مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هفتم، شماره دوم، پیاپی بیست و ششم، پاییز ۱۳۹۷ (۷۹-۷۱)

ارزیابی بیمارگری جدایه بومی قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai (Ascomycota: Hypocreales) روی حشرات بالغ ملخ *Chrotogonus trachypterus* Blanchard (Orth.: Pyrgomorphidae) در شرایط آزمایشگاهی

مصطفی حمزه‌ای[۱*]، علی میرشکار[۲]، محمد سالاری[۳]، عباس خانی[٤]، سیدکاظم صباغ[٥]

۱. مدرس دانشگاه پیام نور زابل، ایران.
۲. استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.
۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.
٤. دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.
٥. استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۸/۲٦)

چکیده

ملخ *Chrotogonus trachypterus* (Orth.: Pyrgomorphidae)، از آفات بومی و مهم سیستان بوده و خسارت قابل توجهی را به محصولات زراعی، به‌خصوص در مرحله گیاهچه‌ای آن‌ها، وارد می‌آورد. به منظور معرفی عامل کنترل بیولوژیک، کارایی جدایه‌ای بومی از قارچ *Trichoderma harzianum* در کنترل میکروبی حشرات کامل ملخ *C. trachypterus* در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل و در سه تکرار به‌روش موضعی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی، پنج غلظت $۱×۱۰^{٤}$، $۱×۱۰^{٥}$، $۱×۱۰^{٦}$، $۱×۱۰^{٧}$ و $۱×۱۰^{٨}$ کنیدی/ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی Tween®80 ۰/۰۵٪، تهیه و با استفاده از میکروپلیکاتور در زیر پیش‌گرده حشرات کامل قرار داده شد. حشرات کامل شاهد با آب مقطر حاوی Tween®80 ۰/۰۵٪، تیمار شدند. مرگ‌ومیر تجمعی ملخ‌ها، به‌صورت روزانه تا ۱۵ روز پس از شروع آزمایش، ثبت شد. داده‌ها با استفاده از روش لگاریتم- پروبیت برازش گردیدند. نتایج آزمون بیماریزایی نشان داد جدایه قارچی روی حشرات کامل بیماری‌زا بوده و درصد مرگ‌ومیر حشرات کامل با افزایش غلظت سوسپانسیون کنیدی قارچ افزایش یافت. نتایج نشان‌دهنده بالاترین میانگین درصد و مرگ‌ومیر (۷۵٪) در غلظت $۱×۱۰^{٨}$ کنیدی/ میلی‌لیتر و پائین‌ترین درصد و مرگ‌ومیر (۲۵٪) در غلظت $۱×۱۰^{٤}$ کنیدی/ میلی‌لیتر بود ($p<۰/۰۵$). مقدار به‌دست‌آمده LC_{50} معادل $۱/۰۱×۱۰^{٦}$ کنیدی در میلی‌لیتر بود. این اولین گزارش از بیمارگری قارچ *T. harzianum* روی ملخ *C. trachypterus* است.

واژه‌های کلیدی: *Trichoderma harzianum*، *Chrotogonus trachypterus*، بیمارگری، زیست‌سنجی، کنترل بیولوژیک.

* نویسنده مسئول: E-mail: mostafa.hm53@gmail.com

Pathogenicity assessment of an indigenous strain of *Trichoderma harzianum* Rifai (Ascomycota: Hypocreales) to the grasshopper, *Chrotogonus trachypterus* (Orth.: Pyrgomorphidae) (B.) in laboratory conditions

Mostafa Hamzehei[1*], Ali Mirshekar[2], Mohammad Salari[3], Abbas Khani[4], Seyed Kazem Sabbagh[5]

1. Lecturer, Payame-Noor University of Zabol, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran.
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran.
4. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran.

(Received: Mar. 3, 2017 - Accepted: Nov. 17, 2018)

Abstract

The Sugarcane grasshopper (*Chrotogonus trachypterus*) is one of the most important and indigenous and harmful pest of field crops in Sistan region of Iran and cause considerable damage especially during seedling stages. We conducted this study in order to introduction of a biocontrol agent to *C. trachypterus* in a completely randomized designs and factorial experiment with three replications using topical application under laboratory conditions. For inoculations, after the preliminary experiments, five fungal suspensions prepared at consecrations of $1×10^4$, $1×10^5$, $1×10^6$, $1×10^7$ and $1×10^8$ conidia mL^{-1} in distilled water containing 0.05% Tween-80®. Grasshoppers typically inoculated under the pronotal shield using a Hamilton microaplicator. Control treatment were treated with distilled water containing 0.05% Tween-80® as surfactant. The corrected cumulative percent mortality was recorded daily until 15 days after inoculations. Percentage of insect mortality was analyzed using (log-probit) methods. Results showed *T. harzianum* was pathogenic to adult insects and insect mortality increased with increasing concentrations. The highest and lowest mortality observed at 10^8 conidia mL^{-1} and 10^4 conidia mL^{-1} with a 75 and 25 percent respectively ($p<0.05$). The LC_{50} value was $1.01×10^6$ conidia mL^{-1}. This is the first report of the pathogenicity of *T. harzianum* to the grasshopper, *C. trachypterus*.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *Chrotogonus trachypterus*, Pathogenicity, Bioassay, Biological control.

