The University of Tehran Press

Biological Control of Pests and Plant Diseases

Online ISNN: 2322-2883

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

# Efficacy of native isolates and commercial products of two entomopathogenic nematode species on model host, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae

**Laleh Ebrahimi[1]✉, Aziz Sheikhigarjan[2], Mehran Ghazavi[3]**

1. Corresponding Author, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E-mail: ebrahimi.laleh@gmail.com
2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, Iran. E-mail: asheikhi48@gmail.com
3. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E-mail: mehr729@yahoo.com

**Article Info**

**Article type:**

Research Article

**Article history:**

Received: 14 November 2023

Revised: 31 December 2023

Accepted: 1 January 2024

Published online: 22 December 2022

**Keywords**:

*biological control*,

*compatibility*,

*$LC_{50}$*,

*pathogenicity*,

*Steinernema sp.*

**ABSTRACT**

Entomopathogenic nematodes are valuable biocontrol agents of pests. The use of indigenous isolates compared to imported isolates has advantages including compatibility with the environment and native pests and not causing adverse effects on indigenous species. In the present study, the effect of native isolates of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* on model host, *Tenebrio molitor* was compared with exotic commercial products by two bioassay methods (in Petri dishes and soil). Probit analysis showed a significant correlation between the nematode concentrations and the insect mortality ($R2 \geq 0.90$). The Iranian *S. carpocapsae* isolate showed the lowest $LC_{50}$ value (5 IJ Larva$^{-1}$) and the commercial *S. feltiae* isolate showed the highest $LC_{50}$ value (7 IJ Larva$^{-1}$). However, based on the $LC_{50}$ ratio values there was no significant difference between the four nematode isolates. The comparison of the mortality percentage of the pest in soil bioassay showed a similar effect of native isolates with commercial isolates ($P \leq 0.01$). The impact of native nematode isolates on par with commercial isolates which had been selected among numerous isolates, showed their high potential Therefor, basic research with the aim of developing the practical application of these valuable agents is suggested.

**Cite this article:** Ebrahimi, L., Sheikhigarjan, A., & Ghazavi, M. (2022). Efficacy of native isolates and commercial products of two entomopathogenic nematode species on model host, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 11 (2), 57-67. DOI: http//doi.org/10.22059/JBIOC.2024.367970.326

© The Author(s).

**Publisher:** The University of Tehran Press.

DOI: http//doi.org/10.22059/JBIOC.2024.367970.326

## Extended Abstract

Entomopathogenic nematodes (EPNs) form Steinernematidae and Heterorhabditidae are valuable biological control agents of the insect pests. EPNs are effective against a wide range of insect pests, including those that live in the soil, on plant surfaces, and in plant tissues. Those nematodes are a promising tool for biological control of insect pests in various settings, including sustainable food production and turf management. Exotic/imported and native/ indigenous isolates of entomopathogenic nematodes (EPNs) have been studied for their potential as biocontrol agents against insect pests in various regions. The use of native isolates compared to imported isolates has advantages including compatibility with the environment and native pests and not causing adverse effects on indigenous species. In the present study, the effect of native isolates of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* on model host, *Tenebrio molitor* was compared with exotic commercial products by two bioassay methods (in Petri dishes and soil). In Petri dish assay, based on

preliminary experiments a range of 25 - 200 IJs per ml (i.e., 25. 50, 100, 150 and 200 IJs) was used. Infective juveniles were added in 1 ml distilled water to the glass Petri dishes (9 cm diameter) lined with filter paper and 15 *T. molitor* larvae (average weight 100±2 mg) were placed in each petri dish. The control received 1 ml distilled water without nematodes. A piece of fresh potato was used as feeding source which was renewed daily. Soil bioassay experiments were conducted in Plastic cylindrical dishes (5 cm height and 3 cm diameter) which were filled with 20 g autoclaved sandy soil. Infective juveniles (400 IJs i.e., 80 IJs $cm^{-1}$) were added in 500µl of water to the surface of the soil. Finally, four larvae (average weight 100±2 mg) were placed on the soil and the dishes were covered with ventilated lids to avoid desiccation. Control dishes received 500µl distilled water without nematodes. A total of 20 insect larvae (i.e. five dishes) were used for each treatment and control in each replication. Both of the Petri dish and soil bioassays were conducted for all four nematode isolates and repeated three times. The dishes were kept at 25±2 °C, 75 ± 5% RH and 16:8 (L:D) photoperiod for four days, then the mortality of the insects was recorded. All dead insects were collected and dissected to ensure presence of nematodes inside the cadavers. $LC_{10}$, $LC_{50}$ and $LC_{90}$ values were obtained by Probit analysis using SAS software. Analysis of variance was done and the means were evaluated by Duncan's multiple-range test (SAS Institute 2012). For comparison of LC values lethal dose ratios were used (Russell et al. 2007). Probit analysis showed a significant correlation between the nematode concentrations and the insect mortality ($R2 \geq 0.90$). The Iranian *S. carpocapsae* isolate showed the lowest $LC_{50}$ value (5 IJ $Larva^{-1}$) and the commercial *S. feltiae* isolate showed the highest $LC_{50}$ value (7 IJ $Larva^{-1}$). However, based on the $LC_{50}$ ratio values there was no significant difference between the four nematode isolates. Analysis of variance of the results of the soil bioassay showed a significant effect of all four isolates compared to the control (df=4, 8; F value=107.29, $P \leq 0.01$). However, comparison of the mortality percentage showed a similar effect of native isolates with commercial isolates ($P \leq 0.01$). Although the comparison of the average between isolates indicated that there was no significant difference between the lethality of different isolates. Similarity of the effect of native and exotic isolates against pests has been confirmed in other studies. For example, Lacey et al. (2001) reported that native isolates of EPNs in the Azores archipelago in the Atlantic Ocean were as effective as exotic isolates against the Japanese beetle. Although the yellow mealworm is one of the important pests of stored products in Iran and other parts of the world, it is widely used as a model and laboratory host for microbial agents and EPNs (de Souza et al. 2015) that simulates the sensitivity of the wireworms to the pathogens. The efficiency of Iranian isolates as much as commercial isolates in this study shows the high potential of native isolates in controlling native pests of the country. The impact of native nematode isolates on par with commercial isolates which had been selected among numerous isolates, showed their high potential and the results of this study emphasize the necessity of basic research with the aim of developing the practical application of these valuable agents.

