

اثرات دوگانه قارچ بیمارگر حشرات روی کنترل آفات و بیماری های گیاه

مریم رنجبران

دانشجوی کارشناسی گیاه پزشکی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

ranjbaran57@gmail.com

مقدمه

انگور با بیش از ۷/۴ میلیون هکتار سطح زیر کشت، یکی از محصولات است که در سراسر دنیا بیشترین کشت و کار را به خود اختصاص داده است. اما مانند هر محصول دیگری، همواره در معرض تهدید آفات و بیماری ها بوده و همین منجر به استفاده از سموم شیمیایی فراوانی شده است. از بین آفات، کرم خوسه خوار انگور با نام علمی *Lobesia botrana* و از بین عوامل بیماری زا، قارچ لیگنینولایتیک *Eutypella microtheca* از مهم ترین عوامل تهدید کننده اقتصادی انگور در سراسر جهان به شمار می آیند.

L. botrana بیشتر در مناطقی از جمله جنوب اروپا (فرانسه، اسپانیا، ایتالیا و جزایر مدیترانه ای) و آمریکای جنوبی، نظیر آرژانتین و شیلی اهمیت اقتصادی دارد. لاروهای آن قادر به تغذیه از جوانه های گل و میوه هستند. قارچ های لیگنینولایتیک، نظیر گونه های *E. microtheca*، *Phaeomoniella chlamydospora* و گونه های جنس *Phaeoacremonium* موجب بروز بیماری های تنه مو با علائمی نظیر نکروز، تغییر رنگ چوب، آلودگی های آوندی و پوسیدگی می شوند. خسارت اقتصادی ناشی از این عوامل بیش از ۱/۵ میلیارد دلار در سال تخمین زده شده است. برای کنترل این دو عامل خسارت زا، معمولاً ترکیبات شیمیایی استفاده می شوند. البته برای کنترل *L. botrana* راهکار اختلال در جفتگیری نیز در تاکستان ها به کار گرفته می شود. اما با وجود استفاده از ترکیبات شیمیایی این آفت همچنان طغیان می کند و با توجه به آثار زیان بار زیست

محیطی که این ترکیبات روی تنوع زیستی دارند، به شدت مورد انتقاد هستند. البته هنوز روش قطعی و موثر، اقتصادی و سازگار با محیط زیست برای کنترل این عوامل خسارت زا ارائه نشده است اما با جایگزین کردن عوامل کنترل بیولوژیک مثل قارچ های بیمارگر حشرات می توانیم به کنترل آفات، در عین دوستی با محیط زیست امیدوار باشیم. EPF ها قارچ هایی هستند که برای گیاهان ضرری ندارند بلکه برای کنترل بیولوژیک بندپایان آفت محصولات کشاورزی، به ویژه حشرات استفاده می شوند. این قارچ ها طیف وسیعی از گونه های قارچی را از دید مورفولوژیکی، فیلوژنتیکی و اکولوژیکی شامل می شوند. اگر چه EPF ها به طور ویژه برای کنترل حشرات آفت در اکوسیستم های طبیعی و مصنوعی شناخته شده است، اما مطالعات اخیر به تازگی نشان داده اند که برخی از آن ها اثرات مهاری در رشد برخی از عوامل بیماری زا قارچی نیز دارند. بنابراین با گسترده تر شدن مطالعات، به استفاده از این دسته EPF ها برای کنترل همزمان چند عامل خسارت زا در برنامه مدیریت تلفیقی آفات (IPM) می توان بسیار امیدوار بود. در این پژوهش، اثر سه استرین یکی از گونه های EPF به نام *Metarhizium anisopliae* به طور همزمان روی شب پره *L. botrana* در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه، و قارچ *E. microtheca* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است. یافته های این پژوهش به عنوان پایه استفاده از EPF به عنوان عامل بیوکنترل دوگانه در تاکستان ها برای کنترل همزمان آفات و بیماری ها ارائه می شود.

استرین‌های EPF

استرین‌های *M. anisopliae* از خاک تاکستان‌های واقع در سن خوان آرژانتین تهیه شدند. جداسازی استرین‌ها از نمونه‌های خاک با کمک لاروهای کرم آرد، با نام علمی *Tenebrio molitor* به عنوان طعمه صورت گرفت. پس از آزمایش‌های اولیه مهارکننده روی *L. botrana*، سه استرین CEP۴۱۳، CEP۵۸۹ و CEP۵۹۱ برای انجام آزمایش اصلی انتخاب و ابتدا از لحاظ مورفولوژیکی و سپس ژنتیکی شناسایی شدند. استرین‌ها دارای کنیدی‌های استوانه‌ای به طول ۵-۹ میکرومتر، به رنگ سبز زیتونی بودند.