مقدمه

ملخ زمینی[1]، *Chrotogonus trachypterus* Blanchard (Orthoptera: Acrididiae)، از مهمترین آفات گیاه‌خوار در نواحی نیمه خشک محسوب می‌شود. پوره و حشرات کامل ملخ، با ولع زیادی از برگ و ساقه محصولات زراعی، جالیزی و علوفه‌ای مانند گندم، سورگوم، ذرت، بادام زمینی، برنج، نیشکر، ارزن، یونجه، هندوانه، خزبره و ... تغذیه می‌کنند (Asad *et al*., 2001 a,b)؛ در صورت فراهم بودن شرایط مناسب آب و هوایی، به‌دلیل تفریخ بیشتر تخم‌ها و همزمانی ظاهر شدن پوره‌ها با کشت میزبان‌های گیاهی، با جمعیت زیاد و گاهی به صورت طغیانی در تمام طول سال فعال است (Meena *et al*., 2015)؛ این حشره پنج تا شش نسل در سال تولید می‌کند (Mirshekar *et al*., 2004) و سالیانه خسارت شدید و جبران‌ناپذیری به محصولات زراعی در استان سیستان و بلوچستان به خصوص در جالیزکاری‌های سیستان وارد می‌آورد (Omara, 1997). در حال حاضر کنترل *C. trachypterus*، تنها با کاربرد مکرر و گسترده حشره‌کش‌های شیمیایی انجام می‌شود (Meena & Singh, 2014)؛ مشکلات ناشی از کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی مانند توسعه مقاومت در آفات نسبت به سموم شیمیایی و همچنین آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه سموم شیمیایی، تلاش‌ها را برای یافتن ترکیبات جایگزین مؤثر، امن و کاربردی افزایش داده است (Butt *et al*., 2001). کاربرد میکروارگانیسم‌های بیمارگر (قارچ‌های بیمارگر حشرات، باکتری‌ها و ویرس‌ها) در قالب عوامل بیوکنترل و تولید انبوه آنها به عنوان فرآورده‌های دوستدار محیط زیست[2] برای کنترل آفات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای بسیار امیدبخش بوده است (Faria & Wraight, 2001). ده درصد فرآورده‌های تجاری مبتنی بر قارچ‌های بیمارگر حشرات، علیه راست بالان به کار رفته است که بیماری ویروسی یا باکتریایی در جمعیت آنها گزارش نشده است؛ در این بین، بیشتر مطالعات روی ملخ‌های مهاجر و غیر مهاجر شاخک کوتاه (Acrididae)، متمرکز شده است (Faria and wriaght, 2007).

تاکنون گزارشی از وقوع آلودگی طبیعی در جمعیت ملخ *C. trachypterus* توسط قارچ‌های بیمارگر حشرات داده نشده است؛ در مطالعه‌ای، بیمارگری هفت جدایه مختلف از قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* روی این حشره بررسی و تلفات قابل توجهی در حشرات مورد آزمایش گزارش شد (Mirshekar *et al*., 2004). گونه‌های مختلف تریکودرما (*Trichoderma* spp.) به دلیل نرخ تولیدمثلی بالا، توانایی زیاد در استفاده از منابع غذایی مختلف، قدرت تهاجم بالا علیه عوامل بیماری‌زا، بهره‌گیری از مکانیسم‌های آنتاگونیستی مختلف چون رقابت، میکوپارازیتیسم[3] و آنتی‌بیوز و با ترشح آنزیم‌های خارج سلولی نظیر پروتئازها، کیتینازها، بتاگلوکانازها و آنتی‌بیوتیک‌های فرّار و غیرفرّار، از جمله شناخته‌شده‌ترین عوامل بیوکنترل قارچ‌های بیمارگر گیاهی هستند (Ownley *et al*., 2009). توانایی *T. harzianum* به‌عنوان کاراترین گونه تریکودرما در کنترل بیمارگرهای گیاهی، ثابت شده است (Samuelian, 2016). علاوه بر این، بیمارگری این گونه روی حشرات نیز گزارش شده است و *T. harzianum* منجر به مرگ‌ومیر بالا در جمعیت *Oncopeltus fasciatus* (Santamarina *et al*. 2002)؛ کاهش قابل توجه در بقا و تولید مثل سوسک کاج کوهی (*Dendroctonus rufipennis*) (Cardoza *et al*., 2006) و کاهش معنی‌دار در بقاء شته *Myzus persicae* می‌شود (Ganassi *et al*. 2009). همچنین فعالیت لاروکشی *T. harzianum*

