

Research Article

بررسی امکان کنترل آفت برگ‌خوار سفید بلوط (*Leucoma wiltshirei* Coll. (Lep., Erebidae) از طریق آغشته نمودن تنه درخت به قارچ‌های بیماری‌گر مشرات؛ یک مطالعه میدانی دو ساله

سیده معصومه زمانی^۱، مرضیه علی‌نژاد^۱، حسن عسکری^۲، ریحانه غلامی قوام‌آباد^۱، نرگس سپاسی^۱، سمیرا فراهانی^۱ و یزدانفر آهنگران^۳

۱- موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران

۳- سازمان جنگل‌ها، مراتع و آبخیزداری کشور، چالوس، مازندران، ایران

چکیده: شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط، (*Leucoma wiltshirei* Collenette, 1938 (Lepidoptera: Erebidae)، یکی از آفات مهم درختان بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) در جنگل‌های زاگرس است که خسارت بسیاری به این درختان وارد می‌کند. توسعه برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات با استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به‌ویژه قارچ‌های بیماری‌گر حشرات، می‌تواند راهبردی مؤثر و کارآمدی برای کاهش مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی در مدیریت آفات جنگل باشد. در پژوهش حاضر، ۱۱ جدایه از قارچ بیماری‌گر حشرات *Beauveria bassiana*، بومی جنوب غربی ایران از لاروهای شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط جدا شد. در آزمون‌های آزمایشگاهی، جدایه BG4 در غلظت ۱۰^{-۸} کنیدیوم در میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت پس از تیمار، بیشترین میزان مرگ‌ومیر را در لاروها (۳۳/۳ درصد) ایجاد کرد. بیماری‌زایی این جدایه به همراه سه جدایه قارچی دیگر، شامل *B. bassiana* B2، *Metarhizium anisopliae* M1 و *Lecanicillium lecanii* Vertalec[®] روی لاروهای سن دوم شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط ارزیابی شد. مقادیر میانه غلظت کشنده (LC₅₀) جدایه‌های B2، BG4، M1 و Vertalec[®] ۹۶ ساعت پس از تیمار روی لاروهای سن دوم به ترتیب ۲/۱×۱۰^{-۵}، ۱/۲×۱۰^{-۷}، ۵×۱۰^{-۹} و ۱/۹×۱۰^{-۱۳} کنیدیوم در میلی‌لیتر، محاسبه گردید. در شرایط صحرایی در دو سال متوالی (۱۴۰۲ و ۱۴۰۳)، محلول‌پاشی تنه درختان با فرمولاسیون‌های جدایه‌های B2 و BG4 حاوی سورفکتانت غیریونی و پارافین به ترتیب منجر به مرگ‌ومیر ۷۵-۷۳ و ۶۲-۶۱ درصد جمعیت لاروهای سن دوم و سوم آفت در منطقه رستم (استان فارس)، ۳۰ روز پس از تیمار شد. نرخ بالای مرگ‌ومیر لاروها پس از تیمار با جدایه‌های بومی B2 و BG4 از گونه *B. bassiana* در جنگل‌های زاگرس، نشان‌دهنده پتانسیل بالای این قارچ و کارایی محلول‌پاشی تنه درختان در کنترل بیولوژیک این آفت است. پژوهش‌های آینده می‌تواند بر پایداری فرمولاسیون‌های قارچی و بررسی اثر آن‌ها بر دشمنان طبیعی تمرکز داشته باشد.

اطلاعات مقاله

دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۸

انتشار: ۱۴۰۴/۰۸/۰۶

دبیر تخصصی: جواد کریمی

نویسنده مسئول: سیده معصومه زمانی

ایمیل: zamani832003@yahoo.com

DOI: <https://doi.org/10.22034/jesi.45.4.14>

کلمات کلیدی: بلوط ایرانی، بیماری شناسی حشرات، کنترل میکروبی، عوامل کنترل بیولوژیک، جنگل‌های زاگرس، فرمولاسیون‌های قارچی

مقدمه

گونه‌های بلوط (*Quercus* spp.) از اجزای مهم بسیاری از اکوسیستم‌های جنگلی معتدل و مدیترانه‌ای هستند و زیستگاه‌های مناسبی برای طیف گسترده‌ای از موجودات فراهم می‌کنند (Bugalho et al., 2011; Lindblad & Foster, 2010). بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) از خانواده Fagaceae، یکی از گونه‌های گیاهی مهم جنگل‌های زاگرس است که بیشترین سطح از این رویشگاه را تحت تصرف خود داشته و در ارتفاعات مختلف آن یافت می‌شود (Ghazanfari et al., 2004). شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط، (*Leucoma wiltshirei* Collenette, (Lep.: Erebidae)، یکی از آفات مهم و کلیدی درخت بلوط ایرانی (*Q. brantii*) در ایران (Moradi et al., 2021; Rajaei et al., 2023)، عراق و ترکیه (Kemal et al., 2013) است. لاروهای شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط در طول فصل رشد، از برگ‌های درختان بلوط تغذیه و آسیب زیادی به گیاه می‌زبان وارد می‌کنند. در سال‌های اخیر، طغیان گسترده‌ای این آفت با خسارت جبران‌ناپذیر در نواحی جنگلی زاگرس جنوبی ایران همراه بوده است. درختان بلوط، مورد حمله‌ی لاروهای زمستان‌گذران و نسل اول و دوم آفت قرار می‌گیرند و پس از ریزش برگ‌ها، جوانه‌های درخت دوباره شروع به فعالیت می‌نمایند، اما درخت آلوده ضمن تجدید حیات، مجدد مورد هجوم قرار می‌گیرد. هجوم برگ‌خوار سفید بلوط ۲ تا ۳ بار تکرار می‌گردد و در اثر این بی‌برگی اعمال فیزیولوژیکی درخت دچار مشکل شده و آفات درجه دوم، به ویژه پوست‌خواران به این درختان حمله کرده و در نهایت درخت از پا در می‌آید (Abai, 1980).

این آفت زمستان را به صورت لارو سن دوم یا سوم زیر پوستک‌های درختان آلوده سپری می‌کند. لاروها در اواخر اسفند و اوایل فروردین از پناهگاه‌های زمستانی خارج شده و پس از پنج سن لاروی، به مرحله پیش‌شفیرگی و سپس شفیرگی می‌رسند. دوره شفیرگی حدود ۱۰ روز است و خروج پروانه‌ها به صورت گروهی رخ می‌دهد. ماده‌ها ۲۴ ساعت پس از خروج از شفیره جفت‌گیری کرده و تخم‌گذاری را آغاز می‌کنند. تخم‌ها به طور معمول به صورت رشته‌ای شامل ۶ تا ۱۲ و گاهی تا ۱۸ عدد روی برگ‌ها یا شاخه‌های جوان قرار می‌گیرند و هر ماده در طول ۵ تا ۷ روز عمر خود حدود ۱۰۰ تا ۱۳۰ تخم می‌گذارد که پس از یک هفته تفrix می‌شوند. این آفت در استان فارس سه نسل دارد و لاروهای سن دوم یا سوم از اوایل آذر وارد دیابوز می‌شوند. تغذیه مجدد از اواخر اسفند آغاز و ظهور پروانه‌ها از اواخر اردیبهشت تا اواسط خرداد ادامه دارد (Abai & Askari, 2015).

استفاده از سموم آفت‌کش طی دهه‌های گذشته به عنوان یکی از روش‌های متداول کنترل آفات در بخش‌های کشاورزی و جنگلی مطرح بوده است. با وجود اثربخشی سریع این ترکیبات، کاربرد بی‌رویه‌ی آن‌ها موجب بروز مشکلات متعددی از جمله برهم خوردن تعادل زیست‌محیطی، ایجاد مقاومت در جمعیت آفات، تهدید سلامت انسان و موجودات غیرهدف شده است (Pimentel, 2005; Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Isman, 2019). این چالش‌ها ضرورت استفاده از رویکردهای جایگزین و پایدارتر را در مدیریت آفات برجسته می‌سازد. در همین راستا، مدیریت تلفیقی آفات (Integrated Pest Management – IPM)، با تلفیق روش‌های مختلف کنترل آفات (شیمیایی، مکانیکی، زراعی و زیستی)، به عنوان یک راهبرد پایدار معرفی شده است که هدف آن کاهش وابستگی به سموم و به کارگیری ترکیبی از روش‌های سازگار با محیط زیست است (Dara, 2019). در میان مؤلفه‌های مختلف IPM، عوامل کنترل بیولوژیک نقش اساسی در تنظیم جمعیت آفات و بازگرداندن تعادل اکولوژیک اکوسیستم‌ها دارند (Altieri, 1994). در میان عوامل کنترل بیولوژیک، قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله عوامل مؤثر، مفید و کم‌ضرر در مدیریت جمعیت آفات به شمار می‌روند. این قارچ‌ها به دلیل توانایی در ایجاد بیماری و مرگ در گونه‌های خاصی از حشرات میزبان بدون اثر بر موجودات غیرهدف، قابلیت تولید انبوه و پایداری نسبی در شرایط طبیعی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Butt et al., 2001; Faria & Wraight, 2007). از دیگر ویژگی‌های مثبت آن‌ها می‌توان به ایمن بودن برای مهره‌داران و گیاهان، سازگاری با آفت‌کش‌های شیمیایی و امکان استفاده ترکیبی با عوامل کنترل بیولوژیک تجاری مانند *Bacillus thuringiensis* (Bt) اشاره کرد (Zimmermann, 2007; Inglis et al., 2001).

اگرچه در ایران و سایر کشورها مطالعات متعددی در زمینه‌ی شناسایی و ارزیابی کارایی قارچ‌های بیمارگر حشرات انجام شده است، اما بیشتر این پژوهش‌ها در مرحله‌ی آزمایشگاهی باقی مانده و هنوز در مقیاس میدانی یا تجاری به کار گرفته نشده‌اند. با این حال، گسترش تحقیقات در این زمینه می‌تواند گامی مؤثر در جهت توسعه‌ی روش‌های پایدار و سازگار با محیط زیست برای کنترل آفات جنگلی باشد (Choi & Park, 2012). در عرصه‌های جنگلی، طغیان برخی گونه‌های خسارت‌زا آفات موجب شکنندگی و حساسیت اکوسیستم‌های جنگلی شده و لزوم توجه به حمایت و تقویت عوامل کنترل‌کننده طبیعی آفات در این شرایط ملموس‌تر از پیش است. طبق راهنمای کنترل بیولوژیک آفات در جنگل‌ها توسط سازمان کشاورزی و غذا ملل متحد (FAO) توسط Kenis et al. (2019) در سال ۲۰۱۹، آفات جنگل را می‌توان به استقرار و استفاده از روش‌های بیولوژیک در چارچوب یک برنامه IPM مدیریت کرد. اولین پروژه کنترل بیولوژیک کلاسیک علیه آفات جنگلی با استفاده از پارازیتوئیدها و شکارگرها در سال ۱۹۰۵، در اروپا و ژاپن انجام شد (Doane & McManus, 1981). چهار استراتژی اصلی برای استفاده از عوامل بیمارگر حشرات در جنگل وجود دارد: روش اول معرفی عامل بیمارگر یا introduction به جمعیت آفت برای گسترش و انتشار دادن آن، روش دوم رهاسازی تلقیحی یا inoculative control به صورت سرکوب غیردائمی جمعیت آفت و تکرار تیمار با هر شیوع آفت و روش سوم انبوه‌سازی یا inundative control شامل کاربردهای مکرر در مقیاس وسیع، در نهایت روش چهارم، حفاظت و حمایت از جمعیت‌های طبیعی عوامل کنترل بیولوژیک یا conservation biological control است که بر حفظ زیستگاه، تقویت شرایط طبیعی و جلوگیری از تخریب اکولوژیکی تأکید دارد (Van Frankenhuyzen et al., 2009; Kenis et al., 2019).

