمول و مناسبی برای قارچ‌های بیمارگر محسوب می‌شود (Sevim et al. 2010, Raja Rishi et al. 2013). حساس بودن لارو این حشره به قارچ‌های بیمارگر، آسان و ارزان انجام شدن از مزیت‌های این روش محسوب می‌شود (Meyling 2007).

بر اساس آزمون‌های اولیه مشخص شد که بین سه میزبان مورد مطالعه، سن گندم نسبت به ۲۳ جدایه مختلف حساس‌تر و لارو سوسک مقاوم‌تر بود. بر همین اساس غلظت‌های آزمایش انتخاب شد. تمام جدایه‌ها برای پوره سن گندم و لارو شب‌پره آرد بیماری‌زا بودند در حالی‌که با غلظت‌های مورد استفاده، لارو سوسک *Z. morio* هیچ حساسیتی به جدایه‌ها نداشت و مرگ مشخصی مشاهده نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین و گروه‌بندی جدایه‌ها نشان داد که روند زهرآگینی در جدایه‌های مختلف روی پوره سن گندم ( $F_{22,46}=42.09$ )، جدایه‌های مختلف روی شب‌پره آرد ( $P<0.0001$ ) و لارو شب‌پره آرد ( $F_{22,46}=47.8$ ) متفاوت است ( $P<0.0001$ ). کم‌ترین زهرآگینی در جدایه DE و بیشترین زهرآگینی در جدایه‌های TV و TZ مشاهده شد. دسته‌بندی جدایه‌ها بر اساس درصد ایجاد مرگ نشان داد که ۸۲ درصد جدایه‌ها زهرآگینی متوسطی داشتند و در گروه B قرار گرفتند (جدول ۲). دوی و همکاران اثر ۲۹ جدایه مختلف از قارچ *B. bassiana* روی ۸ گونه حشره مختلف از راسته‌های متفاوت (بال‌پولک‌داران ۴ گونه، سخت‌بال‌پوشان ۲ گونه، یک گونه جوربال، یک گونه ناجوربال و یک گونه زنبور) بررسی کردند و نشان دادند که همه جدایه‌ها قدرت بیمارگری داشتند اکثر آن‌ها در درجه‌بندی A قرار گرفتند. به جز برای دو میزبان *Chilo partellus* و *Maconellicoccus* (Lep.: Pyralidae) و *hirsutus* Green (Hem.: Pseudococcidae) که بیشتر جدایه‌ها در درجه B زهرآگینی واقع شدند. این محققان جدایه‌های بررسی شده را فاقد ترجیح میزبانی دانسته و قارچ را به عنوان یک بیمارگر عمومی معرفی کردند (Devi et al. 2008).

جدول ۱. میانگین درصد مرگ ( $\pm$  خطای معیار) ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف *B. bassiana* روی لاروهای سن چهارم *Ephestia kuehniella* (Ek) و پوره‌های سن پنجم *Eurygaster integriceps* (Ei) و میانگین درصد ( $\pm$  خطای معیار) تندش یک‌طرفه

کنیدی در جدایه‌های *Beauveria bassiana*

Table 1. Percentages (Mean $\pm$ SE) of mortality on 4<sup>th</sup> larval instars of *Ephestia kuehniella* and 5<sup>th</sup> nymphal instars of *Eurygaster integriceps* caused by different isolates of *Beauveria bassiana* and percentages (Mean $\pm$ SE) of unipolar conidial germination for *Beauveria bassiana* isolates

