کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۶، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۶ (۲۳۲-۲۲۱)
DOI: 10.22059/jbioc.2017.233933.199

بیمارگری جدایه‌ای بومی از نماتودهای مرتبط با حشرات، *Acrobeloides maximus*، علیه لاروهای کرم خراط، *Zeuzera pyrina*، در شرایط آزمایشگاه

الهام سالاری[۱]، جواد کریمی*[۲]، حسین صادقی نامقی[۳] و مجید فصیحی هرندی[۴]
۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۴. استاد، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات کیست هیداتید، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۲۲)

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور بررسی پتانسیل بیمارگری جدایه بومی ***Acrobeloides maximus* K29**، از نماتودهای بیمارگر حشرات از استان کرمان، علیه لاروهای کرم خراط ***Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae)**، مخربترین آفت درختان گردو در ایران، انجام شد. اهداف اصلی این مطالعه شامل ارزیابی بیمارگری درون تشتک پتری و روی شاخه، بررسی رابطه بین اندازه بدن میزبان و حساسیت به نماتود و همچنین توانایی تولیدمثل و نفوذ نماتود به بدن آفت می‌شدند. ارزیابی بیمارگری در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت در شرایط آزمایشگاه انجام گرفت. میزان LC_{50} محاسبه شده پس از ۷۲ ساعت **12.1 IJs larva^{-1}** محاسبه شد. در آزمایش‌های شاخه نیز این نماتود بیش از ۶۵ درصد تلفات روی لاروها ایجاد و تشریح اجساد لاروها آلودگی نماتودی را در آن‌ها تایید نمود. بررسی رابطه بین اندازه بدن لاروهای ***Z. pyrina*** و حساسیت آن‌ها به نماتود نشان داد که میزان تلفات ایجاد شده در لاروهای بزرگتر پس از قرار گرفتن در معرض این بیمارگر بیشتر بود. جدایه **K29**، نفوذ و تولیدمثل موفقیت‌آمیزی در بدن لاروهای خراط و ***Galleria mellonella*** داشتند. بیشترین میزان تولیدمثل در غلظت ۲۰ لارو عفونت‌زا در لاروهای ***Z. pyrina*** (**30560.5±559.3 IJs**) محاسبه شد. نتایج بیانگر آنست‌که جدایه بومی **K29**، قادر به بیمارگری و تکثیر در لاروهای کرم خراط است. بنابراین می‌توان این نماتود بیمارگر را در برنامه‌های مدیریت تلفیقی کرم خراط مورد توجه قرار داد. لیکن هنوز مطالعات بیشتری درخصوص چگونگی ردیابی لاروهای تیمار شده با این بیمارگر در تنه‌های تنومند درختان گردو لازم است.

کلیدواژگان: پاتولوژی حشرات، نماتود بیمارگر حشرات، *Zeuzera pyrina*

Efficacy of a Native Entomophilic Nematode Isolate, *Acrobeloides maximus*, against Leopard Moth Borer Larvae under Laboratory Conditions

Elham Salari[1], Javad Karimi*[2], Hussein Sadeghi Nameghi[3] and Majid Fasihi Harandi[4]
1. PhD Student, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2.Associate Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad,
3.Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4. Professor, Research Center for Hydatid Disease in Iran, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
(Received: May 24, 2017- Accepted: October 14, 2017)

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biological traits of the native isolate (K29) of entomopathogenic nematode (EPN), *Acrobeloides maximus*, from Kerman region against the larvae of *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) the serious pest of walnut trees in Iran. Main purposes were to determine the pathogenicity intensities on plate and in tree branchs, and also, the relationship between host body size and susceptibility to EPNs and reproduction and penetration potential of EPN. Plate assays were performed using a range of EPN concentrations (5, 10, 20, 50 and 100 infective juveniles (IJs) per larva) in laboratory. The LC_{50} of *A. maximus* K29 was 12.1 IJs larva^{-1} against *Z. pyrina* larvae after 72 h. This EPN caused high insect mortality in branch test and dissection of cadavers confirmed nematode infection. The addressing relation between host body size and susceptibility of larvae to nematode showed higher mortality rates in the larger larvae after exposing to *A. maximus* K29 isolate. The results of the penetration and reproduction assays indicated that *A. maximus* K29 was able to successfully penetrate and reproduce in the haemocoels of *Z. pyrina* and *G. mellonella* larvae. The highest reproduction was recorded at 20 IJs larva^{-1} in *Z. pyrina* (30560.5±559.3 IJs). In conclusion, our findings demonstrate that *A. maximus* K29, is virulent to *Z. pyrina* larvae and it causes infection and successfully recycles in this pest. Notwithstanding the effectiveness of this pathogenic agent on *Z. pyrina* larvae, further studies are required for better track of infection of treated larvae within the walnut tree trunks.

Keywords: entomopathogenic nematode, *Zeuzera pyrina*, insect pathology.

* Corresponding author E-mail: jkb@um.ac.ir

تازه‌های تحقیق

نتایج این پژوهش اثبات کرد که جدایه بومی نماتود بیمارگر K29 که برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود، باوجود آزادزی بودن و رفتار پارازیتی، دارای پتانسیل قابل توجهی جهت کاربرد علیه لاروهای کرم خراط دارد. این نماتود بیمارگر بومی در آزمون‌های مختلف پتری دیش و روی شاخه قادر به ایجاد بیماریزایی و تکثیر در لاروهای کرم خراط بود. نظر به مشاهدات انجام شده در خصوص زهرآگینی بالای این جدایه بومی از نماتودهای بیمارگر بر روی لاروهای کرم خراط، پتانسیل نفوذ و تولیدمثل آن در بدن آفت و همچنین توانایی این جدایه بومی در ورود و کشتن لاروهای کرم خراط درون دالان‌های لاروی آفت در شاخه‌های درخت گردو از یک سو، و نیز سازگاری نماتودهای بیمارگر با زیستگاه‌های مخفیانه لاروهای کرم خراط از سوی دیگر، در میان سایر عوامل کنترل بیولوژیک، این عامل کنترل زیستی می‌تواند به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک موثر جهت کاربرد در قالب برنامه‌های مدیریت کنترل این آفت مهم اقتصادی در باغات گردو مورد توجه قرار گیرد.

مقدمه

گردو، *Juglans regia* L.، با سطح زیر کشت حدود ۶۰،۰۰۰ هکتار در ایران به عنوان یکی از محصولات راهبردی و ذخایر ملی کشور محسوب شده و ارزش بسیار زیادی برای کشاورزان دارد. ایران حدود ۱۱/۵ درصد از تولید جهانی این محصول را به خود اختصاص داده (Amirghasemi 2006) و با تولید سالانه بیش از ۱۵۰۰۰۰ تن گردو، به‌عنوان چهارمین تولیدکننده جهانی این محصول پس از چین، آمریکا و ترکیه می‌باشد (Ebrahimi *et al*. 2009, Siahnouri *et al*. 2013).