در دنیا، برخی آفات راسته‌های سخت‌بالپوشان (Coleoptera)، جربال و ناجوربال (Hemiptera)، زنبورها (Hymenoptera) و پروانه‌ها (Lepidoptera) در اکوسیستم‌های جنگلی هدف اقدامات مدیریتی مختلف از جمله کنترل میکروبی با استفاده از قارچ‌های بیمارگر بومی یا وارداتی قرار گرفته‌اند. از جمله برنامه‌های موفق و گسترده‌ی مقابله با آفات جنگلی با استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توان به کنترل آفات برگ‌خوار کاج با *Beauveria bassiana* در چین (Li et al., 2009)، کنترل ملخ صحرایی *Schistocerca gregaria* با *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* در آفریقا، استرالیا و چین (Lomer et al., 2001)، مدیریت آفت *Ostrinia nubilalis* با استفاده از *B. bassiana* در اروپا و آمریکا (Lewis et al., 2002; Bing & Lewis, 1991, 1992)، و کنترل آفت برگ‌خوار بلوط *Porthesia melania* در ایران با جدایه‌های بومی قارچ‌های بیمارگر حشرات *M. anisopliae* و *B. bassiana* اشاره کرد (Alinejad et al., 2025).

تحقیق حاضر در جنگل‌های بلوط زاگرس در استان فارس، با هدف جمع‌آوری و شناسایی گونه‌های قارچ بیمارگر حشرات بومی، بررسی کارایی آن‌ها و همچنین ارزیابی پتانسیل برخی دیگر از قارچ‌های بیمارگر روی آفت شب‌پره برگ‌خوار بلوط در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی طی دو سال متوالی انجام گرفت. همچنین نظر به اینکه چگونگی استفاده از عوامل کنترل‌کننده، نقش مهمی در میزان تأثیر آن‌ها دارد، آزمایش‌های میدانی به گونه‌ای طراحی شد که قارچ‌های مورد نظر تنه درختان بلوط (به عنوان مکان زمستان‌گذرانی لاروهای این آفت) را در زمستان پوشش داده تا زمانی که لاروها از محل‌های زمستانی از زیر پوستک درختان خارج و به سمت برگ‌ها و جوانه‌های نورسته شاخ و برگ حرکت می‌کنند، در معرض آلودگی به قارچ بیمارگر قرار گیرند. فرضیه آزمون بر این اساس بنا نهاده شد که کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک روی تنه درختان بلوط، در مقایسه با روش متداول پاشش روی شاخ و برگ، استراتژی مناسب‌تر و قابل اجراتری در جنگل هم به لحاظ زیست‌محیطی و هم از نظر اقتصادی می‌باشد و گام مهمی در راستای حفاظت و نگهداری رویشگاه‌های بلوط ایرانی خواهد بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش حشرات در آزمایشگاه. طی ماه‌های اردیبهشت تا خردادماه ۱۴۰۱، تخم‌های آفت برگ‌خوار سفید بلوط از درختان بلوط ایرانی آلوده در استان فارس (۲۹/۱۰۴۴ درجه عرض شمالی و ۵۳/۰۴۵۹ درجه طول شرقی) جمع‌آوری شد. لاروها در قفس‌های (۳۰×۳۰×۳۰ سانتی‌متر) با سوراخ‌هایی که با توری ظریف پوشیده شده بودند در اتاقک‌های رشد 26 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 65 ± 2 درصد و دوره روشنایی ۱۶:۸ ساعت (L:D) نگهداری شدند تا لارو سن دوم به دست آید. تحت شرایط آزمایشگاهی برگ‌های تازه بلوط ایرانی روزانه در اختیار لاروها قرار گرفت. سن لاروی با حضور پوست‌های جدید و کپسول‌های سر تعیین شد.

جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات. قارچ‌های بیمارگر از لاروهای آفت برگ‌خوار سفید بلوط که از زیر پوست درختان بلوط ایرانی (*Q. brantii*) مناطق مختلف جنگل‌های زاگرس در استان فارس جمع‌آوری شده بودند، جداسازی شدند. برای این منظور، حشرات آلوده به صورت سطحی، استریل شده و در محفظه مرطوب دسیکاتور تا ظهور میسلیم فعال در حال رشد نگهداری شدند. میسلیم رشدیافته، به محیط کشت سابورد دکستروز آگار (Sabouraud's dextrose agar) حاوی ۱ درصد عصاره مخمر (SDYA) منتقل شد و سپس جدایه‌های قارچی در محیط‌های انتخابی حاوی ۴۰ گرم گلوکز، ۱۰ گرم پروتئوز پیتون (protease)، ۱۵ گرم آگار، ۰/۰۱ گرم کریستال ویولت (crystal violet)، ۰/۵ گرم سیکلوهگزامید (Cycloheximide)، ۰/۵ گرم کلرامفنیکل (chloramphenicol) و یک لیتر آب مقطر بازکشت شدند. تهیه کشت خالص از همه جدایه‌های بدست آمده با جداسازی تک اسپور (monosporic cultures) به دست آمد.

شناسایی جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات و آنالیز فیلوژنتیک. شناسایی جدایه‌های قارچی ابتدا بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی انجام شد. بررسی‌های میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ Olympus BX51 (ژاپن) بر روی کشت‌های خالص در محیط سابورد دکستروز آگار حاوی عصاره مخمر (SDYA) صورت گرفت. ویژگی‌های ریختی از جمله شکل و اندازه کنیدی‌ها، نحوه رشد میسلیم و ساختار کنیدی‌برها بررسی و با کلید شناسایی معتبر (Humber 1998) مقایسه گردید. نتایج حاصل نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی از نظر ریخت‌شناسی متعلق به گونه *Beauveria bassiana* هستند. برای تایید شناسایی‌های مورفولوژیکی، جدایه‌ای که در آزمایش‌های زیست‌سنجی، بیشترین بیماری‌زایی را روی حشره هدف داشت، مورد مطالعات مولکولی قرار گرفت. میسلیم این جدایه پس از کشت در محیط مایع Sabouraud's Dextrose Broth (SDB) حاوی دو درصد گلوکز، نیم درصد پیتون و نیم درصد عصاره مخمر به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA ژنومی با روش (Pfeifer & Khachatourians 1993) انجام شد؛ در این روش، میسلیم پس از فیلتراسیون و شست‌وشو با آب مقطر استریل، در نیتروژن مایع پودر گردید، سپس با استفاده از بافر لیز حاوی SDS و EDTA تجزیه سلولی انجام شد. عصاره با مخلوط فلن-کلروفرم-ایزواکلیل الکل استخراج و DNA به‌وسیله ایزوپروپانول رسوب داده شد. رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شسته و پس از خشک شدن در بافر TE حل گردید. برای انجام تجزیه و تحلیل ناحیه ژنی ITS DNA، از پرایمرهای (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS1 و (5'-ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5') شامل ITS1-5.8S-ITS2 استفاده شد (White et al., 1990). برای بررسی موفقیت تکثیر ناحیه ژنی استفاده شده، دو میکرولیتر از محصول PCR (Polymerase chain reaction) روی ژل آگارز حاوی DNA Green Viewer™ بارگذاری شد. محصولات PCR خالص‌سازی و توسط پرایمرهای ITS1 و ITS4 در مؤسسه ژنومیک پکن (Beijing Genomics Institute = GI) در چین توالی‌یابی شدند. توالی‌های نهایی در پایگاه اطلاعاتی GenBank ثبت گردیدند.

تهیه اسپور برای انجام زیست‌سنجی‌های آزمایشگاهی. از میان جدایه‌های مورد بررسی در آزمون‌های زیست‌سنجی، سه جدایه شامل *B. bassiana* BG4، B2، *M. anisopliae* M1 و *L. wiltshirei* را علیه لاروهای *L. wiltshirei* نشان دادند، برای تولید اسپور و انجام آزمایش‌های صحرایی انتخاب شدند. به منظور تهیه کنیدی‌های تازه برای انجام زیست‌سنجی‌ها، جدایه‌های به‌دست‌آمده به مدت ۱۴ روز در ظروف پتری حاوی محیط SDYA در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. کنیدی‌ها با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد (v/v) پخش‌کننده Tween* 80 به سطح کلنی‌ها جمع‌آوری شدند. سوسپانسیون حاصل با استفاده از کاغذ صافی استریل (Whatman no. 1) فیلتر و به یک فالدون استریل ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. غلظت سوسپانسیون قارچی با استفاده از یک لام هموسیستمتر در زیر میکروسکوپ نوری تعیین شد. غلظت سوسپانسیون‌های اولیه به 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر رسانده شد. زنده‌مانی اسپورها با تلقیح مرکز ظروف پتری نه سانتی‌متری حاوی محیط SDYA با دو میکرولیتر از سوسپانسیون به دست آمده تایید شد. درصد جوانه‌زنی اسپورها ۱۲ ساعت پس از تلقیح با شمارش ۱۰۰ کنیدی در ظروف پتری اندازه‌گیری شد. سپس سایر غلظت‌های مورد نیاز برای آزمون‌های زیست‌سنجی روی حشره آفت در شرایط آزمایشگاهی، شامل غلظت‌های 10^5 ، 10^6 ، 10^7 و 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر از سوسپانسیون اولیه گرفته شد. تیمارهای شاهد حاوی آب مقطر استریل شده به همراه ۰/۰۵ درصد (v/v) پخش‌کننده Tween* 80 بود.

