نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران، ۲۱: (۲)، ۱۳۸۰

بررسی بیماریزایی نماتودهای *Steinernema* sp. و *Heterorhabditis bacteriophora* روی کرم سفید ریشه *Polyphylla olivieri*

رحیم پرویزی[1]

چکیده

دو خانواده Steinernematidae و Heterorhabditidae که به راسته نماتودهای Rhabditida تعلق دارند، پارازیت اجباری طیف وسیعی از حشرات می‌باشند که برخی گونه‌های آنها در مبارزه بیولوژیکی با آفات مورد استفاده قرار می‌گیرند. از میان آنها گونه‌های دو جنس *Steinernema* spp و *Heterorhabditis* spp بیشترین کارآیی و استفاده را دارند. برای بررسی کارآیی نماتودهای بیماریزای کرم‌های سفید ریشه، طی سالهای ۷۸-۱۳۷۷ آزمایش‌هایی در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با دو نماتود *Steinernema* sp. و *Heterorhabditis bacteriophora* هر کدام با دو دز $۲/۵\times۱۰^{۵}$ و ۵×۱۰^{۵} نماتود در هر متر مربع و تیمار (شاهد = آب مقطر) در چهار تکرار (هر تکرار شامل ۵ گلدان) در شهرستان ارومیه انجام شد. آزمایشها در گلدانهای ۶×۱۵ سانتی‌متری و با خاک شنی لومی انجام شد. نماتودها در مقادیر مورد اشاره و بعد از غروب آفتاب همراه با ۲۰ سانتی‌متر مکعب آب مقطر به سطح خاک گلدانها محلول‌پاشی شد و سطح گلدانها بعد از قرار دادن یک لارو سن سوم روی هر یک از آنها با توری بسته شد. بعد از ۱۴ روز تعداد لاروهای مرده در گلدانها شمارش شد. نتایج محاسبات آماری نشان داد که نماتودهای *Steinernema* sp. و *H. bacteriophora* با دز ۵×۱۰^{۵} نماتود در هر متر مربع، بطور متوسط و به ترتیب ۳۳/۳۸ و ۴۵/۸۷ درصد لاروهای سن سوم کرم سفید را پارازیته نمودند.

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان غربی.

این مقاله در تاریخ ۸۰/۶/۱۲ دریافت و چاپ آن در تاریخ ۸۰/۱۱/۹ به تصویب نهایی رسید.

واژگان کلیدی: بیماریزایی، نماتودهای بیماریزای حشرات *Steinernema* sp. و *Heterorhabditis bacteriophora* کرم سفید ریشه *Polyphylla olivieri*

مقدمه

کرم سفید ریشه *Polyphylla olivieri* Cast (*Coleopatera: scarabaeidae*) یکی از آفات مهمی است که در اکثر نقاط کشور ما انتشار دارد و خساراتی به درختان میوه و سایر گیاهان زراعی وارد می‌کند (۱). اهمیت اقتصادی این حشره بسیار بالا بوده و در حال حاضر به شکل یکی از مهم‌ترین و خطرناکترین آفات درختان میوه سردسیری در ایران خودنمایی می‌کند (۲). سایر گونه‌های کرم سفید ریشه‌ای که از ایران گزارش شده، گونه‌ی *Melolontha adspersa* Motsh ، از استان خراسان و گونه‌های *M. alba* و *M. pectoralis. M. Kratis* از نواحی شمال ایران و در سواحل دریای مازندران انتشار دارند (۲ و ۱). کرم‌های سفید ریشه[1] از آفات مهم مراتع در جنوب آمریکا می‌باشند و گونه‌هایی که بطور معمول به مراتع حمله می‌کنند شامل سوسک ژاپنی *Popillia japonica* Newman سوسک‌های خرداد[2] *Cyclocephala* spp., *phyllophaga* spp. هستند (۱۵و۱۳). در نیویورک کرم‌های سفید ریشه که به مراتع و گیاهان زینتی حمله می‌کنند شامل سوسک ژاپنی *Anomalia orientalis* waterhouse و *Rhigotrogus majalis* (Raiomosky) می‌باشد (۱٦). در کلرادو و سایر مناطق گرم و خشک شمال شرقی آمریکا گونه‌های مختلف *Polyphylla* و *Phyllophaga* گونه‌های غالب می‌باشند (۱٤). در اروپا کرم سفید ریشه گونه *Phylloperta horticola* (۱٤و۱۳) و گونه *Adoryphorus couloni* در استرالیا (۳) باعث خسارت جدی به چمن زمین‌های ورزشی و مزاتع می‌شوند. کرمهای سفید ریشه، مورد حمله‌ی پاتوژن‌های مختلفی از جمله گونه‌هایی از جنس‌های *Steinernem* و *Heterorhabditis* قرار می‌گیرند، سه گونه نماتود *Steinernema glaseri* ، *Steinernema anamali* و *Steinernema Kushidai* از کرمهای سفید ریشه به ترتیب در روسیه،

