14(2) 387-394, Summer 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Toxicity study of different isolates of *Metarhizium anisopliae* extracted from the soil of different orchards of East Azarbaijan on flour moth (*Anagasta kuehniella*)

Mohaddase Moghassem [1], Manijeh Jamshidi Koljahi [1*], Reza Khakvar [2], Sevil Nematollahi [1]

[1] *Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran*
[2] *Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran*

Key Words
Flour moth
Microbial control
Isolation
Virulence
Metarhizium anisopliae

Abstract

Introduction: Entomopathogenic fungi are the biocontrol agents which naturally keep the insect population in balance and can be used as microbial insecticides.

Materials & Methods: In the present study, some isolates of entomopathogenic fungi were isolated from different soil samples and their virulence was investigated against flour moth, *Anagasta kuehniella* Zeller (Lep: Pyralidae). Five isolates *M. anisopliae* from Twenty isolates were isolated, using soil-baiting method from collected soil samples in different gardens East Azarbaijan were identified. The flour moth, *A. kuehniella* were infected using dipping method with isolates were performed at 5 concentrations, in 3 replications and with 12 of flour moth.

Results: The results showed that the instars of fourth larval instars of flour moth were susceptible to all isolates of *M. anisopliae*. The most virulent isolates were MTA with approximately 90% mortality on *A. kuehniella*. The most virulent isolates were MTA with 0.42×10^6 conidia/ml LC_{50} on *A. kuehniella* while the least virulent isolate were MTV 4.3×10^9 conidia/ml LC_{50} on *A. kuehniella*.

Conclusion: Comparison of means and grouping of isolates showed that there was a significant difference between *M. anisopliae* isolates and the effectiveness of different concentrations.

* Corresponding Author's email: ma.jamshidi001@gmail.com
Received: 1 April 2021; Reviewed: 8 May 2021; Revised: 11 July 2021; Accepted: 13 August 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.293216.2575

مقاله پژوهشی

بررسی زهراگینی جدایه‌های مختلف قارچ *Metarhizium anisopliae* استخراج شده از خاک باغات مختلف آذربایجان‌شرقی روی بید آرد (*Anagasta kuehniella*)

محدثه مقسم[۱]، منیژه جمشیدی کلجاهی[۱]*، رضا خاکور[۲]، سویل نعمت‌اللهی[۱]

[۱] گروه گیاه‌پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

[۲] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

کلمات کلیدی

بید آرد
کنترل میکروبی
جداسازی
زهراگینی
Metarhizium anisopliae

چکیده

مقدمه: قارچ‌های بیماری‌گر حشرات ازجمله عوامل کنترل بیولوژیک هستند که به‌صورت طبیعی جمعیت حشرات را در سطح تعادل نگاه می‌دارند و به‌عنوان حشره‌کش‌های میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات، از خاک باغات مناطق مختلف آذربایجان‌شرقی جداسازی و بیماری‌زایی آن‌ها علیه بید آرد *Anagasta kuehniella* (Lep.:Pyralidae) بررسی شد. از ۲۰ نمونه مختلف خاک جمع‌آوری شده، ۵ جدایه قارچ بیمارگر *Metarhizium anisopliae*، با استفاده از روش طعمه‌گذاری با لارو بید آرد *A. kuehniella* جداسازی و شناسایی شد و سپس زیست‌سنجی لاروهای سن چهارم، به‌روش غوطه‌ورسازی با جدایه‌ها در ۵ غلظت، در ۳ تکرار و با ۱۲ عدد لارو بید آرد انجام شد.

نتایج: نتایج زیست‌سنجی نشان داد که لاروهای سن چهارم بید آرد به همه جدایه‌ها حساس بودند. بیش‌ترین مرگ و میر به‌وسیله جدایه MTA با حدود ۹۰ درصد روی میزبان بید آرد *A. kuehniella* بوده است که در بالاترین گروه زهرآگینی قرار گرفتند. جدایه MTA با کم‌ترین LC_{50} با مقدار $۰/٤۲\times۱۰^{٦}$ کنیدی بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین زهرآگینی را نسبت به سایر جدایه‌ها داشته و بیش‌ترین LC_{50} ثبت شده مربوط به جدایه MTV، با مقدار $٤/۳\times۱۰^{۹}$ کنیدی بر میلی‌لیتر بود، که کم‌ترین زهراگینی را نسبت به سایر جدایه‌ها داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری: مقایسه میانگین و گروه‌بندی جدایه‌ها نشان داد که بین جدایه‌ها و اثربخشی غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ma.jamshidi001@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۲ فروردین ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۸ اردیبهشت ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲۰ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۲ مرداد ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.293216.2575

