نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۸۷ – ۲۸(۲): ۴۵-۶۰

بررسی واکنش لاروهای سن آخر سرخرطومی میوه‌خوار بلوط، *Curculio glandium* (Col.: Curculionidae)، به نماتدهای بیمارگر حشرات *Steinernema bicornutum* و *Heterorhabditis bacteriophora* در شرایط آزمایشگاه

مصطفی نیکدل[۱و*]، غلامرضا نیکنام[۲]، محمود شجاعی[۱]، حسن عسگری[۳] و سید ابوالقاسم محمدی[۴]

۱- گروه حشره‌شناسی دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ۲- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز، ۳- بخش تحقیقات مبارزه‌ی بیولوژیک، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، ۴- گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تبریز.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mnikdel1374@gmail.com

A survey on the response of the last instar larvae of acorn weevil, *Curculio glandium* (Col.: Curculionidae), to entomopathogenic nematodes *Steinernema bicornutum* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the laboratory

M. Nikdel[1&*], G. Niknam[2], M. Shojaee[1], H. Askary[3] and S. A. Mohammadi [4]

1. Department of Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural, University of Tabriz, Tabriz, Iran, 3. Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran, 4. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding author, E-mail: mnikdel1374@gmail.com

چکیده

سرخرطومی میوه‌خوار بلوط، *Curculio glandium* Marsham، آفت میوه‌خوار درختان بلوط در جنگل‌های اغلب نقاط دنیا و ایران می‌باشد که با تغذیه از میوه‌ی این درختان باعث اختلال در تکثیر و زادآوری آن‌ها می‌شود. به دلیل محدودیت کاربرد سموم شیمیایی در عرصه‌های جنگلی و از طرفی لزوم کنترل آفت، تأثیر دو گونه از نماتدهای بیمارگر حشرات جمع‌آوری شده از جنگل‌های منطقه‌ی ارسباران، روی لاروهای سن آخر این آفت در دو دامنه‌ی دمایی در شرایط آزمایشگاه بررسی گردید. در طی این بررسی، ابتدا میزان نفوذ (penetration assay) نماتدهای *Steinernema bicornutum* و *Heterorhabditis bacteriophora* با مایه‌زنی ٤۰۰۰ IJs/ml و ٤۰ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ºC و تشریح لاروهای مرده آفت به ترتیب ۰/۵۵٪ و ۱/٦٪ محاسبه گردید. سپس آزمایش واکنش لاروهای آفت در دو دامنه‌ی دمایی ۲٤ºC–۲۱ و ۲۸ºC–۲۵ با استفاده از غلظت‌های صفر، ۱۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ لارو سن سوم (مرحله‌ی آلوده‌کننده) نماتدها در هر میلی‌لیتر آب مقطر (IJs/ml)، در داخل پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری حاوی کاغذ صافی آغشته به ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون از هر گونه نماتد انجام گرفت. حداکثر مرگ و میر ایجاد شده توسط *S. bicornutum* و *H. bacteriophora* در دمای ۲٤ºC–۲۱ به ترتیب ۲۵٪ و ۵۸/۳٪ و در دمای ۲۸ºC–۲۵ به ترتیب ۳۰/۵٪ و ٦۳/۵٪ بود. تجزیه‌ی واریانس میزان مرگ و میر لاروهای آفت در تیمارهای مختلف نشان داد که گونه‌ی نماتد، دما و غلظت، تأثیر

دریافت: ۱۳۸۶/۱۲/۱، پذیرش: ۱۳۸۷/۸/۷.

معنی‌داری بر مرگ و میر داشتند. با افزایش غلظت نماتد، تلفات لاروهای سرخرطومی نیز افزایش یافت. بیشترین میزان نفوذ نماتد به بدن لارو سرخرطومی و بیشترین درصد مرگ و میر آن در هر دو دامنه‌ی دمایی به گونه‌ی *H. bacteriophora* تعلق داشت. براساس تجزیه‌ی پروبیت، LC_{50} نماتد *H. bacteriophora* در دو دامنه‌ی دمایی مورد آزمایش به ترتیب ۱۳۳۱ و ۱۰۳۷ IJs/ml محاسبه گردید. تجزیه‌ی رگرسیون لگاریتم غلظت و پروبیت تعداد لاروهای مرده، رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری بین غلظت و مرگ و میر را در هر دو گونه و دامنه‌های دمایی نشان داد. به این ترتیب گونه‌ی *H. bacteriophora* در مقایسه با گونه‌ی *S. bicornutum* تأثیر بیشتری داشته و جهت بررسی‌های تکمیلی بعدی در شناسایی عامل مؤثر کنترل زیستی آفت پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: سرخرطومی میوه‌خوار بلوط، *Curculio glandium*، نماتدهای انگل حشرات، کنترل بیولوژیک