Locations	Isolates	Mortality (%)		unipolar conidial germination
		(Ek)	(Ei)	
Dezful- Zavieh- Cowpea farm1	DC1	35.06 $\pm$ 1.26	47.00 $\pm$ 2.31	95.20 $\pm$ 1.9
Dezful- Zavieh- Cowpea farm 2	DC2	33.22 $\pm$ 2.16	48.00 $\pm$ 1.00	93.30 $\pm$ 1.5
Dezful- Zavieh- Eggplant farm	DE	22.70 $\pm$ 1.39	32.5 $\pm$ 1.71	92.90 $\pm$ 1.7
Dezful- Zavieh- Citrus groves	DO	60.00 $\pm$ 2.04	62.50 $\pm$ 2.50	93.50 $\pm$ 1.6
Dezful- Zavieh- Turnip farm	DT	41.93 $\pm$ 2.16	49.67 $\pm$ 1.33	92.50 $\pm$ 0.45
Dezful- Zavieh- Vineyard	DV	36.87 $\pm$ 2.82	64.17 $\pm$ 1.54	97.70 $\pm$ 0.9
Dezful- Zavieh- Corn field	DZ	37.12 $\pm$ 1.36	55.00 $\pm$ 1.29	95.70 $\pm$ 2.2
Karaj- Meshkin dasht- Apple Garden	MA	54.00 $\pm$ 1.83	64.17 $\pm$ 2.01	84.60 $\pm$ 2.7
Mako- Gharetapeh- Wheat field	MAW	57.80 $\pm$ 2.06	63.00 $\pm$ 1.91	96.10 $\pm$ 1.8
Karaj- Meshkin dasht- Cherry Garden	MCH	43.15 $\pm$ 0.91	65.00 $\pm$ 1.83	85.50 $\pm$ 0.6
Karaj- Meshkin dasht- Organic farm	MO	57.78 $\pm$ 2.14	58.33 $\pm$ 2.11	97.80 $\pm$ 0.9
Karaj- Meshkin dasht- Vineyard	MV	46.57 $\pm$ 2.62	62.50 $\pm$ 1.12	88.40 $\pm$ 1.7
Karaj- Meshkin dasht- Corn field	MZ	54.07 $\pm$ 2.24	64.67 $\pm$ 1.67	94.20 $\pm$ 2.4
Karaj- Uzbek - Cucumbers farm	OC	37.03 $\pm$ 1.25	59.17 $\pm$ 2.39	98.20 $\pm$ 0.7
Karaj- Uzbek - Fruit garden	OG	55.96 $\pm$ 2.03	61.67 $\pm$ 2.11	95.30 $\pm$ 1.2
Karaj- Uzbek - Corn field 1	OZ1	58.43 $\pm$ 1.90	71.67 $\pm$ 1.67	97.62 $\pm$ 1.9
Karaj- Uzbek - Corn field 2	OZ2	39.91 $\pm$ 2.00	60.83 $\pm$ 2.01	85.50 $\pm$ 1.1
Karaj- Tankaman- Bean farm	TB	52.39 $\pm$ 2.31	61.67 $\pm$ 2.11	100.0 $\pm$ 0.0
Karaj- Tankaman- Eggplant farm	TE	50.70 $\pm$ 1.82	60.00 $\pm$ 1.83	72.24 $\pm$ 2.3
Karaj- Tankaman- Vineyard	TV	89.15 $\pm$ 2.39	86.00 $\pm$ 1.53	95.50 $\pm$ 0.5
Karaj- Tankaman- Corn field	TZ	75.27 $\pm$ 2.00	89.17 $\pm$ 2.71	91.90 $\pm$ 1.9
Urmia- Nazlo- Vegetable field	UN	45.74 $\pm$ 1.84	66.67 $\pm$ 1.61	85.50 $\pm$ 1.2
Urmia- Nazlo- Wheat field	UW	65.12 $\pm$ 2.10	65.83 $\pm$ 2.01	91.70 $\pm$ 1.0

جدول ۲. دسته‌بندی جدایه‌های فارچ *Beauveria bassiana* بر اساس مرگ لاروهای *Ephestia kuehniella* و پوره‌های

*Eurygaster integriceps*: A- زهرآگینی کم (۱۰ تا ۳۳ درصد تلفات)، B- زهرآگینی متوسط (۳۴ تا ۶۷ درصد تلفات) و C-

زهرآگینی زیاد (۶۸ تا ۱۰۰ درصد تلفات)

Table 2. Grouping of *Beauveria bassiana* isolates on the basis of caused mortalities on larvae of *Ephestia kuehniella* and nymphs of *Eurygaster integriceps*: A- Low virulence (0-33% mortality), B- Medium virulence (34-67% mortality) and C- High virulence (68-100% mortality)