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، دوره ۱۱، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۸۰۹۰

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

# مقایسه کارایی جدایه‌های بومی و فراورده تجاری دو گونه نماتد بیماری‌زای حشرات روی میزبان آزمایشگاهی، *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

لاله ابراهیمی[۱] ✉ | عزیز شیخی گرجان[۲] | مهران غزوی[۳]

۱. نویسنده مسئول، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: ebrahimi.laleh@gmail.com

۲. بخش تحقیقات حشره شناسی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: asheikhi48@gmail.com

۳. بخش تحقیقات حشره شناسی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: mehr729@yahoo.com

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:**

مقالهٔ پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

**تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۱۰/۱۰

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۱۰/۱۱

**تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۱۰/۰۱

**کلیدواژه‌ها:**

*بیماری‌زایی، سازگاری، کنترل زیستی، $LC_{50}$، Steinernema sp.*

**چکیده**

نماتدهای بیماری‌زای حشرات عوامل ارزشمند کنترل زیستی آفات می‌باشند. استفاده از جدایه‌های بومی در مقایسه با جدایه‌های وارداتی دارای مزایایی مانند سازگاری با محیط زیست و آفت بومی و عدم ایجاد اثرات نامطلوب احتمالی بر گونه‌های بومی است. در مطالعه حاضر، تاثیر دو جدایه بومی *Steinernema carpocapsae* و *Steinernema feltiae* روی لاروهای کرم زرد آرد، *Tenebrio molitor* با جدایه‌های وارداتی همین گونه ها با دو روش زیست‌سنجی در پتری‌دیش و خاک مقایسه شد. نتایج تجزیه پروبیت نشان‌دهنده همبستگی معنی دار میان غلظت هر چهار جدایه نماتد و درصد مرگ‌ومیر حشره بود ( $R2 \geq 0.90$). جدایه ایرانی *S. carpocapsae* کمترین ( $LC_{50}$ پنج لارو آلوده‌کننده نماتد به ازای لارو آفت) و فراورده تجاری *S. feltiae* بیشترین ( $LC_{50}$ هفت لارو آلوده‌کننده نماتد به ازای لارو آفت) را نشان دادند. با این حال، مقایسه نسبت مقادیر $LC_{50}$ نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین چهار جدایه نماتد بود. مقایسه میانگین درصد مرگ‌ومیر لاروهای آفت در روش زیست‌سنجی در خاک نیز نشان‌دهنده تاثیر مشابه جدایه‌های بومی *S. carpocapsae* و *S. feltiae* با جدایه‌های تجاری بود ($P \leq 0.01$). تاثیر جدایه‌های بومی این نماتدها هم‌تراز جدایه‌های تجاری که برای تولید تجاری از بین چندین جدایه انتخاب شده‌اند، بیانگر پتانسیل بالای آنها است. بنابراین، انجام تحقیقات بنیادی با هدف توسعه کاربردی این عوامل ارزشمند در کشور پیشنهاد می‌گردد.

**استناد:** ابراهیمی، لاله؛ شیخی گرجان، عزیز؛ و غزوی، مهران (۱۴۰۱). مقایسه کارایی جدایه‌های بومی و فراورده تجاری دو گونه نماتد بیماری‌زای حشرات روی میزبان آزمایشگاهی، *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی*، ۱۱ (۲)، ۶۷-۵۷. DOI: http//doi.org/10.22059/JBIOC.2024.367970.326

**ناشر:** مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org/10.22059/JBIOC.2024.367970.326

## مقدمه

نماتدهای بیماری‌زای حشرات از دو خانواده Steinernematidae و Heterorhabditidae انگل اجباری حشرات بوده و با کمک باکتری همزیست خود، منجر به مرگ حشرات میزبان می‌گردند (Patil et al., 2022). گونه‌های Heterorhabditidae با باکتری جنس *Photorhabdus* و گونه‌های Steinernematidae با جنس *Xenorhabdus* رابطه-ی هم‌زیستی دارند (Toledo et al., 2023). یافتن میزبان‌ها و آلوده کردن آن‌ها در هر دو خانواده توسط لارو سن سوم آلوده‌کننده (IJ) که از نظر ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی برای بقاء در محیط خارج از بدن حشره میزبان سازگار شده‌است، صورت می‌پذیرد. نقش این مرحله‌ی زیستی نماتد که تنها مرحله‌ی مقاوم آن می‌باشد، یافتن میزبان مناسب است. مرحله مقاوم در چرخه زندگی نماتدهای بیماریزای حشرات در خارج از بدن میزبان بدون نیاز به تغذیه سپری می‌شود. این نماتدها به‌دلیل توانایی ایجاد مرگ سریع میزبان، نرخ بالای تولیدمثل در داخل لاشه میزبان، توانایی جستجوی فعال میزبان و یافتن حشرات میزبان در زیستگاه های مخفی، پایداری در محیط و عدم تاثیر منفی روی محیط زیست و موجودات غیر هدف، عوامل کنترل زیستی ارزشمندی برای کنترل آفات بندپا محسوب می‌شوند (Dolinski, 2015 & Shapiro-Ilan). این به نوبه خود به تجاری‌سازی نماتدهای بیماری‌زای حشرات کمک کرده است و در حال حاضر حداقل پنج گونه *Heterorhabditis* و هشت گونه *Steinernema* به تولید تجاری رسیده‌اند (Koppenhöfer et al., 2020). همچنین می‌توان نماتدهای بیمارگر حشرات را از طریق مهندسی ژنتیک دستکاری نموده و بیماری‌زایی و پایداری آنها را تغییر داد، برخی از زهرابه‌های تولیدی آن‌ها قابل انتقال و بیان در میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و یا به عنوان عامل کنترل زیستی اشباعی یا تقویتی قابل استفاده هستند (Koppenhöfer et al., 2020).