Abstract

The acorn weevil, *Curculio glandium* Marsham, is an important forest pest of oak trees in most of countries as well as Iran. The pest disturbs regeneration of host trees by feeding on their acorn. The necessitate to control the pest as well as limitations of chemical pesticide application in natural resources, different indigenous entomopathogenic nematodes (EPNs): *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema bicornutum* were tested under laboratory conditions upon the fifth instar larvae of acorn weevil collected from Arasbaran forest. In the first experiment, penetration assay was conducted using a suspension of 4000 IJs of the EPNs per 1 ml distilled water in multi-well plates. The plates were incubated for 40 h at 25ºC and dead larvae were dissected. Penetration percentage was %1.6 for *H. bacteriophora* and %0.55 for *S. bicornutum*. In the second experiment, *H. bacteriophora* and *S. bicornutum* were applied at different concentrations (0, 150, 250, 500, 1000 and 2000 IJs per 1ml of distilled water) in the 9 cm Petri plates lined with filter papers in order to test their capability of parasitization of the fifth instar larvae of *C. glandium*. The experiments were conducted at two temperature ranges (21-24ºC and 25-28ºC). Maximum mortality caused by *H. bacteriophora* and *S. bicornutum* were %58.3, %25 (at 21-24ºC) and %63.5, %30.5 (at 25-28ºC), respectively. Therefore, *H. bacteriophora* caused higher larval mortality comparing to *S. bicornutum* at both temperature ranges. Analysis of variance revealed significant nematode species and concentration as well as temperature effects on larval mortality. By increasing of concentration of nematode and temperature, larval mortality was raised. The highest penetration in larva and the highest mortality of fifth instar larvae of *C. glandium* was observed for *H. bacteriophora* under the both temperature ranges. Based on probit analysis, the LC_{50} of *H. bacteriophora* at two temperature ranges of 21-24ºC and 25-28ºC were determined 1331 and 1037 IJs/ml, respectively. Regression analysis showed significant relationship between concentrations and larval mortality in both nematodes and both temperature ranges. Therefore, *H. bacteriophora* comparing to *S. bicornutum* is more effective and can be suggested for complementary studies toward finding a suitable biocontrol agent of the pest.

Key words: acorn weevil, *Curculio glandium*, entomopathogenic nematodes, biological control

مقدمه

سرخرطومی میوه‌خوار بلوط، *Curculio glandium* Marsham، یکی از آفات مهم میوه‌خوار در جنگل‌های بلوط می‌باشد که با تغذیه از محتویات داخلی بذر در طی پنج مرحله‌ی لاروی خسارت قابل توجهی به درختان بلوط وارد می‌سازد و در زادآوری و تجدید حیات این درختان مشکلات زیادی را ایجاد می‌کند. این حشره تاکنون از کشورهای فرانسه، انگلیس، شمال آمریکا، اسپانیا، یوگسلاوی سابق، چک، اسلواکی و اغلب جمهوری‌های شوروی سابق

گزارش شده است (Maksimovic *et al.*, 1982). این آفت در ایران از استان‌های غربی و جنوب غرب کشور شامل آذربایجان شرقی و غربی، کردستان، اردبیل و فارس گزارش شده و دارای اهمیت اقتصادی زیادی می‌باشد (Abai, 1984). این آفت در جنگل‌های ارسباران (استان آذربایجان شرقی) روی دو گونه بلوط *Quercus petraea* و *Q. macrantera* فعالیت داشته و علاوه بر درختان بلوط که میزبان اصلی آن هستند، گاهی به میوه‌ی درختان فندق نیز حمله می‌کند (Sadaghian & Nikdel, 2007).

بر اساس مطالعات انجام گرفته در جنگل‌های بلوط ارسباران، سرخرطومی میوه‌خوار بلوط به صورت لارو سن آخر (سن پنجم) در داخل خاک اطراف درختان بلوط (محل ریزش میوه‌ها) و در عمق ۱۰ تا ۳۵ سانتی‌متری زمستان‌گذرانی می‌کند. حشرات کامل در اواسط بهار ظاهر شده و تخم‌های خود را داخل میوه‌های تازه‌ی درختان میزبان قرار می‌دهند. تغذیه و فعالیت لاروها از تیرماه تا مهرماه ادامه می‌یابد و هم‌زمان با موعد ریزش میوه‌ها در پاییز، لاروهای سن آخر سرخرطومی از میوه‌های آلوده خارج شده و تا بهار سال بعد داخل خاک باقی می‌مانند. بدین ترتیب این حشره در منطقه‌ی ارسباران یک نسل در سال ایجاد می‌کند (Sadaghian & Nikdel, 2007). اگر چه به دلیل وجود تنوع وسیع زیستی در عرصه‌های جنگلی، دشمنان طبیعی نسبتاً زیادی در محل‌های زندگی آفت یافت می‌شوند اما گاهی به لحاظ برخی تغییرات محیطی در اکوسیستم‌های جنگلی که عمدتاً با دخالت انسان و یا گاهی بر اساس تغییرات آب و هوایی و اکوسیستمی در این عرصه‌ها رخ می‌دهد، طغیان و خسارت شدید سرخرطومی میوه‌خوار حادث شده و اعمال شیوه‌های کنترل کاربردی را ضروری می‌سازد (Nikdel & Sadaghian, 2001). از طرفی با توجه به محدودیت کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی در عرصه‌های منابع طبیعی لازم است از عناصر و عوامل کنترل بیولوژیک آفت به خصوص از عوامل بومی نظیر نماتدهای بیمارگر حشرات (EPNs[1]) استفاده شود. کاربرد نماتدها در کنترل حشرات آفت از سال‌ها پیش در اغلب کشورهای اروپایی و آمریکا رایج شده و در کنترل تعداد زیادی از حشرات به خصوص آفاتی که مرحله‌ای از زندگی آن‌ها خاک‌زی می‌باشد، موفقیت زیادی داشته است (Ellers-Kirk *et al.*, 2000; Mracek & Sturhan, 2000; Schroer & Ehlers, 2005;