نمونه‌های *Lobesia botrana*

اثرات استرین‌های *M. anisopliae* روی لارو سن پنجم، شفیره و حشرات کامل شب پره *L. botrana* مشاهده شد. لاروهای تازه از تخم بیرون آمده از یکی از کلنی‌های پرورشی در شهر مندوسا واقع در آرژانتین جمع آوری شدند. از آنجایی که مشاهدات قبلی حاکی از آن بودند که با بالا رفتن سن لاروها، اثرات بیمارگری قارچ روی آن‌ها بیشتر می‌شود، لاروهای سن پنجم- سن آخر- برای آزمایش انتخاب شدند. لاروها با جیره مصنوعی که در طول رشد به طور آزاد فراهم شد تغذیه شدند. لاروها در یک اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعته، در دمای 25 ± 5 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۳۰ درصد الی ۵۰ درصد نگهداری شدند.

نمونه‌های *Eutypella microtheca*

نمونه‌های قارچ بیمارگر گیاهی *E. microtheca* از یکی از تاکستان‌های استان سن خوان آرژانتین جمع آوری شدند. چهارده گیاه که علائم بیماری یوتیپیوز- شامل برگ‌های کوچک و رنگ پریده، ساقه‌هایی با فواصل میان گرهی کوتاه و سخت، شاخه‌های کوتوله، چوب قهوه‌ای تیره و گوه‌ای سخت- از تاکستان انتخاب شدند. گیاهان آلوده ریشه کن شدند و بافت‌های آلوده جدا و به آزمایشگاه منتقل شدند. ۲ تا ۵ نمونه فرعی نیز از بافت‌های چوبی آلوده جداسازی شد. به منظور حذف میکروارگانیسم‌های غیر انگلی (غیر هدف) سطح هر نمونه به مدت ۳۰ ثانیه با اتانول، ۲ دقیقه با محلول ۳/۵ درصد سدیم هیپوکلریت و در آخر دوباره ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد استریل شد. سپس نمونه‌های فرعی در پتری‌های حاوی محیط کشت آگار عصاره مالت (MEA) و ظروف حاوی آگار گلوکز

سیب زمینی (PGA) کشت داده شدند. به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی و مخمری، به هر دو محیط کشت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر استریتومایسین سولفات، ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر کلترتراسایکلین هیدروژن کلرید، ۵ میلی گرم در میلی لیتر دی کلران اضافه شد. ظروف بلافاصله در تاریکی در یک اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و در طی ۴ هفته به طور روزانه بررسی شدند تا میسلیوم‌های جدید مشاهده شدند. سپس به منظور استخراج استرین خالص قارچ، جداسازی‌های پی در پی صورت گرفت. شناسایی قارچ بیمارگر گیاهی ابتدا بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و سپس روش‌های مولکولی صورت گرفت. بدین منظور، DNA ژنوم قارچ از میسلیوم در حال رشد روی محیط کشت مایع پپتون مالت (MP) طی ۲۱ روز با کمک کیت میکروبی DNeasy UltraClean کشور آلمان، طبق پروتکل سازنده استخراج شد. سپس DNA استخراج شده خالص سازی شد و ناحیه رونویسی شده داخلی DNA ریبوزومی (ITS۱، ITS۲ و ۵/۸ S) با PCR همانند سازی گردید. محصولات PCR به منظور خالص سازی و تعیین توالی به کره جنوبی ارسال شد. در نهایت، استرین CC۵۸ به عنوان قارچ *E. microtheca* شناخته شد و در یک مجموعه کلکسیون قارچ شناسی واقع در آرژانتین، استان چوبوت نگهداری شد.