زیست‌سنجی‌های آزمایشگاهی روی آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط. در این پژوهش، دو گروه از جدایه‌های قارچی به‌منظور ارزیابی کارایی آن‌ها علیه آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط مورد استفاده قرار گرفتند؛ گروه نخست شامل یازده جدایه بومی جداسازی‌شده از لاروهای آلوده با کدهای BG1، BG2، BG3، BG4، BG5، BG6، BG7، BG8، BG9، BG10 و BG11 و گروه دوم متشکل از سه جدایه‌ی بیمارگر حشرات شامل *M. anisopliae*، *B. bassiana* (B2) و *Lecanicillium lecanii* (Vertalec) (M1) بود. در آزمایشگاه، حساسیت لاروهای سن دوم شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط به جدایه‌های قارچی در چهار غلظت مختلف 10^5 ، 10^6 ، 10^7 و 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون کنیدی هر جدایه بر اساس روش ذکرشده در بخش «تهیه اسپور برای انجام زیست‌سنجی‌های آزمایشگاهی» آماده گردید. لاروهای هر تیمار با غوطه‌ور شدن جداگانه در سوسپانسیون کنیدی به مدت ۱۰ ثانیه تلقیح شدند و لاروهای شاهد در آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد Tween* 80 قرار گرفتند. لاروهای تیمار شده به صورت جداگانه به ظروف پوشیده شده با کاغذ صافی استریل منتقل و به همراه برگ‌های تازه *Q. brantii* در انکوباتور نگهداری شدند. برای هر تیمار ۲۴ لارو در هر ظرف استفاده شد. آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام شد. مرگ‌ومیر

لاروها در اثر عفونت قارچی روزانه به مدت شش روز ثبت شد. لاروهای مرده به ظروف پتری استریل شده حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل شدند و به مدت پنج روز در دسیکاتور نگهداری شدند و مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). تنها لاروهایی که در دوران نگهداری در دسیکاتور با میسلیوم سفید و اسپورهای قارچی پوشیده شدند به عنوان لاروهای مرده در اثر عفونت قارچی در نظر گرفته شدند.

تولید بلاستوسپور. برای تولید بلاستوسپور روش‌های ارائه شده توسط Feng *et al.* (1994) و Mascarin & Jaronski (2016) با برخی تغییرات و بهینه‌سازی به کار گرفته شد. به منظور (برای تهیه) کشت اولیه، جدایه‌های منتخب در حجم کمی از محیط نمکی پایه (the basal salt medium) کشت داده شد، سپس ۱۰ میلی لیتر Tween 80 استریل ۰/۱ درصد به پلیت‌های هفت روزه اضافه شد و کنیدی‌ها با استفاده از حلقه تلقیح (inoculation loop) جمع‌آوری و به یک فالكون استریل منتقل شد. سوسپانسیون اسپور به میزان 10^6 کنیدیوم در میلی لیتر تهیه شد. سپس به عنوان کشت اولیه در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری، ۱۵ میلی لیتر از این سوسپانسیون در ۱۵۰ میلی لیتر محیط نمکی پایه تلقیح شد و به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر چرخشی با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه نگهداری شد (Mascarin & Jaronski, 2016). در طول فرآیند تولید اسپور، ارلن‌ها به طور مرتب متوقف و تکان داده می‌شدند تا رشد میسلیوم روی دیواره‌ها به حداقل برسد و از بین برود. به منظور تلقیح کشت مایع حاوی بلاستوسپور قارچ به محیط جامد، از جو پرک استفاده شد. ۳۰۰ گرم از جو پرک شسته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر جوشانده شد. سپس در کیسه‌های پلاستیکی قابل اتوکلاو ریخته و به مدت یک ساعت با فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن، ۲۰ میلی لیتر کشت مایع حاوی بلاستوسپور قارچ به طور جداگانه به هر کیسه پلاستیکی حاوی جو تلقیح شد (شکل ۲). تمام این مراحل در محفظه جریان هوای آرام انجام شد. کیسه‌های پلاستیکی تلقیح شده در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته نگهداری شدند. پس از سه هفته، کیسه‌های حاوی اسپور و محیط کشت جامد جهت خشک شدن به پاکت‌های کاغذی منتقل شدند و در انکوباتور به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. جهت جداسازی و خالص‌سازی اسپورها از محیط کشت جامد از دستگاه Micoharvester استفاده شد. اسپورهای جداسازی شده تا زمان انجام آزمون‌های بعدی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۱- ظروف حاوی لاروهای شب‌پره سفید بلوط تیمار شده با قارچ‌های بیمارگر در انکوباتور

Fig. 1. *Leucoma wiltshirei* larvae treated with entomopathogenic fungi inside the containers in the incubator



شکل ۲- تلقیح قارچ روی محیط‌های جامد

Fig. 2. Fungal inoculation on the solid culture media

تولید فرمولاسیون حشره‌کش قارچی. پودر اسپور قارچ‌های *B. bassiana* (جدایه‌های B2 و BG4) و *M. anisopliae* جدایه M1 تولید شد. به منظور افزایش میزان زنده‌مانی جدایه‌های قارچی مورد آزمایش از دو نوع از فرمولاسیون مایع امولسیون شونده (EC) استفاده شد. فرمولاسیون نوع یک، از سه میلی‌لیتر سورفکتانت غیریونی بر پایه مشتقات الکل‌های چرب اتوکسیله و یک گرم پودر اسپور (10^9 اسپور در گرم) و فرمولاسیون نوع دو، از دو میلی‌لیتر سورفکتانت غیریونی، شش میلی‌لیتر پارافین و یک گرم پودر اسپور (10^9 اسپور در گرم) به دست آمدند. حجم هر دو مخلوط با افزودن آب مقطر استریل به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر افزایش یافت، سپس در ۵۰ دور در دقیقه و دمای پایین‌تر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه همگن شدند.

بیماری‌زایی فرمولاسیون‌های حشره‌کش قارچی روی آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط در شرایط صحرایی. دو نوع فرمولاسیون مایع امولسیون شونده علیه لاروهای سن دوم شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط مورد آزمایش قرار گرفتند. فرمولاسیون‌های بدون قارچ و آب مقطر استریل به تنهایی به عنوان شاهد استفاده شد. آزمایش‌های عرصه‌ای با جدایه‌های *B. bassiana* B2، *B. bassiana* BG4 و *M. anisopliae* M1 انجام شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی صحرایی روی مرحله زمستان‌گذران آفت (لارو سن دو و سه) زیر پوست تنه درختان بلوط ایرانی *Q. brantii* در منطقه رستم در استان فارس (۳۰ درجه و ۳۷ دقیقه عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۵۳ دقیقه طول شرقی) و در دو سال متوالی (آذر سال‌های ۱۴۰۲ و ۱۴۰۳) انجام شد. فرمولاسیون‌های تهیه شده با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی (randomized complete block design=RCBD)، شامل نه تیمار (دو فرمولاسیون مایع امولسیون شونده برای هر جدایه، تیمار شاهد و دو فرمولاسیون بدون قارچ) در پنج تکرار (درخت) مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۳).

درختان بلوط به فاصله حداقل پنجاه متر از یکدیگر برای زیست‌سنجی عرصه‌ای انتخاب و به صورت تصادفی در تیمارها مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌برداری از زیر پوست درختان جهت اطمینان از حضور آفت انجام شد. همچنین این درختان قبلاً با هیچ نوع حشره‌کشی تیمار نشده بودند. در هر تکرار ده قطعه نمونه از پوست درخت با اندازه‌های نسبتاً مساوی به طور تصادفی از تمام جهات درخت مورد بررسی برای شمارش آماری انتخاب شد. برای تعیین سطح جمعیت لارو، در هر تکرار درست قبل از محلول‌پاشی یک پیش‌شمارش صورت گرفت. درختان هر تیمار با استفاده از سمپاش دستی پنج لیتری (با نازل و قفل ماشه قابل تنظیم) اسپری شدند. برای هر قارچ، محلول اسپری شامل سوسپانسیون کنیدی با غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر بود. برای اطمینان از پوشش کامل تنه، حدود پنج تا شش لیتر از محلول برای هر درخت استفاده شد. درختان تیمار شده ۳، ۷، ۱۱ و ۳۰ روز پس از تیمار مورد نمونه‌برداری قرار گرفتند تا میزان مرگ‌ومیر لاروها بررسی شود. میزان تلفات به صورت تعداد لارو مرده در زیر پوست هر درخت نسبت به تعداد کل لاروها در زیر پوست هر درخت (dead larvae per tree trunk/total number) محاسبه شد. داده‌های مرگ‌ومیر برای جبران مرگ‌های طبیعی با استفاده از فرمول ابوت (Abbott's formula) تصحیح شدند (Abbott, 1925). پس از تیمار، لاروهای مرده به طور تصادفی از زیر پوست درختان تیمار شده جمع‌آوری و در ظروف پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. جداسازی مجدد قارچ بیمارگر از لاروهای مرده با استفاده از روشی که در آزمون جداسازی قارچ توضیح داده شد برای تأیید عفونت لارو به قارچ انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها. داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس سه عاملی (Three-way ANOVA) در نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., 2002) مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحلیل، درصد مرگ‌ومیر لاروها به عنوان متغیر پاسخ و زمان قرارگیری در معرض (روز نمونه‌برداری)، غلظت سوسپانسیون کنیدی قارچ‌های بیمارگر (10^5 ، 10^6 ، 10^7 و 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر) و نوع جدایه قارچی به عنوان عوامل اصلی در نظر گرفته شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range Test) در سطح خطای $\alpha=0.01$ انجام شد. مقادیر LC_{50} (Median Lethal Concentration) و LC_{90} (Lethal Concentration for 90% mortality) قارچ‌های بیمارگر و میانه زمان کشنده LT_{50} (Lethal Time Median) با استفاده از تجزیه و تحلیل پروبیت در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., 2008) برآورد شد.



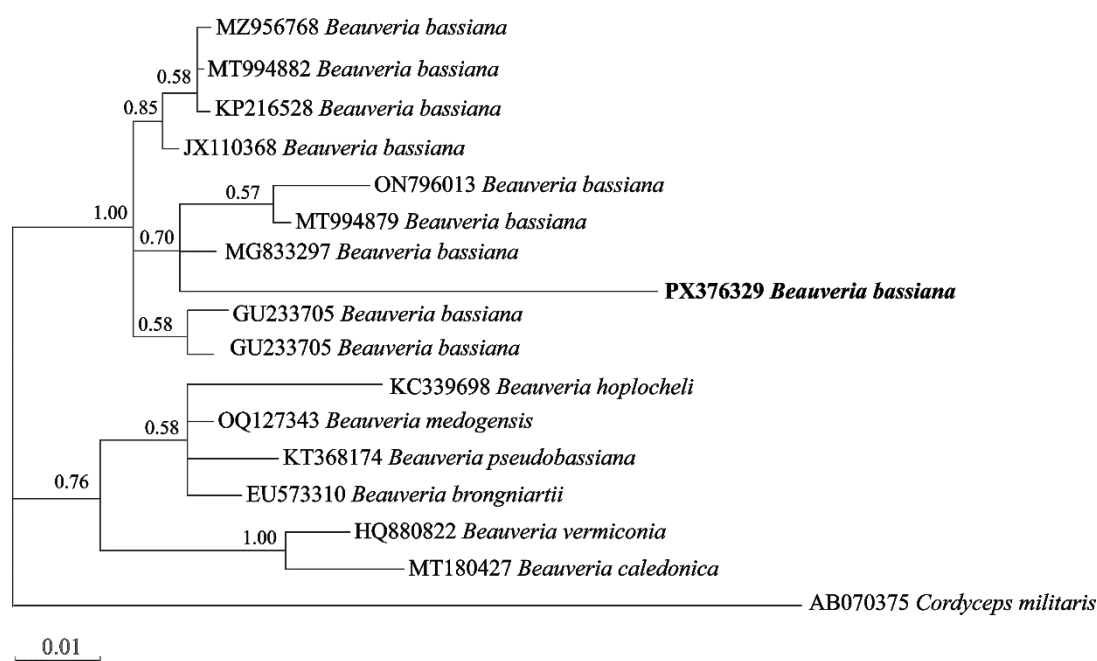
شکل ۳- لاروهای زمستان‌گذران شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط در زیر قطعه نمونه پوست درخت

Fig 3. Overwintering larvae of the oak defoliator, *Leucoma wiltshirei* beneath a piece of tree bark

درخت فیلوژنتیک حاصل از داده‌های ITS با استفاده از روش احتمال بیزی (Bayesian 50% majority rule consensus tree) و مدل تکاملی GTR+G+I بازسازی شد. تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار PAUP ver. 4.0b10 انجام گرفت و تعداد تکرارها (MCMC generations) برابر با ۱,۰۰۰,۰۰۰ بود؛ در هر ۱۰۰ مرحله یک درخت نمونه‌برداری شد و ۲۵ درصد از نمونه‌ها برای گرم شدن زنجیره‌ها (burn-in) حذف گردید.