کرم زرد آرد، *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) یکی از آفات انباری بومی اروپا می‌باشد که در حال حاضر در سراسر جهان پراکنده است. این آفت غلات و سایر مواد غذایی انباری را آلوده می‌نماید و مصرف لارو و تخم این آفت همراه با مواد غذایی آلوده منجر به ناراحتی‌های گوارشی می گردد (Baek *et al.* 2015). علاوه براین، *T. molitor* یک گونه معمول و کارآمد برای تولید پروتئین حشرات است و پروتئین حاصل از آن برای مصرف حیوانی و انسانی استفاده می شود. همچنین، این گونه چرخه زندگی کوتاهی دارد و در تبدیل زیستی زباله‌های آلی بسیار کارآمد است (Houbraken *et al.* 2016). یکی دیگر از جنبه‌های مهم کاربرد لاروهای این حشره، استفاده از آن به عنوان میزبان آزمایشگاهی در بررسی‌های عوامل بیماری‌زای حشرات به ویژه قارچ‌ها و نماتدهای بیماری‌زای حشرات می‌باشد (de Souza *et al.* 2015; Cambon *et al.* 2020). این حشره ضریب تبدیل غذایی بالایی دارد (به مفهوم کارایی در تبدیل غذا به وزن بدن) و علاوه بر این، تولیدمثل و رشد سریع‌تری دارد و کسر خوراکی آن در مقایسه با مرغ (۵۵٪) و گاو (۴۰٪) تقریباً ۱۰۰٪ است (Errico *et al.*, 2022). در اتحادیه اروپا، کرم زرد آرد در فهرست حشرات با بالاترین پتانسیل به عنوان غذای انسان و خوراک ماکیان و طیور قرار دارد (Errico *et al.*, 2022).

مطالعاتی وجود دارد که شدت بیماری‌زایی و کارایی جدایه‌های غیر بومی نماتدهای بیماری‌زا را در مقابل جدایه‌های بومی علیه آفات مختلف حشرات مقایسه کرده اند (Berry *et al.* 1997 Iraki *et al.* 2000; Lawrence 2004; McGraw & Koppenhöfer 2008; Edmunds *et al.* 2021). برخلاف سایر عوامل بیماری‌زای حشرات، نماتدهای بیماری‌زای حشرات به دلیل عدم آسیب به انسان، موجودات غیرهدف و محیط زیست، از ثبت تجاری در بسیاری از کشورهای جهان معاف هستند (Koppenhöfer et al., 2020). با این حال، براساس نظر Ehlers & Hokkanen (1996) رهاسازی نماتدهای بیماری‌زای غیر بومی باید تحت نظارت انجام شود تا اثرات نامطلوب احتمالی بر گونه‌های نماتد بومی کاهش یابد و سایر خطرات زیست-محیطی مربوط به باکتری همزیست یا سایر مسائل محتمل که هنوز شناسایی نشده‌اند، کاهش یابد. عوامل کنترل زیستی غیر بومی ممکن است بر دشمنان طبیعی بومی تأثیر منفی بگذارند و نباید تصور کرد که نماتدهای بیماری‌زای حشرات از این امکان مستثنی هستند (Millar & Barbercheck 2001). از سوی دیگر، جمعیت‌های بومی دارای ویژگی‌های زیادی هستند که

آنها را برای استفاده در کنترل بیولوژیکی حفاظتی قابل استفاده می‌کند، از جمله افزایش سطح آلودگی با افزایش تراکم میزبان بومی (واکنش وابسته به تراکم جمعیت میزبان)، چرخش مجدد در میزبان و پایداری در محیط زیست (Koppenhöfer et al., 2020). بنابراین، آگاهی از کارایی جدایه‌های بومی نماتدهای بیماری‌زای حشرات و تکیه بر آنها در کنترل آفات به جای استفاده از جدایه‌های غیر بومی تجاری منجر به تقویت این عوامل در محیط های بومی شده و از آثار منفی ناخواسته استفاده از جدایه‌های خارجی ممانعت می‌نماید(Shapiro-Ilan, Hazir & Glazer, 2022).

تحقیقات حدود ۲۰ سال گذشته در ایران نشان دهنده غنی بودن خاک کشور از نظر وجود و تنوع این عوامل کنترل بیولوژیک و همچنین، کارایی بالای این عوامل در کنترل آفات در مقیاس آزمایشگاهی می باشد (Karimi, Safari& Kharazi-Pakdel, 2010; Ebrahimi, 2023). تحقیقات علمی نشان داده است که جدایه‌های بومی هر منطقه به علت سازگاری اکولوژیکی بالا، تاثیر بیشتری نسبت به جدایه‌های غیربومی و خارجی دارند. بنابراین، حتی در صورت امکان واردات این محصول از خارج، استفاده از عوامل داخلی ارزش بالایی دارد. با توجه به این که گونه‌های به کار رفته در تولیدات تجاری از بین بهترین و کارامدترین گونه‌های جهان انتخاب می‌شوند، مقایسه کارایی محصول تجاری با جدایه‌های داخلی دورنمایی از کارامدی جدایه‌های داخلی را بازتاب می‌نماید.