1. Surface grasshopper
2. Eco-friendly products
3. Mycoparasitism

IMI 206040 روی سوسک‌های پوستخوار جنس *Scolytus* گزارش شده است (Jassim *et al.*, 1990). Abdul-Wahid & Elbanna (2012)، تأثیر کنیدی و متابولیت‌های قارچ *T. harzianum* را روی سوسری *Periplaneta americana* بررسی کردند و نشان دادند تیمار متابولیت‌های قارچ، مرگ‌ومیر بیشتری ایجاد می‌کند؛ همچنین سه روز پس از تیمار کنیدی قارچ، ۱۰۰٪ کاهش در جمعیت سوسری مشاهده کردند.

تحقیق حاضر به منظور ارزیابی حساسیت حشرات کامل ملخ *C. trachypterus* به قارچ *T. harzianum* به منظور یافتن راهکار و جایگزینی مناسب برای کنترل آن به جای حشره‌کش‌های شیمیایی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش آزمایشگاهی حشرات

حشرات مورد نیاز جهت انجام مطالعات، از مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی سیستان (زابل) و به آزمایشگاه بخش حشره‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل منتقل شد. پرورش در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی با دمای ۲±۲۸ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی انجام گرفت. برای پرورش حشرات از قفس‌های چوبی به ۳۵×۳۵×۳۵ سانتی‌متر مکعب استفاده شد. در هر قفس، حفراتی برای قرار دادن استوانه‌های تخم‌ریزی و یک لامپ ۱۰۰ وات جهت تأمین گرمای تشعشعی تعبیه شد. برای تخم‌گذاری حشرات ماده، ماسه بادی پس از شستشو و ضدعفونی درون استوانه‌های پی‌وی‌سی به حجم ۱۱۰ سانتی‌متر مکعب ریخته و جهت تأمین رطوبت محل تخم‌گذاری به آن ۲۰ سی‌سی آب مقطر اضافه شد و در اختیار حشرات ماده آماده تخم‌گذاری قرار گرفت. استوانه‌ها هر روز بازدید و در صورت مشاهده کپسول تخم ملخ، استوانه جدید جایگزین شد. بعد از تشکیل کپسول تخم، دهانه استوانه‌های تخم‌ریزی با ورقه آلومینیومی پوشانده شد و درون انکوباتور با درجه حرارت ۳۵ °C داخل ظروف پلاستیکی با کف و درپوش توری قرار گرفت. برای پرورش پوره‌ها، از ظرف‌های استوانه‌ای از جنس پی وی سی شفاف با سرپوش و کف توری سیمی استفاده شد. جهت تغذیه ملخ‌ها در بهار و تابستان از یونجه و در پاییز و زمستان از برگ ریحان استفاده شد که روزانه پس از ضدعفونی کردن، در اختیار حشرات مورد مطالعه قرار می‌گرفت.

کشت قارچ و تهیه غلظت‌ها

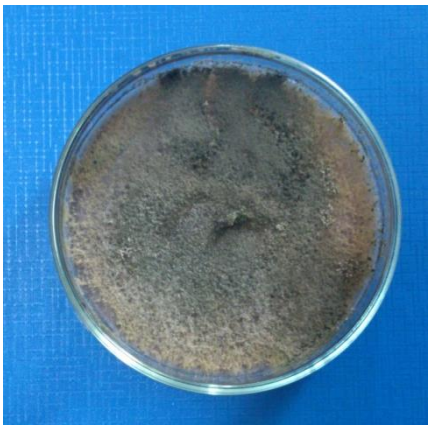
جدایه بومی قارچ *T. harzianum*، مورد استفاده در این آزمایش از ریزوسفر درختان جدا شده و از بخش حشره‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و تا انجام آزمایش‌ها، در یخچال نگهداری شد.