مقدمه

کنترل بیولوژیک به‌کمک قارچ‌های بیمارگر حشرات یک عامل بسیار مهم در کاهش تراکم جمعیت آفات محسوب می‌شود (۱). حشرات تقریباً ۶۷٪ گونه‌های جانوران را تشکیل داده و فعالیت آن‌ها به‌عنوان گیاه‌خوار و تغذیه از محصولات کشاورزی سبب خسارت مستقیم به محصول می‌شود، هم‌چنین خسارت غیرمستقیم آن‌ها از راه انتقال ویروس‌های گیاهی و یا کاهش عملکرد محصول وارد می‌شود (۲). در بین عوامل کنترل بیولوژیک، قارچ‌ها یکی از امیدبخش‌ترین انواع بیمارگرها بوده و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. قارچ‌های بیمارگر حشرات برای پستانداران کم‌خطر بوده و هم‌چنین به محیط زیست نیز آسیب نمی‌زنند. اسپور آن‌ها از کوتیکول وارد بدن حشرات شده و در همولنف آن‌ها تولید میسلیوم کرده و باعث مرگ آن‌ها می‌شود. بعد مرگ حشرات میسلیوم‌های داخل بدن به سمت خارج لاشه حرکت کرده و سطح بدن را از خارج می‌پوشانند (۳). قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌صورت طبیعی جمعیت حشرات را کنترل می‌کنند و به‌عنوان حشره‌کش‌های میکروبی به‌کار می‌روند. استفاده از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در جهت کنترل آفات کنترل میکروبی نامیده می‌شود (۴). این قارچ‌ها اغلب متعلق به رده Entomophthora (در Zygomycota) و یا رده Hyphomycet (در Deuteromycota) می‌باشند (۲) و به‌دلیل پرورش آسان، بی‌خطر بودن برای انسان و دام، انتشار آسان، مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیط و نداشتن خاصیت تجمع در مواد غذایی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات دارای اهمیت بالا بوده و همواره مورد توجه کارشناسان و دست‌اندرکاران امر بوده‌است (۱، ۵). در این راستا قارچ‌های زیادی شناسایی شده‌اند، که باعث بیماری و حتی مرگ حشرات می‌شوند (۶). بررسی‌ها نشان داده است که در بین ۱۰۰ هزار گونه قارچ شناخته شده حدود ۷۵۰ تا ۱۰۰۰ گونه توانایی ایجاد بیماری در حشرات را دارند (۷). قارچ (Ascomycota: Clavicipitaceae) *Metarhizium anisopliae* با بیش از ۲۰۰ گونه میزبان که بیش‌تر آن‌ها خاکزی هستند (۸، ۹ ، ۱۰). از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌گر است که به‌صورت فرمولاسیون‌های مختلف تجاری برای کنترل آفات گیاهان زراعی، باغی، گلخانه‌ای و جنگل به‌کار گرفته می‌شوند (۱۱، ۱۲، ۱۳). قارچ‌بیمارگر *M. anisopliae* اثرات کشندگی متعدد روی راسته‌های مختلف حشرات نشان می‌دهند محققان از این عامل به دفعات برای مبارزه با حشرات راسته‌های مختلف استفاده کرده‌اند (۱۴، ۱۵). کنترل شیمیایی آفات در مرحله از برداشت محصولات با ماندگاری بالا دارای محدویت‌های زیادی بوده و کارائی کم‌تری در مقایسه با مزرعه دارد این امر به‌ویژه در مورد تولید محصولات ارگانیک یا مورد استفاده برای رده‌های سنی حساس مانند نوزادان دارای اهمیت بیش‌تری است (۱۶، ۱۷). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که جدایه‌های *M. anisopliae* از عوامل بالقوه کنترل میکروبی در برابر برخی آفات انباری هستند (۱۸) و بیماری‌زایی قارچ *Metarhizium* علیه آفات انباری به‌طور گسترده تحقیق شده است (۱۹). از آن‌جایی‌که گندم از محصولات مهم در جهت خودکفایی کشور است و گسترش تولید آن نیاز به نگه‌داری درازمدت در انبارها دارد حضور آفات می‌تواند تهدیدی برای اقتصاد کشور باشد. مهم‌ترین آلودگی‌های کارخانجات آرد و سیلوهای گندم، آفات انباری می‌باشند که خسارت آن‌ها به‌صورت کمی و کیفی است (۲۰). کنترل بیولوژیک آفات در محصولات انباری با استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌عنوان راهکاری برای حل مسئله کاربرد وسیع آفت‌کش‌های شیمیایی محسوب می‌شود (۲۱، ۲۲). میان آفات انباری، شب‌پره بید آرد *A. kuehniella* یکی از آفات جدی و همگانی غلات انباری است و در سراسر دنیا انتشار دارد که خسارت زیادی روی محصولات انباری به‌خصوص آرد و دانه‌های غلات ایجاد می‌کند (۲۳، ۲۴). لاروهای این آفت در درجه اول غلات آرد شده را ترجیح می‌دهند به‌طوری‌که آرد و سبوس، غذای اصلی آن‌ها هستند و در اغلب انبارهای ایران هستند (۲۵). به‌طورکلی قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* برای کنترل میکروبی شپره‌های HB. *Plodia interpunctella* و *A. kuehniella* در شرایط انبارداری غلات با موفقیت استفاده شده‌است (۲۶). جداسازی جدایه‌های مختلف قارچی و انجام زیست‌سنجی روی میزبان *A. kuehniella* و بررسی کنترل بیولوژیک آن بر روی بید آرد و بررسی عوامل تاثیرگذار در زهرآگینی آن‌ها درک کامل‌تری از عملکرد این عوامل کنترلی فراهم خواهد کرد. در این تحقیق به‌منظور جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ بیمارگر با هدف تعیین میزان کشندگی قارچ‌های بیمارگر استخراج شده و اثر متقابل همه جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی جدایه‌های قارچ *M. anisopliae*: نمونه‌های مختلفی از خاک باغات، مناطق مختلف آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری شد. هر نمونه به‌مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم خاک به‌عمق ۲۰ سانتی‌متری از زیر سطح زمین جمع‌آوری و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شد و الک شدند. برای جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* از روش طعمه‌گذاری با لارو بید آرد *A. kuehniella* استفاده شد (۲۷). بدین‌صورت که مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم خاک داخل ظروف یک‌بار مصرف ریخته شد و سپس ۵ لارو بیدآرد اضافه شد. در ابتدا لاروهای سن ۴ داخل آب ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه قرار داده‌شد تا قدرت تار تنیدنشان از بین برود (۲۷). سپس داخل انکوباتور با دمای ۱±۲۵

سلسیوس و رطوبت ۵±۶۵ درصد و ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شد و به‌مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. لاروهای مرده برای اثبات مرگ در اثر قارچ، بعد از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲٪ روی کاغذ صافی مرطوب انتقال داده شده و سپس در انکوباتور با شرایط دمایی ۲±۲۵ سلسیوس و رطوبت ۵±۶۵ درصد و ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شد (۲۸) و به‌مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت.

کشت قارچ روی محیط کشت SDA: برای افزایش تولید اسپور از محیط کشت Sabroud Dextrose Agar+Yeast extract (SDAY) استفاده شد. این محیط کشت با دارا بودن شرایط اسیدی (pH=۵/۶) از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری می‌نماید (۲۹). بدین‌ترتیب بعد از کامل شدن رشد قارچ روی بدن لاروها، میسیلیوم‌های روی بدن لارو را بر روی محیط کشت Sabroud Dextrose Agar+Yeast extract (SDAY)، در شرایط سترون در زیر هود لامینار کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۵±۶۵ درصد و دوره روشنایی:تاریکی ۸:۱۶ ساعت به‌مدت دو هفته نگه‌داری شدند تا به‌طور کامل کنیدی‌زایی نمایند، لازم به‌ذکر است با بررسی جدایه‌های به‌دست آمده براساس ویژگی‌های ماکرو و میکرومورفولوژیکی برای شناسایی جدایه‌های قارچی از روش کشت اسلاید استفاده شد و اسلایدهای میکروسکوپی از نمونه‌ها تهیه و از کلید شناسایی هامبر برای شناسایی جدایه‌ها به‌صورت *Sensu lato* استفاده شد و تا سطح گونه شناسایی (۳۰) و تایید گونه قارچ توسط افراد متخصص صورت گرفت.