کرم خراط *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae)، مهمترین آفت اقتصادی در باغات گردو می‌باشد که در سال‌های اخیر خسارت‌های شدید و قابل توجهی به بسیاری از مناطق گردوکاری کشور از جمله استان کرمان وارد نموده است. به‌طور کلی لاروهای کرم خراط پلی‌فاژ بوده و علاوه بر گردو به تعداد زیادی از درختان میوه و درختان غیرمثمر متعلق به بیش از ۳۰ خانواده گیاهی حمله می‌کنند (Gatwick 1992). عمده‌ی خسارت این حشره مربوط به مرحله لاروی است که تغذیه اصلی آن‌ها از چوب شاخه و تنه بوده و علاوه بر خسارت به محصول، سبب مرگ قسمت‌هایی از درخت می‌شوند (Langström *et al*. 2004, Alford 2007). در حال حاضر برای از بین بردن لاروها درون دالان‌های لاروی اغلب از سیم‌های مفتولی استفاده می‌شود که روشی زمان‌بر، سخت و در سطح زیاد امکان‌ناپذیر می‌باشد. مبارزه شیمیایی با این آفت نیز به‌دلیل طولانی بودن دوره تخمریزی حشرات بالغ و همچنین مخفی بودن بخش عمده‌ای از مراحل خسارت‌زای دوره زندگی از دسترس مبارزه، نه تنها موثر نبوده، بلکه با از بین بردن دشمنان طبیعی آفت باعث افزایش آفت نیز می‌شود (Hegazi *et al*. 2009, Shamseldean *et al*. 2009). از روش‌های کنترل غیر-شیمیایی برای کنترل لاروهای کرم خراط می‌توان به قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر حشرات به صورت دو فرم تجاری و غیرتجاری مانند *Bacillus thuringiensis* (Myers 1988, Nashnosh *et al*. 1993)، بازدارنده‌های سنتز کیتین (Myers 1988) و فرمون‌ها (Pasqualini *et al*. 1992, Nashnosh *et al*. 1993, Avilla and Bosh 2001) اشاره نمود که در سال‌های اخیر در کشورهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما تمام آن‌ها دارای یکسری محدودیت‌هایی هستند. لذا یافتن روش‌های جایگزین موثر در کنترل این آفت مهم اقتصادی امری ضروری است.

نماتودهای بیمارگر حشرات (EPNs)[1] به‌عنوان یکی از عوامل کنترل بیولوژیک موفق، از پتانسیل بالایی برای کنترل آفاتی که زیستگاه مخفی دارند، برخوردار می‌باشند (Burnell and Stock 2000, Koppenhöfer 2007, Lacey and Georgis 2012, Poinar and Grewal 2012, Lacey *et al*. 2015). آفاتی از قبیل کرم سیب *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) (Lacey and Unruh 1998, Lacey *et al*. 2015)، پروانه‌های زنبور مانند *Synanthedon pictipes* (Grote & Robinson) (Lepidoptera: Sesiidae) (Cottrell *et al*. 2011)، *Synanthedon*

1. Entomopathogenic nematodes

Shapiro-) *exitiosa* (Say) (Lepidoptera: Sesiidae) (Ilan *et al*. 2014) و پروانه چوبخوار *Prionoxystus robiniae* Peck (Lep., Cossidae) (Canhilal and Carner 2006) ازجمله آفات ساکن زیستگاه‌های مخفی می‌باشند که به طور موفقیت‌آمیز توسط نماتودهای بیمارگر کنترل شده‌اند. یکی از دلایل موفقیت نماتود-های بیمارگر در کنترل چنین آفاتی، نزدیکی زیستگاه مخفیانه لاروهای آفت به زیستگاه طبیعی نماتودهای بیمارگر و بالا بودن میزان رطوبت درون دالان‌های لاروی می‌باشد که نماتودها می‌توانند به آسانی به میزبان خود دسترسی پیدا کنند. همچنین در این زیستگاه‌ها نماتودها به‌خوبی از آفت‌کش‌های شیمیایی و اشعه فرابنفش خورشید که برای آن‌ها آسیب رسان بوده و کارایی آن‌ها را در برابر حشرات هدف کاهش می‌دهند، محافظت می‌شوند (Shamseldean *et al*. 2009). هرچند در خصوص بررسی تاثیر نماتودهای بیمارگر در کنترل کرم خراط مطالعات کمی انجام شده، لیکن تحقیقات بیانگر آنست‌که علاوه بر زیستگاه مناسب کرم خراط جهت کاربرد نماتودهای بیمارگر، این آفت حساسیت بالایی به نماتودهای بیمارگر حشرات دارد (Abdel-Kawy *et al*. 1988, Sammour and Saleh 1996, Shamseldean *et al*. 2009, Ashtari *et al*. 2011, Salari *et al*. 2015).

البته لازم به‌ذکر است که گونه‌ها و نژادهای نماتود-های بیمارگر حشرات از لحاظ ایجاد بیمارگری، توانایی تولیدمثل، رفتار جستجوی میزبان و زنده‌مانی در شرایط مختلف با یکدیگر متفاوتند. لذا در کاربرد نماتودهای بیمارگر در منطقه‌ای خاص بایستی اطلاعات لازم مانند وجود یا عدم وجود گونه‌های بومی این عوامل در اختیار باشد. به‌دلیل سازگاری بهتر گونه-های بومی نماتود با جمعیت‌های دشمنان طبیعی و همچنین شرایط آب و هوایی منطقه خود، آفات موجود در آن مناطق به‌طور مؤثرتری توسط این عوامل کنترل خواهند گردید (Miller and Barbercheck 2001, Campos-Herrera and Gutiérrez 2009). نظر به اقلیم خاص استان کرمان که سبب تنوع آب و هوایی و به‌تبع آن ایجاد مناطق اکولوژیک متفاوت و غنای تنوع زیستی شده است (Mehrabi Boshrabadi *et al*. 2008)، می‌توان امید داشت که جمعیت‌های بومی نماتودهای بیمارگر در این استان پتانسیل ایجاد بیمارگری در کرم خراط را داشته باشند. از این‌رو هدف از پژوهش حاضر بررسی پتانسیل کنترل بیولوژیک یک جدایه بومی از نماتودهای بیمارگر مرتبط با حشرات از استان کرمان شامل مطالعات ارزیابی بیمارگری درون تشتک پتری و شاخه، بررسی رابطه بین اندازه بدن میزبان و حساسیت به نماتود و همچنین بررسی توانایی تولیدمثل و نفوذ نماتود به بدن لاروهای کرم خراط در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و نگهداری لاروهای کرم خراط

جمع‌آوری نمونه‌های لاور کرم خراط در فاصله تیر تا شهریور ماه ۱۳۹۴ از باغات گردوی با آلودگی بسیار بالا به کرم خراط و درختان آلوده‌ی پلاک‌گذاری شده توسط سازمان جهاد کشاورزی در روستای ده‌زارچی از توابع شهرستان بافت در استان کرمان انجام گرفت.