کشت قارچ و تهیه غلظت‌ها

به منظور تولید کنیدی به مقدار زیاد، پس از خالص سازی به روش تک کنیدی، جدایه قارچی مورد نظر در محیط کشت SDA+Y[1] کشت گردید. این محیط کشت با دارا بودن محیط اسیدی (pH=5.6) از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری کرده و باعث تولید کنیدی به اندازه کافی می‌شود (شکل ۱). برای تهیه مایه تلقیح از کشت‌هایی که در آنها هاگ‌زایی به‌طور کامل صورت گرفته بود (۲۱-۱۴ روز پس از کشت)، استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون، سطح تشتک‌های پتری با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول Tween®80 ۰/۰۵٪ شستشو و کنیدی‌ها به کمک اسکارپل از سطح محیط کشت جمع‌آوری شدند. پس از شمارش کنیدی‌ها با استفاده از لام گلبول‌شمار و تهیه غلظت پایه 10^8 کنیدی/میلی‌لیتر، سایر غلظت‌ها

1. Sabouraud Dextrose Agar + Yeast extract

از طریق رقیق‌سازی غلظت پایه تهیه شد. از آب مقطر حاوی توئین Tween®80 ۰/۰۵٪، به عنوان شاهد استفاده شد. جهت اندازه‌گیری میزان زنده مانی هاگ، آزمایش زنده‌مانی کنیدی‌ها[1] صورت گرفت. بدین ترتیب که روز قبل از انجام آزمایش، یک قطره از سوسپانسیون موردنظر به‌صورت استریل درون محلول Tween®80 ۰/۰۵٪ به حالت تعلیق درآمد و روی محیط SDA+Y کشت شد و روز بعد تنها از کشتی استفاده شد که بیش از ۸۵٪ آن جوانه زده بود. سوسپانسیون آماده شده تا هنگام انجام آزمایش‌ها (حداکثر ۵ روز)، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.



شکل ۱. پرگنه قارچ *T. harzianum* روی محیط کشت SDA+Y

آزمایش‌های زیست‌سنجی

پس از انجام آزمایش مقدماتی و تعیین دزهای حداقل و حداکثر سوسپانسیون‌های کنیدی قارچ با غلظت‌های لگاریتمی 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی/میلی‌لیتر استفاده گردید. در تمامی آزمایش‌ها، از حشرات کامل که نسبت به پوره‌ها رشد بال‌پوش‌ها در آن‌ها کامل شده است و حداکثر یک هفته از کامل شدن آن‌ها گذشته بود، استفاده شد. آزمایش‌ها در شش تیمار (دزهای مختلف به‌همراه تیمار شاهد) و سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. تیمار شاهد در این آزمایش تنها با محلول Tween®80 ۰/۰۵٪ تحت تأثیر قرار گرفت. زیست‌سنجی‌ها در این آزمایش‌ها، از تیمار شاهد آغاز شد و در ادامه تلقیح از پایین‌ترین غلظت شروع و به بالاترین غلظت ختم گردید. برای آلوده ساختن حشرات، آن‌ها را جداگانه از قفس خارج کرده و با استفاده از میکرواپلیکاتور، یک میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی هاگ زیر پیش گرده ملخ‌ها قرار داده شد و درون ظرف‌های استوانه‌ای از جنس پی‌وی‌سی شفاف قرار گرفتند. برای جلوگیری از تماس حشرات با فضولات خود و پایین آوردن احتمال آلودگی به بیماری‌های باکتریایی، دو انتهای ظرف‌های استوانه‌ای با توری سیمی مسدود شد. ظرف‌های استوانه‌ای درون انکوباتور و در دمای ۱±۳۰ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵±۶۰٪ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد. حشرات مرده از ظروف اصلی جمع‌آوری، و پس از ضد عفونی سطحی به اتاقک مرطوب (تشتک پتری حاوی کاغذ صافی اشباع شده با آب مقطر سترون) منتقل شدند. مرگ‌ومیر حشرات روزانه و با مشاهده کنیدیزایی در سطح لاشه حشره به‌مدت ۲۰ روز ثبت گردید (شکل ۲) و جدول مرگ‌ومیر تجمعی آن‌ها تهیه شد؛ پس از انقضای ۲۰ روز و پایان مدت زیست‌سنجی‌ها، تمامی ملخ‌های زنده باقیمانده با منجمد کردن و سپس اتوکلاو کردن از بین برده شدند. مرگ‌ومیر هر کدام از تکرارها با فرمول ابوت (Abbot, 1925)، اصلاح شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز پروبیت داده‌های حاصل از محاسبه مرگ‌ومیر تجمعی بر اساس طرح پایه کاملاً تصادفی با نرم‌افزار SPSS 16 انجام و LC_{50} و حدود بالا و پایین محاسبه شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی[2] در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