پرورش حشرات: برای تهیه لارو بید آرد مقدار ۸ گرم تخم پروانه بید آرد (هر گرم تخم بید آرد حدود ۵۰۰۰۰ تخم) یک‌روزه از انسکتاریوم گرگان تهیه و در یک جعبه کائوچویی همراه با قالب یخ به آزمایشگاه کنترل بیولوژیک مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی آذربایجان‌شرقی انتقال یافت. به‌منظور تدارک بستر پرورش، داخل دو تشتک با ابعاد ۱۰×۳۰×۴۰ سانتی‌متر به ارتفاع ۵ سانتی‌متر آرد گندم و سبوس به نسبت ۴ به ۱ ریخته و سپس بر روی سطح آرد و سبوس هر کدام از تشتک‌ها مقدار ۴ گرم تخم که بر روی یک ورق کاغذ قرار یافته بود، گذاشته شد. روی تشتک‌ها با پارچه مشکی پوشانیده شد. این بستر پرورش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. تخم‌ها پس از سه روز تفریخ شده و در روز بعد ورق کاغذ همراه با پوسته‌های باقی‌مانده تخم و تخم‌های تفریخ‌نشده احتمالی دور ریخته شد. در شرایط آزمایشگاهی ۱۶ روز بعد لارو سن ۴ ظاهر گردیده و با استفاده از الک مناسب لاروها از آرد جدا کرده و در آزمایش زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. لاروهای ریزتر برای نیازهای بعدی تحت همان شرایط نگه‌داری شدند.

آماده کردن زادمایه قارچ: در این تحقیق از روش‌های استاندارد آزمون عوامل بیمارگر قارچی استفاده شد (۳۱، ۳۲، ۳۳). برای این منظور بعد از گذشت ۱۴ تا ۲۰ روز از کشت قارچ، که اسپورزایی قارچ به‌طور کامل انجام شد. در شرایط استریل زیر هود، سطح کشت را با تیغ استریل، تراش داده و به آن ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر استریل به‌همراه ۵ سی‌سی محلول توئین ۸۰، ۰/۰۲ درصد اضافه گردید. سپس به‌منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها، به‌مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. در ادامه سوسپانسیون حاصله جهت جداسازی قطعات هیف و میسیلیوم از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده و جهت تعیین غلظت کنیدی‌ها، شمارش اسپور توسط لام هموسیتومتر آلمانی انجام شد. بعد از تعیین غلظت سوسپانسیون حاصله با رقیق کردن، غلظت‌های 10^4 تا 10^8 کنیدی بر میلی‌لیتر، از غلظت‌های مادری با افزودن حجم مشخصی از آب مقطر استریل تهیه شدند (۳۴).

مرحله غوطه‌وری: آلوده‌سازی لاروهای سن چهارم بید آرد با سوسپانسیون کنیدی با غلظت‌های 10^4 تا 10^8 به‌روش غوطه‌وری انجام شد. برای هر جدایه ۵ غلظت به همراه شاهد (آب مقطر دارای توئین ۸۰، ۰/۰۲ درصد) تهیه و استفاده شد. آزمایش با ۵ جدایه و هر جدایه در ۳ تکرار و در هر تکرار شامل ۱۲ لارو سن چهارم انجام گرفت. لاروها به‌مدت ۱۰ ثانیه به‌روش غوطه‌ورسازی در معرض غلظت‌ها قرار گرفته و سپس به‌منظور آبگیری و خشک شدن به کاغذ صافی استریل منتقل گردید. در ادامه لاروها همراه با غذا (یک قاشق چایخوری آرد و سبوس به نسبت ۴ به ۱) به ظروفی به ابعاد ۳×۴×۵ سانتی‌متر، منتقل گردید (به‌منظور جریان یافتن هوا داخل ظرف، منافذی بر روی درپوش ظرف ایجاد شد) و سپس به‌داخل انکوباتور انتقال داده شد. میزان مرگ و میر بعد از ۳ الی ۱۰ روز برای همه غلظت‌ها ثبت گردید (۳۵). کل آزمایش یک‌بار دیگر تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری برای هر جدایه به‌طور جداگانه، در غلظت‌های مختلف با استفاده از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. درصد میانگین و خطای استاندارد با نرم‌افزار Excel و تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS, 2003 (ver. 9.2) انجام شد. به‌منظور تعیین اثربخشی جدایه‌ها، داده‌های مرگ و میر بعد از تجزیه واریانس جهت بررسی تفاوت بین تیمارها ($P<۰/۰۵$)، از آزمون F-LSD برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شده است. هم‌چنین از نرم‌افزار Polo_Plus برای تعیین غلظت‌های کشنده LC_{50} جدایه‌های مختلف استفاده گردید. لازم به‌ذکر است برای تصحیح درصد مرگ و میر در تیمارها به‌خاطر تلفات شاهد از فرمول Schneider-Orelli's استفاده شد.

نتایج

جداسازی جدایه‌ها: از ۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده، ۱۷ جدایه قارچ بیمارگر مختلف، جداسازی و شناسایی شد، که ۵ جدایه قارچ بیمارگر *M. anisopliae* در این مقاله آورده شد. تمام جدایه‌ها برای لارو بید آرد بیماری‌زا بودند. قارچ *M. anisopliae* روی محیط کشت Sabroud Dextrose Agar (SDA)، دارای کلونی با سطح برجسته، عموماً سبز تیره و سطح زیرین آن کرم رنگ بود. کنیدیفورها منشعب و کنیدی‌ها کشیده و استوانه‌ای هستند که به‌صورت زنجیره‌ای به‌هم‌فشرده و لایه لایه تشکیل می‌شوند. به‌طوری که جوان‌ترین کنیدی در قاعده زنجیر قرار دارند به‌طول تقریبی ۱۵ میکرومتر، معمولاً به‌طور زنجیری در ردیف‌های منشوری شکل تجمع یافته بودند (شکل ۱).