لاروهای جمع‌آوری شده سپس در شرایط کنترل شده درون اتاقک رشد نگهداری شدند. برای تغذیه لاروهای این آفت از قطعات کوچکی از چوب شاخه-های تازه درخت گردو استفاده شد که هر سه روز یک-بار در اختیار لاروها قرار می‌گرفت. لاروهای کرم خراط قبل از استفاده در آزمایشات به منظور بررسی جهت عدم وجود سایر آلودگی‌ها و بیماری‌ها، حداقل به‌مدت یک هفته در شرایط آزمایشگاه نگهداری می‌شدند و تنها لاروهایی که از نظر تغذیه و حرکت سالم به‌نظر می‌رسیدند، در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین بر اساس میانگین وزن، طول بدن و عرض کپسول سر، سنین مختلف لاروی از یکدیگر تفکیک شدند.

تکثیر نماتودهای بیمارگر مورد مطالعه

در این مطالعه از جدایه بومی نماتود بیمارگر K29 که با استفاده از طعمه‌گذاری لاروهای گالریا از نمونه‌های خاک استان کرمان جداسازی شده بود، استفاده شد. بر اساس اطلاعات حاصل از مشخصات کلیدی مورفومتریک و به کمک داده‌های مولکولی مشخص شد که جدایه

K29 با مشخصات جنس *Acrobeloides* از خانواده Cephalobidae مطابقت دارد. تایید نهایی هویت این جدایه به‌نام *Acrobeloides maximus* Thorne, 1925 (Rhabditida: Cephalobidae) توسط دکتر خواکین ابولافیا از گروه زیست‌شناسی جانوری و گیاهی دانشگاه Universidad de Jaén, Jaen,) جائن اسپانیا Spain) صورت پذیرفت. در راستای انجام آزمایشات مختلف، این جدایه بیمارگر بومی بر روی لاروهای سن آخر پروانه موم‌خوار در آزمایشگاه تکثیر شد. ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از آلوده‌سازی، لاشه لاروهای آلوده به بیمارگر، به تله‌وایت[2] منتقل و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای نگهداری نماتودهای استخراج شده به‌منظور مطالعات بیشتر، لاروهای عفونت‌زا، ۸ تا ۱۰ روز پس از خروج، به‌صورت یک روز در میان جمع‌آوری و با استفاده از آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شده و جهت استفاده در آزمایشات بعدی، درون لوله‌های فالکون (۱۵۰ میلی-لیتری) حاوی اسفنج‌های خرد شده‌ی استریل در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند (Kaya and Stock 1997).

آزمون‌های زیست سنجی

آزمون بیمارگری جدایه K29 درون تشتک پتری بر روی لاروهای کرم خراط

آزمون بیمارگری جدایه K29 بر روی لاروهای کرم خراط با تهیه غلظت‌های مختلف از این بیمارگر انجام گرفت. به‌دلیل فقدان اطلاعات در خصوص حساسیت لاروهای آفت به تراکم‌های مختلف این بیمارگر، پس از انجام آزمون مقدماتی بیمارگری (شامل دامنه غلظتی ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت)، غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل برای انجام آزمایشات تکمیلی روی آفت تعیین گردید. آزمایش‌ها درون تشتک‌های پتری شیشه‌ای به‌قطر ۵ سانتی‌متر حاوی کاغذ صافی واتمن شماره یک مرطوب انجام شد. در تیمار شاهد تنها از ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل استفاده شد. سپس یک لارو سن آخر کرم خراط به‌صورت انفرادی به هر یک از تشتک‌های پتری واحد آزمایشی اضافه شد. به منظور تغذیه لاروها از قطعات کوچک چوب تازه درخت گردو استفاده شد. این ظروف به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد منتقل شدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان تلفات ایجاد شده در آفت محاسبه شد و به منظور تعیین شاخص زهرآگینی جدایه K29 بر روی لاروهای کرم خراط، میزان LC_{50} این بیمارگر پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه گردید. در مجموع ۱۵ تکرار به ازای هر یک از غلظت‌ها در نظر گرفته شد و کل آزمایش دو بار تکرار شد. جهت بررسی و تایید آلودگی توسط نماتود، اجساد در سومین روز بعد از شروع آزمایش در زیر استریومیکروسکوپ تشریح شدند.

آزمون بیمارگری جدایه K29 در شاخه

پس از جمع‌آوری شاخه‌های سالم و آلوده به کرم خراط (هر یک از شاخه‌ها با طول تقریبی ۱۳ سانتی-متر و قطر ۱۲ میلی‌متر) و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه، دو آزمون شاخه به منظور اطمینان از تلفات حاصل از نماتود انجام شد. هدف از انجام آزمون اول شاخه اطمینان از این بود که پس از کاربرد نماتود، تلفات ایجاد شده در لاروها ناشی از این بیمارگر خواهد بود.

بدین منظور لاروهای سالم کرم خراط به‌صورت انفرادی درون تشتک‌های پتری به قطر ۱۵ سانتی‌متر و حاوی سه کاغذ صافی مرطوب، در جوار شاخه‌های سالم قرار گرفتند. سپس به لاروها فرصت داده شد تا وارد شاخه‌ها شده و سپس آلوده‌سازی آن‌ها با بیمارگر انجام گرفت. آزمون شاخه دوم به منظور شبیه‌سازی شرایط نیمه‌طبیعی با استفاده از شاخه‌های آلوده به کرم خراط و حاوی دالان‌های فعال لاروی انجام گرفت. سپس این دو گروه شاخه‌ها در معرض غلظت ۱۶۰ لارو عفونت‌زا در سانتی‌متر مربع از جدایه K29 در حجم ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل قرار گرفتند. روش انجام آزمایش به‌صورت تزریق هر یک از تیمارها درون دالان‌های لاروی هر یک از شاخه‌ها بود. در تیمار شاهد هر دو آزمایش تنها از ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل استفاده شد. هر تیمار دارای ۷ تکرار بود و کل آزمایش

2. White trap

نیز دو بار تکرار شد. تمام تشتک‌های پتری واحد آزمایشی با پارافیلم پوشیده شده و در شرایط کنترل شده درون اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از پنج روز، تعداد لاروهای زنده و مرده با باز کردن شاخه‌ها و خارج کردن لاروها از شاخه مورد شمارش قرار گرفتند و در نهایت به منظور تایید آلودگی نماتودی اجساد لاروهای مرده به تله وایت انتقال یافتند.