۱- white grub

۲- May or June

ایالت متحده آمریکا و ژاپن گزارش شده است (۱۲ و ۱۱). همچنین نماتودهای *Heterorhabditis magidis* و *H. bacteriophora* strain HP88 از لاروهای سوسک ژاپنی در اوهایو (۱۰) و گونه‌های *Phyllophaga* در یوتا (۱۲) جداسازی و گزارش شده است. در هلند از لاروهای سوسک *Phylloperlha horticola* گونه‌های مختلف جنس *Heterorhabditis* جدا شده است (۱٤ و ۱۳). نماتدهای دو خانواده Steinernematidae و Heterorhabditidae یکی از عوامل مهم برای مبارزه بیولوژیکی با آفات خاکزی هستند (۸،۹). نماتدهای خانواده Steinernematidae و Heterorhabditidae به ترتیب با باکتریهای جنس‌های *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* که در قسمت ابتدای روده لاروهای نماتود زندگی می‌کند رابطه همزیستی دارند (٤). لاروهای سن سوم تنها مرحله آزادزی این نماتودها بوده و به محض یافتن میزبان حساس، این لاروها از طریق کوتیکول سطح بدن، منافذ طبیعی مانند دهان، مخرج و سوراخهای تنفسی به داخل هموسل میزبان نفوذ نموده و در آنجا باکتری‌ها را از طریق مخرج خود آزاد می‌نماید. سپس این باکتری‌ها تکثیر یافته و میزبان را در عرض ٤۸-۲٤ ساعت از بین می‌برند (۹). هدف از اجرای این تحقیق دستیابی به عوامل بیولوژیک کارآمد برای کنترل کرم سفید ریشه در باغات استان آذربایجان غربی بوده است.

مواد و روشها

الف - پرورش و تکثیر نماتود: دو گونه نماتود *Steinernema* sp. و *Heterorhabditis bacteriophora* از کرمهای سفید ریشه در پای درختان هلو و سیب در روستاهای کهریز و قولنجی ارومیه جمع‌آوری گردید. نماتدهای روی لاروهای پروانه موم خوار طبق روش دات کی و همکاران (۷) بشرح زیر تکثیر شدند. برای این منظور لاروهای سن سوم پروانه موم خوار به جعبه‌های پرورش ۳۵×۲۵ سانتی‌متری حاوی خاک رسی لومی استریل که قبلاً حدود ۵۰۰۰۰ پوره در آنها رها شده بود منتقل شده و به مدت چهار روز در درجه حرارت ۲٤ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰-٦۰٪ نگهداری شدند. پنج روز بعد لاروهای مرده از جعبه‌های پرورشی جمع‌آوری شده و به ظروف پتری به قطر ۹ سانتی‌متر حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل شدند (۱۸). در این آزمایش لاروهای سن سوم نسل جدید نماتود که از لاروهای بیمار

پروانه خارج می‌شدند به ظروف ۵۰ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر استریل منتقل شده و تا زمان آزمایش در درجه حرارت ۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. قبل از آزمایش با لام گلبول شمار تعداد نماتودهای زنده موجود در یک سانتی‌متر مکعب از محلول حاوی نماتود در ظروف برآورد گردید و دزهای مورد نظر از طریق رقیق کردن سوسپانسیونهای غلیظ بدست آمد. زنده بودن نماتودها موقع تهیه دز مشخص گردید و ۹۵ درصد نماتودهبا در زمان انجام آزمایش زنده بودند. نمونه‌های نماتودهای بیماریزای حشرات جهت تشخیص نزد Bedding از انستیتوی تولید و فرآوری گیاهی استرالیا ارسال شد.