شکل ۱: آ) عکس میکروسکوپی از قارچ *Metarhizium anisopliae* ب) کلونی جدایه‌ها روی محیط کشت SDA ج) رشد کنیدی‌های قارچی رو بدن لارو (سبز تیره)

زهرآگینی جدایه‌ها: به‌منظور تعیین بیش‌ترین میزان اثرگذاری جدایه روی تلفات لارو بیدآرد، براساس آزمون‌های اولیه مشخص شد که میزبان مورد مطالعه، لارو بیدآرد به‌همه جدایه‌های قارچ‌های مختلف حساس بوده است و تمام جدایه‌ها برای لارو بیدآرد بیماری‌زا بودند (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین درصد مرگ و میر (± خطای معیار) ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف، *Metarhizium anisopliae* روی لاروهای سن چهارم *Anagasta kuehniella* (AK) در غلظت‌های 10^4 تا 10^8 (*A. kuehniella*) مرگ و میر

محل جمع‌آوری	کد جدایه‌ها	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
آذربایجان‌شرقی، دره لیقوان، باغ گیلاس	MTB	۲/۸۷±۱۱/۱۱	۲/۷±۲۲/۲۲	۴/۸±۲۵	۲/۷±۳۰/۵۶	۰±۴۱/۶۷
آذربایجان‌شرقی، خلعت‌پوشان، باغ سیب	MTE	۲/۷±۱۳/۸۹	۲/۷±۲۲/۲۲	۴/۷±۳۳/۸	۲/۷±۴۴/۴۴	۲/۷±۶۳/۸۹
آذربایجان‌شرقی، دره لیقوان، باغ سیب	MTA	۲/۷±۲۲/۲۲	۲/۷±۳۸/۸۹	۴/۷±۵۸/۳۳	۲/۷±۷۲/۲۲	۲/۷±۸۶/۱۱
آذربایجان‌شرقی، باسمنج، باغ سیب	MTF	۲/۷±۱۳/۸۹	۰±۲۵	۲/۷±۳۸/۸۹	۲/۷±۵۲/۷۸	۵/۵۶±۶۳/۸۹
آذربایجان‌شرقی، فتح آباد، باغ میوه	MTV	۰±۸/۳۳	۲/۷±۱۳/۸۹	۲/۷±۲۲/۲۲	۲/۷±۲۷/۷۸	۰±۳۳/۳۳

بیش‌ترین زهرآگینی به‌وسیله جدایه MTA با حدود ۹۰ درصد مرگ و میر و کم‌ترین زهراگینی به‌وسیله جدایه MTV با حدود ۳۰ درصد مرگ و میر روی میزبان *A. Kuehniella* مشاهده شد. دسته‌بندی جدایه‌ها براساس درصد ایجاد مرگ نشان داد که ۶۰ درصد جدایه‌ها زهرآگینی متوسطی داشتند و در گروه B قرار گرفتند (جدول ۲). مقایسه میانگین و گروه‌بندی جدایه‌ها نشان داد که روند زهرآگینی در جدایه‌ها، MTA (p=۰/۰۰۱؛ df=۴/۱۷؛ f=۶۶/۳۶)، جدایه MTB (p=۰/۰۰۵؛ df=۴/۱۷؛ f=۱۳/۵۸)، جدایه MTE (p=۰/۰۰۱؛ df=۴/۱۷؛ f=۳۵/۵)، جدایه MTF (p=۰/۰۰۱؛ df=۴/۱۷؛ f=۳۷/۸) و جدایه MTV (p=۰/۰۰۱؛ df=۴/۱۷؛ f=۲۲/۸)، قارچ مورد مطالعه روی لارو بیدآرد متفاوت و معنی‌دار است.

قدرت بیماری‌زایی: نتایج تجزیه پروبیت نشان داد که جدایه MTA با کم‌ترین میزان LC_{50} به‌مقدار $۰/۴۲\times۱۰^۶$ کنیدی بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین زهرآگینی را داشتند و جدایه MTV با بیش‌ترین میزان LC_{50} به‌مقدار $۴/۳\times۱۰^۹$ کنیدی بر میلی‌لیتر، کم‌ترین میزان زهراگینی را داشته است (جدول ۳). به‌منظور تعیین سمیت، بیش‌ترین سمیت مربوط به جدایه MTA و کم‌ترین سمیت مربوط به جدایه MTV است که جدایه MTA، ۱۰۱۹۹/۹ بار سمی‌تر از جدایه MTV است (جدول ۳).

جدول ۲: دسته‌بندی جدایه‌های قارچ *Metarhizium anisopliae* براساس مرگ لاروهای بید آرد (*Anagasta kuehniella*)

A- زهرآگینی کم (۱۰ تا ۳۳ درصد تلفات)، B- زهرآگینی متوسط (۳۴ تا ۶۷ درصد تلفات) C- زهرآگینی زیاد (۶۸ تا ۱۰۰ درصد تلفات)

A. kuehniella			
رتبه	تعداد جدایه	درصد (از کل جدایه)	زهرآگینی جدایه‌ها
A	۱	۲۰	MTV^{e}
B	۳	۶۰	MTB^{d} MTE^{bc} MTF^{b}
C	۱	۲۰	MTA^{a}

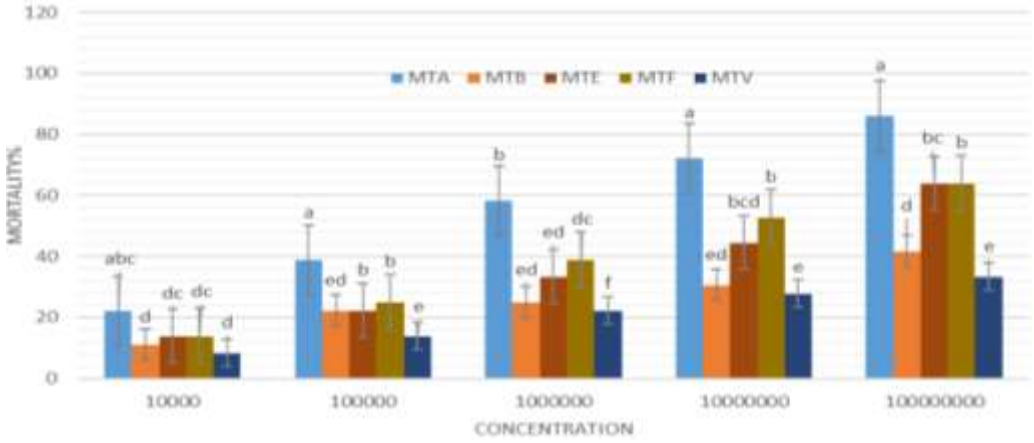
حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون (F-LSD, P<۰/۰۵) می‌باشد