1. Viability

2. Tukey's test

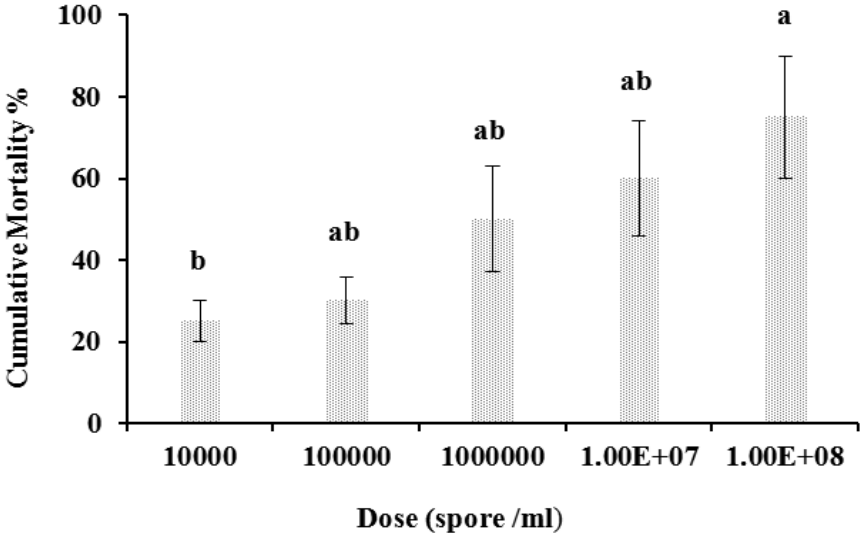
شکل ۲. تغییر رنگ ملخ بر اثر تیمار با قارچ *T. harzianum*

نتایج و بحث

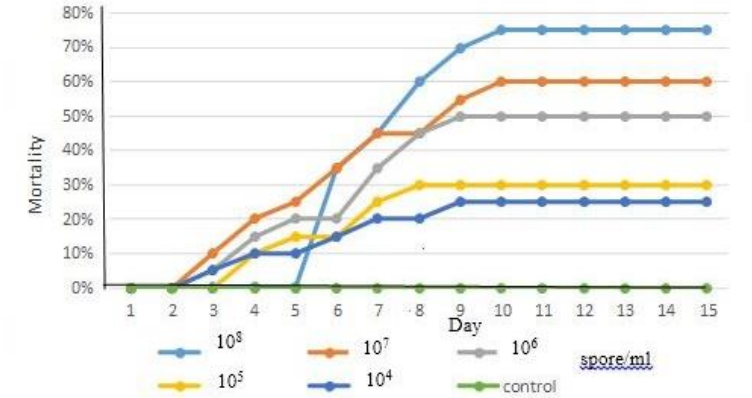
جدایه ایرانی *T. harzianum*، طبق اصول کخ روی حشرات کامل ملخ بیمارگر بودند و با افزایش غلظت، درصد مرگ‌ومیر افزایش یافت (شکل ۳). چهار روز بعد از آزمایش، همه ملخ‌ها زنده بودند و مرگ‌ومیر حشرات کامل از روز پنجم بعد از آلودگی مشاهده شد. مرگ‌ومیر در گروه شاهد بسیار کم بود و هیچ‌گونه علائم رشد قارچ روی حشرات کامل ملخ مشاهده نشد. همچنین نتایج تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در سطح پنج درصد، رابطه مستقیم تلفات را با افزایش غلظت نشان داد (جدول ۱ و شکل ۴). نتایج حاصل از مرگ‌ومیر تجمعی در طی ۱۵ روز نشان داد تلفات بیشتر از ۵۰ درصد در طول مدت آزمایش در غلظت‌های $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر مشاهده گردید. به‌طورکلی کمترین میزان آلودگی بعد از ۱۵ روز (شکل ۲) مربوط به غلظت $۱۰^{۴}$ کنیدی در میلی‌لیتر با میانگین ۲۵٪ بود و بیشترین مرگ‌ومیر مربوط به غلظت $۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر با میانگین ۷۵٪ بود. در غلظت $۱۰^{۵}$ کنیدی در میلی‌لیتر، ۴۰٪ مرگ‌ومیر، در غلظت $۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر، ۶۵٪ مرگ‌ومیر و در غلظت $۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی‌لیتر، میزان ۷۵٪ مرگ‌ومیر مشاهده گردید. بین میزان غلظت $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۶}$ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). این در صورتی است که بین غلظت‌های $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان مرگ‌ومیر وجود ندارد. تفاوت میزان مرگ‌ومیر در غلظت $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۸}$ فوق‌العاده معنی‌دار می‌باشد. پس از قرار دادن پروپیت ۵ معادل ۵۰٪ تلفات و تبدیل Log_x، مقدار به‌دست‌آمده LC_{50} معادل $۱/۰۱\times۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر بود که نشان‌دهنده میزان مرگ‌ومیر ۵۰٪ بین غلظت‌های $۱/۲۸\times۱۰^{۵}$ و $۶/۸\times۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۱).