در این مطالعه ارزیابی و مقایسه بیماری‌زایی جدایه بومی و محصول وارداتی دو گونه نماتد بیماری‌زای حشرات، *S. carpocapsae* و *S. feltiae* علیه لاروهای *T. molitor* انجام شده است.

## روش‌شناسی پژوهش

### حشره میزبان

لاروهای *T. molitor* با اندازه بزرگ و میانگین وزن ۲±۱۰۰ میلی‌گرم از کلنی موجود در آزمایشگاه موسسه تحقیقات گیاهپزشکی واقع در کرج جداسازی و مورد استفاده قرار گرفت. این کلنی روی بستر سبوس گندم پرورش داده شد و از قطعات تازه سیب‌زمینی برای تامین آب مورد نیاز حشرات استفاده گردید.

### جدایه‌های نماتد

در این بررسی، دو جدایه بومی *Steinernema feltiae* (Ebrahimi et al. 2011b) و *Steinernema carpocapsae* (Ebrahimi et al. 2019) و دو جدایه وارداتی *S. feltiae* و *S. carpocapsae* (شرکت کوپرت هلند) استفاده شد. برای تکثیر جدایه‌های بومی، لاروهای شب‌پره موم‌خوار بزرگ، *Galleria mellonella* در داخل ظروف پتری مفروش با کاغذ صافی با لارو آلوده‌کننده نماتد تلقیح گردید. بعد از ۴۸ ساعت لاروهای مرده به تله وایت (White, 1927) منتقل شدند. بعد از هفت الی ۱۲ روز، لاروهای نماتد از تله وایت جمع‌آوری شده و در فلاسک‌های مخصوص کشت بافت تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند. از کشت تازه نماتد که بیش از ۱۵ روز از برداشت و ذخیره در یخچال سپری نشده بود در آزمایش‌ها استفاده شد. حدود ۲۰ دقیقه قبل از استفاده از نماتدها در آزمایش، نماتدها از یخچال خارج شده و در دمای محیط قرار گرفتند.

### زیست‌سنجی نماتدهای بیماریزای حشرات

*زیست‌سنجی به روش آلوده‌سازی در پتری دیش*: برای بررسی اثرات کشنده، پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی، پنج غلظت مختلف از نماتد، شامل ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ لارو آلوده‌کننده نماتد در یک میلی لیتر آب مقطر به ظرف پتری شیشه‌ای مفروش با کاغذ صافی اضافه شد. ۱۵ لارو *T. molitor* (میانگین وزن ۲ ± ۱۰۰ میلی‌گرم) در هر پتری قرار داده شد. در شاهد از آب مقطر استریل به‌جای سوسپانسیون نماتد استفاده شد. از قطعات مکعبی سیب‌زمینی تازه به عنوان منبع تغذیه‌ای حشره در هر ظرف استفاده گردید. کل آزمایش سه بار و در زمان‌های مختلف تکرار شد. ظروف آزمایش در دمای ۲±

۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ± ۷۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت چهار روز نگهداری شدند و سپس مرگ‌ومیر حشرات ثبت گردید. برای اطمینان از این که عامل مرگ حشرات نماتد می‌باشد، لاروهای مرده تشریح شده و از نظر وجود نماتد مورد بررسی قرار گرفتند.

*زیست‌سنجی به روش آلوده‌سازی خاک:* برای شبیه‌سازی شرایط طبیعی حضور نماتد در خاک، آزمایش دیگری با یک غلظت به مقدار دو برابر بالاترین غلظت مورد استفاده در زیست‌سنجی‌های قبلی یعنی ۴۰۰ لارو آلوده کننده نماتد (معادل ۸۰ لارو آلوده کننده نماتد بر سانتی‌متر مربع خاک) برای تیمار حشره در خاک استفاده شد. از بطری‌های پلاستیکی به قطر سه سانتی‌متر و ارتفاع پنج سانتی‌متر استفاده شد. بعد از افزودن ۲۰ گرم خاک شنی استریل به هر بطری، ۴۰۰ لارو آلوده کننده نماتد در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به سطح خاک افزوده شد و سپس چهار لارو *T. molitor* (میانگین وزن ۲ ± ۱۰۰ میلی‌گرم) در هر بطری اضافه گردید. شاهد ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل دریافت کرد. در مجموع برای هر تکرار ۲۰ لارو حشره (یعنی پنج بطری) مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش برای هر چهار جدایه نماتد انجام شد. از قطعات مکعبی سیب‌زمینی تازه به عنوان منبع تغذیه‌ای حشره در هر بطری استفاده گردید. کل آزمایش سه بار و در زمان‌های مختلف تکرار شد. ظروف آزمایش در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ± ۷۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت چهار روز نگهداری و سپس مرگ و میر حشرات ثبت شد. حشرات مرده تشریح و از نظر وجود نماتد در لاشه بررسی شدند.