جدول ۳: تعیین حدود LC_{50} و Ralative potencies جدایه‌های مختلف قارچ *Metarhizium anisopliae* زیست‌سنجی آن‌ها روی لاروهای سن چهارم بید آرد *Anagasta kuehniella* (*AK*)

کد جدایه‌ها	LC_{50} (کنیدی بر میلی‌لیتر) حدود اطمینان ۹۵٪	(±SE) شیب	درجه آزادی	مجذور مربعات	Ralative potencies
MTB	۱/۲×۱۰^{۹} (۰/۷×۱۰^{۹}-۲/۴×۱۰^{۹})	۰/۲۲±۰/۰۷۴	۱۳	۲/۲۵	۲۴۹۹/۷
MTE	۱/۵×۱۰^{۷} (۳/۹×۱۰^{۷}-۱۴/۳×۱۰^{۷})	۰/۳۵±۰/۰۷	۱۳	۲/۲۶	۳۵/۷۳
MTA	۰/۴۲×۱۰^{۶} (۰/۱×۱۰^{۶}-۱۳/۱×۱۰^{۶})	۰/۴۵±۰/۰۷	۱۳	۲/۰۴	۱
MTF	۷/۷×۱۰^{۶} (۳/۲×۱۰^{۶}-۱۳/۳×۱۰^{۶})	۰/۳۶±۰/۰۷	۱۳	۲/۰۱	۱۸/۳۳
MTV	۴/۳×۱۰^{۹} (۲/۸×۱۰^{۹}-۷/۲×۱۰^{۹})	۰/۲۳±۰/۰۷	۱۳	۱/۳۴	۱۰۱۹۹/۹

Toxicity ratio of isolates to MTA isolates, which had the highest toxicity

نتایج مقایسه میانگین و گروه‌بندی جدایه‌ها نشان داد که در همه جدایه‌ها با افزایش غلظت‌سوسپانسیون اسپور به‌طور معنی‌داری مرگ‌و میرلاروها افزایش یافت. به‌عبارتی‌روندزهرآگینی‌درجدایه‌های مختلف قارچ مورد مطالعه روی لارو بیدآرد متفاوت و معنی‌دار است (شکل ۲).



شکل ۲: میانگین درصد مرگ و میر (± خطای معیار) روی لارو سن چهارم بید آرد *Anagasta kuehniella* (*AK*) توسط جدایه‌های مختلف *Metarhizium anisopliae* با ۵ غلظت مختلف

حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار در هر ستون (F-LSD, P<۰/۰۵) می‌باشد