1- Entomopathogenic nematodes

(Shapiro-Ilan & Cottrell, 2005) . فرمولاسیون‌های متعددی نیز از این نماتدها بر حسب محل زندگی آفت، موقعیت کاربرد و یا نوع محصول، تولید شده‌اند. تاکنون ۱۹ گونه آفت سرخرطومی حساس به EPNs در دنیا شناخته شده‌اند و کنترل برخی از آن‌ها با استفاده از نماتدها انجام می‌گیرد (Smith, 2007). هم‌چنین کنترل طبیعی و کاربردی تعدادی از دوبالان، سخت‌بال‌پوشان و بال‌پولک‌داران آفت توسط گونه‌های *Heterorhabditis* و *Steinernema* در کشورهای مختلف از جمله چین، آمریکا، دانمارک، استرالیا و انگلستان از موارد استفاده‌ی EPNs می‌باشد. در آمریکا، نماتدهای *Steinernema feltiae* و *Heterorhabditis bacteriophora* به ترتیب ۶۷ و ۸۳ درصد مرگ و میر در لاروهای مگس *Lycoriella auripila* (Winn) (Dip.: Sciaridae) ایجاد کردند (Nickle & Cantelo, 1991). کاربرد نماتد *S. feltiae* علیه سرخرطومی آلو، *Conotrachelus nenuphar* Herbst، در آمریکای شمالی تأثیر قابل توجهی در مرحله‌ی لاروی آفت ایجاد کرده است (Shapiro-Ilan *et al*., 2002).

در ایران، درباره‌ی نماتدهای بیمارگر و انگل حشرات مطالعاتی در چند سال اخیر شروع شده ولی تاکنون استفاده از این نماتدها کاربرد عملی پیدا نکرده است. البته در همین مدت کم موارد متعددی از وجود آن‌ها درخاک‌های مناطق مختلف کشور گزارش شده است (Nikdel *et al*., 2002; Parvizi, 2003; Tanha Maafi *et al*., 2006). با توجه به موارد مذکور، امکان استفاده از نماتدهای بیمارگر در کنترل حشرات آفت در ایران وجود دارد. به همین منظور در این مطالعه کارآیی دو گونه از این نماتدها علیه لاروهای سن پنجم آفت سرخرطومی بلوط جنگل‌های ارسباران در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

دو گونه از نماتدهای انگل حشرات شامل *Steinernema bicornutum* و *H. bacteriophora* از خاک‌های نمونه‌برداری شده از مناطق جنگلی ارسباران با استفاده از لارو سن آخر پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ، *Galleria mellonella* (L.)، استخراج، شناسایی و جهت انجام آزمایش انتخاب شدند. شناسایی نماتدها بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی، تصاویر

میکروسکوپ الکترونی آن‌ها و نیز لقاح بین‌گونه‌ای (cross breeding) (در مورد *S. bicornutum*) انجام گرفت. لاروهای سن سوم (IJ) (infective juvenile) این نماتدها براساس روش Woodring & Kaya (1988) در طی شش روز قبل از آزمایش با استفاده از تله‌ی وایت (White trap) جمع‌آوری و در یخچال (۷–۸ºC) نگهداری شدند. برای به دست آوردن غلظت‌های لازم نماتدها، از روش رقیق‌کردن متوالی استفاده گردید (Glazer & Lewis, 2000).

میوه‌های آلوده به سرخرطومی درختان بلوط (گونه‌ی *Q. petraea*) در فاصله‌ی ارتفاعی ۱۲۰۰ تا ۱۵۰۰ متر جنگل‌های ارسباران در اوایل مهرماه سال ۱۳۸٦ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. با توجه به این که در این مرحله، لاروهای سن آخر (سن پنجم) سرخرطومی از میوه‌های آلوده خارج شده و وارد خاک می‌شوند، میوه‌های جمع‌آوری‌شده، داخل جعبه‌هایی از جنس پلی‌استایرن به ابعاد ۵ × ۱۰ × ۲۰ سانتی‌متر نگهداری شدند تا به تدریج لاروهای خارج‌شده تفکیک و جمع‌آوری شوند. لاروهای خارج‌شده از میوه‌های بلوط، در طی ۲٤ ساعت قبل از تیمار با نماتد، در ظروف شیشه‌ای مات در شرایط معمولی اتاق نگه‌داری شدند.