نتایج

جدایه‌های قارچی بدست آمده. در مجموع یازده جدایه قارچی خالص از لاروهای *L. wiltshirei* در زیر پوست درختان بلوط ایرانی از مناطق مختلف جنگل‌های زاگرس در استان فارس جداسازی و از نظر مورفولوژیکی به عنوان گونه *B. bassiana* شناسایی شدند. این جدایه‌ها با کدهای BG1، BG2، BG3، BG4، BG5، BG6، BG7، BG8، BG9، BG10 و BG11 نام‌گذاری شدند و همگی از نمونه‌های لارو آلوده *L. wiltshirei* جمع‌آوری شده از استان فارس (مختصات جغرافیایی ۳۰ درجه و ۳۷ دقیقه عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۵۳ دقیقه طول شرقی) به‌دست آمدند. نتایج شناسایی مولکولی نیز این جدایه‌ها را در یک شاخه با سایر جدایه‌های *Beauveria bassiana* قرار داد و شباهت بالایی آن‌ها را با توالی‌های ثبت‌شده در GenBank نشان داد (شکل ۴). همچنین در این پژوهش از سه جدایه قارچی بیمارگر دیگر نیز جهت انجام آزمایش‌های مقایسه‌ای استفاده شد (جدول ۱).



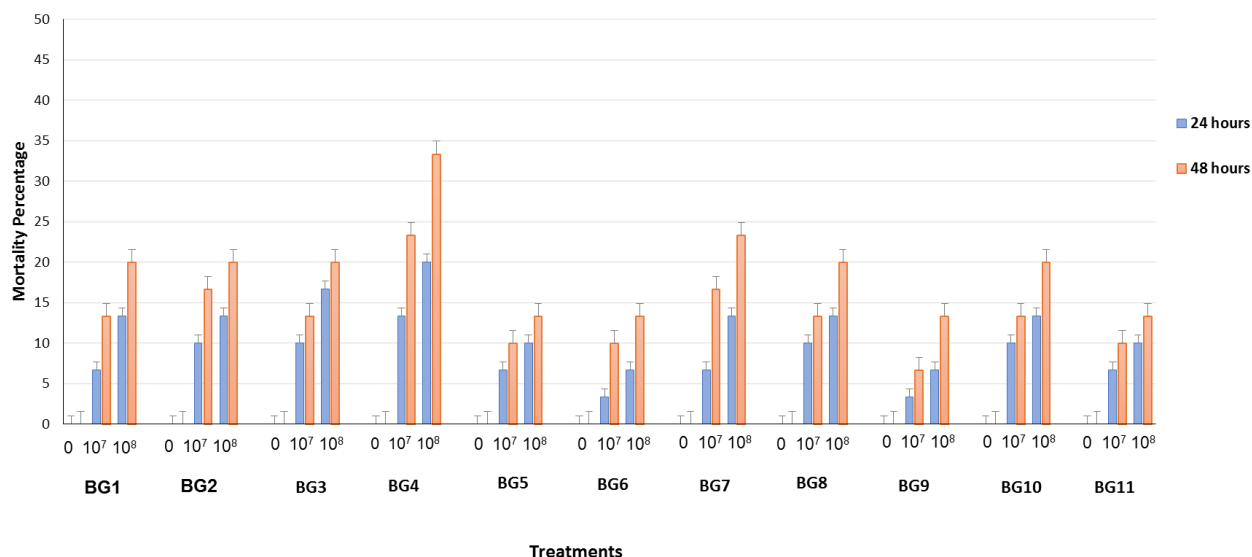
شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Beauveria bassiana* بر اساس ناحیه ITS rDNA و مقایسه آن‌ها با توالی‌های ثبت‌شده در GenBank. اعداد روی شاخه‌ها نشان‌دهنده مقادیر Bootstrap هستند.

Fig. 4. Phylogenetic tree of *Beauveria bassiana* isolates based on ITS rDNA region and their comparison with sequences deposited in the GenBank. Numbers on branches indicate bootstrap values.

جدول ۱- سایر جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر استفاده شده در تحقیق جاری

Table 1. Additional isolates of entomopathogenic fungi which used in the current project

Isolate number/code	Locality/site	Host pest	Latitude-longitude
<i>Beauveria bassiana</i> /B2	Mazandaran	<i>Cydalima perspectalis</i>	36°34'N, 51°47'E
<i>Metarhizium anisopliae</i> /M1	Green Muscle™ بازاریابی شده از فرآورده تجاری	-	-
<i>Icenicillium lecanii</i> /Vertalec	Koppert BV بازاریابی شده از فرآورده تجاری	-	-



شکل ۵- مرگومیر جدایه‌های *Beauveria bassiana* روی لاروهای سن دوم *Leucoma wiltshirei* در غلظت‌های 10^0 و 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار (میانگین $\pm$ SE)

Fig. 5. Mortality rate caused by *Beauveria bassiana* isolates on second-instar larvae of *Leucoma wiltshirei* at concentrations of 0, 10^7 , and 10^8 conidia per mL, 24 and 48 hours after treatment (mean $\pm$ SE).

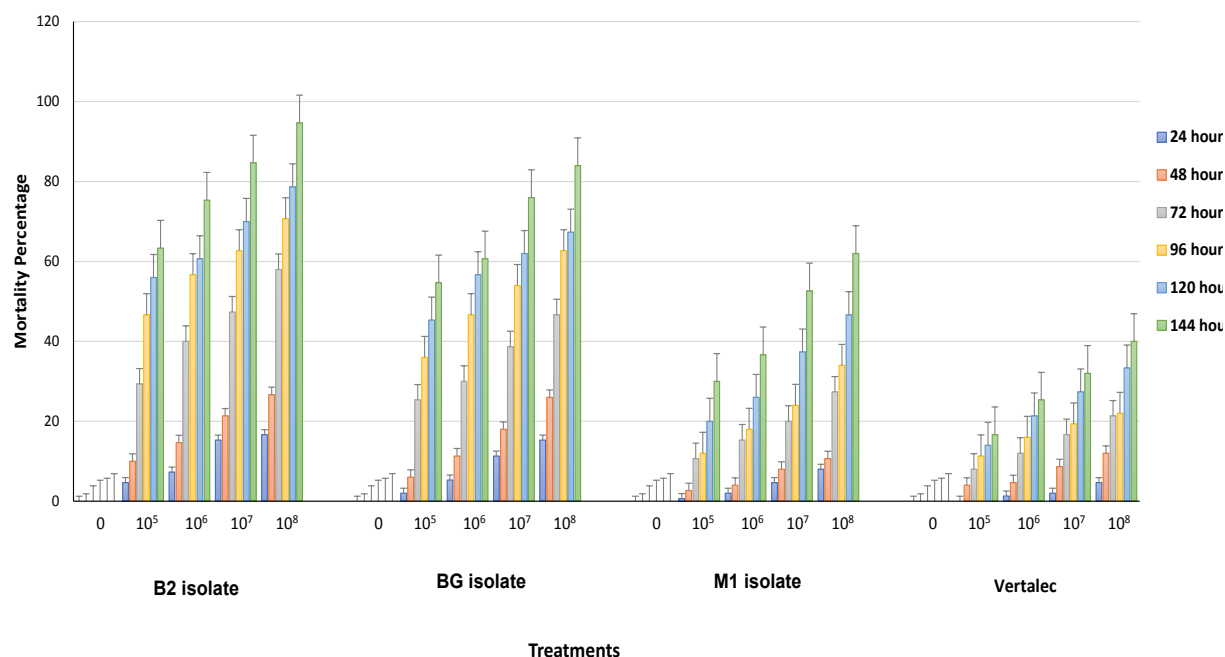
زیست‌سنجی‌های آزمایشگاهی جدایه‌های *B. bassiana* روی آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط. بر اساس نتایج این پژوهش در غربالگری اولیه و در شرایط آزمایشگاهی، هر یازده جدایه قارچ *B. bassiana* (BG1, BG2, BG3, BG4, BG5, BG6, BG7, BG8, BG9, BG10, BG11) علیه لاروهای سن دوم شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط در غلظت‌های 10^7 و 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر، بیماری‌زا بودند؛ درصد مرگومیر در بین جدایه‌ها با یکدیگر متفاوت بود. بیش‌ترین میزان مرگومیر لارو شب‌پره سفید بلوط توسط جدایه *B. bassiana* BG4 در غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر ۴۸ ساعت پس از تیمار ۳۳/۳ درصد بود (شکل ۵). در غلظت 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت پس از تیمار، جدایه *B. bassiana* BG4 بالاترین میزان مرگومیر را داشت که به طور معنی‌داری بیشتر از مرگومیر ایجاد شده توسط سایر جدایه‌های قارچی مورد آزمایش بود ($F_{10,22} = 12.67$; $p < 0.001$) (جدول ۲).

جدول ۲- گروه‌بندی میانگین مرگومیر در لاروهای سن دوم *Leucoma wiltshirei*، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از قرار گرفتن در غلظت‌های 10^7 و 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر از جدایه‌های (*B. bassiana* BG11, BG10, BG9, BG8, BG7, BG6, BG5, BG4, BG3, BG2, BG1)

Table 2. Mean mortality of second-instar larvae of *Leucoma wiltshirei* after exposure to different isolates of *Beauveria bassiana*, concentrations, and times (mean $\pm$ SE). Means followed by the same letter in a column are not significantly different according to Duncan's multiple range test.