در این تحقیق برای اولین بار کارایی قارچ *T. harzianum* روی این گونه ملخ مطالعه شد. تنها Mirshekar *et al.* (2004)، بیمارگری پنج جدایه بومی *Beauveria bassiana*، جدایه‌ای بومی از *Metarhizium anisopliae* و فرآورده تجاری Green Muscle® مبتنی بر کنیدی‌های *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* IMI 330189 را روی ملخ *C. trachypterus* بررسی کردند و توانایی بیمارگری آنها را روی ملخ گزارش کردند. همچنین یافته‌های آنها مبنی بر افزایش درصد مرگ ومیر با افزایش غلظت قارچ، مطابق با یافته‌های این تحقیق می‌باشد. یکی از مهمترین عوامل تعیین‌کننده بیمارگری قارچ‌های بیمارگر حشرات، کایموتریپسین‌سرین‌پروتئاز (Pr1) و آنزیم‌های مشابه آن در سایر قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌باشد (St. Leger *et al.*, 1987b). آنزیم پروتئاز (Prb1) از قارچ *T. harzianum* خالص‌سازی و شناسایی شده و فعالیت بیوکنترلی این قارچ با بیان ژن Prb1 ثابت شده است (Nautiyal and Dion, 2008) ؛ از آنجایی‌که آنزیم Pr1، خصوصیات مشابهی با آنزیم Prb1 گونه‌های *Trichoderma* دارد (Shakeri and Foster, 2007)، به نظر می‌رسد پروتئینازهای ترشح شده در این قارچ، نقش کلیدی در فعالیت ضد قارچی و بیمارگری در حشرات دارند؛ بنابراین با توجه به شباهت مکانیسم‌های دخیل در ایجاد بیماری *T. harzianum* بین حشرات و قارچ-های پاتوژن گیاهی، کاربرد آنها در خاک و یا به صورت اسپری روی شاخ و برگ، می‌تواند جمعیت سایر حشرات غیر هدف را نیز تحت تأثیر قرار دهد

(Shakeri & Foster, 2007). در این مطالعه فعالیت حشره‌کشی این جدایه از قارچ تریکودرما به شیوه قطره‌گذاری روی ملخ در شرایط آزمایشگاهی قابل توجه بود؛ کاربرد مزرعه‌ای این عوامل به شیوه پاششی روی اندام‌های هوایی گیاه تحت تأثیر فاکتورهای غیر زنده (اشعه ماورای بنفش، دما، رطوبت پایین) می‌باشد که منجر به کاهش قابل توجه زنده‌مانی کنیدی‌های قارچ می‌گردد (Vega *et al*., 2012) از طرفی روی فون حشرات خاکزی و غیر هدف نیز تأثیر منفی می‌گذارد؛ در سال‌های اخیر کاربرد اندوفیتی میکروارگانیزم‌های بیمارگر نظیر باکتری‌ها و قارچ‌ها، که بدون آسیب آشکار و اثرات منفی بر میزبان به‌صورت همزیست درون بافت‌های آن زندگی می‌کنند به‌عنوان عوامل بیوکنترل مورد توجه بوده است (Vega *et al*., 2008; Biswas *et al*., 2012; Barelli *et al*., 2016). به تازگی (Parsa *et al*., 2013, Renuka *et al*., 2016)، اشغال اندوفیتی بافت‌های گیاهان مختلف توسط چند جدایه شناخته شده از قارچ‌های بیمارگر حشرات را در شرایط طبیعی و یا با تلقیح مصنوعی بسیار قابل توجه نشان دادند و امکان کاربرد اندوفیتی این عوامل بیمارگر روی آفات مهم کشاورزی را بسیار امیدبخش گزارش کردند. *Trichoderma harzianum*، عامل بیوکنترل شناخته‌شده‌ای است که توانایی استقرار اندوفیتی آن در گیاه ثابت شده است (Howell, 2003). بیشتر مطالعات روی نحوه استقرار این قارچ در ریزوسفر گیاه متمرکز شده است که منجر به تحریک رشد و القای مقاومت در گیاه برابر بیمارگرهای قارچی می‌شود (Benitez *et al*., 2004; Harman, 2006). کاربرد روش‌های مختلف تلقیح و نوع ابزار مورد استفاده به همراه انتخاب بهترین مرحله‌ای از گیاه که استقرار اندوفیتی در آن با راندمان بالاتری صورت می‌گیرد، در موفقیت استقرار قارچ در گیاه نقش دارند (Tefera & Vidal, 2009; Greenfield *et al*., 20)؛ لذا در ادامه نیز آزمون‌های زیست‌سنجی به منظورجداسازی، شناسایی و معرفی کاراترین جدایه‌های تریکودرما که در حشرات آفت ایجاد مرگ‌ومیر می‌کند و سپس ارزیابی قابلیت استقرار اندوفیتی و طولانی مدت آنها در گیاهان زراعی، توصیه می‌شود.