ب- **آزمایشات گلخانه‌ای، آلوده سازی:** برای بررسی کارآیی نماتودها طی سالهای ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ از گلدانهای پلاستیکی ۶×۱۵ سانتی‌متری استفاده شد. آزمایشها با دو گونه *Steinernema* sp. و *Heterorhabditis bacteriophora* در قالب دو تیمار $۲/۵\times۱۰^۵$ و ۵×۱۰^۵ نماتود در متر مربع خاک در قالب طرح کرتهای کاملاً تصادفی در چهار تکرار (هر تکرار شامل ۵ گلدان) انجام شد آب مقطر نیز تیمار شاهد بررسی بود. لاروهای سن سوم کرم سفید ریشه از باغ سیب آلوده‌ای در روستای کهریز، مجاور ایستگاه تحقیقات باغبانی کهریز جمع‌آوری و پس از اندازه‌گیری طول لارو و مشاهده تیرگی مشخص انتهای بدن، آرایش و تعداد خارهای کوچک در قسمت شکمی انتهای بدن (۲) در هر گلدان یک لارو قرار داده شد. گلدانها با خاک شنی لومی ضدعفونی شده پر شدند و سپس نماتودها همراه با ۲۰ سانتی‌متر مکعب آب مقطر در سطح خاک محلول پاشی گردید و سطح آنها با توری بسته شد. جهت حفظ رطوبت، گلدانها روزانه یک بار آبیاری شدند. دو هفته بعد تعداد لاروهای مرده گلدانها شمارش شده و لاروهای مرده کرم سفید ریشه در آزمایشگاه بطور جداگانه به ظروف پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل می‌شدند. پارازیتسم لاروهای مرده با خروج نماتودهای بیماریزا و مشاهده آنها تعیین شد. بر اساس داده‌های بدست آمده با استفاده از فرمول آبوت درصد تلفات محاسبه شد و پس از انجام تبدیلات لازم میزان تاثیر تیمارها با استفاده از آزمون جدید چند دامنه‌ای دانکن با هم مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آماری بررسی اثر *Steinernema* sp. و *Heterorhabditis bacteriophora* علیه کرم سفید ریشه در سال ۷۷ در جدول ۱ درج شده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های آماری آزمایشات سال ۱۳۷۷

سطح احتمال	ارزش F	مربع میانگین	میانگین مربعات	درجه آزادی
۰/۱۲۶۰	۲/۳۳۰	۶۷۲/۹۱۱	۲۰۱۸/۷۳۲	۳
		۲۸۸/۷۸۸	۳۴۶۵/۴۵۰	۱۲
			۵۴۸۴/۱۸۲	۱۵

ضریب تغییرات = ۵۹/۶۵٪

بطوریکه از جدول تجزیه واریانس معلوم می‌گردد، اثر تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۵٪ معنی‌دار شده است. مقایسه میانگین‌های درجه تاثیر تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۵٪ در جدول ۲ درج شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۵٪

گونه نماتود	میزان مصرف نماتود به ازای هر متر مربع خاک	درصد مرگ و میر
Steinernema sp	$۲/۵\times۱۰^{۵}$	۱۴/۱۴b
Steinernema sp	۵×۱۰^{۵}	۳۰/۸۶ab
H. bacteriophora	$۲/۵\times۱۰^{۵}$	۲۳/۹۵ab
H. bacteriophora	۵×۱۰^{۵}	۴۵a

مقایسه میانگین‌های درجه تاثیر تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۵٪ نشان داد که تعداد ۵×۱۰^{۵} نماتود *Heterorhabditis bacteriophora* بیشترین تاثیر را داشته و با تعداد

$۲/۵\times۱۰^{۵}$ نماتود *H.bacteriophora* و ۵×۱۰^{۵} *Steinernema* sp در یک گروه قرار گرفته و اختلاف آنها با تیمار $۲/۵\times۱۰^{۵}$ نماتد *Steinernema* sp در سطح ۵٪ معنی‌دار است. نتایج تجزیه واریانس داده‌های آماری اثر *Steinernema* sp و *Heterorhabditis bacteriophora* در کنترل کرم سفید ریشه در سال ۷۸ در جدول ۳ درج شده است.

جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های آماری سال ۱۳۷۸

سطح احتمال	ارزش F	مربع میانگین	میانگین مربعات	درجه آزادی
۰/۰۱۷۵	۵/۰۲۹	۸۳٤/۱٦٤	۲۵۰۲/٤۹۱	۳
		۸٦۱/۱٦۵	۱۹۹۰/۳۳۷	۱۲
			٤٤۹۲/۸۲۸	۱۵

ضریب تغییرات = ۴۳/۰۲٪

بطوریکه از جدول تجزیه واریانس معلوم می‌گردد، اثر تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است. به منظور تعیین اختلاف اثر تیمارهای مورد آزمایش، میانگین درجه تاثیر تیمارها مورد مقایسه قرار گرفته‌اند که نتایج آن در جدول ٤ درج شده است.