Factors	Means	N	Duncan grouping
Isolate			
BG4	13.44	30	A
BG7	11	30	B
BG10	10.22	30	BC
BG8	10.11	30	BC
BG3	10	30	BC
BG2	9.44	30	C
BG1	9.11	30	CD
BG5	7.88	30	DE
BG11	7.44	30	E
BG6	6.44	30	EF
BG9	5.66	30	F
Time			
48 h	10.66	165	A
24 h	7.65	165	B
Concentration			
10^8 conidia ml ⁻¹	16.15	110	A
10^7 conidia ml ⁻¹	11.33	110	B
0	0	110	C

N: Total values based on the data set; means with the same letter are not significantly different from each other.



شکل ۶- مرگومیر جدایه‌های *Beauveria bassiana* (B2, BG)، *Metarhizium anisopliae* (M1) و *Lecanicillium lecanii* (Vertalec) روی لاروهای سن دوم *Leucoma wiltshirei* در غلظت‌های ۰، ۱۰^۵، ۱۰^۶، ۱۰^۷ و ۱۰^۸ کنیدیوم در میلی‌لیتر، در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از تیمار (میانگین ± SE).

Fig. 6. Mortality of *Beauveria bassiana* isolates (B2 and BG), *Metarhizium anisopliae* (M1), and *Lecanicillium lecanii* (Vertalec) against second-instar larvae of *Leucoma wiltshirei* at concentrations of 0, 10⁵, 10⁶, 10⁷, and 10⁸ conidia per mL, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 hours after treatment (mean ± SE).

جدول ۳- گروه‌بندی میانگین مرگومیر در لاروهای سن دوم *Leucoma wiltshirei*، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از قرار گرفتن در غلظت‌های ۱۰^۷ و ۱۰^۸ کنیدیوم در میلی‌لیتر از جدایه‌های *Beauveria bassiana* (B2, BG)، *Metarhizium anisopliae* (M1) و *Lecanicillium lecanii* (Vertalec)

Table 3. Mean mortality grouping of second-instar larvae of *Leucoma wiltshirei* after exposure to *Beauveria bassiana* isolates (B2 and BG), *Metarhizium anisopliae* (M1), and *Lecanicillium lecanii* (Vertalec), concentrations, and times (mean ± SE). Means followed by the same letter in a column are not significantly different according to Duncan's multiple range test.

Factors	Means	N	Duncan grouping
Isolate			
B2	37.04	150	A
BG	31.4	150	B
M1	17.11	150	C
Vertalec	12.66	150	D
Time			
144 h	44.43	100	A
120 h	36.13	100	B
96 h	29.93	100	C
72 h	22.33	100	D
Concentration			
10 ⁸ conidia ml ⁻¹	40.63	120	A
10 ⁷ conidia ml ⁻¹	33.91	120	B
10 ⁶ conidia ml ⁻¹	27	120	C
10 ⁵ conidia ml ⁻¹	21	120	D
0	0.0	120	E

N: Total values based on the data set; means with the same letter are not significantly different from each other.

زیست‌سنجی‌های آزمایشگاهی جدایه منتخب *B. bassiana* و سایر جدایه‌های قارچی روی آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط. نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی، هر چهار جدایه قارچی (*B. bassiana* (B2, BG), *M. anisopliae* (M1) و *L. lecanii* (Vertalec) برای لاروهای سن دوم شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط در غلظت‌های 10^5 ، 10^6 ، 10^7 و 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر، بیماری‌زا بودند؛ نرخ مرگ‌ومیر در میان جدایه‌ها متفاوت بود (شکل ۶). میزان مرگ‌ومیر بسته به جدایه‌های مختلف قارچی، غلظت اسپور و تعداد روزهای پس از تیمار به طور معنی‌داری متفاوت بود ($F_{15,80} = 19.63$; $p < 0.0001$) (جدول ۳). در تیمار شاهد، مرگ‌ومیر لاروها کمتر از ۵ درصد بود. در غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر و ۱۴۴ ساعت پس از تلقیح، جدایه *B. bassiana* B2 بالاترین میزان مرگ‌ومیر (۹۴/۶۶ درصد) را داشت که به طور معنی‌داری بیشتر از مرگ‌ومیر ایجاد شده توسط *B. bassiana* BG (۸۴ درصد)، *M. anisopliae* M1 (۶۲ درصد) و *L. lecanii* Vertalec (۴۰ درصد) بود ($p < 0.0001$).

B. bassiana BG4 پس از *B. bassiana* B2 دومین جدایه با بیش‌ترین میزان مرگ‌ومیر روی لاروهای آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط بود که ۷۶ درصد تلفات لاروی در غلظت 10^7 کنیدیوم در میلی‌لیتر و ۸۴ درصد مرگ‌ومیر در غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر در ۱۴۴ ساعت پس از تیمار را به همراه داشت ($p < 0.0001$). کمترین درصد مرگ‌ومیر در لاروها مربوط به جدایه *L. lecanii* (Vertalec) با ۴۰ درصد تلفات در غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر در ۱۴۴ ساعت پس از تیمار بود ($p < 0.0001$). در ۹۶ ساعت پس از تیمار، *B. bassiana* B2 دارای پایین‌ترین غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) را داشت و این مقدار برابر با $2/1 \times 10^5$ کنیدی در میلی‌لیتر بود، در حالی که *L. lecanii* Vertalec بالاترین LC_{50} را با مقدار $1/9 \times 10^{13}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر روی لاروهای سن دوم آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط نشان داد (جدول ۴). مقادیر LT_{50} محاسبه شده برای *B. bassiana* B2، *B. bassiana* BG، *M. anisopliae* M1 و *L. lecanii* Vertalec به ترتیب ۷۲/۸، ۸۸/۸۵ و ۱۶۰ ساعت در غلظت 10^7 کنیدیوم در میلی‌لیتر بود (جدول ۵).

بیماری‌زایی فرمولاسیون‌های حشره‌کش‌های قارچی روی آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط در شرایط صحرایی. تأثیر دو فرمولاسیون از هر یک از قارچ‌های بیمارگر (*B. bassiana* (BG و B2) و *M. anisopliae* (M1) و *B. bassiana* (BG و B2) + Formulation 1، *B. bassiana* (BG و B2) + Formulation 2، *M. anisopliae* (M1) + Formulation 1 و *M. anisopliae* (M1) + Formulation 2) روی لاروهای آفت برگ‌خوار سفید بلوط در منطقه رستم در استان فارس طی دو سال متوالی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌های میدانی نشان داد که میانگین مرگ‌ومیر ناشی از کاربرد فرمولاسیون‌های قارچی در دو سال متوالی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشت ($F_{15,80} = 19.63$; $p = 0.0001$). در مقابل، فرمولاسیون‌های قارچی تأثیر معنی‌داری بر مرگ‌ومیر لاروهای شب‌پره سفید بلوط داشتند ($F_{8,288} = 11797$; $p < 0.0001$). همچنین، اثر متقابل تیمارها (سال و زمان) و فرمولاسیون‌های قارچی معنی‌دار بود ($F_{24,288} = 2.10$; $p < 0.0001$) (جدول ۶). در سال اول، فرمولاسیون نوع دو جدایه B2 نسبت به سایر تیمارها برتری قابل توجهی داشت و باعث مرگ‌ومیر ۷۳ درصدی لاروهای آفت برگ‌خوار بلوط، ۳۰ روز پس از تیمار تنه درختان بلوط شد (جدول ۷). فرمولاسیون نوع دو جدایه‌های BG و M1 به ترتیب با میزان مرگ‌ومیر ۶۲ و ۵۴ درصد در رتبه بعدی قرار دارند (شکل ۷). درصد مرگ لاروها در سال دوم آزمایش روندی مشابه با سال اول داشت. فرمولاسیون نوع دو جدایه B2 ۷۵/۲ درصد مرگ‌ومیر را ۳۰ روز پس از تیمار ایجاد کرد. این میزان به طور قابل توجهی بیشتر از سایر تیمارها بود که شامل میزان مرگ‌ومیر حاصل از فرمولاسیون نوع دو جدایه‌های BG و M1 بود به ترتیب با ۶۱ درصد و ۵۴/۸ درصد بود ($p < 0.0001$) (شکل ۸).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که از گونه *B. bassiana* بطور طبیعی در زیستگاه‌های آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط گسترده هستند، زیرا این گونه قارچی از لاروهای جمع‌آوری‌شده از جنگل‌های تحت بررسی به دفعات متعدد جدا شد. تفاوت مشاهده‌شده در ویژگی‌های کیفی و کمی جدایه‌های به‌دست‌آمده می‌تواند ناشی از عوامل متعددی باشد که بر ترکیب گونه‌ای و فراوانی قارچ‌های بیمارگر حشرات در زیستگاه‌های طبیعی تأثیر می‌گذارند (Dyczko et al., 2024). مسلماً، داشتن شناخت کافی از ترکیب و توزیع گونه‌های بومی قارچ‌های بیمارگر حشرات در ارزیابی اثربخشی و پتانسیل آنها در کنترل بیولوژیک در یک اکوسیستم خاص بسیار مهم است.

جدول ۵- مقادیر LT_{50} و LT_{90} جدایه‌های *Beauveria bassiana* (B2, BG)، *Metarhizium anisopliae* (M1) و *Lecanicillium lecanii* (Vertalec) روی

لاروهای سن دوم *Leucoma wiltshirei*، در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر

Table 5. LT_{50} and LT_{90} values of *Beauveria bassiana* isolates (B2 and BG), *Metarhizium anisopliae* (M1), and *Lecanicillium lecanii* (Vertalec) against second-instar larvae of *Leucoma wiltshirei* at a concentration of 10^7 conidia/mL

Fungi	X ²	P-value	Intercept±SE	Slope±SE	LT ₅₀	LT ₉₀
B2	48.75	<0.000	-5.02±0.73	0.01±0.00	72.8 (57.3-91.6)	217.04 (152.6-464.2)
BG	68.95	<0.000	-5.04±0.13	0.02±0.00	88.5 (73.5-108.8)	275.2 (194.3-535)
M1	41.97	<0.000	-5.29±0.12	0.00±0.00	160 (98.8-263)	543 (308-824)
Vertalec	59.21	<0.000	-4.64±0.49	0.01±0.00	-	1142 (674-2743)

جدول ۶- آنالیز واریانس اثربخشی فرمولاسیون‌های *Beauveria bassiana* (B2, BG) و *Metarhizium anisopliae* (M1) روی آفت *Leucoma wiltshirei*، ۳، ۷، ۱۱ و ۳۰ روز بعد از پاشش در آزمون صحرایی (منطقه رستم) در استان فارس و در دو سال متوالی

Table 6. Analysis of variance for the efficacy of *Beauveria bassiana* (B2 and BG) and *Metarhizium anisopliae* (M1) formulations against *Leucoma wiltshirei*, at 3, 7, 11, and 30 days after spraying in field trials (Rostam region, Fars Province) over two consecutive years.