بحث

از ۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده، ۱۷ جدایه قارچ بیمارگر مختلف، جداسازی و شناسایی شد، که ۵ جدایه قارچ بیمارگر *Metarhizium anisopliae* در این مقاله آورده شد. لارو بید آرد به همه جدایه‌ها حساس بود. با توجه به نتایج این تحقیق جداسازی با روش تله خاکی به‌وسیله طعمه حشره‌ای روش مناسبی برای قارچ‌های بیمارگر محسوب می‌شود که با یافته‌های Asensio و همکاران که به عنوان یک روش جداسازی استاندارد برای قارچ‌های بیمارگر، می‌توان از طریق نمونه‌برداری از خاک و زیستگاه طبیعی جداسازی و سپس آن‌ها را خالص و مشاهده نمود مطابقت دارد (۳۶). هم‌چنین خاک به‌دلیل حفظ قارچ در مقابل اشعه ماوراءبنفش خورشید مرکز اصلی استقرار و رشد قارچ‌های بیمارگر حشرات است (۳۷). این امر خاک را به یک محیط مساعد برای بیوکنترل حشرات با بیمارگرهای قارچی تبدیل می‌کند. تعداد زیادی از قارچ‌های بیمارگر حشرات مانند *Paecilomyces* و *Metarhizium* بیش‌تر از نمونه‌های خاک به‌دست آمد (۳۸). از قارچ بیمارگر حشرات باید در مرحله مناسبی از رشد حشره استفاده گردد تا کنترل موثر آفت حاصل شود نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پیش‌نیاز آغاز آلودگی به بیماری قارچی در حشرات چسبیدن و جوانه زدن اسپور قارچ در سطح کوتیکول جلد حشرات حساس است (۳۹). لذا به‌جهت بدن بزرگ حشره و اواخر پوست‌اندازی طبیعی است که اسپور بیش‌تری به بدن لارو سن چهام نسبت به لاروهای سنین پایین بچسبد (۴۰). بر این اساس، با توجه به طول دوره سن چهارم لاروی، از لاروهای تازه تفریخ شده برای مطالعه استفاده گردید و تاثیر هر یک از جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* بر روی آن بررسی و غلظت‌های کشنده ۵۰٪ محاسبه شد و جدایه MTA با کم‌ترین LC_{50} با مقدار $۰/۴۲\times۱۰^{۶}$ کنیدی بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین زهرآگینی را نسبت به سایر جدایه‌ها داشته و بیش‌ترین LC_{50} ثبت شده مربوط به جدایه MTV، با مقدار $۴/۳\times۱۰^{۹}$ کنیدی بر میلی‌لیتر بود که کم‌ترین زهراگینی را نسبت به سایر جدایه‌ها داشته است. نتایج این تحقیق با یافته‌های Mirshekaret و همکاران، در مورد داده‌های حاصل از کاربرد دو جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* یک جدایه از قارچ *M. anisopliae* به‌همراه یک فرآورده بیولوژیک مبتنی بر اسپورهای قارچ *M. anisopliae* var. *acridum* با نام تجاری Green Muscle ویژه کنترل ملخ‌های شاخک کوتاه روی ملخ *Chrotogonus trachypterus* Blanchard کم‌ترین LC_{50} مربوط به جدایه قارچ *M. anisopliae* در حشرات و معادل ۱۸۷ اسپور بر حشره بود (۴۱). بیش‌ترین LC_{50} مربوط به فرآورده بیولوژیک روی حشرات، معادل ۲۰ اسپور بر حشره بوده، مطابقت دارد. همین‌طور با نتایج Draganova و Markova هم‌سو است، که گزارش کردند لارو سن آخر بید آرد به آلودگی توسط قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* و Zimmerman *Verticillium lecanii* حساس می‌باشد. تفاوت ژنتیکی و میزان فعالیت آنزیم‌ها برای رخنه در کوتیکول میزبان منجر به تاثیر متفاوت جدایه‌ای قارچ می‌شود (۱۸). از آن‌جایی‌که پروتئین‌ها ترکیب مهمی از کوتیکول را تشکیل می‌دهند، آنزیم پروتئاز نقش اصلی را در فرایند رخنه در جلد ایفا می‌کند. لذا تفاوت در میزان آلوده‌سازی جدایه‌های یک قارچ ممکن است به‌دلیل تفاوت در مقدار آنزیم‌های تجزیه کننده کوتیکول در آن جدایه باشد (۴۲). مطالعات سایر محققین اثبات کرد اکثر جدایه‌های *M. anisopliae* دارای قدرت بیمارگری بالایی هستند و این تاییدی است بر مطالعه اخیر که ارزیابی ۵ جدایه از قارچ *M. anisopliae* نشان داد که جدایه‌ها تا حد مطلوبی قادر به ایجاد بیماری بودند. در سال ۲۰۱۲ با جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات از مزارع ذرت اثر کنترل‌کنندگی آن‌ها روی *Tribolium confusum*، *Sitophilus zeamais* و *Rhyzopertha dominica* بررسی شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در میان قارچ‌های بیمارگر جداسازی شده آفلاتوکسین‌های ترشح شده از جنس‌های *Paecilomyces* و *Metarhizium* بیش‌ترین اثرکشندگی را روی آفات مورد بررسی داشتند (۵). نتایج بررسی‌هایی که در ایران، سوریه، ترکیه، ازبکستان، قزاقستان، قرقیزستان و روسیه به‌منظور یافتن قارچ‌های بیمارگر سن گندم انجام شده، نشان داد که جدایه *M. anisopliae* بیماری‌زایی بالایی را روی سن گندم داشت (۴۳). در تحقیقی دیگر Shan و Feng تأثیر ۱۶ جدایه از قارچ *M. anisopliae* روی شته سبز هلو *Myzus persicae* (Sulzer) نشان داد که ۱۰ جدایه موجب ۶۷ تا ۱۰۰ درصد مرگ در جمعیت آفت شدند (۴۴). در این مطالعه نیز مانند نتایج سایر محققین با افزایش غلظت سوسپانسیون کنیدی میزان مرگ و میر حشره افزایش یافت چنان‌که kupper، گزارش کرد غلظت زیاد و شرط تماس اسپور به بدن حشره از عوامل موفقیت در بیماریزایی قارچی به‌شمار می‌آید (۴۵) زیرا با افزایش تراکم کنیدی شانس تماس بدن حشره با کنیدی افزایش می‌یابد (۴۰). نتایج این بررسی با نتایج سایر محققین (۴۶، ۴۷)، هم‌سو است که در تمامی جدایه‌ها با افزایش غلظت به‌طور معنی‌داری مرگ و میر افزایش یافت. بررسی اثر بیمارگری ۳ قارچ *Paecilomyces fumosoroseus* (n32)، *Verticillium* (= *Lecanicillium*) *lecanii* (V16)، *M. anisopliae* (L6) (M440) علیه حشرات کامل شته مومی کلم بررسی شد، مشاهده گردید که مرگ شته‌ها با افزایش غلظت اسپور و زمان تماس افزایش پیدا می‌کند (۴۸). در تحقیق حاضر مشخص شد که جدایه‌های MTA با حدود ۹۰ درصد مرگ و میر در لارو بید آرد شدند. لازم به ذکر است که در این تحقیق از روش غوطه‌وری استفاده شده است. در این روش احتمال برخورد اسپورها با سطح بدن حشره نسبت به روش پاششی افزایش می‌یابد که با نتایج تحقیق Kivan، بیماری‌زایی چهار جدایه از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه از قارچ *M. anisopliae* را به‌روش غوطه‌وری روی حشرات کامل سن گندم مورد بررسی قرار داد (۴۹). در غلظت $۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر میزان مرگ و میر سن گندم توسط جدایه‌های قارچ *B. bassiana* ۴۰ تا ۸۲/۵ درصد، بعد از ۸ روز نشان داده شد، در حالی‌که قارچ *M. anisoplaie* با ۱۰۰ درصد مرگ و میر موثرترین