بررسی میزان نفوذ[3] و توانایی تکثیر[4] جدایه K29 روی لارو کرم خراط و *Galleria mellonella*

میزان نفوذ و تولیدمثل جدایه K29 در لاروهای کرم خراط و همچنین لاروهای گالریا به‌عنوان کنترل مثبت در دو غلظت (۵ و ۲۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت) مورد آزمون و مقایسه قرار گرفتند. برای انجام آزمون، ۲۰ عدد لارو سن آخر از هر یک از میزبان‌ها به صورت انفرادی درون تشتک‌های پتری شیشه‌ای ۵ سانتی‌متری حاوی کاغذ صافی مرطوب به‌طور جداگانه با این دو غلظت مذکور بیمارگر بومی مورد تیمار قرار گرفتند. سپس ظروف حاوی لاروهای تیمار شده درون اتاقک رشد در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. از آنجایی که نماتودهای بیمارگر جهت تکمیل دوره زندگی و تولیدمثل در بدن میزبان به بیشتر از سه روز زمان نیاز دارند (Sharifi *et al*. 2014)، لذا تعداد لاروهای بیمارگری که سه روز پس از تشریح اجساد هر یک از میزبان‌ها درون بدن میزبان شمارش شدند، نشان دهنده تعداد لاروهای بیمارگری است که به بدن میزبان‌ها نفوذ کرده‌اند. بنابراین پس از سه روز، نیمی از اجساد به صورت تصادفی انتخاب شده و پس از شستشو با آب مقطر، جهت تعیین و شمارش تعداد کل لاروهای عفونت‌زای نفوذ کرده به بدن هر یک از میزبان‌ها، در زیر استریومیکروسکوپ تشریح شدند. سپس به منظور محاسبه پتانسیل تولیدمثل جدایه K29، سایر اجساد به‌شکل جداگانه به تله وایت منتقل شده و تا پایان خروج آخرین لارو عفونت‌زا، میزان کل لاروهای عفونت‌زای خارج شده از هر یک از اجساد مورد شمارش قرار گرفتند. بدین ترتیب تعداد لاروهای عفونت‌زای تولید شده به ازای هر لارو کرم خراط محاسبه و با لاروهای گالریا مقایسه شدند. در تیمار شاهد مربوط به هر یک از میزبان‌ها تنها ۲۰۰ میکرو-لیتر آب مقطر استریل استفاده شد. در مجموع ۱۵ تکرار به ازای هر یک از غلظت‌ها در نظر گرفته شد و کل آزمایش دو بار تکرار شد.

ارزیابی ارتباط بین اندازه بدن لارو کرم خراط و میزان حساسیت آن‌ها به جدایه K29

به‌منظور بررسی تاثیر اندازه بدن میزبان بر میزان حساسیت آن‌ها نسبت به نماتودهای بیمارگر، لاروهای سنین مختلف کرم خراط به‌طور جداگانه در معرض جدایه K29 قرار گرفتند. بدین منظور پس از توزین لاروهای سنین مختلف، این لاروها بر اساس طول بدن، عرض کپسول سر و میانگین به‌دست آمده از مجموع وزن آن‌ها در دو گروه[5] متمایز بزرگ و کوچک قرار گرفتند. گروه کوچک و بزرگ به‌ترتیب شامل لاروهایی با میانگین طول حدود ۱۲ و ۲۶ میلی‌متر بود. میانگین وزن لاروها (شامل ۳۰ عدد لارو) در هر یک از گروه-های کوچک و بزرگ به‌ترتیب ۰/۹۹ ± ۳۶ و ۴/۱۰ ± ۲۸۵ گرم محاسبه شد. واحد آزمایشی برای هر یک از این دو گروه متمایز، مشابه آزمون بیمارگری بود و با دو غلظت مشخص از نماتود (یکی غلظت LC_{50} بیمارگر و دیگری غلظت ۲۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت) در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تیمار شدند. در تیمار شاهد در هر یک از گروه‌ها، تنها از آب مقطر استریل استفاده شد. در مجموع آزمایش شامل ۱۵ تکرار بود و کل آزمایش نیز دو بار تکرار شد. درصد تلفات تجمعی لاروهای کرم خراط در گروه‌های مختلف، در شرایط آزمایشگاهی، پس از ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفتن در معرض نماتود محاسبه شد. به منظور تایید آلودگی نماتودی اجساد آلوده در دو گروه پس از سه روز در زیر استریومیکروسکوپ تشریح شده و میزان حساسیت و تلفات لاروها بر اساس جثه آن‌ها مقایسه شدند.

3. Penertation Test
4. Reproduction Capability Tests
5. Size class

تجزیه و تحلیل آماری

در آزمایشات مربوط به بررسی میزان حساسیت آفت به نماتودهای بیمارگر، در صورت مشاهده تلفات در تیمار شاهد، درصد تلفات ناشی از عوامل بیمارگر در تیمار-های دیگر بر اساس فرمول Abbott اصلاح گردید (Abbott 1925). برای محاسبه شاخص زهرآگینی[6] نماتود بیمارگر بومی روی لاروهای کرم خراط، داده-های حاصل از زیست‌سنجی با استفاده از نرم‌افزار POLO-PC و از روش Probit Analysis در سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و پارامترهایی از قبیل شاخص زهرآگینی و شیب خط رگرسیونی پروبیت میزان تلفات غلظت با استفاده از این نرم‌افزار به‌دست آمد. از آزمون آماری غیر-پارامتریک Kruskal-Wallis (K-W) test جهت آنالیز آماری اثرات جدایه بومی K29 در آزمون شاخه استفاده شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها و همگن بودن واریانس آن‌ها، از آنالیز واریانس دوطرفه جهت مقایسه درصد تلفات تجمعی گروه‌های اندازه‌ای مختلف آفت ۷۲ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض دو غلظت متفاوت از جدایه K29 استفاده شد (اندازه بدن میزبان × غلظت بیمارگر). میانگین میزان نفوذ و تولیدمثل بیمارگر در بدن لاروهای خراط و همچنین لاروهای گالریا، توسط آنالیز واریانس دو طرفه طرح فاکتوریل محاسبه گردید (غلظت نماتود × گونه میزبان). زمانی‌که تجزیه واریانس در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود، آزمون چند دامنه‌ای توکی[7] جهت تعیین تفاوت‌های معنی‌دار میان میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. لازم به‌ذکر است که محاسبه کلیه آنالیزهای آماری به‌جز محاسبه شاخص زهرآگینی عوامل بیمارگر، توسط نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

نتایج

بیمارگری جدایه K29 درون تشتک پتری بر روی لاروهای کرم خراط

نتایج نشان داد که در آزمون تشتک پتری (در دامنه‌ی غلظت ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت) جدایه بومی K29 قادر به ایجاد بیمارگری در آفت بود. آنالیز پروبیت استفاده شده به منظور تعیین میزان LC_{50} این بیمارگر پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی لاروهای کرم خراط در جدول شماره ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان قرار گرفتن آفت در معرض جدایه K29، میزان LC_{50} محاسبه شده برای این بیمارگر کاهش یافت. میزان LC_{50} محاسبه شده برای جدایه بومی K29 پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۱۵/۲ و ۱۲/۱ لارو بیمارگر به ازای هر لارو آفت تعیین گردید.