Source	df	Sum of squares	Mean square	F value	Pr>F
Model	71	204450.73	2879.58	1562.4	<0.0001
Error	288	530.8	1.84	-	-
Corrected Total	359	204981.53	-	-	-
Year	1	4.22	4.22	2.29	0.1311
Fungi formulations	8	173951.3	21743.9	11797	<.0001
Time	3	19781.2	6593.73	3577.6	<.0001
Year×Fungi formulations	8	172.25	21.53	11.68	<.0001
Year×Time	3	11.8750	3.9583	2.15	0.0944
Fungi formulations×Time	24	10437.11	434.87	235.96	<.0001
Year×Fungi formulations×Time	24	92.7500	3.8646	2.10	0.0024

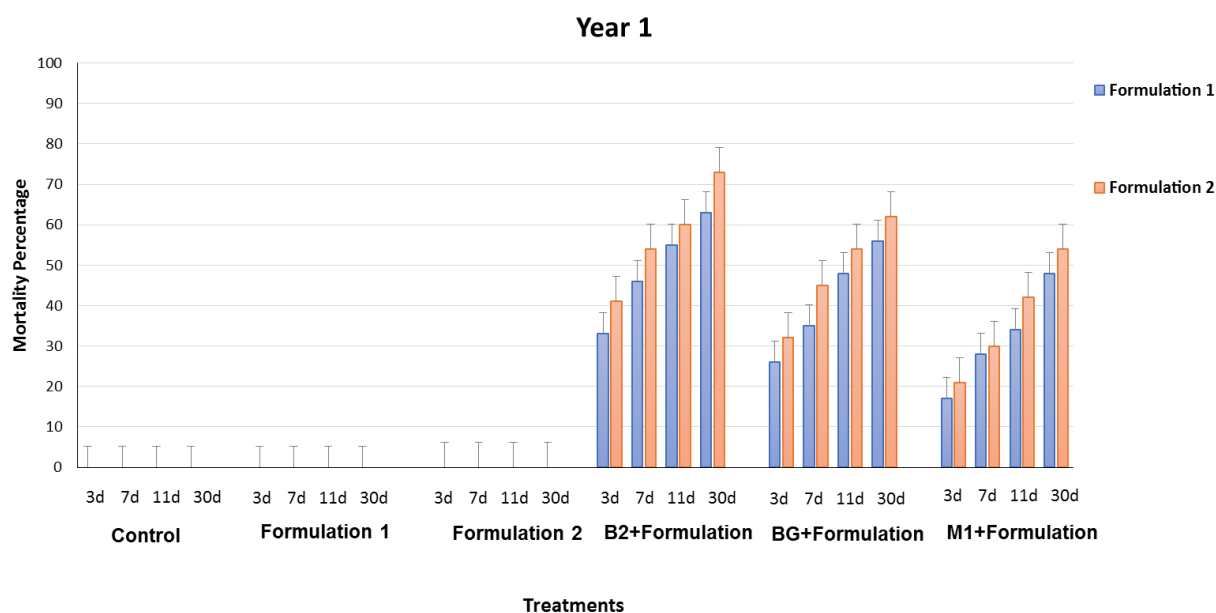
علاوه بر این، تغییرات سریع اقلیمی و سایر دگرگونی‌های زیست‌محیطی اخیر، ضرورت گسترش دانش ما درباره گونه‌های قارچی بومی را بیش از پیش آشکار می‌سازد. درک چگونگی تعامل این قارچ‌ها با میزبانان بندپا در اکوسیستم‌های در حال تغییر، برای پیش‌بینی تأثیرات آنها بر پویایی جمعیت آفت و برای توسعه استراتژی‌های مدیریت پایدار جمعیت آفت ضروری است؛ چراکه تنها در اینصورت می‌توان از آفت‌کش‌های زیستی مبتنی بر قارچ برای کنترل جمعیت آفت با شرایطی که با محیط زیست سازگار و از نظر اقتصادی مقرون بصره باشد، در قالب یک استراتژی مدیریت پایدار جمعیت آفت بهره برد (Sullivan *et al.*, 2022). در این مطالعه بیماری‌گری ۱۱ جدایه بومی *B. bassiana* که از زیستگاه‌های جنگلی محل زندگی آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط جداسازی شده بودند، در آزمون‌های زیست‌سنجی ارزیابی شد. علاوه بر این، سه جدایه قارچی دیگر شامل *B. bassiana* B2، *M. anisopliae* M1 و *L. lecanii* Vertalec نیز در شرایط آزمایشگاهی علیه لاروهای سن دوم این آفت مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج زیست‌سنجی نشان داد که تمام جدایه‌های قارچی دارای فعالیت بیماری‌گری علیه لاروهای سن دوم بودند، با این حال میزان مرگ‌ومیر ناشی از آنها تفاوت قابل‌توجهی داشت. بر اساس نتایج آزمایشگاهی و نیز میدانی پژوهش، لاروهای آفت شب‌پره برگ‌خوار سفید بلوط نسبت به جدایه‌های قارچ بیماری‌گر *B. bassiana* حساسیت بالاتری نسبت به سایر گونه‌های قارچی مورد آزمایش داشتند. پایین‌تر بودن بیماری‌زایی *L. lecanii* احتمالاً به حساسیت بالاتر کنیدی‌ها به اشعه فرابنفش و کاهش بقاء آن در شرایط خشک محیطی مربوط است (Braga *et al.*, 2001). همچنین، با افزایش زمان قرار گرفتن لاروها در معرض قارچ و غلظت بالاتر اسپور این قارچ‌ها، اثربخشی آنها افزایش یافت. این نتیجه با یافته Zamani *et al.* (2023) مطابقت دارد. طبق نتایج ایشان غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی جدایه *B. bassiana* B2 باعث مرگ‌ومیر ۱۰۰ درصدی لاروهای *Cydalima perspectalis* در شرایط آزمایشگاهی شد. همچنین *B. bassiana* B2 بر سایر جدایه‌های مورد مطالعه (Zamani *et al.*, 2023) برتری داشت و با مقادیر پایین LC_{50} ($1/2 \times 10^7$ کنیدیوم در میلی‌لیتر، ۹۶ ساعت پس از تیمار) و LT_{50} ($73/93$ ساعت در غلظت 10^7 کنیدیوم در میلی‌لیتر) این برتری نشان داده شد.

جدول ۷- گروه‌بندی میانگین مرگ‌ومیر در لاروهای آفت *Leucoma wiltshirei*، ۳، ۷، ۱۱ و ۳۰ روز بعد از پاشش در آزمون صحرایی (منطقه رستم) در استان فارس و در دو سال متوالی

Table 7. Mean mortality grouping of *Leucoma wiltshirei* larvae at 3, 7, 11, and 30 days after spraying in field trials (Rostam region, Fars Province) over two consecutive years

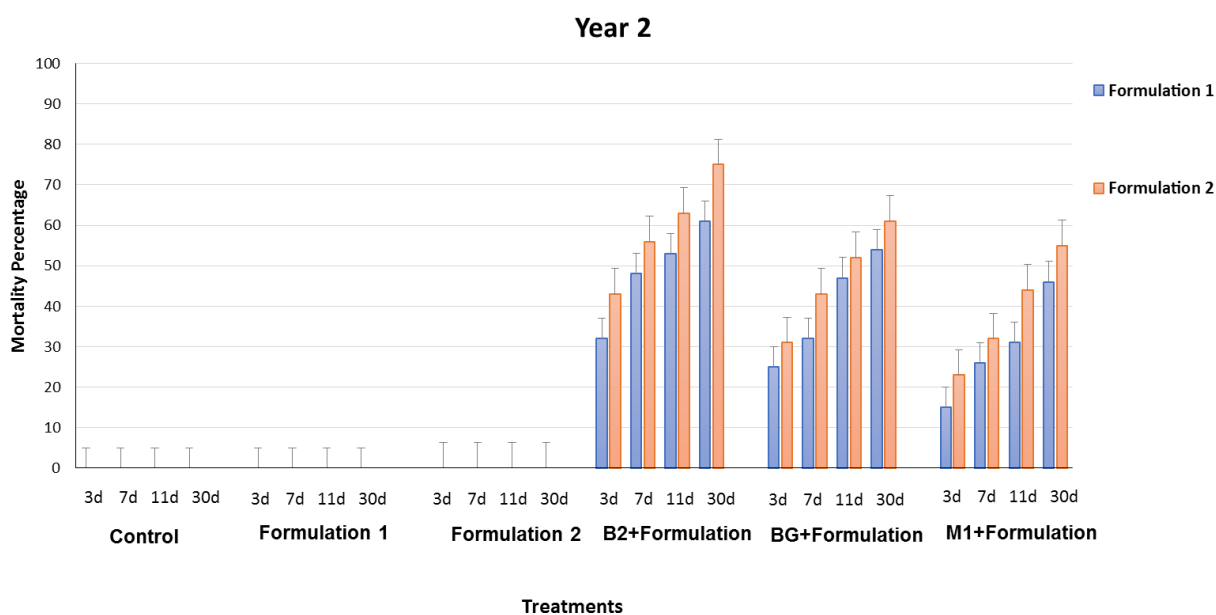
Factors	Means	N	Duncan grouping
Isolate			
Year			
Year 1	29.39	180	A
Year 2	29.17	180	A
Fungi formulations			
B2+Formulation 2	58.15	40	A
B2+Formulation 1	49.87	40	B
BG+Formulation 2	48.15	40	C
BG+Formulation 1	39.27	40	D
M1+Formulation 2	37.87	40	E
M1+Formulation 1	30.55	40	F
Formulation 1- fungi free	0.00	40	G
Formulation 2- fungi free	0.00	40	G
Control	0.00	40	G
Time			
30 days	39.16	90	A
11 days	32.4	90	B
7 days	26.53	90	C
3 days	19.04	90	D

N: Total values based on the data set, means with the same letter are not significantly different from each other.



شکل ۷- درصد مرگومیر تصحیح شده (فرمول ابوت) لاروهای *Leucoma wiltshirei*، ۳، ۷، ۱۱ و ۳۰ روز بعد از پاشش در آزمون صحرایی (منطقه رستم) در استان فارس در سال اول

Fig. 7. Corrected mortality percentage (Abbott's formula) of *Leucoma wiltshirei* larvae at 3, 7, 11, and 30 days after spraying in field trials (Rostam region, Fars Province) in the first year



شکل ۸- درصد مرگومیر تصحیح شده (فرمول ابوت) لاروهای *Leucoma wiltshirei*، ۳، ۷، ۱۱ و ۳۰ روز بعد از پاشش در آزمون صحرایی (منطقه رستم) در استان فارس در سال دوم

Fig. 8. Corrected mortality percentage (Abbott's formula) of *Leucoma wiltshirei* larvae at 3, 7, 11, and 30 days after spraying in field trials (Rostam region, Fars Province) in the second year

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، مقادیر میانگین غلظت کشنده (LC₅₀) جدایه‌های B2، *B. bassiana* B2 و *B. bassiana* BG4 به ترتیب $2/1 \times 10^5$ و $1/2 \times 10^7$ کنیدیوم در میلی‌لیتر، ۹۶ ساعت پس از تیمار روی لاروهای سن دوم *L. wiltshirei* محاسبه گردید. به طور مشابه، Hu et al. (2021) مقادیر LC₅₀ جدایه‌های *B. bassiana* Bb10331 و Bb7725 را در برابر لارو شب‌پره برگ‌خوار سفید امریکایی (*Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae)) به ترتیب $4/22 \times 10^6$ و $3/28 \times 10^6$ کنیدیوم در میلی‌لیتر ۱۲۰ ساعت پس از تیمار تعیین کردند. همچنین، Alinejad et al. (2025) در پژوهشی روی شب‌پره گزنده بلوط *P. melania* نشان

دادند که جدایه‌های بومی *B. bassiana*، به‌ویژه BG، در غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر منجر به ۱۰۰ درصد مرگ‌ومیر لاروها در هر دو روش غوطه‌وری و پاشش شدند. این نتایج، هم‌سو با یافته‌های پژوهش حاضر، بر پتانسیل بالای جدایه‌های *B. bassiana* در کنترل زیستی آفات برگ‌خوار جنگلی تأکید می‌کند.