اثر EPF روی *L. botrana* در آزمایشگاه

ارزیابی اثر بیماری‌زایی EPF روی حشرات در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی، می‌تواند با تکنیک‌های کاربردی مختلف، نظیر فروبردن حشرات در سوسپانسیون اسپور، میکرو اپلیکیشن موضعی و یا اسپری کردن مستقیم فرمولاسیون‌های EPF روی حشرات یا گیاهان انجام شود. در این آزمایش، بیماری‌زایی *M. anisopliae* روی مراحل مختلف رشدی شب پره‌ها، با روش میکرو اپلیکیشن موضعی- که از سطح بالاتری از دقت و سطح اطمینان برخوردار بوده برای مقایسه حساسیت مراحل مختلف رشدی به EPF بهتر است- صورت گرفت. برای انجام آزمایش در شرایط آزمایشگاهی، ۲۴۰ لارو سن پنجم (L_5)، ۲۴۰ شفیره (P_p) و ۲۴۰ حشره کامل (A_d) شب پره *L. botrana* مورد مشاهده قرار گرفتند و سه استرین انتخاب شده EPF با روش میکرو اپلیکیشن موضعی روی آن‌ها به کار رفت تا میزان مرگ و میر مشاهده و ثبت شود. EPF روی شفیره‌های بدون پيله اعمال شد.



آزمایش شامل چهار گروه بود:

- (۱) حشرات تیمار شده با استرین CEP۴۱۳
- (۲) حشرات تیمار شده با استرین CEP۵۸۹
- (۳) حشرات تیمار شده با استرین CEP۵۹۱
- (۴) تیمار شاهد (حشرات تیمار شده با محلول فاقد هر گونه استرین EPF)

حشرات هر گروه به صورت موضعی با یک قطره ۱ میکرو لیتری از استرین مربوط به گروه خود تیمار شدند. گروه تیمار شاهد نیز با ۱ میکرو لیتر آب مقطر تیمار شد. میزان مرگ و میر با استفاده از زیر مجموعه‌ای از ۲۰ فرد در هر تکرار اندازه گیری شد. پس از اعمال قارچ‌ها، همه لاروهای سن پنجم، شفیره‌ها و حشرات کامل شب پره *L. botrana* با دقت به پتری‌های استریل ۹۰ میلی متری پوشانده شده توسط کاغذ صافی استریل منتقل شدند. بلافاصله ظروف پتری در اتاقک‌های رشد در دمای ۲۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. با توجه به رقابت شدید لاروها برای غذا، یک رژیم غذایی مصنوعی به صورت آزاد در طول آزمایش در اختیار لاروها قرار گرفت. حشرات کامل با دقت بلافاصله پس از اتمام مرحله شفیرگی تلقیح شدند و به سینی‌های پلاستیکی ۲۰ در ۱۰ در ۱۵ سانتی متری منتقل شدند. حشرات کامل در طول آزمایش با محلول آسکوربیک اسید ۵ درصد با استفاده از سرنگ پلاستیکی تغذیه شدند. از آنجایی که مرگ و میر در دوره‌های طولانی مدت نمی‌تواند معرف شرایط مزرعه باشد، نرخ مرگ و میر لاروهای سن پنجم، شفیره‌ها و حشرات کامل *L. botrana* تا روز هفتم آزمایش اندازه گیری شد. شب پره‌های کشته شده به دقت از پتری‌ها خارج شدند تا از انتقال افق جلوگیری شود. برای جلوگیری از فرار حشرات کامل از سینی، کشته شده‌ها تا پایان آزمایش خارج نشدند. برای به دست آوردن میزان مرگ و میر تصحیح شده (CM) از معادله ابوت استفاده شد.