جدول شماره ۱- مقادیر LC_{50} محاسبه شده (لارو بیمارگر به ازای هر لارو آفت) جدایه *Acrobeloides maximus* K29 علیه لاروهای *Z. pyrina*

Table 1- The calculated LC50 values (IJs $larva^{-1}$) for *Acrobeloides maximus* K29 isolate on *Z. pyrina* larvae in Petri dish bioassays

Incubation period (hours)	LC_{50} (95% fiducial limits)[a]	Intercep±SE[b]	Slope±SE	χ^{2c} (df=3)	P-value[d]
48	15.2 (9.6 - 22.4)	-2.26 ± 0.48	2.43 ± 0.42	2.59	0.46
72	12.1 (7.3 - 17.7)	-2.39± 0.57	2.59 ± 0.49	0.45	0.93

[a] Concentration are expressed in IJs $larva^{-1}$; [b] SE, standard error; [c] Pearson χ^2 of the slope; [d] P-values represent the probability of the slope

بیمارگری جدایه *A. maximus* K29 در آزمون شاخه

پنج روز پس از کاربرد جدایه بومی *A. maximus* K29، در هر دو آزمون شاخه لاروهای کرم خراط آلوده به نماتود درون شاخه‌های گردو مشاهده شدند. میزان تلفات محاسبه شده لارو آفت در آزمون شاخه اول پس از تزریق مستقیم (IJs cm^{-2}) ۱۶۰ لارو عفونت‌زا در سانتی‌متر مربع درون شاخه‌ها، میزان ۶۶/۷ درصد مشاهده شد. نتایج آزمون شاخه دوم نشان داد که جدایه K29 در شاخه‌های آلوده توانایی بیمارگری نسبتا بالاتری در مقایسه با شاخه‌های سالم در لاروهای کرم خراط دارا می‌باشد. در آزمون شاخه دوم پس از کاربرد (IJs cm^{-2}) ۱۶۰ لارو عفونت‌زا در سانتی‌متر مربع به صورت تزریق مستقیم درون شاخه‌ها، میزان تلفات آفت ۷۱/۴ درصد محاسبه شد.

6. LC50
7. Tukey HSD Test

میزان نفوذ و توانایی تکثیر جدایه بیمارگر بومی بر روی لاروهای خراط و *Galleria mellonella*

نتایج آنالیز توانایی نفوذ و تکثیر جدایه بومیK29 درون حفره عمومی بدن لاروهای خراط و گالریا در جدول شماره ۲ ارائه شده است. نتایج این بررسی نشان داد که این جدایه مورد مطالعه، توانایی نفوذ و تولیدمثل موفقیت‌آمیزی در بدن لاروهای خراط و گالریا داشته و نتاج آن‌ها نیز به‌طور موفقیت‌آمیزی از اجساد این میزبان‌ها خارج شدند. نتایج آزمون بررسی توانایی نفوذ بیانگر آن بود که در این جدایه بیمارگر مورد آزمون با افزایش غلظت بیمارگر، میزان هجوم لاورهای عفونت‌زا به درون هموسل لاروهای خراط و گالریا افزایش می‌یابد ($F_{1, 76} = 2669.19, P < 0.0001$). این در حالیست که هیچ‌گونه تفاوت آماری بین میزبان‌های مختلف (لاروهای خراط و گالریا) در میزان نفوذ جدایه بومی K29 مشاهده نگردید ($F_{1, 76} = 2.55, P = 0.1147$). همچنین اثرات متقابل بین میزبان و غلظت مورد کاربرد بیمارگر، برای این جدایه بومی اثر معنی‌داری در میزان نفوذ این عامل بیوکنترل به بدن لاروهای میزبان نداشتند ($F_{1, 76} = 0.99, P = 0.3217$).

بیشترین میزان نفوذ در غلظت ۲۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت در لاروهای کرم خراط محاسبه شد (۱۵/۳± ۰/۳۴). هرچند که در غلظت فوق هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میزان نفوذ بیمارگر به حفره بدن لاروهای خراط و گالریا مشاهده نشد ($P > 0.05$). پس از ۷۲ ساعت، کمترین میزان نفوذ در غلظت ۵ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت در لاروهای *G. mellonella* ثبت شد (۱/۹۵± ۰/۱۸) و به‌طور مشابه در غلظت فوق هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میزان نفوذ این بیمارگر به بدن لاروهای خراط و گالریا مشاهده نشد ($P > 0.05$) (جدول شماره ۲).

نتایج آزمون بررسی پتانسیل تولیدمثل این بیمارگر نشان داد پتانسیل تولیدمثل و نتاج حاصل از تکثیر این جدایه بومی در لاروهای خراط به طور معنی‌داری بیشتر از لاروهای گالریا محاسبه شد ($F_{1, 76} = 15.28, P = 0.0002$). همچنین توانایی تکثیر جدایه بومی K29 درون لاروهای خراط و گالریا به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت مورد کاربرد این بیمارگر افزایش داشت ($F_{1, 76} = 3344.47, P < 0.0001$)، هرچند که اثرات متقابل بین غلظت مورد کاربرد نماتود و گونه‌ی میزبان، تاثیر معنی‌داری در توانایی تکثیر این عامل بیوکنترل درون بدن لاروهای میزبان بروز نداد ($F_{1, 76} = 6.48, P = 0.13$).

نتایج نشان داد که در غلظت ۲۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت، میزان تولیدمثل جدایه بومی K29 در لاروهای خراط به‌طور معنی‌داری بیشتر از لاروهای گالریا بود ($P < 0.05$)، در حالیکه در غلظت ۵ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت، تفاوت معنی‌داری در توانایی تکثیر این بیمارگر در بدن میزبان‌های مختلف (لاروهای خراط و گالریا) مشاهد نشد ($P > 0.05$). بیشترین میزان تولیدمثل این عوامل بیمارگر در غلظت ۲۰ لارو عفونت‌زا در لاروهای *Z. pyrina* محاسبه شد (۵۵۹/۳ ± ۳۰۵۶۰/۵: میانگین تعداد لارو عفونت‌زا). لازم به‌ذکر است که با افزایش غلظت مورد استفاده این بیمارگر، تعداد لاروهای عفونت‌زایی که به بدن هر یک از میزبان‌های لارو کرم خراط و گالریا نفوذ کردند، افزایش یافت؛ این در حالیست که تعداد نتاج تولید شده به ازای لاروهای نفوذ کرده به بدن، متناسب با افزایش در غلظت کاربرد بیمارگر کاهش پیدا نمودند (جدول شماره ۲).