از آنجا که فراتر رفتن از شرایط آزمایشگاهی به سمت آزمایش‌های میدانی، داده‌های ارزشمندی در مورد اثربخشی قارچ‌های بیمارگر حشرات در دنیای واقعی در کنترل جمعیت آفات ارائه می‌دهد و این مطالعات می‌توانند چالش‌های عملی و تأثیر شرایط محیطی بر اثربخشی قارچ‌های بیمارگر را آشکار کنند، در این تحقیق بررسی عملکرد قارچ‌های بیمارگر روی آفت شب‌پره برگ‌خوار بلوط از طریق کاربرد اسپری‌پاشی تنه درختان در شرایط صحرایی طی دو سال متوالی انجام گرفت. نتایج آزمون‌های صحرایی این تحقیق در طی دو سال متوالی نشان داد که افزودن مایع امولسیون کننده به فرمولاسیون قارچی بیشترین مرگ‌ومیر را روی لاروهای آفت شب‌پره برگ‌خوار بلوط کرد. محلول‌پاشی فرمولاسیون‌های جدایه‌های B2 و BG4 حاوی سورفکتانت غیریونی و پارافین روی تنه درختان بلوط منجر به مرگ‌ومیر ۷۵-۷۳ و ۶۲-۶۱ درصدی جمعیت آفت ۳۰ روز پس از تیمار شد. این فرمولاسیون از قارچ بیمارگر حشرات بالاترین پتانسیل برای کنترل آفت را داشت و فرمولاسیون جدایه‌های B2 و BG4 حاوی سورفکتانت غیریونی بر پایه مشتقات الکلی‌های چرب اتوکسیله با ایجاد ۶۳-۶۱ و ۵۶-۵۴ درصد تلفات در رتبه بعدی قرار گرفتند. نتایج مشابهی در پژوهش‌های میدانی (Luz & Batagin, 2005) گزارش شده است. این محققان نشان دادند که فرمولاسیون روغنی *B. bassiana* در کنترل پوره‌های *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae) در شرایط میدانی موجب افزایش معنی‌دار کارایی قارچ شد، به‌طوری‌که تیمار روغنی در غلظت 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر باعث مرگ‌ومیر ۷۶ تا ۸۸ درصدی حشرات پس از ۲۱ روز گردید، در حالی‌که فرمولاسیون آبی تنها حدود ۵۰ درصد تلفات ایجاد کرد. این پژوهش تأیید می‌کند که افزودن روغن به فرمولاسیون قارچ‌های بیمارگر، پایداری کنیدی‌ها را در برابر اشعه فرابنفش و خشکی افزایش داده و در نتیجه، اثربخشی قارچ را در شرایط صحرایی به‌طور بهبود می‌دهد. در دیگر مطالعات نیز، قارچ‌های فرموله شده با روغن‌ها نتایج خوبی در کنترل بیولوژیکی آفات حشره‌ای در شرایط عرصه‌ای نشان داده‌اند (Batta, 2003). این پتانسیل به توانایی روغن در محافظت از کنیدی‌های قارچی در برابر شرایط نامطلوب محیطی، به‌ویژه اشعه ماوراء بنفش و در نتیجه طولانی شدن ماندگاری در عرصه نسبت داده می‌شود (Daoust et al., 1983; Jaronski, 2010). روغن همچنین بهتر از آب با کوتیکول چربی‌دوست حشره ترکیب شده و به سرعت پخش می‌شود و احتمالاً اسپورهای قارچ را به سطح بدن حشره منتقل می‌کند (Wright et al., 2001). Luz و Batagin (2005) گزارش کردند که کنیدی‌های *B. bassiana* در روغن ذرت (۹۲/۵ درصد) و پس از آن خار مریم (۳۲/۸ درصد)، بزرگ (۲۷ درصد) و روغن سویا (۱۹ درصد) بهتر جوانه می‌زنند. شب‌پره *L. wiltshirei* یکی از آفات مخرب و مهم است که به درختان بلوط ایرانی در جنگل‌های زاگرس ایران آسیب جدی وارد کرده است. عوامل کنترل میکروبی، از جمله قارچ‌ها، روش مؤثرتر و پایدارتری برای مدیریت آفات ارائه می‌دهند.

با توجه به ملاحظات ایمنی محیطی و پایداری اکوسیستم، استفاده از جدایه‌های بومی در برنامه‌های کنترل میکروبی، رویکرد مطلوب‌تری به نظر می‌رسد. اگرچه شرایط محیطی و در دسترس بودن میزبان از عوامل مهم در حفظ جمعیت این آفت هستند، اما وجود قارچ‌های بیمارگر حشرات در اکوسیستم نیز مسلماً بر پویایی جمعیت آفت تأثیرگذار است. این مطالعه حضور رایج قارچ‌های بیمارگر حشرات از گونه *B. bassiana* در زیستگاه آفت برگ‌خوار سفید بلوط را با پتانسیل کشنده علیه جمعیت محلی این آفت آشکار کرد. قارچ‌های بیمارگر حشرات با منبع محلی به خوبی با شرایط ریزاقلمی محلی سازگار هستند و آنها را به کاندیداهای امیدوارکننده‌ای برای کنترل بیولوژیک تبدیل می‌کنند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که جدایه بومی *B. bassiana* BG4 عامل کنترل بیولوژیکی امیدوارکننده علیه مراحل لاروی آفت برگ‌خوار سفید بلوط می‌باشد. با این وجود، برای پیشبرد این یافته به سمت کاربردهای عملی، استفاده از فرمولاسیون مناسب برای حفظ بهتر اسپورهای قارچی و کاربرد فرمولاسیون در محل مناسب روی درخت (محل تجمع آفت) جهت اثربخشی و ایمنی قارچ‌های بیمارگر حشرات در زیستگاه‌های طبیعی مورد نیاز بود؛ که مد نظر ما قرار گرفت و به مرحله اجرا درآمد.

نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط صحرایی کاربرد فرمولاسیون مایع امولسیون شونده از *B. bassiana* BG4 شامل سورفکتانت غیر یونی و پارافین در برابر لاروهای آفت *L. wiltshirei* فرمولاسیون مناسبی بوده و مرگ‌ومیر بالایی را ایجاد نموده است. این فرمولاسیون می‌تواند مد نظر تولیدکنندگان محصولات بیولوژیک علیه این آفت قرار گیرد. آغشته کردن تنه درختان، بعنوان روشی منطبق با زیست‌شناسی آفت برگ‌خوار سفید بلوط، کاربردی مناسب از قارچ‌های بیمارگر بر علیه این آفت را ایجاد نمود. در این کاربرد، لاروهای کوچک سنین اولیه یک و دو که به آرامی همراه با مکث‌های طولانی از تنه درخت بالا می‌روند در معرض عفونت قارچ بیمارگر قرار می‌گیرند. به‌عنوان یک یافته عملی و بر اساس نتایج بدست آمده در آزمایش‌های این تحقیق، با کانون‌یابی و شناسایی مناطق تجمع آفت برگ‌خوار سفید بلوط در سال قبل و استفاده از فرمولاسیون قارچ *B. bassiana* روی تنه درختان در زمان زمستان‌گذرانی آفت (با حمایت نهادهای مسئول و بهره‌گیری از افراد محلی)، می‌تواند به کنترل مؤثر، عملی و کم‌هزینه آفت در عرصه‌های جنگلی منجر شود. همچنین، انجام مطالعات بیشتر برای بررسی پایداری فرمولاسیون‌های قارچی در شرایط اقلیمی گوناگون و ارزیابی تأثیر آنها بر دشمنان طبیعی و سایر حشرات غیرهدف ضروری است. چنین پژوهش‌هایی می‌تواند به بهبود اثربخشی و ایمنی زیستی قارچ‌های بیمارگر در محیط‌های طبیعی کمک کرده و زمینه‌ساز توسعه راهکارهای پایدار در مدیریت تلفیقی آفات جنگلی باشد.

Author Contributions

Seyede Masoomeh Zamani: project administration and funding acquisition, investigation, methodology, draft preparation; **Marzieh Alinejad:** methodology, formal analysis, visualization, **Hassan Askary:** methodology, final review and edit; **Reihaneh Gholami Gavamabad:** final review and edit, **Narges Sepasi:** final review and edit, **Samira Farahani:** final review and edit, **Yazdanfar Ahangaran:** field experiments and coordination

Author's Information

Seyede Masoomeh Zamani	✉ zamani832003@yahoo.com	 https://orcid.org/0000-0002-4654-7023
Marzieh Alinejad	✉ alinejad.marzieh@gmail.com	 https://orcid.org/0000-0003-1182-7073
Hassan Askary	✉ askary2@gmail.com	 https://orcid.org/0000-0002-6825-7828
Reihaneh Gholami Gavamabad	✉ reihanehgholami95@gmail.com	 https://orcid.org/0000-0002-2437-0036
Narges Sepasi	✉ sepasi.n68@gmail.com	 https://orcid.org/0000-0001-5486-7820
Samira Farahani	✉ samira_farahani005@yahoo.com	 https://orcid.org/0000-0002-6897-0631
Yazdanfar Ahangaran	✉ ahangaran_343@yahoo.com	-

Funding

This research was carried out with the financial support of the Natural Resources and Watershed Management Organization of Iran and in collaboration with the General Office of Natural Resources and Watershed Management.

Data Availability Statement

All data supporting the findings of this study are available within the paper.

Acknowledgments

This research was carried out with the financial support of the Nature Resources and Watershed Management Organization of Iran and in collaboration with the General office of Natural Resources and Watershed Management of Fars Province, for which we hereby express our gratitude. In addition, we extend our appreciation to the anonymous referees and the editor for their valuable.

Ethics Approval

This study involved the use of entomopathogenic fungi and plant-based solid substrates. All applicable international, national, and institutional guidelines for the ethical use of microbial agents in research were followed. This article does not contain any studies involving human participants or vertebrate animals performed by any of the authors.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Generative AI statement

The authors declare that no Gen AI was used in the creation of this manuscript.