Group	No. of isolates	Percentage of isolates	<i>E. kuehniella</i>		<i>E. integriceps</i>	
			Isolates	No. of isolates	Percentage of isolates	Isolates
A	2	8.6	DC2 <sup>m</sup> DE <sup>n</sup>	1	4.3	DE <sup>i</sup>
			UW <sup>c</sup> DO <sup>cd</sup> OZ1 <sup>d</sup> (MAW, MO) <sup>de</sup> (OG, MZ, MA) <sup>def</sup>			UN <sup>bc</sup> (MZ, MCH, TE) <sup>cd</sup> (DV, MA, TB) <sup>cde</sup> (DO, MV, MAW) <sup>cdef</sup>
B	19	82.6	TB <sup>efg</sup> TE <sup>fg</sup> MV <sup>gh</sup> (UN, MCH) <sup>ghi</sup> DT <sup>hijk</sup> OZ2 <sup>ijkl</sup> (OC, DZ) <sup>iklm</sup> DV <sup>klm</sup> DC1 <sup>lm</sup>	19	82.6	(OZ2, OG, UW) <sup>def</sup> OC <sup>efg</sup> TB <sup>fg</sup> DZ <sup>g</sup> (DT, DC2, DC1) <sup>h</sup>
C	2	8.6	TV <sup>a</sup> TZ <sup>b</sup>	3	13	(TV, TZ) <sup>a</sup> OZ1 <sup>c</sup>

حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون (F-LSD, P<0.05) می‌باشد.

Different letters are indicating significant differences among isolates in each column (F-LSD, P<0.05).

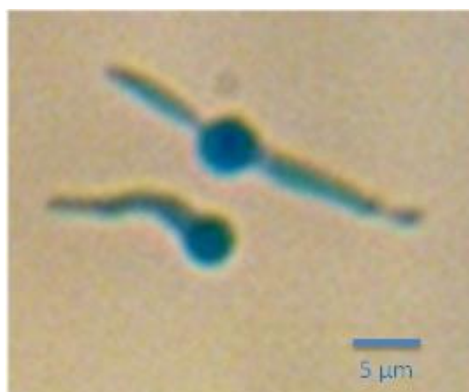
*B. bassiana* دارد. با وجود این که قارچ *B. bassiana* دامنه میزبانی وسیعی دارد در مواردی عدم حساسیت به این قارچ در برخی از گونه‌های خانواده Tenebrionidae مشاهده شده است. برای مثال برخی از گونه‌ها مانند سوسک‌های قرمز آرد شامل *Tribolium castaneum* (Herbst (Col.: Tenebrionidae و Chevolet (Col.: Tenebrionidae) *Ulomoides dermestoides* به این قارچ مقاوم هستند (Akbar et al. 2004, Pedrini et al. 2010). خصوصیات مختلف مورفولوژیک و فیزیولوژیک در حساسیت میزبان‌ها دخیل است، هر دو سوسک دارای ترکیبات ترش‌دی دفاعی از غدد پیش قفسه سینه و شکمی هستند که حاوی مشتقات کینون‌اند و اثرات دافعه، محرک (برای شکارگران) و ضد میکروبی دارند (Lord 2009, Pedrini et al. 2010). همچنین، کینون‌ها در سختی کوتیکول و نیز در دفاع میکروبی در کوتیکول شرکت دارند (Suderman et al. 2006, Yezerki et al. 2007). عدم تأثیر جدایه‌های آزمون شده در این تحقیق روی لارو سوسک نشان‌دهنده وجود ویژگی خاص در این حشره می‌باشد که روشن شدن آن می‌تواند نقش مهمی در تشریح کامل‌تر روند بیماری‌گری داشته باشد، لذا انجام مطالعات تکمیلی پیشنهاد می‌شود.

دو نوع تندش مختلف، یک‌طرفه و دو طرفه در کنیدی‌های جدایه‌های مختلف مشاهده شد (شکل ۱) که درصد تندش در جدایه‌های مختلف متفاوت بود ( $F_{22,46}=10.3, P<0.0001$ ) (جدول ۱). جدایه TB بیشترین تندش یک‌طرفه (۱۰۰ درصد) را داشت. طبق نتایج، همبستگی بین قطبیت تندشی کنیدی‌ها و زهرآگینی آن‌ها روی سن گندم ( $r=0.02, P=0.8$ ) و روی لارو شب‌پره آرد ( $r=0.07, P=0.5$ ) مشاهده نشد. طلایی حسنلویی و همکاران در بررسی زهرآگینی ده جدایه از *B. bassiana* علیه *Plutella xylostella* L. (Lep.: Plutellidae) سه نوع تندش (تندش یک‌طرفه، دو طرفه و چند طرفه) را مشاهده کردند. آنها برای نخستین بار همبستگی مثبت بین زهرآگینی و نوع تندش هم در تشنگ پتری روی محیط کشت SDAY و هم در اسکن الکترونی روی کوتیکول حشرات را گزارش کردند به طوری که زهرآگین‌ترین جدایه‌ها، بیشترین میزان تندش یک‌طرفه را داشتند.