شد. آزمایش در مساحت حدود ۴/۶۳ هکتار صورت پذیرفت. از ۴۵ روز قبل از آزمایش یا در طول آزمایش، هیچ گونه آفتکش شیمیایی یا بیولوژیکی به تاک‌ها اضافه نشد. برای جلوگیری از شفیره شدن، در آزمایش از لاروهای تازه از تخم بیرون آمده سن سوم (L۳) و چهارم (L۴) شب پره استفاده شد. آزمایش شامل ۲ تیمار بود: EPF مثبت و EPF منفی؛ و هر تیمار ۶ تکرار داشت. از تکنیک میکرو اپلیکیشن استفاده شد و در تیمار EPF مثبت، روی ۲۰ لارو به طور موضعی ۱ میکرو لیتر قطره استرین CEP۵۹۱ اعمال شد. روی تیمار دوم، یعنی تیمار شاهد، ۱ میکرو لیتر آب مقطر استریل اعمال شد. سپس لاروها به مزرعه آزمایشی برده شدند و با دقت به تعداد ۲۰ لارو به ازای هر خوشه، روی خوشه‌ها قرار گرفتند. خوشه‌های انگور بلافاصله با توری پارچه‌ای به قطر منفذ ۵۰۰ در ۵۰۰ میکرومتر پوشانده شدند. سپس از بالای هر توری به محور راشی خوشه‌ها یک نوار پارچه‌ای متصل شد تا هر واحد آزمایشی محصور شود. بدین ترتیب، یک سیستم بسته به وجود آمدن تا از ورود و خروج حشرات به واحدهای آزمایشی جلوگیری شود. هر تیمار از سایر تیمارها حداقل ۲۰ متر فاصله داشت. بعد از ۷ روز، خوشه‌ها به دقت از درخت جدا شدند و ظروف پلاستیکی در بسته به آزمایشگاه منتقل شدند تا مرگ و میر لاروها مشخص شود. دمای محیط و رطوبت نسبی در طول هر سه فصل، از یک ایستگاه هواشناسی خودکار به دست آمد.

ارزیابی رشد *E. microtheca*

ما میزان مهاری سه استرین CEP۴۱۳، CEP۵۸۹، CEP۵۹۱ و CEP۵۹۱ را بر روی رشد استرین CC۵۸ قارچ *E. microtheca* بررسی کردیم. استرین CC۵۸ در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، زیرا فراوان‌ترین استرین بیماری‌زای گیاهی موثر بر تاک‌های مورد مطالعه بود.

اثر EPF روی *L. botrana* در مزرعه

بر اساس مرگ و میر تصحیح شده (CM) که در آزمایشگاه مشاهده شد، یکی از استرین‌های *M. anisopliae* به نام CEP۵۹۱ برای آزمایش‌های مزرعه‌ای انتخاب شد. آزمایش در طول یک سال - از سپتامبر ۲۰۱۸ تا مارس ۲۰۱۹ - در فصل‌های مختلف تکرار شد. فصل اول: در بهار، وقتی درختان رشد کافی داشتند و گل آذین‌های آن‌ها به خوبی نمایان شده بود. فصل دوم: در اوایل تابستان، وقتی خوشه‌ها هنوز توسعه نیافته بودند. فصل سوم: در اواخر تابستان، که ابتدای رسیدگی انگورها بود. آزمایش‌ها در یکی از مزارع آزمایشی واقع در سن خوان آرژانتین، که از سال ۲۰۱۱ در آن کشت انگور صورت گرفته بود، انجام

نتایج

۱. کنترل بیولوژیک *L. botrana* در آزمایشگاه

تمامی استرین‌های *M. anisopliae* به کار رفته در این آزمایش، قادر به آلوده سازی تمامی مراحل رشدی کرم خورشه خوار انگور، از قبیل لارو سن پنجم (L_5)، شفیره (P_p) و حشرات کامل (A_d) بودند (تصویر ۱- الف تا ج به ترتیب). هیچ تفاوت معنی داری بین اثر EPF روی L_5 ($P=0/8905$ و $F=0/12$) و A_d ($P=0/8097$ و $F=0/22$) مشاهده نشد. اما در مورد اثر روی مرحله P_p ، تفاوت‌ها معنی دار بودند ($P=0/0006$ و $F=33/25$). اثر استرین CEP591 (۹۹/۹ درصد) روی کنترل مرحله P_p بیشتر از استرین CEP589 (۸۱/۶ درصد) و CEP413 (۷۹/۹۸ درصد) بود (تصویر ۲). در کل، مرگ و میر گروه تیمار شاهد در همه موارد کمتر از ۱۵ درصد بود.