REFERENCES

- Abai, M. (1980) Zur Kenntnis von *Leucoma wiltshirei* Coll. (Lep., Lymantriidae), eines neuen Schädling iranischer Eichenwälder. *Journal of Applied Entomology*, 90(1–5), 511–519.
- Abai, M. & Askari, H. (2015). Forest entomology [in Persian]. Tehran, Iran: Elm-e Keshavarzi Iran Publishing.
- Abbott, W. S. (1925) Method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265>
- Alinejad, M., Zamani, S. M., Farahani, S. & Gholami Ghavamabad, R. (2025) Efficacy of indigenous entomopathogenic fungi isolates in controlling the oak moth (*Porthesia melania* Stgr.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 32(4), 355–372. <https://doi.org/10.22092/ijfpr.2024.365471.2158>
- Altieri, M. (1994) Biodiversity and pest management in agroecosystems. Haworth Press, New York.
- Batta, Y. A. (2003) Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*, 22(3), 415–422. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00200-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00200-4)
- Bing, L. A. & Lewis, L. C. (1991) Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental Entomology*, 20(4), 1207–1211. <https://doi.org/10.1093/ee/20.4.1207>

- Bing, L. A. & Lewis, L. C. (1992) Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: The influence of plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) feeding. *Biocontrol Science and Technology*, 2(1), 39–47. <https://doi.org/10.1080/09583159209355216>
- Braga, G. U. L., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J. & Roberts, D. W. (2001) Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 734–739. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740734:BSUAUR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740734:BSUAUR>2.0.CO;2)
- Bugalho, M. N., Caldeira, M. C., Pereira, J.S., Aronson, J. & Pausas, J. G. (2011) Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 9(5), 278–286. <https://doi.org/10.1890/100084>
- Butt, T. M., Harris, J. G. & Powell, K. A. (1999) Microbial biopesticides. In F. R. Hall & J. J. Menn (Eds.), *Methods in biotechnology*, vol. 5: *Biopesticides: Use and delivery* (pp. 266–269). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-515-8:266>
- Butt, T. M., Jackson, C. & Magan, N. (Eds.). (2001) *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI Publishing
- Choi, W. I. & Park, Y. S. (2012) Dispersal patterns of exotic forest pests in South Korea. *Insect Science*, 19(5), 535–548. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2011.01480.x>
- Damalas, C. A. & Eleftherohorinos, I. G. (2011) Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402–1419. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>
- Daoust R. A., Ward, M. G. & Roberts, D. W. (1982) Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(2), 228–236. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90071-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90071-3)
- Dara, S. K., Montalva, C. & Barta, M. (2019) Microbial control of invasive forest pests with entomopathogenic fungi: A review of the current situation. *Insects*, 10(11), 341. <https://doi.org/10.3390/insects10110341>
- Doane, C. C. & McManus, M. L. (1981) The gypsy moth: Research toward integrated pest management (Tech. Bull. No. 1584). Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service
- Dyczko, D., Plewa-Tutaj, K. & Kiewra, D. (2024) Entomopathogenic fungi in forest habitats of *Ixodes ricinus*. *Insects*, 15(5), 341. <https://doi.org/10.3390/insects15050341>
- Faria, M. R. de. & Wraight, S. P. (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Feng, M. G., Poprawski, T. J. & Khachatourians, G. G. (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1), 3–34. <https://doi.org/10.1080/09583159409355309>
- Ghazanfari, H., Namiranian, M., Sobhani, H. & Mohajer, R. M. (2004) Traditional forest management and its application to encourage public participation for sustainable forest management in the northern Zagros mountains of Kurdistan province, Iran. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 19(Suppl. 4), 65–71. <https://doi.org/10.1080/14004080410034074>
- Hu, R., Bai, P., Liu, B. & Yu, J. (2021) On the virulence of two *Beauveria bassiana* strains against *Hyphantria cunea*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00452-z>
- Humber, R. A. (1998) Entomopathogenic fungal identification. Ithaca, NY: USDA-ARS Plant Protection Research Unit.
- IBM Corp. (2008) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. & Strasser, H. (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (pp. 23–69). CABI Publishing. City? Country?
- Isman, M. B. (2019) Challenges of pest management for the twenty-first century: New tools and strategies to combat old enemies. *Frontiers in Agronomy*, 1, 2. <https://doi.org/10.3389/fagro.2019.00002>
- Jaronski, S. T. (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, 55(1), 159–185. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9248-3>
- Kemal, M., Seven, E. & Koçak, A. Ö. (2013) *Leucoma wiltshirei* Collenette, new to the fauna of Turkey (Lymantriidae, Lepidoptera). *Cesa News*, 92, 7–9
- Kenis, M., Hurley, B. P., Colombari, F., Lawson, S., Sun, J., Wilcken, C., Weeks, R. & Sathyapala, S. (2019). Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests (FAO Forestry Paper No. 182). Rome, Italy: FAO.
- Lewis, L. C., Bruck, D. J. & Gunnarson, R. D. (2002). On-farm evaluation of *Beauveria bassiana* for control of *Ostrinia nubilalis* in Iowa, USA. *BioControl*, 47(2), 167–176. <https://doi.org/10.1023/A:1014574526071>

- Li, Z., Alves, S. B., Roberts, D. W., Fan, M., Delalibera, I. Jr. & Tang, J. (2010). Biological control of insects in Brazil and China: History, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 20(2), 117–136. <https://doi.org/10.1080/09583150903431665>
- Lindbladh, M. & Foster, D. R. (2010). Dynamics of long-lived foundation species: The history of *Quercus* in southern Scandinavia. *Journal of Ecology*, 98(6), 1330–1345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01733.x>
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J. & Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46, 667–702. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>
- Luz, C. & Batagin, I. (2005). Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia*, 160(1), 51–62. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0210-3>
- Luz, C. & Batagin, I. (2005). Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia*, 160(1), 51–62. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0210-3>
- Mascarin, G. M. & Jaronski, S. T. (2016) The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Moradi, M. J., Kiadaliri, H., Kafaky, S. B. & Bakhoda, H. (2021) Detection of high potential areas of Persian oak forests decline in Zagros, Iran, using TOPSIS method. *Cerne*, 27, e102640. <https://doi.org/10.1590/01047760202127012640>
- Pfeifer, T. A. & Khachatourians, G. G. (1993) Isolation of DNA from entomopathogenic fungi grown in liquid cultures. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61(2), 113–116. <https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1022>
- Pimentel, D. (2005) Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability*, 7(2), 229–252. <https://doi.org/10.1007/s10668-005-7314-2>
- Rajaei, H., Alipanah, H. & Stüning, D. (2023) A historical review of lepidopterology in Iran. *Integrative Systematics: Stuttgart Contributions to Natural History*, 6(Suppl. 1), 13–76. <https://doi.org/10.18476>
- SAS Institute Inc. (2002). SAS/STAT user's guide, version 9.0. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sullivan, C. F., Parker, B. L. & Skinner, M. A. (2022) Review of commercial *Metarhizium* and *Beauveria*-based biopesticides for the biological control of ticks in the USA. *Insects*, 13(3), 260. <https://doi.org/10.3390/insects13030260>
- van Frankenhuyzen, K. (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.009>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky. & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego, CA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wraight, S. P., Carruthers, R. I., Bradley, C. A., Jaronski, S. T., Lacey, L. A., Wood, P. & Galaini-Wraight, S. (1998) Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(3), 217–226. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4734>
- Zamani, S. M., Gholami Ghavamabad, R. & Kazerani, F. (2023) Efficacy of indigenous isolates of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the box tree moth, *Cydalima perspectalis*, invasive pest in Iranian forests. *Bulletin of Insectology*, 76(1), 117–125
- Zimmermann, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(5–6), 553–596.

Citation: Zamani, S. M., Alinejad, M., Askary, H., Gholamighavamabad, R., Sepasi, N., Farahani, S. & Ahangaran, Y. (2025) Investigation on the possibility control of *Leucoma wiltshirei* Coll. (Lep., Erebidae) using tree trunk spraying with entomopathogenic fungi: A two-year field study. *J. Entomol. Soc. Iran*, 45 (4), 663–678.

DOI: <https://doi.org/10.22034/jesi.45.4.14>

URL: https://jesi.areeo.ac.ir/article_131275.html



Research Article

Field performance of trunk-applied entomopathogenic fungi for management of the oak moth, *Leucoma wiltshirei* Coll. (Lep., Erebidae) during a two-year study

Seyede Masoomeh Zamani¹ , Marzieh Alinejad¹ , Hassan Askary² , Reihaneh Gholami Ghavamabad¹ , Narges Sepasi¹ , Samira Farahani¹  & Yazdanfar Ahangaran³

1- Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR), Tehran, Iran

2- Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Tehran, Iran

3- Forests, Range and Watershed Management Organization, Chalous, Mazandaran, Iran

Abstract. The oak defoliator moth, *Leucoma wiltshirei* Collenette, 1938 (Lepidoptera: Erebidae), is one of the most important pests of the Persian oak (*Quercus brantii* Lindl.) in the Zagros forests, causing significant damage to these trees. Developing integrated pest management (IPM) programs using biological control agents, especially entomopathogenic fungi (EPF), can be an effective and environmentally sustainable strategy to reduce the use of chemical insecticides in forest pest management. In the present study, eleven indigenous isolates of *Beauveria bassiana* were obtained from larvae of *L. wiltshirei* collected from the Zagros forests in southwestern Iran. Under laboratory conditions, isolate BG4 at a concentration of 10^8 conidia mL^{-1} caused the highest larval mortality (33.3%) after 48 hours of exposure. The pathogenicity of this isolate, along with three other fungal isolates, *B. bassiana* B2, *Metarhizium anisopliae* M1, and *Lecanicillium lecanii* (Vertalec®), was evaluated against second-instar larvae of *L. wiltshirei*. The median lethal concentrations (LC_{50}) of isolates B2, BG4, M1, and Vertalec® were calculated as 2.1×10^5 , 1.2×10^7 , 5×10^9 , and 1.9×10^{13} conidia mL^{-1} , respectively, 96 hours after treatment. In two consecutive field trials, trunk spraying of oak trees with formulations of isolates B2 and BG4 containing nonionic surfactant and paraffin resulted in 73–75% and 61–62% larval mortality, respectively, 30 days post-treatment in Rostam, Fars Province. The high mortality rates observed following treatments with native *B. bassiana* isolates indicate the strong potential of this fungus and the effectiveness of trunk spraying for biological control of *L. wiltshirei*. Future studies should focus on the stability of fungal formulations under variable climatic conditions and their potential effects on non-target organisms.

Keywords: *Quercus brantii*, insect pathology, microbial control, biocontrol agents, Zagros forests, fungi formulation

Article Info

Received: 10 August 2025

Accepted: 10 October 2025

Published: 28 October 2025

Subject Editor: Javad Karimi

Corresponding author: Seyede Masoomeh Zamani

E-mail: zamani832003@yahoo.com

DOI: <https://doi.org/10.22034/jesi.45.4.14>