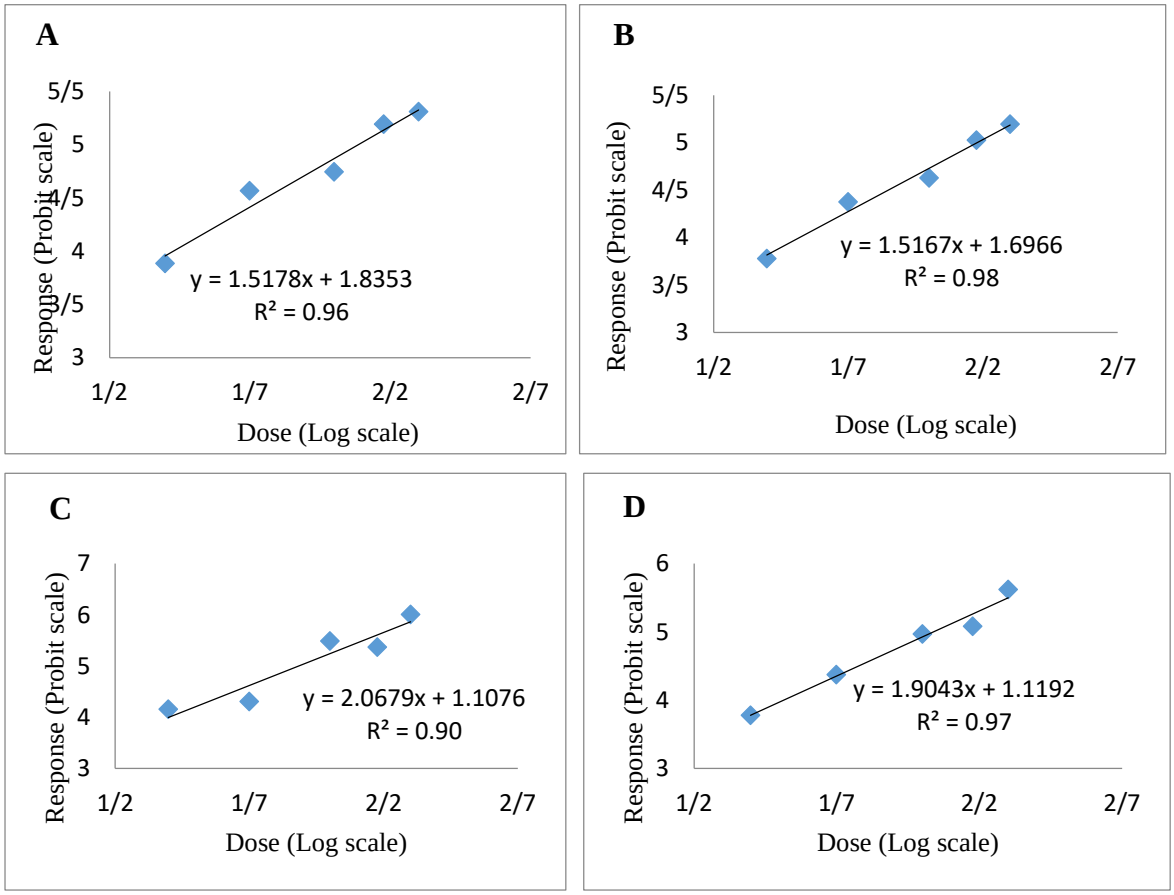
## تجزیه آماری

تجزیه پروبیت داده‌ها، تجزیه‌ی واریانس و مقایسه میانگین‌ها با کمک نرم افزار SAS انجام گرفت (SAS Institute 2012). برای مقایسه مقادیر $LC_{10}$، $LC_{50}$ و $LC_{90}$ جدایه‌های مختلف از روش نسبت‌های مقادیر کشنده (Russell et al. 2007) استفاده گردید.

## یافته‌های پژوهش

### زیست‌سنجی نماتدهای بیماریزای حشرات

در زیست‌سنجی به روش آلوده‌سازی در پتری دیش معادله خط رگرسیون دوز- اثر بیانگر رابطه‌ی معنی‌دار میان غلظت نماتد و درصد مرگ‌ومیر حشره بود (شکل ۱). تجزیه پروبیت داده‌های حاصل از این نتایج آزمایش نشان‌دهنده اثر مشابه هر چهار جدایه نماتد بود (جدول ۱). براساس نتایج حاصل از روش نسبت مقادیر کشنده (Russell et al. 2007 )، مقادیر $LC_{10}$ و $LC_{50}$ و $LC_{90}$ برای هر چهار جدایه مورد ارزیابی دارای همپوشانی بوده و نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین هر چهار جدایه بود.




**شکل ۱.** پروبیت درصد مرگ و میر *Tenebrio molitor* تیمار شده با غلظتهای مختلف جدایههای نماتدهای بیماریزای حشرات؛ A: *Steinernema carpocapsae*-Iranian isolate؛ B: *Steinernema carpocapsae*-commercial isolate؛ C: *Steinernema feltiae*-Iranian isolate؛ D: *Steinernema feltiae*-commercial isolate

Figure 2. Mortality (probit-transformed) of *Tenebrio molitor* treated with different concentrations of entomopathogenic nematode isolates; A: *Steinernema carpocapsae*-Iranian isolate, B: *Steinernema carpocapsae*-commercial isolate, C: *Steinernema feltiae*-Iranian isolate, D: *Steinernema feltiae*-commercial isolate

**جدول ۱.** مقادیر $LC_{10}$، $LC_{50}$ و $LC_{90}$ برای جدایههای مختلف نماتدهای بیماریزای حشرات علیه لاروهای ***Tenebrio molitor***

Table 1. $LC_{10}$, $LC_{50}$ and $LC_{90}$ values for different entomopathogenic nematode isolates against *Tenebrio molitor* larvae

| Nematode species | Isolate | Chi-Square (df, P value) | $LC^{a}_{10}$ (95% CL[b]) | $LC_{50}$ (95% CL) | $LC_{90}$ (95% CL) |
|---|---|---|---|---|---|
| *Steinernema carpocapsae* | Iranian | 0.46 (3, 0.92) | 1.27 (0.71-1.82) | 5 (4.05-6.06) | 19.66 (14.32-32.80) |
| *Steinernema feltiae* | commercial | 6.57 (3, 0.086) | 1.43 (0.79-2.03) | 5.84 (4.76-7.15) | 23.88 (16.78-43.09) |
| *Steinernema carpocapsae* | Iranian | 0.38 (3, 0.94) | 1.23 (0.66-1.79) | 5.14 (4.15-6.27) | 21.37 (15.22-37.38) |
| *Steinernema feltiae* | commercial | 2.32 (3, 0.51) | 1.04 (0.38-1.72) | 6.99 (5.41-9.52) | 46.91 (26.05-153.73) |