استرین‌های CEP413، CEP589 و CEP591 با CC58 در ظروف پتری جداگانه حاوی محیط کشت آگار گلوکز سیب زمینی (PGA) کشت داده شدند. برای رسیدن به این هدف، یک دیسک میسلیم ۵ میلی‌متری، که از لبه‌های یک کشت ۱۰ روزه CC58 به دست آمده بود، در مرکز ظرف حاوی ۲۰ میلی‌لیتر PGA قرار داده شد. بلافاصله، چهار دیسک از یک استرین EPF (از کشت‌های ۱۰ روزه) با قطری مشابه با استرین CC58 در چهار محل تقریباً ۳ سانتی‌متر از مرکز ظرف پتری قرار داده شد. ظروف پتری برای جلوگیری از ریزش کنیدی‌ها بر روی محیط آگار وارونه شدند و سپس در تاریکی در دمای 28 ± 2 درجه سلسیوس انکوبه شدند. رشد کلنی *E. microtheca* هر ۹۶ ساعت در دو محور عمود بر هم، در طول ۲۰ روز بعد زیر استریومیکروسکوپ با استفاده از کولیس دیجیتالی اندازه گیری شد. کنترل با اندازه‌گیری رشد شعاعی استرین *E. microtheca* که در حال رشد جداگانه (دیسک‌های آگار بدون EPF) روی ظروف پتری جداگانه (نشان دهنده رشد بالقوه استرین *E. microtheca*) تعیین شد. درصد بازداري رشد (GI) با فرمول زیر محاسبه شد:

$$GI (\%) = ((A-B)/A) \times 100$$

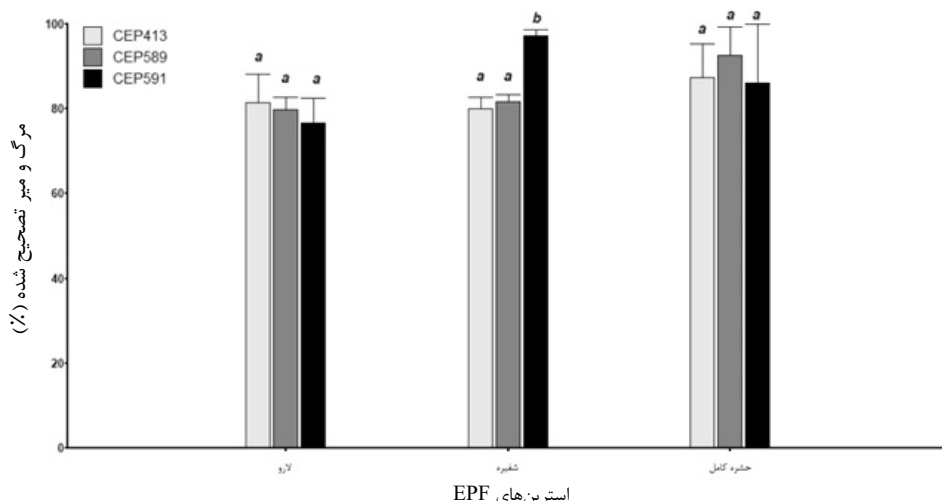
که در آن A نشان دهنده رشد شعاعی (میلی متر) تیمار شاهد و B نشان دهنده رشد شعاعی (میلی متر) پاتوژن تحت تاثیر EPF است. سه پلیت تکراری برای هر ترکیب استرین بیماری‌زای گیاهی و EPF و برای تیمار شاهد تهیه شد.

آنالیزهای آماری

اثر استرین‌های CEP413، CEP589 و CEP591 روی نرخ مرگ و میر لاروهای سن پنجم (L_5)، شفیره‌ها (P_p) و حشرات کامل (A_d) شب پره *L. botrana* در آزمایشگاه با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (عامل مستقل: استرین EPF، متغیر پاسخ: مرگ و میر تصحیح شده (CM)) آنالیز شد. اثر استرین CEP591 روی شب پره در مزرعه نیز با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (عامل مستقل: فصل سال، متغیر پاسخ: مرگ و میر تصحیح شده (CM)) آنالیز شد. اثرات آنتاگونیستی EPF روی رشد قارچ *E. microtheca* نیز با تحلیل واریانس یک طرفه (عامل مستقل: استرین‌های EPF، متغیر پاسخ: درصد مهار رشد پاتوژن) تحلیل شد. آزمون LSD فیشر برای تجزیه و تحلیل تفاوت‌های هر تیمار انجام شد.



تصویر ۱- اثر EPF روی *Lobesia botrana* اثر بخشی آلودگی استرین‌های *Metarhizium anisopliae* روی لارو (الف)، شفیره (ب) و حشره کامل (ج) قابل مشاهده است.