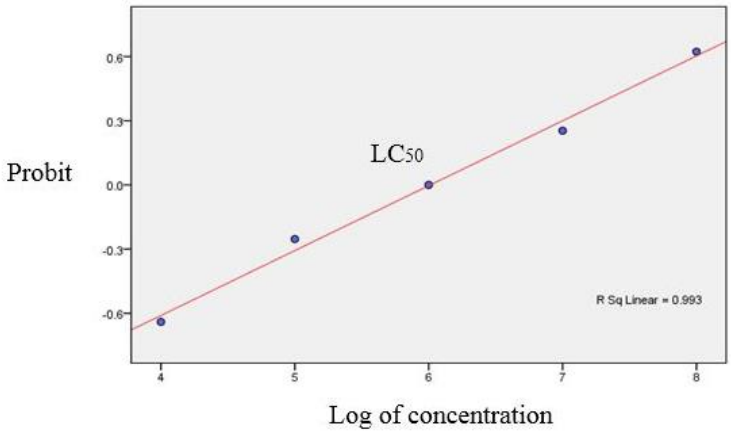
شکل ۳. مرگ‌ومیر تجمعی (٪) ± خطای استاندارد حشرات کامل *Chrotogonus trachypterus* به شیوه قطره‌گذاری با سوسپانسیون *T. harzianum* روی ملخ‌های *Chrotogonus trachypterus*، ۱۵ روز پس از آلودگی مستقیم



شکل ٤. تلفات ملخ‌های *Chrotogonus trachypterus* در مدت ۱۵ روز پس از آلودگی با قارچ *Trichoderma harzianum*

جدول ۱. برآورد LC_{50} همراه با محدوده اطمینان ۹۵ درصد و پارامترهای خط غلظت- پاسخ قارچ *Trichoderma harzianum* روی حشرات کامل *Chrotogonus trachypterus*

Number of insects	LC_{50} (Confidence limits 95%)	Chi-square χ^2 (df)	Probability	Slope	Line equation
133	$1.01\times10^6(1.28\times10^5\text{-}6.8\times10^6)$	0.11(3)	0.99	0.3±0.08	Y=0.3x-1.804



شکل ۵. نمودار خط رگرسیون غلظت- پاسخ اثر قارچ *Trichoderma harzianum* بر حشرات کامل ملخ *Chrotogonus trachypterus* پس از ۱۵ روز

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.؛ نگارندگان مراتب قدردانی خود را از گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطرتأمین جدایه قارچی و دانشگاه زابل که زمینه انجام این تحقیق را فراهم کرده است، ابراز می‌دارند.

REFERENCES

Abbott, W. S.; (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology; 18(2): 265-267.

Abdul-Wahid, O. A.; Elbanna, S. M.; (2012). Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches; *Periplaneta americana*. African Journal of Microbiology Research; 6(5): 1024-1032.

Asad, R.; Awan, M. S.; Abro, G. H.;

Shah, A. A.; (2001a). Studies on feeding, copulation, oviposition and defense behavior of *Chrotogonus trachypterus* (Blanch.) (Orthoptera: Pyrgomorphidae) under laboratory conditions. Pakistan Journal of Zoology; 33(2): 85-91.

Asad, R.; Awan, M. S.; Abro, G. H.; Shah, A. A.; (2001b). Studies on biology of *Chrotogonus trachypterus* (Blanch.) (Orthoptera: Pyrgomorphidae) under laboratory conditions. Pakistan Journal of Zoology; 33(1): 7-12.

Barelli, L.; Moonjely, S.; Behie, S. W.; Bidochka, M. J.; (2016). Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. Plant Molecular Biology; 90(6): 657-664.

Benitez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C.; Codón, A. C; (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology; 7: 249-260.

Biswas, C.; Dey, P.; Satpathy, S.; Satya, P.; (2012). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. Biocontrol; 57: 565-571.