قارچ شناخته شد، مطابقت دارد. هم‌چنین میزان رطوبت نسبی در آزمایش‌های انجام شده ۵±۶۵ درصد بوده است که می‌تواند در تأثیر گذاری قارچ روی میزبان نقش داشته باشد. زیرا رطوبت تأثیر مهمی بر شروع و میزان فعالیت اینوکلوم قارچ دارد (۵۰). Hall، نیز نشان داد که همه‌قارچ‌ها برای رشد و اسپورزایی نیاز به رطوبت دارند (۵۱). Vu و همکاران، بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر حشرات شامل *Lecanicillium lecanii*، *Paecilomyces Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae* را روی شته سبز هلو *Myzus persicae* بررسی کردند (۵۲). نتایج این بررسی نشان داد که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ میان قارچ‌های بیمارگر تست شده، بیماری‌زایی را در شته *M. persicae* نشان دادند. Talaei Hassanlouiee، در بررسی میزان حساسیت تخم سن گندم به قارچ *B. bassiana* رطوبت نسبی محیط را به‌عنوان عوامل تاثیرگذار معرفی نمود (۵۳). براساس نتایج پژوهش حاضر، آلودگی قارچی لارو بیدآرد با تله خاکی ۱۴ روز طول کشید. در صورتی‌که در بررسی Talaei Hassanlouiee، جداسازی قارچ *B. bassiana* با تله خاکی به‌وسیله لارو گالریا (*Galleria mellonella*) ۱۰ روز به‌طول انجامید (۵۳). در نتیجه لارو بید آرد نسبت به لارو گالریا مقاوم‌تراست که یکی از دلایل این امر می‌تواند به جثه کوچک‌تر و سطح کم‌تر لارو بید آرد در مقایسه با لارو گالریا باشد که سبب آلودگی با اسپورهای قارچی در زمان کوتاه‌تر می‌گردد. براساس مشاهدات این تحقیق، پس از زیست‌سنجی، در ۲۴ ساعت اولیه مرگ و میری مشاهده نمی‌شود که نشان‌دهنده این واقعیت است که قارچ به‌مدت زمانی حدود ۴۸ تا ۷۲ ساعت برای تندش و نفوذ در کوتیکول حشره نیاز دارد. پس از آن به‌تدریج قسمتی از بدن لارو شروع به قهوه‌ای‌شدن می‌کند. علائم تلفات روی لاروها و قارچی بودن در مراحل اولیه با سفت و سخت شدن بدن لارو و قهوه‌ای رنگ شدن لارو قابل رویت بود. امروزه به‌دلیل مصرف بالای آفتکش‌های شیمیایی و به‌ویژه قارچکش‌ها در مزارع کشاورزی علیه پاتوژن‌های خاک یا بذرزاد، امکان کاهش تعداد گونه‌های میکروبی خاک از جمله قارچ‌های بیمارگر حشرات وجود دارد. تحقیقات در رابطه با ارزیابی قدرت بیمارگری و زهرآگینی جدایه‌های جدا شده روی آفات مختلف، اهمیت بالایی در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات دارا می‌باشد. بر این اساس، جدایه‌های مختلف قارچ می‌توانند زهرآگینی متفاوتی در غلظت‌های مختلف روی میزبان‌های مختلف داشته باشند. توجه به این مهم می‌تواند در تصمیم گیری‌های کنترلی بسیار با اهمیت باشد. به‌طور کلی بررسی زهرآگینی، از یک طرف در روشن شدن میزان بیمارگری مفید خواهد بود و از طرف دیگر می‌تواند به‌عنوان یک عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌های مؤثر محسوب شود. براساس نتایج پژوهش حاضر، می‌توان از جدایه‌های مورد مطالعه در کنترل تلفیقی آفت مذکور استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از راهنمایی‌های بی‌دریغ خانم دکتر فرزانه سادات سیدطالبی و گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و کمک‌های جناب آقای مهندس جعفرلو مشهدی مرکز تحقیقات آذربایجان‌شرقی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. **Islam, M.T., Omar, D., Latif, M.A. and Morshed, M.M., 2011.** The integrated use of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* with botanical insecticide, neem against *Bemisia tabaci* on eggplant. African Journal of Microbiology Research. 5(2): 3409-3413.
2. **Shah, P.A. and Pell, J.K., 2003.** Entomopathogenic fungi as biological control agents. Microbiol Biotechnol. 61: 413-423.
3. **Leger, R.J., Goettel, M.S., Roberts, D.W. and Staples, R.C., 1991.** Prepenetration events during infection of host cuticle by Metarhizium anisopliae. Journal of Invertebrate Pathology. 58: 168-179.
4. **Vincent, C., Goettel, M. and Lazarovits, G., 2007.** Biological Control: a global perspective. Case Histories from around the world. CABI Publishing, Wallingford, UK. 440 p.
5. **Barra, P., Rosso, L., Nesci, A. and Etcheverry, M., 2013.** Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* in stored maize. 86: 217-226.
6. **Samson, R.A., Evans, H.C. and Latge, J.P., 1988.** Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin. 187 p.
7. **Vega, F. and Kaya, H., 2012.** Insect Pathology, 2nd Edition. Academic Press, USA.
8. **Gillot, C., 2005.** Entomology. (3rd Ed). Saskatchewan University. Saskatoon. Canada, Springer Dordrecht, Netherlands. 834 p.
9. **Padmaja, V. and Kaur, G., 2001.** Use of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Moniliales: Deuteromycetes) for controlling termites. Current Science. 81: 645-647.
10. **Faria, M. and Wraight, P., 2007.** Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control. 43: 237-256.
11. **Maniana, N.K., Ekesil, S., Lohrl, B. and Mwangi, F., 2002.** Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, Metarhizium anisopliae, on cherysanthemum. Mycopathologia. 155: 229-235.
12. **Zurek, L. and Keddie, B.A., 2000.** *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, a promising microbial control agent of the satin moth (Lepidoptera: Lymantriidae). Biocontrol Science and Technology. 10: 641-644.
13. **Goettel, M.S., Eilenberg, J. and Glare, T.R., 2005.** Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, In Comprehensive Molecular Insect Science, L. Gilbert, I., Iatrou, K. and Gill, S., Elsevier, Oxford. 361-406.
14. **Castrillo, L.A., Ugine, T.A., Filotas, M.J., Sanderson, J.P., Vandenberg, J.D. and Wraight, S.P., 2008.** Molecular characterization and comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates (Ascomycota: Hypocreales) associated with the greenhouse shorefly, *Scatella tenuicosta* (Diptera: Ephydrididae). Biological Control. 45: 154-162.
15. **Carrillo, D., Dunlap, C.A., Avery, P.B., Navarrete, J., Duncan, R.E., Jackson, M.A., Behle, R.W., Cave, R.D., Crane, J., Rooney, A.P. and Pena, J.E., 2014.** Entomopathogenic fungi as biological control agents for the vector of the laurel wilt disease, the red bay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae). Biological Control. 81: 44-50.
16. **Lee, S., Lee, B., Choi, W., Park, B., Kim, J. and Campbell, B., 2001.** Fumigant toxicity of volatile natural

products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). Pest Management Science. 57: 548-553.