برآورد میزان نفوذ نماتد

در این آزمایش ابتدا کف ۱۰ چاهک از چاهک‌های سه پلیت زیست‌سنجی با یک لایه کاغذ صافی هم‌اندازه‌ی چاهک پوشیده شدند. سپس با استفاده از میکروپیپت، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ٤۰۰۰ IJs/ml (شامل ۲۰۰ لارو آلوده‌کننده یا IJ) حاوی نماتد *S. bicornutum* در هر چاهک از پلیت اول و به همان ترتیب سوسپانسیون *H. bacteriophora* در پلیت دوم مایه‌زنی شدند. در پلیت سوم نیز کاغذهای صافی با همان مقدار آب مقطر به عنوان تیمار شاهد مرطوب گردید. بدین ترتیب سه تیمار و هر تیمار با ده تکرار در نظر گرفته شد. در هر سه پلیت، داخل هر یک از چاهک‌ها یک لارو سن آخر *C. glandium* منتقل و به مدت دو روز در دمای ۲۵ºC نگهداری شدند. بعد از حدود ٤۰ ساعت، ضمن بررسی وجود لاروهای مرده در هر یک از پلیت‌ها، لاروهای مرده در زیر بینوکولر تشریح و تعداد نماتدهای واردشده به داخل هر لارو شمارش گردید. درصد نفوذ هر گونه نماتد به بدن هر لارو بر اساس تعداد لاروهای نماتد (IJs) واردشده و بر اساس فرمول P = N×100/T محاسبه شد. در این فرمول T، N و P به

ترتیب تعداد نماتدهای اولیه‌ی مایه‌زنی‌شده به چاهک، نماتدهای شمارش‌شده در هر لاشه (IJ واردشده به بدن هر لارو مرده) و درصد نفوذ را نشان می‌دهند (Glazer & Lewis, 2000).

بررسی بیماری‌زایی

برای انجام آزمایش بیماری‌زایی دو گونه نماتد روی لاروهای سرخرطومی، کف پتری‌دیش‌های با قطر ۹ سانتی‌متر با کاغذ صافی هم‌اندازه‌ی پتری پوشانده شده و در تمام تیمارها از آن‌ها استفاده شد. به طوری که برای هر یک از غلظت‌های صفر، ۱۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ IJs/ml، پنج پتری‌دیش انتخاب شده و کاغذ صافی کف آن‌ها با ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تیمار مربوطه مایه‌زنی گردید. سپس ۱۲ لارو سن پنجم سرخرطومی *C. glandium* در هر پتری قرار داده شد. در پتری‌دیش‌های شاهد به جای سوسپانسیون نماتد، از دو میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. پتری‌های آماده‌شده به مدت سه روز در دمای ۲۴ºC–۲۱ نگه‌داری و نتایج مرگ و میر لاروهای تیمارشده بعد از سه روز بررسی گردید. این مرحله از آزمایش در دمای ۲۸ºC–۲۵ نیز به همان صورت طراحی گردید. شایان ذکر است که لاشه‌ی لاروهای آلوده به نماتد *H. bacteriophora* قهوه‌ای رنگ (شکل ۱) اما در مورد گونه‌ی *S. bicornutum* لاشه‌ها رنگ طبیعی بدن لارو زنده را داشتند. تجزیه‌ی آماری داده‌های مربوط به درصد مرگ و میر ناشی از گونه‌های نماتد در دو دامنه‌ی دمایی با نرم‌افزار SAS، محاسبه‌ی LC_{50} و LC_{90} با نرم‌افزار SPSS, 13.0 (SPSS, 2004) و تهیه‌ی نمودارها و خطوط رگرسیون مربوطه با نرم‌افزار Excel انجام گرفت. شایان ذکر است که در موارد وجود تلفات در شاهد، از فرمول Abbott (1925) برای اصلاح درصد مرگ و میر در تیمارها استفاده شد.

نتایج

در آزمایش تعیین درصد نفوذ نماتدهای مورد بررسی در پلیت‌ها، میزان نفوذ *H. bacteriophora* و *S. bicornutum* به ترتیب ۱/۶٪ و ۰/۵۵٪ تعیین گردید؛ یعنی قدرت نفوذ گونه‌ی اول حدود سه برابر گونه‌ی دوم بود.

در آزمایش زیست‌سنجی روی کاغذ صافی و پتری‌دیش‌ها، به طور کلی قدرت بیماری‌زایی دو گونه، تأثیر دو دامنه‌ی دمایی و نیز غلظت نماتدها بر مرگ و میر لاروهای سن آخر *C. glandium* دارای اختلاف معنی‌دار بودند. با افزایش غلظت در هر دو گونه‌ی نماتد و در هر دو دامنه‌ی دمایی تلفات لاروها افزایش یافت و رابطه‌ی مستقیم بین غلظت و مرگ و میر مشاهده شد. همچنین افزایش دما سبب افزایش مرگ لاروها گردید. اثر متقابل عوامل مورد بررسی به غیر از اثر متقابل گونه و دامنه‌ی دمایی دارای اختلاف معنی‌دار در ایجاد مرگ و میر بود (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیه‌ی واریانس مرگ و میر لاروهای سن آخر *C. glandium* تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت دو گونه نماتد در دو دامنه‌ی دمایی ۲۴°C–۲۱ و ۲۸°C–۲۵.

Table 1. ANOVA of *C. glandium* larval mortality exposed to different concentrations of *H. bacteriophora* and *S. bicornutum* at 21-24ºC and 25-28ºC.