Butt, T.; Jackson, M. C.; Magan, N.; (2001). Fungi as Biocontrol Agents*:* Progress, Problems and Potential. Australian Entomologist; 2: 23- 26.

Cardoza, Y. J.; Klepzig, K. D.; Raffa, K. F.; (2006). Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. Ecological Entomology; 31 (6): 636-645.

Faria, M.; Wraight, S. P.; (2001). Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop protection; 20(9): 767-778.

Faria, M. R.; Wraight, S. P.; (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control; 43(3): 237-256.

Ganassi, S.; Altomare, C.; Sabatini, M. A.; (2009). Interactions between fungi belonging to the genus *Trichoderma* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphidoidea) to open new perspectives of biological control. Italian Journal of Mycology; 38(3): 3-9.

Gathage, J. W.; Lagat, Z. O.; Fiaboe, K. K. M.; Akutse, K. S.; Ekesi, S.; Maniania, N. K.; (2016). Prospects of fungal endophytes in the control of *Liriomyza* leafminer flies in common bean *Phaseolus vulgaris* under field conditions. BioControl; 61(6): 741-753.

Greenfield, M.; Gómez-Jiménez, M. I.; Ortiz, V.; Vega, F. E.; Kramer, M.; Parsa, S.; (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Biological Control; 95: 40-48.

Harman, G. E.; (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology; 96: 190-194.

Howell, C. R.; (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease; 87(1): 4-10.

Jassim, H. K.; Foster, H. A.; Fairhurst, C. P.; (1990). Biological control of Dutch elm dis ease: larvicidal activity of *T. harzianum*, *T. polysporum* and *Scytalidium lignicola* in *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus* reared in artificial culture. Annual of Applied Biology; 117: 187-96

Meena, S.; Kachhwaha, N.; Meena, G. (2015). Screening of toxicity of plant extracts against Acridid Grasshopper, *Chrotogonus trachypterus* Blanchard. Advances in Applied Science Research; 6(4): 65-68.

Meena, S.; Singh, N. P.; (2014). Ultrastructural changes in female reproductive organ of *Chrotogonus trachypterus* Blanchard induced by Deltamethrin. IOSR Journal of Agriculture and veterinary Science; 7(5): 1-6.

Mirshekar, A.; Ghazavi, M.; Azmayeshfard,

P.; Kharazi-Pakdel, A.; (2004). Comparative and laboratory study of pathogencity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on *Chrotogonus trachypterus*. MSc. Dissertation. The University of Tehran.

Nautiyal, C. S.; Dion, P.; (2008). Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. Berlin: Springer.

Omara, H.; (1997). Study of biology and bioecology of the grasshoppers, *Chrotogonus* spp. in Sistan and Baluchistan province. Final report of the research project; pages 27-19.

Ownley, B. H.; Gwinn, K. D.; Vega, F. E.; (2009). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution., pp. 113-128. in: The ecology of fungal entomopathogens. Eds., Helen E. R., H. E.; Vega, F. E.; Chandler, D.; Goettel, M. S.; Pell, J.; Wajnberg, E.; Springer, Netherlands.

Parsa, S.; Ortiz, V.; Vega, F. E.; (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. JoVE (Journal of Visualized Experiments); (74): e50360-e50360.

Renuka, S., Ramanujam, B.; Poornesha, B.; (2016). Endophytic Ability of Different Isolates of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in Stem and Leaf Tissues of Maize (*Zea mays* L.). Indian Journal of Microbiology; 56(2); 126-133.

Samuelian, S.; (2016). Potential of *Trichoderma harzianum* for control of banana leaf fungal pathogens when applied with a food source and an organic adjuvant. 3 Biotech; 6(1): 1-11.

Santamarina, M.; Roselló, J.; Llacer, R.; Sanchis, V.; (2002). Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects in vitro. Revista iberoamericana de micología; 19 (2): 99-103.

Shakeri, J.; Foster, H. A.; (2007). Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. Enzyme and Microbial Technology; 40(4): 961-968.

St. Leger R. J.; Cooper, R. M.; Charnley, A. K.; (1987b). Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic Deuteromycetes. Archives of Biochemistry and Biophysics; 258(1): 123-131.

Tefera, T.; Vidal, S.; (2009). Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. BioControl; 54(5): 663-669.

Vega, F. E.; Meyling, N. V.; Luangsa-ard, J. J.; Blackwell, M.; (2012). Fungal entomopathogens., pp. 171-220. in: Insect pathology. (2nd ed.). Eds., Vega, F. E.; Kaya H. K.; Elsevier Science.

Vega, F. E.; Posada, F.; Aime, M. C.; Pava-Ripoll, M.; Infante, F.; Rehner, S. A.; (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control; 46: 72-82.