[a] مقادیر LC بر اساس لارو آلوده کننده نماتد به ازای لارو حشره می باشند

[b] حدود اطمینان

[a] LC values are based on IJ Insect larva$^{-1}$

[b] confidence limits

نتایج آزمایش زیست‌سنجی تک غلظت (۸۰ لارو آلوده کننده نماتد در هر سانتی‌متر خاک) چهار جدایه نماتد مورد بررسی در جدول 2 خلاصه شده است. تجزیه واریانس نتایج این آزمایش نشان دهنده تاثیر معنی‌دار هر چهار جدایه در مقایسه با شاهد بود ($df=4, 8$; F value= 107.29, $P \leq 0.01$). هر چند مقایسه میانگین بین جدایه‌ها حاکی از عدم وجود تفاوت معنی‌دار میان اثر کشندگی جدایه‌های مختلف با یکدیگر بود (جدول ۲).

## بحث

جدایه‌های تجاری نماتدهای بیماریزای حشرات، از مزیت قابل دسترس بودن برخوردار هستند، با این حال، نگرانی از اثرات منفی ناخواسته روی موجودات غیرهدف و مسائل زیست محیطی مربوط به وارد کردن یک موجود زنده غیربومی به یک زیستگاه جدید همواره مورد بحث می‌باشد (Sandhi *et al.* 2020). براساس مطالعه Shields *et al.* (2018) جدایه‌های بومی نماتدهای بیماریزای حشرات پایداری محیطی و کارایی کنترل زیستی بالاتری نسبت به جدایه‌های خارجی دارند.

**جدول ۲.** مقایسه میانگین درصد مرگ و میر لاروهای *Tenebrio molitor* تیمار شده با جدایه‌های مختلف نماتدهای بیماری‌زای حشرات در خاک

Table 2. Mean comparison of *Tenebrio molitor* larvae mortality treated with different entomopathogenic nematode isolates at soil

| Treatment | Isolate* | Mortality (%±SE) |
|---|---|---|
| *Steinernema carpocapsae* | Iranian | 90±5[a] |
| *Steinernema carpocapsae* | Commercial | 86.67±5.7[a] |
| *Steinernema feltiae* | Iranian | 86.67±5.7[a] |
| *Steinernema feltiae* | Commercial | 85±10[a] |
| Control | | 0[b] |

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. تعداد حشرات در هر تیمار ۶۰ لارو بود.

In each column means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test. N = 60 insects for each treatment

* Nematode concentration was 80 IJ $cm^{-2}$ for all isolates

براساس نتایج مطالعه حاضر، کمترین مقدار $LC_{50}$ به *S. carpocapsae* بومی بود، هرچند مقایسه نسبت مقادیر هر چهار جدایه نشان دهنده عدم معنی‌داری تفاوت $LC_{50}$ جدایه‌ها بود. در زیست‌سنجی به روش آلوده کردن خاک نیز بیماری‌زایی چهار جدایه علیه لاروهای سن آخر *T. molitor* تفاوت معنی‌داری نشان نداد. مشابه بودن تاثیر جدایه‌های بومی و غیربومی علیه آفات در مطالعه‌های دیگر نیز تایید شده است. برای مثال Lacey *et al.* (2001) گزارش نمودند که جدایه‌های بومی نماتدهای بیماری‌زای حشرات در مجمع الاجزایر آزور در اقیانوس اطلس به اندازه جدایه‌های غیر بومی علیه سوسک ژاپنی موثر بودند. براساس مطالعه Noujeim *et al.* (2015) نیز جدایه بومی *H. bacteriophora* در مقایسه با محصول تجاری این گونه، به دلیل سازگاری اکولوژیکی با محیط و میزبان، کارایی بالاتری در کنترل زنبور تخم‌ریز اره‌ای، *Cephalcia tannourinensis* داشت. کارامد بودن جدایه‌های ایرانی به اندازه جدایه‌های تجاری در این مطالعه، نشان دهنده پتانسیل بالای جدایه‌های بومی در کنترل آفات بومی کشور می‌باشد.

کرم زرد آرد با این که یکی از آفات مهم محصولات انباری در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد، در عین حال به عنوان میزبان آزمایشگاهی عوامل میکروبی و نماتدهای بیماریزای حشرات کاربرد وسیعی دارد (de Souza *et al.* 2015) و در برخی مطالعه‌ها به عنوان میزبانی که حساسیت کرم‌های مفتولی به عوامل بیماری‌زا را شبیه سازی می‌کند، به کار رفته است. برای