Source of variation	df	MS	F	P
Species	1	59.99	1188 **	0.0001
Temperature	1	0.88	7.9 **	0.006
Species × Temperature	1	0.064	0.01 ns	0.90
Concentration	5	102.63	1149.3 **	0.0001
Species × Concentration	5	4.71	21.9 **	0.0001
Temperature × Concentration	5	0.40	7.22 **	0.0001
Species × Temperature × Concentration	5	0.62	10.3 **	0.0001
E	96	0.07		
Total	119			
			CV = 5.74%	

**Significant difference at 1% level. ns: none significant.

حداکثر مرگ و میر در دمای ۲۴ºC–۲۱ توسط *H. bacteriophora*، ۵۸/۳٪ (درغلظت ۲۰۰۰ IJs/ml) و توسط *S. bicornutum*، ۲۶/۶٪ (درغلظت ۱۰۰۰ IJs/ml) به دست آمد و در محدوده‌ی دمایی ۲۸ºC–۲۵ حداکثر مرگ و میر لاروها توسط گونه‌ی اول ۶۳/۵٪ و در گونه‌ی دوم ۳۰/۵٪ بود که این میزان مرگ و میر در هر دو گونه در غلظت ۲۰۰۰ IJs/ml حاصل شد. به این ترتیب بیماری‌زایی *H. bacteriophora* در لارو سن پنجم سرخرطومی میوه‌خوار بلوط

بیش از *S. bicornutum* بوده و در هر دو دامنه‌ی دمایی (۲۴°C–۲۱ و ۲۸°C–۲۵) مرگ و میر بیشتری درتمام غلظت‌ها ایجاد کرد.

مقایسه‌ی میانگین درصد مرگ و میر لاروهای سرخرطومی در غلظت‌های مورد استفاده تحت تأثیر دامنه‌های دمایی مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. به طوری که در این جدول مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت و نیز دما درصد مرگ و میر لاروها در هر دو گونه‌ی نماتد افزایش یافته است ولی بین دو غلظت ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ IJs/ml اختلاف معنی‌دار وجود ندارد.

جدول ۲. مقایسه‌ی میانگین درصد مرگ و میر لاروهای سن آخر سرخرطومی *C. glandium* درغلظت‌های مختلف دو گونه نماتد تحت دو دامنه‌ی دمایی.

Table 2. Mean comparison of *C. glandium* larval mortality exposed to different doses of two nematode species at two temperature ranges. Temp. = Temperature.

Nematode	Temp.	Concentration (IJs/ml)					Means	LSD %5
		150	250	500	1000	2000		
H. bacteriophora	21-24°C	5.75	9.95	15.0	38.30	41.65	22.1	0.87
	25-28°C	8.63	13 .05	21.50	55.60	59.90	36.4	
S. bicornutum	21-24°C	2.47	5.90	8.40	28.55	27.75	14.6	0.87
	25-28°C	5.35	9.0	14.90	45.85	46.0	24.2	
	Means	5.6	8.3	15.0	42.1	43.8		1.38

تجزیه‌ی پروبیت داده‌ها و محاسبه‌ی LC_{50} دو گونه و دو دامنه‌ی دمایی نشان داد که به طور کلی مقادیر LC_{50} در گونه‌ی *H. bacteriophora* کمتر از گونه *S. bicornutum* بوده و در هر دو گونه با افزایش دما از مقادیر LC_{50} کاسته می‌شود (جدول ۳). بنابراین در کنترل آفت سرخرطومی میوه‌خوار بلوط، غلظت خیلی پایین یا سوسپانسیون رقیقی از نماتد *H. bacteriophora* برای کشتن ۵۰٪ افراد مورد تیمار نسبت به نماتد *S. bicornutum* لازم است. به عبارت دیگر، میزان حساسیت لاروهای سرخرطومی میوه‌خوار بلوط به *H. bacteriophora* نسبت به *S. bicornutum* بیشتر بوده و این موضوع در هر دو دامنه‌ی دمایی اتفاق افتاد.

جدول ۳. نتایج تجزیه‌ی پروبیت و رگرسیون لگاریتم غلظت و لاروهای مرده‌ی سرخرطومی *C. glandium*.

Table 3. Probit analysis results and probit/log regression line of *C. glandium* larval mortality.

Nematode	Temprature	LC_{50} (IJs/ml)	LC_{90} (IJs/ml)	R^2	Regression line (y = bx + a)
H. bacteriophora	21-24°C	9799	1331	0.9306	Y = 0.41x + 3.16
	25-28°C	5232	1037	0.9357	Y = 0.50x + 2.95
S. bicornutum	21-24°C	67758	5481	0.9148	Y = 0.39x + 2.56
	25-28°C	46402	4062	0.8689	Y = 0.37x + 2.68

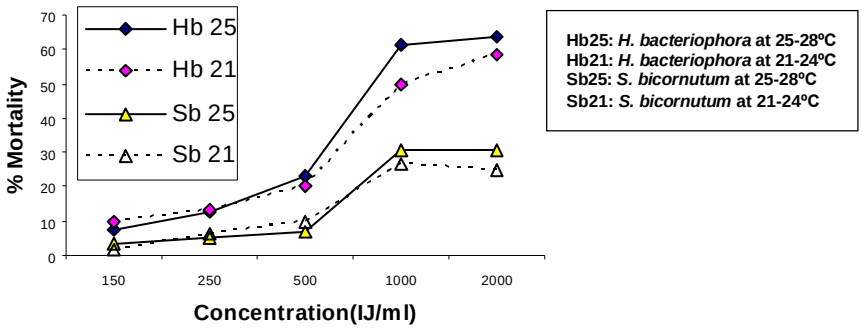
شکل ۱. مقایسه‌ی لارو زنده‌ی (پائین) سرخرطومی میوه‌خوار بلوط با لارو مرده (بالا)، تحت تأثیر نماتد *H. bacteriophora*.