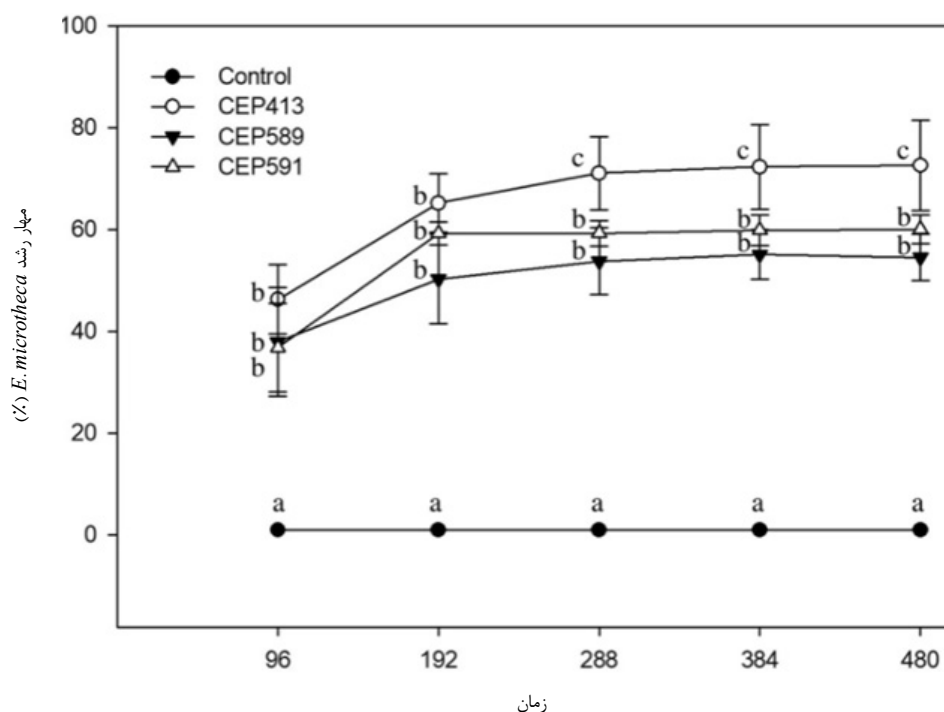
تصویر ۲- درصد مرگ و میر تصحیح شده لارو، شفیره و حشره کامل *Lobesia botrana* تحت تاثیر سه استرین CEP413، CEP589 و CEP591. میانگین درصدی (±SD) (انحراف معیار) افراد آلوده شده در سه تکرار نشان داده شده است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها در هر مرحله رشدی *L. botrana* است (LSD فیشر؛ $P < 0.05$).

۳. اثرات بازدارندگی EPF روی رشد *E. microtheca*

رشد *E. microtheca* به طور معنا داری با اثر بازدارندگی EPF مواجه شد ($F=151/49$ و $P<0.001$). در رشد قارچ های تیمار شده با استرین CEP413، CEP589 و CEP591 کاهش معنا داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد (تصویر ۳). در انتهای آزمایش بعد از ۴۸۰ ساعت، درصد بازدارندگی استرین CEP413 ($12/24 \pm 65/2$) به طور معناداری بیشتر از CEP591 ($10/11 \pm 55/07$) و CEP589 ($9/12 \pm 50/27$) بود ($F=7/8$ و $P=0.013$).

۲. کنترل بیولوژیک *L. botrana* در مزرعه

در شرایط مزرعه، لارو کرم خوشه خوار انگور در تمام فصول یاد شده به EPF حساس بودند. با این حال، مرگ و میر آن ها به طور معنا داری تحت تاثیر فصل بود ($F=6/92$ و $P=0.0074$). به طور کلی، لاروها در ابتدای بهار (۹۱ درصد) و ابتدای تابستان (۸۱/۵ درصد) نسبت به اواخر تابستان، حساسیت بیشتری به استرین CEP591 داشتند (جدول ۱). در انتهای تابستان، درصد مرگ و میر تصحیح شده به طور محسوسی به ۶۴/۹ درصد کاهش یافت. مرگ و میر لاروهای گروه شاهد در طول فصول نسبتاً ثابت بود ($F=1/11$ و $P=0.3551$) که ۵ درصد گرد شده اند.



تصویر ۳- درصد مهار رشد قارچ *Eutypella* گیاهی *microtheca* تحت تاثیر *Metarhizium anisopliae* (استرین CEP413، CEP589 و CEP591) در طی ۲۰ روز. کنترل شامل پلاک های آگار بدون اسپور قارچی بود. درصد میانگین (±SD) (انحراف معیار) نشان دهنده سه تکرار است. تفاوت بین تیمارها در هر بازه زمانی معنی دار است (LSD فیشر؛ $P < 0.05$).