مثال، Shah *et al.* (2023) برای بررسی تاثیر قارچ بیماریزای حشرات *Metarhizium anisopliae* علیه کرم‌های مفتولی سیب‌زمینی شیرین در استرالیا، اثر این قارچ را در آزمایشگاه و گلخانه علیه *T. molitor* به عنوان حشره مدل ارزیابی نمود و نتایج نشان‌دهنده مرگ‌ومیر حشره در گلخانه ه میزان ۷۶٪ در خاک استریل و ۱۳٪ در خاک غیر استریل بود. با توجه به این که کرم‌های مفتولی و کاذب مفتولی ریشه در طبیعت اغلب به صورت ترکیبی از گونه‌های همزاد وجود دارند و به دست آوردن جمعیت یکنواخت از لاروهای یک گونه برای انجام زیست‌سنجی دشوار می‌باشد و از طرف دیگر *T. molitor* دارای شباهت‌هایی با کرم‌های مفتولی است و برخلاف آنها، امکان پرورش انبوه و به دست آوردن جمعیت یکنواخت جهت استفاده در زیست‌سنجی ها فراهم می‌باشد، بنابراین، به عنوان حشره مدل در ارزیابی تاثیر عوامل بیماریزای حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد Shah (*et al.* 2023). با این حال مطالعه‌هایی نیز بیماری‌زایی نماتدهای بیماری‌زای حشرات را علیه *T. molitor* به عنوان یک آفت انباری بررسی نموده اند. در ارزیابی Roy& Kim (2020) جدایه *S. feltiae* K1 در غلظت ۸۰ لارو آلوده کننده نماتد به ازای هر لارو حشره منجر به مرگ‌ومیر ۶۳٪ لاروهای *T. molitor* تا ۷۲ ساعت پس از تیمار به روش آلوده‌سازی کاغذ صافی در پتری دیش (مشابه روش مطالعه حاضر) گردید. هر چند، در این مطالعه لاروهای شب‌پره برگخوار چغندر نیز به همان روش تیمار شده و ۸۳٪ تلفات لاروی گزارش گردید. در این مطالعه، یکی از دلایل تفاوت میزان مرگ‌ومیر، قوی‌تر بودن سیستم ایمنی *T. molitor* در مقایسه با شب‌پره برگخوار چغندر علیه *S. feltiae* گزارش شده است (Roy& Kim 2020) و دفاع ایمنی قوی‌تر حشرات راسته سخت بالپوش‌ها در مقایسه با بالپولکداران علیه نماتدهای بیماریزای حشرات و گونه *S. feltiae* در مطالعه‌های دیگری نیز تایید شده است (Ebrahimi *et al.* 2011a). علاوه براین، لاروهای *T. molitor* به عنوان میزبان آزمایشگاهی نماتدهای بیماریزای حشرات و همچنین بستر تولید *in vivo* این نماتدها به کار می‌روند. مطالعه‌های مختلفی تولید نماتدهای بیماریزای حشرات را روی این لاروها و عوامل موثر در میزان بیماریزایی و کارایی تولید را بررسی نموده اند ( Christen *et al.* 2007; Prabowo *et al.* 2019). با توجه به این که این آفت یک حشره مدل است، احتمالا نتایج زیست‌سنجی‌ها قابل تعمیم به سایر حشرات آفت مشابه نیز باشد، هر چند، کارایی عوامل کنترل بیولوژیک بسته به گونه‌های آفت خاص و شرایط محیطی می‌تواند متفاوت باشد و برای تعیین موثرترین رویکرد برای کنترل آفات در یک موقعیت خاص، تحقیقات و آزمایش‌های بیشتری مورد نیاز است.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در حالت کلی، نتایج این مطالعه نشان‌دهنده کارایی بالای جدایه‌های بومی نماتدهای بیماری‌زای حشرات بود. جدایه‌های تجاری در دنیا از بین موثرترین و کارامدترین جدایه‌ها انتخاب می‌شوند و بنابراین تاثیر جدایه‌های بومی نماتدهای بیماریزای حشرات هم‌تراز جدایه‌های تجاری بیانگر پتانسیل بالای این عوامل کنترل بیولوژیک بومی در کنترل آفات کشور می‌باشد. جدایه‌های بومی مورد استفاده در این مطالعه در سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۹۴ (به ترتیب گونه *S. feltiae* و *S. carpocapsae*) از خاک جداسازی شده و به طور میانگین، بعد از بیش از پنج سال کشت آزمایشگاهی، بیماری‌زایی هم‌تراز با محصول تجاری وارداتی را نشان می‌دهند. چنین جدایه‌هایی از توان بالقوه بالایی برای استفاده در تولید و فرمولاسیون برخوردار می‌باشند. بنابراین حمایت از تحقیقات بنیادی جهت توسعه این عوامل ارزشمند در کشور ضروری می‌باشد.

## سپاس‌گزاری

این پژوهش بخشی از نتایج پروژه انجام یافته در موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور است. نویسندگان کمال تشکر را از حمایت‌های موسسه و همچنین آزمایشگاه موسسه تحقیقات گیاهپزشکی واقع در کرج دارند.

## REFERENCES


Baek, S., Perez, A. E., Turcotte, R. M., White, J. B., Adedipe, F., & Park, Y. L. (2015). Response of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults to potato: Implications for monitoring and sampling. *Journal of Stored Products Research*, *60*, 5-10.

Berry, R. E., Liu, J., & Reed, G. (1997). Comparison of endemic and exotic entomopathogenic nematode species for control of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, *90*(6), 1528-1533.

Cambon, M. C., Lafont, P., Frayssinet, M., Lanois, A., Ogier, J. C., Pages, S., ... & Gaudriault, S. (2020). Bacterial community profile after the lethal infection of *Steinernema–Xenorhabdus* pairs into soil-reared *Tenebrio molitor* larvae. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(2), fiaa009.

Christen, J. M., Campbell, J. F., Lewis, E. E., Shapiro-Ilan, D. I., & Ramaswamy, S. B. (2007). Responses of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* to its insect hosts, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. *Parasitology*, *134*(6), 889-898.

de Souza, P. C., Morey, A. T., Castanheira, G. M., Bocate, K. P., Panagio, L. A., Ito, F. A., ... & Almeida, R. S. (2015). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal of Microbiological Methods*, *118*, 182-186.