جدول ٤- مقایسه درصد میانگین‌های درصد تاثیر تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۱٪

گونه نماتود	میزان مصرف نماتود به ازای هر متر مربع خاک	درصد مرگ و میر
Steinernema sp	$۲/۵\times۱۰^{۵}$	۱۳/۲۸b
Steinernema sp	۵×۱۰^{۵}	۳۵/۹۳ ab
H. bacteriophora	$۲/۵\times۱۰^{۵}$	۲۳/۹۵ab
H. bacteriophora	۵×۱۰^{۵}	٤٦/۵۷a

مقایسه میانگین های درجه تاثیر تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۱٪ نشان داد که تعداد ۵×۱۰^{۵} نماتد در متر مربع از گونه‌ی *Heterorhabditis bacteriophora* بیشترین تاثیر را داشته و

با تعداد ۲/۵×۱۰^۵ نماتد *H.bacteriophora* و ۵×۱۰^۵ نماتد در متر مربع *Steinernema sp* در یک گروه قرار گرفته و اختلاف آنها با نماتد ۲/۵×۱۰^۵ نماتد *S.* sp در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. نتایج آزمایشات نشان می‌دهد که در این بررسی، زمانیکه گونه‌های *Steinernema* sp و *Heterorhabditis bacteriophora* با دزهای ۵×۱۰^۵ نماتد در متر مربع و در اواخر مرحله سن سوم لاروی به خاک محلول پاشی شد، به طور متوسط و به ترتیب ۳۳/۳۸٪ و ۴۵/۸۷٪ باعث کاهش جمعیت آفت گردید. با توجه به اینکه خاک محیط مناسبی را از نظر دما، رطوبت و حفاظت از اشعه ماوراء بنفش برای نماتودها تأمین می‌کند، در صورت انجام بررسی‌های لازم و معرفی گونه‌های مؤثرتر و تولید انبوه و بیوفابریک آنها که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشند می توان امیدوار بود که کاربرد این عوامل بتواند بعنوان یک روش بیولوژیکی موثر مورد استفاده قرار گیرد. این نتایج موافق با مطالعات سایر محققین است. در چند سال گذشته و در مبارزه بیولوژیکی با آفات، نماتودهای بیماریزای حشرات مورد استفاده قرار گرفته و گونه‌های دو جنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* کارآیی لازم را نشان داده‌اند، زیرا در نماتودها از شرایط نامساعد محیطی مثل درجه حرارت، رطوبت و نور ماوراء بنفش در امان هستند (۹). در کلرادو و سایر مناطق گرم و خشک جنوب غربی آمریکا، کرم‌های سفید ریشه مربوط به دو جنس *Polyphylla* و *Phyllophaga* گونه‌های غالب هستند و در آزمایشات انجام شده، میزان پارازیتسم *Heterorhabditis heliotidis* و *H.bacteriophor strain Hp88* ۶۳-۴۸٪ گزارش شده است (۱۷). در اوهایو بیماریزایی نماتودهای بیماریزای حشرات روی سوسک[1] *Cyclocephala hirta* بررسی شد و نماتودهای *Steinernema glaseri* و *Hetrorohabditis* spp بیماریزایی بیشتری نشان دادند (۵).

سپاسگزاری

از آقای دکتر بدنیگ مدیر بخش حشره شناسی انستیتوی تولید و فرآوری گیاهی استرالیا به خاطر تشخیص نماتودهای بیماریزای حشرات سپاسگزاری می‌گردد.

۱- western masked chafer

منابع

۱- اسماعیلی، م.، ۱۳۶۲. آفات مهم درختان میوه، مرکز نشر سپهر صفحه ۵۷۸، تهران.

۲- رجبی، غ.، ۱۳۷۰. حشرات زیان آور درختان میوه سردسیری ایران، جلد اول سخت بالپوشان، انتشارات موسسه تحقیقات آفات و بیماریها ۲۲۱صفحه، تهران.

3- Berg, G. N., R. A. Bedding, and R. J. Akhurst, 1984. Development in the Application of Nematodes for the Control of Subterranean Pasture Pests. Proceeding of the 4th Australian Appied Entomology Research Conference, Adelaide, pp. 352-356.