EPF strain

CM (%)—S1

CM (%)—S2

CM (%)—S3

CEP591

91 ± 9.8 a

81.58 ± 17.53a

64.97 ± 6.88b

دما

22.5 ± 1.2 °C

25.4 ± 2.5 °C

21.7 ± 2.1 °C

رطوبت نسبی

52 ± 12.2%

64 ± 8.4%

61 ± 3.9%

جدول ۱- مرگ و میر تصحیح شده $\pm$ SD (انحراف معیار) برای لاروهای L۳ و L۴ شب پره *Lobesia botrana* تحت تاثیر *Metarhizium anisopliae* (استرین CEP۵۹۱) در شرایط مزرعه. تمامی آزمایش‌ها در شرایط طبیعی یک تاکستان در سن خوان آرژانتین صورت گرفتند. آزمایش از ابتدای بهار (S۱) شروع شد و تا ابتدای تابستان (S۲) و انتهای تابستان (S۳)، که دوره کامل رشدی انگور است، انجام گرفت. حرف a و b تفاوت معنا داری را بین فصول نشان می‌دهد (LSD فیشر، $P < 0.05$).

بحث

کنترل *L. botrana* به طور ویژه روی یک مرحله رشدی خاص در چرخه زندگی این حشره تمرکز کرده بودند. در این پژوهش، این تاثیر روی تمامی مراحل مختلف رشدی، از قبیل لارو، شفیره و حشره کامل *L. botrana* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج این پژوهش، با سایر پژوهش‌هایی که نقش استرین‌های EPF را به عنوان یک روش کارآمد در کنترل تمام مراحل رشدی حشرات آفت نظیر *Dermanyssus gallinae*، *Tetranychus urticae*، *Megalurothrips sjostedti* و *S. litura* بررسی کرده‌اند، تطابق دارد. تفاوت در اثر بخشی EPF بین مرحله لاروی و شفیرگی *L. botrana* ممکن است با دوره پوست اندازی بین دو مرحله مرتبط باشد. در مرحله لاروی، برخلاف مرحله شفیرگی، ممکن است فواصل زمانی بین پوست اندازی‌های متوالی کوتاه‌تر باشد که این عامل مهمی در مقاومت حشره به عفونت قارچی گزارش شده است.

در مزرعه، استرین CEP۵۹۱ در مرگ و میر لاروهای *L. botrana* در طول فصول موثر نشان داده شد. با این حال، اثر CEP۵۹۱ در کنترل *L. botrana* به فصل سال بستگی داشت. در انتهای تابستان، CEP۵۹۱ بیماری‌زایی کمتری روی *L. botrana* داشت و موجب شد مرگ و میر حدود ۶۴ درصد باشد که نسبت به دو فصل دیگر، که مرگ و میر لاروها در دامنه ۸۱ درصد تا ۹۱ درصد متغیر بود، کمتر باشد. نتایج این پژوهش با پژوهش‌های قبلی، که حاکی از آن بودند که در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی، روند تاثیر کنترل بیولوژیک EPF روی حشرات آفت در شرایط مزرعه، یک سیر نزولی دارد. برای مثال، رودریگز و همکارانش مشاهده کردند که دز *M. anisopliae* که برای کشتن پنجاه درصد کنه‌های *Varroa destructor* لازم بود، در شرایط آزمایشگاهی به طرز قابل توجهی نسبت به دز لازم در شرایط طبیعی مزرعه کمتر بود. مشاهدات مشابهی توسط آلتیمیرا و همکارانش صورت گرفت که از *Beauveria pseudobassiana* برای کنترل *L. botrana* در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی استفاده شده بود. این تنوع