ارتباط بین اندازه بدن لاروهای کرم خراط و میزان حساسیت آن‌ها به نماتود بیمارگر

نتایج بررسی اینکه آیا اندازه بدن میزبان می‌تواند بر میزان حساسیت آن‌ها نسبت به نماتودهای بیمارگر تاثیرگذار باشد یا خیر، نشان داد که ۷۲ ساعت پس از کاربرد جدایه بومی K29 تلفات ایجاد شده در لاروهای کرم خراط به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت بیمارگر قرار داشت ($F_{1, 16} = 62.23, P < 0.0001$). میزان تلفات آفت در غلظت ۲۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت به‌طور معنی‌داری بیشتر از تلفات ایجاد شده در غلظت LC_{50} این بیمارگر محاسبه شد. هرچند که لاروهای بزرگتر آفت نسبت به این بیمارگر بومی حساسیت بیشتری در مقایسه با لاروهای کوچکتر نشان دادند، اندازه بدن میزبان در میزان مرگ‌ومیر ایجاد شده در لاروهای آفت در اثر جدایه بومی K29، ۷۲ ساعت پس

از کاربرد این عامل کنترل‌زیستی تاثیر معنی‌داری نداشت ($F_{1, 16} = 2.94, P = 0.11$). اثرات متقابل بین غلظت نماتودها و اندازه بدن لاروهای آفت در ایجاد مرگ‌ومیر در لاروهای کرم خراط پس از قرار گرفتن در معرض جدایه بومی K29 غیرمعنی‌دار محاسبه گردید ($F_{1, 16} = 1.06, P = 0.32$). بیشترین میزان تلفات در غلظت ۲۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت و سایز کلاس بزرگ آفت، با ۹۳/۳ درصد تلفات و کمترین آن در غلظت ۱۲ لارو عفونت‌زا و سایز کلاس کوچک آفت، با ایجاد ۴۶/۷ درصد تلفات در آفت مشاهده شد.

جدول شماره ۲- میانگین (± خطای معیار) نفوذ و تولیدمثل لاروهای عفونت‌زای جدایه *Acrobeloides maximus* K29 در بدن لاروهای *Z. pyrina* و *G. mellonella* در شرایط آزمایشگاه

Table 2- Average number of *Acrobeloides maximus* K29 IJs invading *Z. pyrina* and *G. mellonella* larvae in the laboratory condition

Application rates (IJs larva^{-1})	Host	EPN Invasion (IJs larva^{-1}±SE)	EPN Reproduction (IJs larva^{-1}±SE)	Reproduction rate (per invaded IJ)
5	*Z. pyrina*	0.23b±2.1	105.99b±8104.50	3859.28571
	G. mellonella	0.18b±1.59	93.05b±7957.005	3896.02564
20	*Z. pyrina*	0.34a±15.3	559.27c±30560.50	1997.4183
	G. mellonella	0.22a±14.65	469.75a±28160.20	1922.19795

*میانگین‌های با حروف متفاوت، بر اساس آزمون Tukey در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارند.

*Different letters indicate significant differences according to Tukey's HSD test ($P < 0.05$)

بحث

نظر به سازگاری نماتودهای بیمارگر با زیستگاه مخفیانه لاروهای کرم خراط، این بیمارگرها می‌توانند به‌عنوان یک عامل کنترل‌زیستی مناسب در مبارزه با این آفت مطرح شوند. نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر آنست‌که جدایه بومی K29 که برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود، باوجود آزادزی بودن و رفتار پارازیتی، دارای پتانسیل قابل توجهی جهت کاربرد علیه لاروهای کرم خراط می‌باشد. آزمایشات بیمارگری نشان دادند که این جدایه قادر به آلوده‌سازی و کشتن لاروهای خراط در آزمون تشتک پتری و نیز در داخل دالان‌های لاروی آفت درون شاخه‌های درخت گردو بودند. این نتایج موید یافته‌های سایر محققان در خصوص توانایی نماتودهای بیمارگر در ایجاد بیمارگری در لاروهای کرم خراط در درختان سیب، زیتون و گردو تحت شرایط محیطی مختلف بود (Abdel-Kawy *et al*. 1988, Sammour and Saleh 1996, Shamseldean *et al*. 2009, Ashtari *et al*. 2011, Salari *et al*. 2015). نتایج آزمون LC_{50} بیانگر آنست‌که تحت شرایط آزمایشگاهی، این جدایه بیمارگر بومی دارای زهرآگینی قابل توجهی بر روی لاروهای کرم خراط می‌باشد. نتایج یک مطالعه مشابه بر روی یک آفت چوبخوار به نام سوسک شاخک بلند *Rhagium bifasciatum* (Coleoptera: Cerambycidae)، در دامنه‌ای از غلظت‌های مشابه با پژوهش حاضر، نشان داد که نماتودهای بیمارگر مورد کاربرد دارای زهر-آگینی بالایی بر روی لاروهای *R. bifasciatum* بودند (Harvey *et al*. 2012). همچنین، اشتری و همکاران نشان دادند که در غلظت ۲۰۰۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت گونه‌های بیمارگر *Steinernema carpocapsae* و *Heterorhabditis bacteriophora* زهرآگینی بالایی در برابر لاروهای کرم خراط در آزمون تشتک پتری دارند (ایجاد ۱۰۰ درصد تلفات) (Ashtari *et al*. 2011)؛ این در حالیست‌که نتایج پژوهش حاضر بیانگر نتایج مشابه آن‌ها در غلظت‌های بسیار پایین‌تر بود (غلظت کمتر از ۲۰ لارو عفونت‌زا به ازای هر لارو آفت). یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که در آزمون شاخه جدایه K29، در غلظت ۱۶۰ لارو عفونت‌زا در سانتی‌متر مربع قادر به نفوذ به

درون شاخه‌های سالم و آلوده به آفت درخت گردو و ایجاد تلفات بالا در لاروهای خراط بدون هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بود. هرچند لازم به ذکر است که این بیمارگر در شاخه‌های آلوده به آفت نسبت به شاخه-های سالم پتانسیل بیمارگری بالاتری در برابر لاروهای خراط از خود نشان داد. یک دلیل وجود این تفاوت را می‌توان عدم تشابه اندازه و سن لاروهای میزبان درون شاخه‌های آلوده در مقایسه با شاخه‌های سالم ذکر نمود. یک دلیل دیگر برای وجود این تفاوت ممکن است به‌علت آن باشد که درون دالان‌های فعال شاخه-های آلوده میزان رطوبت نسبی به طور قابل توجهی بالاتر است و در نتیجه شرایط مناسب‌تری جهت دسترسی این بیمارگرها به لاروهای آفت فراهم می-کند.

یکی از شروط مهم و اساسی برای حفظ پایداری و ایجاد آلودگی ثانویه موفقیت‌آمیز توسط نماتودهای بیمارگر، توانایی نفوذ و تولیدمثل این بیمارگرها درون بدن میزبان است (Susurluk and Ehlers 2008, Salame *et al*. 2010). همچنین، یافته‌های حاصل از پژوهش‌های مختلف حاکی از آنست‌که زهرآگینی نماتودهای بیمارگر به فاکتورهای مختلفی از جمله توانایی نفوذ و تولیدمثل آن‌ها بستگی دارد (Gaugler 1988, Lewis *et al*. 1993, Glazer *et al*. 2001).