Ebrahimi, L. (2023). Efficacy of alginate-based formulation of *Steinernema carpocapsae* IRMoghan1 against *Mythimna loreyi* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, *33*(1), 35-47.

Ebrahimi, L., Niknam, G., & Dunphy, G. B. (2011a). Hemocyte responses of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata, and the greater wax moth, *Galleria mellonella*, to the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Insect Science*, *11*(1), 75.

Ebrahimi, L., Niknam, G., & Lewis, E. E. (2011b). Lethal and sublethal effects of Iranian isolates of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* on the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *BioControl*, *56*, 781-788.

Ebrahimi, L., TanhaMaafi, Z., & Sharifi, P. (2019). First report of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, from Moghan region of Iran and its efficacy against the turnip moth, *Agrotis segetum* Denis and Schiffermuller (Lepidoptera: Noctuidae), larvae. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *29*, 1-6.

Edmunds, C., Wilding, C. S., & Rae, R. (2021). Pathogenicity and environmental tolerance of commercial and UK native entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to the larvae of mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Ochlerotatus detritus*). *International Journal of Pest Management*, *67*(3), 232-240.

Ehlers, R. U., & Hokkanen, H. M. T. (1996). Insect biocontrol with non-endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.): conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, *6*(3), 295-302.

Errico, S., Spagnoletta, A., Verardi, A., Moliterni, S., Dimatteo, S., & Sangiorgio, P. (2022). *Tenebrio molitor* as a source of interesting natural compounds, their recovery processes, biological effects, and safety aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 148-197.

Houbraken, M., Spranghers, T., De Clercq, P., Cooreman-Algoed, M., Couchement, T., De Clercq, G., Verbeke, S., & Spanoghe, P. (2016). Pesticide contamination of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) for human consumption. *Food Chemistry*, *201*, 264-269.

Iraki, N., Salah, N., Sansour, M. A., Segal, D., Glazer, I., Johnigk, S. A., ... & Ehlers, R. U. (2000). Isolation and characterization of two entomopathogenic nematode strains, *Heterorhabditis indica* (Nematoda, Rhabditida), from the West Bank, Palestinian Territories. *Journal of Applied Entomology*, *124*(9-10), 375-380.

Karimi, J., Safari, T., & Kharazi-Pakdel, A. (2010). Status of entomopathogenic nematodes researches in Iran. *Journal of Biopesticide*, *3*, 474-478.

Koppenhöfer, A. M., Shapiro-Ilan, D. I., & Hiltpold, I. (2020). Entomopathogenic nematodes in

sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *4*, 125.

Lacey, L. A., Rosa, J. S., Simoes, N. O., Amaral, J. J., & Kaya, H. K. (2001). Comparative dispersal and larvicidal activity of exotic and Azorean isolates of entomopathogenic nematodes against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *European Journal of Entomology*, *98*(4), 439-444.

Lawrence, J. L. (2004). *Conservation of insect natural enemies in heterogeneous vegetable landscapes*. Ph.D. Dissertation. The Ohio State University.

McGraw, B. A., & Koppenhöfer, A. M. (2008). Evaluation of two endemic and five commercial entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) against annual bluegrass weevil (Coleoptera: Curculionidae) larvae and adults. *Biological control*, *46*(3), 467-475.

Millar, L. C., & Barbercheck, M. E. (2001). Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. *Biological Control*, *22*(3), 235-245.

Noujeim, E., Rehayem, M., & Nemer, N. (2015). Comparison of indigenous and exotic entomopathogenic nematode strains for control of the cedar web-spinning sawfly, *Cephalcia tannourinensis* in vitro. *Biocontrol Science and Technology*, *25*(7), 843-851.

Patil, J., Linga, V., Vijayakumar, R., Subaharan, K., Navik, O., Bakthavatsalam, N., Priyank Hanuman Mhatre, P.H., & Sekhar, J. (2022). Biocontrol potential of entomopathogenic nematodes for the sustainable management of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Pest Management Science*, *78*(7), 2883-2895.

Russell, R. M., Preisler, H. K., Savin, N. E., & Robertson, J. L. (2007). *Bioassays with arthropods*. CRC Press. California, USA, 224 p.

Roy, M. C., & Kim, Y. (2020). Tolerance of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, to an entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, at two infection foci, the intestine and the hemocoel. *Journal of Invertebrate Pathology*, *174*, 107428.

Sandhi, R. K., Shapiro-Ilan, D., & Reddy, G. V. (2020). Montana native entomopathogenic nematode species against *Limonius californicus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology*, *113*(5), 2104-2111.

Shah, S., Ash, G. J., & Wilson, B. A. (2023). Resporulation of *Metarhizium anisopliae* granules on soil and mortality of *Tenebrio molitor*: Implications for wireworm management in sweetpotato. *Annals of Applied Biology*, *182*(1), 65-76.

Shapiro-Ilan, D., & Dolinski, C. (2015). Entomopathogenic nematode application technology. *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection*, 231-254.

Shapiro-Ilan, D. I., Hazir, S., & Glazer, I. (2022). 12 Entomopathogenic Nematodes as Models for Inundative Biological Control. *Nematodes as Model Organisms*, CABI publishing, 293.

Shields, E. J., Testa, A. M., & O'Neil, W. J. (2018). Long-term persistence of native New York entomopathogenic nematode isolates across crop rotation. *Journal of Economic Entomology*, *111*(6), 2592-2598.

Toledo, J., Morán-Aceves, B. M., Ibarra, J. E., & Liedo, P. (2023). Can Entomopathogenic Nematodes and Their Symbiotic Bacteria Suppress Fruit Fly Pests? A Review. *Microorganisms*, *11*(7), 1682.

White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66, 302-303.