4- Boemare, N. E., R. J. Akhurst. And R. G. Mourant. 1993. DNA Relatedness Between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic Pacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal to Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus *Photorhabdus* gen. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 249-255.

5- Converse, V. and P. S. Grewal, 1998. Virulence of Entomopathogenic Nematodes to the Western Masked Chafer *Cyclocephala hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae) K.Econ. Entomol. 81: 428-432.

6- Downing, A. S. 1994. Effect of Irrigation and Spray Volume on Efficacy of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) Against White Grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Econ. Entomol. 87: 643-646.

7- Dutky, S. R., J. V. Thompson, and G. E. Cantwell. 1964. A Technique for the Mass Propagation of the D-D 136 Nematode, J. Insect Pathol. 6: 417-422.

8- Kaya, H. K. 1990. Soil Ecology, pp. 93-115. In Entomopathogenic Nematodes in Biological Control (R. Gaugler and H. K. Kaya, eds). CRC Press Boca Raton, Florida.

9- Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic Nematodes. Annu. Rev. Entomol 38, 181-206.

10- Manweiler, S. A. 1994. Development of the First Eat Flea Biological Control Product Emplaying the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*. Proceeding of the Brighton Crop Pest Conference Pests and Dis-3: 1005-1012.

11- Poinar, G. O., T. Jackson, and M. Klein,. 1987. *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida) Parasitic in Japanese Beetle, *Papillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera) in Ohio. Proceeding of the Helminthological Society of Washington 54, 53-59.

12- Poinar, G. O. Jr. 1992. Nematodes Associated with Scarabaeidae. In: the Use of Pathogens Scarab Pest Manegement (T. Aglare, ed.) pp. 93-110, Intercept books,

Adnover.

13- Sheltar. D. J. 1990. Entomopathogenous. Nematodes for Turfgrass Insects with Notes on other Biological Control Agents, pp. 255-236. In Integrated Pest Management for Iturfgrass Pests. (A.Leslie, ed.) Lewis, Boca Raton, FL.

14- Smits, P. H., G. L. Wiegers, and H. J. Vlug, 1994. Selection of Insect Parasitic Nematodes for Biological Control of the Grass Grub *Phylloperthe horticola*. Ent. Exp? Appl. 70: 77-82.

15- Tashiro, H. 1987. Turfgrass Insects of the United States and Canada. Coraell University Press Ithaca, NY.

16- Villani, M. G., and R. J. Wright, 1998. Entomopathogenous Nematodes as Biological Control Agents of European Chafer and Japanese Beetle. (Scarabaidae: Coleoptera) Larvae Infesting Turfgrass. J. Econ. Entomol. 81: 486-847.

17- Whitney S. O. and R. J. Zimmerman. 1989. Biological and Chemical Control of Turfgrass-Infesting Scarbs in Colorado. South West. Entomol. 14:351-355.

18- White C. F. 1927. A Method for Obtaining Infective Larvae from Cultures. Science 66: 302-303.

Journal of Entomological Society of Iran. 21 (2), 2001

Survey on Pathogenicity of Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema* sp. and *Heterorhabgitis bacteriophora* infesting larval *Polyphylla olivieri*

R. Parvizi[1]

Abstract

Entomopathogenic nematodes in the families, Steinernematidae and Heterorhabditidae are obligate parasite of many insects and two species *Steinernema* sp. and *Heterorhabitis bacteriophora* have been used efficiently for biological control of pests. In order to evaluate the efficacy of entomopathogenic nematodes collected from *Polyphylla olivieri* larvae in 1998-1999, field expriments arranged in a completely randomized block design. *Steinernema* sp. and *heterorhabditis bacteriophora*, nematodes were applied with inilial inoculum levels of 0, $2.5x10^5$, $5x10^5$ individual per m^2. The experiments were conducted in 6x15 cm pots containing a sandy-loam soil mixture. Nematodes at the mentioned rates suspended in 20 cm^3 distilled-water were sprayed on the surface of the soil in the pots. After releasing a third instar larvae in each pot, they were covered with gauze. After 14 days dead larvae were counted in the pots. The results indicated that *steinernema* sp. and *H. bacteriophora* at the rate of $5x10^5$ individuls per m^2 were able to parasitize 33.33% and 45.37% of the pest larvae respectively.

key words: Pathogenicity, Entomopathogenic nematodes, *Steinernema* sp., *Heterorhabditis bacteriophora*, *polyphylla olivieri*.

1- Agricultural Research Center of West Azarbaijan.