بنابراین، پتانسیل نفوذ و تولیدمثل نماتودهای بیمارگر بر روی حشرات میزبان نشان‌دهنده پویایی جمعیت آن‌ها بوده و به‌نظر می‌رسد داشتن اطلاعات در خصوص این فاکتورها می‌تواند در تعیین زمان و مقدار مصرف بعدی این بیمارگرها نقش داشته و در نتیجه در کاهش هزینه‌های کاربرد این عوامل موثر باشد (Salame *et al*. 2010). در پژوهش حاضر پتانسیل نفوذ و تولیدمثل یک جدایه بومی از نماتودهای بیمارگر در بدن لاروهای کرم خراط با لاروهای گالریا مورد مقایسه قرار گرفت، هرچند که تاکنون مطالعاتی در خصوص بررسی این فاکتورها در کرم خراط انجام نشده بود. نتایج نشان داد که جدایه K29، قادر به نفوذ به بدن هر دو میزبان بود و لاروهای عفونت‌زای آن به طور موفقیت‌آمیز از اجساد میزبان‌ها خارج شدند. اگر-چه لازم به ذکر است که در مدت زمان مشابه، موفقیت این بیمارگر در نفوذ و تولیدمثل، بر اساس غلظت مورد استفاده بیمارگر و گونه حشره میزبان با یکدیگر متفاوت بود. تفاوت در توانایی تولیدمثل گونه‌های مختلف نماتودهای بیمارگر در خیلی از حشرات میزبان دیده شده است (Ebssa and Koppenhöfer 2011).

نتایج مطالعات ابسا و کوپنهوفر بیانگر آن بود که توانایی تولیدمثل سه گونه نماتود بیمارگر در لاروهای کرم طوقه‌بر *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) بر اساس گونه نماتود و مراحل رشدی آفت متفاوت است (Ebssa and Koppenhöfer 2011).

همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت بیمارگر، میزان نفوذ و تولیدمثل این بیمارگر در بدن لاروهای کرم خراط و گالریا افزایش یافت. لازم به ذکر است که با افزایش غلظت بیمارگر به ازای نفوذ هر لاروعفونت‌زا به بدن میزبان، میزان تولیدمثل بیمارگرها در بدن میزبان کاهش یافت. توانایی نفوذ و تولیدمثل نسبتا بالای مشاهده شده در K29 در بدن لاروهای کرم خراط در این پژوهش موید آنست‌که کرم خراط میزبان مناسبی برای کاربرد نماتودهای بیمارگر خواهد بود. سلامه و همکاران اثبات کردند که تعداد لارو-عفونت‌زای بازیابی شده از بدن حشرات میزبان می‌تواند به‌عنوان شاخصی جهت توسعه بیشتر نماتودهای بیمارگر برای استفاده تجاری از آن‌ها را در نظر گرفته شود (Salame *et al*. 2010). همچنین مشخص شده است که توانایی تولیدمثل در میزبان هدف می‌تواند موجب سرکوب طغیان مجدد آفت شود (Smits 1996, Shields *et al*.1999).

اندازه بدن آفت می‌تواند یکی از فاکتورهای اثرگذار در تعیین موفقیت نماتودهای بیمارگر در کنترل آفات هدف آن‌ها باشد. نیلسن و فیلیپسن بیان کردند که نماتودها می‌توانند درون بدن میزبان‌های بزرگ دو یا تعداد بیشتری از نسل خود را سپری نمایند (Nielsen and Philipsen 2004). تاثیر اندازه بدن میزبان در متفاوت بودن میزان حساسیت گونه‌های مختلف راسته Lepidoptera و Coleoptera نسبت به گونه‌های مختلف نماتودهای بیمارگر مشاهده شده است. نتایج برخی از مطالعات حاکی از آن است که میزبان‌های

بزرگتر حساسیت بیشتری در برابر نماتودهای بیمارگر دارند (Hodson *et al*. 2011, Khatri-Chhetri *et al*. 2011). اما این امر همیشه ثابت نمی‌باشد، به‌طوری‌که محققین دیگر نشان دادند با افزایش سن و اندازه حشرات، میـــزان مرگ‌ومیر آن‌هـا در برابر نماتودهـــای بیمارگر کاهش می‌یابد (Fuxa *et al*. 1988, Glazer 1992). میزان تلفات نسبتا بالاتر در لاروهای بزرگتر در آزمون ارتباط بین اندازه بدن میزبان و حساسیت آن‌ها به نماتودهای بیمارگر برای جدایه K29 موید نتایج کورتل و همکاران بود که نشان دادند در غلظت‌های مشابه مورد استفاده در پژوهش حاضر، لاروهای متوسط و بزرگتر پروانه چوبخوار *S. pictipes* حساسیت بیشتر در برابر ۴ جدایه از *S. carpocapsae* از خود نشان دادند (Cottrell *et al*. 2011).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش اثبات کرد که جدایه بیمارگر بومی K29 قادر به بیمارگری و تکثیر در لاروهای کرم خراط بود. همچنین فاکتورهای موثر در کارایی و اثربخشی این بیمارگر مانند توانایی نفوذ و تولیدمثل آن علیه کرم خراط برای اولین‌بار در این پژوهش انجام گرفته است. بنابراین نظر به نتایج حاصل از این پژوهش و نیز سازگاری نماتودهای بیمارگر با زیستگاه مخفیانه لارو-های کرم خراط که شرایط مطلوبی را جهت کاربرد عوامل میکروبی فراهم نموده است، این نماتود بیمارگر بومی را می‌توان به عنوان یک ابزار کنترل بیولوژیک جهت کاربرد در قالب برنامه‌های مدیریت کنترل این آفت مهم اقتصادی در باغات گردو مورد توجه قرار داد.

لیکن هنوز یک سوال اساسی در خصوص چگونگی ردیابی لاروهای تیمار شده با این گروه از بیمارگرها در تنه‌های تنومند درختان گردو وجود دارد که لازم است مورد توجه قرار گیرد. بنابراین بررسی‌های آتی در این خصوص می‌تواند چشم‌انداز روشن‌تری از کارایی این گروه از عوامل کنترل‌زیستی در مدیریت کنترل کرم خراط در شرایط طبیعی ارایه نماید.

REFERENCES

Abbott W (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267.

Abdel-Kawy A, El-Bishry M, El-Kifl T (1992) Controlling the leopard moth borer, *Zeuzera pyrina* by three entomopathogenic nematode species in the field. Bulletin of the Faculty of Agriculture of Cairo University 121: 769–780.

Alford DV (2007) Pest of fruits crops, a color handbook. Academic Press, USA.

Amirghasemi M (2006) Identification of Walnut and its properties. Yas Publication, IRAN.

Ashtari M, Karimi J, Rezapanah MR, Hassani-kakhki M (2011) Biocontrol of leopard moth, *Zeuzera pyrina* L. (Lep.: Cossidae) using entomopathogenic nematodes in Iran. IOBC/wprs Bulletin 66: 333 – 335.

Avilla J, Bosh D (2001) Mass trapping and mating disruption for the control of leopard moth and apple clear wing moth. IOBC/wprs Bulletin 24: 167-172.

Burnell AM, Stock SP (2000) *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts—lethal pathogens of insects. Nematology 21: 31-42.