Fig. 1. Comparison of live *C. glandium* larva (lower) with dead one (upper) exposed to *H. bacteriophora*.

تجزیه‌ی رگرسیون لگاریتم غلظت و پروبیت تعداد لاروهای مرده نیز نشان داد که رابطه‌ی مثبت و معنی‌داری بین غلظت و مرگ و میر لاروها وجود دارد. ضریب تبیین (R^2) خط رگرسیون غلظت با مرگ و میر درگونه‌ی *H. bacteriophora* در دماهای ۲۴°C–۲۱ و ۲۸°C–۲۵ به ترتیب برابر با ۰/۹۳۰۶ و ۰/۹۳۵۷ و در گونه‌ی *S. bicornutum* مقادیر فوق به ترتیب برابر با ۰/۹۱۴۸

و ۰/۸٦۸۹ بودند که مؤید روند صعودی میزان مرگ و میر در لاروها با افزایش غلظت نماتد می‌باشد (شکل ۳).

منحنی تغییرات میزان مرگ و میر لاروها توسط دو گونه نماتد در دو دامنه‌ی دمایی متفاوت و با غلظت‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است.



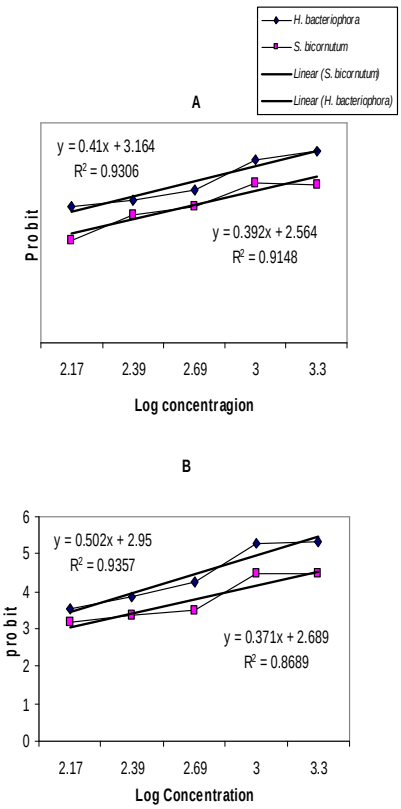
شکل ۲. میزان مرگ و میر لاروهای سن پنجم سرخرطومی میوه‌خوار بلوط تحت تأثیر دما و غلظت‌های مختلف نماتدهای *H. bacteriophora* و *S. Bicornutum*.

Fig. 2. Effect of different nematode concentrations of *H. bacteriophora* and *S. bicornutum*, and temperatures on the mortatlity rate of fifth instar larvae of *C. glandium*.

بحث

بیماری‌زایی بالا در گونه‌ی *H. bacteriophora* با توجه به قدرت نفوذ بیشتر آن (۱/٦٪ در مقایسه با ۰/۵۵٪) و همراه بودن باکتری *Photorhabdus* با آن که نسبت به باکتری هم‌زیست گونه‌ی دیگر مواد حشره‌کش بیشتری تولید می‌کند، قابل توجیه است. ضمناً علت قدرت نفوذ بیشتر *H. bacteriophora* داشتن زائده‌ی دندان‌مانند پشتی (dorsal tooth) می‌باشد که آن را به نفوذ از طریق جلد بدن حشره (علاوه بر راه منافذ طبیعی بدن) قادر می‌سازد.

بدین ترتیب لاروهای سرخرطومی *C. glandium* میزبان مناسبی برای نماتد *S. bicornutum* نیستند و تقریباً در مطلوب‌ترین شرایط حداکثر مرگ و میر ناشی از آن ۳۰/۵٪ بوده است. از طرفی با عنایت به مطالعه‌ی Shapiro-Ilan & McCoy (2000)، چون در شرایط



شکل ۳. تجزیه‌ی پروبیت تغییرات میزان مرگ و میر لاروهای *C. glandium* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نماتد *H. bacteriophora* و *S. bicornutum* در دو دامنه‌ی دمای ۲۱–۲٤ºC (A) و ۲۵–۲۸ºC (B).

Fig. 3. Probit of mortality rate variation of *C. glandium* larvae exposed to different concentrations of *H. bacteriophora* and *S. bicornutum* (A) at 21-24ºC and (B) at 25-28ºC.

مزرعه‌ای نسبت به آزمایشگاه و گلخانه که شرایط کنترل‌شده‌ای دارند، حشرات کمتر حساس هستند و هم‌چنین بر اساس مطالعه‌ی Belair *et al*. (1999) – کاربرد چهار گونه از نماتدهای جنس *Steinernema* علیه لاروهای آفت برگ‌خوار باغات سیب، *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Lep.: Tortricidae) – که موضوع کاهش تأثیر عامل

کنترل زیستی در شرایط صحرائی را تأیید می‌کند، لذا مرگ و میر آفت در شرایط مزرعه با این نماتدها کمتر از مقادیر فوق خواهد بود و بدین ترتیب احتمالاً گونه‌ی *H. bacteriophora* به مراتب مناسب‌تر از گونه‌ی *S. bicornutum* عمل خواهد نمود.