استرین‌های *M. anisopliae* در کنترل دو عامل خسارت‌زای انگور در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی بسیار موثر بودند. استرین‌های EPF موجب مرگ و میر بالای تمام مراحل رشدی کرم خوشه خوار انگور و مهار رشد قارچ بیمارگر گیاهی *E. microtheca* شدند. به طور کلی، سه استرین *M. anisopliae* در کنترل کرم خوشه خوار انگور در مراحل لارو سن پنجم، شفیره و حشره کامل بسیار موثر بودند. میانگین مرگ و میر تصحیح شده در مورد لاروهای تیمار شده با EPF بیش از درصد بود، در حالیکه این عدد در مورد شفیره و حشره کامل بیش از ۸۵ درصد بود. با این حال، مرگ و میر تصحیح شده برای شفیره‌های تیمار شده با استرین CEP۵۹۱ به طور معنا داری بیشتر از دو استرین دیگر بود و تقریباً موجب مرگ صد درصدی شفیره‌ها شد. این نتیجه زمانی اهمیت پیدا می‌کند که ما می‌دانیم مرحله شفیرگی در گونه‌های بال پولک داران، سخت بالپوشان و سوسری‌ها نسبت به بقیه مراحل رشدی مقاومت بالاتری به عفونت‌های قارچی دارد. مطابق نتایج به دست آمده، در پژوهش‌های قبلی نیز تاثیر EPF در مراحل نابالغ رشدی کرم خوشه خوار انگور، از قبیل لارو و شفیره بررسی شده بود. به طور مشابه، پژوهش اخیر نشان داد دو قارچ *Metarhizium* و *Beauveria* که از خاک تاکستان‌های آرژانتین جداسازی شده بودند، علیه لارو سن پنجم کرم خوشه خوار انگور در شرایط آزمایشگاهی موثر هستند. علاوه بر آن، پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که *Metarhizium* یک جنس EPF موفق در کنترل بیولوژیک برخی از بال پولک داران آفت از قبیل *Spodoptera frugiperda*، *S. litura* و *absoluta* *Plutella xylostella* می‌باشد و این نشان می‌دهد که استرین‌های این جنس، این توانایی را دارند که به عنوان آفتکش زیستی علیه چندین گونه آفت بال پولکی استفاده شود.

پژوهش‌های قبلی در زمینه تاثیر استرین‌های EPF روی

در اثر بخشی EPF در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی ممکن است با عوامل غیر زیستی از جمله دما، رطوبت نسبی و تابش فرابنفش که بر برخی از فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر کنیدی‌زایی تاثیر می‌گذارند، در ارتباط باشد.

نتایج حاکی از آن است که سه استرین *M. anisopliae* در مهار رشد *E. microtheca* در طول ۲۰ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در تاریکی تاثیر داشتند. هر سه استرین به طور معنا داری رشد قارچ را تا بیش از ۵۰ درصد مهار کردند. استرین CEP۴۱۳ نسبت به دو استرین دیگر، در مهار رشد و تکثیر *E. microtheca* تاثیر بیشتری داشت. گونه‌های مختلف EPF مانند *Beauveria bassiana*، *Metarhizium brunneum*، *M. anisopliae*، *Lecanicillium lecanii* به عنوان گزینه‌های مناسب برای کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مانند *Rhizoctonia solani*، *Pythium myriotylum*، *Sphaerotheca fuliginea* و *Botrytis cinerea* شناخته شده‌اند. با این حال، طبق گزارش‌های تهیه شده، این اولین باری است که اثر آنتاگونیستی قارچ *M. anisopliae* روی *E. microtheca* بررسی می‌شود و مطالعات نشان می‌دهد که استرین‌های *M. anisopliae* می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای کنترل بیولوژیک یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای انگور به کار روند.



برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) به منظور کنترل عوامل خسارت‌زای انگور در تاجکستان‌ها مورد استفاده قرار بگیرند. با این حال، تحقیقات بیشتری در زمینه بهبود و حفظ اثر بخش‌های EPF در شرایط طبیعی، به ویژه در شرایط مختلف محیطی لازم است.

این پژوهش نشان داد که سه استرین *M. anisopliae* در آلودگی و کشتن مراحل مختلف رشدی شب‌پره *L. botrana* در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی تأثیر به سزایی داشتند. علاوه بر آن، همین سه استرین قادر بودند در شرایط آزمایشگاهی، رشد قارچ بیماری‌زای گیاهی *E. microtheca* را مهار کنند. نتایج حاکی از آن بود که استرین‌های *M. anisopliae* می‌توانند در

منابع

1. Aguilera-Sammaritano, J., Caballero, J., Deymié, M. et al. Dual effects of entomopathogenic fungi on control of the pest *Lobesia botrana* and the pathogenic fungus *Eutypella microtheca* on grapevine. Biol Res (2021) 44, 54. <https://rdcu.be/ch1gN>
2. <https://bugwoodcloud.org/images/384x1276025/256.jpg>