17. **Christos, G., Athanassiou Nickolas, G., Kavallieratos Christos, I. and Demetrius, C., 2017.** Influence of Temperature and Relative Humidity on the Insecticidal Efficacy of Metarhizium anisopliae against Larvae of *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae) on Wheat. Journal of Insect Science. 17(1): 1-7.
18. **Draganova, S. and Markova, E., 2006.** Bioassays with isolates of Entomopathogenic fungi against *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep.: Pyralidae). Bulgarian Journal of Agricultural Science. 12(5): 637-643.
19. **Ekesi, S., Egwurube, E.A., Akpa, A.D. and Onu, I., 2001.** Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the control of the groundnut bruchid, Caryedonserratus on groundnut. J. Stored Prod Res. 37: 313-321.
20. **Maroufpoor, M. and Ostovan, H., 2017.** Fauna of mites associated with stored wheat in Kurdistan Province and one new record for Iranian mite fauna. Journal of animal environment. 9(1): 149-158. (In Persian)
21. **Moore, D., Lord, J.C. and Smith, S., 2000.** Pathogens, chapter 9, In: (Alternatives to pesticide in stored-product IPM), B H Subramanyan and Hagstrum D W (eds.). Kulver Academic Publishers, Dortrecht, The Netherlands. 193-227.
22. **Tajick Ghanbalani, M.A., Asgharzadeh, A., Hadizadeh, A.R. and Mohammadi Sharif, M., 2009.** A quick method for Metarhizium anisopliae isolation from cultural soils. American Journal of Agricultural and Biological Science. 4(2): 152-155.
23. **Esmaili, M., Azemayeshfard, P. and Mir-Karimi, A., 2011.** Agricultural Entomology. Tehran University Press. 691 p.
24. **Ziaei, M.A., Farshbaf pourabad, R. and Jafarlu, M., 2013.** Effect of different wheat varieties on α-amylase enzyme activity in midgut of Mediterranean flour moth *Anagasta kuehniella* (Lep. Pyralidae) and its fecundity. Journal of animal environment. 4(4): 113-122. (In Persian)
25. **Bagheri Zenouz, A., 1996.** Stored product pests and their control methods. Sepehr Publication Center. Tehran. 305 p.
26. **Horak, M., 1994.** A review of cadrawalker in Australia: five new native species and the two introduced pest species (Lepidoptera: Pyralidae: Phycitinae). Australian Journal of Entomology. 33(3): 245-262.
27. **Meyling, N.V. and Eilenberg, J., 2006.** Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agro ecosystem. Agriculture Ecosystems and Environment. 113: 336-341.
28. **Meyling, N.V., 2007.** Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual. 1-18.
29. **Webb, S.E. and Shelton, A.M., 1990.** Effect of age structure on the outcome of viral epizootics in field populations ofimported cabbage worm (Lepidoptera: Pieridae). Environmental Entomology. 19: 111-116.
30. **Humber, R.A., 2005.** Entomopathogenic fungal identification. From http:/ www.ars.usda.gov/SP2User Files/Place/1907051 0/APSwkshoprev.pdf.
31. **Boucias, D.G. and Pendland, J.C., 1998.** Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers. Boston, Masachusetts. 491 p.
32. **Gillespie, A.T. and Clayton, N., 1989.** The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxin in pathogenesis. Pesticides Science. 27: 203-215.
33. **Yoshinori, T. and Kaya, H.K., 1992.** Insect Pathology. Academic Press. USA.
34. **Jenkins, N.E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A.J. and Lomer, C.J., 1998.** Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol, News and Information. 19(1): 29-39.
35. **Majidi Shilser, F., Kamali, K., Alinia, F. and Ershad, J., 2002.** Effect of temperature on germination, mycelial growth and pathogenicity of *Beauveria bassiana* fungus on rice tapeworm. Journal of Plant Pests and Diseases. 123-138. (In Persian)
36. **Asensio, L., Carbonell, T., Lopez Jimenez, J. and López Llorca, L., 2003.** Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province [Spain]. Spanish Journal of Agricultural Research. 1: 37-45.
37. **Klingen, I. and Haukeland, S., 2006.** The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes, In: Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T., (eds.) An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Springer, Dordrecht, Netherlands. 145-211.
38. **Demirci, F. and Denizhan, E., 2010.** *Paecilomyces lilacinus*, a potential biocontrol agent on apple rust mite *Aculus schlechtendali* and interactions with some fungicides in vitro. Phytoparasitica. 38: 125-132.
39. **Fargues, J., 1984.** Adhesion of the fungal spore to the insect cuticul in relation to pathology. In: Roberts, D.W. and Aist, J.R., (eds.). Infection processes in fungi. The Rockefeller Foundation. 90-110.
40. **Al-Deghairi, M.A., 2008.** Bioassay evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Against egg and nymphs of *Bemisia tabaci Genndius* (Hom.: Aleyrodidae). 11(12): 1550-1560.
41. **Mirshekar, A.M., Ghazavi, P., Azmayeshfard, A. and Kharazi-Pakdel, A., 2004.** Comparative and laboratory study of pathogencity of *Beauveria bassiana* and Metarhizium anisopliae on Chrotogonus trachypterus. 68(1): 141-156.
42. **Guopta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N. and Ignoffo, C.M., 1994.** Relationships among enzyme activities and Virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Glleria mellnella* and *Trichoplusia ni*. Journal of Invertebrate pathology. 64: 13-17.
43. **Parker, B.L., Skinner, M.L., Costa, S.D., Gouli, S., Reid, W.E. and Bouhssini, M., 2003.** Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hem: Scutelleridae): collection and characterization for development. Biological Control. 27: 260-272.
44. **Shan, L. and Feng, M., 2006.** Comparative susceptibility of *Myzus persicae* to 16 strains of *Metarhizium* spp. from different host insects and geographic regions. Wei sheng wu xue bao Acta microbiologica Sinica. 46(4): 602-607.
45. **Kuepper, G., 2003.** Colorado Potato Beetle: Organic Control Options. ATTRA (National Sustainable Agriculture Information Service). From http:/ attar. Ncat. Org/attar-pub/ coloradopotato. html.
46. **Kim, J.J., Goettel, M.S. and Gillespie, D.R., 2007.** Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. Biological Control. 40: 327-332.
47. **Hafez, M., Zaki, F.N., Moursy, A. and Sabbour, M., 2005.** Biological effects of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the potato tuber *Phythorimaea operculella*. Journal of Pest Science. 70: 158-159.
48. **Asi, M.R., Bashir, M.H., Afzal, M. and Imran. S., 2009.** Effect of conidial concentration of entomopathogenic fungi on mortality of cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. Pakistan Journal of Life and Social Sciences. 2: 175-180.
49. **Kivan, M., 2006.** Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var anisopliae (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutelleridae). Entomological Generalis. 30(1): 063-069.
50. **Batman, R.P., Carey, M., Moore, D. and Prior, C., 1993.** The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Annals of Applied Biology. 122: 145-152.
51. **Hall, R.A., 1981.** The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In Burges, H.D., (ed): Microbial control of pests and plant disease. Academic Press Inc, London. 483-498.
52. **Vu, V.H., Hong, S.I. and Kim, K., 2007.** Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. Bioscience and Bioengineerin. 104: 498-505.
53. **Talaei-Hassanloui, R., 1999.** Laboratory investigation into pathogenicity of *Beauveria bassiana* on sunn pest *Eurygaster integriceps*. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Iran. (In Persian).