Campos-Herrera R, Gutiérrez C (2009) A laboratory study on the activity of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) Rioja strain against horticultural insect pests. Journal of Pest Science 82: 305-309.

Canhilal R, Carner GR (2006) Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in South Carolina. Journal of Agricultural and Urban Entomology 23: 159-166.

Cottrell T, Shapiro-Ilan D, Horton D, Mizell III R (2011) Laboratory virulence and orchard efficacy of entomopathogenic nematodes against the lesser peachtree borer (Lepidoptera: Sesiidae). Journal of Economic Entomology 104: 47-53.

Ebrahimi A, Zarei A, Fatahi R, Ghasemi Varnamkhasti M (2009) Study on some morphological and physical attributes of walnut used in mass models. Scientia Horticulturae 121: 490–494.

Ebssa L, Koppenhöfer AM (2011) Entomopathogenic nematodes for the management of *Agrotis ipsilon*: effect of instar, nematode species and nematode production method. Pest Management Science 68: 947-957.

Fuxa JR, Richter AR, Silva FA (1988) Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. Journal of Nematology 20: 91–95.

Gatwick J (1992) Crop pests in the UK. Collected edition of MAFF leaflets. Chapman & Hall, UK.

Gaugler R (1988) Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. Agriculture, Ecosystems and Environment 24: 351-360.

Glazer I (1992) Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes to insects. Journal of Invertebrate Pathology 59: 90–94.

Glazer I, Alekseev E, Samish M (2001) Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged female *Boophilus annulatus* ticks. Journal of Parasitology 87: 808-812.

Harvey CD, Alameen KM, Griffin CT (2012) The impact of entomopathogenic nematodes on a non-target, service-providing longhorn beetle is limited by targeted application when controlling forestry pest *Hylobius abietis*. Biological Control 62: 173–182.

Hegazi E, Khafagi WE, Konstantopoulou M, Raptopoulos D, Tawfik H, Abd El-aziz GM, Abd El-rahman SM, Atwa A, Aggamy E, Showeil S (2009) Efficient Mass-trapping method as an alternative tactic for suppressing populations of leopard moth (Lepidoptera: Cossidae). Ecology and Population Biology 102: 809-818.

Hodson AK, Friedman ML, Wu LN, Lewis EE (2011) European earwig (*Forficula auricularia*) as a novel host for the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Journal of Invertebrate Pathology 107: 60–64.

Kaya HK, Stock S (1997) Techniques in insect nematology. Manual of techniques in insect pathology 1: Academic Press 281-324.

Khatri-Chhetri HB, Timsina GP, Manandhar HK, Moens M (2011) Potential of Nepalese entomopathogenic nematodes as biocontrol agents against *Holotrichia longipennis* Blanch. (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Pest Science 84: 457–469.

Koppenhöfer AM (2007) Nematodes, *In:* Lacey LA, Kaya HK (ed.), Field manual of techniques in invertebrate pathology application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Springer, USA. pp. 249-266.

Lacey LA, Unruh TR (1998) Entomopathogenic nematodes for control of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): effect of nematode species, concentration, temperature, and humidity. Biological Control 13: 190-197.

Lacey LA, Georgis R (2012) Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. Journal of Nematology 44: 218-225.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. Journal of Invertebrate Pathology 132: 1–41.

Langström B, Heliövaara K, Moraal L, Turcani M, Viitasaari M, Ylioja T (2004) Non-coleopteran insects. *In*: Lieutier F (ed.) Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a Synthesis. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 501–538.

Lewis EE, Gaugler R, Harrison R (1993) Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. Canadian Journal of Zoology 71: 765 –769.

Mehrabi Boshrabadi H, Villano R, Fleming E (2008) Technical efficiency and environmental-technological gaps in wheat production in Kerman province of Iran: A meta-frontier analysis. Agricultural Economics 38: 67-76.

Miller LC, Barbercheck ME (2001) Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. Biological Control 22: 235-245.

Myers JH (1988) Can a general hypothesis explain population cycles of forest Lepidoptera? Advances in Ecology Research 18: 179-242.

Nashnosh IM, Baraka MM, Ismai W, Maayuf M (1993) Laboratory evaluation of natural and commercial preparations of entomopathogenic fungi and bacteria on the leopard moth, *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera; Cossidae). Arab Journal of Plant Protection 11: 73-76.

Nielsen O, Philipsen H (2004) Recycling of entomopathogenic nematodes in *Delia radicum* and in other insects from cruciferous crops. BioControl 49: 285–294.

Pasqualini E, Antropoli A, Faccioli B (1992) Attractant performance of a synthetic sex pheromone for *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera; Cossidae). Bollettino dell'Istituto di Entomologia "Guido Grandi", Universita degli Studi Bologna 46: 101-108.

Poinar JG, Grewal P (2012) History of entomopathogenic nematology. Journal of nematology 44: 153-161.

Salame L, Glazer I, Miqaia N, Chkhubianishvili T (2010) Characterization of populations of entomopathogenic nematodes isolated at diverse sites across Irland. Phytoparasitica 38: 39-52.

Salari E, Karimi J, Sadeghi-Nameghi H, Hosseini M (2015) Efficacy of two entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* for control of the leopard

moth borer *Zeuzera pyrina* (Lepidoptera: Cossidae) larvae under laboratory conditions. Biocontrol Science and Technology 25: 260-275.

Sammour EA, Saleh ME (1996) Combination of entomopathogenic nematodes and insecticides for controlling of apple borer, *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae). Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences 5: 369-380.

Siahnouri Z, Sadeghian M, Salehisormghi M, Qomi M (2013) Determination of Iranian Walnut and Pistachio Mineral Contents. Journal of Basic and Applied Scientific Research 3: 217-220.

Shamseldean M, Hasanain S, Rezk M (2009) Virulence of entomopathogenic nematodes against lepidopterous pests of horticultural crops in Egypt. *In:* the 4th Conference on recent technologies in Agriculture, 3-5 Nov., Cairo University, Giza, Egypt. pp. 74–84.

Shapiro-Ilan D, Cottrell T, Mizell III RF, Horton DL, Zaid A (2014) Field suppression of the peachtree borer, *Synanthedon exitiosa*, using *Steinernema carpocapsae*: Effects of irrigation, a sprayable gel and application method. Biological Control 82: 7-12.

Sharifi Sh, Karimi J, Hosseini M, Rezapanah MR (2014) Efficacy of two entomopathogenic nematode species as potential biocontrol agents against the rosaceae longhorned beetle, *Osphranteria coerulescens* under laboratory conditions. Nematology 16: 729-737.

Shields EJ, Testa A, Miller JM, Flanders KL (1999) Field efficacy and persistence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' and *H. bacteriophora* 'NC' on *Alfalfa snout* beetle larvae (Coleoptera: Curculionidae). Environmental Entomology 28:128–136.

Smits PH (1996) Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology 6: 379–387.

Susurluk A, Ehlers RU (2008) Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in different crops. BioControl 53: 627–641.