بر اساس بررسی‌های محققین مختلف، در نماتدهای نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری با افزایش دما و نزدیک شدن آن به دمای مطلوب رشد نماتد- باکتری، بیماری‌زایی نماتد روی حشره‌ی میزبان زیاد می‌شود (Kepenekci *et al.*, 2004; Shapiro-Ilan & Cottrell, 2005). در این مطالعه نیز دامنه‌ی دمایی تأثیر معنی‌داری در میزان مرگ و میر لاروهای مورد آزمایش توسط نماتد نشان داد. البته مرحله‌ی زندگی میزبان هم در این مورد نقش مهمی دارد. از طرفی Belair *et al.* (2003) نشان داده‌اند که معمولاً نماتدهای مناطق حاره دمای بهینه‌ی بالاتری نسبت به ایزوله‌های مناطق معتدل دارند. اگر چه نماتدهای مورد استفاده در این مطالعه بومی ناحیه‌ی معتدل و سردسیر هستند، با وجود این افزایش دما تأثیر معنی‌داری در بیماری‌زایی آن‌ها داشت. اما برای حصول اطمینان بیشتر در این زمینه‌ی بررسی گونه‌های دیگر در منطقه و یا مقایسه‌ی نماتدهای مورد آزمایش با گونه‌های نواحی گرمسیر لازم است.

نکته‌ی دیگری که در مورد دمای مناسب برای تأثیر نماتد قابل ذکر می‌باشد این است که در صورت کاربرد صحرائی هر یک از این نماتدها یا گونه‌های دیگر علیه لاروهای سن آخر سرخرطومی میوه‌خوار بلوط، تأثیر آن‌ها در داخل خاک و در نیمه‌ی دوم پائیز مد نظر خواهد بود که در این دوره‌ی زمانی دمای داخل خاک نسبت به فصول بهار و تابستان کمتر است. با این حال حتی با وجود تأثیر مثبت دمای بالا در افزایش مرگ و میر در آزمایشگاه، مبنای محاسبه همان مرگ و میر در دماهای پائین خواهد بود. در مطالعه‌ی Kepenekci *et al.* (2004) در ترکیه در رابطه با تأثیر چهار استرین از نماتدهای EPNs علیه لاروهای سرخرطومی میوه‌ی فندق، *Curculio elephas* Gyll.، که هدف کنترل لاروهای آفت در داخل خاک سواحل دریای سیاه در پائیز بوده است، استرینی که در دمای مشابه داخل خاک، در آن موقع از سال، تأثیر مناسبی داشته است برای کنترل آفت معرفی گردیده است.

تجزیه‌ی پروبیت داده‌های دو گونه نماتد در دماهای مورد استفاده نشان داد که *H. bacteriophora* در دامنه‌ی دمایی ۲۵–۲۸ºC با داشتن کمترین مقادیر LC_{50} (۱۰۳۷ IJs/ml) و LC_{90} (۵۲۳۲ IJs/ml)، بیشترین شیب خط پروبیت را داراست و در دامنه‌ی دمایی ۲۱–۲٤ºC نیز با داشتن شیب خط بیشتر از گونه‌ی *S. bicornutum*، دارای LC_{50} برابر با ۱۳۳۱ IJs/ml می‌باشد (جدول۳). لذا این گونه به دلیل داشتن قدرت کشندگی بیشتر در حشره و یا حساسیت بیشتر حشره به آن، به عنوان گونه‌ی مناسب‌تر (نسبت به گونه‌ی *S. bicornutum*) جهت بررسی‌های صحرائی علیه آفت سرخرطومی میوه‌ی بلوط پیشنهاد می‌شود، زیرا در هر دو دامنه‌ی دمایی تأثیر مطلوب با کمترین دز را دارد. در مطالعه‌ی تأثیر گونه‌های *Heterorhabditis* و *Steinernema carpocapsae* و *S. feltiae* روی لاروهای سرخرطومی *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) در شرایط گلخانه‌ای در آمریکا نیز گونه‌های *Heterorhabditis* با ایجاد ۹٦٪ مرگ و میر مؤثرتر ازگونه‌های *Steinernema* در دز مشابه بوده‌اند (Smith, 2007).

مطالعات Shapiro-Ilan *et al.* (1999) ثابت کرده است که لاروهای مسن سرخرطومی ریشه، *Diaprepes abbreviatus* (L.)، نسبت به لاروهای جوان آن در برابر نماتدهای *Heterorhabditis indica*، *H. bacteriophora* و *Steinernema riobrave* حساس‌ترند. اگر چه در مورد سرخرطومی میوه‌خوار بلوط مقایسه‌ی سنین مختلف لاروی انجام نگرفته است اما با توجه به شرایط زندگی آن و این که تنها مرحله‌ی سن پنجم آن داخل خاک به‌سر می‌برد، در صورت استفاده از EPNs بهتر است برنامه‌ی کنترل آن در سن آخر (پنجم) لاروی انجام گیرد. زیرا سنین قبلی لاروهای آن داخل میوه (روی درخت) قرار دارند و کاربرد نماتدها در اندام‌های هوایی نسبت به کاربرد آن در خاک دارای مشکلات زیادی است. البته چنانچه مطالعات مشابهی با گونه‌های مختلف نماتد روی *C. glandium* انجام می‌شد، قضاوت بهتری در مورد نحوه و میزان تأثیر گونه‌های منطقه‌ی ارسباران روی این آفت و یا تفاوت تأثیر گونه‌های *Steinernema* و *Heterorhabditis* ارائه می‌گردید، اما با توجه به منابع موجود، این اولین بررسی EPNs در کنترل آفت سرخرطومی میوه‌خوار بلوط می‌باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تبریز (آزمایشگاه نماتدشناسی) و مؤسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور به خاطر تأمین امکانات لازم و مساعدت در اجرای این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