طبق تحقیقات صحرایی، قارچ *B. bassiana* در زیستگاه‌های سن گندم، بیشترین پراکنش را دارد (Parker et al. 2003, Kazemi-Yazdi et al. 2011). بررسی پراکنش جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر در سن‌های زمستانگذران و خاک مناطق زمستانگذران (تله گالریا) در استان ایلام نشان داده است که قارچ *B. bassiana* از هر دو منشأ بیشترین پراکنش را داشته و در زیست‌سنجی جدایه‌ها با غلظت  $10^6$  روی پوره سن سه در شرایط آزمایشگاهی، بیشترین مرگ (۷۴ درصد) گزارش شده است (Nouri-Aiin et al. 2014). در آزمایشگاه نیز اثر مناسب جدایه‌های مختلف این قارچ روی سن گندم گزارش شده است (Trissi et al. 2012, Talaei-Hassanloui and Kharazi-Pakdel 2002, Abdollahi et al. 2010, پوره‌ها (به‌ویژه پوره سن پنجم) به طوری معنی‌دار به این قارچ حساس‌تر هستند (Talaei-Hassanloui and Kharazi-Pakdel 2002, Haji Allahverdi Pour et al. 2008, Mohammadbeigi and Port 2013).

در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ جدایه با غلظت  $10^8$  کنیدی بر میلی‌لیتر روی لارو *E. kuehniella* Wakefield (۱۰۰ درصد داشتند) (et al. 2005). بررسی اثر چهار جدایه از *B. bassiana* و دو جدایه از *M. anisopliae* و یک جدایه از *Verticillium lecanii* Zimmerman روی لارو سن آخر شب‌پره آرد نشان داد که جدایه‌های *B. bassiana* بیشترین اثر را داشتند و مؤثرترین جدایه تلفاتی با ۸۷ درصد داشته است (Draganova and Markova 2006). فرجی و همکاران اثر ۵ جدایه از قارچ *B. bassiana* (جداشده از خاک با تله گالریا) را روی لارو سن سوم شب‌پره آرد بررسی کردند که میزان مرگ از ۱۷ تا ۸۸ درصد بود (Faraji et al. 2013).

تاکنون گزارشی در زمینه زیست‌سنجی قارچ *B. bassiana* روی *Z. morio* بیان نشده است. از آنجایی که پرورش تجاری این حشره در کشورهای متعددی مورد توجه است (Eilenberg et al. 2015) پرداختن به عواملی که قادر به ایجاد بیماری‌های عفونی در کلنی‌های پرورش هستند، حایز اهمیت می‌باشد. طبق نتایج ما، لارو این سوسک مقاومت بالایی به قارچ



شکل ۱. دو نوع تندش یک‌طرفه (سمت پایین) و دو طرفه (سمت بالا) کنیدی‌های قارچ *Beauveria bassiana*  
Figure 1. Two kinds of conidial germinations, the unipolar germination (downward) and bipolar germination (upward) for *Beauveria bassiana* conidia

داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مختص هر گونه، نحوه تندش متفاوت باشد.

به‌طور کلی، جدایه‌های مختلف قارچی می‌توانند زهرآگینی متفاوتی روی میزبان‌های مختلف داشته باشند که توجه به این مهم می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های کنترلی بسیار با اهمیت باشد. بررسی عوامل تأثیرگذار در زهرآگینی، از یک طرف در روشن شدن روند بیماری‌گری مفید خواهد بود و از طرف دیگر می‌تواند به عنوان یک عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌های مؤثر محسوب شود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، نوع یا قطبیت تندش کنیدی به عنوان یک فاکتور کلیدی تک در گزینش جدایه‌ها یا توجیه تفاوت زهرآگینی آنها محسوب نشده است و در ادامه سایر خصوصیات قارچ و میزبان از جمله بیان آنزیم‌های مختلف در جدایه‌های قارچ و نوع یا مقادیر عصاره‌های کوتیکولی در میزبان‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد.

اسکن الکترونی نشان داد که کنیدی‌ها با تندش یک‌طرفه لوله تندش ضخیم‌تر تولید می‌کنند در حالی که در تندش‌های دو طرفه کنیدی‌ها، نفوذی در کوتیکول مشاهده نشده است. از دیگر دلایل ارائه شده توسط آنها برای زهرآگینی بیشتر کنیدی‌های با تندش یک‌طرفه، تجمع و هدایت آنزیم‌های مختلف تسهیل ورود به جلد حشره میزبان به یک طرف لوله‌تندشی در تندش‌های یک‌طرفه می‌باشد در حالی که این میزان آنزیم در تندش‌های دو طرفه در دو طرف توزیع می‌گردد (Talaei-Hassanlouei *et al.* 2007). عوامل مختلفی مثل شرایط تغذیه‌ای و فیزیکی هم می‌تواند در نوع تندش اثر داشته باشد (Brey *et al.* 1986, St. Leger *et al.* 1994). به هر حال، تحقیق حاضر، فقط در شرایط آزمایشگاهی روی محیط کشت انجام شد و ممکن است در شرایط طبیعی در سطح کوتیکول حشره به دلیل

## REFERENCES

- Akbar W, Lord JC, Nechols JR, Howard RW (2004) Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *Journal of Economic Entomology* 97 (2): 273-280.
- Altre JA, Vandenberg JD, Cantone, FA (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 332-338.
- Brey PT, Latge JP, Prevost MC (1986) Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 34-41.
- Butt TM, Jackson C, Magan N (2001) Introduction: Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: Butt T M, Jackson C, Magan N (eds.). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, UK. pp: 1-8
- Charnley AK (2003) Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research* 40: 241-321.
- Devi KU, Padmavathi J, Rao CUM, Khan PAA, Mohan CM (2008) A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology* 18 (10): 975-989.

- Draganova S, Markova E** (2006) Bioassays with isolates of Entomopathogenic fungi against *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep.: Pyralidae). Bulgarian Journal of Agricultural Science 12 (5): 637-643.
- Eilenberg J, Vlák JM, Nielsen-LeRoux C, Cappellozza S, Jensen AB** (2015) Diseases in insects produced for food and feed. Journal of Insects as Food and Feed 1 (2): 87-102.
- Faraji S, Mehrvar A, Derakhshan Shadmehri A** (2013) Studies on the virulence of different isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metscn.) Sorokin against Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) African Journal of Agricultural Research 8 (30): 4157-4161.
- Faria M, Wraight P** (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43: 237-256.
- Goettel MS, Hajek AE, Siegel JP, Evans HC** (2001) Safety of fungal biocontrol agents, In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds.) Fungal as biocontrol agent. CAB International, Wallingford, UK. pp. 346-347.
- Goettel MS, Johnson DL, Inglis GD** (1955) The role of fungi in the biological control of grasshoppers. Canadian Journal of Botany 73 (1): 1-75.
- Greathead DJ** (1992) Natural enemies of tropical locusts and grasshoppers: their impact and potential as biological control agents, In: Lomer CJ, Prior C (eds.), Biological control of locusts and grasshoppers. Wallingford, UK: C. A. B. International. pp. 105-121.
- Hajek AE, St. Lege RG**. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology 39: 293-322.
- Hajek, AE, Shimazu M** (1996) Types of spores produced by *Entomophaga maimaiga* infecting the gypsy moth *Lymantria dispar*. Canadian Journal of Botany 74: 708-715.
- Haji Allahverdi Pour H, Ghazavi M, Kharazi-Pakdel A** (2008) Comparison of the virulence of some Iranian isolates of *Beauveria bassiana* to *Eurygaster integriceps* (Hem.: Scutelleridae) and production of the selected isolate. Journal of Entomological Society of Iran 28(1): 13-26.
- Humber RA** (2005) Entomopathogenic Fungal Identification. Available on: [www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/19070510/APS/wkshoprev.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/19070510/APS/wkshoprev.pdf)
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser, H** (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds.), Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI, Wallingford. pp. 27-69.
- Kazemi Yazdî F, Eilenberg J, Mohammadipour A** (2011) Biological Characterization of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) from Overwintering Sites of Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* (Hem.: Scutelleridae) in Iran. International Journal of Agricultural Science and Research 2 (3): 7-16.
- Klingen I, Haukeland S** (2006) The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes, In: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds.) An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 145-211.
- Lord JC** (2009) Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of *Tribolium castaneum* with reduced oxygen and increased carbon dioxide. Journal of Applied Entomology 133 (2): 101-107.
- Meyling NV** (2007) Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual pp: 1-18.
- Meyling NV, Eilenberg J** (2006) Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agro ecosystem. Agriculture Ecosystems and Environment 113: 336-341.
- Mohammadbeigi A, Port G** (2013) Pathogenicity of the isolates *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on different nymph instars of the Sunn pest *Eurygaster integriceps* Puton (Hem.: Scutelleridae). International Journal of AgriScience 3 (12): 912-920.
- Ngumbi PM, Irungu LW, Ndegwa PN, Maniania, NK** (2011) Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to adult *Phlebotomus duboscqi* (Neveu-Lemaire) in the laboratory. Journal of Vector Borne Diseases 48: 37-40.
- Nouri Aiin M, Askary H, Imani S, Zare R** (2014) Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hibernating sites of Sunn Pest (*Eurygaster integriceps*) on Ilam Mountains. Iran International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3(12): 314-325.
- Parker BL, Skinner ML, Costa SD, Gouli S, Reid W, El Bouhssini M** (2003). Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hem.:Scutelleridae): collection and characterization for development. Biological Control 27: 260-272.
- Pedrini N, Villaverde ML, Fuse CB, Dal Bello GM, Juarez MP** (2010) *Beauveria bassiana* Infection Alters Colony Development and Defensive Secretions of the Beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Col.: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology 103 (4): 1094-1099.
- Raja Rishi R, Borah RK, Kumar R, Pandey S** (2013) Isolation, identification and mass production of soil microbes and their utility for biocontrol. International Journal of Advanced Life Sciences 6 (3): 168-173.
- Riba G, Couteaudier Y, Maurer P, Neuveglise C** (1994) Molecular Methods Offer New Challenges for Fungal Bioinsecticides, in VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. pp: 16-22.



- Sanchez-Pena SR, Lara JS, Medina RF** (2011) Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. *Journal of Insect Science* 11 (1): 1-10.
- Santiago-Alvarez C, Maranhao EA, Maranhao E, Quesada-Moraga E** (2006) Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. *BioControl* 51: 519-532.
- SAS Institute** (2002). SAS for Windows, Release 9.1, Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Sevim A, Demir İ, Hofte M, Humber RA, Demirbag Z** (2010) Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. *BioControl* 55: 279-297.
- St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo N, Roberts DW** (1996) Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1257-1264.
- St. Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW** (1994) Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology* 140: 1651-1660.
- Suderman RJ, Dittmer NT, Kanost MR, Kramer KJ** (2006) Model reactions for insect cuticle sclerotization: Cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (4): 353-365.
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A** (2002) Evaluation of Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* Put. susceptibility in different developmental stages to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *In: Proceedings of the Second International Conference on Alternative Methods of Plant Pest and Diseases Control*, 4-7 March., Lille, France. 588-591.
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel MS, Mozaffari, J** (2006) Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology* 16:525-534.
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel MS, Little S, Mozaffari, J** (2007) Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 102-107.
- Todorova SI, Cote JC, Martel P, Coderre D** (1994) Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa decemlineata* (Col.: Chrysomelidae) and *Coleomegilla maculata* lengi (Col.: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga* 39: 159-169.
- Trissi A, El Bouhssini M, Al Salti MN, Abdulhai M, Skinner M, Parker BL** (2012) Virulence of *Beauveria bassiana* against Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hem.: Scutelleridae) at different time periods of application. *Journal of Entomology and Nematology* 4(5): 49-53
- Vandenberg JD, Ramos M, Altre JA** (1998) Dose-response and age- and temperature-related susceptibility of the diamondback moth (Lep.: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). *Environmental Entomology* 27: 1017-1021.
- Vega F, Kaya H** (2012) *Insect Pathology*, 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press, USA.
- Wakefield ME, Cox PD, Moore D, Aquino De Muro M, Bell BA** (2005) Mycopest: Results and perspectives. *In: Proceedings of the 6th Meeting of COST Action 842 Working Group IV Biocontrol of Arthropod Pests in Stored Products*, 10-11 Jun., Locorotondo, Italy. 17-26.
- Wraight SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski, ST, Vandenberg, JD** (2010) Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 186-199.
- Yezerki A, Ciccone C, Rozitski J, Volingavage B** (2007) The effects of a naturally produced enzoquinone on microbes common to flour. *Journal of Chemical Ecology* 33 (6): 1217-1225.
- Yip, HY, Rath AC, Koen TB** (1992) Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Col.: Scarabaeidae, *Adoryphorus couloni*). *Mycological Research* 96: 92-96.
- Zare M, Talaei-Hassanloui R, Fotouhifar K** (2014) Relatedness of proteolytic potency and virulence in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* isolates. *Journal of Crop Protection* 3 (4): 425-434.