Abai, M. (1984) Study on the *Curculio glandium* Marsh. *Proceeding of XVII International Congress of Entomology, Hamburg, Federal Repulic of Germany*, 79-83.

Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 256-267.

Belair, G., Fournier, Y. & Dauphinais, N. (2003) Efficacy of steinernematid nematodes against three insect pests of crucifers in Quebec. *Journal of Nematology* 35, 259-265.

Belair, G., Vincent, C., Lemire, S. & Coderre, D. (1999) Laboratory and field assays with entomopathogenic nematodes for the management of oblique banded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Harris) (Tortricidae). *Supplement to the Journal of Nematology* 31, 684-689.

Ellers-Kirk, C. D., Fleischer S. J., Snyder R. H. & Lynch J. P. (2000) Potential of entomopathogenic nematodes for biological control of *Acalymma vittatum* (Coleoptera: Chrysomelidae) in cucumbers grown in conventional and organic soil management systems. *Journal of Economic Entomology* 93, 605-612.

Glazer, I. & Lewis, E. E. (2000) Bioasseys for entomopathogenic nematodes. pp. 229-247 in Navon, A. & Ascher, K. R. S. (Eds) *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. 324 pp. CAB International.

Kepenekci, I., Gokce, A. & Gaugler, R. (2004) Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematropica* 34, 199-204.

Maksimovic, M., Milivojevic, B. & Pekic, R. (1982) Damage to acorns in the oak seedling stand of kupinska Greda. *Zastita Bilja* 33, 221-257.

Mracek, Z. & Sturhan, D. (2000) Epizootic of the entomopathogenic nematode *Steinernema intermedium* (Poinar) in an aggregation of the bibionid fly, *Bibio marci* L. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 149-150.

Nickle, W. R. & Cantelo, W. W. (1991) Control of a mushroom-infesting fly, *Lycoriella mali*, with *Steinernema feltiae*. *Journal o f Nematology* 23, 145-147.

Nikdel, M. & Sadaghian, B. (2001) Biology and natural enemies of gypsy moth in Arasbaran forests (Iran). *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 8, 29-37. [In Persian with English summary].

Nikdel, M., Sadaghian B., Dordaei, A. A. & Tavanaei G. H. (2002) First record of mermithid entomopathogenic nematode, *Hexamermis* sp. on *Euproctis chrysorhoea* L. from Iran. *Pajouhesh-va-Sazandegi* 14, 102-103. [In Persian].

Parvizi, R. (2003) An evaluation of the efficacy of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* sp. in controlling immature stages of the apple clearwing, *Synanthedon myopaaeformis*. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 34, 303-311. [In Persian with English summary].

Sadaghian, B. & Nikdel, M. (2007) Damage assessment of the acorn pests in Arasbaran forests. *Iranian Journal of Forests and Range Protection Research* 4, 113-118. [In Persian with English summary].

Schroer, S. & Ehlers, R. U. (2005) Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Biological Control* 33, 81-86.

Shapiro-Ilan, D. I., Cate, J. R., Hunsberger, J. A. & McCoy, C. W. (1999) Effects of temperature and host age on suppression of *Diaprepes abbreviatus* (Col., Curculionidae) by entomopathogenic nematodes. *Journal of Economical Entomol*ogy 92, 1088-1092.

Shapiro-Ilan, D. I. & Cottrell, Ted E. (2005) Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 89, 150-156.

Shapiro-Ilan, D. I. & McCoy, C. W. (2000) Suseptibility of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to different rate of entomopathogenic nematodes in the greenhouse. *Florida Entomologist* 83, 1-9.

Shapiro-Ilan, D. I., Mizell R. F. & Campbell, J. F. (2002) Susceptibility of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, to entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 34, 246-249.

Smith, K. A. (2007) Control of insect pests with entomopathogenic nematodes I. control of weevils with entomopathogenic nematodes, in the Food & Fertilizer Technology Center Network (FFTC). Availble on: *http:www. Agnet.org/library/tb/139a/* (accessed 27 November 2007).

SPSS (2004) *SPSS user's manual for windows, release 13.0*. SPSS Incorporation, Chicago.

Tanha Maafi, Z., Ebrahimi, N., Abootorabi, E. & Spiridonov S. E. (2006) Record of two steinernematid species from Iran. *Proceeding of the 17th Iranian Plant Protection Congress*, 482.

Woodring, J. L. & Kaya, H. K. (1988) *Steinernematid and heterorhabditid nematodes*: *a handbook of biology and techniques*. 28 pp. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas.